

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.09.002

· 基础研究 ·

RGD 修饰的肿瘤抑素 19 肽的合成与鉴定及其对肝癌 SK-Hep-1 细胞增殖、迁移和侵袭的抑制作用

王顺^{1a,2}, 于佳琪^{1d}, 胡月^{1b}, 赵正林^{1a}, 牛淑冬^{1c}, 贾迪^{1a}, 杨超^{1a}, 衣同辉^{1d}, 李淑艳^{1a} (1. 齐齐哈尔医学院 a. 生物化学教研室; b. 附属第三医院肿瘤内科; c. 生理学教研室; d. 卫生检验中心, 黑龙江齐齐哈尔 161006; 2. 龙泉市人民医院检验科, 浙江龙泉 323700)

[摘要] **目的:** 探讨精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)修饰对肿瘤抑素 19 肽(T-19)抗肝癌活性的影响, 比较分析 T-19 及 RGD 修饰的 T-19(RGD-T-19)对肝癌 SK-Hep-1 细胞增殖、侵袭和迁移能力的影响。**方法:** 用 Fmoc 固相法合成 T-19 及 RGD-T-19, 用高效液相色谱仪和质谱进行分离、鉴定。常规培养 SK-Hep-1 细胞, 用 0、50、100、150、200、250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 T-19 及 RGD-T-19 分别处理细胞, 分为 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (对照)组、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组、150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组、250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组。CCK-8 法、克隆形成实验、划痕愈合实验和 Transwell 小室实验、WB 法和 qPCR 法分别检测 SK-Hep-1 细胞的增殖、迁移、侵袭能力, 以及环氧合酶-2(COX-2)、基质金属蛋白酶-2(MMP-2)、MMP-9、组织基质金属蛋白酶抑制剂-1(TIMP-1)、TIMP-2 蛋白和 MMP-1、MMP-2 mRNA 的表达。**结果:** 经质谱鉴定, 用 Fmoc 固相法合成的 T-19 及 RGD-T-19 纯度高。T-19 和 RGD-T-19 均能显著抑制 SK-Hep-1 细胞的增殖、迁移、侵袭能力, 抑制 COX-2 蛋白、MMP-2 和 MMP-9 蛋白及 mRNA 的表达、促进 TIMP-1、TIMP-2 蛋白的表达 ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$), RGD-T-19 的抑制或促进效应均明显强于 T-19 (均 $P < 0.05$)。**结论:** 利用 Fmoc 固相法合成了纯度高、活性好的 T-19 及 RGD-T-19, 两种肽均能抑制 SK-Hep-1 细胞增殖、侵袭和迁移能力, RGD-T-19 作用明显强于 T-19。

[关键词] 肿瘤抑素; RGD 序列; 肝癌; SK-Hep-1 细胞; 增殖; 侵袭; 迁移; 肝癌

[中图分类号] R735.7; R730.5; R979.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2024)09-0849-08

Synthesis and identification of RGD-modified tumstatin peptide 19 and its inhibitory effect on proliferation, migration, and invasion of liver cancer SK-Hep-1 cells

WANG Shun^{1a,2}, YU Jiaqi^{1b}, HU Yue^{1a}, ZHAO Zhenglin^{1a}, NIU Shudong^{1c}, JIA Di^{1a}, YANG Chao^{1a}, YI Tonghui^{1d}, LI Shuyan^{1a} (1. a. Department of Biochemistry; b. Department of Medical Oncology of the Third Affiliated Hospital; c. Department of Physiology; d. Health Inspection Center, Qiqihar Medical University, Qiqihar 161006, Heilongjiang, China; 2. Clinical Laboratory of Longquan People's Hospital, Longquan 323700, Zhejiang, China)

[Abstract] **Objective:** To analyze the effects of arginine-glycine-aspartic acid (RGD) modification on anti-hepatocarcinoma activity of tumstatin peptide 19 (T-19) and to comparatively analyze the effects of tumor suppressor peptide 19 (T-19) and RGD modified-T-19 (RGD-T-19) on the proliferation, invasion, migration of on liver cancer SK-Hep-1 cells. **Methods:** T-19 and RGD-T-19 were synthesized by Fmoc solid-phase method and separated and identified using high-performance liquid chromatography and mass spectrometry. SK-Hep-1 cells were routinely cultured and treated with 0, 50, 100, 150, 200, and 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of T-19 and RGD-T-19, respectively. The cells were divided into control group (0 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ group, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ group, 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ group, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ group, and 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ group. CCK-8 assay and clone formation test were used to detect the effects of T-19 and RGD-T-19 on the viability and proliferation of SK-hep-1 cells. The invasion and migration of SK-Hep-1 cells were observed by scratch and Transwell test. The mRNA expression of cellular matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 was detected by qPCR. The protein expression of COX-2, MMP-2, MMP-9, TIMP-1, and TIMP-2 was detected by Western blot. **Results:** The synthesized T-19 and RGD-T-19 were identified to be of high purity by mass spectroscopy. Both T-19 and RGD-T-19 significantly inhibited the proliferation, migration, and invasion abilities of SK-Hep-1 cells, suppressed the protein expression of COX-2 and both the mRNA and protein expression of MMP-2, and MMP-9, but promoted the protein expression of TIMP-1 and TIMP-2 ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$). Notably, the inhibitory or promoting effects of RGD-T-19 were significantly stronger than those of T-19 ($P < 0.05$). **Conclusion:** T-19 and RGD-T-19 synthesized

[基金项目] 齐齐哈尔市科学技术局面上研究项目(No.LSFSGG-2023030)

[作者简介] 王顺(1981—),男,硕士,副主任技师,主要从事小分子肽抗肿瘤机制的研究。E-mail:1941183880@qq.com

[通信作者] 衣同辉, E-mail:371298276@qq.com; 李淑艳, E-mail:lsy6910553@163.com

by Fmoc solid-phase method were highly pure and eligible. Both T-19 and RGD-T-19 can inhibit the proliferation, invasion, and migration of SK-Hep-1 cells, with better effects of RGD-T-19 than T-19.

[Key words] tumstatin; RGD sequence; liver cancer; SK-Hep-1 cell; proliferation; invasion; migration

[Chin J Cancer Biother, 2024, 31(9): 849-856. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.09.002]

据世界卫生组织(WHO)统计,肝细胞癌的发病率和病死率分别位居恶性肿瘤的第6位和第3位^[1-2],治疗方式包括手术治疗、放疗、化疗和生物治疗等^[3]。手术切除是肝癌治疗的重要手段,但因肝癌的临床表现隐匿,大约70%的患者在就诊时已处于中晚期不能进行手术治疗,同时手术治疗还存在术后易转移和复发的风险。放疗和化疗存在着特异性差和不良反应多等问题。目前,研发具有高效低毒、广谱性和高选择性的肿瘤抑制肽成为肿瘤生物治疗的新热点^[4-6],其中针对肿瘤细胞的特异性表型分子或特异性细胞受体,设计优化的肿瘤靶向肽,是近年来医学科研领域的重要发现之一。精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(Arg-Gly-Asp, RGD)是1997年通过噬菌体筛选技术分离获得的第一个肿瘤靶向肽,自分离以来, RGD修饰成为肿瘤靶向治疗的研究热点^[7]。肿瘤抑素是胶原蛋白IV α 3链非胶原区域的多肽片段,靠近C端的第185~203位氨基酸残基之间的区域称为肿瘤抑素19肽(tumstatin peptide 19, T-19)^[8],通过基因工程技术合成肽虽然具有质量高、疗效强、有天然活性等优点,但同时具有产量低、不易纯化、操作复杂且合成技术受表达限制等缺点。相比于基因工程合成肽, Fmoc固相法具有合成方便、快速、容易实现自动化和实验条件要求不高、技术趋于成熟等优点,成为许多实验室进行常规多肽固相合成的首选方法^[9]。本研究利用Fmoc固相法合成T-19并进行C端RGD修饰,制备了T-19和RGD-T-19两种肽;同时采用常见的N端乙酰化(acetylation, Ac)和C端酰胺化(amidation, amide)合成方式,使合成肽更接近于天然蛋白模拟物,提高了靶向性和稳定性。课题组前期研究证明了T-19具有抑制肝癌HepG2细胞增殖的作用^[10],本研究选择肝癌SK-Hep-1细胞为实验材料,分析比较RGD修饰后T-19对SK-Hep-1细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响及机制,为肝癌的临床治疗提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 细胞及主要试剂

人肝癌细胞SK-Hep-1购自中国医学科学院基础医学研究所基础医学细胞中心,用含10%胎牛血清DMEM-H培养液在37℃、5% CO₂培养箱中常规培养。

茚三酮购自上海麦克林生化科技股份有限公司,

乙腈购自迪马科技公司,异丙醇和乙醚购自天津市科密欧化学试剂有限公司,芴甲氧羰基-L-丙氨酸-L-丙氨酸(fluroenylmethyloxycarbonyl -L- alanyl -L- alanine, Fmoc-AA)购自吉尔生化(上海)有限公司, Rink amide MBHA树脂购自天津南开合成科技有限公司, N,N-二甲基甲酰胺(N,N-dimethylformamide, DMF)购自天津天泰精细化学品有限公司, 1-羟基苯并三唑(1-hydroxybenzotriazole, HOBT)、O-苯并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸酯(O-benzotriazole-tetramethyluronium hexafluorophosphate, HBTU)均购自上海阿拉丁试剂有限公司, N,N-二异丙基乙胺(N,N-diisopropylethylamine, DIEA)购自上海麦克林生化科技股份有限公司, 苯酚、吡啶、哌啶、三异丙基硅烷(triisopropylsilane, TIS)均购自北京化工厂, 二氯甲烷(dichloromethane, DCM)购自天津市科密欧化学试剂有限公司, 三氟乙酸(trifluoroacetic acid, TFA)购自山东豪顺化工有限公司。胎牛血清、DMEM-H培养基均购自美国Gibco公司, CCK-8检测试剂盒购自北京索莱宝生物科技有限公司, Transwell小室、Matrigel基质胶均购自美国Corning公司, 兔抗 β -actin、COX-2、MMP-2、MMP-9、TIMP-1、TIMP-2抗体均购自美国CST公司, 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG购自北京中杉金桥生物技术有限公司, ECL显色液购自北京博奥森技术有限公司, PCR逆转录试剂盒、PCR荧光定量试剂盒均购自宝生物工程(大连)有限公司, Prime Script™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)试剂盒、TB Green® Premix Ex Taq™ II (Tli RNase H Plus)均购自日本TaKaRa公司, TRIzol试剂购自南京碧云天生物技术有限公司。

1.2 T-19及RGD-T-19的设计、合成与纯化

1.2.1 T-19及RGD-T-19的设计

采用Fmoc固相法合成T-19。以T-19(氨基酸序列:A-S-P-F-L-E-C-H-G-R-G-T-C-N-Y-Y-S-N-S)为母肽,在其C端添加RGD序列获得RGD-T-19,末端序列为Ac和amide,获得肽的分子序列。T-19(Ac-A-S-P-F-L-E-C-H-G-R-G-T-C-N-Y-Y-S-N-S-amide)、RGD-T-19(Ac-A-S-P-F-L-E-C-H-G-R-G-T-C-N-Y-Y-S-N-S-R-G-D-amide)。

1.2.2 多肽合成溶液的配制及合成过程

多肽合成过程中需要的溶液及配制方法见表1。

Fmoc固相法合成T-19及RGD-T-19的过程如下。

①树脂溶胀:称取0.25 g树脂置于含3.0 mL无水DCM的多肽合成管中浸泡过夜,充分溶胀。

②树脂 Fmoc 基脱保护:减压抽滤掉 DCM, 加入 8.0 mL 脱保护液, 室温振荡剪切 30 min, 依次用 DCM、异丙醇、DMF 洗 2~3 次, 每次 2 min。

③氨基酸的活化:称取 250 mg Fmoc-AA, 加入活化试剂 A、B 各 1.6 mL, 加入 0.22 mL DIEA, 室温下活化 10 min。

④氨基酸的偶联:将活化的氨基酸加入合成管, 加入 1.5 mL DMF 和 6 mL DCM, 室温振荡反应 2 h, 具体反应时间视氨基酸数量而定。待反应完毕后, 减压抽滤去除反应溶液, 依次用 DMF、异丙醇、DCM 清洗树脂 2~3 次。

⑤茚三酮检测:取少量树脂于离心管中, 依次加入检测试剂 A、B、C 各 1 滴, 100 °C 加热 5 min。若树脂呈黄色透亮状, 表明反应完全, 可以进行下步操

作;若树脂呈蓝色, 表明反应不完全, 重新活化氨基酸, 连接直至反应完全。

⑥氨基酸 Fmoc 基脱保护:方法同②。

⑦重复③~⑥:完成多肽上所有氨基酸的连接。

⑧乙酰化:最后一个氨基酸连到树脂以后, 脱去 Fmoc 保护, 进行 Ac 反应, 加入 0.5 mL 乙酸酐和 0.8 mL DIEA, 室温振荡反应 20 min, 清洗 3 次, 茚三酮检测合格后, 依次用 DCM、DMF、甲醇清洗树脂 2~3 次, 真空干燥 1 h。

⑨合成肽剪切:向合成管中加入 12.0 mL 剪切液, 振荡 4 h。用冰浴的无水乙醚萃取沉淀, 离心收集, 50% 乙腈 (acetonitrile, ACN) 溶解多肽沉淀, 真空干燥获粗品合成肽。

表 1 多肽合成溶液的配制方法

溶液	配制方法
脱保护溶液	配制含 20% 哌啶的 DMF 保护液 (哌啶:DMF = 1:4 体积比) 100 mL, 混匀
活化试剂 A	0.45 mol/L HBTU 溶液:称取 8.535 g HBTU 溶于 50 mL DMF 溶液中, 混匀
活化试剂 B	0.35 mol/L HOBT 溶液:称取 2.36 g HOBT 溶于 50 mL DMF 溶液中, 混匀
检测试剂 A	称取 5.0 g 茚三酮, 加入 100 mL 无水乙醇溶液中溶解
检测试剂 B	称取 100.0 g 苯酚, 加入 25 mL 无水乙醇并置于 70 °C 水浴锅中溶解
检测试剂 C	量取 98 mL 吡啶, 加入 2 mL 0.001 mol/L 的 KCN 溶液混合均匀
剪切液	TFA:TIS:H ₂ O = 95:5:5 (体积比)

1.2.3 T-19 及 RGD-T-19 的纯化及鉴定

将冷冻干燥得到的 T-19 和 RGD-T-19 多肽粗品粉末用流动相 A 溶解, 用 0.22 μm 孔径的滤膜过滤。通过高效液相色谱仪和 Hypersil C8 柱进行纯化, 流动相 A 为蒸馏水 (含 0.1% TFA)、流动相 B 为 ACN (含 0.1% TFA), 流速为 1.0 mL/min, 保持柱温 25 °C, 收集合并洗脱峰, 冷冻干燥后进行质谱鉴定。

1.3 CCK-8 法和细胞克隆形成实验检测 T-19 和 RGD-T-19 对细胞增殖能力的影响

CCK-8 法检测 SK-Hep-1 细胞增殖活性:取对数生长期细胞, 将其密度调整为 1×10^4 个/mL, 按 100 μL/孔接种于 96 孔板, 培养 24 h。各孔中加入 T-19 及 RGD-T-19 (浓度分别为 0.50、100、150、200、250 μg/mL, 每个浓度设 3 个复孔), 0 μg/mL 为对照。分别培养 24、48 h 后弃去含肽培养基, 每孔加 100 μL 无血清的 DMEM-H 培养基, 10 μL CCK-8 试剂, 继续培养 2 h。用酶标仪测定 450 nm 处各孔的光密度 (D) 值, 以 D 值代表细胞增殖活力, 绘制其生长曲线并计算 IC_{50} 。

细胞克隆形成实验:实验分为 T-19 组和 RGD-T-19 组。取对数生长期的 SK-Hep-1 细胞, 按 5×10^5 个/孔接种于 6 孔板, 每孔加含 10% 胎牛血清 DMEM-H 培养液 2.0 mL, 24 h 后常规处理, 并分别加入 T-19 及

RGD-T-19 (浓度均为 150 μg/mL, 0 μg/mL 为对照), 每组设 3 个复孔。24 h 后, 弃去含肽培养基, 消化、收集细胞各组细胞, 调整细胞密度, 以 1×10^3 个/孔接种于相应的 6 孔板, 其后常规培养细胞, 2 周后分别用无水甲醇固定 10 min, 用 0.5% 结晶紫染色 8 min; 弃染色液, 冲洗后于室温晾干拍照, 用 Image J 软件计算克隆形成数。

1.4 划痕愈合实验检测各组 SK-Hep-1 细胞的迁移能力

取对数生长期的 SK-Hep-1 细胞, 按 6×10^5 个/孔接种于 12 孔板中, 形成单细胞层时, 用 20 μL 无菌移液器吸头做垂直线划痕, PBS 洗涤后, 镜下观察并拍照 (0 h)。然后按 1.3 节 CCK-8 法中的方法处理细胞, 培养 24 h 时观察、拍照。依据公式“迁移率 = (0 h 的划痕面积 - 24 h 的划痕面积) / 0 h 的划痕面积 × 100%”计算细胞迁移率。

1.5 Transwell 实验检测 SK-Hep-1 细胞的侵袭能力

将 50 mg/L Matrigel 基质胶和无血清 DMEM-H 培养液按 1:8 混匀, 取 50 μL 铺于 Transwell 小室的上室, 4 °C 过夜风干。按 1.3 CCK-8 法中的方法处理细胞, 将各组细胞密度调整为 5×10^5 个/mL, 向各小室的上室中加 200 μL 细胞悬液, 在下室中加入 600 μL

含20%胎牛血清的DMEM-H培养液,培养24 h后弃培养液,用棉签擦去上室中的细胞,洗涤,加200 μ L甲醇固定60 min。弃甲醇,加入100 μ L结晶紫染色液处理8 min,晾干,镜下计数并拍照。依据公式“细胞侵袭率=(对照组穿膜细胞数-实验组穿膜细胞数)/对照组穿膜细胞数 \times 100%”计算细胞侵袭率。

1.6 WB法检测各组SK-Hep-1细胞中迁移和侵袭相关蛋白质的表达

常规培养SK-Hep-1细胞24 h,按1.3节CCK-8法中的方法处理细胞,培养24 h后收集并裂解SK-Hep-1细胞,离心10 min收集上清液并检测蛋白含量,按30 μ g/孔进行SDS-PAGE,转膜后用5%脱脂牛奶室温封闭2 h,加入抗 β -actin、COX-2、MMP-2、MMP-9、TIMP-1和TIMP-2抗体稀释液(均为1:1 000),4 $^{\circ}$ C处理过夜,洗膜后加入1:5 000的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗室温处理3.5 h,ECL曝光胶片后用Image J软件进行分析。

1.7 qPCR法检测各组SK-Hep-1细胞中MMP-2、MMP-9 mRNA的表达

用TRIzol试剂提取各组SK-Hep-1细胞总RNA,用Prime ScriptTM RT Reagent Kit with gDNA Eraser试剂盒去除基因组DNA,进行逆转录反应,用TB Green[®] Premix Ex TaqTM II (Tli RNase H Plus)试剂盒进行qPCR检测。MMP-2上游引物为5'-CCTGCAAGTTTCCATTCCGC-3',下游引物为5'-AACAGT

GGACATGGCGGTC-3';MMP-9上游引物为5'-CGCAGACATCGTCATCCAGT-3',下游引物为5'-AACCGAGTTGAACCACGAC-3'。 β -actin上游引物为5'-CCTTCCTTCCTGGGCATGG-3',下游引物为5'-GATCTTCATTGTGCTGGGTGC-3'。PCR反应条件:95 $^{\circ}$ C 10 min,95 $^{\circ}$ C 10 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,共40个循环。采用2^{- $\Delta\Delta$ CT}法计算目的基因的相对含量。

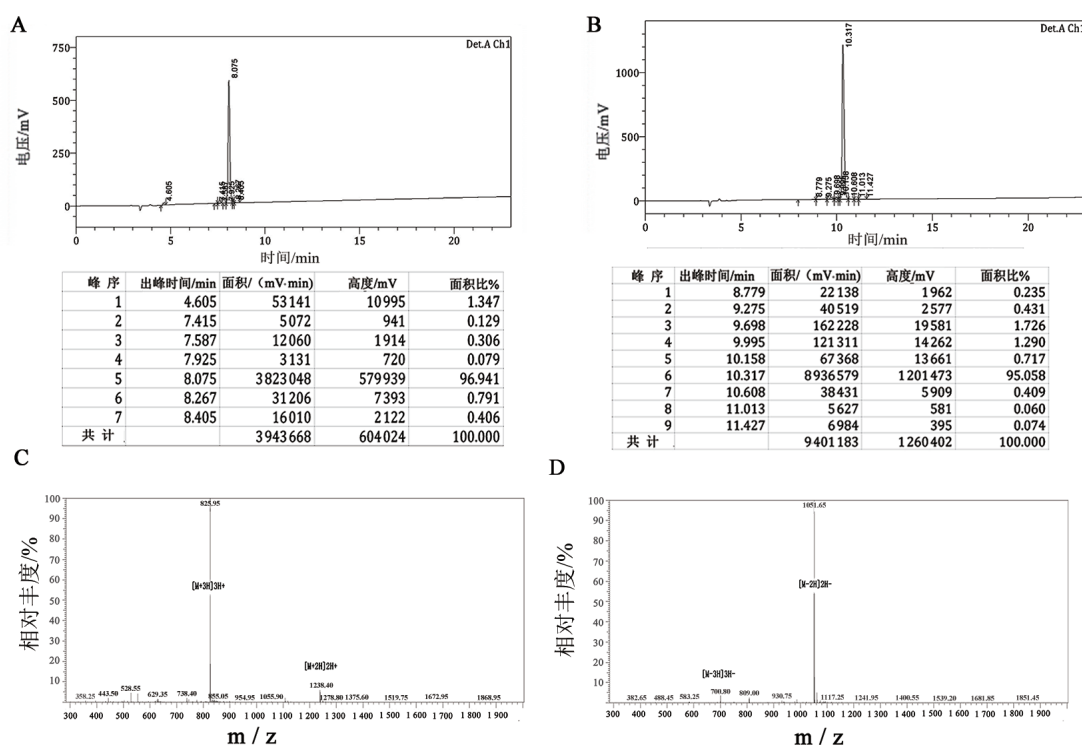
1.8 统计学处理

所有实验均独立重复3次。实验数据均使用GraphPad Prism8.0软件进行分析处理,呈正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用t检验。以P<0.05或P<0.01表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 T-19及RGD-T-19的纯化与鉴定

通过高效液相色谱对合成肽进行分离纯化,T-19的纯度为96.94%,出峰时间为8.075 min(图1A);RGD-T-19的纯度为95.06%,出峰时间为10.317 min(图1B)。合成肽的质谱鉴定结果见图1C、D,多肽的质荷比(mass to charge ratio, m/z)及分子量见表2。T-19的理论分子量为2 106.25,质谱鉴定后分子量计算值为2 105.30(图1C);RGD-T-19的理论分子量为2 475.62,质谱鉴定后分子量计算值为2 474.85(图1D),误差在允许范围内,表明合成的多肽无误。



A: 色谱检测T-19的出峰图;B: 色谱检测RGD-T-19的出峰图;C: T-19的质谱图;D: RGD-T-19的质谱图。

图1 色谱检测T-19和RGD-T-19的出峰图和质谱图

表 2 多肽的质荷比及分子量

多肽	m/z	分子量计算值	理论分子量
T-19	1051.65/(+2) 700.80/(+3)	2 105.30	2 106.25
RGD-T-19	1238.40/(+2) 825.95/(+3)	2 474.85	2 475.62

括号中的数字表示电荷数

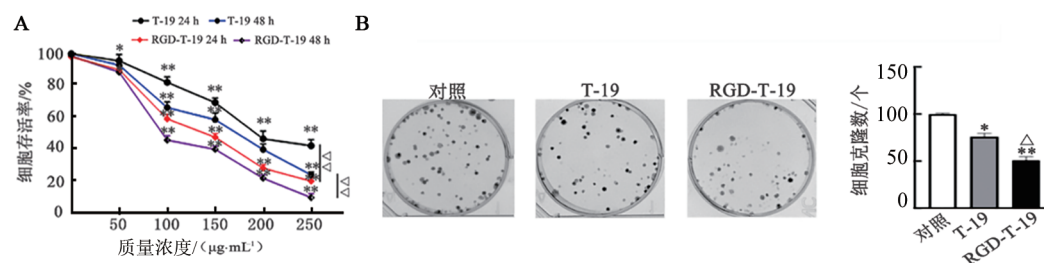
2.2 T-19 和 RGD-T-19 均可显著抑制 SK-Hep-1 细胞的增殖活性, 后者作用更强

CCK-8 法检测结果(图 2A)显示, 与对照组比较, 不同浓度的 T-19 和 RGD-T-19 均能明显抑制 SK-Hep-1 细胞的增殖活力($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。应用线性回归分析计算两者抑制 SK-Hep-1 细胞生长的 IC_{50} , T-19 作用 24 和 48 h 的 IC_{50} 分别为 200.0 $\mu\text{g/mL}$ 和 181.3 $\mu\text{g/mL}$; RGD-T-19 作用 24 和 48 h 的 IC_{50} 分别为 150.0 $\mu\text{g/mL}$ 和 99.1 $\mu\text{g/mL}$ 。克隆形成实验检测结果(图 2B)显示, 与对照组比较, T-19 组和 RGD-T-19 组 SK-Hep-1 细胞形成克隆数均明显减少($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与 T-19 组比较, RGD-T-19 组 SK-Hep-1 细胞形成克隆数明显减少($P < 0.05$)。实验结果说明, T-19 和 RGD-T-19 均能显著抑制 SK-Hep-1 细胞的增殖能力,

RGD 修饰的 T-19 的效果更好。

2.3 T-19 和 RGD-T-19 均可显著抑制 SK-Hep-1 细胞的迁移和侵袭能力, 后者作用更强

划痕愈合实验检测结果(图 3A)显示, 与对照组相比, T-19 和 RGD-T-19 组 SK-Hep-1 细胞的迁移率均明显下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 且呈浓度依赖性($P < 0.05$), RGD-T-19 比 T-19 的作用均更强(均 $P < 0.05$)。Transwell 小室实验检测结果(图 3B)显示, 与对照组相比, T-19 和 RGD-T-19 组 SK-Hep-1 细胞侵袭率均明显下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 或 $P < 0.001$), 且呈浓度依赖性($P < 0.05$), RGD-T-19 比 T-19 的作用均更强(均 $P < 0.05$)。实验结果表明, T-19 和 RGD-T-19 均可显著抑制 SK-Hep-1 细胞的迁移和侵袭能力, RGD-T-19 比 T-19 的作用更为明显。



A、B: CCK-8 法(A)和细胞克隆形成实验(B)分别检测 T-19 及 RGD-T-19 对 SK-Hep-1 细胞增殖活性和细胞克隆形成能力的影响。与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 T-19 组相比, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

图 2 T-19 及 RGD-T-19 对 SK-Hep-1 细胞增殖的影响

2.4 T-19 及 RGD-T-19 均能明显抑制 SK-Hep-1 细胞中 COX-2、MMP-2、MMP-9 和促进 TIMP-1 和 TIMP-2 蛋白的表达

WB 法检测结果(图 4A、B)显示, 与对照组比较, 不同浓度 T-19 和 RGD-T-19 处理的 SK-Hep-1 细胞中 COX-2、MMP-2、MMP-9 明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 且呈现浓度依赖性趋势($P < 0.05$), 而 TIMP-1、TIMP-2 的表达却明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 并且呈现浓度依赖性趋势($P < 0.05$); 与 T-19 组相比, RGD-T-19 组 SK-Hep-1 细胞中上述各种蛋白表达的变化更为显著($P < 0.05$)。实验结果表明, T-19 和 RGD-T-19 能剂量依赖性地抑制 SK-Hep-1 细胞中 COX-2、MMP-2、MMP-9 的表达, 促进 TIMP-1 和 TIMP-2 的表达, 这种作用 RGD-T-19 比 T-19 更为明显。

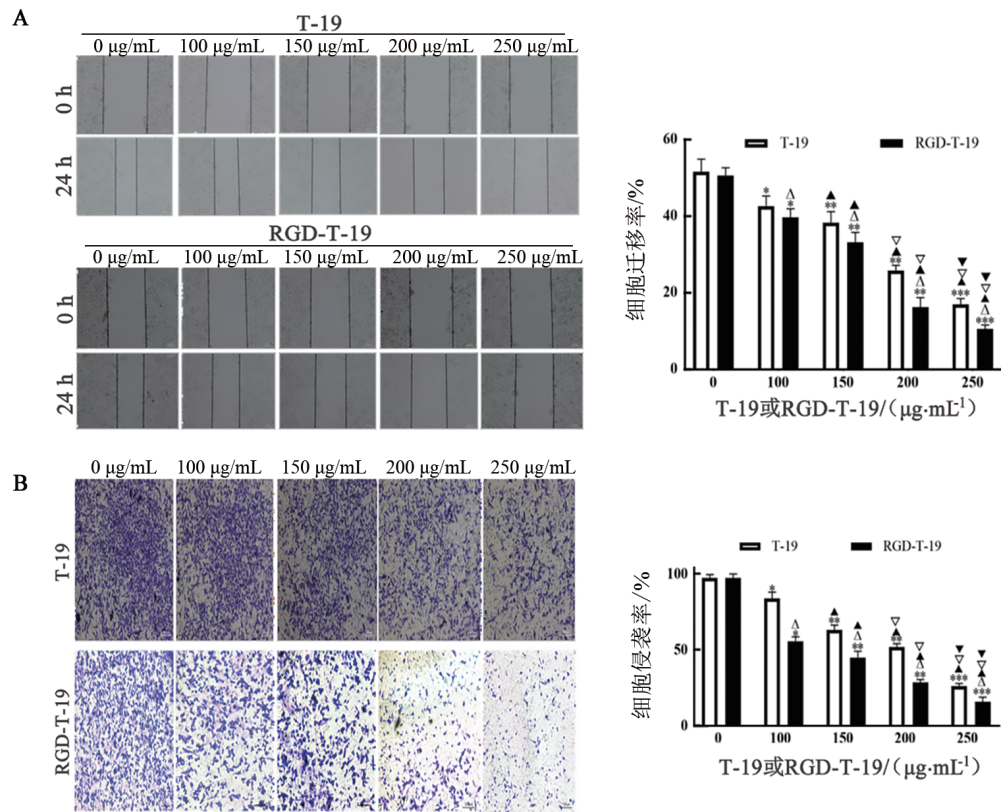
2.5 T-19 及 RGD-T-19 均能明显抑制 SK-Hep-1 细胞

中 MMP-2 和 MMP-9 mRNA 的表达

qPCR 法检测结果(图 5)显示, 与对照组比较, 150 $\mu\text{g/mL}$ 的 T-19 和 RGD-T-19 处理 24 h 的 SK-Hep-1 细胞中 MMP-2 和 MMP-9 mRNA 表达均显著下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与 T-19 组比较, RGD-T-19 组 SK-Hep-1 细胞中 MMP-2 和 MMP-9 mRNA 下降得均更为显著(均 $P < 0.05$)。实验结果说明, T-19 及 RGD-T-19 可显著抑制 MMP-2 和 MMP-9 mRNA 的表达, RGD-T-19 的作用更为显著。

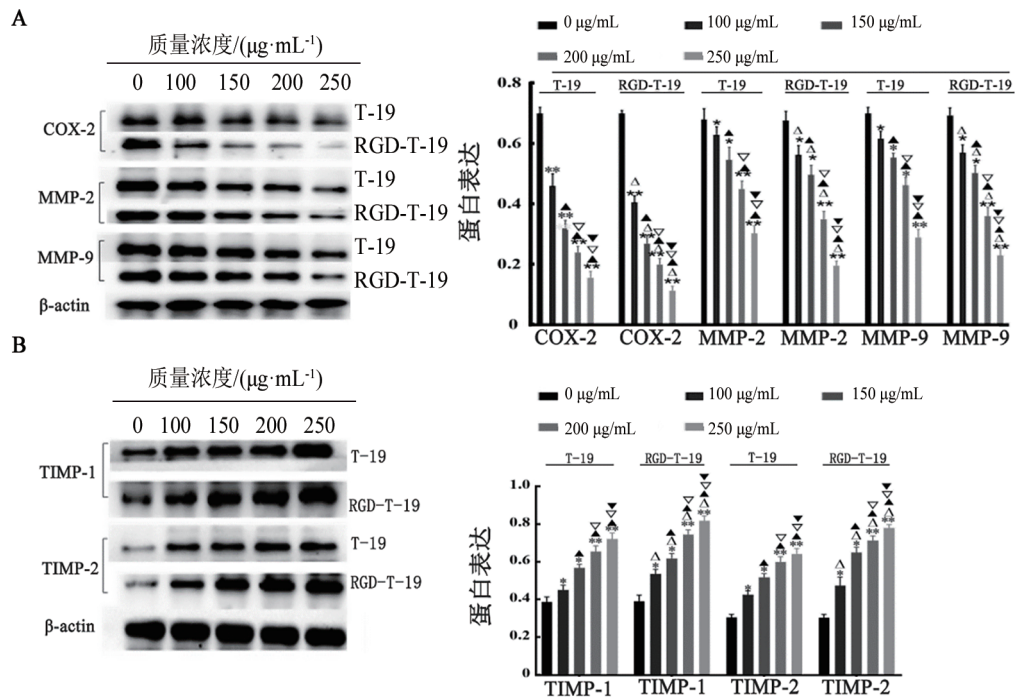
3 讨论

肿瘤抑制肽具有高效低毒、抗原性低且不易出现耐药等特点, 被研究者广泛关注, 但半衰期短、稳定性差等限制了其临床应用。为了提高肿瘤抑制肽的靶向性和稳定性, “靶点”修饰一直以来都是研究



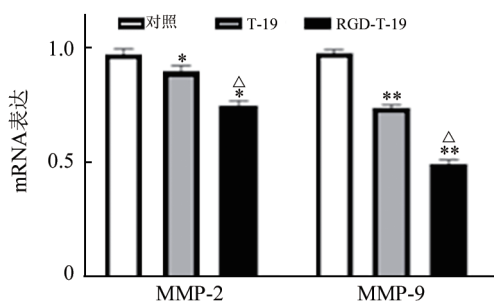
A: 划痕愈合实验检测 T-19 和 RGD-T-19 对 SK-Hep-1 细胞迁移能力的影响 ($\times 50$); B: Transwell 小室实验检测 T-19 和 RGD-T-19 对 SK-Hep-1 细胞侵袭能力的影响 ($\times 100$)。与对照组相比, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$; 与 T-19 组相比, $^{\Delta}P < 0.05$; 与 100 $\mu\text{g/mL}$ 相比, $^{\wedge}P < 0.05$; 与 150 $\mu\text{g/mL}$ 相比, $^{\nabla}P < 0.05$; 与 200 $\mu\text{g/mL}$ 相比, $^{\triangledown}P < 0.05$ 。

图3 T-19 及 RGD-T-19 对 SK-Hep-1 细胞迁移和侵袭能力的影响



A、B: WB 法检测 T-19 和 RGD-T-19 处理后 SK-Hep-1 细胞中 COX-2、MMP-2 和 MMP-9(A) 和 TIMP-1 和 TIMP-2(B) 的表达。与对照组相比, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$; 与 T-19 组相比, $^{\Delta}P < 0.05$; 与 100 $\mu\text{g/mL}$ 相比, $^{\wedge}P < 0.05$; 与 150 $\mu\text{g/mL}$ 相比, $^{\nabla}P < 0.05$; 与 200 $\mu\text{g/mL}$ 相比, $^{\triangledown}P < 0.05$ 。

图4 T-19 和 RGD-T-19 对 SK-Hep-1 细胞迁移和侵袭相关蛋白表达的影响



与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 T-19 组相比, $\Delta P < 0.05$ 。

图5 T-19和RGD-T-19对SK-Hep-1细胞MMP-2、MMP-9 mRNA表达的影响

者们关注的热点^[11-12]。最理想的修饰效果是增加肽的水溶性和稳定性、延长其在体内半衰期、提高杀伤活性,但对正常细胞无伤害。通常按照修饰物以及修饰位点的不同分为C端酰胺化、N端乙酰化、N-糖基化或O-糖基化及RGD修饰等。

RGD修饰是将RGD连接到肽的C端,经RGD修饰的肽与细胞的黏附性增强,有利于肿瘤靶向治疗。RGD肽是组织再生和治疗及器官置换的合适靶点,适于药物靶向输送,目前RGD配体广泛应用于国内外生物医学研究中^[13-14]。细胞外基质(ECM)中的纤维粘连蛋白、层粘连蛋白以及血液中的黏附蛋白等含有RGD序列,属于RGD蛋白。RGD蛋白通过RGD序列与细胞表面的整合素受体识别和结合,将胞外的信息通过整合素传到细胞内,调控细胞的增殖、分化、黏附和凋亡等活动^[15-16]。

贾麒钰等^[17]报道, RGD修饰整合素靶向肽,可以增加其细胞黏附力,有效抑制大鼠破骨细胞的活化。杨阳等^[18]通过制备一种RGD环肽修饰、 Zn^{2+} 掺杂并负载双硫仑的树枝状介孔硅纳米颗粒,初步研究其对结肠直肠癌CT26细胞产生强烈的靶向细胞毒性。LI等^[19]对抗血管生成的metargidin肽(antiangiogenic metargidin peptide, AMEP)进行RGD修饰后发现,修饰后的AMEP抑制黑色素瘤细胞血管生成作用明显加强。

为了提高T-19抗肿瘤活性,本研究对T-19进行RGD修饰,将RGD序列连接到T-19的C端,探讨RGD修饰后的T-19对SK-Hep-1细胞增殖、侵袭和转移能力的影响是否发生变化。CCK-8法、克隆形成实验、Transwell小室实验、划痕实验检测结果表明, T-19和RGD-19均以剂量依赖性方式抑制SK-Hep-1细胞的增殖、迁移和侵袭能力, RGD-19的作用明显强于T-19。T-19是通过非RGD依赖方式抑制细胞增殖,相对来说靶向性低、药物用量大;而RGD-T-19除上述作用方式外,可能通过RGD识别细胞表面的整合素分子,增加了与细胞的靶向性和亲和力,故 IC_{50}

均低于T-19。

血管生成因子、黏附因子、基质分解酶等诸多因素参与肿瘤的侵袭和迁移过程^[20]。肿瘤细胞与细胞外基质中层粘连蛋白、纤维粘连蛋白等大分子物质黏附后被激活,合成并分泌各种基质分解酶,破坏基底膜和ECM形成的天然保护屏障,然后肿瘤细胞从瘤体脱落,随血液或淋巴循环向远处扩散转移^[21]。在各种分解酶中,环氧合酶(cyclooxygenase, COX)和MMP的作用备受重视。花生四烯酸是合成前列腺素的原料,COX是催化反应的关键酶。COX分为COX-1(结构型)和COX-2(诱导型)两大类^[22]。其中COX-2在机体正常状态下极少表达,在多种癌细胞中高表达,在肿瘤组织中COX-2的表达与整合素水平呈正相关^[23-24]。COX-2可能通过整合素信号通路影响下游MMP-2、MMP-9的表达,进而调控肿瘤细胞的黏附、侵袭和转移^[25-26]。ECM中含有RGD蛋白,经RGD靶向结合细胞表面的整合素参与调节细胞增殖、分化等过程。肝癌等肿瘤细胞表面多种整合素表达增加^[27-29],含有RGD序列的小分子多肽会和ECM中的RGD蛋白竞争与整合素的结合,产生去整合素效应^[30],通过阻断整合素信号通路,抑制肿瘤细胞的增殖、侵袭和转移。

研究^[31]发现, MMP-2和MMP-9的表达量与肿瘤恶性度和转移能力呈正相关。组织金属蛋白酶抑制剂(tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP)与MMP的作用相反,高表达时能够阻止癌细胞的侵袭转移。本研究发现,随着T-19和RGD-T-19以剂量依赖性方式抑制SK-Hep-1细胞中COX-2、MMP-2、MMP-9的表达,而且以同样的方式促进TIMP-1、TIMP-2蛋白的表达, RGD-T-19作用明显强于T-19。本研究的qPCR法检测结果与WB法检测结果基本一致。

基于上述研究, RGD修饰后T-19作用增强的原因可能是RGD与SK-Hep-1细胞表面某种整合素结合,产生去整合素效应,阻断了经整合素信号通向下流的信号传递,故COX-2的活化减少,进一步抑制了下游MMP-2和MMP-9的活化,上调TIMP-1、TIMP-2蛋白表达,抑制了SK-Hep-1细胞的侵袭和迁移。

[参考文献]

- [1] XIA C F, DONG X S, LI H, *et al.* Cancer statistics in China and United States, 2022: profiles, trends, and determinants[J]. Chin Med J, 2022, 135(5): 584-590. DOI: 10.1097/CM9.0000000000002108.
- [2] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, *et al.* Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin,

- 2021, 71(3): 209-249. DOI: 10.3322/caac.21660.
- [3] GANESAN P, KULIK L M. Hepatocellular Carcinoma[J]. Clinics in Liver Disease, 2023, 27(1): 85-102. DOI: 10.1016/j.cld.2022.08.004.
- [4] WEN Q, ZHANG L, ZHAO F, *et al.* Production technology and functionality of bioactive peptides[J]. Curr Pharm Des. 2023,29(9): 652-674. DOI: 10.2174/1381612829666230201121353.
- [5] QUINTAL-BOJÓRQUEZ N, SEGURA-CAMPOS M R. Bioactive peptides as therapeutic adjuvants for cancer[J]. Nutr Cancer, 2021, 73(8): 1309-1321. DOI: 10.1080/01635581.2020.1813316.
- [6] POURALI G, KAZEMI D, POURALI R, *et al.* Bioactive peptides: potential impact on the treatment of gastrointestinal cancers[J]. Curr Pharm Des, 2023, 29(31): 2450-2460. DOI: 10.2174/0113816128261378231019201709.
- [7] RUOSLAHTI E. RGD and other recognition sequences for integrins [J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 1996, 12: 697-715. DOI: 10.1146/annurev.cellbio.12.1.697.
- [8] SAUS J, WIESLANDER J, LANGEVELD J P, *et al.* Identification of the Goodpasture antigen as the alpha 3(IV) chain of collagen IV [J]. J Biol Chem, 1988, 263(26): 13374-13380.
- [9] REDMAN J E, GHADIRI M R. Synthesis of photoactivep-azidotetra fluoropheny lalanine containing peptide by solid-phase Fmoc methodology[J]. Org Lett, 2002, 4(25): 4467-4469. DOI: 10.1021/ol026998f.
- [10] 衣同辉, 吴艳敏, 刘睿, 等. 人参皂苷 Rg3 联合肿瘤抑素 19 肽对肝癌 HepG2 细胞凋亡的影响及机制[J]. 北京中医药大学学报, 2020, 43(7): 575-582. DOI: 10.3969/j.issn.1006-2157.2020.07.009.
- [11] YOSHINAMI Y, SHOJI H. Recent advances in immunotherapy and molecular targeted therapy for gastric cancer[J/OL]. Future Sci OA, 2023, 9(2): FSO842[2024-05-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10061264/>. DOI: 10.2144/fsoa-2023-0002.
- [12] LIU J S, PANDYA P, AFSHAR S. Therapeutic advances in oncology [J/OL]. Int J Mol Sci, 2021, 22(4): 2008[2024-05-10]. DOI: 10.3390/ijms22042008.
- [13] KUMAR V B, TIWARI O S, FINKELSTEIN-ZUTA G, *et al.* Design of functional RGD peptide-based biomaterials for tissue engineering[J/OL]. Pharmaceutics, 2023, 15(2): 345[2024-05-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36839667/>. DOI: 10.3390/pharmaceutics15020345.
- [14] COSSU J, THOREAU F, BOTURYN D. Multimeric RGD-based strategies for selective drug delivery to tumor tissues[J/OL]. Pharmaceutics, 2023, 15(2): 525[2024-05-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36839846/>. DOI: 10.3390/pharmaceutics15020525.
- [15] ARAP W, PASQUALINI R, RUOSLAHTI E. Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model[J]. Science. 1998,279(5349):377-380. DOI: 10.1126/science. 279.5349. 377.
- [16] CIARROCCHI A, RIEBER M S, RIEBER M. Extracellular RGD-binding proteins modulate cell adhesion. Biochem Biophys Res Commun[J]. 1992, 183(2): 544-552. DOI: 10.1016/0006-291x(92) 90516-n.
- [17] 贾麒麟, 黄晓夏, 郭建, 等. 整合素靶向肽促进 SD 大鼠骨髓间充质干细胞的增殖[J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(30): 4780-4786.
- [18] 杨阳, 朱烨飞, 王欣月, 等. cRGD 修饰负载钆的枝状介孔硅载体递送双硫仑靶向杀伤结直肠癌 CT26 细胞[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2023, 30(12): 1043-1050. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.12.002.
- [19] LI T L, KANG G B, WANG T Y, *et al.* Tumor angiogenesis and anti-angiogenic gene therapy for cancer[J]. Oncol Lett, 2018, 16(1): 687-702. DOI: 10.3892/ol.2018.8733.
- [20] GRIFFIOEN A W, TROMP S C, HILLEN H F. Angiogenesis modulates the tumour immune response[J]. Int J Exp Pathol, 1998, 79(6): 363-368. DOI: 10.1046/j.1365-2613.1998.00091.x.
- [21] DAS S K, MAJI S, WECHMAN S L, *et al.* MDA-9/Syntenin (SDCBP): novel gene and therapeutic target for cancer metastasis [J]. Pharmacol Res, 2020, 155: 104695[2024-05-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7551653/>. DOI: 10.1016/j.phrs.2020.104695.
- [22] ZEIDLER R, CSANADY M, GIRES O, *et al.* Tumor cell-derived prostaglandin E2 inhibits monocyte function by interfering with CCR5 and Mac-1[J]. FASEB J, 2000, 14(5): 661-668. DOI: 10.1096/fasebj.14.5.661.
- [23] FREJBORG E, SALO T, SALEM A. Role of cyclooxygenase-2 in head and neck tumorigenesis[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(23): 9246[2024-05-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7731111/>. DOI: 10.3390/ijms21239246.
- [24] YE Y, WANG X P, JESCHKE U, *et al.* COX-2-PGE2-EPs in gynecological cancers[J]. Arch Gynecol Obstet, 2020, 301(6): 1365-1375. DOI: 10.1007/s00404-020-05559-6.
- [25] LEUNG E, MCARTHUR D, MORRIS A, *et al.* Cyclooxygenase-2 inhibition prevents migration of colorectal cancer cells to extracellular matrix by down-regulation of matrix metalloproteinase-2 expression[J]. Dis Colon Rectum, 2008, 51(3): 342-347. DOI: 10.1007/s10350-007-9120-4.
- [26] WANG W, WANG J Y. Toll-like receptor 4 (TLR4)/cyclooxygenase-2 (COX-2) regulates prostate cancer cell proliferation, migration, and invasion by NF- κ B activation[J]. Med Sci Monit, 2018, 24: 5588-5597. DOI: 10.12659/MSM.906857.
- [27] AGGARWAL A, AL-ROHIL R N, BATRA A, *et al.* Expression of integrin α 3 β 1 and cyclooxygenase-2 (COX2) are positively correlated in human breast cancer[J]. BMC Cancer, 2014, 14: 459. DOI: 10.1186/1471-2407-14-459.
- [28] KHAN Z, MARSHALL J F. The role of integrins in TGF β activation in the tumour stroma[J]. Cell Tissue Res, 2016, 365(3): 657-673. DOI: 10.1007/s00441-016-2474-y.
- [29] SUN F K, WANG J P, SUN Q, *et al.* Interleukin-8 promotes integrin β 3 upregulation and cell invasion through PI3K/Akt pathway in hepatocellular carcinoma[J/OL]. J Exp Clin Cancer Res, 2019, 38(1): 449[2024-05-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31684995/>. DOI: 10.1186/s13046-019-1455-x.
- [30] WEN S Y, HOU Y X, FU L X, *et al.* Cancer-associated fibroblast (CAF) -derived IL32 promotes breast cancer cell invasion and metastasis *via* integrin β 3-p38 MAPK signalling[J]. Cancer Lett, 2019, 442: 320-332. DOI: 10.1016/j.canlet.2018.10.015.
- [31] 逯文娟, 李昭, 马小云, 等. 吴茱萸碱对神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞增殖、迁移及侵袭的影响[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2023, 30(10): 887-892. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.10.006.

[收稿日期] 2024-05-11

[修回日期] 2024-07-26

[本文编辑] 向正华