

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2011.04.008

· 基础研究 ·

## 乳腺癌特异性多肽介导的 HSV-TK/GCV 系统的构建及其靶向杀伤效应

耿计伟,董坚,刘为青,高嫦娥,熊秋霞,缪延栋,周华华,李秋恬,李臣(昆明医学院第一附属医院生物治疗中心,云南昆明650032)

**[摘要]** 目的:研究乳腺癌 MDA-MB-231 细胞特异性转导多肽 PI 介导的 HSV-TK/GCV 抗癌系统对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的体外靶向杀伤作用。方法:以 PCR 从质粒 pORF-HSV-TK 中扩增目的基因 PI-TK,克隆到原核表达载体 pET-28a(+)中,构建 pET-28a(+)-PI-TK 载体,转化宿主菌,经 IPTG 诱导表达 PI-TK 融合蛋白,利用 His-Tag 对其进行纯化,SDS-PAGE 和 Western blotting 鉴定 PI-TK 融合蛋白。将不同质量浓度的 PI-TK 融合蛋白与 MDA-MB-231 细胞共培养,联合更昔洛韦(ganciclovir,GCV)作用后,倒置显微镜下观察细胞的形态变化,CCK-8 法检测 MDA-MB-231 细胞的增殖。结果:成功构建了重组原核表达载体 pET-28a(+)-PI-TK,获得纯化的 PI-TK 融合蛋白,SDS-PAGE 及 Western blotting 鉴定 PI-TK 融合蛋白表达正确。单独 PI-TK 融合蛋白不影响 MDA-MB-231 细胞的形态和增殖,但 PI-TK 融合蛋白联合 GCV 能剂量依赖性靶向抑制 MDA-MB-231 细胞的增殖,200  $\mu\text{g/ml}$  PI-TK + 10 mg/L GCV 作用的抑制率达(68.9  $\pm$  7.57)%;PI-TK 联合 GCV 抑制 MDA-MB-231 细胞的 IC<sub>50</sub> 值为 152.64  $\mu\text{g/ml}$ 。上述各作用对 MDA-MB-435 细胞均无影响( $P < 0.05$ )。结论:乳腺癌特异性转导多肽 PI 介导的 HSV-TK/GCV 抗癌系统可靶向杀伤 MDA-MB-231 细胞。

**[关键词]** 乳腺癌特异性多肽;PI;乳腺癌;MDA-MB-231 细胞;HSV-TK/GCV 抗癌系统;靶向性

**[中图分类号]** R737.9;R730.5

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2011)04-0383-06

## Construction and targeted effects of breast cancer specific peptide-mediated HSV-TK/GCV anti-tumor system

GENG Ji-wei, DONG Jian, LIU Wei-qing, GAO Chang-e, XIONG Qiu-xia, MIAO Yan-dong, ZHOU Hua-hua, LI Qiu-tian, LI Chen (Biotherapy Center, First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650032, Yunnan, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the targeted killing effect of breast cancer specific peptide PI-mediated HSV-TK/GCV system against human breast cancer MDA-MB-231 cells *in vitro*. **Methods:** PI-TK gene was amplified from pORF-HSV-TK plasmid by PCR, and was re-inserted into the prokaryotic expression plasmid pET-28a(+); the pET-28a(+)-PI-TK plasmid was constructed and transfected into the host bacteria. After induction with IPTG, PI-TK fusion protein was purified by His-Tag and further identified by SDS-PAGE and Western blotting analysis. MDA-MB-231 cells were cultured with different dosages of PI-TK fusion protein; after further treatment with ganciclovir (GCV), the morphology changes of MDA-MB-231 cells were observed under inverted microscope, and the cell proliferation was evaluated by CCK-8 assay. **Results:** Recombinant prokaryotic expression plasmid pET-28a(+)-PI-TK was successfully constructed. The purified PI-TK fusion protein was obtained and confirmed by the SDS-PAGE and Western blotting analysis. PI-TK fusion protein alone failed to affect the morphology and proliferation of MDA-MB-231 cells, but when combined with GCV, PI-TK fusion protein specifically inhibited the proliferation of MDA-MB-231 cells in a dose-dependent manner, with inhibito-

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目(No. 3086033);云南省应用基础研究重点项目资助(No. 2009CC023);云南省科技基础条件平台建设项目资助(No. 2007DA006)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 3086033), the Key Foundation of Applied Basic Research Program Yunnan Province (No. 2009CC023), and the Basic Platform Construction Program for Science and Technology in Yunnan Province (No. 2007DA006)

**[作者简介]** 耿计伟(1983-),男,山东省菏泽市人,医学硕士,主要从事恶性肿瘤的临床与基础研究。E-mail: gengj126@163.com.

**[通信作者]** 董坚(DONG Jian, corresponding author), E-mail: dongjian18@yahoo.com.

**[网络出版]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20110714.1100.001.html>

ry rate of 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  PI-TK + 10 mg/L GCV being (68.9  $\pm$  7.57)%, and  $\text{IC}_{50}$  being 152.64  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , but it had no effects on MDA-MB-435 cells ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** The breast cancer specific peptides PI-mediated HSV-TK anti-tumor system can specifically kill MDA-MB-231 cells.

[ **Key words** ] breast cancer specific peptide; breast cancer; MDA-MB-231 cell; HSV-TK/GCV suicide gene system; targeted

[ Chin J Cancer Biother, 2011, 18(4): 383-388 ]

随着分子生物学技术的发展,基因治疗成为肿瘤研究的热点,但是到目前为止,恶性肿瘤基因治疗的临床疗效并不太令人满意,其中一个很重要的原因是肿瘤的基因治疗缺乏靶向特异性。本课题组前期采用 pC89 噬菌体肽库与人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 共培养,筛选出特异性进入肿瘤细胞的多肽噬菌体, DNA 测序获取噬菌体上的多肽序列,获得了一条具有 MDA-MB-231 细胞靶向性的多肽即 PI。PI 能够特异性进入人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 中,而与其他乳腺癌细胞如 MDA-MB-435 细胞及其他组织来源实体瘤细胞株,尤其是人体正常细胞株无亲和性<sup>[14]</sup>。此外,该多肽具有蛋白携带能力,并保持其特异性。已有研究<sup>[5]</sup>表明,HSV-TK/GCV 系统具抗肿瘤效应,HSV-TK 基因与哺乳动物细胞内的 TK 基因不同,它可催化一些核苷类似物( nucleotide analogs, Nas )的磷酸化,如阿昔洛韦( aciclovir, ACV )、更昔洛韦( ganciclovir, GCV )等<sup>[6-7]</sup>,终产物 NasTP 可干扰、抑制宿主细胞 DNA 的合成,导致细胞死亡。本课题选择 HSV-TK 自杀基因作为治疗基因,研究 PI 多肽作为靶向性载体携带 HSV-TK 基因对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞进行靶向杀伤的可行性,为进一步探讨 PI 作为靶向性载体的应用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞株和材料

乳腺癌 MDA-MB-231 及 MDA-MB-435 细胞由本实验室保存。原核表达质粒 pET-28a(+)由本实验室保存,质粒 pORF-HSV-TK 购自美国 Invivogen 公司,大肠杆菌菌株 *E. coli* DH5 $\alpha$  购自博迈德生物有限公司,表达菌株 *E. coli* BL21( DE3 )plysS 购自百泰克生物有限公司, T4 DNA 连接酶、Taq DNA 聚合酶、质粒提取试剂盒、限制性内切酶、DNA 标准分子量及 DNA Marker DL2000 均为大连宝生物产品。GCV 为上海五洲通制药有限公司产品,胎牛血清为杭州四季青公司产品,多克隆羊抗 HSV-1 TK 抗体、兔抗羊 IgG-HRP、鼠抗羊 IgG-PE 均购自 Santa Cruz 生物有限公司,其余常规试剂均为进口或国产分析纯试剂。小片段凝胶回收试剂盒购自德国 Qiagen

公司, His Talontm Cartridge Purification 试剂盒购自美国 Clontech 公司, CCK-8 试剂盒购自碧云天生物技术研究所, Fix-Perm 破膜剂购自 BD 公司。

### 1.2 PCR 扩增目的基因片段

根据质粒 pORF-HSV-TK 中的 TK 开放阅读框全长序列设计引物, HSV-TK 基因全长序列为 1 128 bp, PI 基因 cDNA 序列为 33 bp( 5'-TGCGCATC-CCCATCTGGCGCCCTTCGTTGTTGC-3' ), 设计上游引物含 BamH I 酶切位点和 PI cDNA, 下游引物含 Hind III 酶切位点( 引物合成由 TaKaRa 公司完成 )。上游引物: 5'-AAGGATCC-PIcDNA-ATGGCCTCG-TACCCCG-3', 下游引物: 5'-CGAAGCTTTCAGTTAGCCTCCCCATC-3'。PCR 反应条件: 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min, 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 45 s, 50  $^{\circ}\text{C}$  退火 50 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 90 s, 共 35 个循环; 最后 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 8 min。PCR 产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 用胶回收试剂盒进行纯化。

### 1.3 pET-28a(+)-PI-TK 表达载体的构建及鉴定

原核表达载体 pET-28a(+)及 PCR 产物均经过 BamH I 和 Hind III 双酶切后处理回收, 两者以 1:3 的比例混合, 在 T4 DNA 连接酶作用下 16  $^{\circ}\text{C}$  连接过夜, 连接产物转化大肠杆菌 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞, 筛选 Kan 阳性重组子, 提取质粒后, 经过 BamH I 和 Hind III 双酶切初步鉴定, 并送 TaKaRa 公司进行序列测定。

### 1.4 PI-TK 融合蛋白的诱导表达及其分离纯化

将重组原核表达载体 pET-28a(+)-PI-TK 转化表达菌株 BL21( DE3 )plysS 感受态细胞, 取过夜菌液以 1:100 的比例接种于含 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  卡那霉素的 LB 培养基中, 至  $D$  值为 0.4~0.6, 加入终浓度为 1.0 mmol/L 的 IPTG, 37  $^{\circ}\text{C}$  条件下诱导 2 h, 离心收菌, 超声裂菌, 将全菌蛋白、上清液、沉淀分别取样进行 SDS-PAGE。收集诱导菌株细菌沉淀, 按照 His Talontm Cartridge Purification 试剂盒说明书进行 PI-TK 融合蛋白的分离纯化, 经过柱、洗柱、溶解、洗脱, 收集纯化的 PI-TK 融合蛋白, -80  $^{\circ}\text{C}$  保存, 另取 5  $\mu\text{l}$  的 PI-TK 蛋白进行 SDS-PAGE 分析。

### 1.5 Western blotting 鉴定 PI-TK 融合蛋白

参照文献[ 8 ]方法, 纯化的 PI-TK 融合蛋白按

常规方法进行 SDS-PAGE, 蛋白转至硝酸纤维素膜, 37 °C、5% 脱脂奶粉封闭 30 min, 加入多克隆羊源性 HSV1-TK 抗体(1:500) 4 °C 孵育过夜。洗涤 3 次后, 加入兔抗羊 IgG-HRP (1:1 000), 37 °C 反应 30 min。硫酸葡萄糖处理后用四甲基联苯胺显色 5 min, 然后终止反应。

### 1.6 CCK-8 法检测 MDA-MB-231 细胞的增殖

将 PI-TK 融合蛋白按照 0、40、80、120、160 和 200 μg/ml 质量浓度依次加入 MDA-MB-231 细胞中, 分别接种于 96 孔板中, 每组设置 6 个复孔, 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养。每 24 h 取一组进行观察, 共 1 周。CCK-8 法检测 MDA-MB-231 细胞的增殖, 在酶标仪 525 nm 波长下检测光密度值(D), 并绘制 MDA-MB-231 细胞增殖曲线。

### 1.7 流式细胞术检测 MDA-MB-231 细胞内 PI-TK 融合蛋白的表达

以 1 × 10<sup>5</sup> 细胞/孔在 24 孔板培养 MDA-MB-231 细胞, 无血清培养基处理 4 h, 然后补加 10% FBS 及终质量浓度为 200 μg/ml 的 PI-TK 融合蛋白, 共孵育 48 h 后, 用 0.25% 胰酶消化处理, 制成细胞悬液, 300 × g 离心 5 min, 弃上清, 用 PBS 洗 3 次后收集细胞沉淀, 重新悬浮于 50 μl 的 PBS。在细胞悬液中加入 500 μl 破膜剂 1, 室温暗室孵育 30 min, 离心收集细胞沉淀, 加入 1 ml 破膜剂 2 处理 15 min (室温, 暗室), 离心收集细胞沉淀, 然后加 200 μl 破膜剂 2 重新悬浮细胞。

将细胞分为 3 份, 第一份做为阴性对照, 不做染色处理。第二份按照 1 × 10<sup>6</sup> 细胞: 10 μl 抗体的比例加入羊抗 HSV-TK, 室温暗室孵育 30 min, 加 10 倍体积的 PBS 稀释后离心, 加入 100 μl PBS 重悬细胞; 然后分别加入 10 μl 鼠抗羊 IgG-PE 室温暗室孵育 15 min, 再加 200 μl PBS 后即可上流式仪检测。第三份不加 TK 抗体作为同型对照。

### 1.8 CCK-8 法检测 PI-TK 融合蛋白联合 GCV 体外对 MDA-MB-231 细胞的杀伤

分别取与多肽特异性结合的 MDA-MB-231 细胞(阳性细胞)及不与多肽特异性结合的 MDA-MB-435 细胞(阴性细胞)体外培养<sup>[2]</sup>。将过滤除菌的 PI-TK 融合蛋白按照 0、40、80、120、160 和 200 μg/ml 的梯度依次加入 MDA-MB-231 细胞中, 每个质量浓度设 3 个复孔, 加入含 10 mg/L GCV 的完全培养基<sup>[9]</sup>。同样方法处理对照组 MDA-MB-435 细胞。空白组加入等体积完全培养基, 置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中继续培养 48 h, 然后分别在每孔加入 15 μl CCK-8, 培养 1.5 h, 在酶标仪 450 nm、650

nm 双波长下检测各孔光密度值(D)。倒置显微镜下观察 PI-TK 融合蛋白联合 GCV 细胞组及单用 PI-TK 融合蛋白或 GCV 细胞组的两种细胞的形态。细胞杀伤率按下式计算: 细胞杀伤率(%) = [1 - (实验组 D - 空白组 D) / (对照组 D - 空白组 D)] × 100%。应用 SPSS 统计软件线性回归方法计算 IC<sub>50</sub> 值。

### 1.9 统计学处理

数据均采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 利用 SAS 软件进行 t 检验, P < 0.05 或 P < 0.01 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 pET-28a(+)-PI-TK 重组质粒的构建和鉴定

以真核质粒 pORF-HSV-TK 为模板进行 PCR 扩增, 产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳, 在 1 177 bp 处有特异性扩增条带(图 1), 与融合基因 PI-TK 片段一致。

重组质粒 pET-28a(+)-PI-TK 经 Hind III、BamH I 双酶切得到大小约 1 177 bp 和 5 360 bp 的两条片段(图 2)。送大连宝生物有限公司测序, 测序结果表明, 融合基因插入正确, 无移码及突变。

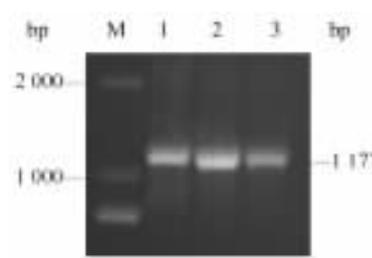


图 1 PI-TK 基因 PCR 产物的电泳分析

Fig. 1 Electrophoresis analysis of PCR product of PI-TK gene

M: Marker; 1: PI-TK gene

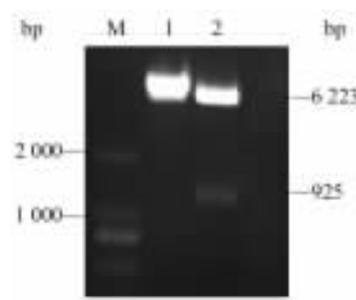


图 2 pET-28a(+)-PI-TK 重组质粒的双酶切鉴定

Fig. 2 Identification of pET-28a(+)-PI-TK recombinant plasmid by double restriction enzyme digestion

M: Marker; 1: pET-28a(+)-PI-TK digested by BamH I ;

2: pET-28a(+)-PI-TK digested by Hind III and BamH I

### 2.2 PI-TK 融合蛋白在大肠杆菌中的诱导表达、纯化及鉴定

选择表达菌 *E. coli* BL21( DE3 )pLysS 为宿主菌,振荡培养 10 ~ 12 h, IPTG 诱导,超声破菌后的上清液和沉淀分别经 SDS-PAGE 分析,在相对分子质量约 50 000 处出现一条明显的条带,且在上清中的表达量明显大于沉淀中,表明 PI-TK 融合蛋白主要以可溶性形式表达(图 3)。

表达产物经 His Talontm Cartridge Purification 试剂盒分离纯化后,核酸蛋白分析仪检测,其浓度约为 200 μg/ml。取 5 μl 的 PI-TK 融合蛋白进行 SDS-PAGE,考马斯亮蓝染色,可看到单一的条带,与目的蛋白大小基本一致(图 4)。Western blotting 鉴定结果亦与上述一致,表明所表达的融合蛋白为 PI-TK。

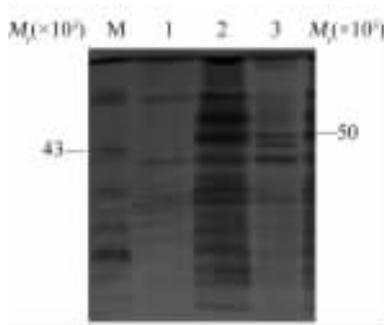


图 3 SDS-PAGE 检测细菌裂解上清中 PI-TK 融合蛋白表达

Fig. 3 SDS-PAGE analyzed PI-TK fusion protein expression in supernatant of bacteria lysis

M: Marker; 1: *E. coli* BL21; 2: Supernatant of *E. coli* BL21; 3: Cell lysis of *E. coli* BL21

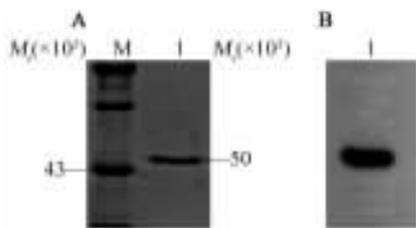


图 4 SDS-PAGE( A)和 Western blotting( B ) 鉴定 PI-TK 融合蛋白

Fig. 4 Identification of purified PI-TK fusion protein by SDS-PAGE( A )and Western blotting ( B ) analysis

M: Marker; 1: Purified PI-TK protein

### 2.3 PI-TK 融合蛋白不影响 MDA-MB-231 细胞的增殖

将不同浓度的 PI-TK 融合蛋白与 MDA-MB-231 细胞共孵育,观察 PI-TK 融合蛋白对 MDA-MB-231 细胞增殖的影响,从图 5 看出,不同浓度的 PI-TK 融

合蛋白对 MDA-MB-231 细胞的增殖没有影响。

### 2.4 PI-TK 融合蛋白联合 GCV 作用对不同细胞形态的影响

不同质量浓度的 PI-TK 融合蛋白联合 GCV 作用于实验组 MDA-MB-231 和对照组 MDA-MB-435 细胞 48 h 后,MDA-MB-231 细胞随着 PI-TK 融合蛋白质量浓度的增加,贴壁细胞的数量明显减少,细胞皱缩,形态由梭形变为圆形,细胞质和核质浓缩,核增大有部分核碎裂;对照组 MDA-MB-435 细胞增殖良好,且无明显变化。并且单独 PI-TK 或 GCV 处理组 MDA-MB-231 及 MDA-MB-435 细胞的形态也无明显变化(图 6)。

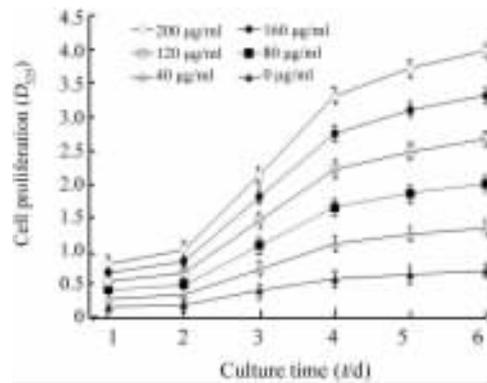


图 5 PI-TK 融合蛋白不影响 MDA-MB-231 细胞的增殖

Fig. 5 PI-TK fusion protein did not affect proliferation of MDA-MB-231 cells

### 2.5 PI-TK 融合蛋白与 MDA-MB-231 共培养后细胞内 PI-TK 融合蛋白的表达

将 PI-TK 融合蛋白与 MDA-MB-231 共培养后,流式细胞仪检测细胞内 PI-TK 融合蛋白的表达。结果(图 7)显示,PI-TK 融合蛋白与 MDA-MB-231 细胞共培养后,MDA-MB-231 细胞中 PI-TK 融合蛋白的表达率为 80. 13%,而对照组不表达 PI-TK 融合蛋白。

### 2.6 PI-TK 融合蛋白联合 GCV 对 MDA-MB-231 细胞的体外杀伤作用

将不同质量浓度的 PI-TK 融合蛋白与 MDA-MB-231、MDA-MB-435 细胞共培养 48 h 后,加入含 10 mg/L GCV 的完全培养基。CCK-8 法检测结果(图 8)显示,PI-TK 和 GCV 联合对 MDA-MB-231 细胞有明显的杀伤作用,200 μg/ml PI-TK + 10 mg/L GCV 作用的杀伤率达( 68. 9 ± 7. 57 )%,且杀伤率与融合蛋白质量浓度呈明显的剂量效应关系。PI-TK 和 GCV 联合作用对 MDA-MB-231 细胞的 IC<sub>50</sub> 值为 152. 64 μg/ml;而对 MDA-MB-435 细胞无明显杀伤

作用。结果表明,该融合蛋白对 MDA-MB-231 细胞 具有明显的靶向杀伤作用。

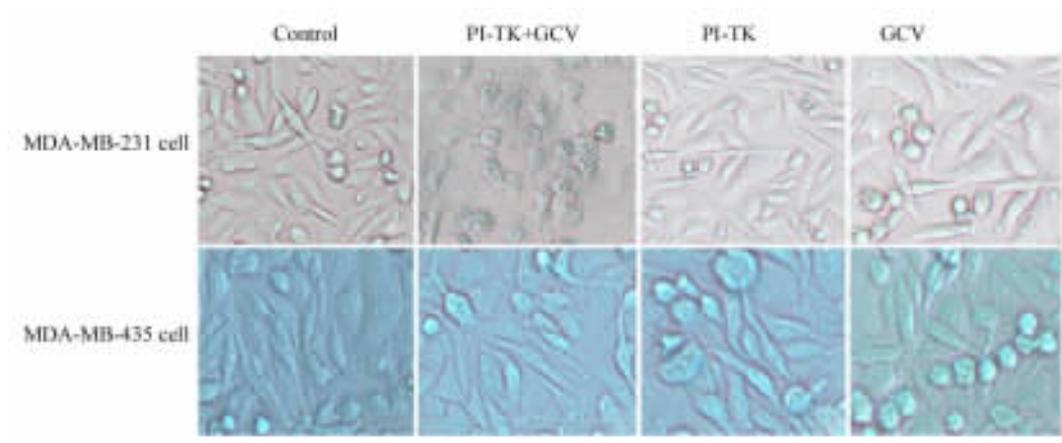


图 6 PI-TK 融合蛋白联合 GCV 对不同肿瘤细胞形态的影响( ×100 )

Fig. 6 Effect of PI-TK fusion protein and GCV on morphology of different tumor cells ( ×100 )

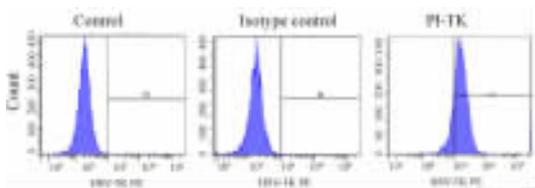


图 7 PI-TK 融合蛋白与 MDA-MB-231 细胞共培养后细胞内 PI-TK 融合蛋白的表达

Fig. 7 Expression of PI-TK fusion protein in MDA-MB-231 cells after co-cultivation with PI-TK fusion protein

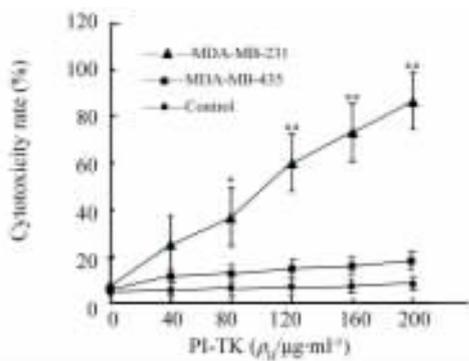


图 8 PI-TK 融合蛋白联合 GCV 对 MDA-MB-231 细胞的杀伤作用

Fig. 8 Cytotoxicity effect of PI-TK fusion protein combined with GCV on MDA-MB-231 cells

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs control group

### 3 讨论

近年来在分子生物学飞速发展的推动下,向细胞内运输蛋白或多肽药物为主的分子治疗产生了良

好的前景。近年来发现一类称为蛋白转导域( protein-transduction domain, PTD )的肽链<sup>[10-13]</sup>,其与生物活性药物偶联后,可携带原先不能进入细胞的物质穿过细胞膜,发挥其生物学效应<sup>[14]</sup>,为蛋白质的直接转导表达及调控提供了新的思路<sup>[15-17]</sup>。细胞穿透肽具有转运效率高、毒性低、对运载物的大小无明显限制、无免疫原性、不引起炎症反应,且对进入细胞的量可有效控制、使其保持在生理浓度范围等优点,因而得到广泛的应用<sup>[18-19]</sup>。

乳腺癌是一种严重威胁妇女健康的常见恶性肿瘤,发病率逐年上升,并且有年轻化趋势<sup>[20-21]</sup>。目前以手术、放疗、化疗和内分泌治疗为主的综合治疗模式可以使患者获得较高的生存率,但仍有较高的复发和转移率<sup>[22]</sup>。本课题组前期筛选出乳腺癌 MDA-MB-231 细胞特异性多肽 PI,其序列以非极性疏水性氨基酸为主,碱性氨基酸所占比例很少,有别于以往研究中的蛋白转导序列。PI 多肽转导具有 MDA-MB-231 细胞靶向性,在乳腺癌细胞间的转导效率高,达 90% 以上,有望成为基因治疗乳腺癌的载体<sup>[14]</sup>。体外实验<sup>[1]</sup>显示,乳腺癌特异性 PI 多肽还具有蛋白携带能力。

HSV-TK/更昔洛韦自杀基因系统( HSV-TK/GCV )以其具有的自杀效应在很多肿瘤治疗研究中都显示了较好的效果,其独特的“旁观者效应”<sup>[23-24]</sup>受到广大研究者的青睐。但单独应用 HSV-TK/GCV 系统尚存在不足,如仅针对分裂期细胞的杀伤效应有限、缺乏靶向性、肿瘤内部用药对远处转移肿瘤无效等<sup>[25]</sup>。

基于以上的实验基础,HSV-TK/GCV 系统和 PI

存在一定的互补性,联合 HSV-TK/GCV 系统和 PI 的靶向性基因治疗有可能提高乳腺癌的治疗效果。本课题首先通过 PCR 方法以质粒 pORF-HSV-TK 为模板扩增出目的基因 PI-TK,将 PI-TK 基因克隆到高效表达载体 pET-28a(+ )中,构建重组表达载体 pET-28a(+)-PI-TK。转化表达菌株 *E. coli* BL21(DE3) plysS, IPTG 诱导 PI-TK 融合蛋白的表达,并利用 pET28a(+ )上的 His-tag 成功获得纯化的 PI-TK 融合蛋白。进一步利用 PI-TK 融合蛋白观察了 PI 介导的 HSV-TK/GCV 自杀基因系统对人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的杀伤效应,结果发现,单独 PI-TK 对人 MDA-MB-231 细胞的形态及增殖能力均无影响。将不同浓度的融合蛋白与 MDA-MB-231、MDA-MB-435 细胞共培养后,加入 10 mg/L 的 GCV, CCK-8 法检测结果表明,PI-TK 联合 GCV 对 MDA-MB-231 细胞有明显的杀伤作用,最大杀伤率达(68.9 ± 7.57)% ,且杀伤率与 PI-TK 浓度呈明显的剂量效应关系;而 PI-TK 联合 GCV 对 MDA-MB-435 细胞无明显杀伤作用。结果说明,PI-TK 融合蛋白具有细胞靶向杀伤作用。本研究为进一步探讨乳腺癌特异性转导多肽 PI 作为靶向性载体治疗乳腺癌奠定了实验基础。

#### [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] Li WQ, Dong J, Zhao DP, et al. Expression of fusion peptide with high affinity to human breast cancer and its targeting transportation effect [ J ]. *Basic Clin Med*, 2009, 29( 3 ): 229-233.
- [ 2 ] 董坚, 刘为青, 蒋爱梅, 等. 乳腺癌细胞靶向特异性多肽研究 [ J ]. *科学通报*, 2008, 53( 1 ): 417-425.
- [ 3 ] Dong J, Liu WQ, Jiang AM, et al. A novel peptide, selected from phage display library of random peptides, can efficiently target into human breast cancer cells [ J ]. *Chin Sci Bull*, 2008, 53( 6 ): 860-867.
- [ 4 ] Dong J, Yang J, Chen MQ, et al. A comparative study of gene vaccines encoding different extracellular domains of the vascular endothelial growth factor receptor 2 in the mouse model of colon adenocarcinoma CT-26 [ J ]. *Cancer Biol Ther*, 2008, 7( 4 ): 502-509.
- [ 5 ] Pan X, Li ZS, Xu GM, et al. Adenovirus-mediated gene transfer in the treatment of pancreatic cancer [ J ]. *Pancreas*, 2003, 26: 274-278.
- [ 6 ] 胡铁山, 李贵涛. HSV-TK/GCV 自杀基因系统对骨肉瘤细胞体外杀伤效应 [ J ]. *第四军医大学学报*, 2004, 25( 3 ): 204-207.
- [ 7 ] 谢苏庆, 许国铭, 李兆申, 等. 逆转录病毒介导单纯疱疹病毒-胸苷激酶基因治疗胰腺癌的实验研究 [ J ]. *中华消化杂志*, 2000, 20( 1 ): 11-13.
- [ 8 ] Sambrook J, Russell D. *分子克隆实验指南* [ M ]. 第 3 版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [ 9 ] 杨生玺, 张丽珊. HSV-TK 基因对乳腺癌细胞的体外作用 [ J ]. *第四军医大学学报*, 2005, 26( 15 ): 1386.
- [ 10 ] Green M, Loenstein PM. Autonomous functional domain of chemically synthesized human immunodeficiency virus Tat trans activator protein [ J ]. *Cell*, 1988, 55( 6 ): 1179-1188.
- [ 11 ] Frankel AD, Pabo CO. Cellular uptake of the Tat protein from human immunodeficiency virus [ J ]. *Cell*, 1988, 55( 6 ): 1188-1193.
- [ 12 ] Xiong F, Xiao SB, Peng FN, et al. Herpes simplex virus VP22 enhances adenovirus-mediated microdystrophin gene transfer to skeletal muscles in microdystrophin deficient ( mdx ) mice [ J ]. *Hum Gene Ther*, 2007, 18( 6 ): 490-501.
- [ 13 ] Brian A, Richard T, Patrick SS. A Tat-streptavidin fusion protein directs uptake of biotinylated cargo into mammalian cells [ J ]. *Protein Eng Des Sel*, 2005, 18( 3 ): 147-152.
- [ 14 ] Sub YJ, Tae JY, Karp HS, et al. Characteristics of HIV-Tat protein transduction domain [ J ]. *J Microbiol*, 2004, ( 42 ): 328-335.
- [ 15 ] Hong FD, Clayman GL. Isolation of a peptide for targeted drug delivery into human head and neck solid tumors [ J ]. *Cancer Res*, 2000, 60( 23 ): 6551-6556.
- [ 16 ] Larocca D, Burg MA, Jensen-Pergakes K, et al. Evolving phage vector for cell targeted gene delivery [ J ]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2002, 3( 1 ): 45-57.
- [ 17 ] Urbanelli L, Ronchini C, Fontana L, et al. Targeted gene transduction of mammalian cells expressing the HER2/neu receptor by filamentous phage [ J ]. *J Mol Biol*, 2001, 313( 5 ): 965-976.
- [ 18 ] Doris PA. Renal proximal tubule sodium transport and genetic mechanisms of essential hypertension [ J ]. *Hypertens*, 2000, 18( 5 ): 509-519.
- [ 19 ] Strazzullo P, Galletti F, Barba G. Altered renal handling of sodium in human hypertension [ J ]. *Hypertension*, 2003, 41( 5 ): 1000-1005.
- [ 20 ] Ross L, Bette can, Rowan T, et al. Low-fat dietary pattern risk of invasive breast cancer [ J ]. *JAMA*, 2006, 295( 6 ): 629-642.
- [ 21 ] Pearson G, Robinson F, Beers GT, et al. Mitogen-activated protein ( MAP ) Kinase pathways: Regulation and physiological functions [ J ]. *Endocr Rev*, 2001, 22( 2 ): 153-183.
- [ 22 ] Lippert C, Seeger H, Mueck AO. The effect of endogenous estradiol metabolites on the proliferation of human breast cancer cells [ J ]. *Life Sci*, 2003, 72( 8 ): 877-883.
- [ 23 ] Freeman SM, Abboud CN, Whartenby KA, et al. The "bystander effect": Tumor regression when a fraction of the tumor mass is genetically modified [ J ]. *Cancer Res*, 1993, 53( 21 ): 5274-5283.
- [ 24 ] Culver KW, Ram Z, Wallbridge S, et al. *In vivo* gene transfer with retroviral vector producer cells for treatment of experimental brain tumors [ J ]. *Science*, 1992, 256( 5063 ): 1550-1552.
- [ 25 ] Burrow FJ, Core M, Smiley WR, et al. Purified herpes simplex virus thymidine kinase retroviral particles; characterization of bystander killing mechanisms in transfected tumor cells [ J ]. *Cancer Gene Ther*, 2002, 9( 1 ): 87-95.

[ 收稿日期 ] 2011-04-15

[ 修回日期 ] 2011-05-28

[ 本文编辑 ] 王莹