论著

文章编号:1000-5404(2006)05-0438-03

VEGF受体3亲和肽亲和特性研究

侍立峰,梁志清 (第三军医大学西南医院妇产科,重庆 400038)

提 要:目的 通过测定人源VEGF受体3(VEGFR3)亲和肽(WHGSLKQNLWWY)及VEGF-D与VEGFR3的功能性亲和常数,鉴定亲和肽的亲和特性。**方法** 通过戊二醛耦联法包被多肽,确定最佳多肽包被浓度,最佳多肽与VEGFR3结合反应时间以及包被系数后,采用非竞争性ELISA固项法,得到多肽及VEGF-D与VEGFR3的结合反应曲线,计算多肽及VEGF-D与VEGFR3的亲和常数。**结果** 多肽及VEGF-D与VEGFR3的功能性亲和常数分别为$(1.42 \pm 1.45) \times 10^{7}$ mol/L^{-1}和$(1.03 \pm 1.16) \times 10^{8}$ mol/L^{-1}。**结论** 该多肽与VEGFR3亲合能力较强,为今后开发以该多肽为基础的靶向治疗药物提供了理论依据。

关键词: 酶联免疫吸附测定;多肽;亲和力;卵巢癌;血管内皮生长因子受体3

中图法分类号: R341.6; R392.11; R737.31 **文献标识码:** A

Research on function of VEGF receptor 3 high-bound peptide

SHI Li-feng, LIANG Zhi-qing (Department of Obstetrics and Gynecology, Southwest Hospital, Third Millitary Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To assess the function of the peptide (WHGSLKQNLWWY) through measuring the a functional affinity constant between humanized VEGF receptor 3 and peptide, then comparing it to that between VEGF D and peptide. Methods After coating the peptide by BSA binding with glutaral couple, the best concentration, best time of peptide to coat the plate and the coating coefficient were determined. With cognizance of the advantages of solid phase method in time consumption and convenience, we assessed the functional affinity constant of engineered peptide and VEGF-D with non-competitive ELISA method. We plotted the *D* (410) standard curve of the binding reaction of peptide and VEGFR3/Fc using four grades of concentration of VEGFR3/Fc and a series of consistency of peptide. We got the consistency of peptide at the half of maximal OD value through the standard curve and calculated the affinity constant by law of Mass Action. Results The affinity constant of peptide was between $10^{7} - 10^{8}$ mol/L^{-1}, which was only smaller by 10 times than that of VEGF-D. Conclusion The peptide we got from the peptide liberary can strongly bind to the target (VEGFR3), thus providing a theoretical basis for its pharmacal use.

Key words: enzyme-linked immunosorbent assay; peptide; affinity; ovarian carcinoma; VEGF receptor 3

卵巢癌是最常见的女性生殖道恶性肿瘤,其发病率高达2%左右,由于具有早期诊断率低,浸润性生长和转移迅速,对药物治疗反应差等特点,其病死率已居女性生殖道恶性肿瘤之首[1]。针对癌细胞的靶向治疗是一种重要的抗卵巢癌的治疗手段。我们在以往的实验中,通过噬菌体肽库技术[2],筛选到与卵巢癌组织淋巴管上皮细胞的血管内皮生长因子受体3(VEGFR3)具有高亲和力的噬菌体融合多肽。为进一步了解多肽与靶分子的结合特性,我们对多肽进行了生物合成并分别测定其与原始配体VEGF-D同VEGFR3的功能性亲和常数[3]。评估多肽的亲和功能,为进一步研究靶向治疗药物提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

多肽序列(WHGSLKQNLWWY)此前通过噬菌体展示技术由本实验室从噬菌体12肽库中筛选、鉴定、测序而得到;多肽的合成由北京中科亚光生物技术有限公司采用固相法多肽合成仪合成,序列(WHGSLKQ NLWWY),产品经高压液相色谱分

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30371484)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30371484)

作者简介: 侍立峰(1977-),男,江苏省连云港市人,硕士研究生,医师,主要从事卵巢肿瘤方面的研究,现在解放军第117医院妇产科。电话:(023)65398434

通讯作者: 梁志清,电话:(023)68754409

收稿日期: 2005-11-17;**修回日期:** 2005-12-06

析，纯度 >99%；rhVEGFR3/Fc 蛋白（R&D #349-F4）；rhVEGF-D 蛋白（R&D #622-VD）活性经 ELISA 检测 4 μg/ml rhVEGFR3/Fc（100 μl/孔）结合 rhVEGF-D 浓度范围（8～500 ng/ml）；HRP 标记羊抗人 IgGFc（Rockland 公司购得#209-1303）工作浓度 1∶5 000；22 mg ABTS（购于上海 sangon 公司 #A0400）溶解于 50mmol/L 乙酸钠（pH 4.0）100 ml 中制备显色液；BSA 购于上海 sangon 公司；ELISA 板购于 Costar 公司；TBST（Tween-20 0.2%）、PBSN、硼酸缓冲液（pH 10、pH 8.5）为本实验室配制；Bio-Rad M500 自动读板仪。

1.2　方法

1.2.1　多肽的戊二醛耦联　　取 20 mgBSA（68×10^3），硼酸缓冲液（pH 10）充分溶解，加入 5 mg 合成肽（1.6×10^3），分子比（1∶10）。缓慢加入 0.3% 戊二醛 1 ml，37 ℃孵育 2 h，加入 1 mol/L 甘油 0.25 ml，温箱中反应 30 min，pH 8.5 硼酸缓冲液透析 24～48 h，换液 4 次，-20 ℃备用。

1.2.2　确定多肽的最佳反应时间　　将多肽以 PBSN 包板液稀释至 5 μg/ml，每孔 100 μl，封阻液及 PBS 阴性对照，室温振荡孵育 24 h，封阻液室温封闭 12 h，将 VEGFR3 稀释至 2 μg/ml，每孔加入 100 μl，每组 4 孔，共设 6 组，室温下各组振荡孵育时间分别为 2、4、8、16、24、64 h，TBST 洗板，每孔加入 200 ng 辣根过氧化物酶标记的羊抗人 IgG Fc，室温孵育 2 h 加入 ABTS 显色液避光显色 15 min；每孔滴 1 滴 2 mol/L 硫酸中止反应；读 $D(410)$ 值，并做出曲线。

1.2.3　确定多肽的最佳包被浓度　　PBSN 稀释多肽以 20、10、5、2.5、1.25、0.625、0.3125、0.15625、0.078125、0.039 062 5 μg/ml 浓度包被微孔板，并设内对照及封阻液、PBS 阴性对照，室温孵育 24 h，封闭 12 h 后；再次洗板，将 VEGFR3/Fc 以 2 μg/ml 浓度向每孔加入 100 μl，室温下振荡孵育 8 h，其后显色过程同 1.2.2，并做出曲线。

1.2.4　亲和常数计算公式的演变　　质量作用定律方程 $K=[AgAb]/[Ag]\times[Ab]$　$K=(n-1)/(n[Ab']总-[Ab]总)$ 其中 [Ag]、[Ab] 为反应体系达平衡时（吸光度值为平台期的 50%）时的受体、配体浓度；n 为加入的受体浓度比值；[Ab]总、[Ab']总为不同反应加入的总配体浓度。以上正是采用非竞争性 ELISA 法测定蛋白亲和常数的理论基础[2,3]。由于小分子肽的包被过程中包被效率较低，为了计算更为精确，我们设计包被系数“D”，那么公式可进一步变形为 $K=D(n-1)/(n[Ab']总-[Ab]总)$。

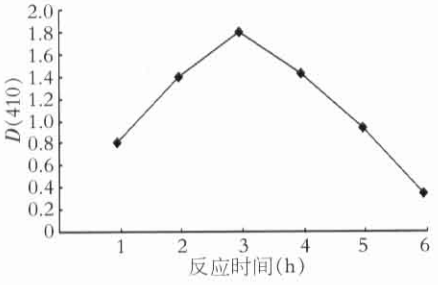
1.2.5　测定不同浓度多肽包板条件下 VEGFR3/Fc 结合反应曲线　　以 PBSN 包板液将多肽稀释为 10、5、2.5、1.25、0.625 和 0.312 5 μg/ml 6 个浓度后依次加入微孔板中，每孔 100 μl，设 1 组内对照，封阻液及 PBS 作阴性对照。洗板及封闭后将 2、1、0.5、0.25 μg/ml 的 VEGFR3/Fc 与多肽结合，室温 200 r/min 振荡孵育 16 h；其后的显色过程同 1.2.2。注：多肽包被后剩余未包被液体测 $D(280)$ 值。计算包被系数（D）=（包被前 $D(280)$ - 未结合液体 $D(280)$）/包被前 $D(280)$ 值。

1.2.6　测定不同浓度 VEGF-D 包板条件下 VEGFR3/Fc 结合反应曲线　　以 PBSN 包板液将 VEGF-D 稀释为 500、250、125、62.5、31.25、15.625 ng/ml 6 个浓度后依次加入微孔板中，每孔 100 μl，其后过程同 1.2.5。

2　结果

2.1　确定多肽最佳反应时间

以 5 μg/ml 多肽包板，及 2 μg/mlVEGFR3/Fc 为代表，确定二者最佳反应时间，结果表明孵育 8 h 后 $D(410)$ 值达到最大，其后随着孵育时间的延长 $D(410)$ 值反而下降（图 1）。证明 8 h 为多肽与 VEGFR3 的最佳反应时间。

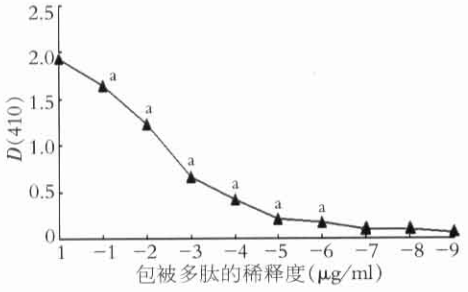


1：2^1 h；2：2^2 h；3：2^3 h；4：2^4 h；5：2^5 h；6：2^6 h

图 1　多肽与 VEGFR3 不同反应时间的吸光度值变化

2.2　确定最佳多肽包被浓度

当多肽以 10、5、2.5、1.25、0.625、0.312 5 μg/ml 浓度包被时，$D(410)$ 值分别为 1.645、1.228、0.658、0.421、0.214、0.165，均在 0.15～2.5 范围之间（图 2），我们取这 6 个浓度测定多肽与 VEGFR3 反应曲线。

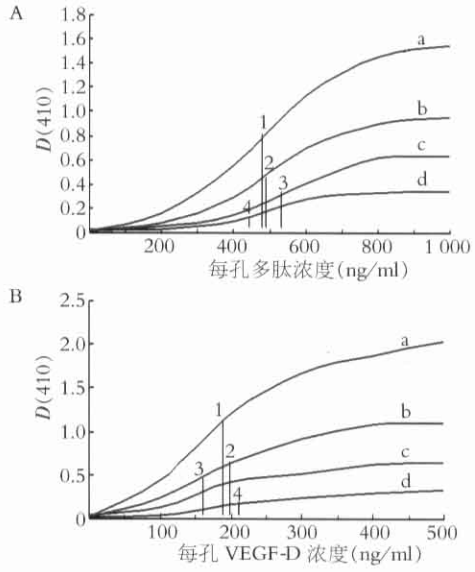


1 代表浓度为 20 μg/ml，余下分别代表 20×2^{-1}、20×2^{-2}、20×2^{-3} …20×2^{-9} μg/ml；a：所取 6 个包被多肽浓度

图 2　不同多肽包被浓度吸光度值变化

2.3　测定 4 个倍比多肽浓度包板下 VEGFR3/Fc 的结合反应曲线

以 5% 递减法确定出 a、b、c、d 4 条曲线右侧的结合反应平台期（A、B、C、D 分别代表以 2、1、0.5 和 0.25 μg/ml 浓度与多肽结合的 VEGFR3/Fc，四者浓度之比为 8∶4∶2∶1），通过作图法取其最大吸光度值一半处对应的配体浓度（分别对应图中 1、2、3、4 点）。多肽在 1 处浓度为 490 ng/ml，2 处浓度为 500 ng/ml，3 处浓度为 530 ng/ml，4 处浓度为 440 ng/ml（图 3A）。VEGF-D 在 1 处浓度为 180 ng/ml，2 处浓度为 190 ng/ml，3 处浓度为 160 ng/ml，4 处浓度为 210 ng/ml（图 3B）。



A：多肽与 VEGFR3 结合反应曲线；B:VEGF-D 与 VEGFR3 结合反应曲线

图3 多肽及 VEGF-D 与 VEGFR3 结合反应曲线

2.4 包被系数

分别取两条曲线趋直线部分待测分子浓度计算包被系数 D =(包被前 $D(280)$ - 未结合液体 $D(280)$)/包被前 $D(280)$ 值，所得值求算术均数结果分别为，多肽包被系数为：$D_1 = (0.248 \pm 0.101)$，VEGF-D 分子包被系数为 $D_2 = (0.893 \pm 0.233)$。

2.5 计算多肽及 VEGF-D 功能性亲和常数

根据上述公式，计算出多肽分子质量(1.6×10^3)及 VEGF-D(分子质量 20×10^3)的功能性亲和常数分别为 $(1.42 \pm 1.45) \times 10^7$ mol/L^{-1}和 $(1.03 \pm 1.16) \times 10^8$ mol/L^{-1}。

3 讨论

肿瘤导向治疗是肿瘤生物学治疗的一种，噬菌体展示技术的出现为导向治疗提供了新的思路[4]。与抗体片段相比，小分子载体由于分子质量较小(1 000～2 000)，组织穿透性好，且不易在体内诱发免疫应答，因此可以作为一个良好的靶向载体。应用噬菌体展示技术对肿瘤组织特异标记性抗原进行固相筛选能快速找出与肿瘤组织特异性结合的短肽[5]。而这些短肽与靶细胞的亲和功能特性是决定其能否作为靶向载体的关键。为此我们对实验所得的阳性序列进行多肽合成并对其亲和功能进行研究。

亲和常数(affinity constant)表示的是抗原表面单一决定簇与相应抗体的单一结合位点间的结合强度。广义来说是鉴定两活性基团结合活性的特异性指标[6,7]。非竞争 ELISA 测定多肽的亲和常数操作简便，结果可靠[8-10]，但要做到小分子多肽与酶标板的有效结合并非易事，虽然经过了戊二醛耦联的方法，但包被的效率对亲和常数结果的影响仍不容忽视。为此，我们加入包被系数 D，即计算酶与标板结合多肽的比例来减少实验结果的偏差。

VEGFR3 属于酪氨酸激酶受体家族成员，主要表达于淋巴管内皮细胞，一系列研究证明 VEGFR3 是淋巴管生成所必需的。在人体内受体与 VEGF-C、VEGF-D 分子的相互作用同卵巢癌高淋巴转移的特性密切相关[11,12]。为了对多肽与靶分子 VEGFR3 的亲和功能进行充分评估，我们选择受体的原始配体 VEGF-D 分子进行比较。通常情况下由于多肽分子量小，辅助基团缺乏，结合活力相对原始配体低。根据实验结果，多肽与靶分子 VEGFR3 的亲和力为 $(1.42 \pm 1.45) \times 10^7$ mol/L^{-1}，与靶分子原始配体 VEGF-D 分子亲和力 $(1.03 \pm 1.16) \times 10^8$ mol/L^{-1} 二者相比仅相差不到 10 倍。证明合成肽与 VEGF 受体 3 具有较高的亲和力，以此为基础，我们可以在多肽的改造，开发抗肿瘤药物等方面进行进一步的探讨。

参考文献：

[1] JANCARKOVA N, KRKAVCOVA M, JANASHIA M, *et al*. Genetic aspects of malignant epithelial overican tumons[J]. cESKA gYNEKOL, 2005, 70(4): 299 - 306.

[2] DENG X K, NESBIT L A, MORROW K J,Jr.. Recombinant single-chain variable fragment antibodies directed against Clostridium difficile toxin B produced by use of an optimized phage display system[J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2003, 10(4): 587 - 595.

[3] BEATTY J D, BEATTY B G, VLAHOS W G. Measurement of monoclonal antibody affinity by non-competitive enzyme immunoassay[J]. J Immunol Methods, 1987, 100 (1-2): 173 - 179.

[4] BORYSOWSKI J, GORSKI A. Phage-display technology and its application to experimental oncological therapy[J]. Postepy Hig Med Dosw (Online), 2004, 58: 100 - 107.

[5] SMITH G P, PETRENKO V A. Phage display[J]. Chem Rev, 1997, 97(2): 391 - 410.

[6] AZIMZADEH A, VAN-REGENMORTEL M H. Antibody affinity measurements[J]. J Mol Recognit, 1990, 3(3): 108 - 116.

[7] 韩焕兴，范列英，胡栋平，等，人源抗乙肝病毒表面抗原单克隆抗体的抗原结合活性[J]. 中华医学杂志，1996，76(6)：467 - 468.

[8] CAPIAUMONT J, JACOB C, SAREM M, *et al*. Assay of a seric human hexapeptide (HWESAS) using a monoclonal antibody and ELISA [J]. Clin Chim Acta, 2000, 293(1-2): 89 - 103.

[9] BARKIA A, MARTIN C, PUCHOIS P, *et al*. Enzyme-linked immunosorbent assay for human proapolipoprotein A-I using specific antibodies against synthetic peptide[J]. J Lipid Res, 1988, 29(1): 77 - 84.

[10] PESCE A J, MICHAEL J G. Artifacts and limitations of enzyme immunoassay[J]. J Immunol Methods, 1992, 150(1-2): 111 - 119.

[11] AL-RAWI M A, MANSEL R E, JIANG W G. Molecular and cellular mechanisms of lymphangiogenesis[J]. Eur J Surg Oncol, 2005, 31 (2): 117 - 121.

[12] TRAPPEN P O, PEPPER M S. Lymphangiogenesis in human gynaecological cancers[J]. Angiogenesis, 2005, 8(2): 137 - 145.

(编辑 栾 嘉)