P-糖蛋白结合肽的筛选及合成肽鉴定

王祥卫,张远宁,叶 钢,周 锋 (第三军医大学新桥医院泌尿外科,重庆 400037)

[摘 要] **目的** 筛选人膀胱癌 P-糖蛋白特异性结合肽并合成鉴定。**方法** 利用表达获得的 P-糖蛋白胞外段融合蛋白为靶蛋白,采用酶联板法筛选噬菌体随机 12 肽库,化学合成该特异性肽序列,免疫细胞化学方法进行鉴定。**结果** 从噬菌体随机肽库中筛选获得了与 P-糖蛋白特异性结合的噬菌体阳性克隆,测序获得特异性结合肽序列。免疫细胞化学结果显示特异性合成肽可与耐药细胞 BIU-87/ADM 结合,而与敏感细胞 BIU-87 不结合。**结论** 筛选获得的结合肽具有一定的亲和力,可与特定的肿瘤细胞结合,表现出一定的肿瘤特异性;P-糖蛋白结合肽的筛选,为人膀胱癌多药耐药的靶向治疗结论提供实验依据。

[关键词] 多药耐药;P-糖蛋白;结合肽;噬菌体随机 12 肽库

[中图分类号] R967 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2009)06-0374-03

Screening and synthesis of specific peptide to P-glycoprotein

WANG Xiang-wei, ZHANG Yuan-ning, YE Gang, ZHOU Feng (Department of Urology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To screen and identify peptide specific to P-glycoprotein. **Methods** The fused P-glycoprotein was used as target to biospan its binding peptide with enzyme-linked plate assay in phage random 12 peptide library, synthesis of peptide specific to P-glycoprotein and immunocytochemical staining in BIU-87/ADM and BIU-87 cells was done to identify the posive phage clones. **Results** Peptide specific binding to P-glycoprotein was acquired after biospanning. The inserted sequence of the peptide was identified by sequencing analyses. Immunocytochemical staining results revealed that the binding only occurred in MDR cells BIU-87/ADM, not in sensitive cells BIU-87. **Conclusion** It indicates that this kind of binding exerts its affinity and specificity to MDR cells. The biospanning of peptide provides a base for the targeted reversal of multidrug resistance in human bladder cancer.

Keywords: multidrug-resistance; P-glycoprotein; binding peptide; phage random 12 peptide library

P-糖蛋白广泛表达于膀胱癌耐药细胞表面,将细胞内的化疗药物泵出细胞外,导致肿瘤细胞出现多药耐药性(MDR)[1-2]。肿瘤细胞多药耐药的靶向逆转的关键,是寻找特异性的靶向性载体。近年来,噬菌体随机肽库技术[2]的发展为筛选肽类小分子导向工具提供了机会。噬菌体随机肽库容量极大,易于筛选和扩增。通过亲和筛选,可以得到具有较高特异性和亲和力的理想目的肽段。我们利用表达获得的 GST-Pgp 融合蛋白[3],筛选噬菌体随机 12 肽库,获得特异性结合肽,化学合成该肽序列,进行了鉴定。报告如下。

1 材料与方法

1.1 试剂

Ph. D. -12™肽库(New England Biolabs)为展示在噬菌体 p Ⅲ蛋白 N 端的 12 肽库,由北京军事医学科学院肿瘤分子生物室张立新博士惠赠。-96 g Ⅲ测序引物:5'-CCC TCA TAG TTA GCG TAA CG -3',由大连 TaKaRa 公司合成。HRP/AntiM13 单抗为 amercham pharmacia biotech 产品;GST-Pgp 融合蛋白由本室制备;免疫组化试剂盒为 DAKO 产品;其它试剂均为国产分析纯或化学纯。Bio-NP-12 肽由上海生工合成。

1.2 方法

人膀胱癌移行上皮细胞系 BIU-87 由北京大学泌尿外科研究所惠赠。耐药细胞系 BIU-87/ADM 由我科建立。参照肽库说明,将待测噬菌体按梯度稀释测定滴度。噬菌体滴度 = 蓝斑数 × 稀释度 × 10^2(pfu/mL)。采用酶联板法[5],进行 4 轮筛选。最后一轮筛选中,TBST 中 Tween-20 的浓度提高到 0.5%(V/V)。挑取单个第 4 轮洗脱液测定滴度后的蓝斑,进行扩增。将 GST-Pgp、GST 包被拆酶标板过夜,分别依次加入一抗(噬菌体)和二抗(HRP/抗 M13 噬菌体单抗),最后显色,测定 OD_{450}。测序模板的快速纯化参照肽库说明进行。沉淀重悬于 30μl TE,送测序。根据测序结果,人工合成生物素标记的 P-糖蛋白结合 12 肽(Bio-NP-12):NDGLLFTWQPSP(上海生工)。培养的肿瘤细胞 BIU-87/ADM 和 BIU-87 多聚甲醛室温固定 20 min,4 ℃保存;按试剂盒说明,加入 Bio-NP-12,最后加亲和素-生物素-辣根过氧化物酶试剂,蒸馏水终止显色。脱水,透明,树胶封片。

2 结果

经 4 轮淘洗,噬菌体克隆获得有效的富集,第 4 轮的洗脱液滴度达到 8.6×10^7 pfu/mL,与第 1 轮相比(8×10^5 pfu/mL),

[基金项目] 重庆市自然科学基金项目(2006BB5084)

[作者简介] 王祥卫(1969-),男,山东省济南市人,副主任医师,副教授,博士后,主要从事泌尿肿瘤方面的研究。电话:(023)68774624,E-mail: winn0324@sohu.com

[收稿日期] 2009-08-10 [修回日期] 2009-09-12

富集达107倍。分别从四轮筛选后测定滴度的平板上随机挑取200个蓝斑进行扩增,进行ELISA分析。从上述筛选获得的噬菌体克隆中挑选GST-Pgp吸光度A_{450}/GST A_{450}>2.5者,共获得8个阳性克隆。挑选从上述筛选获得的噬菌体克隆,扩增后提取噬菌体ssDNA,进行插入肽的DNA序列测定。序列分析的结果表明,8个噬菌体克隆插入肽的DNA序列完全一致,按照肽库说明书给出的遗传密码,推导出插入肽的氨基酸序列:NDGLLFTWQPSP。合成肽相应的质谱图及纯度分析的HPLC色谱图结果表明,多肽序列:Biotin- NDGLLFTWQPSP,分子量:1 600.83,纯度大于96.33%。应用免疫细胞化学染色方法,分别检测Bio-NP-12肽与人膀胱癌敏感细胞及多药耐药细胞系的结合情况(图1、图2),结果表明:BIU-87/ADM细胞胞膜呈现阳性着色,而BIU-87细胞胞膜未见着色。说明这种结合具有一定的肿瘤特异性。



图1 BIU-87/ADM细胞Bio-NP-12免疫细胞化学染色结果(20×20)



图2 BIU-87细胞Bio-NP-12免疫细胞化学染色结果(苏木素复染,20×20)

3 讨论

噬菌体展示技术是以经改建的噬菌体为载体,将外源性基因插入到这些噬菌体编码外壳蛋白pⅢ或pVⅢ的末端构成融合蛋白呈现在噬菌体表面,外源基因可在噬菌体表面有效地表达,可以采用亲和筛选法,筛选表达特异肽序列的噬菌体,并可通过测定噬菌体单链DNA顺序,推导出所融合外源基因的氨基酸序列[4]。噬菌体随机肽库就是噬菌体展示技术的具体应用。噬菌体随机肽库的主要优势在于可筛选大量的噬菌体克隆,一般可筛选含大于10^9不同的序列的克隆,且扩增方便,操作较为容易。目前噬菌体随机肽库主要用于表位筛选、疫苗制备、蛋白作用底物或配体确定、分离与鉴定特异抗原模拟肽和新型生物活性肽的筛选等[5]。

本研究所选用的噬菌体肽库为12肽库,含有1.9×10^9个随机12肽序列,噬菌体表面所有5个拷贝pⅢ蛋白上都展示有随机多肽。多肽与pⅢ蛋白融合而不是与pVⅢ蛋白融合,有利于筛选到高亲和力的结合肽。一般认为,表达在pⅢ衣壳蛋白表面的肽库较容易筛选到亲和力较强的结合位点。与7肽库相比,12肽可折叠成短的结构单元,在筛选到线性结合肽的同时,也有可能得到具有一定结构单元的结合肽。应用融合蛋白从肽库中筛选结合肽的方法存在的问题是,GST可能影响所筛选到的结合肽的专一性,就是说所得到的结合肽不一定是针对目标蛋白,也有可能是针对GST。因此,本研究在筛选中增加GST预吸附噬菌体肽库的步骤,将可能存在的GST结合肽去除,以提高结合的专一性。

特异性的噬菌体克隆在每轮筛选及扩增中得到选择性富集,是筛库成功的关键。在此过程中应注意富集效果和筛选强度。本研究以富集指数(即筛选中,洗脱下来的噬菌体克隆与上一轮洗脱液的噬菌体克隆数之比)作为监测富集效果的指标,观察噬菌体克隆富集情况,最后获得了较理想的结果。本研究在筛选过程中逐轮降低靶蛋白(GST-P-gp)用量和增加洗涤强度,充分保证第一轮筛选最大限度地得到具有结合活性的阳性噬菌体,而在以后的筛选中逐渐淘筛出结合力最强的噬菌体。

由于噬菌体多肽库具有庞大的多样性,而筛选配基又为大分子,因此不难想象,可能会有多种多样的多肽可与筛选配基中的不同部位结合。但是,目前的研究显示,筛选配基中能与多肽结合的位点仅有数个,因此与想象的情况并不一致。更重要的是,这些位点通常都是筛选配基与其配体的结合部位或活性位点。可能因为以下几点:①蛋白质与蛋白质之间的相互作用需要两个蛋白质分子的整体空间构形的识别和嵌合;实际上两个分子间少数几个关键性残基(例如3~10个)弱相互作用提供了结合能的绝大部分,而含有与结合有关的几个关键性残基的短肽就可以模拟蛋白质上的结合位点[12]。②将多肽牵引至靶蛋白的力量之

一来自于将水分子从靶分子的沟槽中取代出来，这些沟槽主要存在于受体与配体的结合位点或活性部位[13]。③亲和筛选中回收的噬菌体均是与筛选配基结合牢固且能耐受漂洗过程的噬菌体。因此，通过筛选所获得的结合肽具有一定的特异性和亲和力。

筛选出的结合肽种类较少，可能的原因是：①由于P-糖蛋白胞外段分子较小，其蛋白序列中的免疫活性表位可能较少；②随筛选轮次的增加，使筛选到序列完全一致的肽的几率增加；③所用肽库经过几次扩增，可能使其中的某些序列丢失。

亲和筛选中，即使经过多轮筛选，也不能排除非特异性噬菌体克隆的存在，因而进一步挑取单个克隆，确定它与筛选配基的特异性吸附是实验必不可少的步骤。通常采用的确定阳性克隆的方法有：micropanning、ELISA、噬斑分析及膜印实验等[14]；其中，ELISA能半定量测定筛选配基与噬菌体克隆间的结合常数，是最为常用的方法。实验中，我们应用该方法筛选阳性克隆，采用不含P-糖蛋白的GST蛋白作为对照，以GST-Pgp A_{450}/GST A_{450} >2.5作为阳性结果判定标准，避免了由于噬菌体用量过大所可能造成的假阳性，所获得的实验结果较为可靠。本研究Bio-NP-12肽免疫细胞化学分析结果表明，筛选获得的结合肽具有一定的亲和力，可与特定的肿瘤细胞结合，表现出一定的肿瘤特异性。

P-糖蛋白特异性结合肽的筛选，为人膀胱癌多药耐药的靶向逆转研究提供了导向载体。可以利用该合成短肽，联接化疗敏感药物或毒素，进行膀胱灌注给药，这样在获得治疗效果的同时，可避免对正常膀胱粘膜细胞的损伤。另外，通过构建重组P-糖蛋白结合肽免疫毒素，能更有效的应用于多药耐药的靶向逆转。

[参考文献]

[1] Sonneveld P, List AF. Chemotherapy resistance in acute myeloid leukaemia[J]. Best Pract Res Clin Haematol, 2001, 14(1): 211-233.

[2] Brown CK, Modzelewski RA, Johnson CS, et al. A novel approach for the identification of unique tumor vasculature binding peptides using an E. coli peptide display library[J]. AnnSurgOncol, 2000, 7(10): 743-749.

[3] 王祥卫，杨唐俊，张立新. P-糖蛋白胞外段的高效表达[J]. 中华泌尿外科杂志，2002，23(9)：565-567.

[4] Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on virion surface[J]. Science, 1985, 228(4705): 1315-1317.

[5] Romagnoli G, Poloni F, Flego M, et al. Epitope mapping of the monoclonal antibody MM12.10 to external MDR1 P-glycoprotein domain by synthetic peptide scanning and phage display technologies[J]. Biol Chem, 1999, 380(5): 553.

[6] 汪 云，肖 岚，吕凤林. HPV18E2蛋白CTL表位多肽的构建与表达[J]. 局解手术学杂志，2007，16(6)：376-378.

[7] Devlin JJ, Panganiban LC, Devlin PE, et al. Random peptide library: a source of specific protein binding molecule[J]. Science 1990, 249(4967): 404-406.

[8] Zhu Z, Ming Y, Sun B. Identification of epitopes of trichosanthin by phage peptide library[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 282(4): 921-927.

[9] Ohkubo S, Miyadera K, Sugimoto Y, et al. Substrate phage as a tool to identify novel substrate sequences of proteases[J]. Comb Chem High Throughput Screen, 2001, 4(7): 573-583.

[10] Pasqualini R. Vascular targeting with phage peptide libraries[J]. Q J Nucl Med, 1999, 43(2): 159-162。

[11] Szardenings M. Phage display selection on whole cells yields a peptide specific for melanocortin receptor 1[J]. J Biol Chem' 1997, 272(44): 27943-27948.

[12] Wells JA. Binding in the growth hormone receptor complex[J]. Proc Natl Acd Sci USA, 1996, 93(1): 1-6.

[13] Ring D. What makes a binding site. [J] Curr Opin Struct Biol, 1995, 5(2): 825-829.

[14] Cook AD, Davies JM, Myers MA, et al. Mimotopes identified by phage display for the monoclonal antibody CII-C1 to type II collagen[J]. J Autoimmun, 1998, 11(3): 205-11.

（编辑：左艳芳）

（上接第373页）

[3] Kvinlaug BT, Huntly BJ. Targeting cancer stem cells[J]. Expert Opin Ther Targets, 2007, 11(7): 915-927.

[4] Hermann PC, Huber SL, Herrler T, et al. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer[J]. Cell Stem Cell, 2007, 1(3): 313-323.

[5] Winton T, Livingston R, Johnson D, et al. Vinorelbine plus cisplatin vs. observation in resected non-small-cell lung cancer[J]. N Engl J Med, 2005, 352(25): 2589-2597.

[6] Reckamp KL, Figlin RA, Burdick MD, et al. CXCR4 expression on circulating pan-cytokeratin positive cells is associated with survival in patients with advanced non-small cell lung cancer[J]. BMC Cancer, 2009, 9: 213-221.

[7] Giulia Bertolini, Luca Roz, Paola Perego, et al. Highly tumorigenic lung cancer CD133+ cells display stem-like features and are spared by cisplatin treatment[J]. PNAS, 2009, 106(38): 16281-16286.

[8] Ho MM, Ng AV, Lam S, et al. Side population in human lung cancer cell lines and tumors is enriched with stem-like cancer cells[J]. Cancer Res, 2007, 67(10): 4827-4833.

[9] Bendall SC, Stwartm H, Menendez P, et al. IGF and FGF cooperatively establish the regulatory stem cell niche of p luripotent human cells in vitro[J]. Nature, 2007, 448 (7157): 1015-1021.

[10] 董强刚，姚 明，耿 沁，等. 人肺腺癌干细胞的分离及鉴定[J]. 肿瘤，2008，28(1)：1-7.

（编辑：左艳芳）