

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00215

# Tat 穿膜肽的临床应用研究进展

## Progress in clinical application of transcriptional activator protein Tat

蒋怡彬<sup>1</sup>, 俞仲望<sup>2</sup>, 徐晓辉<sup>2\*</sup>

1. 第二军医大学生物技术本科 2004 级, 上海 200433

2. 第二军医大学基础部神经生物学教研室, 上海 200433

**[摘要]** 穿膜肽 Tat(transcriptional activator protein)是一种带正电荷的短肽,可以协助大分子物质进入哺乳动物细胞。最近的研究表明,多种与 Tat 融合的物质能够穿过细胞膜而且可以发挥其生物学功能。这项技术对结合物的大小没有严格的限制,即使是原本无法使用的大分子物质也有可能用于治疗疾病。Tat 已经在肿瘤、糖尿病、免疫治疗等临床领域展现出很大的研究价值,并且已经取得了不少新的进展,具有广泛的应用前景。

**[关键词]** 穿膜肽; Tat 基因产物; 治疗应用; 药物运输

**[中图分类号]** R 341      **[文献标志码]** B      **[文章编号]** 0258-879X(2008)02-0215-03

蛋白转导域 PTD 和穿膜肽 CPPs 系特指那些小于 20 个氨基酸、带正电荷的短肽,可以穿过大多数细胞膜。它们可以将大分子运输入几乎所有的哺乳动物细胞,无需特殊的培养环境,而且它们的重组蛋白也表现出穿膜活性。其中研究较多的是 1988 年发现的 HIV-1 的转录活化因子 Tat。

### 1 Tat 蛋白的简介

引起人类艾滋病的病毒 HIV-1 编码 5 种以上的蛋白质,它们具有调控病毒生长的作用。编码 Tat 的基因包含 2 个外显子,分别编码 72 和 14 个氨基酸,是 HIV-1 基因表达和病毒复制的基础。另外,它也是感染早期发挥作用的蛋白,能够反式激活特定病毒或者细胞基因的表达。Tat 蛋白具有 3 个不同的结构域<sup>[1]</sup>:(1)酸性 N 末端,主要具有反式激活功能;(2)DNA 结合区(第 22~37 位氨基酸),富含半胱氨酸,带有一个锌指基元;(3)碱性区(第 48~60 位氨基酸),参与核转运及蛋白对钙离子非依赖性细胞的附着作用。对其序列的研究,已经确定了蛋白转导所必需的区域<sup>[2]</sup>,Tat 49-57 (RKKRRQRRR)是保持穿膜活性的最小片段,任意去除一个精氨酸都会使其活性降低一半。在所有的蛋白转导域中,Tat 是最大的热点,许多在细菌内合成的 Tat 融合蛋白能进入哺乳动物细胞而且仍能保持活性。此外,它还能协助 45 nm 铁珠、λ 噬菌体和脂质体进入细胞<sup>[3]</sup>。至于 Tat 进入细胞的确切机制的探讨,虽然有所进展,但还有待深入的研究。

### 2 Tat 蛋白的医学应用研究

**2.1 细胞保护作用** Apaf-1 是细胞色素 C 诱导的凋亡蛋白酶激活因子,可以和前体 caspase-9(天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶)以及 dATP 形成多蛋白的复合物,介导细胞凋亡。将一种新的 Apaf-1 抑制剂与 Tat 结合后,可以有效地改善

线粒体介导的细胞程序性死亡<sup>[4]</sup>。这种抑制剂的体外实验表现出良好的前景,是非常有效的 Apaf-1 抑制剂,然而细胞内运输和特异性的限制使它难以被用于人体,所以必须进行结构修改,改善它的溶解度与膜透性。Apaf-1 抑制蛋白与 Tat 连接后显示出更高的活性,当与整合蛋白接触后显示出细胞质内的荧光扩散同时有细胞膜结合,最有可能的机制是转移作用或者转导,但是同时也观察到一定的细胞毒性。

细胞凋亡是败血症中主要的病理机制,在细胞凋亡的信号转导通路中,Bcl-x<sub>L</sub>属于负控制信号,抑制细胞凋亡,它的 BH4 结构域也具有抗凋亡活性。在体外实验中,TAT-Bcl-x<sub>L</sub>和 TAT-BH4 融合蛋白可以保护人淋巴细胞不受大肠杆菌诱导而凋亡;体内实验中能有效降低败血症模式鼠的淋巴细胞凋亡率。Tat 结合的 Bcl-2 类似的多肽,可以提供一种新的治疗方法,阻止败血症中的细胞凋亡并提高存活率<sup>[5]</sup>。

**2.2 肿瘤治疗** 对于癌症分子水平上的研究,主要是为了发现新的治疗策略和化合物,希望其特异性地作用于细胞恶性转变的基因或者生物化学方面的靶点。基因治疗、抗体治疗等已经用于治疗癌症,但小分子的化合物能够弥补上述方法的不足。它们可以特异性地识别蛋白质的结构域,干扰酶的功能或蛋白质的相互作用,从而达到治疗的目的。运用成熟的筛选技术,可以方便地得到靶蛋白的配体,再利用 Tat 的穿膜特性与其结合后即可开展一系列实验。因此,Tat 在肿瘤治疗方面具有良好的前景。

Tünnemann 等<sup>[6]</sup>将人肿瘤抑制基因 p21<sup>WAF/CIP</sup>和鼠的 DNA 连接酶分别与 Tat 结合后与 C2C12 鼠肌原细胞混合培养,可以观察到其对细胞周期的强烈抑制。同时还发现 Tat 转运蛋白和多肽的机制不同,Tat 结合蛋白通过细胞内吞进入细胞内囊泡,然而结合 Tat 的多肽通过膜电位依赖的方法

**[收稿日期]** 2007-09-21      **[接受日期]** 2007-12-20

**[作者简介]** 蒋怡彬,学员. E-mail:jacksonkingdom@163.com

\* 通讯作者(Corresponding author). E-mail:xxhxxh530@tom.com

快速进入细胞,并显示出很高的移动性。

最近一种治疗酸性实体瘤的新的药物靶向系统诞生了,它是对 pH 值非常敏感的聚合物和 Tat 穿膜肽。这个靶向系统由两部分组成:(1)一个聚合胶团,含多聚左旋乳酸(PLLA)构成的疏水核心和与 Tat 结合的聚乙二醇(PEG)构成的亲水外壳。(2)对 pH 值非常敏感的多聚异丁烯酰基磺胺二甲氧嘧啶(PSD)与 PEG 的聚合物。胶粒中 PSD 阴离子与 Tat 阳离子共同构成最终的运载体系,使他们可以保护胶粒,并在酸性实体瘤的 pH 环境中暴露活性部位。这个药物靶向系统能非常有效地识别 pH 值的细微不同并陷入细胞,与胶粒结合的 Tat 可以帮助它转移到细胞内甚至细胞核表面。因此它在肿瘤治疗方面具有良好的前景,进一步的实验仍在继续<sup>[7]</sup>。

恶性胶质瘤是最常见的脑部肿瘤,如不采取强有力的化学疗法平均存活率少于 1 年。这类肿瘤的药物抗性使得烷化剂(抗癌药物)无法使用,而破坏增殖细胞核抗原(PCNA)的功能可以使细胞对烷化剂敏感。PCNA 是相对分子质量为 36 000 的多肽,在 DNA 转录与修复中具有重要作用,通过协助众多蛋白质的折叠来调节它们的相互作用。运用一种细胞周期蛋白依赖激酶的抑制剂 p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 的模拟物,或许可以成为使细胞致敏的新方法。Baker 等<sup>[8]</sup>将 p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 与 Tat48-60 连接并命名为 Tat48-60-P10,它包含与 PCNA 相互作用的区域 PIP Box。实验表明,Tat48-60-P10 对 U251 和 U373 神经胶质瘤细胞系有非常明显的致敏作用。

ErbB2 是癌症治疗的有效靶点,但由于其抗药性和不良反应,用于 ErbB2 阳性乳腺癌的治疗效果不够理想。使用穿膜肽的治疗具有良好的前景,因为被转运的物质能保持生物学活性。将 Tat 与抗 HER-2/neu 肽模拟物(AHNP)连接后就构成了肽载体,可以特异性地瞄准 ErbB2 过表达的乳腺癌。将信号转导与转录活化因子 3(STAT3)的抑制肽与上述载体结合后(P3-AHNP-STAT3BP),在体外实验中成功地降低了 STAT3 与互相作用的 DNA 序列的结合,并且能抑制细胞生长。注射的 P3-AHNP-STAT3BP 优先在 435. eB 乳腺癌细胞接种处聚积,能更好地减少增殖、促进凋亡和抑制肿瘤生长。这种新的多肽运输系统,为将来安全有效的新一代癌症特异性分子治疗提供了坚实的基础<sup>[9]</sup>。

蛋白激酶 2(CK2)是一种丝氨酸-苏氨酸激酶,在人类肿瘤中经常失调。如果某种多肽能够与 CK2 的酸性结构域结合,也许它可以表现出抗癌特性。通过扫描一个随机的环形肽噬菌体展示文库,找到了一种新的多肽 P15,可以在体外阻断底物从而扰乱 CK2 的磷酸化。将它与 Tat 融合后,迅速使 caspase 激活,并对多种肿瘤细胞株产生细胞毒性,从而诱导凋亡。另外将 P15-Tat 注射入患有肿瘤的小鼠后,肿块发生实质性退化。这种新型环形肽在体内能阻断 CK2 的磷酸化并表现出抗癌活性,有可能被用作治疗实体瘤或癌症治疗的佐剂<sup>[10]</sup>。

临床上对抑癌药物的抗性是癌症治疗失败的主要原因,50%的人类肿瘤或者对化疗完全抵抗或者只是短暂地有反应。到目前为止,最具有特征性的机制是能量依赖的药物流出泵蛋白,如 P-糖蛋白(Pgp)的过度表达,把药物从细胞质

中运出。Tat 与一种普通的抗癌药物多柔比星结合后,对耐药和药物敏感的肿瘤都具有杀灭活性。穿膜肽连接的多柔比星可以穿过 Pgp 流出泵从而杀死耐药的细胞。这个发现为开发有效的抗癌药物提供了新的希望<sup>[11]</sup>。

单链抗体可变区片段(scFv)相比 IgG 有更好的药代动力学和生物扰动特性。肿瘤摄取 scFvs 的速度很快,但血浆中 scFvs 的半衰期比 IgG 短。由于较短的保留时间,scFvs 在肿瘤中沉积的净剂量较低,从而限制了其在放射免疫治疗中的运用。为了改善肿瘤对 scFvs 的摄取和储留,将 Tat 与 scFvs 连接,实验中的 scFvs 是抗肿瘤相关糖蛋白 72 的单克隆抗体 CC49。穿膜肽提高了 scFvs 在肿瘤中的储留,但没有影响峰值剂量的积累,药代动力学也没有改变。因此,这种穿膜肽复合物可能用于改进单克隆抗体放射性药物<sup>[12]</sup>。

2.3 糖尿病 胰岛移植是治疗 1 型糖尿病的有效方法,但是胰岛的活性受到坏死和凋亡的影响,这是由于氧化应激、体外培养与移植中的创伤造成。在实验中,将细胞保护蛋白和 Tat 结合转入产生胰岛素的细胞,可以让其拥有抵抗 TNF 毒性的能力,并且可以降低胰岛细胞培养时的死亡率。这种暂时性的保护能增强可移植的胰岛的活性,另外延长培养的胰岛的活性,让患者优先接受移植治疗<sup>[13]</sup>。

2.4 抗真菌 Jung 等<sup>[14]</sup>发现 Tat 47-58 具有抗真菌活性,并且对人的红细胞无溶血效应。Tat 在陷入真菌细胞时对细胞膜没有任何损害,流式细胞计数显示 Tat 的入膜途径是能量和盐非依赖性的。扫描显微镜法显示,Tat 在细胞核迅速堆积没有受到时间和温度的任何妨碍。一旦进入细胞核,多肽就开始影响白珠菌的细胞周期,使它停在 G<sub>1</sub> 期。

2.5 免疫治疗 大量研究表明,机体在清除细胞内感染和抗肿瘤的过程中,细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)介导的特异性细胞免疫发挥重要作用。CTL 通过其 T 细胞受体特异性识别抗原提呈细胞(APC)表面的 MHC-I 类分子-肽复合物(CTL 表位),然后自身得以活化,最终通过多种机制杀伤靶细胞。而外源性抗原(如可溶性蛋白质或多肽)被 APC 以胞饮方式内吞后,绝大多数进入 MHC-II 类抗原提呈途径以激活 CD4<sup>+</sup> 辅助性 T 细胞(T<sub>H</sub>),仅有少量抗原可被 MHC-I 类分子提呈。因此由内源性蛋白质抗原激发的特异性 CTL 应答的能力远远强于外源性抗原。故对于肽疫苗而言,如何将其有效地投入 APC 内 MHC-I 类抗原提呈途径是激发特异性 CTL 应答的关键。Yin 等<sup>[15]</sup>在实验设计了穿膜肽人乳头瘤病毒(HPV) 16 E7 限制性 CTL 表位(第 49~57 位氨基酸)的融合肽疫苗,并应用多肽固相合成技术在其 N 末端加上 Tat49-57 序列,不会影响表位的提呈效率,而且在体外能有效激发针对 E749-57 特异性的 CTL 应答。这为新型抗肿瘤及细胞内感染的多肽疫苗设计提供了新思路。

2.6 中枢神经系统疾病的治疗 在一些体内与体外模型中,胶质细胞源性神经生长因子(GDNF)能促进中脑多巴胺能神经的存活。由于多巴胺能神经元的死亡是帕金森病的病因,GDNF 有望成为该疾病的治疗因子。但是这种神经生长因子不能穿过血脑屏障,而 HIV-1-Tat 衍生穿膜肽能够使融合蛋白穿过血脑屏障。在神经外伤和局部缺血的体内模型中,Tat-GDNF 能够增强 GDNF 的神经元保护作用;然而,

在帕金森病模型的体内实验中,Tat-GDNF并没起到保护神经元的作用。也许将它与Tat抗凋亡蛋白一起使用会有更好的效果<sup>[16]</sup>。

2.7 脑组织标记 Santra等<sup>[17]</sup>将Tat与色谱数据系统(Mn/ZnS)量子量子 dots (Qdots)结合,然后通过动脉内输送进入小鼠大脑,可以在数分钟内标记大脑组织而无需处理血脑屏障。Qdots的装载率非常高,可以对整个小鼠的大脑使用粗略的荧光目测法,而且仅使用一个低功率的便携式紫外灯。组织学的数据清楚地显示,Tat结合的Qdots沿着上皮细胞移行,然后到达脑实质。没有Tat的Qdots不能标记脑组织,说明Tat是穿过血脑屏障所必需的。现阶段的实验表明将大量Qdots成像因子运送到脑组织是可行的。

### 3 展望

虽然穿膜肽开始在医学领域使用,但是缺少靶特异性。因此对于肽序列的修改或者引入人工合成的氨基酸侧链可以提高其特异性。然而,众所周知即使是最小的序列改变也可以对肽的穿膜药物运输活性造成巨大影响,所以必须确定一个精确的尺度来定义具有高药物运输活性的穿膜肽。值得我们更深入探索的是阐明导致膜转位的机制,这需要了解运输肽与膜组分之间的相互作用以及发生作用后的结构变化。将来设计的穿膜肽必须满足所确定的标准,这将是下一代穿膜肽设计的起点。

### [参考文献]

- [1] Vogel B E, Lee S J, Hildebrand A, Carig W, Pierschbacher M D, Wong-Staal F, et al. A novel integrin specificity exemplified by binding of the alpha beta 5 integrin to the basic domain of the HIV Tat protein and vitronectin[J]. J Cell Biol, 1993, 121:461-468.
- [2] 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, 272:16010-16017.
- [3] Snyderl E L, Dowdy S F. Cell penetrating peptides in drug delivery[J]. Pharm Res, 2004, 21:389-393.
- [4] Orzóz M, Mondragón L, Marzo I, Sanclimens G, Messeguer A, Pérez-Payo E, et al. Conjugation of a novel Apaf-1 inhibitor to peptide-based cell-membrane transporters: effective methods to improve inhibition of mitochondria-mediated apoptosis[J]. Peptides, 2007, 28:958-968.
- [5] Hotchkiss RS, McConnell KW, Bullok K, Davis C G, Chang K C, Schwulst S J, et al. TAT-BH4 and TAT-Bcl-x<sub>L</sub> peptides protect against sepsis-induced lymphocyte apoptosis *in vivo* [J]. J Immunol, 2006, 176:5471-5477.
- [6] Tünnemann G, Martin R M, Haupt S, Patsch C, Edenhofer F, Cardoso M C, et al. Cargo-dependent mode of uptake and bioavailability of TAT-containing proteins and peptides in living cells[J]. FASEB J, 2006, 20:1775-1784.
- [7] Sethuraman V A, Bae Y H. TAT peptide-based micelle system for potential active targeting of anti-cancer agents to acidic solid tumors[J]. J Contr Rel, 2007, 118:216-224.
- [8] Baker R D, Howl J, Nicholl I D. A synchological cell penetrating peptide mimic of p21<sup>WAF1/CIP1</sup> is pro-apoptogenic[J]. Peptides, 2007, 28:731-740.
- [9] Tan M, Lan KH, Yao J, Lu C H, Sun M, Neal C L, et al. Selective inhibition of ErbB2-overexpressing breast cancer *in vivo* by a novel TAT-based ErbB2-targeting signal transducers and activators of transcription 3-blocking peptide[J]. Cancer Res, 2006, 66:3764-3772.
- [10] Perea SE, Reyes O, Puchades Y, Mendoza O, Vispo N S, Torrens I, et al. Antitumor effect of a novel proapoptotic peptide that impairs the phosphorylation by the protein kinase 2 (casein kinase 2) [J]. Cancer Res, 2004, 64:7127-7129.
- [11] Liang J F, Yang V C. Synthesis of doxorubicin-peptide conjugate with multidrug resistant tumor cell killing activity[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2005, 15:5071-5075.
- [12] Jain M, Chauhan S C, Singh A P, Venkatraman G, Colcher D, Batra S K. Penetratin improves tumor retention of single-chain antibodies: a novel step toward optimization of radioimmunotherapy of solid tumors[J]. Cancer Res, 2005, 65:7840-7846.
- [13] Ribeiro M M, Klein D, Pileggi A, Molano R D, Fraker C, Ricordi C, et al. Heme oxygenase-1 fused to a TAT peptide transduces and protects pancreatic beta-cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 305:876-881.
- [14] Jung H J, Park Y, Hahm K S, Lee D G. Biological activity of Tat (47-58) peptide on human pathogenic fungi[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 345:222-228.
- [15] Yin R, Hao F, Hao J, Yang X C. Design of a cell-penetrating peptide vaccine based on HPV16 E7 epitope and its immunologic effect *in vitro* [J]. J Clin Dermatol, 2005, 34:807-809.
- [16] Dietz G P, Valbuena P C, Dietz B, Meuer K, Mueller P, Weishaupt J H, et al. Application of a blood-brain-barrier-penetrating form of GDNF in a mouse model for Parkinson's disease[J]. Brain Res, 2006, 1082:61-66.
- [17] Santra S, Yang H, Stanley J T, Holloway P H, Moudgil B M, Walter G, et al. Rapid and effective labeling of brain tissue using TAT-conjugated CdS: Mn/ZnS quantum dots[J]. Chem Commun (Camb), 2005(25):3144-3146.

[本文编辑] 尹 茶