

## 细胞穿膜肽 TAT 以非融合形式递送蛋白质的能力探究

窦佳<sup>1</sup>, 吉丽娜<sup>1\*</sup>, 华子春<sup>1,2,3\*</sup>

(1. 南京大学生命科学学院, 医药生物技术国家重点实验室, 江苏 南京 210023; 2. 江苏省产业技术研究院医药生物技术研究所, 常州南京大学高新技术研究院, 江苏 常州 213164; 3. 南京吉芮康生物科技研究院, 江苏 南京 210044)

**摘要:** 穿膜肽 TAT 被证实可用于不同类型药物分子的递送, 包括核酸、蛋白质和小分子药物等。TAT 可以通过共价连接和非共价连接等形式递送分子。但是迄今 TAT 采用非共价连接形式递送蛋白质分子报道较少, 也未有研究比较过融合形式和非融合形式下 TAT 递送蛋白质能力的差异。为了探究非融合形式对于 TAT 递送蛋白质能力的影响, 本文采用了荧光显微镜观察和流式细胞检测法在细胞水平上探究了 TAT 以非融合形式递送增强型绿色荧光蛋白 (enhanced green fluorescent protein, EGFP) 进入人非小细胞肺癌细胞 A549 的能力, 发现其可以穿膜递送 EGFP, 并且递送能力与 TAT 浓度呈现正相关。同时, 本文还表达纯化了 TAT 与绿色荧光蛋白质 EGFP 的融合蛋白 TAT-EGFP 并考察了其穿膜能力。本文将两种形式的递送效果进行定量对比后发现: 当 TAT 以融合蛋白形式递送 EGFP 时, 其递送能力要明显优于 TAT 以非融合形式递送 EGFP 的能力。本文报道了 TAT 能够以非融合形式递送 EGFP, 尽管其递送效果有待进一步提高, 但是该递送形式在操作便捷性上有着不可比拟的优势, 是未来一种值得选择的递送方案。

**关键词:** 细胞穿膜肽; TAT; 非融合表达; 递送形式; TAT-EGFP; 穿膜能力

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)08-2384-07

## Exploring the ability of TAT, a cell-penetrating peptide, to deliver proteins in a non-fused form

DOU Jia<sup>1</sup>, JI Li-na<sup>1\*</sup>, HUA Zi-chun<sup>1,2,3\*</sup>

(1. State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, School of Life Science, Nanjing University, Nanjing 210023, China; 2. Institute of Pharmaceutical Biotechnology of Jiangsu Industrial Technology Research Institute and Changzhou High-Tech Research Institute of Nanjing University, Changzhou 213164, China; 3. Nanjing Genrecom Laboratories, Nanjing 210044, China)

**Abstract:** Accumulating evidence has shown that the cell-penetrating peptide TAT can be applied to deliver different types of drug molecules, including nucleic acids, proteins and small molecule drugs. Usually TAT delivers cargoes on the basis of their covalent bonds or non-covalent interactions. However, there are few reports on the delivery of proteins by TAT in a non-covalent manner, and no quantitative comparisons have been made on the protein delivery ability of TAT in fusion and non-fusion manners. In order to explore the ability of TAT to deliver proteins in non-fusion manner, here we used fluorescence microscopy and flow cytometry to investigate the ability of TAT to deliver enhanced green fluorescent protein (EGFP) into non-small cell lung cancer cells A549 in a non-fusion manner. It was found that TAT could deliver EGFP into A549 cells, and its delivery ability was positively

收稿日期: 2023-03-06; 修回日期: 2023-04-25.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (32250016, 82130106); 南京市生命健康科技专项计划 (202110016); 常州市科技局 (CZ20210010, CJ20210024, CJ20220019).

\*通讯作者 Tel: 13814039758; E-mail: zchua@nju.edu.cn;

Tel: 15996254057; E-mail: jilina@nju.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-0266

correlated with its concentration. In addition, the fusion protein TAT-EGFP was overexpressed and purified, and its permeability across cell membrane was also investigated. In this paper, based on quantitative comparison, we found that the delivery of EGFP by TAT in fusion manner is significantly efficient than that of TAT in non-fusion manner. This is the report that TAT can deliver EGFP in a non-fusion manner. Although its delivery efficiency remains to be improved as compared with the fusion manner, the non-fusion manner has shown incomparable advantages in ease of operation, suggesting that it is also a candidate for delivery strategy in the future.

**Key words:** cell-penetrating peptide; TAT; non-fusion expression; delivery strategy; TAT-EGFP; cell permeability

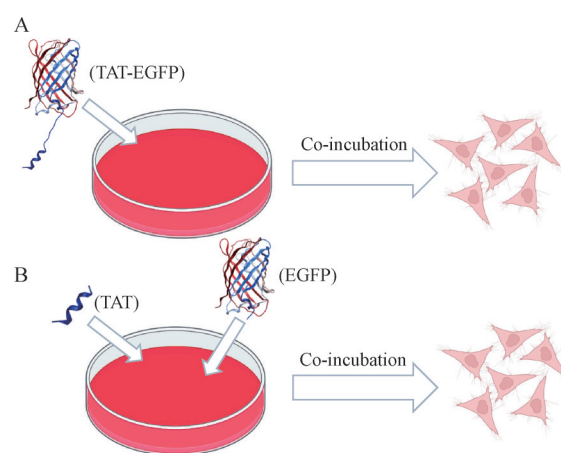
细胞穿膜肽是一种可以穿透细胞膜进入细胞, 并能够保持其自身生物活性的类信号肽的短肽物质<sup>[1]</sup>。Frankel 等<sup>[2]</sup>于 1988 年首次发现人类免疫缺陷病毒 HIV 的反式激活蛋白 (transactivator) 可以穿透细胞膜进入胞内。研究发现, 该蛋白的一段氨基酸序列具有穿膜活性, 后期人们称其为穿膜肽 TAT。此后, 多种穿膜肽被陆续发现<sup>[3,4]</sup>。这些肽的链长一般不超过 30 个氨基酸, 并且带有正电荷<sup>[5]</sup>。

TAT 的氨基酸序列对于其穿膜能力至关重要, 11 个氨基酸的 TAT 穿膜能力强。自 2000 年起, 与 TAT 相关的研究逐年递增。基于其良好的穿膜活性和低细胞毒性<sup>[6]</sup>, TAT 可被应用于递送蛋白质<sup>[7]</sup>、核酸<sup>[8]</sup>和小分子药物<sup>[6]</sup>等进入细胞, 从而促进药物分子到达靶标部位。TAT 在眼部疾病治疗<sup>[9]</sup>、神经系统相关疾病治疗<sup>[7]</sup>和肿瘤治疗<sup>[10]</sup>等方面显现出较好的应用潜力。理论上, TAT 可以通过共价结合和非共价结合的形式进行药物分子递送。根据目前已发表文献, 以共价结合的形式, 如通过 TAT 与蛋白质融合表达后进行分子递送报道居多, 而以非融合形式进行蛋白质递送报道则十分稀少。因此, 非融合递送形式是否可以有效地实现蛋白质的跨膜转运, 以及非融合形式与融合蛋白递送形式相比较, 递送效果有多大差别? 目前尚无报道能够回答这一问题。

本文采用增强型绿色荧光蛋白 (enhanced green fluorescent protein, EGFP) 作为模式蛋白, 用于表征 TAT 递送分子进入细胞的能力。EGFP 的分子量为 26.9 kDa, 具有球型构象, 在 488 nm 处被激发, 发射光波长为 507 nm, 易于检测。EGFP 是分子量较大的蛋白质, 不是容易跨膜的小分子; 此外, EGFP 具有亲水性, 对于细胞膜的磷脂双分子结构而言, 不容易跨膜进入细胞。EGFP 的内源性荧光容易被追踪, 是理想的示踪剂。总体而言, EGFP 是一种理想的可用于评价递送效果的模式蛋白。

为了探究 TAT 非融合形式是否可以递送蛋白以及不同的递送形式对于 TAT 递送能力的影响, 本文首先表达纯化 TAT 与 EGFP 的融合蛋白 (TAT-EGFP), 在细

胞水平上考察其穿膜能力。同时, 考察了 TAT 和 EGFP (TAT+EGFP) 与人非小细胞肺癌细胞 A549 共孵育后递送 EGFP 的能力, 对比了采用不同递送形式时 TAT 的递送能力 (图 1)。



**Figure 1** Schematic diagram of two delivery manners. A: TAT-EGFP, the fusion protein of TAT and EGFP, was incubated with A549 cells; B: TAT and EGFP were co-incubated with A549 cells. TAT: Cell-penetrating peptide TAT; EGFP: Enhanced green fluorescent protein

## 材料与方法

**实验材料** 人非小细胞肺癌细胞 A549 来源于本实验室冻存; 穿膜肽 TAT 由金斯瑞生物科技有限公司合成 (氨基酸序列: YGRKKRRQRRR); TAT-EGFP 的表达质粒 (pET28a-TAT-EGFP-His) 由本实验室构建; Ni-NTA 琼脂糖介质来源于上海生工生物工程有限公司; 多聚甲醛固定液购自武汉赛维尔生物科技有限公司; DAPI 染色液购自上海碧云天生物科技有限公司。

**TAT-EGFP 融合蛋白质的表达纯化** 将质粒 pET28a-TAT-EGFP-His 转化进入 *E. coli* BL21 (DE3) 菌株。在 16 °C 下使用 0.24 g·mL<sup>-1</sup> 异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside, IPTG) 诱导 BL21 (DE3) 菌株过量表达 TAT-EGFP, 20 h 后离心收集菌体。用结合缓冲液 (50 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl,

500 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl, pH 8.5) 重悬菌体, 600 bar 破碎菌体, 13 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 60 min, 后收集上清。

使用 2~3 个柱体积的结合缓冲液平衡 Ni-NTA 纯化柱后, 开始将表达菌体裂解液上清上样于纯化柱。上样结束后, 先用结合缓冲液洗涤纯化柱, 然后用 50 mmol·L<sup>-1</sup> 咪唑缓冲液进行洗脱, 收集洗脱液。

**荧光倒置显微镜观察** 将生长状态良好的 A549 细胞接种到 96 孔板中培养, 第二天用不含血清的 DMEM 培养基配制不同浓度的 TAT-EGFP、TAT 和 EGFP, 与细胞共孵育 2 h。然后换成含 10% 血清的培养基继续培养 2 h, 结束培养后用 4% 多聚甲醛固定细胞, 并用 DAPI 染色 10 min, 在倒置荧光显微镜下观察。

**流式细胞术检测** 将生长状态良好的 A549 细胞接种到 6 孔板中, 在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养。第二天在 6 孔板中加入不同浓度的 TAT-EGFP、TAT 和 EGFP, 孵育 2 h 后将培养基更换成含 10% 血清的新鲜培养基。继续培养 2 h 后, 去除培养基, 分别用 0.01 mol·L<sup>-1</sup> PBS 和胰酶清洗和消化细胞, 离心收集细胞, 用流式细胞仪进行检测。EGFP 阳性率 = 流式细胞结果中向右移的细胞数/细胞总数。增加率 = (实验组平均荧光强度或阳性率 - 对照组平均荧光强度或阳性率) / 对照组平均荧光强度或阳性率。

**TAT 和 TAT-EGFP 的细胞毒性检测** 将生长状态良好的 A549 细胞接种到 96 孔板中, 在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养。第二天在 96 孔板中分别加入不同浓度 (0、10、20、40、60、80、120、150 和 200 μmol·L<sup>-1</sup>) 的 TAT-EGFP 和 TAT。继续培养 2 h 后, 去除培养基, 加入 100 μL 的 10% CCK8 溶液, 在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下避光培养 1 h, 然后利用酶标仪在 450 nm 处检测吸光度。

**统计学分析** 结果用 FlowJo 分析流式结果后, 采用 *t* 检验进行显著性分析, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。 *P* < 0.05 说明差异具有统计学意义。

## 结果

### 1 利用 TAT 穿膜递送 EGFP

以 40 μmol·L<sup>-1</sup> EGFP 处理的 A549 细胞为对照, 利用不同浓度 (10、20、40、60 和 120 μmol·L<sup>-1</sup>) 的 TAT 向 A549 细胞递送 40 μmol·L<sup>-1</sup> EGFP。TAT 与 EGFP 分别加入 0.01 mol·L<sup>-1</sup> PBS 中 (137 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl, 2.7 mmol·L<sup>-1</sup> KCl, 10 mmol·L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mmol·L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4), 两者在 37 °C 条件下共同孵育 2 h, 形成非共价复合物。通过网站 [https://web.expasy.org/compute\\_pi/](https://web.expasy.org/compute_pi/) 计算得到 TAT 等电点为 12.31, EGFP 的等电点为 5.58。在 pH 7.4 的孵育缓冲液中, 二者因静电相互作用形成非共价复合物。将该复合物与细胞共同

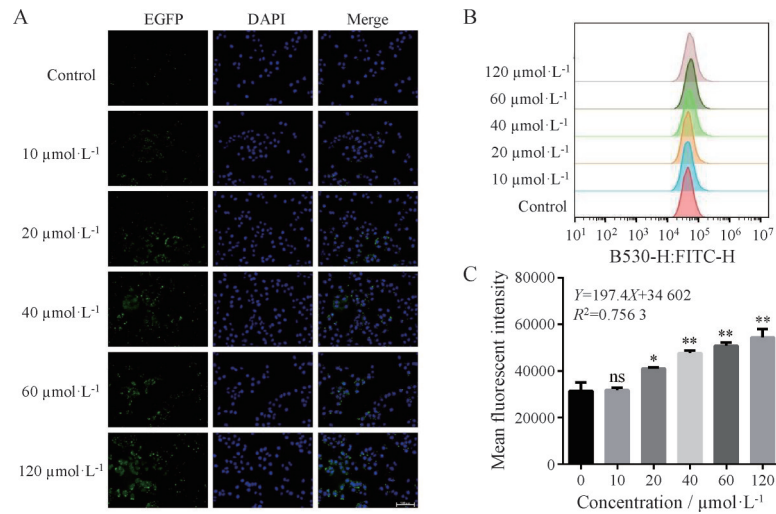
孵育后, 在荧光显微镜下进行观察。由图 2A 可以看出, TAT 可以将 EGFP 递送进入 A549 细胞, 并且随着 TAT 浓度的增加, EGFP 的荧光强度逐渐增强, 说明 TAT 递送 EGFP 进入细胞的能力与 TAT 的浓度之间存在正相关。将经过上述处理的 A549 细胞进行流式分析, 图 2B 结果显示, 随着 TAT 浓度的增加, 细胞的平均荧光强度有明显增强, 对该结果进行统计分析后可获得图 2C。然后对图 2C 的平均荧光强度结果进行线性拟合, 可得  $Y = 197.4 X + 34\ 602$ , 斜率 *k* 值为 197.4,  $R^2 = 0.756\ 3$ 。结合荧光显微观察和流式分析的结果发现, TAT 具有将 EGFP 递送进入 A549 细胞的能力, 并且随着 TAT 浓度的增强, 其递送的效果也明显增强。

### 2 TAT-EGFP 融合蛋白质的表达与纯化

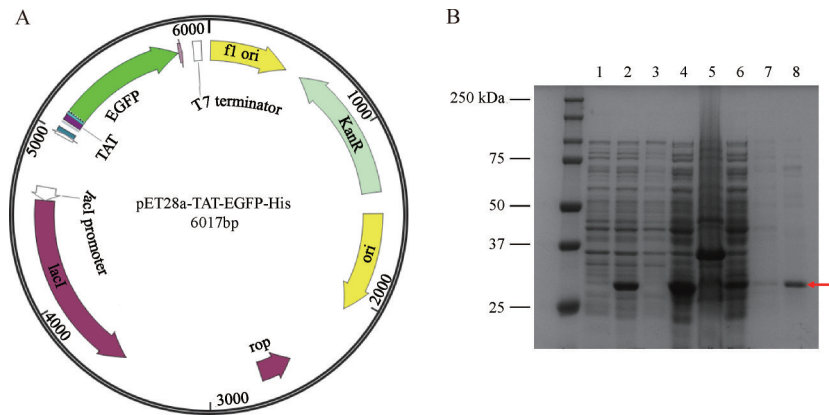
本文构建了能够表达融合蛋白 TAT-EGFP 的质粒 pET28a-TAT-EGFP-His, 质粒图谱如图 3A 所示, 每个 EGFP 分子上融合有 1 个 TAT 分子。利用 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析 TAT-EGFP 的表达和纯化。如图 3B 中箭头所示, 与 IPTG 未诱导的表达菌株 (泳道 1 和 3) 相比, IPTG 诱导后, TAT-EGFP 表达菌株裂解液样品中出现分子量大于 25 kDa 的蛋白质条带 (泳道 2 和 4), 其分子量与 TAT-EGFP 融合蛋白的理论分子量 30 kDa 相符合。如泳道 4 和 5 所示, TAT-EGFP 出现在裂解液上清中, 而不存在于沉淀中, 因此, 重组 TAT-EGFP 主要以可溶形式表达。以 50 mmol·L<sup>-1</sup> 咪唑溶液为洗脱液, 利用 Ni-NTA 介质纯化获得如泳道 8 所示的 TAT-EGFP。SDS-PAGE 电泳的灰度定量分析显示, 融合蛋白 TAT-EGFP 的纯度高于 87%。

### 3 TAT-EGFP 融合蛋白质的穿膜能力

以 40 μmol·L<sup>-1</sup> EGFP 处理的 A549 细胞为对照, 采用不同浓度 (10、20、40、60 和 120 μmol·L<sup>-1</sup>) 的 TAT-EGFP 处理 A549 细胞, 然后进行倒置荧光显微镜观察。由图 4A 可以看出, 与对照组相比, 随着 TAT-EGFP 浓度的增高, 能够发出绿色荧光的阳性细胞比例增加。对同样经过 TAT-EGFP 处理的 A549 细胞进行流式分析, 由图 4B 可以看出, 与对照组相比, 经 TAT-EGFP 处理过的细胞的荧光峰发生明显的偏移。对图 4B 的结果进行统计分析后获得图 4C, 可以看出随着 TAT-EGFP 浓度的增加, 细胞的平均荧光强度逐渐增强。对于平均荧光强度结果进行线性拟合, 得到方程  $Y = 2\ 734 X + 32\ 443$ , 其中斜率 *k* 值为 2 734, 反映了 TAT-EGFP 的穿膜能力随其浓度变化的趋势;  $R^2 = 0.952\ 9$ , 代表两组数据间的线性相关度。此方程的 *k* 值明显高于图 2C 中的 *k* 值 (表 1), 说明其递送能力对于 TAT 浓度的敏感性高于 TAT+EGFP 组。荧光显微观察和流式分析结果均表明 TAT-EGFP 具有较强的穿膜能力, 并



**Figure 2** The transmembrane delivery of EGFP into A549 cells by TAT. A: A549 cells were observed under fluorescence microscopy after incubation with  $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  EGFP and TAT at different concentrations. Scale bar:  $500 \mu\text{m}$ ; B: Flow cytometry analysis of EGFP-positive A549 cells after they were incubated with  $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  EGFP and different concentrations of TAT; C: The mean fluorescence intensity of EGFP-positive A549 cells were obtained based on the flow cytometry analysis in B.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs control group ( $0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ). ns:  $P > 0.05$



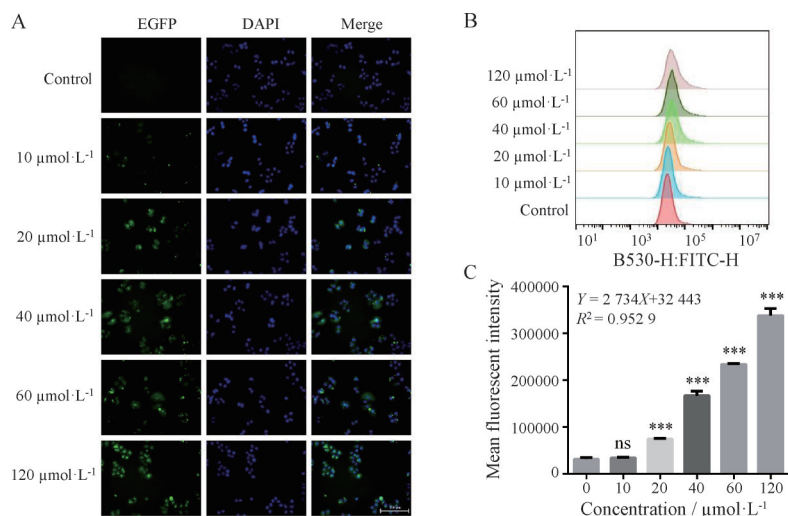
**Figure 3** Expression and purification of fusion protein TAT-EGFP. A: pET28a-TAT-EGFP-His plasmid map. TAT-EGFP with a His tag at its N-terminal can be overexpressed by in *E. coli* containing pET28a-TAT-EGFP-His; B: The purification of TAT-EGFP protein using Ni-NTA. Lane 1 and 2: The lysate of *E. coli* overexpressing TAT-EGFP before and after IPTG induction; Lane 3: The lysate of *E. coli* containing pET28a after IPTG induction was used as a control; Lane 4 and 5: The supernatant and pellet fractions of *E. coli* lysate when TAT-EGFP was overexpressed; After the supernatant of *E. coli* lysate was loaded on Ni-NTA column, we collected the flow-through sample, washed the column with binding buffer and eluted TAT-EGFP with  $50 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  imidazole. Lanes 6–8: Flow-through sample, flow-through binding buffer, and eluted TAT-EGFP sample. IPTG: Isopropyl-beta-*D*-thiogalactopyranoside

且随着其浓度的增加, 穿膜能力明显增强。

#### 4 比较 TAT 不同递送形式的递送效果

由前面的结果可知, 融合蛋白形式的 TAT-EGFP 具有良好的穿膜能力以及独立的 TAT 可以将 EGFP 递送进入 A549 细胞内。首先本文利用 CCK8 法测定 TAT 和 TAT-EGFP 对于 A549 细胞的毒性, 结果可知, TAT-EGFP 的  $\text{IC}_{50}$  值为  $487.8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , TAT 的  $\text{IC}_{50}$  值为  $519.3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; 开展递送实验时使用的 TAT-EGFP 或 (TAT+EGFP) 的浓度仅为两者  $\text{IC}_{50}$  剂量的  $1/12 \sim 1/13$ ,

因此不会对细胞造成毒性影响。本文比较了这两种形式的递送效果。以  $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  EGFP 处理的 A549 细胞为对照, 第一组 (TAT+EGFP) 用  $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  TAT 和  $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  EGFP, 第二组用  $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  TAT-EGFP 处理 A549 细胞, 2 h 后进行流式分析。由图 5A 可以看出, TAT-EGFP 的荧光强度显著高于 TAT+EGFP 组, TAT-EGFP 的平均荧光强度相较于对照组增加了  $(413.8 \pm 29.9)\%$ , 而 TAT+EGFP 的平均荧光强度相较于对照组增加了  $(46.7 \pm 3.5)\%$ 。从图 5B 中能够发出



**Figure 4** The transmembrane ability of TAT-EGFP fusion proteins. A: A549 cells were observed under fluorescence microscopy after incubation with TAT-EGFP at different concentrations. Scale bar: 200 μm; B: Flow cytometry analysis of TAT-EGFP A549 cells after they were incubated with different concentrations of TAT-EGFP; C: The mean fluorescence intensity of EGFP-positive A549 cells were obtained based on the flow cytometry analysis in B.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \*\*\* $P < 0.001$  vs control group

**Table 1** The  $k$  values of two delivery manners

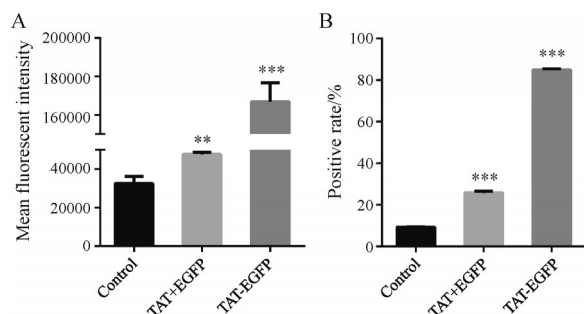
Delivery manner	$k$	$b$
Fusion (TAT-EGFP)	2 734	32 443
Non-fusion (TAT+EGFP)	197.4	34 602

绿色荧光的阳性细胞的比例来看,对照组的阳性细胞比例为  $(9.3 \pm 0.2)\%$ , TAT+EGFP 组的阳性细胞比例为  $(25.7 \pm 0.9)\%$ , TAT-EGFP 组的阳性细胞比例为  $(84.9 \pm 0.5)\%$ , TAT+EGFP 组的阳性细胞比例相较于对照组增加了  $(176 \pm 9.4)\%$ , TAT-EGFP 的阳性细胞比例相较于对照组增加了  $(812 \pm 5.5)\%$ 。由平均荧光强度和阳性细胞比例的比较可以看出, TAT-EGFP 递送 EGFP 进入 A549 细胞的能力要明显优于 TAT+EGFP 形式。

### 讨论

生物屏障是保护机体不受外界微生物等损害的关键部位,但是部分给药策略无法递送药物穿透这些生物屏障,如皮肤屏障和血脑屏障<sup>[11]</sup>等,导致药物无法到达靶标部位,从而影响治疗效果。细胞穿膜肽的出现提供了一种全新的给药策略。自发现以来,细胞穿膜肽在药物递送方面的应用极为广泛<sup>[12-14]</sup>。作为第一个被发现的细胞穿膜肽, TAT 一直以来得到了广泛研究。近年来,与 TAT 相关的文献发表量也在逐年增加,说明其一直以来都是具有研究和应用潜力的穿膜肽。

TAT 与被递送分子的连接形式分为两种,一种为共价连接,如穿膜肽-蛋白质/肽融合分子的形式,另一种为非共价连接,如非融合形式。其中,采用非共价结合递送分子的报道较少。而本文报道了将穿膜肽 TAT



**Figure 5** The comparison of TAT+EGFP group and TAT-EGFP group by flow cytometry analysis. A: The mean fluorescence intensities of EGFP-positive A549 cells in control, TAT+EGFP group and TAT-EGFP group were obtained from flow cytometry analysis. The growth rates of mean fluorescence intensity for TAT+EGFP group and TAT-EGFP group were listed after compared with control; B: Percentages of EGFP-positive A549 cells in control, TAT+EGFP group and TAT-EGFP group were compared. The growth rates of positive percentages for TAT+EGFP group and TAT-EGFP group were listed after compared with control.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs control group

和 EGFP 以非融合形式进行递送的形式。结果表明,在本文的实验条件下, TAT 在非融合形式下可以成功地将 EGFP 递送进入 A549 细胞内,并且递送效果与 TAT 的浓度呈现正相关性。目前已报道的关于 TAT 以非共价形式成功递送蛋白质的文献只有两篇,第一篇论文<sup>[15]</sup>中作者将 TAT 与钙调蛋白 (calmodulin, CaM) 融合形成 TAT-CaM 复合物,将其与不同的蛋白以非共价的形式结合,实现了肌红蛋白、 $\beta$ -半乳糖苷酶和辣根过氧化物酶的胞内递送;另一篇论文<sup>[16]</sup>作者利用生物

素化的 TAT 与亲和素进行非共价连接, 将其递送到 RBL-2H3 细胞内部。上述的两篇研究报道中 TAT 均需要在被修饰的条件下才能够将不同分子量的蛋白质递送到细胞中, 而本文在未对 TAT 进行任何修饰的情况下, 便实现了 EGFP 的跨膜递送。

虽然有大量的文献报道过 TAT 具有递送不同分子的能力, 并且一般会通过共价结合或非共价结合的形式递送分子, 但是目前的文献都是利用单一的递送形式开展研究, 缺乏对不同的递送形式的比较, 因此本文在同一个研究体系中, 比较了两种不同结合形式对于 TAT 递送蛋白质能力的影响。

本研究探究了 TAT+EGFP 联用形式下的穿膜效果, 并且将其与 TAT-EGFP 的效果进行对比, 结果发现在相同浓度下, TAT-EGFP 的递送效果要优于 TAT+EGFP。对 TAT-EGFP 组的线性拟合方程  $Y = 2\ 734 X + 32\ 443$  和 TAT+EGFP 组的线性拟合方程  $Y = 197.4 X + 34\ 602$  进行比较, 可以发现, 在相同浓度范围内, 两者的截距值相近, 说明两组实验中的背景值相似, 这为进一步的比较奠定了科学基础。TAT-EGFP 组的斜率  $k$  值明显高于 TAT+EGFP 组, 说明 TAT-EGFP 组的递送效果随着浓度变化的趋势更加显著, 即两种形式的浓度效应不同, TAT-EGFP 组的递送效率对于蛋白浓度更加敏感。

融合表达的优势在于递送效率高, 因此其应用广泛, 通常采用共价键将穿膜肽与被递送分子连接成为一个分子的形式进行递送。Cattelan 等<sup>[17]</sup> 研究证明, 低黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶融合蛋白 TAT-HPRT 可以直接穿膜进入到 HPRT 缺陷的细胞中, 显著提高细胞活性。TAT 和肉毒毒素重链融合蛋白 TAT-EGFP-HCS 能够通过血脑屏障特异性递送至中枢神经系统<sup>[18]</sup>。但是, 共价结合形式的最大劣势在于连接过程复杂, 针对不同类型的药物, 如蛋白质、核酸和小分子化合物等, 有不同的连接方法; 对于蛋白质而言, 一般采用融合蛋白的形式来进行递送, 如通过构建 TAT 与 RNA 结合蛋白 (HuR) 的融合蛋白来通过竞争性阻断 HuR 与其伴侣的相互作用来抑制促炎基因表达<sup>[19]</sup>。对于核酸分子, 一般会通过共价偶联的手段进行连接, 如 Brodyagin 等<sup>[20]</sup> 将不同的穿膜肽与 PNA 偶联, 发现与 TAT 偶联的 PNA 可以在 MCF-7 细胞中被吸收。针对小分子药物, 一般通过化学修饰等手段进行连接并递送, TAT 修饰的固体脂质纳米颗粒能够结合紫杉醇 (PTX) 和顺铂, 进而抑制宫颈癌肿瘤生长<sup>[21]</sup>。由此可见, 共价结合的形式虽然应用广泛, 但是针对不同分子需要不同的手段进行共价连接, 连接反应因目标分子而异, 应用时比较繁琐。

虽然非融合形式的递送效率不如融合形式, 但是非融合形式的简便性也是融合形式无法比拟的。非融合形式下, 不需要额外构建表达质粒或者进行化学偶联, 就可以将分子顺利递送进入细胞内。此外, 虽然目前采用非共价连接的形式进行药物递送的报道比较少, 但是该形式在递送分子的广泛性上也不亚于共价结合的形式。研究表明, 人乳头瘤病毒 HPV 的癌蛋白 E7 与 Pep-1 的复合物通过非共价结合形成稳定的纳米颗粒, 并以 293:1 的摩尔比 (E7:Pep-7) 有效地转染在 HEK-1T 细胞系中<sup>[22]</sup>。细胞穿膜肽 MPG 可以通过非共价结合将 DNA 分子转移到细胞系中<sup>[23]</sup>。研究人员发现在弱酸性环境下, 细胞穿膜肽 LH<sub>2</sub> 和 PTX 可以形成非共价复合物 (PTX-LH<sub>2</sub>), 其在三阴性乳腺癌移植小鼠模型中显示出强烈的抗肿瘤作用<sup>[24]</sup>。从以往研究可以看出, 通过非共价结合的形式, 细胞穿膜肽也可以顺利地将蛋白质、核酸和小分子化合物等递送进入细胞, 与共价结合相比仍具有应用的广泛性并且操作更加便捷。

TAT 的跨膜机制一直以来都是人们在讨论的问题。2004 年, Wadia 等<sup>[25]</sup> 通过实验发现 TAT 跨膜转导的形式可能为内吞作用。而 2006 年, Tunnemann 等<sup>[26]</sup> 发现 TAT 融合蛋白进入细胞的形式受到被递送分子尺寸等因素影响, 既存在内吞作用也存在直接内化的形式。其中内吞作用包括吞噬作用和胞吞作用。Yamano 等<sup>[27]</sup> 发现使用内吞作用抑制剂可以显著抑制 TAT 进入细胞。此外, TAT 的跨膜机制也可能和被递送分子的带电性质、TAT 的浓度、温度和细胞类型等因素相关<sup>[28]</sup>。本研究中两种不同联用形式也可能是通过不同的机制进行跨膜递送的, 从而表现出不同的效率, 但是具体机制仍需进一步的探索。

近年来, 对于穿膜肽的报道越来越多, TAT 也被广泛应用于各个领域, 包括治疗肿瘤、神经退行性疾病和眼部疾病等。其中, TAT 与被递送分子之间的连接形式也各有不同, 包括融合蛋白表达、非共价连接等。本文证明 TAT 可以采用非融合表达的形式进行 EGFP 的跨膜递送, 并证明其递送能力与 TAT 的浓度存在正相关性。同时, 本文还对融合和非融合表达形式进行了比较, 发现融合表达的递送效率高于非融合表达, 但是非融合表达的便捷性明显优于融合表达。TAT 的非融合表达形式的便捷性和通用性使得其可以成为一种可考虑的新型药物递送策略。

**作者贡献:** 窦佳参与实验研究、论文撰写及论文修改; 华子春和吉丽娜是本文的通讯作者, 负责实验设计及把关, 提供本文思路, 参与稿件修改等工作。

**利益冲突:** 本文不存在任何利益冲突。

## References

- [1] Munyendo WL, Lv H, Benza-Ingoula H, et al. Cell penetrating peptides in the delivery of biopharmaceuticals [J]. *Biomolecules*, 2012, 2: 187-202.
- [2] Frankel AD, Pabo CO. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus [J]. *Cell*, 1988, 55: 1189-1193.
- [3] Derossi D, Joliot AH, Chassaing G, et al. The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes [J]. *J Biol Chem*, 1994, 269: 10444-10450.
- [4] Futaki S, Suzuki T, Ohashi W, et al. Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276: 5836-5840.
- [5] Sun Y, Sun Y, Zhao R, et al. Intracellular delivery of messenger RNA by recombinant PP7 virus-like particles carrying low molecular weight protamine [J]. *BMC Biotechnol*, 2016, 16: 46.
- [6] Shan S, Jia S, Lawson T, et al. The use of TAT peptide-functionalized graphene as a highly nuclear-targeting carrier system for suppression of choroidal melanoma [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20: 4454.
- [7] Zhu Y, Bu Q, Liu X, et al. Neuroprotective effect of TAT-14-3-3epsilon fusion protein against cerebral ischemia/reperfusion injury in rats [J]. *PLoS One*, 2014, 9: e93334.
- [8] Wang G, Jia T, Xu X, et al. Novel miR-122 delivery system based on MS2 virus like particle surface displaying cell-penetrating peptide TAT for hepatocellular carcinoma [J]. *Oncotarget*, 2016, 7: 59402-59416.
- [9] Wu B, Li M, Li K, et al. Cell penetrating peptide TAT-functionalized liposomes for efficient ophthalmic delivery of flurbiprofen: penetration and its underlying mechanism, retention, anti-inflammation and biocompatibility [J]. *Int J Pharm*, 2021, 598: 120405.
- [10] Song J, Zhang Y, Zhang W, et al. Cell penetrating peptide TAT can kill cancer cells *via* membrane disruption after attachment of camptothecin [J]. *Peptides*, 2015, 63: 143-149.
- [11] Li Q, Du LN. Research progress of focused ultrasound combined with microbubbles to open blood-brain barrier for brain-targeted delivery [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2021, 56: 761-770.
- [12] Duan Z, Chen C, Qin J, et al. Cell-penetrating peptide conjugates to enhance the antitumor effect of paclitaxel on drug-resistant lung cancer [J]. *Drug Deliv*, 2017, 24: 752-764.
- [13] Mao L, Wang K, Zhang P, et al. Carbonyl reductase 1 attenuates ischemic brain injury by reducing oxidative stress and neuroinflammation [J]. *Transl Stroke Res*, 2021, 12: 711-724.
- [14] Rohira H, Shankar S, Yadav S, et al. Enhanced *in vivo* antifungal activity of novel cell penetrating peptide natamycin conjugate for efficient fungal keratitis management [J]. *Int J Pharm*, 2021, 600: 120484.
- [15] Salerno JC, Ngwa VM, Nowak SJ, et al. Novel cell-penetrating peptide-adaptors effect intracellular delivery and endosomal escape of protein cargos [J]. *J Cell Sci*, 2016, 129: 2473-2474.
- [16] Howl J, Jones S. Cell penetrating peptide-mediated transport enables the regulated secretion of accumulated cargoes from mast cells [J]. *J Control Release*, 2015, 202: 108-117.
- [17] Cattelan P, Dolcetta D, Hladnik U, et al. HIV-1 TAT-mediated protein transduction of human HPRT into deficient cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 441: 114-119.
- [18] Hao F, Feng Y, Guan Y. A novel botulinum toxin TAT-EGFP-HCS fusion protein capable of specific delivery through the blood-brain barrier to the central nervous system [J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2019, 18: 37-43.
- [19] Wang K, Tong H, Gao Y, et al. Cell-penetrating peptide TAT-HuR-HNS3 suppresses proinflammatory gene expression *via* competitively blocking interaction of HuR with its partners [J]. *J Immunol*, 2022, 208: 2376-2389.
- [20] Brodyagin N, Kataoka Y, Kumpina I, et al. Cellular uptake of 2-aminopyridine-modified peptide nucleic acids conjugated with cell-penetrating peptides [J]. *Biopolymers*, 2022, 113: e23484.
- [21] Liu B, Han L, Liu J, et al. Co-delivery of paclitaxel and TOS-cisplatin *via* TAT-targeted solid lipid nanoparticles with synergistic antitumor activity against cervical cancer [J]. *Int J Nanomed*, 2017, 12: 955-968.
- [22] Mardani G, Bolhassani A, Agi E, et al. Protein vaccination with HPV16 E7/Pep-I nanoparticles elicits a protective T-helper cell-mediated immune response [J]. *IUBMB Life*, 2016, 68: 459-467.
- [23] Saleh T, Bolhassani A, Shojaosadati SA, et al. MPG-based nanoparticle: an efficient delivery system for enhancing the potency of DNA vaccine expressing HPV16E7 [J]. *Vaccine*, 2015, 33: 3164-3170.
- [24] Nam SH, Jang J, Cheon DH, et al. pH-activatable cell penetrating peptide dimers for potent delivery of anticancer drug to triple-negative breast cancer [J]. *J Control Release*, 2021, 330: 898-906.
- [25] Wadia JS, Stan RV, Dowdy SF. Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis [J]. *Nat Med*, 2004, 10: 310-315.
- [26] Tunnemann G, Martin RM, Haupt S, 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.
- [27] Yamano S, Dai J, Yuvienco C, et al. Modified Tat peptide with cationic lipids enhances gene transfection efficiency *via* temperature-dependent and caveolae-mediated endocytosis [J]. *J Control Release*, 2011, 152: 278-285.
- [28] Zou L, Peng Q, Wang P, et al. Progress in research and application of HIV-1 TAT-derived cell-penetrating peptide [J]. *J Membr Biol*, 2017, 250: 115-122.