

融合蛋白 PTD-SOD 对紫外辐照下 L-02 细胞的保护和修复能力的研究

张晨 陈晓超 刘树滔 刘元刚 饶平凡

(福州大学生物工程研究所 福州 350002)

摘要 通过体外细胞培养,探讨了融合蛋白 PTD-SOD 是否经由跨膜转导而增强 SOD 对靶细胞紫外辐射损伤防护和修复能力。结果表明辐照时间为 120s,酶活力为 320U/mL 时,PTD-SOD 对细胞的保护率达 58.5%,约为野生型 SOD 的 5 倍;紫外辐照时间为 140s,酶活力为 500U/mL 时,PTD-SOD 对细胞的保护率仍有 43.2%,相同情况下野生型 SOD 的保护率趋近于 0;辐照时间 40s,酶活力为 500U/mL 时 PTD-SOD 对细胞的修复率有 50.1%,而野生型 SOD 的修复率最高也没有超过 8%。这些结果说明相对野生型 SOD,PTD-SOD 对 L-02 细胞的保护和修复能力得到了显著的增强,能有效地提高 SOD 的生物利用率。

关键词 蛋白质转导域,氧化歧化酶,紫外辐射

中图分类号 Q691.9

氧化歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)是国际公认的自由基清除剂。作为催化超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)进行歧化反应的金属酶,它在防氧毒性、抗辐射损伤、治疗自身免疫性疾病、防治各种炎症等方面都具有重要的作用^[1]。但由于 SOD 分子量在 32000Da 左右,很难进入细胞发挥作用,且 SOD 在体内的半衰期较短,因此外源 SOD 的生物利用率很低^[2]。1988 年,Green M 等^[3]发现了反式激活因子 TAT 蛋白能够跨膜转导进入细胞。1997 年,Vives 等^[4]发现 TAT 蛋白的一段区域能够穿过细胞膜并定位到细胞中,称之为 TAT 蛋白质转导域(Protein transduction domain, PTD)。1998 年,Nagahara H 等发现 TAT 蛋白转导域与其他外源蛋白融合后表达的融合蛋白(TAT-蛋白质)能够高效地进入体外培养的人细胞,并且表现出生物学功能^[5]。因此通过 DNA 重组技术将 PTD 的编码序列与 SOD 基因融合,并进行大量表达,制备 PTD-SOD 融合蛋白。实验证明 PTD-SOD 具有跨膜转导能力^[6,7],但它的抗辐射能力是否因此得到提高还未被证实。本研究以人正常肝细胞(L-02)为模型,研究 PTD-SOD 较野生型 SOD 是否在生物利用率上有所提高,从而使其在抗紫外辐射损伤方面的能力也有所增强。

1 材料和方法

1.1 实验材料

PTD-SOD 与野生型 SOD 均来自基因重组大肠杆菌的大量表达,样品详细获得方法参照文献[6]。人正常肝细胞(L-02)购买于上海中国科学院细胞库;超氧化歧化酶(SOD)测试盒,南京建成;紫外灯管($\lambda=253.7\text{nm}$, 30W, 220V),福州散化公司;RP1640 培养基、DMSO(二甲基亚砷),美国 GIBCO 公司;HEPES,美国 Hyclone 公司;新生牛血清,杭州四季青公司;MTT(溴化四甲基唑)、胰蛋白酶,美国 Amresco 公司。

1.2 仪器

离心机(Hitachi Koki-CF15RX, Japan),上海光谱仪器有限公司 752 紫外分光光度计(上海光谱),超净工作台(Thermo Forma-1285, USA)、二氧化碳培养箱(Thermo Forma-3111, USA),DG5031 型酶联免疫检测仪(国营华东)。

1.3 实验方法

1.3.1 SOD 样品的制备 参照文献中 SOD 分离纯

福州大学科技发展基金(2006-XQ-20)资助

第一作者:张晨,男,1982年9月出生,2007年于福州大学获得硕士学位,现在福州大学生物工程研究所工作,研究方向为生物化学与分子生物学

通讯联系人:刘树滔

收稿日期:初稿 2007-03-28,修回 2007-05-21

化的方法,通过发酵,硫酸铵沉降,亲和层析,以及透析的方法进行样品的制备^[8]。

1.3.2 SOD 活力测定 采用 SOD 试剂盒,黄嘌呤氧化酶法(羟胺法)测定 SOD 活力。

1.3.3 蛋白质浓度的测定 Folin-酚试剂法测定蛋白质的浓度,以牛血清白蛋白为标准蛋白^[9]。

1.3.4 细胞存活率测定 收集细胞,调整细胞数为 $4 \times 10^5/\text{mL}$ 接种于 96 孔板, $100 \mu\text{L}/\text{孔}$, 每组设 4 个平行孔。培养 24h, 弃去培养基, PBS 清洗细胞后加入新鲜的无血清培养基 $200 \mu\text{L}$, 将孔板放入培养箱内培养 3h。固定细胞培养板与光源的距离为 60cm, 打开孔板盖, 在超净工作台内进行辐照。辐照完毕后, 将孔板内培养基弃去, 加入新鲜无血清培养基 $200 \mu\text{L}$, 置于细胞培养箱内培养 24h, 结束后, 移去培养基, 加入 1 mg/mL 的 MTT 溶液 $50 \mu\text{L}$, 37°C 孵育 3h 后, 弃去上清液, 加入 $150 \mu\text{L}$ 二甲基亚砜, 微量振荡仪振荡 10min, 待沉淀完全溶解后, 用酶联免疫检测仪测 A_{590} 值^[10]。相同实验重复三次, 取平均值进行计算。存活率计算公式为: $(A_{590} \text{ 辐照组} / A_{590} \text{ 无辐照组}) \times 100\%$ 。

1.3.5 细胞保护率测定 同 1.3.4 的方法接种培养细胞, PBS 清洗细胞后, 加入 SOD 样品和新鲜的无血清培养基各 $100 \mu\text{L}$, 并以 PBS 缓冲液做出辐照对照组和无辐照对照组。将孔板放入培养箱内培养 3h。同 1.3.4 的方法进行辐照。辐照完毕后, 将孔板内培养基弃去, 并置于细胞培养箱内培养 24h。培养结束后, 移去培养基, 用 1.3.4 中 MTT 法测 A_{590} 值^[7]。实验重复三次, 取平均值进行计算。保护率计算公式为: $[(A_{590} \text{ 试验组} - A_{590} \text{ 辐照组}) / (A_{590} \text{ 无辐照组} - A_{590} \text{ 辐照组})] \times 100\%$ 。

1.3.6 细胞修复率测定 同 1.3.4 的方法接种培养细胞, PBS 清洗细胞后, 加入新鲜的无血清培养基 $200 \mu\text{L}$ 。然后打开孔板盖进行紫外辐照。辐照完毕后, 将孔板内培养基弃去, 加入 SOD 样品和新鲜的无血清培养基各 $100 \mu\text{L}$, 并以 PBS 缓冲液做出辐照对照组和无辐照对照组, 细胞培养箱内培养 24h。培养结束后, 移去培养基, 用 1.3.4 中 MTT 法测 A_{590} 值^[7]。实验重复三次, 取平均值进行计算。修复率计算公式为: $[(A_{590} \text{ 试验组} - A_{590} \text{ 辐照组}) / (A_{590} \text{ 无辐照组} - A_{590} \text{ 辐照组})] \times 100\%$ 。

2 结果

2.1 PTD-SOD 与野生型 SOD 的分离纯化

通过 1.3.1 的方法分别从发酵液中纯化出 PTD-SOD 与 SOD, 使之达到电泳纯, 并测定纯化后的 SOD 活力和蛋白含量(表 1), -20°C 冰箱保存

待用。

Table 1 The protein content and enzyme activity of SOD after purification

Sample	Protein content	Enzyme activity
PTD-SOD	274 $\mu\text{g/mL}$	1000U/mL
wild-type SOD	308 $\mu\text{g/mL}$	1200U/mL

2.2 辐照时间的选择

用黑色挡板遮挡紫外辐射, 调整每组细胞辐照时间。最大辐照时间为 400s, 以辐照时间为 0s 作为对照, 每间隔 40s 作为一个测量点。

L-02 细胞随着辐照时间的增加, 细胞存活率逐渐下降, 在辐照时间为 200s 时细胞存活率仅为 24.6% (图 1)。由此可见, L-02 是种对紫外辐射敏感的细胞株, 可以作为测试对象检测样品对紫外辐射的防护和修复能力。

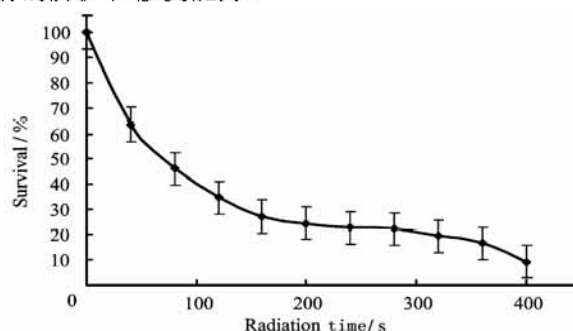


Fig.1 The sensitivity of L-02 to UV-C

2.3 SOD 酶活力对细胞辐射防护能力的影响

如图 1 所示, 辐照时间超过 120s 后, L-02 细胞存活率的下降较不明显, 此时细胞存活率为 35%。因此选择 120s 作为辐照时间, 取 PTD-SOD 酶活力为 480U/mL, 每间隔 80U/mL 作为一个测量点; 取野生型 SOD 酶活力为 480U/mL, 每间隔 120U/mL 作为一个测量点, 测定不同浓度的样品对 L-02 细胞的保护率, 结果呈现出较高的重现性。

随着 SOD 酶活力的不断增加, 细胞的抗紫外能力也相应增加(图 2), 当 PTD-SOD 酶活力增加到 320U/mL 时, 保护率达到 58.5%, 此后 PTD-SOD 浓度的增加并不能提高细胞的抗辐射能力。而野生型 SOD 对细胞的保护能力在所检测范围内始终随着浓度的增加而增加, 它在酶活力为 500U/mL 时对细胞的保护率仅为 13.2%。

2.4 辐照时间对 SOD 的辐射保护能力的影响

取 PTD-SOD 样品, 辐照时间范围为 60–300s, 每间隔 40s 作为一个测量点; 取野生型 SOD 样品, 辐照时间范围为 25–205s, 每间隔 20s 作为一个测

量点。测定酶活力为 500U/mL 的 SOD 对 L-02 细胞的保护率, 结果呈现出较高的重现性。

随着辐照时间的增长, SOD 对细胞的保护能力逐渐降低 (图 3)。相比野生型 SOD, PTD-SOD 对细胞的保护率的下降趋势比较缓慢。当辐照时间为 120s 时 PTD-SOD 对细胞的保护率仍然大于 50%, 而野生型 SOD 在辐射时间为 30s 情况下对细胞的保护率就已经下降到 50%, 辐照时间为 140s 时 PTD-SOD 对细胞的保护率仍有 43.2%, 而辐照时间为 105s 时野生型 SOD 对细胞的保护能力即趋近于 0。

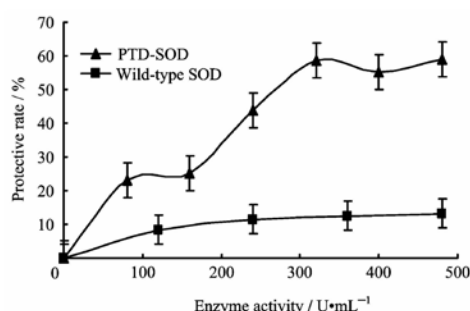


Fig.2 Comparison of anti-ultraviolet ability between PTD-SOD and wild-type SOD

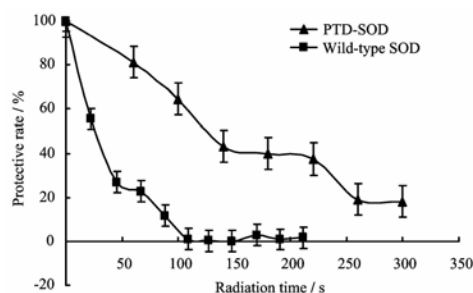


Fig.3 Effects of radiation duration on protective rate with 500U/mL SOD

2.5 辐照时间对 SOD 修复细胞能力的影响

以辐照时间作为细胞接受辐射时间的依据, 辐照时间范围为 20–200s, 每间隔 20s 测定酶活力为 500U/mL 的 SOD 样品对 L-02 细胞的修复率。

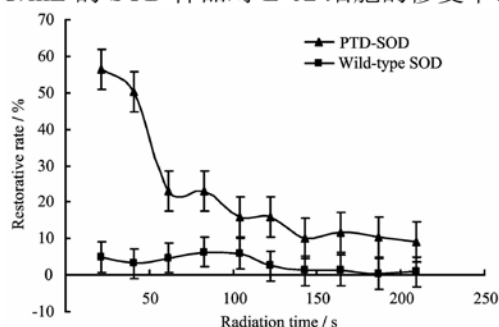


Fig.4 Effects of radiation duration on restorative rate with 500U/mL SOD

随着辐照时间的增长, SOD 对细胞的修复能力逐渐降低 (图 4)。辐照时间为 40s 时 PTD-SOD 对细胞的修复率为 50.1%, 随着辐照时间增加为 60s, PTD-SOD 对细胞的修复率跌至 22.9%, 但是野生型 SOD 对细胞活力的修复能力始终低于 8%。

3 讨论

辐射损伤机理较为复杂, 目前尚未研究清楚。有研究表明电离辐射产生的自由基作用于核酸与生物膜, 引起细胞的损伤是辐射损伤的主要原因^[11]。虽然野生型 SOD 清除自由基的作用已被证实, 但医学上却应用较少。究其原因, 应该是在体内产生自由基后, 野生型 SOD 无法迅速进入细胞内发挥作用所致。本实验也证明野生型 SOD 无论是防护和后期修复的效果均不理想。PTD-SOD 活力达到 320U/mL 时, 对细胞的保护能力即可达到 58.5% 其效果约为野生型 SOD 的 5 倍 (图 2)。随着辐照剂量的增加两种 SOD 对 L-02 细胞的保护能力随之下降, 酶活力为 500U/mL 的野生型 SOD 在辐照时间为 125s 时保护效果即基本为 0, 而同活力的 PTD-SOD 在辐照时间为 140s 时对 L-02 细胞仍有 43.2% 的保护能力 (图 3)。在 L-02 细胞接受较少的辐照时间时 PTD-SOD 能对细胞进行有效的修复, 辐照时间为 40s 时, PTD-SOD 对靶细胞的修复率为 50.1%, 而野生型 SOD 的修复率始终低于 8% (图 4)。此外, 在用维生素 C (Vc) 作为对照样品的实验中表明, Vc 对细胞具有很强的保护作用 (Vc 含量为 150μg/mL 辐射时间为 50s 时, 保护率接近 100%), 但它的修复效果并不理想 (Vc 含量为 150μg/mL 辐射时间为 50s 时, 修复率约 15%), 且随着 Vc 用量的增加而缓慢增强。Vc 是通过扩散的运输方式进入细胞, 这种进入方式决定了 Vc 进入细胞的速度比较缓慢, 且呈浓度依赖关系^[12]。这些实验结果说明 SOD 的跨膜转导能力对辐射损伤细胞的保护和修复具有重要的影响。

自从 1969 年 McCord 和 Fridovich 首次从牛血红细胞中发现超 SOD 以来, SOD 作为人体内一种重要的抗氧化酶, 已被国内外学者广泛研究^[13]。SOD 作用的机理是将超氧阴离子自由基歧化产生 O_2 和 H_2O_2 。 H_2O_2 又在过氧化氢酶 (Catalase, CAT) 的作用下, 生成 H_2O 和 O_2 ^[14]。实验表明 PTD-SOD 对细胞的保护存在极限, 单纯的增加 SOD 活力并不能完全消除紫外辐射对细胞的影响。这可能是因为当 PTD-SOD 将细胞内的 O_2^- 歧化为 H_2O_2 和 O_2 后, 胞内存在的 CAT 不足以将 H_2O_2 迅速转化, 导致 H_2O_2 的积累, 而大量的 H_2O_2 对细胞同样具有杀伤

作用,同时还可能抑制 SOD 的活性。所以研究一种与 PTD-SOD 配套使用的 CAT,可能也是增强外源 SOD 生物利用率的一种手段。

本 研 究 组 已 经 在 前 期 的 实 验 中 证 明 了 PTD-SOD 的跨膜能力。在此基础上证明了 PTD-SOD 能更有效地保护细胞免于紫外损伤,这将有助于 SOD 在医药、食品、化妆品等方面的应用。进一步改良 SOD 的理化性质和使用条件,以及与 SOD 配套的 CAT 的研究工作正在进行中。

参考文献

- 1 田春美, 钟秋平. 中国热带医学, 2005, **5**(8): 1730-1732
TIAN Chunmei, ZHONG Qiuping. China Tropical Medicine, 2005, **5**(8): 1730-1732
- 2 孔庆胜, 迮玉官. 济宁医学院学报, 2006, **29**(1): 16-17
KONG Qingsheng, ZE Yuguan. Journal of Jining Medical College, 2006, **29**(1): 16-17
- 3 Green M, Loewenstein P M. Cell, 1988, **55**(6): 1179-1188
- 4 Vives E, Brodin P, Leblen B. J BiolChem, 1997, **272**: 16010-16017
- 5 Nagahara H, Vocero-Akbani A, Snyder E L, *et al.* Nat Med, 1998, **4**: 1449-1452
- 6 陈春. TAT-PTD 融合的 hCu, Zn-SOD 的表达、纯化和表征. 福州大学硕士学位论文, 2005: 53-59
CHEN Chun. Cu, Zn-superoxide dismutase mediated by an TAT-PTD: expression, purification and characterization. Fuzhou University dissertation. 2005: 53-59
- 7 Won Sik Eum, Sang Ho Jang, *et al.* Mol Cells, 2005, **19**(2): 191-197
- 8 陈春, 陈躬瑞, 刘树滔, 等. 福州大学学报(自然科学版), 2004, **12**: 763-768
CHEN Chun, CHEN Gongrui, LIU Shutao, *et al.* Journal of Fuzhou University (Natural Sciences Edition), 2004, **12**: 763-768
- 9 王爱军, 王凤山, 王友联, 等. 中国生化药物杂志, 2003, **24**(2): 78-80
WANG Aijun, WANG Fengshan, WANG Youlian, *et al.* Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics, 2003, **24**(2): 78-80
- 10 Russell C A, Vindelov L L. Journal of Immunological Methods, 1998, **217**: 165-175
- 11 李宇国, 倪瑾, 韩玲, 等. 辐射研究与辐射工艺学报, 2004, **22**(6): 356-360
LI Yuguo, NI Jin, HAN Ling, *et al.* Journal of Radiation Research and Radiation Processing, 2004, **22**(6): 356-360
- 12 沈萍. 微生物学(第1版). 北京: 高等教育出版社, 2007. 91-92
SHEN Ping. Microbiology (I). Beijing: Higher Education Press, 2007. 91-92
- 13 McCord J M. J Biol Chem, 1969, **244**: 6049-6051
- 14 史大永, 李良智, 邱龙辉, 等. 青岛化工学院学院学报, 2001, **322**(1): 50-52
SHI Dayong, LI Liangzhi, QIU Longhui, *et al.* Journal of Qingdao Institute of Chemical Technology, 2001, **322**(1): 50-52

Protective and repairing abilities of fusion protein PTD-SOD for L-02 cell irradiated by UV-C

ZHANG Chen CHEN Xiaochao LIU Shutao LIU Yuangang RAO Pingfan
(Institute of Biotechnology, Fuzhou University, Fuzhou 350002)

ABSTRACT Cell culture was carried out to investigate whether the protective and repairing capacity of SOD against the radiation damage induced by UV-C was improved because of its transduction ability. When L-02 cell line being exposed to UV-C in the solution with SOD enzymatic activity of 320U/mL, the protective rate of PTD-SOD increased to 58.5%, which was about 5 times of that of wild-type SOD; when irradiation duration prolonged to 140s, the protective rate of PTD-SOD remained to be 43.2%, while that of wild-type SOD was almost undetectable. Regarding restorative rate, that of PTD-SOD could reserve 50.1% when L-02 cell exposed to UV-C for 40s, while that of wild-type SOD was less than 8%. These results suggested PTD enhanced the protective and repairing ability of SOD against UV radiation remarkably, owing to improve bioavailability of SOD.

KEYWORDS Protein transduction domain, Superoxide dismutase, Ultraviolet

CLC Q691.9