论著

文章编号:1000-5404(2005)04-0340-03

放射性碘标记人工合成RGD肽拮抗物的设计与分子特性的计算机分析与模拟研究

郑秀海[1],董家鸿[1],李前伟[2],喻智勇[1],王曙光[1] (第三军医大学西南医院:[1]全军肝胆外科研究所,[2]核医学科,重庆 400038)

提 要:目的 设计一种可用于放射性碘标记的含RGD基序的粘附分子 $\alpha_v\beta_3$ 的肽拮抗物。**方法** 采用氨基酸替代的方法,构建所需的含有RGD结构和可被放射性碘标记的多肽分子,应用生物信息学和计算机模拟的方法,对该多肽分子的结构和性能进行分析,并由此预测该分子的生物学性能。**结果** 所设计可用于放射性碘标记的分子与已知的 $\alpha_v\beta_3$ 的肽拮抗物在结构和生物学性能方面具有相似性。**结论** 该分子符合放射性标记的要求,可能与已有的 $\alpha_v\beta_3$ 的肽拮抗物具有相似的生物学性能。

关键词:RGD肽;$\alpha_v\beta_3$ 拮抗物;整合素;^{125}I标记;分子设计

中图法分类号:R392.11;R394-33 **文献标识码**:A

Study of molecular models and characters of an RGD-containing antagonist for radioiodine-labeling

ZHENG Xiu-hai[1], DONG Jia-hong[1], LI Qian-wei[2], YU Zhi-yong[1], WANG Shu-guang[1] ([1]Institute of Hepatobiliary Surgery, [2]Department of Nuclear Medicine, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To design a molecular of RGD-containing antagonist of integrin $\alpha_v\beta_3$ for radioiodine-labeling. **Methods** In order to acquire an RGD-containing antagonist which can be labeled by radioiodine, a Phe was replaced by a Tyr in an RGD-containing peptide. The new peptide was analyzed by comparing with a known one from the protein database and its biological functions were forecasted. **Results** The new peptide which can be labeled by radioiodine was similar to the original $\alpha_v\beta_3$ antagonist in molecular structure and biological functions. **Conclusion** The new peptide can be labeled by radioiodine. Its biological functions may be similar to those of the known integrin $\alpha_v\beta_3$ antagonist.

Key words: RGD peptide; $\alpha_v\beta_3$ antagonists; integrins; ^{125}I labeling; molecular design

实体肿瘤在生长过程中诱导新生血管的形成,其间新生血管内皮细胞特异性地表达整合素 $\alpha_v\beta_3$,而在成熟的血管内皮细胞该分子不表达或表达很弱[1]。研究表明,整合素 $\alpha_v\beta_3$ 识别含有RGD结构的配体[2]。因此,通过设计适当的含有RGD结构的多肽,利用其能够与肿瘤新生血管相结合的特性,就可以用于肿瘤的导向诊断和治疗。CDCRGDCFC(RGD-4C-F)是应用噬菌体肽库的方法筛选出来的整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的有效配体[3],其中RGD是与整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的结合部位,但是,RGD表位的形成受很多因素的影响,包括RGD的空间结构、邻近的氨基酸基团的侧链均对其与整合素 $\alpha_v\beta_3$ 结合效率具有很大影响[4]。我们对RGD-4C-F分子进行改造,在其中引入可以被放射性核素碘标记的酪氨酸基团替代苯丙氨酸,形成新的能够被放射性碘标记的多肽分子CDCRGDCYC(RGD-4C-Y),并对改造后的分子结构和生物学性能进行了探讨。

1 材料与方法

1.1 序列比对和数据库搜索

采用美国国立生物信息技术中心的nr数据库,该数据库汇集了SWISS-PROT、PIR、PRF以及从GenBank序列编码区中得到的蛋白质和PDB中拥有原子坐标的蛋白质,并去除了冗余的序列。选择蛋白质搜索引擎BLASTP进行搜索。

1.2 多肽序列结构分析

一级结构及理化性质的分析应用瑞士生物信息学会(Swiss

作者简介:郑秀海(1969-),男,河南省安阳市人,博士研究生,主治医师,主要从事肝胆胰肿瘤方面的研究。电话:(023)65460505

通讯作者:王曙光,电话:(023)68754181

收稿日期:2004-02-26;修回日期:2004-04-25

Institute of Bioinformatics, SIB)的 ExPASy 服务器上的 ProtParam 软件进行分析。多肽序列的编辑和格式转换应用 DNASTAR 公司的 editseq 4.01 版软件，二级结构分析应用 DNASTAR 公司的 protean 4.01 版软件进行。三级结构的预测和重建采用美国国立生物信息技术中心 Cn3D 软件，版本号 3.0。

2　结果

2.1　同源性搜索

应用 BLASTP 搜索引擎分别对 RGD-4C-F 和 RGD-4C-Y 在蛋白质数据库 cr 中搜索，结果未见有含 RGD-4C-Y 序列的蛋白，在 PDB 数据库中得到与已知两个序列最为接近的两个同分异构短肽序列：1FUV 和 1FUL，其线性氨基酸序列为：ACDCRGDCFCG。

2.2　RGD-4C-F 和 RGD-4C-Y 的一级结构和理化性质分析

应用 ProtParam 软件对 RGD-4C-F 和 RGD-4C-Y 进行一级结构和理化性质分析，结果见表 1。

表 1　RGD-4C-F 和 RGD-4C-Y 的一级结构和理化性质的理论计算与预测结果比较

Tab 1　Comparison of the physical and chemical characters of the primary structure of RGD-4C-F and RGD-4C-Y in theory

Item	RDG-4C-F	RDG-4C-Y
Number of amino acids	9	9
Molecular weight	1021.1	1037.1
Theoretical pI	4.21	4.21
Total number of negatively charged residues (Asp + Glu)	2	2
Total number of positively charged residues (Arg + Lys)	1	1
Formula:	$C_{37}H_{56}N_{12}O_{14}S_4$	$C_{37}H_{56}N_{12}O_{15}S_4$
Total number of atoms	123	124
Estimated half-life	1.2 hours (mammalian reticulocytes, *in vitro*) >20 hours (yeast, *in vivo*) >10 hours (Escherichia coli, *in vivo*)	1.2 hours (mammalian reticulocytes, *in vitro*) >20 hours (yeast, *in vivo*) >10 hours (Escherichia coli, *in vivo*)
Instability index *	30.29 (stable)	20.86 (stable)
Aliphatic index * *	0.00	0.00
Grand average of hydropathicity (GRAVY)	0.100	-0.356

* instability index (Ⅱ) which is defined as:

$$II = (10/L) \times \sum_{i=1}^{i=L-1} DIWV(x[i]x[i+1])$$

where: L is the length of sequence, DIWV(x[i]x[i+1]) is the instability weight value for the dipeptide starting in position i.

* * Aliphatic index = X(Ala) + a × X(Val) + b × [X(Ile) + X(Leu)]

where X(Ala), X(Val), X(Ile), and X(Leu) are mole percent (100 X mole fraction) of alanine, valine, isoleucine, and leucine. The coefficients a and b are the relative volume of valine side chain (a = 2.9) and of Leu/Ile side chains (b = 3.9) to the side chain of alanine.

2.3　RGD-4C-F 和 RGD-4C-Y 的二级结构分析

应用 protean 4.01 分别对 RGD-4C-F 和 RGD-4C-Y 进行分析，可见二者区别仅在第 8 位的苯环(图 1)。

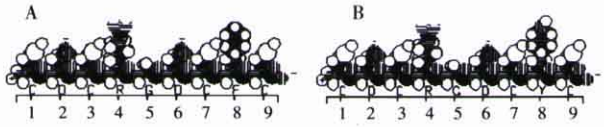
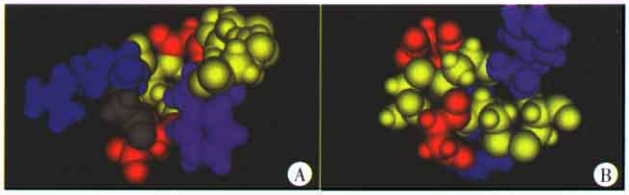


图 1　线形结构 RGD-4C-F(A)，RGD-4C-Y(B)

Fig 1　Aralysis of the linear structures, RGD-4C-F (A), RGD-4C-Y (B)

2.4　1FUL 和 1FUV 的三级结构

进一步搜索 1FUL 和 1FUV，在瑞士生物信息研究所分子生物学服务器 SWISS-PROT PDB 蛋白质数据库中得到其 PDB 文件。应用 Cn3D 3.0 重现 1FUL 和 1FUV 的三级结构，可见苯丙氨酸的苯环位于分子的外侧，远离 RGD 结构域(图 2)。



A: 1FUL; B: 1FUV

图 2　1FUL 和 1FUV 的三维结构分析

Fig 2　Analysis of the three dimensional structures, 1FUL, 1FUV

3　讨论

整合素 $\alpha_v\beta_3$ 是一跨膜的糖蛋白，仅见于新生血管内皮细胞，通过和多种细胞外基质蛋白的相互作用，参与肿瘤的血管形成过程，影响肿瘤的生长，浸润和转移[5]。$\alpha_v\beta_3$ 的配体依赖于 RGD 结构发挥其生物学作用，特定的含有 RGD 结构的多肽能够通过和其配体 $\alpha_v\beta_3$ 的结合抑制肿瘤新生血管的形成，RGD 多肽与其它示踪剂或者药物的结合，能够用于肿瘤的诊断和治疗[6]。

与其它蛋白质一样，含 RGD 结构的多肽的物理化学特性，空间结构形式，空间分子表面电荷分布对其与 $\alpha_v\beta_3$ 的结合表位有重要影响，含 RGD 的多肽的一级结构决定其与 $\alpha_v\beta_3$ 的结合效率，而具有相同一级结构的含有 RGD 的多肽，空间结构形式的不同，以及与 RGD 结构在空间结构上相邻的氨基酸残基侧链也能够显著影响它与 $\alpha_v\beta_3$ 的结合，并且影响它选择性的结合。对 ACDCRGDCFCG 的两种同分异构体的研究显示，对称

结构的C1、C4和C2、C3半胱氨酸二硫键的结合形成的RGD分子较C1、C3和C2、C4半胱氨酸二硫键的结合形成的RGD分子与$\alpha_v\beta_3$的亲合力高18倍。但是后者较前者分子稳定性差,在自然状态下二者含量的比率在50:50到90:10不等[4]。RGD-4C是利用噬菌体肽库技术分离出来的与$\alpha_v\beta_3$有高度亲和力的短肽,其中4个半胱氨酸的巯基通过二硫键的作用结合。研究显示,该环形的RGD多肽结构较线状的结构具有较强的与$\alpha_v\beta_3$配体相结合的能力,对形成有效的RGD表位起关键作用[7]。

通过合适的载体将放射性核素导入到特定的部位,在肿瘤的诊断和治疗方面具有重要意义。放射性碘^{125}I、^{131}I是易于获得的常用核素,多肽或蛋白分子的碘化依赖于其中所含有的酪氨酸基团。RGD-4C-F中含有苯丙氨酸,与酪氨酸基团同为芳香族氨基酸,二者仅相差一个-OH基团,且苯丙氨酸不构成RGD-4C-F表位,苯丙氨酸基团的替换,不影响其酸性氨基酸(门冬氨酸、谷氨酸)和碱性氨基酸(组氨酸、赖氨酸、精氨酸)的组成,因此对分子的理论上的等电点没有影响,对两分子的在体和离体的半衰期的理论估计,二者也没有差别,说明该氨基酸的替换不影响该分子的酶解位点。二者的不稳定指数虽然有差异,但均小于阈值40,为稳定分子。脂肪簇指数为多肽或蛋白质中脂肪簇侧链的相对含量,因为该氨基酸替代没有脂肪簇侧链的参与,所以二者没有区别。GRAVY是蛋白质的亲水指数[8],二者无显著差异。

氨基酸的不同排列组合可以组成的多肽和蛋白的数量非常庞大,但是,研究表明,蛋白质的空间结构形式,却只有有限的几百种。即蛋白质的空间构型有很强的规律性,这就为蛋白质立体结构预测,特别是表位的预测提供了依据。随着近年计算机技术和数据库技术的飞速发展,应用计算机分析、模拟多肽、蛋白质的空间结构成为越来越成熟的技术。DNASTAR是一个功能强大的核酸、蛋白分析工具,特别在蛋白质的二级结构分析方面,具有直观易用的特点,而且软件包内的editseq 4.01和protean 4.01配合,可以任意编辑自己的多肽和蛋白序列,并予以分析。对于RGD-4C-F的同分异构分子而言,因为氨基酸的替换并未影响多肽主链的结构,所以,它们的α螺旋和β片层结构没有区别。

对多肽或蛋白质空间三维结构的分析,通常采用X射线晶体结构分析、多维核磁共振(NMR)波谱分析和电子显微镜二维晶体三维重构的方法,这些方法虽然直接可靠,但实验步骤复杂,对实验室条件要求很高,难度较大。我们从nr数据库进行序列同源性搜索,得到两个结构类似的同源同分异构序列,在一级结构分析的基础上对该多肽的立体结构和生物学活性进行了预测。通过对1FUL和1FUV的三维结构的研究,可见苯丙氨酸不构成RGD肽的表位。重建的三维结构图中,可见苯丙氨酸,酪氨酸残基的芳香簇基团位于多肽分子的侧面,距离RGD核心结构以及S-S键较远,-OH基的加入,可能不影响或者对RGD的表位形成影响甚微。因此,RGD-4C-Y可能具有与RGD-4C-F类似的作为整合素$\alpha_v\beta_3$配体的生物学活性,具有作为肿瘤导向诊断和治疗的一种载体的应用前景。

参考文献:

[1] Brooks P C, Clark R A, Cheresh D A. Requirement of vascular integrin alpha v beta3 for angiogenesis[J]. Science, 1994, 264(5158): 569-571.

[2] Koivunen E, Wang B, Ruoslahti E. Phage libraries displaying cyclic peptides with different ring sizes: ligand specificities of the RGD-directed integrins[J]. Biotechnology, 1995, 13(3): 265-270.

[3] Koivunen E, Restel B H, Rajotte D, *et al*. Integrin-binding peptides derived from phage display libraries[J]. Methods Mol Biol, 1999, 129: 3-17.

[4] Assa-Munt N, Jia X, Laakkonen P, *et al*. Solution structures and integrin binding activities of an RGD peptide with two isomers[J]. Biochemistry, 2001, 40(8): 2373-2378.

[5] Parise L V, Lee J, Juliano R L. New aspects of integrin signaling in cancer[J]. Semin Cancer Biol, 2000, 10(6): 407-414.

[6] Arap W, Pasqualini R, Ruoslahti E. Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model[J]. Science, 1998, 279(5349): 377-380.

[7] Haubner R, Gratias R, Diefenbach B, *et al*. Structural and functional aspects of RGD-containing cyclic pentapeptides as highly potent and selective integrin $\alpha_v\beta_3$ antagonists[J]. J Am Chem Soc, 1996, 118(32): 7461-7472.

[8] Kyte J, Doolittle R F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein[J]. J Mol Biol, 1982, 157(1): 105-132.

(编辑 陈聪连)