

<https://doi.org/10.22643/JRMP.2020.6.2.92>

Evaluation of intracellular uptake of cyclic RGD peptides in integrin $\alpha_v\beta_3$ -expressing tumor cells

Soyoung Lee^{1,2}, Young-Hwa Kim^{3,4}, In Ho Song², Ji Young Choi², Hyewon Youn^{3,4,5}, Byung Chul Lee^{2,6*}, Sang Eun Kim^{2,6,7}

¹Department of Transdisciplinary Studies, Graduate School of Convergence Science and Technology, Seoul National University, Seoul, Korea

²Department of Nuclear Medicine, Seoul National University Bundang Hospital, Seoul National University College of Medicine, Seongnam, Korea

³Department of Nuclear Medicine, Seoul National University Hospital, Korea

⁴Cancer Research Institute, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea

⁵Cancer Imaging Center, Seoul National University Hospital, Seoul, Korea

⁶Center for Nanomolecular Imaging and Innovative Drug Development, Advanced Institutes of Convergence Technology, Suwon, Korea

⁷Department of Molecular and Biopharmaceutical Sciences, Graduate School of Convergence Science and Technology, Seoul National University, Seoul, Korea

ABSTRACT

The cyclic Arg-Gly-Asp (cRGD) peptide is well-known as a binding molecule to the integrin $\alpha_v\beta_3$ receptor which is highly expressed on activated endothelial cells and new blood vessels in tumors. Although numerous results have been reported by the usage of cRGD peptide-based ligands for cancer diagnosis and therapy, the distinct mechanisms, and functions of cRGD-integrin binding to cancer cells are still being investigated. In this study, we evaluated the internalization efficacy of different types of cRGD peptides (monomer, dimer and tetramer form) in integrin $\alpha_v\beta_3$ overexpressing cancer cells. Western blot and flow cytometric analysis showed U87MG expresses highly integrin $\alpha_v\beta_3$, whereas CT-26 does not show integrin $\alpha_v\beta_3$ expression. Cytotoxicity assay indicated that all cRGD peptides (0-200 μ M) had at least 70-80% of viability in U87MG cells. Fluorescence images showed cRGD dimer peptides have the highest cellular internalization compare to cRGD monomer and cRGD tetramer peptides. Additionally, transmission electron microscope results clearly visualized the endocytic internalization of integrin $\alpha_v\beta_3$ receptors and correlated with confocal microscopic results. These results support the rationale for the use of cRGD dimer peptides for imaging, diagnosis, or therapy of integrin $\alpha_v\beta_3$ -rich glioblastoma.

Key Word: cRGD peptide, integrin $\alpha_v\beta_3$, glioblastoma, internalization, therapy

Introduction

인테그린(integrin)은 세포외기질과 세포 내 단백질 사이의 신호를 양방향으로 통합하는 막횡단 수용체이며 세포 표면에서 24 개의 서로 다른 α 및 β 이종 이합체 조합으로 발현되고, 18 개의 α - 및 8 개의 β - 서브 유닛으로 구성된 막관통 당단백질(transmembrane glycoproteins) 그룹이다(1-4).

다양한 인테그린 그룹 중에서 인테그린 $\alpha_v\beta_3$ 는 종양신생혈관형성(tumor-induced angiogenesis)과 공격적인 종양에서 특이적으로 높은 발현을 나타낸다(5). 이러한 종양신생혈관형성은 종양세포 및 간질세포(interstitial cell)에서 신생혈관 펩타이드 방출 또는 내인성 혈관 신생 억제제의 하향 조절에 의해 시작되며 세포외기질(extracellular matrix, ECM)의 변형을 포함한다(4,6,7). 여러 연구에 따르면, 세포외기질

Received: December 17, 2020 / Revised: December 24, 2020 / Accepted: December 29, 2020

Corresponding Author : Prof. Byung Chul Lee, Department of Nuclear Medicine, Seoul National University Bundang Hospital, 82, Gumiro 173 Beongil, Bundanggu, Seongnam 13620, Korea, Tel: +82-31-787-2956, Fax: +82-31-787-4072, E-mail: leebc@snu.ac.kr
Prof. Sang Eun Kim, Department of Molecular and Biopharmaceutical Sciences, Graduate School of Convergence Science and Technology, Seoul National University, Seoul, Korea, Tel: +82-31-787-7671, Fax: +82-31-787-4018, E-mail: kse@snu.ac.kr

Copyright©2020 The Korean Society of Radiopharmaceuticals and Molecular Probes

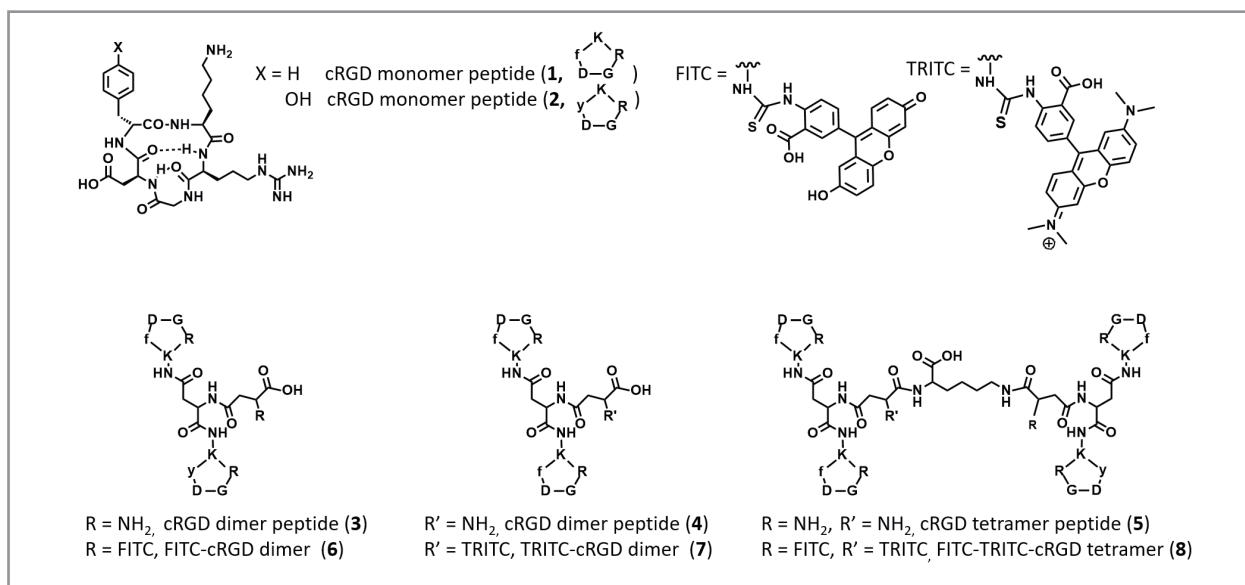
을 통한 내피 세포 이동 및 침입은 인테그린과 같은 세포 부착 수용체에 의해 조절된다(8).

아르기닌-글라이신-아스파르트산(Arg-Gly-Asp, RGD) 펩타이드는 세포외기질 성분인 vitronectin과 fibronectin 내에서 인테그린을 인식하는 아미노산 서열로, 세포의 막단백질인 인테그린 $\alpha_v\beta_3$ 과 서로 결합한다(9-12). 이러한 인테그린 $\alpha_v\beta_3$ 와 RGD 펩타이드 간의 결합은 인테그린 $\alpha_v\beta_3$ 의 형태 변화를 초래하고, 인테그린과 세포 외 리간드 간 결합 친화도를 증가시키는 것으로 알려져 있다(12-14). 여러 연구에서 보고된 인테그린 $\alpha_v\beta_3$ 와 RGD 펩타이드 간 높은 결합력으로 인해 RGD 펩타이드는 종양 표적 진단 및 치료를 위한 리간드로서 다양한 연구가 활발히 진행되었다(14-16). 특히, RGD 펩타이드의 구조와 결합력에 관한 연구들에서 세 개 이상의 아미노산 서열로 이루어진 선형의 RGD 펩타이드(linear RGD peptide)보다 고리형의 RGD 펩타이드(cyclic RGD, cRGD)가 체내 안정성 및 인테그린과의 결합친화도가 높은 것으로 보고되었으며(17), cRGD 펩타이드가 한 개인 단량체(monomer)보다 두 개(dimer) 또는 그 이상의 다량체(multimer)로 구성된 리간드가 체내에서 보다 높은 종양 섭취 및 선택성을 보여주는 것으로 보고되었다(18). cRGD 펩타이드를 이용하여 형광염료, 진단용 방사성동위원소를 도입한 종양신생혈관 표적 진단 프로브뿐만 아니라 항암제, 나노물질 및 치료용 방사성동위원소 등이 도입된 종양 표적용 리

간드로 많이 활용되었고 최근엔 진단 및 치료가 동시에 가능한 동반진단치료제(theranostics)로서 cRGD 펩타이드를 활용한 사례가 보고되었다(16,19).

cRGD 펩타이드는 빠른 시간 내 종양에 대한 높은 섭취율을 보이며 종양에서 빠른 배출 속도를 보여줌으로써 조기 종양 영상 획득이 가능하여 이상적인 종양신생혈관 표적 영상 프로브로서 적합함이 보고되었으나(18,20), 치료측면에서는 종양 조직에서의 빠른 배출 속도로 인해 치료의약품으로서의 한계를 보인다. 종양세포에서의 약물 머무름을 증진시킬 수 있는 요인 중 하나로 세포 내재화(internalization) 능력을 고려해 볼 수 있으며 cRGD 펩타이드 또한 인테그린 $\alpha_v\beta_3$ 을 통한 종양세포 내재화 가능성이 보고된 바 있으나(21) 자세한 실험결과가 보고된 문헌은 미미하다. 이에 본 연구에서는 cRGD가 포함된 다양한 형태로써, 다양한 단량체, 이량체 및 사량체 cRGD 펩타이드(Scheme 1)에서 세포 수준의 내재화능력을 비교 및 평가하고자 한다.

위의 화합물들을 이용하여, 인테그린 $\alpha_v\beta_3$ 과발현하는 암세포주, 특히 인간 유사 교모세포종인 U87MG 세포주에서 다양한 cRGD 펩타이드들의 세포 내 흡수 효능을 평가했다(19, 22-24). 먼저, 인테그린 $\alpha_v\beta_3$ 양성 및 음성 세포주에서 인테그린 $\alpha_v\beta_3$ 발현을 평가하고, 인테그린 $\alpha_v\beta_3$ 을 과발현하는 암세포주에서 다양한 cRGD 화합물들에 대해 세포 독성 분석을 수행하였다. 준비된 cRGD 화합물의 내재화 성능정도를



Scheme 1. The structure of various cRGD peptides (1-8)

직접 눈으로 관찰하기 위해, 형광염료(FITC or TRITC)가 도입된 cRGD 펩타이드를 중앙 셀에 처리하여 공초점 현미경을 통한 형광 이미지를 관찰하였다. 공초점 현미경을 통한 종양세포에서의 형광 이미지를 관찰하였다. 또한 보다 정량적인 세포 내재화를 검토하기 위해 cRGD 펩타이드 결합 인테그린 $\alpha_v\beta_3$ 의 클러스터링 및 세포 내 이입의 시각화를 전자현미경으로 확인하였다.

Materials

본 연구에 사용된 cRGD 펩타이드(1-8)는 선행 연구를 따라 각각 합성하여 준비하였다(20). U87MG(인간 유사 교모세포종)은 American Type Culture Collection (ATCC)에서 구입하였다. CT-26(마우스 대장종양세포주)는 한국세포주은행 (KCLB)에서 구매하였다. Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS, Cat. No. 21600, Gibco)에서 구입하여 cRGD 펩타이드의 용해 및 세척 용도로 사용하였다. Trypsin(1:250, Cat. No. 27250-018, Gibco), Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dehydrate (EDTA, Cat. No. E5134, Sigma-Aldrich)을 혼합하여 0.05% Trypsin-0.53 mM EDTA 용액을 제조하였다.

Protocol

1. Cell culture

U87MG는 Minimum Essential Medium Eagle (MEM, Welgene)에서, CT-26은 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Welgene)에서 배양하였다. 모든 세포주는 10%의 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS, Gibco) 및 1% 항생제-항진균제(mL 당 10,000 단위 페니실린, 10 mg 스트렙토마이신 및 25 μ g 암포테리신 B 포함, Gibco)가 첨가된 완전 배지에서 5% CO₂ 대기 및 37°C 온도 조건으로 배양되었다.

2. Western blot analysis

Phenylmethylsulfonyl Fluoride (PMSF) Protease 억제제 및 Phosphatase 억제제(Cat. No. 11873580001, Sigma-Aldrich)가 포함된 Pierce™ IP Lysis 버퍼(Cat. No. 87787, Sigma-Aldrich)를 사용하여 세포로부터 단백질을 추출하였다. 5 μ g의 단백질을 SDS-PAGE (10%)로 전기영동하고 PVDF 멤브레인에 blotting하였다. 멤브레인을 5% 탈지유 또는 bovine serum albumin (BSA)가 포함된 Tris 완충액(TBS-T; 10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20)에서 60 분 동안 blocking하였다. 멤브레인을 토끼 유래 항-인테그린 α_v 항체(1:5,000, Cat. No. ab179475, Abcam) 토끼 유래 항-인테그린 β_3 항체(1:2,000, Cat. No. 13166, Signaling Technology) 또는 마우스 유래 항- β -actin 항체(1:5,000, Cat. No. A5441, Sigma-Aldrich)로 실온에서 1 시간 처리 후 멤브레인을 TBS-T로 3 회 세척하였다. 2차 항체는 항-토끼 IgG, HRP 연결 항체(1:2,000, Cat. No. 7074S, Cell Signaling Technology) 또는 항 마우스 IgG, HRP 연결 항체(1:3000, Cat. No. 7076S, Cell Signaling Technology)로 실온에서 1 시간 처리하고 TBS-T로 3 회 세척한 후, 면역 반응성 단백질 밴드를 검출하기 위해 Chemiluminescent Substrate (Cat. No. 34578, Thermo Fisher Scientific)로 발색하여 ChemiDoc Imaging System (Bio-rad)으로 확인하였다.

3. In Vitro Cytotoxicity

3.1. Proliferation assay

준비된 cRGD 화합물의 세포 독성을 확인하기 위해, CCK-8 (Dojindo)을 사용하여 세포증식능을 평가하였다. U87MG 세포(7×10^3 cells/mL, 0.2 mL)를 96-well cell culture plate (SPL Life Sciences)에서 24 시간 동안 배양하였다. 기존 배지를 버린 후, 0, 0.5, 5, 50, 100, 150, 200 및 500 μ M의 cRGD 화합물을 포함하는 새로운 배지를 48 시간 동안 처리하였다. 세포 활성을 측정하기 위해, 100 μ L의 CCK-8 용액(10% CCK-8 + 90% MEM 배지)을 각 well에 첨가한 뒤, 37°C에서 1 시간 동안 배양했다. 흡광도(optical density)는 450 nm에서 분광광도계(PowerWave™ XS Microplate Reader, BioTek)로 측정하였다.

3.2. Crystal violet cell death assay

96-well cell culture plate에 well 당 4×10^4 개의 U87MG 세포를 분주하고 37°C에서 24 시간 동안 배양하였다. 기존 배지 제거 후, cRGD 화합물 0, 0.5, 5, 50, 100, 150, 200 및 500 μM 을 포함하는 새로운 배지를 37°C에서 24 시간 동안 처리하였다. 반응 종료 후, 200 μL DPBS로 2회 세척하고 남은 액체를 제거하였다. 50 μL 의 크리스탈 바이올렛 용액(0.5 g in 20% methanol 100 mL)을 각 well에 첨가하고, 실온에서 20 분 동안 교반하며 처리하였다. 증류수로 4회 세척 후 실온에서 2 시간 동안 건조한 후, 사진 촬영 후 colony를 계수하였다. cRGD 미처리 대조군의 colony 개수를 100% 로 설정하고, 약물 처리 시험군의 colony 개수를 대조하였다(25).

4. In vitro fluorescence imaging

cRGD 펩타이드의 세포 내 이입을 관찰하기 위해 형광이 달린 cRGD 펩타이드를 8-well cell culture plate (Cat. No. 30408, SPL Life Sciences) well 당 3×10^4 개의 U87MG 세포를 분주하고 24 시간 동안 배양하였다. 기존의 배지를 제거하고, FITC-cRGD dimer peptide 5 (200 μM), TRITC-cRGD dimer peptide 7 (200 μM), FITC-TRITC-cRGD tetramer peptide 8 (100 μM)를 포함하는 새로운 배지를 각각 처리하고, 15, 30, 45 분 및 1 시간 동안 반응한 후, 세포를 DPBS로 세척하였다. 마지막으로 Gold Antifade Mountant (Cat. No. P36935, ProLongTM, Invitrogen)로 봉입한 후 공초점현미경(LSM 800, Carl Zeiss, Germany)을 이용하여 촬영하였다. Figure 3에서 관찰된 그룹 간의 상대적 형광강도 비(fluorescence intensity ratio)는 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{Fluorescence intensity ratio} = \frac{\text{FITC or TRITC fluorescence intensity / number of nucleus}}{\text{DAPI fluorescence intensity / number of nucleus}}$$

5. Electronic microscopic imaging

마우스 유래 항-사람 CD51/CD61 (integrin $\alpha_v\beta_3$) 항체 (FITC-conjugated form, Cat. No. 11-0519-42, Invitrogen)에 SiteClickTM QdotTM 655 Antibody Labeling Kit (Cat. No. S10453, Invitrogen)를 이용하여 양자점 (quantum dot)이 표지된 전자현미경 관찰용 항체를 제조

하였다. 표지된 항체의 기능을 확인하기 위해, U87MG 세포 및 CT-26 세포에 표지된 항체를 처리하여 유세포 분석과 공초점현미경 촬영을 수행하였다. 6-well plate에서 1×10^5 개의 U87MG 또는 6×10^4 개의 CT-26 세포를 24 시간 동안 배양하였다. 기존의 배지를 제거하고, cRGD monomer peptides 1 and 2 (400 μM), cRGD dimer peptides 3 and 4 (200 μM), cRGD tetramer peptide 5 (100 μM) 이 포함된 새로운 배지를 1 시간 동안 처리한 후, 표지된 항체를 2 시간 동안 처리하였다. 트립신 용액을 처리하여 세포를 회수한 뒤, 1300 rpm (350 g)에서 3분 동안 원심 분리하였다. 2% 글루타르알데히드(glutaraldehyde, GAA, Cat. No. 16537-15, EMS) 용액에서 세포를 하루 동안 고정하였다. 고정된 세포 블록을 단면화하기 위해 절삭한 뒤, 단면을 투과 전자현미경 (JEM-1400, JEOL)을 사용하여 촬영하였다.

Representative Results

인테그린 $\alpha_v\beta_3$ 의 발현 정도를 평가하기 위해 웨스턴 블롯으로 인테그린 $\alpha_v\beta_3$ 의 양성 세포(U87MG)와 음성 세포(CT-26)를 선별하여 실험하였다(26,27). U87MG 세포와 CT-26 세포에서 모두 인테그린 α_v 의 발현은 확인되나, 인테그린 β_3 는 U87MG에서 높게 발현하였으나, CT-26에서는 그 발현정도가 낮음이 관찰되었다(Fig. 1A). 세포 표면에서 발현하는 인테그린 $\alpha_v\beta_3$ 단백질의 양을 평가하기 위해, 유세포 분석을 수행한 결과는 U87MG세포의 인테그린 $\alpha_v\beta_3$ 발현율은 대조군에 비해 93% 였으나, CT-26에서는 인테그린 $\alpha_v\beta_3$ 의 발현율이 대조군 대비 0.2% 였다(Fig. 1B).

다양한 cRGD 펩타이드들의 세포독성은 U87MG 세포에서 두 가지 방식으로 평가하였다. 첫번째 방식은 세포증식분 석 (Proliferation assay)으로 측정하였고, 다른 방식은 콜로니 생성분석 (Crystal violet cell death assay)으로 평가하였다. 세포증식분석에서 세포생존력은 CCK-8 kit을 사용하여 측정하였다. 실험에 사용된 cRGD 펩타이드들의 농도는 0 - 500 μM 이었으며, 200 μM 농도로 펩타이드 1-5를 각각 처리 시 세포생존율은 0 μM 대비 각각 76.25%, 67.63%, 82.29%, 72.53% 및 54.24%였다. 더 높은 농도로서 500 μM 농도의 펩타이드 1-5를 각각 처리시에는 세포생존율은 0 μM 농도

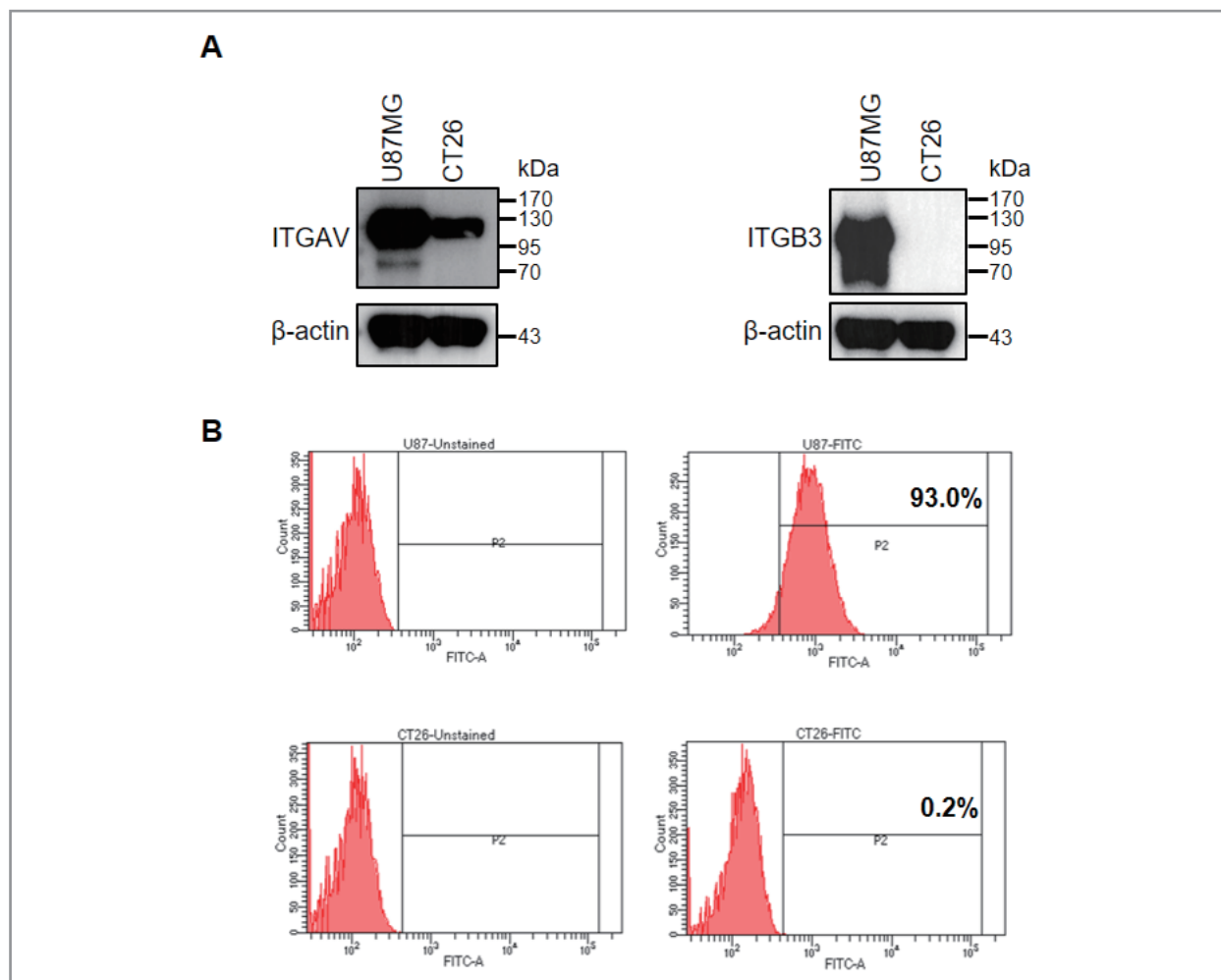


Figure 1. Protein expression levels in integrin $\alpha_v\beta_3$ positive and negative cells. (A) Western blot shows integrin $\alpha_v\beta_3$ expression level of U87MG and CT-26 cells. (B) Flow cytometric assay shows integrin $\alpha_v\beta_3$ expression level of U87MG and CT-26.

에 비해 각각 73.45%, 45.91%, 63.81%, 38.36% 및 55.28% 인 것으로 관찰되었다(Fig. 2A). 70% 이상의 세포생존력을 보이는 농도를 기준으로, RGD 펩타이드 몰수에 따라 cRGD 펩타이드의 농도를 단량체(1 and 2)는 400 μM , 이량체는 (3 and 4) 200 μM , 사량체 (5)는 100 μM 로 설정하여 이 후 실험에 사용하였다.

콜로니생성능은 동일한 농도의 cRGD 펩타이드들을 처리 후 각각 비교하였다. 200 μM 의 cRGD 펩타이드(1-5)들을 각각 처리 시 클론생성능은 0 μM 대비 각각 51.0%, 52.0%, 62.4%, 34.9% 및 13.4%이었으며, 동일 농도에서는 단량체, 이량체, 사량체 순으로 클론생성능이 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 2B).

공초점현미경을 이용하여 FITC-cRGD dimer peptide (6)

처리군, TRITC-cRGD dimer peptide (7) 화합물 처리군에서 cRGD 펩타이드가 세포 내재화 과정을 통해 U87MG 세포 내로 이입되어 세포질에 존재하는 것을 확인하였다 (Fig. 3). 사량체인 FITC-TRITC-cRGD tetramer peptide (8) 처리군에서도 TRITC와 FITC 채널에서 각각 세포 내재화 현상을 확인하였다. 이량체와 사량체 간 세포 내재화 정도를 비교하기 위해 FITC의 fluorescence intensity ratio를 비교한 결과, FITC-cRGD dimer peptide (6) 펩타이드 처리군은 12.7 ± 1.4 , FITC-TRITC-cRGD tetramer peptide (8) 처리군은 1.9 ± 0.2 로, 이량체가 사량체에 비해 6.6배 높은 수치를 보였다 ($p < 0.01$). TRITC의 fluorescence intensity ratio에서 TRITC-cRGD dimer 2와 이량체 7과 사량체 8 간 유의한 차이는 확인할 수 없었다 (2.3 ± 0.4 vs. 2.3 ± 0.6).

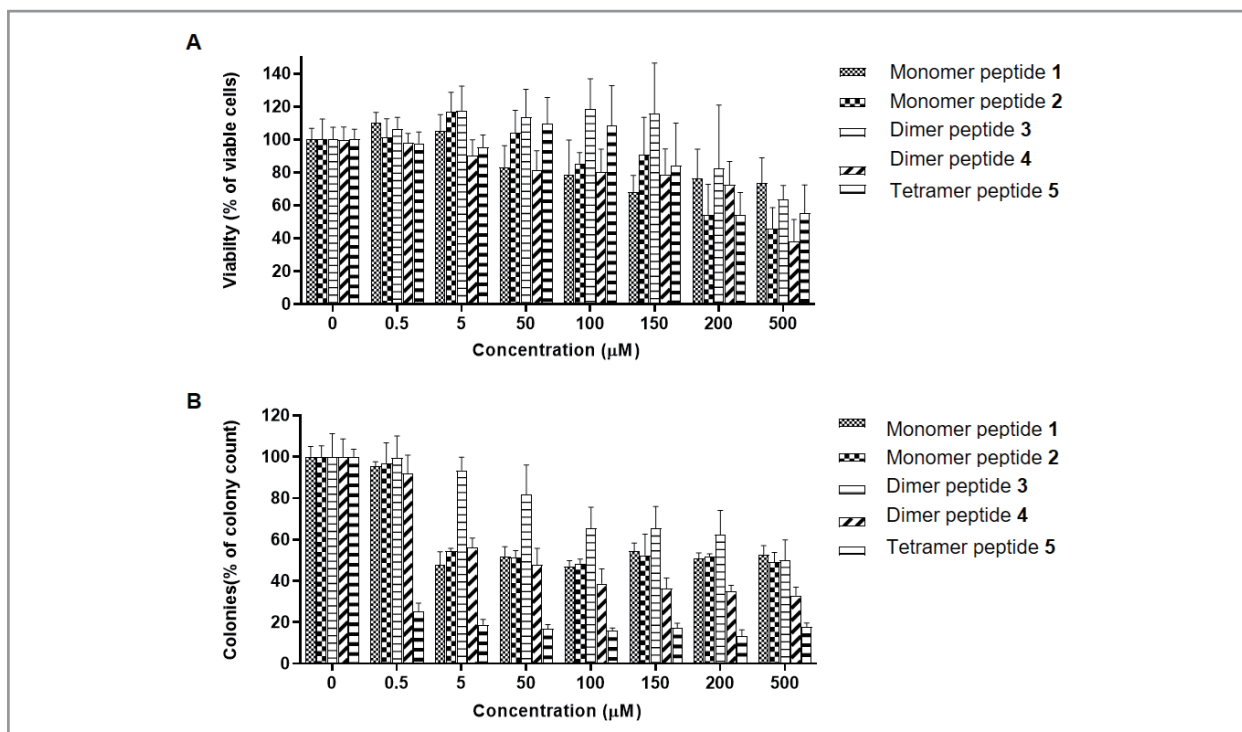


Figure 2. *In vitro* cytotoxicity assay of various cRGD peptides. (A) Proliferation assay (B) Crystal violet cell death assay.

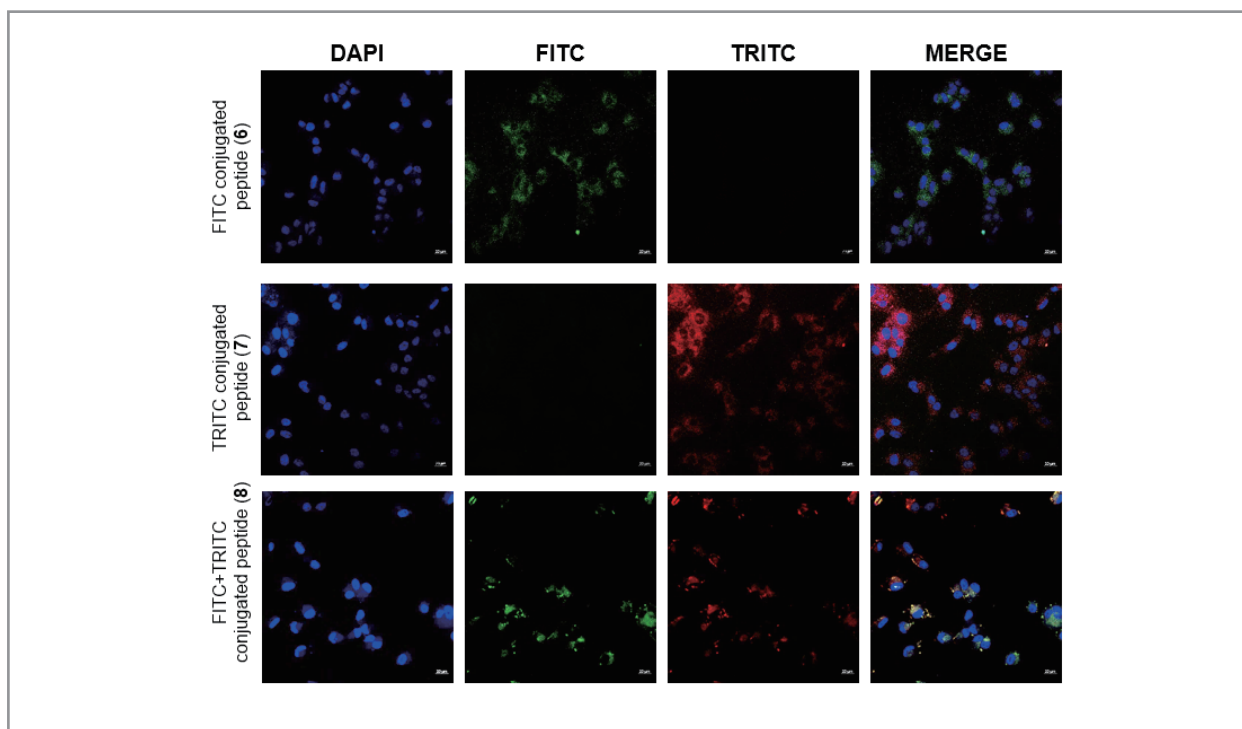


Figure 3. Confocal microscopy analysis of fluorescence dye conjugated cRGD peptides (6-8) U87MG cells. Cell nuclei were stained with DAPI (blue). Two different dyes expressed green (for FITC) and red (TRITC) color, respectively. The merge image showed the internalized RGD compounds localized in the cytoplasm.

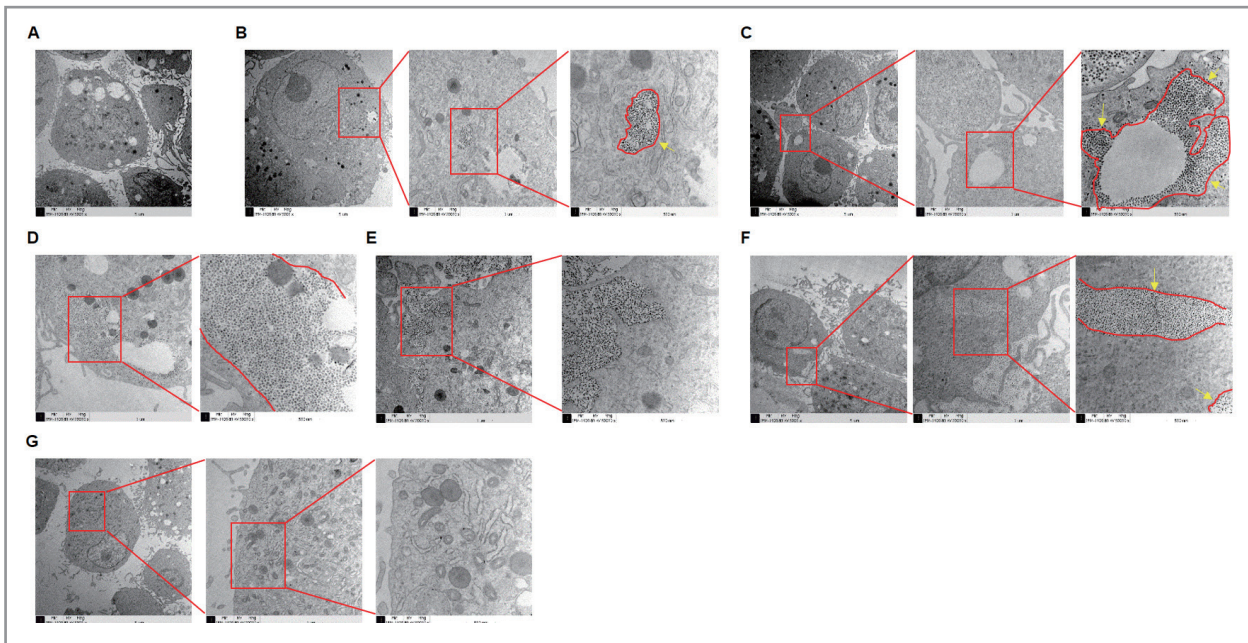


Figure 4. Visualization/Quantification of clustering and endocytosis of cRGD peptide bound integrin $\alpha_v\beta_3$. A) U87MG only; B) peptide 1 + QD-Ab; C) peptide 2 + QD-Ab; D) peptide 3 + QD-Ab; E) peptide 4 + QD-Ab; F) peptide 5 + QD-Ab; G) QD-Ab only.

이어서 각각의 cRGD 펩타이드(1-5)들을 결합 후 양자점-표지 항체 처리군과 양자점-표지 항체 단독 처리군을 준비하고 전자 현미경으로 이미지를 촬영하였다. 단량체와 사량체 (1, 2, and 5)와 비교하여 이량체 RGD 펩타이드(3 and 4)로 처리한 군에서 세포질에 보다 많은 양자점을 확인하였다 (Fig. 4). 보다 자세히는 펩타이드 1을 처리한 군에서 양자점은 20 nm의 크기로 세포질에서 관찰이 되었고, 펩타이드 2 처리군의 양자점은 1 처리군에 비해 1.85배 큰 37 nm의 크기로 세포질에서 관찰이 되었다. 이량체 펩타이드들 간에서는 3 처리군에서 양자점은 20 nm 및 40 nm 크기가 모두 관찰되었고, 4 처리군의 양자점의 크기가 20 nm으로 일정했다. 마지막으로 사량체 펩타이드 5을 처리군에서는 20 nm 및 40 nm의 양자점이 모두 관찰되었다.

Discussion

본 연구에서는 cRGD 펩타이드의 종양에서의 머무름을 증대하고 세포내 이입을 증가시켜 치료용의약품으로서의 개발 가능성을 확인하고자, 인테그린 $\alpha_v\beta_3$ 과발현 세포주를 이용하여 다양한 타입의 cRGD 펩타이드의 세포 내재화를 평

가하였다.

웨스턴 블롯과 유세포 분석을 통해, 실험에 사용된 U87MG 인간 유사 교묘세포종의 경우 인테그린 $\alpha_v\beta_3$ 이 CT-26 세포에 비해 많이 발현되어 있다는 것을 확인하였다. 또한 세포독성 평가를 통해 실험에 사용하기 적합한 세포생존율(> 70%)을 보인 cRGD 펩타이드의 적정 농도를 확인하였으며, 공초점현미경, 전자현미경 실험에 사용할 cRGD 펩타이드의 농도를 RGD 개수에 따라 각각 단량체 펩타이드(1 and 2)는 400 μ M, 이량체 펩타이드(3 and 4)는 200 μ M, 사량체 펩타이드(5)는 100 μ M로 설정하였다.

콜로니생성능 분석의 경우, 각각의 cRGD 펩타이드들을 처리 후, 세포생존율을 측정하는 방법인 세포증식능 분석과는 측정법의 차이로 인한 대조적인 결과를 보였다. 이러한 이유로는 cRGD 펩타이드를 처리 시, 특정 농도 이상에서 세포 부착 단백질인 인테그린을 자극하여 세포가 플레이트에서 이탈하는 경향이 있어 세포 독성과는 별개로 클론생성능이 감소하는 결과가 반영되었기 때문이라 생각된다(28). 클론생성능과는 달리 세포증식분석에서는 cRGD 펩타이드 화합물에 대한 세포 자체의 독성에는 영향이 없다고 판단하였다. 다만 사량체 펩타이드 5를 처리할 때, 단량체 또는 이량체 펩타이드(1-4)에 비해 상대적으로 세포의 생존능이 감소되는 것으로 보여 이후 실험에서 200 μ M 이하의 농도로 처리하였다.

이어서 공초점현미경 및 전자현미경 이미지를 통해 형광이 도입된 다양한 형태의 cRGD 펩타이드가 인테그린 $\alpha_v\beta_3$ 에 결합하여 세포 내재화됨을 비교 확인하였다. FITC-fluorescence intensity ratio를 통해 이량체(6)가 사량체(8)에 비해 보다 높은 종양 세포 내재화가 일어난 것을 확인하였으나, TRITC의 fluorescence intensity에서는 이량체(7), 사량체(8)간의 차이를 확인할 수 없었다. 이는 FITC-TRITC-cRGD tetramer peptide 8의 TRITC emission 파장 측정 시, FITC의 형광 방출 에너지로 인해 TRITC가 여기 되는 형광공명에너지 전달(fluorescence resonance energy transfer, FRET)이 발생되고 이로 인해 TRITC의 fluorescence intensity가 과 측정될 수 있다고 생각된다. 이러한 결과를 볼 때, 공초점 현미경을 이용한 펩타이드들 간의 정밀한 세포 내재화 정량평가에는 한계가 있음을 확인할 수 있었다. 추가적으로 내재화 정도를 평가하기 위해, 다양한 cRGD 펩타이드를 결합시킨 뒤, 양자점-표지 항체를 처리하여 얻은 전자현미경 결과에서 cRGD 펩타이드의 종류와 RGD 개수에 따른 내재화 차이와 세포질에서 관찰되는 양자점의 크기에서 차이가 있음을 정성적으로 확인하였다. 특이한 점으로는 단량체 펩타이드 1과 2의 전자 현미경 샘플에서 세포 내로 이입된 항체에 표지된 양자점의 형태 및 크기에 차이가 있었다. 먼저, 양자점의 크기를 전자 현미경으로 측정할 결과 단량체 펩타이드 1 처리군에서 나노 입자의 크기는 동일하게 20 nm 사이즈였으나, 단량체 펩타이드 2 처리군의 나노 입자 크기는 1 처리군의 1.85배인 37 nm였다. 이러한 결과는 이량체와 사량체에서 Tyrosine (y)이 함유된 cRGD 펩타이드로 처리된 모든 군에서 관찰되는데 이는 cRGD 펩타이드 부분의 Tyrosine기가 -OH기를 가지고 있기 때문에 상대적으로 Phenylalanine (f)기 보다 극성이 높아 c(RGDyK)를 갖는 펩타이드가 근접 단백질과의 결합으로 인해 밀집되어 양자점 나노입자의 크기가 더 크게 나타난 것으로 생각된다. 따라서 인테그린 $\alpha_v\beta_3$ 에 cRGD 펩타이드가 결합한 후, 다른 위치에 항-인테그린 $\alpha_v\beta_3$ 항체가 인테그린 $\alpha_v\beta_3$ 와 결합하면서 서로 다른 세포 내재화 양상을 보여주는 것으로 생각되며(29, 30), 후속 연구를 통해 검증하고자 한다. 더불어 본 실험에 사용된 샘플들은 향후 추가적으로 유도 결합 플라즈마 질량분광법(Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, ICP-MS) 분석을 통해 샘플 당 양자점의 카드륨의 양을 계측하면 세포 내재화의 정량적인 분석이 가능

할 것으로 생각된다.

Conclusion

본 연구에서는 인테그린 $\alpha_v\beta_3$ 고발현 종양세포주에서 다양한 타입의 cRGD 펩타이드가 세포에 내재화하는 것을 평가하였고, 공초점 현미경과 전자현미경으로 관찰된 결과를 통해 이량체 cRGD 펩타이드가 단량체와 사량체 cRGD 펩타이드들 보다 더 높은 세포 내재화 능력을 가짐을 확인하였다. 이로서 cRGD 펩타이드가 인테그린 $\alpha_v\beta_3$ 가 많이 발현되어 있는 종양세포에서의 섭취를 증진시키고자 할 때 이량체 펩타이드 구조가 유리함을 확인 할 수 있었고, 향후 cRGD 펩타이드 기반의 종양 치료의약품 개발할때 중요한 자료로 활용될것으로 기대된다.

Acknowledgments

This study was funded by the Korean Research Foundation grant (NRF-2018M2A2B3A02071842).

References

1. Barczyk M, Carracedo S, Gullberg D. Integrins. *Cell Tissue Res* 2010;339:269-80.
2. Calderwood DA. Integrin activation. *J Cell Sci* 2004;117:657-666.
3. Cooper J, Giancotti FG. Integrin Signaling in Cancer: Mechanotransduction, Stemness, Epithelial Plasticity, and Therapeutic Resistance. *Cancer Cell* 2019;35:347-367.
4. Morse EM, Brahme NN, Calderwood DA. Integrin cytoplasmic tail interactions. *Biochemistry* 2014;53:810-20.
5. Gasparini G, Brooks PC, Biganzoli E, Vermeulen

- PB, Bonoldi E, Dirix LY, Ranieri G, Miceli R, Cheresch DA. Vascular integrin alpha(v)beta3: a new prognostic indicator in breast cancer. *Clin Cancer Res* 1998;4:2625-34.
6. Gupta MK, Qin RY. Mechanism and its regulation of tumor-induced angiogenesis. *World J Gastroenterol* 2003;9:1144-1155.
 7. LaFoya B, Munroe JA, Miyamoto A, Detweiler MA, Crow JJ, Gazdik T, Albig AR. Beyond the Matrix: The Many Non-ECM Ligands for Integrins. *Int J Mol Sci* 2018;19:449.
 8. Huttenlocher A, Horwitz AR. Integrins in cell migration. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011;3:a005074.
 9. Koivunen E, Wang B, Ruoslahti E. Phage libraries displaying cyclic peptides with different ring sizes: ligand specificities of the RGD-directed integrins. *Biotechnology* 1995;13:265-270.
 10. Pierschbacher, MD, Ruoslahti, E. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature* 1984;309:30–33.
 11. Ruoslahti E, Pierschbacher MD. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science* 1987;238:491-7.
 12. Nieberler M, Reuning U, Reichart F, et al. Exploring the Role of RGD-Recognizing Integrins in Cancer. *Cancers (Basel)* 2017;9:116.
 13. Zhu J, Zhu J, Springer TA. Complete integrin headpiece opening in eight steps. *J Cell Biol* 2013;201:1053–1068.
 14. Van Agthoven JF, Xiong J-P, Alonso JL, Rui X, Adair BD, Goodman SL, Arnaout MA. Structural basis for pure antagonism of integrin $\alpha_v\beta_3$ by a high-affinity form of fibronectin. *Nat Struct Mol Biol* 2014;21:384–388.
 15. Zhou Y, Chakraborty S, Liu S. Radiolabeled Cyclic RGD Peptides as Radiotracers for Imaging Tumors and Thrombosis by SPECT. *Theranostic* 2011;1:58-82.
 16. Danhier F, Le Breton A, Pr eat V. RGD-based strategies to target alpha(v) beta(3) integrin in cancer therapy and diagnosis. *Mol Pharm* 2012;9:2961-73.
 17. Fani M, Psimadas D, Zikos C, Xanthopoulos S, Loudos GK, Bouziotis P, Varvarigou AD. Comparative evaluation of linear and cyclic ^{99m}Tc -RGD peptides for targeting of integrins in tumor angiogenesis. *Anticancer Res* 2006;26:431-4.
 18. Wu Z, Li ZB, Chen K, Cai W, He L, Chin FT, Li F, Chen X. microPET of tumor integrin $\alpha_v\beta_3$ expression using ^{18}F -labeled PEGylated tetrameric RGD peptide (^{18}F -FPRGD4). *J Nucl Med* 2007;48:1536-44.
 19. Desgrosellier JS, Cheresch DA. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* 2010;10:9-22.
 20. Lee BC, Moon BS, Kim JS, Jung JH, Park HS, Katzenellenbogen JA, Kim SE. Synthesis and biological evaluation of RGD peptides with the $^{99m}\text{Tc}/^{188}\text{Re}$ chelated iminodiacetate core: highly enhanced uptake and excretion kinetics of theranostics against tumor angiogenesis. *RSC Adv* 2013;3:782-792.
 21. Sancey L, Garanger E, Foillard S, Schoehn G, Hurbin A, Albiges-Rizo C, Boturnyn D, Souchier C, Grichine A, Dumy P, Coll JL. Clustering and internalization of integrin $\alpha_v\beta_3$ with a tetrameric RGD-synthetic peptide. *Mol Ther* 2009;17:837-43.
 22. Liu Z, Jia B, Zhao H, Chen X, Wang F. Specific targeting of human integrin $\alpha(v)\beta(3)$ with ^{111}In -labeled AbegrinTM in nude mouse models. *Mol Imaging Biol* 2011;13:112-20.
 23. Wang H, Chen K, Cai W, Li Z, He L, Kashefi A, Chen X. Integrin-targeted imaging and therapy with RGD4C-TNF fusion protein. *Mol Cancer Ther* 2008;7:1044-53.
 24. Jin ZH, Furukawa T, Waki A, Akaji K, Coll JL, Saga T, Fujibayashi Y. Effect of multimerization of a linear Arg-Gly-Asp peptide on integrin binding affinity and

- specificity. *Biol Pharm Bul* 2010;33:370-8.
25. Schilling R, Geserick P, Leverkus M. Characterization of the ripoptosome and its components: implications for anti-inflammatory and cancer therapy. *Methods Enzymo* 2014;545:83-102.
 26. Borza CM, Pozzi A, Borza DB, Pedchenko V, Hellmark T, Hudson BG, Zent R. Integrin $\alpha 3\beta 1$, a novel receptor for $\alpha 3(\text{IV})$ noncollagenous domain and a trans-dominant Inhibitor for integrin $\alpha \text{v}\beta 3$. *J Biol Chem* 2006;281:20932-9.
 27. Yao B, He QM, Tian L, Xiao F, Jiang Y, Zhang R, Li G, Zhang L, Hou JM, Wang L, Cheng XC, Wen YJ, Kan B, Li J, Zhao X, Hu B, Zhou Q, Zhang L, Wei YQ. Enhanced antitumor effect of the combination of tumstatin gene therapy and gemcitabine in murine models. *Hum Gene Ther* 2005;16:1075-86.
 28. Paolillo M, Galiazzo MC, Daga A, Ciusani E, Serra M, Colombo L and Schinelli S: An RGD small-molecule integrin antagonist induces detachment-mediated anoikis in glioma cancer stem cells. *Int J Oncol* 2018;53: 2683-2694.
 29. Kamata T, Handa M, Takakuwa S, Sato Y, Kawai Y, Ikeda Y, Aiso S. Epitope mapping for monoclonal antibody reveals the activation mechanism for $\alpha \text{v}\beta 3$ integrin. *PLoS One* 2013;8:e66096.
 30. Bridgewater RE, Norman JC, Caswell PT. Integrin trafficking at a glance. *J Cell Sci* 2012;125:3695-701.