

一种基于绿色荧光蛋白的蛋白酶体抑制剂细胞筛选模型

方海同^{1,2}, 胡政¹, 周光飏^{1,2}

1 中国科学院广州生物医药与健康研究院, 广州 510663

2 中国科学技术大学生命科学学院, 合肥 230027

摘要: 为建立基于绿色荧光蛋白(GFP)的药物筛选模型, 并用此模型从包括中药提取物在内的化合物中筛选新型蛋白酶体抑制剂, 本研究构建了 pGC-E1-ZU1-GFP 融合蛋白慢病毒表达载体并感染 A549 细胞, 筛选稳定表达细胞株, 用已知蛋白酶体抑制剂 PS-341 处理细胞, 荧光显微镜检测处理前后细胞 GFP 水平变化。结果获得了稳定表达 pGC-E1-ZU1-GFP 的 A549 细胞, 这些细胞用 PS-341 处理 24 h 后用荧光显微镜检测, 发现细胞绿色荧光强度相对于对照组明显增强。利用这一模型对一些化合物进行筛查, 发现了一些新的蛋白酶体抑制剂。

关键词: 蛋白酶体抑制剂, 筛选模型, 绿色荧光蛋白

Establishment of a GFP-based cellular model for screening novel proteasome inhibitors

Haitong Fang^{1,2}, Zheng Hu¹, and Guangbiao Zhou¹

1 *Guangzhou Institute of Biomedicine and Health, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510663, China*

2 *School of Life Science, University of Science and Technology of China, Hefei 230027, China*

Abstract: To establish a green fluorescent protein (GFP)-based cellular model for screening proteasome inhibitors from compounds including extracts from Traditional Chinese Medicinal herbs, we transfected A549 cells with lentivirus expression vector pGC-E1-ZU1-GFP, and selected clones stably expressing ZU1-GFP. The A549-ZU1-GFP cells were treated with PS-341 for 24 h, and the accumulation of GFP was analyzed by fluorescence microscope. We found that the fluorescence intensity of A549-ZU1-GFP cells treated with PS-341 was significantly increased as compared to the control. We screened for proteasome inhibitors from compounds including some from Traditional Chinese Medicinal herbs, and the data suggested a few compounds could be novel proteasome inhibitors.

Keywords: proteasome inhibitor, screening model, green fluorescent protein

蛋白酶体(Proteasome)是一种分布于细胞浆与细胞核、具有糜蛋白酶样、胰蛋白酶样及 caspase 样酶活性的蛋白酶复合体, 是细胞降解内源性蛋白质的场所^[1], 对维持细胞周期、增殖、生存等细胞生物

Received: September 4, 2008; **Accepted:** December 8, 2008

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 30871110), Key Project of Knowledge Innovation Program of the Chinese Academy of Sciences (No. KSCX1-YW-R-26), Key Program of Natural Science Foundation of Guangdong Province (No. 06107503), the Science and Technology Planning Project of Guangdong Province (No. 2007B030701005), National High-tech Program of China (863 Program) (No. 2006AA02A301).

Corresponding author: Guangbiao Zhou. Tel: +86-20-32290596; E-mail: Zhou_guangbiao@gibh.ac.cn

国家自然科学基金项目(No. 30871110), 中国科学院知识创新工程重要方向项目(No. KSCX1-YW-R-26), 广东省自然科学基金重点项目(No. 06107503), 广东省科技计划项目(No. 2007B030701005), 国家高技术研究发展计划(863 计划) (No. 2006AA02A301)资助。

学行为的正常具有极其重要的作用^[2]。二肽硼酸化合物 PS-341/Bortezomib/Velcade 通过抑制蛋白酶体功能进而诱导肿瘤细胞凋亡, 在临床上治疗多发性骨髓瘤(Multiple myeloma, MM)可显著延长患者的生存期^[3]。临床试验取得的巨大成功, 不仅使 PS-341 成为“重磅炸弹”式的新药受到如潮好评, 同时说明蛋白酶体是一个可靠的肿瘤治疗新靶点。我国有丰富的中药、植物药资源, 这些中药的提取物能否通过抑制蛋白酶体功能而发挥抗肿瘤作用呢? 迄今为止, 除了雷公藤红素^[4]、冬凌草甲素^[5]等外, 其他中药提取物对蛋白酶体功能的影响鲜有报道。本实验建立了基于绿色荧光蛋白(Green fluorescent protein, GFP)的蛋白酶体抑制剂筛选模型, 这些细胞在蛋白酶体抑制剂作用下可发出绿色荧光, 但如果化合物不具有抑制蛋白酶体功能的活性, 则不能使这些细胞发出绿色荧光。这一系统适用于筛选新型蛋白酶体抑制剂。

1 材料和方法

1.1 材料

PS-341 购自美国强生公司, PBS 溶解至储存浓度 2.6 mmol/L, 培养基稀释至需要浓度; 人非小细胞肺癌细胞株 A549、慢病毒包装细胞 293T 和慢病毒载体系统 (pGC-E1, pHelper 1.0 及 Helper 2.0 三种质粒) 及质粒 Ub^{G76V}-GFP 由本实验室保存; DMEM 培养基购自 Gibco 公司; 胎牛血清 (Fetal bovine serum, FBS) 购自 TBD 公司; LIPOFECTAMINETM 2000 Reagent 购自 Invitrogen 公司; DNA 聚合酶 EX Taq、限制性核酸内切酶 Age I 和 EcoR I 及 T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司; 微量质粒提取试剂盒购自 Omega Biotek 公司; Midi 质粒提取试剂盒及凝胶回收试剂盒购自 Qiagen 公司; polybrane 购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

饱和湿度、37°C、5% CO₂ 的条件下, A549 和 293T 细胞在含 10% FBS 的高糖 DMEM 中培养。

1.2.2 融合蛋白表达载体构建

质粒 Ub^{G76V}-GFP 酶切位点 EcoR I 和 Not I 之间含 ZU1-GFP 片段, 质粒按照载体设计引物进行 PCR 扩增, 引物序列为: 上游引物 5'-GAACCGTCAGAT

CCGCTAGCGCTACCGGTCGCCACCATGCAGATC TTCGTGAAGAC-3', 下游引物 5'-TTAGGTCCCTC GACGAATTCTTACTTGTACAGCTCGTCCAT-3'。取 15 μL PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 按照 Qiagen 凝胶回收试剂盒说明切胶回收目的片段。用 Nhe I 和 EcoR I 进行酶切 PCR 产物和 pGC-E1 载体, 胶回收后用 T4 DNA 连接酶连接得 pGC-E1-ZU1-GFP 质粒, 随后转化 *E. coli* DH5α。菌落 PCR 鉴定阳性克隆, 挑选的阳性克隆质粒送 Invitrogen 测序。

1.2.3 重组慢病毒的包装

将 293T 细胞接种于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基内, 置饱和湿度、37°C 含 5% CO₂ 的培养箱内。待细胞密度达到 70%~80% 时即可用于转染。转染前 2 h 将细胞培养基更换为无血清培养基。用 pGC-E1-ZU1-GFP、pHelper 1.0 (gag/pol 元件) 及 pHelper 2.0 (VSVG 元件) 3 种质粒转染 293T 细胞, 具体操作依照 LIPOFECTAMINETM 2000 Reagent 说明进行。培养 8 h 后倒去含有转染混和物的培养基, 细胞加入 PBS 液, 轻轻左右晃动一下培养瓶以洗涤残余的转染混和物, 然后倒去。细胞中加入含 10% 血清的细胞培养基 25 mL, 于 37°C、5% CO₂ 培养箱内继续培养 48 h。收集转染 48 h 后的 293T 细胞上清液, 4000 × g 4°C 离心 10 min。过滤杯过滤浓缩, 收集病毒浓缩液, 分装后保存在病毒管中, -80°C 长期保存。空载体 pGC-E1 作为对照包装病毒。

1.2.4 慢病毒感染细胞及单克隆的获得

吸去六孔板的 A549 细胞的培养基, 每孔加入病毒浓缩液 2 mL, 加入 polybrane 至终浓度 8 μg/mL, 5 h 后换为正常 DMEM 培养基继续培养, 48 h 后每孔取 1 × 10³ 个细胞至 10 cm 细胞培养皿均匀培养, 7 d 后吸尽培养皿内培养基, PBS 轻轻漂洗 2 遍, 吸取 50 μL 胰酶消化单个克隆并转移至 24 孔板 500 μL 培养基继续培养, 荧光显微镜高亮度观察细胞, 有微弱绿色荧光的细胞即为阳性克隆。获得的细胞克隆为 A549-ZU1-GFP 细胞, 空载体对照细胞为 A549-NC-GFP。

1.2.5 药物处理及荧光观察

24 孔板培养 A549-ZU1-GFP 和 A549-NC-GFP 细胞至细胞密度达到 80%, PS-341 作用细胞 24 h, LEICA DMI6000B 型倒置荧光显微镜 200 倍观察细

胞绿色荧光。本实验还用一些化合物处理 A549-ZU1-GFP 细胞, 以筛选新的蛋白酶体抑制剂。

2 结果

2.1 目的片段的克隆

以质粒 Ub^{G76V}-GFP 为模板 PCR 扩增目的片段 ZU1-GFP, *Nhe I*/*EcoR I* 双酶切 PCR 产物, 琼脂糖凝胶电泳鉴定结果如图 1 所示, 酶切片段与目的序列大小一致。

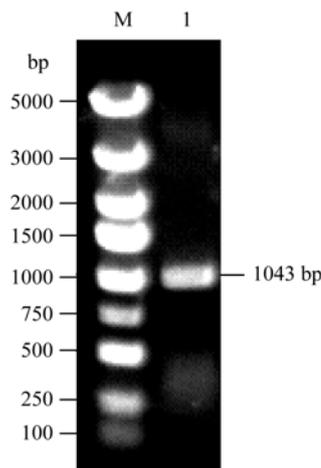


图 1 PCR 产物酶切鉴定

Fig. 1 Identification of PCR product.

2.2 融合蛋白表达载体的酶切鉴定

融合蛋白表达载体 pGC-E1-ZU1-GFP 以 *Nhe I*/*EcoR I* 双酶切, 酶切鉴定结果如图 2 所示, 酶切片段大小符合预期, 测序结果与目的序列完全相同, 表达载体构建成功。

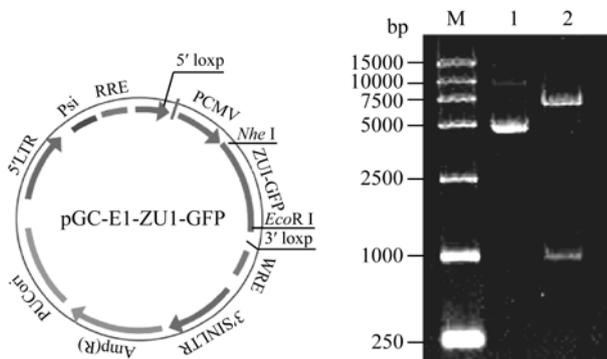


图 2 融合蛋白表达载体 pGC-E1-ZU1-GFP 示意图(左)及酶切鉴定(右)

Fig. 2 Plasmid construction(left) and identification(right). M: DL15000 DNA marker; 1: plasmid; 2: cleavage fragment.

2.3 细胞感染及 A549-ZU1-GFP 细胞的筛选

六孔板培养 A549 细胞, 细胞密度达到 70%~80% 时, 吸去培养基, 每孔加入病毒浓缩液 2 mL, 加入 8 mg/mL 的 polybrene 2 μ L, 5 h 后换为正常 DMEM 培养基培养, 48 h 后每孔取 1×10^3 个细胞至 10 cm 细胞培养皿均匀培养, 7 d 后吸尽培养皿内培养基, PBS 轻轻漂洗 2 遍, 吸取 50 μ L 胰酶消化单个克隆并转移至 24 孔板 500 μ L 培养基培养。细胞贴壁后, 荧光显微镜检测细胞绿色荧光, 有微弱绿色荧光的克隆为阳性克隆。获得的细胞克隆为 A549-ZU1-GFP 细胞, 空载体对照细胞为 A549-NC-GFP。

2.4 蛋白酶体抑制剂处理与新型蛋白酶体抑制剂的筛选

24 孔板培养 A549-ZU1-GFP 细胞和 A549-NC-GFP 细胞, 蛋白酶体抑制剂 PS-341 分别以 0、50、100 和 150 nmol/L 的浓度处理细胞 24 h, 倒置荧光生物显微镜观察细胞绿色荧光, 如图 3 所示, 蛋白酶体抑制剂 PS-341 明显地增强了 A549-ZU1-GFP 细胞绿色荧光强度, 而对空载体对照细胞的绿色荧光水平无明显影响。本实验利用这一模型对一些化合物进行筛查, 初步发现了一些新的蛋白酶体抑制剂, 有关研究仍在进行中。

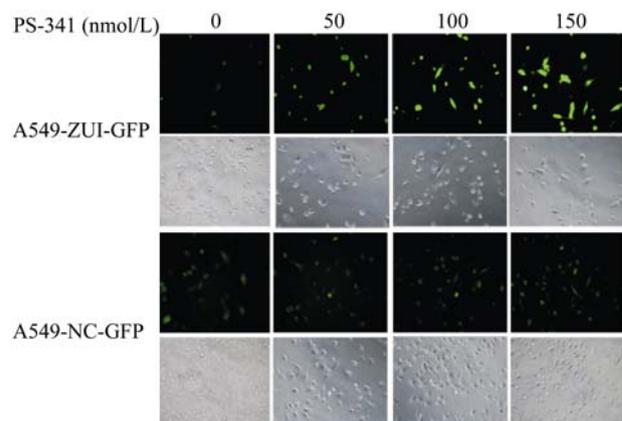


图 3 蛋白酶体抑制剂可显著增强 A549-ZU1-GFP 细胞的绿色荧光

Fig. 3 Proteasome inhibitor enhances fluorescence intensity of A549-ZU1-GFP cells.

3 讨论

泛素-蛋白酶体系统(Ubiquitin-proteasome system)是细胞降解内源性蛋白质的场所, 控制着许多对正常和恶性细胞的周期调控、细胞凋亡等行为

均有重要影响的蛋白质的表达水平, 这些蛋白包括细胞周期蛋白(Cyclins)、天冬氨酸特异的半胱氨酸蛋白酶(Caspases)、BCL-2、核因子- κ B(NF- κ B)等^[1,6]。其中泛素是一种由 76 个氨基酸组成的高度保守的蛋白质, 对一些错配、受损或短寿命(Short-lived)蛋白质而言它就像“标签”一样, 被贴上标签的蛋白质就会被运送到细胞内的“垃圾处理厂”并在那里被降解^[7,8]。这个“垃圾处理厂”就是蛋白酶体, 它分布于细胞核及细胞浆, 是一种桶状、巨大 26S (1500~2000 kD)、具有多种催化活性的蛋白酶复合体。在结构上, 蛋白酶体由 2 个亚复合体组成: 20S 具有催化活性的核心颗粒(Core particle, CP)和 19S 调节颗粒(Regulatory particle, RP)。20S CP 是一种由 4 个叠环构成的桶状结构, 其中 2 个相同的 β -环位于外侧, 2 个相同的 β -环位于内侧。在真核生物, 每个 α 、 β 环由 7 个不同的亚单位构成, 这样组成了 $\alpha 1-7 \beta 1-7 \beta 1-7 \alpha 1-7$ 的 20S 复合体结构。20S 复合体的催化部位存在于 β 亚单位中。20S 桶状结构的一侧或两侧可结合由 17 个不同亚单位形成的 19S RP 帽状结构。蛋白酶体具有糜蛋白酶样、胰蛋白酶样活性及谷氨酰基后肽水解活性(即 caspase 样酶活性), 可识别被泛素标记的蛋白质并将之降解为 7~9 个氨基酸的短肽^[9]。由于泛素-蛋白酶体系统对细胞的增殖、生存等行为影响重大, 所以通过抑制蛋白酶体功能从而治疗肿瘤的设想曾受到过广泛的质疑, 因为人们认为这种办法可能会在杀死肿瘤细胞的同时置病人于死地^[10]。不过后来的事实消除了这种担忧。研究显示, 小分子化合物 PS-341 可以一种浓度依赖性的方式靶向作用于多发性骨髓瘤细胞蛋白酶体的 $\beta 5$ 亚单位及免疫蛋白酶体相应的催化亚单位 $\beta 5i$, 抑制其糜蛋白酶样活性^[11]。PS-341 对蛋白酶体功能抑制的后果之一是导致 I κ B 在细胞内的积聚, 进而抑制具有抗凋亡、促进肿瘤生长能力的转录因子 NF- κ B 的功能^[11]。PS-341 不仅在体外具有强大的诱导 MM 细胞凋亡的作用, 而且在 MM 小鼠模型也可明显抑制 MM 细胞的生长并延长小鼠生存期^[12]。Richardson 等^[3]用 PS-341 治疗 202 例复发、难治性 MM 患者, 在可进行疗效评估的 193 例患者中, 35% 病人病情得到好转或明显好转, 生存期也得到延长。这些结果说明蛋白酶体是一个可靠的肿瘤治疗新靶点^[13]。

最近几年, 组合化学的长足发展使得短时间合

成大量化合物成为可能, 传统的筛选方法费时费力, 且效率较低, 而高通量筛选技术(High throughput screening, HTS)则具有微量化、自动化、规模化和高效率, 已经逐渐成为药物发现的主流方法。建立以蛋白酶体为靶标的高通量药物筛选技术平台显然具有理论和实践上的重要意义。泛素融合 GFP 蛋白在泛素蛋白酶体降解系统功能正常的细胞内很快被降解, 泛素蛋白酶体途径被抑制则引起 GFP 在细胞内的积累^[14]。文献未见报道采用慢病毒重组载体 pGC-E1-ZU1-GFP 感染人非小细胞肺癌 A549 细胞来鉴定化合物对蛋白酶体的抑制作用。ZU1-GFP 为泛素-绿色荧光蛋白融合基因, 其编码的泛素-绿色荧光蛋白发生了突变, 即在 N 端泛素的第 76 位甘氨酸突变为缬氨酸, 阻断了融合蛋白的去泛素化过程, 使得融合蛋白可以直接进入蛋白酶体进行降解。用化合物处理表达 ZU1-GFP 融合蛋白的细胞, 如果化合物具有抑制蛋白酶体的活性, 就会引起融合蛋白在细胞内的积累, 表现为细胞绿色荧光增加; 如果化合物不具有抑制蛋白酶体的活性, 细胞不会发出绿色荧光, 因而可以用于蛋白酶体抑制剂的筛选。Rickardson 等^[15]用绿色荧光蛋白(GFP)与鸟氨酸脱羧酶融合并稳定转染人胚肾 293(HEK 293)细胞, 在正常情况下鸟氨酸脱羧酶是由蛋白酶体降解的(这一过程不需要泛素化), 如果化合物具有抑制蛋白酶体的活性, GFP 就会在细胞内堆积, 因此可以用于蛋白酶体抑制剂的筛选。一般而言, 肿瘤细胞更依赖泛素-蛋白酶体系统且对蛋白酶体抑制剂更为敏感。A549 是一种肺癌细胞株, 能反映肿瘤细胞在化合物作用下蛋白酶体活性的变化, 而 HEK293 作为一种人胚肾细胞株, 其泛素-蛋白酶体系统可能与肿瘤细胞有所不同, 不能完全模拟肿瘤细胞蛋白酶体活性的变化, 因而本模型在筛选抗肿瘤药物方面更具有优势。同时通过观察 A549-ZU1-GFP 细胞形态学改变等指标, 可以直接了解化合物对肿瘤细胞的作用, 而以 293 细胞为基础的筛选模型也不具有这一优势。将 A549-ZU1-GFP 细胞移植到免疫缺陷小鼠建立肿瘤模型, 可以进而评价化合物的体内抗肿瘤作用。而用慢病毒进行载体转染, 可使外源基因整合到细胞基因组, 因此表达更稳定。由此可见, 本实验建立的蛋白酶体抑制剂筛选体系在筛选抗肿瘤药物方面更为实用、可靠。实验结果证明该模型能有效

反映蛋白酶体抑制剂 PS-341 对细胞泛素蛋白酶体途径的抑制作用, 表明 A549-ZU1-GFP 细胞作为蛋白酶体抑制剂筛选细胞是完全可行的。A549-ZU1-GFP 细胞为较高通量特异筛选蛋白酶体抑制剂提供了一个良好的模型, 应用该模型有希望筛选到更有效、特异性更好的蛋白酶体抑制剂。我国幅员辽阔, 有着丰富的中药/植物药资源。迄今为止, 除了雷公藤红素、冬凌草甲素等外, 其他中药提取物的蛋白酶体抑制性能鲜有报道。本研究拟用这一筛选平台, 从现有的萜类、植物肽、黄酮类、生物碱、皂甙、蒽醌、木脂素类、香豆素类化合物及部分中药复方中等筛选新型蛋白酶体抑制剂, 并进一步研究其抗肿瘤作用及毒副作用, 为开发具有自主知识产权的新型蛋白酶体抑制剂奠定基础。

4 结论

本研究构建了慢病毒表达载体并感染 A549 细胞, 建立了稳定表达 pGC-E1-ZU1-GFP 融合蛋白的细胞株, 这种细胞在已知蛋白酶体抑制剂的作用下可发出绿色荧光, 而在没有蛋白酶体抑制活性的化合物作用下则不会发出荧光, 因此可以作为新型蛋白酶体抑制剂的筛选平台。本研究建立的蛋白酶体抑制剂细胞筛选模型, 具有稳定、高效、低成本的特点, 并可实现机械操作, 减少手工操作带来的误差。另外, 也可以将这种细胞通过皮下(甚至静脉)注射到免疫缺陷小鼠建成肿瘤的动物模型, 观察化合物在体内是否具有蛋白酶体抑制活性、对荷瘤小鼠是否具有治疗作用, 对开发新的靶向作用于肿瘤细胞泛素-蛋白酶体系统的药物具有显著意义。同时, 利用这一模型从我国丰富的植物药资源中筛选蛋白酶体抑制剂, 对促进中医药的现代化、国际化也有帮助。

REFERENCES

[1] Ciechanover A. Proteolysis: From the lysosome to ubiquitin and the proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, **6**: 79–87.

- [2] Jan S, Richard DV. The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. *Annu Rev Plant Biol*, 2004, **55**: 555–590.
- [3] Richardson PG, Barlogie B, Berenson J, *et al.* A phase 2 study of bortezomib in relapsed, refractory myeloma. *N Engl J Med*, 2003, **348**: 2609–2617.
- [4] Yang H, Chen D, Cui QC, *et al.* Celastrol, a triterpene extracted from the Chinese “Thunder of God Vine,” is a potent proteasome inhibitor and suppresses human prostate cancer growth in nude mice. *Cancer Res*, 2006, **66**: 4758–4765.
- [5] Zhou GB, Chen SJ, Wang ZY, *et al.* Back to the future of oridonin: again, compound from medicinal herb shows potent antileukemia efficacies *in vitro* and *in vivo*. *Cell Res*, 2007, **17**: 274–276.
- [6] Etlinger JD, Goldberg AL. A soluble ATP-dependent proteolytic system responsible for the degradation of abnormal proteins in reticulocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **74**: 54–58.
- [7] Hershko A, Heller H, Ganoth D, *et al.* Protein Turnover and Lysosome Function. New York: Academic Press, 1978: 149–169.
- [8] Hough R, Pratt G, Rechsteiner M. Ubiquitin-lysosome conjugates. Identification and characterization of an ATP-dependent protease from rabbit reticulocyte lysates. *J Biol Chem*, 1986, **261**: 2400–2408.
- [9] Wilk S, Orlowski M. Cation-sensitive neutral endopeptidase: Isolation and specificity of the bovine pituitary enzyme. *J Neurochem*, 1980, **35**: 1172–1182.
- [10] Garber K. Cancer research. Taking garbage in, tossing cancer out? *Science*, 2002, **295**: 612–613.
- [11] Hideshima T, Chauhan D, Richardson P, *et al.* NF-kappa B as a therapeutic target in multiple myeloma. *J Biol Chem*, 2002, **277**: 16639–16647.
- [12] LeBlanc R, Catley LP, Hideshima T, *et al.* Proteasome inhibitor PS-341 inhibits human myeloma cell growth *in vivo* and prolongs survival in a murine model. *Cancer Res*, 2002, **62**: 4996–5000.
- [13] Adams J. The proteasome: a suitable antineoplastic target. *Nat Rev Cancer*, 2004, **4**: 349–360.
- [14] Dantuma NP, Lindsten K, Glas R, *et al.* Short-lived green fluorescent proteins for quantifying ubiquitin/proteasomedependent proteolysis in living cells. *Nat Biotechnol*, 2000, **18**: 538–543.
- [15] Rickardson L, Wickstrom M, Larsson R, *et al.* Image-based screening for the identification of novel proteasome inhibitors. *J Biomol Screen*, 2007, **12**: 203–210.