

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2014.06.005

• 基础研究 •

双靶点抗肿瘤肽RGDSY-CTTHWGFTLC的设计合成及活性研究



黄榕权, 龙捷, 张雅洁

Synthesis and Activity of Dual Targeted Antineoplastic Polypeptide RGDSY-CTTHWGFTLC

HUANG Rongquan, LONG Jie, ZHANG Yajie

Department of Pathology, Guangzhou Medical University, Guangzhou 510182, China

Corresponding Author: ZHANG Yajie, E-mail: yajie.zhang@163.com

Abstract: Objective To synthesize peptide RGDSY-CTTHWGFTLC (RGDSY-CTT), which derived from peptide CTTHWGFTLC (CTT), to improve its water-solubility and stability, and antitumor efficacy. **Methods** (1) Peptide RGDSY-CTT was designed and chemically synthesised. CTT (positive control) and STT (STTHWGFTLS, negative control) were synthesised and analyzed by mass spectrometry. (2) Type IV collagenase, casein were mixed up with peptides RGDSY-CTT and CTT respectively, and then incubated for 1 h at 37°C. The degradation of casein was analyzed by SDS gelelectrophoresis. (3) RGDSY-CTT and CTT were dissolved in distilled water to detect quantity of protein by BCA quantitative assay. (4) MCF-7 cells were incubated with peptides RGDSY-CTT, CTT and STT respectively in 96-well polystyrene plates precoated with fibronectin (10 µg/ml) for 2 h. The effects of oligopeptide on adhesion of MCF-7 cells were detected in cell adhesion tests. (5) MCF-7 cells were incubated with peptides RGDSY-CTT, CTT and STT respectively in Transwell membrane. The effects of RGDSY-CTT and CTT on the migration of MCF-7 cells were detected by cell migration test. **Results** Peptides were synthesised and analyzed by mass spectrometry, which accorded with expectant. RGDSY-CTT and CTT could restrain the hydrolization of casein, which was induced by MMP-2 and MMP-9. The inhibition ratio of RGDSY-CTT at 250 µg/ml was 53.6% and CTT was 77.7%. While the concentration reached 500 µg/ml, the inhibition ratio of RGDSY-CTT and CTT was 94.6% and 96.9%. The maximum solubility of CTT was about 745 µg/ml by BCA test. However, the solubility of RGDSY-CTT was over 4 030 µg/ml. The solution didn't reach saturation. At concentrations of 50, 100 and 200 µg/ml of RGDSY-CTT, the adhesion ratio of MCF-7 cells were 85.1%, 74.1% and 63.8%, which was significantly lower than CTT group ($P < 0.01$). At the concentration of 100 µg/ml, the inhibition ratio of cellular migration treated with RGDSY-CTT and CTT were 42.9% and 39.2%, respectively. At the concentration of 200 µg/ml, the inhibition ratio was increased to 60.8% and 57.0%. Under both concentrations, the inhibition of RGDSY-CTT was both higher than that of CTT ($P < 0.05$). **Conclusion** The water-solubility of the new peptide RGDSY-CTT is obviously higher than that of CTT. Compared with CTT, RGDSY-CTT could inhibit the adhesion of MCF-7 cells and has stronger migration inhibitory ability.

Key words: Peptide; CTTHWGFTLC; RGD; Breast cancer

摘要: 目的 设计合成CTTHWGFTLC (简称CTT)的衍生肽RGDSY-CTTHWGFTLC (简称RGDSY-CTT),以期获得更优的水溶性、活性和抗肿瘤能力。方法 (1)自行设计RGDSY-CTT肽,化学合成(公司合成),并合成CTT(阳性对照)、STT(即STTHWGFTLS,阴性对照),质谱分析。(2)将IV型胶原酶、酶底物酪蛋白分别与RGDSY-CTT、CTT共孵育,酪蛋白水解抑制实验检测短肽的抑酶活性。(3)取RGDSY-CTT、CTT分别溶于蒸馏水,以蛋白定量BCA法对比两者的溶解度。(4)MCF-7细胞接种于预涂布纤连蛋白的96孔板,分别与RGDSY-CTT、CTT、STT共孵育,细胞黏

附试验比较短肽对MCF-7细胞黏附能力的影响。(5)MCF-7细胞接种于Transwell小室的上室,分别与RGDSY-CTT、CTT、STT共孵育,细胞迁移试验比较RGDSY-CTT与CTT对MCF-7细胞迁移能力的影响。结果 短肽合成,质谱分析符合。在

收稿日期: 2013-04-15; 修回日期: 2013-07-17

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(S2012010010181); 广东省自然科学基金博士启动项目(8451018201000858); 广州市市属高校科研资助项目(10A164)

作者单位: 510182 广州, 广州医科大学病理教研室

通信作者: 张雅洁, E-mail: yajie.zhang@163.com

作者简介: 黄榕权(1978-), 男, 硕士, 讲师, 主要从事肿瘤病理方面的研究

浓度为250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时RGDSY-CTT、CTT对IV型胶原酶的水解抑制率为53.6%和77.7%；在500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时，两者抑制率分别为94.6%和96.9%。BCA法测得CTT的饱和溶解度约为745 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，而RGDSY-CTT最高检测值为4 030 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，溶液并未饱和。RGDSY-CTT在终浓度为50、100、200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时，MCF-7细胞的黏附率依次降低为：85.1%、74.1%、63.8%，黏附率显著低于CTT处理组 ($P < 0.01$)。在100和200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度时，RGDSY-CTT对MCF-7细胞的迁移抑制率为42.9%和60.8%；两个浓度RGDSY-CTT的抑制作用均比CTT强 ($P < 0.05$)。结论 新合成短肽RGDSY-CTT的水溶性较CTT明显改善。RGDSY-CTT获得了抑制肿瘤细胞黏附的能力，并具有比CTT更强的运动抑制能力。

关键词：短肽；CTTHWGFTLC；RGD；乳腺癌

中图分类号：R737.9 文献标识码：A

0 引言

近年来，随着一些涉及肿瘤浸润、转移及血管新生特异性靶点的发现，肿瘤靶向治疗的研究成为肿瘤研究的新热点，肿瘤靶向药物以其高效低毒的特性，必将成为今后肿瘤化疗药物开发的趋势。短肽CTT是由Koivunen等^[1]于1999年利用噬菌体展示技术筛选出来的针对MMP-2、MMP-9的特异性阻断剂。研究表明，MMP-2、MMP-9在多种恶性肿瘤中呈现高表达，与肿瘤侵袭、转移及肿瘤脉管生成密切相关^[2-4]，是抗肿瘤转移的理想靶点。短肽CTT不但在肿瘤浸润转移方面有很好的抑瘤效果，而且也表现出良好的肿瘤靶向性^[1,5-6]，预示着CTT在抗肿瘤药物开发、靶向带药或肿瘤显像方面有良好的应用前景。但目前的研究也发现CTT在应用方面存在一些问题：(1) CTT主要由疏水性氨基酸构成，因而水溶性较差^[7-9]；(2) CTT只有10个氨基酸，体内稳定性较差，容易被降解^[9-11]。随着对短肽CTT结构和效能关系研究的逐步深入，对其分子结构进行适当改造、改善理化性质和药代动力学性质，增强抗肿瘤效果，以利于其在药物开发方面的应用，成为短肽CTT应用研究的热点。

RGD三肽序列是目前倍受关注的功能肽片段，是细胞外基质中各种粘连蛋白共同含有中的一个保守三肽，它可与细胞膜上的整合素相互识别，从而介导细胞与细胞外基质之间的黏附^[12]。国内外学者发现外源性RGD肽可竞争性封闭肿瘤细胞的整合素与ECM结合，从而阻断肿瘤细胞与ECM的黏附及其信号转导通路，进一步抑制肿瘤细胞的增殖和诱导肿瘤细胞的凋亡^[13-15]。此外，外源性RGD肽还可下调MMP-2、MMP-9的表达和分泌，抑制肿瘤细胞对基质蛋白的水解，从而抑制肿瘤的

侵袭和转移^[16-17]。因RGD序列肽具有上述的抗肿瘤活性，而且其中精氨酸R、天冬氨酸D均为极性氨基酸，若将其用于CTT的结构改造，对提高CTT的水溶性和稳定性，增强抗肿瘤功能都有重要的意义。

基于以上背景，本研究对短肽CTT的结构进行设计改良，在其氨基端接上一段极性氨基酸序列(RGDSY-)，其中引入RGD三肽，得到双靶向抗肿瘤的CTT衍生肽RGDSY-CTT，希望能提高短肽的水溶性和稳定性，并获得更强的抗肿瘤效果，为开发更有效的肽类抗肿瘤靶向治疗药物提供实验理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 乳腺癌MCF-7细胞株由广州医学院实验中心提供。

1.1.2 肽段合成 参照文献^[1,5]，本研究自行设计十五肽：RGDSYC*TTHWGFTLC*，由广州杰特伟公司合成，并同时合成C*TTHWGFTLC*及STTHWGFTLS作为对照肽，*为二硫键氧化成环部位，上述多肽均经高压液相色谱仪(HPLC)及质谱分析确认。

1.1.3 主要试剂 BCA蛋白定量试剂盒购自凯基生物公司；IV型胶原酶(主要成分为MMP-2、MMP-9)购自美国Gibco公司；酪蛋白(β -casein)购自美国Sigma公司；纤连蛋白(Fn)购自美国CHEMICON公司；Costar Transwell TM培养板(3422)购自美国Corning公司；MTT购自Sigma公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 MCF-7采用RPMI 1640培养液(含10%胎牛血清)37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO₂培养箱常规培养，细胞长至80%~90%，0.25%胰酶消化，按1:3传代。

1.2.2 多肽溶液配置 多肽以PBS配成溶液，过滤除菌，-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.3 酪蛋白(β -casein)水解抑制实验 实验设7组，第一组为最大水解组：IV型胶原酶(80 $\mu\text{g}/\text{ml}$)及底物 β -casein(1.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$)；第二组为无水解组：只有底物 β -casein(1.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$)；第三至第七组为实验组：除胶原酶和 β -casein外分别加入250、500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RGDSY-CTT；250、500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CTT；500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ STT。37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h，加入5 \times 蛋白质上样缓冲液(PH6.8Tris-cl60 mmol/l，甘油25%，SDS 5%，溴酚蓝0.1%)混合后上样于12%聚丙烯酰胺凝胶(12%分离胶，4%积层胶)每孔20 μl ，进行连续

SDS-PAGE电泳, 积层胶 80V 30 min, 分离胶200V 90 min。0.25%考马斯亮蓝染色2 h, 脱色过夜。凝胶电泳结果用Iamgemaster进行拍照, 采用Quantity one软件密度扫描分析。重复3次, 取平均灰度值, 计算酪蛋白水解抑制率。

1.2.4 短肽溶解度检测 精确称取CTT及RGDSY-CTT各0.25、0.5、1.0、2.0 mg分别溶于0.5 ml蒸馏水, 溶解条件参见我国《药典》凡例2000年版: 置于(25±2)℃环境, 每隔5 min摇床振荡30 s, 观察30 min。待其充分溶解后, 2 000 r/min离心2 min, 取上清液, BCA法测蛋白浓度。每个蛋白梯度样品做3个复孔, 用酶标仪测定562 nm波长的吸光度值, 取平均值。绘制标准曲线, 查得相应蛋白含量, 计算蛋白浓度。

1.2.5 细胞黏附实验 以Fn (10 μg/ml) 每孔50 μl包被96孔板, 1%BSA100 μl封闭2 h, 接种指数生长期的MCF-7细胞约5×10⁴细胞/孔。实验设实验组、空白对照组(细胞+培养液)和空白调零组(只加培养液)。实验组CTT、RGDSY-CTT、STT分别设终浓度为50、100、200 μg/ml共9组, 细胞37℃孵育2 h, 弃培养液, PBS洗涤3次。每孔加入20 μl MTT (5 mg/ml), 孵育4 h, 弃上清液, 每孔再加入200 μl DMSO, 摇床振荡20 min至MTT结晶溶解, 酶标分析仪490 nm测吸光度值。实验每组重复6次。

1.2.6 细胞迁移实验 以Fn (10 μg/ml) 每孔50 μl涂布Transwell小室滤膜下表面。接种指数生长期的MCF-7细胞于Transwell小室上室每孔100 μl (约1×10⁵细胞), 下室加入NIH/3T3细胞培养上清液600 μl。实验设实验组和空白对照组, 实验组CTT、RGDSY-CTT、STT分别设终浓度为100、200 μg/ml共6组。37℃孵育12 h后, 用棉签擦去滤膜上层未穿膜的肿瘤细胞, 滤膜经甲醛固定30 min, 伊红染色, 200倍显微镜下计数上下左右中5个视野的穿膜细胞数。实验每组重复5次。

1.3 统计学方法

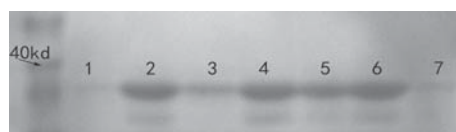
采用SPSS12.0统计分析软件建立数据库, 进行统计分析。计数资料的统计描述用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组均数的比较采用单因素方差分析。 $P < 0.01$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 酪蛋白水解抑制实验

灰度值扫描显示RGDSY-CTT、CTT对IV型胶原酶的抑制作用明显, 浓度为250 μg/ml时RGDSY-CTT和CTT抑制率约为53.6%和77.7%; 高浓度

500 μg/ml时, 两者抑制率相近, 分别为94.6%和96.9%; 高浓度500 μg/ml时, STT抑制效率仅有11.6%, 见图1。



1:collagenase IV+β-casein; 2:β-casein; 3:collagenase IV+β-casein+ 250 μg/ml RGDSY-CTT; 4:collagenase IV+β-casein +500μg/ml RGDSY-CTT; 5:collagenase IV+β-casein +250 μg/ml CTT; 6:collagenase IV +β-casein +500 μg/ml CTT; 7:collagenase IV+β-casein +500 μg/ml STT

图1 酪蛋白水解抑制实验

Figure1 β-casein hydrolyzation and inhibition assay

2.2 短肽RGDSY-CTTHWGFTLC的水溶性检测

由BCA法检测结果绘制标准曲线查得相应蛋白含量见图2, 计算各组样品蛋白浓度得到: CTT的溶解度约为745 μg/ml, RGDSY-CTT四个检测组均完全溶解, 溶液未饱和, 最高检测浓度为4 030 μg/ml。

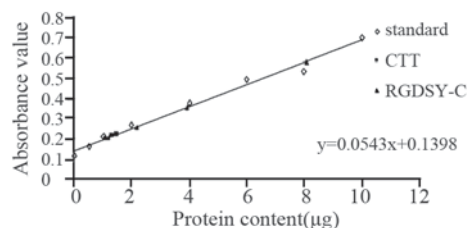


图2 蛋白定量BCA 法检测短肽溶液蛋白含量

Figure2 Quantity of peptides was detected by BCA

2.3 RGDSY-CTT对MCF-7细胞黏附能力的影响

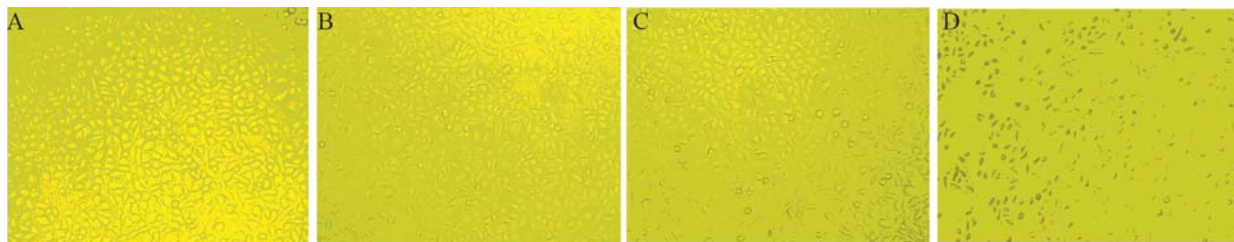
RGDSY-CTT在终浓度为50、100、200 μg/ml时, MCF-7细胞的黏附率依次为: 85.1%、74.1%、63.8%, 随着浓度升高, 黏附率降低($P < 0.01$); RGDSY-CTT在三种浓度对MCF-7细胞黏附能力的抑制作用均比CTT强($P < 0.01$); CTT与STT在各浓度下对MCF-7细胞黏附能力的影响与空白对照相比差异均无统计学意义($P > 0.05$), 见图3。

2.4 RGDSY-CTT对MCF-7细胞迁移能力的影响

RGDSY-CTT在100和200 μg/ml时对MCF-7细胞的迁移能力抑制率分别为42.9%和60.8%; CTT在100和200 μg/ml时对MCF-7细胞的迁移能力抑制率分别为39.2%和57.0%; RGDSY-CTT比CTT对MCF-7细胞的迁移能力抑制作用更明显($P < 0.05$), 见图4。

3 讨论

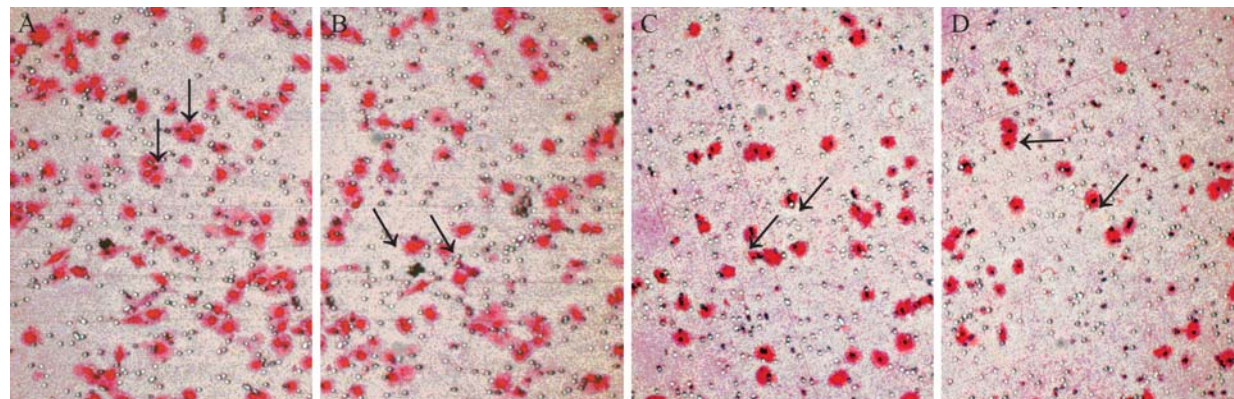
环肽CTT能特异性抑制MMP-2和MMP-9, 对其他基质金属蛋白酶家族成员无明显影响^[1,7], 在开发以MMP-2、MMP-9为靶点的抗肿瘤药物



A:blank; B:200μg/ml STT; C:200μg/ml CTT; D:200μg/mlRGDSY-CTT (×100)

图3 短肽处理2h对MCF-7细胞黏附的影响

Figure3 Cellular adhesion capability of MCF-7 by peptides after 2h



A:blank; B:200μg/ml STT; C:200μg/ml CTT; D:200μg/ml RGDSY-CTT (Eosin staining×100)

图4 短肽对MCF-7细胞迁移的抑制作用

Figure4 The inhibition of celler migration capability of MCF-7 by peptides

方面展现了良好的应用前景。对环肽CTT进行结构改造或是化学修饰，改善其理化性质，增加生物利用度以及增强其抗肿瘤功能，是CTT在抗肿瘤转移应用研究方面的重要内容。本研究从改善CTT水溶性，增加其稳定性，同时增强其抗肿瘤能力的目的出发，以环肽CTT为基础，引入含RGD功能基团的极性氨基酸序列（RGDSY-），将RGDSY序列中酪氨酸Y的自由羧基与环肽CTT第一个氨基酸半胱氨酸C的自由氨基以肽键连接而成，得到新肽RGDSY-CTT。新肽中加入的极性氨基酸序列（RGDSY-）含有RGD序列肽，能以整合素 $\alpha_v\beta_3$ 为靶点阻断肿瘤细胞与基质或基底膜之间黏附，这将使新肽RGDSY-CTT具有更优的理化特性以及双靶点抗肿瘤功能。

短肽CTT由10个氨基酸构成，其中两个半胱氨酸（C）二硫键缩合形成胱氨酸极难溶于水，且色氨酸、甘氨酸、苯丙氨酸、亮氨酸（W、G、F、L）均为侧链疏水氨基酸，具有很强的疏水性。药物溶解度直接影响药物在体内的吸收与药物生物利用度，因此CTT的水溶性差在一定程度上限制了它作为药物的开发和应用。目前常用的改善肽类药物水溶性的方法有：（1）增加极性亲水氨基酸构成比例^[18-19]；（2）通过高亲水性分子化学修饰等^[20-21]。本研究中设计的新肽RGDSY-CTT，引入了极性氨基酸序列（RGDSY-），序列中含有四个极性氨基酸（R、D、S、Y），增加了极性氨基酸在

肽构成中的比例，据Swiss Institute of Bioinformatics建立的专业蛋白质分析系统EXPASY评估其亲水性能比CTT有显著提高。而参照《药典》凡例2000版检测药物溶解度的条件，将RGDSY-CTT与CTT分别溶于蒸馏水中，通过蛋白定量BCA法测得CTT的饱和溶解度约为745 μg/ml，而RGDSY-CTT溶解度在4 030 μg/ml以上（实验中最高检测浓度至4 030 μg/ml），表明了引入极性氨基酸序列（RGDSY-）对改善CTT的水溶性有显著效果。

短肽CTT是由10个氨基酸组成的小分子肽，体内稳定性差，容易降解，这也是小分子活性肽在应用中普遍会遇到的问题。为克服这一缺点，目前常采用的改造方式有：（1）在小分子肽中掺入非天然氨基酸^[22-23]；（2）增加肽的长度，一般认为12肽以上有助增加肽的刚性，减少降解^[9]。本研究设计的新肽RGDSY-CTT为15肽，这将在一定程度上有助于增加短肽的刚性；当然，肽分子越大，免疫原性也会越大，因此增加的氨基酸序列也不宜过长^[9]。

新肽RGDSY-CTT的理化特性更优于CTT，有利于增加其生物利用度，然而这种设计是否会影响到短肽的功能基团，从而影响其活性，是评价本次改造成败的关键。本研究通过酪蛋白水解抑制实验检测RGDSY-CTT抑制MMP-2、MMP-9水解底物酪蛋白的能力，结果显示RGDSY-CTT、CTT对MMP-2、MMP-9的抑制作用明显，在浓度为

250 $\mu\text{g/ml}$ 时, RGDSY-CTT抑制率约为53.6%, 低于CTT的抑制率77.7%; 而在高浓度500 $\mu\text{g/ml}$ 时, 两者抑制率相近, 分别为94.6%和96.9%。低浓度时RGDSY-CTT抑制效率比CTT低, 是由于前者分子量较大, 相同质量浓度所带的抑酶功能基团较少, 这一比率与两者质量摩尔比基本一致。在高浓度时, 两者功能基团与酶作用接近饱和, 因此两者的抑制效率也都接近于完全抑制。由此可见, 新肽RGDSY-CTT所加的极性氨基酸序列并未影响短肽抑制MMP-2、MMP-9的活性。

新肽RGDSY-CTT引入了RGD功能序列, 从结构组成上除了具有抑制MMP-2、MMP-9的活性, 还可阻断肿瘤细胞整合素 $\alpha_v\beta_3$ 对细胞外基质的黏附, 使其具有了针对整合素为靶点的抗肿瘤活性。本研究把MCF-7细胞种植于涂布Fn的孔板, 与短肽共孵育2 h后, 检测其对MCF-7细胞黏附能力的影响, 结果显示随着RGDSY-CTT浓度升高, MCF-7细胞的黏附率明显降低, 而CTT各浓度组黏附率均未见明显下降。这说明新肽RGDSY-CTT具有抗肿瘤细胞黏附作用, 而且这种活性主要来自于引入的RGD片段, 而非环肽CTT所原有的。此外, 通过细胞迁移试验观察短肽对MCF-7细胞迁移的影响, 结果显示相同浓度下RGDSY-CTT对MCF-7细胞迁移的抑制能力比CTT更强($P < 0.05$)。这一结果表明新肽RGDSY-CTT能通过RGD片段抑制MCF-7细胞的黏附作用而影响其运动迁移能力, 从而增强其抗肿瘤浸润和转移的效果。

综上所述, 本研究设计合成的新肽RGDSY-CTT有更优于CTT的理化特性且具有CTT及RGD两个功能基团, 可作用于不同的抗肿瘤靶点, 在开发靶向抗肿瘤药物或肿瘤显像方面都将具有更好的应用前景。

参考文献:

- [1] Koivunen E, Arap W, Valtanen H, *et al.* Tumor targeting with a selective gelatinase inhibitor[J]. *Nat Biotechnol*, 1999, 17(8):768-74.
- [2] Kang JH, Han IH, Sung MK, *et al.* Soybean saponin inhibits tumor cell metastasis by modulating expressions of MMP-2, MMP-9 and TIMP-2[J]. *Cancer Lett*, 2008, 261(1):84-92.
- [3] Alford SH, Vrana MS, Waite L, *et al.* Matrix metalloproteinase expression in high grade soft tissue sarcomas[J]. *Oncol Rep*, 2007, 18(6):1529-36.
- [4] Stahtea XN, Roussidis AE, Kanakis I, *et al.* Imatinib inhibits colorectal cancer cell growth and suppresses stromal-induced growth stimulation, MT1-MMP expression and pro-MMP2 activation[J]. *Int J Cancer*, 2007, 121(12):2808-14.
- [5] Medina OP, Kairemo K, Valtanen H, *et al.* Radionuclide imaging of tumor xenografts in mice using a gelatinase-targeting peptide[J]. *Anticancer Res*, 2005, 25(1A):33-42.
- [6] Zou Y, Chen Y, Jiang Y, *et al.* Targeting matrix metalloproteinases and endothelial cells with a fusion peptide against tumor[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(15):7295-300.

- [7] Heikkilä P, Suojanen J, Pirilä E, *et al.* Human tongue carcinoma growth is inhibited by selective antigelatinolytic peptides[J]. *Int J Cancer*, 2006, 118(9):2202-9.
- [8] Medina OP, Söderlund T, Laakkonen LJ, *et al.* Binding of novel peptide inhibitors of type IV collagenases to phospholipid membranes and use in liposome targeting to tumor cells *in vitro*[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(10):3978-85.
- [9] Liang YJ, Liu KL. Peptide drug research: infinite scene in the perilous peak[N]. *Zhongguo Yi Yao Bao*, 2007-01-18(11). [梁远军, 刘克良. 肽类药物研究: 无限风光在险峰[N]. *中国医药报*, 2007-01-18(11).]
- [10] Björklund M, Valtanen H, Savilahti H, *et al.* Use of intein-directed peptide biosynthesis to improve serum stability and bioactivity of a gelatinase inhibitory peptide[J]. *Comb Chem High Throughput Screen*, 2003, 6(1):29-35.
- [11] Mukai T, Suganuma N, Soejima K, *et al.* Synthesis of a beta-tetrapeptide analog as a mother compound for the development of matrix metalloproteinase-2-imaging agents[J]. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 2008, 56(3):260-5.
- [12] Sawyer AA, Hennessy KM, Bellis SL, *et al.* The effect of adsorbed serum proteins, RGD and proteoglycan-binding peptides on the adhesion of mesenchymal stem cells to hydroxyapatite[J]. *Biomaterials*, 2007, 28(3):383-92.
- [13] Oliva IB, Coelho RM, Barcellos GG, *et al.* Effect of RGD-disintegrins on melanoma cell growth and metastasis: involvement of the actin cytoskeleton, FAK and c-Fos[J]. *Toxicol*, 2007, 50(8):1053-63.
- [14] Jones S, Martel C, Belzacq-Casagrande AS, *et al.* Mitoparan and target-selective chimeric analogues: membrane translocation and intracellular redistribution induces mitochondrial apoptosis[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1783(5):849-63.
- [15] Terentiev AA, Moldogazieva NT. Cell adhesion proteins and alpha-fetoprotein. Similar structural motifs as prerequisites for common functions[J]. *Biochemistry (Mosc)*, 2007, 72(9):920-35.
- [16] Das S, Banerji A, Frei E, *et al.* Rapid expression and activation of MMP-2 and MMP-9 upon exposure of human breast cancer cells (MCF-7) to fibronectin in serum free medium[J]. *Life Sci*, 2008, 82(9-10):467-76.
- [17] Baum O, Hlushchuk R, Forster A, *et al.* Increased invasive potential and up-regulation of MMP-2 in MDA-MB-231 breast cancer cells expressing the beta3 integrin subunit[J]. *Int J Oncol*, 2007, 30(2):325-32.
- [18] Angell Y, Chen D, Brahimi F, *et al.* A combinatorial method for solution-phase synthesis of labeled bivalent beta-turn mimics[J]. *J Am Chem Soc*, 2008, 130(2):556-65.
- [19] Wang W, Jiang J, Ballard CE, *et al.* Prodrug approaches to the improved delivery of peptide drugs[J]. *Curr Pharm Des*, 1999, 5(4):265-87.
- [20] Ryan SM, Mantovani G, Wang X, *et al.* Advances in PEGylation of important biotech molecules: delivery aspects[J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2008, 5(4):371-83.
- [21] Wang LY, Wu KL. Methods of peptide and protein pegylation[J]. *You Ji Hua Xue*, 2003, 23(11):1320-3. [王良友, 刘克良. 多肽和蛋白质的聚乙二醇化修饰方法[J]. *有机化学*, 2003, 23(11):1320-3.]
- [22] Weiss HM, Wirz B, Schweitzer A, *et al.* ADME investigations of unnatural peptides: distribution of a ^{14}C -labeled beta-3-octaarginine in rats[J]. *Chem Biodivers*, 2007, 4(7):1413-37.
- [23] Sato AK, Viswanathan M, Kent RB, *et al.* Therapeutic peptides: technological advances driving peptides into development[J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2006, 17(6):638-42.