DOI:10.16016/j.1000-5404.201601172

抗 CAⅨ蛋白多糖区多肽的合成及其寻靶能力

朱连华,郭燕丽,范校周,熊星宇,黄海韵,徐 丹,方可敬 (400038 重庆,第三军医大学西南医院超声科)

[摘要] **目的** 合成能够与碳酸酐酶9(carbonic anhydrase Ⅸ,CAⅨ)蛋白多糖区特异性结合的多肽分子(proteoglycan-like region peptide, PGLR-P1),并初步探讨其在体外的寻靶能力。**方法** 通过化学固相合成法合成多肽分子,对其纯度和相对分子质量进行分析,并初步探讨其与CAⅨ蛋白、表达CAⅨ的肿瘤细胞和相应移植瘤组织的结合能力以及携载多肽的靶向纳米泡的体外寻靶能力。**结果** 合成的多肽分子纯度高于98%,相对分子质量(1 722.2±0.4),其能与CAⅨ蛋白、表达CAⅨ的肿瘤细胞及相应移植瘤组织发生特异性靶向结合,且携载多肽的靶向纳米泡特异性靶向结合CAⅨ表达阳性的肿瘤细胞。**结论** 化学合成的多肽分子PGLR-P1在分子、细胞和组织水平均能与CAⅨ蛋白发生特异性结合。

[关键词] 碳酸酐酶9;多肽;恶性肿瘤
[中图法分类号] R341;R914.5;R962 [文献标志码] A

Synthesis of anti-CAⅨ proteoglycan-like region peptide and evaluation of its target binding ability

Zhu Lianhua, Guo Yanli, Fan Xiaozhou, Xiong Xingyu, Huang Haiyun, Xu Dan, Fang Kejing (Department of Ultrasonography, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To synthesize the peptide (PGLR-P1) specifically binding to the proteoglycan-like region of carbonic anhydrase Ⅸ (CAⅨ) and investigate its target binding ability *in vitro*. **Methods** The peptide was synthesized through the standard solid phase synthesis, its purity was measured, and its relative molecular weight was studied. Its target binding ability to CAⅨ protein, CAⅨ-positive tumor cells and transplanted tumor tissues, and the binding capacity of ultrasonic nanobubbles carrying the synthesized peptide to cells *in vitro* were investigated and analyzed. **Results** The purity of our synthesized peptide was higher than 98%, with a relative molecular weight of 1 722.2±0.4. It could bind targetly to CAⅨ protein, CAⅨ-positive tumor cells and transplanted tumor tissue, and ultrasonic nanobubbles carrying the peptide were confirmed to bind targetly to CAⅨ-positive tumor cells. **Conclusion** The synthesized peptide PGLR-P1 can specifically and targetly bind to CAⅨ protein in molecular, cell and tissue levels.

[**Key words**] carbonic anhydrase Ⅸ; peptide; malignant tumor

Supported by the National International S&T Cooperation Program of China (2015DFA30920) and the International S&T Cooperation Program of Chongqing (CSTC2014gjhz110004). Corresponding author: Guo Yanli, E-mail: guoyanli71@aliyun.com

碳酸酐酶9(carbonic anhydrase Ⅸ,CAⅨ)又称G250、MN,是一种位于多种恶性肿瘤细胞膜上,由酸性氨基酸组成的跨膜蛋白。其结构可以分为胞内区、跨膜区和胞外区,胞外区主要由酶催化区与蛋白多糖区组成。与其他碳酸酐酶同工酶相比,蛋白多糖区是CAⅨ所特有的结构,故特异性靶向于CAⅨ蛋白多糖区的配体,不会与其他碳酸酐酶同工酶相结合,引起交叉反应[1]。因此,构建和合成短小、稳定、特异性靶向于CAⅨ蛋白多糖区的配体,有利于多种恶性肿瘤(乳腺癌、胃癌、小细胞肺癌、肾癌、宫颈癌等)的靶向分子显像和靶向治疗。多肽是由α-氨基酸以肽键的方式连接成的化合物,通常由10~100个氨基酸分子脱水缩合而成。多肽分子化学结构简单、分布广泛、性质稳定,已广泛应用于医学诊断和药物开发中。Rana等[2]通过噬菌体展示库技术淘选出针对CAⅨ蛋白多糖区的多肽分子(proteoglycan-like region peptide, PGLR-P1,NMPKDVTTRMSS),并研究其与CAⅨ蛋白分子的

[基金项目] 国家国际科技合作专项(2015DFA30920);重庆市国际科技合作专项(CSTC2014gjhz110004)
[通信作者] 郭燕丽,E-mail:guoyanli71@aliyun.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160516.1350.004.html(2016-05-16)

结合能力和体内代谢分布,但尚未从病理学上证实其与肿瘤细胞和肿瘤组织的结合能力以及连接到超声纳米泡表面后是否改变其与 CAⅨ的亲和力。因此,本实验通过化学固相合成法合成靶向于 CAⅨ蛋白多糖区的特异性多肽分子 PGLR-P1,并在分子、细胞和组织水平初步探讨其与 CAⅨ特异性结合的能力,从而为恶性肿瘤的分子影像学提供一种理想配体。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

人肾癌 786-0 细胞、人宫颈癌 HeLa 细胞和人胰腺癌 BxPC-3 细胞均购自中科院上海细胞库,胎牛血清和 RPMI1640 培养基均购自 HyClone 公司,各型氨基酸购自苏州天马医药集团精细化学品有限公司,小鼠抗人 CAⅨ单克隆抗体购自 Abcam 公司,FITC 标记山羊抗小鼠 IgG、TMB 显色液和 DAPI 染色液均购自碧云天生物技术有限公司,FITC 标记链霉亲和素和链霉亲和素均购自博士德生物技术有限公司。

1.2 CAⅨ特异性多肽合成

采用标准化学固相合成法合成生物素化多肽分子 PLGR-P1[H_2 N-NMPKDVTTRMSSk(biotin)-$CONH_2$]。具体步骤如下:二氯甲烷溶胀树脂后,接上第 1 个氨基酸(赖氨酸),脱除 Fmoc 保护,茚三酮检测树脂上氨基酸。重复上述步骤,从右至左依次连接序列中的氨基酸,最后进行生物素化标记。合成结束后,切割下多肽,乙醚洗涤后,得到多肽粗品。采用高效液相色谱法(HPLC)分离纯化多肽粗品,并进行纯度与相对分子质量检测。

1.3 ELISA 鉴定多肽与 CAⅨ蛋白亲和力

用包被液稀释重组人 CAⅨ蛋白胞外区至 10 μg/mL,酶标板中每孔加入 100 μL,4 ℃包被过夜,洗板,用 5% 的 BSA 封闭 2 h。加入化学合成的生物素化多肽,100 μL/孔,37 ℃孵育 1 h。洗板后加入 1∶5 000 的 HRP-链霉亲和素,100 μL/孔,37 ℃孵育 1 h。洗板后加入 TMB 显色液 100 μL/孔,室温反应 15 min,每孔再加入 50 μL 浓度为 2 mol/L 的浓硫酸终止反应,酶标仪上检测各孔的光密度值[D(450)]。以多肽溶液直接包被酶标板作为阳性对照,以包被液替代 CAⅨ蛋白作为空白对照。

1.4 细胞 ELISA 鉴定多肽与表达 CAⅨ细胞结合力

取对数生长的肾癌 786-0、宫颈癌 HeLa 和胰腺癌 BxPC-3 细胞,按 2×10^4/mL 接种在 96 孔板,培养过夜。洗板后 4% 多聚甲醛固定 15 min,每孔加入 100 μL 的 3% 的过氧化氢液阻断内源性过氧化物酶活性,37 ℃孵育 30 min。洗板后加入 5% 的 BSA 封闭 2 h,每孔加入 100 μL 的多肽,37 ℃孵育 1 h,其后处理如上。以多肽溶液直接包被作为阳性对照,以 PBS 代替细胞作为空白对照。

1.5 细胞免疫荧光鉴定

取对数生长的肾癌 786-0、宫颈癌 HeLa 和胰腺癌 BxPC-3 细胞,按 5×10^4/mL 接种在铺有玻片的 24 孔板上,培养过夜。洗板后 4% 多聚甲醛固定 15 min,加入 5% 的 BSA 封闭 2 h,每孔加入 100 μL 的小鼠抗人 CAⅨ单抗,4 ℃过夜孵育。PBS 漂洗 3 次后,加入 100 μL 的 FITC 标记山羊抗小鼠 IgG,37 ℃避光孵育 2 h。PBS 漂洗后用 DAPI 染色液进行复染 3 min,漂洗后在激光共聚焦镜下观察。以同样的步骤使用多肽进行细胞免疫荧光测定,以检测多肽与表达 CAⅨ细胞的结合力。

1.6 携载多肽的靶向纳米泡和空白纳米泡与肿瘤细胞结合情况

将 DPPC、DPPG、DPPE、DPPA 以及生物素化的 DSPE-PEG(2000)按一定比例溶于有机溶剂中,振荡过夜后移至西林瓶,全氟丙烷置换瓶中空气,ST 银汞胶囊调和器振荡后静置过夜。离心后分离得到空白纳米泡。通过生物素-亲和素系统将多肽连接到空白纳米泡表面得到携载多肽的靶向纳米泡。将对数生长的 786-0、HeLa 和 BxPC-3 细胞以 5×10^4 细胞/孔接种在 24 孔中,过夜培养后用 4% 多聚甲醛固定,漂洗后加入纳米泡。每种细胞分为 2 组,一组加入 30 μL 的靶向纳米泡,一组加入 30 μL 的等浓度空白纳米泡,4 ℃冰箱中孵育 2 h。玻片清洗 3 次后,将玻片倒置于切片上,在普通光学显微镜(Olympus)下观察。

1.7 免疫组织化学鉴定

取对数生长的肾癌 786-0、宫颈癌 HeLa 和胰腺癌 BxPC-3 细胞接种于 4 周左右的裸鼠背部皮下,构建皮下移植瘤。待肿瘤直径大约 1 cm 时,以颈椎脱臼法处死裸鼠,取出移植瘤标本后 -20 ℃冰冻。取出冰冻标本放在组织支撑器上,滴加冷冻包埋剂,放入冰冻切片机中低温固化后切片,切片厚约 4 μm。4% 多聚甲醛固定 15 min,用浓度 25 μg/mL 的链霉亲和素封闭 15 min 后,再用 5% BSA 封闭 2 h。加入 100 μL 的多肽后,4 ℃孵育过夜。加入 100 μL 的 FITC 标记链霉亲和素孵育 1 h,注意避光。PBS 漂洗后用 DAPI 染色液进行复染 10 min,漂洗后在激光共聚焦镜下观察。本研究动物实验经过第三军医大学伦理委员会批准。

2 结果

2.1 多肽合成及纯化结果

采用高效液相色谱(HPLC)分析生物素化多肽,其纯度 >98%,结果见图 1。质谱检测合成的生物素化多肽相对分子质量是(1 722.2 ± 0.4),结果见图 2,理论计算生物素化多肽相对分子质量是 1 721.1,故合成多肽相对分子质量与理论值一致。

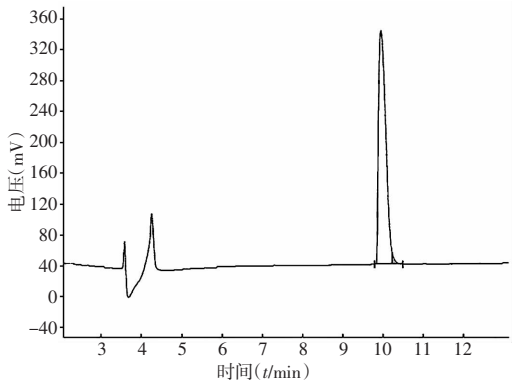


图 1　多肽 PGLR-P1 的液相色谱

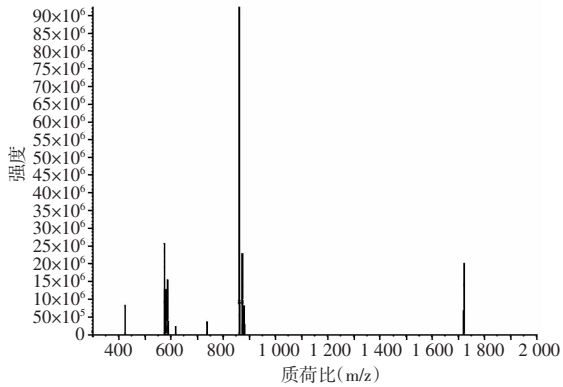


图 2　多肽 PGLR-P1 的质谱

2.2　直接 ELISA 和细胞 ELISA 检测结果

对化学合成的多肽进行 ELISA 检测,结果显示阳性对照组、实验组、阴性对照组(不加多肽)和空白对照组(包被液)的 $D(450)$ 值分别为(5.025 ± 0.123)、(0.220 ± 0.047)、(0.098 ± 0.008)和(0.050 ± 0.001),实验组与阴性对照组的比值 > 2.1,且实验组 $D(450)$ 值 > 0.2,表明多肽与 CAⅨ蛋白发生特异性结合。对化学合成的多肽进行细胞 ELISA 检测,各种细胞均设阳性对照组、实验组、阴性对照组(不加多肽)和空白对照组(PBS),测定 $D(450)$ 值后计算实验组与阴性对照组比值,786-0 细胞、HeLa 细胞和 BxPC-3 细胞的比值分别为(4.636 ± 0.962)、(3.192 ± 0.726)和(1.424 ± 0.306),且实验组 786-0 细胞和 HeLa 细胞 $D(450)$ 值 > 0.2,表明多肽可与肾癌 786-0 细胞和宫颈癌 HeLa 细胞发生特异性靶向结合,却不能特异性结合胰腺癌 BxPC-3 细胞。

2.3　细胞免疫荧光结果

使用 CAⅨ单抗的细胞免疫荧光检测结果显示,肾癌 786-0 细胞和宫颈癌 HeLa 细胞膜表面高表达 CAⅨ蛋白,胰腺癌 BxPC-3 细胞膜表面未表达 CAⅨ(图 3)。使用化学合成的多肽进行细胞免疫荧光结果显示,肾癌 786-0 细胞和宫颈癌 HeLa 细胞能够与多肽结合,而 BxPC-3 细胞和未加多肽的细胞爬片均为阴性,表明多肽能有效特异性靶向结合 CAⅨ表达阳性的细胞,却不能特异性结合 CAⅨ表达阴性的细胞(图 4),与细胞 ELISA 结果相一致。

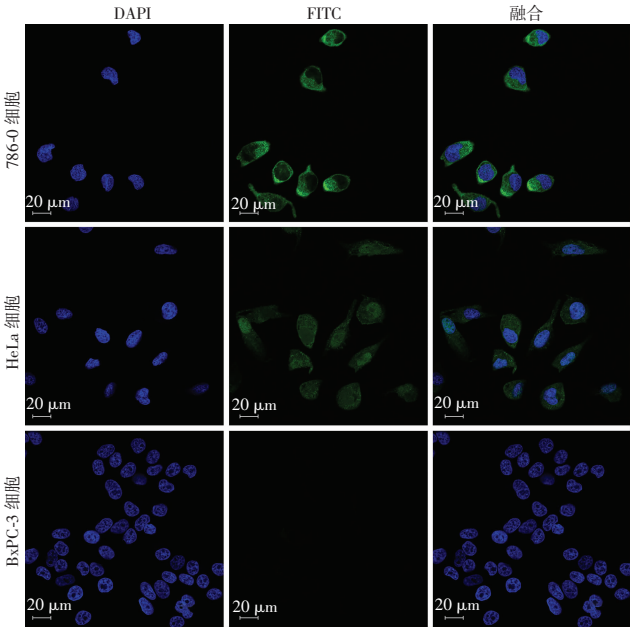


图 3　细胞免疫荧光检测 CAⅨ单克隆抗体与 786-0 细胞、HeLa 细胞和 BxPC-3 细胞的结合情况　(激光共聚集显微镜)

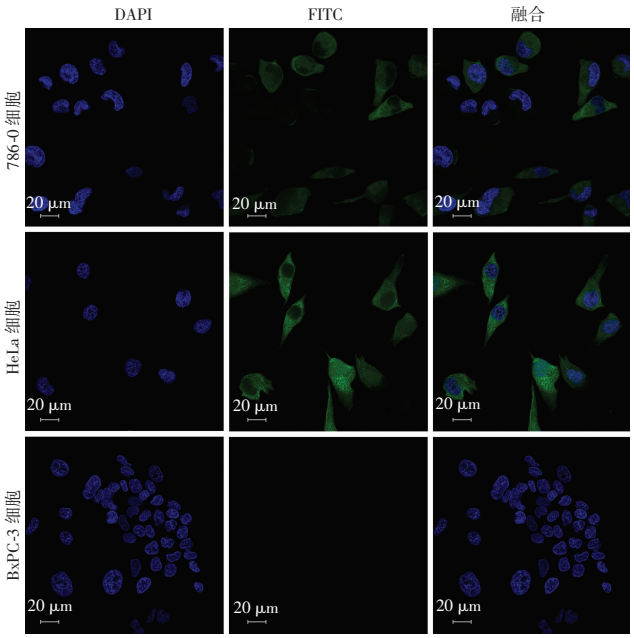
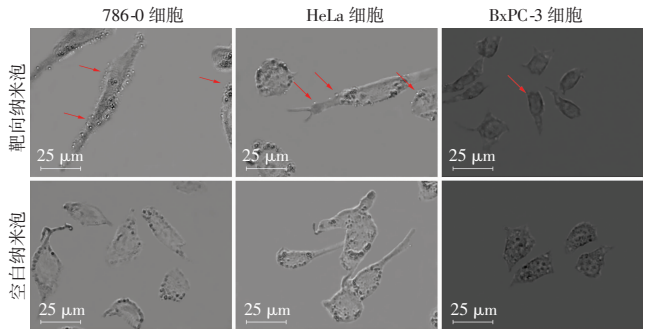


图 4　细胞免疫荧光检测多肽 PGLR-P1 与 CAⅨ阳性表达细胞(786-0 细胞与 HeLa 细胞)和阴性表达细胞(BxPC-3 细胞)的结合情况　(激光共聚集显微镜)

2.4　携载多肽的靶向纳米泡体外寻靶能力

纳米泡与肿瘤细胞反应 2 h 后,普通光镜下观察细

胞与纳米泡的结合情况,携载多肽的靶向纳米泡较多地围绕在肾癌 786-0 和宫颈癌 HeLa 细胞的细胞膜周围,胰腺癌 BxPC-3 细胞的细胞膜周围偶见 1 ~2 个靶向纳米泡,而空白纳米泡组 3 种肿瘤细胞膜周围均只偶见 1 ~2 个纳米泡,表明携载多肽的靶向纳米泡可特异性靶向聚集在 CAⅨ表达阳性细胞的细胞膜周围(图 5)。



↑:示靶向纳米泡

图 5 携载多肽的靶向纳米泡和空白纳米泡与 CAⅨ阳性表达细胞(786-0 细胞与 HeLa 细胞)和阴性表达细胞(BxPC-3 细胞)的结合情况 (倒置显微镜)

2.5 组织免疫荧光结果

采用化学合成多肽对移植瘤标本进行免疫荧光显示,多肽可与肾癌 786-0 和宫颈癌 HeLa 移植瘤组织中实质细胞发生特异性靶向结合,却未与胰腺癌 BxPC-3 移植瘤组织实质细胞发生特异性结合(图 6)。

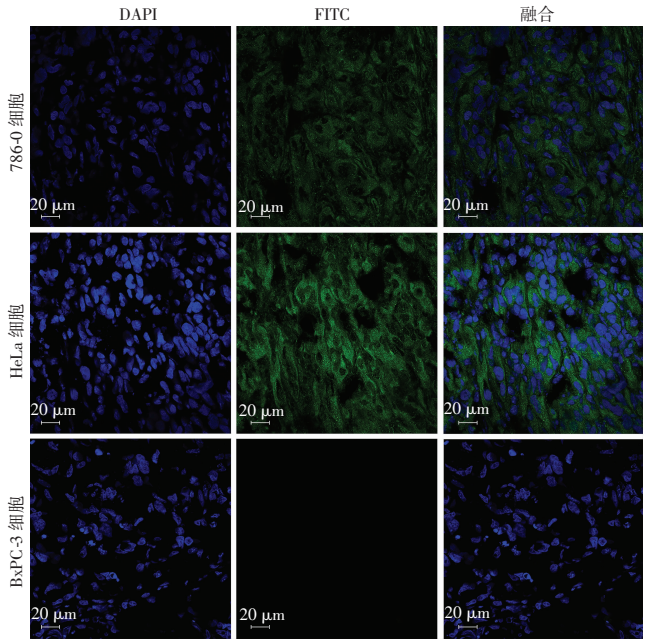


图 6 组织免疫荧光检测多肽 PGLR-P1 与 CAⅨ阳性表达细胞(786-0 细胞与 HeLa 细胞)和阴性表达细胞(BxPC-3 细胞)的移植瘤组织结合情况 (激光共聚集显微镜)

3 讨论

恶性肿瘤严重影响人类的生命健康,据全国肿瘤登记中心统计,全国每年恶性肿瘤的发生率与致死率不断上升,早期诊断和及时治疗对于提高肿瘤患者生存质量和改善患者预后具有极为重要的价值[3-4]。由于常规的医学影像技术尚不能在组织发生解剖结构改变之前检测出恶性肿瘤的分子表达改变,因此肿瘤的早期诊断和特异性显像一直是近年来医学影像学研究的热点和难点,分子影像学的出现为早期发现恶性肿瘤分子表达改变提供了一种新方法和希望,其主要包括核素分子影像、磁共振分子影像、超声分子影像等[5]。其中,超声分子影像学是分子影像学的重要组成部分,目前用于肿瘤超声分子影像学的特异性靶点主要局限在血管内,如血管内皮生长因子受体-2(vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR-2),只能实现肿瘤组织血池内显像,不能穿过肿瘤血管壁,到达肿瘤组织,实现肿瘤实质细胞特异性超声显像[6]。同时这些靶点不具有肿瘤特异性,如 VEGFR-2 在炎症反应时其表达量也会增加,故针对 VEGFR-2 的超声造影剂也能显著增强炎症组织显像效果,但尚不能真正实现肿瘤组织的特异性超声分子显像[7]。实现肿瘤分子显像的基础和关键环节是选择能与恶性肿瘤细胞特异性结合的靶点,在此基础上才能构建出特异性强、性能稳定的靶向分子探针。

恶性肿瘤由于组织高密度生长,易发生缺氧,导致缺氧诱导因子-1 表达,进而多种实体恶性肿瘤组织的实质细胞膜上均高表达 CAⅨ,而其在大多数正常组织中不表达[8]。同时 CAⅨ胞外蛋白多糖区是其特有结构,有利于携载针对 CAⅨ蛋白多糖区抗体的造影剂和药物直接特异性靶向结合恶性肿瘤细胞,而不会与正常组织细胞结合,故 CAⅨ是恶性肿瘤靶向治疗和分子显像中理想靶点,因此本研究选择 CAⅨ作为恶性肿瘤的特异性靶点,合成并研究能与 CAⅨ蛋白多糖区特异性靶向结合的配体。

目前,有多种配体可与 CAⅨ蛋白多糖区发生特异性结合,包括单克隆抗体 M75、G250,重组合成的抗体片段 A3 和 CC7,多肽 CaⅨ-P1[9-11]。其中,抗 CAⅨ单克隆抗体已进入临床试验阶段,如^{124}I 标记的嵌合单克隆抗体 cG250 诊断肾透明细胞癌的灵敏度和特异性分别达到 94% 和 100%,同时 cG250 可作为抗体药物,延长肾癌患者生存时间[12]。然而,单克隆抗体具有相对分子质量大、免疫原性高等缺点,因此严重限制了其作为靶向配体在肿瘤特异性显像和治疗中的深入

研究。与传统的单克隆抗体相比,多肽分子具有相对分子质量低、选择性与特异性高、细胞渗透性强、易于修饰且不影响多肽自身特性、免疫原性低等优点,是分子影像学中理想配体[13]。目前,靶向于肿瘤血管的携载 VEGFR-2 多肽分子的超声造影剂(BR55)已用于二期临床试验,其能使丰富、紊乱的肿瘤血管特异性显像,表明以多肽为配体的靶向超声造影剂具有较好的临床应用前景[14]。结合上述研究进展,我们选择 CAⅨ作为肿瘤细胞靶点,多肽 PGLR-P1 作为 CAⅨ的靶向配体,通过免疫荧光法进一步发现生物素化的 PGLR-P1 特异性靶向结合 CAⅨ表达阳性的 786-0 和 HeLa 细胞及其相应移植瘤组织,且与 CAⅨ表达阴性的 BxPC-3 细胞及其移植瘤组织无结合能力,进而证实多肽 PGLR-P1 靶向结合 CAⅨ表达阳性肿瘤细胞和肿瘤组织。同时我们制备了携载多肽的靶向纳米泡和空白纳米泡,发现携载多肽的靶向纳米泡能特异靶向聚集在 CAⅨ表达阳性的肿瘤细胞周围,即连接到超声纳米泡表面后未明显改变多肽 PGLR-P1 对 CAⅨ的亲和力,故其可作为恶性肿瘤超声分子影像学中的特异性配体,携载多肽 PGLR-P1 的靶向纳米泡可作为恶性肿瘤早期靶向诊断的一种新型靶向超声造影剂。

总之,我们通过化学合成的方法合成多肽 PGLR-P1,并在体内外多水平探讨其与 CAⅨ蛋白、CAⅨ表达阳性细胞以及相应移植瘤组织特异性靶向结合的能力,且初步探讨携载 CAⅨ多肽靶向纳米泡的体外寻靶能力。然而本研究也存在不足,比如虽然酶联免疫吸附实验和细胞免疫荧光定性证实了多肽 PGLR-P1 靶向特异性,但是未进一步量化其与 CAⅨ的亲和力。下一步,我们将研究携载多肽的靶向纳米泡的基本物理特点以及其在体内的靶向显像能力,实现恶性肿瘤实质细胞的超声分子显像。

参考文献:

[1] Tafreshi N K, Lloyd M C, Bui M M, *et al*. Carbonic anhydrase Ⅸ as an imaging and therapeutic target for tumors and metastases[J]. Subcell Biochem, 2014, 75: 221 - 254. DOI: 10.1007/978-94-007-7359-2_12

[2] Rana S, Nissen F, Lindner T, *et al*. Screening of a novel peptide targeting the proteoglycan-like region of human carbonic anhydrase Ⅸ[J]. Mol Imaging, 2013, 12(8): 1 - 12. DOI: 10.2310/7290.2013.00066

[3] Chen W, Zheng R, Zeng H, *et al*. Annual report on status of cancer in China, 2011[J]. Chin J Cancer Res, 2015, 27(1): 2 - 12. DOI: 10.3978/j.issn.1000-9604.2015.01.06

[4] Chen W, Zheng R, Baade P D, *et al*. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115 - 132. DOI: 10.3322/caac.21338

[5] 范校周, 郭燕丽, 涂追, 等. 前列腺特异性膜抗原胞外区的真核表达及其纳米抗体的淘选[J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(21): 2320 - 2324. DOI: 10.16016/j.1000-5404.2013.21.012

[6] Wang H, Kaneko O F, Tian L, *et al*. Three-dimensional ultrasound molecular imaging of angiogenesis in colon cancer using a clinical matrix array ultrasound transducer[J]. Invest Radiol, 2015, 50(5): 322 - 329. DOI: 10.1097/rli.0000000000000128

[7] Varga A, Gyulavari P, Greff Z, *et al*. Targeting vascular endothelial growth factor receptor 2 and protein kinase D1 related pathways by a multiple kinase inhibitor in angiogenesis and inflammation related processes *in vitro*[J]. PLoS One, 2015, 10(4): e0124234. DOI: 10.1371/journal.pone.0124234

[8] Mahon B P, Pinard M A, McKenna R. Targeting carbonic anhydrase Ⅸ activity and expression[J]. Molecules, 2015, 20(2): 2323 - 2348. DOI: 10.3390/molecules20022323

[9] Ng H L, Lu A, Lin G, *et al*. The potential of liposomes with carbonic anhydrase Ⅸ to deliver anticancer ingredients to cancer cells *in vivo*[J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(1): 230 - 255. DOI: 10.3390/ijms16010230

[10] Al-Ahmadie H A, Alden D, Qin L X, *et al*. Carbonic anhydrase Ⅸ expression in clear cell renal cell carcinoma: an immunohistochemical study comparing 2 antibodies[J]. Am J Surg Pathol, 2008, 32(3): 377 - 382. DOI: 10.1097/PAS.0b013e3181570343

[11] Askoxylakis V, Garcia-Boy R, Rana S, *et al*. A new peptide ligand for targeting human carbonic anhydrase Ⅸ, identified through the phage display technology[J]. PLoS One, 2010, 5(12): e15962. DOI: 10.1371/journal.pone.0015962

[12] Pastorek J, Pastorekova S. Hypoxia-induced carbonic anhydrase Ⅸ as a target for cancer therapy: from biology to clinical use[J]. Semin Cancer Biol, 2015, 31: 52 - 64. DOI: 10.1016/j.semcancer.2014.08.002

[13] Liu J, Liu J, Xu H, *et al*. Novel tumor-targeting, self-assembling peptide nanofiber as a carrier for effective curcumin delivery[J]. Int J Nanomedicine, 2014, 9: 197 - 207. DOI: 10.2147/IJN.S55875

[14] van-Rooij T, Daeichin V, Skachkov I, *et al*. Targeted ultrasound contrast agents for ultrasound molecular imaging and therapy[J]. Int J Hyperthermia, 2015, 31(2): 90 - 106. DOI: 10.3109/02656736.2014.997809

(收稿:2016-01-28;修回:2016-04-15)

(编辑 汪勤俭)