

一种特异性识别非小细胞肺癌 A549 细胞的小分子肽*

郭琳琅^{1)**} 郭颖¹⁾ DERICK LAU²⁾ 许寅超¹⁾

(¹⁾南方医科大学珠江医院, 广州 510282; ²⁾ University of California at Davis Cancer Center, USA)

摘要 应用“一个珠子一个化合物”的组合化学肽库, 以期筛选得到特异性识别非小细胞肺癌细胞 (A549) 的小分子肽. 初次筛选共得到 29 个与 A549 阳性结合的珠子, 经氨基酸序列分析后发现含有 -NGXG- 肽链结构的序列共有 10 个. 选择 cNGQGEQc 作进一步的细胞特异性研究, 发现 cNGQGEQc 与非小细胞肺癌 A549、Calu-1 及 H178 的粘附特异性明显高于其他细胞系, 对 cNGQGEQc 的结构分析显示, -NGXG- 及六肽长度对小分子肽与 A549 细胞的粘附非常重要. 标记 FITC 的小分子肽 cNGQGEQc 能与 A549 细胞发生特异性结合. 用抗整合素的抗体 ($\alpha 1 \sim 6$, αv 和 $\beta 1 \sim 5$) 阻断小分子肽与 A549 细胞表面的相应受体结合, 结果显示, $\alpha 3$ 与 β 亚单位的任何组合均对 cNGQGEQc 与 A549 细胞的粘附有明显的阻断作用. 结果表明, 小分子肽 cNGQGEQc 是通过细胞表面整合素 $\alpha 3$ 与非小细胞肺癌 A549 发生特异性结合.

关键词 小分子肽, 组合化学, 非小细胞肺癌

学科分类号 Q516, R734.2

肺癌目前我国城市恶性肿瘤的发病中已居于首位, 且其发病率仍呈明显上升趋势. 肺癌患者的预后差, 平均存活时间仅为 1 年, 一方面是因为尚未建立早期、特异性的筛选或诊断方法, 患者在明确诊断后病程往往已发展至中、晚期, 部分已发生转移, 另一方面, 缺乏理想的治疗手段, 临床观察仅约 20% 的非小细胞肺癌患者对抗癌药物有一定疗效, 且副作用大, 对骨髓造血等重要脏器的功能有严重的抑制作用. 建立肺癌早期、特异性的诊断和治疗方法已成为临床肿瘤学亟需解决的重点问题之一. 尽管单克隆抗体仍是目前临床肿瘤诊断和治疗的主要研究课题之一, 但近年来, 小分子肽与单克隆抗体相比, 因其细胞穿透力强, 稳定性好而日益受到人们的重视, 有望成为肿瘤临床应用研究的一个崭新的方向^[1].

1991 年 Lam 等^[2, 3]提出并建立了“一个珠子一条肽链”的组合化学肽库技术. 利用该技术可同时为数万种肽链进行筛选, 筛选效率很高. 目前国外学者已成功筛选得到特异性识别不同瘤细胞的小分子肽^[4~7]. 本研究利用六肽组合化学肽库筛选能与非小细胞肺癌细胞 (A549) 粘附的小分子肽, 通过对其特异性和结构稳定性的分析, 从而得到特异性好

且稳定性强的小分子肽, 有望为非小细胞肺癌的特异性诊断及治疗提供新的方法.

1 材料与方法

1.1 组合化学肽库

组合化学肽库的设计是利用化学合成的方法把 20 种氨基酸随即合成在一种树脂胶的珠子上, 珠子直径 70~90 μm , 根据实验需要可以合成含有不同长度肽链的肽库, 本实验采用 6 个氨基酸长度的肽库. 理论上, 6 个氨基酸长度的肽库含有 $20^6 = 6.4 \times 10^7$ 种不同的小分子肽链. 具体实验原理和操作方法参见文献[2, 3].

1.2 细胞培养

本实验所用细胞株包括 A549 (肺腺癌), Calu-1 (肺鳞癌), H178 (肺腺鳞癌), DMS53 (小细胞肺癌), HBE (非肿瘤性支气管上皮细胞), PC-3 (前列腺癌), LuCap (前列腺癌), SKOV-3 (卵巢

* 广东省科技计划项目 (2002C5050107) 和广州市科技攻关项目 (2003Z2-E0061, E0063).

** 通讯联系人. Tel: 020-61643495, E-mail: linlangg@yahoo.com

收稿日期: 2007-02-27, 接受日期: 2007-04-02

癌), HT-29 (结肠癌细胞), Jurket (T 淋巴瘤细胞), K562 (白血病细胞), Raji (伯基特淋巴瘤) 均来自 The American Type Culture Collection (ATCC). HBE, Jurket, K562, LuCap 细胞使用 RPMI 培养液, 其他细胞系均使用 DMEM 培养液. 细胞置于 37℃, 5% CO₂ 的培养箱中培养.

1.3 小分子肽的筛选

吸取 200 μ l (约 15 000 个) 的小分子肽珠子, PBS 缓冲液和 70%乙醇各洗 3 次, 然后细胞培养液洗 2 次. 转移小分子肽珠子至 6 孔的细胞培养板 (约 5 000 个 / 孔). 用胰蛋白酶 /EDTA 消化细胞, 离心除去消化液, 加入 10 ml 的培养液重新使细胞悬浮, 每孔加入 0.5 ml 的细胞悬液. 摇动培养板, 使细胞和珠子充分混合, 然后置培养板于 37℃, 5% CO₂ 的培养箱中培养 48 h. 48 h 后, 在显微镜下挑选与细胞结合的阳性珠子, 以珠子上结合细胞的数量来判定细胞与小分子肽结合力的强弱, 评定标准设为: 珠子全被细胞包裹, 结合力为++++; 1/2~3/4 珠子表面有细胞粘附, 结合力为+++; 1/4~1/2 珠子表面有细胞粘附, 结合力为++; 小于 1/4 珠子的表面有细胞粘附, 结合力为+. 用 Guaniding/HCl (8.0 mol/L) 除去珠子表面细胞, 蒸馏水洗 3 次, 把珠子放在微小的滤膜上, 用氨基酸序列分析仪(Procise 494)分析珠子表面的小分子肽序列.

1.4 小分子肽的特异性分析

不同种类的细胞株分别与筛选得到的小分子肽珠子混合培养 48 h, 随机计数 100 个珠子, 计算并比较每种细胞与小分子肽的结合百分率, 以此评价筛选得到的小分子肽与细胞粘附结合的特异性.

1.5 小分子肽的结构稳定性分析

把小分子肽中的氨基酸分别用丙氨酸替代或分别删除小分子肽中每一种氨基酸, 得到不同的小分子肽, 然后把小分子肽珠子和 A549 细胞混合培养 48 h, 观察细胞与不同小分子肽珠子的粘附结合情况, 分析肽链的长度及特定氨基酸对小分子肽的粘附活性的影响.

1.6 免疫荧光染色

细胞准备包括: a. 胰蛋白酶消化上述培养细胞, 细胞离心机制备细胞涂片, 丙酮固定 10 min, 备用. b. 种植上述贴壁细胞于玻片上, 37℃, 5% CO₂ 的培养箱中培养 16 h. 免疫抗体包括一抗: 鼠抗人整合素 α 3 单克隆抗体 (Chemicon 公司, USA), 稀释度 1:100; 二抗: 山羊抗鼠 FITC-IgG

(Sigma 公司, USA), 稀释度 1:200. 一抗与上述备用细胞孵育, 室温 1 h, PBS 冲洗, 二抗孵育, 室温 30 min, PBS 冲洗, 封片. 标记 FITC 的小分子肽 cNGQGEQc 由美国加州大学 DAVIS 癌症中心 Lam 教授实验室合成和标记, 浓度为 0.4 mg/L, 与细胞孵育, 室温 1 h, PBS 冲洗, 封片. 激光共聚焦显微镜下观察.

1.7 A549 细胞表面与小分子肽粘附结合位点的确定

利用特异性抗细胞表面粘附分子整合素的单克隆抗体, 阻断小分子肽 cNGQGEQc 与 A549 细胞表面相关受体结合, 确定小分子肽与 A549 细胞的粘附位点. 阻断抗体有整合素 α 1~6, α v/ β 1~5 (Chemicon 公司, USA), 在 96 孔细胞培养板的 A1~7 孔中分别加入浓度为 1.5 mg/L 的抗 α 1、 α 2、 α 3、 α 4、 α 5、 α 6、 α v 抗体, B1~5 孔中分别加入抗 β 1、 β 2、 β 3、 β 4、 β 5 抗体, 因此, 在 A1B1 孔中含有抗 α 1 和 β 1 两种抗体, A1B2 孔中含有抗 α 1 和 β 2 两种抗体, 依次类推, 不同孔中即含有抗 α 和 β 两种抗体的不同组合. 然后加入 A549 细胞悬液, 摇动培养板, 使两者充分混合, 置细胞培养箱中孵育 10 min, 加入小分子肽珠子. 混合细胞和珠子, 37℃, 5% CO₂ 的培养箱中培养, 48 h 后计数有细胞粘附珠子的百分率. 在 48 孔细胞培养板中分别加入不同浓度的抗 α 3 阻断抗体 (0, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 5 mg/L), 其余步骤同上, 48 h 后计数有细胞粘附珠子的百分率, 以此判定抗体对细胞与小分子肽结合的阻断百分率.

2 结 果

2.1 与 A549 细胞阳性结合的小分子肽的序列

本实验共对大约 90 000 个小分子肽珠子进行了筛选, 其中挑选出 29 个与 A549 阳性结合的珠子 (图 1), 阳性珠子占总珠子数的 0.032% (29/90000). 经氨基酸序列分析后发现含有 -NGXG-肽链结构的序列共有 10 个 (表 1).

2.2 小分子肽与瘤细胞结合的特异性

根据上述 2.1 中小分子肽与 A549 的结合率, 我们选择小分子肽 cNGQGEQc 作进一步的细胞特异性研究. 不同细胞株分别与 cNGQGEQc 培养 24 h 和 48 h 后, cNGQGEQc 与非小细胞肺癌细胞株 A549、Calu-1 和 H178 的结合率明显高于其他细胞株 (表 2).

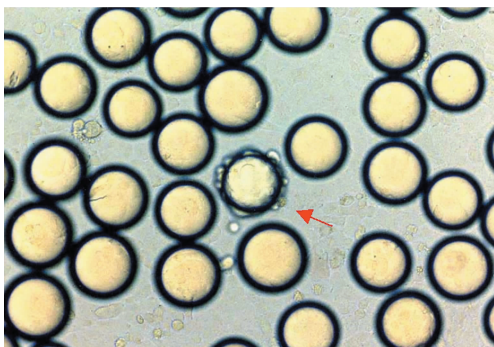


Fig. 1 Positive beads attachment with A549 cells after 48 h incubation (arrow)

Table 1 Consensus sequences identified by screening a one-bead one-peptide library with A549 cell

No.	Peptide sequence	Affinity of cell binding to peptide
1	c NGMGAY c	++
2	c NGQGEQ c	++++
3	c NGQGPL c	+++
4	c NGLGRS c	+++
5	c NGLGQY c	+++
6	c NGYGTT c	+++
7	c NGQGDA c	+++
8	c NGQGAZ c	+++
9	c NGFGSF c	+++
10	c NGQGAG c	++

Table 2 Analysis of cell type-specific attachment to cNGQGEQc peptide beads

Cell lines	Tumor types	% cell growth on beads	
		24 h	48 h
A549	Lung adenocarcinoma	56.6	95
Calu-1	Lung squamous carcinoma	41.6	97
H178	Lung adenosquamous carcinoma	23.3	70
DMS53	Lung small cell carcinoma	0	0
HBE	Non-malignant bronchioepithelial cells	0	5
PC-3	Prostate carcinoma	5.0	11.7
SKOV-3	Ovarian carcinoma	3.3	6.7
LuCap	Prostate carcinoma	0	0
HT-29	Colon carcinoma	0	0
HL-60	Myloid leukemia	0	0
Jurket	T-cell lymphoma	0	0
Raji	Buriktt lymphoma	0	0

2.3 小分子肽的结构与其粘附活性的关系

分别用丙氨酸替代小分子肽 cNGQGEQc 中的每一种氨基酸或删除小分子肽中某个氨基酸, 得到的小分子肽与 A549 细胞的结合百分率 (表 3).

2.4 瘤细胞表面整合素 $\alpha 3$ 的表达

上述 A549 等 12 种细胞株表面整合素 $\alpha 3$ 的表达水平各不相同 (图 2), 其中 A549 和 Calu-1 细胞的阳性染色最强, H178 细胞次之, HBE、PC-3 及 SKOV3 细胞再次之, DMS53, LunCap, HT-29, HL-60, Jurket, Raji 等细胞为阴性反应.

2.5 小分子肽免疫标记肺癌细胞

激光共聚焦显微镜显示, 小分子肽 cNGQGEQc 与非细胞肺癌细胞 A549 (图 3a) 和 H178 结合 (图 3b) (绿色), 而与 DMS53、LunCap 等细胞未见阳性结合.

Table 3 Sequence specificity of cNGQGEQc for attachment and growth of A549 cells to peptide beads

No.	Sequence	% beads with cells
1	c NGQGEQ c	92
2	c NGQGEA c	90
3	c NGQGAQ c	80
4	c NGQAQ c	0
5	c NGAQGEQ c	85
6	c NAQGEQ c	0
7	c AQGEQ c	0
8	c GQGEQ c	0
9	c QGEQ c	0
10	c NGQGE c	0
11	c NGQG c	1

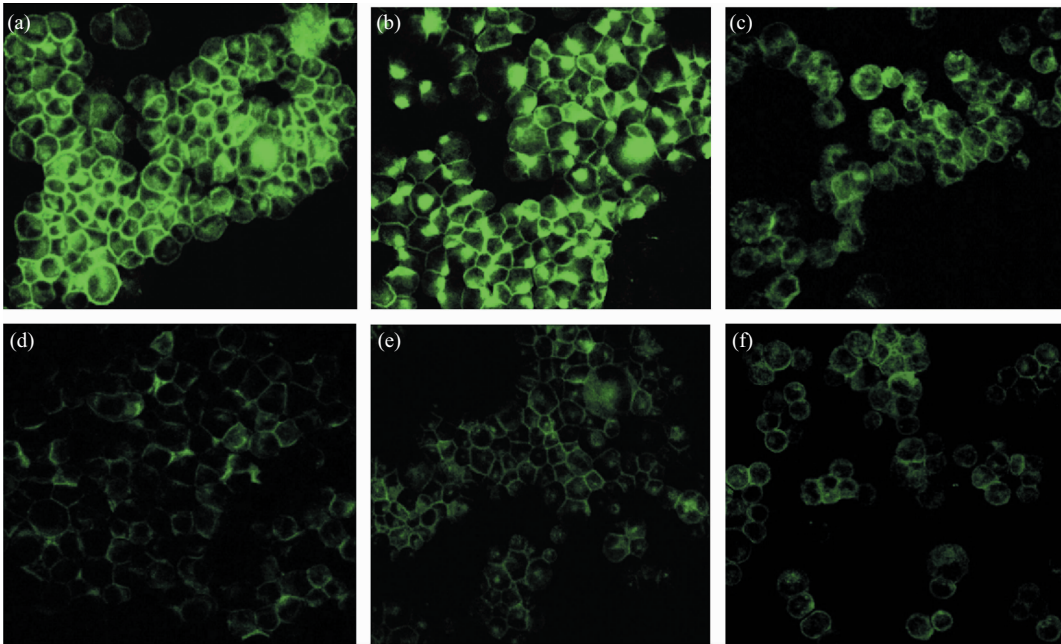


Fig. 2 Immunofluorescent staining showing integrin $\alpha 3$ expression on tumor cell surface
(a) A549. (b) Calu-1. (c) H178. (d) HBE. (e) PC-3. (f) SKOV3.

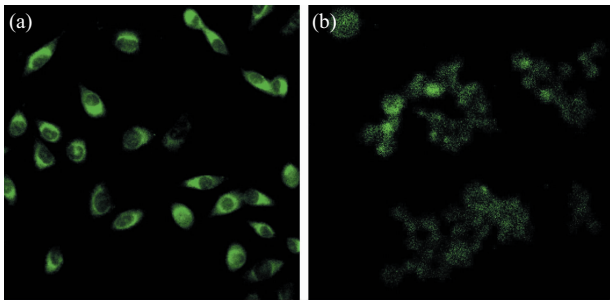


Fig. 3 Immunofluorescent staining showing peptide binding to A549 (a) and H178 (b) cells

2.6 小分子肽与 A549 细胞表面整合素的阻断结合实验

按照 1.7 中所述，用抗整合素($\alpha 1\sim 6$, αv , 和 $\beta 1\sim 5$) 单克隆抗体 (1.5 mg/L) 阻断 A549 细胞与小分子肽的结合实验，结果显示，抗整合素 $\alpha 3$ 抗体与抗 β 亚单位抗体的任何组合如 $\alpha 3\beta 1$ 、 $\alpha 3\beta 2$ 、 $\alpha 3\beta 3$ 、 $\alpha 3\beta 4$ 、 $\alpha 3\beta 5$ 均可阻断 A549 细胞与 cNGQGEQc 的粘附，而 α 其他亚单位与 β 亚单位的组合如 $\alpha 1\beta 1$ 、 $\alpha 2\beta 1$ 、 $\alpha 4\beta 1$ 、 $\alpha 2\beta 2$ 等对 A549 细胞与 cNGQGEQc 的粘附均无明显的阻断作用。抗整合素 $\alpha 3$ 抗体对 A549 细胞与小分子肽结合的阻断作用随其浓度增加而增强 (表 4)。

Table 4 Inhibition of attachment of A549 cells to peptide beads by anti-integrin $\alpha 3$ Ab

Integrin $\alpha 3$ / (mg·L ⁻¹)	% Inhibition of cell attachment
0	0
0.125	0
0.25	8.1
0.5	95.7
1.0	100
2.0	100
5.0	100

3 讨 论

国外学者应用组合化学肽库技术已筛选得到多种与细胞粘附相关的小分子肽. Pennington 等^[4] (1996 年) 用前列腺癌细胞株 (DU-H) 在 150 万个肽链中筛选出 2 种与细胞粘附有关的肽链，序列为 RU-1 (LNIVS-VNGRHX) 和 RX-1 (DNRIRLQKXX). DeRoock 等^[5] (2001 年) 发现，筛选得到的 2 个 6 氨基酸短肽，RZ-3 (kmviywkag) 和 HYD-1 (kikmviswkg)，能支持前列腺癌细胞粘附，并抑制癌细胞与细胞外基质蛋白粘附. Mikawa 等^[6] 发现小分子肽 NleDI/V/Nle 能特异性与肺泡细胞癌细胞粘

附. Aina 等^[7]筛选得到的小分子 cDGXGXXc 能特异性粘附至卵巢癌细胞表面. 最近我们应用六肽组合化学肽库成功筛选得到与小细胞肺癌细胞 DMS53 特异性结合的小分子肽 cFNQRQQc^[8]. 在本研究中我们共挑选了 29 个与 A549 细胞阳性结合的珠子, 氨基酸序列分析显示, 含有 -NGXG- 肽链结构的序列高达 10 个, 选择与 A549 结合力最强的小分子肽 cNGQGEQc, 进一步观察其与另外 11 种不同种类瘤细胞的结合力, 以验证 cNGQGEQc 的细胞特异性, 表明小分子肽 cNGQGEQc 与非小细胞肺癌细胞 A549, Calu-1 及 H178 的结合率明显高于其他瘤细胞. 我们用标记 FITC 的小分子肽 cNGQGEQc 免疫染色细胞, 发现小分子肽可与 A549 细胞发生特异性结合. 结果表明, cNGQGEQc 与非小细胞肺癌的粘附有较高的特异性.

我们对小分子肽 cNGQGEQc 结构中每一个位置的氨基酸与 A549 细胞的粘附能力作进一步验证, 分别用丙氨酸逐步替代小分子肽序列中的每一个氨基酸, 发现, 其中 -NGXG- 3 个氨基酸对小分子肽与 A549 细胞的粘附至关重要. 另外, 我们还通过删除小分子肽中某一氨基酸验证了小分子肽的长度(六肽) cNGQGEQc 与 A549 细胞粘附活性密切相关.

小分子肽 cNGQGEQc 是如何与 A549 等非小细胞肺癌细胞发生特异性的结合, 为回答这个问题, 我们首先应用免疫荧光染色技术检测不同细胞表面与细胞粘附关系密切的整合素 $\alpha 3$ 的表达情况, 发现 A549, Calu-1 等非小细胞肺癌细胞表面整合素 $\alpha 3$ 呈强阳性表达, 其他细胞株弱表达或阴性染色, 整合素 $\alpha 3$ 的表达强度与小分子肽 cNGQGEQc 结合细胞的能力呈正相关关系, 提示 cNGQGEQc 可能是通过识别 A549 细胞表面整合素 $\alpha 3$ 而与细胞发生结合的. 为验证这一推测, 我们使用了抗整合素 $\alpha 1 \sim 6$, αv 的阻断抗体观察其能否阻断小分子肽与 A549 细胞的结合, 同时我们还对整合素亚单位 β 与 α 进行不同的组合, 研究其对小分子肽与 A549 细胞结合的影响, 结果显示, 仅抗整合素 $\alpha 3$ 抗体对小分子肽与 A549 细胞的结合有阻断作用, 抗体的阻断作用与其浓度有关, 当抗

体的浓度达到 0.6 mg/L 时, 对小分子肽与 A549 细胞的结合才发挥明显的阻断作用. 另外, 抗整合素 $\alpha 3$ 抗体与任何一个 β 亚单位的组合都不会影响整合素 $\alpha 3$ 的阻断作用. 结果表明, 小分子肽 cNGQGEQc 与 A549 的特异性结合是通过整合素 $\alpha 3$ 的介导而完成的. Aina 等^[7]利用阻断抗体实验发现, cDGXGXXc 特异性粘附卵巢癌细胞也是在整合素 $\alpha 3$ 介导下完成的. 小分子肽 NleDI/V/Nle 则能识别肺泡细胞癌细胞表面整合素 $\alpha 4\beta 1$ 与细胞发生特异性结合^[9].

总之, 本研究筛选得到的小分子六肽 cNGQGEQc 能特异性与非小细胞肺癌细胞 A549 结合, 其与 A549 细胞结合的配体是细胞表面的整合素 $\alpha 3$. 下一步研究将利用 A549 裸鼠动物模型体内探讨小分子肽 cNGQGEQc 与 A549 细胞的结合情况.

参 考 文 献

- 1 Lam K S. Treatment of B-cell lymphoma using peptides-a novel concept. *Western J Med*, 1993, **158** (5): 475~479
- 2 Lam K S, Salmon S E, Hers E M, *et al.* A new type of synthetic peptide library for identifying ligand-binding activity. *Nature*, 1991, **354** (6348): 82~84
- 3 Lam K S, Lebl M, Krchnak V. The "one-bead-one-compound" combinatorial library method. *Chem Rev*, 1997, **97** (2): 411~448
- 4 Pennington M E, Lam K S, Cress A E. The use of combinatorial library method to isolate human tumor adhesion peptides. *Molec Diversity*, 1996, **2** (1~2): 19~28
- 5 DeRoock I B, Pennington M E, Sroka T C, *et al.* Synthetic peptides inhibit adhesion of human tumor cells to extracellular matrix proteins. *Cancer Res*, 2001, **61** (8): 3308~3313
- 6 Mikawa M, Wang H, Guo L L, *et al.* Novel peptide ligands for integrin $\alpha 4\beta 1$ overexpressed in cancer cells. *Mol Cancer Ther*, 2004, **3** (10): 1329~1334
- 7 Aina O H, Marik J, Liu R, *et al.* Identification of novel targeting peptides for human ovarian cancer cells using "one-bead one-compound" combinatorial libraries. *Mol Cancer Ther*, 2005, **4** (5): 806~813
- 8 郭琳琅, 郭颖, Lau D, 等. 一种特异性识别小细胞肺癌细胞的小分子肽. *生物化学与生物物理进展*, 2006, **33** (6): 562~566
Guo L L, Guo Y, Lau D, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2006, **33** (6): 562~566

A Novel Specific Small Molecule Peptide for Non-small Cell Lung Cancer Cell A549*

GUO Lin-Lang^{1)**}, GUO Ying¹⁾, DERICK LAU²⁾, XU Yin-Chao¹⁾

¹⁾*Zhujiang Hospital, Nanfang Medical University, Guangzhou 510282, China;*

²⁾*University of California at Davis Cancer Center, USA)*

Abstract To screen small molecule peptide specific binding to non-small cell lung cancer cell (A549) using the “one-bead one-peptide” combinatorial library. Twenty-nine positive beads binding to A549 cell were totally obtained after primary screening. Consensus peptide sequence of -NGXG- was identified by amino acid sequencing in ten beads. Peptide cNGQGGEQc was re-synthesized on beads and further studied for its cell specificity, alanine scanning and site-directed deletion. The results showed that cNGQGGEQc is specific for cell attachment to non-small cell lung cancer cells including A549, Calu-1 and H178, but not to other tumor cell lines. Both motif of -NGXG- and the length of six peptides are very important for A549 adhesion. Peptide cNGQGGEQc labeled with FITC can specifically bind to A549 cell. In a blocking assay with anti-integrin antibodies($\alpha 1 \sim 6$, $\alpha v/\beta 1 \sim 5$), cell adhesion of A549 to peptide beads was obviously inhibited by integrin $\alpha 3$ combining with any β subunits. Results suggested that small molecule peptide cNGQGGEQc can bind specifically to non-small cell lung cancer cell A549 via integrin $\alpha 3$ on cell surface.

Key words small molecule peptide, combinatorial chemistry, non-small cell lung cancer

*This work was supported by grants from The Science and Technology Plan of Guangdong Province(2002C5050107)and The Science, Technology Plan of Guangzhou (2003Z2-E0061, E0063).

**Corresponding author . Tel: 86-20-61643495, E-mail: linlangg@yahoo.com

Received: February 27, 2007 Accepted: April 2, 2007