

人源性双亲性穿膜肽 PKV14 的合成及其对 BHK-21 细胞的影响

陈莹¹, 宋金春¹, 刘岩松^{2*}

1. 武汉大学人民医院 药学部, 湖北 武汉 430060

2. 武汉回盛生物科技股份有限公司, 湖北 武汉 430000

摘要: 目的 合成人源性双亲性穿膜肽 RRTLRRRRRAAQRCG (PKV14), 并研究其细胞穿膜效果和对细胞活性的影响。方法 采用固相合成法合成 PKV14, 采用高效液相色谱和质谱对 PKV14 进行验证, 使用荧光显微镜和酶标仪观察 PKV14 在 BHK-21 细胞系中的穿膜效果, 采用 MTT 实验法检测 PKV14 的细胞毒性。结果 合成了 PKV14 肽段, 并且 PKV14 对于 BHK-21 细胞系的穿膜效率极高, 细胞毒性实验表明 PKV14 对 BHK-21 细胞活性无影响。结论 PKV14 是具有高穿膜活性, 安全低毒的新型人源性细胞穿膜肽, 有作为药物载体的潜力。

关键词: 人源性双亲性穿膜肽; PKV14; 穿膜活性; BHK-21 细胞

中图分类号: R914.2; R966 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2018)10-2482-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2018.10.003

Synthesis of human-derived amphipathic cell-penetrating peptide PKV14 and effect on BHK-21 cell

CHEN Ying¹, SONG Jin-chun¹, LIU Yan-song²

1. Department of Pharmacy, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China

2. HVSEN Biotech Co., Ltd, Wuhan 430000, China

Abstract: Objective To synthesize the human-derived amphipathic cell-penetrating peptide RRTLRRRRRAAQRCG (PKV14), and investigate the effect on cell membrane penetration and its cytotoxicity. **Methods** PKV14 was synthesized by a solid-phase peptide synthesis. HPLC and MS analysis methods were applied to identifying its structure. The penetrating effects of PKV14 in BHK-21 cells were tested by fluorescence microscopy and microplate reader. The cytotoxicity of PKV14 was tested by MTT method. **Results** PKV14 was synthesized successfully and it was confirmed that PKV14 had a very high penetrating efficiency in BHK-21 cells. Cytotoxicity test showed that PKV14 had no effect on the activity of BHK-21 cells. **Conclusion** PKV14 is a novel human cell penetrating peptide with high penetrating activity, safety, and low toxicity which has potential as a drug carrier.

Key words: human-derived amphipathic cell-penetrating peptide; PKV14; cell membrane penetration; BHK-21 cell

机体细胞膜屏障仅仅允许相对分子质量小于 600 的非脂溶性分子进入活细胞^[1], 虽对机体有重要的保护作用, 但也使许多有应用前景的药物被摒弃。细胞穿膜肽是一些小于 30 个氨基酸的短肽, 能够携带相对分子质量比自身大许多倍的分子进入细胞^[2]。Green 和 Frankel 首次观察到来自 HIV-1 反式激活因子的 TAT 序列可以被不同类型的细胞高效吸收^[3-4], 但由于来源于病毒的 TAT 在临床因安全性方面存在风险, 人源性的穿膜肽不断受到人们的

关注。细胞穿膜肽有多种分类方式, 根据理化性质可以分为阳离子、双亲性和疏水性穿膜肽^[5]。双亲性穿膜肽具有亲水性的 N 端和疏水性的 C 端。一些双亲性穿膜肽是从天然蛋白质中分离出来的, 如 pVEC^[6]、ARF(1-22)^[7]、bPrPp (1-28)^[8]。通过对人类蛋白质数据库进行检索分析发现人类的 3-磷酸肌醇依赖蛋白激酶 1 突变体 (3-phosphoinositide dependent protein kinase-1 variant) 的一段长 14 个氨基酸的短肽 PKV14 (RRTLRRRRRAAQRCG) 具有

收稿日期: 2018-02-27

基金项目: 湖北省卫生计生委青年人才项目 (WJ2017Q006)

作者简介: 陈莹 (1986—), 女, 主管药师, 博士, 研究方向为临床药学。Tel: (027)88041911-88381 E-mail: chenyy@whu.edu.cn

*通信作者 刘岩松, 男, 工程师, 博士, 从事多肽及蛋白研究。Tel: (027)83235399 E-mail: afoost@126.com

双亲性,推测该段短肽可能是一个新型的具有自主穿膜功能的人源性双亲性穿膜肽。因此本研究采用固相合成的方法合成人源性双亲性穿膜肽 PKV14 (RRTLRRRRAAQRCG),并探讨其细胞穿膜效果和对细胞活性的影响。

1 材料

1.1 试剂和耗材

Fmoc-Gly-Wang树脂(批号40901)、Fmoc-氨基酸(批号35269)、二氯甲烷(DCM)、六氢吡啶、*N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)、*O*-苯并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸盐(HBTU)(质量分数99%,批号00702)、甲基吗啉(NMM)、茚三酮、三氟乙酸(TFA)、三异丙基硅烷(TIS)(质量分数 $\geq 99\%$,批号91100)、TAT多肽[HIV-1 tat Protein (49-57),批号71312]均购于吉尔生化(上海)有限公司;MTT(批号ST316)购于上海碧云天生物技术有限公司;乙腈(高效液相色谱纯,美国Tedia Chemical),除特殊说明外,其余所有试剂均为分析纯。胎牛血清(货号SV30087,美国Hyclone公司);DMEM高糖培养液(货号SH30022.01,美国Hyclone公司);细胞培养相关器皿均购于美国Corning公司。

1.2 质粒和细胞

BHK-21 细胞株购于武汉普诺赛生命科技有限公司;Lipofectamine® 2000(货号11668027)购于美国 Thermo Fisher 公司;pEGFP 质粒(批号MLCC024)购于武汉淼灵生物科技有限公司。

1.3 仪器和设备

Waters 2000 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司);Agilent6410 质谱仪(美国 Agilent 公司);倒置荧光显微镜(德国 Leica 公司);ELX800 酶标仪(美国 BioTeK 公司)。

2 方法和结果

2.1 人源性双亲性穿膜肽 PKV14 的合成

称取 1 g Fmoc-Gly-Wang 树脂倒入反应柱中,加入 5 mL 无水 DCM 浸泡 30 min,使树脂充分溶胀后抽干;在树脂中加入适量 20%六氢吡啶和 80%DMF 溶液,通氮气搅拌鼓动 30 min 后抽干;向反应柱中加入适量 DMF,氮气鼓动 2 min,抽干,重复此操作 6 次。将 3 倍物质的量的第 2 个 Fmoc 保护的氨基酸和 2.85 倍物质的量的 HBTU(缩合剂)溶于 DMF,随后加入反应柱中,再加入 6 倍树脂物质的量的 NMM,氮气搅拌鼓动反应 30 min。取少许样品采用茚三酮法检测,颜色透明即表示连接成

功。将反应柱中的溶液抽干,加入适量 DMF 洗涤,氮气鼓动 2 min,抽干,重复操作 3 次;反复上述操作直至连上多肽链最后 1 个氨基酸;将干燥后的树脂装入合适的离心管中,加入适量切割液(95%TFA+2%TIS+3% H_2O),在 25 °C 恒温条件下机械搅拌 2 h,进行切割;将上述液体滤过,用 TFA 洗涤再滤过,将滤液全部收集到烧瓶中,加入 10 倍体积的冰无水乙醇,放置 2 h 后经高速(12 000 r/min)离心得到所需多肽粗品 290 mg,得率为 29%。

2.2 人源性双亲性穿膜肽 PKV14 的表征和鉴定

采用高效液相色谱法和质谱法对粗肽进行分离和分子结构鉴定。

色谱条件:Kromasil 100-5 C_{18} 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm);流动相 A 为 0.1% TFA 乙腈溶液;流动相 B 为 0.1% TFA 水溶液;25 min 内流动相 A 由 10%~100%梯度洗脱,体积流量为 1 mL/min,检测波长为 220 nm。对收集的主峰分子进行质谱鉴定,质谱检测条件为:电喷雾电离(ESI)模式;曲形脱溶剂装置(CDL)温度为 250 °C;加热模块温度为 200 °C;探针电压 4.5 kV;检测器电压 1.5 kV;CDL 电压-20 V;雾化气体积流量 2.0 L/min;流动相体积流量 0.2 mL/min,采用全离子扫描模式,扫描范围 m/z 400~1 500。在上述色谱条件下,穿膜肽的保留时间在 9.5 min 左右,色谱峰呈对称性,峰面积较大;杂质峰保留时间为 9.1 min,峰面积基本可以忽略不计。根据峰面积计算得合成的穿膜肽质量分数为 98.96%。

为了进一步验证合成的穿膜肽结构,采用质谱法对其相对分子质量进行了检测。在正离子模式下, m/z 400~1 500 扫描范围内出现了 m/z 440.44($[M+4H]^{4+}$)、586.49($[M+3H]^{3+}$)、879.39($[M+2H]^{2+}$) 3 个离子峰,推测为穿膜肽的 3 个碎片离子。根据碎片离子峰的质荷比,计算出穿膜肽相对分子质量为 1 756.08,与 PKV14 理论相对分子质量 1 756.06 一致,因此可以证明合成的穿膜肽即为 PKV14。

2.3 PKV14 与质粒 pEGFP 非共价结合的 N/P 比优化

合成的穿膜肽 PKV14 为双亲性穿膜肽,因此应用非共价结合法可实现核酸和蛋白质等生物活性大分子的胞内递送,并保留其生物活性。将 PKV14 与含有绿色荧光蛋白基因的表达式质粒 pEGFP 按 0、10、20、40、80 的 N/P 比混合,37 °C 条件下孵育 30 min 后,将上述混合液进行琼脂糖电泳实验确定最优 N/P 比,见图 1。

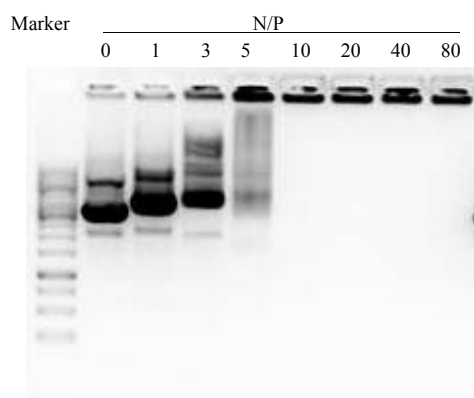


图 1 不同 N/P 条件下 PKV14 与质粒 DNA 复合物的电泳图
Fig. 1 Electrophorogram of PKV14 and plasmid DNA complexes under different N/P conditions

第一条带为标准条带 DNA Marker S Plus (100~5 000 bp)。在 $N/P < 5$ 时, PKV14 和质粒 DNA 的复合物条带、亮度与裸 DNA 相差不多或有少量滞留在起点, 表明在该比例下质粒 pEGFP 未被包裹完全, 依然带有电荷, 能发生移动; 当 $N/P = 5$ 时, 复合物泳道中几乎无亮带出现, 亮带出现在起点, 表明 PKV14 能够将质粒 DNA 基本包裹完全, 复合物所带电荷被抵消, 基本滞留在起点, 不会发生外加电场的静电破坏作用; 当 $N/P > 5$ 时, 包裹程度更加完全。

2.4 PKV14 对 BHK-21 细胞的穿膜实验

采用荧光显微镜检测 PKV14 对 BHK21 细胞的穿膜活性。

2.4.1 不同孵育时间对穿膜效率的影响 取对数生长期的乳仓鼠肾细胞 (BHK-21) 以 5×10^4 /孔接种于 12 孔板, 在 37°C , 5% CO_2 培养箱中培养, 待细胞长至 80%~90% 汇合时吸弃培养板中的旧培养液, 用没有血清的培养基洗两次, 在 12 孔板中分别加入含 N/P 比为 0、10、20、40、80 的 PKV14 和质粒 pEGFP 复合物的培养基, TAT 对照组按照上述同样条件处理, Lipofectamine® 2000 作为阳性对照组, 其处理方法按照说明书进行。培养 6 h 后去掉培养基, 并加入含 10% 胎牛血清的新鲜培养基, 分别在 1、2、3、4 h 后采用荧光倒置显微镜观察转染结果, 记录 CCD 图像。此外, BHK-21 细胞经上述处理经酶标仪检测, 得到荧光定量结果, 见图 2。

在分别经过 1~4 h 孵育后的时间节点观察得到, PKV14 与质粒 DNA 结合 N/P 比在 10、20、40、80 时, 其荧光强度随着时间的增加而逐渐增强。在

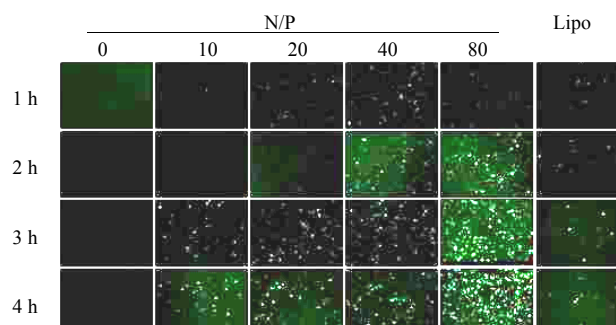


图 2 不同时间条件下 PKV14 对 BHK21 细胞的穿膜活性
Fig. 2 Transduction activity of PKV14 in BHK21 cells after 1 h to 4 h of incubation

4 h 的 BHK-21 细胞系中, PKV14 与质粒 pEGFP 在 N/P 比为 10 的条件下结合时, 在荧光显微镜下能够观察到荧光, 表明其已能将质粒 pEGFP 带入胞内; 当 N/P 比为 20 时, 荧光强度就已高于 Lipofectamine® 2000, 且在 N/P 比为 80 时, 其荧光强度最高, 远远强于 Lipofectamine® 2000。表明 4 h 的孵育时间可以得到最佳的转染效率, 并且 PKV14 的转染效率高于 Lipofectamine® 2000。

2.4.2 PKV14 与 TAT 在 4 h 孵育条件下的转染效率比较 在 PKV14 与质粒 pEGFP N/P 比为 10、20、40、80 时, 其穿膜效率都远远高于 TAT。见图 3。

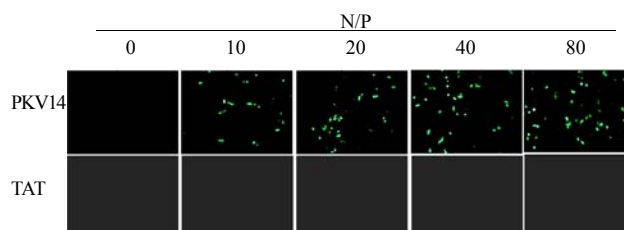


图 3 4 h 孵育条件下 PKV14 和 TAT 对 BHK21 细胞的穿膜活性

Fig. 3 Transduction activity of PKV14 and TAT in BHK21 cells after 4 h of incubation

2.4.3 不同 PKV14 浓度下的荧光强度 将 2.5、5.0、7.5、10.0 $\mu\text{mol/L}$ PKV14 与质粒 pEGFP 结合物及 TAT 加入到 BHK-21 细胞中, 孵育 4 h 后, 经酶标仪检测, 得到各组荧光定量结果, 见表 1。不同浓度 PKV14 与质粒 pEGFP 结合物组的荧光强度均强于 TAT, 且在 10.0 $\mu\text{mol/L}$ 时, 荧光强度最强。

2.5 细胞毒性实验

取对数生长期的 BHK-21 细胞, 以每孔 1×10^4 个细胞接种于 96 孔板, 37°C 条件下 5% CO_2 培养箱

表1 不同浓度条件下的转染荧光强度

Table 1 The fluorescence intensity of PKV14 in BHK-21 cells under different concentration

组别	荧光强度				
	0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	2.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	5.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	7.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	10.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
TAT	0.01×10^5	0.32×10^5	0.79×10^5	0.85×10^5	1.09×10^5
PKV14	0.01×10^5	1.51×10^5	2.76×10^5	3.11×10^5	3.73×10^5

培养 24 h, 使细胞贴壁。培养至对数生长期, 换成无血清的培养液, 继续培养 1 h。配制不同浓度的穿膜肽 PKV14, 同时设置 3 个阴性对照孔、阳性对照孔 (Lipofectamine® 2000), 阳性对照孔按照说明书操作进行实验。37 °C, 5% CO₂ 培养箱培养 1~24 h。孵育时间结束后, 每孔加入 PBS 洗涤。贴壁细胞每孔加入 20 μL 0.5% MTT 溶液, 继续孵育 4~6 h 后弃掉培养液, 每孔加入 150 μL DMSO (二甲基亚

砷), 震荡 10 min。在酶标仪免疫检测仪上测定 490 nm 波长下的光吸收值, 处理数据得到细胞存活率, 结果见表 2。细胞穿膜肽 PKV14 在 0~27 $\mu\text{mol/L}$ 时, 细胞存活率接近 90%, 与阳性对照组无明显差别, 表明 PKV14 安全低毒, 其毒性与 Lipofectamine® 2000 无差别, 且各浓度的毒性变化不大, 无浓度相关性。

$$\text{细胞存活率} = A(\text{实验}) / A(\text{阴性对照})$$

表2 PKV14 的细胞毒性

Table 2 The cytotoxicity of PKV14

组别	细胞存活率/%					
	0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	1.7 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	3.4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	6.8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	13.6 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	27.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
阳性对照	98.0	91.7	96.5	92.4	88.5	89.6
PKV14	100.1	90.3	89.7	90.8	89.5	86.7

3 讨论

目前普遍的将药物、DNA 等导入细胞内的方法有多种, 如电穿孔法^[9]、显微注射法^[10]、成孔蛋白质法^[11]、免疫毒素法^[12]、脂质体包裹法^[13]和病毒载体^[14]等。由于上述方法大多存在对细胞的损伤性、导入率低等缺点, 使许多无生物膜通透性大分子药物在药物应用方面大大受限。相比之下, 细胞穿膜肽的应用大大缓解了上述问题, 因此细胞穿膜肽所研究的药物在国内外均有报道^[15-17]。

检验一个穿膜肽能否作为药物载体的最重要的标准是其能否高效、安全地携带药物分子进入细胞, 发挥生物学效应。但已发现的穿膜肽大多为非人源性的, 在实际应用中会存在免疫反应等问题, 存在较大风险。因此人源性穿膜肽的研究必将成为药物载体研究方面的热点。

本研究通过对人类蛋白质数据库进行检索分析发现了人源双亲性穿膜肽 PKV14, 并采用固相合成法合成了人源性穿膜肽 PKV14, 合成方法、氨基酸连接顺序的固定性保证了人源性穿膜肽 PKV14 合成的准确、可靠。对合成粗品进行提纯, 并应用高

效液相色谱和质谱法分析, 发现其质量分数高达 98.96%, 相对分子质量与理论值基本一致, 表明本方法合成 PKV14 成功。

体外实验发现, PKV14 与质粒 pEGFP 在 N/P 比为 5 时就能够较好地以非共价的方式结合, 表明 PKV14 的包裹性较强。通过荧光显微镜检测发现, 在 N/P 比为 10 时, PKV14 携带质粒 pEGFP 进入 BHK-21 细胞的穿膜效率就已经达到金标准 Lipofectamine® 2000 的穿膜效率, 并远远高于 TAT 的穿膜效率, 且随着 N/P 值的增大, 穿膜效率也进一步提高。另外通过细胞毒性实验发现 PKV14 对 BHK-21 细胞的活性无影响, 表明其作为药物载体是安全低毒的。

综上所述, PKV14 具有运输药物分子进入细胞发挥药理活性的潜力。本研究对于新型人源性双亲性穿膜肽 PKV14 作为药物载体的研究提供了依据。

参考文献

- [1] Wang F, Wang Y, Zhang X, et al. Recent progress of cell-penetrating peptides as new carriers for intracellular cargo delivery [J]. *J Control Release*, 2014, 174: 126-136.

- [2] Huang Y W, Lee H J, Tolliver L M, *et al.* Delivery of nucleic acid and nanomaterials by cell-penetrating peptides: opportunities and challenges [J]. *Biomed Res Int*, 2015: 834079.
- [3] Green M, Loewenstein P M. Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein [J]. *Cell*, 1988, 55(6): 1179-1188.
- [4] Frankel A D, Pabo C O. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus [J]. *Cell*, 1988, 55(6): 1189-1193.
- [5] Copolovici D M, Langel K, Eriste E, *et al.* Cell-penetrating peptides: design, synthesis, and applications [J]. *ACS Nano*, 2014, 25: 8(3):1972-1994.
- [6] Nan Y H, Park I S, Hahm K S, *et al.* Antimicrobial activity, bactericidal mechanism and LPS-neutralizing activity of the cell-penetrating peptide pVEC and its analogs [J]. *J Pept Sci*, 2011, 17(12): 812-817.
- [7] Johansson H J, El-Andaloussi S, Holm T, *et al.* Characterization of a novel cytotoxic cell-penetrating peptide derived from p14ARF protein [J]. *Mol Ther*, 2008, 16(1): 115-123.
- [8] Magzoub M, Sandgren S, Lundberg P, *et al.* N-terminal peptides from unprocessed prion proteins enter cells by macropinocytosis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 348(2): 379-385.
- [9] Yi Y, Kuipers O P. Development of an efficient electroporation method for rhizobacterial *Bacillus mycoides* strains [J]. *J Microbiol Methods*, 2017, 133: 82-86.
- [10] Sato M, Kosuke M, Koriyama M, *et al.* Timing of CRISPR/Cas9-related mRNA microinjection after activation as an important factor affecting genome editing efficiency in porcine oocytes [J]. *Theriogenology*, 2018, 108: 29-38.
- [11] Henning-Knechtel A, Knechtel J, Magzoub M. DNA-assisted oligomerization of pore-forming toxin monomers into precisely-controlled protein channels [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(21): 12057-12068.
- [12] Eggers R, Philippi A, Altmeyer M O, *et al.* Primary T cells for mRNA-mediated immunotoxin delivery [J]. *Gene Ther*, 2018, 25(1): 47-53.
- [13] Steyer B, Carlson-Stevermer J, Angenent-Mari N, *et al.* High content analysis platform for optimization of lipid mediated CRISPR-Cas9 delivery strategies in human cells [J]. *Acta Biomater*, 2016, 34: 143-158.
- [14] DiCarlo J E, Deeconda A, Tsang S H. Viral Vectors, Engineered cells and the CRISPR revolution [J]. *Adv Exp Med Biol.*, 2017, 1016: 3-27.
- [15] Wang Q M, Gao Z, Liu S, *et al.* Hybrid polymeric micelles based on bioactive polypeptides as pH- responsive delivery systems against melanoma [J]. *Biomaterials*, 2014, 35(25): 7008-7021.
- [16] Jiang Y, Li M, Zhang Z, *et al.* Cell-penetrating peptides as delivery enhancers for vaccine [J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2014, 15(3): 256-266.
- [17] Liu S, Huang W, Jin M J, *et al.* High gene delivery efficiency of alkylated low-molecular-weight polyethylenimine through gemini surfactant-like effect [J]. *Int J Nanomed*, 2014. 9: 3567-3581.