

论著

文章编号:1000-5404(2013)01-0010-05

噬菌体展示肽库筛选 VPAC1 高亲和力结合多肽

唐波¹, 黄定德¹, 郑磊¹, 任浩¹, 李前伟^{1,2} (400038 重庆, 第三军医大学西南医院核医学科¹; 100875 北京, 北京师范大学化学学院放射性药物教育部重点实验室²)

[摘要] **目的** 通过噬菌体展示肽库技术筛选 VPAC1 高亲和力结合十二肽配体, 并进行特异性和亲和力鉴定。**方法** 建立稳定表达 VPAC1 的真核细胞系; 利用噬菌体肽库展示技术进行全细胞差减筛选, 随机挑取 40 个噬菌体克隆进行测序, 初步鉴定确定阳性克隆, 明确外源十二肽序列, 固相合成该十二肽; 利用体外竞争结合 ELISA 及流式细胞分析, 鉴定目标多肽与 VPAC1 受体结合的特异性及亲和力。**结果** 成功构建稳定表达 VPAC1 细胞系; 经过 4 轮差减筛选, 回收噬菌体逐轮得到富集, 随机挑取 40 个克隆测序, 共得到 15 条序列不同的多肽, 经 ELISA 鉴定有 7 个克隆与细胞有特异性高结合能力; 阳性噬菌体克隆与细胞结合通过多肽 VP1 介导; VP1 能特异高亲和地与 VPAC1 受体结合。**结论** 通过噬菌体展示肽库技术成功筛选得到与 VPAC1 高亲和力特异结合十二肽。

[关键词] VPAC1; 稳定转染; 噬菌体展示肽库; 十二肽; 分子探针

[中图分类号] R341; R394.33; R394.3

[文献标志码] A

Screening of a high-affinity peptide specific for VPAC1 from phage display peptide library

Tang Bo¹, Huang Dingde¹, Zheng Lei¹, Ren Hao¹, Li Qianwei^{1,2} (¹Department of Nuclear Medicine, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; ²Key Laboratory of Radiopharmaceuticals of Ministry of Education, College of Chemistry, Beijing Normal University, Beijing, 100875, China)

[Abstract] **Objective** To screen a high-affinity peptide specific for vasoactive intestinal peptide receptor VPAC1 using phage display peptide library, and to identify the specificity and affinity of the selected peptide. **Methods** A eukaryotic cell line stably expressing VPAC1 was established, four-round subtractive panning using phage display peptide library was conducted, and then forty phage clones were randomly picked out for sequencing. The positive phage clones were identified using cellular ELISA, and exogenous dodecapeptide was determined and synthesized. *In vitro* competitive binding analysis and flow cytometry were performed to evaluate the binding specificity and affinity of target dodecapeptide. **Results** VPAC1 was stably expressed on transfected CHO-K1/VPAC1 cells. A significant enrichment was obtained through four rounds of panning, and fifteen different peptide sequences were identified from forty clones. Seven phage clones had specific and high affinity binding with positive cells through cellular ELISA analysis. The positive phage clones bound to CHO-K1/VPAC1 through candidate peptide VP1, and VP1 could specifically bind to VPAC1. **Conclusion** A high-affinity dodecapeptide specific for VPAC1 is obtained using phage display peptide library.

[Key words] VPAC1; stable transfection; phage displayed peptide library; dodecapeptide; molecular probe

Supported by the Open Fund of Key Laboratory of Radiopharmaceuticals of Ministry of Education of Beijing Normal University (120204). Corresponding author: Li Qianwei, Tel: 86-23-68754422, E-mail: tmmuxny@yahoo.com.cn

血管活性肠肽受体 (vasoactive intestinal peptide receptor, VIPR) 属于 7 次跨膜 G 蛋白偶联受体家族, 整个受体包括 3 个部分: N-末端胞外域, 含 1 个疏水的 N 端信号肽以及 VIP 结合位点; 跨膜域, 含 7 个疏水的

跨膜片段; C-末端胞浆域, 与信号转导相关。目前发现血管活性肠肽受体有 3 种亚型: VPAC1、VPAC2 和 PAC1, 在人体组织中, 内源性 VIP 主要通过 VPAC1 和 VPAC2 受体亚型结合发挥生物效应^[1], 并且 VIP 能够诱导 VPAC1 的内化和核定位, 通过信号转导调节肿瘤相关因子 VEGF 和 EGFR 等基因的表达, 从而促进肿瘤生长进展^[2-3]。研究证实, VPAC1 在结肠直肠癌等多种肿瘤细胞及其转移灶中呈高水平表达, 而 VPAC2

[基金项目] 北京师范大学放射性药物教育部重点实验室开放基金(120204)

[通信作者] 李前伟, 电话: (023)68754422; E-mail: tmmuxny@yahoo.com.cn

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20121207.1022.004.html> (2012-12-07)

仅表达于良性平滑肌瘤等少数肿瘤,并且 VPAC1 与天然配体 VIP 的结合亲和力是 VPAC2 的 20 倍^[4]。

目前,结直肠癌 VIPR 分子显像常用的分子探针主要为 VIP 或 VIP 类似物^[5-7],缺乏对 VPAC1 的高选择性,同时存在一定的促肿瘤增殖的风险。随着体外分子展示技术的发展,为寻找和发现与 VPAC1 高选择性及高亲和力结合的多肽配体奠定了基础。针对筛选得到的目标多肽,利用适合显像或治疗的核素标记,在结直肠癌的分子影像诊断和靶向内照射治疗中有重要应用价值。本研究以稳定表达 VPAC1 的 CHO-K1 细胞为靶细胞,利用噬菌体肽库展示技术筛选得到与 VPAC1 高亲和力结合的十二肽配体,为其后续放射性核素标记的 VPAC1 阳性肿瘤分子显像及靶向内照射治疗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

噬菌体随机十二肽库试剂盒(包括噬菌体随机十二肽库,肽库滴度 2×10^{13} pfu/mL,复杂度 2.8×10^9 ,*E. coli* ER2738 宿主菌以及-96g III 测序引物)购自 New England Biolabs 公司;中国仓鼠卵巢细胞亚株 CHO-K1 购自中科院上海细胞库;G418 购自 Invitrogen 公司;抗 VPAC1 单克隆抗体购自 Santa Cruz Biotechnology 公司;PrimeScript RT reagent Kit 试剂盒购自 TaKaRa 公司;FITC 标记山羊抗兔 IgG 购自中杉金桥公司;X-gal 购自 Amresco;IPTG 购自 Merck 公司;蛋白酶抑制剂购自 ROCHE 公司;HRP-抗 M13 单克隆抗体购自 GE Healthcare 公司;细胞培养基、胎牛血清及胰酶等购自 Hyclone 公司;TMB 底物显色试剂盒购自康为世纪公司。

1.2 方法

1.2.1 构建稳定表达 VPAC1 的 CHO-K1 细胞 用 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基将 CHO-K1 细胞置 37 °C, 5% CO₂ 孵箱常规培养,待细胞生长融合至 85% 左右,接种 96 孔板,次日,加不同浓度梯度的 G418 筛选培养基,观察两周,确定 G418 最佳筛选浓度。将真核重组表达质粒载体 pcDNA3.1(+)/VPAC1 进行酶切线性化,回收纯化,按转染试剂盒说明转染 CHO-K1 细胞(24 孔板, 2×10^5 /孔)。转染第 3 天在培养基中加入 700 μg/mL G418 筛选 1 周,每 3 天更换 1 次培养液,1 周后用胰酶将单独的细胞群消化收集到新的 24 孔板培养,继续使用 700 μg/mL G418 筛选 1 周,挑选生长良好的细胞克隆继续在 200 μg/mL G418 培养基中维持培养约 1 个月。

1.2.2 稳定表达 VPAC1 细胞的鉴定 取挑选出的生长良好的细胞株扩大培养,按照 RNA 抽提试剂盒说明提取总 RNA,按 TaKaRa PrimeScript RT reagent Kit 试剂盒说明进行反转录,根据设计的特异性引物检测目的基因 VPAC1 的表达。取得测细胞爬片,固定封闭后,加入兔抗人 VPAC1 单抗 4 °C 孵育过夜,次日滴加二抗 FITC 标记山羊抗兔 IgG, DAPI 衬染核,封片观察目的蛋白 VPAC1 表达。

1.2.3 噬菌体随机十二肽库的全细胞差减筛选 培养 CHO-K1/VPAC1 及 CHO-K1 细胞生长汇合至 85% 左右,用含

1% BSA 的无血清培养基培养 1~2 h, PBS 洗涤 1 次,以 0.25% 胰酶消化 CHO-K1 细胞, 1 000 r/min 离心去上清后用 3 mL PBS-BSA 重悬封闭 15 min, 并计数细胞约 1×10^7 , 同时取 10 μL 噬菌体十二肽库(滴度约 2.0×10^{11} pfu) 同样用 PBS-BSA 封闭 15 min, 加入 500 μL 蛋白酶抑制剂于细胞封闭悬液混匀, 于 37 °C 缓慢震荡孵育 1.5 h; 孵育结束前适时消化阳性 CHO-K1/VPAC1 细胞并用同样条件封闭, 计数阳性细胞约 $10^6 \sim 10^7$, 将上述阴性细胞孵育液 1 500 r/min 离心 2 min; 上清加入已封闭好的阳性 CHO-K1/VPAC1 细胞, 4 °C 缓慢震荡孵育 1 h, 1 500 r/min 离心 2 min, 细胞沉淀用 2 mL 0.1% TBST 洗涤 2 次, 3 min/次, 最后用 PBS-BSA 洗涤 1 次去除 TBST; 细胞结合的噬菌体用 2.0 mL 酸洗脱缓冲液(0.2 mol/L Glycine-HCl, pH 2.2, 1.0 mg/mL BSA) 冰上洗脱 8 min, 立即用 300 μL 中和缓冲液(1.0 mol/L Tris-HCl, pH 9.1) 中和, 1 500 r/min 离心 2 min, 小心收集上清中和洗脱液并准确计量; 细胞沉淀用细胞裂解缓冲液(0.1% Triton 2.0 mL, 500 μL 蛋白酶抑制剂) 室温裂解细胞 30 min, 并准确计量细胞裂解液体积, 收集内化进入细胞的噬菌体; 分别取 10 μL 中和洗脱液及细胞裂解液测滴度, 剩余用作扩增, 测滴度, 分别取 1.0×10^{11} pfu 的中和及裂解扩增噬菌体共同混合投入到下一轮筛选, 重复进行四轮筛选, TBST 浓度逐轮增加至 0.5%, 洗涤时间增至 5 min/次, 洗涤次数增至 7 次, 阴性细胞孵育时间逐轮增至 2 h, 阳性细胞孵育时间逐轮减至 30 min, 其余条件同第一轮筛选。各轮筛选得到的回收噬菌体及扩增液均铺制 LB/IPTG/X-gal 平板利用蓝斑形成实验测定滴度, 并计算每轮回收率。经过第 4 轮筛选后, 将回收得到的细胞结合及内化的噬菌体稀释合适的滴度铺制 LB/IPTG/X-gal 平板, 37 °C 培养过夜后, 分别随机挑取 20 个分隔良好的蓝斑, 扩增纯化, 加入 50% 甘油保存于 -20 °C, 待后续测序及相关鉴定用。

1.2.4 噬菌体克隆 DNA 提取及测序 按噬菌体单链 DNA 提取试剂盒操作说明扩增噬菌体克隆及提取纯化 DNA, 用-96g III 测序引物 5'-CCC TCA TAG TTA GCG TAA CG-3' 送华大基因进行全自动测序分析, 根据 DNA 序列推导相应的氨基酸序列并进行同源性分析。

1.2.5 ELISA 初步鉴定阳性克隆 同时接种 CHO-K1/VPAC1 及 CHO-K1 细胞于 96 孔板, 1.0×10^5 个/孔, 培养至细胞贴壁长满单层, PBS 洗涤 2 遍, 用 50 μL 0.25% 戊二醛固定 15 min, PBS 洗涤 3 次, 加入 3% 过氧化氢 100 μL/孔, 阻断内源性过氧化物酶活性; PBS 洗涤 3 次, 加入 200 μL/孔 1% BSA 封闭 30 min, 将需鉴定的噬菌体克隆分别取 1×10^{10} pfu 加入到阳性和阴性细胞孔, 37 °C 孵育 2 h, 0.05% PBST 洗涤 5 min × 3 次, 加 HRP-抗 M13 单克隆抗体(1:5 000 稀释) 37 °C 孵育 1 h, 0.05% PBST 洗涤 5 min × 3 次; 加入 TMB 显色 30 min, 2 mol/L 硫酸终止反应, 测定 450 nm 波长处光密度值 $[D(450)]$, 同时设置无关噬菌体及空白对照, 每个克隆设置两个复孔, 独立重复测定 3 次, 计算平均 $D(450)$ 值及结合特异性(Selectivity), Selectivity 的计算公式为: $ODS1-ODC1/ODS2-ODC2$, 其中 ODS1 和 ODC1 分别代表待测噬菌体克隆和无关噬菌体加入阳性 CHO-K1/VPAC1 细胞所得 $D(450)$ 值, ODS2 和 ODC2 分别代表待测噬菌体克隆和无关噬菌体加入阴性 CHO-K1 细胞所得 $D(450)$ 值。

1.2.6 多肽的固相合成 目标多肽及 FITC 偶联的多肽委托上海强耀生物科技有限公司采用固相法合成, 经 HPLC 纯化

和质谱分析鉴定。

1.2.7 目标多肽与噬菌体克隆竞争结合实验 接种 CHO-K1/VPAC1 细胞于 96 孔板, 1.0×10^5 个/孔, 培养至细胞贴壁长满单层, 去掉培养液, PBS 洗涤 2 次, 0.25% 戊二醛固定 15 min, PBS 洗涤 3 次, 加入 3% 过氧化氢 100 μ L/孔 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, PBS 洗涤 3 次, 加入 200 μ L/孔 1% BSA 封闭 30 min; 其后加入不同浓度梯度的合成目标多肽 0、0.000 1、0.001、0.01、0.1、1、10、100 μ g/mL 于各对应孔, 再加入约 1×10^{10} pfu 的含相同插入多肽序列的噬菌体克隆 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h, 加 HRP-抗 M13 单克隆抗体 (1:5 000 稀释) 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 加入 TMB 显色 30 min, 2 mol/L 硫酸终止反应, 测定 450 nm 波长处光密度值 [D(450)], 同时设置无关噬菌体及空白对照, 每个多肽浓度设置 2 个复孔, 独立重复 3 次实验, 观察不同浓度多肽对阳性噬菌体克隆与细胞结合的抑制情况, 抑制率 = [零浓度对照组 D(450) 值 - 实验浓度组 D(450) 值] / 零浓度对照组 D(450) 值 \times 100%。

1.2.8 目标多肽与 VPAC1 受体结合特异性鉴定 通过竞争抑制 ELISA 和流式细胞分析来鉴定目标多肽与 VPAC1 受体结合的特异性, 竞争抑制 ELISA 实验步骤同上, 1% BSA 封闭后, 加入不同浓度梯度的 VIP 0、0.001、0.01、0.1、1、10、100 μ g/mL 于各对应孔, 其余步骤同上, 同时设置无关噬菌体及空白对照, 每个多肽浓度设置 2 个复孔, 独立重复 3 次实验, 按上述方法计算抑制率, 观察不同浓度 VIP 对目标多肽与细胞结合的抑制情况。用 0.25% 胰酶消化 CHO-K1/VPAC1 细胞, PBS 洗涤 2 次, 用 2% PBS-BSA 封闭 30 min, 离心, 用 PBS 重悬细胞, 调整细胞浓度为 2×10^6 个/mL, 分别取 1 mL 细胞悬液于 5 mL 离心管, 加入终浓度为 50 μ mol/L VIP 与细胞室温孵育 30 min, 加入 FITC 偶联目标多肽, 室温孵育 1 h, PBS 洗涤 2 次, 用 300 μ L PBS 重悬细胞, 上流式细胞仪检测, 以 PBS 和无关多肽作为对照。

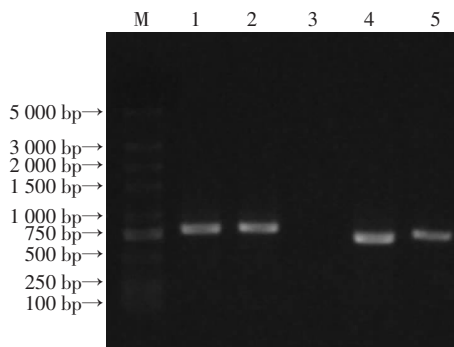
1.3 统计学分析

采用 SPSS 17.0 软件, 采用 *t* 检验和 Wilcoxon 符号秩检验比较不同噬菌体克隆实验组与对照组差异。

2 结果

2.1 VPAC1 在 CHO-K1 细胞的稳定表达

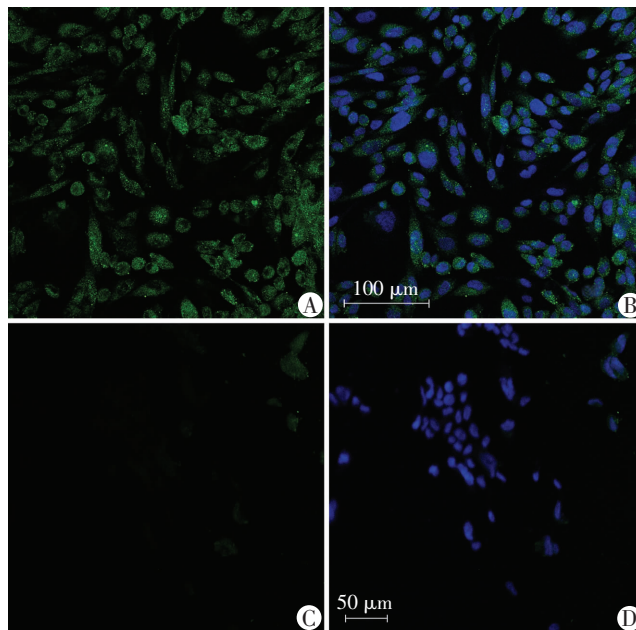
2.1.1 逆转录 PCR 结果 挑取稳定生长的细胞克隆, 扩大培养, 提取总 RNA, 反转录之后以 VPAC1 目的基因设计的特异引物进行 PCR, 结果显示, 阳性细胞出现特异性目的条带, 表明目的基因 VPAC1 在 CHO-K1 细胞稳定表达 (图 1)。



M: 标准; 1, 2: 阳性转染细胞; 3: 非转染细胞; 4, 5: GAPDH

图 1 RT-PCR 检测目的基因 VPAC1 表达

2.1.2 免疫荧光结果 免疫荧光结果显示在阳性细胞膜膜和胞质内有较强的荧光信号 (图 2A、B), 表明有大量目的蛋白 VPAC1 表达, 而对照未转染的 CHO-K1 细胞未检测到目的蛋白的表达 (图 2C、D), 说明 VPAC1 已在转染后的阳性细胞稳定表达。

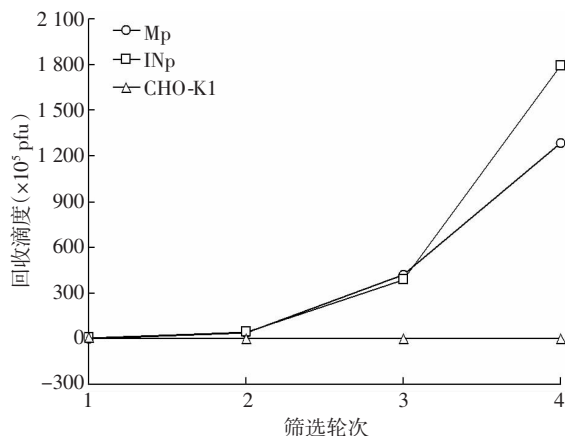


A: 转染组; B: 转染组融合图像; C: 对照组; D: 对照组融合图像

图 2 免疫荧光检测 VPAC1 的表达 ($\times 200$)

2.2 噬菌体随机十二肽库的全细胞差减筛选

经过 4 轮筛选可见回收噬菌体滴度及回收率明显增加, 细胞结合及内化噬菌体均得到显著的富集, 而吸附细胞 CHO-K1 所结合噬菌体保持低水平并有所下降 (图 3)。随着筛选轮次增加, 阳性细胞结合噬菌体回收率从第 1 轮 2.978×10^{-6} 增加到第 4 轮 1.538×10^{-3} , 增加了约 516.5 倍, 回收噬菌体得到了明显富集。



Mp: 膜结合噬菌体; INp: 细胞内化噬菌体; CHO-K1: 与 CHO-K1 细胞结合的噬菌体; 回收噬菌体滴度通过 LB/IPTG/Xgal 板蓝斑形成实验测得

图 3 噬菌体回收富集曲线

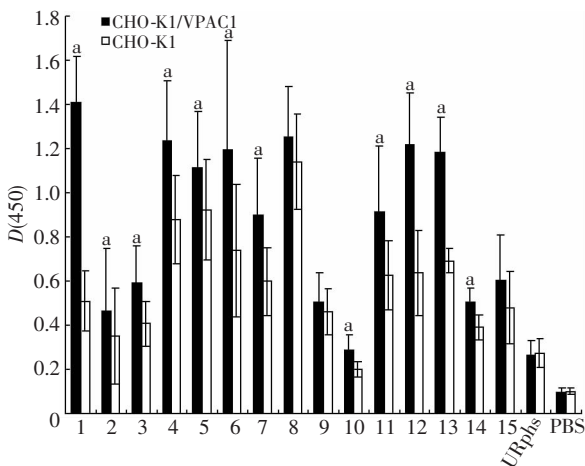
2.3 噬菌体 DNA 测序分析

随机挑取 40 个分隔良好的蓝色噬菌斑, 其中膜结合和细胞内化各取 20 个, 分别将其命名编号为 Mp1-20 和 INp21-40,

扩增提取 DNA 并测序。40 个噬菌体克隆经过测序归类后,一共得到 15 条不同的多肽序列,分别将多肽命名为 VP1 ~ VP15,其中 VP1 在全部克隆中重复次数最多达到 12 次。

2.4 噬菌体克隆的 ELISA 鉴定

对得到的 15 个噬菌体克隆用全细胞 ELISA 测定其与阳性细胞的结合能力,进一步排除假阳性克隆和与细胞结合差异不明显的克隆。除 8、9、15 号及对照在两种细胞 $D(450)$ 值无明显差异外,其余克隆在阳性细胞和阴性细胞间结合 $D(450)$ 值均有差异性(图 4),并且通过结合特异性公式计算得到 Selectivity 大于 2.0 的克隆有 1、2、3、6、12、13、14 号,可以认为这部分克隆在两种细胞间有差异性结合,其中 1 号克隆结合特异性最大达到 4.85,因此挑选 1 号克隆为阳性克隆做进一步鉴定。



1~15:噬菌体克隆;URphs:无关噬菌体对照(随机从噬菌体肽库中挑取的噬菌体克隆);PBS:空白对照组 a: $P < 0.05$,与 CHO-K1 细胞比较

图 4 细胞 ELISA 鉴定噬菌体克隆与细胞结合能力

2.5 目标多肽与噬菌体克隆的竞争结合分析

多肽竞争抑制实验结果显示,当用目标多肽 VP1 与细胞预孵育后,噬菌体与细胞的结合受到抑制,随着多肽浓度的增加,噬菌体与细胞结合的 $D(450)$ 值逐渐降低,抑制率呈浓度依赖性。当多肽浓度超过 $0.0001 \mu\text{g/mL}$ 时,抑制率有明显的增加,其中 IC_{50} 约为 $0.0185 \mu\text{g/mL}$ ($0.0132 \mu\text{mol/L}$),而无关对照多肽对阳性克隆与细胞的结合没有明显抑制作用(图 5)。

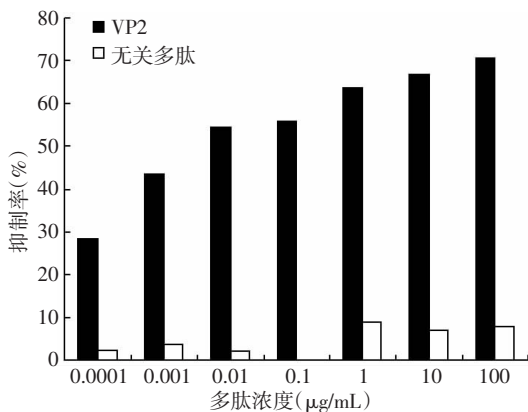


图 5 目标多肽 VP1 与阳性噬菌体克隆的竞争结合曲线分析

2.6 阳性克隆与 VPAC1 受体结合特异性

为证实 VP1 与细胞结合是 VPAC1 受体特异性的,用 VPAC1 天然配体 VIP 与阳性克隆竞争结合 CHO-K1/VPAC1,结果表明,随着 VIP 浓度的增加,噬菌体与细胞结合的 $D(450)$ 值逐渐下降,抑制率逐渐增高,呈浓度依赖性,多肽浓度为 0、0.001、0.01、0.1、1、10、100 $\mu\text{g/mL}$ 的抑制率分别为 0%、17.22%、28.70%、41.47%、47.28%、49.49%、53.32%。其中 IC_{50} 约为 $9.0884 \mu\text{g/mL}$ ($2.7327 \mu\text{mol/L}$)。流式细胞检测结果显示,空白对照调零为 1.5%,FITC-VP1 与细胞孵育后,荧光标记的阳性细胞数百分比为 90.3%,表明多肽 VP1 与 CHO-K1/VPAC1 细胞有较强的特异结合能力;加入 VIP 后,荧光标记阳性细胞数百分比为 11.7%,荧光强度明显减弱,而无关对照多肽组荧光强度无明显变化,表明 VIP 能够竞争抑制 FITC-VP1 与细胞结合,也说明 VP1 能与 VPAC1 受体特异性结合。

3 讨论

目前全球结直肠癌(colorectal cancer, CRC)的病死率已升至恶性肿瘤的第 3 位^[8],并且原发灶根治切除后局部复发或转移的发生率高达 40%,使得结直肠癌的早期诊断和治疗具有重要意义。研究^[9]表明,肿瘤细胞常高表达特定的细胞表面分子,如肿瘤细胞相关抗原或肿瘤细胞特异抗原等,而其在正常组织细胞中表达相对缺乏,使得这类肿瘤相关分子标志成为肿瘤诊断或靶向投递治疗药物的潜在靶点,而靶向肿瘤特异靶点的结合配体在肿瘤早期诊断和治疗中发挥着重要作用。

VPAC1 作为血管活性肠肽受体主要的一种亚型,在调节 VIP 生理功能及介导 VIP 调节肿瘤增殖分化和促肿瘤生长进展中发挥着重要的作用^[1-3],同时 VPAC1 在结直肠癌等肿瘤细胞及其转移灶中高水平表达,而在正常组织细胞表达水平较低,并且肿瘤细胞 VPAC1 的结合位点是正常组织细胞的 22.5 ~ 57.9 倍^[10],同时正常胃肠道比其他组织器官具有相对较低水平的 VPAC1 表达,使得 VPAC1 成为潜在的 CRC 分子影像诊断和靶向治疗的理想靶标。目前,噬菌体肽库展示技术较为成熟且应用广泛,可用于筛选几乎任何靶分子的亲和多肽。由于噬菌体肽库展示技术具有库容量大、体积小、筛选方法简便有效、筛选周期短,将表型特征与基因型相关联,使筛选更具有特异性、高效性和可操作性等优点,已成功用于筛选针对不同肿瘤细胞如肾癌、前列腺癌和肿瘤干细胞等的特异性结合多肽^[11-13]。

由于以纯化的蛋白分子作为筛选靶标可能在包被靶分子过程破坏靶分子的天然结构和构象,使得筛选得到的多肽能与纯化蛋白靶标结合而与天然的细胞表面靶分子结合欠佳,极大地降低了筛选的有效性和成功率^[11]。因此,本研究利用稳定转染 VPAC1 的 CHO-K1 细胞作为筛选靶细胞,同时为减少 CHO-K1 细胞表面其他成分对噬菌体肽库的非特异结合,在每一轮筛

选前,以 CHO-K1 细胞作为吸附细胞,去除与 CHO-K1 细胞结合的噬菌体,再以未结合噬菌体与 CHO-K1/VPAC1 细胞筛选。逐轮增加筛选压力,以提高筛选得到更高亲和力克隆的概率,保持噬菌体投入量,噬菌体回收率逐轮提高,表明阳性噬菌体克隆得到有效富集(图3)。在筛选过程中,为尽量去除非特异性结合,将噬菌体与吸附细胞结合孵育温度置于 37 °C,以尽可能去除与吸附细胞结合及内吞的噬菌体。而在随后与 CHO-K1/VPAC1 细胞筛选时,保持筛选温度为 4 °C,同时回收洗脱细胞膜结合噬菌体及细胞裂解液中噬菌体,分别扩增后混合投入下一轮筛选,避免漏筛与细胞结合能力强而内化入细胞的噬菌体。从筛选结果可见阳性克隆在膜结合和内化两部分均占相当比例,进一步证实该筛选策略的有效性。这是较之前其他筛选方法基础上的改进和创新^[14-16]。

经过4轮筛选,膜结合和内化各挑取20个克隆做进一步鉴定,细胞 ELISA 结合分析排除假阳性克隆,发现克隆 VP1 与细胞结合特异性最强,所以选择该克隆做进一步的后续鉴定。为证实该阳性克隆与细胞结合是通过其插入外源多肽介导的,本研究合成了目标多肽 VP1,与阳性噬菌体克隆进行竞争结合实验分析,发现合成的 VP1 多肽能以浓度依赖方式竞争抑制阳性克隆与细胞结合(图5),表明阳性噬菌体克隆与细胞结合是经多肽 VP1 介导的。此外,利用 VPAC1 天然配体 VIP 与阳性噬菌体克隆的竞争结合及流式细胞分析发现, VIP 也以浓度依赖方式抑制阳性噬菌体克隆与细胞结合,表明 VIP 能竞争抑制 VP1 与 CHO-K1/VPAC1 细胞的结合,进一步证实 VP1 与细胞结合经 VPAC1 介导,是 VPAC1 的特异性配体。本研究结果还显示,目标多肽 VP1 和 VIP 竞争抑制噬菌体阳性克隆与细胞结合的 IC₅₀ 不同,分别约为 0.013 2 μmol/L 与 2.732 7 μmol/L,表明 VP1 具有较 VIP 更高的结合亲和力。

综上所述,本研究通过对特定靶标 VPAC1 的全细胞水平筛选,有效地避免了重组纯化蛋白靶标空间结构容易破坏的不足,同时针对 VPAC1 的特异性筛选较肿瘤细胞的广泛筛选更具针对性,更容易明确筛选得到多肽的结合靶点。经过4轮严格筛选和后续鉴定,初步证实获得的目标十二肽 VP1 与 VPAC1 能特异高亲和力的结合。经数据库同源比对分析,发现该十二肽为一全新多肽,有望成为靶向 VPAC1 的配体用于分子显像或传递化疗药物等。后续将进一步对该十二肽与受体结合进行生物信息学分析,明确多肽与受体结合的结构基础,对该多肽进一步改造以探讨该十二肽是否可以用于抗肿瘤药物载体或作为抑制肿瘤生长和转移的拮抗多肽。目前,正在进行放射性核素⁹⁹Tc^m 标记该十二肽配体,鉴定标记理化性质,进一步对其进

行健康动物及荷瘤动物示踪动力学及显像研究。

参考文献:

- [1] Muller J M, Debaigt C, Goursaud S, *et al.* Unconventional binding sites and receptors for VIP and related peptides PACAP and PHI/PHM: an update[J]. *Peptides*, 2007, 28(9): 1655-1666.
- [2] Valdehita A, Bajo A M, Fernandez-Martinez A B, *et al.* Nuclear localization of vasoactive intestinal peptide (VIP) receptors in human breast cancer[J]. *Peptides*, 2010, 31(11): 2035-2045.
- [3] Valdehita A, Carmena M J, Collado B, *et al.* Vasoactive intestinal peptide (VIP) increases vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and secretion in human breast cancer cells[J]. *Regul Pept*, 2007, 144(1/3): 101-108.
- [4] Reubi J C, Laderach M, Waser B, *et al.* Vasoactive intestinal peptide/pituitary adenylate cyclase-activating peptide receptor subtypes in human tumors and their tissues of origin[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(11): 3105-3112.
- [5] Rao P S, Thakur ML, Pallela V, *et al.* ⁹⁹Tc^m labeled VIP analog: evaluation for imaging colorectal cancer[J]. *Nucl Med Biol*, 2001, 28(4): 445-450.
- [6] Kothari K, Prasad S, Korde A, *et al.* ⁹⁹Tc^m (CO)₃-VIP analogues: preparation and evaluation as tumor imaging agent[J]. *Appl Radiat Isot*, 2007, 65(4): 382-386.
- [7] Cheng D F, Yin D Z, Zhang L, *et al.* Preparation of the novel fluorine-18-labeled VIP analog for PET imaging studies using two different synthesis methods[J]. *J Fluor Chem*, 2007, 128(3): 196-201.
- [8] Jemal A, Siegel R, Ward E, *et al.* Cancer statistics 2009[J]. *CA Cancer J Clin*, 2009, 59(4): 225-249.
- [9] Zhang B, Zhang Y, Wang J, *et al.* Screening and identification of a targeting peptide to hepatocarcinoma from a phage display peptide library[J]. *Mol Med*, 2007, 13(5/6): 246-254.
- [10] Virgolini I, Yang Q, Li S, *et al.* Cross-competition between vasoactive intestinal peptide and somatostatin for binding to tumor cell membrane receptors[J]. *Cancer Res*, 1994, 54(3): 690-700.
- [11] Tu X, Zhuang J, Wang W, *et al.* Screening and identification of a renal carcinoma specific peptide from a phage display peptide library[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2011, 30: 105.
- [12] Qin B, Tai W, Shukla R S, *et al.* Identification of a LNCaP-specific binding peptide using phage display[J]. *Pharm Res*, 2011, 28(10): 2422-2434.
- [13] Sun J, Zhang C, Liu G, *et al.* A novel mouse CD133 binding-peptide screened by phage display inhibits cancer cell motility in vitro[J]. *Clin Exp Metastasis*, 2012, 29(3): 185-196.
- [14] Zang L, Shi L, Guo J, *et al.* Screening and identification of a peptide specifically targeted to NCI-H1299 from a phage display peptide library[J]. *Cancer Lett*, 2009, 281(1): 64-70.
- [15] Zhang Y, Chen J, Zhang Y, *et al.* Panning and identification of a colon tumor binding peptide from a phage display peptide library[J]. *J Biomol Screen*, 2007, 12(3): 429-435.
- [16] Park H Y, Lee K J, Lee S J, *et al.* Screening of peptides bound to breast cancer stem cell specific surface marker CD44 by phage display[J]. *Mol Biotechnol*, 2012, 51(3): 212-220.

(收稿:2012-08-08;修回:2012-10-16)

(编辑 汪勤俭)