

噬菌体展示肽库技术在胃癌研究与治疗中的进展

刘芳远, 苏秀兰*

(内蒙古医科大学附属医院 临床医学研究中心, 内蒙古 呼和浩特 010050)

摘要: 胃癌是我国最常见的消化道肿瘤之一。近几年,胃癌早期诊断以及低副作用的有效治疗已经成为研究人员重点关注的方向和领域。噬菌体展示肽库技术(PDL)作为分析蛋白质之间相互作用的有效方法,具有简便、高效、高通量等优点,这使得PDL在胃癌的诊断检测和靶向治疗领域展示出了极大的研究价值和潜力。本文就目前PDL技术在胃癌诊断和治疗领域中的研究进展进行综述。

关键词: 胃癌;噬菌体展示肽库;靶向治疗

中图分类号: R573

文献标识码: A

文章编号: 2095-512X(2020)05-0548-05

PROGRESS OF PHAGE DISPLAY LIBRARY IN THE STUDY AND THERAPY OF GASTRIC CANCER

Liu Fang-yuan, Su Xiu-lan

(Research Center for Clinical Medicine, The Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010050 China)

Abstract: Gastric cancer is one of the most common deadly tumors in China. Researches on gastric cancer mainly focus on early diagnosis and effective treatment with low side effects. Phage display library technology (PDL), as an efficient and convenient tool for studying the interaction mechanism between proteins, has a great prospect in the field of early diagnosis and targeted therapy of gastric cancer. In this review, we will focus on the progress and application of the detection and treatment in gastric cancer.

Key words: gastric cancer; phage display library; targeted therapy

胃癌(gastric cancer)是全世界高发的恶性消化道肿瘤之一,在我国,胃癌的发病率和死亡率一直处于较高水平,且病人预后较差^[1]。近几年,探索胃癌灵敏而特异的早期诊断手段,研发低副作用的治疗方法,在肿瘤靶向治疗中具有十分重要的意义。噬菌体展示肽库技术(phage display library, PDL)是作为一种靶向肽研发的常用方法,已经广泛应用于肿瘤靶向治疗领域,尤其在单克隆抗体制备、蛋白质特异性结合研究、肿瘤抗原筛选及识别等领域均取得诸多进展^[2,3]。目前,许多肿瘤标记物的特异性结合肽已经被筛选出来,这些多肽已经用于肿瘤早期筛查和检测。

1 噬菌体肽库简介及其筛选原理

作为一种能够侵染细菌的病毒,噬菌体能够进入宿主菌内部完成复制并在宿主菌内部表达所携带的遗传物质。一些噬菌体,如M13噬菌体和FD噬菌体,都是良好的基因表达载体,已经被广泛应用于分子生物学和遗传学实验当中。1985年,Smith等人^[4]将限制性内切酶EcoRI编码基因的一段片段序列插入到丝状噬菌体外壳蛋白的基因序列后,将重组后的丝状噬菌体感染进细菌内部并进行扩增,最终获得了基因片段序列编码的蛋白。1990年,Scoot等人^[5]将编码多肽的随机基因片段与丝状

收稿日期: 2020-04-27;修回日期: 2020-09-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(81960560)

作者简介: 刘芳远(1989-),男,内蒙古医科大学附属医院临床医学研究中心实习研究员。

通讯作者: 苏秀兰,教授,博士生导师,E-mail: xlsu@sina.com 内蒙古医科大学附属医院临床医学研究中心,010050

噬菌体表面蛋白基因相融合,通过一系列转染流程后使多肽序列最终通过噬菌体表面表达出来,首次发明了PDL。利用特定的靶分子筛选噬菌体肽库,研究者找到与其特异性结合的噬菌体,从而得到与

之结合的蛋白质和多肽的编码基因。与传统抗体生产方式相比,PDL技术具有更加简单、稳定且高效的优点^[6](见表1)。

表1 不同抗体制备方法比较
Tab.1 Comparison of different antibody preparations

方法	免疫血清	杂交瘤技术	噬菌体展示肽库技术
抗体形式	多克隆抗体	单克隆抗体	单克隆基因组重组抗体
宿主细胞	无	杂交瘤	细菌
筛选范围	无	0 ~ 10 ³	10 ⁷ ~ 10 ⁹
操作	简单	复杂	相对简单
免疫	几个月	几个月	几周
生产量	有限	有限	无限
人源抗体	否	否	可以

PDL技术的原理是将指定的外源基因片段插入到编码噬菌体蛋白外壳的基因阅读框中,在不影响蛋白外壳编码基因自身正常表达的前提下,使植入的外源基因随着编码外壳蛋白的基因共同表达出来,这样,外源基因编码的多肽能够以融合蛋白的形式出现在噬菌体的蛋白外壳表面^[7]。不仅如此,由于蛋白质相互作用的独立性和特异性,被展示的外源蛋白能够较为完整地保持独立的结构和生物学功能。基于上述特点,PDL技术被广泛应用于探索受体与配体相互作用的研究,以及筛选高特异性和高亲和力的配体分子^[8]。噬菌体在插入外源基因片段的完成构建后,首先会将其与药物靶蛋白共同孵育一段是假案,通过这一过程能够洗去未能与药物靶蛋白充分结合的噬菌体,从而完成初步筛选。接下来,再使用竞争性的受体与药物靶蛋白进行结合,进一步淘汰掉吸附不足的噬菌体,这样经过洗脱和筛选淘汰后得到的噬菌体,具有更强的同药物靶蛋白结合的能力。随后重组的噬菌体感染到宿主菌内部进行繁殖和扩增,扩增后得到的新噬菌体再进行新一轮洗脱和淘筛流程。经过2~3轮的“吸附-洗脱-扩增”循环后(对于某些亲和力弱的抗体需经过更多轮的循环),便能得到与药物靶蛋白高度结合的特异性噬菌体(见图1)。

2 PDL技术在癌症研究中的进展

癌细胞具有增殖快,易侵袭等特点,针对癌细胞的化学药物治疗往往具有一定的毒副作用,利用PDL技术研发的抗癌多肽类药物可以改善这一问

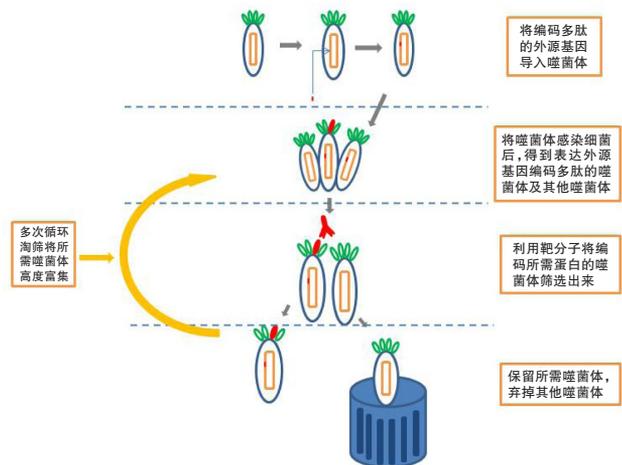


图1 噬菌体展示肽库的筛选流程
Fig.1 Screening process of phage display peptide library

题。常见的抗癌多肽类药物开发模式是首先利用PDL技术筛选肿瘤细胞抗原表位特异性结合的多肽,将该多肽与癌症治疗药物偶联后,直接靶向作用于肿瘤细胞或肿瘤组织^[9]。这种抗癌多肽类药物不仅靶向准确度高,还可以调节药物浓度,降低药物副作用^[10]。如果将荧光基团与这些特异性结合多肽进行结合,新形成的荧光性多肽也可以用于早期癌症筛查和肿瘤病变部位检测。

最早的抗癌多肽类药物研发主要针对肝癌领域,先后有人利用PDL技术筛选得到了肝癌细胞表位肽 HCBP1 (FQHPSFI)^[11], 肝细胞癌抗体结合肽 XC24p11^[12]和肝癌血清标记结合肽 HC1 (RGW-CRPLPKGEG)^[13],这些多肽均可以用于识别肿瘤表面标记的识别,从而能被开发为肽探针用于癌症早

期诊断。Shen^[14]通过PDL技术从15肽库中筛选出了两种对前列腺癌特异性膜抗原(prostate specific membrane antigen, PSMA)具有高度亲和力的562肽(SHSFSVGS GDHSPFT)和563肽(GRFLTGGTGRLL-RIS),这两种多肽可以进一步用于开发前列腺癌的成像检测和免疫治疗的靶点。

除了能与肿瘤细胞表面结合的短肽以外, Li等^[15]研发出了可以进入肝癌细胞的穿透多肽,这种多肽大幅提高了肿瘤靶向治疗药物进入细胞内的效率,从而有助于提高药物的治疗效果。随后他们将其与放射性荧光素结合后发现,穿透多肽还可以用于肿瘤的定位检测,并且具备极高的灵敏度和精确度。

人血管内皮生长因子受体3(VEGFR3)的异常表达对肿瘤具有促进作用,因此成为了肿瘤靶向治疗的候选靶点。Qin等人通过PDL技术筛选得到了与VEGF3具有高亲和力的P1肽(CSDSWHYWC),并且发现P1肽可以作为肿瘤治疗的潜在药物载体^[16]。BUSSOLATI将来源于人肾癌的血管内皮细胞注射在裸鼠皮下,利用PDL技术筛选出能够与肾癌血管内皮细胞特异性结合的多肽BB1(CVGN DNSSC),将BB1与皂草素耦合后注入小鼠体内后发现,BB1-皂草素会选择性的破坏人肾癌血管内皮细胞而不损害小鼠体内的正常细胞,这一发现表明BB1能够作为抗肿瘤血管生成剂的运载工具^[17]。Hou等人^[18]通过PDL技术筛选出一种可以与结肠癌肿瘤细胞特异性结合的多肽SBP-DWS(DWSSWVYRDPQT),这种多肽可以靶向作用于Glypican-3,被认为能够用于开发结肠癌的检测探针和治疗药物载体。Li等人^[19]利用M13噬菌体肽库中筛选得到了多肽CPS3,并成功利用CPS3制备了包含阿霉素和miRNA101表达质粒的脂质体药物传递载体(CSP3-Lipo-DOX-miR101)。该载体对宫颈癌Siha细胞具有良好的作用效果,表明CPS3具有能够作为宫颈癌靶向药物载体的潜力。

此外,还有研究人员利用PDL技术对肿瘤病人血清进行筛选,并发现几种特异性多肽,用于癌症检测与治疗。Mintz利用PDL技术对前列腺癌病人血清抗体进行筛选后,成功获得了特异性多肽(CNVSDKSC),肽与前列腺癌病人血清能够特异性结合^[20]。苏荣也对结肠癌病人血清和正常人血清进行比对后,筛选出了结肠癌病人血清中的特有序列^[21]。

3 PDI技术在胃癌领域的研究

由于PDL技术可以筛选到与肿瘤表面标记物其特异性结合的多肽,使得这种技术在癌症诊断和靶向治疗方面都具有极高的应用潜力。近些年,利用PDL技术对胃癌进行的研究不断增多,尤其在早期检测和靶向治疗方面均取得了诸多进展。

3.1 胃癌早期检测

在胃癌病人体内的血管内皮细胞、外膜细胞、平滑肌细胞及细胞外基质中,通常会表达某些十分稀少且难以检测的分子标记物,PDL技术可以利用多肽特异性结合的能力,提高治疗效率并减少传统方法带来的副作用^[22]。Sarhin^[23]利用PDL技术筛选出两种MKN-45细胞特异性结合的多肽DE532(VETSQYFRG TLS)和DE-Obs(HNDLFPSWYHNY),这两种肽可以作为胃癌研究诊断和治疗药物的潜在载体。余明军等人^[23]利用PDL技术筛选出能与胃癌BGC823细胞特异性结合的十二肽GC11(GSLLP TESRPWH)。Zhang等人^[24]同样筛选获得了可以与胃癌细胞特异性结合的多肽AAD(AAD-NAKTKSFPV)。这两种多肽均可用于胃癌组织与正常胃粘膜组织的鉴别,为早期内镜检测胃癌提供了可能。Han等人^[25]则鉴定出一种12肽GP5(IHK-DKNAPSLVP),这种肽对胃癌细胞具有极高的灵敏度和特异性,表明GP5可以作为胃癌检测和靶向治疗的潜在工具。

3.2 胃癌靶向治疗

目前,基于细胞水平上的靶向治疗已经成为胃癌治疗的有效手段之一。利用PDL技术筛选出的多肽可以偶合靶向治疗药物,不仅能够调节药物浓度,还能精准作用于癌细胞,减少副作用。白飞虎等人通过3轮淘筛后筛选出了多肽(SMSSIASPYIA-LE),这种多肽能够与人胃癌细胞GC9811和腹膜高转移亚系细胞GC9811-P进行特异性结合,为后续研发靶向药物提供了基础。Zhang等人通过筛选PDL技术开发了可用于胃癌检测的多肽探针RP1,RP1多肽对胃癌细胞CD44蛋白表现出高度的亲和力和特异性,可以被用作胃癌细胞靶向治疗的候选探针。Chen等人利用PDL技术成功合成并筛选到了环七肽GX1(CGNSNP KSC),进一步的实验结果表明GX1对胃癌的血管内皮细胞具有良好的靶向性和特异性,并且对胃癌的血管生成具有一定的抑制作用。Nakayama等筛选出了多肽KLP(SWKLP PS),KLP肽极易与来自胃癌复发病人的恶性腹水中的癌细胞结合,同时含有基序KLP的合成肽也显示出对腹膜肿瘤的结合活性,此外还发现用

KLP多肽修饰脂质体能够增强阿霉素对胃癌细胞的抗肿瘤活性。

3.3 胃癌抗肿瘤疫苗研发

由于利用PDL技术筛选的多肽能够特异性识别并结合肿瘤细胞表面的分子标记物,因此该技术为恶性肿瘤疫苗研制提供了广阔的前景。肿瘤细胞表面的抗原是疫苗研究的重要靶向目标,由于PDL技术在筛选配体方面的独特优势,极大的推动了肿瘤疫苗研发的进展。相比于传统疫苗,PDL技术筛选得到的抗原表位疫苗,由于保留了多肽本身的天然构象,所以更容易被抗原提呈细胞摄取,从而诱发免疫应答反应。Deng课题组首先利用单克隆抗体GF22结合PDL技术筛选出了碱性纤维细胞生长因子(bFGF)的模拟肽LPGHFK,并发现该模拟肽引发的抗bFGF反应比GF22效果更加明显;随后该课题组又利用PDL技术筛选了获得bFGF抗原表位模拟肽T3(AMKEDGRLLASKCVTD),两种模拟肽在内皮细胞增殖、肿瘤血管生成、肿瘤细胞增殖和迁移过程中均具有明显的抑制作用,可用于肿瘤疫苗研发和靶向药物载体。由于机体免疫机制的复杂性,肿瘤疫苗的研究还需要更多的工作。

4 前景与展望

PDL技术以其高通量、便捷灵活的技术特点,在许多领域都得到的广泛的应用,尤其在肿瘤靶向治疗领域,具有非常理想的实用性。随着PDL技术筛选靶标范围的扩展及筛选方法的改进,将有高亲和力和高特异性的多肽被筛选出来,如何将这些多肽应用于临床治疗,需要进一步的实验证明和临床验证。但是无论怎样,PDL技术都已经在肿瘤诊断和靶向治疗领域体现出了巨大的研究价值和潜力。

参考文献

- [1]GAO K, WU J. National trend of gastric cancer mortality in China (2003–2015): a population-based study [J]. *Cancer communications*, 2019; **39**(1): 24
- [2]LIU R, LI X, XIAO W, et al. Tumor-targeting peptides from combinatorial libraries [J]. *Advanced drug delivery reviews*, 2017; **110–111**: 13–37
- [3]ZHANG D, JIA H, WANG Y, et al. A CD44 specific peptide developed by phage display for targeting gastric cancer [J]. *Biotechnology letters*, 2015; **37**(11): 2311–20
- [4]SMITH G P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface [J]. *Science*, 1985; **228**(4705): 1315–7
- [5]SCOTT J K, SMITH G P. Searching for peptide ligands with an epitope library [J]. *Science*, 1990; **249**(4967): 386–90
- [6]FUKUDA M N. Peptide-displaying phage technology in glyco biology [J]. *Glycobiology*, 2012; **22**(3): 318–25
- [7]WILLATS W G. Phage display: practicalities and prospects [J]. *Plant molecular biology*, 2002; **50**(6): 837–54
- [8]BRATKOVIC T. Progress in phage display: evolution of the technique and its application [J]. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 2010; **67**(5): 749–67
- [9]HE B, CHEN H, LI N, et al. SAROTUP: a suite of tools for finding potential target-unrelated peptides from phage display data [J]. *International journal of biological sciences*, 2019; **15**(7): 1452–9
- [10]RAJARAMK, VERMEERENV, SOMERSK, et al. Construction of helper plasmid-mediated dual-display phage for autoantibody screening in serum [J]. *Applied microbiology and biotechnology*, 2014; **98**(14): 6365–73
- [11]ZHANG B, ZHANG Y, WANG J, et al. Screening and identification of a targeting peptide to hepatocarcinoma from a phage display peptide library [J]. *Molecular medicine*, 2007; **13**(5–6): 246–54
- [12]HWANG H M, HEO C K, LEE H J, et al. Identification of anti-SF3B1 autoantibody as a diagnostic marker in patients with hepatocellular carcinoma [J]. *Journal of translational medicine*, 2018; **16**(1): 177
- [13]ZHANG Z, XU L, WANG Z. Screening serum biomarkers for early primary hepatocellular carcinoma using a phage display technique [J]. *Journal of clinical laboratory analysis*, 2011; **25**(6): 402–8
- [14]SHEN D, XIE F, EDWARDS W B. Evaluation of phage display discovered peptides as ligands for prostate-specific membrane antigen (PSMA) [J]. *PloS one*, 2013; **8**(7): e68339
- [15]李晶, 汪磊, 韩红辉, 等. 肝癌细胞特异性内在化肽的筛选和初步鉴定 [J]. *现代免疫学*, 2007; **027**(1): 23–6
- [16]QIN X, WAN Y, LI M, et al. Identification of a novel peptide ligand of human vascular endothelial growth factor receptor 3 for targeted tumour diagnosis and therapy [J]. *Journal of biochemistry*, 2007; **142**(1): 79–85
- [17]BUSSOLATI B, GRANGE C, TEI L, et al. Targeting of human renal tumor-derived endothelial cells with peptides obtained by phage display [J]. *Journal of molecular medicine*, 2007; **85**(8): 897–906
- [18]HOU L, ZHU D, LIANG Y, et al. Identification of a specific peptide binding to colon cancer cells from a phage-displayed peptide library [J]. *British journal of cancer*, 2018; **118**(1): 79–87
- [19]XIAO L, MA N, HE H, et al. Development of a novel drug targeting delivery system for cervical cancer therapy [J]. *Nano*

- technology, 2019;30(7): 075604
- [20]MINTZ P J, KIM J, DO K A, et al. Fingerprinting the circulating repertoire of antibodies from cancer patients [J]. Nature biotechnology, 2003;21(1): 57-63
- [21]苏荣,李秀萍,靳更林,等.应用噬菌体随机肽库筛选结肠癌患者血清中的肿瘤标记物的研究[J].宁夏医学杂志,2006;2: 8-10
- [22]SAHIN D, TAFLAN S O, YARTAS G, et al. Screening and Identification of Peptides Specifically Targeted to Gastric Cancer Cells from a Phage Display Peptide Library [J]. Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP, 2018;19(4): 927-32
- [23]余明军,孙学军,禄韶英,等.噬菌体随机十二肽库淘选及鉴定胃癌特异性结合肽[J].中国普外基础与临床杂志,2010;017(010): 1050-5
- [24]ZHANG W J, SUI Y X, BUDHA A, et al. Affinity peptide developed by phage display selection for targeting gastric cancer [J]. World journal of gastroenterology, 2012; 18(17): 2053-60
- [25]HAN J, GAO X, DUAN W, et al. The further characterization of the peptide specifically binding to gastric cancer [J]. Molecular and cellular probes, 2016;30(3): 125-31

(上接第 521 页)

病毒感染关系密切,病理基础为急性炎症、黏膜水肿、黏液分泌量多、呼吸道阻塞等,治疗目的在于改善通气,消除炎症,控制症状。目前临床尚无足够的证据支持支气管扩张剂治疗肺炎具有积极意义,一般不建议将支气管扩张剂作为常规治疗方案,但针对合并过敏、哮喘的患儿可能有效,但临床用药普遍存在联合用药、过度使用支气管扩张剂的情况。激素类药物也是常用的治疗肺炎的药物,但长期应用可能存在安全问题,但本次调查结果发现临床治疗肺炎疾病中广泛存在使用激素药物的情况。调查结果显示第 1 代、第 2 代头孢菌素使用率相对较高,但过度使用抗菌药物可能增加不良反应风险。146 例肺炎患儿的临床治疗,开具用药医嘱 395 条;其中合理医嘱 305 条(77.22%),不合理医嘱 90 条(22.78%);分析原因发现,临床针对儿童肺炎传统经验治疗方案为联合抗菌药物与抗病毒药物,该方案疗效明显,但是因儿童机体肝肾功能发育不完全,可能存在不合理用药现象,此外部分糖皮质激素不可单独用于治疗病毒性肺炎,部分药物不可长期应用,总之儿童肺炎临床用药治疗中存在一定不合理用药现象,针对该情况临床需加强用药监督与点评干预,减少不合理用药现象^[9,10]。

综上所述,调查结果显示临床治疗肺炎存在过度用药的情况,尤其是支气管扩张剂、激素、抗菌药物、抗病毒药物等,因此为提高用药安全,规范治疗,减少滥用药物意义重大;儿童肺炎患者不合理用药的主要原因为品种选择不合理、联合用药不合理等,临床需要加强医嘱前的审核,减少不合理医嘱。

参考文献

- [1]成美,凌柏,卞海林,等.2016年至2017年某院儿科住院患儿超说明书用药调查分析[J].中国药业,2018;27(17):89-92
- [2]刘建红,喻佳洁,谢勇,等.采用循证药学干预后住院支气管肺炎患儿的用药合理性分析[J].中国医药,2018;13(11): 1646-1650
- [3] Qiu JL, Huang L, Shao MY, et al. Efficacy and safety of azithromycin combined with glucocorticoid on refractory *Mycoplasma pneumoniae pneumonia* in children: A PRISMA-compliant systematic review and meta-analysis[J]. Medicine (Baltimore), 2020;99(22):e20121
- [4]杨福双,高法,谭田慧,等.基于数据挖掘的中医药治疗小儿肺炎组方用药规律研究[J].中国中药杂志,2020;45(8): 1942-1947
- [5]方思晓,杨悦.小儿急性支气管肺炎临床用药分析[J].中国药物警戒,2018;15(12):746-763
- [6] Zheng B, Zhao J, Cao L. The clinical characteristics and risk factors for necrotizing pneumonia caused by *Mycoplasma pneumoniae* in children[J]. BMC Infect Dis, 2020;20(1):391
- [7]周鸿良,朱彤,沈佩芳.小儿肺炎患者院感病原菌检测、耐药性及其防治措施[J].中国卫生检验杂志,2019;29(6): 737-739
- [8]庄日蒸.联合用药对小儿难治性支原体肺炎的疗效[J].中国卫生标准管理,2019;21(10):81-83
- [9] Wang H, Lu Z, Bao Y, et al. Clinical diagnostic application of metagenomic next-generation sequencing in children with severe nonresponding pneumonia[J]. PLoS One, 2020;15(6):e0232610
- [10]陈晨,黄旭强,赵丹洋,等.2014-2018年患儿肺炎支原体耐药调查分析[J].中华医院感染学杂志,2019;29(12):1850-1855