

新穿膜融合蛋白 His-T1-绿色荧光蛋白的跨膜效率及其对细胞存活的影响

王 怡¹, 林海环¹, 杨 静¹, 姜丽娟¹, 李校堃^{1,2*}

(1. 温州医学院药学院, 浙江 温州 325035; 2. 教育部生物反应器与药物开发工程研究中心, 吉林 长春 130000)

摘要: 目的 研究穿膜融合蛋白 His-T1-绿色荧光蛋白(GFP)的跨膜效率及其对细胞存活的影响。方法 以浓度为 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 His-T1-GFP 与人鼻咽癌 CNE2 或大鼠肾小管上皮 NRK52E 细胞孵育 6 h, 应用荧光显微镜观察 His-T1-GFP 跨膜进入细胞的情况。应用多功能酶标仪检测细胞荧光强度, 研究 His-T1-GFP 跨膜的动力学因素: 以浓度为 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 His-T1-GFP 与 CNE2 或 NRK52E 细胞孵育 10 min 至 24 h, 观察孵育时间对穿膜作用的影响; 以浓度为 $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 至 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 His-T1-GFP 与两种细胞孵育 6 h, 观察蛋白浓度对跨膜效率的影响; 以浓度为 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 His-T1-GFP 与两种细胞分别在 4°C 和 37°C 的条件下孵育 6 h, 观察温度对蛋白跨膜效率的影响。用细胞乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒和 MTT 法来评价 $5.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度的 His-T1-GFP 对细胞存活的影响。结果 在一定浓度范围内, His-T1-GFP 能够有效穿透 CNE2 和 NRK52E 细胞膜, 且对 NRK52E 细胞的跨膜效率明显高于 His-TAT-GFP。His-T1-GFP 在 10 min 内就能有效跨膜进入细胞, 并且在 6 h 内进入细胞的量与时间成正相关。在一定浓度范围($25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \sim 1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)内, 该蛋白进入细胞的量与自身浓度成正相关, 而在 4°C 时该蛋白仍具有跨膜能力。当其终浓度高达 $5.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 对 CNE2 和 NRK52E 两种细胞几乎无毒性作用。结论 His-T1-GFP 蛋白是一种跨膜效率高且低毒的穿膜融合蛋白。

关键词: 穿膜肽; 融合蛋白, His-T1-绿色荧光蛋白; 细胞膜通透性; 细胞毒性

中图分类号: R962

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2008)02-0129-07

穿膜肽(cell-penetrating peptides, CPP)是一类能够穿透细胞膜进入细胞质甚至细胞核, 而不损坏细胞膜结构的小分子多肽(其长度一般不超过 30 个氨基酸)。近几年来, 已经证实 CPP 能够运载一系列包括多肽、蛋白、核酸和寡聚核苷酸等具有不同生物活性的物质进入活细胞^[1]。虽然 CPP 融合有治疗作用的“货物分子”具有潜在的广泛临床应用价值, 但是它在细胞和组织中的转运效率、生物利用度和生物安全性还有待进一步研究。

由 11 个氨基酸(YGRKKRRQRRR)组成的 Tat 蛋白转导域(Tat protein transduction domain, TAT)来源于 HIV-1 的反式激活蛋白, 是一种在蛋白转导过程中能高效穿过生物膜的结构域, 它能将其共价连接的多肽、蛋白质及 DNA 等分子跨膜导入几乎所有的组织和细胞, 甚至可以通过血-脑脊液屏障, 转导效率高而且对细胞无明显损伤^[2-6]。在之前的研究中, 根据穿膜肽的构效关系设计了 TAT 的改构体 T1, 其氨基酸一级结构为 RRRKKRRRR^[7]。通过基因克隆技术, 成功地在大肠杆菌表达系统中表达了 N 端融合 His 标签(组氨酸标签)、C 端融合绿色荧光蛋白(green fluorescence protein, GFP)报导蛋白即 His-T1-GFP 融合蛋白。通过荧光显微镜、免疫组化等手段观察发现融合蛋白 His-T1-GFP 经静脉注射后, 能够穿透小鼠血-脑脊液屏障进入大脑皮质和海马^[7]。因此进一步研究 His-T1-GFP 在体外对人鼻咽癌 CNE2 细胞和大鼠肾小管上皮 NRK52E 细胞的跨膜效率, 考查该蛋白对这两种细胞的毒性

收稿日期: 2007-07-23 接受日期: 2008-01-03

基金项目: 浙江省自然科学基金重点项目(Z205755)

作者简介: 王 怡(1981-), 女, 广东省广州人, 助理研究员, 硕士, 主要从事微生物学与生化药学研究; 李校堃(1964-), 男, 医学博士, 研究方向为成纤维生长因子蛋白和基因药物。

* 联系作者 E-mail: xiaokunli@163.com Tel: (0577) 88067925

作用,初步探讨其跨膜递送动力学特征及内在化机制。

1 材料与方法

1.1 试剂及仪器

RPMI-1640 培养基, Gibco 公司; 小牛血清, 杭州四季青生物工程材料研究所; 噻唑蓝 (MTT), Fluck 公司; 乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 试剂盒, 南京建成生物工程研究所; 融合蛋白 His-TAT-GFP (阳性对照)、His-T1-GFP 及 His-GFP (阴性对照) 根据已报道的方法^[7] 通过大肠杆菌发酵, 冻干粉保存。使用前称取适量的蛋白冻干粉, 用含有 0.4% 小牛血清的饥饿 RPMI-1640 培养基溶解, 用直径 0.22 μm 的滤膜过滤除菌后使用。

SpectraMax M5 多功能酶标仪, Molecular Devices 公司; 荧光倒置 DIC 相差显微镜 TE2000-s, Nikon 公司。

1.2 细胞株

CNE2 细胞由中山大学馈赠; NRK52E 细胞由中山大学肾病研究所馈赠。

1.3 细胞培养

CNE2 细胞和 NRK52E 细胞分别于 37℃, 5% CO_2 条件下培养在含有 10% (V/V) 小牛血清的 RPMI-1640 培养基中, 细胞贴壁生长良好。取经 0.25% 胰蛋白酶消化后的 CNE2 和 NRK52E 细胞用 RPMI-1640 培养液 (含 10% 小牛血清) 配成 1×10^9 L 的悬液, 接种于 24 孔细胞培养板中 (每孔 1 mL), 于 37℃, 5% CO_2 条件下贴壁过夜生长, 作为待用细胞。

1.4 不同细胞对 His-T1-GFP 跨膜递送的影响

取待用细胞, 分别加入 3 种蛋白: His-TAT-GFP, His-T1-GFP 和 His-GFP 至终浓度 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。37℃, 5% CO_2 条件下孵育 6 h。实验分 3 组: 阳性对照组为蛋白 His-TAT-GFP, 实验组为蛋白 His-T1-GFP, 阴性对照组为 His-GFP; 每组平行设定 3 孔。孵育结束后用 4℃ pH 7.4 的 PBS 清洗 3 次, 小心吸除 PBS, 4% 多聚甲醛固定 10 min。蒸馏水清洗 3 次后室温凉干, 荧光显微镜镜检。

1.5 影响 His-T1-GFP 跨膜递送动力学的因素

1.5.1 作用时间

取待用细胞, 融合蛋白 His-T1-GFP 以终浓度 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 于 37℃, 5% CO_2 条件下分别孵育 10, 30 min 及 1, 3, 6 和 24 h。孵育结束后用 4℃ 的 pH

7.4 的 PBS 清洗 3 次, 小心吸除 PBS, 4% 多聚甲醛固定 10 min。蒸馏水清洗 3 次后室温凉干, 多功能酶标仪检测荧光强度, 激发波长为 395 nm, 发射波长为 509 nm, 底部读板。

1.5.2 蛋白浓度

取待用细胞, 融合蛋白 His-T1-GFP 以终浓度为 25, 50, 100, 500 和 $1000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 分别加入贴壁过夜生长的 CNE2 和 NRK52E 细胞, 在 37℃, 5% CO_2 条件下孵育 6 h。孵育结束后用 4℃ pH 7.4 的 PBS 清洗 3 次, 小心吸除 PBS, 4% 多聚甲醛固定 10 min。蒸馏水清洗 3 次后室温凉干, 多功能酶标仪检测荧光强度, 激发波长为 395 nm, 发射波长为 509 nm, 底部读板。

1.5.3 作用温度

取待用细胞, 融合蛋白 His-T1-GFP 以终浓度 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 分别加入贴壁过夜生长的 CNE2 和 NRK52E 细胞后, 分别于 37℃ 和 4℃ 下孵育 6 h。孵育结束后用 4℃ pH 7.4 的 PBS 清洗 3 次, 小心吸除 PBS, 4% 多聚甲醛固定 10 min。蒸馏水清洗 3 次后室温凉干, 多功能酶标仪检测荧光强度, 激发波长为 395 nm, 发射波长为 509 nm, 底部读板。

1.6 His-T1-GFP 的细胞毒性

1.6.1 LDH 酶活性方法检测对细胞膜完整性的影响

取待用细胞, His-T1-GFP 及 His-TAT-GFP 分别以终浓度 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 分别加入贴壁过夜生长的 CNE2 和 NRK52E 细胞, 空白对照孔中加入含有 0.4% 小牛血清的 RPMI-1640 饥饿培养液, 37℃, 5% CO_2 孵育 24 h。使用 LDH 试剂盒测定 LDH 的含量: 在 440 nm 处, 1 cm 光径, 空白试管调零, 测各管吸光度, 查标准曲线, 求 LDH 酶活性。全部比色在 5 ~ 15 min 完成, 避免读数降低。LDH 的活性用 $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$ 表示。

1.6.2 MTT 法检测对细胞增殖的影响

将生长旺盛的 CNE2 和 NRK52E 细胞经 0.25% 胰蛋白酶消化后, 用 RPMI-1640 培养液 (含 10% 小牛血清) 配成 $5 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 的悬液, 加入 96 孔圆底细胞培养孔内, 每孔 100 μL , 置 37℃, 5% CO_2 条件下培养 24 h 后, 弃培养上清, 用 37℃ 预温的 RPMI-1640 培养液洗 1 次; 每孔加入 100 μL 含有 0.4% 小牛血清的饥饿 RPMI-1640 培养液 (含 0.4% 小牛血清), 置 37℃, 5% CO_2 条件下饥饿培养 24 h 后弃培养上清。每孔加入 0.1 mL 浓度为 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 融合蛋白 His-TAT-GFP 和 His-T1-GFP。空白对照孔中加入 RPMI-1640 饥饿培

养液 0.1 mL, 每个样品做 3 个平行。37℃, 5% CO₂ 孵育 24 h。每孔加入 20 μL pH 7.4 PBS 配制的 5 g·L⁻¹ MTT, 再置 37℃, 5% CO₂ 孵育 4 h; 取出, 甩脱上清, 每孔加 0.2 mL 预温 RPMI-1640 培养液清洗一遍; 每孔加入 0.15 mL 二甲亚砜混匀, 30 min 后在酶联检测仪上 570 nm 波长处测吸光度 (absorbance, A) 值, 空白试剂调零。细胞活性 (%) = 实验组 $A_{570\text{ nm}}$ 值 / 对照组 $A_{570\text{ nm}}$ 值 × 100%。

1.7 方法 1.5.3 得出的数据使用两样品均数比较

的 *t* 检验进行统计学分析; 方法 1.6.1 及方法 1.6.2 得出的数据使用单因数方差分析进行统计学分析。两种统计方法的检验标准均为 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 His-T1-GFP 可有效跨过不同细胞的细胞膜

如图 1 及图 2 所示, His-TAT-GFP 和 His-T1-GFP 组均有效穿透视野内所有 CNE2 和 NRK52E 细

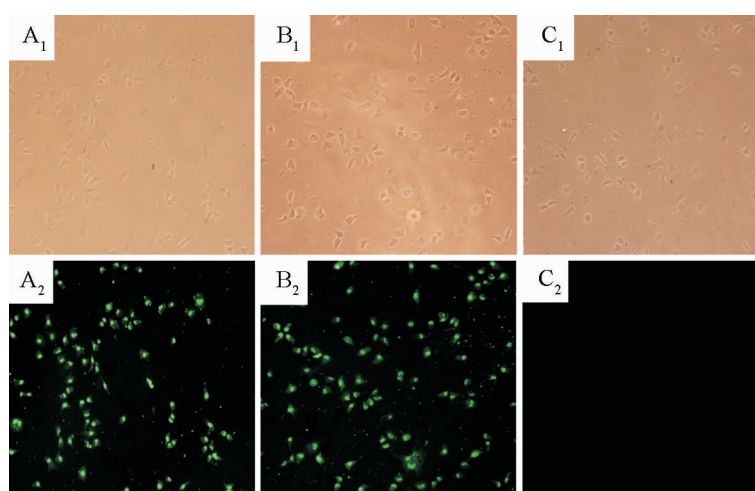


Fig 1. Cell penetrating efficiency of His-T1-GFP to CNE2 cells (×20). GFP: green fluorescence protein. TAT: Tat protein transduction domain. A₁ and A₂: His-TAT-GFP group; B₁ and B₂: His-T1-GFP group; C₁ and C₂: His-GFP group. The concentration of the 3 fusion proteins was 500 mg·L⁻¹, the incubation time was 6 h. A₁, B₁ and C₁ were captured with visible light, and A₂, B₂ and C₂ were captured with fluorescent light.

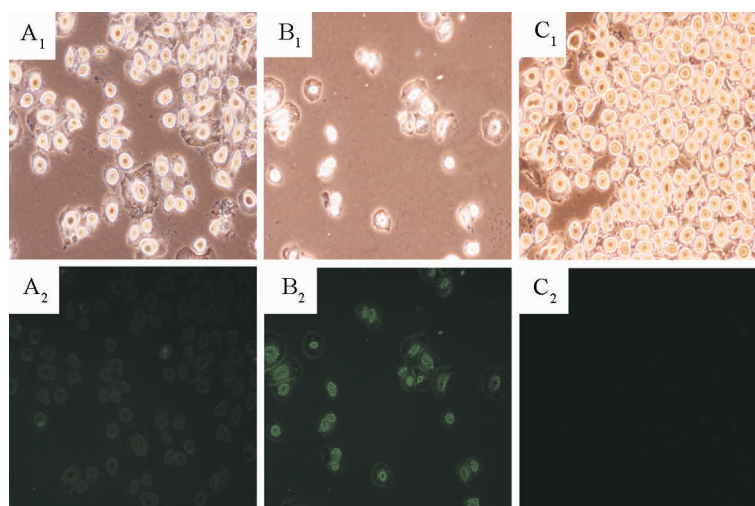


Fig 2. Cell penetrating efficiency of His-T1-GFP to NRK52E cells (×200). A₁ and A₂: His-TAT-GFP group; B₁ and B₂: His-T1-GFP group; C₁ and C₂: His-GFP group. The concentrations of the 3 fusion proteins was 500 mg·L⁻¹, the incubation time was 6 h. A₁, B₁ and C₁ were captured with visible light, and A₂, B₂ and C₂ were captured with fluorescent light.

胞的细胞膜进入细胞内,并主要定位于细胞核内。His-T1-GFP 蛋白在与 NRK52E 细胞作用时,通过荧光强度的比对,蛋白 His-T1-GFP 比 His-TAT-GFP 蛋白具有更明显的穿膜效率。而阴性对照 His-GFP 蛋白及 RPMI-1640 培养液空白对照在荧光镜下没有看见细胞内有明显荧光,提示它们没有细胞穿透能力。

2.2 蛋白浓度、作用时间及温度对 His-T1-GFP 跨膜递送动力学的影响

如表 1 所示,His-T1-GFP 在一定作用时间内(10 min ~ 6 h)进入细胞的量与时间成正相关。如表 2 所示,在一定浓度范围(25 ~ 1000 mg·L⁻¹)内,蛋白进入细胞的量与自身浓度成正相关。表 3 结

Tab 1. Time affects transmembrane efficiency of His-T1-GFP

Time/min	Transmembrane efficiency (FI)	
	NRK52E cell	CNE2 cell
10	1055 ± 10	1055 ± 4
30	1112 ± 9	1124 ± 3
60	1993 ± 2	2426 ± 11
180	2699 ± 9	2659 ± 6
360	2830 ± 6	2879 ± 9
1440	2649 ± 18	2747 ± 11

FI: fluorescence intensity. The cells were treated with 500 mg·L⁻¹ His-T1-GFP at 37°C. $\bar{x} \pm s$, $n=3$. There is no significant difference between the cell lines. NRK52E: $Y = 0.794X + 1781.239$, $r = 0.542$; CNE2: $Y = 0.785X + 1876.310$, $r = 0.519$.

Tab 2. Concentration affects transmembrane efficiency of His-T1-GFP

His-T1-GFP/ mg·L ⁻¹	Transmembrane efficiency (FI)	
	NRK52E cell	CNE2 cell
25	154 ± 4	150 ± 2
50	235 ± 11	232 ± 10
100	534 ± 24	526 ± 18
500	3030 ± 80	3110 ± 40
1000	6600 ± 110	6760 ± 130

The cells were treated with His-T1-GFP at 37°C for 6 h. $\bar{x} \pm s$, $n=3$. There is no significant difference between the cell lines. NRK52E: $Y = 0.785X - 107.818$, $r = 0.999$; CNE2: $Y = 6.798X - 121.789$, $r = 0.999$.

Tab 3. Temperature affects transmembrane efficiency of His-T1-GFP

Temperature/°C	Transmembrane efficiency (FI)	
	NRK52E cell	CNE2 cell
4	2165 ± 5	2306 ± 5
37	2175 ± 11 *	2346 ± 17 **

The cells were treated with 500 mg·L⁻¹ His-T1-GFP for 6 h. $\bar{x} \pm s$, $n=3$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with 4°C group. There is no significant difference between the cell lines.

果表明,该融合蛋白在 4°C 时跨膜能力受到部分抑制:在 NRK52E 细胞实验中,4°C 和 37°C 条件下 His-T1-GFP 的跨膜递送能力有统计学差异,4°C 时跨膜递送能力比 37°C 时降低 0.99%;在 CNE2 细胞实验中,4°C 和 37°C 条件下 His-T1-GFP 的跨膜递送能力有显著性差异,4°C 时跨膜递送能力比 37°C 时降低 2.5%。但是在 4°C 时,His-T1-GFP 仍可以明显跨膜进入细胞,温度对该蛋白的跨膜能力影响较小。

2.3 融合蛋白 His-T1-GFP 对细胞存活的影响

2.3.1 对细胞膜完整性的影响

由于细胞膜完整的细胞,其胞内的 LDH 基本不能从细胞内漏出;而细胞膜破裂的细胞,由于细胞内的 LDH 漏出细胞外,使得培养液中 LDH 的量大为增加,通过测定培养液中 LDH 的活性可以判断细胞膜的完整性。由表 4 可见,浓度高达 5 g·L⁻¹ 的 His-TAT-GFP 及 His-T1-GFP 分别对 CNE2 和 NRK52E 细胞作用 24 h 后,细胞培养液中的 LDH 稍多于空白对照组,但经单因素方差分析,3 种处理方法细胞培养液中 LDH 活性无显著性差异,表明 5 g·L⁻¹ 的 His-T1-GFP 对 CNE2 及 NRK52E 细胞膜几乎无破坏作用。

Tab 4. Effect of fusion proteins on integrity of cell membrane

Fusion protein	LDH/U·L ⁻¹	
	NRK52E cell	CNE2 cell
His-TAT-GFP	0.180 ± 0.010	0.174 ± 0.010
His-T1-GFP	0.169 ± 0.010	0.170 ± 0.010
His-GFP	0.164 ± 0.010	0.160 ± 0.010

The cells were treated with 5 g·L⁻¹ protein at 37°C for 24 h. The activity of LDH efflux was expressed as the cell membrane integrity. $\bar{x} \pm s$, $n=3$. There is no significant difference among the 3 groups.

2.3.2 对细胞增殖的影响

表 5 所示,与加入 0.4% 小牛血清的饥饿培养基比较,终浓度为 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 His-TAT-GFP 和 His-T1-GFP 对 2 种细胞的增殖能力无影响。这一结果也从另一个侧面说明高浓度 ($5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 的 His-TAT-GFP 和 His-T1-GFP 在跨膜递送的过程中对细胞膜无损伤。

Tab 5. Effect of fusion proteins on cell proliferation

Fusion protein	Cell proliferation/%	
	NRK52E cell	CNE2 cell
His-TAT-GFP	100.8 ± 2.0	100.0 ± 4.0
His-T1-GFP	100.0 ± 0.0	100.1 ± 1.0
His-GFP	101.5 ± 2.4	100.0 ± 0.0

The cells were treated with $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ protein at 37°C for 24 h. The cell proliferation was determined with MTT assay. $\bar{x} \pm s$, $n=3$. There is no significant difference among the 3 groups.

3 讨论

以前研究认为,TAT 介导的蛋白转导过程和蛋白转导域中的带有强正电荷的碱性氨基酸(精氨酸和赖氨酸残基)有关^[8-9]。展开的 TAT 及货物分子融合蛋白与带有负电荷的细胞膜相互反应,然后直接发生转膜进入细胞内。进入细胞内后,融合蛋白在伴侣分子系统的辅助下重新进行蛋白折叠恢复其原来的蛋白构型^[10]。然而,随后的研究对 TAT 的直接穿膜作用提出质疑,认为其内在化的机制依赖于巨噬细胞的胞饮作用^[11]和网格蛋白依赖性的内吞作用^[12]。

CPP T1 是根据穿膜肽的构效关系设计的 TAT 的改构体,实验已经证明 T1 能够携带 GFP 在体内有效穿过小鼠的血-脑脊液屏障^[7]。本研究进一步观察了融合蛋白 His-T1-GFP 在细胞水平上的跨膜递送作用。实验结果表明,His-T1-GFP 具有跨膜递送进入 CNE2 及 NRK52E 细胞的生物活性,并且主要定位于细胞浆和细胞核,证明穿膜肽 T1 对不同种属(大鼠和人)不同组织(肾小管上皮和鼻咽癌)来源的细胞均具穿透能力。其中 His-T1-GFP 穿透不同细胞的细胞膜时效率存在差异,原因可能是:①不同种类的细胞,细胞的某些特性有所不同,如细胞膜通透性或细胞膜结构不同,导致 His-T1-GFP 更容易进入某些细胞;②也可能由于部分细胞的细胞连

接不够紧密,贴壁性能差,基膜结构不紧密,使细胞表面有更多的蛋白作用位点;③也可能由于部分细胞内某种蛋白酶活力降低所致。

跨膜动力学研究表明,His-T1-GFP 的跨膜递送效率在一定范围内与时间和蛋白浓度存在正相关关系,即 His-T1-GFP 在一定的范围内穿膜进入细胞的量随着时间的延长或浓度的升高而增多;温度对 His-T1-GFP 的跨膜递送能力影响很小。通常,蛋白及肽进入细胞的机制是:蛋白或肽与细胞膜上相应受体结合,然后发生一系列构象变化,最终在细胞质膜上形成运输孔道;或它们通过胞吞作用,进入内吞小体后引起 pH 值从中性到酸性的转化,使内吞体膜产生孔道,从而进入细胞浆。但以此种方式实现的细胞内在化仅对某些分子适用,且往往受环境温度的影响,如 4°C 时,该过程会被完全阻断。然而,His-T1-GFP 在 4°C 时可被活细胞摄取,提示其摄取机制包括非经典的内吞作用^[13]。同时在 4°C 环境中,ATP 酶近乎无活性,而 CPP T1 介导的跨膜过程仍有效进行,提示 CPP T1 进入细胞的过程可能是通过非受体蛋白依赖的方式实现的^[14]。

His-T1-GFP 对细胞的毒性作用结果显示,终浓度高达 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 His-T1-GFP 对 CNE2 及 NRK52E 2 种细胞膜几乎没有破坏作用,即 T1 跨膜的过程不损伤细胞膜,不会造成细胞质的泄漏。同时,终浓度高达 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 His-T1-GFP 与 CNE2 及 NRK52E 2 种细胞孵育 24 h 后,对 2 种细胞的增殖能力基本没有影响,表明了 T1 穿膜的过程不对细胞产生致死的毒性作用。这一结果也从另一个侧面说明高浓度 ($5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 的 His-T1-GFP 在跨膜递送的过程中对细胞膜没有产生损伤,对细胞无毒性作用。

综上所述,His-T1-GFP 是一种跨膜效率高且低毒的新的穿膜肽融合蛋白。

4 参考文献:

- [1] Wagstaff KM, Jans DA. Protein transduction: cell penetrating peptides and their therapeutic applications[J]. *Curr Med Chem*, 2006, **13**(12):1371-1387.
- [2] Fawell S, Seery J, Daikh Y, Moore C, Chen LL, Pepsinsky B, et al. Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91**(2):664-668.
- [3] Rudolph C, Plank C, Lausier J, Schillinger U, Muller RH, Rosenecker J. Oligomers of the arginine-rich motif

- of the HIV-1 TAT protein are capable of transferring plasmid DNA into cells[J]. *J Biol Chem*, 2003, **278** (13):11411–11418.
- [4] Torchilin VP, Levchenko TS, Rammohan R, Volodina N, Papahadjopoulos-Sternberg B, D'Souza GG. Cell transfection *in vitro* and *in vivo* with nontoxic TAT peptide-liposome-DNA complexes[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**(4):1972–1977.
- [5] Torchilin VP. TAT peptide-modified liposomes for intracellular delivery of drugs and DNA[J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2002, **7**(2):265–267.
- [6] Vivès 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.
- [7] Wang Y, Cai ZH, Jian LJ, Li XK. Construction, expression and activity assay of a novel cell penetrating peptide[J]. *Pharm Biotechnol* (药物生物技术), 2007, **14**(2):79–84.
- [8] Schwarze SR, Ho A, Vocero-Akbani A, Dowdy SF. *In vivo* protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse[J]. *Science*, 1999, **285**(5433):1569–1572.
- [9] Magzoub M, Kilk K, Eriksson LE, Langel U, Graslund A. Interaction and structure induction of cell-penetrating peptides in the presence of phospholipid vesicles[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2001, **1512**(1):77–89.
- [10] Schwarze SR, Hruska KA, Dowdy SF. Protein transduction: unrestricted delivery into all cells[J]. *Trends Cell Biol*, 2000, **10**(7):290–295.
- [11] Kaplan IM, Wadia JS, Dowdy SF. Cationic TAT peptide transduction domain enters cells by macropinocytosis[J]. *J Control Release*, 2005, **102**(1):247–253.
- [12] Richard JP, Melikov K, Brooks H, Prevot P, Lebleu B, Chernomordik LV. Cellular uptake of unconjugated TAT peptide involves clathrin-dependent endocytosis and heparan sulfate receptors[J]. *J Biol Chem*, 2005, **280** (15):15300–15306.
- [13] Pujals S, Fernández-Carreado J, López-Iglesias C, Kogan MJ, Giralt E. Mechanistic aspects of CPP-mediated intracellular drug delivery: relevance of CPP self-assembly[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2006, **1758**(3):264–279.
- [14] Suzuki T, Futaki S, Niwa M, Tanaka S, Ueda K, Sugiyama Y. Possible existence of common internalization mechanisms among arginine-rich peptides[J]. *J Biol Chem*, 2002, **277**(4):2437–2443.

Transmembrane efficiency of His-T1-green fluorescence protein and its effect on cell survival

WANG Yi¹, LIN Hai-Huan¹, YANG Jing¹, JIANG Li-Juan¹, LI Xiao-Kun^{1,2*}

(1. Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China; 2. Engineering Research Center of Bio-reactor and Pharmaceutical Development, Ministry of Education, Changchu 130000, China)

Abstract: **AIM** To study the transmembrane efficiency of a novel cell penetrating peptide (CPP) fusion protein, His-T1-green fluorescence protein (GFP), and its effect on cell survival. **METHODS** His-T1-GFP 500 mg·L⁻¹ was incubated with CNE2 and NRK52E cells separately for 6 h. And its cell penetrating efficiency to CNE2 and NRK52E cells was observed by fluorescence microscopy. For its transmembrane dynamics analysis, His-T1-GFP 500 mg·L⁻¹ was incubated with CNE2 and NRK52E cells separately from 10 min to 24 h to investigate the influence of incubation time; His-T1-GFP 25 mg·L⁻¹–1.0 g·L⁻¹ was incubated with CNE2 and NRK52E cells for 6 h to

detect the effect of incubation protein concentration; His-T1-GFP 500 mg·L⁻¹ was incubated with CNE2 and NRK52E cells at 4°C and 37°C for 6 h to analyze the effect of incubation temperature. All the dynamic data were calculated with fluorescence intensity immunoanalyzer. Finally, the toxicity of His-T1-GFP 5.0 g·L⁻¹ on CNE2 and NRK52E cells was evaluated with lactate dehydrogenase (LDH) kit and MTT assay. **RESULTS** His-T1-GFP could effectively penetrate through CNE2 and NRK52E cell membranes, with a higher efficacy compared with its positive control His-TAT-GFP when penetrating NRK52E cell. His-T1-GFP could penetrate into target cells in 10 min,

and could increase its concentration in cells within 6 h; also, the concentration of the protein in cells was relevant to its protein concentration; in the concentration of $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ to $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, the concentration of the protein in cells could be increased with higher incubation concentration; and the permeation capability of His-T1-GFP could be maintained even at 4°C . When its final concentration was up to $5.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, there was no obvious toxic effect to either cell membrane integrity or cell proliferation.

CONCLUSION His-T1-GFP is a novel CPP fusion protein with high permeating efficiency and low cytotoxicity.

Key words: cell penetrating peptide; fusion protein, His-T1-green fluorescence protein; cell membrane permeability; cytotoxicity

Foundation item: The project supported by National Natural Science Foundation of Zhejiang Province (Z205755)

* Corresponding author.

(本文编辑 乔虹)

《毒理学百科》简介

毒理学是疾病预防控制事业的一门非常重要的支撑学科,涉及的领域非常宽广,这就要求毒理学家和从事与毒理学相关工作的人员有比较宽厚的知识面。我国毒理学学科近年来的发展非常迅速,毒理学专业人员队伍不断扩大。《毒理学百科》全书,可以帮助人们更深入地了解毒理学及相关领域的基础理论、专业知识和有关的背景信息。

《毒理学百科》第二版由美国国家医学图书馆的 Philip WEXLER 博士主编,近 400 位毒理学家参与编写。作者多为资深毒理学专家或各自领域的著名学者,或长期从事该领域的研究工作,使此百科全书具有相当的权威性。原版全书共 4 卷,收集了 1057 个条目,按英文字母顺序排列,内容详尽、信息量大,既有毒理学的基本理论、学科体系知识的介绍,也包含毒理学专业知识、新的进展资料、毒理学派生出的相关社会科学问题(如历史事件、法律、条规、教育、国际和区域组织)等信息资料。本百科全书还对近年来出现的毒理学新名词首次做了比较系统和权威性的解释。很多在其他专著、教科书、工具书中查不到的毒理学或相关的信息资料都能在此百科全书中找到。

为了方便国内读者,科学出版社委托中国毒理学会组织国内有关毒理学专家,对原著中除所有化合物以外的条目进行了梳理归类,分 3 卷出版。其中《精选卷》是从原 4 卷出版物中精选出更具毒理学专业性的条目编辑而成,所提供的信息适合于毒理学科不同专业领域的广大读者,能满足读者对毒理学基本知识的索求和专业的了解;另外,将与毒理学研究与发展密切相关的背景知识和有关信息,如与毒理学非常密切的交叉或基础学科的名词术语、蛋白质组学、代谢组学、纳米技术等新的技术与概念、以及人体组织器官的生理与病理等条目,合编成《拓展卷》;将有关重大毒理学事件、毒理学信息、国际组织、毒理学相关的国际和地区法规、毒理学历史事件、军事与反恐等汇集成《社科卷》。

地址:北京市东城区东皇城根北街 16 号,科学出版社科爱传播中心(100717)

联系人:杨琴 电话:64006871 传真:64034056 E-mail:yangq@kbooks.cn