



一种溶酶体靶向的原位自组装短肽设计及 抗肿瘤活性研究*

陈翠霞** 彭晓婷 朱钰婷 郝瑞瑞 杨柳新 王 彤 牛晓雅 赵玉荣**

(中国石油大学(华东)生物工程与技术中心, 青岛 266580)

摘要 肿瘤已成为威胁人类生命的一大杀手, 目前主要采用手术和放、化疗等手段进行治疗, 但由于放、化疗的细胞选择性差、毒副作用明显且易引起肿瘤细胞产生耐受(耐药)性, 不利于肿瘤的持续治疗, 因此亟待研发具有定向定位优势、毒副作用低的新型靶向药物. 原位自组装多肽能识别肿瘤部位的特异性高表达物质, 在肿瘤部位靶向性聚集形成稳定的纳米结构, 实现精准和高效治疗, 有望成为一种新型的抗肿瘤药物. 本研究基于多肽原位自组装的设计理念, 利用溶酶体内组织蛋白酶L的催化活性, 设计了靶向溶酶体且能够原位自组装的多肽分子Fmoc-FFRIKFERQ-OH, 研究了该分子的自组装特性及抗肿瘤活性. 结果显示, 在体外酸性条件下, 组织蛋白酶L能精准切割Fmoc-FFRIKFERQ-OH分子, 其酶切产物Fmoc-FFR-OH自组装形成长纳米纤维结构, 对肿瘤细胞A375和SH-SY5Y均具有较好的杀伤作用. 该分子通过靶向溶酶体杀伤肿瘤细胞且对正常细胞的毒性较低, 有望成为一种新型的抗肿瘤药物.

关键词 溶酶体靶向, 多肽原位自组装, 酶响应性, 抗肿瘤活性

中图分类号 Q26, O648.17

DOI: 10.16476/j.pibb.2020.0170

肿瘤的发病率和死亡率逐年上升, 已严重威胁人类健康^[1]. 目前肿瘤治疗主要使用手术和放、化疗, 但放、化疗通常毒副作用明显、细胞选择性差且易导致肿瘤细胞产生耐受(耐药)性, 不利于肿瘤的持续治疗. 因此亟待研发具有靶向性且毒副作用小的新型抗肿瘤药物. 抗肿瘤多肽因其活性高、毒性低且不易引起细胞产生非特异性免疫反应等优点, 展现出良好的应用前景. 然而, 普通抗肿瘤多肽存在生物体内的作用机制不明确、稳定性差等问题, 性能还需进一步提升.

多肽自组装是多肽分子自发聚集形成有序结构(如纳米球、纳米管、纳米棒等)的过程, 通过该过程, 一方面可以提升多肽分子的稳定性; 另一方面, 可赋予其特殊的生物学功能, 如药物控释、细胞培养、组织工程支架等^[2]. 一些具有特定形貌的多肽自组装结构也表现出优良的抗肿瘤活性^[3-6], 如Chen等^[4]发现, CL-1多肽在组装后对含有磷脂酰丝氨酸的磷脂膜具有较大的破坏作用, 具有较好的抗肿瘤活性. KLVFF-交联的透明质酸纳米纤维,

表现出较好的抗乳腺癌细胞的发展和转移性能^[3]. 前期研究中, 我们也发现短肽分子A₉K形成的纳米短棒能破坏肿瘤细胞的细胞膜, 快速杀死肿瘤细胞^[5-6]. 多肽分子的组装过程主要依赖于分子内/间各基团的静电吸引、疏水作用、氢键以及范德华力等非共价作用力共同驱动, 组装过程容易受到外界环境(如pH、温度、光照、离子强度等)的影响, 从而导致组装体微观形貌或材料宏观性质发生改变. 基于此, 科学家提出了“肽原位自组装”的概念, 即具有靶向性的前体肽分子在体内特定靶点部位高效聚集, 并在该部位特异性高表达的物质诱导下, 自组装形成特定形貌的组装体结构^[7-8], 从而行使特殊的生物学功能. 在不同肿瘤组织中, 碱性磷酸酶、酪氨酸酶、基质金属蛋白酶等生物酶的表达量增加, 特定序列的多肽分子可在上述酶的催化

* 中央高校自主创新项目(18CX05012A, 18CX02119A)资助.

** 通讯联系人.

陈翠霞. Tel: 0532-86981561, E-mail: chenex@upc.edu.cn

赵玉荣. Tel: 0532-86981562, E-mail: yurongzhao@upc.edu.cn

收稿日期: 2020-06-01, 接受日期: 2020-08-07

作用下组装形成特定形貌的纳米结构, 杀死肿瘤细胞^[9-13], 在肿瘤的精准定位和靶向治疗方面展现出广阔的应用前景。

溶酶体在分子伴侣热休克蛋白 70 (heat shock cognate protein, HSC70) 的参与下调控细胞内自噬, 在肿瘤的发生和发展过程中扮演重要角色^[14-15]。HSC70 可识别含有 KFERQ 序列的蛋白质和多肽底物, 并与溶酶体膜上的受体结合, 介导底物进入溶酶体进行降解^[16]。溶酶体中含有多种水解酶, 其中组织蛋白酶 L (cathepsin L) 是一种普遍表达的半胱氨酸蛋白酶, 在降解多种生理蛋白底物方面具有较高的特异性^[17], 能调控肿瘤细胞的生长^[18]。根据 Schechter—Berger 命名法, 将酶切位点定义为 P 位点, 其酶切序列为 ...P3-P2-P1-P1'-P2'-P3'...^[19], 当水解蛋白质分子时, 底物序列中的 P2 位点决定了 cathepsin L 的酶切特异性, 一般其 P2 位为含有苯环的氨基酸时, cathepsin L 的酶切效率较高^[20]; 同时当 P1 位点为精氨酸 (arginine, R), P2 和 P3 位点为疏水性氨基酸残基时, 其酶切效率也能大大提升^[21]。通过溶酶体内组织蛋白酶水解产生的氨基酸残基可被肿瘤细胞利用, 进行快速分裂增殖, 因此可通过控制溶酶体的活性来达到抗肿瘤的目的^[22]。

本研究利用肿瘤细胞内溶酶体数量较多的微环境, 基于多肽原位自组装的设计理念, 将溶酶体靶向序列与自组装超短肽序列结合, 设计了包含 cathepsin L 酶切位点的短肽分子 Fmoc-FFRIKFERQ-OH, 目的是使该分子既能靶向溶酶体, 又能利用溶酶体内 cathepsin L 的催化作用原位组装形成新的组装体结构, 选择性杀伤肿瘤细胞。通过基质辅助激光解析电离飞行时间质谱 (matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS) 和原子力显微镜 (atomic force microscopy, AFM) 等仪器考察 cathepsin L 酶切前后肽分子质量及组装体微观形貌的改变, 并通过 MTT 法以及流式细胞仪等考察多肽对 L929、A375 及 SH-SY5Y 的细胞毒性。结果表明, 在体外酸性条件下, cathepsin L 能够精准切割 Fmoc-FFRIKFERQ-OH 分子, 其酶切产物 Fmoc-FFR-OH 能在酸性环境中自组装形成长纤维结构, 对肿瘤细胞 A375 以及 SH-SY5Y 均具有较好的杀伤作用。该分子序列短、合成方便, 能通过靶向溶酶体并在溶酶体酶的催化下原位组装的机理杀伤肿瘤细胞, 且对正常细胞的毒性较低, 有望成为一种新

型的抗肿瘤药物。

1 材料与方法

1.1 材料

多肽合成所需要的氨基酸、树脂、1-羟基苯并三氮唑 (HOBt)、1, 1, 3, 3-四甲基脒六氟磷酸盐 (HBTU) 等购自吉尔生化有限公司 (上海); 合成多肽所需溶剂如 N, N-二甲基甲酰胺 (DMF)、二氯甲烷 (DCM)、二异丙基乙胺 (DIEA)、三氟乙酸 (TFA)、三异丙基硅烷 (TIS) 等购自博迈杰生物科技有限公司 (珠海); 哌啶 (piperidine)、乙醚购自西陇化工 (上海)、乙腈购自 Merck 公司 (美国)。Cathepsin L (来源于人肝脏, 酶活 ≥ 0.5 U/mg)、1, 4-二硫苏糖醇 (DTT)、3-(4, 5-二甲基噻唑-2)-2, 5-二苯基四氮唑溴盐 (噻唑蓝, MTT) 购自 Sigma-Aldrich 公司 (美国); 胰酶 (trypsin) 购自 USA Xiasi Bio 公司 (美国); Lyso-Tracker Red (溶酶体红色荧光探针) 购自碧云天生物技术有限公司 (上海); 胎牛血清 (FBS) 购自四季青生物工程材料有限公司 (杭州); 青链霉素购自瑞阳制药有限公司 (山东); DMEM 培养基购自 Gibco 公司 (美国); RPMI-1640 培养基购自吉诺生物医药技术有限公司 (山东); 其他生化试剂均购自国药集团 (上海)。

小鼠成纤维细胞 (L929)、人神经胶质瘤细胞 (SH-SY5Y)、人恶性黑色素瘤细胞 (A375) 均购自中国科学院上海细胞库。其中 SH-SY5Y 细胞用含 10%FBS、1%青链霉素的 RPMI-1640 培养基在 37°C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养。L929、A375 细胞用含 10%FBS、1%青链霉素的 DMEM 培养基在 37°C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养。

1.2 多肽分子的合成

本实验中使用的多肽分子 Fmoc-FFRIKFERQ-OH、Fmoc-FFR-OH 采用 Fmoc 固相合成法, 利用微波辅助多肽合成仪 (Liberty 1 型 CEM 公司, 美国) 合成。多肽分子合成是由 C 端至 N 端进行, 每连接一个氨基酸就执行一次脱保护、活化、缩合步骤。样品合成结束后, 连有多肽分子的树脂在裂解液 (95% (v/v) TFA、2.5% (v/v) 超纯水、2.5% (v/v) TIS) 中室温搅拌。裂解产物再次抽滤, 液体旋转蒸发, 冰乙醚沉淀, 采用乙醚清洗多次沉淀后冷冻干燥, 即可得到多肽固体粉末。多肽产品的纯度采用 MALDI-TOF-MS 和 C₁₈ 反向-高效液相 (reverse phase-high performance liquid

chromatography, RP-HPLC) 的方法进行鉴定.

1.3 多肽溶液的配制

称取 0.3735 mg Fmoc-FFRIKFERQ-OH 多肽粉末, 溶解在 Hepes 缓冲液中, 溶液配制后需涡旋均匀并放入超声波清洗器内超声使其充分溶解. 若超声 30 min 后多肽分子仍未完全溶解, 可继续 85°C 水浴加热 2 h 以促其溶解. 对于 AFM 实验所用样品, 在室温下放置 7 d 后进行扫描, 以保证多肽分子可充分自组装.

1.4 多肽的 cathepsin L 酶响应性

首先配制酶促反应缓冲液: 1 mmol/L EDTA、2 mmol/L DTT、20 mmol/L 醋酸钠缓冲液, 醋酸调 pH 至 5.5. 酶促反应前, 将 2 μ l cathepsin L (≥ 0.5 U/mg) 于 48 μ l 缓冲液中活化 30 min, 取 50 μ l 新鲜配制的 0.25 mmol/L Fmoc-FFRIKFERQ-OH 加入到上述缓冲液中, 至酶切底物的终浓度为 0.125 mmol/L, 混合均匀后置于 37°C 水浴中, 反应 0 min、30 min、2 h、4 h、6 h、8 h、12 h 后分别取样进行质谱检测, 分析酶解效率. 由于 pH 5.5 的条件下 cathepsin L 活力最为稳定^[23], 故酶切反应在醋酸-醋酸钠缓冲液 (pH 5.5) 中进行. 由于 cathepsin L 是含巯基的半胱氨酸蛋白酶, 具有巯基激活效应的二硫苏糖醇 (DTT) 和乙二胺四乙酸 (EDTA) 都能够有效提高 cathepsin L 活性^[24], 因此在上述醋酸-醋酸钠缓冲液中加入适量 DTT 和 EDTA.

1.5 MALDI-TOF-MS 实验

MALDI-TOF-MS (Microflex 型 Bruker 公司, 德国) 用来检测多肽酶切反应前后分子质量的变化. 实验所用基质为 α -氰基-4-羟基肉桂酸 (HCCA, Bruker) 的 TA30 饱和溶液 (由 30% (v/v) 乙腈、70% (v/v) 0.1% TFA 水溶液配制而成). 分别取基质上清液 2.5 μ l 和样品 2.5 μ l 混合均匀, 取 2.5 μ l 混合均匀后的样品点于靶板上, 放置于通风橱中至样品自然干燥. 实验中采用延时引出和正离子反射模式检测, 激光波长 337 nm, 加速电压 19.0 kV, 反射电压 20.0 kV, 延时引出时间 140 ns, 激光频率 60 Hz, 累加 450 次单次扫描结果作为质谱图.

1.6 AFM 实验

AFM (Nanoscope Iva 型 Nanoscope Iva 公司, 美国) 是通过检测待测样品和微悬臂的原子间相互作用力来表征组装体的形貌. 本实验采用剥离的新

鲜云母片表面作为基底, 在上面滴加 10 μ l 待测样品, 吸附约 30 s 后, 用少量超纯水冲洗云母片, 并用氮气吹干. 本实验扫描过程中采用轻敲模式 (tapping mode), 扫描频率 1 Hz, 扫描角度 0°, 扫描分辨率为 512 $\times$ 512. 采用 TESP-V2 型单晶硅探针 (Bruker), 针尖半径不大于 10 nm, 悬臂约 127 μ m, 胡克系数为 42 N/m.

1.7 抗肿瘤活性检测

采用 MTT 法检测多肽对细胞增殖率的影响. 首先按 1×10^4 cells/孔将 L929、SH-SY5Y、A375 细胞接入 96 孔细胞培养板, 置于 5% CO₂ 培养箱 37°C 培养 24 h 后, 加入配制好的多肽溶液. 加入培养基的孔作为对照组, 设立相应培养基但无细胞组作为空白组, 每组设置 6 个孔重复, 配制好的 96 孔细胞培养板放置于 5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 后, 每孔加入 5 g/L MTT 溶液 20 μ l, 4 h 后弃除各孔中的全部液体, 加入 150 μ l 二甲基亚砷 (DMSO), 振荡 10 min 后置于酶标仪 (Spectra Max M2e 型 Molecular Devices 公司, 美国) 中检测 490 nm 处的吸光度 (A_{490}) 值, 实验至少重复 3 次以上. 根据下列公式计算细胞相对增殖率:

$$Survival\ ratio = \frac{A(\text{实验组}) - A(\text{空白组})}{A(\text{对照组}) - A(\text{空白组})}$$

1.8 流式细胞检测及荧光染色

采用流式细胞术 (flow cytometry, FCM) 以及荧光染色检测溶酶体膜结构的变化. Lyso-Tracker Red 是一种溶酶体红色荧光探针, 能通透细胞膜, 可用于活细胞溶酶体特异性荧光染色. 按 1×10^4 cell/孔接种于 96 孔细胞培养板, 培养 24 h 后, 加入配制好的多肽溶液在 5% CO₂ 培养箱中培养 48 h, 然后收集细胞, 去除细胞培养液, 加入 37°C 预温育的 Lyso-Tracker Red 染色液, 与 37°C 孵育细胞 40 min. 随后用磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 重悬细胞, 使用流式细胞仪 (FACSCalibur 型 BD 公司, 美国) 进行检测.

荧光染色实验同样使用 Lyso-Tracker Red 进行检测, 按 1×10^4 cell/孔接入 96 孔细胞培养板, 培养 24 h 后, 加入配制好的多肽溶液于 5% CO₂ 培养箱中培养 48 h. 然后去除细胞培养液, 采用 PBS 洗涤 3 次, 加入 37°C 预温育的 Lyso-Tracker Red 染色液, 与 37°C 孵育细胞 40 min. 弃去上清液, 采用 PBS 清洗 3 遍, 使用倒置荧光显微镜 (DMI300B 型 Leica 公司, 德国) 进行检测.

2 实验结果

2.1 多肽分子设计及性质表征

溶酶体可通过膜受体介导细胞自噬过程, 引发细胞死亡, 因此在肿瘤的发生和发展过程中扮演重要的角色^[14-15]. 进入溶酶体降解的蛋白质分子具有一定的选择性, 一般含有KFERQ序列的蛋白质分子能与溶酶体膜受体结合, 进入溶酶体内部^[16]. 因此, 在我们的研究中, 采用KFERQ序列作为抗肿瘤肽的溶酶体靶向序列. 为使进入溶酶体的多肽分子能在溶酶体内组织蛋白酶的催化下进行原位自组装, 在靶向肽的N端加入具有较强自组装能力的超短肽Fmoc-FF序列^[25]. 为使设计的分子具有溶酶体 cathepsin L 响应性, 在Fmoc-FF 以及 KFERQ

两个片段之间插入酶敏感性序列R↓I, 设计序列为Fmoc-FFRIKFERQ-OH的多肽. 在该序列中, P1位点为亲水性的R残基, P2位点为含苯环的疏水性氨基酸, 该设计能使cathepsin L的酶切效率较高且特异性较强^[20-21]. 为验证酶切产物的组装性能, 我们还合成了Fmoc-FFR-OH多肽.

通过MALDI-TOF-MS实验分析, Fmoc-FFRIKFERQ-OH和Fmoc-FFR-OH多肽的相对分子质量分别为1 495.0 ([M+H]⁺) 和 692.5 ([M+H]⁺), 与理论计算的相对分子质量 (1 493.7 和 690.7) 吻合 (图 1a, b), 同时, RP-HPLC实验结果显示, 合成的多肽RP-HPLC谱图中只有尖锐的单峰出现, 对其峰面积积分可知多肽纯度达到98% (图 1c, d), 符合后续实验要求.

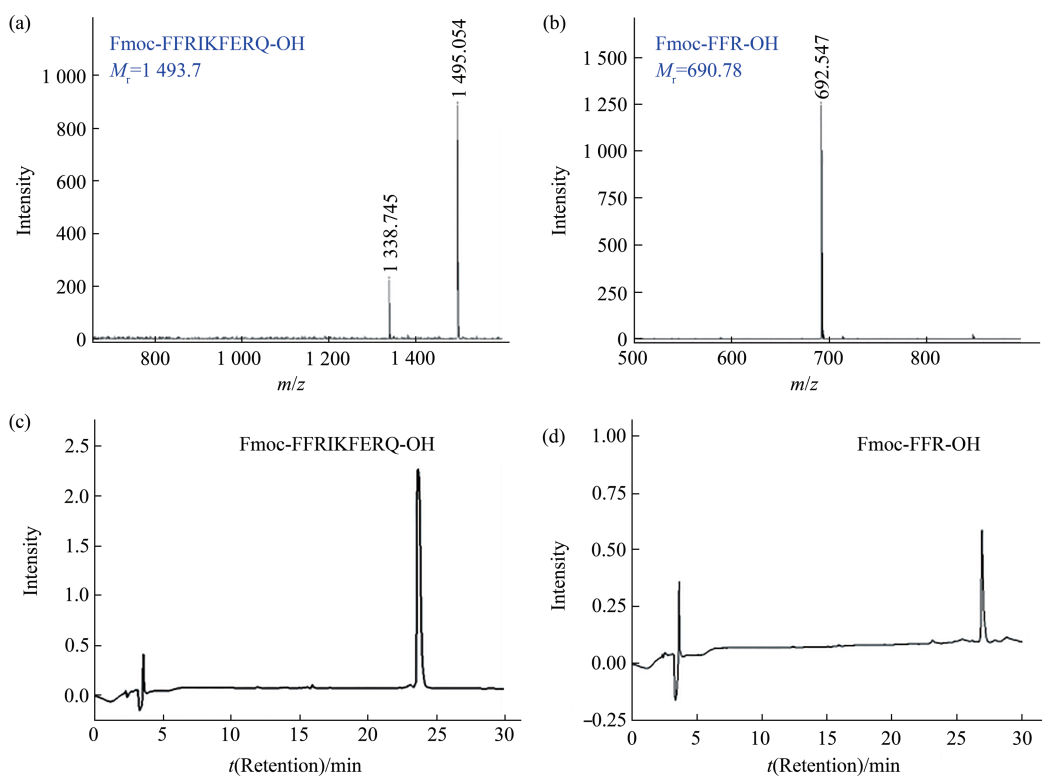


Fig. 1 MALDI-TOF-MS spectra and RP-HPLC profiles of Fmoc-FFRIKFERQ-OH and Fmoc-FFR-OH
(a, b) MALDI-TOF-MS spectra of Fmoc-FFRIKFERQ-OH and Fmoc-FFR-OH. (c, d) RP-HPLC profiles of Fmoc-FFRIKFERQ-OH and Fmoc-FFR-OH.

2.2 Cathepsin L对Fmoc-FFRIKFERQ-OH的酶切效应

为检验短肽Fmoc-FFRIKFERQ-OH对cathepsin L的酶响应性, 首先将cathepsin L置于醋酸缓冲液中预活化30 min, 然后加入

0.25 mmol/L Fmoc-FFRIKFERQ-OH混合均匀后, 37℃水浴不同时间后取样, 进行MALDI-TOF-MS分析, 结果如图2所示. 反应0 h时, 在酶促反应体系中, 仅能检测到Fmoc-FFRIKFERQ-OH单一样品, 其相对分子质量为1 495.0 ([M+H]⁺) (图

2a). 当反应2 h后, 酶切体系中开始出现相对分子质量为692.7的酶切产物峰, 该数值与Fmoc-FFR-OH一致 ($[M+H]^+$), 但峰值较低, 表明反应产物的量非常少. 随着反应时间延长至4 h时, 酶反应体系中检测到相对分子质量为692.7、858.1的新产物峰 (图2b). 其中, 692.7为Fmoc-FFRIKFERQ-OH酶切产物Fmoc-FFR-OH ($[M+H]^+$)的分子质量, 858.1为Fmoc-FFRIKFERQ-OH酶切产物NH₂-IKFERQ-OH (理论相对分子质量为819.9) $[M+K]^+$

的分子质量. 当反应时间延长到12 h, 相对分子质量为692.6、858.0产物峰值均增强, 而Fmoc-FFRIKFERQ-OH底物1495.0的峰值逐渐降低至零, 说明此时Fmoc-FFRIKFERQ-OH已被酶切完全 (图2c). 上述结果表明, 在体外酸性条件下, 我们设计的多肽分子Fmoc-FFRIKFERQ-OH能被cathepsin L准确切割为Fmoc-FFR-OH和NH₂-IKFERQ-OH两条短肽 (图2d).

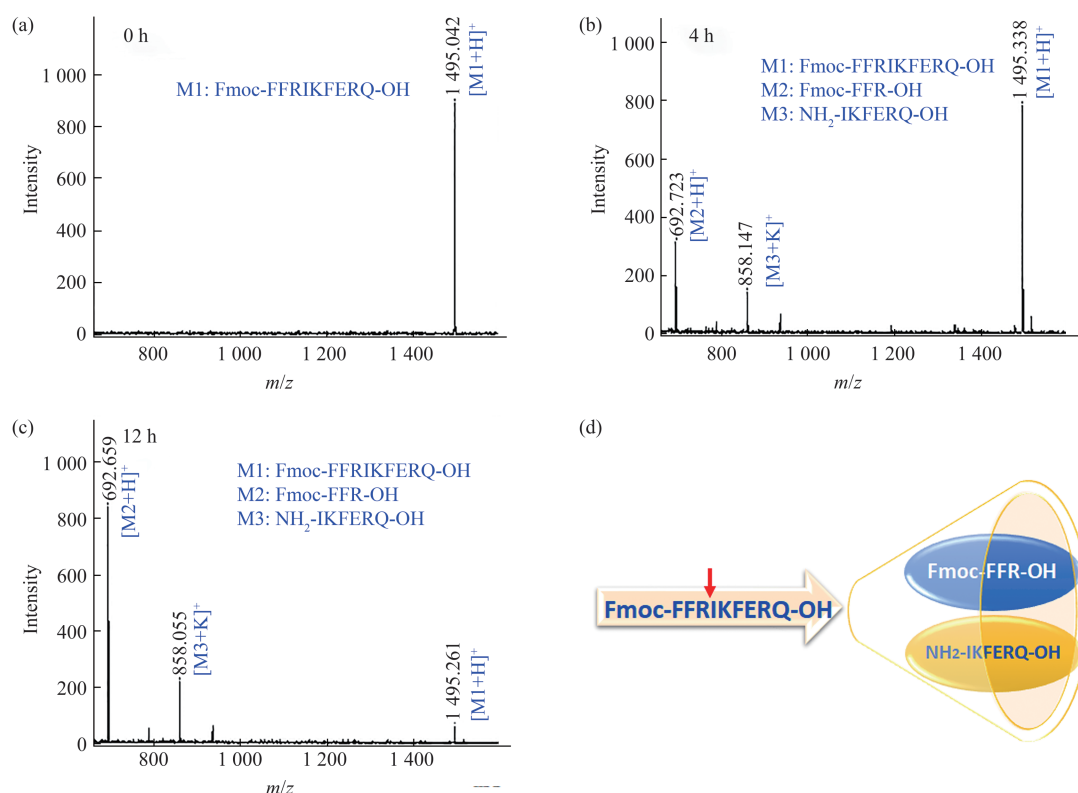


Fig. 2 Analysis of enzymatic digestion products of cathepsin L

(a-c) MALDI-TOF-MS spectra of Fmoc-FFRIKFERQ-OH after incubation with cathepsin L for 0, 4 and 12 h respectively. (d) The possible enzymatic process of Fmoc-FFRIKFERQ-OH after incubation with cathepsin L.

2.3 Fmoc-FFRIKFERQ-OH及其酶切产物的微观组装形貌

分别用pH 5.5、pH 7.2超纯水配制5 mmol/L Fmoc-FFRIKFERQ-OH和5 mmol/L Fmoc-FFR-OH溶液, 室温下放置7 d使其充分自组装, 采用AFM检测上述多肽的组装形貌. 结果显示, 在酸性和中性条件下, Fmoc-FFRIKFERQ-OH均组装成短棒状纳米结构 (图3a, b), 而Fmoc-FFR-OH于pH 5.5、pH 7.2条件下均形成长纤维状结构 (图3c, d). 酶解后另外的产物KFERQ作为生物体内广泛存在的

溶酶体信号序列, 不具有生物毒性, 在本研究中未检测到其组装体形貌.

2.4 多肽的抗肿瘤性能

上述研究表明, 多肽分子Fmoc-FFRIKFERQ-OH对cathepsin L酶具有高响应性, 其酶切产物Fmoc-FFR-OH可自组装形成纳米纤维结构. Yang等^[26]指出多肽分子在细胞内自组装形成的纳米纤维结构能够有效破坏细胞结构, 引发细胞死亡. 因此, 我们采用MTT法检测了该多肽对正常细胞L929、肿瘤细胞A375以及SH-SY5Y的细胞毒性.

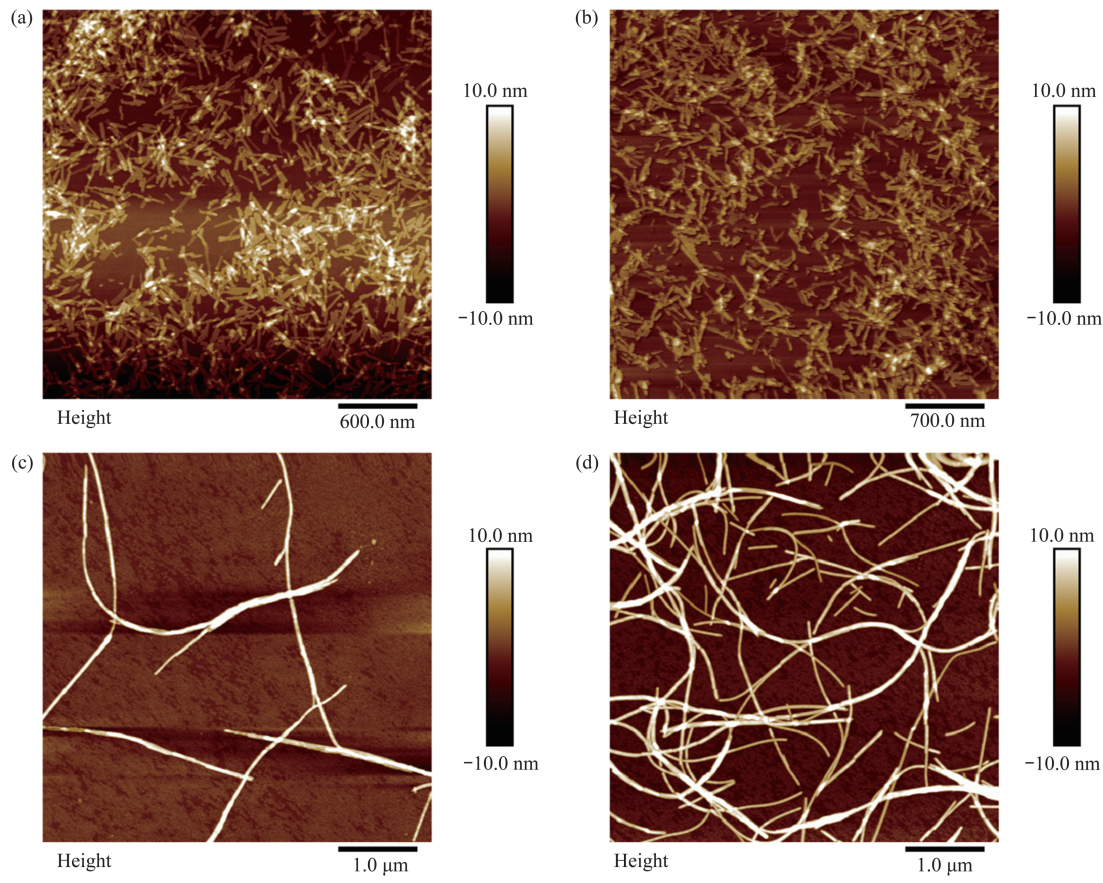


Fig. 3 AFM images of Fmoc-FFRIKFERQ-OH and Fmoc-FFR-OH at pH 5.5 and pH 7.2
(a, b) AFM images of Fmoc-FFRIKFERQ-OH at pH 5.5 (a) and pH 7.2 (b). (c, d) AFM images of Fmoc-FFR-OH at pH 5.5 (c) and pH 7.2 (d).

结果显示, Fmoc-FFRIKFERQ-OH 对正常细胞 L929 的毒性较小 (图 4). 当作用于肿瘤细胞 A375 和 SH-SY5Y 时, 随着多肽浓度的增加, Fmoc-FFRIKFERQ-OH 对 A375 和 SH-SY5Y 细胞的杀伤力逐渐增强, 当浓度增加至 1 mmol/L 时, 其细胞死亡率分别为 63.92%、73.44%, 与对照相比, 具有显著性差异 (图 4). 因此, 多肽分子 Fmoc-FFRIKFERQ-OH 对肿瘤细胞 A375 和 SH-SY5Y 具有较强的杀伤作用, 而对正常细胞具有较低的毒副作用.

质谱及 AFM 实验表明, 多肽分子 Fmoc-FFRIKFERQ-OH 能够被溶酶体内的 cathepsin L 降解. 接下来, 我们通过流式细胞术以及荧光染色实验检测多肽分子加入后细胞内溶酶体结构的变化情况. Lyso-Tracker Red 能穿越细胞膜, 高选择性地滞留在偏酸性的溶酶体中, 从而实现对于溶酶体的特异性荧光标记. 对照组细胞染色后, 溶酶体荧光强度较强 (图 5d), 此时细胞伸展为梭形, 紧密地贴

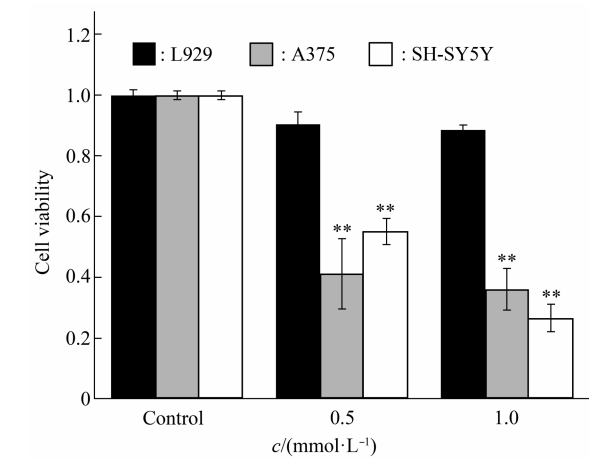


Fig. 4 Cytotoxicity of Fmoc-FFRIKFERQ-OH against L929, A375 and SH-SY5Y cells
** $P < 0.001$.

壁在孔板的底部 (图 5a). 当加入 0.5 mmol/L Fmoc-FFRIKFERQ-OH 时, 部分细胞变圆 (图 5b),

细胞内溶酶体染色的荧光强度降低 (图 5e)。当 Fmoc-FFRIKFERQ-OH 浓度继续增加至 1 mmol/L, 溶酶体荧光强度基本消失, 此时大部分细胞形态发生皱缩, 且从细胞培养板板底脱离 (图 5c)。MTT 结果表明, 该多肽浓度下, SH-SY5Y 细胞的存活率仅为 26.56%, 表明大部分细胞已死亡。流式细胞仪结果显示, 对照细胞内, 溶酶体红色荧光的阴性率为 5.23%, 说明绝大多数的溶酶体结构是完整的。当细胞与 0.5 mmol/L Fmoc-FFRIKFERQ-OH 温育 48 h 后, 细胞红色荧光的阴性率为 16.60%, 说

明有部分细胞的溶酶体遭到破坏, 当将 Fmoc-FFRIKFERQ-OH 的浓度增加到 1 mmol/L, 细胞红色荧光的阴性率升高为 33.30%, 说明大部分肿瘤细胞内溶酶体结构遭到破坏 (图 5g~i), 该实验结果说明, Fmoc-FFRIKFERQ-OH 多肽可通过诱导溶酶体破裂达到杀伤肿瘤细胞的目的。而此浓度下 MTT 结果显示细胞死亡率为 73.44%, 表明 Fmoc-FFRIKFERQ-OH 不仅通过溶酶体破坏途径杀伤肿瘤, 而且还存在其他诱导肿瘤细胞死亡的途径。

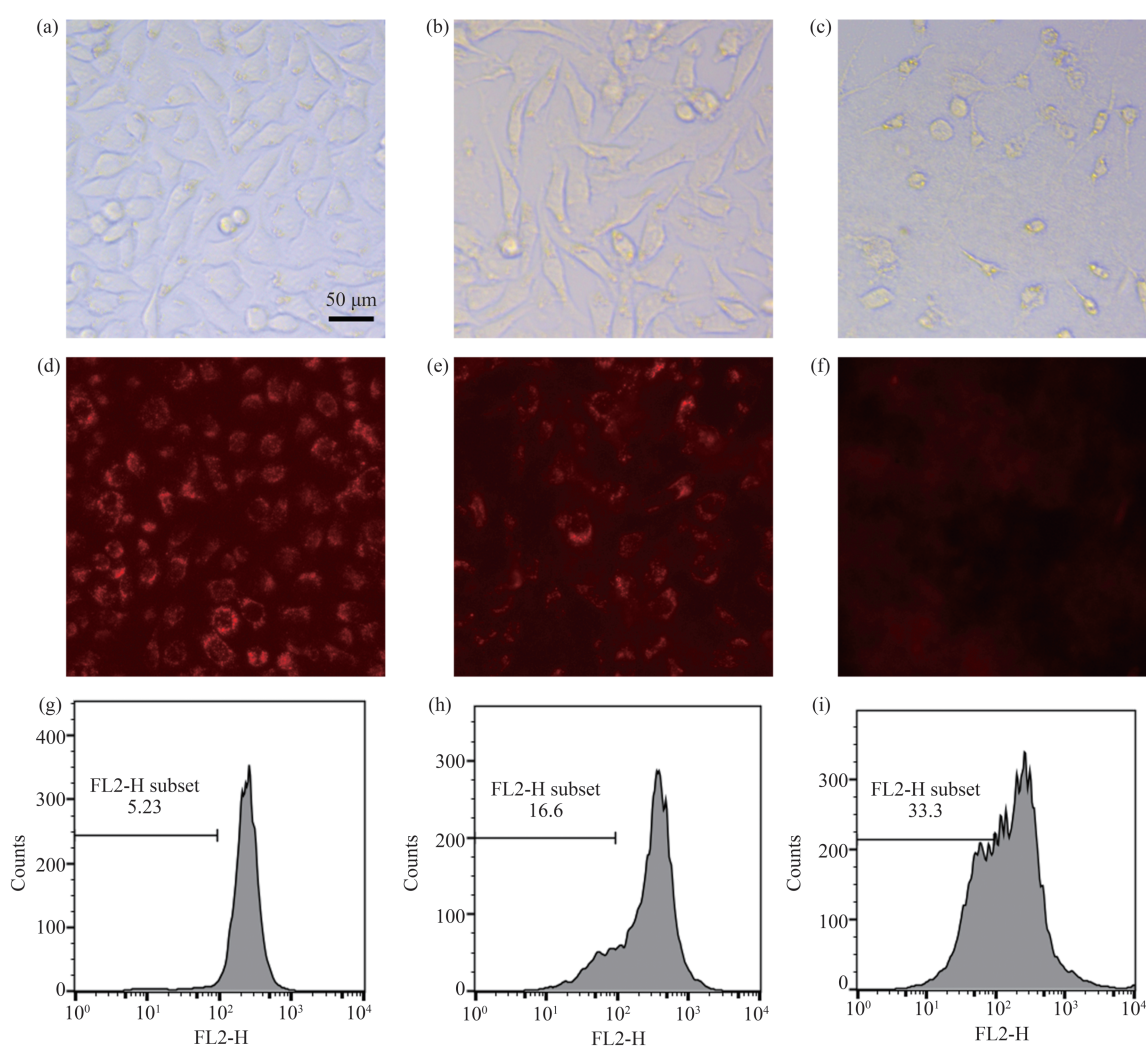


Fig. 5 Fluorescence staining and FCM results of lysosome in the absence or presence of Fmoc-FFRIKFERQ-OH

(a-c) Inverted microscope images of the SH-SY5Y cells before and after incubation with Fmoc-FFRIKFERQ-OH at concentration of 0, 0.5 and 1 mmol/L, respectively for 48 h. (d-f) Fluorescence images of lysosomes in SH-SY5Y cells after incubation with Fmoc-FFRIKFERQ-OH at concentration of 0, 0.5 and 1 mmol/L respectively for 48 h. (g-i) Flow cytometry results of intracellular lysosomal fluorescence intensity after the cells were treated with Fmoc-FFRIKFERQ-OH at concentration of 0, 0.5 and 1 mmol/L for 48 h. The cells were labelled with lyso-tracker red.

3 讨 论

肿瘤治疗一直以来都是人们需要攻克的难题,而近年来肿瘤耐药性的出现使肿瘤治疗更加困难.原位自组装多肽能够靶向性地聚集在肿瘤部位,借助肿瘤部位局部温度高、pH低以及某些生物酶高表达等微环境进行原位自组装形成特定的纳米结构,与肿瘤细胞内维持细胞形态的微管蛋白等结合,影响细胞的增殖和迁移,在肿瘤的精确定位和靶向治疗方面表现出优异的效果^[9-10, 27-28].

溶酶体作为细胞的“自杀包”,调控肿瘤细胞的发生和发展,可作为肿瘤治疗的靶点^[29].本文依据多肽原位自组装的设计理念,将溶酶体靶向序列与 cathepsin L 的酶促反应专一性结合起来,设计了可靶向溶酶体的多肽分子 Fmoc-FFRIKFERQ-OH,该分子在中性条件下自组装形成尺寸较小的短棒状纳米结构(图3),可通过细胞内吞的方式进入肿瘤细胞内部(图6, I),然后在溶酶体靶向

序列 KFERQ 的指引下到达溶酶体(图6, II).溶酶体内高活性的 cathepsin L 专一性地识别 Fmoc-FFRIKFERQ-OH 分子内 R↓I 间的肽键,生成 Fmoc-FFR-OH 产物分子,而该分子可在酸性条件下自组装形成长的纳米纤维(图3),当溶酶体内 Fmoc-FFR-OH 的含量达到一定阈值(图6, III),溶酶体膜溶胀,诱导肿瘤细胞程序性坏死(图6, IV).与肿瘤细胞相比,正常细胞中溶酶体数量远低于肿瘤细胞,因此 Fmoc-FFRIKFERQ-OH 对正常细胞表现为较低的毒性.

肿瘤的靶向治疗已成为未来肿瘤治疗的主要方向和突破口,原位自组装多肽因其独特性质在肿瘤治疗中呈现出巨大的优势和潜能,可利用肿瘤组织特异性高表达的成分诱导多肽在肿瘤部位聚集并发生原位组装,形成稳定的纳米结构,一方面克服了肽分子在细胞内的不稳定性,另一方面也增加了肽分子在局部组织的聚集,降低了对正常组织的毒副作用,从而达到精准治疗肿瘤的目的.

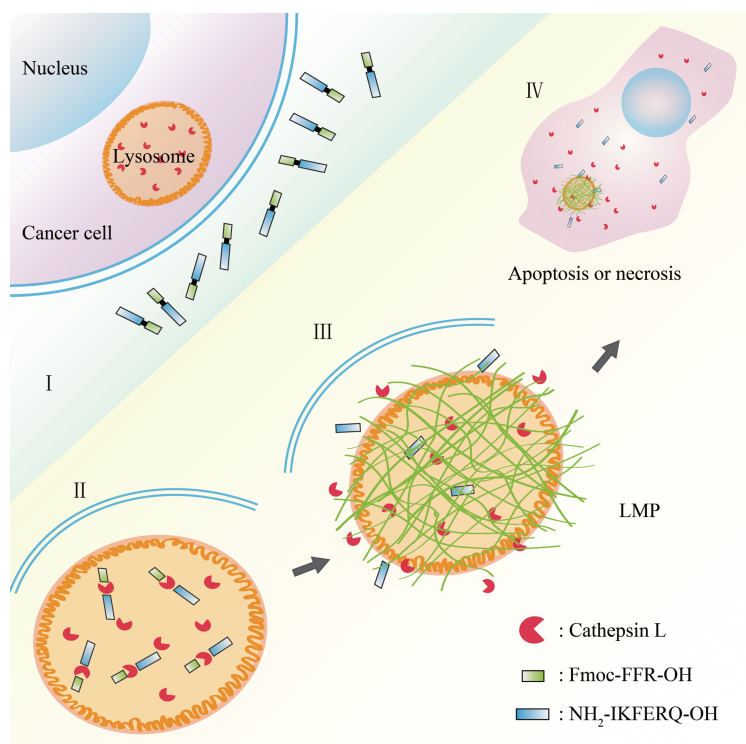


Fig. 6 The possible antitumor mechanism of lysosomal targeting peptide Fmoc-FFRIKFERQ-OH

Fmoc-FFRIKFERQ-OH, which self-assembles into small rod-like nanostructures in neutral conditions, can pass through tumor cell membrane *via* endocytosis (I). The peptide arrives at lysosomes in tumor cells by the guiding of the signal sequence KFERQ (II). After traversing into the lysosome, the active cathepsin L degrades Fmoc-FFRIKFERQ-OH and produces Fmoc-FFR-OH. The latter peptide can self-assemble into very long nanofibers under acid condition. When the content of assembled Fmoc-FFR-OH reaches a certain threshold (III), lysosome membrane was disrupted, leading to tumor cell apoptosis, and(/or) death (IV).

参 考 文 献

- [1] Wang J, Li N, Cao L, *et al.* Dox-loaded peptide dendritic copolymer nanoparticles for combating multidrug resistance by regulating the lysosomal pathway of apoptosis in breast cancer cells. *J Mater Chem B*, 2020, **8**(6): 1157-1170
- [2] Zhao Y, Yang W, Chen C, *et al.* Rational design and self-assembly of short amphiphilic peptides and applications. *Curr Opin Colloid Interface Sci*, 2018, **35**: 112-123
- [3] Luo S, Feng J, Xiao L, *et al.* Targeting self-assembly peptide for inhibiting breast tumor progression and metastasis. *Biomaterials*, 2020, **249**: 120055
- [4] Chen L, Liang J. Peptide fibrils with altered stability, activity, and cell selectivity. *Biomacromolecules*, 2013, **14**(7): 2326-2331
- [5] Chen C, Hu J, Zhang S, *et al.* Molecular mechanisms of antibacterial and antitumor actions of designed surfactant-like peptides. *Biomaterials*, 2012, **35**(2): 592-603
- [6] Xu H, Chen C, Hu J, *et al.* Dual modes of antitumor action of an amphiphilic peptide A₉K. *Biomaterials*, 2013, **34**(11): 2731-2737
- [7] Zhan J, Cai Y, Ji S, *et al.* Spatiotemporal control of supramolecular self-assembly and function. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2017, **9**(11): 10012-10018
- [8] Qi G, Guo Y, Wang L, *et al.* Self-assembled peptide-based nanomaterials for biomedical imaging and therapy. *Adv Mater*, 2018, **30**(22): e1703444
- [9] Feng Z, Wang H, Chen X, *et al.* Self-assembling ability determines the activity of enzyme-instructed self-assembly for inhibiting cancer cells. *J Am Chem Soc*, 2017, **139**(43): 15377-15384
- [10] Zhou J, Du X, Chen X, *et al.* Enzymatic self-assembly confers exceptionally strong synergism with NF- κ B targeting for selective necroptosis of cancer cells. *J Am Chem Soc*, 2018, **140**(6): 2301-2308
- [11] Youssef H, Dewolf C E. Interfacial self-assembly of antimicrobial peptide GL13K into non-fibril crystalline β sheets. *Langmuir*, 2020, **36**(2): 660-665
- [12] Shen Z, Guo Z, Zhou L, *et al.* Biomembrane induced in situ self-assembly of peptide with enhanced antimicrobial activity. *Biomater Sci*, 2020, **8**(7): 2031-2039
- [13] Kim B J, Xu B. Enzyme-instructed self-assembly for cancer therapy and imaging. *Bioconjugate Chem*, 2020, **31**(3): 492-500
- [14] Saftig P, Sandhoff K. Cancer: killing from the inside. *Nature*, 2013, **502**(7471): 312-313
- [15] Boya P, Kroemer G. Lysosomal membrane permeabilization in cell death. *Oncogene*, 2008, **27**(50): 6434-6451
- [16] Cuervo A M, Dice J F. A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science*, 1996, **273**(5274): 501-503
- [17] Nomura T, Fujishima A, Fujisawa Y. Characterization and crystallization of recombinant human cathepsin L. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, **228**(3): 792-796
- [18] Gocheva V, Zeng W, Ke D, *et al.* Distinct roles for cysteine cathepsin genes in multistage tumorigenesis. *Genes Dev*, 2006, **20**(5): 543-556
- [19] Schechter I, Berger A. On the active site of proteases. 3. Mapping the active site of papain; specific peptide inhibitors of papain. *Biochem Biophys Res Commun*, 1968, **32**(5): 898-902
- [20] Biniossek M L, Nägler D K, Becker-Pauly C, *et al.* Proteomic identification of protease cleavage sites characterizes prime and non-prime specificity of cysteine cathepsins B, L, and S. *J Proteome Res*, 2011, **10**(12): 5363-5373
- [21] 胡庆国, 张进杰, 纪蓉, 等. 组织蛋白酶L及其酶学特性研究. 合肥学院学报(自然科学版), 2010, **20**(3): 65-71
Hu Q G, Zhang J J, Ji R, *et al.* Journal of Hefei University(Natural Sciences), 2010, **20**(3): 65-71
- [22] Gulbins E, Kolesnick R N. It takes a CAD to kill a tumor cell with a LMP. *Cancer Cell*, 2013, **24**(3): 279-281
- [23] Mason R W, Green G D J, Barrett A J. Human liver cathepsin L. *Biochem J*, 1985, **226**(1): 233-241
- [24] Turk V, Stoka V, Vasiljeva O, *et al.* Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers. *Biochim Biophys Acta*, 2012, **1824**(1): 68-88
- [25] Yan X, Zhu P, Li J. Self-assembly and application of diphenylalanine-based nanostructures. *Chem Soc Rev*, 2010, **39**(6): 1877-1890
- [26] Yang Z, Xu K, Guo Z, *et al.* Intracellular enzymatic formation of nanofibers results in hydrogelation and regulated cell death. *Adv Mater*, 2007, **19**(20): 3152-3156
- [27] Li J, Bullara D, Du X, *et al.* Kinetic analysis of nanostructures formed by enzyme-instructed intracellular assemblies against cancer cell. *ACS Nano*, 2018, **12**(4): 3804-3815
- [28] Qiao S, Wang Y, Lin Y, *et al.* Thermo-controlled *in situ* phase transition of polymer-peptides on cell surfaces for high-performance proliferative inhibition. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2016, **8**(27): 17016-17022
- [29] Gyparaki M T, Papavassiliou A G. Lysosome: the cell's 'suicidal bag' as a promising cancer target. *Trends Mol Med*, 2014, **20**(5): 239-241

Design of a Lysosome Targeting *in situ* Self-assembly Peptide and Its Antitumor Activity*

CHEN Cui-Xia**, PENG Xiao-Ting, ZHU Yu-Ting, HAO Rui-Rui, YANG Liu-Xin,
WANG Tong, NIU Xiao-Ya, ZHAO Yu-Rong**

(Centre for Bioengineering and Biotechnology, China University of Petroleum (EastChina), Qingdao 266580, China)

Abstract Tumor has greatly threatened to human life. Now the main means of tumor treatment are surgery and/or) chemoradiotherapy. However, the chemoradiotherapy is usually not suitable to sustained treatment of tumors due to its poor cell selectivity, side effects and inducing tumor cells resistance. Therefore, it is urgent to develop new drugs with low toxicity and high activity at the tumor sites. *In situ* self-assembly peptides which can target the tumors and self-assemble into specific nanostructures induced by the specific and highly expressed substances at the tumor tissues are expected to be a new kind of anti-tumor drugs. In this study, we designed a peptide denoted as Fmoc-FFRIKFERQ-OH based on the concept of *in situ* self-assembly of peptides. This peptide can target lysosomes and self-assemble *in situ* after being degraded by cathepsin L in lysosomes. The self-assembly properties of Fmoc-FFRIKFERQ-OH and its enzymolysis products degraded by cathepsin L were observed by AFM and MALDI-TOF-MS. The anti-tumor activity of this peptide was measured by using the MTT and flow cytometry assay. The results demonstrated that cathepsin L could precisely hydrolyze the Fmoc-FFRIKFERQ-OH molecule under acidic conditions *in vitro*, and its enzymolysis product Fmoc-FFR-OH self-assembled into long nanofibers, which had high antitumor activity against both A375 and SH-SY5Y cells. The relative survival rate was only 36.08% and 25.56% for A375 and SH-SY5Y, respectively. Comparatively, Fmoc-FFRIKFERQ-OH had lower toxic and side effects on normal cells L929. The self-assembled long fibers formed by Fmoc-FFR-OH can disrupt the membrane of lysosome, which can induce cell apoptosis and/or) death. Thus, the designed Fmoc-FFRIKFERQ-OH is expected to be a new anti-tumor drug due to its high antitumor activity and low toxicity against to normal cells.

Key words lysosomal targeting, self-assembly of peptides *in situ*, enzymatic response, anti-tumor activity

DOI: 10.16476/j.pibb.2020.0170

* This work was supported by grants from the Fundamental Research Funds for the Central Universities(18CX05012A and 18CX02119A).

** Corresponding author.

CHEN Cui-Xia. Tel: 86-532-86981561, E-mail: chenex@upc.edu.cn

ZHAO Yu-Rong. Tel: 86-532-86981562, E-mail: yurongzhao@upc.edu.cn

Received: June 1, 2020 Accepted: August 7, 2020