

改良型 TAT-VP3 融合蛋白对膀胱癌 BIU-87 细胞 Bcl-2 和 Survivin 表达的影响

马真¹⁾, 李俊²⁾, 王剑松¹⁾, 詹辉¹⁾, 王春晖¹⁾, 张之甲¹⁾

(1) 昆明医科大学第二附属医院泌尿外科, 云南省泌尿外科研究所, 云南昆明 650101; 2) 昆明医科大学第一附属医院肾内科, 云南昆明 650032)

[摘要] **目的** 探讨应用改良型 TAT-VP3 融合蛋白干预膀胱癌 BIU-87 细胞后, 对肿瘤细胞的抑制效应, 及对 Bcl-2 和 Survivin 表达的影响, 为以后对改良型 TAT-VP3 融合蛋白的进一步研究提供实验基础. **方法** 运用 MTT 比色法检测 BIU-87 细胞的生长抑制率. 利用不同浓度的改良型 TAT-VP3 融合蛋白干预膀胱癌 BIU-87 细胞, 24 h, 48 h, 72 h, 运用实时荧光定量酶链聚合反应 (QPCR) 检测 Bcl-2 和 Survivin mRNA 的表达变化. 运用不同浓度的改良型 TAT-VP3 融合蛋白干预膀胱癌 BIU-87 细胞, 24 h 后蛋白免疫印迹法 (Western Blot) 检测 Bcl-2 和 Survivin 蛋白的表达情况. **结果** 改良型 TAT-VP3 融合蛋白干预膀胱癌 BIU-87 细胞后, 肿瘤细胞凋亡率与时间和剂量呈依赖关系 ($P < 0.05$), Bcl-2 和 Survivin mRNA 表达与时间和药物剂量呈依赖关系. 不同浓度的改良型 TAT-VP3 融合蛋白作用 24 h 后, Bcl-2 和 Survivin 蛋白表达与药物剂量呈依赖关系. **结论** 改良型 TAT-VP3 融合蛋白对膀胱癌 BIU-87 细胞具有一定的抑制作用, 并对凋亡相关因子 (Bcl-2 和 Survivin) 的表达有影响.

[关键词] 细胞凋亡; VP3 蛋白; 膀胱癌; Bcl-2; Survivin

[中图分类号] R737.14 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-4706 (2012) 07-0006-05

The Effect of Modified TAT-VP3 Fusion Protein on the Expression of Bcl-2 and Survivin in Human Bladder Cancer BIU-87 Cells

MA Zhen¹⁾, LI Jun²⁾, WANG Jian-song¹⁾, ZHAN Hui¹⁾, WANG Chun-hui¹⁾, ZHANG Zhi-jia¹⁾

(1) Dept. of Urology, The 2nd Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650101;
2) Dept. of Nephrology, The 1st Affiliated Hospital of Kunming Medical University,
Kunming Yunnan 650032, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the inhibitory effect of improved TAT-VP3 fusion protein on human bladder cancer BIU-87 cells, and the effect on the expression of bcl-2 and survivin in BIU-87 cells, and provide experiment basis for the further study of improved TAT-VP3 fusion protein. **Methods** The inhibition rate of cell growth was detected using the method of MTT. Different concentrations of improved TAT-VP3 fusion protein were used to interfere with human bladder cancer BIU-87 cells, then the expression of bcl-2 and survivin mRNA was detected by real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (qPCR) after 24 h, 48 h, 72 h, and the expression of bcl-2 and survivin protein was detected by western blotting after 24 h. **Results** When improved TAT-VP3 fusion protein interfered with human bladder cancer BIU-87 cells, the inhibition rate of tumor cell growth showed a time- and dose-dependent manner ($P < 0.05$), and the expression of bcl-2 and survivin mRNA showed a time- and dose-dependent manner, too. When different concentration of improved TAT-VP3 fusion protein

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (30760251)

[作者简介] 马真 (1985~), 男, 云南开远市人, 在读硕士研究生, 主要从事膀胱肿瘤临床工作.

[通讯作者] 王剑松. E-mail: jjiansongwang@yahoo.com

interfered with tumor cells, the expression of bcl-2 and survivin protein showed a dose-dependent manner after 24 h. **Conclusion** Improved TAT-VP3 fusion protein can inhibit the growth of BIU-87 cells in a certain, and influence the expression of bcl-2 and survivin.

[**Key words**] Apoptosis; VP3 protein; Bladder carcinoma; Bcl-2; Survivin

凋亡素 (Apoptin) 是来源于鸡贫血病毒 (chicken anemia virus, CAV) 的一种由 121 个氨基酸组成的小分子蛋白。而 CAV 属于新型的单链环状 DNA 病毒 Circoviridae 家族。后来的研究发现, VP3 能诱导人肿瘤细胞的凋亡, 对不同来源的肿瘤细胞和正常细胞的研究一致证明了 Apoptin 的细胞凋亡效应的肿瘤特异性^[1-3]。凋亡素的分子量为 13.6 kDa, 自然状态下的很难进入细胞内。在前期实验中, 本实验室利用反式激活蛋白 (TAT) 具有蛋白转导结构域的特点, 可以快速有效地将与之相连的肽段或蛋白质直接跨膜转运进入细胞^[4]的原理, 成功构建了改良型 TAT-VP3 重组载体, 并诱导了该融合蛋白的表达^[5], 使得 Apoptin 能够在天然状态下进入细胞, 发挥作用。为了进一步了解 Apoptin 对肿瘤细胞的诱导凋亡作用, 本实验通过生长抑制率, 凋亡抑制因子 (Bcl-2 和 Survivin) 的表达, 探讨改良型 TAT-VP3 融合蛋白对体外膀胱癌 BIU-87 细胞的抑制及对部分凋亡抑制因子表达的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

膀胱癌 BIU-87 细胞由本室保存。改良型 TAT-VP3 融合蛋白由本研究室前期工作完成并保存。胎牛血清购自上海依科赛公司。鼠抗人单抗

Survivin、兔抗人单抗 Bcl-2、GAPDH 内参抗体均购自 Santa cruz 公司。羊抗兔 / 鼠 IgG-HRP 二抗购自 Abmart 公司。噻唑蓝 (MTT 试剂) 购自北京 Solarbio 公司。TRNzol 总 RNA 提取试剂盒、普通 PCR 试剂盒、实时定量 PCR 试剂盒、Quant cDNA 第一链合成试剂盒购自北京 TIANGEN 公司。各目的片段的上下游引物由 Invitrogen 公司合成提供。

1.2 方法

1.2.1 人膀胱癌 BIU-87 细胞培养 BIU-87 细胞培养于含 15% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液中, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养, 2~3 d 传代 1 次。

1.2.2 噻唑蓝 (MTT) 比色法测定检测肿瘤细胞抑制率 准备 3 块无菌 96 孔板, 分为 3 组 (分别为 72 h 组、48 h 组、24 h 组), 取对数生长期的 BIU-87 细胞, 以 2×10^4 个 / 孔接种于 96 孔板上, 培养 24 h 后加入含不同浓度的改良型 TAT-VP3 融合蛋白 (0.1 mg/L、0.5 mg/L、1 mg/L、10 mg/L、50 mg/L、100 mg/L) 的培养液, 同时设对照组, 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度下分别培养 24 h、48 h、72 h。同时设不加药物的阴性对照组。按照说明加入 MTT, 继续培养 4 h, 吸取培养液, 加入二甲亚砜 (DMSO), 摇床上震荡 10 min, 酶标仪在 490 nm 处测取吸光度 OD 值 (每组设 5 个复孔, 重复 4 次)。

$$\text{肿瘤细胞增殖抑制率} = \left(1 - \frac{\text{加药组 OD 值}}{\text{对照组 OD 值}}\right) \times 100\%$$

1.2.3 实时荧光定量 PCR (QPCR) 检测 准备无菌 6 孔板 3 块, 分为 3 组 (分别为 72 h 组、48 h 组、24 h 组)。在每板板盖上标记 6 孔板 6 孔为: 1、2、3、4、5、6。取对数生长期 BIU-87 细胞, 以 3×10^5 个 / 孔接种于 3 块板上, 培养 24 h 后, 72 h 组弃除培养液, 依次按 1~6 顺序, 加入含不同浓度的改良型 TAT-VP3 融合蛋白 (对照组、0.1 mg/L、0.5 mg/L、1 mg/L、5 mg/L、10 mg/L) 的培养液。隔 24 h 后, 以同样方法加药 48 h 组。再隔 24 h 后, 又以同样的方法加药 24 h 组。用 Trizol 法分别提取不同时间点, 不同药物浓度的各孔总 RNA。采用 TIANGEN 公司的 Quant cDNA 第一链

合成试剂盒合成 cDNA。接下来行实时荧光定量 PCR (QPCR) 反应, bcl2-F: GATGACTGAGTA-CCTGAA; bcl2-R: AGGAGAAATCAAACAGAG; survivin-F: CGCTTTCCTTCTGTCAA; survivin-R: ATTCTTCTTCTTATTGTTGGTT; GAPDH 作内参, GAPDH-F: CTCTGGTAAAGTGGATATTGT; GAPDH-R: GGTGGAATCATATTGGAACA; 采用购自 TIANGEN 公司的 RealMasterMix (SYBR Green) (目录号 FR202) 进行操作, 运用 50 μL 反应体系为: 上、下游引物均为 2 μL、RealMasterMix (SYBR Green) 22.5 μL、cDNA 2 μL (0.5 μg/μL), 补足去离子水至 50 μL。采用的 QPCR 反应条件为

预变性 95 °C 2 min; 变性 95 °C 10 s; 退火 50 °C 30 s; 延伸 68 °C 45 s; 共 40 个循环. 最后记录结果, 用 2- $\Delta\Delta Ct$ 法进行分析.

1.2.4 蛋白免疫印迹法检测 准备无菌 6 孔板 1 块, 在板盖上标记 6 孔板 6 孔为: 1、2、3、4、5、6. 取对数生长期 BIU-87 细胞, 以 3×10^5 个 / 孔接种于 6 孔板上, 培养 24 h 后, 依次按 1~6 顺序, 加入含不同浓度的改良型 TAT-VP3 融合蛋白 (对照组、0.1 mg/L、0.5 mg/L、1 mg/L、5 mg/L、10 mg/L) 的培养液, 继续培养 24 h. 各组细胞分别用 400 μ L RIRA 裂解液 (含 PMSF) 置于冰上裂解 30 min, 离心得到各组细胞的蛋白样品. 然后分别置于 0.5 mL 离心管中, 沸水煮 10 min, 使蛋白变性. 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分离, 经电转膜仪转至 PVDF 膜. 然后用 5% 脱脂奶粉室温下摇床轻摇封闭 1 h, 用 TBST 液洗膜 3 次. 孵一抗 (鼠抗人单抗 Survivin 或兔抗人单抗 Bcl-2, 二者分开进行), 37 °C 孵育 2 h, 用 PBS 室温下摇床上洗 3

次. 然后孵二抗 (羊抗兔 / 鼠 IgG-HRP 二抗, 1:5 000 比例稀释), 37 °C 孵 1 h, 漂洗后加化学发光底物显色, 照相并分析.

1.3 统计学处理

应用 SPSS 统计学软件进行 *t* 检验和单因素方差分析, 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 膀胱癌 BIU-87 细胞的生长抑制率

MTT 结果显示, 不同浓度的改良型 TAT-VP3 融合蛋白 (0.1 mg/L、0.5 mg/L、1 mg/L、10 mg/L、50 mg/L、100 mg/L) 均能有效抑制膀胱癌 BIU-87 细胞的增殖, 其抑制作用呈现出明显的剂量依赖性 ($P < 0.05$); 并随着作用时间的延长其抑制作用显著增强, 呈现出明显的时间依赖性 ($P < 0.05$), 见表 1, 图 1.

表 1 改良型 TAT-VP3 融合蛋白不同浓度, 不同时间点对 BIU-87 细胞的生长抑制率 [% , ($\bar{x} \pm s$)]

Tab. 1 Interfering with different concentration of improved TAT-VP3 fusion protein and at different time point, the inhibition rate of growth of BIU-87 cells [% , ($\bar{x} \pm s$)]

TAT-Apoptin (mg/L)	24 h	48 h	72 h
0	0	0	0
0.1	1.61 \pm 0.87*	2.60 \pm 1.74* Δ	15.57 \pm 1.83* Δ
0.5	1.61 \pm 0.60*	6.07 \pm 2.14* Δ	22.06 \pm 2.40* Δ
1	5.50 \pm 1.92*	10.41 \pm 1.64* Δ	26.25 \pm 1.09* Δ
10	8.72 \pm 1.83	20.06 \pm 1.87 Δ	56.61 \pm 1.91 Δ
50	44.95 \pm 2.07*	67.61 \pm 2.34* Δ	79.53 \pm 2.06* Δ
100	75.69 \pm 2.58*	80.33 \pm 2.47* Δ	84.09 \pm 2.21* Δ

同一时间点与 10 mg/L 组比较, * $P < 0.05$; 同一药物浓度, 与 24 h 组比较, $\Delta P < 0.05$.

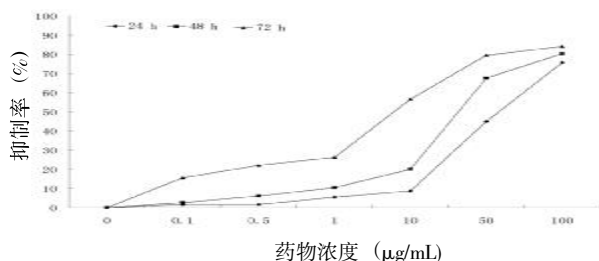


图 1 改良型 TAT-VP3 融合蛋白不同浓度, 不同时间点对 BIU-87 细胞的生长抑制率

Fig. 1 Interfering with different concentration of improved TAT-VP3 fusion protein and at different time point, the inhibition rate of growth of BIU-87 cells

2.2 QPCR 检测各组 Bcl-2 和 Survivin mRNA 表达水平

结果如图 2 所示. 随着作用时间延长, Bcl-2 和 Survivin mRNA 表达量逐渐减少, 其中, 0.5 mg/L 组, Bcl-2 和 Survivin mRNA 表达量 48 h、72 h 与 24 h 比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$). 同一时间点, 随着药物浓度的增加, 表达量亦逐渐减少.

2.3 膀胱癌 BIU-87 细胞的 Western blot 检测

结果如图 3 所示, 随着药物浓度的逐渐增加, Bcl-2 和 Survivin 蛋白表达逐渐减少, 存在剂量依赖性. 灰度值测定, bcl-2 蛋白表达, 0.5 mg/L 组与 1 mg/L 组, 1 mg/L 组与 5 mg/L 组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 其它各组比较均有统计学

意义 ($P < 0.05$). Survivin 蛋白表达, 0.1 mg/L 组与 0.5 mg/L 组, 1 mg/L 组比较, 0.5 mg/L 组与 1 mg/L 组比较, 无统计学意义 ($P > 0.05$); 其它各组比较均有意义 ($P < 0.05$).

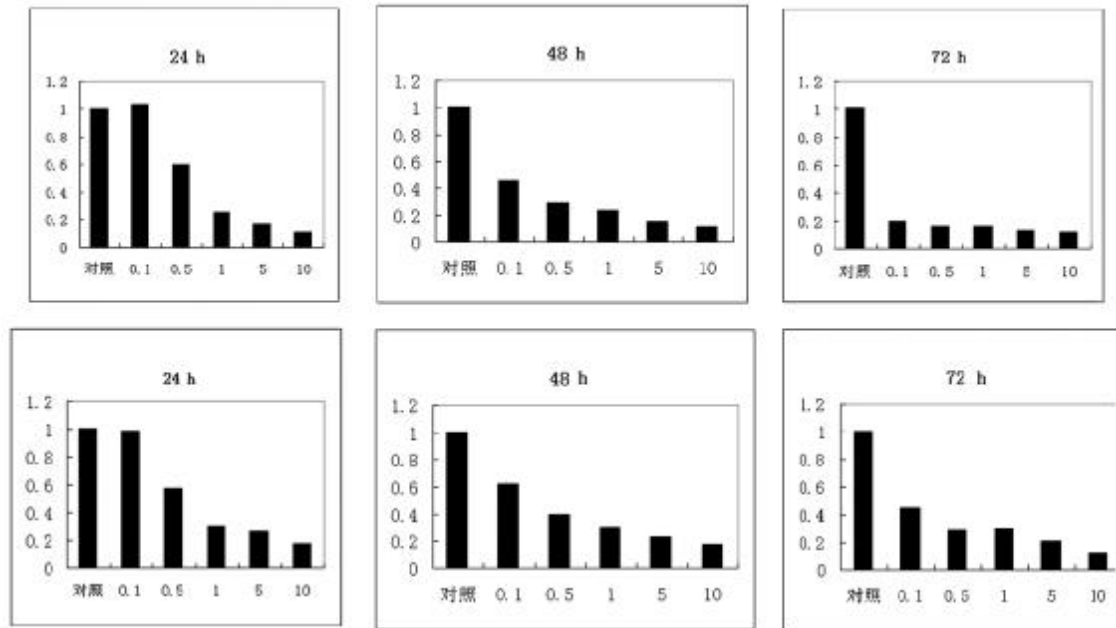


图2 改良型 TAT-VP3 融合蛋白不同浓度, 不同时间点对 BIU-87 细胞 Bcl-2 和 Survivin mRNA 表达的影响

Fig. 2 Interfering with different concentration of improved TAT-VP3 fusion protein and at different time point, the effect of the expression of bcl-2 and survivin mRNA on BIU-87 cells

24 h, bcl-2 mRNA, 0.1 mg/L、0.5 mg/L、5 mg/L、10 mg/L 组与对照组比较, $P < 0.05$; 5mg/L 组与 10mg/L 组比较, $P > 0.05$. Survivin mRNA, 1 mg/L 组与 5 mg/L 组比较, $P > 0.05$; 其它各组比较均有意义 ($P < 0.05$).

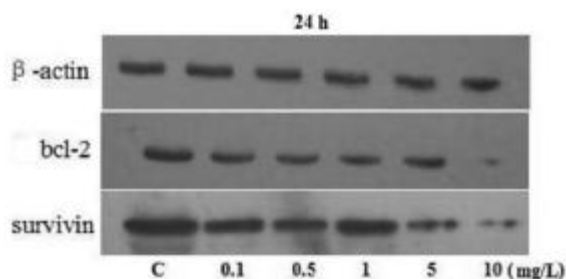


图3 改良型 TAT-VP3 融合蛋白不同浓度对 BIU-87 细胞 Bcl-2 和 Survivin 蛋白表达的影响

Fig. 3 Interfering with different concentration of improved TAT-VP3 fusion protein, the effect of the expression of bcl-2 and survivin protein on BIU-87 cells

3 讨论

凋亡素 (Apoptin) 是来源于鸡贫血病毒 (chicken anemia virus, CAV) 的一种小分子蛋白. 该病毒通过细胞凋亡导致雏鸡红细胞和胸腺细胞的缺损、鸡贫血和免疫缺陷的发生而致鸡的死亡^[6]. CAV 能编码 3 种蛋白质, 即 VP1、VP2、VP3, 其

中, VP3 为 CAV 的凋亡功能蛋白. 后来的研究发现, VP3 能诱导人类大多数肿瘤细胞的凋亡. 但是凋亡素是一种胞内蛋白, 不能直接透过细胞膜, 只有在肿瘤细胞内部才能表现出诱导凋亡活性. 利用凋亡素治疗肿瘤必须寻求进入肿瘤细胞的机制. 本实验室在前期的研究中, 成功的诱导、表达和纯化出了改良型 TAT-VP3 融合蛋白. 此次实验就是利用该改良型融合蛋白进行.

Bcl-2 是第 1 个被发现的抗凋亡基因, 能广泛抑制细胞凋亡, 尤其是抑制 DNA 损伤的细胞凋亡, 延长细胞的存活期, 保护发生基因突变的细胞长期生存而不凋亡. bcl-2 的过量表达, 促进细胞增殖, 细胞存活, 相反的, 抑制了 bcl-2 的表达, 则可促进细胞凋亡. 同样的, survivin 也是一种抗凋亡因子, 它在正常组织中无表达, 但可选择性地一些癌组织中过量表达, 且表达量与疾病的恶性程度有关, 吴宇东等^[7]认为 survivin 的表达水平与膀胱癌细胞的病理分级和临床分期有相关性. 而王艳波等^[8]的研究亦发现, survivin 在膀胱癌细胞中的表达量远远高于癌旁组织, 其表达量与病理分级和临床分期均有相关性.

本实验, 利用前期工作制成的改良型 TAT-VP3 融合蛋白作用膀胱癌 BIU-87 细胞, MTT 比色法检测 BIU-87 细胞的生长抑制率. 不同浓度的改良型 TAT-VP3 融合蛋白作用膀胱癌 BIU-87 细胞, 24 h, 48 h, 72 h, 实时荧光定量酶链聚合反应 (QPCR) 检测 Bcl-2 和 Survivin mRNA 的表达变化. 运用不同浓度的改良型 TAT-VP3 融合蛋白作用膀胱癌 BIU-87 细胞, 24h 后蛋白免疫印迹法 (Western Blotting) 检测 Bcl-2 和 Survivin 蛋白的表达情况. 结果发现, TAT-VP3 能够有效的抑制膀胱癌 BIU-87 细胞的增殖, 且随着作用时间和药物浓度的逐渐增加, 癌细胞的增殖抑制率也逐渐增加. 而在 TAT-VP3 的作用下, bcl-2 和 survivin 抗凋亡因子的表达亦发生了变化, 随着时间和浓度的增加, 呈现逐渐降低的趋势, 即抑制了二者的表达, 如前所述, 抑制了 bcl-2 和 survivin 抗凋亡因子的表达, 则促进了肿瘤细胞的凋亡.

改良型 TAT-VP3 融合蛋白的纯化成功, 使体外表达的凋亡素直接用于肿瘤治疗成为可能. 当然, 改良型 TAT-VP3 融合蛋白运用于临床, 还需要很长的一段时间, 在此期间, 还需要不断的研究来明确其在体内治疗时能否在肿瘤细胞内达到有效的治疗浓度, 它对机体是否存在某些毒副作用等等问题, 这些问题还需要今后进一步研究.

[参考文献]

- [1] DANEN-VAN OORSCHOT A A M, FISHER D F, GRIMBERGEN J M, et al. Apoptin induces apoptosis in human transformed and malignant cells but not in normal cell [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 5 843 - 5 847.
- [2] ZHANG Y H, LELIVELD S R, KOOISTRA K, et al. Recombinant Apoptin multimers kill tumor cells but are non-toxic and epitope-shielded in a normal-cell-specific fashion [J]. *Exp Cell Res*, 2003, 289: 36 - 46.
- [3] ROHN J L, NOTEBORN M H M. The viral death effector Apoptin reveals tumor-specific process [J]. *Apoptosis*, 2004, 9: 315 - 322.
- [4] CAO H D, YANG Y X, LU L, et al. Attenuated *Salmonella typhimurium* carrying TRAIL and VP3 genes inhibits the growth of gastric cancer cells in vitro and in vivo [J]. *Tumori*, 2010, 96(2): 296 - 303.
- [5] 张启波, 王剑松, 詹辉, 等. 改良型 TAT-VP3 融合蛋白的表达、纯化及鉴定 [J]. *昆明医学院学报*, 2010, 31(9): 4 - 6.
- [6] NOTEBORN MHM, KOCH G. Chicken anemia virus infection molecular basis of pathogenesis [J]. *Avian Pathol*, 1995, 24: 11 - 31.
- [7] WU Y, WANG G, WEI J, et al. Survivin protein expression positively correlated with proliferative activity of cancer cells in bladder cancer [J]. *Indian J Med Sci*, 2005, 59(6): 235 - 242.
- [8] 王艳波, 朱朝辉, 曾甫清, 等. Survivin 在膀胱癌移行细胞中的表达及其临床意义 [J]. *临床泌尿外科杂志*, 2007, 22(4): 292 - 295.

(2012-04-23 收稿)