

## RGD 多肽与尿激酶原嵌合分子的构建及性质研究

焦建伟 茹 强 俞梅敏 茹炳根\*

(北京大学生命科学学院,蛋白质工程国家重点实验室,北京 100871)

**摘 要** 利用定点突变及 DNA 重组技术,将编码 RGD 多肽(GPRGDWRMLG)的双链 DNA 片段,定向插入到相对于编码尿激酶原的 Gly118-Leu119 的 cDNA 分子中,构建了尿激酶原的嵌合体基因,并在甲醇酵母表达系统中进行了分泌表达。经过 Zn<sup>2+</sup> 螯合柱及 SP 阳离子柱两步层析后,目的蛋白质被纯化。经纤维蛋白平板测活,嵌合分子的比活为 65 000 IU/mg。嵌合分子与尿激酶相比,对显色底物 S2444 作用的催化效率偏低,但具有较强的抑制血小板聚集的功能,抑制常数 IC<sub>50</sub> 为 2.1 μmol/L。以上结果表明嵌合分子不但具有较强的溶栓功能,而且具有抗栓功能,很可能是一种具有发展前景的双功能溶栓-抗栓分子。

**关键词** 尿激酶原, RGD, 溶栓, 抗血小板聚集

**中图分类号** Q71 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2001)05-0531-03

在血栓疾病的药物治疗中,纤溶酶原激活剂(UK,tPA 等)是目前应用较为广泛的溶栓药物<sup>[1]</sup>,但此类药物都具有不同程度的缺陷即血栓再堵塞和颅内出血等。因此,构建新的安全有效的溶栓剂正成为当前的一个研究热点<sup>[2]</sup>。

GP II b/III a 是活化的血小板膜上的糖蛋白,是介导血小板引起的血栓形成中的核心分子,它主要与含 Arg-Gly-Asp(RGD)序列的功能分子如纤维蛋白原、纤维粘连蛋白等发生作用<sup>[3]</sup>。为此我们设想如果将含 RGD 的分子引入尿激酶原中,特有的 RGD 分子将会竞争性地与血小板上的膜蛋白 GP II b/III a 分子结合,从而起到抗血小板聚集引起的血栓形成。在本实验室已有的工作基础上<sup>[4]</sup>,分析尿激酶原特有的空间结构,选择了尿激酶原 K 区的 β 发夹结构的 Gly118-Leu119 作为插入位点。与血小板上 GP II b/III a 分子结合的配体分子通常含有 RGD 三肽,但 RGD 两边的氨基酸组成对它们的结合有很重要的影响<sup>[5]</sup>。在分析与 GP II b/III a 结合的配体分子的氨基酸组成,尤其是 RGD 两边氨基酸组成的普遍规律下,选择了 CPRGDWRMLC 十肽作为效应分子。我们设想将含 RGD 的多肽—GPRGDWRMLG 在一定的构象限制下导入溶栓剂,获得既有溶栓活性又有抗血小板聚集的双功能溶栓剂。

我们以尿激酶原的 G118-L119 为插入位点,构建了含 RGD 多肽的嵌合分子,并在甲醇酵母表达系

统中进行表达,结果表明嵌合分子同时具有溶栓和抗栓活性,基本达到了预期目标。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

尿激酶原的基因构建在 pBS-proUK 中。穿梭质粒 pPIC9K,甲醇酵母 *Pichia pastoris* GS115 均为本实验室提供。尿激酶原纯品由本实验室纯化。

纤溶酶、纤维蛋白原、凝血酶原、S2444(pyro-Glu-Gly-Arg-p-nitroalide)购自 Sigma 公司;尿激酶标准品购自中国药品生物制品检定所;各种限制酶购自 Bio-labs 公司;其余试剂均为国产分析纯。

#### 1.2 方法

**1.2.1 嵌合分子的构建:**为便于构建嵌合分子,我们在尿激酶原 K 区 G118-L119 相对应的 cDNA 核苷酸序列处产生一个单一的酶切位点 *Stu* I。将合成的寡核苷酸引物 5'-CGGCCACGCGGCGACTGGCCATGCGGTG-3' 和 5'-CACCGCATGCGCCAGTCCGGCGTGGGCCG-3' 经过退火后形成平末端双链 DNA 分子(编码 GPRGDWRMLG 十肽),与经过 *Stu* I 单酶切的 pBS-proUK 进行平端连接,经过酶切验证及核苷酸序列测定。将验证正确的突变分子插入到表达载体 pPIC9K 进行表达,过程如下:用与突变分子两端配对的引物做 PCR 扩增,经过 *Xho* I / *Not* I 双酶切,与同样经 *Xho* I / *Not* I 双酶切的表达质粒 pPIC9K

收稿日期:2001-02-19,修回日期:2001-05-28。

\* 联系作者。Tel:86-10-62751842; Fax:86-10-62751842; E-mail: rulab@pku.edu.cn

连接,然后筛选重组表达载体。

**1.2.2 蛋白质的表达与纯化:** pPIC9K 是一种分泌表达型质粒,在甲醇酵母表达体系中,嵌合分子是以活性形式存在于培养液上清中。将重组表达载体经过电转化甲醇酵母,最后筛选出一高效表达菌株。挑取单菌落,接入 3mL MGY,28℃ 震荡培养 48h。再将此菌液接入 100mL 培养基中,28℃ 培养 48h 后,加入甲醇至总体积的 2%,诱导表达 48h。菌液于 1500g 离心 10min,收集上清。表达产物经过离心后获得尿激酶原嵌合分子的粗品,并通过  $Zn^{2+}$  螯合柱及 SP 阳离子柱两步纯化,得到纯品。

**1.2.3 免疫印迹分析:** 以尿激酶的单克隆抗体为一抗,羊抗鼠的 IgG 为二抗进行免疫印迹分析。

**1.2.4 血纤维蛋白平板测活:** 以尿激酶标准品为计算活性的参照,参考文献[6]。

**1.2.5 水解显色底物 S2444 的动力学性质分析<sup>[7]</sup>:** 分别测定嵌合分子及尿激酶对显色底物 S2444 作用的动力学性质。

**1.2.6 血小板聚集抑制试验:** 血小板聚集抑制实验参考文献[8]。血小板聚集抑制率 = (对照的最大聚集率 - 样品的最大聚集率) / 对照的最大聚集率。

## 2 结 果

### 2.1 尿激酶原嵌合体基因的构建

我们首先利用定点突变的方法在尿激酶原 cDNA 的 K 区引入了一个 *Stu* I 单酶切位点,以便于插入编码 RGD 多肽的寡核苷酸片段。之后我们将编码 GPRGDWRMLG 的寡核苷酸片段插入到 *Stu* I 位点之间,产生 RGD 多肽-尿激酶原嵌合体分子,经过限制性酶切验证以及序列测定正确。

### 2.2 蛋白质的表达与纯化

甲醇酵母表达体系是一种高效、分泌型的外源蛋白表达系统,表达的蛋白是以活性形式存在的。经纤维蛋白平板法测活测定,酵母分泌表达的蛋白水平为 1 000 IU/mL。表达产物经过离心后,收集上清,经过  $Zn^{2+}$  螯合层析及 SP 强阳离子两步层析后,融合蛋白得到纯化。SDS-PAGE 结果(Fig. 1)显示在

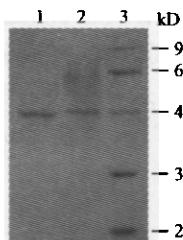


图 1 纯化蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig.1 SDS-PAGE analysis of the purified protein

1. proUK; 2. Chimeric proUK; 3. Protein marker

分子量为 43kD 的位置有一条主要的蛋白电泳条带,目的蛋白质的纯度在 80% 以上。经过测定,嵌合分子的比活为 65 000 IU/mg,与尿激酶原的比活 100 000 IU/mg 相比略有下降。

### 2.3 免疫印迹分析

为了验证嵌合分子的抗原性,进行了免疫印迹分析,从 Fig. 2 可以看出嵌合分子与尿激酶原都显示出明显的蛋白质杂交带,表明嵌合分子保留了尿激酶原的抗原性。

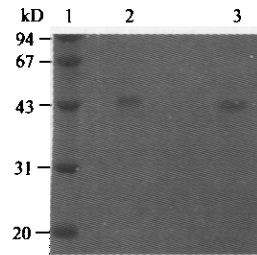


图 2 纯化蛋白的免疫印迹分析

Fig.2 Western blot analysis of the purified protein

1. Protein marker; 2. proUK; 3. Chimeric proUK

### 2.4 动力学常数的测定

尿激酶和嵌合分子分别对显色底物 S2444 进行了动力学性质分析。结果(Table 1)显示,嵌合分子与尿激酶相比,对显色底物 S2444 的亲及催化速度均有不同程度的下降,可能由于 RGD 类肽插入后改变了嵌合分子的构象,导致催化效率( $k_{cat}/K_m$ )有一定下降。

表 1 嵌合分子与尿激酶对显色底物 S2444 的动力学分析

Table 1 Kinetic analysis on the substrate S2444 by

chimeric UK or UK

	$K_m/(\mu\text{mol/L})$	$k_{cat}/(\text{s}^{-1})$	$k_{cat}/K_m(\mu\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{L})$
Chimeric UK	69.2	3.5	0.05
UK	60.4	6.9	0.11

### 2.5 抑制血小板聚集实验

从 Fig. 3 可以看出尿激酶原几乎没有抑制血小板聚集的活性,而嵌合分子具有明显的抑制 ADP 诱导的血小板聚集的生物活性,抑制血小板聚集的  $IC_{50}$  为  $2.1 \mu\text{mol/L}$ 。

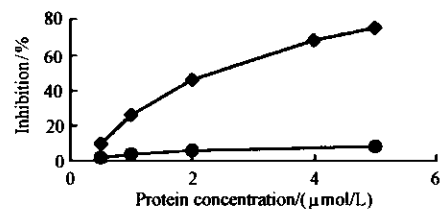


图 3 ADP 诱导的血小板聚集的抑制实验

Fig.3 Inhibition of ADP-induced platelet aggregation

Chimeric proUK (◆); proUK (●)

### 3 讨 论

临床经验证明,循环系统中血小板的活化是血栓形成及溶栓后再栓塞形成的直接原因。血小板活化的最终途径包括其膜糖蛋白 GP II b/III a 的构象变化,纤维蛋白原与相邻血小板上 Gp II b/III a 受体的结合。含 RGD 的多肽通过与 GP II b/III a 结合后,从而抑制纤维蛋白原与血小板结合后导致的血栓形成。鉴于 RGD 序列肽在抑制血小板聚集上的作用,我们考虑在尿激酶原分子上插入含 RGD 的多肽。

只有有活性的 RGD 多肽才能抑制血小板的聚集。通过分析多肽,所有功能性的 RGD 肽都位于暴露的、伸展的分子表面。由于 RGD 序列周围的空间结构制约着其活性功能的发挥对其活性影响很大,在对尿激酶原空间结构分析的基础上,我们选择了尿激酶原 K 区 C 端的  $\beta$  发夹区(G118-L119)作为插入 RGD 类肽的位点。主要是由于 K 区的二级结构以  $\beta$ -折叠为主,其结构紧密,是一个较好的分子骨架<sup>[9]</sup>。Kringle 区的 G118-L119 位点暴露于蛋白分子表面的  $\beta$  回折中,两边为  $\beta$  折叠,这样的结构骨架有利于形成有活性的 RGD 构象。RGD 多肽在其他活性蛋白中多出现在  $\beta$ -折叠的 loop 的顶端,因此将 RGD 多肽插入到这一 loop 区中,由于其环境的相似性,更易形成活性构象。计算机模拟预测的结果表明,我们所设计的嵌合体中的 RGD 多肽可以形成有活性的构象。

将构建的嵌合分子的基因在甲醇酵母的表达系统中进行表达,并经过金属螯合层析及离子交换层析后得到嵌合蛋白质。在激活纤溶酶原的实验中,

嵌合分子的催化效率有所下降,可能是在 kringle 区插入含 RGD 多肽 GPRGDWRMLG 后,影响了尿激酶原的活性中心,但在纤维蛋白平板测活中该嵌合分子仍具有较强的溶栓活性。在血小板聚集的抑制实验中,嵌合分子明显是由于插入的 RGD 多肽发挥了作用,具有较强的抑制血栓形成的功能。总之,我们构建的含 RGD 多肽的尿激酶原基本达到了预期目标,具有较强的溶栓功能,并且拥有较强的抗血小板聚集的功能,进一步的体内动物实验正在进行中。

### REFERENCES(参考文献)

- [ 1 ] Sherry S, Marder V J. Thrombosis, fibrinolysis, and thrombolytic therapy: a perspective. *Prog Cardiovasc Dis*, 1991, 34: 89 ~ 100
- [ 2 ] Collen D. Thrombolytic therapy. *Throm Haemost*, 1997, 78: 742 ~ 746
- [ 3 ] Hu D D, White C A, Panzer-Knodle S *et al.* A new model of dual interaction ligand binding sites on integrin  $\alpha$  II b/ $\beta$ 3. *J Biol Chem*, 1999, 274: 4633 ~ 4639
- [ 4 ] QIAN B(钱斌), SUN Y Q(孙迎庆), GUO Y(郭雁) *et al.* A Prourokinase-RGDS chimera-Construction, expression and characterization. *Sci China Ser C(中国科学 C 辑)*, 1999, 42: 125 ~ 131
- [ 5 ] Cheng S, Craig W S, Mullen D *et al.* Design and synthesis of novel cyclic RGD-containing peptides as highly potent and selective integrin antagonists. *J Med Chem*, 1994, 37: 1 ~ 8
- [ 6 ] Astrup T, Müllertz S. The fibrin plate method for estimating the fibrinolytic activity. *Arch Biochem Biophys*, 1952, 40: 346 ~ 351
- [ 7 ] Liu J N, Gurewich V. The kinetics of plasminogen activation by thrombin-cleaved prourokinase and promotion of its activity by fibrin fragment E-2 and by tissue plasminogen activator. *Blood*, 1993, 81: 980 ~ 987
- [ 8 ] Jia L G, Wang X M, Shannon J D *et al.* Function of disintegrin-like/cysteine-rich domain of atropysin A. *J Biol Chem*, 1997, 272: 13094 ~ 13102
- [ 9 ] Li X, Smith L A G, Dason C. Sequential 1H NMR assignment and secondary structure of the kringle domain from urokinase. *Biochemistry*, 1992, 32: 9562 ~ 9571

## Construction and Characterization of the Chimeric Protein Consisting RGD-containing Peptide and ProUK

JIAO Jian-Wei RU Qiang YU Mei-Min RU Bing-Gen\*

(National Laboratory of Protein Engineering, College of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, China)

**Abstract** On the basis of structure analysis and computer modeling of proUK, two-chain DNA fragment encoding RGD peptide was inserted into the corresponding proUK cDNA site between Gly118-Leu119, using site-directed mutagenesis and DNA recombinant techniques. The chimeric gene was expressed in methylotrophic yeast *Pichia pastoris* expression system. The chimeric protein was purified after two step purification of  $Zn^{2+}$  chelating column and SP cation exchange column. The specific activity was 65,000 IU/mg protein. The chimeric protein had somewhat lower catalytic efficiency (*kcat*/Km) on the substrate S2444 as compared to Urokinase. But it had high anti-platelet aggregation activity, and the half inhibit constant was 2.1  $\mu$ mol/L. The results showed that the chimeric protein not only had higher thrombolytic activity but also obtained anti-thrombus function. Further evaluation of the thrombolytic and antithrombolytic potential in appropriate animal models seemed to be investigated.

**Key words** ProUK; RGD; thrombolysis; anti-platelet aggregation

Received: February 19, 2001

\* Corresponding author. Tel: 86-10-62751842; Fax: 86-10-62751842; E-mail: rulab@pku.edu.cn