

细胞选择性穿膜肽的穿膜效果研究

谭拥军[†],王坤,余雳,黄小芹,陈燕,谭桂湘

(湖南大学 生物学院,湖南 长沙 410082)

摘要:细胞穿膜肽是一类能够穿透细胞膜并且不损坏细胞膜结构的小分子多肽,该多肽一般由不多于 30 个氨基酸组成.针对 FITC 标记的具有肺癌或肝癌细胞选择性的两种穿膜肽,设置不同浓度梯度,分别处理多种肿瘤细胞,荧光显微镜下观察不同作用浓度下,细胞的荧光强度,并通过流式细胞仪检测含有荧光的细胞数.结果表明:两种细胞穿膜肽具有不同的细胞选择性.CPP33 在作用浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 时能观察到较强的荧光选择性,流式细胞仪检测含有荧光的细胞数约大于 50%,CPP44 在作用浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 时能观察到较强的荧光选择性,流式细胞仪检测含有荧光的细胞数约大于 60%.并且随着作用浓度的增加,两种细胞中含有荧光的细胞数不断上升.因此这种针对选择性肿瘤细胞的穿膜肽可能为小分子药物在体内的精确递送提供一种新的方法.

关键词:肿瘤选择性穿膜肽;肺癌;肝癌;浓度梯度;小分子药物

中图分类号:Q784

文献标志码:A

Transmembrane Delivery of Tumour Lineage-homing Cell-penetrating Peptides

TAN Yongjun[†], WANG Kun, YU Li, HUANG Xiaoqin, CHEN Yan, TAN Guixiang

(College of Biology, Hunan University, Changsha 410082, China)

Abstract: Cell penetrating peptides are small molecular peptides that can penetrate cell membranes without damaging the structure of cell membranes. These peptides are generally composed of no more than 30 amino acids. Two tumor lineage-homing cell-penetrating peptides labeled with FITC for lung cancer and liver cancer were synthesized and added to different kinds of tumor cells with different concentration gradients. The number of cells containing fluorescence was detected. The results approved that the two kinds of cell-penetrating peptides showed different cell selectivity. The fluorescence specificity of CPP33 was strong at the concentration of 10 $\mu\text{mol/L}$. The number of cells containing fluorescence was about 50% by Flow cytometer. The fluorescence specificity of CPP44 was strong at the concentration of 10 $\mu\text{mol/L}$. The number of cells containing fluorescence was about 60% by Flow cytometer. Moreover, the number of cells containing fluorescence increased with the increase of concentration respectively. In conclusion, these tumor lineage-homing cell-penetrating peptides may provide a new method for precise delivery of anticancer molecules in vivo.

Key words: tumor lineage-homing cell-penetrating peptides; lung cancer; liver cancer; concentration gradient; anticancer molecules

* 收稿日期:2018-02-18

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81472718), National Natural Science Foundation of China(81472718)

作者简介:谭拥军(1967—),男,湖南长沙人,湖南大学教授,博士生导师

[†] 通讯联系人, E-mail: yjtan@hnu.edu.cn

细胞穿膜肽 (cell penetrating peptides, CPPs) 是一类由氨基酸组成具有穿透细胞膜能力的小分子多肽, 其中氨基酸的个数一般不多于 30^[1-2]. CPPs 最早从 HIV-I 的 TAT 蛋白中发现, 该蛋白中包含具有穿膜能力的特殊肽段区域蛋白转导域 (protein transduction domains, PTD), 该区域是一个包含 13 个氨基酸可溶性肽段^[3-4]. 随着研究的深入, 细胞穿膜肽的数量不断增加.

CPPs 的分类有多种, 可以根据其来源或序列的不同分为不同的亚类^[5], 还可以依据肽链所含脯氨酸的多少分为富含脯氨酸和多脯氨酸两种^[6], 如 SAP, 该多肽中的脯氨酸含量高达 50%. 除此之外, 由于不同穿膜肽进入细胞后, 会引起细胞内 Ca²⁺ 的不同变化, 可以将细胞穿膜肽分为两亲性和非两亲性, 两亲性细胞穿膜肽会引起细胞内 Ca²⁺ 不同程度的提高, 而非两亲性细胞穿膜肽在转运过程中几乎不会对细胞内 Ca²⁺ 产生影响^[7]. 不同于普通的分类, 还有一种特殊类型的细胞穿膜肽, 该类穿膜肽由两条及以上的肽链组成, 如转运蛋白、PEVEC、MAP 和 PEP-1^[8].

近年来, CPPs 作为分子载体用于药物递送系统的应用已经越来越广泛. 通过融合的方法可以携带核酸^[9]、蛋白^[10]、小分子化合物^[11-12]、核磁共振成像载体^[13]等进入细胞. Meyer-Losic 等^[14]将人工合成的一种功能肽 DPV1047 Vectocell 与 SN38 通过物理混合的方式制成复合物, 通过对溶解性、毒性、稳定性的研究证明其具有很好的抗肿瘤作用, 并且在动物实验上取得明显的效果.

但由于大部分细胞穿膜肽没有选择性, 因此针对特定细胞的靶向治疗还停留在初级阶段. 并且现有的肿瘤细胞选择性穿膜肽也是建立通过把已知非选择性穿膜肽与识别细胞表面抗原的抗体^[15]连接或者与其它针对某种细胞的选择性分子形成复合物产生的, 这种连接不仅受到所连分子理化性质的限制, 对所针对的肿瘤细胞也具有一定的局限性. 近期 Kondo 等人^[16]通过 mRNA 展示技术构建多肽文库, 成功获得了肿瘤选择性细胞穿膜肽, 并利用合成的肿瘤选择性穿膜肽对比多种不同肿瘤验证了其选择性效果.

本文分别研究了肺癌细胞选择性穿膜肽 CPP33、肝癌细胞选择性穿膜肽 CPP44, 经 FITC 标

记后, 不同作用浓度下, 在肿瘤细胞 A549 和 HepG2 等五种不同细胞中的细胞选择性, 观察了不同浓度下细胞内的荧光强弱, 通过流式细胞仪分析了不同细胞中荧光的强度. 确认了 CPP33、CPP44 两种细胞穿膜肽具有明显的细胞选择性.

1 材料与方法

1.1 材料

乳腺癌细胞 MCF-7、肝癌细胞 HepG2、肺癌细胞 A549、宫颈癌细胞 HeLa、骨肉瘤细胞 U2OS 来源于 (American Type Culture Collection, ATCC), DMEM 培养基、1640 培养基以及血清均为 GIBCO 公司产品, Flow Cytometer 由 BECKMAN COULTER 公司提供. FITC 标记多肽由上海淘普生物科技有限公司合成, 序列信息如下:

CPP33: RLWMRWYSPRTRAYG

CPP44: KRPTMRFYRTWNP MK

1.2 方法

1.2.1 不同浓度肿瘤细胞选择性穿膜肽显微观察

在含有 MCF-7、HepG2、A549、HeLa、U2OS 5 种肿瘤细胞的 10 cm 培养盘中加入含 10% 胎牛血清 (Fetal Bovine Serum, FBS) 的 DMEM 培养液后将培养盘放入 37 °C 5%CO₂ 培养箱中培养, 待细胞密度长至 90% 时, 吸出培养液, 用 1X 无菌 PBS 漂洗两次, 每盘加入 1 mL 1X 胰酶放入培养箱中消化 2 min, 待细胞变圆脱落时, 加入 1 mL 含 10% FBS 的 DMEM 培养液轻轻吹打数次至单个细胞, 并用培养液配成单个细胞悬液, 以每孔 1.2×10⁶ 个细胞接种到 6 孔板中, 每孔总体积为 2 mL, 放入培养箱中培养.

在超净工作台中分别向 CPP33、CPP44 合成的多肽中分别加入 4.22 mL、4.16 mL 无菌 ddH₂O 将其稀释至 400 μmol/L. 待 6 孔板中的细胞密度长至 70% 时, 吸出培养液, 用无菌 PBS 漂洗两次, 按终浓度 2 μmol/L、5 μmol/L、10 μmol/L、20 μmol/L 设置浓度梯度, 用含 FBS 培养液按照上述浓度梯度稀释多肽加入到培养板中, 剩余 2 孔只加 2 mL 培养液用作对照, 放入培养箱中培养, 6 h 后观察细胞的荧光强度, 并以穿膜数超过 50% 为有效穿膜肽统计穿膜率.

1.2.2 流式细胞仪检测细胞荧光

按照上述方法培养细胞,待细胞密度长至 90% 时,每盘加入 1 mL 1X 胰酶放入培养箱中消化 2 min,待细胞变圆脱落时,加入 1 mL 含 10% FBS 的 DMEM 完全培养基轻轻吹打数次至单个细胞,并用培养液配成单个细胞悬液,以每孔 7×10^6 个细胞接种到 10 cm 培养盘中,每种细胞按照终浓度 $10 \mu\text{mol/L}$ 加入 FITC 标记的穿膜肽,6 h 后收集细胞。

吸去培养皿中的培养液,用无菌 PBS 漂洗两次,加入 1 mL 1X 胰酶,置于培养箱中消化 2 min,待细胞变圆脱落时,加入 1 mL 含 10% FBS 的 DMEM 完全培养基轻轻吹打数次至单个细胞。将细胞收集在 2 mL Eppendorf 管中, 4°C 条件下 $1\,000\text{ r/min}$ 离心 5 min,去除上清胰酶培养基混合物。加入 PBS 漂洗两次, 4°C , $1\,000\text{ r/min}$ 离心 5 min。加入 1 mL 无菌 PBS,使其细胞密度为 $1 \times 10^6/\text{mL}$,冰上存放用于流式检测,并取相同培养条件下,未加穿膜肽的细胞作对照。

流式分析,创建 Forward Scatter (FSC) vs. Side Scatter (SSC) 峰图,将对照样品放入“test”管,调节 FSC 和 SSC 电压使细胞集中于 FSC vs. SSC 峰图内。创建一个门(R1)包括所有的细胞,基于门(R1)创建 Fluorescence Channel 1 (FL1) vs. SSC 峰图,调节 FL1 PMT 电压值以便 DEAB“control”样品峰分布在 102 内。取下对照样品,换上待检测样品,保持参数不变,出现在 102 以外的 Polt 即为含绿色荧光的细胞,分析约 100 000 个细胞,记录每种细胞中含绿色荧光的强度。

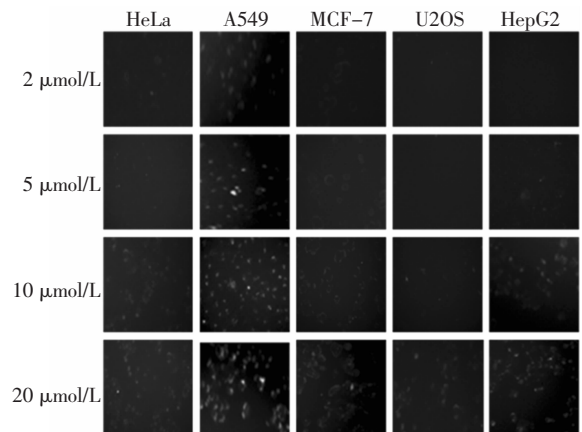
2 实验结果

2.1 不同浓度肿瘤细胞选择性穿膜肽显微分析

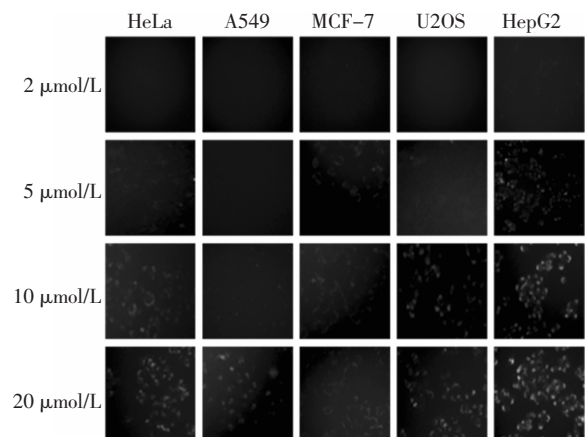
2.1.1 不同浓度肿瘤细胞选择性穿膜肽显微观察

对比两种肿瘤细胞选择性穿膜肽在 5 种不同肿瘤中的荧光强度。当肿瘤细胞浓度为 $2 \mu\text{mol/L}$ 时, CPP33, CPP44 在 5 种细胞中几乎没有荧光;当肿瘤细胞浓度为 $5 \mu\text{mol/L}$ 时,5 种细胞的荧光度有所提高,加有 CPP33 的细胞中, A549 细胞中的荧光强度最高;加有 CPP44 的细胞中, HepG2 细胞中的荧光强度最高,两种穿膜肽在两种细胞开始出现明显的选择性;当肿瘤细胞浓度为 $10 \mu\text{mol/L}$ 时, CPP33、CPP44 两种穿膜肽在两种细胞中的荧光强度提高明

显,而在其他细胞中的荧光强度仍然很低;当肿瘤细胞浓度增加大 $20 \mu\text{mol/L}$, CPP33、CPP44 两种穿膜肽在 A549、HepG2 两种细胞中的荧光强度有所增加,但增加幅度较 $10 \mu\text{mol/L}$ 时有所减少,并且其他细胞中的荧光强度也有不同幅度提高。如图 1 所示。



(a) 不同浓度 CPP33 在 5 种细胞中的荧光强度



(b) 不同浓度 CPP44 在 5 种细胞中的荧光强度

图 1 细胞选择性穿膜肽显微观察

Fig.1 Microscopic observation of tumour lineage-homing cell-penetrating peptides

2.1.2 不同浓度肿瘤细胞选择性穿膜肽荧光细胞计数

当肿瘤细胞浓度为 $2 \mu\text{mol/L}$ 时, CPP33 在 5 种细胞中的荧光度均低于 5%;当肿瘤细胞浓度为 $5 \mu\text{mol/L}$ 时,加有 CPP33 的细胞中, A549 细胞中的荧光强度最高大于 20%;当肿瘤细胞浓度为 $10 \mu\text{mol/L}$ 时, CPP33 在 A549 细胞中的荧光强度大于 50%;当肿瘤细胞浓度增加大 $20 \mu\text{mol/L}$, CPP33 在 A549 中的荧光强度约为 60%。如图 2(a)(b)(c)(d) 所示。当肿瘤细胞浓度为 $2 \mu\text{mol/L}$ 时, CPP33, CPP44 在 5

种细胞中的荧光强度均不超过 2%；当肿瘤细胞浓度为 5 μmol/L 时，加有 CPP44 的细胞中，HepG2 细胞中的荧光强度最强大于 10%；当肿瘤细胞浓度为 10 μmol/L 时，CPP44 在 HepG2 细胞中的荧光强度大于 50%；当肿瘤细胞浓度增加大 20 μmol/L 时，CPP33、CPP44 两种穿膜肽在 A549、HepG2 两种细胞中的荧光强度大于 70%。如图 2(e)(f)(g)(h)所示。

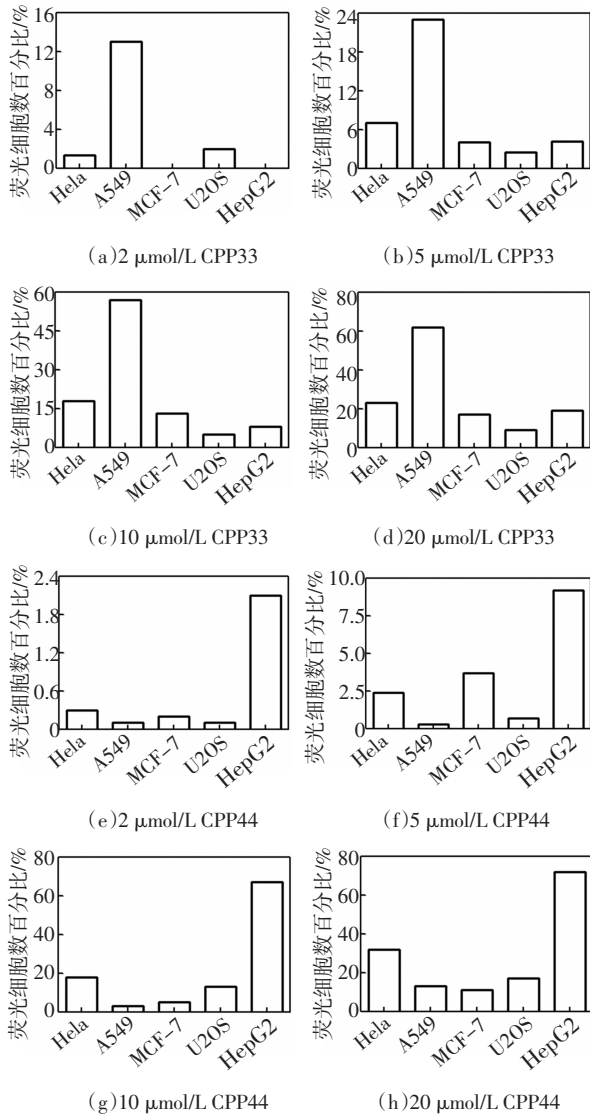


图 2 细胞选择性穿膜肽荧光细胞计数

Fig.2 Tumour lineage-homing cell-penetrating peptides fluorescent cell counting

2.2 流式细胞仪检测细胞荧光强度选择性

流式分析 10 μmol/L CPP33 处理 6 h 后，5 种细胞中 A549 细胞中的荧光强度最强，见图 3(b)，是其他 4 种细胞(HeLa、MCF-7、U2OS、HepG2)荧光强度的两倍，分别如图 3(a)(c)(d)(e)所示。同样，流式分

析 10 μmol/L CPP44 处理 6 h 后，5 种细胞中 HepG2 细胞中的荧光强度最强，见图 3(j)，是其他 4 种细胞(HeLa、A549、MCF-7、U2OS)荧光强度的两倍，分别如图 3(f)(g)(h)(i)所示。

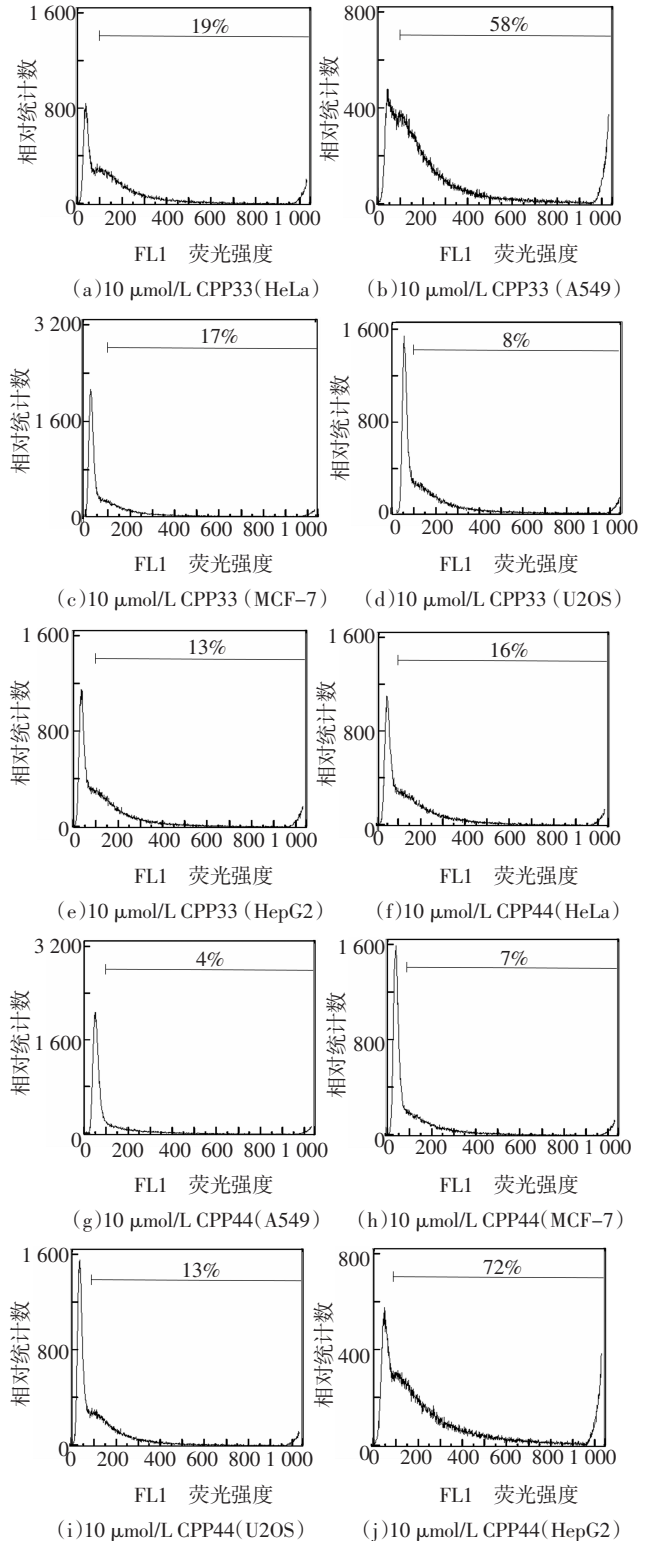


图 3 不同肿瘤细胞荧光强度选择性

Fig.3 Fluorescence intensity specificity of tumour lineage-homing cell-penetrating peptides

3 结论

本实验对两种不同肿瘤细胞选择性穿膜肽进行研究,运用不同细胞对比,发现 CPP33 穿膜肽能够有效穿过肺癌细胞 A549 的细胞膜进入细胞.同样, CPP44 穿膜肽能够有效穿过肝癌细胞 HepG2 的细胞膜进入细胞.两种穿膜肽均有较高肿瘤细胞选择性.

细胞穿膜肽作为有效的药物运输载体已经在临床有所运用,但由于细胞种类的多样性和每种细胞的复杂性,目前只有少数针对少数细胞的选择性穿膜肽被发现和应用,对于特殊细胞的穿膜肽的开发还处于初级阶段.相对于非选择性细胞穿膜肽, CPP33、CPP44 具有良好的细胞选择性,因此 CPP33、CPP44 可能成为有效的肿瘤选择性药物运输载体,这也为实现肿瘤细胞的靶向治疗提供了广阔的前景.

参考文献

- [1] ZHANG D, WANG J, XU D. Cell-penetrating peptides as noninvasive transmembrane vectors for the development of novel multi-functional drug-delivery systems [J]. *Journal of Controlled Release*, 2016, 229: 130—139.
- [2] BOLHASSANI A. Potential efficacy of cell-penetrating peptides for nucleic acid and drug delivery in cancer [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1816(2): 232—246.
- [3] VIVES E, BRODIN P, LEBLEU B. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(25): 16010—16017.
- [4] GUIDOTTI G, BRAMBILLA L, ROSSI D. Cell-penetrating peptides: from basic research to clinics [J]. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2017, 38(4): 406—424.
- [5] KOREN E, TORCHILIN V P. Cell-penetrating peptides: breaking through to the other side [J]. *Trends in Molecular Medicine*, 2012, 18(7): 385—393.
- [6] PUJALS S, SABIDO E, TARRAGO T, *et al.* All-D proline-rich cell-penetrating peptides: a preliminary in vivo internalization study [J]. *Biochemical Society Transactions*, 2007, 35 (Pt 4): 794—796.
- [7] LORENTS A, KODAVALI P K, OSKOLKOV N, *et al.* Cell-penetrating peptides split into two groups based on modulation of intracellular calcium concentration [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(20): 16880—16889.
- [8] PETRESCU A D, VESPA A, HUANG H, *et al.* Fluorescent sterols monitor cell penetrating peptide Pep-1 mediated uptake and intracellular targeting of cargo protein in living cells [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1788(2): 425—441.
- [9] BOISGUERIN P, DESHAYES S, GAIT M J, *et al.* Delivery of therapeutic oligonucleotides with cell penetrating peptides [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2015, 87: 52—67.
- [10] LIU J, GAJ T, PATTERSON J T, *et al.* Cell-penetrating peptide-mediated delivery of TALEN proteins via bioconjugation for genome engineering [J]. *Plos one*, 2014, 9(1): e85755.
- [11] LINDGREN M, ROSENTHAL-AIZMAN K, SAAR K, *et al.* Overcoming methotrexate resistance in breast cancer tumour cells by the use of a new cell-penetrating peptide [J]. *Biochemical Pharmacology*, 2006, 71(4): 416—425.
- [12] WANG F, WANG Y, ZHANG X, *et al.* Recent progress of cell-penetrating peptides as new carriers for intracellular cargo delivery [J]. *Journal of Controlled Release*, 2014, 174: 126—136.
- [13] LEWIN M, CARLESSO N, TUNG C H, *et al.* Tat peptide-derived magnetic nanoparticles allow in vivo tracking and recovery of progenitor cells [J]. *Nature Biotechnology*, 2000, 18(4): 410—414.
- [14] MEYER-LOSIC F, NICOLAZZI C, QUINONERO J, *et al.* DTS-108, a novel peptidic prodrug of SN38; in vivo efficacy and toxicokinetic studies [J]. *Clinical Cancer Research*, 2008, 14(7): 2145—2153.
- [15] TURCHICK A, HEGAN D C, JENSEN R B, *et al.* A cell-penetrating antibody inhibits human RAD51 via direct binding [J]. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(20): 11782—11799.
- [16] KONDO E, SAITO K, TASHIRO Y, *et al.* Tumour lineage-homing cell-penetrating peptides as anticancer molecular delivery systems [J]. *Nature Communications*, 2012, 3: 951.