

基于复杂生物体系的噬菌体随机肽库筛选

朱永红 邹全明*

(第三军医大学医学检验系, 重庆 400038)

摘要 近年来, 噬菌体肽库生物淘筛方法又取得了新的进展, 出现了以活细胞、病毒及组织器官等复杂生物体系, 代替纯化的抗原、抗体或受体分子等作为筛选靶标的方法, 并取得了较好的应用效果. 其中, 以肿瘤组织筛选噬菌体肽库获得的短肽能选择性富集于肿瘤组织, 在肿瘤靶向性治疗中具有潜在的应用前景.

关键词 噬菌体显示, 随机肽库, 生物淘筛, 体内生物淘筛

学科分类号 Q78

噬菌体显示技术是将外源蛋白与噬菌体外壳蛋白融合而将外源蛋白表达于噬菌体的表面, 该技术已广泛用于随机肽库 (random peptide libraries, RPLs) 及抗体库等的构建. 其中由噬菌体递呈的 RPLs 包括随机短肽库、限制性肽库及基于蛋白质框架的随机突变库等, 这些 RPLs 除了大量用于蛋白质抗原表位分析外^[1], 还广泛用于各种蛋白质、核酸和碳水化合物的结合特性研究, 以及进行蛋白质生物活性的改造等^[2]. 这些研究都基于一种称之为生物淘筛 (bio-panning) 的筛选方法的建立. 传统的生物淘筛方法系将筛选分子 (纯化的抗原、抗体、受体及核酸等) 包被 (固相化) 在微孔板上, 加入 RPLs 孵育, 继之以酸或竞争性受体洗脱下吸附的噬菌体, 经繁殖扩增后, 再进行下一轮淘筛, 由此筛选出与纯化的筛选分子结合的肽段分子. 近年来, 又出现了一些以病毒、活细胞及组织器官等复杂生物体系作为筛选靶标的筛选方法, 并获得了较好的应用效果, 现介绍如下.

1 以细胞作为靶标的筛选方法

以往采用噬菌体 RPLs 研究受体与配体的相互作用大多以纯化的受体分子筛选肽库, 从而获得与受体分子结合的肽段, 而当对某一受体分子的结构信息了解不多以及在细胞膜表面受体未知的情况下, 获得纯化的天然受体分子将十分困难, 而且纯化的受体分子还可能失去其天然构象与功能, 此时, 采用表达该受体的完整细胞作为筛选靶标不失为一种简便的选择. 目前, 用于筛选噬菌体 RPLs 的细胞包括转染受体基因的细胞、血小板、外周血中性粒细胞及体外培养的肿瘤细胞等. Goodson

等^[3]将尿激酶受体 (uPAR) 基因转染 COS-7 猴肾细胞及 Sf9 昆虫细胞, 获得尿激酶受体的高表达细胞, 以此筛选 15 肽 RPLs, 获得数条尿激酶受体结合肽, 这些短肽序列与已知尿激酶序列不同. 采用细胞筛选 RPLs 需遵循一定的筛选程序, 以减少非特异性噬菌体吸附. Goodson 等采用的筛选步骤如下: 先将噬菌体 RPLs 与表达非相关受体 P 物质受体的 Sf9 细胞孵育, 将细胞离心, 去除非特异性吸附噬菌体, 收集上清, 再与表达尿激酶受体的 Sf9 细胞孵育, 充分洗涤细胞, 用 6 mol/L 尿素 (pH 3) 洗脱与细胞表面结合的噬菌体, 洗脱的结合噬菌体经扩增后以表达 uPAR 的 COS-7 细胞再进行下一轮亲和筛选, 第 3 轮又以 Sf9 细胞进行筛选.

Szardenings 等^[4]采用表达黑色素皮质素受体 1 (MC1) 的细胞, 筛选该受体的天然配体的噬菌体突变库, 获得了能特异地与 MC1 受体结合的配体突变体. Doorbar 等^[5]以凝血酶受体的限制性配体 (tethered ligand) 序列为基础, 构建了一个噬菌体 14 肽库, 然后以人外周血小板筛选该肽库, 用一种已知的由凝血酶衍生的凝血酶受体的短肽激动剂洗脱与血小板结合的噬菌体, 由此筛选到凝血酶受体结合的短肽. 这些短肽与天然配体具有一些共同的结构特点, 序列中有一精氨酸残基, 后接一个脯氨酸残基. 对其中几个肽段进行人工合成, 发现其中一个合成肽能抑制肽激动剂诱发的血小板聚集, 以及抑制凝血酶和肽激动剂诱导的 5-羟色胺释放及酪氨酸磷酸化. 该肽段的抗血小板聚集活性是以

* 通讯联系人.

Tel: 023-68752316, E-mail: Clinimmu@mail.tmmu.com.cn

收稿日期: 2000-01-27, 接受日期: 2000-02-29

往报道的凝血酶受体肽拮抗剂的 10 倍以上。最近, Mazzucchelli 等^[6]用人嗜中性粒细胞 (PMN) 筛选噬菌体 6 肽、9 肽及 10 肽库, 通过降低 pH 值及加入非离子型去垢剂洗脱结合噬菌体, 获得了几条能与 PMN 结合的短肽, 含这些短肽的噬菌体与 PMN 的结合具有高度特异性, 而且能诱导 PMN 细胞内钙增加, 这些短肽将有助于细胞表面特异性受体分子的鉴定。

国内学者马学军等^[7]在改造人干扰素 $\alpha 1c/86D$ 的研究中, 先采用噬菌体显示技术构建基于 AB 环的干扰素突变库, 然后采用细胞选择的策略选择出具有高抗病毒活性的干扰素突变体。研究中筛选用细胞为 WISH 细胞, 该细胞表面干扰素受体的表达非常丰富, 由此建立了干扰素突变体的封闭-竞争筛选方法, 其基本原理如下: 用足够量的干扰素分子先封闭 WISH 细胞表面的所有干扰素受体部位, 加入重组噬菌体, 经过 3 次非特异性吸附后, 未结合的噬菌体与非封闭的 WISH 细胞结合, 充分洗涤后, 用过量的干扰素分子特异地竞争洗脱出与受体结合的噬菌体干扰素突变体。所筛选到的突变体较母体干扰素的活性高 4~16 倍。

2 以病毒颗粒作为靶标的筛选方法

筛选与病毒相互作用的短肽有助于确定何种蛋白质能与病毒结合以及寻找细胞膜上的病毒受体分子, 与病毒结合的短肽可能具有干扰病毒与宿主细胞结合及其内化的作用, 从而降低病毒的感染性。Pulli 等^[8]用纯化的埃可病毒 22 (EV22) 包被微孔板, 以此筛选 RPLs, 获得一环肽, 该环肽能部分阻止埃可病毒感染人 A549 肺癌细胞系。值得一提的是, 纯化的呈现该短肽的噬菌体也具有抑制病毒感染的作用。Heiskanen 等^[9]研究发现, 与汉坦病毒结合的噬菌体也能抑制该病毒对培养细胞的感染。

3 以组织器官作为靶标的筛选方法

1996 年, Pasqualini 等^[10]将噬菌体 RPLs 静脉注射给小鼠, 待噬菌体在小鼠体内循环 1~4 min 后, 杀死小鼠, 收集各器官中的噬菌体, 经体外扩增后再注射给小鼠进行下一轮筛选。采用这种体内生物淘筛 (*in vivo* bio-panning) 方法, 筛选到脑组织和肾组织特异性靶向肽。用脑组织特异性靶向肽包被经戊二醛固定的红细胞, 然后将其静脉注射入小鼠体内, 结果这种包被的红细胞选择性定位于

脑组织内。由于噬菌体在小鼠体内仅循环几分钟, 因此与噬菌体结合的受体很可能位于内皮细胞表面, 免疫组织化学染色也显示噬菌体在注入体内数分钟后未离开血管循环, 仍停留在血管腔。随后, Rajotte 等^[11]采用相同的方法筛选到能选择性结合到肺、皮肤、胰腺、小肠、子宫、肾上腺及视网膜内皮的短肽。采用能与肺血管内皮选择结合的短肽 CFE-1 对小鼠肺组织进行亲和层析, 分离到一种分子质量为 55 ku 的细胞膜表面蛋白, 蛋白质序列分析发现, 该蛋白质受体为细胞膜二肽酶 (MDP), 该酶是细胞膜表面的一种锌依赖性金属蛋白酶。表面呈现 CFE-1 肽的噬菌体能选择性与转染 MDP cDNA 的 COS-1 细胞结合。此外, 合成的 CFE-1 肽能抑制 MDP 的活性。该项研究为阐明噬菌体呈现短肽与肺组织特异性结合的分子基础提供了很好的研究方法和线索, CFE-1 短肽在研制肺组织靶向给药系统时可能具有潜在应用价值^[12]。

近年来, 以肿瘤特异性抗原或标志物筛选 RPLs 获得肿瘤靶向性短肽分子, 为肿瘤靶向性治疗提供了新的发展方向。首先通过筛选获得肿瘤靶向性短肽分子, 然后将该短肽分子与药物或脂质体连接或将该短肽表达于基因治疗中的病毒或细胞载体上, 从而达到肿瘤靶向治疗的目的^[13], 递呈短肽的噬菌体本身也可能成为基因治疗的载体^[14]。很显然, 由短肽介导的靶向治疗方法较之传统的抗体介导的靶向治疗更有优越性, 由抗体介导的靶向治疗通常具有组织穿透性差及存在免疫原性等缺点^[15]。但在大多数情况下, 肿瘤抗原及标志物不易确定, 获得纯化的肿瘤抗原或标志物十分困难, 此时, 采用肿瘤组织作为筛选靶标不失为一种创新性选择。Arap 等^[16]将人乳腺癌移植给裸鼠, 再将噬菌体 RPLs 注射给这些肿瘤移植小鼠, 由此筛选获得与肿瘤血管内皮特异性结合的短肽, 所获得的 2 个肿瘤靶向性短肽分别含有整合素 (integrin) 配体的基序 (motif) RGD-4C 及 CNGRC。将所获得的短肽与抗癌药阿霉素偶联, 能增强阿霉素在裸鼠中抗人乳腺癌移植物的效果, 并降低其毒性反应, 他们还将呈现 9 肽 CDCRGDCFC 的噬菌体 (RGD-4C 噬菌体) 注入黑色素瘤及乳腺癌移植小鼠, 结果这些噬菌体在肿瘤移植物中的聚集量明显高于对照噬菌体, 而在一些正常组织中则检测不到该噬菌体, 提示该噬菌体具有特异性结合肿瘤组织的特性。有学者认为, 由短肽介导的肿瘤靶向治疗易于推广到临床, 因为短肽容易制备, 由短肽携带的抗

肿瘤药物又是目前临床上正在使用的药物。此外,一些抗肿瘤效果更好,由于常规给药毒性太大,未能进入临床使用的药物,有可能在靶向治疗中发挥重要作用^[17]。最近, Ellerby 等^[18]设计并合成了一种短肽,该短肽含有两个功能结构域,其中一个含有肿瘤靶向性结构域,另一个为介导程序性细胞死亡的结构域,这种肿瘤靶向性促凋亡肽 (targeted pro-apoptotic peptide) 能选择性作用于肿瘤血管内皮细胞,具有良好的抗癌活性。

4 展 望

新的筛选方法尤其是体内生物淘筛方法的建立进一步拓展了噬菌体肽库技术的应用范围,这些筛选方法使得以前采用传统的生物淘筛方法不能进行的筛选成为可能。采用由完整细胞、病毒或组织器官筛选到的肽段均呈现出非常好的应用前景。其中,采用肿瘤组织筛选的肿瘤靶向性短肽在肿瘤影像诊断及其靶向性治疗中均具有极大的应用价值。随着研究的深入,许多结合短肽将逐步进入临床应用阶段。

参 考 文 献

- 1 Cortese R, Felici F, Galfre G, *et al.* Epitope discovery using peptide libraries displayed on phage. *TIBTECH*, 1994, **12** (7): 262~ 267
- 2 Koivunen E, Arap W, Rajotte D, *et al.* Identification of receptor ligands with phage display peptide libraries. *J Nucl Med*, 1999, **40** (5): 883~ 888
- 3 Goodson R J, Doyle M V, Kaufman S E, *et al.* High-affinity urokinase receptor antagonists identified with bacteriophage peptide display. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91** (5): 7129~ 7133
- 4 Szardenings M, Tornroth S, Mutulis F, *et al.* Phage display selection on whole cells yields a peptide specific for melanocortin receptor 1. *J Biol Chem*, 1997, **272** (44): 27943~ 27948
- 5 Doorbar J, Winter G. Isolation of a peptide antagonist to the thrombin receptor using phage display. *J Mol Biol*, 1994, **244** (4): 361~ 369
- 6 Mazzucchelli L, Burritt J B, Jesaitis A J, *et al.* Cell-specific binding by human neutrophils. *Blood*, 1999, **93** (5): 1738~ 1748
- 7 马学军, 胡 荣, 吕 海, 等. 噬菌体显示技术改造人干扰素 $\alpha 1c/86D$ 的研究. *中国科学 (C 辑)*, 1999, **29** (2): 209~ 216
- 8 Pulli T, Koivunen E, Hyypia T. Cell-surface interactions of echovirus 22. *J Biol Chem*, 1997, **272** (34): 21176~ 21180
- 9 Heiskanen T, Ludkvist A, Vaehri A, *et al.* Phage-displayed peptide targeting on the Puumala Hantavirus neutralization site. *J Virol*, 1997, **71** (5): 3879~ 3885
- 10 Pasqualini R, Ruoslahti E. Organ targeting *in vivo* using phage display peptide libraries. *Nature*, 1996, **380** (6572): 364~ 366
- 11 Rajotte D, Arap W, Hagedorn M, *et al.* Molecular heterogeneity of the vascular endothelium revealed by *in vivo* phage display. *J Clin Invest*, 1998, **102** (2): 430~ 437
- 12 Rajotte D, Ruoslahti E. Membrane dipeptidase is the receptor for a lung-targeting peptide identified by *in vivo* phage display. *J Biol Chem*, 1999, **274** (17): 11593~ 11598
- 13 Pasqualini R. Vascular targeting with phage peptide libraries. *Q J Nucl Med*, 1999, **43** (2): 159~ 162
- 14 Barry M A, Dower W J, Johnston S A. Toward cell-targeting gene therapy vectors: selection of cell-binding peptides from random peptide-presenting phage libraries. *Nat Med*, 1996, **2** (3): 299~ 305
- 15 Burg M A, Pasqualini R, Arap W, *et al.* NG2 proteoglycan-binding peptides target tumor neovasculature. *Can Res*, 1999, **59** (12): 2869~ 2874
- 16 Arap W, Pasqualini R, Ruoslahti E. Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model. *Science*, 1998, **279** (5349): 377~ 380
- 17 Barinaga M. Peptide-guided cancer drugs show promise in mice. *Science*, 1998, **279** (5349): 323~ 324
- 18 Ellerby H M, Arap M, Ellerby L M, *et al.* Anti-cancer activity of targeted pro-apoptotic peptides. *Nat Med*, 1999, **5** (9): 1032~ 1038

Screening of Phage Display Peptide Libraries Using Complex Biological Systems as Selector Targets

ZHU Yong-Hong, ZOU Quan-Ming*

(Faculty of Medical Laboratory Sciences, The Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract During recent years, some new methods for phage display panning have been developed by using complex biological systems instead of purified antigens, antibodies or receptors as selector targets. These complex biological systems include living cells, viruses, mouse tissues and tumors etc. The peptides identified by using tumors as selector molecules can selectively home to blood vessels of experimental tumors and may have potential applications in targeted anti-tumor treatment.

Key words phage display, random peptide libraries (RPLs), bio-panning, *in vivo* bio-panning

* Corresponding author. Tel: 86-23-68752316, E-mail: Clinimmu@mail.tmmu.com.cn

Received: January 27, 2000 Accepted: February 29, 2000