

# 金属硫蛋白-3 对 dUTPase 调节 dUTP 细胞毒性作用的影响

陈巧林<sup>1\*\*</sup> 康巧华<sup>1\*\*\*</sup> 任宏伟<sup>1</sup> 王宗元<sup>2</sup> 茹炳根<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>(北京大学生命科学学院生物化学与分子生物学系蛋白质工程国家重点实验室,北京 100871)

<sup>2</sup>(扬州大学畜牧兽医学院,扬州 225009)

**摘 要** 金属硫蛋白-3(MT-3),又称神经生长抑制因子,是一种脑特异性金属硫蛋白。人细胞核 dUTP 焦磷酸酶(dUTP pyrophosphatase, dUTPase)是最近在脑中研究发现的能与金属硫蛋白-3(human metallothionein-3, hMT-3)相互作用的一个蛋白,两者共同作用具有神经生长抑制活性。为了探讨 hMT-3 对 dUTPase 调节 dUTP 引起的细胞毒性作用的影响,通过基因转染 HEK293 细胞观察细胞在 dUTP 中的生长情况,发现共转染 hMT-3 和 dUTPase 基因的细胞比单转染 dUTPase 或 hMT-3 基因的细胞具有更强的对 dUTP 细胞毒性的耐受能力;同时在大肠杆菌 BL21 中表达重组蛋白,测定 hMT-3 在 dUTPase 水解 dUTP 中的作用,结果显示重组蛋白 hMT-3 可以促进 dUTPase 对 dUTP 的水解。结果均初步证实了 hMT-3 对 dUTPase 抵抗 dUTP 引起的正常细胞死亡有一定的协同作用,为进一步研究 dUTPase 及其相互作用蛋白 hMT-3 在化疗中的应用提供理论依据。

**关键词** hMT-3, dUTPase, 基因转染, dUTP, 细胞毒性

中图分类号 Q74 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2004)03-0389-05

dUTP 可以通过 DNA 聚合酶错误掺入到 DNA 中,最终导致产生 DNA 碎片及细胞死亡,叶酸兴奋剂和胸苷酸合成酶(TS)抑制剂的抗肿瘤活性就是依靠 dUTP 的错误掺入,来对肿瘤组织产生化疗作用的<sup>[1,2]</sup>。但是 dUTP 对正常组织细胞也有杀伤作用,所以需要在化疗过程中对正常组织进行保护,减少 dUTP 对其的损伤。dUTPase 作为细胞内 dUTP 水平的主要调节者,它的表达对 TS 抑制剂产生的细胞毒性起关键调节作用<sup>[3,4]</sup>。如果在化疗时增加正常组织中 dUTPase 的表达,而同时注射 dUTPase 拮抗剂于肿瘤组织中,有望提高化疗药物的作用效果和特异性,并可减少病人化疗时由于 dUTP 对正常细胞的杀伤而产生的痛苦。这就首先要求寻找 dUTPase 的影响因子并对 dUTPase 清除 dUTP 产生的细胞毒性的具体情形进行研究。

金属硫蛋白-3(metallothionein-3, MT-3)又称神经生长抑制因子(neuronal growth inhibitory factor, GIF),是由 Uchida 等人<sup>[5]</sup>于 1991 年首次从人脑中分离出来,它是一类特异分布于中枢神经系统(CNS)的低分子量、富含半胱氨酸和不含芳香族氨基酸的金属

结合蛋白。研究发现 MT-3 可能与阿尔茨海默氏症(Alzheimer's disease, AD)病理相关,在 AD 病人脑提取物存在下,对神经细胞具有特异的生长抑制活性。

本实验室最近通过酵母双杂交系统研究证实 hMT-3 与 dUTPase 具有很强的相互作用,dUTPase 表现了预期中的与 hMT-3 共同抑制神经元生长的作用<sup>[6]</sup>。反过来,MT-3 对 dUTPase 调节 dUTP 的细胞毒性作用是否有影响,这对将来研究 dUTPase 及其作用因子在化疗中的作用机制及应用很有必要。

本文在 dUTP 引起正常细胞发生死亡后,观察 dUTPase 和 hMT-3 基因转染对 dUTP 引起的细胞死亡是否具有缓解作用,以及缓解作用的差异;同时体外观察 hMT-3 重组表达蛋白对 dUTPase 水解 dUTP 的影响,旨在初步探讨 hMT-3 对 dUTPase 调节 dUTP 引起的细胞毒性是否有协同作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种和质粒:** DH5 $\alpha$ 、BL21 大肠杆菌为我室保存。带 Flag 标签(小肽 MDYKDDDDK)的真核表达

收稿日期 2003-11-11,修回日期 2004-01-14。

基金项目 国家 95 攻关合同项目基金资助(No.96-C02-01-09)。

\* 通讯作者。 Tel 86-10-62751842; Fax 86-10-62751842; E-mail: rulab@pku.edu.cn

\*\* 现在工作单位 北京大学人民医院风湿免疫科,北京 100044。

\*\*\* 现在地址: Department of Pathology University of Arkansas for Medical Sciences, AR 72205, USA

中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

载体 pFlag-CMV-2 和带 HA(hemagglutinin) 标签(小肽 MYPYDVPDYA) 的真核表达载体 pSV-HA 由军事医学科学院生物工程研究所马清钧教授及杨淑静博士惠赠。含人 dUTPase 及 hMT-3 全长 cDNA 的 pSV-HA-dUTPase 和 pFlag-CMV-2-hMT-3 质粒系本实验室克隆获得。

**1.1.2 细胞株及培养试剂:** HEK293 细胞(人胚胎肾细胞)来源于协和医科大学细胞中心处,其完全培养基为 RPMI 1640 细胞培养基(Gibco),其中含 10% 小牛血清(浙江杭州四季青生物材料厂生产);25 cm<sup>2</sup> 细胞培养瓶为 Corstar 公司产品;硫酸庆大霉素(40 u/mL 使用浓度),青霉素(100 u/mL 使用浓度)均为国产注射用产品;胰蛋白酶(0.25% 使用浓度)为 Clontech 公司产品。

**1.1.3 转染及其它试剂:** 脂质体转染试剂 Lipofectamine<sup>TM</sup> Reagent 为美国 Life Technologies 公司产品;抗 Flag 标签的小鼠单抗购自 Sigma 公司,抗 HA 标签的大鼠单抗购自 Roche 公司;谷胱甘肽-S-转移酶(GST)融合表达系统和 Sephacryl S-100 分子筛层析介质为瑞典 Pharmacia 公司产品;四甲基偶氮唑盐(MTT),dUTP, DMSO 均购自 Sigma 公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 dUTP 引起细胞死亡的浓度:** 用 0.25% 胰蛋白酶消化 293 细胞,将细胞制成悬液( $2 \times 10^4$ /mL),按 100  $\mu$ L 悬液/孔接种到 96 孔细胞培养板中,37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养过夜。吸去培养液,每孔加入最终浓度为 0.2 ~ 20 mol/L 不同梯度的 dUTP,补充 1640 培养基至总体积为 100  $\mu$ L。培养箱中培养 24 h 后,吸去培养液,用 0.01 mol/L 的 PBS 洗 3 次。加入 100  $\mu$ L MTT 溶液(浓度为 0.5 mg/mL),细胞培养箱中培养 4 h。吸去上清液,PBS 洗 1 次,每孔加入 DMSO 100  $\mu$ L,振荡 2 min。酶标仪 550 nm 波长测定吸收值,计算细胞存活率。

**1.2.2 基因转染观察 hMT-3 对 dUTPase 调节 dUTP 细胞毒性作用的影响:** 293 细胞培养于含有 10% 小牛血清的 RPMI 1640 完全培养基内,培养基中补充 100 ku/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素,细胞置于 37 $^{\circ}$ C 含有 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱内培养。采用 Lipofectamine 基因转染方法将真核表达质粒 pSVHA-dUTPase (10  $\mu$ g) 和 pFlag-hMT-3 (10  $\mu$ g) 导入生长达到 30% 浓度的上述细胞中,培养 48 h 后,Western blot 方法验证转染质粒在细胞中的表达,并按 1:10 传代培养于 96 孔培养板中,加入最终浓度为 X 的 dUTP (X 为上面已证实的 dUTP 完全能够杀死细胞的最小浓度)继

续培养 24 h,用 MTT 方法测定细胞存活率。

### 1.2.3 重组蛋白体外观察 hMT-3 对 dUTPase 水解 dUTP 反应的影响:

(1) 重组蛋白的诱导表达及纯化[参考文献 7] 的方法进行重组质粒 pGEX-4T-2-dUTPase 及 pGEX-4T-2-hMT-3 的表达、纯化。对冻干得到的蛋白用 DC Protein Assay 测定浓度,巯基含量用 DTNB 巯基试剂进行测定<sup>[8]</sup>。

(2) hMT-3 在 dUTPase 水解 dUTP 反应中的作用 称取 3.3 mg 制得的重组 dUTPase 蛋白样品,溶于 300  $\mu$ L 0.05 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 缓冲液中,稀释 100 倍,得到的样品蛋白溶液浓度为 0.11 mg/mL。称取 3.8 mg 制得的 hMT-3 重组蛋白样品,溶于 200  $\mu$ L 0.05 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 缓冲液中,稀释 50 倍,得到的样品蛋白溶液浓度为 0.38 mg/mL。第一实验组 10 个 Eppendorf 管平均分为 2 个小组,每小组分别加入配制的 dUTPase 蛋白溶液 0、2、4、6、8  $\mu$ L,同时加入配制的 hMT-3 蛋白溶液 4  $\mu$ L,其中一小组各管加 1  $\mu$ L 底物,另一小组不加底物作为对照;第二实验组 8 个 Eppendorf 管,每管分别加入配制的 hMT-3 蛋白溶液 0.5、1、2、4、6、8、10、20  $\mu$ L,各管加配制的 dUTPase 蛋白溶液 4  $\mu$ L 和 1  $\mu$ L 底物。用 0.05 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液补充至 60  $\mu$ L,37 $^{\circ}$ C 水浴中反应 10 min,加双蒸水至 800  $\mu$ L,其它步骤参照文献 [9,10] 进行测定。

## 2 结果

### 2.1 dUTP 引起细胞死亡的浓度

进行不同浓度 dUTP 致 293 细胞死亡的研究。Fig.1 结果表明,dUTP 终浓度在大于 3 mol/L 时细胞死亡开始明显,而在小于 3 mol/L 时细胞死亡不明显,14 mol/L 为最小完全杀死细胞的浓度。

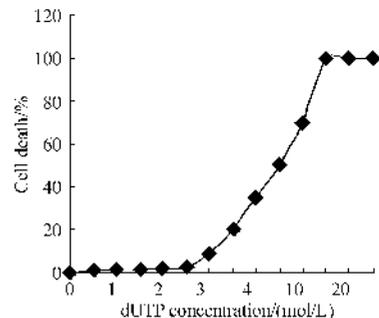


图 1 不同浓度 dUTP 致细胞死亡的结果

Fig.1 Result of cellular death caused by different concentrations of dUTP

## 2.2 基因转染细胞生长结果

**2.2.1 转染质粒在细胞中的表达**:转染了 pSVHA-dUTPase (10 $\mu$ g) 和 pFLAG-hMT-3 (10 $\mu$ g) 的 293 细胞裂解后,分别用抗 FLAG 抗体和抗 HA 抗体进行免疫印迹,Western blot 结果显示可检测到 HA-dUTPase 和 FLAG-hMT-3 蛋白,而未转染的细胞则没有对应的条带(见 Fig. 2)。

**2.2.2 基因转染对细胞生长的影响**:显微镜下观察,结果发现在培养基中加入 14mol/L dUTP 的细胞与没有加入 dUTP 的正常细胞(见 Fig. 3a)相比,细胞几乎全部失去突起,皱缩成球形,细胞透光率下降,部分细胞破裂(见 Fig. 3b);转染了外源基因 pSVHA-dUTPase 后对细胞形态有所改善,部分细胞保留突起,破碎细胞减少(见 Fig. 3c);共转染 pSVHA-dUTPase 和 pFLAG-hMT-3 的细胞形态改善更明显,细胞突起保留增多,破碎细胞更为减少(见 Fig. 3d);而转染 pSV-HA 和 pFLAG-hMT-3 的细胞在 14mol/L dUTP 的培养下都失去了突起,皱缩成球形(见 Fig. 3e)。结

果初步证明 hMT-3 可以协同 dUTPase 使细胞产生一定的对 dUTP 毒性的调节。

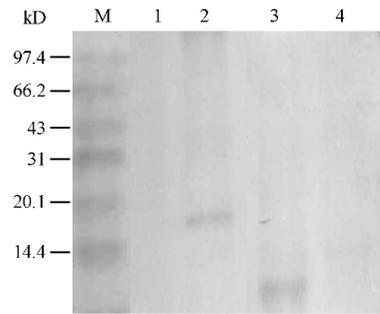


图 2 293 细胞中 dUTPase 与 hMT-3 表达的 Western blot 结果  
Fig. 2 The results of Western blotting about the expression of dUTPase and hMT-3 in 293 cell 293 cells transfected with dUTPase and hMT-3 genes

M: protein molecular weight marker(97.4, 66.2, 43, 31, 20.1, 14.4); 1: rat anti-HA was used as the antibody for Western blotting in normal 293 cells; 2: rat anti-HA was used as the antibody for Western blotting in 293 cells transfected with pSVHA-dUTPase and pFLAG-hMT-3; 3: mouse anti-Flag was used as the antibody for Western blotting in 293 cells transfected with pSVHA-dUTPase and pFLAG-hMT-3; 4: mouse anti-Flag was used as the antibody for Western blotting in normal 293 cells

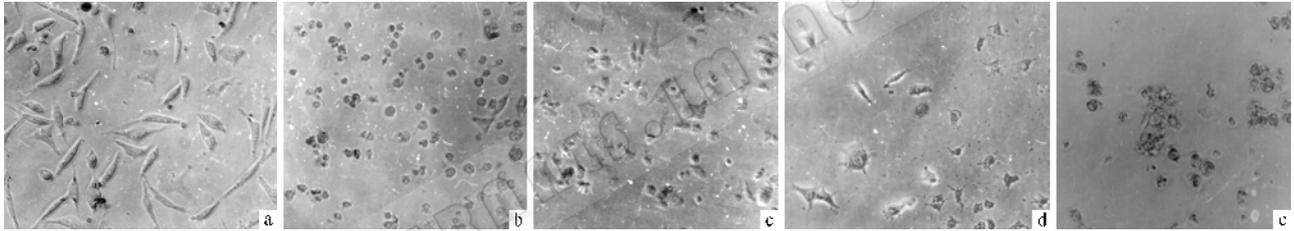


图 3 转染 dUTPase 与 hMT-3 基因的 293 细胞在 dUTP 中的生长结果

Fig. 3 The growth result of the 293 cells transfected with dUTPase and hMT-3 genes

(a) Normal growth map of 293 cell; (b) Death map of 293 cell caused by dUTP; (c) Growth of 293 cell transfected with pSVHA-dUTPase gene in dUTP culture; (d) Growth of 293 cell transfected with pSVHA-dUTPase and pFLAG-hMT-3 genes in dUTP culture; (e) Growth of 293 cell transfected with pSV-HA and pFLAG-hMT-3 genes in dUTP culture

MTT 还原测定法测定基因转染后细胞在 dUTP 中的生长抑制情况如 Fig. 4 所示。

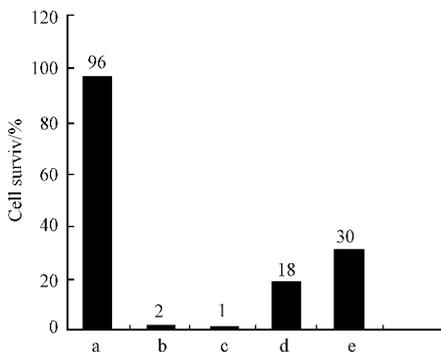


图 4 不同基因转染组细胞存活结果

Fig. 4 The growth result of cells transfected with different genes a: normal cell with culture medium; b: normal cell cultured in 14 mmol/L dUTP; c: cell transfected with pSV-HA and pFLAG-hMT-3 and cultured in 14 mmol/L dUTP; d: cell transfected with pSVHA-dUTPase and cultured in 14 mmol/L dUTP; e: cell transfected with pSVHA-dUTPase and pFLAG-hMT-3 and cultured in 14 mmol/L dUTP

## 2.3 人 dUTPase 与 hMT-3 的表达及重组蛋白纯化

IPTG 诱导表达产物经谷胱甘肽-Sephacryl 4B 亲和层析、凝血酶酶切和 Sephacryl S100 纯化后,得到纯度 95% 以上的人 dUTPase 和人 MT-3 蛋白,分子量分别为 18kD 和 7kD (Fig. 5)。

## 2.4 重组 hMT-3 蛋白对 dUTPase 水解 dUTP 的影响

10 组样品进行酶反应后所测  $A_{575}$  值见表 1、2。

根据表 1 中的数据,计算得到在重组蛋白 hMT-3 加入反应后,1  $\mu$ L 重组 dUTPase 在 10min (37 $^{\circ}$ C pH 8.0) 内催化 dUTP 水解产生 9.97nmol 的焦磷酸,因此酶的比活为: 9.97nmol / (10min  $\times$  0.11g/L  $\times$  1 $\mu$ L) = 9064 (nmol  $\cdot$  min $^{-1}$   $\cdot$  mg $^{-1}$ )。与同一批未加入 hMT-3 蛋白 dUTPase 的酶比活(7982nmol  $\cdot$  min $^{-1}$   $\cdot$  mg $^{-1}$ )相比<sup>[11]</sup>,发现 dUTPase 的比活有所上升,表明 hMT-3 对 dUTPase 水解 dUTP 的活性有一定的增强作用。

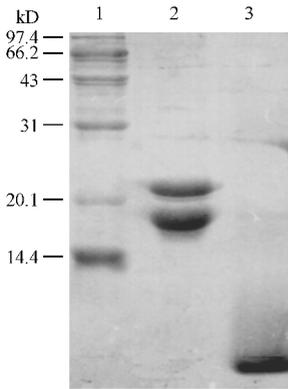


图 5 dUTPase 和 hMT-3 纯化蛋白的 SDS-PAGE 电泳图

Fig.5 SDS-PAGE (15%) showing purification of dUTPase and human MT-3

1: protein molecular weight marker (97.4, 66.2, 43, 31, 20.1, 14.4kD);  
2: purified dUTPase protein; 3: purified human MT-3 protein

表 1 重组蛋白 hMT-3 与 dUTPase 加入酶反应中 575nm 下测得的吸收值

Table 1 Absorbency of the reactivity with recombinated hMT-3 and dUTPase at 575 nm

Tube number	dUTPase/ $\mu\text{g}$	hMT-3/ $\mu\text{g}$	$A_{575}$	PP <sub>i</sub> /nmol
1	0	1.52	0	0
2	0.22	1.52	0.075	20.01
3	0.44	1.52	0.148	39.96
4	0.66	1.52	0.221	59.87
5	0.88	1.52	0.295	78.75

表 2 不同浓度重组蛋白 hMT-3 加入 dUTPase 酶反应中 575nm 下测得的吸收值

Table 2 Absorbency of the dUTPase with different concentration recombinated hMT-3 at 575 nm

Tube number	dUTPase/ $\mu\text{g}$	hMT-3/ $\mu\text{g}$	$A_{575}$	PP <sub>i</sub> /nmol
1	0.44	0.19	0.128	34.10
2	0.44	0.38	0.131	35.05
3	0.44	0.76	0.136	36.34
4	0.44	1.52	0.148	39.96
5	0.44	2.28	0.151	40.19
6	0.44	3.04	0.152	40.45
7	0.44	3.80	0.152	40.46
8	0.44	7.60	0.153	40.48

根据表 2 中的数据,可以计算得到不同重组蛋白 hMT-3 浓度加入反应后,重组 dUTPase 的酶比活数值。可以看出在重组蛋白 hMT-3 加入量小于 1.52  $\mu\text{g}$  时,dUTPase 的酶活性随着 hMT-3 加入量的增多而上升,但当加入量大于 1.52  $\mu\text{g}$  时酶比活基本没有影响。表明在一定范围内,dUTPase 水解 dUTP 的活性对 hMT-3 的加入浓度有一定的依赖性。

### 3 讨论

在通过 TS 抑制剂和二氢叶酸还原酶(DHFR)介入的致细胞死亡的分子机制中,不正常的 dUTP 代谢起着很重要的作用<sup>[1]</sup>,同时大量的研究表明,化疗中 dUTP 对正常组织细胞产生的损伤也很大,这一直是困扰肿瘤治疗的难题。dUTPase 作为 dUTP 浓度调节的关键因素,许多事实显示该酶的表达对 TS 抑制剂产生的细胞毒性起关键调节作用。Canman 和其合作者证明在人的某些组织细胞中,提高 dUTPase 的水平能增加对癌症化疗药物 5'-氟脱氧尿苷(FUdR,一种 TS 抑制剂)的抵抗力<sup>[12]</sup>。Leslie A. Parsels 等人<sup>[13]</sup>首先报道了大肠杆菌 dUTPase(dutE)的表达可以使 HT29 细胞免受 5'-FdUrd 引起的 DNA 碎片和细胞毒性,进一步又研究了 dutE 在一个 HT29 纯系中的表达能力会影响 FdUrd 和其它 TS 抑制剂对正常细胞的作用。

已经证明<sup>[14]</sup>dUTPase 可以调节 dUTP 对细胞的毒性作用,dUTPase 就成为肿瘤化疗中的靶子。对于肿瘤细胞,希望减少 dUTPase 的表达来提高化疗药物的肿瘤杀伤作用,而对正常细胞而言,则需要增加 dUTPase 的表达来提高对 dUTP 毒性的耐受。在同一机体中,这是一个矛盾的过程,于是只有寻找 dUTPase 的拮抗剂和其它成分,通过对这些成分的制约来影响 dUTPase 在不同组织中发挥不同的作用。

MT-3 是金属硫蛋白家族的一员,它在氨基酸序列、高级结构、金属结合性质上都类似于哺乳动物组织中的其它 MTs。同时,MTs 家族中只有 MT-3 具有明确的神经生长抑制作用,但体外神经细胞培养实验表明 MT-3 神经生长抑制活性的发挥,必须依赖培养体系中加入一定量的脑提取物,如果不存在脑提取物,MT-3 将与其它 MTs 一样表现对神经元存活的刺激效应<sup>[15]</sup>。因此,MT-3 并不具有直接的神经元生长抑制活性,而是绝对依赖于脑提取物。推测脑提取物中存在某种因子,MT-3 通过蛋白相互作用,或者激活某种未知抑制因子,或者抑制某些神经营养因子的活性,从而抑制神经细胞轴突的生长。在 AD 病中,由于 MT-3 水平显著下降,影响了分子相互作用,从而影响了大脑的正常生理功能,造成 AD 病变。如果能够筛选出这种未知因子,将有可能探明 AD 病的分子机理。

我们的实验已经证明 dUTPase 可以与 hMT-3 特异性相互作用,并且在脑中协同 hMT-3 对神经细胞

生长产生抑制作用。本文则通过基因转染和体外生化实验等手段,初步证明了 hMT-3 可以协同 dUTPase 减弱 dUTP 对正常细胞的损伤,为进一步加强化疗药物针对肿瘤组织的特定作用以及减少对正常组织的损伤这一医学问题提供了有效思路。

## REFERENCES (参考文献)

- [ 1 ] Harris JM, McIntosh EM, Muscat GE *et al.* Structure/function analysis of a dUTPase: Catalytic mechanism of a potential chemotherapeutic target. *J Mol Biol*, 1999, **288**: 275 - 287
- [ 2 ] Goulian M, Bleile B, Tseng BY. The effect of methotrexate on levels of dUTP in animal cells. *J Biol Chem*, 1980, **255**: 10630 - 10637
- [ 3 ] Clinie S, Lutz T, Radul J *et al.* Expression of trimeric human dUTP pyrophosphatase in *Escherichia coli* and purification of the enzyme. *Protein Expression and Purification*, 1994, **5**: 252 - 258
- [ 4 ] Chen QL(陈巧林), Ren HW(任宏伟), Ru BG(茹炳根). Progresses on the study of dUTP pyrophosphatase. *Chemistry of Life (生命的化学)*, 2002, **22**(4): 356 - 359
- [ 5 ] Uchida Y, Takio K, Titani K *et al.* The growth inhibitory factor that is deficient in the Alzheimer's disease brain is a 68 amino acid metallothionein-like protein. *Neuron*, 1991, **7**(2): 337 - 347
- [ 6 ] Chen QL(陈巧林), Kang QH(康巧华), Ren HW(任宏伟) *et al.* Molecular cloning and authenticating and biological activity of GIF-interacting protein(s). *Acta Genetica Sinica(遗传学报)*, 2004, **31**(1): 7 - 12
- [ 7 ] Kang QH(康巧华), Chen QL(陈巧林), Ji QZ(季清洲) *et al.* Cloning and expression of G-protein Rab3a cDNA. *Chin J Biochem Mol Bio(中国生物化学与分子生物学报)*, 2002, **18**(1): 75 -

79

- [ 8 ] Erickson JC, Sewell AK, Jensen LT *et al.* Enhanced neurotrophic activity in Alzheimer's disease cortex is not associated with down-regulation of metallothionein-III (GIF). *Brain Res*, 1994, **649**(1-2): 297 - 304
- [ 9 ] Grindey GB, Nichol CA. Micro procedure for determination of pyrophosphate and orthophosphate. *Analytical Biochemistry*, 1970, **33**: 114 - 119
- [ 10 ] Grindey GB, Nichol CA. Mamol/Lalian deoxyuridine 5'-triphosphate pyrophosphatase. *Biochim Biophys Acta*, 1971, **240**: 180 - 183
- [ 11 ] Chen QL(陈巧林), Ren HW(任宏伟), Kang QH(康巧华) *et al.* Cloning, expression of human nucleolus dUTPase and the determination of its enzymatic activity. *Chin J Biochem Mol Bio(中国生物化学与分子生物学报)*, 2003, **19**(5): 606 - 611
- [ 12 ] Canman CE, Radany EH, Parsels LA *et al.* Induction of resistance to fluorodeoxyuridine cytotoxicity and DNA damage in human tumor cells by expression of *Escherichia coli* deoxyuridine triphosphatase. *Cancer Res*, 1994, **54**: 2296 - 2298
- [ 13 ] Parsels LA, Parsels JD, Wagner LM *et al.* Mechanism and pharmacological specificity of dUTPase-mediated protection from DNA damage and cytotoxicity in human tumor cells. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1998, **42**: 357 - 362
- [ 14 ] Webley SD, Hardcastle A, Landner RD *et al.* Deoxyuridine triphosphatase (dUTPase) expression and sensitivity to the thymidylate synthase (TS) inhibitor ZD9331. *Br J Cancer*, 2000, **83**: 792 - 799
- [ 15 ] Erickson JC, Sewell AK, Jensen LT *et al.* Enhanced neurotrophic activity in Alzheimer's disease cortex is not associated with down-regulation of metallothionein-III (GIF). *Brain Res*, 1994, **649**: 297 - 304

## Affection of Metallothionein-3 to dUTPase's Accommodating Cellular Toxicity of dUTP

CHEN Qiao-Lin<sup>1</sup> KANG Qiao-Hua<sup>1</sup> REN Hong-Wei<sup>1</sup> WANG Zong-Yuan<sup>2</sup> RU Bing-Gen<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>( Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Life Sciences, Peking University, National Laboratory of Protein Engineering, Beijing 100871, China )

<sup>2</sup>( College of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China )

**Abstract** Metallothionein-3 (MT-3), renamed as growth inhibitory factor (GIF), is a brain specific member of the metallothionein family. Human dUTPase is a recently found protein in brain that can interact with hMT-3. They have the growth inhibitory activity on neuron cell by interaction. To study the affection of hMT-3 to dUTPase's eliminating the cellular toxicity caused by dUTP, the pSVHA-dUTPase and pFlag-hMT-3 genes have been transfected into HEK293 cells. In addition, the dUTPase and hMT-3 proteins were expressed in BL21 to study the role of hMT-3 on the hydrolyzation of dUTP by dUTPase. The results demonstrate that the cells co-transfected with dUTPase and hMT-3 genes have more strong resistibility to dUTP than the cells transfected only with dUTPase gene. And that the hMT-3 protein can accelerate the hydrolyzation of dUTP by dUTPase. All these indicate that hMT-3 can cooperate with dUTPase to protect better the 293 cells from dUTP. This research offered the theoretic elements for the application of hMT-3 and dUTPase in chemic cure.

**Key words** hMT-3, dUTPase, gene transfection, dUTP, cellular toxicity

Received: 11-11-2003

This work was supported by Grant from the National 9th Five Years Plan Special Research Programs of China (No.96-C02-01-09).

\* Corresponding author. Tel: 86-10-62751842; Fax: 86-10-62751842; E-mail: nmlab@pku.edu.cn

©中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>