

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00892

## DR5 来源的反义多肽 FR-11 的合成及其抑制 TRAIL 介导细胞凋亡的活性研究

高云,王梁华,孙铭娟,任娜,宗英,焦炳华\*

第二军医大学基础部生物化学与分子生物学教研室,上海 200433

**[摘要]** 目的:筛选出能影响配体 TRAIL 功能的死亡受体 DR5 来源的反义多肽。方法:依据蛋白质密码理论,编写可按参数要求进行氨基酸序列匹配比对的生物学软件,利用该软件对 TRAIL(序列 I)和 DR5(序列 II)进行比对,寻找两序列间的反义同源盒匹配序列。结合蛋白质和配体-受体复合物的结构信息,进一步理论筛选相互作用区域,合成可能与 TRAIL 作用的小分子活性肽。采用 ELISA 结合和竞争实验,分析所合成多肽与 TRAIL 的结合;在 TRAIL 诱导细胞凋亡实验中,分析与死亡受体竞争结合 TRAIL 的程度,观察多肽影响 TRAIL 介导细胞凋亡的生物活性。结果:经软件初筛选和理论分析,共合成 10 条多肽。通过 ELISA 结合实验筛选到一条多肽(命名为“FR-11”),能与 TRAIL 发生浓度依赖性的特异结合,并能抑制 DR5 与配体 TRAIL 的结合。该多肽与 TRAIL 97~103aa 的匹配率大于 50%,计算机模拟三维结构显示该序列位于 DR5 的胞外区,是与 TRAIL 结合的关键区域。细胞学实验表明:FR-11 肽能够抑制 TRAIL 介导的 SW1990 细胞和 L929 细胞的凋亡,这种抑制作用呈 FR-11 浓度依赖性,而在 TRAIL 浓度较低时更为明显,提示能抑制 TRAIL 与死亡受体的结合。结论:根据蛋白质密码理论设计的软件能筛选出影响配体-受体相互作用的功能反义多肽;某些多肽能模拟受体与配体发生结合,具有抑制配体介导的生物活性。

**[关键词]** DR5;反义多肽;TRAIL;细胞凋亡

**[中图分类号]** TQ 936.16 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)08-0892-04

### Synthesis of DR5-derived complementary peptide FR-11 and its inhibitory effect on TRAIL-mediated cell apoptosis

GAO Yun, WANG Liang-hua, SUN Ming-juan, REN Na, ZONG Ying, JIAO Bing-hua\*

Department of Molecular Biology and Biochemistry, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

**[ABSTRACT]** **Objective:** To synthesize DR5-derived complementary peptide(s) that can influence the function of TRAIL and to observe its(their) inhibitory effect on TRAIL-mediated cell death. **Methods:** A software was designed to identify the matching domains of two known peptide sequences according to the theory of Proteomic Code. The antisense homology box sequences between DR5 and its ligand TRAIL were searched by the designed software. Possibly active peptide(s) was/were selected and synthesized based on the structural information of TRAIL-DR5 complex. The binding between TRAIL molecule and the selected peptide(s) was examined by ELISA; the inhibitory effect of the selected peptide(s) against TRAIL-induced cell death was studied by cellular experiments. **Results:** Ten complementary peptide sequences were obtained based on software selection and structural analyzing. One active DR5-derived peptide FR-11 was selected with ligand-binding analysis using ELISA; FR-11 showed specific binding to TRAIL in a dose-dependant manner and blocked the binding of TRAIL with DR5. The matching rate between FR-11 and TRAIL 97-103aa was higher than 50%. Computer analysis showed that FR-11 corresponded to the extracellular domain of DR5, a key binding site to TRAIL. Further study indicated that FR-11 inhibited TRAIL-induced apoptosis of SW1990 cells and L929 cells in a dose-dependant manner; the inhibitory effect of FR-11 was more potent when the concentration of TRAIL was low, suggesting that it inhibited the binding between TRAIL and death receptor. **Conclusion:** The software designed based on the theory of Proteomic Code can be used to select complementary peptides which influence the interaction between ligand and receptor. The selected peptide FR-11 can bind to the ligand TRAIL and subsequently inhibit the biological function of the ligand.

**[KEY WORDS]** DR5; antisense peptide; TRAIL; apoptosis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(8): 892-895]

**[收稿日期]** 2008-01-20 **[接受日期]** 2008-06-04

**[基金项目]** 上海市科委生物医药重点攻关项目(034319223), Supported by Biomedical Key Project of Shanghai Science and Technology Committee(034319223).

**[作者简介]** 高云, 硕士. E-mail: lanbo197932@yahoo.com.cn

\* 通讯作者 (Corresponding author). Tel: 021-25070303, E-mail: jiaobh@uninet.com.cn

研究表明,由DNA模板链编码的有义肽和由其互补链编码的反义肽之间可能发生特定的相互作用,并且这种相互作用广泛存在于肽-肽、肽-蛋白质、蛋白质-蛋白质等多种体系中<sup>[1]</sup>。进一步研究表明,这种相互作用的基础在于由有义密码子编码的有义氨基酸和其对应的反义密码子组成的特定氨基酸对两两相互作用。在此基础上,Miller于2002年提出了蛋白质密码理论,该理论认为:蛋白质相互作用的信息存储于编码蛋白质的核苷酸序列中,编码一个蛋白特定片段的反义核苷酸序列是编码另一个可与之相互作用蛋白特定片段的有义核苷酸序列<sup>[2]</sup>。蛋白质密码理论的提出揭示了特定肽或蛋白体系中氨基酸序列的对应关系,为筛选与特定蛋白相互作用的小分子活性肽提供了新的思路。目前,已有研究组编写了相应的生物信息学软件,在Fas配体<sup>[3]</sup>、C5a过敏毒素<sup>[4]</sup>等分子中筛选到能与其相应受体作用的功能反义多肽。

TRAIL是近些年来新发现的肿瘤坏死因子配体家族中一个重要成员。由于其和受体结合后可特异性诱导肿瘤细胞凋亡而不影响正常细胞,因此其在肿瘤治疗方面受到广泛关注<sup>[5-6]</sup>。目前共鉴定了5个TRAIL的受体:TRAIL-R I (DR4)、TRAIL-R II (DR5)、DcR I、DcR II、OPG。其中DR4、DR5胞内含有死亡结构域,与TRAIL结合后能向胞内传递死亡信号,引起细胞凋亡<sup>[7]</sup>。目前,TRAIL分子<sup>[8]</sup>及TRAIL-DR5复合物的三维晶体结构都已经清楚<sup>[9]</sup>。

本研究试图根据蛋白质密码理论中有义-反义氨基酸对应关系编写有关生物信息学软件,在死亡受体DR5和TRAIL分子中筛选符合一定匹配条件的反义多肽序列,并利用有关的结构信息对软件筛选到的结果进行理论上的初筛;在此基础上合成多肽,用ELISA和细胞生物学检测方法观察多肽与配体TRAIL结合情况以及对TRAIL诱导细胞凋亡行为的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 多肽的分子设计

1.1.1 软件的开发和性能 根据蛋白质密码理论,本实验室设计和开发了一种可从任意两条已知氨基酸序列中找出有一定相关匹配度片段的软件Anjiusuan。该软件支持直接从网页或其他文档中导入符合规范格式的氨基酸序列,导入两条序列后,可在比对参数框中对比对的参数进行任意设定,软件将按设置参数条件进行比对,在比对过程中可由进

程指示表反映比对进程,比对结束后可在即时窗口中观察比对结果。

1.1.2 TRAIL和DR5来源的氨基酸序列比对 将TRAIL来源的氨基酸序列为序列I,DR5来源的序列为序列II为输入,设置4个氨基酸连续匹配为一个核心匹配区,在两条序列中进行循环往复比对(比对模式见图1)。第一次比对结束后,将序列I倒置过来,进行反向比对。在软件初始结果中将满足一定长度范围内(8~12aa)一定匹配条件(匹配度大于50%)的序列作为软件比对筛选结果。

图1 Anjiusuan软件序列比对模式图

Fig 1 The searching style of Anjiusuan software

Continuous matching of 4 amino acids was considered as selecting criteria and cycling matching was performed

2.1.3 软件比对筛选结果的理论筛选 按下列因素对软件比对筛选结果进行理论初筛:(1)多肽受体和配体相互作用的结构因素,优先选择位于TRAIL-DR5相互作用结合位点的氨基酸序列;(2)选择高匹配率的多肽序列;(3)考虑多肽序列本身的理化特性。

1.2 多肽合成 在上述软件比对筛选和理论再筛选的基础上,所有选出的多肽委托上海吉尔生化有限公司合成,并经HPLC纯化和质谱分析确认。

1.3 多肽与相应目标蛋白的ELISA结合实验 合成的多肽以50~100 μg/ml溶于PBS,并按照一定比例进行稀释,以间接包被法包被于ELISA结合平板上。目标蛋白重组人TRAIL由本教研室制备。多肽与TRAIL结合情况采用间接法<sup>[10]</sup>。其中一抗为兔抗人TRAIL特异性一抗(Santa Cruz公司,批号sc-8301),二抗为辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗(晶美生物公司,批号214-1516),TMB底物显色,405 nm比色。

1.4 竞争性ELISA实验 将DR5(晶美生物公司,批号4568-50)固相包被于ELISA结合平板(1 μg/ml浓度,每孔50 μl),将50 ng/ml的TRAIL与不同浓度的受试多肽溶液预先进行混合,在37℃下放置1 h,加入分析平板,浸泡式洗涤法洗去非特异性

结合的 TRAIL。加入特异性兔抗人 TRAIL 抗体,洗涤,再加入生物素标记的羊抗兔二抗(晶美生物公司,批号 4010-08),加入辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素(晶美生物公司,批号 18-152)。观察在施加不同浓度的受试合成多肽溶液的情况下,多肽和 DR5 与 TRAIL 竞争性结合情况。

1.5 细胞凋亡实验 细胞培养:人胰管癌上皮细胞 SW1990、小鼠成纤维细胞 L929 购自中科院细胞资源中心,本室冻存。培养条件:RPMI 1640(Gibco 公司)培养基,含 10%胎牛血清(杭州四季青公司),37℃,5%CO<sub>2</sub>。

将 TRAIL 与不同浓度的多肽溶液进行混合,将生长至对数生长期的 SW1990 细胞、L929 细胞分别接种于 96 孔培养板(SW1990:1.0×10<sup>5</sup>/ml,L929 细胞:1.5×10<sup>5</sup>/ml),每孔 100 μl。37℃下培养 18~22 h。细胞生长密度至孔面积的 60%~70%。加入样品(多肽与 TRAIL 的混合溶液;对照孔为 TRAIL),同时加入放线菌素 D(Fluka 公司)使其终浓度为 1.5 μg/ml。继续培养 16~18 h。MTT 法测定细胞活力,观察不同浓度的合成多肽溶液对 TRAIL 介导肿瘤细胞凋亡的影响。

1.6 统计学处理 实验结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,用 SPSS 13.0 统计软件包进行 *t* 检验。

## 2 结果

2.1 筛选多肽结果和匹配情况 在软件筛选的基础上,经理论筛选和初步的序列分析,最后选择合成 10 条多肽。其中,在本研究中筛选到的阳性多肽 FR-11 肽匹配片段的长度为 11aa,匹配率 55%,与 TRAIL 相关序列的匹配情况如图 2 所示。

0.053 329),说明结合在平板上的 TRAIL 增加。表明 TRAIL 能与 ELISA 平板上的 FR-11 肽发生浓度依赖性结合。

2.3 竞争性 ELISA 实验结果 结果显示,随着游离的 FR-11 肽浓度的提高(1、10、100 μg/ml),结合孔的 D<sub>405</sub>降低(0.516±0.024 556、0.419 66±0.015 535、0.249 667±0.018 037),表明 TRAIL 与 DR5 的结合减少。

2.4 细胞学实验结果 实验结果显示,与对照组相比,3 种浓度(100、10、1 ng/ml)TRAIL 条件下,200 μg/ml 浓度的 FR-11 对 SW1990 细胞的抑制率分别为(20.0±2.6)%、(37.0±2.5)%、(65.0±6.1)%,对 L929 细胞的抑制率分别为(20.0±4.0)%、(27.0±3.0)%、(38.0±4.5)%。当 TRAIL 浓度为 1 ng/ml 时,FR-11 肽组和对照组相比,两者有显著性差异(*P*<0.01);当 TRAIL 浓度为 100 ng/ml 时,FR-11 组与对照组相比,两者有差异(*P*<0.05)。说明 FR-11 的这种抑制作用在低浓度 TRAIL 条件下更明显。图 3 显示的是在加样 6 h,10 ng/ml 的 TRAIL 浓度下,FR-11 对于 SW1990 凋亡的抑制效果。随后固定 TRAIL 的作用浓度为 10 ng/ml,将其与不同浓度(100、200、500 μg/ml)的 FR-11 进行混合,作用于 SW1990 细胞。结果发现,与对照组相比,3 种浓度的 FR-11 对 TRAIL 介导细胞凋亡的抑制率分别为(14.0±4.0)%、(21.0±5.0)%、(31.0±4.0)%,说明随 FR-11 浓度增加,其抑制凋亡的程度也增加。

图 2 DR5 来源的 FR-11 与 TRAIL(241~251)的匹配情况示意图

Fig 2 Matching of DR5-derived peptide FR-11 with TRAIL(241-251)

Sequence I (up) is derived from TRAIL(aa:241-251). Sequence II (below) is derived from DR5. The amino acids linked by lines are matching pairs

2.2 ELISA 结合实验结果 ELISA 实验结果显示,随着平板上 FR-11 多肽包被浓度的提高(50 ng/ml、1 μg/ml、10 μg/ml),D<sub>405</sub>增加(0.262 667±0.262 577、0.623 333±0.070 088、0.945 ±

图 3 FR-11 肽对于 TRAIL 介导 SW1990 细胞凋亡的抑制效果的细胞图片

Fig 3 Apoptosis of SW1990 cells induced by TRAIL was inhibited by FR-11

A:Control group; TRAIL(10 ng/ml);B:TRAIL(10 ng/ml) and FR-11 (200 μg/ml). The picture were taken after the sample was added 6 h later. Original magnification:×400

## 3 讨论

小分子活性肽的筛选方法包括基于噬菌体展示

文库、基于蛋白质结构及结构预测、基于蛋白质酶解等<sup>[11]</sup>。寻找 TRAIL 及其受体 DR4、DR5 相关的小分子活性肽一直以来都是一个研究热点。目前,国外已有研究组通过合成一系列 TRAIL 胞外区来源的多肽,找到一条八肽能诱导 Jurkat T 细胞显著凋亡<sup>[12]</sup>。本研究中我们在蛋白质密码理论的基础上筛选活性多肽,这是筛选新方法的有效尝试。我们找到了一条 DR5 来源的 FR-11 肽具有一定的生物学活性,说明了该方法的可行性。该研究方法可运用于其他受体-配体相互作用系统,为小分子活性肽的筛选提供了一条新的可能途径。本研究中我们找到的 FR-11 肽能够与 TRAIL 结合并能抑制 TRAIL 介导的细胞凋亡作用。这对于进一步研究 TRAIL 和 DR5 分子相互作用机制以及 TRAIL 通过 DR5 分子介导的生物学行为,都有重要的理论和实践意义。

有义-反义氨基酸对之间并不是一一对应关系,一个有义氨基酸往往对应多个反义伙伴。一条有义肽对应的反义肽可以有好多条。在本研究中我们在相互作用的受体和配体间寻找符合一定条件的反义同源盒序列,是因为由配体(或受体)衍生的肽段具有与相应受体(或配体)发生作用的可能性。并且我们在软件筛选的基础上,进一步结合了结构因素及多肽理化性质等信息,并运用了包括 ELISA、细胞凋亡实验等生物学检测方法进行筛选。这样一方面大大降低了多肽合成的数量,减少了筛选的工作量。另一方面也弥补了单使用蛋白质密码理论筛选带来的不足。

从本研究的结果来看,我们找到的 FR-11 肽,从匹配度上看并不高,与 TRAIL<sub>241~251</sub> 匹配率为 55%。国外有文献报道,在 FasL 配体中找到的反义同源盒序列匹配度为 70%<sup>[3]</sup>。而在本研究中我们将 50% 作为软件筛选条件,这是因为如果匹配条件设置得过高,可供选择的肽序列就非常少,无法更多考虑其他因素。但从结构信息上看,该多肽序列位于 DR5 分子胞外第 2 个半胱氨酸重复区域。其上分布有许多直接与 TRAIL 作用的氨基酸残基。在 ELISA 实验中,随着包被于平板上的 FR-11 肽浓度的提高,TRAIL 结合量增加,说明 FR-11 能与 TRAIL 发生特异性结合,在细胞学实验中,在 FR-11 肽浓度较高(500 μg/ml)而 TRAIL 浓度较低条件下,才能有较明显的抑制作用,这可能是由于 FR-11 缺少蛋白的高级结构,因此与天然蛋白 DR5 相比,一方面 FR-11 肽与 TRAIL 的结合力要远远

低于 DR5 分子,另一方面在细胞培养基中 FR-11 也容易被降解。在下一步的工作中,我们希望对 FR-11 进行修饰,如替换部分氨基酸,以提高其稳定性。同时,通过更多的筛选,找到作用更强的多肽。

## [参考文献]

- [1] Baranyi L, Campbell W, Ohshima K, Fujimoto S, Boros M, Kaszaki J, et al. Antisense homology box-derived peptides represent a new class of endothelin receptor inhibitors[J]. *Peptides*, 1998, 19: 211-223.
- [2] Heal J R, Roberts G W, Raynes J G, Bhakoo A, Miller A D. Specific interactions between sense and complementary peptides: the basis for the proteomic code[J]. *Chem Biol Chem*, 2002, 3: 123-151.
- [3] Hayakawa A, Kojima T, Yokoyama I, Suzuki H, Tajiri H, Nakashima I. A short peptide derived from the antisense homology box of Fas ligand induces apoptosis in anti-Fas antibody-insensitive human ovarian cancer cells[J]. *Apoptosis*, 2000, 5: 37-41.
- [4] Fujita E, Farkas I, Campbell W, Baranyi L, Okada H, Okada N. Inactivation of C5a anaphylatoxin by a peptide that is complementary to a region of C5a[J]. *J Immunol*, 2004, 172: 6382-6387.
- [5] Cretney E, Shanker A, Yagita H, Smyth M J, Sayers T J. TNF-related apoptosis-inducing ligand as a therapeutic agent in autoimmunity and cancer[J]. *Immunol Cell Biol*, 2006, 84: 87-98.
- [6] Merino D, Lalaoui N, Morizot A, Solary E, Micheau O. TRAIL in cancer therapy: present and future challenges[J]. *Exp Opin Ther Targets*, 2007, 11: 1299-1314.
- [7] Huang Y, Sheikh M S. TRAIL death receptors and cancer therapeutics[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2007, 224: 284-289.
- [8] Cha S S, Kim M S, Choi Y H, Sung B J, Shin N K, Shin H C, et al. 2.8 Å resolution Crystal structure of human TRAIL, a cytokine with selective antitumor activity[J]. *Immunity*, 1999, 11: 253-261.
- [9] Cha S S, Sung B J, Kim Y A, Song Y L, Kim H J, Kim S, et al. Crystal structure of TRAIL-DR5 complex identifies a critical role of the unique frame insertion in conferring recognition specificity[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275: 31171-31177.
- [10] Ball J M, Henry N L, Montelaro R C, Newman M J. A versatile synthetic peptide-based ELISA for identifying antibody epitopes[J]. *J Immunol Methods*, 1994, 171: 37-44.
- [11] 罗以勤, 王梁华, 焦炳华. 小分子活性肽筛选方法[J]. *生命的化学*, 2004, 24: 16-18.
- [12] Kaga C, Okochi M, Nakanishi M, Hayashi H, Kato R, Honda H. Screening of a novel octamer peptide, CNSWSKD, that induces caspase-dependent cell death[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 362: 1063-1068.

[本文编辑] 李丹阳