DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.04.019
第24卷第4期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 4
2002年4月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Apr. 2002

文章编号:1000-5404(2002)04-0421-04

论著

TAT蛋白转导结构域介导的BCR/ABL融合蛋白在小鼠体内的跨膜转运

梁英民[1],蒋珊珊[1],孙 强[2],刘 利[1],刘 强[1],陈任安[1],李巧娥[1],韩 骅[2] (第四军医大学:[1]唐都医院血液内科,西安 710038;[2]基础医学部遗传与发育生物学教研室;西安 710033)

提 要:目的 探讨HIV-1反式激活蛋白(TAT)的蛋白转导结构域(PTD)介导的BCR/ABL(TAT PTD-BCR/ABL)融合蛋白在小鼠体内的跨膜转运和通过血脑屏障作用。方法 在大肠杆菌中表达PTD-BCR/ABL融合蛋白,经Ni-NTA树脂亲合层析,纯化后的融合蛋白经小鼠尾静脉注射体内,用免疫组织化学方法对小鼠组织细胞内的PTD-BCR/ABL融合蛋白进行检测。结果 ①表达和纯化了分子量为23×10^3的PTD-BCR/ABL融合蛋白;②在接受融合蛋白的小鼠肝、脾、肾及心肌组织的细胞内检测到了PTD-BCR/ABL融合蛋白;③接受融合蛋白的小鼠脑组织细胞中可以检测到融合蛋白的存在。结论 PTD可在体内介导较大分子量的融合蛋白进入组织细胞和通过血脑屏障,有望为利用外源性蛋白质进行细胞内治疗和中枢神经系统疾病的治疗提供一种新的工具。

关键词:蛋白转导;组织细胞;血脑屏障
中图法分类号:R329.24;R341 文献标识码:A

TAT protein transduction domain mediates transmembrane delivery of BCR/ABL fusion protein into tissue cells of mice *in vivo*

LIANG Ying-min, JIANG Shan-shan, SUN Qiang, LIU Li, LIU Qiang, CHENG Ren-an, LI Qiao-e, HAN Hua (Department of Hematology, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China)

Abstract: Objective To explore whether protein transcription domain (PTD) of HIV-1 trans activitor transcription (TAT) can mediate the BCR/ABL fusion protein being transported through membrane and passing through blood brain barrier of mice in order to provide the experimental basis for intracellular therapy and treatment of central nervous system diseases. Methods The TAT PTD-BCR/ABL fusion protein was expressed in *E. coli* and purified with affinity resin-Ni-NTA. The purified fusion protein was injected into caudal vein of mice and then examined in tissue section by immunohistochemisty. Results TAT PTD-BCR/ABL fusion protein with molecular weight of 23×10^3 was successfully expressed and purified. The fusion protein was detected in especially obviously in the nucleus of tissue cells from the liver, spleen, kidneys, cardiac muscle and so on. Brain tissues of mice with the injection was found the expression of BCR/ABL fusion protein. Conclusion TAT PTD can mediate fusion protein with larger molecular weight to enter into tissue cells and pass through blood brain barrier. It is promising to provide a novel approach for the treatment of cancer and central nervous system disease with exogenous and bioactive proteins.

Key words: protein transportation; tissue cells; blood brain barrier

细胞膜在细胞内外的物质与信息交换中发挥着重要作用,生理情况下,除了一些可自由扩散的小分子物质外,细胞内外的物质和信息传递需要通过分泌、胞吐或受体及离子通道等方式进行。而很多具有治疗作用的生物大分子物质如蛋白质、多肽、DNA及某些化学物质则不能通过细胞膜,从而限制细胞内的治疗方法的研究进展。

蛋白转导域(Protein transduction domains, PTDs)是指具有介导蛋白质跨膜转运的某些蛋白质的结构域。已经证明HIV-1的反式激活蛋白(TAT)、果蝇的ANTP及HSV-1 VP22转录因子的蛋白转导域(PTDs)能介导不同大小的蛋白质进入细胞内[1]。我们已经构建和表达了TAT PTD-BCR/ABL融合蛋白,并在体外证明了PTD可以介导BCR/ABL融合蛋白跨膜转运[1,2],为研究PTD在体内能否介导蛋白质的跨膜转运,我们对PTD-BCR/ABL融合蛋白进行了表达,纯化后的融合蛋白经静脉注入小鼠体内,经免疫组织化学的方法证明了PTD介导的融合蛋白不仅可以进入小鼠体内的各种组织细胞,而且也能透过血脑屏障。这一结果为利用外源性的蛋白质进行细胞内治疗提供了新的途径。

1 材料和方法

1.1 材料

大肠杆菌BL21购自Navagene公司,表达PTD-BCR/ABL融合蛋白的质粒pEPb及表达无TAT的PTD的BCR/ABL融合蛋白质粒pEb由本室构建[2,3]。BALB/c小鼠由第四军医大学实验动物中心提供,HL-60细胞株由本室保存,抗His标签抗体购自Santa Cruz公司,链霉菌抗生物蛋白-过氧化酶免疫组化超敏试剂盒(Universal LSAB® +Kit)为DAKO公司产品。

1.2 方法

1.2.1 PTD-BCR/ABL融合蛋白的表达与纯化 PTD-BCR/

作者简介:梁英民(1957-),男,陕西省泾阳县人,副教授,主要从事白血病靶向治疗方面的研究,发表论文20余篇。电话:(029)3377426;E-mail:liangym@fmmu.edu.cn

收稿日期:2001-09-05;修回日期:2001-12-20

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

ABL 融合蛋白的表达与纯化方法同文献[2,3]，即用表达质粒 pEPb 转化大肠杆菌 BL21，挑取阳性单克隆过夜培养，加入 IPTG 至终浓度为 0.001 mol/L，诱导不同时间后，收集菌体，悬浮于 PBS，超声裂菌，离心，弃去上清，除去杂蛋白，用 8 mol/L 尿素溶解沉淀蛋白，用变性稀释液稀释 4 倍，过滤除去不溶性组分后，在 Ni-NTA-agarose 柱上进行亲和层析，收集洗脱蛋白，透析后冻干保存。对照组 BCR/ABL 融合蛋白的表达与纯化方法同上，pEb 质粒进行表达，纯化后的 BCR/ABL 融合蛋白冻干备用。

1.2.2 小鼠体内组织细胞的蛋白转导 4～8 周的 BALB/c 小鼠，经尾静脉注射含 300 μg 与 500 μg 的 PTD-BCR/ABL 融合蛋白及无 PTD 的 BCR/ABL 融合蛋白的无菌溶液，分别在注射后 2 h 和 4 h，用乙醚麻醉小鼠，暴露心脏，生理盐水冲洗，甲醛灌注，30 min 后取脑、肝、脾、心、肾组织，40 g/L 多聚甲醛固定，石蜡包埋，切片备用。

1.2.3 免疫组化 取石蜡包埋小鼠组织脱蜡切片，PBS 冲洗 3 次，加过氧化酶阻断溶液以阻断内源性过氧化酶，非免疫动物血清封片，PBS 冲洗后分别加抗 His、抗 BCR/ABL 抗血清，4 ℃过夜，加生物素标记的兔抗鼠第二抗体，室温孵育 10 min，PBS 冲洗后加链亲和素-过氧化酶溶液，同等条件下孵育，PBS 冲洗。随后每片加 100 μl 新鲜配制的 DAB 溶液显色。显微镜观察细胞显色适当后水洗、凉干、中性树胶封固。显微镜下分析、摄像。

2 结果

2.1 TAT PTD-BCR/ABL 融合蛋白的表达与纯化

为了确定 PTD 能否在体内与体外将生物大分子蛋白质导入细胞内，我们将人工合成的 TAT PTD 的九肽与含有慢性粒细胞白血病 BCR/ABL 断裂点的 152 个氨基酸的基因片段进行了重组，构建了 PTD-BCR/ABL 融合蛋白表达载体(pEPb)，并在融合蛋白基因的 5′端加上了 His 标签序列，有利于表达蛋白的纯化及检测，见图 1。

用同样方法构建了不含 PTD、而仍有 His 标签的 BCR/ABL 融合蛋白表达载体(pEb)。表达质粒 pEPb，pEb 分别转染大肠杆菌，表达的融合蛋白用 Ni-NTA-agarose 亲和层析柱进行纯化后，进行 SDS-PAGE 分析，结果见图 2，分别在分子量 23×10^3 和 21×10^3 见到一电泳带。

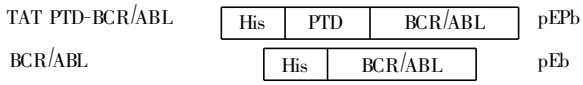
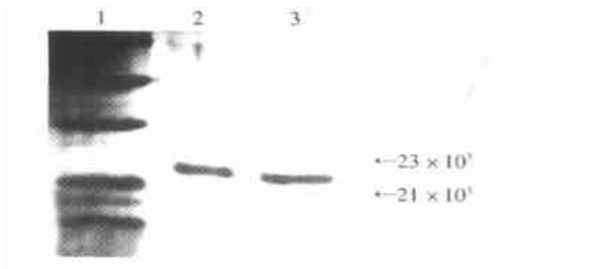


图 1 TAT PTD-BCR/ABL 融合蛋白基因的结构图

Fig 1 Schematic diagram of PTD—BCR/ABL fusion protein



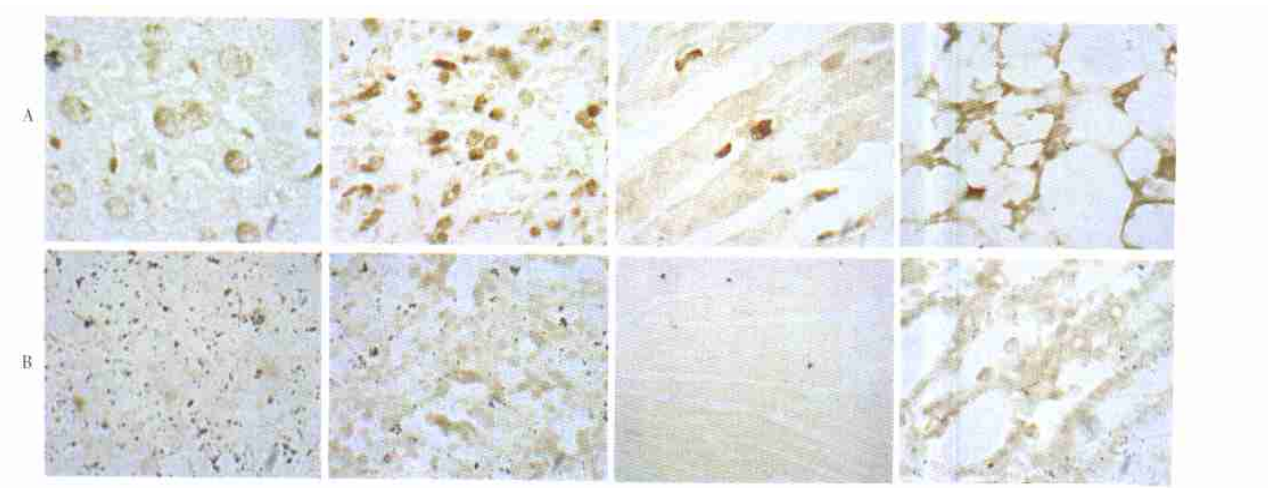
1: Marker; 2: Purified PTD-BCR/ABL fusion protein; 3: Purified BCR/ABL fusion protein

图 2 PTD-BCR/ABL 融合蛋白的 SDS-PAG 分析

Fig 2 SDS-Pag analysis of PTD-BCR/ABL fusion protein

2.2 PTD 介导的 BCR/ABL 融合蛋白在体内的跨膜转运

将标记有 His 标签的 PTD-BCR/ABL 和无 PTD 的 BCR/ABL 融合蛋白经尾静脉注射入小鼠体内，分别于注射后 2 h 取肝、脾、肾及心肌组织，制备 3～4 μm 组织切片，每种组织进行抗 His 单克隆抗体染色，图 3 为小鼠不同组织细胞内融合蛋白的跨膜转运情况。肝细胞，肝血窦内皮细胞，枯否氏细胞，脾脏红髓血管内皮细胞，白髓淋巴小结中的淋巴细胞，心肌细胞，肾脏的肾小球系膜细胞及部分肾小管上皮细胞均呈不同程度阳性染色，而且以细胞核最为明显。对比之下，无 PTD 的 BCR/ABL 融合蛋白注射入小鼠体内，各种组织切片均无阳性染色出现。



The tissue sections from left to right are from the liver, spleen, heart muscle and kidneys in the mice injected intravenously with PTD-BCR/ABL (A) or with BCR/ABL fusion protein (B)

图 3 PTD-BCR/ABL 融合蛋白在小鼠组织细胞的跨膜转运

Fig 3 Transduction of PTD-BCR/ABL fusion protein into various tissue cells of mouse

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



图 4　PTD-BCR/ABL 融合蛋白在 HL-60 细胞内的分布

Fig 4　Distribution of the PTD-BCR/ABL fusion protein in the HL-60 cells

为了证明 PTD-BCR/ABL 融合蛋白在细胞核、浆内的分布的差别, 将与融合蛋白培养的 HL-60 细胞进行免疫细胞化学染色, 从图 4 中可见细胞核、浆内均可见分布, 但以细胞核的聚集较为明显。

2.3　PTD-BCR/ABL 融合蛋白通过血脑屏障作用

正常情况下血脑屏障只能透过 6 个氨基酸以下的多肽性物质, 为了确定 PTD-BCR/ABL 融合蛋白是否可以通过血脑屏障, 给小鼠体内注射 PTD-BCR/ABL 和无 PTD 的 BCR/ABL 融合蛋白 4 h 后, 制备脑组织切片, 用抗 His 抗体染色, 结果见图 5。从图 5 可见神经元、胶质细胞及血管内皮细胞均可见阳性反应, 尤其以细胞核沉积最为明显, 说明 PTD 在小鼠体内不但可以介导蛋白质进入各种组织细胞, 而且还可以介导蛋白质通过血脑屏障。



Immunohistochemical methods shows the fusion protein has no expression in the brain section of mice received BCR/ABL injection (A) and expresses in that with PTD-BCR/ABL injection (B, C). Strong staining is seen in the nuclei of brain cells (C)

图 5　PTD-BCR/ABL 融合蛋白通过血脑屏障作用

Fig 5　Transduction of PTD— BCR/ABL fusion protein across blood brain barrier

3　讨论

由于分子生物学技术的研究进展, 对疾病的认识已从细胞水平深入到了分子水平, 在很多疾病和肿瘤发病的分子机制研究中已积累了丰富的知识; 而另一方面, 针对疾病发生分子机制的靶向治疗如特异性免疫治疗, 基因治疗及信号转导途径的治疗也成为目前研究的热点。然而由于受细胞膜通透性的限制, 利用外源性生物活性物质的细胞内治疗一直受到限制。

1988 年 Green[4] 和 Frankel[5] 首次报告了来自 HIV-1 TAT 具有蛋白转导作用。Vives 等[6] 对 TAT 通过细胞膜的转导作用进行了研究, 发现该蛋白分子中一个富含碱性氨基酸、具有较多正电荷的多肽片段(TAT48-60)与 TAT 的跨膜转导有关, 因而被称为跨膜转导结构域(Protein Transduction Domain, PTD)。Schwarze 等[7] 进一步研究发现, 将 PTD 与相对分子量(Mr)15×10^3 ~2×10^5 的蛋白构成 PTD 融合蛋白, 可以介导这些蛋白分子从细胞外向细胞内直接跨膜转运, 说明 PTD 具有广谱的蛋白转导作用。我们首先将 PTD 与慢性粒细胞白血病的特异性融合蛋白片段 BCR/ABL 连接成分子量为(Mr)23×10^3 的 PTD-BCR/ABL 融合蛋白, 并在体外细胞培养中, 证明了将该融合蛋白加入培养的 HL-60, C2C12 细胞培养液中, 很快被转导入细胞内[2], 本研究将表达、纯化的 PTD-BCR/ABL 融合蛋白经小鼠尾静脉注射入体内, 2 h 后 PTD-BCR/ABL 融合蛋白就可以在各种组织细胞内检测到, 而且以细胞核最为明显。说明了 PTD 不仅将 BCR/ABL 融合蛋白片段转入细胞内, 而且进入细胞的蛋白质可能具有核内聚积的现象, 从而为利用 PTD 的蛋白转导作用打下了基础。

血脑屏障主要是由血管内皮细胞构成, 内皮细胞间的紧密连接和缺乏内吞囊泡的特点, 限制血和脑之间物质的自由交换, 因此, 有治疗作用的蛋白质多肽和很多化学药物很难通过血脑屏障。Schwarze 等[7] 将 PTD 与 β-半乳糖苷酶(Gal)融合, 表达的 PTD-Gal 经腹腔注射入小鼠体内, 2 h 后即可在脑组织切片中检测到明显的 Gal 活性。这一结果表明 PTD 不仅可以将分子量较大的半乳糖苷酶导入脑组织中, 而且保持了该蛋白的生物活性。我们将 PTD-BCR/ABL 融合蛋白注射入小鼠体内, 同样也在脑组织中检测到了该融合蛋白。进一步证明了 PTD 可以介导蛋白质通过血脑屏障, 这可能成为利用大分子生物活性物质及药物治疗神经系统疾病的一个新的方法。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

参考文献：

[1] Schwarze S R, Dowdy S F. *In vivo* protein transduction: intracellular delivery of biologically active proteins, compounds and DNA[J]. Trends Pharmacol Sci, 2000, 21(2): 45—48.

[2] 梁英民, 孙 强, 蒋姗姗, 等. PTD-BCR/ABL 融合蛋白的表达及其跨膜转运[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2001, 17(4): 377—380.

[3] 梁英民, 蒋姗姗, 孙 强, 等. BCR/ABL 融合蛋白的表达和纯化及其抗血清的制备[J]. 第四军医大学学报, 2001, 22(14): 1 315—1 317.

[4] Green M, Loewenstein P M. Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus Tat trans—activator protein [J]. Cell, 1988, 55(6): 1 179—1 188.

[5] Frankel A D, Pabo Co. Cellular uptake of the Tat protein from human immunodeficiency Virus [J]. Cell, 1988, 55(6): 1 189—1 193.

[6] Vives E, Brodin P, Lebieu 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): 16 010—16 017.

[7] Schwarze S R, Ho A, Vocero-Akbani A, *et al*. *In vivo* protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse [J]. Science, 1999, 285(5433): 1 569—1 572.

（编辑 张大春）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2002)04-0424-01

自发性乙状结肠穿孔 1 例

A case report of colon sigmoideum perforation

石 彦，宋 爽，靳明林 （第三军医大学附属西南医院普通外科，重庆 400038）

患者，廖×，男，69 岁。因便秘 4 d，负重后突发左下腹剧痛并迅速扩展至全腹而就诊。有冠心病、动脉硬化病史 10 年。查体：急性病容，烦躁不安，血压 10/6.5 kPa，腹膨隆呈板状，指肛检查扪及大量质硬粪块。腹部平片示结肠内大量粪便贮积，未见膈下游离气体及肠梗阻征象，诊断性腹穿抽出黄色混浊伴恶臭液体，涂片脓细胞(＋＋＋)。拟诊：空腔脏器穿孔伴弥漫性腹膜炎、中毒性休克。在积极抗休克的同时全麻下剖腹探查，术中见：腹腔充满淡黄色粪液，大网膜移向左下腹，腹膜及肠管广泛充血水肿并附有脓苔，结肠内大量结燥粪便，降结肠及直肠内扪及质硬粪石，乙状结肠肠袢对系膜缘有一直径 1 cm 穿孔，边缘粘膜外翻，附有大量脓苔。取穿孔旁组织送冰冻病理检查示：急性缺血坏死性肠炎。大量生理盐水冲洗腹腔至清亮，甲硝唑冲洗腹腔后行乙状结肠袢式造瘘术，左、右结肠旁沟放置血浆管，盆腔放置烟卷引流。术后诊断：① 自发性乙状结肠穿孔伴弥漫性腹膜炎；② 中毒性休克。术后经积极抗感染及营养支持治疗，患者痊愈出院。

讨论

自发性乙状结肠穿孔临床罕见，也称为粪性溃病，自发性大肠破裂，结肠粪性穿孔[1]，平均发病年龄 60 岁，无性别差异，约 60% 的患者有便秘史[2]。Tokunaga 等[2] 报道该病的好发部位为腹膜返折附近直肠前壁、直肠乙状结肠交界处对系膜缘和乙状结肠肠袢对系膜缘。分析本病例并结合文献，造成自发性乙状结肠穿孔的原因主要有：① 乙状结肠袢到直肠乙状结肠交界处是结肠最狭窄部位，大便结燥时不易通过而形成机械阻挡作用使肠内压增高，局部易缺血，甚至造成溃疡直至穿孔；② 乙状结肠最下动脉与直肠上动脉之间的 Drummond 动脉弓较细甚至缺乏，该处肠管的血供差，尤其是老年人合并有动脉硬化时更是如此，这是该部位容易发病的解剖学依据；③ 大便用力过猛、负重、导泻等可造成结肠内压突然增高的因素均为该病的诱因。

本病术前不易确诊，多在手术时明确诊断[3]，我们认为当出现下列情况时应高度怀疑本病的可能：① 老年便秘患者突然出现左下腹疼痛并迅速蔓延至全腹而表现为弥漫性腹膜炎；② 指肛检查于直肠扪及质硬干结粪块；③ 诊断性腹穿抽出混浊伴粪臭液体；④ 腹部平片示结肠内粪便贮积伴肠腔扩张，但不一定有膈下游离气体；⑤ 问及大便用力过猛、突然搬运重物或导泻等诱因；⑥ 有高血压、动脉硬化的病史。

彻底清洗腹腔、充分引流是治疗该病的关键。对穿孔的处理应依据具体病情选择，主要方法有：穿孔肠段袢式造瘘、病变肠段切除 Hartman 造瘘、穿孔修补近端结肠双腔造瘘。术中尽量排出结肠内贮积的粪便对降低肠腔内压、减少毒素吸收、加快肠功能恢复有积极作用。预后主要取决于就诊时间早晚、手术是否及时、破口部位及大小、术中清洗是否彻底及术后抗感染营养支持治疗力度和有无合并症等[4]。

关键词：自发性；乙状结肠；穿孔

中图法分类号：R656.1 文献标识码：B

参考文献：

[1] 王长江. 自发性大肠破裂 4 例分析[J]. 中国实用外科杂志, 1995; 3(11): 673—674.

[2] Tokunaga Y, Hata K, Nishitai R, *et al*. Spontaneous perforation of the rectum with possible stercoral etiology: report of a case and review of the literature[J]. Surg Today, 1998, 28(9): 937—939.

[3] 孙明臣, 赵 萍, 吴 潼. 自发性结肠穿孔 11 例诊治体会[J]. 腹部外科, 1998, 11(5): 222—223.

[4] 吕洪海, 薛克修, 胡 军. 宿便性结肠穿孔病因分析与对策[J]. 新乡医学院学报, 1999, 16(4): 343—344.

（编辑 谢义霞）

作者简介：石 彦(1973—)，男，山东省济南市人，硕士研究生，医师，主要从事腹腔感染及胃肠道肿瘤诊断与治疗方面的研究。电话(023)68754000—73074

收稿日期：2001-11-12；修回日期：2002-03-12

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net