恶性肿瘤的诊断与治疗 文章编号：0253-3626（2011）05-0513-04

人乳腺癌细胞特异性多肽跨膜转导机制初步研究

缪延栋，陈 青，高嫦娥，刘为青，熊秋霞，耿计伟，李秋恬，李 臣，董 坚
（昆明医学院第一附属医院生物治疗中心，昆明 650032）

【摘 要】目的：初步探讨人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 特异性多肽 PI 的跨膜转导机制。方法：合成 PI 肽链，并在其 N 端进行 FITC 标记；探讨 FITC-PI 的跨膜转导与 MHC-Ⅰ表达的关系，利用 MHC-Ⅰ抗体阻断 MDA-MB-231 细胞和 Calu-1 细胞表面 MHC-Ⅰ抗原，聚合酶链反应-序列特异性引物法进行基因分析；探讨 FITC-PI 的跨膜转导是否与小窝蛋白介导的内吞有关，抑制剂制霉菌素与 MDA-MB-231 细胞共培养，荧光显微镜观察以及流式细胞仪检测细胞内 FITC-PI 分布情况；探讨 FITC-PI 跨膜转导是否与 2 株细胞表面相同的膜蛋白有关系，膜蛋白提取试剂盒分别提取 2 株细胞膜蛋白，双向电泳对其进行差异性分析。结果：MHC-Ⅰ抗体阻断后，2 株细胞内仍可见 FITC-PI 分布，基因位点分析显示 2 株细胞 HLA-A、B 位点等位基因不同；加入制霉菌素后，镜下观察及流式细胞仪检测均显示 FITC-PI 分布减少；双向电泳初步分析 2 株细胞膜蛋白图谱共有 11 个相同的蛋白点。结论：PI 的跨膜转导机制不单一，其一，部分由小窝蛋白介导的内吞机制，其二，可能与 2 株细胞表面相同的膜蛋白有关系，此研究为将来继续探讨其跨膜转导机制奠定了实验基础和理论依据。

【关键词】细胞穿透肽；乳腺癌；HLA；跨膜转导
【中国图书分类法分类号】R737.9 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-02-20

Transmembrane transduction mechanism of a peptide with high affinity to human breast cancer

MIAO Yan-dong, CHEN Qing, GAO Chang-e, LIU Wei-qing, XIONG Qiu-xia, GENG Ji-wei, LI Qiu-tian, LI Chen, DONG Jian
(*Biotherapy Center, the First Affiliated Hospital, Kunming Medical College*)

【Abstract】*Objective*: To investigate transmembrane transduction mechanism of a peptide (PI) with high affinity to human breast cancer cell line MDA-MB-231. *Methods*: PI was synthesized and labeled with FITC at its N-terminus. The MHC-I antigen in the MDA-MB-231 cells and human lung cancer Calu-1 cells was blocked using anti-MHC-Ⅰ antibody, respectively. HLA- allele analysis was performed by polymerase chain reaction-sequence specific primers. To investigate whether the transmembrane transduction mechanism of PI is associated with the caveolin-mediated endocytosis, the distribution of FITC-PI in MDA-MB-231 cells were detected using inverted fluorescence microscope and flow cytometry after pre-incubation with an inhibitor of endocytosis, nystatin. To investigate whether the transmembrane transduction mechanism of PI is associated with the same membrane protein of the two cell lines, the membrane proteins were detected by two-dimensional electrophoresis. *Results*: FITC-PI was observed in the two cells with MHC-Ⅰ antigen being blocked. Gene typing-analysis revealed that the alleles of the HLA-A and B locis were different. The inhibitor nystatin suppressed FITC-PI distribution. Two-dimensional electrophoresis analysis showed that membrane protein profiles of the two cell lines had 11 same protein spots. *Conclusions*: The transduction of PI is mediated by the caveolin-mediated endocytosis. The same proteins of the two cell lines may be also involved in this process. This study provides experimental evidence for further investigation of the transmembrane transduction mechanism.

【Key words】cell penetrating peptide; breast cancer; HLA; transmembrane transduction

近十多年来，研究者们陆续发现了一些具有穿透细胞膜和（或）核膜的氨基酸序列，长度多数小于 30 个氨基酸的多肽分子，它们可以携带多种物质进行细胞间或细胞内传递，并且不受细胞类型的限制被命名为细胞穿透肽（Cell penetrating peptide，CPP）[1]。目前研究认为 CPP 介导的细胞内转运过程存在多种机制[2,3]，其中包括巨吞饮、网格蛋白介导的内吞以及小窝蛋白介导的内吞机制等[4]，同时也有相关报道称，一些细胞外大分子，比如 tat、病毒 SV40 都是通过小窝蛋白介导的内吞机制进入细胞，制霉菌素是此内吞途径的抑制剂[5,6]。

前期的研究中我们利用表达 108 多肽序列的 pC89 噬菌体肽库与人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 共培养筛选出 1 条肿

作者介绍：缪延栋（1984-），男，硕士，
研究方向：肿瘤基础及临床研究。
通信作者：董 坚，女，教授，Email:dongjian18@yahoo.com。
基金项目：国家自然科学基金资助项目（编号：30860330）；科技条件平台建设（编号：2007DA006）。

瘤细胞特异性十一肽 CASPSGALRSC，我们将其命名为 PI[7]。其多肽序列以非极性疏水性氨基酸为主，碱性氨基酸所占比例少，此结构特点有别于传统的 CPP，其具体的跨膜转导机制尚不明确。在前期的研究中，我们发现 Calu-1 细胞与此多肽也具有亲和性。人类不同细胞表面大约有 1/(400~10 000)的 HLA 抗原分子相同[8]。此 2 株细胞表面是否存在相同的 MHC-Ⅰ抗原分子与 PI 的跨膜转导有关，2 株细胞表面是否有相同膜蛋白能特异性的结合 PI。

本研究拟定从 MHC-Ⅰ抗体阻断 2 株细胞表面 MHC-Ⅰ抗原分子，基因位点分析；观察抑制剂制霉菌素对 PI 转导效率的影响；双向电泳分析 2 株细胞膜蛋白的差异性这几方面初步探讨 PI 的跨膜转导机制。为以后进一步研究 PI 的特异性跨膜转导机制提供一定的理论依据及实验基础。

1 材料与方法

1.1 多肽序列合成

北京中科亚光生物科技有限公司合成 PI 序列，并在其 N 端进行 FITC 标记。多肽 FITC-Ahx-CASPSGALRSC 的合成采用手动固相 Fmoc 法，FITC 标记通过异硫氰酸荧光素与多肽 N 端的氨基直接反应实现，采用 HP1100 型（美国安捷伦公司）反相高效液相色谱仪对粗品进行纯化，MALDI-TOF 质谱进行化学结构鉴定。

1.2 细胞培养

MDA-MB-231 细胞采用完全 L-15 培养基（含 10%FBS，1%青霉素-链霉素双抗，1%L-谷氨酰胺）培养、Calu-1 细胞用完全 Macoy' 5A 培养基（含 10%FBS，1%青霉素-链霉素双抗，1%L-谷氨酰胺）培养，置于 37℃、5%CO_2 培养箱中培养，隔天更换培养液，待细胞铺满瓶底 80%以上按 1:2 比例传代。

1.3 MHC-Ⅰ抗体阻断试验

MDA-MB-231 细胞和 Calu-1 细胞，接种于 96 孔板。24 h 后更换相应的单培养基饥饿培养 6 h，更换相应的含 5% FBS 的培养基并且每孔加入 MHC-Ⅰ抗体（终浓度为 1.2 μg/ml），孵育 6 h 后加入 FITC-PI（终浓度为 1.2 μg/ml）继续共培养 6 h，PBS 清洗 3 次后在荧光显微镜下观察 FITC-PI 分布情况。

1.4 HLA CLASS-Ⅰ基因位点分析

MDA-MB-231 细胞和 Calu-1 细胞制备成单细胞悬液并提取 DNA，聚合酶链反应-序列特异性引物法低分辨基因分型试剂盒（HLA AB UNITRAY 试剂盒）扩增 HLA-A、B DNA 片段。聚合酶链反应体系、循环条件、操作方法均按所附说明。结果判断借助其提供的专用读板纸在凝胶成像仪和紫外灯判读并成像。

1.5 制霉菌素的毒性分析

制霉菌素溶于含 10%FBS L-15 培养基中，浓度分别为 50、100、150、200 nmol/ml，MDA-MB-231 细胞以（1×10^3 个/200 μl）密度接种于 96 孔板，每板加入以上不同浓度的制霉菌素。每一浓度设置 3 个复孔（对照孔不加制霉菌素）。每 1 d 测定 1 个 96 孔板，共 7 d，每孔中加入 20 μl MTT 溶液。孵育 4 h 后吸除培养液，每孔加入 200 μl DMSO 反复混匀直到结晶完全溶解，37℃孵育 5 min。多功能酶标仪检测 490 nm 处的吸光度值。OD 值取 3 孔平均值与各时间点绘制生长曲线。

1.6 制霉菌素抑制试验

MDA-MB-231 细胞接种于 24 孔板，第 2 天更换单 L-15 培养基饥饿培养 6 h。每孔加入制霉菌素（终浓度为 50 μg/ml）1 h 后，再加入 FITC-PI（终浓度 1.2 μg/ml）孵育 6 h，PBS 漂洗 3 遍，倒置荧光显微镜下观察。不加入 FITC-PI 和制霉菌素为空白组，不加入制霉菌素为阴性对照组，加入 FITC-TAT 和制霉菌素组为阳性对照组，分别将各组细胞制备成单细胞悬液，流式细胞仪进行检测。

1.7 双向电泳分析两株细胞膜蛋白

分别收集 MDA-MB-231 细胞和 Calu-1 细胞，加入膜蛋白提取试剂，超速离心（115 000 g，1 h，4℃），重悬膜蛋白沉淀，超纯水清洗 2 次，冰浴中超声处理后离心，吸取上清液，加入磷酸三丁酯室温放置 1 h，加入碘代乙酰胺室温放置 1.5 h，离心收集膜蛋白，Bradford 法测蛋白浓度，一向等点聚焦电泳，二向 SDS-PAGE 凝胶电泳，银染，图像扫描，PDQuest 7.0 软件进行图像分析。

2 结 果

2.1 MHC-Ⅰ抗体阻断实验

观察显示，空白对照组的细胞没有荧光分布；FITC-PI 与 MDA-MB-231 细胞，Calu-1 细胞共培养 6 h 后，FITC-PI 大部分位于胞质内，细胞核内没有分布，这与课题组先前得出结论相符；MHC-Ⅰ抗体封闭 2 株细胞表面的 MHC-Ⅰ抗原分子后显示胞质内 FITC-PI 分布与封闭前一致，提示 PI 的跨膜转导与细胞表面 MHC-Ⅰ抗原分子无关（图 1）。

2.2 HLA CLASS-Ⅰ基因位点分析

MDA-MB-231 细胞和 Calu-1 细胞的 HLA-A、B 基因位点分型结果（表 1），MDA-MB-231 细胞 A 位点检测出 6 个等位基因：*02:01、*02:02、*02:03、*024:02、*24:03、*24:04，B 位点检测出 6 个等位基因，*41:01、*41:03、*41:05、*40:02、*40:03、*40:04；Calu-1 细胞 A 位点检测出 6 个等位基因：*26:01、*26:02、*26:08、*29:01、*29:02、*29:03，B 位点检测出 6 个等位基因：*44:03、*44:04、*44:05、*15:01、*15:04、*15:27。2 株细胞 HLA-A、B 位点检测出的 24 个等位基因均不相同，提示 2 株细胞表面无等同的 HLA-Ⅰ类分子。

2.3 制霉菌素毒性分析

MDA-MB-231 细胞中加入不同浓度制霉菌素的生长曲线和对照组基本一致，提示浓度小于 200 nmol/ml 的制霉菌素对 MDA-MB-231 细胞无毒性。

2.4 制霉菌素抑制试验

观察显示，空白对照组细胞没有荧光分布，FITC-PI 与 MDA-MB-231 细胞共培养 6 h 后，FITC-PI 大部分位于胞质内，细胞核内没有分布，这与课题组先前得出结论相符；加入制霉菌素后胞质内 FITC-PI 分布减少；阳性对照组中 FITC-