

一种特异性识别小细胞肺癌细胞的小分子肽*

郭琳琅^{1)**} 郭颖¹⁾ DERICK LAU²⁾ 肖莎¹⁾ 许寅超¹⁾ 申洪³⁾

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

³⁾南方医科大学基础医学院病理学教研室, 广州 510515)

摘要 应用“一个珠子一个化合物”的组合化学肽库技术, 筛选得到特异性识别小细胞肺癌细胞(DMS53)的小分子肽。初次筛选共得到32个与DMS53阳性结合的珠子, 经氨基酸序列分析后发现, 含有cNGRXXXc或cXNGRXXc肽链结构的序列共有10个。再次合成三种有代表性的小分子肽, 发现cFNGRQQc与DMS53的结合率明显高于其他小分子肽。选择cFNGRQQc作进一步的细胞特异性研究, 发现cFNGRQQc与DMS53的粘附特异性明显高于其他细胞系, 对cFNGRQQc的结构分析显示, -NGR-及六肽长度对小分子肽与DMS53细胞的粘附非常重要。用抗整合素、E-cadherin、NCAM及ICAM的抗体或多肽阻断小分子肽与DMS53细胞表面的相应受体结合, 未见明显的阻断效应。小分子肽与DMS53细胞表面的结合位点有待于进一步证实。

关键词 小分子肽, 组合化学, 小细胞肺癌

学科分类号 Q516, R734.2

小分子肽是近年来受到人们重视且有望成为肿瘤应用研究的一个崭新的方向。小分子肽是一种人工合成化合物, 与单克隆抗体相比, 由于其分子质量小, 极易穿透瘤细胞, 且用非天然氨基酸合成的小分子肽链能防止蛋白酶水解, 有较强的稳定性^[1]。

目前用于小分子肽筛选的常用方法有二种: 一为“一个珠子一条肽链”的组合化学肽库, 二为丝状噬菌体。由于前者在肽链合成过程中可随机加入非天然氨基酸, 因此筛选得到的肽链不易被蛋白酶水解, 结构较后者稳定, 是肽链筛选的理想方法^[2,3]。

本研究利用组合化学肽库技术筛选与小细胞肺癌细胞(DMS53)粘附的小分子肽, 通过进一步对小分子肽的特异性和结构稳定性的分析, 得到特异性好且稳定性强的小分子肽, 有望成为小细胞肺癌的特异性诊断标记物及靶细胞治疗的载体。

1 材料与方法

1.1 组合化学肽库

组合化学肽库的设计是把24种氨基酸随机合成在一种树脂胶的珠子上, 珠子直径70~90 μm。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DMS53(小细胞肺癌细胞), A549(肺腺癌细胞), H178(肺腺鳞癌细胞), MCF-7(乳腺癌细胞), PC-3(前列腺癌细胞), SKOV-3(卵巢癌细胞), HT-29(结肠癌细胞), Hs68(皮肤纤维母细胞), Jaket(T淋巴瘤细胞), K562(白血病细胞), 均来自The American Type Culture Collection。所有肺癌细胞和纤维母细胞使用培养液DMEM, Jaket和K562细胞使用RPMI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 μl(约15 000个)的小分子肽珠子, PBS缓冲液和70%酒精各洗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个珠子/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

*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: 2005-11-23, 接受日期: 2005-12-28

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：7 个以上细胞 / 珠子，结合力为++++；5~6 个细胞 / 珠子，结合力为+++；3~4 个细胞 / 珠子，结合力为++；1~2 细胞 / 珠子，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

把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删除小分子肽中的一个氨基酸，得到不同的小分子肽，然后把小分子肽珠子和 DMS53 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粘附活性的影响。

1.6 确定小分子肽与 DMS53 细胞的粘附位点

采用抗细胞表面粘附分子的抗体或多肽，阻断上述获得的小分子肽与 DMS53 细胞表面相关受体结合，以此确定小分子肽与 DMS53 细胞的粘附位点。阻断抗体有 α_{1-6} ， β_{1-5} (Chemicon 公司，USA)，阻断多肽有整合素 $\alpha II b$ ， αE ， αL ， αM 和 αX ，E-cadherin，NCAM 及 ICAM (Santa Cruz，USA)。在 48 孔细胞培养板中分别加入不同浓度的阻断抗体或多肽 (0，0.125，0.25，0.5，1，2，5 mg/L)，然后加入 DMS53 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 培养箱中培养，培养 24 h 和 48 h 后记数有细胞粘附珠子的百分率。

2 结 果

2.1 与 DMS53 细胞阳性结合的小分子肽序列

本实验共对大约 75 000 个小分子肽珠子进行了筛选，其中挑选出 32 个与 DMS53 阳性结合的珠子 (图 1)，阳性珠子占总珠子数的 0.04% (32/75 000)。细胞与珠子的结合力 (affinity，评定标准见 1.3) 见表 1。32 个阳性珠子经氨基酸序列分析后发现，含有 -NGR- 肽链结构的序列共有 10 个

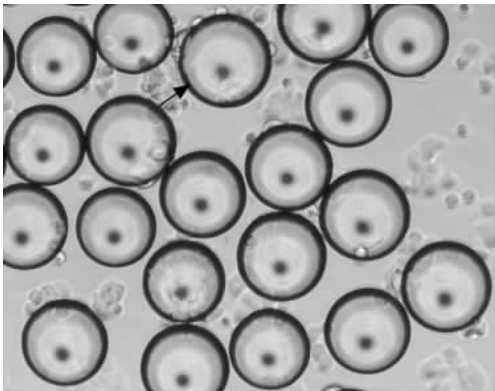


Fig. 1 Positive beads attachment with DMS53 cells after 48 h incubation (arrow)

Table 1 Consensus sequences identified by screening an one-bead one-peptide library with DMS53 cell

No.	Peptide sequence	Affinity of cell binding to peptide (primary screening)	Beads with cell/% (secondary screening)
1	c <u>NGR</u> PMA c	++++	60%
2	c F <u>NGR</u> QQ c	++++	95%
3	c F <u>NGR</u> ML c	++++	
4	c <u>NGR</u> KVH c	++++	
5	c FV <u>NGR</u> Q c	++++	
6	c <u>NGR</u> PMV c	++++	
7	c W <u>NGR</u> HY c	++++	65%
8	c <u>NGR</u> AGT c	++++	
9	c W <u>NGR</u> ST c	++++	
10	c <u>NGR</u> WSY c	++++	
11	c AKNQRT c	+++	
12	c RKQAMH c	++	
13	c RSMRGG c	+++	
14	c RNIHRN c	+++	
15	c TQDHHY c	++	
16	c AIKHTQ c	+++	
17	c MGKKVQ c	++++	
18	c QTVMWV c	++	
19	c FNARGK c	+++	
20	c QKRATR c	++++	
21	c LMKQRM c	+++	
22	c SFKSKY c	+++	
23	c GTHHAE c	++	
24	c PVL DGR c	+++	
25	c FMPKRS c	++++	
26	c TVRMRS c	++++	
27	c IHTRYI c	+++	
28	c DFARGD c	+++	
29	c AQKHKM c	++++	
30	c MAKRQR c	++++	
31	c WDGRHH c	++++	
32	c DGRFKG c	+++	

(表 1). 重新合成的小分子肽 cFNQRQQc 与 DMS53 的结合率明显高于 c WNGRHY c 和 cNGRPMaC.

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 DMS53 的结合率, 我们选择小分子肽 cFNQRQQc 作进一步的细胞特异性研究. 不同细胞株分别与 cFNQRQQc 培养 24 h 和 48 h 后, cFNQRQQc 与 DMS53 细胞的结合率明显高于其他细胞株(表 2).

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

Cell lines	tumor types	Cell growth on beads/%	
		24 h	48 h
DMS53	(SCLC)	61.7	96.7
A549	(Adenocarcinoma)	13.3	35.0
H178	(Adenosquamous CA)	16.7	40.0
MCF-7	(Breast CA)	28.3	73.3
PC-3	(Prostate CA)	20.0	46.7
SKOV-3	(Ovarian CA)	11.7	30.0
HT-29	(Colon CA)	11.7	33.3
Hs68	(Skin fibroblast)	8.0	16.0
Jaket	(T-cell lymphoma)	0	0
K562	(leukemia)	0	0

2.3 小分子肽结构与其粘附活性的关系

把小分子肽中的氨基酸分别用丙氨酸替代或删除小分子肽中的一个氨基酸, 得到的小分子肽与 DMS-53 细胞的结合百分率见表 3.

Table 3 Test for binding specificity to DMS-53 cell with substituted amino acid for cFNQRQQc

No.	Sequence	Beads with cells attachment/%	
		24 h	48 h
1	c FNQRQQ c	55	93.3
2	c FNQRQA c	51.7	91.7
3	c FNGRAQ c	48.3	90
4	c FNGAQQ c	0	0
5	c FNA ⁻ RQQ c	0	1.7
6	c F ⁻ AGRQQ c	0	1.7
7	c ⁻ NGRQQ c	46.7	95
8	c NGRQQ c	10	50
9	c GRQQ c	0	0
10	c FNQRQ c	40	85
11	c FNQR c	30	73.3
12	c NGRQ c	3.3	26.7

2.4 小分子肽 cFNQRQQc 与 DMS53 细胞表面的粘附位点分析

用不同浓度的抗整合素, E-cadherin, NCAM

Table 4 Effects of integrin ($\alpha\beta$), E-cadherin, ECMA and ICAM on DMS53 cell growth on bead with peptide cFNQRQQc

Antibody	Cell attachment on beads (24 h)/%					
	0 mg·L ⁻¹	0.125 mg·L ⁻¹	0.25 mg·L ⁻¹	0.5 mg·L ⁻¹	1 mg·L ⁻¹	2 mg·L ⁻¹
Integrin α 1	48	50	50	48	46	46
Integrin α 2	54	48	50	48	44	44
Integrin α 3	52	54	52	50	46	48
Integrin α 4		52	52	50	50	44
Integrin α 5		50	48	44	42	44
Integrin α 6		48	46	44	44	40
Integrin α v		48	48	48	46	46
Integrin II b		52	52	48	38	40
Integrin α E		50	48	44	44	46
Integrin α L		40	40	44	40	40
Integrin α M		40	42	40	42	42
Integrin α X		52	50	42	44	44
Integrin β 1		44	46	44	40	40
Integrin β 2		48	50	44	46	46
Integrin β 3		46	46	48	44	44
Integrin β 4		52	50	52	48	48
Integrin β 5		50	48	48	46	44
E-cadherin		48	44	48	48	44
NCAM		50	48	44	40	40
ICAM		52	46	48	46	38

和 ICAM 的单克隆抗体或多肽阻断 cFNGRQQc 与 DMS53 细胞表面相关受体结合, 结果显示, 上述抗体和多肽对 cFNGRQQc 与 DMS53 细胞的粘附无明显阻断作用 (表 4)。

3 讨 论

“一个珠子一条肽链”的组合化学肽库技术是 1991 年由 Lam 等^[2,3]首先提出并建立的. 其原理是随机把天然和非天然氨基酸合成于树脂珠子上, 根据实验需要可合成 4、6、8 个氨基酸等不同长度和构象(环状或线状)的肽链, 每个珠子上仅存在一种肽链, 一次实验即可对数万种肽链进行筛选, 筛选效率很高. 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]用前列腺癌细胞株 (DU-H) 在 150 万个肽链中筛选出两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]发现, 筛选得到的两个 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 能特异性地与肺泡细胞癌细胞粘附. Aina 等^[7]筛选得到的小分子肽 cDGX(4)GX(6)X(7)c 能特异性粘附至卵巢癌细胞表面. 我们共挑选了 32 个与 DMS53 细胞阳性结合的珠子, 氨基酸序列分析显示含有 -NGR-肽链结构的序列高达 10 个, 重新合成小分子肽 cFNGRQQc 和 cWNGRHyc, 验证其与 DMS53 细胞结合的特异性, 结果发现小分子肽 cFNGRQQc 与 DMS53 的结合率明显高于 cWNGRHyc. 我们用不同种类的瘤细胞进一步研究 cFNGRQQc 的细胞特异性, cFNGRQQc 与 DMS53 的结合率明显高于其他瘤细胞, 表明 cFNGRQQc 与小细胞肺癌的粘附有较高的特异性。

为验证小分子肽 cFNGRQQc 结构中每一个位置氨基酸在与 DMS53 细胞粘附中的作用, 我们分别用丙氨酸逐步替代每一个氨基酸, 发现 NGR 三个氨基酸对小分子肽与 DMS53 的粘附至关重要. 我们还通过删除小分子肽中某一氨基酸再次验证了 NGR 是小分子肽 c-FNGRQQ-c 与 DMS53 粘附的关键结构. 研究还发现小分子肽的长度(六肽)与细胞的粘附活性也密切相关。

如何确定小分子肽与细胞表面的结合位点, 国外学者已有相关方面的研究报道. Pennington 等^[4]用

整合素 $\alpha 6 \beta 1$ 的单克隆抗体阻断肽链与细胞的结合, 证明癌细胞是通过表面层粘连蛋白 (laminin) 与珠子上肽链结合, 筛选得到的肽链可作为 laminin 的阻断剂. Park 等^[8]则用抗体阻断实验发现, 筛选得到的小分子肽是淋巴瘤细胞表面整合素 $\alpha 4 \beta 1$ 的配体. 我们试图采用相同的方法来确定 c-FNGRQQ-c 与 DMS53 的结合位点, 本研究使用不同浓度的阻断单克隆抗体及多肽包括整合素, E-cadherin, NCAM 及 ICAM, 尽管结果显示上述抗体及多肽未能有效地阻断 c-FNGRQQ-c 与 DMS53 的结合, 两者的结合位点尚不清楚. 但也提示我们, c-FNGRQQ-c 有别于已发现的其他小分子肽, 不是通过细胞表面整合素受体与 DMS53 结合, 与 E-cadherin, NCAM 及 ICAM 也不相关。

综上所述, 本研究筛选得到的六肽分子 cFNGRQQc 是一种能特异性识别小细胞肺癌细胞 DMS53 并与之结合的小分子肽, 下一步研究将利用生物素或荧光素标记小分子肽, 免疫标记小细胞肺癌细胞, 探讨其作为小细胞肺癌特异性诊断标记物的可能性。

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 Park S, Manat R, Vikstrom B, *et al.* Identification of peptide ligands for $\alpha 4 \beta 1$ integrin receptor as potential targeting agents for non-Hodgkin's lymphoma. *Proc Am Peptide Sym*, 2001, **17**: 180~182

A Novel Specific Small Molecule Peptide for Small Cell Lung Cancer*

GUO Lin-Lang^{1)**}, GUO Ying¹⁾, LAU Derick²⁾, XIAO Sha¹⁾, XU Yin-Chao¹⁾, SHEN Hong³⁾

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

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

³⁾*Department of Pathology, Basic Medical College, Nanfang Medical University, Guangzhou 510515, China)*

Abstract Screen small molecule peptide specific binding to small cell lung cancer cell (DMS53) was screened by using the “one-bead one-peptide” combinatorial technology. Thirty two positive beads binding to DMS53 were totally obtained after primary screening. Consensus peptide sequences of cXNGRXXc and cNGRXXXc were identified by amino acid sequencing in ten beads. Three representative peptides were re-synthesized on beads. Secondary screening showed that cell adhesion percentage of cFNQRQQc to DMS53 was higher than the other two peptides. cFNQRQQc was further studied for cell specificity, alanine scanning and site-directed deletion. The results showed that cFNQRQQc is specific for promoting cell adhesion to DMS53 but not to other human cell lines. Both motif of -NGR- and the length of six peptide of cFNQRQQc structure are important for DMS53 attachment. In an antibody or peptide blocking assay, cell adhesion of DMS53 to peptide bead was not inhibited by antibodies or peptides including anti-integrin, E-cadherin, NCAM and ICAM. The binding site on DMS53 surface for cFNQRQQc peptide need to be proven in the future.

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

*This work was supported by a grant from The Science and Technology Plan of Guangzhou (2003Z2-E0061, E0063).

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

Received: November 23, 2005 Accepted: December 28, 2005