

利用含 RGD 的多肽增进细胞摄取 用于细胞中弗林酶活性的检测

王雨薇, 梁高林

(中国科学技术大学化学系, 安徽合肥 230026)

摘要:设计并合成了一种新型自组装多肽纳米荧光探针.在合成方法上使用了新型的生物兼容性的 CBT-Cys 点击反应实现了 RGD 肽的环化.该探针可通过 RGD 序列靶向肿瘤细胞 $\alpha v \beta 3$ 整合素受体,促进细胞的摄取;同时可与细胞内弗林酶作用导致荧光的“关-开”,达到对肿瘤细胞的靶向荧光成像功能.

关键词:整合素;荧光探针;RGD 肽;弗林酶;细胞成像

中图分类号:O657.3 **文献标识码:**A doi:10.3969/j.issn.0253-2778.2017.05.011

引用格式:王雨薇,梁高林.利用含 RGD 的多肽增进细胞摄取用于细胞中弗林酶活性的检测[J].中国科学技术大学学报,2017,47(5):448-454.

WANG Yuwei, LIANG Gaolin. Using RGD-containing peptide to enhance cell uptake for the detection of furin activity in cells[J]. Journal of University of Science and Technology of China, 2017, 47(5): 448-454.

Using RGD-containing peptide to enhance cell uptake for the detection of furin activity in cells

WANG Yuwei, LIANG Gaolin

(Department of Chemistry, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China)

Abstract: A new self-assembled nano fluorescence probe was designed and synthesized. The new biocompatible CBT-Cys click reaction was used to cyclize RGD peptide in synthesis method. Using RGD peptide sequence, this probe can target $\alpha v \beta 3$ integrin of cancer cells and react with furin enzyme in cells, resulting in fluorescence “Off-On”. Thus it achieves the ability to target tumor cells for fluorescence imaging.

Key words: integrin; fluorescence probe; rgd peptide; furin enzyme; cell imaging

0 引言

弗林蛋白酶(Furin 酶),在人体的多种疾病,如炭疽病、阿尔茨海默氏病、埃博拉发热以及多种癌症中起着重要作用^[1].许多种癌细胞,包括非小细胞肺

癌,头部和颈部的鳞状癌细胞等都高表达弗林蛋白酶^[2].因此,对癌症的早期检测来说,检测细胞内弗林酶的表达水平非常重要.弗林酶能够识别并剪切特定的氨基酸序列:Arg-X-Lys/Arg-Arg↓X,其中 Arg 表示精氨酸,Lys 表示赖氨酸,X 可以表示任意

收稿日期:2017-02-06;修回日期:2017-04-17

基金项目:国家自然科学基金(U1532144,21675145)资助.

作者简介:王雨薇,女,1993年生,硕士.研究方向:生物成像. E-mail: lzt2211@mail.ustc.edu.cn

通讯作者:梁高林,博士/教授. E-mail: gliang@ustc.edu.cn

的氨基酸^[3].

RGD 肽是一种由精氨酸(Arg)-甘氨酸(Gly)-天冬氨酸(Asp)3 个氨基酸组成的短肽,它广泛存在于生物体内,生物体内的整合素 $\alpha_v\beta_3$ 可与 RGD 肽特异性结合,并介导多种病理生理过程.这种整合素受体在多种肿瘤细胞表面和新生血管内皮细胞膜上有较高的表达水平,而在成熟的血管内皮细胞与绝大多数正常的器官、系统中低表达或不表达,所以 RGD 肽可以作为某些高表达整合素 $\alpha_v\beta_3$ 肿瘤细胞的特异性靶向受体.RGD 多肽序列与整合素 $\alpha_v\beta_3$ 靶向结合具有重要的生物应用意义,但是线状 RGD 序列结构相对灵活,不稳定性较强,容易被体内各种水解酶水解,导致线性 RGD 在细胞中、体内的应用受到限制.将肽链设计为环形结构是增加多肽生物稳定性的有效方法之一.然而目前 RGD 肽的环化方法多为生物不兼容的,阻碍了其在生物方面的应用.

当前很多成像的研究使用的是荧光信号保持开启的荧光探针.然而这种荧光一直开启的探针会存在在非目标细胞或组织中的非特异内吞作用,会导致假阳性信号^[4].与这种常开信号相比较,“开-关”或“关-开”的荧光信号策略不仅可以提高光学空间分辨率,而且可以妥善解决假阳性信号问题,更适用于细胞的靶向检测与成像^[5-7].当前的多种荧光“开-

关”和“关-开”方法已经用于检测金属离子、阴离子、蛋白质和核苷酸等^[8-13].在这两种方法中,由于“关-开”策略有着较低的背景信号,所以比“开-关”方法在荧光成像中更为有利.组装与解组装在细胞内是两种常见和重要的过程.由于聚集诱导猝灭作用^[14],荧光染料的组装可以导致荧光的猝灭,而解组装可以使荧光信号重新出现,所以探针的组装和解组装可以用于开发荧光信号开关的探针^[15-16].目前已经有一些工作报道弗林蛋白酶控制的纳米粒子自组装和解组装的荧光成像技术^[17],但由于纳米粒子本身需通过胞吞作用进入细胞,较难以被细胞吸收,且上述纳米粒子缺乏对特定细胞的选择性,导致其检测灵敏度较低,所以开发一种具有靶向效果的组装-解组装细胞荧光探针是非常有意义的.

本研究设计了化合物 **1**(图 1),包含可靶向结合整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的肽链 RGD 序列、可被弗林酶特异剪切的 RRVR 序列与荧光发色团 FITC,同时双硫键可被还原剂还原为巯基,通过生物兼容性的 CBT-Cys 点击反应^[18],1,2-氨基硫醇与氰基缩合,生成含有环状 RGD 的二聚体 1-Dimer,通过自组装形成纳米粒子,导致 FITC 荧光猝灭.纳米粒子在与弗林酶作用后 RRVR 序列被剪切,使 FITC 荧光恢复,从而达到靶向肿瘤细胞并对其显像的目的.

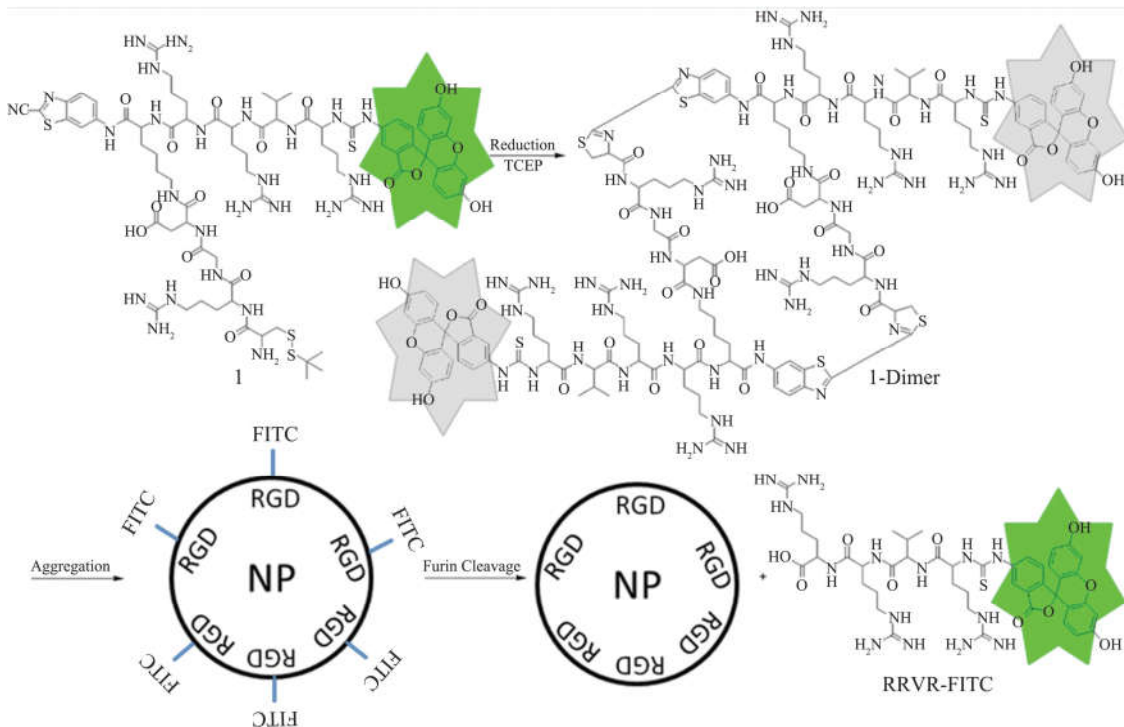


图 1 还原剂引发的缩合反应与自组装成纳米粒子及弗林酶对纳米粒子 RRVR 侧链的剪切导致荧光的减弱和增强的示意图

Fig.1 Schematic illustration of reduction-controlled condensation and self-assembly of nanoparticles inducing fluorescence signal “off and on” for furin activity detection in cancer cells

1 实验

1.1 仪器与试剂

Agilent 1200 高效液相色谱仪;岛津高效液相色谱(HPLC);Ultrflex II MALDI-TOF/TOF 质谱仪;Fluorescence F-4600 荧光光谱仪;Varian Cary 50 UV/Vis 光谱仪;OLMPUS IX71 荧光显微镜。

实验所用试剂购自 Adamas 公司或生工,均为分析纯及以上;胎牛血清(FBS)购自四季青;青霉素-链霉素溶液(100X)购自碧云天(Beyotime)生物技术公司;培养基 Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM)购自 Thermo Fisher Scientific;弗林酶购自 Biolabs,包装规格为 2000U/mL,其中

1U 的定义为在 1min 内 30℃ 剪切 1pmol 的 Boc-RRVR-AMC 所需弗林酶的量;弗林酶抑制剂 II(H-(D)Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-NH₂)购自上海吉尔生化有限公司;抑制剂 Cyclo(RGDyK)来自 Selleck 公司。

1.2 化合物的合成

化合物 Lys(Arg-Arg-Val-Arg)-Asp-Gly-Arg-Cys-(StBu)通过固相合成肽链(SPPS)方法合成。该化合物与 CBT, IBCF 和 MMP 反应,再经 95% TFA 处理, HPLC 纯化,再与 FITC, DIPEA 在 DMF 中反应,经过 HPLC 纯化得到化合物 1。合成的化合物 1 的分子量由高分辨基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱(HR-MALDI-TOF/MS)验证。

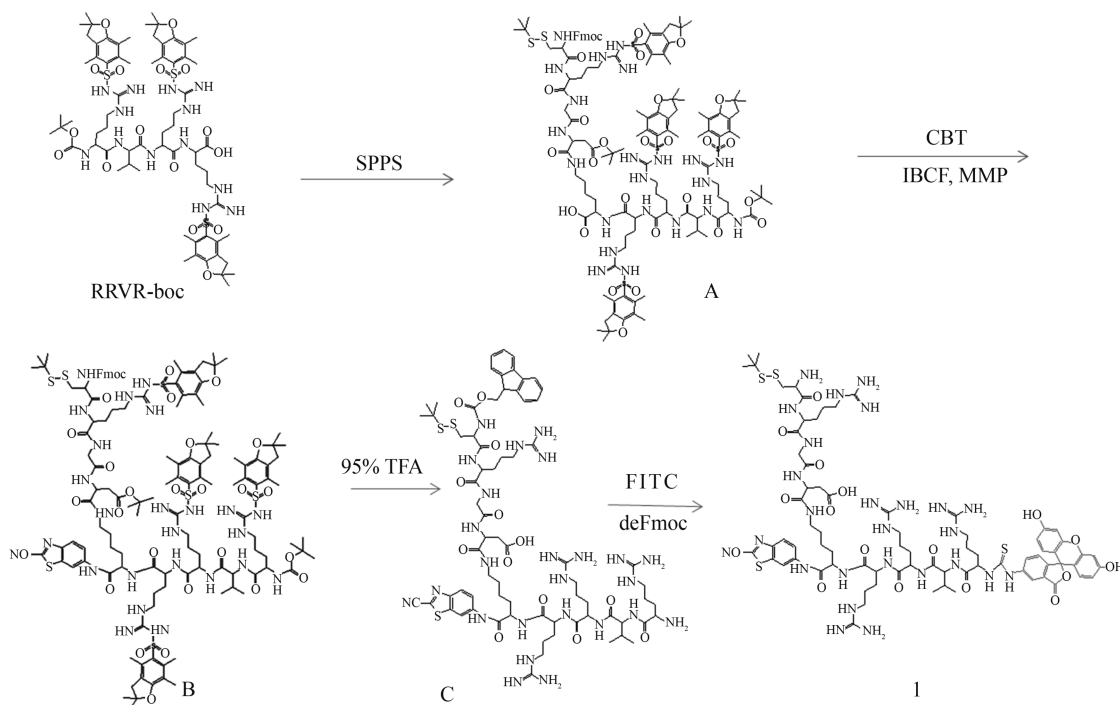


图 2 化合物 1 的合成路线。

Fig.2 Synthesis route of compound 1

2 结果与讨论

2.1 自组装形成的纳米粒子的表征

在合成化合物 1 并对其表征后,我们用 TCEP 引发 1 的缩合并通过自组装生成 1-NPs。然后将其在体外对弗林酶进行荧光检测。如图 4(a)所示, 12 μmol/L 化合物 1 在 pH7.4, 包含 10% (体积分数) DMSO 的缓冲液中,与 3 mmol/L TCEP 在 37℃ 共孵育 1 h,与 1 的荧光强度相比,1-NPs 的荧光强度降低了 58.9%。之后 1-NPs 分散液与弗林酶 (10 pmol/U) 在 37℃ 下孵育 5h,可以看到荧光强度

的增加,达到初始值的 31.4%。由于动态光散射的原因,紫外吸收光谱如果在 500~700 nm 附近有明显吸收,则代表有纳米粒子的存在。从图 4(b)中可以看出,与化合物 1 溶液对比,1 与 TCEP 孵育后的溶液和与 TCEP 孵育后再经弗林酶处理后的溶液在 500~700 nm 有明显的吸收,说明有纳米粒子的存在。我们通过透射电镜对 1-NPs 与 1-NPs 和弗林酶孵育之后的产物进行了表征。如图 3 所示,当 1 与 TCEP 在 37℃ 下孵育 1 h 后,形成的纳米粒子平均粒径有 80~100nm,1-NPs 在与弗林酶孵育后,TEM 显示纳米粒子的形态没有明显的变化,说明

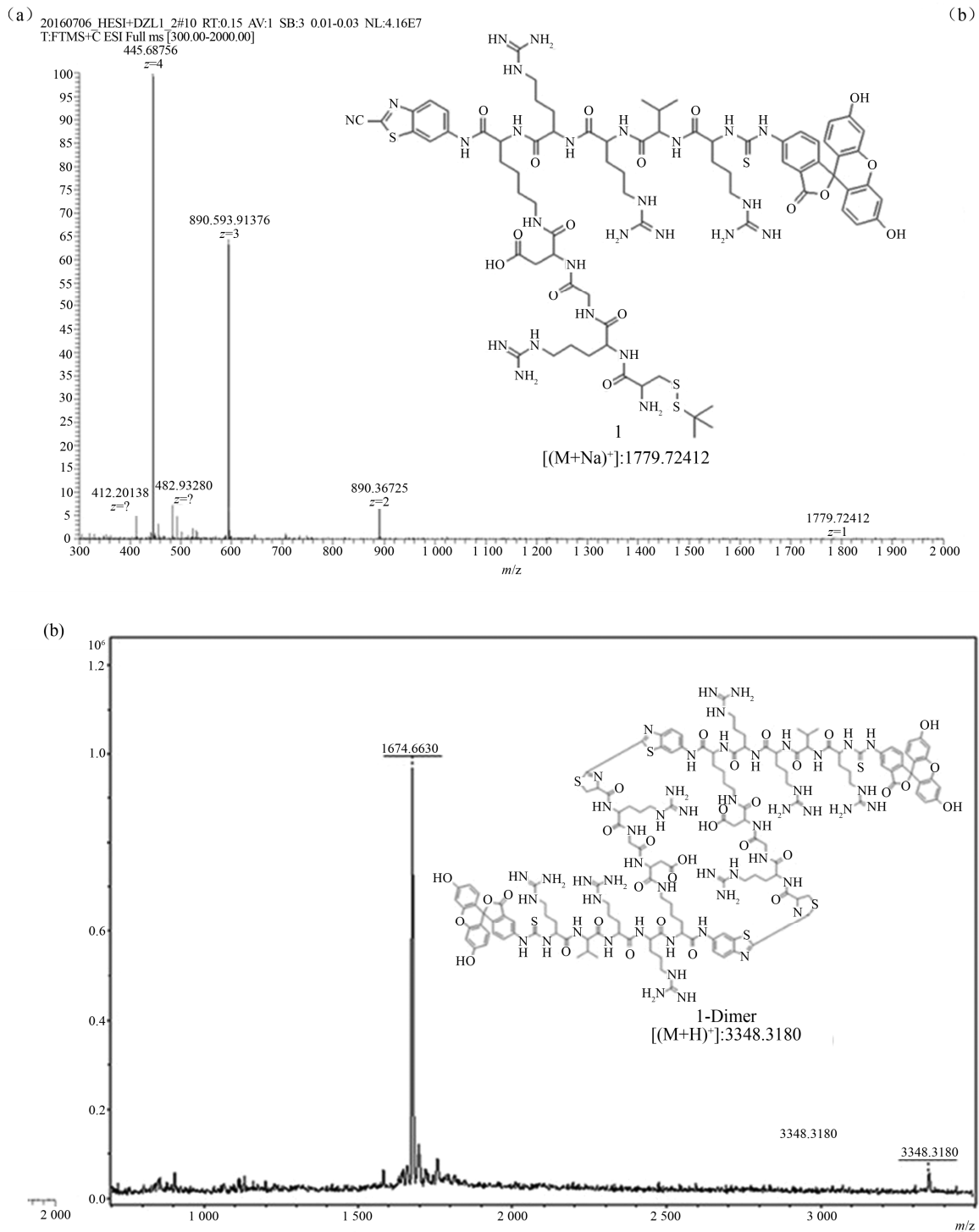


图 3 化合物 1(a)与化合物 1-Dimer(b)的高分辨质谱图

Fig.3 High resolution mass spectrometry of compound 1(a) and 1-Dimer(b)

弗林酶对纳米粒子本身结构无明显影响。

为了从分子水平上验证 TCEP 还原诱导的自组装与弗林酶对纳米粒子侧链的剪切,我们将以上两种孵育混合液注入 HPLC 系统并收集出峰溶液用于质谱分析.如图 4(c)所示,12 $\mu\text{mol/L}$ 化合物 1

与 3 mmol/L TCEP 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 30 min 后, HPLC 谱图只显示保留时间为 12.5 min 的主峰,质谱结果表明它对应化合物 1 的缩合产物峰(1-NPs).这说明 1-NPs 是由 1-Dimer 组成的.1-NPs 与 10 $\mu\text{mol/L}$ 弗林酶在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 5h 后,我们发现一部

分 1-Dimer 与弗林酶作用得到 1-Dimer-Cleaved 与 RRVR-FITC 侧链,说明弗林酶可以对 1-NP 切割, 释放 FITC 分子,从而导致荧光的恢复.

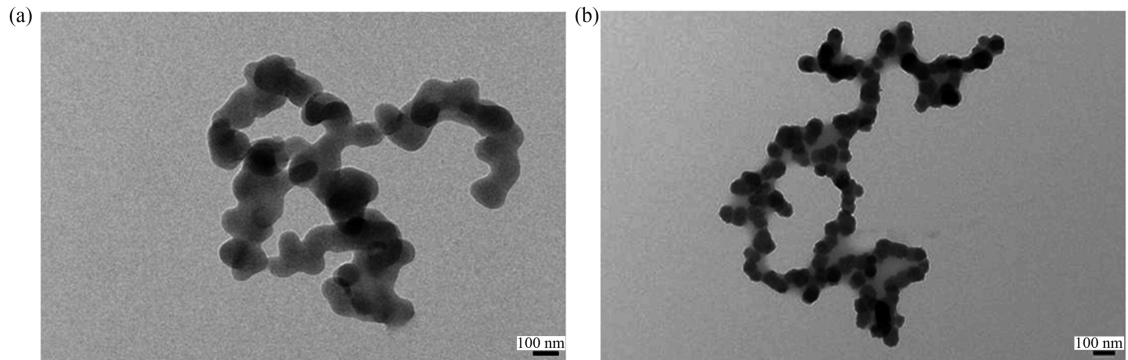


图 4 化合物 1-NPs(a)与弗林酶切后的 1-NPs(b)的 TEM 照片
Fig.4 TEM images of 1-NPs(a) and 1-NPs(b) after furin cleavage

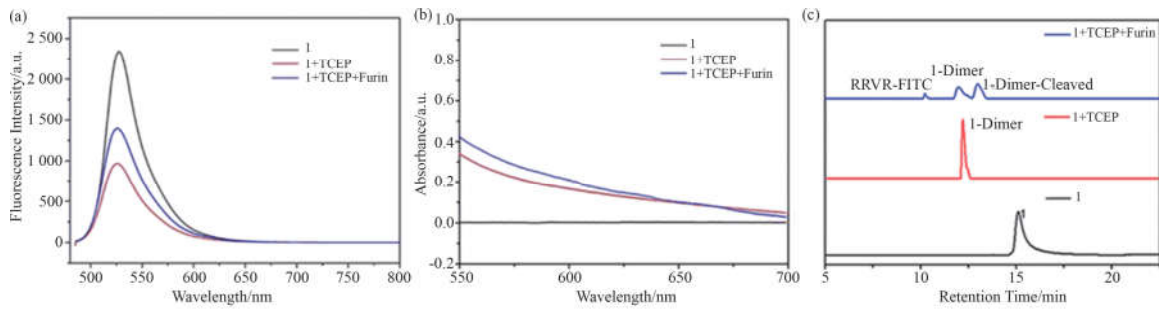
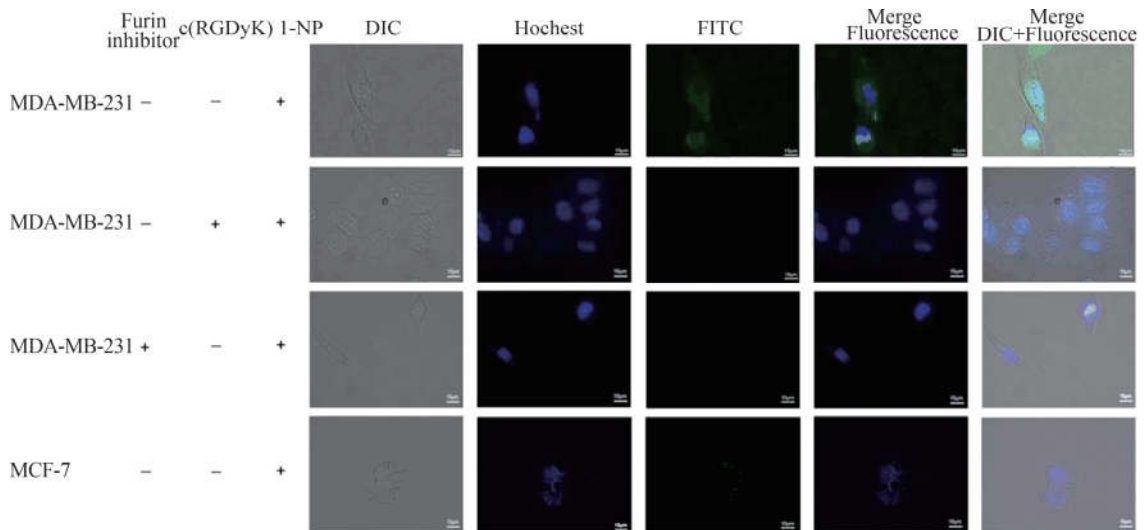


图 5 化合物 1,1+TCEP 与 1+TCEP+furin 的荧光光谱 (a) (激发波长:465 nm), 紫外光谱 (b) 与 HPLC 谱图 (c) (检测波长为 320 nm)

Fig.5 (a)Fluorescence spectra of compound 1, 1+TCEP, and 1+TCEP+furin.Excitation: 465 nm. (b)UV spectra of compound 1, 1+TCEP, and 1+TCEP+furin.(c) HPLC traces, Absorbance: 320 nm



细胞实验条件为 37℃,1-NPs 浓度为 100nmol/L,c(RGDyK)浓度为 100 nmol/L,弗林酶抑制剂浓度为 1 mmol/L,孵育时间 6 h. 细胞核使用 Hoechst 染料染色.

图 6 MDA-MB-231,MCF-7 细胞荧光共聚焦显微镜图片
Fig.6 The laser confocal fluorescence microscopy images of MDA-MB-231 and MCF-7 cells

2.2 细胞成像实验

我们通过细胞实验证明 **1**-NPs 具有靶向 $\alpha_v\beta_3$ 能力和对弗林酶的显像能力. 选用细胞为高表达 $\alpha_v\beta_3$ 、普通表达弗林酶的 MDA-MB-231 细胞. 如图 5 所示, 细胞核用 Hoechst 细胞核染料染色后, 将 100 nmol/L 化合物 **1**-NPs 与细胞在 37°C 下孵育 6h. 荧光显微镜图像显示 FITC 的绿色荧光分布在细胞质中. 而将细胞的 $\alpha_v\beta_3$ 受体用抑制剂 c(RGDyk) 抑制后, 孵育 6h 后 FITC 的绿色荧光很难被观察到. 同时, 我们使用弗林酶抑制剂 II(H-(D)Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-NH₂, 100 μ mol/L) 预先与细胞孵育 30min, 再将纳米粒子与细胞孵育 6h, 荧光显微镜观察下基本观察不到 FITC 的绿色荧光. 随后我们又选用了低表达 $\alpha_v\beta_3$ 、普通表达弗林酶的人乳腺癌细胞 MCF-7 细胞来作为对照试验. 在荧光显微镜观察下只有微弱的绿色荧光. 说明 **1**-NPs 对 $\alpha_v\beta_3$ 具有特异性响应. **1**-NPs 的细胞毒性测试如图 6 所示, 在上述细胞成像的剂量下, 48h 内 **1**-NPs 不会引起明显的细胞毒性.

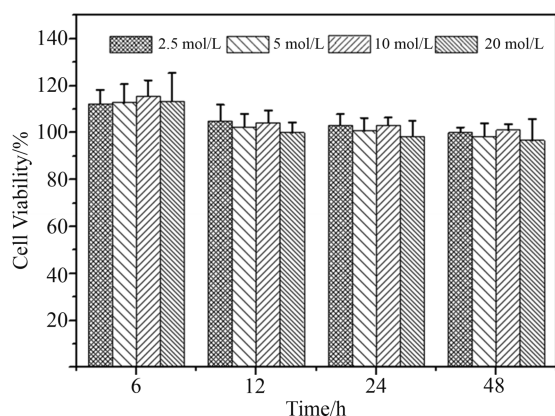


图 7 化合物 **1**-NPs 的细胞毒性测试图

Fig.7 Cell viability test of compound **1**-NPs

3 结论

本文设计并合成了一种新的肿瘤细胞靶向的荧光探针. 经过体外和细胞试验的验证, 该探针可以有效靶向肿瘤细胞的 $\alpha_v\beta_3$ 受体, 并可对弗林酶进行显像. 该荧光探针可以潜在地应用于肿瘤靶向的荧光成像.

参考文献 (References)

[1] THOMAS G. Furin at the cutting edge: From protein traffic to embryogenesis and disease [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2002, 3:753-766.

[2] MBIKAY M, SIROIS F, YAO J, et al. Comparative analysis of expression of the proprotein convertases furin, PACE4, PC1 and PC2 in human lung tumours [J]. *British Journal of Cancer*, 1997, 75 (10): 1509-1514.

[3] HOSAKA M, NAGAHAMA M, KIM W S, et al. Arg-X-Lys/Arg-Arg motif as a signal for precursor cleavage catalyzed by furin within the constitutive secretory pathway[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1991, 266(19):12127-12130.

[4] ZHANG Y, LIU J M, YAN X P. Self-assembly of folate onto polyethyleneimine-coated CdS/ZnS quantum dots for targeted turn-on fluorescence imaging of folate receptor over expressed cancer cells [J]. *Analytical Chemistry*, 2012, 85(1):228-234.

[5] PAN W, YANG H, ZHANG T, et al. Dual-targeted nanocarrier based on cell surface receptor and intracellular mRNA: An effective strategy for cancer cell imaging and therapy [J]. *Analytical Chemistry*, 2013, 85(14):6930-6935.

[6] HETTIARACHCHI S U, PRASAI B, MCCARLEY R L. Detection and cellular imaging of human cancer enzyme using a turn-on, wavelength-shiftable, self-immolative profluorophore [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2014, 136(21):7575-7578.

[7] ZHAO J, YANG D, ZHAO Y, et al. Anion-coordination-induced turn-on fluorescence of an oligourea-functionalized tetraphenylethene in a wide concentration range [J]. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 2014, 53 (26): 6632-6636.

[8] ZHANG J, YUAN Y, YU Z L, et al. Selective detection of ferric ions by blue-green photoluminescent nitrogen-doped phenol formaldehyde resin polymer [J]. *Small*, 2014, 10(18):3662-3666.

[9] XIONG L, SHUHENDLER A J, RAO J. Self-luminescing BRET-FRET near infrared dots for in vivo lymph node mapping and tumor imaging [J]. *Nature Communications*, 2011, 3(6):1193.

[10] YUAN L, LIN W, YANG Y, et al. A unique class of near-infrared functional fluorescent dyes with carboxylic-acid-modulated fluorescence ON/OFF switching: Rational design, synthesis, optical properties, theoretical calculations, and applications for fluorescence imaging in living animals [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2012, 134 (2): 1200-1211.

[11] CAI Y, SHI Y, WANG H, et al. Environment-sensitive fluorescent supramolecular nanofibers for imaging applications [J]. *Analytical Chemistry*, 2014,

- 86(4):2193.
- [12] LIU D, WANG S, SWIERCZEWSKA M, et al. Highly robust, recyclable displacement assay for mercuric ions in aqueous solutions and living cells[J]. ACS Nano, 2012, 6(12):10999.
- [13] XIANG H, QIAN W, YANG L, et al. Optical imaging of articular cartilage degeneration using near-infrared dipicolylamine probes[J]. Biomaterials, 2014, 35(26):7511-7521.
- [14] YUAN W Z, LU P, CHEN S, et al. Changing the behavior of chromophores from aggregation-caused quenching to aggregation-induced emission: development of highly efficient light emitters in the solid state [J]. Advanced Materials, 2010, 22(19):2159.
- [15] REN C, ZHANG J, CHEN M, et al. Self-assembling small molecules for the detection of important analytes [J]. Chemical Society Reviews, 2014, 43(21): 7257-7266.
- [16] HUANG R, WANG X, WANG D, et al. Multifunctional fluorescent probe for sequential detections of glutathione and caspase-3 in vitro and in cells[J]. Analytical Chemistry, 2013, 85(13):6203.
- [17] YUAN Y, ZHANG J, CAO Q, et al. Intracellular disassembly of self-quenched nanoparticles turns nir fluorescence on for sensing furin activity in cells and in tumors [J]. Analytical Chemistry, 2015, 87(12): 6180-6185.
- [18] LIANG G L, REN H J, RAO J H. A biocompatible condensation reaction for controlled assembly of nanostructures in living cells[J]. Nature Chemistry, 2010, 2(3): 54-60.