

核转运抑制肽表达载体的构建及对 HeLa 细胞增殖、迁移的影响*

吴周环¹, 颜瑞巧², 刘建云¹, 车向新¹, 熊建军^{1△}

1. 江西省系统生物医学重点实验室(九江 332000); 2. 九江学院临床医学院 技能中心(九江 332000)

【摘要】 目的 构建核转运抑制肽与红色荧光蛋白(RFP)的融合表达载体,探讨该融合蛋白在 HeLa 细胞中的表达、定位以及对细胞增殖、迁移的影响。方法 分别合成编码两种核转运抑制肽 Bimax1 和 Bimax2 的多核苷酸,退火后插入红色荧光蛋白表达载体 pDs-Red-C1;质粒转化大肠杆菌 DH-5 α ,挑取阳性菌进行 DNA 测序;利用脂质体转染法将重组载体 pDs-Red-Bimax1、pDs-Red-Bimax2 及空白载体转入 HeLa 细胞中,荧光显微镜观察红色荧光的表达与定位;MTT 实验和细胞迁移实验检测融合蛋白表达对细胞增殖、迁移的影响。结果 DNA 测序显示,两种核转运抑制肽 Bimax1 和 Bimax2 成功插入红色荧光蛋白表达载体;转染真核细胞后 Bimax1 和 Bimax2 引导红色荧光蛋白在细胞核表达;同时,融合蛋白 RFP-Bimax1 和 RFP-Bimax2 对 HeLa 细胞的增殖、迁移有抑制作用。结论 成功构建核转运特异性抑制肽与红色荧光蛋白融合表达的载体,融合蛋白在细胞核局限表达并能抑制肿瘤细胞的增殖、迁移。

【关键词】 核转运 红色荧光蛋白 增殖 迁移

Construction of Vectors Expressing Inhibiting Peptides for Nuclear Import and Its Effect on Growth and Migration of HeLa Cell WU Zhou-huan¹, YAN Rui-qiao², LIU Jian-yun¹, CHE Xiang-xin¹, XIONG Jian-jun^{1△}. 1. Key Laboratory of Jiangxi Province for the Systems Bio-medicine, Jiujiang 332000, China; 2. Clinical Skills Center, Clinic Medical College, Jiujiang University, Jiujiang 332000, China

△ Corresponding author, E-mail: jcyx_xiongjianjun@jju.edu.cn

【Abstract】 **Objective** To construct the expression vectors for red fluorescent protein fused with inhibiting peptides for nuclear import (Bimax), and explore the location of Bimax and its potential effects on cell proliferation and migration in HeLa cells. **Methods** Two kinds of polynucleotide encoding inhibiting peptides for nuclear import were synthesis respectively and subsequently annealed for inserting into vector pDs-Red-C1. The recombinant plasmids were transfected into competent bacterial DH-5 α . After transfection, the positive bacteria were picked up for DNA sequencing. The recombinant plasmids pDs-Red-Bimax2, pDs-Red-Bimax1 and negative plasmid pDs-Red-C1 were transfected into HeLa cells respectively according to Lipofectamine2000 protocol. After transfection, the expression and location of red fluorescent protein were observed with fluorescence microscope. Furthermore, MTT assay and cell-migration assay were used to detect the proliferation and migration of Bimax transduced cells. **Results** DNA sequencing showed that the polynucleotides encoding Bimax1 or Bimax2 were inserted into pDs-Red-C1 vector successfully. After transfected into HeLa cells, the inhibiting peptide induced red fluorescent protein locating in nuclear. Furthermore, either the fusion protein RFP-Bimax1 or RFP-Bimax2 can suppress the proliferation and migration of HeLa cells. **Conclusion** The expression vectors for red fluorescent protein fused with inhibiting peptides for nuclear import were successfully constructed. In addition, the fusion proteins were expressed and located in nuclear and suppressed the proliferation and migration of tumor cells.

【Key words】 Nuclear import Red fluorescent protein Proliferation Migration

细胞核与细胞质的区间分布是真核细胞的显著标志,胞质中翻译的核蛋白跨越核膜在细胞核与细胞质之间的穿梭受到严格调节。大量研究表明,多

种疾病包括肿瘤、糖尿病及中枢退行性疾病等的形成与核蛋白的转运异常有关^[1-2]。因此,探明关键蛋白质的入核转运机制和调节因素,对于研究机体的生命活动、阐明疾病机理具有重要意义。近来研究发现,核转运抑制肽 Bimax 能特异性地与 importin α 结合,进而有效抑制 importin α 和 importin β 介导的核输入通路,为研究核转运过程

* 国家自然科学基金(No. 81360143)和江西省自然科学基金(No. 20151BAB205056)资助

△ 通信作者, E-mail: jcyx_xiongjianjun@jju.edu.cn

提供了有利工具^[3],但是其深层次的生理功能尚不清楚。本研究通过构建核转运抑制肽与红色荧光蛋白(RFP)融合表达载体,并转染真核细胞,为进一步研究核转运抑制肽功能奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

HeLa 细胞购自中科院上海细胞研究所;pDs-Red-C1 表达质粒、菌株 DH5 α 由本实验室保存。限制性内切酶 *Kpn* I、*Bam*H I, T4 连接酶购自 TaKaRa 公司;脂质体转染试剂盒

Lipofectamine2000 购自 Invitrogen 公司;引物合成与 DNA 测序由上海英捷生物技术公司完成。

1.2 方法

1.2.1 Bimax 序列的合成 参考 KOSUGL 等^[3]的研究结果,我们分别合成核转运抑制肽中两个亚型 Bimax1 和 Bimax2 的蛋白编码多核苷酸,并在 5'端和 3'端分别引入 *Kpn* I 和 *Bam*H I 酶切位点,以定向插入表达载体,编码序列见表 1。各单链溶于 TE Buffer,终浓度为 50 μ mol/L,互补双链混合于 94 $^{\circ}$ C 保温 5 min,自然降温退火形成双链。

1.2.2 重组质粒构建 利用 *Kpn* I 和 *Bam*H I 内

表 1 引物序列

Table 1 The oligonucleotide coding inhibiting peptides for nuclear import

Gene	Prime sequence (5'-3')	Length/bp
Bimax1	Sense: CAGGAGACGTCCAAGGAAGAGACCTCTGGAATGGGATGAAGATGAAGAACCACCTCGT AAGAGGAAGAGACTGTGGG	77
Bimax1	Anti: GATCCCCACAGTCTCTTCTCTTACGAGGTGGTTCTTCATCTTCATCCCATTCCAGAGGT CTCTTCCTTGGACGTCTCTCTGGTAC	85
Bimax2	Sense: CAGGAGACGCAGAAGGAAGAGGAAACGCGAATGGGACGACGATGACGATCCACCTAAG AAGAGACGCAGACTGGACG	77
Bimax2	Anti: GATCCGTCCAGTCTGCGTCTCTTCTTAGGTGGATCGTCATCGTCGTCATCCGCGTTTC CTCTTCCTTCTGCGTCTCTCTGGTAC	85

切酶对载体 pDs-Red-C1 进行线性化切割,纯化回收;将退火产物 Bimax1 和 Bimax2 分别与线性化 pDs-Red-C1 连接,连接产物转化于感受态细胞 DH5 α ,经卡那霉素抗性平板筛选阳性克隆,挑菌扩增并送测序,测序正确的载体分别命名为 pDs-Red-Bimax1、pDs-Red-Bimax2。

1.2.3 质粒转染 HeLa 细胞在含 10%胎牛血清、无抗生素的 DMEM 中培养,细胞处于对数生长期时随机分为 3 组,pDs-Red-Bimax1 组、pDs-Red-Bimax2 组和阴性对照组 pDs-Red-C1。细胞增殖融合度达到 60%~70% 时进行转染,转染方法参照 Lipofectamine2000 说明书;转染 6 h 后更换培养液,继续常规培养 24 h,吸弃培养基,加入体积分数为 4%多聚甲醛固定 30 min,1 \times PBS 漂洗细胞 3 次,每次 5 min,终浓度 1 μ g/mL 的 DAPI 染细胞核 10 min,PBS 洗 3 次,每次 5 min,在荧光显微镜下观察细胞。

1.2.4 MTT 法检测细胞增殖力 取转染后各组细胞制成 1 \times 10⁴ mL⁻¹ 单细胞悬液,接种于 96 孔板,每孔 200 μ L,分别培养 12 h、24 h、48 h。吸去培养液,每孔加入新鲜配制的 MTT 液 20 μ L,继续培养 4 h,各孔再加入 DMSO 120 μ L,振荡 5 min 使结晶充分溶解,于 570 nm 波长处测定光密度(OD)值。

1.2.5 细胞迁移实验 分别收集转染后的 3 组细

胞,调整细胞密度为 1 \times 10⁴ mL⁻¹;在 Transwell 小室的下室加入 600 μ L 完全培养基,上室加入 200 μ L 细胞悬液,常规培养 24 h 后弃下室培养液,无水乙醇固定 10 min,结晶紫染色 10 min,显微镜下计数小室上室底膜下室面 10 个视野的细胞数,求平均值。

1.2.6 统计学方法 所有的结果数据采用 $\bar{x}\pm s$ 表示。组间两两比较采用 *t* 检验分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 表达载体 pDs-Red-Bimax 的鉴定

测序结果显示(图 1),pDs-Red-Bimax1 和 pDs-Red-Bimax2 载体中插入的编码 Bimax 核苷酸分别为 75 bp;经比对,插入片段无突变、缺失、移码。

2.2 融合蛋白在细胞内表达

转染 6 h 后阴性对照组 pDs-Red-C1 的红色荧光在细胞质与细胞核内均匀表达;而 pDs-Red-Bimax1 组和 pDs-Red-Bimax2 组红色荧光的定位有显著改变,全部集中在细胞核内(图 2),表明核转运特异性抑制肽引导红色荧光蛋白在细胞核表达。

2.3 Bimax 表达抑制细胞增殖

MTT 实验(图 3)显示:转染 48 h,pDs-Red-Bimax1 和 pDs-Red-Bimax2 转染细胞的增殖速度

慢于阴性对照质粒 pDs-Red-C1 转染的细胞 ($P < 0.05$), 表明核转运抑制肽能抑制肿瘤细胞增殖; 而 pDs-Red-Bimax1 组与 pDs-Red-Bimax2 组细胞之间在各时间段内的增殖速度差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.4 Bimax 对细胞迁移的抑制作用

迁移实验显示, 转染 pDs-Red-Bimax1 (7 ± 2) 和 pDs-Red-Bimax2 细胞组 (8 ± 3) 穿膜细胞数低于转染空质粒组 (15 ± 3), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 表明核转运特异性抑制肽能影响肿瘤细胞

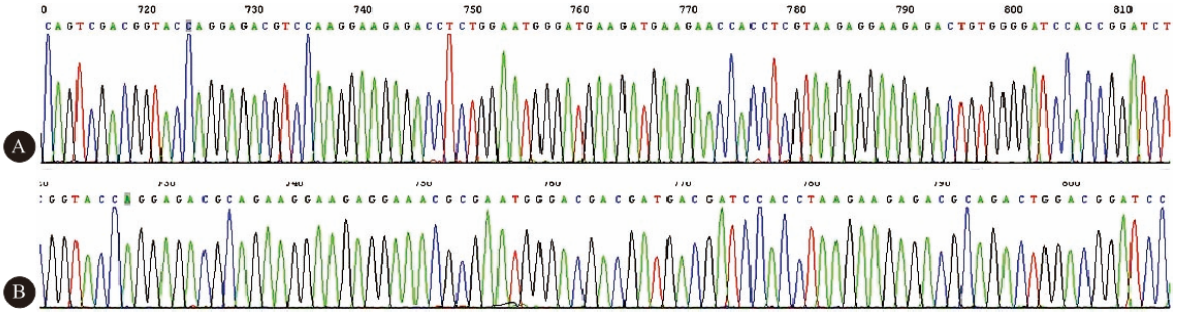


图 1 插入片段 Bimax1(A) 和 Bimax2(B) 的测序结果

Fig 1 The sequencing results of Bimax1 (A) and Bimax2 (B) nucleotide fragments

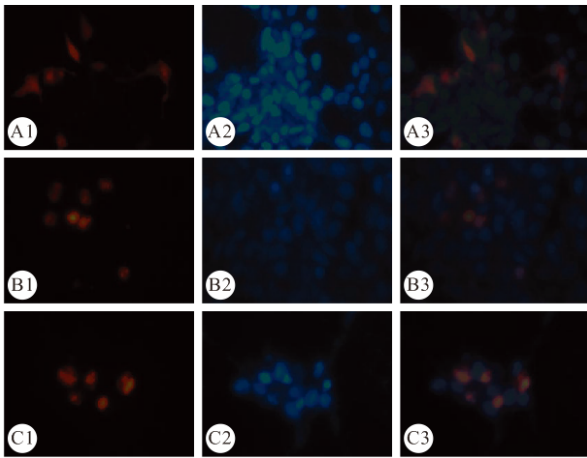


图 2 各组细胞中红色荧光蛋白的表达与定位。×200

Fig 2 The expression and location of red fluorescent protein in transfected HeLa cells. ×200

A: pDs-Red-C1; B: pDs-Red-Bimax1; C: pDs-Red-Bimax2; 1: RFP; 2: DAPI; 3: Merge

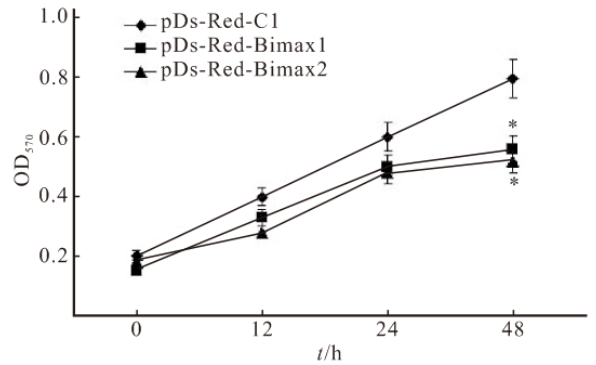


图 3 核转运特异性抑制肽能抑制肿瘤细胞增殖

Fig 3 Effect of inhibiting peptides for nuclear import on HeLa cellular viability

* $P < 0.05$, vs. pDs-Red-C1 at the same time point

迁移能力(图 4)。而 pDs-Red-Bimax1 组与 pDs-Red-Bimax2 组穿膜细胞数差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

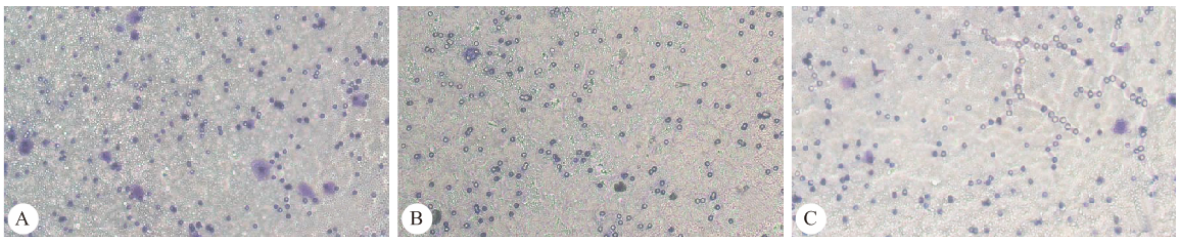


图 4 Transwell 法检测核转运特异性抑制肽肿瘤细胞迁移能力的影响。×200

Fig 4 Effect of inhibiting peptides for nuclear import on HeLa cellular invasion. ×200

A: pDs-Red-C1 transfection group; B: pDs-Red-Bimax1 transfection group; C: pDs-Red-Bimax2 transfection group

3 讨论

核转运蛋白 importin α/β 通路是蛋白转运入核的主要通路,相对分子质量大于 45×10^3 核蛋白通常通过核定位信号序列(NLS)与细胞中的核转运蛋白 importin α 特异结合,并由 importin β 介导穿梭核孔^[4-6]。但是该经典的核转运通路的抑制剂并不多见。2008年 KOSUGI 等^[3]基于经典的核定位信号序列,通过系列突变设计出核转运特异性抑制肽序列 Bimax1 和 Bimax2。该肽段与多个 importin α 蛋白有极高的亲和力,因此,其与 importin α 结合后能有效地阻断 importin α 和 importin β 的核输入通路。

鉴于国内尚未见对核转运特异性抑制肽进行深入研究,我们将核转运抑制肽的蛋白编码序列 Bimax1 和 Bimax2 分别进行人工合成、退火,并与红色荧光蛋白 C 端相连建立融合蛋白表达载体。通过荧光显微镜我们观察到空白载体 pDs-Red-C1 表达的红色荧光在细胞质与细胞核内均匀分布,但是,C 端引入小分子核转运特异性抑制肽(25 个氨基酸),却能引导大分子红色荧光蛋白(225 个氨基酸)集中入核,表明核转运特异性抑制肽与 importin α 亲和力非常强大。值得注意的是,Bimax1 和 Bimax2 的编码蛋白各有 9 个氨基酸的差异,但是其定位于细胞核的能力却相差无几,证实核转运特异性抑制肽与 importin α 的结合可能由某些核心氨基酸介导^[7-9]。

我们的进一步研究发现,融合蛋白 RFP-Bimax1 和 RFP-Bimax2 的表达会导致肿瘤细胞增殖下降。尽管 KOSUGI 等^[3]已经证实核转运抑制肽可导致酵母细胞生长抑制,但是在肿瘤细胞中还是首次提及。同时,本实验还发现融合蛋白 Bimax1 和 Bimax2 的表达也可导致肿瘤细胞迁移能力的下降。以上结果表明细胞的增殖与迁移受到大量核蛋白的调控。事实上,阻断核蛋白入核已经成为部分疾病诊治研究的新策略。例如 NF- κ B 入核的特异性阻断分子 SN50 被设计用来有效抑制 NF- κ B 活化导致的肺损伤^[10]。此外,特异性针对核转录因子 AP-1、NFAT 和 STAT1 的核转运抑制分子也应运而生^[11]。因此,核转运特异性抑制肽在今后的研究中将有着更为广泛的应用。

参 考 文 献

- [1] MCLANE LM, CORBETT AH. Nuclear localization signals and human disease. *IUBMB Life*, 2009, 61(7): 697-706.
- [2] PENTECOST M, VASHISHT AA, LESTER T, *et al.* Evidence for ubiquitin-regulated nuclear and subnuclear trafficking among Paramyxovirinae matrix proteins. *PLoS Pathog*, 2015, 11(3): e1004739 [2017-04-11]. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004739>.
- [3] KOSUGI S, HASEBE M, ENTANI T, *et al.* Design of peptide inhibitors for the importin alpha/beta nuclear import pathway by activity-based profiling. *Chem Biol*, 2008, 15(9): 940-949.
- [4] LANGE A, MILLS RE, LANGE CJ, *et al.* Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with importin alpha. *J Biol Chem*, 2007, 282(8): 5101-5105.
- [5] KANNO Y, MIYAZAKI Y, INOUE Y. The nuclear import of the constitutive androstane receptor by importin/Ran-GTP systems. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1803(8): 968-974.
- [6] YANG CP, CHIANG CW, CHEN CH, *et al.* Identification and characterization of nuclear and nucleolar localization signals in 58-kDa microspherule protein (MSP58). *J Biomed Sci*, 2015, 22: 60 [2017-04-11]. <https://jbiomedsci.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12929-015-0153-z>. doi:10.1186/s12929-015-0153-z.
- [7] TURLURE F, MAERTENS G, RAHMAN S, *et al.* A tripartite DNA-binding element, comprised of the nuclear localization signal and two AT-hook motifs, mediates the association of LEDGF/p75 with chromatin *in vivo*. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(5): 1653-1665.
- [8] WAGNER P, HALL MN. Nuclear protein transport is functionally conserved between yeast and higher eukaryotes. *FEBS Lett*, 1993, 321(2/3): 261-266.
- [9] DINGWALL C, LASKEY RA. Nuclear targeting sequences—a consensus? *Trends Biochem Sci*, 1991, 16(12): 478-481.
- [10] CHIAN CF, CHIANG CH, CHUANG CH, *et al.* SN50, a cell-permeable inhibitor of nuclear factor-kappaB, attenuates ventilator-induced lung injury in an isolated and perfused rat lung model. *Shock*, 2016, 46(2): 194-201.
- [11] TORGERSON TR, COLOSIA AD, DONAHUE JP, *et al.* Regulation of NF-kappa B, AP-1, NFAT, and STAT1 nuclear import in T lymphocytes by noninvasive delivery of peptide carrying the nuclear localization sequence of NF-kappa B p50. *J Immunol*, 1998, 161(11): 6084-6092.

(2017-03-22 收稿, 2017-06-03 修回)

编辑 汤洁