# 沙蚕蛋白酶的荧光标记及细胞摄取机制研究

杲亚许<sup>1</sup> 丁国芳<sup>1,2\*</sup> 杨最素<sup>1</sup> 余方苗<sup>1</sup> 黄芳芳<sup>1</sup> 唐云平<sup>1</sup> 陈艳<sup>1</sup> 陈锐<sup>1</sup> (<sup>1</sup>浙江海洋大学食品与医药学院/浙江省海洋生物医用制品工程技术研究中心,舟山 316022; <sup>2</sup>浙江省海洋水产研究所,舟山 316021)

摘要 该文利用FITC对沙蚕蛋白酶(NAP)进行荧光标记,并通过薄层色谱法、红外光谱法、 紫外光谱法及荧光光谱法对标记物进行表征,紫外分光光度法计算标记度。通过测定NAP与FITC-NAP的酶促反应动力学参数来比较NAP在标记前后的活性,同时应用MTT法考察NAP标记前后对 NCI-H1299细胞毒性的影响。流式细胞术研究NCI-H1299细胞摄取FITC-NAP的机制,荧光显微镜定 性观察NCI-H1299细胞对FITC-NAP的摄取。结果表明,每分子标记物约含1.78分子FITC,其最佳荧 光激发波长为490 nm、发射波长为515 nm;荧光标记后NAP的活性未受到显著影响;NCI-H1299细 胞对FITC-NAP的摄取与药物浓度、作用时间呈正相关;氧化苯砷组的荧光强度低于FITC-NAP组且 有极显著差异(P<0.01),因此NAP的摄取机制为内吞。进一步研究发现,NCI-H1299细胞摄取NAP受 到网格蛋白依赖性内吞和小窝/脂筏蛋白介导的内吞共同作用。荧光显微镜观察发现,随着时间的 增加,更多的细胞摄入FITC-NAP,且主要分布在细胞膜及细胞质中,细胞核中未见分布。

关键词 沙蚕蛋白酶; FITC; 荧光标记; 细胞摄取; 药物动力学

# Study on the Preparation and Cell Uptake Mechanism of Fluorescently-Labeled Nereis Active Protease

Gao Yaxu<sup>1</sup>, Ding Guofang<sup>1,2\*</sup>, Yang Zuisu<sup>1</sup>, Yu Fangmiao<sup>1</sup>, Huang Fangfang<sup>1</sup>, Tang Yunping<sup>1</sup>, Chen Yan<sup>1</sup>, Chen Rui<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Food and Medicine School of Zhejiang Ocean University, Zhejiang Provincial Engineering Technology Research Center of Marine Biomedical Products, Zhoushan 316022, China; <sup>2</sup>Marine Fisheries Research Institute of Zhejiang Province, Zhoushan 316021, China)

**Abstract** In this paper, fluorescent labeling of NAP was performed by FITC. FITC-NAP was characterized by thin-layer chromatography, infrared spectrum, ultraviolet spectrum and fluorescence spectrum. The fluorescence substitute ratio of FITC-NAP was measured by ultraviolet spectrophotometry. The activity of NAP and FITC-NAP were compared by measuring the enzymatic reaction kinetic parameters. Cell viability was evaluated by MTT assay. The uptake mechanism of NCI-H1299 cells to FITC-NAP was studied by flow cytometry. Fluorescence microscopy was used to observe the uptake of FITC-NAP qualitatively. The results indicated that each molecule of the labelled product approximately contained 1.78 molecules of FITC, The optimal fluorescence excitation and emission wavelengths of FITC-NAP were 490 nm and 515 nm. The activity of NAP after fluorescent labeling was not significantly affected. the uptake of FITC-NAP was positively correlated with drug concentration and incubation time. The fluorescence intensity of the Phenylarsine oxide group was lower than that of the FITC-NAP group and there was a significant difference (P < 0.01). This showed

\*通讯作者。Tel: 0580-2299809, E-mail: dinggf2007@163.com

收稿日期: 2018-10-14 接受日期: 2018-12-29

国家自然科学基金(批准号: 81773629)和国家海洋重大计划项目(批准号: 2015862)资助的课题

Received: October 14, 2018 Accepted: December 29, 2018

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81773629) and National Ocean Major Project (Grant No.2015862) \*Corresponding author. Tel: +86-580-2299809, E-mail: dinggf2007@163.com

网络出版时间: 2019-02-21 11:08:47 URL: http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190221.1108.004.html

that the uptake mechanism of NCI-H1299 cells to FITC-NAP was endocytosis. Further studies found that the uptake of NAP was affected by clathrin-dependent endocytosis and caveolin/lipoprotein-mediated endocytosis. Fluorescence microscopy revealed that more cells uptaked FITC-NAP over time, and FITC-NAP mainly distributed in the cell membrane and cytoplasm, no distributed in the nucleus.

Keywords nereis active protease; FITC; fluorescence labeling; cellular uptake; pharmacokinetic.

沙蚕(Nereis)属于环节动物门(Armelida)多毛纲 (Polychaeta)沙蚕科(Nereididae), 沿海地区也称之为 海蜈蚣、海虫、海蚂蟥等,在我国环渤海及江浙沿 海地区分布广泛。沙蚕是传统的海洋中药,它具有 清热解毒、消肿止痛、敛疮生肌、治疗痈疮肿毒等 功效[1]。目前利用新兴的生物技术从沙蚕体内提取 生物活性物质的研究越来越多,在日本有科学家从 沙蚕中分离出了几种多肽,这些多肽对环节动物的 食管具有较强的收缩作用,因此有望将这些多肽开 发为胃动力药[2]。研究人员应用硫酸铵沉淀、凝胶 柱层析以及电泳等生化手段从日本刺沙蚕体内分离 出一种具有抑制血小板聚集、改变血液流变学特性 的丝氨酸蛋白酶,利用这些性质可将其作为降纤和 溶栓药物,同时可以预防和治疗心、脑梗死和脑动 脉、肺动脉血栓形成等疾病[3-5]。同时,沙蚕蛋白酶 表现出对白血病细胞有明显的增殖、生长抑制作用, 并呈现出时效及量效关系[6-8]。

蛋白多肽类药物相比化学药物具有诸多优势, 它们的特异性高、毒副作用小,小剂量给药便可以 发挥较强的生理活性,目前广泛地应用于肿瘤、心 血管疾病等多种病症的治疗<sup>[9]</sup>。NAP属于大分子蛋 白多肽类药物,其吸收、分布、代谢、排泄过程与 小分子药物不同,并且血液及组织中各种内源性蛋白 会对该类药物的定性、定量分析产生很大的影响[10]。 因此传统的活体成像技术、免疫分析法、色谱法 等方法不适用于检测NAP,并且这些方法操作复杂、 需要特殊仪器以及成本高。而对目标药物进行特异 性标记是一个能解决上述问题的方法。同位素标记 法和荧光标记法是目前常用的两种标记方法。与同 位素标记法相比,荧光标记法安全且标记产物的检 测灵敏度高及特异性好[11],而且能对目标药物进行 准确地定性与定量分析, 所以本实验采用FITC对沙 蚕蛋白酶进行荧光标记,并在此基础上进行后续研 究。

近年来的数据分析发现, 肺癌是发病率最高 的恶性肿瘤, 并且每年的发病率、死亡率都在上 升,已成为肿瘤相关死亡的首要病因<sup>[12]</sup>,肺癌约 80%是非小细胞肺癌,在晚期肺癌中的比例占总数 的40%~50%<sup>[13]</sup>。研究表明,NAP对非小细胞肺癌 细胞NCI-H1299有良好的增殖抑制效应,并呈现显 著的量效及时效关系。体外实验表明,NAP诱导 NCI-H1299细胞凋亡的作用机理可能是通过下调 Bcl-2蛋白的表达、上调Bax蛋白的表达,进而诱导 线粒体膜电位的下降,促使细胞色素C的转移,而激 发Caspase家族发生级联反应最终导致肿瘤细胞的 凋亡<sup>[14]</sup>。但NCI-H1299细胞摄取NAP的特性、途径 以及摄取后其在细胞中的分布情况未见研究,而药 物的入胞途径关系着其经细胞摄取后在胞内的分布 和命运<sup>[15]</sup>,因此,研究NAP的细胞摄取和胞内分布情 况,对于今后研究NAP的药物制剂、药理学和药代 动力学具有重要意义。

# 1 材料与方法

# 1.1 细胞与试剂

NCI-H1299细胞株购于中国科学院细胞库,由本实验室传代培养;沙蚕蛋白酶为吉林大学洪敏教授惠赠; RPMI 1640粉末培养基、0.25%胰蛋白酶-EDTA购于Gibco公司;胎牛血清购于杭州四季青生物工程有限公司;二甲基亚砜(DMSO)购于国药集团化学试剂有限公司;H-D-Phe-Pip-Arg-pNA (S-2238)购于北京阿斯雷尔生物技术有限公司;3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)、维拉帕米、MK-571、氧化苯砷、异硫氰酸荧光素(FITC)购于美国Sigma公司;抗荧光淬灭剂、DAPI染液、DiI细胞膜红色荧光探针购于上海碧云天生物技术有限公司;制霉菌素、氯丙嗪购于生工生物工程(上海)股份有限公司;薄层层析硅胶板购于烟台江友硅胶开发有限公司;其他试剂均为国产分析纯。

## 1.2 主要仪器与设备

Forma3111型CO<sub>2</sub>培养箱购于美国Thermo公司;多功能酶标仪购于美国美谷分子仪器有限公司; CKX4倒置显微镜购于日本OLYMPUS公司;傅里叶 变换红外光谱仪购于德国Bruker公司; RF-6000型炭 光分光光度计购于日本日立仪器有限公司; 流式细 胞仪购于美国Millipore公司; 荧光显微镜购于日本 OLYMPUS公司; 恒温层析柜购于上海嘉鹏科技有 限公司; CF16RN型高速冷冻离心机购于日本日立仪 器有限公司; 紫外分光光度计(752FC)购于上海光谱 仪器有限公司; AUW-120型电子天平购于日本岛津 (上海)有限公司; ZHJH-C1209型超净工作台购于上 海智诚分析仪器制造有限公司; LDZF-30KB立式高 压蒸汽灭菌器购于上海申安医疗器械有限公司。

### 1.3 实验方法

1.3.1 NAP的制备 沙蚕活虫粉碎,过滤去除虫体, 取其体液,加入1倍体积缓冲液(0.02 mol/L, pH7.0, PBS)混匀,离心收集上清液,随后用硫酸铵分段盐 析,透析除盐后进行Sephacryl 200凝胶过滤层析和 Phetryl Sepharose疏水层析,最终从沙蚕中分离得到 了沙蚕蛋白酶(NAP)<sup>[4]</sup>。

1.3.2 荧光标记NAP 按两者的物质的量比为2:1 称取FITC及NAP。用pH9.0的碳酸盐缓冲液溶解 NAP, 然后将FITC分批加入含有NAP的碳酸盐缓冲 液(pH9.0)中,充分搅拌,最后置于4℃恒温层析柜中 在避光条件下磁力搅拌,让其充分反应24 h后停止 反应。反应液放入500 Da透析袋并在PBS缓冲液中 透析,除去盐类小分子和未反应的FITC,24 h后更换 1次PBS缓冲液,每隔4 h吸出10 mL透析液,用荧光分 光光度计测量荧光强度,直到透析液的荧光强度与 空白PBS溶液相同后停止透析,取出标记溶液,加入 3倍量体积的无水乙醇并混合均匀,溶液中析出红棕 色沉淀物质,12 000 r/min离心5 min。离心后的沉淀 分别用95%乙醇、无水乙醇各洗涤1次,得到高纯度 的FITC-NAP,最后冷冻干燥,-20 ℃保存。

1.3.3 薄层色谱分析 配制FITC、沙蚕蛋白酶及 FITC-NAP溶液,点样于预制硅胶板,并用吹风机 吹干,放入层析缸中,使用的展开剂为乙醇--水溶液 (3:1, V/V),展开后吹风机吹干,然后利用凝胶成像仪 在365 nm波长紫外光源的照射下观察并拍照,通过 荧光点的位置来判断荧光标记的成功与否。

 1.3.4 荧光取代度的测定 称取1 mg FITC,容量 瓶定容配置成0.1 mg/mL的FITC溶液,用水分别稀释 成0.005 μg/mL、0.01 μg/mL、0.5 μg/mL、1 μg/mL、 10 μg/mL的溶液,紫外光分光光度计选取492 nm波 长并测定各浓度溶液的吸光度D值。制作标准曲线, 其中横坐标为FITC的浓度,纵坐标为吸光度值D。 取10 μg/mL的FITC-NAP溶液测定其吸光度值D,计 算出FITC-NAP的标记度,荧光标记物FITC-NAP的 标记度定义为单位物质的量的NAP中含有的FITC 的物质的量,按照下式进行计算。标记度=FITC-NAP中FITC物质的量/FITC-NAP物质的量。

1.3.5 红外光谱分析 利用傅里叶变换红外光谱 法,通过对比荧光标记前后沙蚕蛋白酶和FITC的 红外光谱图来分析标记前后沙蚕蛋白酶的结构变 化信息。称量1 mg干燥的样品与色谱级的KBr充 分均匀混合,用压片机压制成片,通过傅里叶变换 红外光谱仪进行分析,光谱仪参数如下:扫描范围 400~4 000 cm<sup>-1</sup>,扫描次数64次,分辨率4.0。

1.3.6 紫外光谱分析 用分析天平称取FITC、沙 蚕蛋白酶及FITC-NAP粉末1 mg, 蒸馏水溶解并用容 量瓶定容至10 mL, 得到0.1 mg/mL的样品溶液。用 水为空白对照校准调零, 利用紫外分光光度计对各 样品在420~600 nm范围扫描, 得到各样品紫外光谱 图。

1.3.7 荧光光谱分析 样品配制同"方法1.3.6"。然 后用荧光分光光度计的3D扫描模式对FITC、沙蚕 蛋白酶及FITC-NAP进行全波长扫描,通过对比分析 FITC、沙蚕蛋白酶及FITC-NAP激发波长与发射波 长判断荧光标记成功与否,波谱扫描范围:激发波长 400~600 nm,发射波长450~600 nm。

1.3.8 酶促反应动力学参数测定 采用底物水解 法,观察底物浓度对酶促反应速度的影响并测定动 力学参数。研究表明,凝血酶的特异性发色底物 S-2238(H-D-Phe-Pip-Arg-pNA)同时也是NAP的特 异性底物,因此配制不同浓度的S-2238底物(0.225、 0.45、0.9、1.8、3.6 mmol/L), 在96孔板中每孔加入 300 µL不同浓度的S-2238底物溶液,然后分别加入 20 µL 100 µg/mL的NAP溶液及FITC-NAP溶液。混 匀后立刻用多功能酶标仪连续测量其在380 nm下 的吸光度值的变化, 计算反应初速度, 并绘制曲线分 析底物浓度与反应初速度的关系。根据底物浓度 倒数和反应初速度倒数进行双倒数作图法(double reciprocal plot), 也称为林-贝氏(Lineweaver-Burk)作 图法,得出林--贝氏方程式,求出酶的米氏常数(K<sub>m</sub>) 和最大反应速度(V<sub>max</sub>),并比较FITC-NAP和NAP的 酶促反应动力学参数。

1.3.9 细胞培养 NCI-H1299细胞在RPMI 1640培

养液(含10%胎牛血清、青霉素100 IU/mL、链霉素 100 IU/mL)中进行培养,置于37℃、5% CO₂的培养 箱中孵育,每天换液,待细胞长至占培养瓶底部80% 以上时用0.25%胰蛋白酶溶液进行消化传代。选取 处于对数生长期的细胞来进行实验。

1.3.10 细胞毒性实验 取汇合度为80%~90%的细 胞,用0.25%胰蛋白酶消化分散离心后,计数并调整 细胞浓度,均匀地铺于96孔板中,每孔细胞数约为 1.5×10<sup>4</sup>个, 置于37 ℃、5% CO<sub>2</sub>的条件下培养24 h。 用RPMI 1640培养基将NAP和FITC-NAP配制成浓度 为4、6、8、10、12、14、16 µg/mL溶液,细胞在此 药物浓度梯度下于细胞箱培养4h后,吸出加药培养 液并向每孔中加入200 µL浓度为5 mg/mL的MTT溶 液,继续培养4h后,小心吸除MTT溶液,加入150 µL DMSO, 震荡15 min使紫色结晶体充分溶解, 并用 酶标仪测定490 nm处的吸光度值, 以未加药物处理 的孔作为对照组计算细胞存活率,公式如下:存活 率%=(D1-D3)/(D2-D3)×100%。式中D1为药物组吸 光度值; D2为对照组吸光度值; D3为空白孔吸光度 值。

1.3.11 FITC-NAP浓度对NCI-H1299细胞摄入 FITC-NAP的影响 细胞的消化同"方法1.3.10"。 计数后用营养液将细胞浓度稀释为1×10<sup>5</sup>个/mL, 6 孔板每孔接种2 mL。培养24 h后,去除旧营养液,用 PBS漂洗细胞表面3次除去杂质。随机分为对照组和 实验组,其中实验组加入2 mL含不同浓度(6 μg/mL、 8 μg/mL、10 μg/mL) FITC-NAP的营养液; 对照组加 入等体积不含FITC-NAP的营养液。培养2h后,吸 出加药培养液,用PBS缓冲液漂洗细胞3次,除去未 被细胞摄取的FITC-NAP, 避免其对实验结果的影 响。然后消化细胞, 室温下1 000 r/min离心5 min收 集细胞,再用PBS缓冲液洗涤1次,最后用200 μL PBS 制备成细胞悬液,过200目筛子除去成团细胞及杂 质,通过流式细胞仪检测各组细胞内的荧光强度,每 组吸取10 000个细胞, 通过设门去除细胞碎片, 每组 实验平行做3次。

1.3.12 FITC-NAP作用时间对NCI-H1299细胞摄入
FITC-NAP的影响 细胞前处理同"方法1.3.11"。
用营养液配制浓度为10 μg/mL FITC-NAP溶液,设定
0 min、20 min、40 min、60 min、80 min和100 min
6个时间组,流式细胞仪检测各组细胞内荧光强度,分析药物作用时间对细胞摄取FITC-NAP的影响。

1.3.13 不同药物对NCI-H1299细胞摄入FITC-NAP 的影响 为了研究NCI-H1299细胞对FITC-NAP 的摄取途径及药物外排是否受到某些转运蛋白的 介导,采用相关的抑制剂作用于细胞,然后观察 细胞对FITC-NAP的摄取是否受到影响。细胞的 前处理同"方法1.3.11",随后分别加入含有维拉帕 米(100 μmol/L)、MK-571(50 μmol/L)和氧化苯砷 (10 mmol/L)的培养液作用于细胞30 min,其中,维 拉帕米和氧化苯砷溶解于含0.1% DMSO的PBS中, 用PBS缓冲液漂洗后加入10 μg/mL的FITC-NAP溶 液后继续培养2 h。然后用流式细胞仪检测各组细 胞内荧光强度,通过结果分析FITC-NAP的摄取途径 及药物外排情况。

1.3.14 NCI-H1299细胞对FITC-NAP的摄入机制研 究 药物的入胞的方式决定着药物的命运,于是进 行了NCI-H1299细胞对FITC-NAP的内吞机制的进 一步研究。利用氯丙嗪和制霉菌素两种内吞抑制剂 作用于NCI-H1299细胞,然后观察细胞对FITC-NAP 的摄取是否受到影响。细胞的前处理同"方法1.3.11", 随后分别加入含有氯丙嗪(6 μg/mL)、制霉菌素(24 μg/mL)以及同时含有氯丙嗪(6 μg/mL)和制霉菌素 (24 μg/mL)的培养液,其中,制霉菌素溶解于含0.1% DMSO的PBS中,作用30 min后用PBS缓冲液漂洗后 加入10 μg/mL的FITC-NAP溶液后继续培养2 h。然 后用流式细胞仪检测各组细胞内荧光强度,通过结 果分析FITC-NAP的内吞是否受到网格蛋白和小窝/ 脂筏蛋白的介导。

1.3.15 荧光显微镜观察NCI-H1299细胞对FITC-NAP的摄入 细胞消化后计数,调整细胞浓度约为 1×10<sup>5</sup>个/mL,取2 mL细胞悬液接种于6孔板中的盖玻 片上,摇匀后培养24 h,当细胞汇合度达到80%~90% 后,进行摄取实验,用PBS缓冲液漂洗3次去除杂质。 用培养液配制10 μg/mL FITC-NAP的溶液;设加药 组和空白对照组(只加营养液),分别作用不同时间 (0 min、60 min和120 min)后,吸去培养液,PBS缓冲 液漂洗细胞3次,4%多聚甲醛固定15 min,再用PBS 缓冲液漂洗细胞3次,然后用DAPI染料染色5 min, 用PBS缓冲液清洗细胞3次;再用DiI染料染色5 min, 用PBS缓冲液清洗细胞3次。最后取出盖玻片,倒置 在预先滴加了抗荧光淬灭剂的载玻片上,选择不同 的激发光,通过荧光显微镜观察NCI-H1299细胞对 FITC-NAP摄取并拍照。

# 2 结果

# 2.1 薄层色谱分析

通过TLC结果分析发现:未经FITC标记的NAP 未表现出荧光,证实NAP缺乏荧光基团;而荧光标 记物FITC-NAP呈现可见的绿色荧光,表明沙蚕蛋 白酶上赖氨酸残基的游离氨基与FITC发生亲核反 应,形成硫脲连接共价结合,使NAP带有荧光发色 物质;FITC-NAP的迁移率较小并且与FITC的迁移 率有明显差异,这与NAP是大分子量蛋白的分子特 征相符合,标记产物中没有出现与FITC迁移率相同 的荧光点,证明FITC-NAP中的荧光物质不是游离 的FITC,而是与NAP形成共价键结合在一起(图1)。 综上所述TLC分析结果初步证明,FITC-NAP荧光标 记成功。

#### 2.2 荧光取代度的测定

选择492 nm为FITC含量测定的波长,FITC 的浓度在0.1~10 µg/mL范围内线性关系良好,标 准曲线如图2,其回归方程为y=0.017 4x+0.034 6 (*R*<sup>2</sup>=0.998 4),测得FITC-NAP的标记度为1.78,即标 记后每分子的FITC-NAP约含1.78分子FITC。

#### 2.3 红外光谱分析

红外光谱常用于确认已知化合物结构以及比 对化合物结构信息。通过红外光谱图对比发现, NAP及FITC-NAP的红外光谱图峰形基本相同(图3), 特别在1330~400 cm<sup>-1</sup>范围内的"指纹区", 谱线基本 重叠, 表明FITC-NAP保留了NAP的结构特征。然 而, FITC-NAP上FITC的特征结构却不明显, 分析可 能是因为NAP是一种分子量28 kDa的大分子蛋白质,



图1 NAP、荧光标记反应产物FITC-NAP及FITC的TLC分析 Fig.1 TLC analysis of NAP, fluorescence-labeled FITC-NAP and FITC



而本实验标记的每分子NAP只结合了1.78分子的 FITC,因此FITC基团的量在FITC-NAP中不占优势, 导致FITC的特征谱带响应较弱,其结构信息也可能 被NAP的原始结构所掩盖。结构是生物大分子展现 特定物化特性、发挥生理功能的基础,NAP在荧光 标记过程中结构特征未发生显著变化,这有利于后 续将FITC-NAP应用于NAP的药代动力学、吸收代 谢、生理功能等方面的研究。

#### 2.4 紫外光谱分析

由紫外光谱图可以看出,沙蚕蛋白酶在420~600 nm范围内无特征吸收峰,荧光染料FITC的吸收峰 在492 nm处,而FITC-NAP在492 nm处也出现吸收峰, 说明沙蚕蛋白酶上成功地结合了FITC荧光染料(图4)。

# 2.5 荧光光谱分析

NAP未呈现出典型的荧光光谱特征(图5A)。荧光染料FITC的最佳激发波长为490 nm、发射波长



A: FITC-NAP; B: NAP; C: FITC.

图3 FITC-NAP、NAP及FITC红外光谱图 Fig.3 Infrared spectra of FITC-NAP, NAP and FITC







Fig.6 Effects of substrate on reaction velocity

为520 nm(图5B), 而标记物FITC-NAP在激发波长为490 nm、发射波长为515 nm的测定条件下具有最大的荧光强度(图5C), 两者荧光光谱特征相似并出现了微弱的红移, 推测可能NAP与FITC结合, 引起极

性增加而产生红移。

# 2.6 酶促反应动力学参数测定

以底物浓度为横坐标,反应初速度为纵坐标 绘制曲线,如图6。当底物浓度在较低范围时,酶促



Fig.7 Double reciprocal plot for hydrolysis of S-2238 with the NAP and FITC-NAP



反应初速度随底物浓度的增加而急剧上升,并 且呈正比关系,此时属于一级反应。随着底物 浓度的进一步增高,反应速度增加的幅度逐渐 下降,不再呈现正比关系。通过双倒数作图法 (double reciprocal plot),如图7所示,得出NAP的 林-贝氏方程式为: y=22.062x+31.340,其米氏常 数 $K_m$ =0.705±0.046 mmol/L,最大反应速度 $V_{max}$ = 1.654±0.056 mmol/min/mg。FITC-NAP的林-贝氏方 程式为y=23.998x+30.625, $K_m$ =0.785±0.065 mmol/L,  $V_{max}$ =1.693±0.073 mmoL/min/mg。FITC-NAP的 $K_m$ 和 $V_{max}$ 与NAP相比不存在显著性差异(P>0.05)。所 以NAP的荧光标记对NAP的生物活性没有产生显著 性影响。

#### 2.7 细胞毒性实验

将FITC-NAP组和NAP组的各浓度组进行组间对比,其对细胞的存活率影响不存在显著性差

异,因此MTT实验结果表明,荧光标记过程没有对 NAP的生物活性产生显著影响。随着药物浓度的 增加,NCI-H1299细胞存活率逐渐降低。当质量浓 度小于12 μg/mL时,NCI-H1299细胞的存活率大于 90%(图8),所以后续实验选取的FITC-NAP浓度要 小于12 μg/mL,这样才能保证细胞的存活率,从而 不会影响到后续的摄取实验。

# **2.8** 药物浓度对NCI-H1299细胞摄入FITC-NAP 的影响

流式细胞术结果表明,随着FITC-NAP浓度的增加,细胞内的荧光强度逐渐增强,可见越来越多的细胞摄取了FITC-NAP。与空白组相比,浓度6 μg/mL 组、浓度8 μg/mL组和浓度10 μg/mL组的细胞荧光 强度具有极显著性差异(P<0.01)(图9)。说明细胞对 FITC-NAP的摄取属于浓度依赖型,而且在实验的浓 度范围内没有达到吸收饱和。



\*\*P<0.01,与control组比较。 \*\*P<0.01 vs control group.





\*\*P<0.01, 与0 min组比较。 \*\*P<0.01 vs 0 min group.



# 2.9 药物作用时间对NCI-H1299细胞摄入FITC-NAP的影响

实验结果显示,在一定的药物浓度下,随着药物作用时间的增加,细胞内荧光强度也逐渐增加,表明NCI-H1299细胞对FITC-NAP的摄取量随时间的延长而增加,且在100 min内未见饱和。各时间段的细胞荧光强度与空白组相比具有极显著性差异(P<0.01)(图10),因此NCI-H1299细胞对FITC-NAP的摄取存在明显的时间依赖性。

# 2.10 不同药物对NCI-H1299细胞摄入FITC-NAP的影响

药物跨膜吸收主要包括被动转运、主动转运、 膜动转运三种途径。若以转运是否需要转运体来划 分,可分为转运体介导的转运和非转运体介导的转运<sup>[16]</sup>。不同药物对NCI-H1299细胞摄入FITC-NAP的影响见图11,与FITC-NAP组相比,维拉帕米(P-糖蛋白抑制剂)和MK-571(多药耐药蛋白抑制剂)没有显著影响NCI-H1299细胞对FITC-NAP的摄取,而氧化苯砷组与FITC-NAP组相比具有极显著性差异(P<0.01),氧化苯砷是内吞抑制剂,它能抑制细胞的内吞作用,因此结果表明,NCI-H1299细胞对FITC-NAP吸收途径是内吞; P-糖蛋白与多药耐药蛋白没有介导FITC-NAP的外排。

# 2.11 NCI-H1299细胞对FITC-NAP的摄入机制研 究

氯丙嗪(chlorpromazine)是网格蛋白依赖性



\*\*P<0.01, 与FITC-NAP组比较。 \*\*P<0.01 vs FITC-NAP group.

图11 药物对NCI-H1299细胞摄入FITC-NAP的影响 Fig.11 Effect of drugs on the uptake of FITC-NAP by NCI-H1299 cells



\*P<0.05, \*\*P<0.01, 与FITC-NAP组比较。 \*P<0.05, \*\*P<0.01 vs FITC-NAP group.

内吞抑制剂,制霉菌素(nystatin)是小窝/脂筏蛋 白介导的内吞抑制剂。由图12可知,制霉菌素组 的荧光强度低于FITC-NAP组且具有显著性差异 (P<0.05),而氯丙嗪组与FITC-NAP组相比具有极 显著性差异(P<0.01)。由此可见,NCI-H1299细胞 对NAP的内吞受到网格蛋白通路和小窝/脂筏通路 这两条内吞通路共同调节。当氯丙嗪和制霉菌素 同时作用于细胞时,细胞摄取NAP受到显著抑制, 但相对于空白组其荧光强度具有显著性差异,说明 细胞并没有停止对NAP的摄取。推测可能是因为 这两种内吞抑制剂并不能完全抑制细胞的内吞作 用,也有可能存在其他的内吞通路,这有待进一步 深入研究。

# 2.12 荧光显微镜观察NCI-H1299细胞对FITC-NAP的摄入

细胞核能被DAPI染液染成蓝色,因此可以利用 DAPI对细胞核来进行定位,而细胞膜及细胞质能被 DiI染料染成红色,FITC-NAP在荧光显微镜下发出 绿色荧光。药物不同作用时间对NCI-H1299细胞摄 取FITC-NAP的影响如图13所示,从荧光显微镜拍 摄的照片可以看出,未与FITC-NAP孵育的细胞细 胞内没有绿色荧光,加药组60 min后,部分细胞摄取 了FITC-NAP,且荧光主要分布在细胞膜,细胞质中 含有少量绿色荧光,随着时间的推移大多数细胞的 细胞膜及细胞质中出现绿色荧光,且荧光强度随着 时间的增加而增加,说明更多的细胞摄取了FITC-

图12 不同抑制剂对NCI-H1299细胞摄入FITC-NAP的影响 Fig.12 Effect of different inhibitors on the uptake of FITC-NAP by NCI-H1299 cells



A: 0 min组, 未加药组细胞未观察到绿色荧光; B: 60 min组, 部分细胞表面及细胞质有绿色荧光分布且荧光强度较弱; C: 120 min组, 大多数细胞 带有绿色荧光且荧光强度较强; D: FITC与DAPI的重叠图; E: DiI与DAPI的重叠图。

A: 0 min group, green fluorescence was not observed in untreated group; B: 60 min group, some cell surface and cytoplasm had green fluorescence distribution and weak fluorescence intensity; C: 120 min group, most of the cells had green fluorescence and strong fluorescence intensity; D: overlay of FITC and DAPI; E: overlay of DiI and DAPI.

## 图13 不同时间NCI-H1299细胞摄入FITC-NAP的荧光显微镜照片 Fig.13 Fluorescence microscope photo of NCI-H1299 cells ingest FITC-NAP at different times

NAP。通过重叠图对比发现,绿色荧光主要分布在 细胞膜及细胞质中,细胞核中未见分布,说明FITC-NAP无法通过细胞核的核孔进入细胞核。

# 3 讨论

目前, 生物大分子药物在药物研究开发中被认 为是前沿性尖端的研究领域, 生物大分子药物包括蛋 白、抗体、疫苗、核酸药物、多糖、甚至细胞等生 物体内源性成分。与化学药物比较, 生物大分子药物 的靶向性、高水溶性、高效的生理活性、具有独立 构型以及毒副作用小等特性使其具有明显优势<sup>[17]</sup>, 同 时可以利用生物提取和化学合成的方法大量生产, 并且对肿瘤、艾滋病、心脑血管病等重大疾病有着 良好的治疗效果,所以说它们是天然药物最好的来 源。由于生物大分子药物,特别是由氨基酸组成的 蛋白多肽药物,具有相对分子量大、不易透过生物 膜、易在体内酶解、降解代谢途径多样等特点<sup>[18]</sup>, 因此其在生物体内的吸收、分布、代谢及排泄是特 殊而又复杂的过程。而且用药剂量较小,与此同时 生物体内大量相似物质容易产生干扰,大大增加了 检测难度。荧光标记技术是通过荧光探测在分子水 平上进行检测的方法,该技术可视性强,灵敏度高, 生物背景干扰小,可以动态检测活细胞及生物体内 的生物大分子并观察其组织和细胞行为[19]。在进行 生物分子标记时,荧光染料是非常重要的工具,荧光 染料的选择对标记效果、标记物生物活性和后续实 验有着重要影响。FITC是一种量子产率高和荧光 寿命长的荧光染料,具有较好的光稳定性以及低温 度系数的特点,既可以进行动态定性观测,又可以用 于定量检测<sup>[20]</sup>。梁重阳等<sup>[21]</sup>利用FITC对重组灵芝免 疫调节蛋白(rLz-8)进行标记,并研究其在NB4细胞 中的动态定位,从而阐明rLz-8诱导NB4肿瘤细胞凋 亡可能的亚细胞学机制。孙爽等[22]对同时包载人参 3种成分的透明质酸修饰的纳米脂质载体进行FITC 荧光标记,并通过流式细胞仪定量检测SMMC-7721 细胞对HA-OUR-NLC摄取情况。可见FITC荧光标 记适用于生物大分子的标记,这有利于后续的深入 研究。本研究利用FITC标记NAP可以为其吸收代 谢过程、功能机理、生物分子间相互作用等进一 步研究提供有力的工具。对于标记产物而言,其标 记度过低,标记物的荧光强度不足,不利于后续的观 察分析。而标记度过高,可能导致标记物的原始结 构特征发生变化,从而改变原有生理活性功能,为功 能机理研究、构效关系研究等造成干扰,无法实现 等效研究。本研究中每分子标记产物中约含1.78分 子FITC, 傅里叶变换红外光谱比较分析的结果表明, 标记前后NAP的结构特征未发生明显变化、故标记 产物FITC-NAP的标记度合理, FITC-NAP的酶促反 应动力学参数以及细胞毒性实验与NAP相比没有显 著性差异,所以荧光标记过程没有对NAP的生物活 性产生显著影响, FITC-NAP可以应用于后续研究。

内吞作用(endocytosis)又称入胞作用或胞吞 作用,是通过质膜的变形运动将细胞外物质转运入 细胞内的过程。细胞内吞途径主要包括吞噬作用 (phagocytosis)、网格蛋白依赖性细胞内吞(clathrindependent endocytosis)、小窝/脂筏蛋白介导的细胞 内吞(caveolin-mediated endocytosis)、非网格蛋白和 非小窝蛋白依赖性细胞内吞(clathrin-and caveolinindependent endocytosis)、巨胞饮(macropinocytosis) 等<sup>[23]</sup>。其中网格蛋白途径和小窝/脂筏途径是真核 细胞内吞机制中极为重要的两条通路,国内外研究 表明,网格蛋白途径在调控物质的内吞摄取、转运 以及分解代谢起着重要作用<sup>[24]</sup>,小窝/脂筏介导的 内吞作用是另一条极为重要的内吞通路,近年来也

越来越受到研究者的关注[25]。目前,研究细胞对生 物大分子的内吞机制时,使用最多的方法就是应用 多种内吞相关性抑制剂作用于细胞,抑制细胞相 应的内吞水平,从而找出细胞在摄取该生物大分子 时起到主导作用的内吞机制。本实验采用内吞抑 制剂氧化苯砷作用于细胞后,发现药物组细胞摄取 的FITC-NAP显著低于FITC-NAP组,这说明FITC-NAP进入细胞的途径为内吞作用,进一步研究发现, NCI-H1299细胞对NAP的摄取受到网格蛋白依赖性 内吞和小窝/脂筏蛋白介导的内吞共同作用。在内 吞途径中,这两种通路并非独立的,而是联合作用并 且发挥着不同作用<sup>[26]</sup>, 受小窝/脂筏蛋白介导的通路 是一种低效率内吞, 而受网络蛋白介导的通路是一 种高效率内吞,一个循坏只需要6 min<sup>[27]</sup>。因此,可 否利用联合用药将细胞对NAP的摄取转移到网络蛋 白介导的高效率内吞上,有待进一步研究,这对更好 地发挥NAP的药效至关重要。同时,药物的不同入 胞途径决定其进入细胞后会分布于不同位置,由于 胞内环境不同,因而对于药物最终的命运具有极大 影响[28]。如果药物通过网格蛋白介导入胞后首先进 入早期内涵体,之后转运到溶酶体;而通过小窝蛋白 介导入胞后,一部分进入内质网,另一部分进入高尔 基体,之后转运到溶酶体;通过巨胞饮途径入胞则会 直接进入溶酶体。大分子药物的摄取对其生物学活 性和治疗效果有着重要影响,因此,探明沙蚕蛋白酶 的内吞机制,采用相关的内吞促进剂或抑制剂来调 节肿瘤细胞对NAP的摄取,对发挥NAP的生物活性 以及体内治疗效果有着非常重要的意义。

#### 参考文献 (References)

- 1 管华诗. 中华海洋本草. 上海: 上海科学技术出版社, 2009, 1102-3.
- 2 Takahashi T, Furukawa Y, Muneoka Y, Matsushima O, Ikeda T, Fujita T, *et al.* Isolation and characterization of four novel bioactive peptides from a polychaete annelid, perinereis vancaurica. Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol 1995; 110(3): 297-304.
- 3 张云龙, 洪敏, 王艳萍, 石立红, 李奇, 黄浩刚. 一种新的沙蚕 纤溶酶的纯化、活性鉴定及部分分子特性. 吉林大学学报(医 学 版)[Zhang Yunlong, Hong Min, Wang Yanping, Shi Lihong, Li Qi, Huang Haogang. Purification, identification and partial characteristics of a novel fibrinolytic protease from Nereis virens. Journal of Jilin University (Medicine Edition)] 2007; 33(2): 301-5.
- 4 李奇, 王昭, 洪敏. 一组新的沙蚕蛋白酶同工酶的分离纯化与鉴定. 中国生物化学与分子生物学报(Li Qi, Wang Zhao, Hong

Min. Purification and identification of new isoenzymes of nereid proteinase. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology) 2008; 24(4): 358-64.

- 5 白若伦,李奇,刘佳,姜曦,洪敏. 沙蚕蛋白酶对血小板聚集及血液流变学的影响. 中国新药杂志(Bai Ruolun, Li Qi, Liu Jia, Jiang Xi, Hong Min. Effects of *Nereis* vreins proteinase on platelet aggregation and hemorheology. Chinese Journal of New Drugs) 2009; 18(10): 930-3.
- 6 Ge X, Bo QQ, Hong XY, Jiang X, Hong M, Liu JK. A novel acidic serine protease, ASPNJ inhibits proliferation, induces apoptosis and enhances chemo-susceptibility of acute promyelocytic leukemia cell. Leuk Res 2013; 37(12): 1697-703.
- 7 薄其青, 葛鑫, 崔佳乐, 姜雪, 刘剑凯, 洪敏. 酸性丝氨酸蛋白 酶ASP<sub>NJ</sub>对K563白血病细胞的抑制与损伤作用研究. 中国 生化药物杂志(Bo Qiqing, Ge Xin, Cui Jiale, Jiang Xue, Liu Jiankai, Hong Min. Effects of acidic serine protease ASP<sub>NJ</sub> on inhibition and injury of leukemia cell K562. Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics) 2012; 33(6): 736-9.
- 8 张连芝, 王少华, 邓志会, 薄其青, 葛鑫, 洪敏. 日本刺沙蚕 纤溶酶的酶学性质及其分类.吉林大学学报(医学版)[Zhang Lianzhi, Wang Shaohua, Deng Zhihui, Bo Qiqing, Ge Xin, Hong Min. Enzyme properties and classification of *Neanthes japonica* (Iznka) fibrinolytic enzyme. Journal of Jilin University (Medicine Edition)] 2011; 37(2): 267-70.
- 9 Lewis L, Richard J. Challenges in the delivery of peptide drugs: an industry perspective. Therapeutic Delivery 2015; 6(2): 149-63.
- 10 周浩泽, 沈子龙, 徐寒梅. 蛋白多肽类药物药代动力学分析方 法研究进展. 药学进展(Zhou Haoze, Shen Zilong, Xu Hanmei. Recent progress in pharmacokinetic analysis of protein and peptide drugs. Progress in Pharmaceutical Sciences) 2017; 41(8): 592-9.
- 11 王俊, 吴反修, 常耀光, 陈丰, 续晓琪. 海参硫酸软骨素的荧光标记方法. 食品科学(Wang Jun, Wu Fuxiu, Chang Yaoguang, Chen Feng, Xu Xiaoqi. Fluorescence Labeling of Sea Cucumber Chondroitin Sulfate. Food Science) 2018; 39(7): 1-6.
- 12 Jemal A. Siegel R. Ward E. Hao Yongping. Xu Jiaquan. Thun MJ. Cancer statistics 2009. A Cancer Journal for Clinicians 2009; 59(4): 225-49.
- 13 Winer E, Gralow J, Diller L, Karlan B, Loehrer P, Pierce L, *et al.* Clinical cancer advances 2008: major research advances in cancer treatment, prevention, and screening—a report from the american society of clinical oncology. J Clin Oncol 2009; 27(5): 190-205.
- 14 张国梅,杨最素,丁国芳,黄芳芳,赵玉勤. 沙蚕活性蛋白酶 诱导人肺癌SPC-A-1细胞凋亡的机制研究. 现代食品科技 (Zhang Guomei, Yang Yuansu, Ding Guofang, Huang Fangfang, Zhao Yuqing. The mechanism of *Nereis* active protease-induced apoptosis in lung cancer SPC-A-1 cells. Modern Food Science & Technology) 2015; 31(3): 6-11.

- 15 Sahay G, Alakhova DY, Kabanov AV. Endocytosis of nanomedicines. J Control Release 2010; 145(3): 182-95.
- 16 陈西敬. 药物代谢动力学研究进展. 北京: 化学工业出版社, 2008, 18-20.
- 17 Xu HM, Yin R, Chen L, Siraj S, Wang Y. An RGD-modified endostatin-derived synthetic peptide shows antitumor activity *in vivo*. Bioconjugate Chemistry 2008; 19(10): 1980-6.
- 18 Luu KT, Bergqvist S, Chen E, Hu-Lowe D, Kraynov E. A modelbased approach to predicting the human pharmacokinetics of a monoclonal antibody exhibiting target-mediated drug disposition. J Pharmacol Exp Ther 2012; 341(3): 702-8.
- 19 Hoffmann C, Leroydudal J, Patel S, Gallet O, Pauthe E. Fluorescein isothiocyanate-labeled human plasma fibronectin in extracellular matrix remodeling. Anal Biochem 2008; 372(1): 62-71.
- 20 张雪梅, 胡志宇. 异硫氰酸荧光素在荧光标记领域的应用. 昆明学院学报(Zhang Xuemei, Hu Zhiyu. Application of flourescein isothiocyanate in the field of fluorescent labeling. Journal of Kunming Teachers College) 2015; 37(6): 56-9.
- 21 梁重阳, 徐蔚青, 曹焱鑫, 刘立侠, 张淑芹, 刘志屹, 等. FITC 标记重组灵芝免疫调节蛋白(rLz-8)在NB4细胞中的动态定 位. 高等学校化学学报(Liang Chongyang, Xu Weiqing, Cao Yuxin, Liu Lixia, Zhang Shuqin, Liu Zhiwei, *et al.* Dynamic observation of cellular localization of fluorescein isothiocyanate labeled recombinant ganoderma lucidum immunoregulatory protein (rLz-8) in NB4 APL cell. Chemical Journal of Chinese Universities) 2009; 30(3): 489-92.
- 22 孙爽, 尚尔雨, 肖洪彬, 鞠爱霞, 郭玉岩, 李永吉, 等. 同时包载 人参3种成分的透明质酸修饰的纳米脂质载体的制备及表 征. 中草药(Sun Shuang, Shang Eryu, Xiao Hongbin, Qi Aixia, Guo Yuyan, Li Yongji, *et al.* Preparation and characterization of nanostructured lipid carrier modified by hyaluronic acid loaded with three components in *Ginseng Radix*. Chinese Traditional and Herbal Drugs) 2018; 49(16): 3815-20.
- 23 Mosesson Y, Mills GB, Yarden Y. Derailed endocytosis: an emerging feature of cancer. Nat Rev Cancer 2008; 8(11): 835-50.
- 24 Le Roy C, Wrana JL.. Clathrin- and non-clathrin-mediated endocytic regulation of cell signalling. Nat Rev Mol Cell Biol 2005; 6(2): 112-26.
- 25 Parton RG, Simons K. The multiple faces of caveolae. Nat Rev Mol Cell Biol 2007; 8(3): 185-94.
- 26 秦晓松, 刘勇, 吴丽娜, 刘建华, 王丹丹. Nephrin分子细胞内 吞转运途径的研究. 中国细胞生物学学报(Qin Xiaosong, Liu Yong, Wu Lina, Liu Jianhua, Wang Dandan. Study on endocytic transport pathway of nephrin molecular cells. Chinese Journal of Cell Biology) 2010; 32(4): 527-32.
- 27 Sandvig K, Torgersen ML, Raa HA, Deurs BV. Clathrinindependent endocytosis: from nonexisting to an extreme degree of complexity. Histochem Cell Biol 2008; 129(3): 267-76.
- 28 Krishna OD, Kiick KL. Protein- and peptide-modified synthetic polymeric biomaterials. Biopolymers 2010; 94(1): 32-48.