

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2013.05.002

· 研究快报 ·

中国人膀胱癌 BIU-87 细胞导向肽的体外筛选与特异性鉴定

王伟¹, 杨晓峰², 凡振伟¹, 张帆³, 徐磊¹(1. 山西医科大学 研究生院, 山西 太原 030001; 2. 山西医科大学 第一附属医院 泌尿外科, 山西 太原 030001; 3. 山西医科大学 免疫学研究中心, 山西 太原 030001)

[摘要] **目的:** 体外差减筛选噬菌体展示环七肽库, 获得与中国人膀胱癌 BIU-87 细胞系高度结合的小分子多肽并鉴定其结合特异性。**方法:** 以中国人膀胱癌 BIU-87 细胞作为靶细胞, 正常人膀胱上皮细胞为吸附细胞, 对噬菌体展示环七肽库进行 3 轮体外差减筛选。ELISA 法鉴定与 BIU-87 细胞呈强阳性结合的噬菌体克隆, 对其编码的 DNA 进行序列测定和同源性分析。化学合成与 BIU-87 细胞强阳性结合的肽段并制备成 FITC 标记的荧光探针, 流式细胞术、荧光显微镜下鉴定其与 BIU-87 细胞、正常人膀胱上皮细胞、人前列腺癌 PC3M 细胞、人肝癌 SMMC-7721 细胞以及人结肠癌 HCT116 细胞的特异结合能力。**结果:** 经 3 轮差减筛选将噬菌体展示环七肽库富集了 25 倍, 阳性率达 76%。共获得 10 个强阳性克隆, DNA 共有序列为 SISSLTH、MARYMSA、TVRTSAD。BIU-87 细胞与小分子荧光探针 FITC-SISSLTH 的结合率为 $(80.06 \pm 8.78)\%$, 显著高于 FITC-MARYMSA 的 $(52.93 \pm 7.28)\%$ 、FITC-TVRTSAD 的 $(38.04 \pm 7.47)\%$ 、FITC-EDRKETA 的 $(1.91 \pm 1.37)\%$ 和 FITC 的 $(9.85 \pm 2.9)\%$ (均 $P < 0.01$)。FITC-SISSLTH 与 BIU-87 细胞的结合率显著高于与正常人膀胱上皮细胞、人前列腺癌 PC3M 细胞、人肝癌 SMMC-7721 细胞和结肠癌 HCT116 细胞的结合率 [$(80.06 \pm 8.78)\%$ vs $(13.89 \pm 1.97)\%$, $(8.13 \pm 2.85)\%$, $(27.00 \pm 2.87)\%$, $(2.33 \pm 1.75)\%$; 均 $P < 0.01$]。**结论:** 噬菌体展示环七肽库经 3 轮体外差减筛选获得高效结合 BIU-87 细胞的导向肽 SISSLTH, 具有良好的结合特异性。

[关键词] 噬菌体展示环七肽库; 膀胱癌; BIU-87 细胞; 差减筛选; 小分子荧光探针; 导向肽

[中图分类号] R737.14; R730.51

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2013)05-0515-07

Screening and identifying of homing peptides to bladder cancer BIU-87 cells in Chinese

Wang Wei¹, Yang Xiaofeng², Fan Zhenwei¹, Zhang Fan¹, Xu Lei¹(1. Graduate School, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi, China; 2. Department of Urological Surgery, First Hospital Affiliated to Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi, China; 3. Immunity Research Center, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi, China)

[Abstract] **Objective:** To screen a peptide strongly binding to the bladder cancer BIU-87 cells from phage 7-mer cyclic peptide library *in vitro* in Chinese, and identify its specificity. **Methods:** 3 rounds subtraction screening was performed on a phage 7-mer cyclic peptide library, with the BIU-87 cells as the target cells and normal human bladder epithelial cells as the absorber cells. Phage clones which can positively bind to BIU-87 cells were identified by ELISA, and those coding DNA were sequenced to analyze the homology. Strongly positive peptide was chemically synthesized to prepare fluorescent probe by tagging fluorescein isothiocyanate (FITC). The affinity between the fluorescent probes and BIU-87 bladder cancer cells, human normal bladder epithelial cells, human prostate carcinoma PC3M cells, human hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells and human colon cancer HCT116 cells were identified by flow cytometry and fluorescence microscopy. **Results:** The c7c phage-display peptides library was enriched for 25 times through 3 rounds of subtraction screening and the positive rate was 76%. 10 strongly positive clones were obtained. For the 10 strongly positive clones, the amino acid

[基金项目] 国家自然科学基金项目资助(No. 81172744)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81172744)

[作者简介] 王伟(1987-),男,山西省阳泉市人,硕士生,主要从事泌尿系统肿瘤的研究。E-mail: wangwei20706@126.com

[通信作者] 杨晓峰(Yang Xiaofeng, corresponding author), E-mail: yxfylq@163.com

[网络出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20130930.1601.007.html>

sequences of SISSLTH, MARYMSA and TVRTSAD were consensus sequence. The binding rate of small molecular fluorescent probe FITC-SISSLATH binding to the BIU-87 bladder cancer cells (80.06 ± 8.78)% was obviously higher than of FITC-MARYMSA(52.93 ± 7.28)%, FITC-TVRTSAD(38.04 ± 7.47)%, FITC-EDRKETA(1.91 ± 1.37)% and FITC(9.85 ± 2.9)% (all $P < 0.01$). The binding rate of the BIU-87 bladder cancer cells binding to FITC-SISSLATH(80.06 ± 8.78)% was higher than that of the normal human bladder epithelial cells(13.89 ± 1.97)%, human prostate carcinoma PC3M cells(8.13 ± 2.85)%, human hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells(27 ± 2.87)% and human colon cancer HCT116 cells(2.33 ± 1.75)%(all $P < 0.01$). **Conclusion:** A targeting peptide SISSLTH binding to BIU-87 cells with high specificity and efficiency was obtained from the phage 7-mer cyclic peptide library through 3 rounds of subtraction screening *in vitro*.

[**Key words**] phage 7-mer cyclic peptide library; bladder cancer; BIU-87 cells; subtraction biopanning; small molecular fluorescent probe; homing peptides

[Chin J Cancer Biother, 2013, 20(5): 515-521]

膀胱癌是泌尿系统常见的恶性肿瘤, 其中 75% ~ 85% 为非肌层浸润性膀胱癌(non muscle invasive bladder tumor, NMIBC)或浅表性膀胱癌。目前, 膀胱镜检查是膀胱癌最可靠的诊断方法, 经尿道膀胱肿瘤切除术(transurethral resection of bladder tumour, TURBt)是治疗 NMIBC 的金标准^[1]。由于 TURBt 术中肿瘤没有彻底切除, 存在肿瘤残余或肿瘤种植, 术后常有肿瘤复发, 是临床治愈膀胱癌的一大难点^[2-3]。现有的诊疗手段不能识别微小膀胱肿瘤, 因此进一步探索特异性强、阳性率高、能识别微小肿瘤的新诊疗手段具有重大意义。光学分子影像学技术能够将高特异性分子探针进行活体标记, 在体形成光学分子影像, 为肿瘤的早期诊断和治疗提供了便利条件^[4-5]。本研究旨在采用噬菌体展示环七肽库技术体外筛选中国人膀胱癌 BIU-87 细胞系导向肽, 并鉴定其结合特异性, 为膀胱癌的分诊断和靶向治疗提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 细胞株和主要试剂

中国人膀胱癌细胞系 BIU-87 购自西安交通大学医学院第一附属医院实验医学中心, 正常人膀胱上皮细胞购自武汉原生生物医药科技有限公司, 人前列腺癌 PC3M 细胞系由山西医科大学寄生虫实验室惠赠, 人肝癌 SMMC-7721 细胞系购自武汉博士德生物工程有限公司, 人结肠癌 HCT116 细胞系由山西医科大学重点实验室惠赠。BIU-87 细胞、正常人膀胱上皮细胞、SMMC-7721 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 1640 培养液中; PC3M 细胞、HCT116 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中。以上细胞均在 37 °C、5% CO₂ 条件下常规培养, 细胞生长至 90% 汇合时传代。噬菌体展示环七肽库试剂

盒(包括噬菌体展示环七肽库, 库容 2.0×10^{13} pfu/ml)、宿主菌 *E. coli* ER2738 以及测序引物 5'-CCCT-CATAGTTAGCGTAACG-3' 均购自美国 NEB 公司, M13 噬菌体单链基因组 DNA 快速提取试剂盒购自北京艾德莱生物科技有限公司, HRP-M13 噬菌体抗体购自美国 GE 公司。

1.2 噬菌体滴度的测定

取噬菌体 10 μ l, 用 LB 培养基进行倍比稀释(肽库或未扩增的淘选洗脱物稀释 $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^5$ 倍; 扩增的噬菌体培养物上清稀释 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^{11}$ 倍), 取各稀释度噬菌体 10 μ l 与 200 μ l 对数生长早期的 ER2738 菌液混匀, 室温孵育 5 min, 加入到 3ml 融化的 LB 顶层琼脂(42 °C ~ 47 °C), 混匀后迅速倾倒入于 37 °C 预温 IPTG/Xgal 的 LB 固体平板, 均匀铺开, 凝固后 37 °C 过夜培养。计数稀释 100 倍平板上的蓝色噬菌斑数。噬菌体滴度计算公式: 噬菌体效价(pfu/10 μ l) = 噬斑数 \times 稀释倍数(即每 10 μ l 的噬菌体形成单位)。

1.3 与 BIU-87 细胞特异性结合的噬菌体筛选

BIU-87 细胞和正常人膀胱上皮细胞生长至 90% 时用 2.5% 胰蛋白酶消化, 将细胞按 1×10^5 /孔的密度接种于预先经多聚赖氨酸处理的 60 mm \times 15 mm 细胞培养皿中, 在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养, 待长至 90% 汇合后开始筛选, 共进行 3 轮筛选。

(1) 将 BIU-87 细胞换用无血清 RPMI 1640 液培养 1 h 后, 分别向 BIU-87 细胞和正常人膀胱上皮细胞培养皿中加入 1% BSA, 于 37 °C 孵育 1 h, 封闭以上两种细胞, 0.05% TBST 洗涤 5 次(第 2 轮、第 3 轮 TBST 中 Tween-20 分别调整为 0.10% 和 0.15%)。(2) 加入噬菌体展示环七肽库(约 2.0×10^{11} pfu), 37 °C 孵育 1 h。(3) 吸去上清液, 弃掉未结合的噬菌体, 用 TBST(0.05%) 冲洗 5 次(第 2 轮、第 3 轮 TBST

中 Tween-20 分别调整为 0.10% 和 0.15%, 洗涤次数分别调整为 8 次和 10 次)。(4) 加入 0.2 mol/L Glycine-HCl (pH 2.2) (含 1 mg/ml BSA) 洗脱液 1 ml 于培养皿中, 100 r/min 微摇 10 min 后, 吸出洗脱液, 转移至预先已加好 1 mol/L Tris-HCl (pH 9.1) 中和液 150 μ l 的微量管中, 立即混匀。(5) 将中和洗脱液加入到已封闭的中国人正常膀胱黏膜上皮细胞培养皿中, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 吸附可以结合正常人膀胱上皮细胞的噬菌体, 其上清即为第 1 轮筛选得到的噬菌体库, 将其感染宿主菌 *E. coli* ER2738, 测定滴度、扩增培养, 用于下一轮的筛选。

3 轮筛选中, 肽库与 BIU-87 细胞的孵育时间依次为 60、45、30 min, 与中国人正常膀胱黏膜上皮细胞孵育的时间依次为 1、1.25、1.5 h。经过 3 轮筛选后, 测定第 3 轮筛选得到的噬菌体滴度, 随机挑取 25 个噬菌体单克隆(编号为 S1、S2、……S25), 制备噬菌体原种用于鉴定。

1.4 噬菌体扩增及纯化

(1) 将吸附后噬菌体洗脱液加入对数前期 ER2738 宿主菌液中, 37 $^{\circ}$ C 200 rpm 剧烈振荡培养 4.5 h, 4 $^{\circ}$ C、6 500 \times g 离心 10 min, 上清液再次离心。(2) 取上清上部的 80%, 加入 1/6 体积的 PEG/NaCl (NaCl 14.6 g、PEG-8000 20 g, 用双蒸水定容至 100 ml), 4 $^{\circ}$ C 沉淀过夜。(3) 4 $^{\circ}$ C、6 500 \times g 离心, PEG 沉淀 15 min, 倒掉上清液, 再短暂离心, 吸去残留上清液。(4) 沉淀物重悬于 TBS 中, 悬液转入微量离心管中, 4 $^{\circ}$ C 离心 5 min 使残余细胞沉淀。(5) 上清用 1/6 体积的 PEG/NaCl 再沉淀, 冰上孵育 1 h。(6) 4 $^{\circ}$ C、7 000 \times g 离心 10 min, 弃上清, 再短暂离心, 用微量移液器吸去残余上清。(7) 沉淀物重悬于 200 μ l TBS (含 0.02% NaN_3) 中, 3 500 \times g 离心 1 min, 上清即洗脱下噬菌体的扩增产物, -20 $^{\circ}$ C 贮存, 用于滴定和下一轮筛选。(8) 测定上清的滴度, 取一定量噬菌体开始下一轮筛选。

1.5 ELISA 法鉴定噬菌体阳性克隆

将 BIU-87 细胞、正常人膀胱上皮细胞按 1×10^4 个/孔的密度接种于 96 孔板中, 37 $^{\circ}$ C 培养, 待细胞贴壁、伸展、长满单层后无血清处理 1 h, 0.25% 戊二醛固定, 滴加 3% H_2O_2 (100 μ l/孔) 后置 37 $^{\circ}$ C 培养箱孵育 30 min。加入含 5% BSA 的 PBS 于 37 $^{\circ}$ C 孵箱封闭 1 h 后, 加入滴度约 2.0×10^{11} pfu 的单克隆噬菌体, 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h, PBS 震荡洗涤 5 次, 加入 50 μ l HRP-antiM13 抗体 (1:5 000), 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 0.05% PBS-T 震荡洗涤 3 次, 加入 100 μ l TMB 溶液显色, 酶标仪检测 450 nm 处的光密度 (D) 值。另设

在第一轮筛选时未结合 BIU-87 细胞、正常人膀胱上皮细胞的噬菌体作为对照, 并设 PBS 组作为空白对照。实验重复 3 次。

计算噬菌体特异性结合系数 = $(DS1 - DP1) / (DS2 - DP2)$ 。DS1 为 BIU-87 细胞 + 阳性噬菌体孔的 D 值; DP1 为 BIU-87 细胞 + 第一轮筛选时未结合噬菌体孔的 D 值; DS2 为正常人膀胱上皮细胞 + 筛选阳性噬菌体孔的 D 值; DP2 为正常人膀胱上皮细胞 + 第一轮筛选时未结合噬菌体孔的 D 值。经过 3 次以上重复实验, 认为结合系数稳定大于 2 的噬菌体克隆在两种细胞上有差异性结合, 为强阳性克隆。

1.6 噬菌体阳性克隆 DNA 测序及分析

选取噬菌体 ELISA 结果为阳性的噬菌体克隆扩增液, 按 M13 噬菌体快速提取试剂盒说明书操作提取噬菌体单链 DNA, 并由生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 测序引物为: 5'-CCCTCATAGT-TAGCGTAACG-3'。将测序结果翻译成氨基酸序列, 在 NCBI/BLAST 网站对获得的氨基酸序列之间及它们与已知蛋白质的氨基酸序列进行同源性分析。

1.7 流式细胞术鉴定小分子多肽探针的特异性

FITC 标记的探针 SISLTHK-FITC、MARYMSAK-FITC、TVRTSADK-FITC 以及随机肽序列 EDRKETAK-FITC 由楚肽生物(上海)科技有限公司合成。待 5 种细胞长至 90% 贴壁后, 分别制成 2.5×10^5 个/ml 密度的细胞悬液, 各取 2 ml 装于 6 个离心管中。将 5 种小分子荧光探针和 FITC 干粉分别用无菌水配成浓度为 3.6 mol/L 的液体, 各取 10 μ l 加入细胞管中。室温下避光染色 60 min, PBS 洗涤 2 次, 4% 多聚甲醛固定后进行 FACS 检测。先鉴定各探针和 BIU-87 细胞的亲和力, 选取亲和力最强的探针, 再鉴定其与其他 4 种细胞的亲和力, 加入 PBS 作为空白对照。实验重复 5 次。

1.8 荧光显微镜观察小分子荧光探针与 BIU-87 细胞的结合

将 5 种小分子荧光探针粉末和 FITC 干粉用灭菌水溶解至浓度为 25 μ mol/L。将生长状况良好的 BIU-87 细胞以 1×10^5 个/孔的密度接种于 6 孔板中培养过夜, 无血清处理 1 h, 4% 多聚甲醛固定 20 min, 0.10% Triton X-100 处理 10 min, 0.05% PBST 洗 3 次, 2% PBS-BSA 封闭 1 h 后, 加入 50 μ l 探针溶液, 37 $^{\circ}$ C 孵育过夜。PBS 洗 6 次, 置于荧光倒置显微镜下观察、拍照。将荧光显微镜下拍摄的图片用 Image-Pro-Plus 7.0 (IPP 7.0) 软件进行分析, 选取感兴趣区域 (region of interest, ROI), 自动计算结合了小分子荧光探针的细胞个数。

1.9 统计学处理

计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS(17.0) 软件, 方差分析, 以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 差减筛选有效富集噬菌体展示环七肽库

表 1 差减筛选对环七肽库中阳性噬菌体克隆的富集效应

Tab.1 Enrichment of the positive phage clones from c7c phage display library by subtraction biopanning

Round	Tween-20(%)	Washing time	Input(pfu)	Output(pfu)	Recovery(%)
1	0.02	5	2.0×10^{11}	8.8×10^7	4.4×10^{-4}
2	0.10	7	2.0×10^{11}	1.4×10^8	7.0×10^{-4}
3	0.15	10	2.0×10^{11}	2.15×10^9	1.1×10^{-2}

Total enrichment multiple: 25

2.2 获得稳定结合 BIU-87 细胞的噬菌体克隆

利用 ELISA 法对第 3 轮筛选后随机挑选的 25 个克隆进行初步鉴定, 依据噬菌体克隆与 BIU-87 细胞系的结合情况, 排除非特异性结合的克隆(仅 PBS 包被的空白对照)。结果显示, BIU-87 细胞组与空白对照组(PBS) D 值之比 ≥ 2 的克隆共有 19 个, 它们能与 BIU-87 细胞系较好结合, 为阳性克隆, 阳性率为 76%。进一步用 ELISA 鉴定其与正常人膀胱上皮细胞的结合情况, 验证这 19 个克隆的特异性。经过 3 次以上重复实验, 计算噬菌体特异性结合系数, 发现 10 个噬菌体克隆在两种细胞上有差异性结合, 确认该噬菌体为强阳性克隆(图 1)。结果说明, 这 10 个噬菌体克隆是与中国人膀胱癌 BIU-87 细胞系特异性结合的噬菌体克隆。

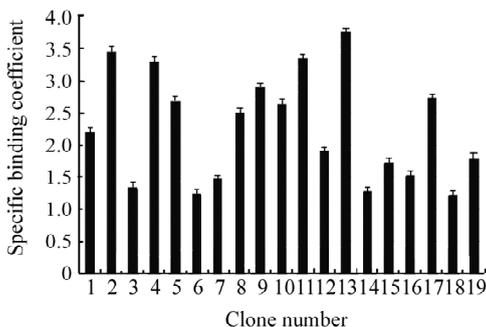


图 1 ELISA 法鉴定噬菌体特异性结合能力
Fig.1 Specific binding ability of phage identified by ELISA

以 BIU-87 细胞系为靶细胞, 以正常人膀胱上皮细胞为吸附细胞, 完成对噬菌体展示环七肽库的 3 轮差减筛选。结果(表 1)显示, 每轮筛选时保持噬菌体投入量, 而回收率逐轮提高, 说明筛选过程有效富集了能够结合 BIU-87 细胞的噬菌体克隆, 3 轮筛选后将环七肽库共富集了 25 倍。

2.3 噬菌体克隆阳性编码小分子多肽序列的同源性分析

对上述 10 个噬菌体克隆提取 DNA 测序, 确定插入序列, 并翻译出相应的氨基酸序列。10 个氨基酸序列中, SISSLTH 出现 3 次, MARYMSA、TVRTSAD 各出现 2 次, KLSLGET、EGQRWMQ、GSTGLSS 均只出现 1 次。在 BLAST 数据库搜索, 上述氨基酸之间均无同源性, 在现有的人源性蛋白质/多肽库中没有发现与本实验所得小分子肽序列完全一致或者有较大同源性的蛋白质分子。

2.4 小分子荧光探针 FITC-SISSLTH 高特异性结合膀胱癌 BIU-87 细胞

流式细胞仪检测结果(图 2、3)显示: 小分子荧光探针 FITC-SISSLTH 与 BIU-87 细胞结合率为 $(80.06 \pm 8.78)\%$, 高于 FITC-MARYMSA 的 $(52.93 \pm 7.28)\%$ 、FITC-TVRTSAD 的 $(38.04 \pm 7.47)\%$ 、FITC-EDRKETA 的 $(1.91 \pm 1.37)\%$ 以及 FITC 的 $(9.85 \pm 2.9)\%$ (均 $P < 0.01$); BIU-87 细胞与小分子荧光探针 FITC-SISSLTH 结合的结合率要明显高于与中国人正常膀胱黏膜上皮细胞的 $(13.89 \pm 1.97)\%$ 、人前列腺癌 PC3M 细胞的 $(8.13 \pm 2.85)\%$ 、人肝癌 SMMC-7721 细胞的 $(27.00 \pm 2.87)\%$ 以及人结肠癌 HCT116 细胞的 $(2.33 \pm 1.75)\%$ (均 $P < 0.01$)。

2.5 FITC-SISSLTH 是与 BIU-87 细胞结合最强的小分子荧光探针

倒置荧光显微镜观察结果显示, 小分子荧光探

针 FITC-SISSLTH 与 BIU-87 细胞结合的数量为 (1 412 ± 99)个、FITC-EDRKETA 的(1 072 ± 92)个 (5 002 ± 677)个,显著高于小分子荧光探针 FITC-MARYMSA 的(3 507 ± 391)个、FITC-TVRTSAD 的

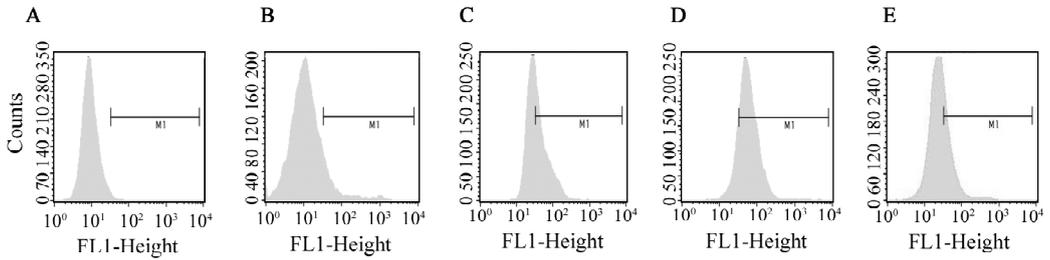


图 2 流式细胞术检测不同小分子荧光探针与 BIU-87 细胞的结合能力

Fig. 2 Binding ability of different small molecule fluorescent probes with BIU-87 cells by FCM analysis

A: FITC-SISSLTH; B: FITC-MARYMSA; C: FITC-TVRTSAD; D: FITC-EDRKETA; E: FITC

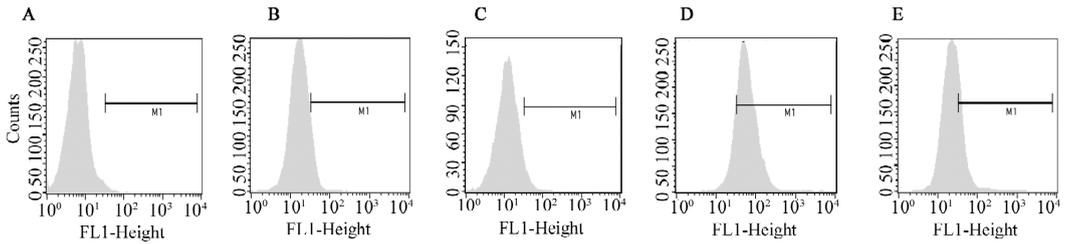


图 3 流式细胞术检测 FITC-SISSLTH 与不同肿瘤细胞的结合能力

Fig. 3 Binding ability of FITC-SISSLTH with different tumor cells by FCM analysis

A: BIU-87; B: Normal human bladder epithelial cells; C: PC3M; D: SMMC-7721; E: HCT 116

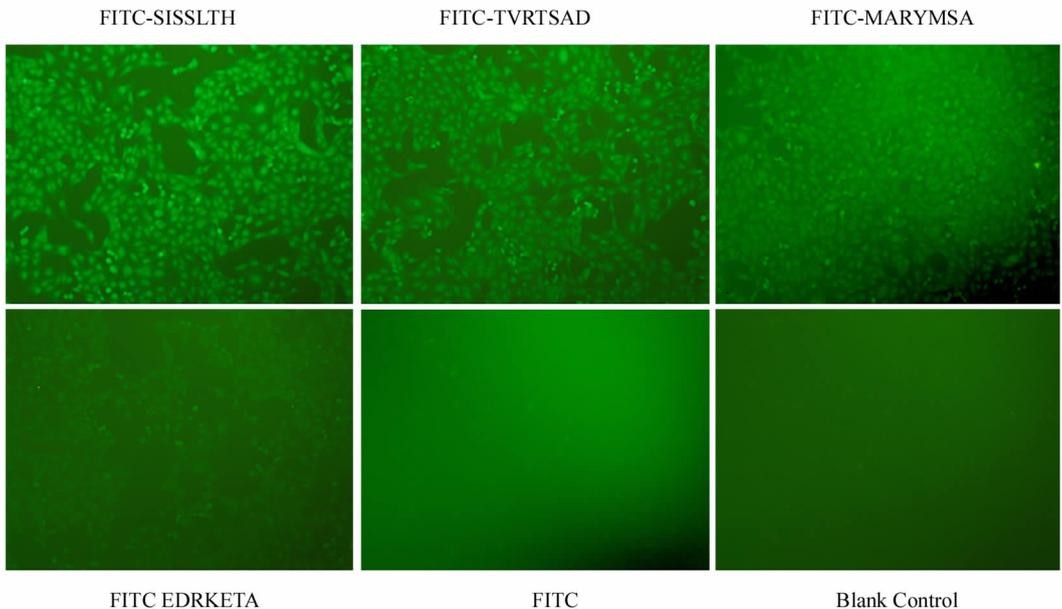


图 4 小分子荧光探针与 BIU-87 细胞系结合情况(× 100)

Fig. 4 Binding condition of small molecule fluorescent probes and BIU-87 cells (× 100)

3 讨论

噬菌体展示肽库技术由 Smith^[6]1985 年建立至今,已成为分子生物学领域一个重要的筛选分子间相互作用的体系。以整个细胞作为靶标筛选肿瘤特异性结合肽,即使未能预知肿瘤细胞表面的特异性分子,也能够获得与肿瘤细胞特异结合的多肽^[7]。由于噬菌体展示肽库技术具有库容大、高通量、操作简便等特点,其已成为筛选肿瘤细胞或组织的特异性结合肽的一个强大工具,在体外已成功筛选到针对不同肿瘤细胞如神经胶质瘤细胞、肺癌细胞以及鼻咽癌细胞等特异性结合肽。在肿瘤血管导向肽方面,人们也成功筛选出了一些可与肿瘤血管靶向性结合的小分子多肽,在肿瘤的诊断、靶向治疗等方面具有潜在的临床应用价值^[8-10]。Lee 等^[11]曾在 2007 年采用噬菌体展示肽库技术成功筛选得到了膀胱肿瘤 HT-1376 细胞系的导向肽-CSNRDARRC 九肽序列,并通过一系列实验证明其能够选择性地与人类膀胱肿瘤组织结合,可进一步作为膀胱肿瘤诊断和治疗的载体;但是仅针对膀胱肿瘤 HT-1376 细胞系,未对其他膀胱肿瘤细胞系进行筛选。李俊等^[12-15]证明,分子探针 FITC-CSNRDARRC 可与中国人膀胱癌细胞及组织特异性结合,但特异性有待提高。膀胱癌 BIU-87 细胞系是我国最早建立的的人体浅表性膀胱癌细胞系^[16-17]。本研究采用噬菌体展示环七肽库技术,以中国人膀胱癌 BIU-87 细胞系作为靶细胞,正常人膀胱上皮细胞为吸附细胞,简便、快速地筛选得到与中国人膀胱癌 BIU-87 细胞系特异结合的噬菌体克隆,筛选出能和中国人膀胱癌 BIU-87 细胞系特异性结合的氨基酸序列。

噬菌体展示肽库筛选技术面临的挑战是如何在最大限度地减少非特异性噬菌体结合的同时,最大限度地富集特异性噬菌体,因此筛选方法的改进始终是该技术发展的动力。目前国内外文献报道的噬菌体展示肽库筛选方法有很多种,主要有固相纯化抗原筛选^[18]、全细胞筛选^[19]、动物体内筛选^[20]以及血清筛选^[21]等。本研究采用了全细胞筛选技术,全细胞筛选具有方便、简捷、不需要纯化抗原等优点,但非特异性结合较多。为减少非特异性的噬菌体结合,最大限度地富集特异性噬菌体,黄建等^[22]利用差减筛选的方法筛选到了特异性抗体,并采用逐轮增强洗涤力度(0.05% TBST, 0.10% TBST, 0.15% TBST)、同时减少与靶细胞 BIU-87 孵育时间(60, 45, 30 min)的方法,获得了与靶细胞具有较高特异性结合的噬菌体克隆。本研究采取差减筛选策略,

以正常人膀胱上皮细胞为吸附细胞,大大减少了与中国人膀胱癌 BIU-87 细胞系非特异性结合的噬菌体,使肽库有效富集了 25 倍,阳性率达 76%。

分析多肽的结构发现,多肽 SISSLTH 有 3 个丝氨酸残基,对构相有一定限制作用,肽环中有 1 个组氨酸残基,能与 Cu、Zn 离子螯合,可以增加多肽的稳定性。因此,本研究获得的环七肽 SISSLTH 是一个构相稳定、体外保存稳定的多肽,使其在与靶分子亲和实验、细胞学实验、体内实验中的结果更加稳定,可重复性高。体外稳定的多肽有利于保存,便于以后的研究。本研究通过流式细胞仪、荧光显微镜两种方法证明了 SISSLTH 为中国人膀胱癌 BIU-87 细胞导向肽,与 BIU-87 细胞有很强的特异性结合力。该结果预示中国人膀胱癌 BIU-87 细胞表面可能存在小分子多肽 SISSLTH 的特异性结合位点,从而为膀胱癌的早期诊断和靶向治疗提供一定的实验依据。

本研究在体外的细胞水平上对多肽 SISSLTH 的特异性进行了验证,要进行膀胱癌的靶向诊断,尚需继续在组织水平上验证其组织特异性,而多肽 SISSLTH 是否同时具有体内靶向性,尚需结合动物活体靶向分布示踪等实验从整体动物水平进一步证实,并结合临床研究进一步检验其特异性和靶向性。本研究为多肽 SISSLTH 在膀胱癌早期诊断和靶向治疗中的应用提供了实验基础。

[参考文献]

- [1] Thomas K, O'Brien T. Improving transurethral resection of bladder tumour: The gold standard for diagnosis and treatment of bladder tumours [J]. *Eur Urol*, 2008, 7(7): 524-528.
- [2] 杨晓峰, 申鹏飞, 亢全寅. 复发性膀胱移行细胞癌 10 年随访结果分析 [J]. *中华泌尿外科杂志*, 1998, 19(9): 19-22.
- [3] Barlow LJ, McKiernan JM, Benson MC. Long-term survival outcomes with intravesical docetaxel in the management of recurrent non-muscle-invasive bladder cancer (NMIBC) after previous BCG therapy [J]. *J Urol*, 2013, 189(3): 834-839.
- [4] Bomhop DJ, Contag CH, Licha K, et al. Advances in contrast agents, reporters, and detection [J]. *J Biomed Opt*, 2001, 6(2): 106-110.
- [5] Banerjee B, Miedema B, Chandrasekhar HR. Emission spectra of colonie tissue and endogenous fluorophores [J]. *Am J Med Sci*, 1998, 316(3): 220-226.
- [6] Smith GP. Filamentous fusion phage: Novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface [J]. *Science*, 1985, 228(4705): 1315-1317.
- [7] Oyama T, Sykes KF, Samli KN, et al. Isolation of lung tumorspecific peptides from a random peptide library: generation of diagnostic and cell-targeting reagents [J]. *Cancer Lett*, 2003, 202(2):

- 219-230.
- [8] Zhi M, Wu KC, Hao ZM, et al. Screening of specific binding peptide targeting blood vessel of human esophageal cancer *in vivo* in mice [J]. Chin Med J (Engl), 2011, 124(4): 581-585.
- [9] Chen K, Yap LP, Park R, et al. A Cy5.5-labeled phage-displayed peptide probe for near-infrared fluorescence imaging of tumor vasculature in living mice [J]. Amino Acids, 2012, 42(4): 1329-1337.
- [10] Laakkonen P, Vuorinen K. Homing peptides as targeted delivery vehicles [J]. Integr Biol(Camb), 2010, 2(7/8): 326-337.
- [11] Lee SM, Lee EJ, Hong HY, et al. Targeting bladder tumor cells *in vivo* and in the urine with a peptide identified by phage display [J]. Mol Cancer Res, 2007, 5(1): 11-19.
- [12] 刘仍新,杨晓峰,李俊. FITC-CSNRDARRC 分子探针靶向标记与膀胱移行细胞癌分级相关性的研究 [J]. 中国医药导报, 2012, 9(29): 25-26.
- [13] 赵扬,杨晓峰,郝小强. 多肽 CSNRDARRC 与膀胱癌细胞结合亲和性及其位点的研究 [J]. 现代泌尿生殖肿瘤杂志, 2011, 3(2): 105-107.
- [14] 李俊,杨晓峰,刘仍新. 小分子肽 CSNRDARRC 与膀胱移行细胞癌组织特异性结合的研究 [J]. 现代泌尿外科杂志, 2012, 17(3): 265-267.
- [15] Jia XY, Yu Q, Zhang ZH, et al. Targeting bladder tumor cells in voided urine of Chinese patients with FITC-CSNRDARRC peptide ligand [J]. Onco Targets Ther, 2012, 5(12): 85-90.
- [16] 俞莉章,黄雅丽. 人体膀胱移行细胞癌细胞系 BIU-87 的建立及其生物学特性 [J]. 北京医科大学学报, 1989, 10(3): 131-135.
- [17] 俞莉章,黄雅丽,宋莲芬. 新建人膀胱癌细胞系 BIU-87 的染色体分析 [J]. 北京医科大学学报, 1990, 2(22): 116-118.
- [18] 毕仙民,梁志清,侍立峰. 应用噬菌体肽库筛选 Endoglin 的结合肽 [J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(7): 582-584.
- [19] Zhang BH, Zhang YQ, Wang JW, et al. Screening and identification of a targeting peptide to NCI-H1299 from a phage display peptide library [J]. Mol Med, 2007, 13(5/6): 246-254.
- [20] Pasqualini R, Ruoslahti E. Organ targeting *in vivo* using phase display peptide libraries [J]. Nature, 1996, 380(6572): 364-366.
- [21] 苏荣,李秀萍,靳更林. 应用噬菌体随机肽库筛选结肠癌患者血清中的肿瘤标记物的研究 [J]. 宁夏医学杂志, 2006, 28(2): 86-88.
- [22] 黄建,肖艳,童永清,等. 全人源抗肝癌噬菌体单链抗体的筛选与鉴定 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2008, 24(3): 256-260.
- [收稿日期] 2013-05-20 [修回日期] 2013-07-29
- [本文编辑] 韩丹,周玲琳

· 科技动态 ·

cGAS 是识别 HIV 及其他逆转录病毒的固有免疫识别受体

人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)等逆转录病毒可以激活固有免疫反应,但对机体如何识别逆转录病毒却知之甚少。cGAS(cyclic guanosine monophosphate-adenosine monophosphate synthase)是近期被发现的一个新的胞内 DNA 识别受体, cGAS 能够结合胞内的 DNA, 催化产生第二信使 cGAMP(cyclic guanosine monophosphate-adenosine monophosphate)。cGAMP 继而结合并活化 STING(stimulator of interferon genes), 启动机体固有免疫反应。

在人的单核细胞系 THP1 细胞中, 作者发现 HIV 逆转录酶抑制剂能够阻断病毒诱导的 I 型干扰素的产生, 整合酶抑制剂则无此功能, 表明 HIV 激活固有免疫反应依赖于其逆转录产生 DNA。在小鼠及人的细胞系中, 敲除或敲低 cGAS 的表达能够阻断鼠白血病病毒(murine leukemia virus, MLV), HIV 及猴免疫缺陷病毒(simian immunodeficiency virus, SIV)诱导的 I 型干扰素及其他细胞因子的产生。作者利用质谱扫描检测证实 HIV 感染能够诱导产生 cGAMP, 而这一过程依赖于 cGAS 以及病毒逆转录产生的 DNA。在人的原代免疫细胞中, 作者重复了上述实验并取得了一致的结果。总之, cGAS 作为一个普遍的识别逆转录病毒 DNA 的受体, 在机体抗 HIV、SIV 以及 MLV 的固有免疫反应中发挥至关重要的作用。

HIV 主要感染人体的 CD4⁺ T 细胞, 但同时它也可以侵入巨噬细胞和树突状细胞, 利用衣壳包裹隐藏病毒核酸, 或通过 TREX1 和 SAMHD1 等分子限制病毒 DNA 的积累等方式, 逃避固有免疫反应, 疫苗的开发因此而困难重重。HIV 及其他逆转录病毒能够通过 cGAS 诱导产生 cGAMP, cGAMP 可能被用来绕过这一难题从而触发免疫反应。因此, 针对能够破坏宿主固有免疫系统的 HIV 及其他病原体, 在新的疫苗研发中, cGAMP 或许可以成为一个有效的疫苗佐剂。

[温明岳 摘译, 安华章 审阅. Gao D, Wu J, Wu YT, et al. Science, 2013, 341(6148): 903-906.]