

TatPTD 介导 HBV 靶向核糖核酸酶进入肝细胞的研究

丁劲, 刘军, 薛采芳, 李英辉, 赵亚, 陈俊, 黄豫晓, 刘忠湘

丁劲, 刘军, 薛采芳, 李英辉, 赵亚, 陈俊, 黄豫晓, 刘忠湘, 中国人民解放军第四军医大学病原生物学教研室 陕西省西安市 710032
丁劲, 男, 1976-11-3 生, 内蒙古呼和浩特人, 汉族, 博士生, 主要从事乙型肝炎的治疗研究。

国家自然科学基金资助课题, No. 30100157
全军医药卫生科研基金资助课题, No. 01MA184
第四军医大学创新工程资助课题, No. CX99005

通讯作者: 刘军, 710032, 陕西省西安市长乐西路 169 号, 中国人民解放军第四军医大学病原生物学教研室. etiology@fmmu.edu.cn
电话: 029-83374536 传真: 029-83374594
收稿日期: 2004-09-22 接受日期: 2004-10-20

TatPTD can introduce HBV targeted ribonuclease into hepatocytes

Jin Ding, Jun Liu, Cai-Fang Xue, Ying-Hui Li, Ya Zhao, Jun Chen, Yu-Xiao Huang, Zhong-Xiang Liu

Jin Ding, Jun Liu, Cai-Fang Xue, Ying-Hui Li, Ya Zhao, Jun Chen, Yu-Xiao Huang, Zhong-Xiang Liu, Department of Etiology, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China
Supported by National Natural Science Foundation of China No. 30100157, Medical Research Fund of Chinese PLA No.01MA184 and Innovation Project of the Fourth Military Medical University, No. CX99005

Correspondence to: Jun Liu, Department of Etiology, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China. etiology@fmmu.edu.cn

Received: 2004-09-22 Accepted: 2004-10-20

Abstract

AIM: To introduce hepatitis B virus (HBV) targeted ribonuclease into hepatocytes by using human immunodeficiency virus Tat protein transduction domain (HIV-TatPTD).

METHODS: The gene encoding HBV targeted ribonuclease was cloned into prokaryotic expression vector pTAT-HA. Recombinant plasmid was transduced into *E. coli* BL21 (DE3) LysS, and then induced with IPTG. The expression of the fusion protein was analyzed by SDS-PAGE. Tat-TR fusion protein was purified and added to the HepG2 cell culture. The transduction efficiency was evaluated by IFA. MTT assay was performed to investigate the cytotoxicity of Tat-TR. Tat-TR was added into the cultured HepG2.2.15 cells, and the HBV DNA concentration was measured using quantitative PCR. Immunohistochemical staining was performed to identify whether TatPTD could introduce TR into the hepatocytes *in vivo*.

RESULTS: Tat-TR fusion protein was successfully expressed and purified. IFA visualization showed that Tat-TR

was introduced into hepatocytes. MTT assay suggested that Tat-TR did not affect the cell growth and had no cytotoxicity. Quantitative PCR result indicated that Tat-TR inhibited the replication of HBV. Immunohistochemical staining result showed that TatPTD delivered TR into hepatocytes *in vivo*.

CONCLUSION: The Tat-TR fusion protein may be valuable for the therapy of HBV infection.

Key Words: HIV-TatPTD; Hepatocytes; Ribonuclease

Ding J, Liu J, Xue CF, Li YH, Zhao Y, Chen J, Huang YX, Liu ZX. TatPTD can introduce HBV targeted ribonuclease into hepatocytes. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(8):958-962

摘要

目的: 利用 HIV-Tat 蛋白转导域 (protein transduction domain, PTD) 高效的跨膜转导特性, 探索将乙肝病毒靶向核糖核酸酶 (targeted ribonuclease, TR) 导入肝细胞的新途径。

方法: 将 TR 基因克隆入含 TatPTD 的 pTAT 原核表达载体, 在大肠杆菌 BL21(DE3)LysS 内诱导融合蛋白表达并进行纯化。将纯化的 Tat-TR 加入培养的 HepG2 细胞, 间接免疫荧光法检测其导入 HepG2 细胞的效率, MTT 法检测其对细胞生长代谢的影响。将 Tat-TR 加入培养的 HepG2.2.15 细胞, 定量 PCR 法检测 HBV DNA 水平并以 SPSS 软件进行统计分析。将 Tat-TR 经尾静脉注入小鼠体内 2 h 后, 对小鼠肝组织进行免疫组化染色, 检测 TatPTD 能否在体内介导 TR 进入肝细胞。

结果: 成功地制备了 Tat-TR 融合蛋白, 其纯度为 90%。间接免疫荧光及 MTT 的检测结果显示 Tat-TR 可以跨膜导入 HepG2 细胞且对细胞生长没有影响。SPSS 统计分析显示 Tat-TR 可以抑制 HBV 的复制。免疫组化染色结果显示, TatPTD 在体内也可以介导 TR 进入肝细胞。

结论: Tat-HBV 靶向核糖核酸酶的制备及活性鉴定, 为应用靶向核糖核酸酶治疗乙肝病毒感染的研究奠定了良好的基础。

关键词: HIV-Tat 蛋白转导域; 肝细胞; 核糖核酸酶

丁劲, 刘军, 薛采芳, 李英辉, 赵亚, 陈俊, 黄豫晓, 刘忠湘. TatPTD 介导 HBV 靶向核糖核酸酶进入肝细胞的研究. *世界华人消化杂志* 2005;13(8):958-962
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/958.asp>

0 引言

乙型肝炎是危害人类健康的重要疾病, 治疗乙型肝炎的研究也一直是医学领域的热点问题^[1-3]. 由于 HBV 的复制过程类似于逆转录病毒, 我室依据核衣壳导向的病毒灭活(capsid-targeted viral inactivation, CATI)原理^[4], 构建了 HBV 靶向核糖核酸酶融合基因^[5], 靶向分子 HBV 核心蛋白是 HBV 包装过程中必需的成分, 效应分子人嗜酸性粒细胞来源的神经毒素是一种人源性的核糖核酸酶. 在 HBV 复制的过程中, 理论上 HBVc 可与之融合的 hEDN 引入核心区, hEDN 则可在核心区内与 HBV 的前基因组 RNA (pgRNA) 相结合并对其酶解. 在体外研究中, 我们利用 TR 基因的真核表达载体转染 HepG2. 2. 15 细胞, 结果显示 TR 的确可以抑制 HBV 的复制^[6]. 但是转染的方法存在着效率低下、效果不稳定和难以体内应用的缺点, 这也极大地阻碍了靶向核糖核酸酶作用的发挥. 近年来蛋白质传导结构域 (PTD) 的发现和功能研究为解决这一问题带来了曙光. PTD 是一类在蛋白转导过程中, 能高效穿过生物膜的结构域, 当其与蛋白质、多肽或 DNA 等分子共价连接时, 可将这些分子高效地转移到细胞内^[7]. 迄今发现的高效 PTD 有 HIV 的 Tat^[8], HSV 的 VP22^[9], 以及果蝇的 ANTP^[10], 其中 Tat 蛋白是研究较为深入的一种^[11-12]. 实验证明, 纯化的 Tat 融合蛋白无需复性即可导入小鼠体内的几乎所有细胞和组织中, 甚至还可以穿过血脑屏障^[13]. Tat 融合蛋白系统已被公认是一种很有前途的运载工具, 无论对于基础研究, 还是临床治疗, 都有着非常广泛的应用前景^[14]. 因此, 利用 Tat 高效的蛋白转导特性, 将与 Tat 融合的 TR 导入肝细胞可能成为治疗 HBV 感染更为有效的途径. 我们将 TR 基因克隆入含 Tat 的 pTAT 原核表达载体, 在大肠杆菌内诱导表达后, 纯化了 Tat-TR 融合蛋白并对 TatPTD 介导 HBV-TR 转入肝细胞的效率和效果进行了检测.

1 材料和方法

1.1 材料 PCR 试剂盒、限制性内切酶及连接酶为 Takara 公司产品. 核酸电泳分子量标准, 低分子量标准蛋白质和 IPTG 均为华美公司产品. 质粒小量提取试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒均购自碧云天生物技术研究. Ni-NTA-agrose 购自基因公司. PD-10 desalting columns 购自 Amersham Pharmacia 生物技术有限公司. SABC 免疫组化检测试剂盒购自博士德公司. pTAT-HA 质粒由美国 Doudy 教授惠赠. 质粒 pcDNA3. 1 (-)/TR、pUC18 及大肠杆菌 JM109、BL21 (DE3) LysS 由本室保存. HepG2. 2. 15 细胞由北京解放军 302 医院程云教授惠赠.

1.2 方法 PCR 引物由北京奥科生物技术有限公司合成. Forward: GCGCATGGCCATGGAGGAGC CGCAGTCAGAT (划线处为 *Nco* I 酶切位点). Backward: GCGCGAATTCTCAGTC TGAATCAGGCCCTT (划线处为 *EcoR* I 酶切位点). 在 50 μ L 体系中, 以 pcDNA3. 1 (-)/TR 为模板进行 PCR. 将 PCR 产物和 pTAT-HA 质粒分别用 *Nco* I 和 *EcoR* I 双酶切, 回收酶切产物, 用 T₄DNA 连接酶于 16 $^{\circ}$ C 水浴连接 16 h, 转化 JM109 感受态细胞. 以含 Amp 的固体培养基 (LB) 筛选阳性克隆, 少量提取质粒后用 *Nco* I 和 *EcoR* I 酶切鉴定. 测序由上海基康公司完成. 以 pTAT-HA/TR 原核表达载体转化大肠杆菌 BL21 (DE3) LysS, IPTG 诱导融合蛋白表达并利用融合蛋白携有的 (His)₆ 标签, 以 Ni-NTA-agrose 柱进行纯化 (具体步骤参见操作手册). 用 PD-10 Desalting columns 除去蛋白洗脱液中咪唑等小分子杂质. 纯化的 Tat-TR 融合蛋白经 SDS-PAGE 分析后, 采用凝胶扫描的方法测定蛋白样品的纯度, BCA 法测定融和蛋白的浓度. HepG2 细胞是人肝癌细胞株, 常规培养于 37 $^{\circ}$ C、50 mL/L CO₂、含 100 mL/L 胎牛血清的 DMEM 培养液中, 加入青、链霉素至终浓度均为 100 mg/L. 每 2 d 换液一次, 4 d 传代.

1.2.1 Tat-TR 跨膜转导效率的鉴定 将 HepG2 细胞以 2×10^8 /L 的密度接种于内置爬片的 24 孔培养板. 待细胞贴壁后 (24 h), 在第 1 组的 2 个复孔中加入 DMEM 20 μ L 作为阴性对照. 2-16 组 (每组 2 个复孔) 均加入 Tat-TR 融合蛋白至终浓度为 200 μ mol/L, 分别在 15 min, 30 min, 1 h, 2 h 和 4 h 时, 于冰上吸去培养液, 4 $^{\circ}$ C 的 PBS (pH 8. 0) 洗涤各孔贴壁细胞 10 min, 每孔加入含 20 g/L 多聚甲醛、1 g/L TritonX-100 的 PBS 溶液 1 mL, 置冰上 30 min. 再以 4 $^{\circ}$ C PBS 洗涤 10 min, 加入 10 g/L 的 BSA 于 42 $^{\circ}$ C 放置 10 min, 4 $^{\circ}$ C 的 PBS 洗涤 10 min, 每孔加入鼠抗 His 抗体 (1:1 000) 1 mL, 42 $^{\circ}$ C 放置 30 min 后, 4 $^{\circ}$ C PBS 洗涤 15 min, 加入 FITC 标记的兔抗鼠 IgG (1:1 000), 42 $^{\circ}$ C 孵育 10 min, PBS 震洗 1 h 后以 500 mL/L 的甘油封片, 荧光显微镜下观察并照相.

1.2.2 MTT 试验 将 HepG2 细胞以 2×10^8 /L 的密度接种于 96 孔培养板, 培养 24 h 后将其分成 2 组, 每组 4 个复孔. 实验组加入 Tat-TR 融合蛋白至终浓度为 200 μ mol/L, 对照组加入 DMEM, 继续培养 72 h. 相差显微镜下观察细胞形态后, 每孔加入 MTT 溶液 20 μ L (5 g/L), 继续孵育 4 h. 每孔加入 DMSO 150 μ L, 振荡 10 min, 使结晶物充分溶解. 选择 490 nm 波长, 在酶联免疫检测仪上测定各孔的吸光度. 以 SPSS 软件对结果进行统计学分析.

1.2.3 HepG2. 2. 15 细胞的培养 HepG2. 2. 15 细胞是在 HepG2 细胞的基因组中整合了完整的 HBV 基因组, 能

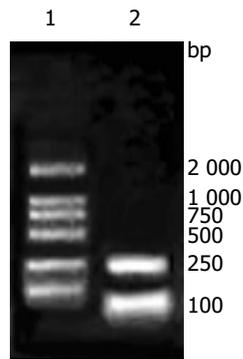


图1 pTAT/TR重组质粒的酶切鉴定. 1: pTAT/TR(*Nco* I/*Eco*R I); 2: DNA Ladder marker.

持续转录和翻译HBV基因,产生HBsAg, HBeAg和Dane颗粒. HepG2.2.15细胞在含150 mL/L胎牛血清的DMEM培养液中,于37°C, 50 mL/L CO₂条件下进行培养,加入G418至终浓度为200 mg/L.每3 d换液1次,6 d传代.

1.2.4 Tat-TR 抗病毒效果的检测 将长势良好的HepG2.2.15细胞以 2×10^8 /L的密度接种于12孔板,培养24 h换液1次.将培养细胞分为2组(每组4个复孔):实验组加入Tat-TR融合蛋白至终浓度100 nmol/L,对照组加入DMEM 20 μ L.继续培养48 h后,每孔吸出上清200 μ L,由第四军医大学临床分子生物学中心测定HBV DNA浓度.将实验组和各对照组浓度均数按 $\alpha = 0.05$ 的水平,以SPSS软件进行统计学分析.

1.2.5 肝组织切片的免疫组化染色 取4-6 wk的Balb/c小鼠,经尾静脉注射Tat-TR融合蛋白200 μ g,另取小鼠尾静脉注射生理盐水作为对照,4 h后均摘眼

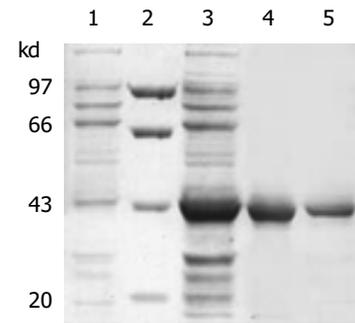


图2 Tat-TR表达纯化的SDS-PAGE分析. 1: pTAT-HA/TR质粒转化BL21未经IPTG诱导; 2: Protein marker; 3: pTAT-HA/TR质粒转化BL21经IPTG诱导产物; 4: 200 mol/L咪唑洗脱液; 5: 500 mol/L咪唑洗脱液.

球放血处死.取小鼠肝组织于100 mg/L甲醛溶液固定,制作石蜡切片(5 μ m厚).将石蜡切片脱蜡水化后,室温下以300 mL/L H₂O₂封闭内源性过氧化物酶,加入正常小鼠血清封闭非特异结合位点,再依次加入鼠抗his单抗、正常山羊血清封闭液、HRP标记的羊抗鼠IgG后,以DAB进行显色.苏木素轻度复染,脱水、透明后中性树胶封固,置显微镜下观察、摄像.

2 结果

2.1 重组质粒pTAT-HA/TR的鉴定 PCR产物的琼脂糖凝胶电泳结果如图1所示,目的片段大小约1 000 bp,与TR大小相当.将构建的pTAT-HA/TR质粒用*Nco* I和*Eco*R I双酶切鉴定,酶切产物的小片段约1 000 bp(图1).测序报告显示核苷酸序列无误,表明pTAT-HA/TR原核表达质粒构建正确.

2.2 Tat-TR融合蛋白原核表达及纯化的SDS-PAGE

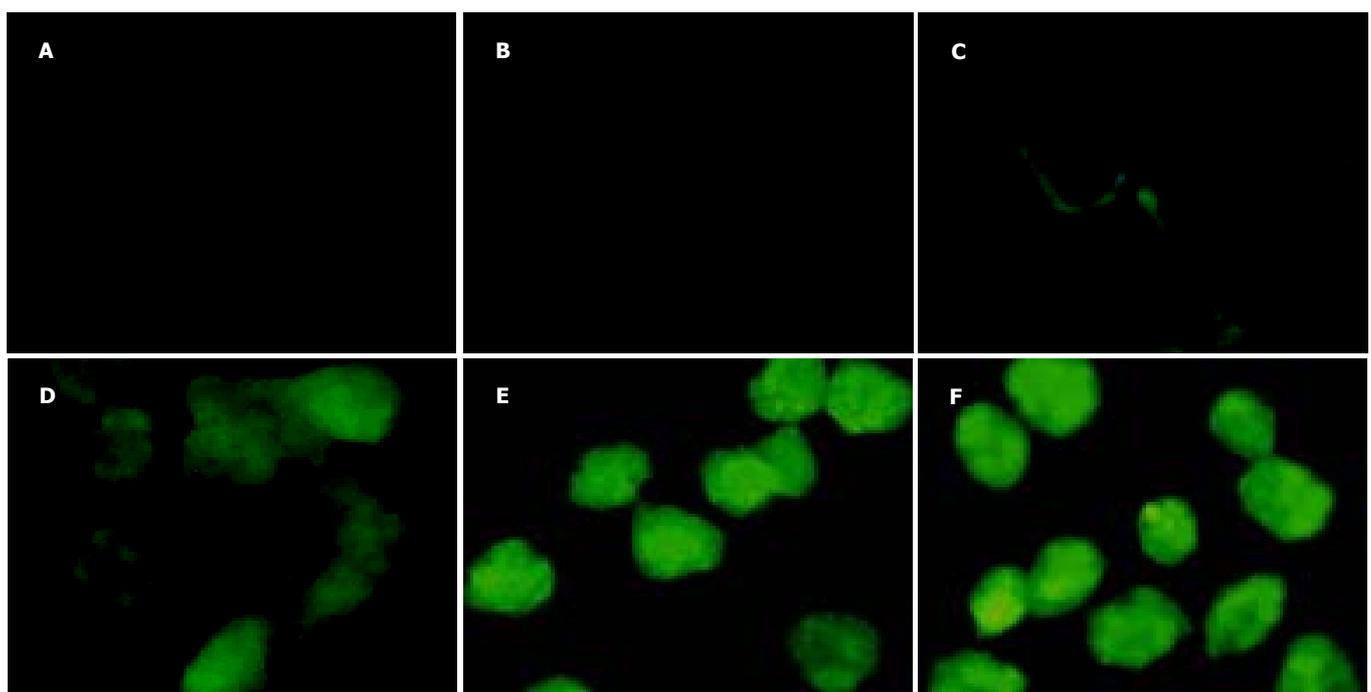


图3 Tat-TR导入HepG2细胞的鉴定. A. DMEM对照; B. 加入Tat-TR 15 min; C. 加入Tat-TR 30 min; D. 加入Tat-TR 1 h; E. 加入Tat-TR 2 h; F. 加入Tat-TR 4 h.

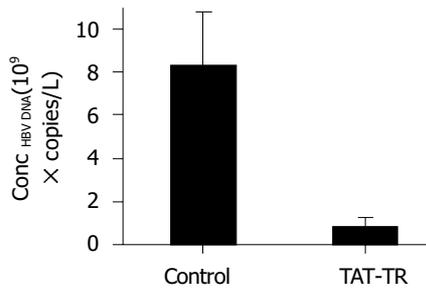


图4 Tat-TR 抑制HBV 复制.

分析 用重组原核表达载体pTAT-HA/TR转化大肠杆菌BL21 (DE3) LysS, 经 IPTG 诱导后与 pTAT-HA 转化相同菌株的表达产物相比较, 在 120 g/L 的 SDS-PAGE 图谱上出现了新的条带, M_r 43 000, 与 TR 的预计分子量大小相当(图 2). Tat-TR 融合蛋白纯化产物的 SDS-PAGE 分析显示, Tat-TR 纯化成功(图 2). 凝胶扫描测定融合蛋白的纯度为 90%. 经定量 Tat-TR 融合蛋白的浓度为 0.8 g/L.

2.3 Tat-TR 跨膜转导的鉴定 加入 Tat-TR 融合蛋白 15 min 时荧光显微镜下观察未见荧光, 30 min 时可检测到较弱荧光并主要集中在胞膜, 1 h 时胞内出现明显的荧光, 2 h 时荧光强度达峰值, 4 h 时没有增强. 而对照组均没有荧光出现, 这一结果说明 Tat PTD 可在短时间内将 TR 高效地导入 HepG2 细胞(图 3).

2.4 MTT 检测结果 加入 Tat-TR 融合蛋白 72 h 后, 倒置显微镜下观察细胞形态和生长状况发现, 各组细胞生长状况良好. MTT 比色测得 A_{490} (mean±SD, $n = 4$) 分别为 0.4875 ± 0.018 和 0.4852 ± 0.050 . SPSS 统计软件分析结果显示: 实验组与对照组之间没有显著性差异 ($P > 0.05$), 说明 Tat-TR 融合蛋白对细胞没有毒性, 也不影响细胞的生长代谢.

2.5 Tat-TR 抗病毒作用的鉴定 Tat-TR 融合蛋白加入 HepG2. 2.15 细胞 48 h 后, 检测上清中 HBV DNA 浓度(图 4). SPSS 软件进行方差分析发现, 实验组 HBV DNA 浓度均数与对照组相比有统计学差异, 并且实验组上清中 HBV DNA 浓度比对照组平均下降了 90.1%.

2.6 Tat-TR 体内转导的鉴定 为了探明 Tat PTD 在体内能否将 TR 引入肝细胞, 试验中将 Tat-TR 融合蛋白及其对照生理盐水, 分别经尾静脉注入小鼠体内, 4 h 后取肝组织制备石蜡切片. 免疫组化染色, 注射 Tat-TR 融合蛋白的小鼠, 肝组织切片免疫组化染色呈阳性(图 5), 而注射生理盐水的小鼠, 肝组织切片染色呈阴性. 这一结果说明 Tat PTD 在体内可以将 TR 引入肝细胞.

3 讨论

近些年来, 人们发现了一类蛋白质功能结构域, 他们可将与其共价连接的分子高效地导入细胞内, 故名蛋白转导域. 研究发现, 这类分子均由富含碱性氨基酸残基的短肽构成, 也称为细胞穿膜肽 (cell penetrate peptide, CPP). 目前, 蛋白转导的机制并不清楚, 推测他是一个不依赖于受体和转运蛋白的过程, 可能直接作用于脂质双层, 这一特点使得所有细胞都可成为被转导的对象. 蛋白质和药物向细胞的导入受制于本身的理化性质, 被动扩散的药物的摄入与其脂溶性直接相关, 极性 or 带电荷的分子只能被有限摄入. 通过与 PTD 的共价连接, 为化合物、蛋白质、多肽等向靶细胞的传递提供一个崭新途径. 目前已有数十种分子质量在 15–120 kD 的 Tat 融合蛋白已被成功导入细胞. 最近的一些研究结果显示, 将荧光素标记的 Tat PTD 多肽通过会阴注射入小鼠体内, 然后在共聚焦显微镜下检测, 发现荧光素可被导入所有组织中^[4]. 从一些体外转导实验结果来看, 利用蛋白转导的策略将治疗所需的化合物输入患者体内的前景良好.

为了探索应用 PTD 将 TR 引入肝细胞治疗乙型肝炎的可行性. 我们构建了 Tat-HBV 靶向核糖核酸酶融合蛋白原核表达载体, 转化大肠杆菌 BL21 (DEIII) 后以 IPTG 诱导表达, 与本室先前的研究相比, 融合蛋白的表达效率显著提高, 这可能是由于在表达载体上目的基因更接近起始密码子引起的. 利用间接免疫荧光法检测 Tat-TR 融合蛋白导入肝细胞的效率发现: 在

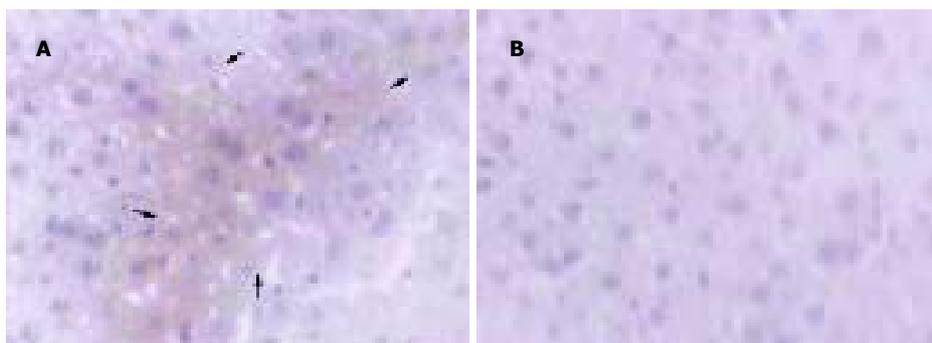


图5 Tat-TR 导入肝细胞的鉴定. A: Tat-TR 组; B: 生理盐水组.

加入 Tat-TR 融合蛋白 30 min 时细胞出现荧光, 此时荧光物质主要集中在胞膜, 这可能是由于 TatPTD 富含碱性氨基酸, 在溶液中带有较强的正电荷, 可与带负电荷的细胞脂膜结合造成的, 这时 Tat 融合蛋白还没有进入到细胞内部, 故胞质没有荧光. 到加入融合蛋白 1 h 时检测, 胞内已经有较强荧光出现, 并且细胞核也着色, 这可能是融合蛋白进入细胞后, 在较短时间内即进入到胞核造成的. 大约 2 h 胞内荧光强度达峰值, 4 h 时没有明显变化, 这就提示蛋白转导可能是以一个浓度依赖的方式进行的, 在 2 h 左右细胞内外蛋白浓度相当, 维持一个动态平衡, 故荧光强度不再变化. MTT 检测结果显示, Tat-TR 融合蛋白对细胞的生长代谢没有影响, 转导过程对靶细胞也没有损害. 与目前常规的脂质体转染相比较发现, Tat PTD 介导的蛋白转导具有明显的优势: (1) 导入细胞的效率大大提高, 融合蛋白几乎可以进入 100% 的培养细胞. (2) 转导过程迅速, 数分钟到几小时内, 就可以看到了融合蛋白进入细胞并在胞内积累. (3) 由于 Tat 融合蛋白以浓度依赖的方式进入细胞, 故每个细胞内的蛋白浓度基本相同, 所以可以相对精确的控制胞内蛋白的浓度. (4) PTD 还具有温度适应性广、携带分子多样及可导入常规方法难以转染的原代细胞等. 本研究采用乙型肝炎体外模型 HepG2. 2. 15 细胞, 进行了 Tat-TR 抗病毒效果的鉴定. 检测指标选用了能客观反映 HBV 负荷及复制情况的 HBV DNA 水平, 检测结果显示 Tat-TR 融合蛋白可以显著抑制乙肝病毒的复制, 抑制率约 90. 1%. 小鼠肝组织的免疫组化染色结果证明, TatPTD 可以在体内将 TR 导入肝细胞, 这就为我们下一步利用 HBV 靶向核糖核酸酶, 抑制乙肝病毒复制的体内试验奠定了良好的基础.

4 参考文献

- 1 Guo SP, Wang WL, Zhai YQ, Zhao YL. Expression of nuclear factor-kappa B in hepatocellular carcinoma and its relation with the X protein of hepatitis B virus. *World J Gastroenterol* 2001;7:340-344
- 2 Zhuang L, You J, Tang BZ, Ding SY, Yan KH, Peng D, Zhang YM, Zhang L. Preliminary results of Thymosin- α 1 versus interferon-alpha-treatment in patient with HBeAg negative and serum HBV DNA positive chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2001;7:407-410
- 3 Song YH, Lin JS, Liu NZ, Kong XJ, Xie N, Wang NX, Jin YX, Liang KH. Anti-HBV hairpin ribozyme-mediated cleavage of target RNA in vitro. *World J Gastroenterol* 2002;8:91-94
- 4 Natsoulis G, Boeke JD. New antiviral strategy using capsid-nuclease fusion proteins. *Nature* 1991;352:632-635
- 5 丁劲, 刘军, 薛采芳, 李英辉, 宫卫东. TAT-乙型肝炎病毒靶向核糖核酸酶融合蛋白原核载体的构建及表达. *细胞与分子免疫学杂志* 2003;19:49-51
- 6 李英辉, 刘军, 薛采芳, 丁劲, 宫卫东, 赵亚. 靶向核糖核酸酶在体外抑制乙肝病毒复制的研究. *中华微生物学与免疫学杂志* 2003;23:484-488
- 7 Schwarze SR, Dowdy SF. In vivo protein transduction: intracellular delivery of biologically active proteins, compounds and DNA. *Trends Pharmacol Sci* 2000;21:45-48
- 8 Fawell S, Seery J, Daikh Y, Moore C, Chen LL, Pepinsky B, Barsoum J. Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:664-668
- 9 Elliott G, O'Hare P. Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein. *Cell* 1997;88:223-233
- 10 Derossi D, Joliot AH, Chassaing G, Prochiantz A. The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J Biol Chem* 1994;269:10444-10450
- 11 Ezhevsky SA, Nagahara H, Vocero-Akbani AM, Gius DR, Wei MC, Dowdy SF. Hypo-phosphorylation of the retinoblastoma protein(pRb) by cyclin D:Cdk4/6 complexes results in active pRb. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:10699-10704
- 12 Vives 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 Biol Chem* 1997;272:16010-16017
- 13 Chellaiah MA, Soga N, Swanson S, McAllister S, Alvarez U, Wang D, Dowdy SF, Hruska KA. Rho-A is critical for osteoclast podosome organization, motility and bone resorption. *J Biol Chem* 2000;275:11993-12002
- 14 Schwarze SR, Ho A, Vocero-Akbani A, Dowdy SF. In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science* 1999;285:1569-1572

编辑 潘伯荣 审读 张海宁