

三种连接子多肽对抗癌融合蛋白 翻译后剪切效果比较研究*

李红艳^{1, 2)} 周志明²⁾ 潘强¹⁾ 杨冬梅¹⁾ 顾锦法²⁾ 沈佳妮¹⁾ 王世兵¹⁾ 章康健^{2)**}

⁽¹⁾ 浙江理工大学生命科学学院, 新元医学与生物技术研究所, 杭州 310018;

⁽²⁾ 中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所, 上海 200031)

摘要 IL-24 和 Smac 为靶向癌症的多基因治疗研究中重要的候选基因。在构建 IL-24 和 Smac 双基因表达载体过程中, 选择一个稳定高效的连接子非常关键。利用三个不同的连接子多肽序列 IETD、EEED、F2A 构建三个真核表达质粒 pcDNA3.1(+)-IL-24-IETD-Smac、pcDNA3.1(+)-IL-24-EEED-Smac、pcDNA3.1(+)-IL-24-F2A-Smac, 并联合 5- 氟尿嘧啶(5-FU)处理研究各连接子介导的融合蛋白剪切效果。上述实验结果表明, 在三种 IL-24-linker-Smac 双基因表达载体中, F2A 连接子剪切效果最佳且与 caspase 活性成正相关。IETD、EEED 连接子介导的融合蛋白都有一定的剪切, 但 IETD/EEED 多肽影响了上游 IL-24 蛋白的半衰期, 加速了剪切后 IL-24 蛋白的泛素化降解。本研究为构建靶向癌症应用的双基因或多基因载体提供了设计参考。

关键词 连接子多肽, IETD, EEED, F2A, caspase 活性

学科分类号 Q2, Q7

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00489

近年来, 在癌症基因治疗过程中, 多基因联合治疗成为一个重要的研究方向, 选择良好的两个或多个基因靶向癌症往往能获得很好的抗癌效果。Liu 等^[1-3]利用病毒携带双基因, 如 TRAIL、MnSOD、IL-24、Smac 等, 靶向肿瘤细胞取得了很好的抗肿瘤效果。Pei 等^[4]、Zhang 等^[5]、Wang 等^[6]利用腺病毒携带双基因在细胞水平和动物体内癌移植肿瘤模型中能抑制肿瘤的进一步生长。

IL-24 为一种细胞因子, 属于 IL-10 家族, 它可以选择性诱导细胞 caspase3/8 活化, 并诱导癌症细胞凋亡, 而对正常细胞无毒副作用或极其微小, 因此在癌症的基因治疗研究中得到广泛应用^[7]。Zhu 等^[8]和 Wei 等^[9]利用腺病毒载体携带 IL-24 在癌症的治疗中取得很好的抗肿瘤效果, ING241 (Ad-IL-24)目前进入临床 2 期。Smac 基因也广泛受到关注, 它位于线粒体中, 可以与 IAPs 家族成员 XIAP、c-IAP-1、c-IAP-2、survivin 等蛋白分子普遍反应, 通过除去 IAPs 的抑制作用使 caspase 酶原活化, 进而达到促使细胞凋亡的作用^[10-11]。Pei 等^[4]和 Pan 等^[12]在腺病毒载体中携带 Smac 基因, 能显

著诱导肝癌细胞 caspase 活化, 并在肝癌移植肿瘤模型中取得很好的治疗效果。

目前介导双基因或多基因表达的方法主要有两种: 第一种是同一载体携带两个不同的基因表达框, 即在一个载体上利用 2 个启动子各驱动表达一个基因, 这种构建方法是根据不同启动子在不同转录水平上进行基因的表达, 一般可以保证 2 个基因的高效表达, 但是在靶向肿瘤的相关应用研究中由于载体(一般为病毒载体)特性表现出不足之处, 如腺病毒载体对插入基因的大小有容量限制, 而痘病毒载体中可搭载的外源基因容量大, 但要求插入的基因必须使用病毒自身相关的启动子, 这也限制了

* 浙江理工大学项目(1204807-Y), 浙江理工大学科研启动基金(11610032611303), 国家重点基础研究发展计划(973)(2010CB529901, 2011CB510100), 浙江省自然科学基金(LY13H080005)和上海自然科学基金(13ZR1446300)资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 021-54921139, E-mail: zhangkangjian@sibcb.ac.cn

收稿日期: 2013-12-04, 接受日期: 2014-05-26

表达多个完整外源基因在此领域的应用;第二种是两个基因共用一个启动子,比较典型的是利用 IRES 序列连接前后两个基因,此种构建方法则是在翻译水平上进行调节控制, IRES (internal ribosome entry site)为内核糖体进入序列,它可以翻译一条 mRNA 上的两个开放阅读框,相对于双表达盒构建方式来说一定程度上降低了外源插入片段的大小,但是不同病毒来源的 IRES 序列对其下游的基因表达效率各不相同,往往表现为 IRES 序列上游基因的蛋白质表达量高于下游基因的表达量,最终导致一个 mRNA 上翻译的两个蛋白质表达量极其不平衡,严重影响了该种构建方式在肿瘤多基因靶向治疗领域的应用。因此,在靶向肿瘤的多基因治疗载体构建中,尽可能结合载体容量和特性,又尽可能多地携带外源抗癌基因并保证其各个基因表达蛋白质的效率,这些方面的探究工作值得我们重视。本研究着眼于在翻译后水平寻找高效剪切的连接子多肽如 IETD、EEED、F2A 等,并对它们进行比较研究,期望为靶向肿瘤的多基因治疗提供一些载体构建设计方面的参考。

IETD 连接子是 caspase 8 的特异识别位点^[13],在应用到靶向肿瘤的基因治疗中 Wang 等^[6]用 IETD 连接 TRAIL 和 Smac 两个基因构建的溶瘤腺病毒 ZD55-TRAIL-IETD-Smac 有很好的剪切效果且能在体外、体内抑制肝癌细胞增殖。在细胞凋亡研究过程中发现,EEED 连接子介导 Sm-F 蛋白剪切,剪切后依旧与 U snRNP 复合物相连接,且剪切活性与 caspase1, 3, 8 相关^[14],目前未见到 EEED 应用于肿瘤多基因治疗的研究报道。2A 连接子是一种自剪切多肽,多种不同的病毒中都含有 2A 肽段,以口蹄疫病毒(FMDV)2A 研究最为典型。FMDV 2A 以其自剪切效率高、上下两个基因表达平衡性好以及结构短小等优点使其在载体构建过程中成为很好的连接工具。人们发现,在 2A 前面加入一个 Furin 蛋白酶酶切位点 RAKR 之后可以去除 2A 自剪切后残留在前面蛋白 C 端的序列^[15],提高连接子的剪切效率,同时也避免 2A 残留序列影响前端蛋白的表达,本文中提到的 F2A 连接子即在 2A 多肽前加入了 Furin 酶切位点。Fang 等^[15]利用 F2A 连接子在慢病毒载体中连接表达单克隆抗体 DC101 的轻链和重链,使得全长的单克隆抗体可以在体内长时间、稳定高效地表达并取得显著的抗肿瘤效果。此外, Liu 等^[16]初步阐述了 FMDV 2A 的特性、剪切活力及其在构建多顺反子载体中的应用。同时

Deszcz 等^[17]发现, caspase 抑制剂能够抑制人鼻病毒 HRV2 中 2A 自剪切酶的活性。

本研究以 IL-24 和 Smac 双基因载体构建为基础,利用上述三个连接子多肽分别连接 IL-24(上游基因)、Smac(下游基因)并联合 5-FU 处理,探究各个连接子多肽在翻译后水平对上下游抗癌蛋白剪切的影响,为该双基因载体筛选出最佳的连接子,同时为靶向癌症的双基因或多基因治疗载体的构建提供了设计参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株和细胞株。 pcDNA3.1(+)真核表达载体、*E. coli* DH5 α 菌株由中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所刘新垣实验室保存; 293T 细胞、HeLa 细胞购于中国科学院上海细胞库。

1.1.2 主要试剂。 KOD-plus/Taq 酶、dNTPs、Ligation high 连接酶等购自 TOYOBO 公司; 质粒 DNA 小量抽提试剂盒、DNA 琼脂糖凝胶回收试剂盒、PCR 产物液体回收试剂盒等购自 Axygen 公司; 质粒 DNA 大量抽提试剂盒购自于天根生物公司; Effectene Transfection Reagent 购自 Qiagen 公司; DMEM 培养液购自于 GIBCO 公司; 5-FU 购于 Sigma 公司; Z-VAD-FMK、MG132、PMSF、细胞裂解液购于碧云天动物药业有限公司; GAPDH 抗体购于北京康为世纪生物科技有限公司; Smac、Cleaved Caspase 3/8 抗体购于 Cell Signaling Technology 公司; IL-24 抗体购于 GenHunter 公司; PARP 抗体购于 Santa Cruz 公司。

1.2 表达质粒的构建

1.2.1 融合基因 IL-24-F2A-Smac 的构建。

引物序列为: IL-24-sense, CCAAGCTT ATGAATTTTCAACAGAGGCTG; IL-24-F2A-antisense, **ATCTCCAGC GAGCTTGAGAAGATCG-AAGTTTAGAGTCTGCTTTACTGGAGCCCTCTT-AGCTCTGAGCTTGTAGAATTTCTGC**; F2A-Smac-sense, **AAGCAGACTCTAAACTTCGATCTTCTC-AAGCTCGCTGGAGATGTTGAGAGCAACCCAG-GTCCAGCGGTTTCCTATTGCACAGAAATCAGAG**; Smac-antisense, GC TCTAGA TCAATCCTC-ACGCAGGTAGG. 黑色加粗字体为 F2A 连接子序列。

以实验室现有质粒 pCB-IL-24 为模板, 利用

IL-24 sense 和 IL-24-F2A antisense 引物, 进行 PCR 反应, 获得 IL-24-F2A (部分序列) 基因; 以 pCB-Smac 质粒为模板, 利用 Smac-F2A sense 和 Smac antisense 引物, 进行 PCR 反应, 获得 F2A-Smac 基因; 然后再分别以上述获得的两个基因为模板, 利用 IL-24 sense 和 Smac antisense 引物, 进行融合 PCR, 得到融合目的基因 IL-24-F2A-Smac.

PCR 反应程序: 94℃ 预变性 2 min; 94℃ 变性 30 s, 58℃ 退火 30 s, 68℃ 延伸 1 min, 30 个循环; 68℃ 10 min, 15℃ 保温. 取 2 μl 进行电泳鉴定, 液体过柱回收目的基因片段(1 260 bp).

除此之外, 我们利用上述二次重叠 PCR 的方法构建了 IL-24-IETD-Smac 和 IL-24-EEED-Smac 融合基因. 其中 IL-24 Sense 和 Smac antisense 共用, 其他引物序列为: IL-24-IETD antisense, GCCAACTCTTCAGAGGTCTGTCTCAATGAGCTTGTAG-AATTTCTGCA; IETD-Smac sense, GAAATTCTACAAGCTCATTGAGACAGACCTCTGAAGAGTTGGCTGTCTG; IL-24-EEED antisense, GCAATAGGAACCGCATCTTCTTCTCGAGCTTGTAGAATTCTCTG; EEED-Smac sense, GAAATTCTACAAGCTCGAGGAAGAAGATGCGGTTCTTATTGC. 黑色加粗字体分别为 IETD 和 EEED 连接子序列.

1.2.2 pcDNA3.1(+)-IL-24-F2A-Smac 质粒的构建.

将 pcDNA3.1(+)-vector 用 *Hind* III 和 *Xba* I 进行双酶切得到 5 384 bp 的大片段纯化回收. 再将得到的融合基因 IL-24-F2A-Smac、IL-24-IETD-Smac 和 IL-24-EEED-Smac 分别进行 *Hind* III 和 *Xba* I 双酶切, 得到大小分别为 1 260、1 188 和 1 188 bp 的小片段纯化回收.

将上述两个纯化产物以一定的比例加到 EP 管中, 加入 Ligation high, 16℃ 水浴连接过夜. 经过转化、挑单克隆后, 摇菌并小量制备质粒, 利用 *Hind* III 和 *Xba* I 双酶切选出阳性质粒, 测序鉴定获得正确质粒 pcDNA3.1 (+)-IL-24-F2A-Smac、pcDNA3.1(+)-IL-24-IETD-Smac 和 pcDNA3.1(+)-IL-24-EEED-Smac.

1.3 细胞转染

293T、HeLa 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 在 5% CO₂、37℃ 细胞培养箱中培养. 转染前一天将细胞接种于 6 孔板中, 次日细胞长至 70%~80% 时开始转染. 具体转染步骤见 Effectene®

Transfection Reagent 转染试剂盒说明书. 8 h 后换新鲜培养液.

1.4 样品处理

质粒转染细胞 24 h 后, 分别加入 5-FU、Z-VAD-FMK 和 MG132 处理一定时间后裂解细胞进行下一步蛋白质印迹检测.

1.5 蛋白质印迹

弃 6 孔板中的细胞培养液, 加入 PBS 洗 2 遍, 将 PBS 去除干净后, 加入 100 μl 裂解液, 在冰上裂解细胞后用细胞刮刀刮下细胞, 收集到已准备好的 EP 管中, 充分震荡后, 4℃、12 000 r/min 离心 10 min. 取上清, 用 Lorry 法测定蛋白质浓度. 取 80 μl 蛋白与 1/4 体积的 5×电泳加样缓冲液混合, 100℃ 煮沸 10 min. 上样, 电泳(浓缩胶电压 80 V, 分离胶电压 120 V). 电泳后转膜至 PVDF 膜上, 然后用 5% 的脱脂牛奶室温封闭 1 h 后, 一抗、二抗进行孵育, 最后化学发光显影进行蛋白质表达检测.

1.6 MTT 检测细胞存活率

将 HeLa 细胞铺于 6 cm 培养皿中, 次日长到 80%~90% 进行转染. 转染步骤见 Effectene® Transfection Reagent 转染试剂盒说明书. 24 h 后将细胞用胰酶消化, 将其铺入 96 孔板中, 每孔 3 000 个细胞, 待其贴壁后加入 5-FU 进行处理, 24 h 后检测细胞存活率. 每孔加入 20 μl MTT (4 g/L), 37℃, 5% CO₂ 孵育 4 h, 吸去上清, 每孔加入 150 μl DMSO, 在摇床上震荡 15 min 后用酶标仪于 570 nm 下检测吸光度, 经过计算分析得出细胞存活率. 计算公式如下:

$$\text{细胞存活率} = \frac{A_{570}(\text{处理组}) - A_{570}(\text{调零组})}{A_{570}(\text{对照组}) - A_{570}(\text{调零组})} \times 100\%$$

2 结 果

2.1 重组质粒 pcDNA3.1 (+)-IL-24-F2A-Smac、pcDNA3.1(+)-IL-24-IETD-Smac、pcDNA3.1(+)-IL-24-EEED-Smac 的构建

2.1.1 融合基因 IL-24-F2A-Smac、IL-24-IETD-Smac、IL-24-EEED-Smac 的扩增. 用 IL-24 sense 和 Smac antisense 引物扩增的产物大小与理论值大小相符(图 1a).

2.1.2 重组质粒 pcDNA3.1 (+)-IL-24-F2A-Smac、pcDNA3.1(+)-IL-24-IETD-Smac、pcDNA3.1(+)-IL-24-EEED-Smac 的酶切鉴定. 将上述 3 个重组质

粒进行 *Hind*Ⅲ 和 *Xba*I 双酶切, 得到的片段大小 (图 1b) 与理论值相符. 3 个质粒经测序、比对后, 序列完全正确.

2.1.3 真核表达载体构建模式图. 利用 CMV 启动子表达 IL-24 和 Smac 两个基因, 两个基因之间分别用 IETD、EEED 和 F2A 进行连接. 其中 IETD 和 EEED 连接子剪切是发生在 IETD/EEED 与下游 Smac 蛋白起始氨基酸序列的 AVPI 四肽之间, 即

在氨基酸 D 与 A 之间剪切, 剪切之后 IETD/EEED 短肽会残留在 IL-24 的 C 端(图 1c). F2A 连接子剪切分为两个步骤: 一个剪切位点是在 2A 自剪切位点处进行剪切, 然后将一个脯氨酸残基残留在 Smac 蛋白的 N 端; 另一个是 Furin 蛋白酶酶切位点, 酶切之后可以去除 2A 自剪切后残留在 IL-24 C 端的氨基酸序列 (图 1c).

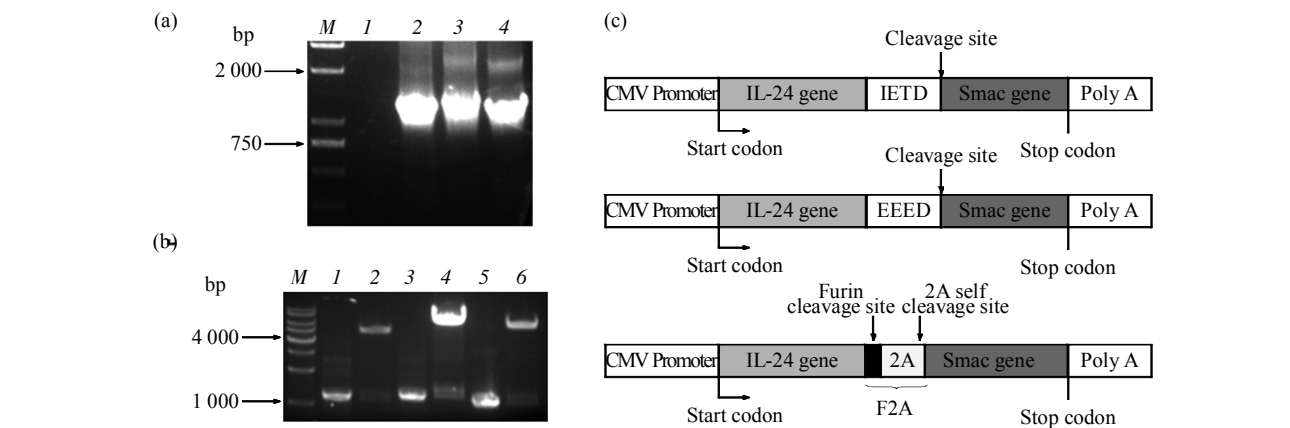


Fig. 1 Identification of the plasmids' construct and the schemachart of fusion genes expression cassettes

(a) *M*: DNA marker; *I*: Negative control; 2: pcDNA3.1(+)-IL-24-IETD-Smac; 3: pcDNA3.1(+)-IL-24-F2A-Smac; 4: pcDNA3.1(+)-IL-24-EEED-Smac. (b) *M*: DNA maker; *I*: IL-24-IETD-Smac positive control; 2: pcDNA3.1(+)-IL-24-IETD-Smac; 3: IL-24-F2A-Smac positive control; 4: pcDNA3.1(+)-IL-24-F2A-Smac; 5: IL-24-EEED-Smac positive control; 6: pcDNA3.1(+)-IL-24-EEED-Smac. (c) The schemachart of fusion genes expression cassettes in which IL-24 and Smac fusion protein with indicated cleaved site.

2.2 F2A 连接子剪切效果优于 IETD、EEED 连接子

为了检测 IETD、EEED、F2A 3 个连接子剪切效果, 将构建的 3 个真核表达质粒转入 293T 中, 转染 24、48、72 h 后收集蛋白, 用蛋白质印迹检测连接子介导的融合蛋白的剪切效果. 结果显示, F2A 连接子介导的融合蛋白剪切效果最好, 在各个时间点都有剪切且剪切随时间推移增加(图 2). IETD/EEED 连接子介导的融合蛋白剪切效果不佳, 与 F2A 连接子介导的融合蛋白一起检测时基本检测不到剪切蛋白(图 2). 以上实验结果表明, 在 3 个连接子 IETD、EEED、F2A 中, F2A 连接子介导的蛋白剪切效果最好.

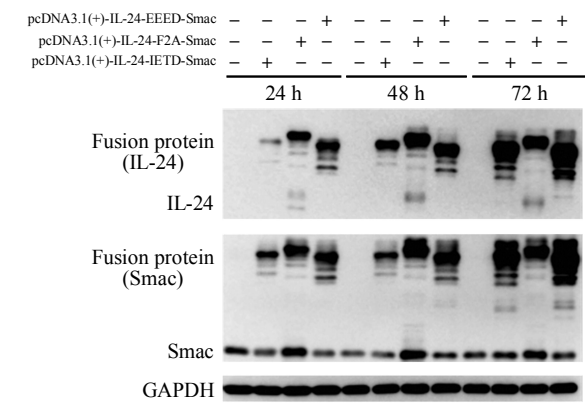


Fig. 2 The cleavage efficiency of each linker peptide at various time points

The detection on the cleavage efficiency of each linker by Western blot. The three kinds of plasmids was transfected into 293T cells for 24 h, 48 h and 72 h, respectively. The cleaved IL-24 and the Smac protein mediated by F2A linker peptide can be detected at each time points, but be not detected in the other two groups of IETD and EEED constructs.

2.3 F2A 的剪切效率依赖于 caspase 活性

2.3.1 Caspase 的活化提高了 F2A 连接子的剪切效率并显著优于 IETD/EEED 连接子. 5-FU 是一种常用的化疗药物. Ohtani 等^[18]研究发现 5-FU 是通过激活 caspase 级联反应包括激活 caspase 1, 3 and 8 来诱导凋亡. Yi 等^[19]也发现 5-FU 通过 caspase 8 信号转导途径诱导 HepG2 的凋亡. 引言中所述各连接子剪切活性均与激活的 caspase 有关, 因此加入 5-FU 增加 caspase 的剪切, 检测各连接子的剪切效率是否发生改变. 结果发现, 经过 5-FU 处理, caspase 3/8 明显活化, F2A 连接子介导的融合蛋白

显著减少, 同时剪切出来的 IL-24/Smac 蛋白量明显增多, 可见 caspase 激活后显著增强了 F2A 的剪切效率(图 3a), 同条件下平行比较发现其剪切效果显著优于 IETD/EEED 连接子. 值得注意的是, 在 5-FU 处理下, IETD/EEED 连接子介导的双融合蛋白均有不同程度的减少, 其下游 Smac 蛋白剪切量增加, 却没有检测到剪切的 IL-24 蛋白(图 3a). 上述结果表明: caspase 活化有利于 3 个连接子多肽的剪切, 同时 caspase 激活可明显增强 F2A 连接子的剪切效率, 并显著优于 IETD/EEED.

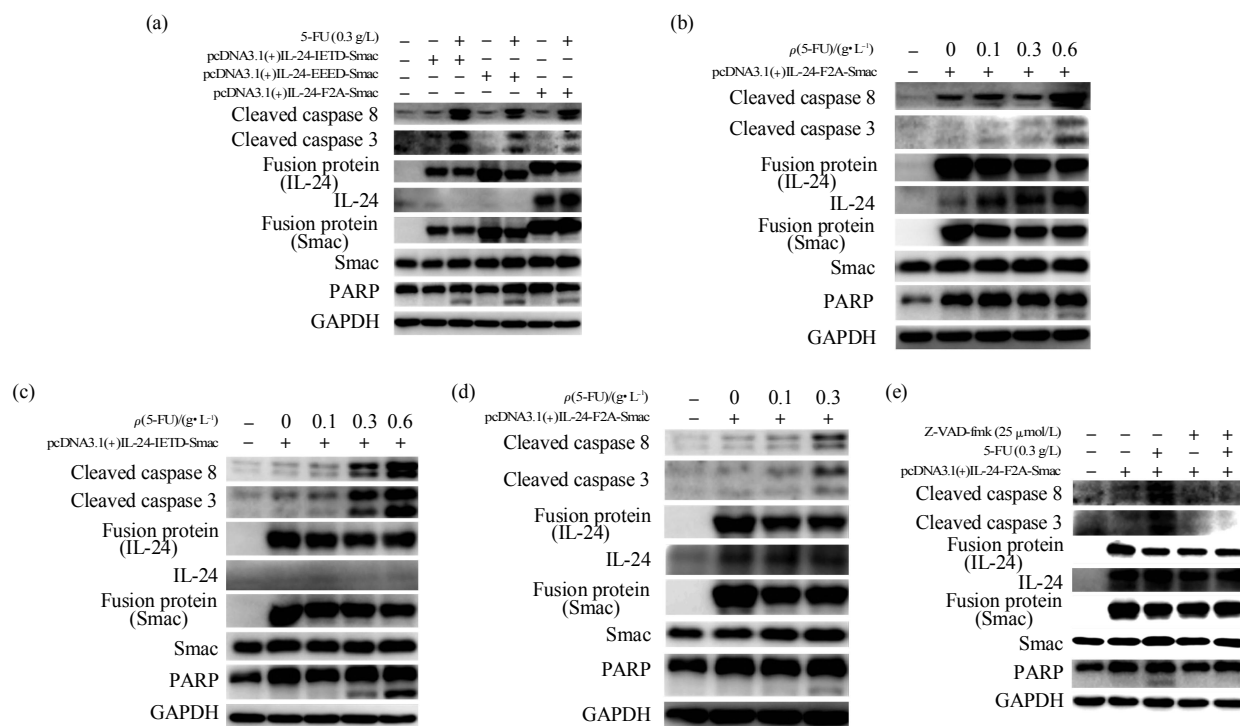


Fig. 3 The cleavage efficiency of each linker after treated by 5-FU

(a) HeLa cells transfected with the pcDNA3.1(+) IL-24-IETD-Smac, pcDNA3.1(+) IL-24-EEED-Smac and pcDNA3.1(+) IL-24-F2A-Smac for 24 h, then be added 5-FU (0.3 g/L) for 24 h. (b~d) HeLa cells transfected with the pcDNA3.1(+) IL-24-IETD-Smac, pcDNA3.1(+) IL-24-EEED-Smac and pcDNA3.1(+) IL-24-F2A-Smac for 24 h respectively, then be added 5-FU (0.1 g/L, 0.3 g/L, 0.6 g/L) for 24 h. (e) HeLa cells transfected with the pcDNA3.1(+) IL-24-F2A-Smac for 24 h, then be added 5-FU (0.3 g/L) and Z-VAD-FMK(25 μ mol/L) for 24 h.

2.3.2 F2A 连接子的剪切效率与 caspase 活化成正相关.

由于 5-FU 的加入增加了 caspase 的活化, 增加了 F2A 连接子的剪切效率, 那么 F2A 的剪切效果的增加程度与 5-FU 是否存在一定的剂量依赖性? 随着 5-FU 剂量的增加, caspase 的活化程度逐渐增加, 结果发现 F2A 连接子剪切效率也逐渐提高(图 3b). IETD、EEED 介导的两个蛋白中 Smac

蛋白逐渐增多, IETD 连接子介导表达载体中仍旧没有检测到 IL-24 蛋白(图 3c), 尽管在 EEED 连接子介导表达载体中能够检测到少量的 IL-24 蛋白, 却没有逐渐增多的迹象(图 3d). 以上实验表明: F2A 连接子的剪切效率与 caspase 活性成正相关.

为了证明 F2A 的蛋白剪切效率确实与活化的 caspase 有关, 加入 caspase 抑制剂 Z-VAD-FMK 抑制 caspase 的活化, 检测 F2A 的剪切效率的变化.

结果显示: 只有加入 5-FU 时 caspase 有明显的剪切, 加入抑制剂后 caspase 的活化受到抑制; 且加入抑制剂后 IL-24 和 Smac 蛋白与只加入 5-FU 处理 (第 3 条泳道) 时相比检测到蛋白量降低 (图 3e), 说明 F2A 连接子的剪切效率确实与 caspase 的活化相关.

2.4 IETD/EEED 连接子多肽加剧了上游 IL-24 蛋白泛素化降解

上述研究结果显示, 提高 caspase 剪切程度可以提高 IETD 或是 EEED 的剪切效率. 而提高 caspase 活性, 在 IL-24-IETD/EEED-Smac 融合蛋白表达系统中, 可以检测到融合蛋白的量逐渐减少, Smac 蛋白量逐渐增多, 而 IL-24 蛋白却检测到很少或是没有, 说明两个上下游蛋白检测到量的差异是出现在剪切过程之后. 文献报道, IL-24 蛋白可通过泛素化降解^[20], 猜测是否是由于 IETD/EEED

剪切后残留在 IL-24 蛋白 C 端引起 IL-24 的泛素化降解, 才导致检测不到或是很少的 IL-24 蛋白. 为了初步验证猜想, 将样品用蛋白酶体抑制剂 MG132 (Z-Leu-leu-leu-CHO) 进行处理, 检测上游 IL-24 蛋白的剪切量是否会发生回复. 结果显示: 随着 MG132 处理时间的增加, IETD/EEED 连接子介导的两个上下游蛋白中, 上游 IL-24 蛋白的剪切量逐渐增加, 下游 Smac 蛋白没有明显变化, caspase 活化程度也没有明显改变. 同时, 在单独 5-FU 处理下, 对于 IL-24 的剪切量, EEED 相较于 IETD 较为显著, 说明在本构建中, EEED 介导的剪切效率略优于 IETD (图 4a, b). 综上所述, 可以说明在 IL-24-linker-Smac 融合蛋白表达系统中, IETD/EEED 短肽的残留加剧了上游 IL-24 蛋白的泛素化降解, 而下游 Smac 蛋白却没有受到影响.

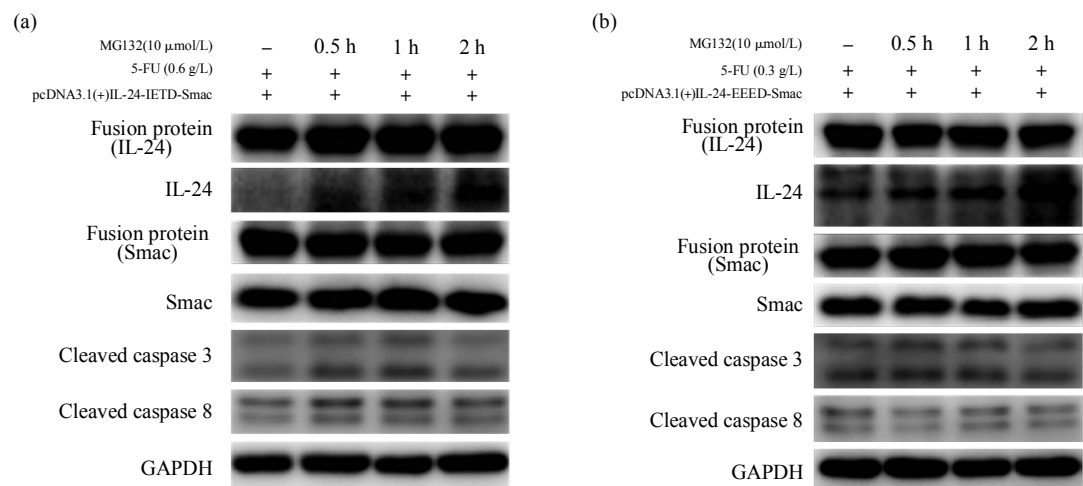


Fig. 4 IL-24 protein with significant degradation regulated by the ubiquitin-proteasome system

(a) HeLa cells transfected with pcDNA3.1(+) IL-24-IETD-Smac for 24 h; then be added MG132 for 0.5 h, 1 h and 2 h. (b) HeLa cells transfected with pcDNA3.1(+) IL-24-EEED-Smac for 24 h; then be added MG132 for 0.5 h, 1 h and 2 h.

2.5 化疗药物增强了 IL-24-F2A-Smac 融合基因的杀伤作用

在 IL-24-linker-Smac 融合蛋白表达系统中, F2A 连接子效果最佳且加入 5-FU 后提高了剪切效率. 那么 5-FU 提高 F2A 的剪切效率是否也可以增强其对肿瘤细胞的杀伤效果. 经过 MTT 检测, 发现不管在 0.1 g/L 还是 0.6 g/L 的 5-FU 作用下, 融合基因联合 5-FU 处理组对肿瘤的杀伤效果都明显优于各单独处理组 (图 5a, b). 这一增强杀伤肿瘤的

生物学表型, 佐证了 caspase 的活化确实提高了 F2A 介导的融合抗癌蛋白的剪切效果, 进而提高了总体的抗癌效果, 其杀伤作用机制可能是由于自然状态下细胞内少量活化的 caspase 和 F2A 剪切得到的 IL-24 和 Smac 蛋白可以引起细胞较少的凋亡效应. 而 5-FU (本身也可以诱发凋亡) 的处理促进了细胞内的 caspase 活化, 进而增强了 F2A 的剪切效率, 剪切出大量的具有抗癌活性的 IL-24 和 Smac 蛋白, 从而引起更大的凋亡效应 (图 5c).

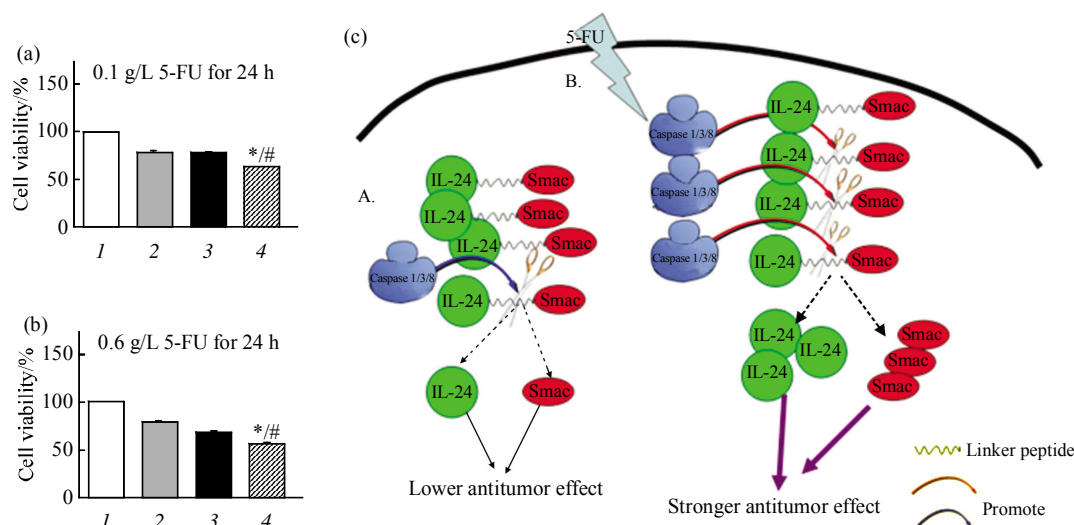


Fig. 5 The cleaved efficiency of F2A enhanced by 5-FU is linked to stronger antitumor effect

(a, b) HeLa cells transfected with pcDNA3.1(+) IL-24-F2A-Smac for 24 h, and then planted into 96well plate with 3000 cells each well. Then, 5-FU (0.1 g/L or 0.6 g/L) was added. The untreated HeLa cells was used as control. After 24 h, cells were detected by MTT assay. 1: Mock; 2: pcDNA3.1(+) IL-24-F2A-Smac; 3: 5-FU; 4: pcDNA3.1(+)IL-24-F2A-Smac+5-FU. (c) The schemachart of the possible mechanism in stronger antitumor effect of anti-cancer proteins mediated by F2A linker peptide. * $P < 0.05$, pcDNA3.1(+)-IL-24-F2A-Smac+5-FU vs pcDNA3.1(+)-IL-24-F2A-Smac; # $P < 0.05$, pcDNA3.1(+)-IL-24-F2A-Smac+5-FU vs 5-FU.

3 讨 论

在癌症的靶向生物治疗过程中, 多基因治疗将成为今后重要的发展趋势之一. 而在多基因载体构建设计方法研究中, 过去 IRES 元件构建的多顺反子普遍受到人们的认可, 但是在多种细胞中 IRES 下游基因的起始效率很不稳定, 加上 IRES 序列较长, 影响了载体装载外源基因的容量, 所以在很大程度上限制了其应用. 目前在翻译后水平寻找理想的连接子是多基因载体构建过程中一个重要的研究方向.

本研究中, 为了在 IL-24 和 Smac 双基因载体构建中寻找一个合适的连接子, 构建了分别由 3 个连接子 IETD、EEED、F2A 连接的真核表达质粒 pcDNA3.1(+)-IL-24-IETD-Smac、pcDNA3.1(+)-IL-24-EEED-Smac、pcDNA3.1(+)-IL-24-F2A-Smac, 并联合化疗药物 5-FU 共同处理, 通过蛋白质印迹检测各个连接子的剪切情况. 结果表明, F2A 连接子剪切效果最好(图 3), 且随着 caspase 活化程度的增加, 蛋白剪切效率逐渐增加; 抑制 caspase 活性, F2A 剪切效率减弱, 说明 F2A 连接子的剪切效率依赖于 caspase 的活化(图 3e); IETD/EEED 连接子较 F2A 剪切效率较低, 在 5-FU 处理 caspase 激活

的状态下, 融合蛋白逐渐减少, 检测到的 Smac 蛋白也有所增加, 这也提示 IETD/EEED 连接子与 caspase 活化成正相关(图 3). 但是值得注意的是, 检测到连接子上游的 IL-24 蛋白的量却始终没有增多的迹象. 由于 IL-24 蛋白可通过泛素化降解^[20], 我们试图加入蛋白酶体抑制剂 MG132 处理, 结果检测到 IL-24 蛋白剪切量回复性增加(图 4), EEED 相对于 IETD 较为显著, 说明在本构建中, EEED 介导的剪切效率优于 IETD, 同时我们的实验结果也说明相较于 F2A 连接子多肽, 发生剪切后 IETD/EEED 短肽残留在 IL-24 蛋白的 C 端影响了其稳定性, 加剧了 IL-24 的泛素化降解.

IL-24 蛋白 C 端残留的 IETD 或是 EEED 短肽加速 IL-24 蛋白降解的原因可能有以下几个方面: a. IETD 或是 EEED 的残留导致 IL-24 整个蛋白质结构的错误折叠, 从而被泛素化标记导致其降解; b. 可能是 IL-24 蛋白氨基酸序列或是自身结构的原因导致其降解, 因为文献报道 TRAIL-IETD-Smac 融合蛋白可以很好地剪切^[6], 还有利用 IETD 连接 CFP 与 YFP 来研究 caspase 8 活化的动力学研究^[21], 说明 IETD 自身作为连接子发生剪切是没有问题的, 而文献报道中并没有侧重研究经过剪切后残留的 IETD 的连接子多肽是不会影响其上游 CFP

蛋白的稳定性, 这可能是 CFP 蛋白本身非人源且具有很长的半衰期相关。另有研究表明 TRAIL-IETD-Smac 构建发现 IETD 上游的 TRAIL 蛋白能稳定地存在^[6], 而在本研究中却发现, 在 IL-24 蛋白 C 端的 IETD/EEED 短肽能加剧其泛素化降解, 致使免疫印迹检测不到或者很微弱, 而这种情况下在给予蛋白酶体抑制剂 MG132 作用下可以发生蛋白质回复性增加。这提示我们在利用连接子连接两个或是多个治疗基因时应该重视其具体的融合蛋白在翻译后水平上剪切情况的相关前期研究, 不能以一概全地来判断连接子是否对抗癌蛋白稳定性产生影响, 实际上除了连接子本身的剪切效率外, 上游基因的结构也值得重视。综上所述, 如果将 Smac 蛋白放在连接子前面(即 Smac-IETD/EEED-IL-24)进行构建, IETD/EEED 连接子或许能够确保上下游两个抗癌蛋白很好地被剪切出来, 并具有足够的蛋白质稳定性。

在本研究中, 相较于 IETD/EEED, F2A 连接子在以上三个连接子中对于蛋白质的剪切效果最好, 在细胞水平上检测了 F2A 介导的双基因 IL-24 和 Smac 对于 HeLa 细胞的杀伤效果, 虽然对其有一定的杀伤效果, 但是仍然不够理想, 可能是因为质粒转染不能像病毒载体一样携带基因快速复制, 从而大量获得抗癌蛋白进而杀伤肿瘤。近年来也有研究发现, 来自 Porcine Teschovirus-1 病毒中的 2A 肽段(P2A)比来自口蹄疫病毒的 2A 肽段(FMDV 2A)自剪切效率更高^[22], 但这些研究与 CFP-IETD-YFP 等相关研究具有类似的研究特点: 即侧重研究这些连接子多肽自身的剪切效果, 并没有考虑其剪切后残留在上游蛋白上的多肽对其稳定性和蛋白质功能的影响, 这可能与利用本身稳定性好的典型非人源荧光蛋白作为研究对象的局限性相关, 但这与最终利用到靶向肿瘤的抗癌蛋白载体构建还是存在一定的应用差距。因此在应用研究中前期的验证工作非常重要, 然后将优化并验证过效果的连接子介导融合基因构建搭载入靶向溶瘤病毒载体或是联合那些能诱导 caspase 活化的小分子化疗药物应用于癌症治疗中, 可能会获得更加显著的抗癌效果。目前, 我们正在开展相关研究, 相信能得到更好的结果。

参 考 文 献

- [1] Liu X Y. Targeting gene-virotherapy of cancer and its prosperity. *Cell Research*, 2006, **16**(11): 879-886
- [2] Liu X Y, Gu J F. Targeting gene-virotherapy of cancer. *Cell Research*, 2006, **16**(1): 25-30
- [3] Liu X Y, Gu J F, Shi W F. Targeting gene-virotherapy for cancer. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2005, **37**(9): 581-587
- [4] Pei Z, Chu L, Zou W, *et al.* An oncolytic adenoviral vector of Smac increases antitumor activity of TRAIL against HCC in human cells and in mice. *Hepatology*, 2004, **39**(5): 1371-1381
- [5] Zhang Y, Gu J, Zhao L, *et al.* Complete elimination of colorectal tumor xenograft by combined manganese superoxide dismutase with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand gene virotherapy. *Cancer Research*, 2006, **66**(8): 4291-4298
- [6] Wang S B, Tan Y, Lei W, *et al.* Complete eradication of xenograft hepatoma by oncolytic adenovirus ZD55 harboring TRAIL-IETD-Smac gene with broad antitumor effect. *Human Gene Therapy*, 2012, **23**(9): 992-1002
- [7] Whitaker E L, Filippov V A, Duerksen-Hughes P J. Interleukin 24: Mechanisms and therapeutic potential of an anti-cancer gene. *Cyto Grow Fac Rev*, 2012, **23**(6): 323-331
- [8] Zhu W, Wei L, Zhang H, *et al.* Oncolytic adenovirus armed with IL-24 Inhibits the growth of breast cancer *in vitro* and *in vivo*. *J Exper Clin Cancer Res: CR*, 2012, **31**(1): 51
- [9] Wei N, Fan J K, Gu J F, *et al.* Double-regulated oncolytic adenovirus-mediated interleukin-24 overexpression exhibits potent antitumor activity on gastric adenocarcinoma. *Human Gene Therapy*, 2010, **21**(7): 855-864
- [10] Martinez-Ruiz G, Maldonado V, Ceballos-Cancino G, *et al.* Role of Smac/DIABLO in cancer progression. *J Exper Clin Cancer Res: CR*, 2008, **27**(1): 48
- [11] Wang S. Design of small-molecule Smac mimetics as IAP antagonists//Compans R W, Cooper M D, Gleba Y Y, *et al.* *Curr Top Microbiol Immunol*. Berlin: Springer, 2011, **348**: 89-113
- [12] Pan Q W, Zhong S Y, Liu B S, *et al.* Enhanced sensitivity of hepatocellular carcinoma cells to chemotherapy with a Smac-armed oncolytic adenovirus. *Acta Pharmacol Sin*, 2007, **28** (12): 1996-2004
- [13] Gross A. Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *J Biol Chem*, 1999, **274**(2): 1156-1163
- [14] Malmegrim de Farias K C, Saelens X, Pruijn G J, *et al.* Caspase-mediated cleavage of the U snRNP-associated Sm-F protein during apoptosis. *Cell Death and Differ*, 2003, **10**(5): 570-579
- [15] Fang J, Qian J J, Yi S, *et al.* Stable antibody expression at therapeutic levels using the 2A peptide. *Nature Biotechnol*, 2005, **23**(5): 584-590
- [16] 刘必胜, 刘新垣, 钱程. 构建多顺反子表达载体的有效工具—FMDV-2A. *生物工程学报*, 2007, **23**(5): 584-590
Liu B S, Liu X Y, Qian C. *Chin J Biotechnol*, 2007, **23** (5): 584-590
- [17] Deszcz L, Seipelt J, Vassilieva E, *et al.* Antiviral activity of caspase inhibitors: effect on picornaviral 2A proteinase. *FEBS Letters*, 2004, **560**(1-3): 51-55
- [18] Ohtani T, Hatori M, Ito H, *et al.* Involvement of caspases in 5-FU

- induced apoptosis in an oral cancer cell line. *Anticancer Res*, 2000, **20** (5A): 3117–3121
- [19] Yi T B, Yang L Y. Caspase-8 in apoptosis of hepatoma cell induced by 5-fluorouracil. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International: HBPD INT*, 2003, **2**(1): 98–101
- [20] Gopalan B, Shanker M, Scott A, *et al.* MDA-7/IL-24, a novel tumor suppressor/cytokine is ubiquitinated and regulated by the ubiquitin-proteasome system, and inhibition of MDA-7/IL-24 degradation enhances the antitumor activity. *Cancer Gene Therapy*, 2008, **15**(1): 1–8
- [21] Luo K Q, Yu V C, Pu Y, *et al.* Measuring dynamics of caspase-8 activation in a single living HeLa cell during TNF α -induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, **304**(2): 217–222
- [22] Kim J H, Lee S R, Li L H, *et al.* High cleavage efficiency of a 2A peptide derived from porcine teschovirus-1 in human cell lines, zebrafish and mice. *PloS One*, 2011, **6**(4): e18556

A Study of Three Linker Peptides' Cleavage Efficiency at The Post-translational Level*

LI Hong-Yan^{1,2)}, ZHOU Zhi-Ming²⁾, PAN Qiang¹⁾, YANG Dong-Mei¹⁾,
GU Jin-Fa²⁾, SHEN Jia-Ni¹⁾, WANG Shi-Bing¹⁾, ZHANG Kang-Jian^{2)**}

⁽¹⁾ *Xin Yuan Institute of Medicine and Biotechnology, College of Life Science, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China;*

⁽²⁾ *Institute of Biochemistry and Cell Biology, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)*

Abstract IL-24 and Smac are the important candidate genes for the targeting multi-genes therapy of cancer. In the construction of IL-24 and Smac dual gene expression vector, a stable and efficient linker is critical. We use three different linkers such as IETD, EEED and F2A to obtain three eukaryotic expression plasmids which are pcDNA3.1 (+)-IL-24-IETD-Smac, pcDNA3.1 (+)-IL-24-EEED-Smac, pcDNA3.1 (+)-IL-24-F2A-Smac, and then combined with 5-fluorouracil (5-FU) treatment to study the cleavage efficiency of the three linker peptides. The results showed that among three IL-24-linker-Smac dual gene expression vectors, the F2A linker is superior to IETD and EEED linkers. In addition, its cleavage efficiency is positively correlated with activated caspases. Moreover, the fusion protein mediated by both IETD and EEED linker also can be cleaved, but their upstream IL-24 protein with 4 additional amino acid residues derived from IETD or EEED linker was detected with obvious degradation regulated by the ubiquitin-proteasome system. This study will provide a reference for the construction of dual-gene or multi-gene expression vector in cancer therapy.

Key words linker peptide, IETD, EEED, F2A, caspase activity

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00489

*This work was supported by grants from the Zhejiang Sci-Tech University (1204807-Y), Scientific Research Foundation of Zhejiang Sci-Tech University (11610032611303), National Basic Research Program of China (2010CB529901, 2011CB510100), Natural Science Foundation of Zhejiang Province (LY13H080005) and Natural Science Foundation of Shanghai (13ZR1446300).

**Corresponding author.

Tel: 86-21-54921139, E-mail: zhangkangjian@sibcb.ac.cn

Received: December 4, 2013 Accepted: May 26, 2014