文章编号:1000-5404(2014)05-0417-05

论著

PTD-ABD融合蛋白对髓系白血病细胞的增殖和凋亡的影响

康志杰[1,2], 闫金松[2], 崔 嵩[3], 李国辉[1], 黄斯勇[1], 梁 亮[4], 尹郸丹[1], 梁英民[1] (710038 西安,第四军医大学第二附属医院血液科[1];116021 大连,大连医科大学附属二院血液科[2];116033 大连,大连医科大学附属中心医院SICU[3];710032 西安,第四军医大学基础医学部医学遗传学与发育生物学教研室[4])

[摘要] **目的** 研究癌基因BCR/ABL C末端肌动蛋白结合域(actin-binding domain,ABD)蛋白对白血病细胞增殖和凋亡的影响。**方法** 构建含有ABD基因的重组表达载体,应用蛋白转导结构域(protein transduction domain,PTD)将蛋白转入白血病细胞内,应用Western blot与免疫荧光法确定蛋白是否进入白血病细胞,然后分别应用流式细胞仪及MTT法检测融合蛋白对白血病细胞凋亡及增殖的影响。**结果** 成功构建PTD-ABD融合表达载体,获得高纯度PTD-ABD融合蛋白。同时构建PTD表达载体并获得高纯度表达蛋白。将PTD、PTD-ABD蛋白与白血病细胞K562、HL60共培养,Western blot与免疫荧光法确定PTD、PTD-ABD蛋白成功进入细胞内。与阴性对照比较,PTD-ABD蛋白能显著抑制HL60细胞的生长,并且对HL60细胞的凋亡具有明显的促进作用,差异具有统计学意义($P<0.05$),但对K562细胞的增殖及凋亡无影响($P>0.05$);PTD蛋白对K562、HL60细胞的增殖及凋亡无影响,与阴性对照比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** PTD转导的ABD蛋白抑制HL60细胞的增殖,并诱导细胞凋亡。

[关键词] BCR/ABL融合蛋白;肌动蛋白结合域;蛋白转导结构域; K562细胞;HL60细胞;细胞增殖;细胞凋亡
[中图法分类号] R394.3; R730.23; R733.7 [文献标志码] A

Effects of PTD-ABD fusion protein on proliferation and apoptosis in myeloid leukemia cells

Kang Zhijie[1,2], Yan Jinsong[2], Cui Song[3], Li Guohui[1], Huang Siyong[1], Liang Liang[4], Yin Dandan[1], Liang Yingmin[1] ([1]Department of Hematology, Second Hospital Affiliated to Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi Province, 710038; [2]Department of Hematology, Second Hospital Affiliated to Dalian Medical University, Dalian, Liaoning Province, 116021; [3]Department of SICU, Dalian Center Hospital Affiliated to Dalian Medical University, Dalian, Liaoning Province, 116031; [4]Department of Genetics and Developmental Biology, School of Basic Medical Sciences, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi Province, 710032, China)

[**Abstract**] Objective To study the function of BCR-ABL protein C-terminal actin-binding domain (ABD) on cell cycle and apoptosis in K562 cells and HL60 cells, and to provide the experimental basis for chronic myeloid leukemia (CML) treatment. Methods The recombinant expression vector harboring ABD was constructed, and then recombinant proteins were transferred into leukemia cells with protein transduction domain (PTD). The localization of recombinant proteins inside the leukemia cells was confirmed by Western blotting and immunofluorescence assay. Growth curves and apoptosis of leukemia cells transfected by PTD-ABD fusion protein were determined by MTT assay and flow cytometry respectively. Results The PTD-ABD and PTD recombinant expression vectors were constructed successfully, and proteins with high purity were obtained. The growth of HL60 cells was inhibited and the apoptosis was accelerated by PTD-ABD fusion protein. The difference between experimental and control groups had statistical significance ($P<0.05$). However, PTD-ABD fusion protein showed no difference on K562 cells ($P>0.05$). In addition, PTD protein had no effect on the apoptosis and growth of K562 and HL60 cells in comparison with negative control ($P>0.05$). Conclusion PTD-ABD fusion protein inhibits the growth and induces the apoptosis in HL60 cells.

[**Key words**] BCR/ABL fusion protein; actin binding domain; protein transduction domain; K562 cells; HL60 cells; cell proliferation; apoptosis

Supported by the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program,2006AA02A111). Corresponding author: Liang Yingmin, E-mail: liangym@fmmu.edu.cn

[基金项目] 国家高技术研究发展计划(863计划,2006AA02A111)
[通信作者] 梁英民,E-mail:liangym@fmmu.edu.cn
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20131129.1808.003.html(2013-11-29)

BCR/ABL基因编码的融合蛋白是慢性粒细胞白血病(chronic myeloid leukemia, CML)的发病原因[1]。肌动蛋白结合域(actin-binding domain,ABD)是BCR/ABL融合蛋白上C末端的一个结构域[2],ABD在BCR/ABL介导的白血病发生中起重要作用[3-5],白血病的发生依赖于碳末端的ABD存在,ABD变异可以降低体外肿瘤细胞的生存活力,在体内则延迟肿瘤的发病时间[3]。蛋白转导域(protein transduction domain,PTD)[4-5]可将与之融合的外源物质跨膜转导进入细胞,本实验室前期研究也证明了PTD可转导多种蛋白进入细胞内[6]。本研究构建PTD与ABD的融合表达蛋白,通过高表达外源可溶性ABD,干预内源ABD的作用,影响白血病细胞的增殖和凋亡,期望在白血病的治疗中探索新的途径。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

含有bcr/abl p210全长的PGD210质粒、K562细胞株、HeLa细胞株为第四军医大学第二附属医院血液科实验室保存,人早幼粒细胞白血病细胞系HL60细胞株由第四军医大学基础医学部医学遗传学与发育生物学教研室保存。pET32a质粒(Novagen公司),组氨酸亲和磁珠、咪唑(Pharmacia),T_4 DNA连接酶(大连TaKaRa公司),IPTG、TMB-H_2O_2(华美生物工程公司),Anti-his tag mAb(Cell signaling technology company),HRP标记的羊抗鼠二抗(丹麦Dako公司),FITC及PE标记的小鼠同种型IgG1(PharMingen公司),S-P免疫组化试剂盒(迈新公司),Hoechst(Sigma公司),MTT(Sino-American Biotec公司)。

1.2 主要仪器

Leica Q500 IW图像分析仪(德国Leica公司),U-2001 Spectrophotometor核酸蛋白检测仪(日本Hitachi公司),JY92-2D超声波细胞粉碎机(宁波新之生物科技股份有限公司),荧光显微镜(奥林巴斯公司),酶联反应检测仪、流式细胞仪(美国BD公司)。

1.3 方法

1.3.1 重组质粒的构建与表达 ABD功能区为BCR/ABL融合基因C末端167~163位氨基酸[7],根据GenBank人v-abl cDNA NM_007313设计引物,ABD反向引物设计终止码,以PGD210质粒为模板,扩增501 bp的ABD片段。合成PTD 2条单链,两端加入*Eco*RⅠ和*Xho*Ⅰ酶切位点[8],退火形成PTD双链(引物序列见表1),应用分子克隆方法[8]构建pET32a-ABD、pET32a-PTD、pET32a-PTD-ABD重组表达质粒,并鉴定。将序列鉴定正确的质粒进行蛋白表达及纯化,方法见文献[8]。

表1 基因引物序列

目的基因	引物序列	片段大小(bp)
ABD	上游:5′-ATGAAGCCACAGTCCGC-3′	501
	下游:5′-CTACCTCTGCACTATGTCACTGA-3′	
PTD	上游:5′-AATTCTATGGTAGGAAGAAACGTCGA-CAGCGTCGTCGGCCC-3′	37
	下游:5′-GGGCCGACGACGCTGTCGACGTTTCT-TCCTACCATAG-3′	

1.3.2 细胞培养 K562、HL60细胞应用含10%的小牛血清的RPMI1640培养液,HeLa细胞应用含10%的小牛血清的DMEM培养液,在5%的CO_2,37 ℃恒温培养箱中培养,常规换液传代,取对数生长期的细胞进行后续实验。

1.3.3 重组表达蛋白与细胞共培养 将不同浓度的重组表达蛋白pET32a-ABD、pET32a-PTD、pET32a-PTD-ABD加入K562、HL60培养上清中,与细胞共培养,加等体积培养液的细胞为阴性对照,收取细胞进行下一步实验。

1.3.4 Western blot检测蛋白表达 3种重组表达蛋白与K562、HL60细胞共培养后,收取并裂解细胞获得各组细胞总蛋白,BCA法进行细胞定量。蛋白经8%的SDS-PAGE电泳,转至PVDF膜,封闭后,依次加入鼠抗人Anti-his单克隆抗体,HRP标记的羊抗鼠IgG孵育,洗膜后应用化学发光试剂盒检测,压片显影,凝胶成像仪上照相。

1.3.5 免疫荧光技术检测重组表达蛋白细胞内定位情况 将HeLa细胞爬片,依次加入终浓度相同的pET32a-PTD、pET32a-PTD-ABD、pET32a-ABD,孵育40 min后收集细胞,洗涤、固定、封闭后,依次加入鼠anti-his单克隆抗体,FITC标记的羊抗鼠IgG孵育,同时另做3张玻片滴加hoechst进行细胞核染色。将处理好的玻片在荧光共聚焦显微镜下观察拍照。

1.3.6 MTT法检测细胞增殖水平 取对数生长期的细胞,实验孔加入不同浓度的pET32a-PTD、pET32a-PTD-ABD融合蛋白共孵育,每孔设3个复孔,加等体积的培养液的细胞为阴性对照,三尖杉酯碱为阳性对照,分别培养24、48、72、96 h,应用MTT法,在酶标仪492 nm波长处测光密度值[D(492)],绘制细胞生长曲线。实验重复3次。

1.3.7 细胞凋亡分析 培养K562、HL60细胞到对数生长期,实验孔加入不同浓度的pET32a-PTD-ABD、pET32a-PTD融合蛋白,加等体积的培养液的细胞为阴性对照,只加培养液的为空白对照,加入三尖杉酯碱的细胞为阳性对照,收集经过处理48 h的K562、HL60细胞,洗涤固定,4 ℃放置。加入Annexin-V-FITC、PI染色,避光反应15 min后,加入400 μL结合缓冲液,流式细胞仪检测,计算机处理分析,实验重复3次。

1.4 统计学处理

组间及组内均数比较采用方差分析及LSD-t检验,采用SPSS 11.0统计软件。

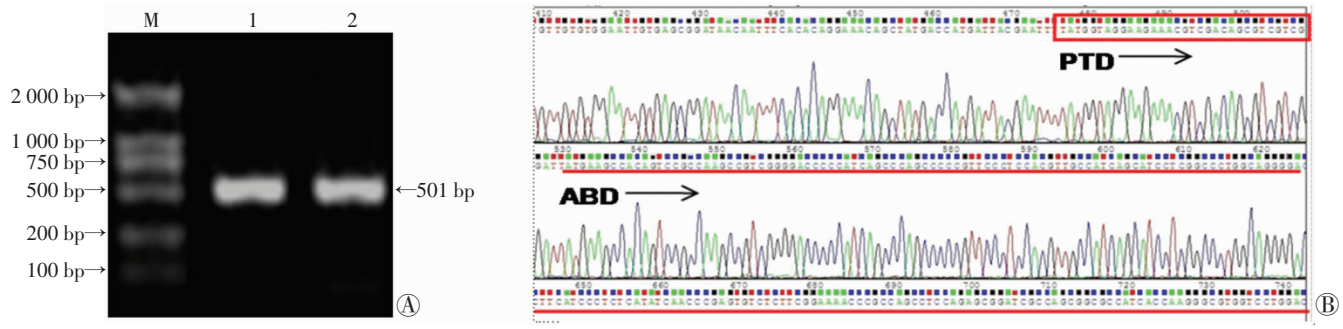
2 结果

2.1 pET32a-ABD、pET32a-PTD、pET32a-PTD-ABD、pET32a-ABD-PTD表达载体构建成功

以PGD210质粒为模板,应用ABD引物进行PCR扩增,2%的琼脂糖凝胶电泳可见1条约501 bp的特异性条带(图1A),与预期目的基因ABD片段大小一致。将ABD片段经纯化后构建重组表达质粒pET32a-ABD,将PTD单链退火为双链双酶切后回收产物连接,构建pET32a-PTD质粒,将PTD连入pET32a-ABD载体,构建的重组质粒pET32a-PTD-ABD,送测序,结果回报序列及读码框均正确(图1B)。

2.2 获得pET32a-ABD、pET32a-PTD、pET32a-PTD-ABD可溶性融合蛋白

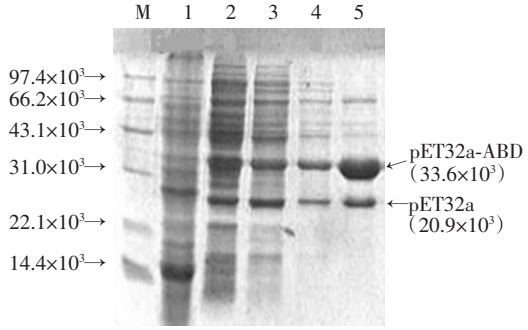
将质粒pET32a-ABD、pET32a-PTD、pET32a-PTD-ABD转化



A:PCR 扩增 ABD 结果　M:DNA 标准(DL 2 000);1、2:均为 ABD 目的片段;B:pET32a-PTD-ABD 测序结果　红框内为 PTD 序列,红色下划线为 ABD 部分序列,序列及读码框均完全正确

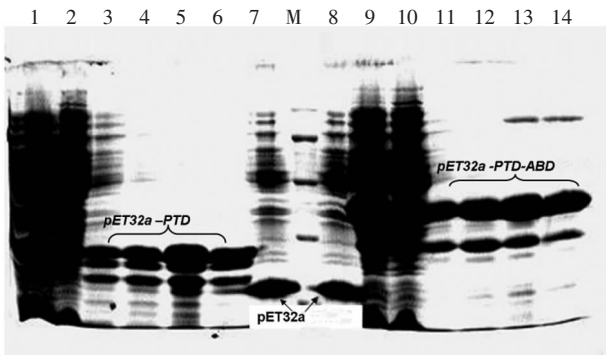
图 1　pET32a-PTD-ABD 载体构建结果

E. coli BL21（DE3）,接种到 100 mL LB 中,然后收集全部菌液,按照实验方法中所示,获得浓缩蛋白。SDS-PAGE 电泳分别可见 pET32a 20.9 × 10^3,pET32a-PTD 23.7 × 10^3,pET32a-ABD 33.6 × 10^3,pET32a-PTD-ABD 38.8 × 10^3 大小的新蛋白片段,与预计大小一致(图 2、3)。pET32a-ABD、pET32a-PTD、pET32a-PTD-ABD 均能从上清中纯化到目的蛋白。



M:标准;1:pET32a 空载体;2:pET32a-ABD 表达蛋白(未纯化);3、4:纯化过程中蛋白电泳;5:纯化后浓缩蛋白

图 2　IPTG 诱导 pET32a-ABD 蛋白表达和梯度透析纯化电泳结果

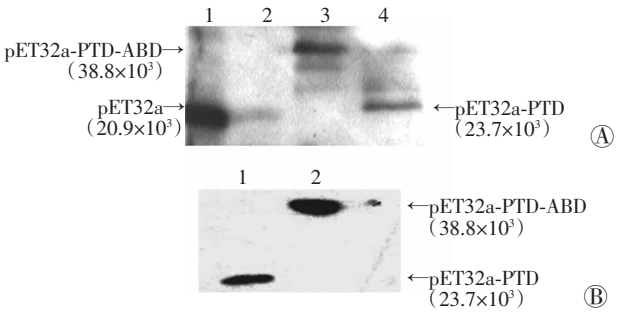


M:标准; 1 ~ 6:pET32a -PTD ;1、2:未纯化蛋白;3 ~ 6:纯化后蛋白;7、8:pET32a;9 ~ 14: pET32a-PTD-ABD;9、10:未纯化蛋白;11 ~ 14:纯化蛋白

图 3　IPTG 诱导 pET32a-PTD、pET32a-PTD-ABD 蛋白表达和梯度透析纯化电泳结果

2.3　Western blot 及免疫荧光法检测融合蛋白的表达

pET32a 载体表达 HIS 标签,应用抗 HIS 抗体可以特异性检测融合表达蛋白。将获得的纯化后的 pET32a-ABD、pET32a-PTD、pET32a-PTD-ABD 融合表达蛋白加入 K562、HL60 细胞上清中,与 K562、HL60 细胞共培养,终浓度分别为 50、100、150 nmol/L,40 min 后收集细胞, PBS 清洗后裂解收总蛋白,行 Western blot 检测,结果除了 pET32a-ABD 外,3 个浓度的 pET32a-PTD、pET32a-PTD-ABD 均能在细胞内检测到,证明两个融合蛋白已经成功进入细胞内(图 4),同时表明,蛋白能成功进入细胞内是由于融合表达了 PTD 的结果。



A:与融合蛋白共孵育的 K562 细胞　1:pET32a;2:pET32a-ABD;3:pET32a-PTD-ABD;4:pET32a-PTD;B:与融合蛋白共孵育的 HL60 细胞　1:pET32a-PTD;2:pET32a-PTD-ABD

图 4　Western blot 检测融合蛋白进入白血病细胞的表达

收集和 3 种融合蛋白共孵育 40 min 的 HeLa 细胞,应用抗 HIS 抗体作为一抗,标记了 FITC 的 IgG 作为二抗,染色后,荧光共聚焦显微镜下观察并拍照。pET32a-PTD、pET32a-PTD-ABD 组细胞均可以看到绿色荧光,并在细胞浆和细胞核内都有分布,而 pET32a-ABD 组抗 HIS 抗体无荧光信号,而 Hoechst 染色可见到蓝色荧光信号,提示蛋白没有进入细胞内,证明没有 PTD 的介导,融合蛋白不能进入细胞内发挥作用(图 5)。

2.4　pET32a-PTD-ABD 融合蛋白对 K562、HL60 细胞增殖的影响

MTT 法测定结果(图 6、7)显示,与阴性对照相比,与 pET32a-PTD 蛋白共培养的 K562、HL60 细胞生长曲线无明显变化,而与三尖杉酯碱共培养的 K562、HL60 细胞生长明显受到抑制;与 pET32a-PTD-ABD 共培养的 K562、HL60 细胞生长不同程度受到抑制。统计学分析结果显示,K562 细胞各组之间无统计学差异($P > 0.05$,图 6);与阴性对照相比,pET32a-PTD-ABD 对 HL60 细胞的生长有明显抑制作用($P < 0.05$),且随着 pET32a-PTD-ABD 浓度的加大,抑制作用越大(图 7)。

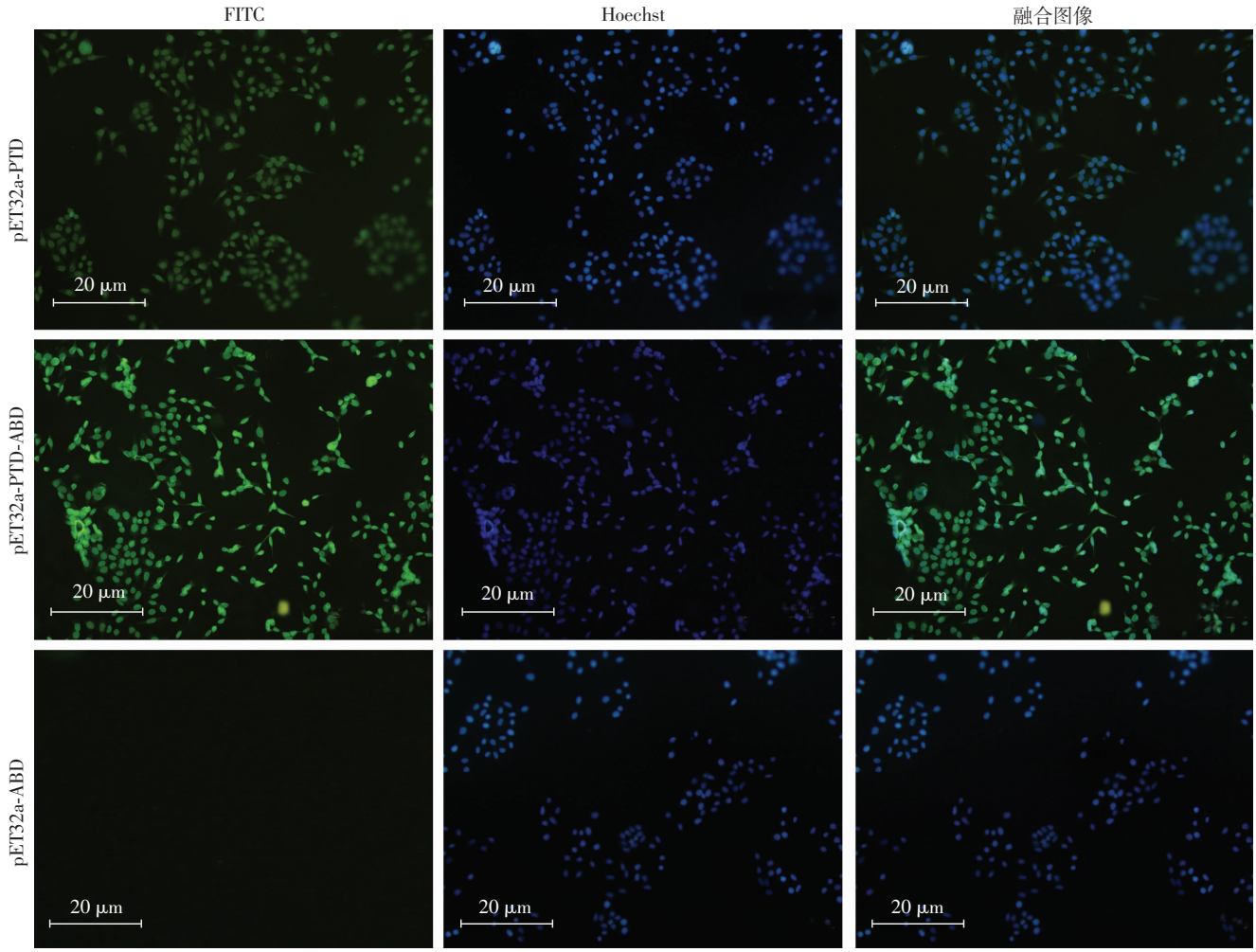


图5 荧光共聚焦显微镜观察融合蛋白在HeLa细胞内的定位

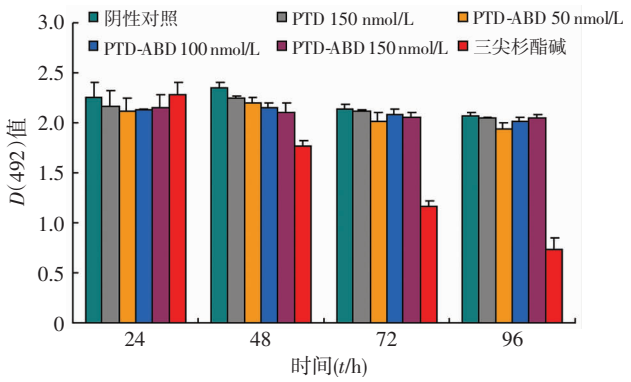
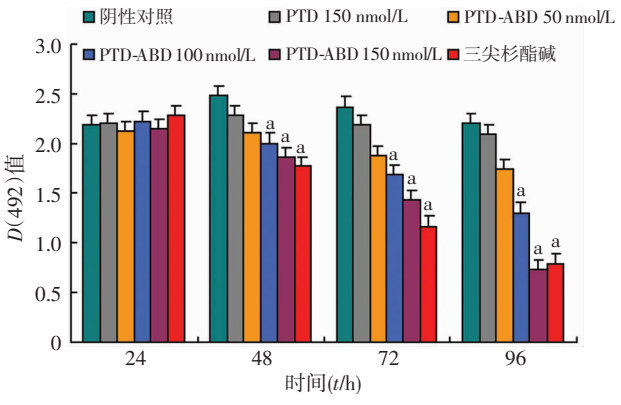


图6 pET32a-PTD-ABD蛋白对K562细胞生长的影响

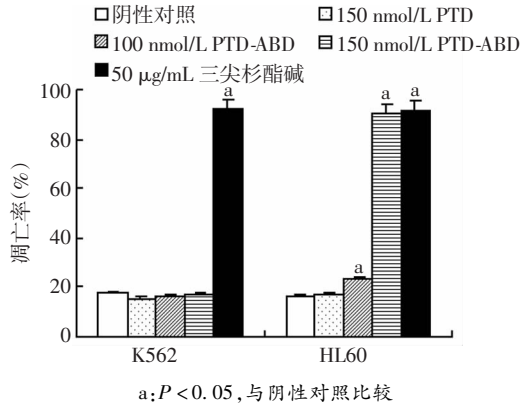


a:$P<0.05$,与阴性对照比较

图7 pET32a-PTD-ABD蛋白对HL60细胞生长的影响

2.5 pET32a-PTD-ABD融合蛋白能够促进HL60细胞的凋亡

将pET32a-PTD、pET32a-PTD-ABD融合蛋白及三尖杉酯碱处理过的K562、HL60细胞应用流式细胞术进行凋亡分析。三尖杉酯碱对K562、HL60有明显的促凋亡作用,但pET32a-PTD组细胞的凋亡与阴性对照比较,差异无统计学意义($P>0.05$),证明PTD蛋白本身对细胞的凋亡无影响。经pET32a-PTD-ABD蛋白处理的K562细胞与阴性对照比较,凋亡无明显增加($P>0.05$),但经该蛋白处理的HL60细胞与阴性对照比较,凋亡明显加速,差异有统计学意义($P<0.05$),且随浓度的增大,差异越大,150 nmol/L PTD-ABD融合蛋白与50 μg/mL三尖杉酯碱的促凋亡作用相当(图8)。



a:$P<0.05$,与阴性对照比较

图 8 pET32a-PTD-ABD 蛋白对 K562、HL60 细胞凋亡的影响

3 讨论

BCR/ABL 融合蛋白是 CML 的发病基础,目前针对该融合蛋白的酪氨酸激酶抑制剂伊马替尼等已经在临床取得了显著疗效,靶向治疗也因此成为目前白血病治疗领域最有前景的治疗模式。在国外的研究中发现,破坏 BCR/ABL 融合蛋白 C 末端的 ABD 区,能够明显降低 BCR/ABL 融合蛋白的致癌性[3],在体内可以延缓白血病的发病时间。ABD 同时还是 ABL 激酶的一部分,在其他白血病及正常细胞中表达,因此,我们设想构建 ABD 结构蛋白的类似物,将其导入细胞内可能达到干预 ABD 结构功能的目的,为治疗 CML 及其他类型白血病探索新的药物作用靶点和研究方向。PTD 目前已经在多个领域研究[9-12]使用,在蛋白转运、尤其是药物转运方面有较高的应用价值。我们应用 PCR 的方法获得目的基因,将 PTD 技术应用于目的蛋白的转导,应用 PTD 介导 ABD 蛋白进入细胞内,40 min 内即可定位于细胞核,且 PTD 蛋白对细胞的增殖及凋亡无影响,比传统的转染方法更迅速、更安全,值得推广。

过表达某个蛋白,然后检测相关信号通路变化及对细胞增殖分化的影响,是目前蛋白功能研究的经典方法之一。我们预测 ABD 蛋白进入 K562 细胞后,因为 ABD 蛋白的过表达,会促进细胞的增殖,减少凋亡。但本研究结果显示,ABD 融合蛋白和阴性对照相比,对 K562 细胞的增殖及凋亡并无明显作用,相反,对另一白血病细胞系 HL60 细胞,PTD-ABD 却能抑制细胞的增殖、促进凋亡,且 150 nmol/L 的融合蛋白与 50 μg/mL 的三尖杉酯碱作用相当,提示 ABD 蛋白在其他类型的白血病中同样起着重要的作用。既往研究报道抑制 ABD 蛋白可延缓 CML 的发病[3],而本实验提示 ABD 过表达对 K562 细胞的作用不大,对 HL60 细胞却有明显的抑制作用,考虑 ABL 基因表达于各种白血病细胞,当高表达 PTD-ABD 时,HL-60 细胞反应就比较明显,凋亡增加;而对于 K562 细胞,由于其本身高表达 BCR/ABL,当其被部分抑制后,细胞增殖虽受影响,但还不足以达到使细胞凋亡的水平增加。

总之,本研究应用分子克隆方法成功构建 PTD 及 ABD 的融合表达载体,通过直接测序方法验证了载体的序列及编码完全正确,通过常规的方法即获得了高纯度的表达蛋白,摒弃了传统的对细胞毒性较大的转染方法,只需将蛋白与细胞共培养就能达到转染的效果,使蛋白很容易进入细胞内发挥作用,抑制白血病细胞的增殖,促进凋亡,对进一步探讨 ABD 蛋白在白血病的治疗及发病机制上奠定了基础。

参考文献:

[1] Craigie D. Case of disease and enlargement of the spleen in which death took place from the presence of purulent matter in the blood[J]. Edinb Med Surg J, 1845, 64: 400-413.

[2] Zhang X, Wong R, Hao S X, *et al*. The SH2 domain of bcr/Abl is not required to induce a murine myeloproliferative disease; however, SH2 signaling influences disease latency and phenotype[J]. Blood, 2001, 97(1): 277-287.

[3] Underhill-Day N, Pierce S, Thompson S E, *et al*. Role of the C-terminal actin binding domain in BCR/ABL-mediated survival and drug resistance[J]. Br J Haematol, 2006, 132(6): 774-783.

[4] Vives E, Brodin P, Lebleu B. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus[J]. J Biol Chem, 1997, 272(25): 16010-16017.

[5] Fawell D, Seery J, Daikh Y, *et al*. Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994, 91(2): 664-668.

[6] 梁英民, 蒋姗姗, 韩骅, 等. TAT PTD-BCR/ABL SH3 融合蛋白对白血病细胞系 K562 凋亡诱导作用[J]. 第四军医大学学报, 2002, 23(9): 821-824.

[7] Heisterkamp N, Stam K, Groffen J, *et al*. Structural organization of the bcr gene and its role in the Ph′ translocation[J]. Nature, 1985, 315(6022): 758-761.

[8] 康志杰, 李国辉, 黄斯勇, 等. Abd-Bcr/Abl 原核表达载体的构建和表达[J]. 科学技术与工程, 2008, 8(9): 2331-2334.

[9] 叶南慧, 林艳云, 潘剑茹, 等. PTD 介导的蛋白转导技术及其在医学领域中的应用[J]. 生物医学工程学杂志, 2011, 28(2): 401-404.

[10] Jin C, Yu D, Cancer M, *et al*. Tat-PTD-modified oncolytic adenovirus driven by the SCG3 promoter and ASH1 enhancer for neuroblastoma therapy[J]. Hum Gene Ther, 2012, 24(8): 766-775.

[11] Yu D, Jin C, Ramachandran M, *et al*. Adenovirus serotype 5 vectors with Tat-PTD modified hexon and serotype 35 fiber show greatly enhanced transduction capacity of primary cell cultures[J]. PLoS One, 2013, 8(1): e54952.

[12] Zhang X M, He D N, Zhou B, *et al*. *In vitro* inhibition of vesicular stomatitis virus replication by purified porcine Mx1 protein fused to HIV-1 Tat protein transduction domain (PTD)[J]. Antiviral Res, 2013, 99(2): 149-157.

(**收稿**:2013-10-09;**修回**:2013-11-21)

(编辑 王 红)