

噬菌体展示体内筛选技术及其应用进展

俞杨 王自正

【摘要】 噬菌体展示技术是将高度多样性的多肽或蛋白展示于噬菌体衣壳蛋白表面的一项技术。这一技术将展示分子的基因型和表型联系在一起,极大地方便了多肽或蛋白分子的功能性筛选。从噬菌体展示文库中筛选出的多肽或蛋白具有高度的特异性和极强的亲和力,在生物医学基础研究和临床诊断治疗中具有重要的应用价值。随着噬菌体展示技术的不断发展,已将其用于活体的体内筛选。体内筛选技术发挥了高通量筛选的特点,能够在活体水平研究血管表面的分子表达状况,分析不同器官血管表面分子的表达差异,从而为临床靶向性诊断和治疗提供实验依据。

【关键词】 噬菌体展示; 肽库; 体内筛选; 血管异质性

【中图分类号】 R782 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1673-4114(2008)01-0005-04

Phage display in vivo selection and its application

YU Yang, WANG Zi-zheng

(Nanjing Clinical Nuclear Medicine Center, Nanjing First Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Nanjing 210006, China)

【Abstract】 Phage display technology is a kind of method which display peptides or proteins of high diversity on the surface of phage coat proteins. This technology establish a linkage between genotype and phenotype, which makes functional screen of peptides or proteins convenient. Peptides or proteins screened from phage display library have high specificity and strong affinity, and play an important roles in basic research and clinical diagnosis and therapy. With the development of phage display, it has been used in the in vivo selection. It has characteristics of high throughput selection so that it can reveal molecular profiles and the differences of molecular profiles expressed on the vascular surface of different organs. Studies of in vivo selection can provide experimental evidences for the targeting diagnosis and therapy.

【Key words】 Phage display; Phage library; In vivo selection; Vascular heterogeneity

1 噬菌体展示技术要点

噬菌体展示技术(phage display technology, PDT)是以经过改建的噬菌体为载体,将外源基因插入噬菌体衣壳蛋白基因Ⅲ或Ⅷ区,从而使表达的外源性多肽或蛋白质与噬菌体衣壳蛋白一起融合表达在噬菌体的表面,并使表达产物保持良好的空间构象,由此提供了可用于亲和筛选的噬菌体多肽或蛋白,通过测定插入噬菌体的DNA序列,即可明确所表达的外源肽或蛋白质的氨基酸序列。任何多肽或蛋白只要能够分泌到细胞周质腔均可通过衣壳蛋白被表达在噬菌体表面,构成多样性丰富($>10^9$)的噬菌体展示文库。

PDT由Smith^[1]在从事噬菌体生物学和分子生

物学十多年研究的基础上首先于1985年在“Science”报道,并率先提出选用丝状噬菌体(filamentous bacteriophage)构建噬菌体表达载体。随后又有人用M13和噬菌体f1构建表达载体。M13、f1均属大肠杆菌丝状噬菌体,其特性相似,基因组均为单链环状DNA,这种噬菌体既能够感染宿主菌,又不杀伤宿主菌;既可以在雄性大肠杆菌内稳定地增殖,又可以向菌体外分泌大量的噬菌体颗粒。现已阐明,衣壳蛋白gpⅢ和gpⅧ均含有可引导其到宿主菌内膜的信号肽,到达宿主菌内膜后信号肽被剪切,gpⅢ和gpⅧ两种蛋白随着噬菌体的分泌形成成熟的衣壳蛋白。目前通常利用在gpⅢ蛋白基因区引入外源肽或蛋白基因,通过定点突变在gpⅢ序列区引入适宜的酶切克隆位点,从而获得新的噬菌体表达载体。

目前,噬菌体展示的功能多肽或蛋白的种类主要有化学合成的随机多肽、天然的cDNA表达多

作者单位: 210006, 南京医科大学附属南京第一医院南京市临床核医学中心

通讯作者: 王自正(E-mail: zzwang136@yahoo.com.cn)

肽、抗体片段和某些特殊的蛋白质。而用于展示的噬菌体种类除了经典的丝状噬菌体,还有 T4 和 T7 等裂解性噬菌体。与丝状噬菌体相比,裂解性噬菌体通过裂解宿主细胞而释放到培养液中,因此尤其适合对宿主细胞具有毒性的蛋白质的展示。随着 PDT 的应用发展,证明其在功能性筛选方面具有重要的应用价值。而且由于文库中多肽序列丰富的多样性 ($>10^9$),这一筛选过程是高通量筛选,由此得到的具有高度特异性和极强亲和力的多肽或蛋白在生物医学基础研究和临床诊断与治疗中具有重要的应用价值^[2,3]。

2 体内筛选是 PDT 的重要进展

利用 PDT 所进行的筛选早期集中在离体筛选,即选用纯化的靶蛋白进行筛选,然而这种筛选策略存在一定的局限性,体外表达、纯化所得的靶蛋白在空间结构和生物学功能上都可能与机体内的天然状态有很大的差异,可能导致分子间识别的差异,所以,一部分研究者希望通过体内筛选的策略更好地模拟在整体状态下的多肽和血管表面分子之间的相互作用^[4,5]。在离体筛选中筛选的靶蛋白往往是已知蛋白,而体内筛选技术有可能发现新的血管表面表达分子,并借助特异性结合多肽客观地评价体内血管表面的分子表达水平。在血管蛋白质组学的研究领域中,已经将噬菌体体内筛选技术作为一种有重要价值的新方法^[5,6]。离体筛选得到的特异性结合多肽在体内存在应用上的困难,主要是体内血液中的蛋白酶和其他蛋白成分有可能干扰筛选所得的多肽配体的稳定性和结合能力,而体内筛选在筛选过程中就施以体内的选择压力,从而为得到具有潜在的临床价值的多肽配体奠定基础。这种多肽配体可以作为示踪剂和药物的靶向性载体将核素、化疗药物或具有治疗作用的基因片段转运到病变局部,或本身就具有生物学效应而作为药物有效地应用于临床疾病的诊断和治疗,这种血管靶向性诊断和治疗的策略可以应用于恶性肿瘤和心血管疾病等与血管相关性病变中,从而强化局部显像和治疗作用,降低全身的非特异性摄取和不良反应^[7-11]。以上的工作绝不是孤立的,在同一个研究中往往互相联系,密不可分。

体内筛选所使用的噬菌体展示文库中,以化学合成的随机多肽文库应用得最为广泛,主要是因为与抗体药物相比,多肽具有下列优点:①与重组技

术的产业化生产工艺相比,多肽筛选、合成和修饰的成本较低;②以单位质量计算具有明显的高生物学活性;③在室温下比抗体更稳定;④不容易产生免疫排异,不良反应小;⑤具有很强的器官和实体瘤穿透性^[3,12]。因此可以认为,多肽配体更容易过渡到体内血管相关性疾病的靶向诊断和治疗。而且,化学合成的多肽文库可以打破天然多肽的限制,在分子识别的过程中具有更高的效率。

3 体内筛选的应用进展和在核医学中的应用前景

噬菌体体内筛选时往往将噬菌体文库从外周循环注射入机体内部,循环一定时间后通过手术获取目的脏器,再分离出与目的脏器的供血血管特异性结合的克隆感染大肠杆菌进行扩增,经过 2~3 轮的筛选后特异性结合的噬菌体克隆得到富集,再由测序得到其氨基酸序列并进行后续研究工作^[13]。噬菌体体内筛选技术的生物学基础在于机体血管表面特异性分子的表达,因此这一技术对血管分子生物学和血管蛋白质组学的发展具有重要的意义,不仅有助于基础研究的探索发展,还有可能得到具有药物前景的前体物质。

Kolonin 等^[14]从遗传性肥胖小鼠体内筛选出与白色脂肪组织的微血管内皮特异性结合的噬菌体多肽,将其作为载体把诱导凋亡的药物带到局部血管可使其发生凋亡,白色脂肪组织明显萎缩,肥胖小鼠的体质量下降且未出现明显的不良反应,并成功地利用层析的方法找到了结合的靶分子 *prohibitin*,证实其确实在白色脂肪组织的微血管内皮特异性表达。根据这个结果,研究人员提出了“血管密码”概念,即某个体中不同脏器的血管内皮具有不同的标志物。

人体体内筛选验证了动物实验的结果: Arap 等^[15]将噬菌体随机多肽文库注射入人体后,收集不同脏器的噬菌体多肽。经过测序和生物学信息分析发现,不同脏器血管内皮分子结合的多肽的模式具有相当的差异性,提示人体血管腔并不是表面分子分布均匀一致的管道,其表面分子的分布与血管所供应的脏器有很强的相关性,利用这一特点,通过切断血供治疗某些脏器特异性的疾病,不会出现严重的全身性不良反应。目前, Ruoslahti^[16]的实验室已经发现“血管密码”在肿瘤的血管生成和转移中也起到重要作用。

Arap 等^[15]根据随机多肽的序列比对找到了与

白细胞介素-11 同源的多肽, 由此推测并证实了白细胞介素-11 的受体就是血管标志物。研究结果证明, 白细胞介素-11 受体的确可以作为进展期前列腺癌的血管表面标志物^[17]。由于筛选文库多采用人工合成的随机多肽, 在实际研究中通过随机序列比对找出多肽结合的血管标志物的情况并不多见, 有时巧妙地应用不同类型的文库有助于解决这个问题。Ruoslahti^[16] 的实验室通过体内筛选获得与正常乳腺血管结合的随机多肽, 同时也可以识别乳腺癌的血管, 序列比对并未提示对应的标志物。他们利用筛选组织构建了一个 cDNA 文库, 再用这个文库对结合多肽进行筛选, 得到的结合克隆做序列比对, 结果发现了肿瘤血管标志物氨肽酶P^[18]。

Laakkonen 等^[19] 研究发现, 噬菌体体内筛选技术除了能用于研究血管表面分子表达情况, 还可以被用于淋巴管表面分子表达的研究。因为缺乏基底膜, 淋巴管在肿瘤转移过程中的障碍比血管更小, 所以具有非常重要的作用。Laakkonen 等^[19] 发现了与肿瘤组织特异性结合的噬菌体多肽 LyP-1, 其不与肿瘤血管共定位, 而与肿瘤的淋巴管共定位。噬菌体多肽 LyP-1 可以穿透细胞膜进入细胞核内, 表明其可以作为肿瘤靶向药物的载体。研究还证实, 噬菌体多肽 LyP-1 本身就具有抗肿瘤活性, 可以通过抑制淋巴管的生成而使肿瘤死亡^[20]。

由于噬菌体展示技术在体内筛选中具有可观的应用前景, 而动物血管与人类存在差异, 人类疾病本身与人为构建的动物疾病模型也存在着区别, 因此有相当一部分研究者认为应该将此项技术广泛用于人体内筛选, 研究多肽在人体的定位情况和生物学效应, 从而为靶向性药物的发现提供线索^[5, 6, 8, 15, 21]。因此, 体内筛选安全性的评价十分重要。Krag 等^[21] 对噬菌体展示技术应用于人体内筛选做了安全性分析的临床研究, 用噬菌体随机多肽文库和抗体单链可变区片段文库对 8 例癌症 IV 期的患者 (包括乳腺癌, 黑色素瘤和胰腺癌) 进行了体内筛选, 其中 3 例患者做了连续筛选, 观察结果无任何严重的不良反应。研究表明, 筛选到的噬菌体阳性克隆确实能与肿瘤特异性结合, 证明应用噬菌体展示技术进行人体内筛选具有安全性, 从而为此项技术广泛应用于人体筛选研究奠定了基础。

体内筛选的噬菌体展示技术可以得到靶器官的血管特异性小分子多肽, 因此此项技术对于核医学靶向性诊断和治疗的小分子多肽载体的开发具有重

要的应用前景^[3, 8, 9, 22]。目前, 在核医学靶向性的多肽载体中, 最有代表性的就是利用噬菌体展示技术筛选得到的精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD) 三肽序列, 该序列可以与血管内皮表面所表达的整合素结合, 被广泛用作核素载体^[23, 24], 而在体内筛选研究中, 动脉粥样斑块特异性结合的多肽被认为可以用于早期的斑块显像^[10, 11]。噬菌体体内筛选提供了一个生物技术平台, 可用于开发血管特异性的多肽探针, 而这些探针靶向性强、灵敏度高, 可在标记核素后作为放射性药物用于病变组织的显像和治疗。

综上所述, 体内筛选是噬菌体展示研究中的新兴领域, 由于其筛选方式有效地模拟了正常的生物学状态, 对认识血管的分子表达谱具有重要的价值, 而且其研究成果可以方便地过渡到临床诊断或治疗药物的开发, 因此近年来这一领域进展迅速。以后的重点主要集中在正常与病变组织 (尤其是肿瘤等难治性疾病) 血管表面分子表达差异的比较、多肽结合受体的确定和以多肽为基础的合成药物的体内靶向性及疗效的研究。随着噬菌体展示技术体内筛选的进一步发展, 此项技术必将作为血管生物学基础研究和临床应用的重要工具, 对生物医学的实践及核医学靶向性诊断和治疗产生极富意义的影响。

参 考 文 献

- [1] Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface [J]. *Science*, 1985, 228 (4705): 1315-1317.
- [2] Kehoe JW, Kay BK. Filamentous phage display in the new millennium [J]. *Chem Rev*, 2005, 105(11): 4056-4072.
- [3] Lanner RC, Sato AK, Gorzelany J, et al. Phage display-derived peptides as therapeutic alternatives to antibodies [J]. *Drug Discov Today*, 2004, 9(12): 525-529.
- [4] Ruoslahti E. Drug targeting to specific vascular sites [J]. *Drug Discov Today*, 2002, 7(22): 1138-1143.
- [5] Hajitou A, Pasqualini R, Arap W. Vascular targeting: recent advances and therapeutic perspectives [J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2006, 16(3): 80-88.
- [6] Zurita AJ, Arap W, Pasqualini R. Mapping tumor vascular diversity by screening phage display libraries [J]. *J Control Release*, 2003, 91(1-2): 183-186.
- [7] Neri D, Bicknell R. Tumour vascular targeting [J]. *Nat Rev Cancer*, 2005, 5(6): 436-446.
- [8] George AJ, Lee L, Pitzalis C. Isolating ligands specific for human vasculature using in vivo phage selection [J]. *Trends Biotechnol*, 2003, 21(5): 199-203.
- [9] Landon LA, Deutscher SL. Combinatorial discovery of tumor targeting peptides using phage display [J]. *J Cell Biochem*, 2003, 90(3): 509-517.
- [10] Liu C, Bhattacharjee G, Boisvert W, et al. In vivo interrogation of

- the molecular display of atherosclerotic lesion surfaces [J]. *Am J Pathol*, 2003, 163(5): 1859-1871.
- [11] Kelly KA, Nahrendorf M, Yu AM, et al. In vivo phage display selection yields atherosclerotic plaque targeted peptides for imaging[J]. *Mol Imaging Biol*, 2006, 8(4): 201-207.
- [12] Landon LA, Zou J, Deutscher SL. Is phage display technology on target for developing peptide-based cancer drugs?[J]. *Curr Drug Discov Technol*, 2004, 1(2): 113-132.
- [13] Trepel M, Arap W, Pasqualini R. In vivo phage display and vascular heterogeneity: implications for targeted medicine [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2002, 6(3): 399-404.
- [14] Kolonin MG, Saha PK, Chan L, et al. Reversal of obesity by targeted ablation of adipose tissue[J]. *Nat Med*, 2004, 10(6): 625-632.
- [15] Arap W, Kolonin MG, Trepel M, et al. Steps toward mapping the human vasculature by phage display[J]. *Nat Med*, 2002, 8(2): 121-127.
- [16] Ruoslahti E. Vascular zip codes in angiogenesis and metastasis[J]. *Biochem Soc Trans*, 2004, 32(pt3): 397-402.
- [17] Zurita A, Troncoso P, Cardo-Vila M, et al. Combinatorial screenings in patients: the interleukin-11 receptor as a candidate target in the progression of human prostate cancer[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(2): 435-439.
- [18] Essler M, Ruoslahti E. Molecular specialization of breast vasculature: A breast-homing phage-displayed peptide binds to aminopeptidase P in breast vasculature [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(4): 2252-2257.
- [19] Laakkonen P, Porkka K, Hoffman JA, et al. A tumor-homing peptide with a targeting specificity related to lymphatic vessels[J]. *Nat Med*, 2002, 8(7): 751-755.
- [20] Laakkonen P, Akerman ME, Biliran H, et al. Antitumor activity of a homing peptide that targets tumor lymphatics and tumor cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(25): 9381-9386.
- [21] Krag DN, Shukla GS, Shen GP, et al. Selection of tumor-binding ligands in cancer patients with phage display libraries[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(15): 7724-7733.
- [22] Sokolov K, Aaron J, Hsu B, et al. Optical systems for in vivo molecular imaging of cancer[J]. *Technol Cancer Res Treat*, 2003, 2(6): 491-504.
- [23] Denardo SJ. Combined molecular targeting for cancer therapy: a new paradigm in need of molecular imaging[J]. *J Nucl Med*, 2006, 47(1): 4-5.
- [24] Lewis MR. Radiolabeled RGD peptides move beyond cancer: PET imaging of delayed-type hypersensitivity reaction[J]. *J Nucl Med*, 2005, 46(1): 2-4.

(收稿日期: 2007-07-05)

钠碘转运体基因介导的肿瘤放射性核素治疗研究

张俊 刘增礼

【摘要】 钠碘转运体(NIS)是一种跨膜糖蛋白,介导碘的主动摄取,使得放射性碘用于治疗不摄碘的肿瘤成为可能。目前 NIS 基因已被成功转入多种肿瘤并表达出有功能的 NIS 蛋白,但治疗的效果并不令人满意。为此,研究者们应用不同的方法进行了改进,并收到较好的效果。

【关键词】 基因疗法; 碘放射性同位素; 肿瘤; 钠碘转运体

【中图分类号】 R817.5, R 730.5 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1673-4114(2008)01-0008-04

Sodium iodide symporter gene-mediated radionuclide therapy of tumors

ZHANG Jun¹, LIU Zeng-li²

(1. Department of Nuclear Medicine, Taizhou People's Hospital, Taizhou 225300, China; 2. Department of Nuclear Medicine, the Second Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215004, China)

【Abstract】 The sodium iodide symporter (NIS) is a transmembrane glycoprotein responsible for uptake of iodide into cells. It has raised the possibility of using radio-iodine for treatment of those tumors that cannot accumulate iodide. The NIS gene has been transferred into a variety of tumors and induced NIS functional expression successfully. However, the effect of therapy is disappointing. Hence, many investigators apply several different approaches to their studies and obtain more effective results.

【Key words】 Gene therapy; Iodineradionuclides; Neoplasms; Sodium iodide symporter

碘是人体必需的微量元素,主要用于甲状腺激素的合成。在生理条件下,甲状腺内浓聚的碘相当

于其在血浆内浓度的 20~40 倍¹⁾。放射性碘可用于测定甲状腺功能,诊断和治疗甲状腺机能亢进和甲状腺癌。甲状腺内碘浓度的维持是通过甲状腺滤泡细胞基底膜上的钠碘转运体(sodium iodide symporter, NIS)实现的。1996 年,大鼠 NIS 基因

作者单位: 1. 225300, 江苏省泰州市人民医院核医学科(张俊)
2. 215004, 苏州大学附属第二医院核医学科(刘增礼)
通讯作者: 刘增礼(E-mail: liuzengli@126.com)