

· 综述 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.08.041

## 噬菌体肽库技术筛选肿瘤靶向短肽的研究进展\*

张 洋<sup>1</sup>综述, 张小明<sup>2</sup>, 刘 刚<sup>2</sup>审校

(1. 四川省宜宾市第一人民医院放射科 644000; 2. 医学影像四川省重点实验室, 四川南充 637000)

[关键词] 噬菌体肽库; 肿瘤; 靶向短肽

[中图分类号] R34

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)08-1124-03

噬菌体展示技术是一项特殊的基因重组表达技术,亦是一种强大的筛选工具。1985年,Smith等成功地创立了噬菌体展示技术;1990年,Scott等在噬菌体展示技术的基础上发展并构建了噬菌体展示随机肽库。噬菌体肽库技术是一种新兴的药物发现工具<sup>[1]</sup>,通过噬菌体随机肽库筛选获得的肽可以作为分子载体运载药物,起到生物导弹的功能。筛选的肽也可以直接与药物靶点分子特异性结合,起到生物治疗的作用。近年来,噬菌体肽库技术已广泛应用于肿瘤研究,如癌症的检测和诊断、肿瘤相关抗原的筛选、肿瘤药物的研制、肿瘤细胞信号传导及肿瘤的基因治疗研究等。现就近年来噬菌体展示肽库技术在筛选肿瘤靶向短肽研究中的应用综述如下。

## 1 噬菌体展示肽库

目前,常用于噬菌体展示的噬菌体有2种类型:(1)M13线性噬菌体;(2)T7噬菌体。噬菌体展示肽库是把随机短肽片段与噬菌体的P3或P8基因的N端进行融合,通过展示技术让随机短肽得以独立表达并具有生物学功能。噬菌体肽库构建的关键环节是得到足够多的能独立表达多肽的单克隆噬菌体,以便于靶标的结合与识别。筛选的结果受多个因素的影响,而合理地应用筛选方法是能得到高特异性、高亲和力多肽的最重要的环节。

## 2 噬菌体随机肽库技术筛选肿瘤靶向短肽的研究

由于传统的化疗药对肿瘤细胞的选择精度较差,易产生较大的不良反应,因此,肿瘤的药物靶向治疗尤为重要。利用能与肿瘤组织特异性结合的分子作为载体,将药物导向肿瘤组织,这种方法可以显著提高药物导向的准确度。根据抗原抗体反应的特异性,利用单克隆抗体为载体的药物导向治疗已成功应用于肿瘤。但这种疗法的效果并不理想,主要的原因是由于抗体相对分子质量较大,使其应用效果降低。研究表明,噬菌体肽库筛选系统提供的载体由于其具有相对分子质量较小、稳定性好、活性高等优点,能较大程度上弥补单克隆抗体疗法的不足<sup>[2]</sup>,因而广泛应用于肿瘤的诊断与治疗的研究中。噬菌体随机展示肽库筛选技术在肿瘤导向治疗研究中的应用主要有4个方面:(1)筛选肿瘤亲和短肽,与标识剂结合后用于肿瘤疗效的评价,为下一步诊疗计划提供帮助;(2)筛选的肿瘤特异肽与各种化疗药物耦联,进而用于肿瘤的药物导向治疗研究;(3)获得与肿瘤特异性结合的氨基酸序列后与基因片段进行耦联,用于肿瘤的基因治疗的研究;(4)筛选肿瘤相关黏附分子的特异性结合短肽,用于抑制肿瘤生长、侵袭及转移的研究。肿瘤导向治疗最为重要的步骤是特异性载体的构建与选择。目前,在筛选肺癌、胃癌、肝癌、结肠癌、前列腺癌等肿瘤靶向短肽的研究中,已取得一定的成果。

**2.1 肺癌靶向短肽的筛选** 目前,肺癌靶向短肽的筛选靶标主要为肺癌细胞和肺癌高表达的蛋白。He等<sup>[3]</sup>利用噬菌体肽

库技术筛选出了能与肺癌H460细胞株特异性结合的环七肽(CSNIDARAC),实验证明此肽能在肺部肿瘤组织中集聚而在正常组织中量少,故有望用于肺癌的显像与治疗;潘雪刁等<sup>[4]</sup>从随机噬菌体肽库中筛选到了能与人类肺癌NCI-H1299细胞高亲和力结合的多肽ZS-5,但此肽在活体中的功能有待进一步鉴定。此外,冯文彬等<sup>[5]</sup>利用噬菌体肽库技术发现了17个与肺癌相关的肿瘤基因,为肺癌的早期诊断提供了一定的依据。利用噬菌体肽库技术能筛选出阻断肿瘤发生的信号通路的短肽。据报道,非小细胞肺癌患者的不良预后与神经菌毛素1(NRP1)有关。据此,Hong等<sup>[6]</sup>从噬菌体肽库中筛选的多肽DG1和DG2能阻抑NRP1的表达,进而有望改善非小细胞肺癌患者的不良预后。

**2.2 胃癌靶向短肽的筛选** 腹膜转移是胃癌患者最主要的死因之一,阻断胃癌细胞的腹膜转移将极大地提高患者生存率。Bai等<sup>[7]</sup>筛选的多肽SMSIASPYIALE能够特异性地靶向胃癌腹膜转移的组织,并且可以明显抑制荷瘤鼠体内胃癌GC9811-P细胞的黏附、浸润及腹膜转移。Zhang等<sup>[8]</sup>用噬菌体随机十二肽库对健康者胃黏膜上皮细胞株GES-1和胃腺癌细胞株BGC823进行减性轮选,获得了与胃癌特异性结合的多肽AADNAKTKSFPV(AAD),它能区分胃癌与正常的胃黏膜,并且有作为胃癌早期诊断探针的潜力。此外,多耐药性仍然是临床药物治疗胃癌的重要挑战。据此,Kang等<sup>[9]</sup>筛选出了能与胃癌多耐药性细胞特异性结合的短肽GMBP1(ETAPLSTML-SPY),通过体外和体内药物敏感性测定法、流式细胞仪分析和蛋白免疫印迹法实验表明多肽GMBP1辨认出了一种新型葡萄糖调节蛋白78(GRP78)受体介导的多耐药性表型,进而对于胃癌细胞多耐药性的研究及了解胃癌细胞的相关活动提供了新的路径。

**2.3 肝癌靶向短肽的筛选** Zhang等<sup>[10]</sup>从噬菌体随机7肽库中获得了特异性的短肽序列FQHPSFI,经实验表明人工固相法合成的多肽FQHPSFI能与肝癌细胞高亲和力结合。王昆仑等<sup>[11]</sup>采用肝癌患者血清与噬菌体随机12肽库进行轮选,经过3轮的吸附-洗脱-扩增的淘筛过程后,得到的3个特异性的噬菌体克隆有望为肝癌的特异性诊断试剂提供载体,而Zhang等<sup>[12]</sup>用30例早期原发性肝细胞肝癌患者血清进行筛选并得到多肽HC1(RGWCRPLPKGEG),实验表明此模拟肽对早期原发性肝细胞肝癌具有高的诊断效率,有望成为早期原发性肝癌的血清生物标志物。在肝癌靶向短肽的筛选中,研究者不仅进行了噬菌体随机肽库的体外筛选,还创新性地进行了活体动物的体内筛选。Du等<sup>[13]</sup>将噬菌体随机12文库注入人源肝癌BEL7402细胞株的荷瘤裸鼠模型体内进行筛选,最终获得了与肝癌组织高亲和力结合的短肽。但有学者认为,体内筛选办法更适合淘选与肿瘤血管内皮细胞特异性结合的

\* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81271643)。 作者简介:张洋(1986-),医师,硕士,主要从事腹部CT与MRI的研究。

肽段<sup>[14]</sup>。

**2.4 结肠癌靶向短肽的筛选** 肿瘤抗原作为肿瘤的标志物已逐渐受到人们的广泛重视。研究表明肿瘤相关糖蛋白 72 (TAG-72) 高表达于许多类型的肿瘤中。据此, Rusckowski 等<sup>[15]</sup>利用噬菌体随机展示肽库技术淘选出了能与 TAG-72 高亲和力结合的 2 肽段 NLIWCRKEFARCTSDM 和 NPGTCKD-KWIECLLNG, 经实验表明, 它们能特异性地结合到荷瘤鼠的 TAG-72 阳性表达的结肠癌瘤块中。因此, 这 2 条肽段有希望用于结肠癌的影像诊断, 是否适用于其他 TAG-72 阳性表达肿瘤的影像诊断有待进一步探究。细胞黏合素 C 高表达于结肠癌、恶性胶质瘤等大多数实体肿瘤中。Kim 等<sup>[16]</sup>从噬菌体肽库中筛选出与细胞黏合素 C 特异性结合的短肽能减少细胞黏合素 C 介导的细胞增殖与迁移。Hsiung 等<sup>[17]</sup>以结肠腺癌细胞为靶标进行淘选并得到能与之结合的特异性七肽 (VRPMLPQ)。此肽经荧光标记实验检测发现, 它可以与结肠癌细胞结合, 且不能与正常组织细胞结合, 故此肽段有助于结肠癌的早期诊断。

**2.5 前列腺癌靶向短肽的筛选** 前列腺癌细胞的特异性抗原为前列腺癌靶向短肽的筛选提供了路径。Shen 等<sup>[18]</sup>利用噬菌体肽库技术, 以固化的前列腺特异性膜抗原蛋白为靶分子, 从随机十五肽库中筛选到高亲和力的多肽 SHSFSVSGGDH-SPFT 和 GRFLTGGTGRLLRIS, 经细胞荧光显微镜观察这些多肽能靶向人前列腺癌的特异性膜抗原, 获得的多肽有望用于前列腺肿瘤的显像与治疗。成纤维细胞生长因子 8b (FGF8b) 是表达在前列腺癌成纤维细胞生长因子 8 的主要同型, 它与疾病的分期及评分有关。Wang 等<sup>[19]</sup>从噬菌体随机肽库中筛选出与 FGF8b 特异性结合的多肽 P12 (HSQAAPV), 实验表明此肽是 FGF8b 的拮抗剂, 故有治疗前列腺癌的潜力。Fagbohun 等<sup>[20]</sup>以转移性的前列腺癌 PC-3M 细胞株为靶标进行筛选, 最终从噬菌体随机肽库中获得了高亲和力的噬菌体颗粒 EPTHSWAT (展示在噬菌体表面的特定序列)。此特异性的噬菌体颗粒被修饰后能选择性地作用于 PC-3M 细胞并且能表达绿色荧光蛋白基因, 故这种噬菌体颗粒有望用于前列腺癌的治疗基因的靶向传递, 为靶向药物的设计提供了实验依据。

**2.6 其他肿瘤靶向短肽的筛选** 据报道, 酪氨酸蛋白激酶 (c-Met) 的异常表达与大多数种类的肿瘤有关。Zhao 等<sup>[21]</sup>利用噬菌体随机肽库技术淘选到与 c-Met 高亲和力结合的序列为 YLFSVHWPLKA 的多肽 Met-pep1, 实验表明此肽具有抑制人平滑肌肉瘤细胞生长增殖的功能。Sun 等<sup>[22]</sup>筛选的多肽 EDIKPKTSLAFR 经示踪剂跟踪实验后表明此多肽复合物能靶向鼻咽癌组织, 故有望用于鼻咽癌的诊断。此外, 喉癌、宫颈癌、胰腺癌、食管癌、卵巢癌、乳腺癌、膀胱癌、骨肉瘤等靶向短肽的筛选均有文献报道。也有研究者直接以肿瘤干细胞表面标记物为靶标进行淘选<sup>[23]</sup>, 总之, 噬菌体肽库技术已广泛地应用于肿瘤靶向肽的筛选。

**2.7 肿瘤血管靶向肽的筛选** 肿瘤血管内皮细胞与其他器官或组织的血管内皮细胞所处的微环境有差异, 这种差异为噬菌体随机多肽在体内的特异性选择提供了条件。此外, 针对肿瘤血管内皮细胞表达而正常血管内皮细胞不表达的受体, 亦有望找到肿瘤导向治疗的靶点。Kelly 等<sup>[24]</sup>以血管内皮细胞黏附分子-1 (VCAM-1) 蛋白为靶分子, 利用噬菌体展示肽库技术淘选出能与 VCAM-1 特异性结合的多肽 (VHSPNKK)。实验发现, 此肽与纳米颗粒耦联的复合物能与表达 VCAM-1 的肿瘤血管内皮细胞高亲和力结合; 而无此多肽序列的复合物则对肿瘤血管细胞没有亲和力。Qin 等<sup>[25]</sup>根据人血管内皮生长因子

受体 3 (VEGFR-3) 高表达于大多数肿瘤, 从噬菌体随机肽库中筛选到能与表达 VEGFR-3 的肿瘤特异性结合的短肽 CSD-SWAYWC, 此肽有望成为肿瘤导向治疗的载体。此外, Zanuy 等<sup>[26]</sup>筛选的五肽 CREKA 亦能与肿瘤血管特异性结合。由于从噬菌体肽库中获得的特异性短肽能靶向肿瘤血管内皮细胞, 进而导向肿瘤, 故将其与显像剂、药物等耦联起来, 既可以早期地诊断肿瘤, 又可以在显著抑制肿瘤生长的同时, 高效地减少传统化疗药的不良反应。目前, 能与高表达于肿瘤新生血管的整合素  $\alpha v \beta 3$  特异性结合的西仑吉肽在治疗胶质瘤的应用中已完成了 III 期临床试验, 但试验以失败告终。通过筛选肿瘤血管特异性结合肽来靶向治疗肿瘤的路径虽好, 但仍面临免疫原性、肿瘤细胞异质性、患者间的差异性问题。

### 3 结 语

通过噬菌体肽库技术获得的多肽被修饰后可作为药物运输的载体、成像的探针或兼两者为一体的多功能的纳米颗粒, 这种纳米颗粒具有更强的肿瘤穿透能力, 更高负荷的药物运载能力, 更多的成像信息及较低的毒性<sup>[27-28]</sup>。用噬菌体肽库技术获得的靶向载体虽优点繁多, 但要使得从肽库中获得的短肽正式应用于临床还要克服很多困难。该技术今后要解决的问题主要有以下几方面: (1) 尽量增加肽库的多样性; (2) 尽量降低多肽的免疫原性; (3) 尽量提高噬菌体的转染率; (4) 进一步提高展示多肽的靶向性; (5) 如何在筛选过程中尽量减少对靶分子或靶细胞的天然构象的影响。该技术在肿瘤方面的应用目前还主要处在实验研究阶段, 故获得能用于临床的高效的肿瘤靶向短肽任重道远。随着噬菌体展示肽库技术的发展和完善, 其在肿瘤靶向载体的研究领域必将会带来更大的推动作用。

### 参考文献

- [1] Fukuda MN. Peptide-displaying phage technology in glycobiology[J]. *Glycobiology*, 2012, 22(3): 318-325.
- [2] Lauven RH, Krumpe, Mori T. The use of phage-displayed peptide libraries to develop tumor-targeting drugs[J]. *Int J Pept Res Ther*, 2006, 12(1): 79-91.
- [3] He XF, Na MH, Kim JS, et al. A novel peptide probe for imaging and targeted delivery of liposomal doxorubicin to lung tumor[J]. *Mol Pharm*, 2011, 8(2): 430-438.
- [4] 潘雪刁, 何冰, 王桂香, 等. 肺癌特异性结合多肽的体外筛选和鉴定[J]. *中国药理学通报*, 2013, 29(3): 342-346.
- [5] 冯文彬, 潘雪刁, 周捷, 等. 利用肺癌特异性结合多肽 ZS-6 筛选肺癌相关标志物[J]. *中国药理学通报*, 2010, 26(1): 44-47.
- [6] Hong TM, Chen YL, Wu YY, et al. Targeting neuropilin 1 as an antitumor strategy in lung cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(16): 4759-4768.
- [7] Bai F, Liang J, Wang J, et al. Inhibitory effects of a specific phage displayed peptide on high peritoneal metastasis of gastric cancer[J]. *J Mol Med*, 2007, 85(2): 169-180.
- [8] Zhang WJ, Sui YX, Budha A, et al. Affinity peptide developed by phage display selection for targeting gastric cancer[J]. *World J Gastroenterol*, 2012, 18(17): 2053-2060.
- [9] Kang J, Zhao G, Lin T, et al. A peptide derived from phage display library exhibits anti-tumor activity by targeting GRP78 in gastric cancer multidrug resistance cells [J]. *Cancer Lett*, 2013, 339(2): 247-259.

- [10] 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.
- [11] 王昆仑, 贺海平. 噬菌体随机 12 肽库筛选肝癌患者血清肿瘤标记物的初步研究[J]. *现代肿瘤医学*, 2010, 18(6):1075-1076.
- [12] Zhang Z, Xu L, Wang Z. Screening serum biomarkers for early primary hepatocellular carcinoma using a phage display technique[J]. *J Clin Lab Anal*, 2011, 25(6):402-408.
- [13] Du B, Yu J, Zhou ZL, et al. Selection of the peptides specifically binding to hepatoma by using phage display in vivo[J]. *Zhong Hua Zhong Liu Za Zhi*, 2005, 27(11):645-647.
- [14] Li XB, Schluesener HJ, Xu SO, et al. Molecular addresses of tumors; selection by in vivo phage display[J]. *Arch Immunol Ther Exp*, 2006, 54(3):177-181.
- [15] Rusckowski M, Gupta S, Liu G, et al. Evidence of specificity of radiolabeled phage display peptides for the TAG-72 antigen[J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2007, 22(4):564-572.
- [16] Kim MY, Kim OR, Choi YS, et al. Selection and characterization of tenascin C targeting peptide[J]. *Mol Cells*, 2012, 33(1):71-77.
- [17] Hsiung PL, Hardy J, Friedland S, et al. Detection of colonic dysplasia in vivo using a targeted heptapeptide and confocal microendoscopy[J]. *Nat Med*, 2008, 14(4):454-458.
- [18] Shen D, Xie F, Edwards WB. Evaluation of phage display discovered peptides as ligands for prostate-specific membrane antigen (PSMA) [J]. *PLoS One*, 2013, 8(7):1-8.
- [19] Wang W, Chen X, Li T, et al. Screening a phage display library for a novel FGF8b-binding peptide with anti-tumor effect on prostate cancer[J]. *Exp Cell Res*, 2013, 319(8):1156-1164.
- [20] Fagbohun OA, Kazmierczak RA, Petrenko VA, et al. Metastatic prostate cancer cell-specific phage-like particles as a targeted gene-delivery system[J]. *J Nanobiotechnology*, 2013, 11:31.
- [21] Zhao P, Grabinski T, Gao C, et al. Identification of amebinding peptide from a phage display library[J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(20):6049-6055.
- [22] Sun L, Chu T, Wang Y, et al. Radiolabeling and biodistribution of a nasopharyngeal carcinoma-targeting peptide identified by in vivo phage display[J]. *Acta Biochim Biophys Sin(Shanghai)*, 2007, 39(8):624-632.
- [23] 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.
- [24] Kelly KA, Allport JR, Tsourkas A, et al. Detection of vascular adhesion molecule-1 expression using a novel multimodal nanoparticle[J]. *Circ Res*, 2005, 96(3):327-336.
- [25] Qin X, Wan Y, Li M, et al. Identification of a novel peptide ligand of human vascular endothelial growth factor receptor 3 for targeted tumor diagnosis and therapy[J]. *J Biochem*, 2007, 142:79-85.
- [26] Zanuy D, Flores-Ortega A, Casanovas J, et al. Energy landscape of a selective tumor-homing pentapeptide[J]. *J Phys Chem B*, 2008, 112(29):8692-8700.
- [27] Banerjee D, Harfouche R, Sengupta S. Nanotechnology-mediated targeting of tumor angiogenesis[J]. *Vasc Cell*, 2011, 3(1):3.
- [28] Namiki Y, Fuchigami T, Tada N, et al. Nanomedicine for cancer: lipid-based nanostructures for drug delivery and monitoring[J]. *Acc Chem Res*, 2011, 44(10):1080-1093.

(收稿日期:2014-10-28 修回日期:2014-12-06)

• 综述 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.08.042

## 偏头痛与神经源性炎症的研究进展\*

董兰真, 蒲圣雄 综述, 周冀英<sup>△</sup> 审校

(重庆医科大学第一附属医院神经内科 400016)

[关键词] 偏头痛; 炎症; 物质 P; 降钙素基因相关肽

[中图分类号] R747.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)08-1126-03

偏头痛是临床上常见的一种原发性头痛。据统计,全球偏头痛发病率约为 11%,其中,男女发病率比例约为 1:3。最新的流行病学调查显示,中国偏头痛患病率约为 9.3%。偏头痛具有很高的致残率,2001 年 WHO 把偏头痛列为全球成年男女致残疾病的第 19 位,及成年女性致残疾病第 12 位。偏头痛的发病机制目前尚不十分清楚。神经源性炎症学说认为当三叉神经节及其纤维受刺激后,可引起神经肽类物质释放增加。这些活性物质作用于邻近脑血管壁,引起神经源性炎症包括血

浆蛋白外渗(PPE)、神经源性血管扩张(NV)和肥大细胞脱颗粒,从而参与头痛的形成。

### 1 PPE

Markowitz 通过使用<sup>125</sup>I 牛血清蛋白,发现电刺激单侧三叉神经节后,同侧的硬脑膜而不是大脑组织形成 PPE。随后的实验发现电刺激三叉神经节还能引起硬脑膜毛细血管后微静脉内皮细胞肥大、微绒毛形成、血小板聚集和肥大细胞脱颗粒<sup>[1]</sup>。物质 P 是形成 PPE 最主要的介质,而物质 P 和降钙素