论著

文章编号:1000-5404(2009)22-2272-03

整合素 αvβ3 特异性结合肽的筛选及初步鉴定

李雪松[1],吴虹晔[1],熊 燕[1],李晓武[1],董家鸿[2] ([1]第三军医大学西南医院全军肝胆外科研究所,重庆 400038;[2]解放军总医院肝胆外科,北京 100037)

摘 要:目的 应用噬菌体随机肽库展示技术筛选能与整合素 αvβ3 分子具特异性结合功能的小肽分子,并对其功能进行初步鉴定。**方法** 根据整合素 αvβ3 分子细胞外配体结合区域的晶体结构及蛋白质序列设计①~⑤号5条短肽,并作为筛选配基,分别经过3轮"吸附-洗脱-扩增"后,ELISA 鉴定阳性克隆,DNA 测序和分析,粘附试验进一步分析化学合成多肽的功能。**结果** 经3轮亲和筛选后,噬菌体克隆得到有效富集,以⑤号肽为代表,ELISA 鉴定显示7个阳性克隆能与⑤号合成短肽有较强结合活性。进行 DNA 测序,多重序列分析获得2个多肽基序:**** HRH,HWR **** 。粘附试验表明化学合成多肽 FITC-HLPWHRH,FITC-HWRLHPH 与表达整合素 αvβ3 的细胞株具有一定的亲和性,且结合能被 αvβ3 分子配体纤维连接蛋白所抑制。**结论** 通过噬菌体随机展示肽库技术在体外对合成的短肽进行筛选,可以获得与整合素 αvβ3 分子具特异性结合能力的小肽分子。

关键词: 整合素 αvβ3;噬菌体肽库;结合肽;淘选
中图法分类号: Q516;R394-33;R394.3 **文献标识码:** A

Screening and function analysis of specific binding peptide of integrin αvβ3

LI Xue-song[1], WU Hong-ye[1], XIONG Yan[1], LI Xiao-wu[1], DONG Jia-hong[2] ([1]Institute of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [2]Department of Hepatobiliary Surgery, General Hospital of PLA, Beijing 100037, China)

Abstract: Objective To screen specific binding peptide of integrin αvβ3 using phage display random peptide library technology and analyze the function of potential peptide. Methods Five short peptides designed according to the crystal structure of the extracellular segment and protein sequence of integrin αvβ3 were utilized as selected ligands and coded from 1 to 5. After 3 rounds of screening, positive phage clones were identified by sandwich ELISA and DNA sequencing. Functions of the peptides were further identified with adhesion test. Results After 3 rounds of screening, the enriched phage clones were identified. As a representative, 7 of 12 phage clones were identified positive by ELISA, which had comparatively strong binding activity to synthesized peptide coded 5. Two sequences were obtained, and the consensus sequence was **** HRH and HWR **** . Adhesion test showed that chemical synthesized peptides "FITC-HLPWHRH, FITC-HWRLHPH" had higher binding affinities to M2 cells expressing integrin αvβ3. Conclusion The peptides with high affinity to integrin αvβ3 can be obtained through the screening of phage random peptide library with the synthesized peptides *in vitro*, which is beneficial to the further studies on the function of integrin αvβ3 in the early diagnosis of cancer and targeting angiogenesis inhibitors specific drug design.

Key words: integrin αvβ3; phage-displayed random peptide library; binding peptide; screening

肿瘤血管生成(angiogenesis)是促进肿瘤生长、侵袭及转移的重要因素之一[1]。其中整合素 αvβ3 分子通过介导血管内皮细胞迁移促进肿瘤血管生成,在促进肿瘤的侵袭、转移中发挥着重要作用。整合素 αvβ3 分子属粘附分子家族,其特异性的在肿瘤新生血管内皮细胞上呈高表达,这一特点使其成为肿瘤血管生成抑制研究的新靶点,但目前仍缺乏与整合素 αvβ3 具高特异性结合能力的肽或小分子物质[2]。噬菌体随机肽库技术在分离筛选可特异性与靶受体结合的小分子多肽方面已显示出巨大的应用潜力,也是研究配体受体相互作用位点的强有力工具[3,4]。本实验拟以 αvβ3 分子亚基上决定其配体结合能力区域的蛋白质序列为原型设计5条短肽,并分别作为筛选配基,筛选噬菌体随机7肽库,以期获得与整合素 αvβ3 亚基具特异结合的小分子肽,并分析多肽片段的特异性,为选择肿瘤血管生成抑制导向治疗的载体以及体外合成更为高效和特异肿瘤示踪相关的短肽药物提供新的研究途径。

作者简介:李雪松,男,湖南省益阳市人,博士,医师,主要从事肝细胞癌方面的研究。E-mail:anzscd@163.com
收稿日期:2009-06-09;修回日期:2009-07-08

1　材料与方法

1.1　主要试剂

生物素标记的①②③④⑤号合成多肽由北京六合华大基因科技股份有限公司合成, FITC 标记的化学合成多肽 FITC - HLPWHRH,FITC-HWRLHPH 由上海强耀生物科技有限公司合成。噬菌体七肽库(PhD-7. TM Phage Display Peptide Library)库浓度为 2.00×10^{12} pfu/ml,宿主菌为 *E. coli* 2738, -28 gⅢ手工测序引物, -96 gⅢ自动测序引物,均购自 New England Biolabs 公司。M2 和 C23 黑色素瘤细胞株本室保存。主要试剂:HRP 抗 M13 单抗(#27-9421-01,1∶5 000 稀释)购自 Amersham Biosciences 公司;ABTS(#A0400,22 mg ABTS 溶于 50 mmol/L 柠檬酸钠 100 ml 中,pH 4.0,过滤除菌)购于 Sangon 公司;PEG-8000(Sangon 公司,#PT1788);封阻缓冲液、碘化物缓冲液、TBST、TBS、0.2 mol/L Glycine-HCl(pH 2.2,含 1 mg/ml 的 BSA)、TE 缓冲液(10 mmol/L Mm Tris-HCl pH 8.0,1 mmol/L EDTA)均为本室自配。主要仪器:恒温培养箱 HZQ-X100(哈尔滨市东明医疗仪器厂)、超速离心机(Beckman JA-30. 50;Eppendorf 5417R、5840R)、Bio-Rad 凝胶呈像仪、Bio-Rad M500 自动读板仪。

1.2　合成多肽筛选配基的设计

整合素 αvβ3 分子的晶体结构和蛋白质序列研究表明 5 个决定其空间构象,影响其 RGD 配体结合活性的区域分别位于 αv 亚基上 143 ~ 154 位和 172 ~ 181 位,β3 亚基上的 177 ~ 186、99 ~ 123、212 ~ 221 位氨基酸之间[3,4]。依据这些研究合成如下 5 条生物素标记的多肽作为筛选配基:①RSQDIDADGQGF;②GGPGSFYWQG;③CYDMKTTCLP;④NFSIQVRQVEDYPVDIYY-LMDLSYS;⑤VSRNRDAPEG。①②号肽序列位于 αv 亚基上,③④⑤号肽序列位于 β3 亚基上。

1.3　噬菌体肽库的筛选

液相淘选法:用 100 μg/ml 链霉亲和素溶于 0.1 mol/L $NaHCO_3$(pH 8.6)中,每孔 1.5 ml 包被 60 mm × 15 mm 聚苯乙烯平皿,4 ℃轻微震荡,孵育过夜。倒掉包被液,每孔加满封阻液(0.1 mol/L $NaHCO_3$,5 mg/ml BSA,0.02% 的 NaN_3,0.1 μg/ml 的链霉亲和素),4 ℃封阻 1 h; 封阻板时,预先将噬菌体与生物素化靶蛋白分子结合。即:在加入 400 μl TBS 的微量离心管中混合 0.1 μg 生物素化靶蛋白和 2×10^{11} pfu 的噬菌体,室温作用 10 ~ 60 min。用 TBST(50 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl,0.1% Tween-20)快速洗板 6 次,将噬菌体-靶蛋白溶液加入到已清洗过的封阻板中,室温温育 10 min。加入生物素至终浓度 0.1 mmol/L,继续温育 5 min,弃去未结合噬菌体液,用 TBST 洗板 10 次,每孔加入甘氨酸洗脱液(0.2 mol/L pH 2.2 Glycine-HCl,1 mg/ml BSA)1 ml,室温轻摇 10 min,洗脱特异性结合的噬菌体,收集洗脱液于微量离心管,加入中和缓冲液 150 μl,留取 2 μl 用于滴度测定,剩余洗脱物进行扩增,用于下一轮筛选。同样的方法进行第 2、3 轮筛选,洗脱液 TBST 的浓度依次递增为 0.3%、0.5%。

1.4　噬菌体滴度的测定

用 LB 培养基对洗脱液进行 10 倍系列稀释,分别取各稀释度的噬菌体 10 μl 加入到 200 μl 制备好的对数生长期的 ER2738 菌液中,快速震荡混匀,室温温育 5 min,加入到 3 ml 已融化的 45 ℃的 Agarose Top 中混匀,立即倾注于 37 ℃预热的 LB/IPTG/Xgal 平皿上,均匀铺开。冷却 10 min 后,37 ℃倒置平皿培养过夜。记数平皿上蓝斑个数。噬菌体滴度(pfu) = 平皿中蓝斑个数 × 稀释倍数。即每 10 μl 的噬菌体形成单位。

1.5　扩增

将 ER2738 的过夜培养物 1∶100 稀释于 20 ml LB 培养基中,盛装于 250 ml 的锥形瓶内,然后加入剩余的洗脱物,37 ℃剧烈震荡培养 4.5 h。倒入离心管,4 ℃,10 000 r/min 离心10 min,收集 80% 的上清液加入 1/6 体积的 PEG/NaCl,4 ℃,10 000 r/min,15 min 离心,弃上清,用 1 ml TBS 悬浮沉淀。4 ℃,10 000 r/min,离心 5 min,去除沉渣,上清中再加入 1/6 体积的 PEG/NaCl,冰上沉淀 60 min,4 ℃,10 000 r/min,离心10 min,弃上清,用 200 μl TBS,0.02% NaN_3 悬浮沉淀物,即为扩增的噬菌体。

1.6　双夹心 ELISA 鉴定

用包被缓冲液稀释合成多肽,每孔 100 μl 包被 96 孔酶标板,密封湿盒中 4 ℃过夜。弃包被液,每孔加满封阻液,4 ℃封阻 2 h。0.5% TBST 洗板 6 次,横向每孔分别加入 10 倍系列稀释的噬菌体克隆并用 TBST 稀释至 200 μl,纵向为不同的噬菌体克隆及相应的封阻缓冲液对照,室温震荡作用 2 h,0.5% TBST 洗板 6 次,加入 1∶5 000 稀释的 HRP conjugate anti-M13 抗体,室温孵育 1 h,再用 TBST 洗板 6 次,加 ABTS 底物显色液(200 μl/孔),室温作用 10 ~ 60 min 显色,酶标仪测 D(450)值。

1.7　提取单链 DNA 测序

取鉴定阳性克隆的噬菌体扩增液 500 μl,加入 200 μl PEG/NaCl,混匀,室温放置 10 min; 10 000 r/min,离心 10 min,弃上清,加 100 μl 碘化物缓冲液彻底重悬,加入等体积氯仿/三氯甲烷(1∶1)抽提 1 次,再用等体积氯仿抽提 1 次,加入 250 μl 无水乙醇,室温温育 10 min;10 000 r/min,离心 10 min,弃上清,用 70% 的乙醇 500 μl 洗沉淀,真空抽干,TE 缓冲液 30 μl 悬浮即可。琼脂糖凝胶电泳鉴定。用肽库自带测序引物送上海生物工程技术有限公司测序。

1.8　粘附实验

以 100 μg/ml 化学合成多肽、100 μg/ml 化学合成多肽和 100 μg/ml 纤维粘接蛋白混合物(100 μl/孔)、100 μg/ml 纤维粘接蛋白,分别包被 96 孔酶标板,4 ℃孵育过夜,去除包被液,封阻缓冲液 4 ℃封阻 2 h。PBST 洗板 3 次。将复苏生长至对数期的黑色素瘤细胞株 M2 和 C23 细胞,制备成细胞悬液,并使细胞尽量分散。每孔加入 200 μl 细胞悬液(M2 和 C23 各 3 孔),使每孔含的细胞数尽量相等。震荡孵育 1 h。除去细胞悬液,PBST 洗板 3 次,除去未结合细胞。加 1% Triton X100 作用 20 min,台盼蓝染色 10 ~ 60 min,显微镜下计数染色细胞数。

2　结果

2.1　3 轮筛选的富集率

5 条合成多肽分别经过 3 轮亲和筛选后,测定每一轮筛选前后的噬菌体滴度,通过公式:回收率(%) = 洗脱液滴度/筛选前滴度 ×100%,计算其回收率,可见回收率逐步提高,特异性噬菌体克隆得到有效富集,富集率以⑤号合成多肽作为代表(表 1)。

表 1　噬菌体 7 肽库对⑤号合成多肽的 3 轮筛选富集率

合成多肽	筛选轮数	筛选前滴度(pfu)	洗脱液滴度(pfu)	富集率(%)
⑤	1	8.000×10^{12}	5.600×10^{4}	6.250×10^{-9}
	2	7.650×10^{12}	8.000×10^{6}	1.046×10^{-6}
	3	8.670×10^{12}	2.000×10^{8}	2.307×10^{-5}

2.2　噬菌体克隆与①~⑤号合成多肽的结合实验

从 5 条合成多肽第 3 轮筛选后洗脱下来的噬菌体中分别随机挑取 15 个分隔良好的蓝色噬斑,制备噬菌体原种。ELISA

检测其分别与①~⑤号合成多肽的反应性。结果共发现有22个阳性噬菌体克隆。其中⑤号合成多肽ELISA结果中有7个克隆显示与⑤号合成多肽的结合较强(图1)。

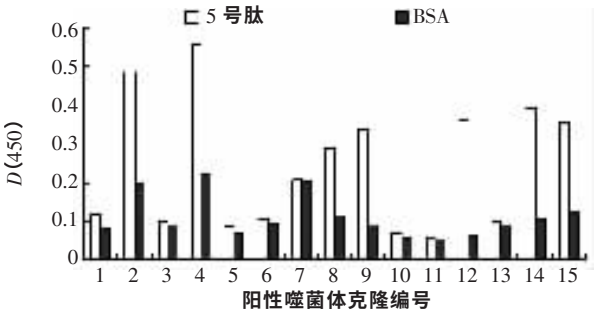


图1 噬菌体克隆与⑤号肽的ELISA鉴定结果

2.3 噬菌体克隆DNA序列测定

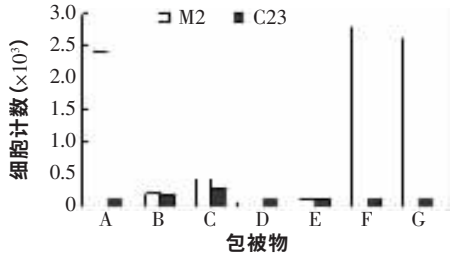
对筛选后鉴定出的阳性克隆,进行DNA序列测定后,推导其相应的7肽氨基酸插入序列。结果显示⑤号多肽筛选后鉴定出的阳性克隆中,5个克隆的外源多肽均含有组氨酸-精氨酸-组氨酸(HRH)序列,另2个克隆的外源多肽中均含有组氨酸-色氨酸-精氨酸(HWR)序列。见表2。

表2 ⑤号多肽阳性噬菌体克隆测序结果

克隆编号	随机7肽序列	克隆编号	随机7肽序列
2	HWRHLAH	9	FPWKHRH
12	HWRLHPH	14	HIKPHRH
4	HLPWHRH	15	MPHIHRH
8	PRHHHRH		

2.4 粘附实验

单一的化学合成多肽与表达整合素αvβ3分子的M2黑色素瘤细胞株具一定的结合活性,与不表达整合素αvβ3分子的C23黑色素瘤细胞株不具结合活性;单一的纤维粘接蛋白与M2细胞具显著结合活性,而与C23细胞不具或具微弱结合活性;预混的化学合成多肽及纤维粘接蛋白与M2细胞的结合明显受到抑制,与C23细胞不具或具微弱结合活性。随机无关序列为从不含以上两个多肽基序的阳性克隆中随机抽取并合成的7肽序列,其与M2细胞及C23细胞均无结合活性。以上进一步说明,依据⑤号多肽筛选结果获得的阳性克隆序列合成的2条化学多肽FITC-HLPWHRH,FITC-HWRLHPH能够模拟αvβ3受体的结合表位与整合素αvβ3分子结合。见图2。



A:纤维连接蛋白;B:纤维连接蛋白和FITC-1;C:纤维连接蛋白和FITC-2;D:空白;E:随机无关序列;F:FITC-1;G:FITC-2

图2 化学合成多肽的细胞粘附实验

3 讨论

整合素αVβ3在肿瘤等病理性血管生成的过程中发挥了重要的作用,由于其在肿瘤、外伤、炎症等组织改建时表达明显增加,而在静息状态的血管中表达极少的这一特点,使其成为抗肿瘤血管生成治疗及肿瘤早期诊断的新靶点。因此对以整合素αVβ3为靶点,抑制肿瘤血管生成为目的的抗肿瘤药物的研究方兴未艾[5]。其中含RGD基序的小分子肽及相关拟肽化合物是目前在研究中的主要的整合素αVβ3分子拮抗剂,研究表明它们均能与αvβ3受体结合并具一定的抑制肿瘤血管生成的活性,但目前仍缺乏兼具高选择性及特异性的研究成果。因此提高αvβ3受体拮抗剂的选择性和特异性,成为αvβ3受体拮抗剂的主要研究方向。

本实验基于上述研究基础,以及对αvβ3分子的晶体结构及蛋白质序列的研究结果,依据决定αvβ3分子的配体结合能力的5个结构域的氨基酸序列,合成①~⑤号短肽作为筛选配基,对噬菌体随机7肽库分别进行了3轮筛选,经过ELISA鉴定,①~④号多肽筛选后并未获得与表达αvβ3的黑色素瘤细胞株M2具结合活性的阳性克隆。而⑤号多肽筛选后获得的7个阳性克隆,DNA序列测定后显示含组氨酸-精氨酸-组氨酸(HRH)和组氨酸-色氨酸-精氨酸(HWR)的两个一致基序。这7个阳性克隆及合成的相关化学多肽FITC-HLPWHRH,FITC-HWRLHPH均能与表达αvβ3分子的M2细胞结合,⑤号多肽是根据αvβ3分子中β3亚基的212~221位的氨基酸设计合成,可以推测筛选所得的小分子肽与αvβ3分子的结合位点可能位于β3亚基胞外区的212~221位氨基酸区域。

总之,通过噬菌体随机肽库展示技术获得了2个小分子肽,能与整合素αvβ3的结构域特异性结合,干扰αvβ3与其配体的结合活性,并且与整合素家族其他成员未发现明显的结合活性,进一步提高了对αvβ3分子结合的特异性和选择性,对基于整合素αvβ3的血管生成抑制的多肽药物前体设计提供了一定的实验依据和结构基础。我们将对化学合成多肽在体内的分布、生物学活性及其在体内示踪及抑制肿瘤血管生成方面的作用作进一步的研究。

参考文献:

[1] van-Hinsbergh V W, Collen A, Koolwijk P. Angiogenesis and anti-angiogenesis: Perspectives for the treatment of solid tumors[J]. Ann Oncol, 1999, 10(Suppl 4): 60-63.

[2] Quinn M J, Byzova T V, Qin J, *et al*. Integrin alphaIIbbeta3 and its antagonism[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003, 23(6): 945-952.

[3] Xiong J P, Stehle T, Diefenbach B, *et al*. Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3[J]. Science, 2001, 294(5541): 339-345.

[4] Xiong J P, Stehle T, Zhang R, *et al*. Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3 in complex with an Arg-Gly-Asp ligand[J]. Science, 2002, 296(5565): 151-155.

[5] Kim K, Hur Y, Ryu E K, *et al*. A neutralizable epitope is induced on HGF upon its interaction with its receptor cMet[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 354(1): 115-121.

(编辑 龙 亮)