

[文章编号] 1000- 4718(2005)06- 1136- 03

# 子宫内膜腺癌细胞系特异性结合短肽筛选及分析

陆琳<sup>2</sup>, 钟雪云<sup>1△</sup>, 王自能<sup>2</sup>, 颜艳灵<sup>1</sup>, 杜彬<sup>1</sup>  
(暨南大学 <sup>1</sup>医学院病理教研室, <sup>2</sup>附属第一医院妇产科, 广东 广州 510632)

[摘要] 目的和方法: 用噬菌体随机 12 肽库对人子宫内膜腺癌细胞系(EAC)进行全细胞筛选, 并通过特异性结合实验检验所筛选出的克隆的结合特异性。结果: 经过 5 轮“吸附- 洗脱- 扩增”, 噬菌体高度富集, 并得到 1 个结合特异性较强的克隆。结论: 利用噬菌体肽库可以简便、迅速地筛选出与 EAC 特异性结合的克隆, 为进一步研制子宫内膜癌的靶向药物提供实验依据。

[关键词] 子宫内膜肿瘤; 细胞系; 噬菌体层学  
[中图分类号] R363 [文献标识码] A

## Selection and analysis of targeted cell- binding mimicry peptides in endometrial adenocarcinoma cell line through random peptide phage display

LU Lin<sup>2</sup>, ZHONG Xue- yun<sup>1</sup>, WANG Zi- neng<sup>2</sup>, YAN Yan- ling<sup>1</sup>, DU Bin<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Department of Pathology, Medical College, <sup>2</sup>Clinical College, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

[ABSTRACT] AIM: To isolate targeted the peptides that binding and internalizing into endometrial carcinoma cell line EAC. METHODS: The tumor cells were screened five rounds of whole cell screen through the Ph. D. - 12 phage display library. Analysis of the displayed peptides specific binding efficiency to the tumor cells was proceeded. The DNA of phages was extracted, sequenced and translated to the sequences of amino acid and analysis using computer software. RESULTS: After five biopannings, the isolated phages showed high specificity and strong affinity for their cognate cell types relative to different cell lines. Through sequencing, the sequences of displayed peptides were obtained. CONCLUSIONS: Whole cell screening against EAC cells through random phage peptide library can obtain phage peptides with a highly tissue specific binding and internalizing ability. The peptides do provide a basis for tumor's targeted delivery as therapy vector.

[KEY WORDS] Endometrial neoplasms; Cell line; Phage display

子宫内膜癌为女性生殖道常见三大恶性肿瘤之一, 绝大多数为腺癌。目前治疗上尚不尽人意, 对于晚期及不能耐受手术的病人, 没有特异性的化疗放疗方案, 传统的药物很难达到肿瘤局部并形成有效的杀伤浓度, 因此, 肿瘤导向药物治疗将成为解决这一问题的重要手段。本研究旨在利用噬菌体肽库技术针对子宫内膜腺癌细胞系 EAC 进行全细胞筛选, 寻找与子宫内膜癌细胞特异性结合的多肽序列, 从而为进一步研制肿瘤的靶向药物提供实验依据。

### 材 料 和 方 法

#### 1 材料

Ph. D. 12 肽库(New England BioLabs), 库容  $2.8 \times 10^9$ 。大肠杆菌 ER2573E. coli(New England BioLabs)。

TritonX- 100、IPTG/X- gal、PEG8000 均购自华美公司。细菌蛋白胨和酵母提取物购自 Oxoid 公司, England。RPMI- 1640 培养基为 Gibco 公司产品, 胎牛血清购自杭州四季青公司。实验所需子宫内膜腺癌细胞系 EAC、人胶质细胞瘤细胞系 SW038 由本室建立<sup>[1]</sup>。人乳腺癌细胞系 MCF- 7 购自上海细胞生物研究所。

#### 2 方法

2.1 细胞培养 取出液氮中保存的肿瘤细胞, 迅速移入 37 °C 水浴中融化, 将细胞移入灭菌试管中, 加入 6 mL 无血清 RPMI- 1640 培养基, 800 r/min, 5 min, 弃上清, 加入 3 mL RPMI- 1640 培养基( $1 \times 10^5$  U/L 青霉素,  $1 \times 10^5$  mg/L 链霉素, 10% 胎牛血清), 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 培养, 传代 3 次。

[收稿日期] 2004- 12- 24 [修回日期] 2005- 01- 13

\* [基金项目] 2001 年度广东省自然科学基金资助课题(015012)

△ 通讯作者 Tel: 020- 85220252; E- mail: tzxy@jnu.edu.cn

**2.2 Ph. D. 12 肽库的生物淘洗** 第 1 轮筛选: 接种约  $10^5$  EAC 肿瘤细胞到 6 孔细胞培养板中, 待细胞贴壁, 生长状况良好后, 吸去培养液, 加入 1 mL RPMI 1640 基本培养基冲洗 2 次, 加入含 0.1% BSA 的 1640 培养液约 2 mL, 置于 37 °C 含 5% CO<sub>2</sub> 湿化培养箱内封闭。在孔中加入 10 μL Ph. D 随机十二肽库原液, 并轻微摇晃以使其混匀扩散, 再次放入细胞培养箱内孵育 1 h, 并不时取出轻微摇晃。取出培养板置于冰上作用 5 min 后, 弃去培养液, 用 4 °C 预冷的含 0.1% BSA 的 Hanks 缓冲液和 D- Hanks 漂洗, 以除去未与细胞结合的噬菌体。每孔中加入 2 mL 预冷的 pH 2.2 的甘氨酸缓冲液进行洗脱, 而后立即将洗脱液加入预先装有 250 μL Tris 缓冲液 (pH 9.1) 的离心管中, 收集洗脱液。在培养板的每孔中加入 1% 的 Triton X- 100 于室温作用 2h 以裂解细胞释放内化部分噬菌体, 收集裂解液。将洗脱液和裂解液全部转移到已加入 ER2573 的液体基本培养基中进行扩增, 提纯, 计算扩增前后的噬菌体数目, 再进入下一轮筛选。经 5 轮筛选后, 从第 5 轮筛选后的计数平板中各随机挑选显色清晰、与邻近噬菌斑分离良好的蓝色噬菌斑进行扩增, 用碘化钠法提取噬菌体 ssDNA, 进行测序。

**2.3 噬菌体对 EAC 细胞结合的特异性分析** 将 EAC SWO38 MCF- 7 等细胞分别培养在 6 孔培养板中, 每种细胞接种 1 孔。每孔加入相同数量的第 5 轮筛选扩增后的噬菌体, 其余筛选操作如步骤 2.2 中所述。比较对子宫内膜癌细胞株 EAC 进行 5 轮扩增筛选后的噬菌体库相对于其它细胞系的结合力。

**2.4 测序结果及分析** 对随机挑选的共 38 个噬菌体克隆进行 DNA 测序, 由于实验中提取的为噬菌体的单链 DNA, 测序后得到的是其互补的碱基序列, 故对测序结果需按照碱基配对的原则转化为噬菌体的单链 DNA 序列, 根据限制内切酶 *Eag* I (CGGCCG) 和 *Kpn* I (GGTACC) 的酶切位点找到插入序列并推导相应的氨基酸序列。运用计算机相关软件对所得短肽进行分析。

## 结 果

### 1 经 5 轮筛选后噬菌体的测序结果

通过对噬菌体肽库进行 5 轮“吸附- 洗脱- 扩增”, 噬菌体高度富集, 结果显示在表面结合的 20 个克隆中, 序列- SNPTTPD(H/T)LWRG- 出现 13 次; 内化结合的 18 个克隆中, - SNPTTPDHLWRG- 出现 12 次, 为表面和内化部分共有的序列。并且这个克

隆都能内化入肿瘤细胞 (见表 1)。

### 2 特异性结合实验结果

特异性结合实验结果表明第 5 轮筛选出的噬菌体肽库与人子宫内膜癌细胞 EAC 的结合能力  $(2.97 \pm 1.16) \times 10^8$  pfu/L, 而与人胶质细胞瘤细胞结合能力为  $(1.00 \pm 0.50) \times 10^6$  pfu/L, 前者是后者的 296 倍, 经统计学分析, 两者差异显著 ( $P < 0.05$ ); 第 5 轮筛选出的噬菌体肽库与人乳腺癌细胞系的结合能力为  $(2.50 \pm 1.50) \times 10^6$  pfu/L, EAC 是 MCF- 7 的 119 倍, 差异显著 ( $P < 0.05$ ) (见表 2)。

表 1 展示肽序列测定结果  
Tab 1 Sequencing of the displayed peptides

Location	Frequency	Sequencing of the displayed peptides	
Surface- bound	13	-SNPTTPD(H/T)LWRG-	
	1	-AHMQFTSLTPH-	
	1	-DIDTRHRDHTKQ-	
	2	-VLPPKPMRQPVA-	
	1	-TNKIVHGTADSL-	
	1	-WSPCQQRLHNSI-	
	1	-TLPSPLALLTVH-	
	Internalized	12	-SNPTTPDHLWRG-
		2	-DLNYFTLSSKRE-
		1	-AHMQFTSLTPH-
1		-SPNFSWLPLGTT-	
1		-DIDTRHRDHTKQ-	
1		-VLPPKMLQPVA-	

表 2 5 轮筛选后噬菌体库对 EAC 及其他人肿瘤细胞系特异性结合分析

Tab 2 Selectivities of binding for the 5- round phage pool on EAC compared to different cell lines ( $10^6$  pfu/L.  $\bar{x} \pm s$ )

	SWO38	MCF- 7	EAC
Surface- bound phages	$1.00 \pm 0.50$	$2.50 \pm 1.50$	$297.51 \pm 116.23^{**}$
Internalized phages	$0.50 \pm 0.50$	$2.50 \pm 0.50$	$153.32 \pm 47.33^{**}$

\*\*  $P < 0.01$  vs SWO38, MCF- 7.

### 3 筛选出的短肽特性分析

将出现频率最高的序列用 ExPASy 提供的软件 ProtParam tool (<http://cn.expasy.org/cgi-bin/prot-param>) 来分析该短肽序列的组成及特点如下:

序列- SNPTTPDHLWRG- 的理论等电点为 6.46, 在体外哺乳动物视网膜细胞的估计半衰期为 1.9 h, 在酵母中估计半衰期超过 20 h, 在大肠杆菌中超过 10 h, 而稳定性分析显示序列- SNPTTPDHLWRG- 为稳定多肽, 不稳定常数至 13.14, 疏水性指数- 1.467。影响多肽片段能否被细胞有效的识别并通过某种途径

与细胞结合及内化的一个重要因素是其能否保持稳定而不易被降解,从上述数据来看,序列中-SNPITPDHLWRG- 的稳定性高,半衰期较长,亲水能力强,这意味着其在细胞内存在的时间也会更长。

## 讨 论

特异性靶向药物已成为目前肿瘤治疗的新途径,然而由于细胞成分复杂,至今很难找到子宫内膜癌特异性结合靶点。噬菌体展示随机多肽库技术由于使用了模拟多肽的思想,可以在对筛选配基的结构和功能了解甚少的情況下获得其模拟多肽<sup>[2,3]</sup>。应用噬菌体随机肽库展示技术,对肿瘤细胞进行全细胞筛选,能快速、准确地找到与肿瘤区特异性结合的噬菌体短肽,进而可作为一种小分子载体系统来研制肿瘤靶向药物,因而为此类新药的筛选提供了有力工具<sup>[4]</sup>。本研究结合噬菌体多肽库技术研究子宫内膜癌细胞系正是为了对此问题作进一步深入地研究。

本实验结果表明,我们从随机肽库中筛选到一个可以和子宫内膜癌细胞表面结合的12肽-SNPITPDHLWRG-,并可内化入细胞。特异性结合实验表明第5轮筛选出的噬菌体克隆与子宫内膜癌细胞的结合能力远大于与人胶质瘤细胞、人乳腺癌细胞的结合能力,表明与子宫内膜细胞结合具有一定的特异性,这些克隆所带有的多肽序列是潜在的肿瘤药物靶向分子。本实验中经筛选后得到的短肽序列经氨基酸分析比较后显示序列-SNPITPDHLWRG- 的稳定性高,估计半衰期可达1.9 h,说明其与细胞结合后将会不容易被细胞内部的酶类物质降解,如以此为靶向,与某些药物分子或标记蛋白结合后可能会延长这些生物大分子在细胞内的生物学活性。另一方面,与子宫内膜癌细胞具有高亲和力的噬菌体通过其表面的展示短肽与细胞特异结合后,可能是经过受体介导的胞吞作用进入胞内,成为内化靶点。靶向短肽与特异性受体的结合为将抗癌药物运送到特定的肿瘤细胞群提供了一种有效的方法<sup>[5]</sup>。另外有实验显示这种受体介导的胞吞作用也是外源基因进入肿瘤细胞的一条重要途径<sup>[6]</sup>。因此,就肿瘤细胞的这种受体介导的胞吞作用方式而言将有助于提高在肿瘤治疗中药物对细胞

的选择性和器官的特异性<sup>[7,8]</sup>。

本实验中选取了2种不同组织来源的细胞系进行对照,并初步显示出短肽对子宫内膜癌细胞结合的特异性。为了能够更加有力地证明实验所得噬菌体短肽的特异性,应更广泛地选取多种不同细胞进行特异性结合分析,尤其是选择正常子宫内膜细胞或子宫来源的肿瘤细胞系进行对照则更加有意义。另外,筛出的高特异性短肽经PIR蛋白质数据库([HTTP://pir.Georgetown.edu](http://pir.georgetown.edu))序列比对,发现它存在于一些信号肽识别受体,雌激素受体,GM-CSF受体及细胞内酶类,是否对细胞具有生物学效应,还需进一步实验证实。我们现在的研究仅是体外的细胞水平上,要研制肿瘤的靶向药物,尚需建立实体瘤的模型进行体内筛选,这都将是我們下一步的研究工作。

## [参 考 文 献]

- [1] 陆琳,杜彬,钟雪云,等. 子宫内膜癌细胞系的建立及其生物学特性[J]. 中国病理生理杂志, 2005, 21(5): 990-992.
- [2] Dale JC, Elizabeth BG, Benson RE, et al. Phage display for target-based antibacterial drug discovery[J]. Drug Discovery Today, 2001, 6(7): 721-727.
- [3] Vasily VI, Franco F, Anil GM. Targeted delivery of multivalent phage display vectors into mammalian cells[J]. Biochem Biophys Acta, 1999, 1448(3): 463-472.
- [4] 高双荣,钟雪云,颜艳灵,等. 利用噬菌体随机肽库对神经胶质瘤母系SWO-38进行全细胞筛选[J]. 中国病理生理杂志, 2002, 18(8): 946-948.
- [5] Jefferies D. Selection of novel ligands from phage display libraries: an alternative approach to drug and vaccine discovery? [J]. Parasitology today, 1998, 14(3): 202-206.
- [6] Margherita M, Marc K, Aurelian R. An approach to increased polyplex gene delivery by peptides selected from a phage display library[J]. J Biochem Biophys Methods, 2002, 52(1): 31-43.
- [7] Mazzucchelli L, Burritt JB, Jesaitis AJ, et al. Identification of human granulocyte binding peptide sequences with phage display libraries[J]. Mol Biol Cell, 1997, 6(4): 455a-458a.
- [8] Barry MA, Dower WJ, Johnston SA. Toward cell-targeting gene therapy vector: selection of cell-binding peptides from random peptide-presenting phage libraries[J]. Nat Med, 1996, 2(3): 299-305.