

DOI:10.3724/SP.J.1008.2015.00929

PEP-1介导的重组肝细胞核因子4 α 蛋白转导对肝癌细胞的抑制作用

邓龙飞¹, 丁晨虹², 谢渭芬², 张 新^{1,2*}

1. 华东理工大学生物工程学院, 上海 200237

2. 第二军医大学长征医院消化内科, 上海 200003

[摘要] **目的** 利用细胞穿膜肽 PEP-1 介导重组肝细胞核因子 4 α (HNF4 α)蛋白进入肝癌细胞,并明确外源融合蛋白 P-HNF4 α 对肝癌细胞的作用。**方法** 构建表达质粒 pET28a-P-HNF4 α ,优化原核表达体系的诱导条件,经大量表达、亲和层析纯化及浓缩、透析后获得纯度较高的带有细胞穿膜肽 PEP-1 的融合蛋白 P-HNF4 α ;P-HNF4 α 转导人肝癌细胞,蛋白质印迹法检测其穿膜效率,核质分离和细胞免疫荧光检测 P-HNF4 α 的亚细胞定位,Real-time PCR 检测肝癌细胞基因表达,CCK-8 法检测肝癌细胞增殖,细胞划痕实验及小室侵袭实验检测 P-HNF4 α 对肝癌细胞转移能力的影响。**结果** 细胞穿膜肽 PEP-1 成功介导融合蛋白 P-HNF4 α 进入 Huh7 细胞并定位于细胞核;P-HNF4 α 蛋白可促进 Huh7 细胞肝功能基因表达,抑制干细胞相关基因表达($P<0.05$ 或 0.01),并显著抑制肝癌细胞增殖($P<0.05$)、迁移($P<0.001$)和侵袭($P<0.05$)能力。**结论** P-HNF4 α 可诱导肝癌细胞向成熟肝细胞分化,降低肝癌细胞的恶性程度,是诱导分化治疗肝癌的潜在手段。

[关键词] 肝细胞癌;肝细胞核因子 4 α ;细胞穿膜肽;PEP-1

[中图分类号] R 735.7

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2015)09-0929-07

Inhibitory effect of PEP-1-mediated recombinant hepatocyte nuclear factor 4 alpha transduction on hepatocellular carcinoma cells

DENG Long-fei¹, DING Chen-hong², XIE Wei-fen², ZHANG Xin^{1,2*}

1. School of Biotechnology, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China

2. Department of Gastroenterology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

[Abstract] **Objective** To investigate cell penetrating peptide (PEP-1)-mediated transduction of recombinant hepatocyte nuclear factor 4 alpha (HNF4 α) protein into hepatocellular carcinoma (HCC) cells, and to observe the effect of the fusion protein P-HNF4 α on HCC cells. **Methods** The expression vector pET28a-P-HNF4 α was constructed. The prokaryotic expression condition of fusion protein P-HNF4 α was optimized. Recombinant P-HNF4 α carrying cell penetrating peptide PEP-1 was obtained by abundant expression, purified by affinity chromatography, and was concentrated and dialyzed. P-HNF4 α was transduced into HCC cells. The transduction efficiency was analyzed by Western blotting analysis. Sub-cellular localization of P-HNF4 α was detected by Western blotting analysis with nuclear and cytoplasmic extracts and confirmed by immunofluorescence assay. Real-time RT-PCR was used to examine the gene expression of HCC cells. The proliferation of HCC cells was detected with CCK-8 kit. The migration and invasion of HCC cells were detected by wound-healing assay and transwell invasion assay, respectively. **Results** P-HNF4 α was efficiently transduced into Huh7 cells and located in the nucleus as mediated by PEP-1. P-HNF4 α significantly up-regulated the expression of characteristic hepatocyte markers and down-regulated the "stemness" genes in Huh7 cells ($P<0.05$ or $P<0.01$). Moreover, the proliferation ($P<0.05$), migration ($P<0.001$) and invasion ($P<0.05$) of HCC cells were significantly suppressed by fusion protein P-HNF4 α . **Conclusion** P-HNF4 α can induce the differentiation of HCC cells to mature hepatocytes and reduce the malignancy phenotype of HCC cells, suggesting that PEP-1-mediated HNF4 α protein transduction may be a potential strategy for HCC differentiation therapy.

[Key words] hepatocellular carcinoma; hepatocyte nuclear factor-4 alpha; cell penetrating peptide; PEP-1

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2015, 36(9):929-935]

[收稿日期] 2014-12-17 **[接受日期]** 2015-07-31

[基金项目] 国家自然科学基金(81372675),国家科技重大专项(2013ZX10002007-007). Supported by National Natural Science Foundation of China (81372675), and the National Science and Technology Major Project (2013ZX10002007-007).

[作者简介] 邓龙飞, 硕士生. E-mail: denglongfei082@163.com

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-81871330, E-mail: zhang68@hotmail.com

肝细胞核因子 4 α (HNF4 α)是核受体超家族成员之一,在肝细胞的分化和功能维持中起着重要的作用。我们前期研究表明,利用腺病毒载体过表达 HNF4 α 可诱导肝癌细胞向成熟肝细胞分化,逆转肝细胞癌的恶性程度^[1]。细胞穿膜肽(cell penetrating peptides, CPPs)是一类由 30 或少于 30 个氨基酸组成的多肽,可以有效地将目标分子包括蛋白、RNA、DNA 等导入细胞。CPPs 一般可分为两大类,一类是主要由赖氨酸阳离子残基组成、具有亲水和疏水氨基酸分布的两亲型;另一类是主要以精氨酸和赖氨酸残基为主的阳离子型^[2]。

本研究利用原核表达载体表达并纯化了带有两亲型 CPPs PEP-1 (KET WWE TWW TEW SQP KKK RKV)的 HNF4 α 融合蛋白 P-HNF4 α ,并研究其对肝癌细胞诱导分化的作用和肝癌细胞恶性表型的影响,探讨 P-HNF4 α 对肝细胞癌的治疗潜能。

1 材料和方法

1.1 主要材料及试剂

原核表达载体 pET28a 购自 Novagen 公司,载体构建相关试剂购自 TaKaRa 公司。融合蛋白原核表达宿主 BL21 (DE3) pLysS 购自北京天根生化科技有限公司,异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)购自 TaKaRa 公司,咪唑购自 Sigma 公司,蛋白纯化 Ni-NTA Agarose Beads 购自 Qiagen 公司,其他蛋白纯化试剂购自国药集团化学试剂有限公司。

人肝癌细胞株 Huh7 与 Hep3B 由第二军医大学长征医院消化内科实验室保存,细胞培养相关试剂均购自 Gibco 公司。核质分离试剂盒购自 Invent Biotechnologies 公司, RNA 抽提试剂盒购自 TaKaRa 公司, CCK-8 试剂盒购自 Dojindo 公司。Anti-HNF4 α 抗体和 anti-Lamin A 抗体购自 Santa Cruz 公司, anti-GAPDH 抗体购自 Sigma 公司, anti-6 \times His 抗体购自 Abcam 公司, IRDye 标记的抗鼠、抗羊二抗购自 LI-COR Biosciences 公司。PCR 引物均由 Invitrogen 公司合成。

1.2 细胞培养

人肝癌细胞株 Huh7 用 DMEM (含 10% 血清)、人肝癌细胞株 Hep3B 用 MEM (含 10% 血清, 1 \times 非必需氨基酸)于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 细胞培养箱中培养。

1.3 载体构建

利用多重 PCR 首先将编码穿膜肽 PEP-1(KET WWE TWW TEW SQP KKK RKV)的 DNA 片段与 HNF4 α 编码片段插入 pET28a 质粒,构建了原核表达载体 pET28a-P-HNF4 α ,该质粒可表达带有 His 标签氨基端连接 PEP-1 的 HNF4 α 融合蛋白。引物序列如下:pET28a-PEP-1-HNF4 α -

F1,5'-GGA CCG AAT GGT CTC AGC CGA AAA AAA AAC GTA AAG TGC GAC TCT CCA AAA CCC TCG T-3'; pET28a-HNF4 α -BamH I -F2, 5'-CGC GGA TCC AAA GAA ACC TGG TGG GAA ACC TGG TGG ACC GAA TGG TCT CAG CCG AAA-3'; pET28a-HNF4 α -Hind III-R, 5'-CCC AAG CTT CTA GAT AAC TTC CTG CTT GGT GAT GGT-3'),得到能够表达融合蛋白 P-HNF4 α 的重组表达质粒 pET28a-P-HNF4 α 。重组质粒经酶切鉴定后,送 Invitrogen 公司测序鉴定。

1.4 融合蛋白 P-HNF4 α 的表达与纯化

因载体 pET28a 多克隆位点上游存在一段表达六聚组氨酸 (6 \times His)标签的序列,故诱导表达的融合蛋白 6 \times His-PEP-1-HNF4 α (P-HNF4 α) 可通过 Ni-NTA Agarose Beads 亲和层析纯化。pET28a-P-HNF4 α 质粒转化原核表达宿主菌大肠杆菌 BL21, LB 培养基 37 $^{\circ}$ C 摇床培养过夜,次日以 1:50 接种到 800 mL LB 培养基,37 $^{\circ}$ C 摇床培养。当 D₆₀₀ 达到 1.0~1.2, 分别加入终浓度为 0、0.1、0.5、1.0 mmol/L 的 IPTG,17 $^{\circ}$ C 诱导表达 16 h^[3] 或 24 $^{\circ}$ C 诱导表达 2 h。4 $^{\circ}$ C 6 000 r/min (离心半径为 7 cm) 收集菌体,于 -80 $^{\circ}$ C 过夜。

用预冷裂解液 [50 mmol/L NaH₂PO₄, 300 mmol/L NaCl, 10 mmol/L Imidazole, 10% 甘油 (pH 8.0), 100 μ g/mL PMSF, 3 mmol/L β -ME] 重悬菌体。冰浴超声裂解细胞,4 $^{\circ}$ C 13 000 r/min (离心半径为 7 cm) 离心收集上清。0.22 μ m 滤膜过滤上清,加入已用裂解液平衡的 Ni-NTA Agarose Beads,4 $^{\circ}$ C 旋转结合 2 h。用 4 倍柱体积洗涤液 [50 mmol/L NaH₂PO₄, 300 mmol/L NaCl, 100 mmol/L Imidazole, 10% 甘油 (pH 8.0)] 洗 3 遍。最后用洗脱液 [50 mmol/L NaH₂PO₄, 300 mmol/L NaCl, 500 mmol/L Imidazole, 10% 甘油 (pH 8.0)] 洗脱蛋白 P-HNF4 α 。经过 PEG20000 浓缩和 PBS (10% 甘油) 透析,所得蛋白用 BCA 蛋白定量试剂盒 (碧云天) 定量,SDS-PAGE 蛋白电泳后按照快速银染法 (碧云天) 鉴定纯度。

1.5 P-HNF4 α 转染肝癌细胞

以 3 \times 10⁵ 个细胞/孔的细胞密度接种 Huh 7 细胞于 6 孔板,培养过夜。次日加入终浓度为 25、50、100、200 nmol/L 的 P-HNF4 α 蛋白,同时做一组细胞不处理的 CTR 对照和 10% 甘油对照。48 h 后收蛋白做蛋白质印迹。P-HNF4 α 一抗为 anti-HNF4 α , 内参 GAPDH 一抗为 anti-GAPDH。

1.6 蛋白质印迹检测

用蛋白裂解液 [100

mmol/L Tris-HCl (pH 6.8), 4% SDS, 20% 甘油, 200 mmol/L DTT]收集蛋白。常规8% SDS-PAGE凝胶电泳分离蛋白,转至硝酸纤维素膜。5%脱脂奶粉/PBST (1 \times PBS, 0.1% Tween20)封闭2 h,一抗于4 $^{\circ}$ C湿盒孵育过夜。次日PBST洗涤3次,5 min/次;二抗室温湿盒避光孵育1 h,PBST避光洗涤3次,5 min/次;用Odyssey Infrared Imaging System(LI-COR Biosciences)在700~800 nm波长通道扫描。

1.7 观察指标

1.7.1 P-HNF4 α 穿膜效率 蛋白质印迹检测上样量为0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 μ g的P-HNF4 α ,每个样品设两个复孔,扫描获得条带灰度值,利用相应的灰度值绘制标准曲线。以6 \times 10⁵个细胞/皿的细胞密度接种Huh7细胞于60 mm细胞培养皿,待细胞贴壁后,加入5.9 μ g P-HNF4 α 至终浓度100 nmol/L,培养24 h后用50 μ L蛋白裂解液收集蛋白,取5 μ L细胞裂解液(约25 μ g细胞总蛋白),蛋白质印迹检测转导至细胞内P-HNF4 α 的条带灰度值,根据标准曲线计算P-HNF4 α 的穿膜效率。

1.7.2 核质分离 以6.5 \times 10⁵个细胞/皿的密度接种Huh7细胞于60 mm细胞培养皿,培养过夜。加P-HNF4 α 至终浓度100 nmol/L,设未处理的CTR对照以及10%甘油对照,培养48 h后,根据核质分离试剂盒MinuteTM Cytoplasmic and Nuclear

Extraction Kit (Invent Biotechnologies)操作步骤做分离。核质抽提物用BCA蛋白定量试剂盒定量,蛋白质印迹检测核质抽提物中P-HNF4 α 蛋白量。P-HNF4 α 一抗为anti-HNF4 α ,胞质内参GAPDH一抗为anti-GAPDH,核内参Lamin A一抗为anti-Lamin A。

1.7.3 细胞免疫荧光 以1 \times 10⁵个细胞/皿的密度接种Huh7细胞至带有包被PLL盖玻片的35 mm细胞培养皿中,培养过夜。加入终浓度为100 nmol/L的P-HNF4 α 融合蛋白。培养48 h后,细胞用预冷的PBS洗2遍,4%多聚甲醛室温固定20 min,0.1% Triton X-100打孔5 min,5%马血清室温封闭2 h,一抗anti-His(Abcam)4 $^{\circ}$ C湿盒孵育过夜,ALEXA488荧光标记的Donkey anti-mouse二抗室温孵育30 min。细胞核用DAPI染色,荧光共聚焦显微镜扫描图像。

1.7.4 Real-PCR测定目的基因表达 以1.2 \times 10⁵个细胞/孔的密度接种Huh7于12孔板细胞培养皿,培养过夜。加入终浓度为100 nmol/L的P-HNF4 α 融合蛋白,设10%甘油对照。培养48、72 h收细胞,按照RNAiso Plus(TaKaRa)法抽提样品总RNA,反转录试剂盒将RNA反转录成cDNA,设计real-time PCR引物(表1),采用SYBR荧光定量法检测目的基因的表达。

表1 Real-time PCR引物序列

Tab 1 Primers for real-time PCR

Genes	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
<i>βactin</i>	CATCCTGCGTCTGGACCT	GTACTTGCGCTCAGGAGGAG
<i>PEPCK</i>	GTGTCCCTCTAGTCTATGAAGC	ATTGACTTGATCCTCCAGATAC
<i>ALDOB</i>	AGGAGGACTCTTCTCTCCCAA	GATTCATCTGCAGCCAGGAT
<i>HPD</i>	TTGGGAAGGTGAAGTTTGCT	GCATTTGGGCAGTTTAGGAA
<i>GYS2</i>	CCAGTGGAAGTCGAAGAAC	TTCTCTCCCATTCATCTGC
<i>ALB</i>	AGCCTAAGGCAGCTTGACTT	CTCGATGAACTTCGGGATGA
<i>CD133</i>	ACATGAAAAGACCTGGGGG	GATCTGGTGTCCAGCATG
<i>BMI</i>	GGAGACCAGCAAGTATTGTCTATTT	CATTGTCGCTGGGCATCGTAAG
<i>KLF4</i>	GCGGCAAAACCTACAAAAG	CCCGTGTGTTTACGGTAGT
<i>SOX2</i>	GCGAACCATCTCTGTGGTCT	GGAAAGTTGGGATCGAACAA
<i>ESG1</i>	GCGCAGTATCACAGCCTTAAA	TCAATCTCTTGGCGATTCA

1.7.5 细胞生长曲线检测 以3 000个细胞/孔的密度接种Huh7和Hep3B细胞于96孔板细胞培养皿,培养过夜,次日换入含P-HNF4 α 的培养液,终浓度为0、25、100 nmol/L。CCK-8试剂盒(Dojindo)检测第0天到第6天细胞数。

1.7.6 细胞划痕实验 将Huh7细胞以7 \times 10⁴细胞/孔的密度接种于24孔板,待融合度达70%时,

使用无菌枪头在单层细胞上划痕,PBS清洗3次后换上含100 nmol/L P-HNF4 α 的DMEM培养液(10% FBS),设置加入相同体积10%甘油的对照和未处理对照,并在显微镜下拍照。于37 $^{\circ}$ C细胞培养箱中培养,每间隔24 h拍照观察。

1.7.7 小室侵袭实验 将Transwell小室上层用matrigel包被,后将Huh7细胞以7 \times 10⁴细胞/

500 μL 无血清 DMEM 混匀,加入终浓度为 100 nmol/L 的 P-HNF4 α (设置相同体积的 PBS 和 10% 甘油对照)。混匀后加入上室,下室加入 1 mL 含 10% FBS 的 DMEM 培养液。培养 48 h 后,擦掉小室上层细胞,用 0.5% 结晶紫溶液染色,显微镜下观察并拍照。

1.8 统计学处理 采用 Graph Pad Prism 5.02 统计软件,所有数据使用配对 *t* 检验进行分析,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 融合蛋白 P-HNF4 α 的表达与纯化 结果表

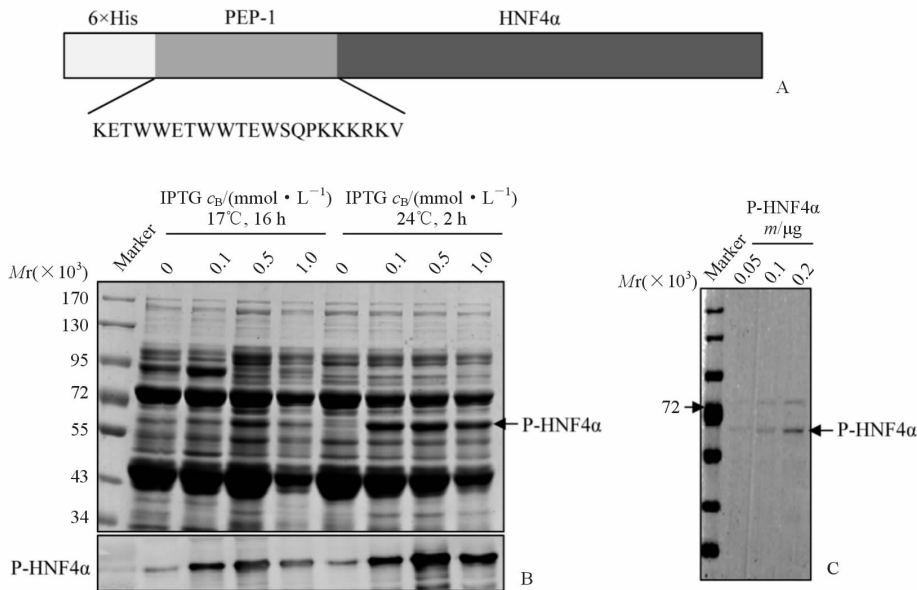


图 1 融合蛋白 P-HNF4 α 的表达、纯化与鉴定

Fig 1 Expression, purification and identification of P-HNF4 α

A: Schematic illustration of fusion protein P-HNF4 α (6 \times His-PEP-1-HNF4 α). Amino acid sequence of PEP-1, KET WWE TWW TEW SQPKKR KV; B: Optimization of the prokaryotic expression conditions for P-HNF4 α . Coomassie blue staining (top) and Western blotting analysis (bottom) showed the expression of P-HNF4 α in designed conditions (0-1.0 mmol/L: concentration of IPTG); C: SDS-PAGE followed by silver staining was used to verify the purity of P-HNF4 α protein, 0.05, 0.1, and 0.2 μg P-HNF4 α protein were designed to run SDS-PAGE

2.2 融合蛋白 P-HNF4 α 的穿膜能力及其在细胞内的定位 蛋白质印迹结果显示:随着浓度的升高,进入细胞的 P-HNF4 α 也随之增加;当加入的 P-HNF4 α 达到 100 nmol/L 时,外源 HNF4 α 蛋白量超过了内源表达的 HNF4 α 蛋白量(图 2A)。根据标准曲线计算 100 nmol/L(5.9 μg) P-HNF4 α 转导 Huh7 细胞时的穿膜效率,5 μL 细胞裂解液中所含 P-HNF4 α 为 $0.3181 \times (1.20 + 1.40) / 2 - 0.0021 = 0.41$ (μg),因此,P-HNF4 α 进入细胞的效率为 $[0.41 \times (50/5)] / 5.9 \times 100\% = 69.5\%$ (图 2B)。100 nmol/L 终浓度的 P-HNF4 α 转导 Huh7 细胞后,核质分离实验和细胞免疫荧光结果均显示 P-HNF4 α 主要

明:构建的原核表达载体 pET28a-P-HNF4 α 可表达带有 His 标签氨基端连接 PEP-1 的 HNF4 α 融合蛋白(图 1A);发现 24 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2 h 所诱导的 P-HNF4 α 表达量较 17 $^{\circ}\text{C}$ 培养 16 h 高(图 1B);虽然 0.5 mmol/L IPTG 可诱导更多的 P-HNF4 α ,但由于非特异条带表达量也较高(图 1B),给下游纯化带来难度,因此最佳的诱导条件确定为 1.0 mmol/L IPTG、24 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2 h。将大量表达的含有 P-HNF4 α 的细菌裂解液经亲和纯化、浓缩和透析后,获得了具有较高纯度的 P-HNF4 α ,根据银染后灰度值计算,其纯度达到 81%(图 1C)。

定位在细胞核内(图 2C、2D)。这些结果表明 P-HNF4 α 可在穿膜肽的介导下进入肝癌细胞并定位于细胞核,提示其具备了在细胞核内发挥生物学功能的条件。

2.3 P-HNF4 α 对肝癌细胞基因表达及恶性表型的影响 结果显示:与 10% 甘油处理的对照组相比,P-HNF4 α 转导可使受 HNF4 α 调控的肝功能相关基因表达明显上调($P < 0.05$ 或 0.01 ,图 3A),诱导恶性肝癌细胞向成熟的肝细胞分化;同时干细胞相关基因的表达下降($P < 0.05$ 或 0.01 ,图 3B),表明肿瘤细胞的自我更新能力和高增殖活性可能受到抑制。这些结果提示 P-HNF4 α 可能通过诱导分化肝癌细胞降低其恶性程度。

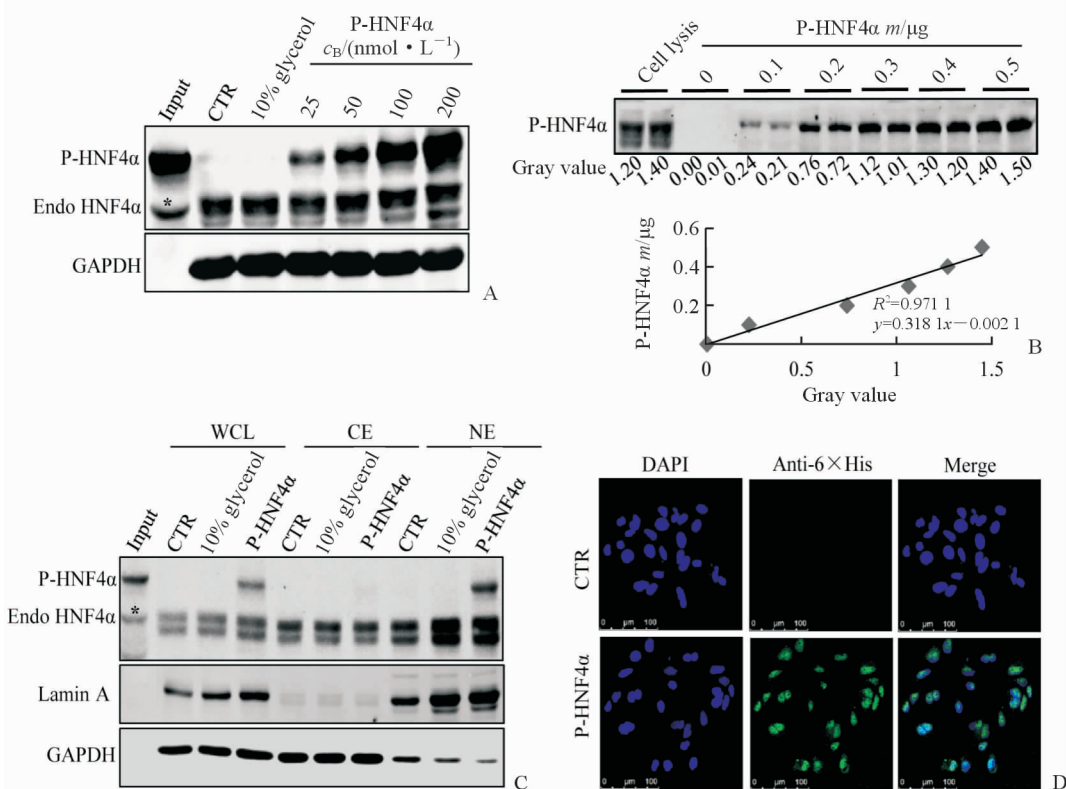


图 2 P-HNF4 α 转导 Huh7 细胞及其亚细胞定位

Fig 2 Transduction and sub-cellular localization of P-HNF4 α in Huh7 cells

A: P-HNF4 α transduced into Huh7 cells. Different concentrations of P-HNF4 α were transduced into Huh7 cells, and Western blotting analysis was processed to detect P-HNF4 α (Input; 0.5 μ g purified P-HNF4 α ; *: Degradation band of P-HNF4 α ; Endo HNF4 α ; Endogenous expression of HNF4 α ; CTR; Non-treated control; 10% glycerol; 10% glycerol/PBS control). B: Transduction efficiency of P-HNF4 α . Western blotting analysis detected different amounts of purified P-HNF4 α (0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, and 0.5 μ g) protein and the cell lysis from Huh7 cells transduced with P-HNF4 α . The standard curve showed different amounts of P-HNF4 α with gray value as the x axis and P-HNF4 α (μ g) as the y axis. C and D: Sub-cellular localization of P-HNF4 α . Sub-cellular fractionation analysis (C) and immunocytochemistry assay (D) were done to determine the localization of P-HNF4 α (100 nmol/L) transduced into Huh7 cells (Input; 0.2 μ g purified P-HNF4 α ; WCL; Whole cell lysis; CE; Cytoplasmic extract; NE; Nuclear extract). Original magnification; \times 400 (D)

进一步检测了 P-HNF4 α 对肝癌细胞恶性表型的影响,包括肝癌细胞增殖能力、迁移能力以及侵袭能力。不同浓度 P-HNF4 α 分别转导 Huh7 和 Hep3B 细胞,细胞生长曲线显示:与对照组(0 nmol/L)相比,25 nmol/L P-HNF4 α 转导肝癌细胞即可抑制其增殖,随着 P-HNF4 α 浓度增加其细胞增殖的抑制效果更加显著($P < 0.05$,图 3C、3D);细胞划痕实验显示 P-HNF4 α 可明显降低 Huh7 细胞的迁移($P < 0.001$,图 4A),小室侵袭实验表明 P-HNF4 α 抑制了 Huh7 的侵袭能力($P < 0.05$,图 4B)。

3 讨论

HNF4 α 是肝脏胚胎期肝上皮细胞形成和肝脏

成熟期肝细胞上皮性状保持所必需的核因子^[4-5],与肝脏结构的构成、肝脏上皮细胞的产生,以及肝细胞的形态和功能分化密切相关^[4-6]。HNF4 α 可在转录水平调控下游多种基因的表达,有效维持和改善肝细胞分化水平,增强肝细胞蛋白合成、糖原合成、药物代谢以及解毒功能。在肝癌的发生发展过程中 HNF4 α 表达下降,其表达下调是肝癌发生的始动因素。我们前期研究显示,腺病毒介导的过表达 HNF4 α 可降低癌细胞的成瘤性,小鼠尾静脉注射携带 HNF4 α 基因的腺病毒可有效抑制肝脏转移瘤的形成,瘤内注射 HNF4 α 腺病毒也表现出显著的抗肿瘤效果^[1]。因此,调控 HNF4 α 表达可能成为治疗肝癌的有效途径。

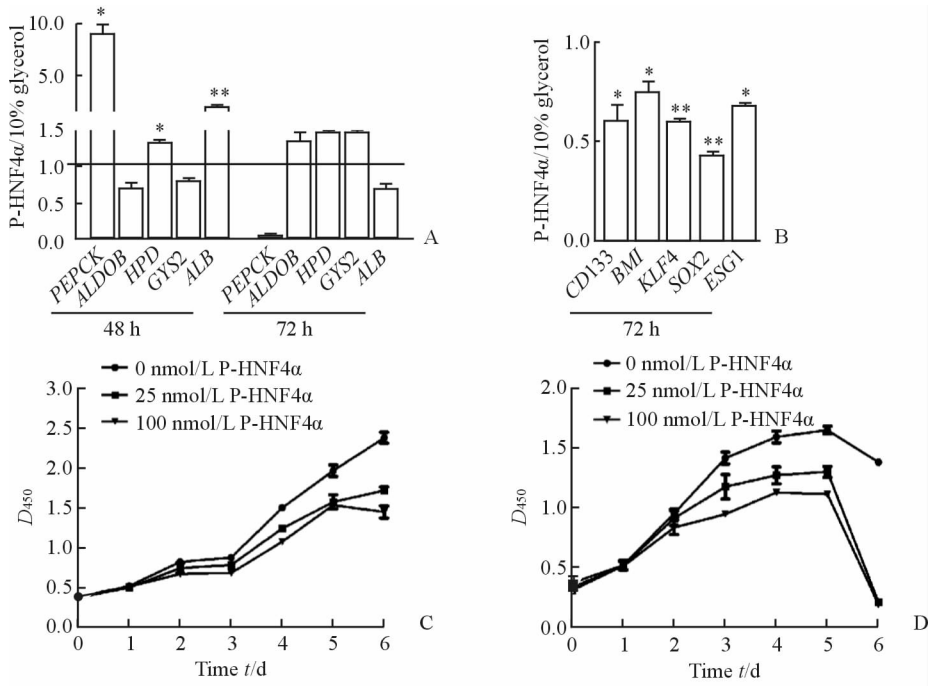


图3 P-HNF4α对肝癌细胞基因表达和增殖的影响

Fig 3 Effect of P-HNF4α on mRNA expression and proliferation of hepatic cellular cancer (HCC) cells

A and B: Gene expression of Huh7 cells transduced with P-HNF4α (100 nmol/L). The mRNA expression levels of characteristic hepatocyte markers (A) and “stemness” genes (B) in Huh7 cells were detected by real-time PCR. C and D: Effect of P-HNF4α on the proliferation of HCC cells. P-HNF4α inhibited the proliferation of Huh7 cells (C) and Hep3B cells (D). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

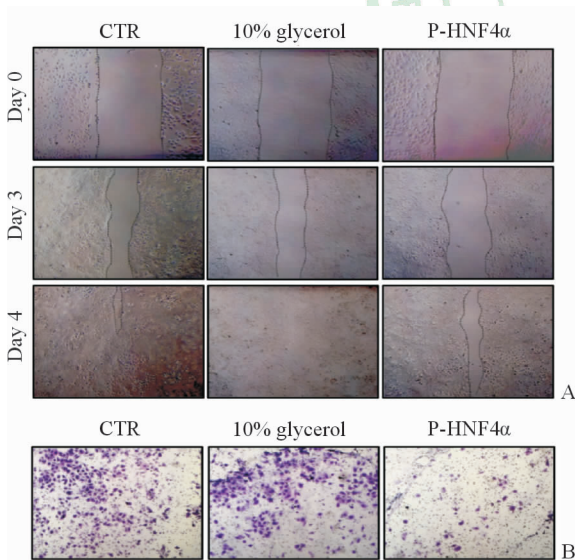


图4 P-HNF4α对肝癌细胞迁移和侵袭的影响

Fig 4 Effect of P-HNF4α on migration and invasion of HCC cells

The wound-healing assay (A) and trans well invasion assay (B) showed the fusion protein P-HNF4α (100 nmol/L) significantly attenuated the migration and invasion ability of Huh7 cells, indicating the inhibition effect of P-HNF4α on tumor malignancy. Original magnification: $\times 40$ (A), $\times 100$ (B)

腺病毒作为基因治疗的研究热点,其临床应用存在争议。病毒一旦进入细胞便成为人为无法控制

的因素,可能在宿主细胞内对宿主基因进行无法预计的修饰;同时病毒所携带的基因转录翻译为功能蛋白的效率不可控。而以多肽和脂类为基础的载体因其具有操作简单、毒性小、免疫原性较低以及无插入突变等优点,被越来越广泛地研究^[7]。众多研究表明, CPPs 是一类可高效穿膜的非病毒型载体。穿膜肽多聚精氨酸(poly-arginine, 11R)可成功介导抑癌蛋白 p53 进入膀胱癌细胞和神经胶质瘤细胞,并抑制了细胞增殖^[8-9];带 11R 的融合蛋白 Oct4-11R、Klf4-11R、Sox2-11R、c-MYC-11R 同时转入小鼠胚胎成纤维细胞后诱导产生了诱导多能干细胞^[10]。这些研究表明穿膜肽可介导核蛋白进入细胞发挥功能。穿膜肽的应用不仅限于细胞学实验,其在体内的应用也在不断尝试中显现出了重要价值。用穿膜肽 Tat 的 p53 和 Smac 融合蛋白处理荷瘤小鼠模型,都发现可显著延长小鼠的存活时间^[11-12]。PEP-1 相比于其他穿膜肽有着独有的优势, PEP-1 能携带完整活性的多肽和蛋白进入细胞;而且其在作为载体介导蛋白药物治疗方面也具有明显优点,如在生理缓冲液中稳定性高、毒性低、对血清不敏感等^[13],并能在极短的时间内携带蛋白药物进入细胞。 PEP-1 介导蛋白药物在神经胶质瘤和肠道缺血

疾病治疗中已显示了极大潜能^[14-15]。

为了拓展 HNF4 α 诱导分化治疗肝癌的新方法,本研究利用穿膜肽 PEP-1 为载体,携带 HNF4 α 蛋白进入肝癌细胞,并确定了其对肝癌细胞的作用。研究表明 PEP-1 介导的 HNF4 α 蛋白转导肝癌细胞,穿膜效率达到 69.5%,P-HNF4 α 转导进入细胞后主要定位在肝癌细胞的细胞核中(图 2C、图 2D),并可促进肝脏功能基因的表达,抑制干性相关基因的表达(图 3A、图 3B),显示该重组蛋白具有 HNF4 α 功能,可在细胞内发挥肝细胞核因子的作用,通过促进肝癌细胞向成熟肝细胞分化从而诱导分化肝癌细胞,降低了肝癌细胞的恶性程度;而且 P-HNF4 α 能有效抑制肝癌细胞增殖,在 25 nmol/L P-HNF4 α 作用下细胞增殖明显受到抑制(图 3C、图 3D),说明低浓度的 P-HNF4 α 即可对肝癌细胞发挥作用;细胞划痕实验和小室侵袭实验也表明 P-HNF4 α 有效抑制了肝癌细胞 Huh7 的迁移和侵袭性(图 4),提示 P-HNF4 α 可降低肝癌细胞的转移能力。这些结果显示 P-HNF4 α 转导具有治疗肝癌的极大潜能。但 P-HNF4 α 对肝癌发展的逆转作用,还需体内实验进一步证实。

[参考文献]

- [1] Yin C, Lin Y, Zhang X, Chen Y X, Zeng X, Yue H Y, et al. Differentiation therapy of hepatocellular carcinoma in mice with recombinant adenovirus carrying hepatocyte nuclear factor-4 α gene [J]. *Hepatology*, 2008, 48:1528-1539.
- [2] Patel L N, Zaro J L, Shen W C. Cell penetrating peptides: intracellular pathways and pharmaceutical perspectives[J]. *Pharm Res*, 2007, 24:1977-1992.
- [3] Chandra V, Hang P, Potluri N, Wu D, Kim Y, Rastinejad F. Multidomain integration in the structure of the HNF4 α nuclear receptor complex[J]. *Nature*, 2013, 495:394-398.
- [4] Parviz F, Matullo C, Garrison W D, Savatski L, Adamson J W, Ning G. Hepatocyte nuclear factor 4 α controls the development of a hepatic epithelium and liver morphogenesis[J]. *Nat Genet*, 2003, 34:292-296.
- [5] Battle M A, Konopka G, Parviz F, Gaggl A L, Yang C, Sladek F M. Hepatocyte nuclear factor 4 α orchestrates expression of cell adhesion proteins during the epithelial transformation of the developing liver[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103:8419-8424.
- [6] Watt A J, Garrison W D, Duncan S A. HNF4 α : a central regulator of hepatocyte differentiation and function[J]. *Hepatology*, 2003, 37:1249-1253.
- [7] Huang Y W, Lee H J, Tolliver L M, Aronstam R S. Delivery of nucleic acids and nanomaterials by cell-penetrating peptides: opportunities and challenges[J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015:834079.
- [8] Inoue M, Tomizawa K, Matsushita M, Lu Y F, Yokoyama T, Yanai H, et al. p53 protein transduction therapy: successful targeting and inhibition of the growth of the bladder cancer cells[J]. *Eur Urol*, 2006, 49:161-168.
- [9] Michiue H, Tomizawa K, Wei F Y, Matsushita M, Lu Y F, Ichikawa T, et al. The NH₂ terminus of influenza virus hemagglutinin-2 subunit peptides enhances the antitumor potency of polyarginine-mediated p53 protein transduction[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280:8285-8289.
- [10] Zhou H, Wu S, Joo J Y, Zhu S, Han D W, Lin T, et al. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins[J]. *Cell Stem Cell*, 2009: 381-384.
- [11] Snyder E L, Meade B R, Saenz C C, Dowdy S F. Treatment of terminal peritoneal carcinomatosis by a transducible p53-activating peptide [J]. *PLoS Biol*, 2004, 2:E36.
- [12] Fulda S, Wick W, Weller M, Debatin K M. Smac agonists sensitize for Apo2L/TRAIL- or anticancer drug-induced apoptosis and induce regression of malignant glioma *in vivo* [J]. *Nat Med*, 2002, 8: 808-815.
- [13] Morris M C, Depollier J, Mery J, Heitz F, Divita G. A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2001, 19:1173-1176.
- [14] Wang B, Lv L, Wang Z, Zhao Y, Wu L, Fang X, et al. Nanoparticles functionalized with Pep-1 as potential glioma targeting delivery system via interleukin 13 receptor α 2-mediated endocytosis [J]. *Biomaterials*, 2014, 35:5897-5907.
- [15] He X H, Yan X T, Wang Y L, Wang C Y, Zhang Z Z, Zhan J. Transduced PEP-1-heme oxygenase-1 fusion protein protects against intestinal ischemia/reperfusion injury[J]. *J Surg Res*, 2014, 187:77-84.