

· 基础研究 ·

肿瘤靶向性细胞穿膜肽的固相合成及体外活性研究

何吉文¹, 李华¹, 姜楠¹, 台艳², 张琪², 杨扬¹, 陈规划¹

中山大学附属第三医院¹肝脏移植中心,²肝脏病实验室, 广东 广州 510630

摘要:目的 采用固相合成法合成以基质金属蛋白酶为靶点的肿瘤靶向性细胞穿膜肽,用5-羧基四甲基罗丹明对其进行荧光标记,并对合成的产物进行生物活性和细胞毒性评估。方法 采用N-苄氧羰基(Fmoc)作为 α -氨基酸的保护基,以逐个延伸的固相合成法合成肿瘤靶向性细胞穿膜肽,并在有耦合剂HATU和DMF的情况下,加入5-羧基四甲基罗丹明进行荧光标记,应用高效液相色谱分析仪和质谱仪测定其纯度和分子量;荧光显微镜观察穿膜肽对体外培养的肝癌细胞株SMMC-7721和正常肝脏细胞株LO2的穿膜效果,以评价穿膜肽的生物学活性;MTT比色法检测穿膜肽对SMMC-7721细胞活性的影响。**结果** 所合成的细胞穿膜肽经高效液相色谱法鉴定纯度为96.05%,经质谱鉴定相对分子量为3504.9。这种穿膜肽对正常肝脏细胞株LO2无明显穿膜作用,但对肝癌细胞株SMMC-7721有较强的穿膜作用,并且对细胞活性无明显影响。**结论** 采用Fmoc固相肽合成法成功合成细胞穿膜肽;所合成的细胞穿膜肽具有肿瘤靶向性。

关键词: 肝肿瘤;肿瘤靶向性;细胞穿膜肽;N-苄氧羰基;固相合成;基质金属蛋白酶2

中图分类号:R73-362 文献标志码:A 文章编号:1673-4254(2011)02-0201-04

Solid-phase synthesis and *in vitro* activity research of tumor-targeting cell-penetrating peptide

HE Ji-wen¹, LI Hua¹, JIANG Nan¹, TAI Yan², ZHANG Qi², YANG Yang¹, CHEN Gui-hua¹

¹Liver Transplantation Center, ²Hepatopathy Laboratory, Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China

Abstract: Objective To synthesize a tumor-targeting cell-penetrating peptide (CPP) and evaluate its biological activity and cytotoxicity *in vitro*. **Methods** With fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc) as the protective group of α -amino acid, the tumor-targeting CPP were synthesized with stepwise amino acid extension using solid-phase synthesis method. 5-carboxytetramethylrhodamine was added for fluorescence labeling in the presence of the coupling agents HATU and DMF. The purity of the CPP was measured by high-performance liquid chromatography and its molecular weight measured by mass spectrometry. Fluorescence microscope was used to assess the cell-penetrating activity of the CPP in hepatocellular carcinoma cell lines SMMC-7721 and normal hepatocellular cell lines LO2. The growth activity of CPP-treated SMMC-7721 cells was measured by MTT assay. **Results** With a purity of 96.05% and a relative molecular mass of 3504.9, the synthesized CPP showed no translocation activity in normal hepatocellular cell lines LO2, but showed strong ability to translocate into SMMC-7721 cells without affecting the biological activity of the cells. **Conclusion** Using Fmoc solid-phase synthesis method, we have successfully synthesized the CPP with tumor-targeting activity.

Key words: liver neoplasms; tumor targeting; cell-penetrating peptides; fluorenylmethyloxycarbonyl; solid-phase synthesis; matrix metalloproteinase

穿膜肽是一类能够穿透细胞膜进入细胞质甚至细胞核而不损坏细胞膜结构的小分子多肽,它的长

度一般不超过30个氨基酸。近几年的研究证实,穿膜肽能运载一系列具有不同生物学活性的物质进入活细胞内,包括蛋白、多肽、核酸和寡聚核苷酸等^[1]。发卡形穿膜肽属于新型的选择性穿膜的小肽,发卡结构区可以构建多种蛋白酶切位点,为分子靶向诊断和治疗提供了新的思路^[2]。由于几乎所有的恶性肿瘤均表达基质金属蛋白酶2(MMP-2),并且MMP-2表达与肿瘤恶性程度、血管生成、侵袭及转移密切相关,它在肿瘤细胞过表达的酶中最具特征^[3-5],

收稿日期:2010-11-18

基金项目:国家“973”项目(2009CB522404);国家自然科学基金(30772135);广东省科技计划项目(2009B030801078)

Supported by National Basic Research Program (2009CB522404) and National Natural Science Foundation of China (30772135).

作者简介:何吉文,硕士研究生,E-mail: hejiwenst@163.com

通讯作者:李华,副教授,硕士研究生导师,电话:020-85252185, E-mail: lihua100@yeah.net

因此我们选择MMP-2作为本研究合成的穿膜肽的作用靶点。本研究采用固相合成的方法合成具有MMP-2识别位点的发卡形穿膜肽并以荧光标记,并探讨其肿瘤细胞靶向性及对细胞活性的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器和设备 质谱仪 Agilent6410 (Agilent 公司,美国);高效液相色谱仪 HPLC/LC-24-AD (岛公司,日本);倒置荧光显微镜 (Laica 公司,德国);酶标仪 ELX800 (BioTeK 公司,美国)。

1.1.2 试剂和细胞 Fmoc-氨基酸、CTC树脂、二氯甲烷(DIC)、N,N-二甲基甲酰胺(DMF)、二异丙基乙胺(DIEA)、六氢吡啶、1-羟基-苯并三氮唑(HOBT)、二异丙基碳二亚胺(DIC)、三氯乙酸(TFA)、1,2-二巯基乙烷(EDT)、茚三酮均购自吉尔生化(上海)有限公司;三星DMF(三星公司,韩国);5-羧基四甲基罗丹明(Sigma公司,美国);MTT试剂盒(北京普利来公司);其余所有试剂均为分析纯。SMMC-7721细胞株和LO2细胞株由中山大学附属第三医院肝脏病实验室保存;胎牛血清FBS(Hyclone公司,美国);DMEM高糖培养液(杭州吉诺公司);细胞培养瓶及培养皿为美国Corning公司产品。

1.2 方法

1.2.1 肿瘤靶向性细胞穿膜肽的合成 取CTC树脂1 g加入6 ml无水DCM浸泡30 min,使树脂充分溶胀后抽干;称取第一个氨基酸Fmoc-Arg(pbf)-OH 0.57 g,用适量DMF溶解,加入DIEA,将该混合液混匀后加入溶胀好的树脂中,反应15 min,取少量该树脂加入六氢吡啶和DMF溶液,5 min后用乙醇洗涤,取少许样品加入茚三酮,摇晃,颜色为深色即表示连接成功;加入1 ml甲醇反应60 min,抽干液体后用DMF、DCM和三星DMF各洗涤2次,完成第一个氨基酸的链接;在树脂中加入六氢吡啶和DMF溶液反应5 min后抽去液体,再加入六氢吡啶和DMF溶液反应10 min,完成脱保护,抽干液体后用DMF、DCM和三星DMF各洗涤2次,第二个Fmoc保护的氨基酸和HOBT及DIC用DMF溶解后加入上述树脂,反应60 min,取少许样品加入茚三酮,摇晃,颜色为透明即表示连接成功;在树脂中加入六氢吡啶和DMF溶液反应5 min后抽去液体,再加入六氢吡啶和DMF溶液反应10 min,完成脱保护,抽干液体后用DMF、DCM和三星DMF各洗涤2次,加入下一个氨基酸;根据靶向性细胞穿膜肽序列C端-RKKRRRRRRR PLGLAG EEEEEEE-N端,采用相同的步骤从C端至N端选用Fmoc保护的氨基酸原料合成多肽。完成最后一个氨

基酸的连接后,加入已用DMF溶解的5-羧基四甲基罗丹明、HOBT和DIC,反应60 min,抽去液体,得到固体;先用TFA、EDT、H₂O配成溶液,将配好的溶液加入上述固体中反应,一段时间后过滤,收集滤液,加入乙醚中,离心,收集沉淀物。

1.2.2 高效液相色谱分离和质谱测定 用高效液相色谱仪 LC-24AD 进行粗肽的分离。对固相合成的多肽产物进行RP-HPLC检测,通过对色谱峰面积进行积分并计算峰面积比例确定多肽产物的纯度。多肽的检测条件为: Diamonsil C18 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),流动相A为0.1% TFA+100% H₂O, B为0.1% TFA+100% 乙腈,梯度25 min 10%~40% B, 25 min 100% B,流速1.0 ml/min,紫外吸收检测波长220 nm。对收集的主峰进行质谱测定,质谱条件为:电喷雾电离(ESI);曲形脱溶剂装置(CDL)温度250 ℃;加热模块温度200 ℃;探针电压4.5 kV;检测器电压1.5 kV;CDL电压-20 V;雾化气流速1.5 L/min;流动相流速(T.flow)0.2 ml/min,全扫描质量范围(m/z)400~1500。

1.2.3 穿膜肽体外活性检测 实验组采用人肝癌细胞株SMMC-7721细胞;对照组采用人正常肝脏细胞株LO2细胞。以HEPES缓冲液(10 mmol/L HEPES, 150 mmol/L NaCl, pH 7.4)为溶剂配制2 mg/ml的穿膜肽溶液。LO2细胞和SMMC-7721细胞均在含10% FBS、100 U/ml青霉素和100 μg/ml链霉素的DMEM培养液中于37 ℃、5% CO₂培养箱条件下培养。取对数生长期的细胞以5×10⁴/孔接种于12孔板,在37 ℃、5% CO₂培养箱中培养,待细胞长至80%~90%汇合时进行穿膜肽细胞靶向性检测,检测前吸弃培养板中的旧培养液,用PBS漂洗细胞两次,每孔加入穿膜肽浓度为100 μg/ml的DMEM(不含血清和双抗)1 ml,放入37 ℃含5% CO₂的培养箱中孵育3 h后取出细胞,每孔按1 μg/ml的量加入Hoechst,继续于37 ℃、5% CO₂培养箱中孵育15 min进行染核,吸弃含穿膜肽的培养液,用PBS漂洗细胞5次,每孔加入适量4%多聚甲醛固定细胞。使用倒置荧光显微镜观察细胞内荧光情况(5-羧基四甲基罗丹明激发波长543 nm;发射波长570 nm;Hoechst激发波长375~385 nm;发射波长420~460 nm)。

1.2.4 穿膜肽对SMMC-7721细胞生物学活性的影响

SMMC-7721细胞按5000/孔接种于96孔板中,在37 ℃、5% CO₂培养箱中培养过夜后吸弃旧培养基,PBS漂洗细胞两次,每孔加入含不同浓度穿膜肽的DMEM(不含血清和双抗),每组设5个复孔,于37 ℃含5% CO₂的培养箱中继续培养24 h。24 h后取出细胞,每孔加入10 μl MTT Stock,37 ℃含5% CO₂

的培养箱中继续培养4 h,终止培养,小心吸弃上清,每孔加入100 μ l MTT 溶解剂,37 $^{\circ}$ C培养箱内继续孵育4 h。显微镜观察紫色结晶状formazan沉积物全部溶解,在酶标仪上以490 nm波长检测个孔的吸光值(D_{490})。

1.3 统计学处理

采用SPSS13.0统计分析软件进行分析,计量资料以均数 \pm 标准差表示,多组之间比较采用单因素方差分析。检验水准: $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 高效液相色谱鉴定纯度

从合成的细胞穿膜肽的色谱分析结果(图1)可以看出,主峰面积较大,而其他峰的面积与主峰相比较小,表明合成的细胞穿膜肽杂质少,纯度高。根据HPLC色谱图中峰面积计算,纯度达到96.0542%。

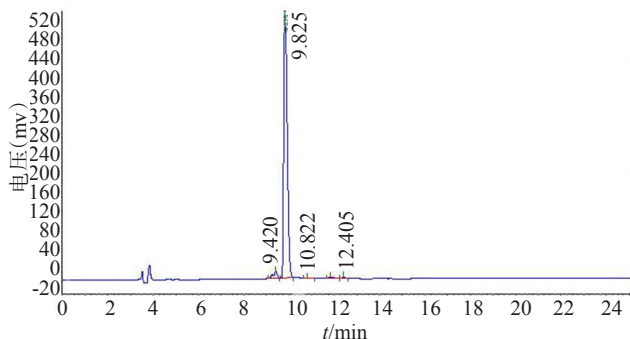


图1 细胞穿膜肽HPLC分析图

Fig.1 High-performance liquid chromatography of the cell-penetrating peptide.

2.2 质谱鉴定

Agilent6410质谱仪分析的结果显示,实际合成的穿膜肽经罗丹明标记后相对分子质量为3504.9,与理论分子质量3504.92相差无几。同时也可以看出,质谱图中主峰明显,说明本次合成的多肽经色谱仪纯化后,可以除去大部分的杂质,从而得到较纯的细胞穿膜肽。

2.3 荧光显微镜观察穿膜肽的细胞靶向性

为了评估穿膜肽的细胞靶向性,两组细胞经穿膜肽处理3 h后,倒置荧光显微镜下观察两种细胞内红色荧光的情况(图2),可观察到实验组几乎所有细胞内都有较强的红色荧光且红色荧光主要集中在细胞质中,而对照组只有极少数的细胞内可观察的较弱的红色荧光。表明本实验合成的细胞穿膜肽具有一定的SMMC-7721靶向性,穿膜肽进入细胞后主要集中在细胞质中。

2.4 穿膜肽对SMMC-7721细胞活性的影响

各种浓度的细胞穿膜肽处理SMMC-7721细胞后,各组的吸光值 D_{490} 与空白对照组比较差异均无统计学意义($P>0.05$),表明各浓度的细胞穿膜肽对细胞活性均没有明显影响,见表1。

3 讨论

细胞穿膜肽又称蛋白转导域,是一大类具有穿细胞膜功能的短肽。由于细胞膜的存在亲水性的物质不能渗透入细胞内,然而当其连接在细胞穿膜肽上时后者可促进其细胞内摄取。因此细胞穿膜肽常被用作药物载体,运载一系列具有生物学活性的物

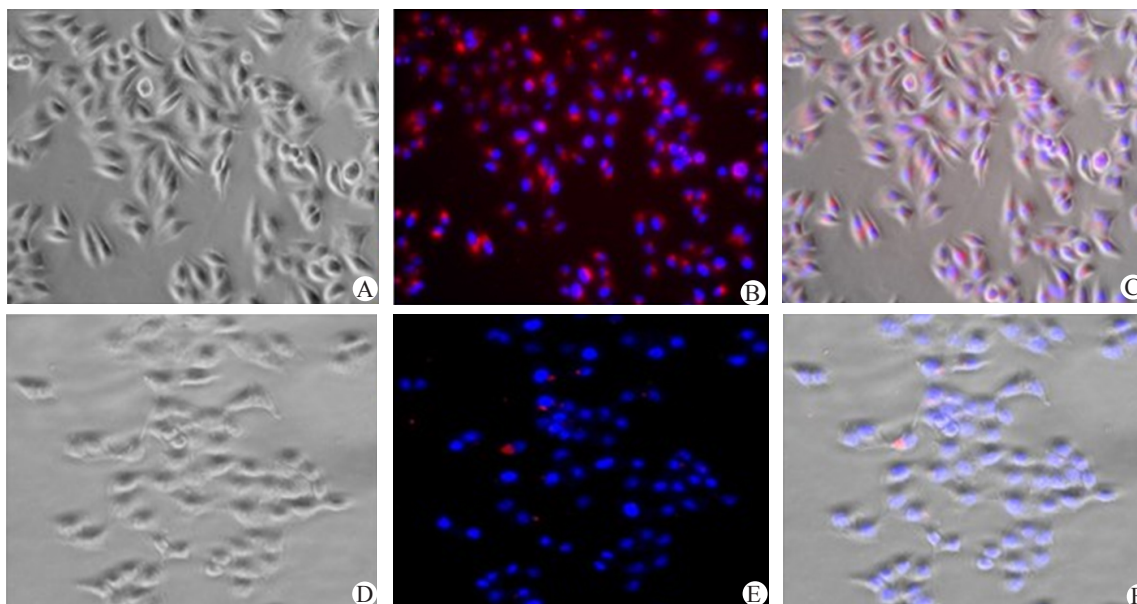


图2 荧光显微镜下观察两种细胞红色荧光情况

白色光下观察SMMC-7721细胞(A)和LO2细胞(D);荧光下观察SMMC-7721细胞(B)和LO2细胞(E);白色光下照片和荧光下照片重叠后的SMMC-7721细胞(C)和LO2细胞(F)

Fig.2 Observation of red fluorescence under fluorescence microscope (Original magnification: $\times 100$).

表1 穿膜肽对SMMC-7721细胞活性的影响

Tab.1 Effect of the cell-penetrating peptide on SMMC-7721 cell viability

穿膜肽终浓度($\mu\text{g/ml}$)	D_{490}
0(空白对照组)	0.2164 \pm 0.01882
20	0.2376 \pm 0.01324
40	0.2344 \pm 0.00422
60	0.2312 \pm 0.01621
80	0.2154 \pm 0.02936
100	0.2376 \pm 0.00456
120	0.2393 \pm 0.00252
140	0.2354 \pm 0.01511
160	0.2364 \pm 0.01201
180	0.2304 \pm 0.01429

质进入细胞内^[6-8],从而使后者在细胞内发挥相应的生物学活性。

本研究采用Fmoc固相多肽合成方法合成靶向性细胞穿膜,粗肽经过纯化和分析得到预期活性产物,合成过程中选用Fmoc-Arg(pbf)-CTC树脂为合成起点,将多肽的羧基端固定在树脂上,向其氨基端逐步递加、延长肽链,每一步反应都较易进行,合成过程中采用茚三酮检测氨基残基是否连接成功,保证每步反应都达到高产率。目标多肽的粗品经高效液相色谱及质谱分析后,纯度为96.0542%,分子量与理论值相等。由于采用固相合成的方法,氨基酸的连接顺序是固定的,证明了所合成的穿膜肽结构正确。

与以往合成的大多数的细胞穿膜肽仅是多聚阳离子不同,本研究合成的穿膜肽由三部分构成:多聚阳离子短肽RKKRRRRRRR、多聚阴离子短肽EEEEEE及在它们之间起连接作用的小短肽PLGLAG,因为多聚阳离子和多聚阴离子之间的正负电荷相吸而形成稳定的分子内发夹结构。同时,将连接肽的序列设计成PLGLAG,它是MMP-2特异性蛋白水解识别片段^[2],水解断裂点在G和L之间。因此,当合成的多肽遇到蛋白水解酶后,后者可以水解切断小连接短肽从而使多聚阳离子短肽被释放出来并游离于细胞外,它便携带着待穿膜物共同附着于细胞膜上并进入细胞内。基于以上所述原理,我们实现了所合成的细胞穿膜肽的肿瘤靶向性,并经过体外培养的肝癌细胞株SMMC-7721和正常肝脏细胞株LO2证实所合成的多肽具有较好的肿瘤细胞靶向性和穿膜性。我们之所以选用肿瘤细胞外基质金属蛋白酶作为所合成的细胞穿膜肽的靶点,是由于它不像其他功能不明的肿瘤抗原,肿瘤细胞外的基

质金属蛋白酶在肿瘤的病理过程中起着重要作用^[9],特别在血管生成和肿瘤转移方面。此外选用蛋白酶作为靶点还因为其对穿膜肽的酶解具有放大作用,一个蛋白酶分子可以酶解多个底物分子,而一个抗原表位一次只能结合一个抗体。药物的安全性是药物使用过程中必须考虑的重要因素之一。本研究从穿膜肽对体外培养细胞活性的影响方面出发,采用经典的MTT比色实验,证实即使在较高浓度应用时所合成的穿膜肽对细胞活性亦无明显影响($P > 0.05$)。结合已被证实的细胞穿膜肽具有向体内各种细胞传递各类物质的巨大潜力^[10],本研究为今后肿瘤早期诊断和靶向性治疗提供了新的思路。

参考文献:

- [1] Wagstaff KM, Jans DA. Protein transduction: cell penetrating peptides and their therapeutic applications [J]. *Curr Med Chem*, 2006, 13(12): 1371-87.
- [2] Jiang T, Olson ES, Nguyen QT, et al. Tumor imaging by means of proteolytic activation of cell-penetrating peptides [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(51): 17867-72.
- [3] Alakus H, Grass G, Henneken JK, et al. Clinicopathological significance of MMP-2 and its specific inhibitor TIMP-2 in gastric cancer [J]. *Histol Histopathol*, 2008, 23(8): 917-23.
- [4] He Q, Chen J, Lin HL, et al. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma, E-cadherin and matrix metalloproteinases-2 in gastric carcinoma and lymph node metastases [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2007, 120(17): 1498-504.
- [5] Minard ME, Ellis LM, Gallick GE. Tiam1 regulates cell adhesion, migration and apoptosis in colon tumor cells [J]. *Clin Exp Metastasis*, 2006, 23(5-6): 301-13.
- [6] Kida S, Eto Y, Yoshioka Y, et al. Evaluation of synthetic cell-penetrating peptides, Pro-rich peptide and octaarginine derivatives, as adenovirus vector carrier [J]. *Protein Pept Lett*, 2010, 17(2): 164-7.
- [7] Yu HH, Nakase I, Pujals S, et al. Expressed protein ligation for the preparation of fusion proteins with cell penetrating peptides for endotoxin removal and intracellular delivery [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1798(12): 2249-57.
- [8] Nguyen QT, Olson ES, Aguilera TA, et al. Surgery with molecular fluorescence imaging using activatable cell-penetrating peptides decreases residual cancer and improves survival [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(9): 4317-22.
- [9] Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression [J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(3): 161-74.
- [10] Gupta B, Levchenko TS, Torchilin VP. Intracellular delivery of large molecules and small particles by cell-penetrating proteins and peptides [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2005, 57(4): 637-51.

(编辑:黄开颜)