

DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.04.009

一种利用荧光标记检测氨肽酶 N 抑制剂与肿瘤细胞结合的方法 *

王 婷¹ 阮林高¹ 戈 梅² 钱秀萍^{1△}

(1 上海交通大学药学院 上海 200240; 2 上海来益生物药物研发中心 上海 201203)

摘要 目的:建立利用荧光标记法检测氨肽酶抑制剂和肿瘤细胞结合的方法。**方法:**以异硫氰酸荧光素(FITC)标记氨肽酶 N 抑制剂 LYRM03 和 Bestatin, 制备荧光探针 FITC-LYRM03、FITC-Bestatin, 应用荧光显微成像观察和流式细胞仪检测标记化合物 FITC-LYRM03、FITC-Bestatin 对肿瘤细胞的结合与氨肽酶 N 抑制活性的相关性。**结果:**化合物 LYRM03 和 Bestatin 具有肿瘤细胞的氨肽酶 N 抑制活性, 荧光标记化合物 FITC-LYRM03、FITC-Bestatin 能与肿瘤细胞有不同程度的结合。**结论:**标记化合物 FITC-LYRM03、FITC-Bestatin 和肿瘤细胞的结合与对肿瘤细胞的氨肽酶 N 抑制活性相一致。

关键词:氨肽酶 N 抑制剂; LYRM03; Bestatin; 异硫氰酸荧光素

中图分类号:R730.231, R730.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)04-634-05

A method for Detecting the Binding Activities of Amino-peptidase N Inhibitors to Tumor Cell by Fluorescein*

WANG Ting¹, RUAN Lin-gao¹, GE Mei, QIAN Xiu-ping^{1△}

(1 School of Pharmacy, Shanghai Jiaotong University, Shanghai, 200240, China;

2 Shanghai Health Creation Center For Biopharmaceuticals R&D, Shanghai, 201203, China)

ABSTRACT Objective: To build a fluorescein labeling method to detect the binding of aminopeptidase N inhibitors with tumor cells. **Methods:** Aminopeptidase N inhibitors LYRM03 and Bestatin were labeled with fluorescein isothiocyanate (FITC), and fluorescein-labeled compounds of FITC-LYRM03 and FITC-Bestatin were purified. The relationship between binding activities to tumor cells and inhibitory activities of aminopeptidase N inhibitors was detected by using fluorescence microscope and flow cytometer. **Results:** Compounds of LYRM03 and Bestatin had inhibitory activities to aminopeptidase N of tumor cells. Fluorescein-labeled FITC-LYRM03 and FITC-Bestatin had different binding activities to tumor cells. **Conclusion:** There was consistency between binding activities of tumor cells and inhibitory activities of aminopeptidase N inhibitors.

Key words: Aminopeptidase N inhibitors; LYRM03; Bestatin; Fluorescein isothiocyanate(FITC)

Chinese Library Classification(CLC): R730.231, R730.5 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)04-634-05

前言

氨肽酶 N(aminopeptidase N, APN/CD13)是一种将氨基酸从寡肽 N 末端切除的膜结合糖蛋白,属于结合 Zn 的金属蛋白酶超家族^[1,2]。它在恶性肿瘤细胞的增殖、分化、侵袭以及血管生成过程中起着重要作用^[3]。因此,抑制氨肽酶的活性,能有效阻止肿瘤的侵袭和转移^[4]。不同来源的 APN 抑制剂,如 Bestatin^[5]、Amastatin^[6]、姜黄素^[6]等已证实具有抗肿瘤活性。本课题组在研究小链霉菌(*Streptomyces parvus* HCCB10043)次级代谢产物的过程中,发现了 3 个小分子肽类化合物,分离纯化后分别鉴定为 Valistatin、Bestatin 和一个新化合物。新化合物为三肽化合物,命名为 LYRM03。这 3 个化合物均具有显著的 APN 抑制活性,其中 LYRM03 的活性最高^[7]。

异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)是一种重要的荧光探针。由于其荧光强度高,能与多种基团生成稳定

的共价键,因而在蛋白质或多肽标记、细胞检测以及药物分析等方面中得到广泛的应用^[8]。LYRM03 上的活性氨基基团,在 pH>8 的碱性环境下,可以和 FITC 中的硫氰酸酯基团反应生成偶联物^[9],因此,本研究将 LYRM03 和 FITC 结合的化合物探针用于活细胞的氨肽酶活性检测。

1 材料方法

1.1 实验材料

1.1.1 主要试剂 LYRM03 由上海来益生物药物研发中心提供, Bestatin 购自中国药品生物制品检定所,两种药物均使用 PBS 缓冲液(上海双螺旋生物科技有限公司)溶解为 2.5 mg·mL⁻¹。L-亮氨酸对硝基苯胺(阿尔法科技公司),使用 PBS 缓冲液溶解为 20 mM。FITC 购自阿拉丁公司,使用 PBS 缓冲液溶解为 1 mg·mL⁻¹。以上试剂 4℃ 放置备用。

1.1.2 主要仪器 多功能读板机(Molecular Devices, 型号 Spec-

* 基金项目:国家重大新药创制专项(2010zx09401-403)

作者简介:王婷(1986-),女,硕士研究生,主要研究方向:微生物与生化药学, E-mail: blhzx0717@yahoo.cn

△ 通讯作者:钱秀萍,副教授,电话: +86(21) 3420-4459, E-mail: qianxp@sjtu.edu.cn

(收稿日期:2013-05-29 接受日期:2013-06-26)

traMax M3);流式细胞仪(BD,型号 FACSCalibur);倒置生物显微镜(上海光学仪器,型号 37XC);荧光显微镜(奥林巴斯,型号 IX71-32PH)。

1.1.3 细胞和培养基 PANC-1(人胰腺癌细胞)、HepG2(人肝癌细胞)、MDA-MB-231(人乳腺癌细胞)、Hela(子宫颈癌细胞)均购自中国科学院上海细胞研究所。DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium)为 Gibco 公司产品,胎牛血清为 Hyclone 公司产品。配制为 10%胎牛血清的细胞培养基,4℃放置备用。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 采用常规培养法将不同的肿瘤细胞培养于含 10%胎牛血清的 DMEM 细胞培养液中,置 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养,2~3 天传代 1 次。实验时均用对数生长期细胞。

1.2.2 制备荧光标记化合物 FITC-LYRM03、FITC-Bestatin 称取 LYRM03 与 Bestatin 适量溶于 0.02 mol·L⁻¹,pH 9.6 碳酸盐缓冲液中,使终浓度均为 2.5 mg·mL⁻¹。LYRM03 加入 150 mg FITC,Bestatin 加入 200 mg FITC,超声混匀。避光,4℃,反应 12 小时。

HPLC 法纯化荧光标记化合物 FITC-LYRM03、FITC-Bestatin,并 4℃避光保存。以质谱法检测产物分子量,并对其特征碎片进行分析,确证结构。

1.2.3 L-亮氨酸对硝基苯胺法检测肿瘤细胞氨肽酶抑制活性 氨肽酶活性检测方法参照文献^[10]。用移液枪取人胰腺癌细胞 PANC-1 180 μL 于 96 孔板,使得每孔含细胞 1.0×10^4 个,共 36 孔,移液枪取 LYRM03、Bestatin 于细胞液,使其在 200 μL 反应体系中终浓度为 1 μM、5 μM、20 μM、50 μM、500 μM,各样品各浓度做三个复孔。阴性对照在 20 μL DMEM 培养基中加入

10 μL 底物,空白对照为 30 μL DMEM 培养基。吹打数次混匀,37℃、5% CO₂ 放置 2 小时。

各孔加入 L-亮氨酸对硝基苯胺,使其在 210 μL 反应体系中终浓度为 1 mM。吹打数次混匀。37℃放置 60 min 后,用多功能读板机检测 405 nm 处 A 值。

1.2.4 FITC-LYRM03、FITC-Bestatin 与 4 种肿瘤细胞的结合 收集 PANC-1 对数生长期细胞,1400 rpm·min⁻¹ 离心 5 分钟,弃上清,培养基稀释计数,调整浓度为 1×10^5 个/mL。4 个 1.5 mL 管各取 0.5 mL 细胞悬液。根据预实验,三管中分别加入不同体积 1 mg·mL⁻¹ 的 FITC、FITC-LYRM03、FITC-Bestatin,至终浓度均为 50 μM,药物相对于细胞过量。第四管作空白对照。37℃、5% CO₂ 放置 2 小时。各组细胞以 1400 rpm·min⁻¹ 离心 5 分钟,去上清。各组加入 500 μL PBS 重悬,并轻柔吹打以洗去残留药物,1400 rpm·min⁻¹ 离心 5 分钟,去上清。重复以上操作 3 遍,用 500 μL PBS 重悬细胞。

选择 488nm 的激发光,用流式细胞仪检测单细胞发光强度,并用荧光显微镜(滤镜 530DF30)进行细胞成像。

2 结果

2.1 LYRM03、Bestatin 对肿瘤细胞 PANC-1、HepG2、Hela、MDA 的氨肽酶抑制活性

采用 L-亮氨酸对硝基苯胺法检测 LYRM03 与 Bestatin 对 4 种肿瘤细胞 PANC-1、HepG2、Hela、MDA 氨肽酶抑制活性,结果见图 1。

本实验研究了肽类化合物 LYRM03、Bestatin 对胰腺癌细胞 PANC-1、肝癌细胞 HepG2、乳腺癌细胞 MDA-MB-231、子宫

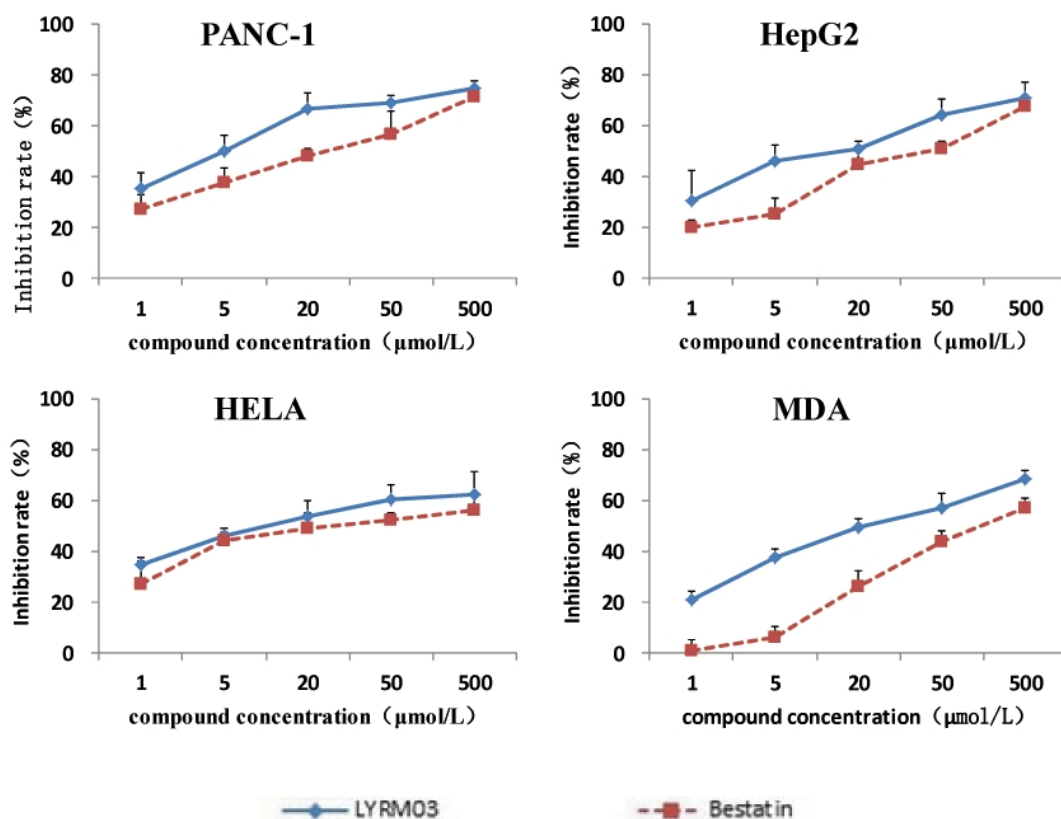


图 1 LYRM03、Bestatin 对 PANC-1、HepG2、Hela、MDA 氨肽酶抑制活性

Fig.1 The inhibition activities of LYRM03 and Bestatin to APN of PANC-1, HepG2, Hela and MDA

颈癌细胞 Hela 细胞的氨肽酶 N 抑制活性,结果表明:随着浓度从 $1\ \mu\text{M}$ 增加至 $500\ \mu\text{M}$,LYRM03 和 Bestatin 对肿瘤细胞氨肽酶 N 的抑制活性增加,而且 LYRM03 较 Bestatin 显示出更好的氨肽酶 N 抑制活性。

2.2 荧光标记化合物 FITC-LYRM03、FITC-Bestatin 的制备和鉴定

定

LYRM03 和 Bestatin 具有活性氨基基团,在 $\text{pH}>8$ 的碱性环境下,可以和 FITC 中的硫氨酸酯基团反应生成偶联物 FITC-LYRM03、FITC-Bestatin,见图 2。

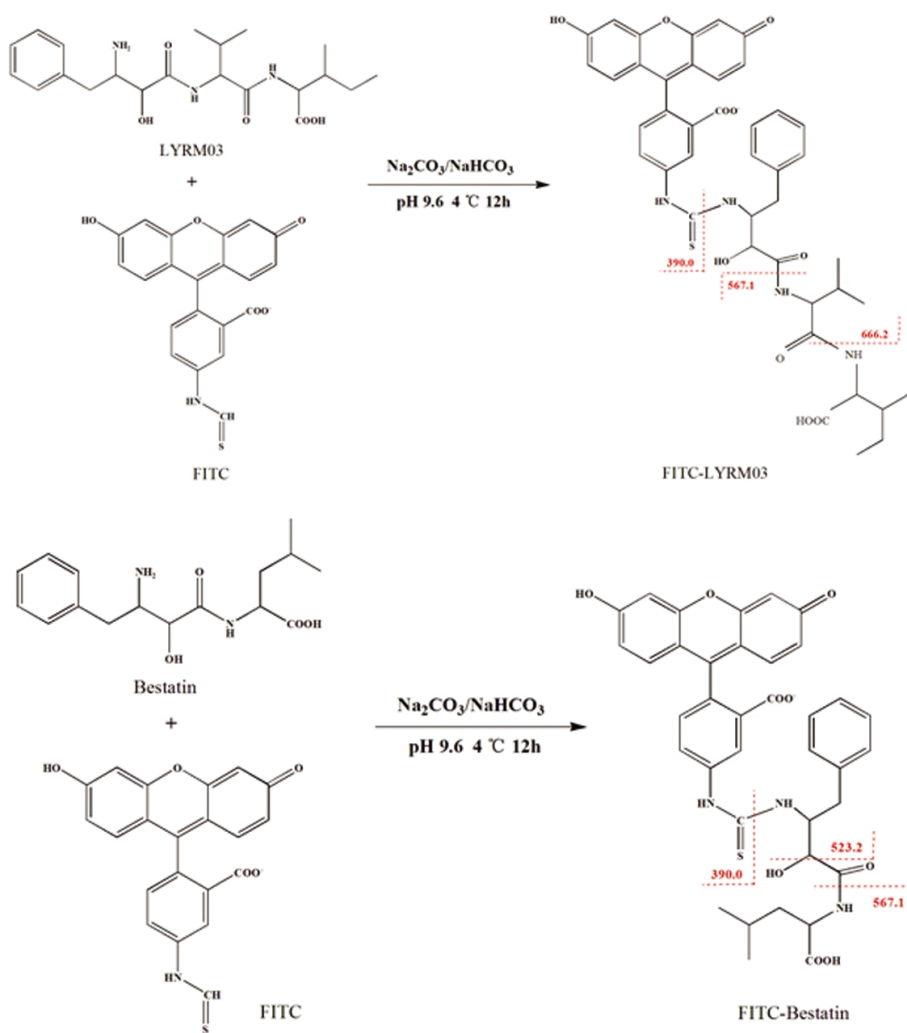


图2 FITC-LYRM03 和 FITC-Bestatin 的化学合成

Fig.2 The chemical synthesis of FITC-LYRM03 and FITC-Bestatin

合成的荧光标记化合物的 HPLC 分析见图 3, FITC-LYRM03 出峰时间为 16 分钟左右, FITC-Bestatin 出峰时间为 12 分钟左右,质谱见图 4。

LYRM03、Bestatin、FITC 的分子量分别为 407 Da、308 Da 和 389 Da, FITC-LYRM03 与 FITC-Bestatin 的分子量为 796 Da 和 697 Da。从图 4 可见,制备的荧光标记化合物的分子量分别为 796.3 Da 和 697.2 Da, 分子量 796.3 Da 的荧光标记化合物裂解峰分别为 390.0 Da、567.1 Da、666.2 Da, 分子量 697.2 Da 的荧光标记化合物裂解峰分别为 390.0 Da、523.2 Da、567.1 Da, 与 FITC-LYRM03 和 FITC-Bestatin 的裂解峰一致(如图 2)。因此可确认荧光分子 FITC 已结合至 LYRM03 与 Bestatin 分子上,制备获得纯化的 FITC-LYRM03 和 FITC-Bestatin。

2.3 荧光标记化合物 FITC-Bestatin、FITC-LYRM03 与 4 种肿

瘤细胞的结合

荧光标记化合物 FITC-LYRM03 和 FITC-Bestatin 分别和胰腺癌细胞 PANC-1、肝癌细胞 HepG2、乳腺癌细胞 MDA-MB-231、宫颈癌细胞 Hela 细胞进行结合反应,荧光显微镜成像观察 LYRM03 和 Bestatin 与 4 种肿瘤细胞的结合,结果见图 5。

从单细胞荧光成像可见, $50\ \mu\text{M}$ FITC 与肿瘤细胞仅有微量的结合,而 FITC 和 LYRM03 或 Bestatin 反应后,较多结合至肿瘤细胞,可见较明显的荧光单细胞。对于 PANC-1 和 HepG2 肿瘤细胞,经 $50\ \mu\text{M}$ FITC-LYRM03 作用的荧光细胞较 FITC-Bestatin 作用后的明显增多。FITC-LYRM03 和 FITC-Bestatin 结合 MDA 肿瘤细胞的能力相对较弱。采用流式细胞仪检测 4 种肿瘤细胞单细胞发光强度,结果见表 1。

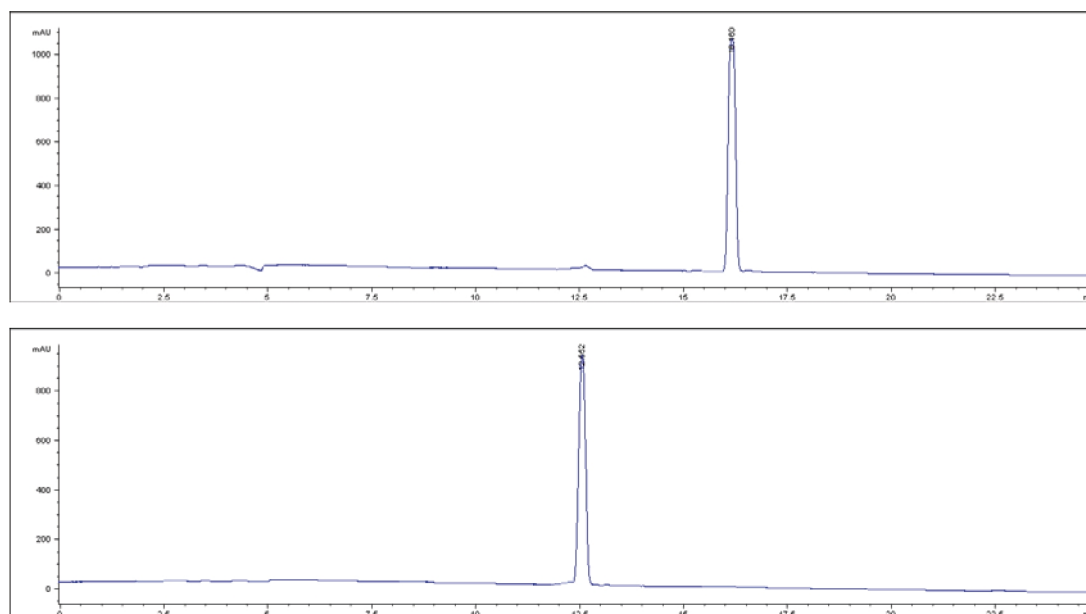


图3 FITC-LYRM03(上)和 FITC-Bestatin(下)的 HPLC 分析

Fig.3 HPLC analysis of FITC-LYRM03 (top) and FITC-Bestatin (bottom)

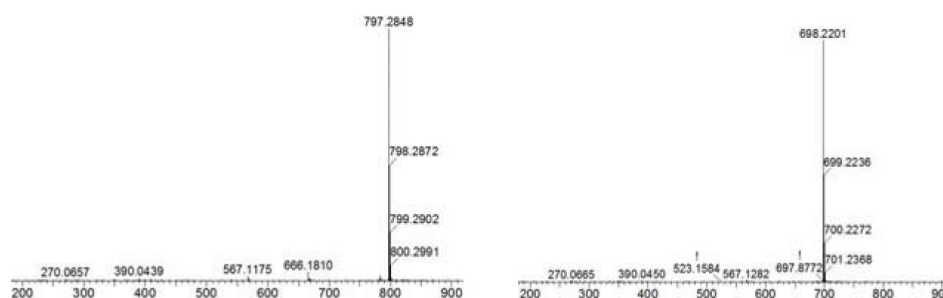


图4 FITC-LYRM03(左)和 FITC-Bestatin(右)的质谱分析

Fig.4 MS analysis of FITC-LYRM03 (left) and FITC-Bestatin (right)

表 1 FITC-LYRM03、FITC-Bestatin 和肿瘤细胞的结合及 APN 抑制活性

Table 1 The bind of FITC-LYRM03 and FITC-Bestatin with tumor cells, and the inhibition activities of APN

	APN 抑制活性(%)			单细胞发光强度		
	50 μ M LYRM03	50 μ M Bestatin	对照	50 μ M FITC	50 μ M FITC-LYRM03	50 μ M FITC-Bestatin
PANC-1	96	57	20	406	2311	1206
HEPG2	64	51	3	491	1513	1008
HELA	60	52	3	261	1192	770
MDA	57	44	4	483	746	520

4 种癌细胞中 FITC-LYRM03、FITC-Bestatin 和 PANC-1 的结合量最大, HepG2 次之, MDA 活性最小。LYRM03、Bestatin 对 PANC-1 细胞的氨肽酶抑制活性最高, HepG2 次之, MDA 活性最小。可见, 用流式细胞仪检测荧光标记化合物和肿瘤细胞的结合与氨肽酶抑制活性一致。

3 讨论

氨肽酶 N 于 1963 年第一次从猪肾中分离得到^[11]。1989 年, 国际生物化学和分子生物学联合会 (IMBMB) 将此酶与 CD13 确定为同一种蛋白^[1], 并在 1992 年进一步确定为来自同一遗传亚型的多种冠状病毒的受体^[12]。氨肽酶 N 是最早被认定

的正常或恶性髓性细胞的表面标志物^[13]。近年来关于氨肽酶 N 的临床研究相继开展, 涉及肺癌、胰腺癌、卵巢癌、结肠癌等恶性肿瘤疾病^[3, 14-16]。

小肽类化合物 Bestatin 是著名抗生素研究者, 日本的梅泽滨夫等人从网状橄榄链霉菌 (*Streptomyces olivoreticuli*) 培养液中发现的一种小分子二肽化合物^[17], 是目前唯一作为临床辅助药物应用于治疗白血病和卵巢癌的氨肽酶 N 抑制剂^[4, 18]。因为 Bestatin 活性不高且对骨髓、胃和肠粘膜细胞有严重的细胞毒性^[19], 所以有必要寻找新的氨肽酶 N 抑制剂。Min 等的研究表明, 肽类化合物 LYRM03、Bestatin 具有对猪肾微粒体 (porcine kidney microsomes) 的氨肽酶 N 抑制活性^[7], 而且本课题组的研

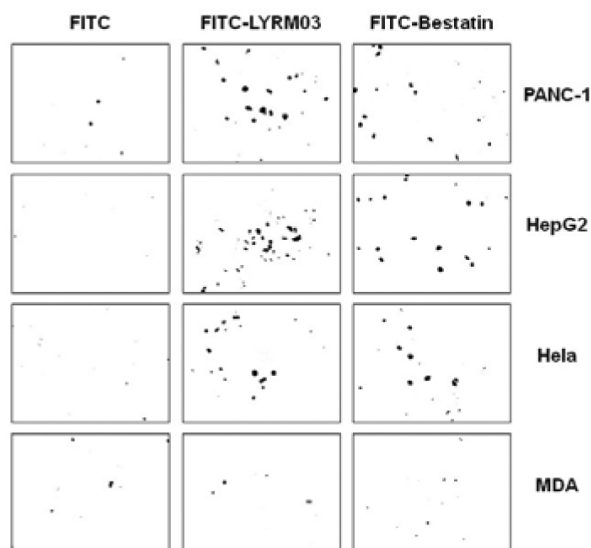


图5 FITC-LYRM03 和 FITC-Bestatin 结合肿瘤细胞的荧光显微成像
($\times 10$)

Fig.5 Fluorescence microscopic images of tumor cells binding with
FITC-LYRM03 and FITC-Bestatin($\times 10$)

究发现 LYRM03 毒性较低, 因此深入研究该化合物对肿瘤细胞的氨肽酶 N 抑制活性以及抗肿瘤活性具有一定的意义。

化学发光分析法是一种灵敏度高、特异性强、检测快速、无放射危害的常用分析技术, 该方法与免疫、生化分析结合后在生物及医学领域有了更广阔的应用前景。荧光测定法相对于其他化学发光法具有更高的灵敏度, 同时该方法根据激发光谱和发射光谱两种特征光谱来检测目标物质, 具有较强的抗干扰性, 也提高了检测结果的准确性。随着组织光学和成像技术的高速发展, 采用荧光标记物进行肿瘤诊断得到了广泛应用^[20]。本实验的荧光标记化合物与肿瘤细胞结合方法, 能够灵敏、准确地反映出不同细胞对药物的敏感性, 将有助于了解 APN 抑制剂与肿瘤细胞的相互作用, 并可通过示踪观察荧光标记化合物在肿瘤细胞的分布状态, 以探讨 APN 抑制剂的作用机制, 为深入研究该类化合物提供可能的新型手段。

4 结论

标记化合物 FITC-LYRM03、FITC-Bestatin 和肿瘤细胞的结合与对肿瘤细胞的氨肽酶 N 抑制活性相一致, LYRM03 有望作为氨肽酶 N 抑制剂成为新的抗肿瘤药物。

参考文献(References)

- [1] Look A-T, Ashmun R-A, Shapiro L-H, et al. Human myeloid plasma membrane glycoprotein CD13 (gp150) is identical to aminopeptidase N[J]. J Clin Invest, 1989, 83(4): 1299-1307
- [2] Bhagwat S-V, Lahdenranta J, Giordano R, et al. CD13/APN is activated by angiogenic signals and is essential for capillary tube formation[J]. Blood, 2001, 97(3): 652-659
- [3] Pasqualini R, Koivunen E, Kain R, et al. Aminopeptidase N is a receptor for tumor-homing peptides and a target for inhibiting angiogenesis[J]. Cancer research, 2000, 60(3): 722-727

- [4] Held-Warmkessel J. Hot topics in colorectal cancer for the oncology APN[J]. ONS Connect, 2007, 22(8 Suppl): 49-50
- [5] Saiki I, Murata J, Watanabe K, et al. Inhibition of tumor cell invasion by ubenimex (bestatin) in vitro[J]. Jpn J Cancer Res, 1989, 80(9): 873-878
- [6] ossain M, Banik N-L, Ray S-K. Synergistic anti-cancer mechanisms of curcumin and paclitaxel for growth inhibition of human brain tumor stem cells and LN18 and U138MG cells [J]. Neurochem Int, 2012, 61(7): 1102-1113
- [7] Rao M, Li Q, Feng L, etc. A new aminopeptidase inhibitor from Streptomyces strain HCCB10043 found by UPLC-MS [J]. Anal Bioanal Chem, 2011, 401(2): 699-706
- [8] 黄晓峰, 张远强, 张英起. 荧光探针技术[J]. 北京: 人民军医出版社, 2004
- [9] 郁美娟, 孟庆华, 任吉存, 等. 基于生命体系中氨基酸键合标记的荧光探针研究进展[J]. 染料与染色, 2004, 41(3): 137-144
- [10] Lejczak B, Kafarski P, Zygmunt J. Inhibition of aminopeptidases by aminophosphonates[J]. Biochemistry, 1989, 28(8): 3549-3555
- [11] Pfeleiderer G, Celliers P-G. Isolation of an Aminopeptidase from Kidney Particles[J]. Biochem Z, 1963, 339186-339189
- [12] Firla B, Arndt M, Frank K, et al. Extracellular cysteines define ectopeptidase (APN, CD13) expression and function[J]. Free Radic Biol Med, 2002, 32(7): 584-595
- [13] Riemann D, Kehlen A, Langner J. CD13-not just a marker in leukemia typing[J]. Immunology today, 1999, 20(2): 83-88
- [14] Bhagwat S V, Petrovic N, Okamoto Y, et al. The angiogenic regulator CD13/APN is a transcriptional target of Ras signaling pathways in endothelial morphogenesis[J]. Blood, 2003, 101(5): 1818-1826
- [15] Petrovic N, Bhagwat S V, Ratzan W J, et al. CD13/APN transcription is induced by RAS/MAPK-mediated phosphorylation of Ets-2 in activated endothelial cells [J]. The Journal of biological chemistry, 2003, 278(49): 49358-49368
- [16] Tokuhara T, Hattori N, Ishida H, et al. Clinical significance of aminopeptidase N in non-small cell lung cancer[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(13): 3971-3978
- [17] Mathe G. Bestatin, an aminopeptidase inhibitor with a multi-pharmacological function[J]. Biomed Pharmacother, 1991, 45(2-3): 49-54
- [18] Chang Y-W, Chen S-C, Cheng E-C, et al. CD13 (aminopeptidase N) can associate with tumor-associated antigen L6 and enhance the motility of human lung cancer cells [J]. International journal of cancer Journal international du cancer, 2005, 116(2): 243-252
- [19] Tsukamoto H, Shibata K, Kajiyama H, et al. Aminopeptidase N (APN)/CD13 inhibitor, Ubenimex, enhances radiation sensitivity in human cervical cancer[J]. BMC Cancer, 2008, 874
- [20] Frimberger D, Schneede P, Hungerhuber E, et al. Autofluorescence and 5-aminolevulinic acid induced fluorescence diagnosis of penile carcinoma-new techniques to monitor Nd:YAG laser therapy[J]. Urol Res, 2002, 30(5): 295-300