

DOI:10.11784/tdxbz201704012

靶向于胶原蛋白的血栓抑制剂 LERNSTY 开发

张 麟, 郝坛义

(天津大学化工学院, 天津 300350)

摘要: 通过荷电氨基酸残基替换 LWWNSYY 中的疏水性氨基酸残基 W 以优化其组成, 设计获得血栓抑制剂 LERNSTY. 研究发现, LERNSTY 溶解度好, 能够有效结合胶原蛋白, K_d 为 $(1.647 \pm 0.303) \mu\text{mol/L}$, 有效半抑制浓度 (IC_{50}) 为 $(2.73 \pm 0.48) \mu\text{g/mL}$, 优于 LWWNSYY. 因此, 通过荷电氨基酸的引入优化获得有效的血栓抑制剂 LERNSTY, 将促进疗效显著而副作用小的抗血栓药物开发.

关键词: 动脉血栓; 胶原蛋白; 血栓抑制剂; 水溶性

中图分类号: TQ464.7 **文献标志码:** A **文章编号:** 0493-2137(2018)04-0401-05

Development of Thrombus Inhibitor LERNSTY Targeted at Collagen

Zhang Lin, Hao Tanyi

(School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300350, China)

Abstract: A thrombus inhibitor LERNSTY was designed based on the optimization of LWWNSYY by replacing the hydrophobic amino acid residue W with charged amino acid residues. LERNSTY was found to have good solubility. It could effectively bind with collagen with a K_d of $(1.647 \pm 0.303) \mu\text{mol/L}$. An effective half inhibitory concentration (IC_{50}) of $(2.73 \pm 0.48) \mu\text{g/mL}$ was obtained, which was better than that of LWWNSYY. Therefore, an effective thrombus inhibitor LERNSTY was obtained through the introduction of charged amino acid residues, which would facilitate the development of curative antithrombotic drugs with fewer side effects.

Keywords: arterial thrombosis; collagen; thrombus inhibitor; solubility

动脉血栓阻塞动脉血流而导致肢体缺血和组织细胞坏死, 造成心肌梗死和中风等严重后果^[1-3]. 血栓性疾病在我国的发病率和病死率呈逐年上升的趋势. 2016 年国家心血管病中心组织编撰的《中国心血管病报告 2015》显示, 每 5 例死亡中就有 2 例死于心血管病. 预计到 2020 年, 血栓性疾病造成的经济损失将远超 6 500 亿美元. 目前, 抗血栓药物, 如抗血小板药物阿司匹林、抗凝药物和溶栓药物华法林, 主要以血液中血小板或凝血因子为靶点, 因而难于区分血栓形成的病理过程和正常凝血的生理功能, 可能破坏正常凝血系统平衡而导致出血风险^[4-6]. 因此, 更换作用靶点开发疗效显著且副作用小的抗血栓药物, 符合当今社会健康可持续发展的迫切需求, 具有重要研究意义和经济价值.

本课题组在前期工作中, 避开血液组分而以血管壁暴露的胶原蛋白为靶点, 仿生设计筛选获得高效抑制剂 LWWNSYY^[7-8], 能够有效覆盖胶原蛋白, 从而有效抑制血小板与胶原蛋白的结合, 抑制动脉血栓形成. 然而, LWWNSYY 富含疏水性氨基酸残基而导致水溶性差等问题^[9], 限制其实际应用, 改善其水溶性十分关键. 目前已有多种改善药物溶解度方法的报道^[10-13], 诸如通过改善药物的整体分子结构使其具有与溶剂分子相似的结构, 通过氢键改善药物溶解度, 通过有机弱酸弱碱药物支撑可溶性盐以增加溶解度, 通过载体改善药物分子生物利用度^[14-15], 通过在难溶性药物分子中引入亲水基团增加其溶解度. 例如, 通过在不溶于水的维生素 K3 分子中引入 $-\text{SO}_3\text{HNa}$ 制成维生素 K3 亚硫酸钠可大幅改善其水

收稿日期: 2017-04-05; 修回日期: 2017-05-05.

作者简介: 张 麟 (1981—), 男, 博士, 教授.

通讯作者: 张 麟, linzhang@tju.edu.cn.

网络出版时间: 2017-05-17. 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/12.1127.N.20170517.1127.004.html>.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(91534119); 天津大学自主创新基金资助项目.

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 91534119) and the Innovation Foundation of Tianjin University.

溶性.

因此,本文通过 LWWSY 的组成分析并综合考虑其设计原理,尝试将其中的 W 替换为谷氨酸(E)、精氨酸(R)、赖氨酸(K)等荷电氨基酸残基.根据胶原蛋白作用位点 GFOGER^[16]的分布形式(见图1),选定 ER 替换原 WW,以和胶原蛋白作用位点中的 ER 静电匹配,即 W2E 和 W3R.同时,为避免疏水性降低过多,用 T 替换原第 6 位氨基酸残基 Y,即 Y6T,构建获得新序列 LERNSTY.通过分子对接检测其与胶原蛋白的结合能力,通过等温滴定量热实验检测其与胶原蛋白结合的热力学参数^[17-19],通过体外血小板黏附实验检测其对血小板聚集(胶原蛋白诱导)的抑制效果^[20-21].



图 1 LERNSTY 序列的设计思路示意

Fig.1 Schematic diagram of design of sequence LERNSTY

1 材料与方法

1.1 材料

七肽 LWWSY、LERNSTY 购自上海吉尔生化有限公司,纯度 > 95%;胶原蛋白片段(GPO)₂-GFOGER(GPO)₃ 购自上海强耀生物科技有限公司,纯度 > 95%;抗凝羊血购自广州蕊特生物科技有限公司;磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、乙二醇、氯化钠、氯化钾和氯化镁均为分析纯,购自天津光复精细化工有限公司.

1.2 方法

1.2.1 分子对接

分子对接选用软件 AUTODOCK VINA 1.1.2^[22](<http://vina.scripps.edu/>)进行,抑制剂作为胶原蛋白的配体,受体与配体结构均以 pqbqt 的格式储存.对接结果中,用打分函数值(E_{VINA})评估配基与胶原蛋白间的亲和结合作用强弱.

1.2.2 等温滴定量热测定

通过等温滴定量热(isothermal titration calorimeters, ITC)实验测量热力学结合参数以表征抑制剂与胶原蛋白片段(GPO)₂GFOGER(GPO)₃之间的相互作用,用量热仪(VP-ITC, MicroCal, 北安普顿)进行

测量.样品池(cell)中注入浓度为 50 μmol/L 的胶原蛋白溶液,注射器(syringe)中加入浓度为 0.4 mmol/L 的抑制剂.上述样品均溶于生理盐水溶液中,加入前经过 20 min 抽气处理以避免溶液中气泡对实验结果的影响.滴定过程为 25 滴,每滴滴入体积为 10 μL,滴定时间间隔为 350 s.参比基线(reference power)设定为 83.68 μJ/s.初始滴的延迟时间(initial delay)设定为 800 s.搅拌转速设定为 307 r/min.样品池温度为 10 °C.对照实验中,通过滴定生理盐水来测定多肽的稀释焓,并在后续数据处理中扣除.滴定结果通过 MicroCal Origin (版本号 7.0)和单一位点结合模型(single-site binding model)进行处理拟合,其公式为

$$Q = \frac{nC_c \Delta H V_0}{2} \left[1 + \frac{C_i}{nC_c} + \frac{1}{nKC_c} - \sqrt{\left(1 + \frac{C_i}{nC_c} + \frac{1}{nKC_c} \right)^2 - \frac{4C_i}{nC_c}} \right] \quad (1)$$

式中: K 为结合常数; n 为滴定滴数; V_0 是样品池胶原蛋白溶液体积; C_c 是胶原蛋白浓度; C_i 是抑制剂溶液浓度; Q 为热量变化值.从而获得抑制剂与胶原蛋白片段作用的热力学参数,包括解离常数 K_d 、焓变 ΔH 、熵变 $T\Delta S$ 以及吉布斯自由能变 ΔG .

1.2.3 抑制剂对血小板黏附的抑制效果测定

通过 96 微孔板(CellBIND-9018,康宁公司,纽约)开展,实验步骤如下.

(1) 胶原蛋白的固定.配制胶原蛋白 100 μg/mL 溶于 0.01 mol/L 碳酸盐缓冲液, pH = 9.6.微孔板中每孔滴加 100 μL 胶原蛋白溶液,于 18 °C 下温浴 4 h,使胶原蛋白吸附固定在微量孔板表面.随后加入 100 μL 溶于 TBS (50 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L 氯化钠, 2 mmol/L 氯化镁, pH = 7.4),质量浓度为 10 mg/mL 的牛血清白蛋白(BSA),在 18 °C 下温浴 2 h,封闭孔板上未吸附的结合位点.然后用 200 μL TBS 清洗微孔 3 遍.

(2) 胶原蛋白封闭.100 μL 不同质量浓度的抑制剂 LWWSY 或 LERNSTY (50、40、30、25、15、10、5、2、1 μg/mL) 添加到固定有胶原蛋白的微孔中,18 °C 温浴 1 h,随后用 200 μL TBS 清洗微孔 3 遍.

(3) 血小板吸附.将羊全血离心,取沉淀(血小板),重悬于吸附缓冲液(TBS + 0.1% BSA + 2 mmol/L 氯化镁, pH = 7.4)中,室温下活化 1 h.100 μL 血小板重悬液滴加到固定有胶原蛋白的微孔中,18 °C 下温浴 1 h 后,用 200 μL TBS 清洗微孔 3 遍,除去未吸附的血小板.

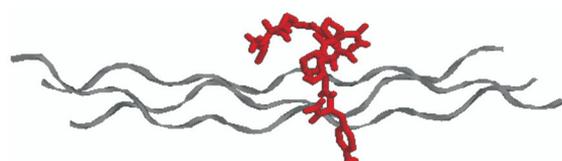
(4) 显色检测.配制细胞溶解液:0.1 mol/L 柠

柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液 (pH = 5.4), 包含 0.1% (质量分数) Triton X-100, 1 mg/mL 磷酸对硝基苯脂 (PNPP). 在待测微孔中加入 100 μ L 细胞裂解液, 18 $^{\circ}$ C 下反应 1 h 后, 加入 50 μ L 的氢氧化钠溶液 (3 mol/L) 终止反应, 用酶标仪 (ELX800, BioTek) 检测 405 nm 处的吸光值 (A_{405}). 通过吸光值与血小板数量间的正比关系, 换算成抑制剂对血小板黏附的抑制率.

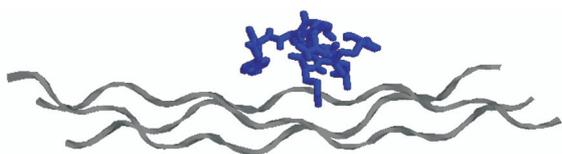
2 结果与讨论

2.1 分子对接

前期工作已建立 AUTODOCK VINA 对接流程进行抑制剂与胶原蛋白结合情况评估^[7-8]. 此处通过对接检测抑制剂 LERNSTY 与胶原蛋白的结合情况, 对接构象如图 2(a) 所示.



(a) LERNSTY (红) 与胶原蛋白 (灰) 结合



(b) LRENSTY (蓝) 与胶原蛋白 (灰) 结合

图 2 抑制剂与胶原蛋白的对接构象图

Fig.2 Docked conformation of inhibitors on collagen

对接构象图显示 LERNSTY 能结合于胶原蛋白表面, 结合位点与整联蛋白 $\alpha 2\beta 1$ ^[7] 以及 LWWNSYY^[8] 的结合位点一致. LERNSTY 的对接打分函数 $E_{VINA} =$

-24.3 kJ/mol, 其值为负, 说明 LERNSTY 与胶原蛋白之间的相互作用利于结合且结合较强. 在序列设计过程中, 对比对接结果发现, E_{VINA} (LERNSTY, -23.0 kJ/mol) 小于 E_{VINA} (LERN-STY), 所以用 T 替换原第 6 位氨基酸残基 Y, 即 Y6T, 后续对 LERNSTY 开展实验验证. 为模拟验证设计构想中抑制剂和胶原蛋白作用位点静电作用对匹配 (见图 1) 的效果, 通过对比对接结果发现, E_{VINA} (LERNSTY) < E_{VINA} (LRENSTY), 表明抑制剂中第 2、3 位置的氨基酸残基的静电空间分布对结合效果的影响很大. 当第 2、3 位置的氨基酸残基电荷排列为负、正时, 恰好与胶原蛋白结合位点 GFOGER 中 ER 排列相匹配, 促进结合 (见图 1). 反之, 当第 2、3 位置的氨基酸残基电荷排列为正、负时, 与胶原蛋白中 ER 排列相排斥, 则减弱结合. 图 2(b) 中所示 LRENSTY 与胶原蛋白的分子对接构象也显示, LRENSTY 与胶原蛋白距离较远, 无法很好结合到胶原蛋白表面. 对接结果验证了本文所提出的改造设计思路的合理性, LERNSTY 通过与胶原蛋白之间的序列匹配和静电吸引促进结合.

2.2 多肽与胶原蛋白的结合

等温滴定量热实验显示, 生理盐水溶液中 LERNSTY 与胶原蛋白作用的解离常数为 $(1.647 \pm 0.303) \mu\text{mol/L}$, 结合自由能为 $\Delta G = -31.301 \text{ kJ/mol}$, 说明 LERNSTY 能够与胶原蛋白自发结合. 结合过程的热力学常数列于表 1. 其中, 焓变 ΔH 大于零, 表明该结合为吸热过程, 熵变 $T\Delta S$ 大于零且大于焓变 ΔH , 说明该过程为疏水相互作用驱动. 两者结合后, 由于静电吸引和疏水作用等作用力, 形成稳定复合物, 不易解离. 而 LWWNSYY 得到的滴定曲线无法拟合, 印证其因为自身疏水团聚而无法和胶原蛋白很好结合 (见图 3).

表 1 抑制剂与胶原蛋白结合的热力学常数

Tab.1 Thermodynamic binding constants for inhibitors on collagen

| 抑制剂 | $K_d / (\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$ | $\Delta G / (\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$ | $\Delta H / (\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$ | $T\Delta S / (\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$ |
|---------|---|--|--|---|
| LERNSTY | 1.647 ± 0.303 | -31.301 ± 1.209 | 6.489 ± 0.226 | 37.790 ± 1.188 |
| LWWNSYY | — | — | — | — |

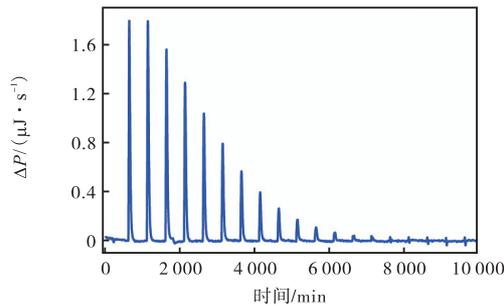
2.3 抑制剂对血小板黏附的抑制效果

利用 96 孔板和酶标仪测量抑制剂对胶原蛋白诱导的血小板黏附的抑制效果. 通过测定抑制率随抑制剂质量浓度的变化曲线如图 4 所示, 利用 Hill 方程进行曲线拟合, 计算式为

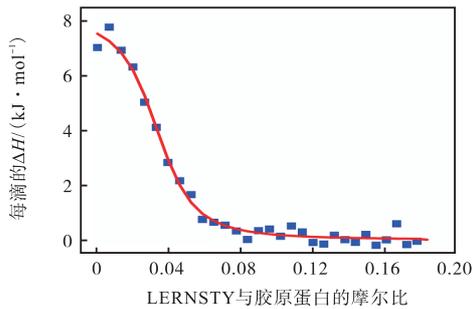
$$y = \frac{I}{\left(\frac{k}{x}\right)^m + 1} \quad (2)$$

式中: $m = 1$; I 代表最大抑制率 IR_{\max} ; k 代表有效半抑制浓度 IC_{50} ; x 为抑制剂质量浓度; y 为吸附抑制率.

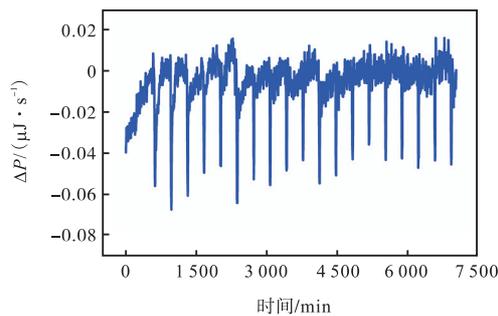
所得待定参数结果如图 5 所示. 结果显示, LERNSTY 和 LWWNSYY 均能抑制血小板黏附. 随质量浓度升高, 抑制率逐渐变大; 当质量浓度达到一定值后, 抑制率也达到上限. 图 5 显示, LERNSTY 的最大抑制率 IR_{\max} 为 $84.69\% \pm 4.53\%$, 低于 LWWNSYY 的最大抑制率 $94.76\% \pm 3.58\%$, 表明



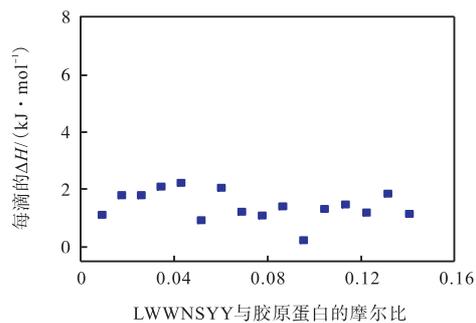
(a) LERNSTY 与胶原蛋白作用的等温滴定曲线



(b) LERNSTY 与胶原蛋白作用的积分焓拟合曲线



(c) LWWSY 与胶原蛋白作用的等温滴定曲线



(d) LWWSY 与胶原蛋白作用的积分焓拟合曲线

图 3 抑制剂与胶原蛋白作用的热力学分析

Fig.3 Thermodynamic characterization of the binding of inhibitors on collagen

LWWSY 和胶原蛋白的作用力更强. 然而 LWWSY 的有效半抑制浓度 IC_{50} 为 $(3.40 \pm 0.28) \mu\text{g}/\text{mL}$, 高于 LERNSTY 的 $(2.73 \pm 0.48) \mu\text{g}/\text{mL}$, 表明 LERNSTY 具有更好的抑制效果. 对比分析表明, LWWSY 和胶原蛋白的结合作用力较强, 但是水溶性差、分散性差等原因导致其形成聚集体而无

法与胶原蛋白有效结合, 因而无法有效抑制血小板在胶原蛋白的黏附, 导致较高的有效半抑制浓度. 通过引入带电基团, LERNSTY 有更好的水溶性和分散性, 能够结合于胶原蛋白的多肽单体浓度高, 因而表现出较低的 IC_{50} , 在血液环境中的抑制效果优于 LWWSY.

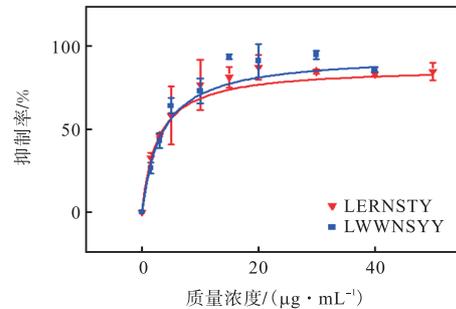


图 4 抑制剂对血小板固相吸附的抑制率随质量浓度变化曲线

Fig.4 Dose-responed inhibition ratio of inhibitors on the platelet adhesion to collagen

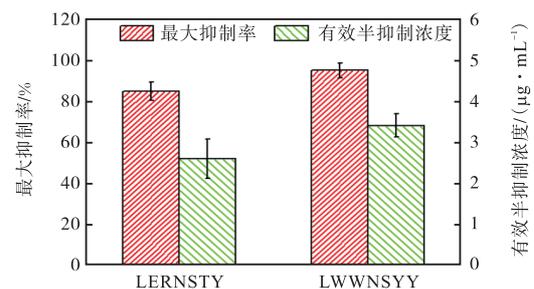


图 5 抑制剂抑制胶原蛋白诱导的血小板黏附效果

Fig.5 Diagram of inhibition on collagen-induced platelet adhesion by various inhibitors

3 结 语

通过胶原蛋白作用位点分析, 引入带电基团序列 ER, 构建新型血栓抑制剂 LERNSTY, 其良好的水溶性增强其生物利用度. 相比于 LWWSY, LERNSTY 能够通过静电作用的匹配优化与胶原蛋白的结合, 其解离常数 K_d 值为 $1.647 \mu\text{mol}/\text{L}$. 血小板黏附抑制实验也表明, LERNSTY 对血小板黏附的抑制效率(IC_{50})相比于 LWWSY 提高 19.71%, 抑制效果显著. 因此, 本文基于结合位点及结合作用分析, 提出通过静电作用对的匹配对血栓抑制剂进行改造的方法, 在改善水溶性的同时也能够改善其结合性能和后续抑制效果, 获得新型血栓抑制剂 LERNSTY, 为血栓抑制剂开发奠定基础.

参考文献:

- [1] Makris M, Calizzani G, Fischer K, et al. EUHASS: The European haemophilia safety surveillance system[J]. *Thrombosis Research*, 2011, 127(S2): 22-25.
- [2] Stoll G, Kleinschnitz C, Nieswandt B. Molecular mechanisms of thrombus formation in ischemic stroke: Novel insights and targets for treatment[J]. *Blood*, 2008, 112(9): 3555-3562.
- [3] Furie B, Furie B C. Mechanisms of thrombus formation[J]. *New England Journal of Medicine*, 2008, 359(9): 938-949.
- [4] Liu J. Research and development of biotechnology and drugs[J]. *Journal of University of Science & Technology of China*, 2008, 38(8): 905-908.
- [5] Stegner D, Nieswandt B. Platelet receptor signaling in thrombus formation[J]. *J Mol Med(Berl)*, 2011, 89(2): 109-121.
- [6] Welsh R C, Roe M T, Steg P G, et al. A critical re-appraisal of aspirin for secondary prevention in patients with ischemic heart disease[J]. *American Heart Journal*, 2016, 181: 92-100.
- [7] Zhang L, Sun Y. Biomimetic design of platelet adhesion inhibitors to block integrin alpha2beta1-collagen interactions: I. Construction of an affinity binding model [J]. *Langmuir*, 2014, 30(16): 4725-4733.
- [8] Zhang L, Zhang C, Sun Y. Biomimetic design of platelet adhesion inhibitors to block integrin alpha2beta1-collagen interactions: II. Inhibitor library, screening, and experimental validation[J]. *Langmuir*, 2014, 30(16): 4734-4742.
- [9] Zhang Chao, Zhang Lin, Zhang Youcai, et al. Development of antithrombotic nanoconjugate blocking integrin alpha2beta1-collagen interactions[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 26292.
- [10] Lipinski C A. Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability[J]. *Journal of Pharmacological & Toxicological Methods*, 2000, 44(1): 235-249.
- [11] Serajuddin A T. Salt formation to improve drug solubility [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2007, 59(7): 603-616.
- [12] Loftsson T. Aqueous solubility and true solutions[J]. *Pharmazie*, 2010, 65(6): 404-407.
- [13] 邓联东, 董岸杰, 张跃庭, 等. 负载紫杉醇的两亲性共聚物纳米粒[J]. 天津大学学报, 2004, 37(1): 15-18.
- [14] Deng Liandong, Dong Anjie, Zhang Yueting, et al. Paclitaxel-loaded amphiphilic copolymer nanoparticles[J]. *Journal of Tianjin University*, 2004, 37(1): 15-18(in Chinese).
- [15] Deglau T E, Maul T M, Villanueva F S, et al. In vivo PEG modification of vascular surfaces for targeted delivery[J]. *J Vasc Surg*, 2012, 55(4): 1087-1095.
- [15] 张麟, 孙娜. 血栓纳米抑制剂 m5k-BAD-L 的构建及其性能研究[J]. 天津大学学报: 自然科学与工程技术版, 2017, 50(5): 477-482.
- [15] Zhang Lin, Sun Na. Design and characterization of antithrombotic nanoconjugate—m5k-BAD-L[J]. *Journal of Tianjin University: Science and Technology*, 2017, 50(5): 477-482(in Chinese).
- [16] Emsley J, Knight C G, Farndale R W, et al. Structural basis of collagen recognition by integrin $\alpha 2\beta 1$ [J]. *Cell*, 2000, 101(1): 47-56.
- [17] Calderwood D A, Tuckwell D S, Eble J, et al. The integrin alpha1 A-domain is a ligand binding site for collagens and laminin[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(19): 12311-12317.
- [18] Jung S M, Moroi M. Platelets interact with soluble and insoluble collagens through characteristically different reactions[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273(24): 14827-14837.
- [19] Cruz M A, Chen J, Whitelock J L, et al. The platelet glycoprotein Ib-von Willebrand factor interaction activates the collagen receptor alpha2beta1 to bind collagen: Activation-dependent conformational change of the alpha2-I domain[J]. *Blood*, 2005, 105(5): 1986-1991.
- [20] Ivaska J, Kapyla J, Pentikainen O, et al. A peptide inhibiting the collagen binding function of integrin 2I domain[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274(6): 3513-3521.
- [21] Miller M W, Basra S, Kulp D W, et al. Small-molecule inhibitors of integrin alpha2beta1 that prevent pathological thrombus formation via an allosteric mechanism[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2009, 106(3): 719-724.
- [22] Trott O, Olson A J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading [J]. *Journal of Computational Chemistry*, 2010, 31(2): 455-461.

(责任编辑: 田 军)