

可活化细胞穿膜肽的设计与酶解研究

王鹏程, 齐宪荣*

(北京大学药学院药剂学研究室, 北京 100191)

摘要: 本文设计可活化细胞穿膜肽 (activatable cell-penetrating peptide, ACPP), 对合成的 ACPP 进行酶解研究。ACPP 由 3 部分连接而成, 寡聚阴离子序列肽-基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) 的底物肽-寡聚阳离子序列肽。采用反相高效液相色谱 (reversed-phase high performance liquid chromatography, RP-HPLC) 监测 37 °C 条件下 IV 型胶原酶 (含 MMP-2 和 MMP-9) 对 ACPP 的酶解过程。收集酶解成分进行基质辅助激光解析电离飞行时间质谱 (matrix assisted laser desorption ionization orthogonal time of flight mass spectrometry, MALDIO-TOF-MS) 检测, 比对推测酶解碎片的序列。结果表明, ACPP 可被 IV 型胶原酶裂解, 释放出寡聚阳离子序列肽, 即细胞穿膜肽 (cell-penetrating peptide, CPP), ACPP 裂解一半的时间约为 4 h。酶解发生于目标位点, 但不排除 ACPP 裂解后肽段的再次断裂。

关键词: 细胞穿膜肽; 酶解; 基质金属蛋白酶; 反相高效液相色谱; 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱
中图分类号: R943 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870 (2010) 08-1048-04

The design and enzymatic hydrolysis of activatable cell-penetrating peptide

WANG Peng-cheng, QI Xian-rong*

(School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100191, China)

Abstract: The paper is aimed to study the enzymatic hydrolysis of the activatable cell-penetrating peptide (ACPP) that was designed and synthesized. The ACPP was composed of three parts, polyanionic sequence peptide, peptide sequence that specifically cleaved by matrix metalloproteinase (MMP) and cell penetrating peptide (CPP). The ACPP was hydrolyzed by type IV collagenase (MMP-2/9) under the condition of 37 °C and was monitored by reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC). The efflux of peak was collected and detected by matrix assisted laser desorption ionization orthogonal time of flight mass spectrometry (MALDIO-TOF-MS) to speculate the sequences of the peptide fragments. The results indicated that the ACPP could be cleaved by type IV collagenase at target site as predicted, released CPP. The half life of the cleavage was about 4 h. Meanwhile, the peptide fragments may be cleaved again at other sites by type IV collagenase.

Key words: cell-penetrating peptide; enzymatic hydrolysis; matrix metalloproteinase; reversed-phase high performance liquid chromatography; matrix assisted laser desorption ionization orthogonal time of flight mass spectrometry

在研究中发现越来越多的肽类、蛋白质及核酸类等生物活性物质具有很好的药理作用。绝大多数的生物大分子因其分子的大小、所带电荷、极性以及细胞膜的屏障作用不能通过被动扩散穿透生物膜, 细胞对于这类分子的摄取非常少。因此, 缺乏穿透细胞膜并到达细胞内靶点的能力是肽类、蛋白质及核酸类药物发展和使用的一个严重的障碍^[1]。

将难进入细胞的生物活性分子与细胞穿膜肽(CPP)通过化学连接或物理集合的形式, 以非侵袭性的方式穿透细胞膜, 克服细胞对亲水性生物活性物质摄取太少的难题, 是目前药物运输系统的重要研究方向^[1-4]。这种由多肽介导的生物活性分子的运输, 具有效率高、毒性低, 而且多肽主链具有可修饰性, 在很多方面都优于传统的方法。然而, CPP缺乏组织和细胞的特异性^[3], 作为药物载体的应用过于复杂和难于控制, 存在靶细胞摄取效率低及体内吸收、分布、生物利用度和毒性等方面问题, 严重限制了其作为药物运输工具的应用。针对这个难题, 可活化的细胞穿膜肽(activatable CPP, ACPP)应运而生^[5]。利用ACPP选择性地生物大分子运送到癌细胞是一种全新的药物运输思路。

基质金属蛋白酶家族中的MMP-2和/或MMP-9已被证实在多种恶性肿瘤中高表达, 包括胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、结肠癌、直肠癌、膀胱癌和前列腺癌等, 但在正常组织中表达微弱。MMP-2和MMP-9的表达与肿瘤细胞的转移潜力相关。在侵袭性肿瘤细胞中MMP-2和MMP-9的表达水平较高, 能降解IV型胶原(血管基底膜的主要成分、转移的主要生理屏障), 与肿瘤的血管发生、肿瘤生长和转移相关^[6, 7]。

基于以上考虑, 本研究设计了以MMP-2和MMP-9为靶酶的ACPP, 采用RP-HPLC和MALDI-TOF-MS, 研究了ACPP的酶解反应行为并对酶解产物的多肽片段进行序列推测, 判断酶解位点。

材料与方 法

材料与仪器 乙腈(色谱纯, 天津西华特种试剂厂)、IV型胶原酶(Sigma, USA)。高效液相色谱仪(Agilent 1100 Series, USA)、Diamondsil C18色谱柱(250.0 mm × 4.6 mm, 5 μm)、MALDI-TOF质谱仪(Waters MALDI Micro MX, USA)。

ACPP的设计与合成 ACPP的序列由3部分组成, 如图1所示的A段、B段和C段, 序列为

E-E-E-E-E-X-P-L-G-L-A-G-R-R-R-R-R-X-K-C, 分子式 $C_{106}H_{188}O_{32}N_{40}S$, 相对分子质量为2566.94。

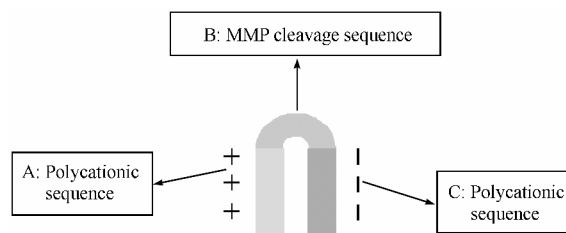


Figure 1 The schematic diagram of activatable cell-penetrating peptide (ACPP)

A段序列R-R-R-R-R-X-K-C为ACPP的活性中心(CPP区), 5个精氨酸组成的序列带正电荷, 具有细胞膜穿透功能^[1]。B段序列P-L-G-L-A-G为MMP-2和MMP-9的识别位点, 并可被IV型胶原酶(主要为MMP-2和MMP-9)特异性断裂^[4-10]。C段序列E-E-E-E-E-X带负电荷, C段的功能为通过中和A段的正电荷来封闭A段的细胞膜穿透活性。

带负电荷的C段序列屏蔽了A段序列的正电荷, 由寡聚精氨酸构成的CPP的活性被具有负电荷的氨基酸构成的抑制性多肽区掩盖, 暂时失去细胞膜穿透功能, 当带正电的寡聚阳离子区和带负电的寡聚阴离子区之间的连接区域(P-L-G-L-A-G)被蛋白酶裂解时, 释放出CPP从而发挥功能。这种复合细胞穿膜肽称为可活化细胞穿膜肽(activatable cell-penetrating peptide, ACPP)。

ACPP被上海科肽生物科技有限公司合成。采用常规Fmoc固相合成法逐步连接单氨基酸直到形成目标序列, 用茚三酮法验证每一步氨基酸缩合与脱保护的正确性。粗肽经RP-HPLC纯化。MALDI-TOF-MS检测验证合成多肽分子量的正确性, 以确保一级结构序列正确。

酶解反应分析 将ACPP粉末0.5 mg溶于蒸馏水500 μL中, 得到质量浓度为1.00 mg·mL⁻¹的ACPP储备液。用蒸馏水将储备液分别稀释为0.571、0.612、0.714、0.833和1.00 mg·mL⁻¹的ACPP水溶液。ACPP储备液与IV型胶原酶储备液混合, 二者终浓度分别为0.571和2.2 mg·mL⁻¹(浓度比为0.26), 在37℃水浴条件下进行酶解反应。在反应过程对酶解体系取样, 进行HPLC分析。流动相: A-水(0.1% TFA); B-乙腈(0.1% TFA); 程序: 在0~40 min内B由5%至70%; 流速: 1 mL·min⁻¹; 紫外检测参数: 214 nm; 进

样量: 20 μL 。收集 HPLC 分离的成分, 冻干, 进行 MALDI-TOF-MS 检测^[11]。解析 HPLC 分离组分的 MALDI-TOF-MS 结果。采用人工比对的方法对 ACPP 的酶解产物多肽片段进行序列推测^[12, 13]。

结果与讨论

1 ACPP 的合成与验证

ACPP 合成后, 采用 MALDI-TOF-MS 检测验证合成多肽分子量的正确性, 结果如图 2。 m/z 实验值为 2 566.49 (2 567.49 为 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 峰) 与理论值 2 566.94 相符, 说明合成的多肽正确。经 HPLC 检测 ACPP 纯度 >99%。

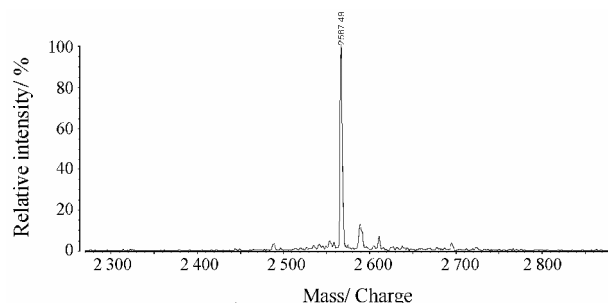


Figure 2 MALDI-TOF-MS of activatable cell-penetrating peptide

2 酶解反应

HPLC 检测 ACPP 的峰位和酶解反应后的图谱变化情况, 不同浓度的 ACPP 溶液都在 14.8 min 左右处有吸收峰 (图 3A)。峰高和峰面积随 ACPP 溶液浓度的升高而增大, 峰面积与 ACPP 浓度呈线性关系 (图 4), MALDI-TOF-MS 检测相对分子质量为 2 567.24 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。可以确定 14.8 min 的峰即为 HPLC 实验条件下 ACPP 的特征吸收峰。随着酶解时间的延长, 出现降解产物的峰 (图 3B), ACPP 的峰面积逐渐减少 (图 5)。37 $^{\circ}\text{C}$ 时, ACPP 降解一半的时间 ($T_{1/2}$) 约为 4 h。

分别收集 T_R 为 7.9, 12.3 和 15.1 min 的 3 个峰, 冻干, 进行 MALDI-TOF-MS 检测。通过 MALDI-TOF-MS 解析及序列推测, 在 T_R 为 7.9 min 的峰中有序列为 G-R-R-R-R-R 多肽片段的 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 峰 (m/z 理论值为 1 012.27, 实验值为 1 012.54); G-R-R-R-R-R 多肽片段的 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 峰 (m/z 理论值为 856.07, 实验值为 856.49)。在 T_R 为 12.3 min 的峰中有序列为 P-L-G-L-A-G-R-R-R-R 的多肽片段的 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 峰 (m/z 理论

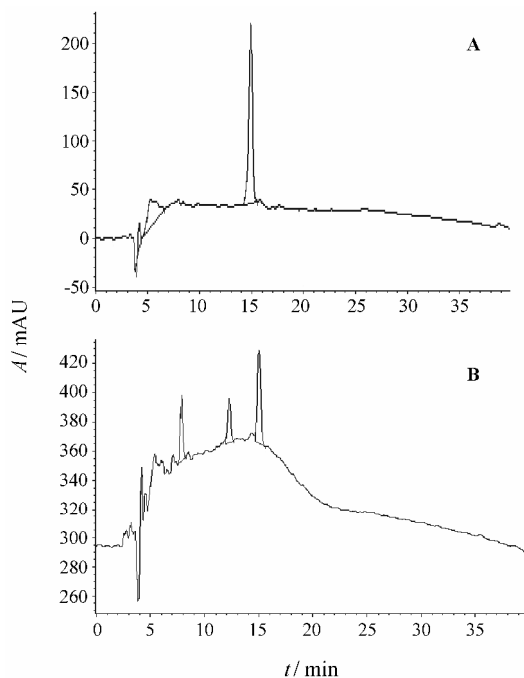


Figure 3 HPLC chromatograms (A, the peak of ACPP; B, the cleavage peaks of the reaction system which reacted at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 23 h. The retain times (T_R) of cleavage peaks were about 7.9 min, 12.3 min)

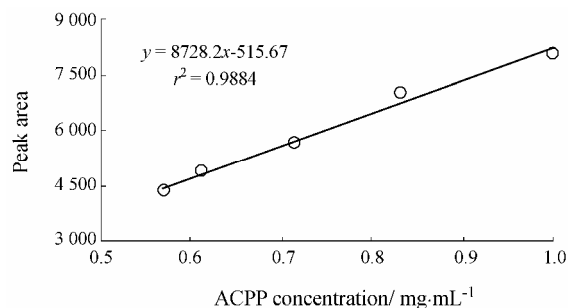


Figure 4 The relationship between ACPP concentration and the peak area

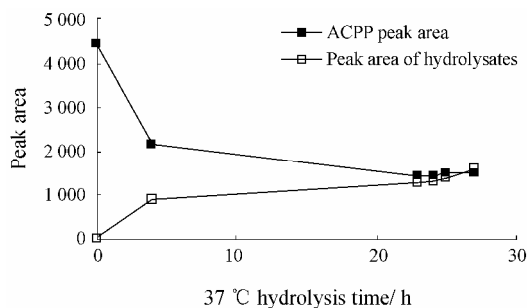


Figure 5 Time-course of peak areas of ACPP and cleaved peptides

值为 1 151.50, 实验值为 1 150.67); E-E-E-E-E-X-P 多肽片段的 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 和 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 峰 (m/z 理论值为 873.98, 实验值为 873.49); E-E-E-E-E-X-P-L 多肽片

段的[M+K]⁺峰 (m/z 理论值为 987.15, 实验值为 986.55); E-E-E-E-X-P-L-G-L-A 多肽片段的[M+K]⁺峰 (m/z 理论值为 1 099.35, 实验值为 1 099.69)。在 T_R 为 15.1 min 的峰中有序列为 E-E-E-E-E-X-P-L-G 多肽片段的[M+Na]⁺峰 (m/z 理论值为 1 044.22, 实验值为 1 043.6)。

IV 型胶原酶的主要成分为 MMP-2 和 MMP-9^[7-11], 有文献报道可以特异性断裂 P-L-G-L-A-G 序列^[8-10] 或其类似序列^[8-11]。IV 型胶原酶有效地裂解了 ACP, 酶解成分中含寡聚精氨酸序列可以发挥 CPP 的细胞穿透功能 (内容另行发表)。该酶解反应除了目标位点的裂解外, 其他位点的裂解片段同时存在, 不排除是最初酶解多肽片段再断裂的结果; IV 型胶原酶成分的多样性也是造成分解位点较多的原因之一; 另外 ACP 降解一半的时间 ($T_{1/2}$) 约为 4 h, 进行酶解产物分析是反应体系进行 23 h 后收集的分解产物峰, 反应时间过长也是造成分解位点较多的另一原因, 但只要 B 段序列断裂, 释放出 CPP (A 段), 即可发挥 CPP 的细胞穿透功能。

References

- [1] Gonçualves E, Kitas E, Seelig J. Binding of oligoarginine to membrane lipids and heparan sulfate: structural and thermodynamic characterization of a cell-penetrating peptide [J]. *Biochemistry*, 2005, 44: 2692-2702.
- [2] Zorko M, Langel Ü. Cell-penetrating peptides: mechanism and kinetics of cargo delivery [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2005, 57: 529-545.
- [3] Järver P, Langel Ü. Cell-penetrating peptides - a brief introduction [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1758: 260-263.
- [4] Ren J, Qin CG, Xu CL, et al. Development of cell-penetrating peptides as vectors for drug delivery [J]. *Acta Pharm Sin (药*
学学报), 2010, 45: 17-25.
- [5] Jiang T, Olson ES, Nguyen QT, et al. Tumor imaging by means of proteolytic activation of cell-penetrating peptides [J]. *PNAS*, 2004, 101: 17867-17872.
- [6] Van der Jagt M, Sweep F, Waas E, et al. Correlation of reversion-inducing cysteine-rich protein with kazal motifs (RECK) and extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN), with MMP-2, MMP-9, and survival in colorectal cancer [J]. *Cancer Lett*, 2006, 237: 289-297.
- [7] Turpeenniemi-Hujanen T. Gelatinases (MMP-2 and -9) and their natural inhibitors as prognostic indicators in solid cancers [J]. *Biochimie*, 2005, 87: 287-297.
- [8] Netzel-Arnett S, Sang QX, Moore WG, et al. Comparative sequence specificities of human 72- and 92-kDa gelatinases (type IV collagenases) and PUMP (matrilysin) [J]. *Biochemistry* 1993, 32: 6427-6432.
- [9] Seltzer JL, Akers KT, Weingarten H, et al. Cleavage specificity of human skin type IV collagenase (gelatinase) [J]. *J Biol Chem*, 1990, 265: 20409-20413.
- [10] Knight CG, Willenbrock F, Murphy G. A novel coumarin-labelled peptide for sensitive continuous assays of the matrix metalloproteinases [J]. *FEBS*, 1992, 296: 263-266.
- [11] Lee GY, Park K, Kim SY, et al. MMPs-specific PEGylated peptide - DOX conjugate micelles that can contain free doxorubicin [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2007, 67: 646-654.
- [12] Sun ZY, Wu S, Wang SQ, et al. Application of liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry in protein sequencing [J]. *Basic Med Sci Clin (基础医学与临床)*, 2003, 23: 126-130.
- [13] Wang XC, Fan CM, Tang XK, et al. Chromatography/nass spectrometric analysis of BSA digest and comparison of protein identification through database search with three different methods [J]. *Chin J Biochem Mol Biol (中国生物化学与分子生物学报)*, 2004, 20: 393-398.