

# 含神经纤毛蛋白-1 靶向序列的细胞穿透肽的合成及其与非小细胞肺癌的特异性结合研究\*

周惠君, 董 萍, 蔡华伟, 吴小艾, 张文杰, 庞富文, 李 林 $\Delta$

四川大学华西医院 核医学科(成都 610041)

**【摘要】** 目的 设计一类具有 C 末端基序的新型肿瘤穿透肽 YCCS, 并检测其对非小细胞肺癌的靶向结合能力。方法 设计了融合肺癌靶向肽段 CS 及神经纤毛蛋白-1 靶向肽段 CRMP-1 的新型多肽 YCCS, 采用 Fmoc 固相合成法合成多肽, 并在多肽上标记荧光素 FITC, 以神经纤毛蛋白-1 阳性的非小细胞肺癌 A549、人乳腺癌 MDA-MB-231, 以及神经纤毛蛋白-1 阴性的正常人肺成纤维细胞 HBE135-E6E7、正常人肝细胞 HL-7702 为研究对象, 观察荧光标记的多肽与 A549 细胞的特异性结合能力。结果 成功设计并合成了肿瘤穿透肽 FITC-YCCS 用于细胞结合研究, 荧光细胞结合实验证实, 在 5  $\mu\text{mol/L}$  浓度下, YCCS 多肽能特异性的与非小细胞肺癌 A549 结合, 而基本不与乳腺癌细胞及正常细胞结合。随多肽浓度升高, 在 20  $\mu\text{mol/L}$  浓度下, YCCS 多肽与乳腺癌细胞 MDA-MB-231 和肝细胞 HL-7702 出现少量结合。结论 本研究设计的肿瘤穿透肽 YCCS 在 5  $\mu\text{mol/L}$  浓度下, 可检测到对非小细胞肺癌 A549 具有特异性结合能力。

**【关键词】** 非小细胞肺癌 肿瘤靶向 神经纤毛蛋白-1 C 末端规则序列多肽

**Cellular Uptake and Localization of Novel NSCLC Penetrating Peptide with Neuropilin-1 Binding Motif** ZHOU Hui-jun, DONG Ping, CAI Hua-wei, WU Xiao-ai, ZHANG Wen-jie, PANG Fu-wen, LI Lin $\Delta$ . Department of Nuclear Medicine, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

$\Delta$  Corresponding author, E-mail: lilinghuaxi@sina.com

**【Abstract】 Objective** To synthesize and study the specific binding affinity of tumor-penetrating peptide YCCS to non-small cell lung carcinoma (NSCLC) cells *in vitro*. **Methods** YCCS peptide was designed by fusing the neuropilin-1 (NRP-1) binding sequence and NSCLC binding peptide CS. YCCS peptide was synthesized and fluorescent labeled with N-terminal FITC. NRP-1 positive human NSCLC cell A549, NRP-1 positive human breast cancer cell MDA-MB-231, normal human bronchial epithelium HBE135-E6E7 and human liver cell HL-7702 were incubated respectively, then we observed the specific binding affinity of tumor-penetrating peptide YCCS to NSCLC cells. **Results** After treated with 5  $\mu\text{mol/L}$  peptide, significant fluorescent signals of FITC-YCCS peptide were demonstrated only in NSCLC A549 cells but marginal captured signal in MDA-MB-231, normal human HBE135-E6E7 or HL-7702 cells, which revealed specific NSCLC cells binding affinity. In 20  $\mu\text{mol/L}$  treated group, non-specific binding were found in MDA-MB-231 and HL-7702 cells. **Conclusion** The results of this novel designed YCCS peptide indicated a promising strategy for improving tumor penetrating with delivery capability of drugs to NSCLC A549 cells when treated with 5  $\mu\text{mol/L}$  peptide.

**【Key words】** Non-small cell lung carcinoma Tumor-targeting Neuropilin-1 C-end rule motif peptide

神经纤毛蛋白-1(neuropilin-1, NRP-1)作为血管内皮生长因子(VEGF)家族成员的共同受体表达于新生血管内皮细胞,对促进肿瘤血管新生有重要作用。临床及临床前研究证据表明,NRP-1在乳腺癌、肺癌、结肠癌、胰腺癌、肾癌以及部分急性白血病细胞中均有高表达,是肿瘤细胞的表面标志物之一,

且高表达水平的 NRP-1 对多种肿瘤的侵袭及预后均有显著影响<sup>[1-6]</sup>。因此,NRP-1 已成为近年来抗肿瘤治疗的热门靶点之一。

近年来,研究者们发现了一类组织穿透型肿瘤导向肽——C 末端规则序列多肽,这类多肽中必须包含一个 C 末端开放的 R/K XX R/K 序列(X 为任意氨基酸,首尾为 R 或 K)。该 R/K XX R/K 序列能特异性被细胞表面的 NRP-1 所识别、结合,并依赖于 NRP-1 的跨膜转运能力使多肽及其携带的活性片段进入细胞内部<sup>[7-10]</sup>。研究发现,利用这类多

\* 国家自然科学基金(No. 81371585, No. 81301250)和教育部博士点基金(No. 20130181110073)资助

$\Delta$  通讯作者, E-mail: lilinghuaxi@sina.com

肽,可以将小分子药物、纳米药物颗粒或生物药物(如抗肿瘤蛋白药物、病毒疫苗等)携带进入肿瘤细胞及肿瘤组织深处<sup>[11-15]</sup>。

在本课题组的前期研究中,我们设计并合成了一种含有 C 末端规则序列的多肽 CRMP-1(YGNKRTR),该多肽可特异性地与 NRP-1 阳性的肿瘤细胞如 A549 及 MDA-MB-231 细胞结合,而基本不与正常细胞 HBE135-E6E7 或 HL-7702 结合;且使用放射性碘 131 标记后,CRMP-1 可对小鼠皮下 A549 肿瘤进行显像(未发表)。为进一步增强多肽对肿瘤细胞的选择性,在本研究中,我们在 CRMP-1 的 N 末端融合了另一段由噬菌体多肽库中筛选出的肺癌细胞识别序列 CS,并使用荧光显微镜及流式细胞术来检测设计的多肽是否能选择性结合 NRP-1 阳性的肺癌细胞,为后续研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 多肽 YCCS 的设计与合成

多肽 YCCS 由两部分构成,包括一段隐藏的 C 末端序列肽段以及一段肺癌细胞靶向多肽 CS,并在多肽的 N 末端添加酪氨酸 Tyr 作为后续放射性碘标记的结合位点。多肽采用 Fmoc 固相合成法,从多肽羧基端向氨基端依次合成。以氯甲基聚苯乙烯树脂作为不溶性的固相载体,首先将一个氨基被封闭基团保护的�多肽序列 C 末端第一个氨基酸共价连接在树脂固相载体上。在三氟乙酸的作用下,脱掉氨基的保护基,使第一个氨基酸连接至固相载体。然后氨基被封闭的第二个氨基酸的羧基通过 N,N'-二环己基碳二亚胺(DCC)活化,羧基被 DCC 活化的第二个氨基酸再与已接在固相载体的第一个氨基酸的氨基反应形成肽键,在固相载体上生成一个带有保护基的肽。重复上述肽键形成反应,使肽链从 C 端向 N 端生长,直至达到所需要的肽链长度,C 末端进行酰胺化以增加多肽的稳定性。最后脱去保护基,用氢氟酸(HF)水解肽链和固相载体之间的酯键,进行荧光素 FITC 标记后,经 HPLC 纯化及质谱分析测定其纯度及相对分子质量,确认后采用真空干燥法冻干。多肽干粉于一 20 ℃ 冷冻保存,使用前用 PBS 缓冲液溶解。

### 1.2 细胞培养

人非小细胞肺癌 A549、人乳腺癌 MDA-MB-231 以及人肝细胞 HL-7702 购自中国上海中科院细胞库。人肺成纤维细胞 HBE135-E6E7 购自美国

ATCC 细胞库。各细胞按培养说明使用 RPMI1640 或 DMEM 高糖培养基,添加 100 mL/L 胎牛血清、100 mL/L 青-链霉素,于 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。

### 1.3 荧光显微镜观察多肽结合

细胞处理流程参考本课题组前期研究所用方法<sup>[16,17]</sup>。药物处理前 1 d,将各组细胞按  $1 \times 10^4$ /孔接种于 24 孔板中培养过夜使细胞贴壁。次日,使用含 20 mL/L 小牛血清(BSA)的培养基替换生长培养基,加入 PBS 溶解的 FITC 标记的多肽溶液至终浓度为 5 μmol/L,37 ℃ 避光孵育 2 h。孵育结束后,弃孔内培养基,PBS 洗涤 3 次,最后加入含 20 mL/L BSA 的培养基,荧光显微镜下观察多肽结合情况。FITC 标记的 NRP-1 结合肽段 CRMP-1 同样加入 4 种细胞作为对照组进行观察。

### 1.4 流式细胞术检测 YCCS 多肽结合

细胞处理同 1.3。将 4 种细胞用 0.25 mL/L 胰酶消化后,使用含 20 mL/L BSA 的培养基将细胞按  $1 \times 10^5$  细胞/管加入洁净 EP 管内,加入 PBS 溶解的 FITC-YCCS 多肽溶液至终浓度为 1、5、20 μmol/L,37 ℃ 避光孵育 2 h。孵育结束后,弃孔内培养基,PBS 洗涤 3 次,流式细胞术检测多肽结合情况。该实验中每种多肽结合浓度同时进行 3 个浮孔处理,检测结果取  $\bar{x} \pm s$ 。

### 1.5 统计学方法

流式细胞术结果分析中,每组浓度下不同细胞结合率进行比较时采用 *t* 检验, $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 多肽合成

多肽的结构式如图 1 所示,从结构中可以看出,该多肽中包含了可与 NRP-1 结合的 C 末端序列肽段 CRMP-1(YGNKRTR),以及肺癌细胞结合肽段(CSNIDARAC)。多肽委托南京金斯瑞生物有限公司合成,质谱结果显示多肽相对分子质量为 1 827,与其理论相对分子质量吻合(1 827.08),HPLC 结果显示其纯度大于 98%,满足后续实验要求。

### 2.2 荧光标记多肽的特异性结合

4 种细胞分别与多肽经 2 h 孵育后,荧光显微镜观察结果如图 2 所示。多肽 CRMP-1 能与 NRP-1 阳性的两种肿瘤细胞 MDA-MB-231、A549 结合而不与正常细胞 HBE135-E6E7、HL-7702 结合,这证实了 CRMP-1 多肽具有与 NRP-1 阳性肿瘤细胞靶向结合的能力。而 YCCS 的结合实验结果表明,

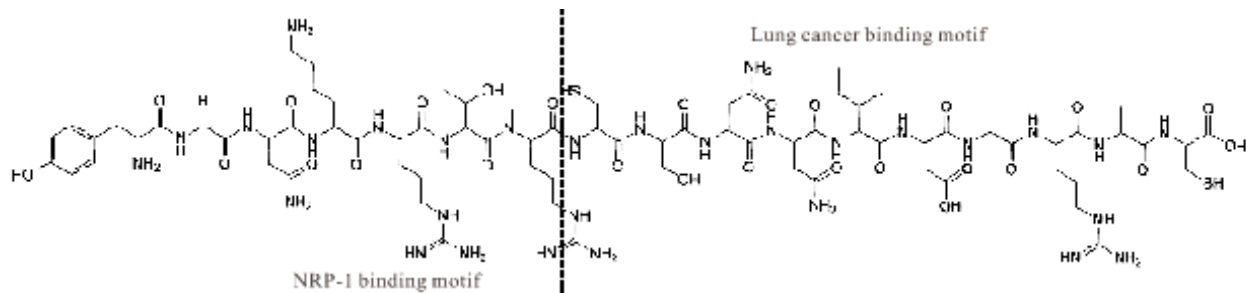


图 1 多肽 YCCS 结构图

Fig 1 Chemical structure of YCCS peptide

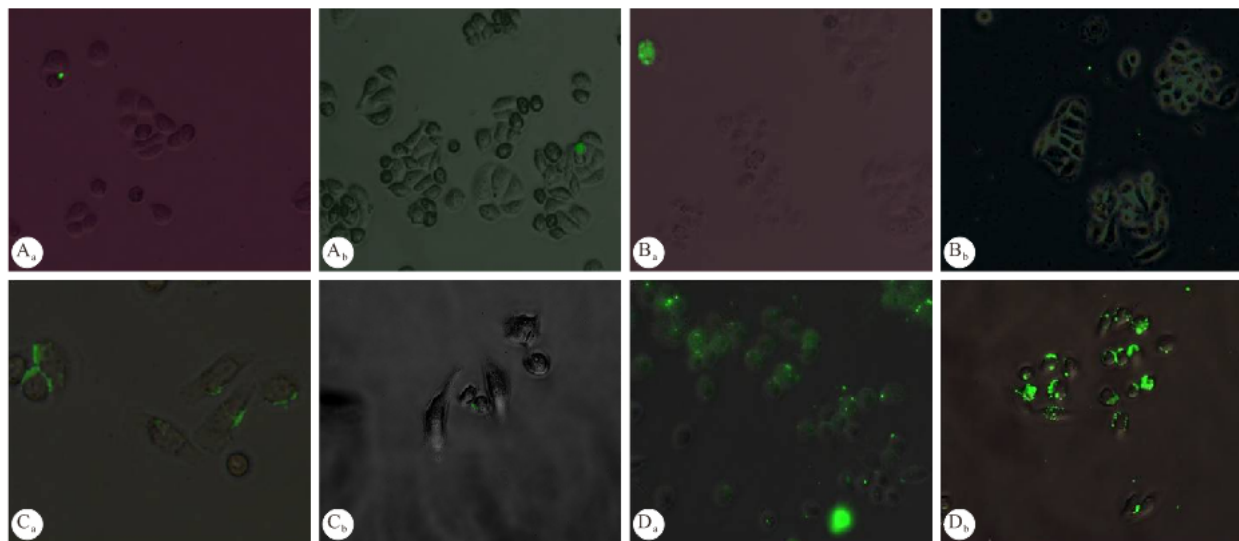


图 2 荧光素 FITC 标记的多肽 CRMP-1 及 YCCS 在 5  $\mu\text{mol/L}$  浓度下与正常细胞和肿瘤细胞的结合情况。 $\times 100$

Fig 2 *In vitro* specific binding result of FITC-labeled CRMP-1 or YCCS peptide with NRP-1 positive cancer cells and normal cells.  $\times 100$

A: HBE135-E6E7; B: HL-7702; C: MDA-MB-231; D: A549; a: CRMP-1 (5  $\mu\text{mol/L}$ ); b: YCCS (5  $\mu\text{mol/L}$ )

在 CRMP-1 的 C 末端添加了肺癌结合肽段后，YCCS 的细胞特异性结合能力得到了进一步提升，在 2 h 的时间内，多肽将优先与肺癌细胞结合，而不与同为 NRP-1 阳性的乳腺癌细胞结合。

流式细胞术结果显示(图 3)，多肽浓度在 1  $\mu\text{mol/L}$  时，未见与细胞明显结合，阳性率均  $< 0.1$ ；5  $\mu\text{mol/L}$  多肽处理后，YCCS 与 A549 的结合阳性率可达  $0.90 \pm 0.04$ ；与 A549 相比，YCCS 多肽与其他 3 种细胞的结合阳性率分别为  $0.14 \pm 0.08$  ( $P < 0.05$ ) (MDA-MB-231)、 $0.07 \pm 0.01$  ( $P < 0.05$ ) (HBE135-E6E7)、 $0.05 \pm 0.01$  ( $P < 0.05$ ) (HL-7702)。当药物浓度提升至 20  $\mu\text{mol/L}$  以后，除 A549 结合阳性率达到了 1.00 以外，YCCS 与其他细胞出现了较明显的非特异性结合；其中，与 A549 相比，多肽与 MDA-MB-231 的结合阳性率上升至  $0.95 \pm 0.05$  ( $P > 0.05$ )，与 HL-7702 的结合阳性率上升为  $0.76 \pm 0.19$  ( $P > 0.05$ )，而与 HBE135-

E6E7 的结合阳性率仍稳定在  $0.14 \pm 0.08$  ( $P < 0.05$ )。

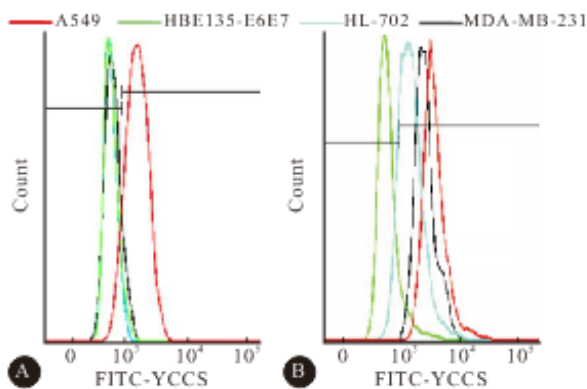


图 3 流式细胞术检测 5  $\mu\text{mol/L}$ (A)与 20  $\mu\text{mol/L}$ (B)多肽分别与 4 种细胞的结合阳性率

Fig 3 FACS analysis of the specific binding of 5  $\mu\text{mol/L}$  (A) and 20  $\mu\text{mol/L}$  (B) FITC-labeled YCCS peptide with A549, HBE135-E6E7, HL7702 and MDA-MB-231 cells

### 3 讨论

近年来研究发现的 C 末端规则序列多肽,可通过靶向结合肿瘤细胞膜表面的 NRP-1 将多肽及其携带的药物分子输送到细胞内,同时 NRP-1 本身也是多种肿瘤的表面标记物;研究者通过将 NRP-1 结合肽段融合在抗肿瘤肽段 RGD 上得到的融合多肽,比单独 RGD 具有更好的组织穿透性和细胞内转运能力<sup>[11, 12]</sup>。本研究选取的 C 末端规则肽段来源于一种肿瘤靶向肽 Lyp-1。Lyp-1 是一种环状肿瘤靶向肽(CGNKRTRGC),该多肽能特异性的与肿瘤新生淋巴管结合<sup>[18, 19]</sup>。从结构中可以看出,该环状多肽中包含有 C 末端规则序列(KRTR),可能通过人工开环的方式得到 C 末端 KRTR 暴露的 NRP-1 靶向多肽。有学者尝试研究剪切开环后的 Lyp-1(tLyp-1),使其 C 末端的 KRTR 暴露,发现 tLyp-1 丧失了对肿瘤淋巴管的结合能力,但拥有了与 NRP-1 靶向结合的特性<sup>[10, 12, 20]</sup>。研究者们已成功利用 tLyp-1 运载肿瘤杀伤多肽、纳米颗粒、阿霉素至肿瘤细胞,但目前为止,利用该多肽进行放射性核素标记用于肿瘤核医学研究尚无报道<sup>[10, 20-22]</sup>。在本研究中,我们对 Lyp-1 肽段进行开环改构,在保留其 C 末端 KRTR 暴露的基础上,在 N 末端添加供放射性碘标记的酪氨酸位点,命名为 CRMP-1(YGNKRTR)。与 CRMP-1 融合的肺癌靶向多肽 CS 来源于噬菌体库展示筛选技术,研究者们发现 CS 能有效地结合在肺癌细胞 H460 和 A549 的细胞膜上,可用于阿霉素的肿瘤靶向运输,但其后续的胞内转运能力尚不清楚<sup>[23]</sup>。因此本研究将 CRMP-1 与肺癌细胞靶向多肽 CS 融合,检测其是否具有靶向结合肺癌细胞的能力。

从本研究结果可见,我们设计的 CRMP-1 能特异性的与 NRP-1 阳性细胞结合,其结合位点主要位于 NRP-1 大量表达的细胞膜上,少许出现在细胞质内。这一结果与其他研究者结果相似<sup>[9]</sup>,也确证了我们设计中添加的酪氨酸位点不会对 C 末端序列多肽与 NRP-1 的特异性结合能力造成显著影响。而在 CRMP-1 融合了肺癌靶向肽 CS 后,同等浓度药物处理相同时间后,新的多肽 YCCS 更为明显的表现出对肺癌细胞 A549 的靶向结合能力,而基本不与同为 NRP-1 阳性的乳腺癌 MDA-MB-231 细胞结合。YCCS 的荧光信号同样出现在细胞膜及细胞质中,但其荧光强度相比单独的 CRMP-1 有一定增强,这可能是由于未被肽酶剪切的 YCCS 和剪切后

的 CRMP-1 同时大量堆积在细胞膜表面所造成。然而,当多肽溶液浓度升高至 20  $\mu\text{mol/L}$  后,YCCS 对乳腺癌细胞和正常肝细胞出现了明显的非特异性结合,这一结果提示我们在后续实验中,YCCS 的有效浓度应控制在 5  $\mu\text{mol/L}$  左右。

利用小分子肿瘤靶向多肽来靶向运载肿瘤显像药物或治疗药物至肿瘤部位,以达到肿瘤诊断和治疗的目的,已成为近年抗肿瘤的研究热点。本研究的荧光结合及流式细胞术检测结果显示,我们所设计的多肽 YCCS 可特异性结合并进入肺癌肿瘤细胞内部,提示该多肽具备针对肺癌细胞靶向结合以及良好的跨膜转运能力。我们后续将进一步进行多肽的放射性核素标记以及体内分布、活体显像及肿瘤靶向放疗研究,评价其用于肺癌靶向核医学诊断、治疗的可行性。

### 参 考 文 献

- Jubb AM, Strickland LA, Liu SD, *et al.* Neuropilin-1 expression in cancer and development. *J Pathol*,2012;226(1): 50-60.
- Ellis LM. The role of neuropilins in cancer. *Mol Cancer Ther*, 2006;5(5):1099-1107.
- Hong TM, Chen YL, Wu YY, *et al.* Targeting neuropilin 1 as an antitumor strategy in lung cancer. *Clin Cancer Res*,2007;13(16):4759-4768.
- Kamiya T, Kawakami T, Abe Y, *et al.* The preserved expression of neuropilin (NRP) 1 contributes to a better prognosis in colon cancer. *Oncol Rep*,2006;15(2):369-373.
- Kreuter M, Woelke K, Bieker R, *et al.* Correlation of neuropilin-1 overexpression to survival in acute myeloid leukemia. *Leukemia*,2006;20(11):1950-1954.
- Kawakami T, Tokunaga T, Hatanaka H, *et al.* Neuropilin 1 and neuropilin 2 co-expression is significantly correlated with increased vascularity and poor prognosis in nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer*,2002;95(10):2196-2201.
- Teesalu T, Sugahara KN, Kotamraju VR, *et al.* C-end rule peptides mediate neuropilin-1-dependent cell, vascular, and tissue penetration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009;106(38): 16157-16162.
- Haspel N, Zanuy D, Nussinov R, *et al.* Binding of a C-end rule peptide to the neuropilin-1 receptor: a molecular modeling approach. *Biochemistry*,2011;50(10):1755-1762.
- Roth L, Agemy L, Kotamraju VR, *et al.* Transtumoral targeting enabled by a novel neuropilin-binding peptide. *Oncogene*,2012;31(33):3754-3763.
- Zanuy D, Kotla R, Nussinov R, *et al.* Sequence dependence of C-end rule peptides in binding and activation of neuropilin-1 receptor. *J Struct Biol*,2013;182(2):78-86. (下转第 38 页)

- 13 Wei D, Li J, Shen M, *et al.* Cellular production of n-3 PUFAs and reduction of n-6-to-n-3 ratios in the pancreatic  $\beta$ -cells and islets enhance insulin secretion and confer protection against cytokin-induced cell death. *Diabetes*,2010;59(2):471-478.
- 14 程 红. 黄酰脲药物受体基因多态性及其与 2 型糖尿病、黄酰脲药物疗效相关性研究进展. *中国医药工业杂志*,2006;37(1):54-57.
- 15 Lin Y, Sun X, Qiu L, *et al.* Exposure to bisphenol A induces dysfunction of insulin secretion and apoptosis through the damage of mitochondria in rat insulinoma (INS-1) cells. *Cell Death Dis*, 2013 Jan 17;4:e460. doi: 10.1038/cddis.2012.206.
- 16 Motoshige H, Oyama K, Takahashi K, *et al.* Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in gemcitabine-induced apoptosis-like cell death in insulinoma cell line INS-1. *Biol Pharm Bull*,2012;35(11):1932-1940.
- 17 Ruszkowska-Ciastek B, Sokup A, Socha MW, *et al.* A preliminary evaluation of VEGF-A, VEGFR1 and VEGFR2 in patients with well-controlled type 2 diabetes mellitus. *J Zhejiang Univ Sci B*,2014;15(6):575-581.
- 18 Zorena K, My śliwska J, My śliwiec M, *et al.* Association between vascular endothelial growth factor and hypertension in children and adolescents type I diabetes mellitus. *J Hum Hypertens*,2010;24(11):755-762.

(2015-05-22 收稿,2015-09-18 修回)

编辑 沈 进

(上接第 22 页)

- 11 Sugahara KN, Teesalu T, Karmali PP, *et al.* Tissue-penetrating delivery of compounds and nanoparticles into tumors. *Cancer Cell*,2009;16(6):510-520.
- 12 Sugahara KN, Teesalu T, Karmali PP, *et al.* Coadministration of a tumor-penetrating peptide enhances the efficacy of cancer drugs. *Science*,2010;328(5981):1031-1035.
- 13 Sharma A, Kapoor P, Gautam A, *et al.* Computational approach for designing tumor homing peptides. *Sci Rep*,2013;3:1607. doi: 10.1038/srep01607.
- 14 Zhu Z, Xie C, Liu Q, *et al.* The effect of hydrophilic chain length and iRGD on drug delivery from poly( $\epsilon$ -caprolactone)-poly(N-vinylpyrrolidone) nanoparticles. *Biomaterials*,2011;32(35):9525-9535.
- 15 Puig-Saus C, Rojas LA, Laborda E, *et al.* iRGD tumor-penetrating peptide-modified oncolytic adenovirus shows enhanced tumor transduction, intratumoral dissemination and antitumor efficacy. *Gene Ther*,2014;21(8):767-774.
- 16 Cai H, Yang H, Xiang B, *et al.* Selective apoptotic killing of solid and hematologic tumor cells by bombesin-targeted delivery of mitochondria-disrupting peptides. *Mol Pharm*,2010;7(2):586-596.
- 17 Yang H, Liu S, Cai H, *et al.* Chondroitin sulfate as a molecular portal that preferentially mediates the apoptotic killing of tumor cells by penetratin-directed mitochondria-disrupting peptides. *J Biol Chem*,2010;285(33):25666-25676.
- 18 Laakkonen P, Porkka K, Hoffman JA, *et al.* A tumor-homing peptide with a targeting specificity related to lymphatic vessels. *Nat Med*,2002;8(7):751-755.
- 19 Laakkonen P, Akerman ME, Biliran H, *et al.* Antitumor activity of a homing peptide that targets tumor lymphatics and tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2004;101(25):9381-9386.
- 20 Alberici L, Roth L, Sugahara KN, *et al.* De novo design of a tumor-penetrating peptide. *Cancer Res*,2013;73(2):804-812.
- 21 Hu Q, Gu G, Liu Z, *et al.* F3 peptide-functionalized PEG-PLA nanoparticles co-administrated with tLyp-1 peptide for anti-glioma drug delivery. *Biomaterials*, 2013; 34(4):1135-1145.
- 22 Yang ZZ, Li JQ, Wang ZZ, *et al.* Tumor-targeting dual peptides-modified cationic liposomes for delivery of siRNA and docetaxel to gliomas. *Biomaterials*,2014;35(19):5226-5239.
- 23 He X, Na MH, Kim JS, *et al.* A novel peptide probe for imaging and targeted delivery of liposomal doxorubicin to lung tumor. *Mol Pharm*,2011;8(2):430-438.

(2015-04-13 收稿,2015-08-13 修回)

编辑 余 琳