新型荧光环肽探针用于病变胶原蛋白的靶向检测

魏文字¹, 白仲添², 刘钊², 雷军强², 肖建喜^{1*}

1. 功能有机分子化学国家重点实验室, 兰州大学化学化工学院, 兰州 730000

2. 兰州大学第一医院, 兰州 730000

*通讯作者, E-mail: xiaojx@lzu.edu.cn

收稿日期: 2020-08-19; 接受日期: 2020-10-09; 网络版发表日期: 2020-12-30

国家自然科学基金(编号: 21775059, 81960323)资助项目

摘要 胶原蛋白是细胞外基质的主要成分, 它在细胞分化、迁移、组织重塑和器官形态发生等大量生理过程中发挥着重要作用. 作为关键的结构蛋白, 胶原蛋白的过度降解与肿瘤等严重疾病的发生息息相关, 已成为癌症分化、侵袭、转移以及癌症分期的重要诊断标准. 因此, 构建胶原蛋白的高效检测方法对肿瘤等相关疾病分子机制的解析和治疗方法的开发至关重要. 环肽具有较为刚性的结构、高的酶稳定性和良好的药理特性等优点. 本文利用邻苯二甲醛(OPA)与多肽序列中的赖氨酸和半胱氨酸反应, 在(Gly-Pro-Hyp)_n序列的基础上进行环化修饰, 成功合成了一个环肽探针FAM-cCTP. 组织染色的结果表明, FAM-cCTP不需要任何预处理, 即可靶向识别小鼠和人的多种石蜡组织切片中的变性胶原. 与特异性结合某种特定类型的胶原蛋白抗体相比, FAM-cCTP是广谱型探针, 可用于选择性检测不同类型和不同物种来源的变性胶原蛋白. 该环肽探针可以一直保持单链状态, 不需要加热等预处理, 克服了传统(Gly-Pro-Hyp)_n探针的缺陷, 为病变胶原蛋白的靶向检测和病理组织染色提供了新的工具.

关键词 病变胶原蛋白, 环肽探针, 三重螺旋结构, 组织染色, 组织成像

1 引言

胶原蛋白是皮肤、骨骼、肌腱、韧带、软骨和血管等结缔组织的主要结构蛋白, 它负责维持组织的机械完整性, 并在细胞分化、组织再生、器官形态发生与伤口愈合等生理过程中发挥关键作用^[1,2]. 胶原蛋白的合成和降解参与调控组织的形成并维持稳态, 它的异常重塑引起了人们的广泛关注^[3,4]. 据报道, 胶原蛋白的变性与骨质疏松、机械损伤、纤维化以及癌症等疾病息息相关^[5-8]. 因此, 靶向检测变性胶原蛋白对胶

原蛋白相关疾病的早期诊断和治疗具有重要意义.

自然界中存在大量环肽, 表现出抗菌、消炎、抗肿瘤和抗病毒等优良特性^[9,10]. 近几十年来, 环肽在药物发现领域引起了越来越多的关注, 与线性肽相比, 环肽具有更严格的构象和优良的药理特性, 具有发展为治疗剂的良好潜力^[11-13]. 除此之外, 环肽对酶水解作用更具抵抗力, 在代谢上更稳定; 同时, 环状结构会限制构象变化, 从而降低受体结合过程中的熵, 增强环肽对受体和蛋白质靶标的结合亲和力和特异性. 因此, 环肽在蛋白质-蛋白质相互作用的研究中被广泛应

引用格式: Wei W, Bai Z, Liu Z, Lei J, Xiao J. Specific recognition of denatured collagen by novel fluorescent cyclic peptide probe. *Sci Sin Chim*, 2021, 51: 485-492, doi: 10.1360/SSC-2020-0157

用^[14-18]。目前, 环肽已被应用于纳米材料、成像和药物治疗等领域^[19-22]。

多肽环化的策略已被广泛研究, 通过二硫键进行多肽环化是最常见的方法之一, 但是该体系在氧化还原环境下不稳定, 并且合成步骤复杂^[23]。2019年, 李学臣课题组^[24]报道了一种具有高度化学选择性的方法来直接环化未保护的多肽。邻苯二甲醛(OPA)与一个未保护的多肽序列中的赖氨酸和半胱氨酸有效反应, 可以形成异吡啶桥连的环肽; 并且, OPA多肽环化产物可以进一步与*N*-马来酰亚胺部分反应以引入功能性基团或分子。

多肽序列(Gly-Pro-Hyp)_n被发现在单链的状态下可以与胶原蛋白的变性部位杂交, 但是, 该序列在常温下会保持三重螺旋结构, 从而丧失病变胶原蛋白的靶向结合能力^[25-32]。因此, 多肽(Gly-Pro-Hyp)_n检测胶原蛋白前必须经过加热预处理, 这会导致组织损伤的风险。在本工作中, 我们基于多肽序列(Gly-Pro-Hyp)_n和OPA环化法, 构建了一种新型胶原蛋白靶向的环肽探针FAM-cCTP, 其可以保持单链状态, 还可以特异性地识别不同类型结缔组织中的病变胶原蛋白, 在胶原蛋白的检测中有良好的应用前景。

2 实验部分

2.1 试剂与仪器

Rink胺树脂(负载=0.345 mmol/g)、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Hyp(*t*Bu)-OH、Fmoc-Cys(Trt)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、1-羟基苯并三氮唑(HOBt)和*O*-苯并三氮唑-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸盐(HBTU)购自吉尔生化有限公司(中国)。二异丙基乙胺(DIEA)、三氟乙酸(TFA)和三异丙基硅烷(Tis)购自百灵威科技有限公司(中国)。5(6)-羧基荧光素(FAM)、吡嗪和OPA购自阿拉丁试剂有限公司(中国)。牛血清白蛋白(BSA)、山羊血清和4',6-二脒基-2-苯基吡啶二盐酸盐(DAPI)购自索莱宝生物科技有限公司(中国)。血红蛋白、胰蛋白酶和胃蛋白酶购自源叶生物技术有限公司(中国)。明胶购自博奥拓达科技有限公司(中国)。二氯甲烷(DCM)和*N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)购自恒兴化学试剂制造有限公司(中国)。所有市售试剂均为分析纯, 无需纯化即可使用。

Waters 2545液相色谱仪(美国沃特世公司)、

Waters Acquity超高液相色谱仪(美国沃特世公司)、Chirascan圆二色光谱仪(英国应用光物理公司)、RF-6000荧光光谱仪(日本岛津公司)、Infinite M200多功能酶标仪(瑞士帝肯公司)、Leica DM4000B正置荧光显微镜(德国徕卡公司)。

2.2 多肽探针的合成

通过标准Fmoc多肽固相合成方法(SPPS)合成所有多肽序列。将Fmoc氨基酸(Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Hyp(*t*Bu)-OH、Fmoc-Cys(Trt)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH)缩合到Rink胺树脂上。使用Fmoc-氨基酸(5 eq.)、HBTU (5 eq.)和DIEA (8 eq.)进行氨基酸逐步偶联。在每个偶联步骤后, 将反应混合物用DMF和DCM洗涤2次, 并用脱帽试剂(0.1 M HOBt, 5% (v/v)吡嗪的DMF溶液)进行Fmoc脱保护。每次脱保护反应步骤后, 将反应混合物用DMF和DCM洗涤2次。所有的偶联反应和Fmoc脱保护反应均通过显色剂(2% 四氯苯醌的DMF溶液:2%乙醛的DMF溶液=1:1)进行检测。在完成序列(GPO)₇GPCGPOGPK的合成后, 用25%的乙酸酐进行封端30 min。封端结束后, 将反应混合物用DMF和DCM各洗涤3次。最后将树脂用TFA/TIS/H₂O (95:2.5:2.5)处理3 h, 以去除*t*Bu、Trt和Boc基团并释放肽。在冷乙醚中多次沉淀、搅拌、离心后得到多肽Ac-(GPO)₇GPCGPOGPK-NH₂ (标记为CTP)。使用反相高效液相色谱(HPLC)在C18柱上纯化肽, 并用质谱表征。

通过固相合成法完成(GPO)₇GPCGPOGPK序列后, 将树脂加入到FAM (5 eq.)、HBTU (5 eq.)和DIEA (8 eq.)的DMF混合溶液中, 以将FAM共价连接至多肽的N端。多肽合成结束后, 将树脂用TFA/TIS/H₂O (95:2.5:2.5)处理3 h, 以去除*t*Bu、Trt和Boc基团并释放肽。在冷乙醚中多次沉淀、搅拌、离心后收集粗产物。使用反相HPLC在C18柱以获得纯化肽FAM-(GPO)₇GPCGPOGPK-NH₂ (标记为FAM-CTP), 并用质谱表征。

分别在溶于10 mM磷酸盐缓冲溶液(PBS, pH 7.4)的CTP和FAM-CTP中加入溶于DMSO中的OPA (1.2 eq.), 使最终的多肽溶液浓度为0.5 mM, 然后在室温下搅拌10~15 min。通过RP-HPLC纯化目标产物, 获得环肽cCTP和荧光标记的环肽探针FAM-cCTP, 并利用质谱进行表征。CTP计算的分子量为2737, ESI-MS测定的分子量为[M+3H]³⁺ *m/z*=913, [M+2H]²⁺ *m/z*=1369;

cCTP计算的分子量为2835, ESI-MS测定的分子量为 $[M+3H]^{3+}$ $m/z=946$, $[M+2H]^{2+}$ $m/z=1419$; FAM-CTP计算的分子量为3053, ESI-MS测定的分子量为 $[M+3H]^{3+}$ $m/z=1019$; FAM-cCTP计算的分子量为3151, ESI-MS测定的分子量为 $[M+3H]^{3+}$ $m/z=1052$.

2.3 圆二色谱

在10 mM PBS (pH 7.4)缓冲液中制备浓度为300 μ M的多肽样品. 在4℃下从190到260 nm进行波长扫描, 每步增量为0.5 nm. 在测量之前, 将多肽溶液在90℃下加热20 min, 然后在4℃下重新平衡至少24 h. 以0.5℃/min的平均加热速率, 通过检测225 nm处圆二色谱(CD)信号的强度来测量多肽的热稳定性. 多肽的热变温度(T_m)定义为热变曲线一阶导数的极值. 每次扫描重复三次.

2.4 荧光光谱测量

用在10 mM PBS (pH 7.4)中制备的环肽FAM-cCTP和对照肽FAM-CTP溶液用于荧光测量. 荧光测量激发波长为495 nm, 步长为1 nm. 在测量前, 多肽在4℃下进行预平衡至少24 h. 在三种条件下记录每种多肽探针的荧光光谱: 4℃, 在80℃加热20 min后, 在4℃下重新平衡24 h后. 激发波长为495 nm. FAM-CTP和FAM-cCTP的重折叠过程通过在80℃加热20 min后立即在541 nm下监测30 min的荧光强度得到.

2.5 蛋白结合实验

将I型胶原蛋白(1 mg/mL)溶解在0.5 M乙酸溶液中. 将胶原蛋白溶液(I型)在70℃加热15 min得到变性胶原蛋白溶液. 分别将70 μ L正常与变性的胶原蛋白溶液加入96孔板中并风干. 用10 mM PBS (pH 7.4)洗涤3次, 每次3 min, 甩板拍干. 用在10 mM PBS (pH 7.4)中配制的1%山羊血清封闭液封闭1 h, 弃去孔内溶液, PBS洗涤3次, 每次3 min. 将70 μ L在10 mM PBS (pH 7.4)中配制的20 μ M荧光多肽探针FAM-CTP和FAM-cCTP溶液添加到每个孔中, 并在4℃下孵育4 h以使其与胶原蛋白膜结合. 结合结束后, 用400 μ L 10 mM PBS (pH 7.4)洗涤孔板5 min, 重复3次. 用酶标仪测量荧光(ex: 495 nm, em: 541 nm). 每次测量重复三次.

胃蛋白酶、牛血清白蛋白(BSA)和血红蛋白的结合测试按照相似的方案进行. 将胃蛋白酶、牛血清白

蛋白和血红蛋白添加到96孔板中并风干. 用10 mM PBS (pH 7.4)洗涤3次, 每次3 min, 甩板拍干. 在蛋白膜上添加70 μ L (20 μ M)荧光多肽探针溶液, 并在4℃下孵育4 h. 结合结束后, 用400 μ L 10 mM PBS (pH 7.4)洗涤3次, 每次5 min. 用酶标仪测量荧光(ex: 495 nm, em: 541 nm). 每次测量重复三次. 每个结合实验重复三次.

2.6 小鼠组织染色与荧光成像

软骨、肠、耳朵、心脏、尾巴和眼组织取自7~8周大的KM小鼠(18~22 g). 将所有组织用在10 mM PBS (pH 7.4)中的4%多聚甲醛固定1 h, 并包埋在石蜡中. 将组织切成4 μ m的厚度置于经多聚赖氨酸处理的载玻片上. 依次使用二甲苯、100%乙醇、95%乙醇、50%乙醇和去离子水洗涤石蜡切片两次, 每次5 min. 软骨、肠、耳朵、心脏、尾巴和眼组织用85℃超纯水处理10 min, 以使胶原蛋白变性. 将0.5 mL山羊血清的PBS (5%, v/v)溶液加到组织上, 在室温下温育30 min以封闭非特异性结合. 用吸水纸除去封闭溶液. 不进行预处理直接稀释, 加入100 μ L荧光多肽探针溶液以覆盖组织, 然后用石蜡膜覆盖以防止干燥, 并在4℃下孵育4 h. 染色后, 除去石蜡膜, 用吸水纸擦去多余的溶液. 用在10 mM PBS (pH 7.4)中配制的200 μ L DAPI (5 μ g/mL)溶液覆盖组织, 染色1 min. 将载玻片浸入染色槽中的1×PBS缓冲液中5 min, 重复5次, 以洗去未结合的染色剂. 将染色的小鼠组织切片在正置荧光显微镜上成像.

对于抑制实验, 在用荧光多肽探针对组织切片染色之前, 将抑制剂G(POG)₁₀多肽溶液添加到受损小鼠肠组织上. 在使用前将该溶液进行预热-淬火处理. 在85℃下加热30 min以确保抑制剂G(POG)₁₀处于单体状态后立即置于冰水中淬火30 s. 在4℃下孵育4 h, 以使胶原蛋白与抑制剂完全结合. 然后将组织切片用1×PBS缓冲液洗涤5次, 以除去所有未结合的抑制剂.

2.7 人病理组织染色与荧光成像

病人关节炎、肝纤维化、肝癌、肺癌和直肠癌的FFPE (福尔马林固定石蜡包埋)组织由兰州大学第一医院提供. 依次使用二甲苯、100%乙醇、95%乙醇、50%乙醇和去离子水洗涤石蜡切片两次, 每次5 min. 将0.5 mL山羊血清封闭液添加到每个组织上, 并在室温下孵育30 min以阻断非特异性结合. 用吸水纸除去

封闭溶液. 将100 μL FAM-cCTP (15 μM)溶液覆盖组织并将载玻片用石蜡膜覆盖以防止干燥, 在4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育4 h. 染色后, 除去石蜡膜, 用吸水纸擦去多余的溶液. 用200 μL DAPI (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 10 mM PBS)溶液覆盖组织, 并在室温下孵育1 min. DAPI染色后, 将载玻片浸入10 mM PBS缓冲液的染色槽中5 min, 重复5次, 以洗去未结合的染色剂. 利用正置荧光显微镜对人病理组织中的病变胶原蛋白和细胞核成像.

3 结果与讨论

3.1 胶原蛋白靶向荧光环肽探针的设计

(Gly-Pro-Hyp) $_n$ 序列可以靶向结合病变胶原蛋白, 但是其倾向于形成三重螺旋结构, 而丧失靶向结合能力. 我们在(Gly-Pro-Hyp) $_n$ 序列的基础上, 通过环化修饰, 构建荧光环肽探针FAM-cCTP. 我们预测, 环状结构会抑制探针形成三重螺旋结构从而保持单链状态, 并且不会影响探针靶向识别胶原蛋白的能力(图1). 我们采用OPA环化法, 在室温条件下制备了荧光环肽探针(图1). 质谱结果表明, 新型环肽cCTP、对照肽CTP及FAM荧光素标记的荧光环肽探针FAM-cCTP和荧光对照肽探针FAM-CTP已成功合成(图2).

3.2 荧光环肽探针形成三重螺旋结构的能力

三重螺旋倾向是胶原蛋白靶向多肽探针的关键指标. 对照线性肽CTP (Ac-(GPO) $_7$ GPCGPOGPK-NH $_2$)的圆二色谱结果表明其在225 nm处出现三重螺旋结构的特征峰(图3(a)), 热变实验表明CTP三重螺旋结构的热变温度为59 $^{\circ}\text{C}$ (图3(b, c)). 然而, 环肽cCTP在225 nm处无特征峰(图3(a)), 并且解折叠过程呈线性变化, 表明环肽cCTP保持单链构象, 而不能形成三重螺旋结构(图3(b, c)).

环肽探针FAM-cCTP及对照肽探针FAM-CTP形成三重螺旋结构的能力通过荧光实验进一步研究. FAM-CTP在4 $^{\circ}\text{C}$ 时呈现弱荧光是因为其三重螺旋结构中三条肽链的紧密堆积导致FAM的荧光自淬灭; 而其在80 $^{\circ}\text{C}$ 时呈现强荧光是因为加热后的单体状态导致荧光恢复. FAM-CTP加热前后在4 $^{\circ}\text{C}$ 时完全重叠的荧光光谱表明, 它可以通过加热和冷却步骤完全重折叠恢复三重螺旋结构(图4(a)). 但是, 环肽探针FAM-cCTP在4 $^{\circ}\text{C}$ 、80 $^{\circ}\text{C}$ 和加热在4 $^{\circ}\text{C}$ 平衡后, 均呈现同样强的荧光,

图1 (a) 靶向病变胶原的新型环肽探针FAM-cCTP的合成; (b) 环肽探针FAM-cCTP与对照线性肽探针FAM-CTP识别变性胶原蛋白的示意图(网络版彩图)

Figure 1 (a) Synthesis of a novel cyclic peptide probe FAM-cCTP. (b) Schematic illustration of the cyclic peptide probe FAM-cCTP and the control peptide FAM-CTP targeting denatured collagen (color online).

图2 新型环肽cCTP、对照肽CTP及FAM荧光素标记的荧光环肽探针FAM-cCTP、荧光对照肽探针FAM-CTP的液相色谱图(a)和相应的质谱结果(b)

Figure 2 HPLC (a) and MS (b) results of the novel cyclic peptide probe cCTP, control peptide CTP and FAM linked fluorescent cyclic peptide probe FAM-cCTP and fluorescent control peptide probe FAM-CTP.

表明它一直保持单链状态(图4(b)).

两个多肽探针的重折叠能力通过实时监测541 nm处的荧光强度进一步研究(图4(c)). FAM-CTP在冷却过程中, 荧光强度急剧下降, 表明它可以迅速重折叠形成

图 3 环肽cCTP和对照线性肽CTP的三重螺旋倾向。(a) CTP (黑色)和cCTP (红色)的CD光谱; CTP (黑色)和cCTP (红色)的CD热变曲线(b)和热变曲线的一阶导数(c) (网络版彩图)

Figure 3 Triple helical propensity of the cyclic peptide cCTP and the control peptide CTP. (a) CD spectra of peptides CTP (black) and cCTP (red). CD melting curves (b) and the first derivative of the melting curves (c) of peptides CTP (black) and cCTP (red) (color online).

图 4 FAM-CTP和FAM-cCTP在495 nm的激发波长下的荧光发射光谱。多肽探针FAM-CTP (a)和FAM-cCTP (b)在4 °C (黑色), 80 °C加热20 min (红色)和加热后在4 °C重新平衡24 h后(蓝色)的荧光光谱; (c) FAM-CTP (黑色)和FAM-cCTP (红色)冷却过程中541 nm处的实时荧光强度变化(网络版彩图)

Figure 4 Fluorescence characterization of peptide probes FAM-CTP and FAM-cCTP. Fluorescence spectra of FAM-CTP (a) and FAM-cCTP (b) at an excitation wavelength of 495 nm under three conditions: equilibrated at 4 °C (black), heated to 80 °C for 20 min (red), and re-equilibrated at 4 °C for 24 h after heating at 80 °C (blue). (c) Real-time monitoring the fluorescence intensity of peptides FAM-CTP (black) and FAM-cCTP (red) at 541 nm at 4 °C immediately after heating at 80 °C for 20 min (color online).

三重螺旋结构; 而FAM-cCTP的荧光强度基本没有变化, 表明它不能形成三重螺旋结构(图4(c))。圆二色谱和荧光实验均表明, 线性肽探针FAM-CTP可以形成三重螺旋结构, 而环肽探针FAM-cCTP则一直保持单链构象。

3.3 荧光环肽探针对于胶原蛋白的靶向结合能力

我们通过蛋白质结合实验, 研究了FAM-cCTP、FAM-CTP和空白对照FAM对胶原蛋白的靶向结合能力(图5)。实验结果表明, 正常胶原蛋白(灰色)、变性胶原蛋白(黑色)、BSA (红色)、血红蛋白(蓝色)和胃蛋白酶(绿色)膜包被的96孔板未被预处理的FAM-CTP染色后, 都呈现低荧光强度, 表明FAM-CTP不能靶向结合胶原蛋白(正常或变性)以及其他蛋白质(图5)。这与文献报道一致, 未预热的FAM-CTP具有三重螺旋结

图 5 FAM-cCTP、FAM-CTP和空白对照FAM染色的正常胶原蛋白(灰色)、变性胶原蛋白(黑色)、BSA(红色)、血红蛋白(蓝色)和胃蛋白酶(绿色)膜包被的96孔板的荧光强度(网络版彩图)

Figure 5 The binding affinity of peptide probes FAM-cCTP, FAM-CTP and FAM toward normal collagen (gray), denatured collagen (black), BSA (red), hemoglobin (blue) and pepsin (green) films in a 96-well plate (color online).

构, 因此不能识别变性胶原。对于未预处理的FAM-cCTP, 在所有的96孔板中, 只有变性胶原蛋白包被的孔板呈现强荧光, 表明FAM-cCTP不用加热, 即可特异性结合变性胶原。同时, 空白对照FAM染色的所有96孔板都呈现极低荧光强度, 因为FAM不能结合任何目标蛋白(图5)。与变性胶原蛋白相比, FAM-cCTP对正常胶原蛋白和其他蛋白质的结合能力极低, 表明环肽探针FAM-cCTP对变性胶原蛋白具有极强的靶向特异性。

3.4 荧光环肽探针对于小鼠组织的靶向荧光成像

我们通过小鼠组织染色实验, 进一步研究了FAM-cCTP、FAM-CTP和经典的胶原靶向的FAM-GPO探针对于病变胶原蛋白的靶向结合能力(图6)。当三个探针均不预加热时, 只有FAM-cCTP可以染色受损小鼠软组织中的病变胶原蛋白; 而当预加热后, 3个多肽探针均可靶向结合病变胶原蛋白(图6)。这些结果再次表明, 只有单链状态的多肽探针才能结合病变胶原蛋白, 三重螺旋结构的多肽探针则完全丧失靶向结合能力。FAM-cCTP一直保持单链状态, 无需任何预处理即可靶向识别病变胶原蛋白。同时, 受损小鼠软组织的成像结果表明, FAM-cCTP具有很强的病变胶原蛋白结合能力, C端环状结构的引入没有影响多肽探针靶向识别病变胶原的能力(图6)。

图 6 未预热(a~c)和预热(d~f)的多肽探针FAM-GPO (a, d), FAM-CTP (b, e), FAM-cCTP (c, f)染色的受损小鼠软骨组织的荧光显微镜照片。比例尺: 50 μm (网络版彩图)

Figure 6 Fluorescence micrographs of impaired mouse cartilage tissues stained with unheated (a–c) and heated (d–f) probes FAM-GPO (a, d), FAM-CTP (b, e), and FAM-cCTP (c, f). Scale bar: 50 μm (color online).

我们利用多肽G(POG)₁₀作为抑制剂进行了抑制实验, 来评估环肽探针FAM-cCTP对病变胶原的结合模式。FAM-cCTP染色的正常小鼠肠组织呈现弱绿色荧光, 而其染色的受损小鼠肠组织则呈现强绿色荧光, 再次表明FAM-cCTP特异性结合变性胶原蛋白, 而不能结合正常胶原蛋白(图7(a, b))。当受损小鼠肠组织先用多肽抑制剂G(POG)₁₀处理, 再用FAM-cCTP染色, 则呈现弱的绿色荧光, 表明G(POG)₁₀有效地阻止了FAM-cCTP对变性胶原蛋白的染色(图7(c))。DAPI对细胞核染色显示蓝色。这些结果表明, 环肽探针FAM-cCTP与G(POG)₁₀有相同的结合位点, 即病变胶原蛋白中部分解折叠的肽链。

将环肽探针FAM-cCTP进一步对受损的小鼠尾巴、眼睛、心脏和耳朵组织切片进行染色(图8)。所有染色组织均呈现强绿色荧光, 表明FAM-cCTP能靶向结合不同类型结缔组织中的变性胶原蛋白(图8)。利用DAPI对细胞核染色显示蓝色, 从而对胶原蛋白进行共定位(图8)。小鼠组织染色的实验一致表明, FAM-cCTP不用预加热处理, 即可对各种类型的小鼠组织中的变性胶原蛋白实现特异性结合。

3.5 荧光环肽探针对人病理组织的靶向荧光成像

利用环肽探针FAM-cCTP进一步对病人肝纤维化、肝癌、肺癌和直肠癌组织进行染色(图9)。荧光显微镜照片均呈现强绿色荧光, 表明FAM-cCTP可特异性识别各种病理组织中的变性胶原蛋白(图9)。DAPI对细胞核的共染色证实了病理组织中胶原蛋白的分

图 7 FAM-cCTP染色的正常(a)和受损(b, c)小鼠肠组织切片的荧光显微镜照片; (c) FAM-cCTP在存在抑制剂G(POG)₁₀的情况下, 染色的受损小鼠肠组织切片的荧光显微镜照片。DAPI对肠组织细胞核染色(蓝色)。比例尺: 50 μm (网络版彩图)

Figure 7 Fluorescence micrographs of normal (a) and impaired (b, c) mouse intestinal tissue sections stained with FAM-cCTP; (c) fluorescence micrograph of impaired mouse intestinal tissue sections stained with FAM-cCTP in the presence of inhibitor G(POG)₁₀. DAPI was used to stain the intestinal nucleus (blue). Scale bar: 50 μm (color online).

图 8 环肽探针FAM-cCTP染色(绿色)的受损的小鼠尾巴(a)、眼角膜(b)、心脏(c)和耳朵(d)组织的显微照片。DAPI同时对细胞核(蓝色)进行共染色。比例尺: 50 μm (网络版彩图)

Figure 8 Fluorescence micrographs of impaired mouse tail (a), cornea (b), heart (c) and ear (d) tissues stained with FAM-cCTP (in green) and DAPI (in blue). Scale bar: 50 μm (color online).

布。这些结果表明, 环肽探针FAM-cCTP是一种广谱型的病变胶原蛋白探针, 其胶原蛋白可以来自不同的物种(人或小鼠), 也可以属于不同的类型(纤维化中的I型、关节炎中的II型和癌症中的IV型胶原)。

4 结论

胶原蛋白是肿瘤等严重疾病的重要生物标记物, 构建胶原蛋白的高灵敏检测方法对胶原相关疾病的机理解析和治疗至关重要。与线性多肽相比, 环肽具有更为刚性的结构、更高的酶稳定性和良好的药理特性。

图 9 环肽探针FAM-cCTP对病理组织进行靶向成像. FAM-cCTP染色的病人肝纤维化(a, e, i)、肝癌(b, f, j)、肺癌(c, g, k)和直肠癌组织(d, h, l)的荧光显微镜照片(绿色). DAPI (蓝色)同时对细胞核进行染色. 比例尺: 50 μm (网络版彩图)

Figure 9 Pathological human tissue staining using unheated FAM-cCTP. Fluorescence micrographs of liver fibrosis (a, e, i), liver cancer (b, f, j), lung cancer (c, g, k) and rectal cancer (d, h, l) tissue sections stained with preheated FAM-cCTP (in green) and DAPI (in blue). Scale bar: 50 μm (color online).

我们利用邻苯二甲醛与多肽序列中的赖氨酸和半胱氨

酸反应, 在(Gly-Pro-Hyp) $_n$ 序列的基础上进行环化修饰, 成功合成了一个环肽探针FAM-cCTP. 圆二色谱和荧光实验结果均表明, 该环肽探针一直保持单链状态, 而没有环化的对照多肽则形成三重螺旋结构, 说明环化是抑制多肽探针形成三重螺旋结构的有效策略.

蛋白质结合和组织染色实验均表明, 该环肽探针FAM-cCTP在不用预加热的条件下, 可以特异性结合变性胶原蛋白. FAM-cCTP被成功地用于小鼠尾巴、眼睛、心脏和耳朵等不同组织切片和肝纤维化、肝癌、肺癌和直肠癌病人的石蜡组织切片的荧光成像. 环肽探针FAM-cCTP为病变胶原蛋白的靶向检测和病理组织染色提供了新的工具, 对肿瘤等重要疾病的机理解析和分子诊断具有重要意义. 该环肽探针还可以与N-马来酰亚胺部分反应引入新的功能基团, 或与药物、聚糖、DNA等分子连接, 构建新型多功能探针, 使其应用扩展到药物递送和治疗领域, 实现胶原相关疾病的诊疗一体化.

参考文献

- Fields GB. *J Biol Chem*, 2013, 288: 8785–8793
- Gelse K. *Adv Drug Deliver Rev*, 2003, 55: 1531–1546
- Bonnans C, Chou J, Werb Z. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15: 786–801
- Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8: 221–233
- Acerbo AS, Kwaczala AT, Yang L, Judex S, Miller LM. *Calcif Tissue Int*, 2014, 95: 446–456
- Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. *Cell*, 2010, 141: 52–67
- Myllyharju J, Kivirikko KI. *Ann Med*, 2001, 33: 7–21
- Conklin MW, Eickhoff JC, Riching KM, Pehlke CA, Eliceiri KW, Provenzano PP, Friedl A, Keely PJ. *Am J Pathol*, 2011, 178: 1221–1232
- Roxin Á, Zheng G. *Future Med Chem*, 2012, 4: 1601–1618
- Kataoka T, Beusen DD, Clark JD, Yodo M, Marshall GR. *Biopolymers*, 1992, 32: 1519–1533
- Morrison C. *Nat Rev Drug Discov*, 2018, 17: 531–533
- Driggers EM, Hale SP, Lee J, Terrett NK. *Nat Rev Drug Discov*, 2008, 7: 608–624
- Tapeinou A, Matsoukas MT, Simal C, Tselios T. *Biopolymers*, 2015, 104: 453–461
- Bruzzoni-Giovanelli H, Alezra V, Wolff N, Dong CZ, Tuffery P, Rebollo A. *Drug Discovery Today*, 2018, 23: 272–285
- Tsomaia N. *Eur J Med Chem*, 2015, 94: 459–470
- Cardote TAF, Ciulli A. *ChemMedChem*, 2016, 11: 787–794
- Qian Z, Dougherty PG, Pei D. *Curr Opin Chem Biol*, 2017, 38: 80–86
- Russo A, Aiello C, Grieco P, Marasco D. *Curr Med Chem*, 2016, 23: 748–762
- Zorzi A, Deyle K, Heinis C. *Curr Opin Chem Biol*, 2017, 38: 24–29
- Brea RJ, Reiriz C, Granja JR. *Chem Soc Rev*, 2010, 39: 1448–1456
- Wrighton NC, Farrell FX, Chang R, Kashyap AK, Barbone FP, Mulcahy LS, Johnson DL, Barrett RW, Jolliffe LK, Dower WJ. *Science*, 1996, 273: 458–463
- Staderini M, Megia-Fernandez A, Dhaliwal K, Bradley M. *Bioorg Med Chem*, 2018, 26: 2816–2826

- 23 Takita KK, Fujii KK, Kadonosono T, Masuda R, Koide T. *ChemBioChem*, 2018, 19: 1613–1617
- 24 Zhang Y, Zhang Q, Wong CTT, Li X. *J Am Chem Soc*, 2019, 141: 12274–12279
- 25 Cai X, Liu Z, Zhao S, Song C, Dong S, Xiao J. *Chem Commun*, 2017, 53: 11905–11908
- 26 Chattopadhyay S, Murphy CJ, McAnulty JF, Raines RT. *Org Biomol Chem*, 2012, 10: 5892–5897
- 27 Fields GB. *Org Biomol Chem*, 2010, 8: 1237–1258
- 28 Hwang J, Huang Y, Burwell TJ, Peterson NC, Connor J, Weiss SJ, Yu SM, Li Y. *ACS Nano*, 2017, 11: 9825–9835
- 29 Li Y, Foss CA, Summerfield DD, Doyle JJ, Torok CM, Dietz HC, Pomper MG, Yu SM. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 14767–14772
- 30 Wang AY, Foss CA, Leong S, Mo X, Pomper MG, Yu SM. *Biomacromolecules*, 2008, 9: 1755–1763
- 31 Wang AY, Mo X, Chen CS, Yu SM. *J Am Chem Soc*, 2005, 127: 4130–4131
- 32 Yu SM, Li Y, Kim D. *Soft Matter*, 2011, 7: 7927–7938

Specific recognition of denatured collagen by novel fluorescent cyclic peptide probe

Wenyu Wei¹, Zhongtian Bai², Zhao Liu², Junqiang Lei², Jianxi Xiao^{1*}

¹ State Key Laboratory of Applied Organic Chemistry, College of Chemistry and Chemical Engineering, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China

² The First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, China

*Corresponding author (email: xiaojx@lzu.edu.cn)

Abstract: As the principal component of the extracellular matrix, collagen plays an important role in various physiological processes such as cell differentiation and migration, tissue remodeling and organ morphogenesis. As a key structural protein, excessive degradation of collagen leads to severe diseases such as tumors, and it has been established as a key prognostic factor for cancer differentiation, invasion and metastasis as well as cancer stage. Therefore, the development of robust assays for collagen is crucial for the diagnosis and therapeutics for various collagen-involved diseases such as tumors. Cyclic peptides have attractive features such as more rigid structure, higher enzymatic stability and excellent pharmacological properties. We have utilized the phthalaldehyde (OPA) reaction of lysine and cysteine to achieve the cyclization of the (Gly-Pro-Hyp)_n sequence, and created a cyclic peptide probe FAM-cCTP. The cyclic peptide probe has been shown to always maintain the single stranded state, and display high specificity of pathological collagen. Furthermore, it has been successfully applied for imaging studies of a broad variety of mice and human tissues. The peptide probe synthesized by the cyclization strategy does not need the heating pretreatment, and has overcome the defects of the traditional (Gly-Pro-Hyp)_n probe. It provides a novel tool for specific detection of pathological collagen and effective staining of pathological tissues.

Keywords: denatured collagen, cyclic peptide probe, triple helical structure, tissue staining, tissue imaging

doi: [10.1360/SSC-2020-0157](https://doi.org/10.1360/SSC-2020-0157)