

论著·基础研究

APC/Asef 多肽抑制剂结构的优化及生物学活性研究

钱金星, 张 健

上海交通大学基础医学院细胞分化与凋亡教育部重点实验室, 上海 200025

[摘要] **目的**·设计并合成结肠腺瘤息肉易感基因 (adenomatous polyposis coli, APC) / 鸟苷酸交换因子 (APC-stimulated guanine nucleotide exchange factor, Asef) 多肽抑制剂, 探讨该抑制剂不同构效之间的关系。**方法**·基于 APC-MAI-150 复合物结构, 一方面在 MAI-150 多肽 N 端用 3-苯基丙酰 (3-phenylpropane)、Glu-Glu (GG) 和 β -Ala-Ala (β -AA) 取代连氨基基团苄氧羰基 (carbobenzoxy, CBZ), 另一方面尝试将 MAI-150 中 N 端第 6 位 Tyr 侧链苯环上的对位羟基替换为 -CN、-NO₂、-NH₂ 和 -F, 设计合成新的 7 条多肽。荧光偏振活性检测多肽亲和力, 并根据活性结果将多肽 MDL-3、MDL-4 和 MDL-5 对接到 APC 蛋白中, 联合计算机对接的多肽和 APC 蛋白的结合模式, 探讨该 3 条多肽的构效关系。**结果**·新合成的 7 条多肽中, 多肽 MDL-5 的 N 端 3-phenylpropane 连氨基亲和力最高, 其半数有效抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration, IC₅₀) 为 2.35 μ mol/L; 与 MDL-5 相比, 多肽 N 端用 GG (MDL-6) 和 β -AA (MDL-7) 连接氨基亲和力明显降低; MDL-3 和 MDL-4 的 N 端第 6 位 Tyr 侧链苯环上的对位羟基替换为 -NH₂ 和 -F 亲和力相比较于替换为 -CN (MDL-1) 和 -NO₂ (MDL-2) 要明显提高, 但新合成的多肽亲和力均低于 MAI-150。**结论**·改造多肽 N 端连氨基基团和第 6 位 Tyr 侧链苯环上的对位羟基无助于提高多肽的亲和力。

[关键词] 结肠腺瘤息肉易感基因 / 鸟苷酸交换因子; 多肽抑制剂; 构效关系

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2018.10.001 **[中图分类号]** R914 **[文献标志码]** A

Structure optimum and biological activity studies of APC/Asef peptide inhibitors

QIAN Jin-xing, ZHANG Jian

Key Laboratory of Cell Differentiation and Apoptosis of National Ministry of Education, Shanghai Jiao Tong University College of Basic Medical Sciences, Shanghai 200025, China

[Abstract] **Objective**·To design and synthesize APC/Asef peptide inhibitors, and investigate the relationship between the structures and affinity of peptides. **Methods**·Based on crystal structure of the APC-MAI-150 complex, on the one hand, 3-phenylpropane, Glu-Glu (GG) and β -Ala-Ala (β -AA) were used to replace carbobenzoxy (CBZ) at the N terminal of MAI-150 to bind -NH₂; on the other hand, -CN, -NO₂, -NH₂, and -F were replaced the para-hydroxyl on the sixth tyrosine (Tyr) side chain benzene at the N terminal of MAI-150. And seven peptides were synthesized. Fluorescence polarization was applied to test peptide affinity, and molecular design laboratory-3 (MDL-3), MDL-4 and MDL-5 were docked into APC protein based on the results of activity. The structure-activity relationship of the three peptides was studied by combining the binding patterns of computer docked peptide and APC protein. **Results**·Among the seven peptides, the N terminal 3-phenylpropane linked -NH₂ of peptide MDL-5 had the highest affinity, which IC₅₀ was 2.35 μ mol/L. Compared with MDL-5, the affinity of MDL-6 and MDL-7 were significantly reduced. The para-hydroxyl on the sixth Tyr side chain benzene at the N terminal replaced with -NH₂ (MDL-3) and -F (MDL-4), which the affinity were higher than -CN (MDL-1) and -NO₂ (MDL-2). However, the affinity of newly synthesized peptides was lower than MAI-150. **Conclusion**·Transforming peptide N terminal linked -NH₂ and the para-hydroxyl group on the sixth Tyr side chain benzene doesn't help to improve the affinity of peptides.

[Key words] APC/Asef; peptide inhibitor; structure-activity relationship

结肠癌是引起患者死亡最为常见的一种癌症, 是目前全球第三大高致死率恶性肿瘤^[1]。结肠癌主要是由于结肠黏膜上皮细胞在多种复杂的体外环境或家族遗传等致癌因素的诱导下发生恶性病变, 从正常的结肠上皮细胞转变为腺瘤息肉, 最终转变为具有侵袭性的恶性肿瘤。相关研究^[2]表明, 结肠腺瘤息肉易感基因 (adenomatous polyposis coli, APC) 是结肠癌早期出现的、与结肠癌发生发展密切相关的重要基因, APC 发生突变后会产生截短型的 APC 蛋白,

该蛋白会持续激活下游鸟苷酸交换因子 (APC-stimulated guanine nucleotide exchange factor, Asef) 蛋白的活性, 从而激活 Rac1 和 CDC42 蛋白活性, 使细胞迁移能力增强。APC 蛋白相对分子质量是 312 000, 含有 2 843 个氨基酸, 包含多个功能结构域, 分为 3 个主要的功能区段: N 端区域、中间区域和 C 端区域^[3-4]。Asef 蛋白的结构域主要分为 4 个部分, 即 APC 结合区域 (APC binding region, ABR)、Src-homology-3 (SH3) 结构域、Dbl-homology (DH) 结构

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划项目 (973 计划) (2015CB910403) [National Program on Key Basic Research Project of China (973 Program), 2015CB910403]。

[作者简介] 钱金星 (1992—), 男, 硕士生; 电子信箱: 18217142620@163.com。

[通信作者] 张 健, 电子信箱: jian.zhang@sjtu.edu.cn。

域和 pleckstrin homology (PH) 结构域^[5]; Asef 可通过 ABR 结合在 APC-PreARM-ARM 结构域的表面口袋中。APC 与 Asef 结合后可在 Asef 的 DH 结构域产生空间位阻, 使 Asef 的构象发生改变, 即 DH 结构域被打开, 使 Asef 的鸟苷酸交换活性被激活, 最终能够与 CDC42 及 Rac1 相结合, 并激活两者的 GTP 酶活性, 使 GTP 转化为 GDP, 继而在细胞的迁移和侵袭过程中发挥重要作用^[6]。

研发具有靶向抗结肠癌的药物一直是近年来的热点和难点。目前, 针对结肠癌的药物主要以静脉输注氟尿嘧啶类药物为主, 但该类药毒性大、不良反应严重, 临床上迫切需要靶向性高且不良反应低的抗结肠癌药物。因此, 针对 APC 和 Asef 之间的相互作用设计蛋白-蛋白相互作用抑制剂, 通过抑制 APC 和 Asef 的相互结合, 进而抑制结肠癌细胞的异常迁移, 将可能成为抑制结肠癌细胞恶性转移的一种有效方法。本研究在多肽 APC-MAI-150 的基础上, 尝试在 N 端用 3-苯基丙酰 (3-phenylpropane)、Glu-Glu (GG) 和 β -Ala-Ala (β -AA) 取代连氨基基团苄氧羰基 (carbobenzoxoy, CBZ), 以及用 -CN、-NO₂、-NH₂ 和 -F 替换第 6 位 Tyr 侧链苯环上的对位羟基, 探究改造后的多肽与 APC 的亲合力是否得到提升, 为后续的多肽改造奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 软件及数据库 蛋白质分子三维结构显示软件 PyMOL 1.7 (美国 Schrödinger 公司), 对接软件 Maestro Elements 3.0 (美国 Schrödinger 公司), 多肽结构式软件 ChemBioDraw Ultra 15.0 (美国 CambridgeSoft 公司), 多肽半数有效抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration, IC₅₀) 值拟合软件 GraphPad Prism 7.00 (美国 GraphPad Software 公司), APC-MAI-150 复合物晶体结构来自 PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>, Protein Data Bank, PDB ID: 5IZ6)。

1.1.2 主要试剂和仪器 APC 蛋白表达质粒 APC (303-739) (含卡那霉素抗性基因, 上海交通大学吴更课题组惠赠), 感受态菌 BL21 (DE3) (中国天根生化科技有限公司), 蛋白酶抑制剂 Cocktail (中国天根生化科技有限公司), APC 蛋白纯化填料 Ni²⁺-NTA (美国 GE Healthcare 公司); 所有多肽购买于武汉昊德生物科技有限公司。APC 蛋白浓缩超滤离心管 (美国 MILLIPORE 公司), 96 孔板 (美国 Corning 公司), 多功能酶标仪 Synergy H4 Hybrid Reader (美国 BioTek 公司), 水平摇床 MAXQ 6000 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司), 水平电泳仪 EPS 600

(美国 Tanon 公司)。

1.2 方法

1.2.1 APC/Asef 多肽抑制剂的合成 多肽抑制剂 MDL-1 ~ MDL-7 均按照图 1 的路线合成, 相应步骤如下。

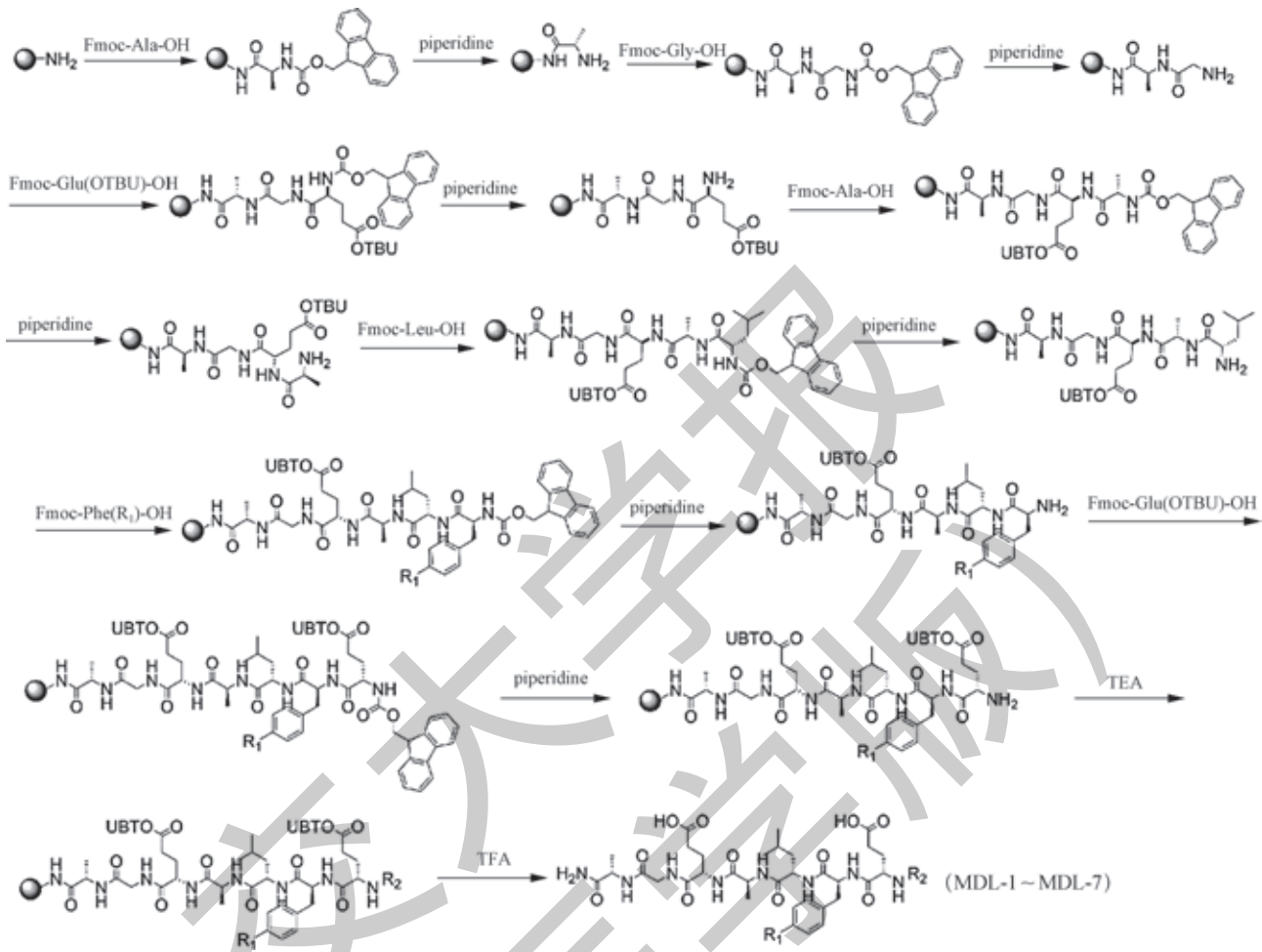
(1) 活化树脂 (脱掉树脂上 Fmoc 基团) 取 1 g 丁苯酰胺树脂 (树脂上带有 Fmoc 基团) 放入接肽瓶中, 加入适量二氯甲烷使树脂膨胀, 后抽滤二氯甲烷。加入 6 mL 20% 哌啶 / N, N-二甲基甲酰胺溶液振荡 5 min, 抽滤二氯甲烷。再加入 6 mL 20% 哌啶 / N, N-二甲基甲酰胺溶液振荡 15 min, 抽滤二氯甲烷。用甲醇清洗 3 次, 二氯甲烷清洗 3 次, 最后再次抽滤二氯甲烷。随后取 10 ~ 20 颗树脂作茚三酮检测, 检测结果显蓝色则呈阳性; 若检测结果呈阴性, 则重复以上活化树脂步骤。

(2) 多肽抑制剂的缩合 称取 N-苄氧羰基-L-丙氨酸 (Fmoc-Ala-OH) 0.43 g、1-羟基苯并三唑 (HOBt) 0.14 g 加入上述接肽瓶中, 再加入 6 mL N, N-二甲基甲酰胺、0.31 mL 2, 4, 6-三甲基吡啶、0.15 mL N, N-二异丙基碳二亚胺, 密封后放入振荡器中反应 1 h, 温度控制在 35 ℃。反应结束后, 用 N, N-二甲基甲酰胺清洗树脂 3 次, 甲醇清洗 3 次, 二氯甲烷清洗 3 次, 依次全部洗完后抽滤二氯甲烷。取 10 ~ 20 颗树脂作茚三酮检测, 检测结果显蓝色则呈阳性, 重复缩合反应步骤直至检测结果显示为阴性。检测通过后加入 6 mL 20% 哌啶 / N, N-二甲基甲酰胺溶液振荡 5 min, 抽滤干溶液后再加入 6 mL 20% 哌啶 / N, N-二甲基甲酰胺溶液振荡 15 min, 再次抽滤干溶液。用 N, N-二甲基甲酰胺清洗 3 次, 甲醇清洗 3 次, 二氯甲烷清洗 3 次, 依次全部洗完后抽干滤液。取 10 ~ 20 颗树脂作茚三酮检测, 检测结果显蓝色则呈阳性; 若检测结果呈阴性, 则重复以上活化树脂步骤。按照上述方法逐一缩合如下多肽: N-苄氧羰基-L-甘氨酸 (Fmoc-Gly-OH)、N-(9-苄氧羰基)-L-谷氨酸 γ -叔丁酯 [Fmoc-Glu (OTBU)-OH]、N-苄氧羰基-L-丙氨酸 (Fmoc-Ala-OH)、N-苄氧羰基-L-亮氨酸 (Fmoc-Leu-OH)、N-(9-苄氧羰基)-L-苯丙氨酸-R₁[Fmoc-Phe (R₁)-OH]、Fmoc-Glu (OTBU)-OH。待合成完毕后, 分别用相应的 R₂ 取代基连接 N 端的氨基, 再分别用 N, N-二甲基甲酰胺和二氯甲烷先后清洗连有多肽链的树脂, 并将树脂置于真空干燥箱内干燥备用。

(3) 多肽抑制剂的切割 将 1.5 g 树脂干燥后, 用刮刀将树脂打散后置于 25 mL 茄形瓶中, 在冰水浴条件下缓慢滴加 15 mL 用于脱除树脂的切割液 (三氟醋酸: 1, 2-乙二硫醇: 水: 对甲酚 = 92.5: 2.5: 2.5: 2.5), 室温振荡 60 min。而后将反应液连同树脂一并转移至过滤器中, 用

水泵抽滤, 将得到的滤液置于圆底烧瓶中, 并在氮气流下吹干。待样品吹至黏稠, 撤下氮气管。然后向圆底烧瓶内倒入 20 mL 的 4 °C 冰乙醚, 混合后充分打散, 于冷冻离

心机 4 °C 下 7 000 × g 离心 15 min, 弃上清液。将沉淀于 20 mL 的 4 °C 冰乙醚中打散, 再次离心, 重复操作 3 次。最后将沉淀真空干燥, 得肽粗品 0.2 g。



注: 多肽 MDL-1 中, R₁=CN、R₂=CBZ; 多肽 MDL-2 中, R₁=NO₂、R₂=CBZ; 多肽 MDL-3 中, R₁=NH₂、R₂=CBZ; 多肽 MDL-4 中, R₁=F、R₂=CBZ; 多肽 MDL-5 中, R₁=OH、R₂=3-phenylpropane; 多肽 MDL-6 中, R₁=OH、R₂=GG; 多肽 MDL-7 中, R₁=OH、R₂=β-AA。Piperidine 为哌啶, TEA (triethylamine) 为三乙胺, TFA (trifluoroacetic acid) 为三氟乙酸。

图 1 多肽抑制剂合成路线

Fig 1 Synthetic route of peptide inhibitors

1.2.2 APC/Asef 多肽抑制剂的纯化及鉴定 采用高效液相色谱法 (high performance liquid chromatography, HPLC) 和质谱法 (mass spectrometry, MS) 对多肽进行纯化鉴定。采用 C18 半制备柱, 流动相: A 相为水相, 是含 0.1% (质量浓度) 三氟乙酸的去离子水; B 相为有机相, 是含 0.1% (质量浓度) 三氟乙酸的 80% 乙腈水溶液; 流速为 6 mL/min; 洗脱梯度为 A 相以每分钟 1% 的变化从 55% 降到 10%, B 相以每分钟 1% 的变化从 45% 升到 90%。根据高效液相色谱图采集 24 ~ 26 min 的洗脱液, 降压浓缩除去洗脱液中的乙腈, 并将剩余的抗肿瘤肽水溶液放入冰箱冷冻成冰块。最后用冷冻干燥机除去水分, 得到蓬松固体粉末。多肽的产量均为 5 mg, 经 HPLC 验证多肽的纯度均大于

98%, 经 MS 验证多肽的结构均正确, 7 条多肽相应的鉴定结果如表 1 所示。

表 1 7 条 APC/Asef 多肽抑制剂鉴定结果
Tab 1 Identification results of seven APC/Asef peptide inhibitors

多肽抑制剂	产量 / mg	HPLC	MS/ (m/z) [M+H] ⁺
MDL-1	5	>98%	893.91
MDL-2	5	>98%	913.91
MDL-3	5	>98%	883.90
MDL-4	5	>98%	886.91
MDL-5	5	>98%	882.93
MDL-6	5	>98%	864.92
MDL-7	5	>98%	892.97

注: [M+H]⁺ 为正离子模式下的一级质谱峰。

1.2.3 荧光偏振筛选体系及多肽抑制剂

(1) APC 蛋白表达与纯化 ①规模培养: 挑取平板单克隆菌落, 加至 10 mL LB 含卡那霉素的液体培养基中, 37 ℃ 摇床 176×g 培养 8 h; 将上述 10 mL 培养液加至 1 L 含卡那霉素的 LB 液体培养基中, 37 ℃ 摇床 200×g 培养 2.5 h; 然后加入诱导剂 IPTG 至 0.2 mmol/L, 诱导温度为 16 ℃, 摇床上 159×g, 诱导 16 h。②收菌及超声裂解: 诱导结束后, 4 ℃ 下 3 700×g 离心 25 min 收菌, 菌体收集于 50 mL 离心管中。称取菌体重量, 向每克菌中加入 7 mL 裂解缓冲液, 充分悬浮菌体, 按照 1:100 加入蛋白酶抑制剂 Cocktail。冰水中混匀 10 min 后, 进行超声裂菌, 裂菌功率 120 W、超声时间 4 s、间隔时间 6 s、工作次数 99 次, 重复 3 次。③收集上清液并纯化蛋白: 将裂解好的菌液高速离心, 4 ℃ 下 20 000×g 离心 50 min, 后将上清液倒入镍柱中, 收集流出液进行除杂洗脱, 即用平衡缓冲液冲洗 100 mL 后, 分别用 20、50、80、100、200 和 500 mmol/L 浓度梯度的咪唑洗脱, 收集洗脱后的溶液样品, 进行 SDS-PAGE 电泳, 观察 APC 蛋白的纯度并将获得纯度高的洗脱液中的蛋白进行合并浓缩。④置换 APC 蛋白保存液: 将洗脱下来的 APC 蛋白进行浓缩, 3 700×g、4 ℃ 离心 20 min, 经多次离心、全部浓缩完成后加入 APC 蛋白保存缓冲液, 置换完毕后测定 APC 蛋白浓度, 最后保存于 -80 ℃ 冰箱备用。

(2) 荧光偏振活性检测 荧光偏振筛选体系中荧光肽反应终浓度为 20 nmol/L, APC 蛋白反应终浓度为 1.10 μmol/L, 二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 含量为 4 μL。检测步骤如下: ① APC 蛋白用等温滴定量热实验 (isothermal titration calorimetry, ITC) 反应缓冲液稀释至反应终浓度 1.10 μmol/L, 多肽用 DMSO 分别稀释至 50.00、25.00、12.50、6.25、3.12、1.56、0.78、0.39、0.19、0.09、0.04 和 0.02 μmol/L 共 12 个浓度梯度。② APC 蛋白 91 μL, 多肽 4 μL, 阴性、阳性对照分别用 4 μL DMSO 补齐, 加完样后置于室温下避光孵育 1 h。③孵育完后, 避光加入 5 μL 底物荧光肽, 再置于室温下避光孵育 1.5 h。④孵育结束后, 用酶标仪检测荧光偏振值, 激发光波长为 485 nm, 发射光波长为 525 nm。以多肽浓度的 log 值为横坐标, 荧光偏振值为纵坐标, 通过 GraphPad Prism 7 拟合出 IC₅₀ 值, 同时检测 MAI-150 的 IC₅₀ 值。

1.2.4 多肽抑制剂对接模型的建立 从 PDB 数据库中下载 APC-MAI-150 复合物晶体结构, 运行 Maestro 软件中 Protein Preparation Wizard 模块, 对 APC 蛋白进行水分子删除、加氢、能量优化等操作; 运行 Maestro 软件中的 Receptor Grid Generation 程序生成口袋格点文件, 将 APC-

MAI-150 结合口袋区域设为对接位点, 运用 Maestro 软件中的 Glide Dock 模块将多肽与 APC 蛋白对接; 通过 Glide Dock 模块的 3 种精度, 即高通量虚拟筛选、标准精度、高精度逐级多层对多肽抑制剂与 APC 口袋结合构象打分, 分数越低则蛋白和小分子结合自由能越低。

2 结果

2.1 His-APC (303-739) 野生型蛋白表达纯化结果

通过镍柱亲和和纯化后, 用梯度浓度的咪唑洗脱 (图 2)。根据 SDS-PAGE 电泳结果, 将 80、100 和 200 mmol/L 咪唑洗脱液合并后浓缩; 待浓缩完毕后置换 APC 蛋白保存缓冲液, 并测定蛋白浓度, 冻存于 -80 ℃ 冰箱备用。

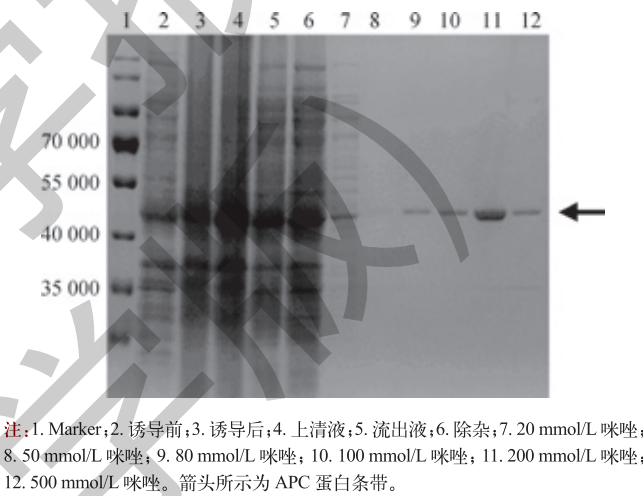


图 2 His-APC (303-739) 野生型蛋白纯化
Fig 2 Purification of His-APC (303-739) WT

2.2 APC/Asef 多肽抑制剂活性检测

7 条多肽抑制剂的 IC₅₀ 结果如表 2 所示。可以看出, 在多肽 MAI-150 基础上, 用 -NH₂ 和 -F 替换 N 端第 6 位 Tyr 侧链苯环上的对位羟基亲和力和 (MDL-3、MDL-4) 明显高于用 -CN 和 -NO₂ 取代 (MDL-1、MDL-2); 但相较于 MAI-150, 第 6 位 Tyr 侧链苯环上的对位羟基用 -CN、-NO₂、-NH₂ 和 -F 替换后亲和力和均有所降低, 对提升多肽抑制剂的亲和力没有帮助。

表 2 APC/Asef 多肽抑制剂序列和 IC₅₀ 值
Tab 2 Sequence and IC₅₀ of APC/Asef peptide inhibitors

多肽抑制剂	序列	IC ₅₀ / (μmol/L)
MDL-1	CBZ-AGEALF (4-CN) E-NH ₂	20.00
MDL-2	CBZ-AGEALF (4-NO ₂) E-NH ₂	9.32
MDL-3	CBZ-AGEALF (4-NH ₂) E-NH ₂	2.53
MDL-4	CBZ-AGEALF (4-F) E-NH ₂	3.29

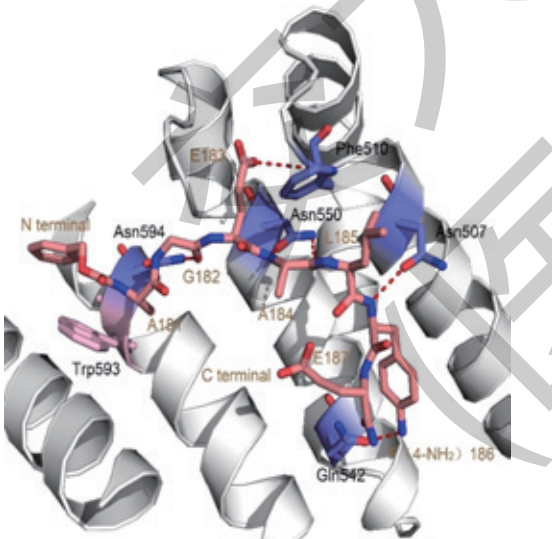
(续表 2)

多肽抑制剂	序列	IC ₅₀ / (μmol/L)
MDL-5	3-phenylpropane-AGEALYE-NH ₂	2.35
MDL-6	GG-AGEALYE-NH ₂	12.12
MDL-7	β-AA-AGEALYE-NH ₂	125.70
MAI-150	CBZ-AGEALYE-NH ₂	1.09

注: 多肽抑制剂 IC₅₀ 值越小, 表示亲和力越高。

2.3 基于活性检测结果的对接模式分析

基于荧光偏振活性检测结果, 将多肽抑制剂 MDL-3 和 MDL-4 对接到 APC 蛋白中 (图 3, 图 4), 探究其与 APC 蛋白的结合模式。从图 3 中可以明显看出, MDL-3 与 APC-ARM 结构域形成 6 个氢键, 即 N 端第 2 位的 Gly 主链上的羰基与 Asn594 的氨基形成一个氢键, 第 3 位的 Glu 侧链上的羧基与 Phe510 肽键上的氨基形成一个氢键, 第 4 位的 Ala 主链的氨基和羰基分别与 Asn550 上的羰基和氨基形成 2 个氢键, 第 6 位的 Tyr 氨基侧链上的氢与 Gln542 羰基氧、Tyr 主链氨基上的氢和 Asn507 的羰基氧形成 2 个氢键。除了氢键作用, N 端 CBZ 封端基团上的苯环与 Trp593 上的苯环形成一个 π - π 相互作用, 从而促进 MDL-3 和 APC 蛋白的结合。

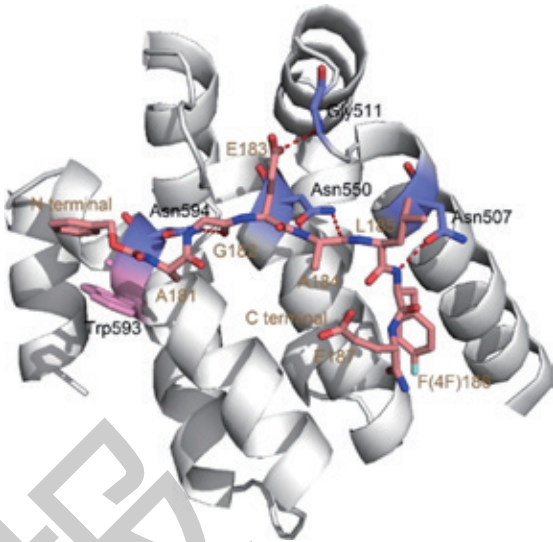


注: 虚线表示氢键。N terminal 为多肽氨基端, C terminal 为多肽羧基端。

图 3 多肽抑制剂 MDL-3 和 APC 对接模式图
Fig 3 Docking model of peptide inhibitor MDL-3 and APC

从图 4 中可以看出, MDL-4 与 MDL-3 和 APC 蛋白结合的模式比较相近, 形成的相互作用也类似。主要差别在于当 -F 取代 Tyr 侧链苯环上的对位羟基时, 不能促进 Tyr 和 APC-Gln542 间氢键的形成。

基于初步优化的结果, 后续优化多肽抑制剂的 N 端尝试分别用 3-phenylpropane、GG 和 β -AA 取代 CBZ, 即合成

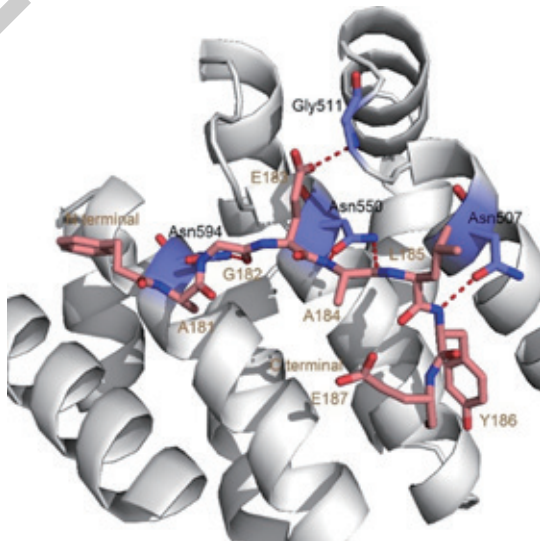


注: 虚线表示氢键。N terminal 为多肽氨基端, C terminal 为多肽羧基端。

图 4 多肽抑制剂 MDL-4 和 APC 对接模式图
Fig 4 Docking model of peptide inhibitor MDL-4 and APC

3-phenylpropane-AGEALYE-NH₂ (MDL-5)、GG-AGEALYE-NH₂ (MDL-6) 和 β -AA-AGEALYE-NH₂ (MDL-7) 这 3 条多肽, 观察是否能促进多肽和 APC 蛋白间形成新的分子间作用力, 从而提升多肽抑制剂的亲和力。荧光偏振活性检测结果 (表 2) 表明, 用 3-phenylpropane、GG 和 β -AA 替换 MAI-150 的 N 端连氨基基团 CBZ, 亲和力均有所降低。

因此, 为了探究该多肽抑制剂与 APC 蛋白的结合模式, 将 MDL-5 对接到 APC 蛋白中 (图 5)。可以看出, MDL-5 的 3-phenylpropane 取代 CBZ 后, 3-phenylpropane 与 APC-Trp593 间的距离约为 5 Å (1 Å=1×10⁻¹⁰ m), 而



注: 虚线表示氢键。N terminal 为多肽氨基端, C terminal 为多肽羧基端。

图 5 多肽抑制剂 MDL-5 和 APC 对接模式图
Fig 5 Docking model of peptide inhibitor MDL-5 and APC

CBZ 和 APC-Trp593 间为 4.2 Å; 该距离的增加, 一方面使 3-phenylpropan 和 APC-Trp593 形成的 π - π 相互作用变弱, 另一方面使得 3-phenylpropane 不能和 APC 形成新的分子间作用力; 因此, 该多肽抑制剂的亲和力和明显降低。而 GG 和 β -AA 替换 CBZ 后多肽抑制剂亲和力也明显降低, 主要是由于 N 端连氨基基团无法和 APC-Trp593 形成稳定的 π - π 相互作用所致。

3 讨论

结肠癌是当今世界上导致死亡较高的一种恶性肿瘤。大量研究表明 APC 在结肠癌的发生与发展过程中发挥着十分重要的作用, 且 APC/Asef 的相互作用又是结肠癌细胞异常迁移和侵袭的一个重要因素。因此, 靶向 APC 和 Asef 的相互作用、设计合成相关抑制剂可能会抑制结肠癌细胞的异常转移, 有望成为一种治疗结肠癌的有效手段。

本课题以已报道的 APC-MAI-150 多肽抑制剂为基础, 在已有的 APC 课题基础上, 综合利用生物信息学、药物化学和荧光偏振等方法改造并优化了 7 条多肽抑制剂, 结合荧光偏振活性检测结果对新合成的多肽抑制剂的构效关系进行探讨。对于新设计的 7 条多肽, 一方面对 MAI-150 的 N 端连氨基基团用 3-phenylpropane (MDL-5)、GG (MDL-6) 和 β -AA (MDL-7) 取代 CBZ, 活性检测结果显示: ① GG 和 β -AA 取代 CBZ 之后与 APC 蛋白形成的分子间作用力减弱, 导致多肽的亲和力明显降低。② 当用 3-phenylpropane 取代 CBZ 时, 多肽的亲和力也有所降低。进而证实了已有文献^[7]的报道, 即 MAI-150 连氨基基团 CBZ 上的苯环与 APC-Trp593 形成较强的 π - π 相互作用, 该作用对于提升多肽的亲和力非常重要。另一方面, 将 MAI-150 中第 6 位 Tyr 侧链苯环上的对位羟基分别用 -CN (MDL-1)、-NO₂ (MDL-2)、-NH₂ (MDL-3) 和 -F (MDL-4) 取代, 检测结果显示这 4 条多肽抑制剂的亲和力均有所降低。其中, 与用 -F 取代羟

基相比, 用 -NH₂ 取代羟基能够促进多肽和 APC 蛋白形成新的氢键作用, 而用 -CN 和 -NO₂ 取代羟基, 则可能会破坏 Tyr 和 APC-Val547、Met503、Val543 之间形成的疏水相互作用, 从而导致多肽抑制剂的亲和力明显降低。另外, 荧光偏振活性检测结果也表明多肽抑制剂 MDL-3、MDL-4 和 MDL-5 亲和力相差并不大, 但均较原始 MAI-150 的亲和力有所下降, 说明改造多肽 N 端的 CBZ 和第 6 位的 Tyr 效应类似, 对提高多肽抑制剂的亲和力没有帮助。基于上述 7 条多肽的初步探究发现, 后续优化多肽抑制剂需保留: ① N 端连氨基基团 CBZ。② 多肽 N 端第 6 位的 Tyr。因此, 该结果可为后续多肽的改造提供一定的基础。

由于多肽抑制剂的透膜性较低, 很难有效进入细胞并靶向目标蛋白, 后续有关多肽抑制剂的优化可尝试用人类免疫缺陷病毒衍生的穿膜多肽 (HIV Tat-derived peptide) 提高多肽的透膜能力, 即将 Tat-derived peptide 连接在 MAI-150 上辅助多肽抑制剂入膜^[8]。另外, 尽管基于蛋白-蛋白相互作用设计了相关 APC/Asef 多肽抑制剂, 而就多肽成药性而言, 其入膜性较差、选择性和活性均较低。因此, 一方面可以考虑设计靶向 APC/Asef 相互作用的小分子化合物, 即由于其入膜性较好、特异性及活性较高, 将有利于临床试验的推进; 另一方面, 可以考虑选择别构调节剂, 即通过诱导蛋白构象变化来调节蛋白活性的位点功能^[9]。别构调节具有位点多样化、调节分子多元化、调节特异性高和调节效应有上限等多重优点, 已成为药物设计的一个重要策略。已有研究^[10]针对现有的肿瘤靶标蛋白设计相应的别构药物, 与常规的正性活性位点的竞争性药物相比较, 别构药物具有较高的特异性、能够和内源性配体同时结合靶蛋白协同发挥作用、区分家族内的同源蛋白、不良反应少等特点。基于此, 研究者可以设计相应的别构抑制剂, 靶向 APC 蛋白, 抑制 APC 和 Asef 的相互结合, 从而抑制结肠癌细胞的迁移和侵袭; 该方法也可为结肠癌的药物设计提供一种新的思路和策略。

参 · 考 · 文 · 献

- [1] Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012[J]. Int J Cancer, 2015, 136(5): 359-386.
- [2] Kawasaki Y, Sagara M, Shibata Y, et al. Identification and characterization of Asef 2, a guanine-nucleotide exchange factor specific for Rac1 and Cdc42[J]. Oncogene, 2007, 26(55): 7620-7627.
- [3] van Es JH, Giles RH, Clevers HC. The many faces of the tumor suppressor gene APC[J]. Exp Cell Res, 2001, 264(1): 126-134.
- [4] Aoki K, Taketo MM. Adenomatous polyposis coli (APC): a multi-functional tumor suppressor gene[J]. J Cell Sci, 2007, 120(Pt 19): 3327-3335.
- [5] Zhang ZY, Chen LY, Gao L, et al. Structural basis for the recognition of Asef by adenomatous polyposis coli[J]. Cell Res, 2012, 22(2): 372-386.
- [6] Mitin N, Betts L, Yohe ME, et al. Release of autoinhibition of Asef by APC leads to CDC42 activation and tumor suppression[J]. Nat Struct Mol Biol, 2007, 14(9): 814-823.
- [7] Jiang HM, Deng R, Yang XY, et al. Peptidomimetic inhibitors of APC-Asef interaction block colorectal cancer migration[J]. Nat Chem Biol, 2017, 13(9): 994-1001.
- [8] Brooks H, Lebleu B, Vivès E. Tat peptide-mediated cellular delivery: back to basics[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2005, 57(4): 559-577.
- [9] Lu SY, Zhang J. Designed covalent allosteric modulators: an emerging paradigm in drug discovery[J]. Drug Discov Today, 2017, 22(2): 447-453.
- [10] Johannessen CM, Boehm JS, Kim SY, et al. COT drives resistance to RAF inhibition through MAP kinase pathway reactivation[J]. Nature, 2010, 468(7326): 968-972.

[收稿日期] 2018-03-20

[本文编辑] 邢宇洋

