

人类巨细胞病毒编码 US28 受体拮抗性多肽的筛选鉴定及体外活性研究*

李璐** 何滔** 莫雪梅 李秀英 张光 孙晗笑***

(暨南大学药学院基因组药物研究所, 广州 510632)

摘要 立足 US28 的广谱趋化因子结合活性, 寻找拮抗剂多肽的先导物。通过预测 US28 的结合模拟位设计多肽序列, 合成相关多肽, 再利用自建的 25 种趋化因子随机构成的噬菌体 12 肽库筛选结合模拟位, 竞争性 ELISA 方法验证, 从而获得 30 个阳性克隆, 测序并推导氨基酸序列, 得到 7 种序列: GSESLNAHCALW、EIDGFNAHCALL、VIARLNAHCALR、ATECLNAHCALW、VIESLNAHCALW、DNGSINAHCALL 及 VKKTLNAHCALR。所有序列富含疏水氨基酸, 其中 8 个克隆有 LNAHCAL 保守序列。采用趋化抑制实验检测多肽对生理性趋化因子引起的细胞迁移活性的影响, 流式细胞仪检测细胞内钙离子浓度变化。结果表明, 利用人源趋化因子序列构建肽库并筛选有效序列的方法取得成功, 筛选出的阳性克隆保守序列 LNAHCAL 可以模拟 Human MIP-1 β 与 US28 N 端的结合位, 从而与合成多肽 H22 结合, 多肽 H22 可以阻断受体结合生理性趋化因子形成的趋化作用, 本身不引起趋化运动, 不影响胞内信号转导和细胞自然活性, 具有广谱趋化因子拮抗剂的可能性。

关键词 人类巨细胞病毒, US28, 结合模拟位, 趋化抑制, 拮抗剂

学科分类号 R392

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00771

人类巨细胞病毒 (human cytomegalovirus, HCMV) 是一种重要的 DNA 病毒, 在普通人群中存在较高的隐性感染率^[1]和致癌潜能^[2-3]。已有的研究显示, 多种人类病毒的基因组中均有编码趋化因子 / 受体类似物的基因。这些病毒趋化因子 / 受体在病毒感染机体和病变过程中充当着正常人源趋化因子 / 受体的“诱骗配体 / 受体”作用^[4-6]。US28 作为人类巨细胞病毒编码的 4 个七次跨膜^[7]趋化因子受体之一^[8], 是一个广谱的 CC 类炎症趋化因子受体^[9], 在 HCMV 感染的细胞中对 β 趋化因子的结合和钙流信号诱导起重要作用^[10]。以往的研究分别从受体和配基突变的两个方面进行分析^[11], 即已显示出趋化因子与 US28 分子间相互作用的研究存在积极的前景。

本文旨在通过对 US28 进行跨膜结构域和结合模拟位的预测, 寻找出其 N 端与趋化因子激动的部位, 合成相应部位的多肽, 构建 25 种人源性趋化因子组成的噬菌体随机 12 肽库, 利用噬菌体展示技术对合成的多肽进行筛选, 运用游离阻断和竞

争性 ELISA 验证结果, 再对该多肽进行体外细胞定向迁移活性及其钙离子信号通路研究, 证明其作为广谱趋化因子拮抗多肽的可能性, 最终筛选出能阻断 US28 与其对应的 CC 类趋化因子相互作用、具有更少免疫原性和更强活性以用来作为拮抗剂的小分子先导物, 同时为大通量筛选广谱抗炎作用先导物提供了平台。

1 材料与方法

1.1 材料

H22 合成多肽、Biotin-H22 多肽和 R. Ch-12 噬

* 国家自然科学基金资助项目(3087221)、广东省关键领域重大项目(粤科计字[2005]162 号)和广州市重大科技计划资助项目(2005Z1-E4081)。

** 共同第一作者。

*** 通讯联系人。

Tel: 020-38375022, E-mail: sunhx718@yahoo.com.cn

收稿日期: 2009-12-31, 接受日期: 2010-03-10

菌体肽库均由本实验室制备; 凝胶图像分析系统、自动酶标分析仪和微型蛋白质电泳及转印系统均为美国 BIO-RAD 公司产品; 高效液相色谱仪为美国 Waters 公司产品; 流式细胞仪(FACS Calibur)为美国 Becton Dickinson 产品; Typton、Yeast Extract 购自 OXOID 公司; IPTG、X-gal、OPD、盐酸四环素及 BSA 均购自 Genview 公司; 脱脂奶粉购自美国 DB Difco 公司; NaN_3 购自 Sigma 公司; 大肠杆菌 TG 1、噬菌粒 pCANTAB5 和辅助噬菌体 M13K07 购自 Amersham 公司; HRP/Anti-M13 Monoclonal Conjugate 购自美国 GE Healthcare 公司; HUMAN MIP-1 β 购自美国 Peprotech 公司; vMIP 购自美国 R&D System; Transwell 趋化装置购自美国 Corning 公司; Fluo-3 (AM) 购自美国 Biotium 公司; 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 生物信息学分析. 依据美国国立生物信息中心(NCBI)提供 DNA 序列数据库 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/index.html>)上查找到人类巨细胞病毒国际标准株 AD169 的 US28 完整氨基酸序列, 利用 TMHMM(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)、DAS (<http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/>)、TopPred (<http://mobyle.pasteur.fr/cgi-bin/MobylePortal/portal.py?form=toppred>)等方法来进行 HCMV US28 跨膜结构域的预测. 运用哈佛大学在线抗原性指数(AI)预测软件、BioEdit 软件以及 DNASTAR 软件进行 US28 结合模拟位的预测. 综合以上所得数据, 选择 US28 的 N 端 14~35 的氨基酸序列(Phe-Asp-Tyr-Asp-Glu-Asp-Ala-Thr-Pro-Cys-Val-Phe-Thr-Asp-Val-Leu-Asn-Gln-Ser-Lys-Pro-Val)作为目标合成多肽, 将此段多肽命名为 H22.

1.2.2 多肽的合成、纯化与检测. 采用 Fmoc-固相法合成, 用 HPLC 纯化多肽并进行高效反相色谱, 收集目的峰多肽冻干保存. 分别取微量 H22 冻干粉溶于 50% 甲醇中, 按 20 μl 上样到 Kromasil C18 柱内, 乙腈洗脱, 220 nm 波长检测 H22 的纯度, 溶于一定量双蒸水中, ABI2000 ESI-LC-MS 进行质谱分析. 以 FluoReporter Biotin-XX Protein Labeling Kit 生物素(Invitrogen 公司)标记多肽. HPLC 使用 XB-C18 柱检测纯度.

1.2.3 噬菌体十二肽库的构建.

按本实验室已确定的肽库构建方法, 参考文献[12]选取目标序列构建十二肽库, 方法简述

如下:

a. 随机 DNA 片段、PCR 引物和测序引物的合成与纯化: 根据 GenBank 上人 C 类、CC 类、CXC 类和 CX₃C 类趋化因子共 25 种基因全长为靶标, 用 Premier5.0 设计引物, 合成编码人源性趋化因子的 DNA 片段、PCR 引物和测序引物, 同时合成用于扩增 12 肽随机 DNA 片段的 5'端和 3'端 PCR 扩增引物和测序引物. 以上合成片段经 PAGE 鉴定后再用凝胶柱纯化.

b. 电转化: 随机 DNA 片段的 PCR 扩增进行 5 个循环, 95 $^{\circ}\text{C}$ 2.5 min, 42 $^{\circ}\text{C}$ 4 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 4.4 min. 扩增产物经 PAGE 纯化后依次经 *Sfi* I、*Not* I 消化, 回收双酶切产物与 pCANTAB5E 载体连接, 电转化感受态宿主细胞 TG1, 铺于含有氨苄青霉素、葡萄糖的 2 $\times$ YT 细菌固体培养基(2 $\times$ YTAG)平板上, 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜. 随机挑选 12 个克隆, 提取质粒, *Sfi* I/*Not* I 双酶切, 检测转化效率. 经辅助噬菌体 M13K07 超感染, 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜, 收集上清, 以终浓度为 3%-PEG 及 4%-NaCl 沉出噬菌体, PBS 悬浮噬菌体沉淀, 即为噬菌体表面呈现的 25 种人趋化因子原始 12 肽库, 将此肽库命名为 R. Ch-12.

1.2.4 R. Ch-12 噬菌体肽库筛选.

a. 以 H22 多肽为靶分子, 用 PL+S 法进行三轮筛选: 以链亲和素 100 μM /孔 4 $^{\circ}\text{C}$ 包被过夜; 加满封闭液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置 2 h, 同时将 1 μg Biotin-H22 与噬菌体十二肽库(2×10^{11} pfu)室温孵育 1 h; 封闭结束后用 0.1%TBST 洗板 6 次, 加入上述 H22 与肽库混合物, 室温 1 h; 加入 Biotin 孵育 5 min, 洗板; 加入甘氨酸-盐酸洗脱缓冲液, 室温 10 min, 用 1 mol/L Tris-HCl 中和洗脱液. 取 1 μl 洗脱产物用于滴度测定, 其余全部扩增、纯化. 自第二轮筛选起, 降低靶分子 Biotin-H22 的投入量(0.1 μg 和 0.01 μg), 洗液改为 0.5% TBST. 第三轮筛选洗脱产物直接测定滴度.

b. 噬菌体滴度测定: 挑取 ER2738 单个菌落培养至对数生长期($A_{600}=0.5 \sim 1.0$), 用 LB 培养液将洗脱液按(未扩增的以 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} ; 已扩增的以 10^{-8} 、 10^{-9} 、 10^{-10})稀释, 取 10 μl 稀释液加到 200 μl ER2738 菌液中, 室温感染 5 min; 然后铺板计数. 噬菌体滴度(pfu/ml)=噬斑数 $\times 10^3 \times$ 稀释倍数.

c. 噬菌体扩增与纯化: 取 50~100 μl 第一轮洗脱产物投入 20 ml LB(含 1:100 稀释的 ER2738

细菌)培养液中, 于 37℃ 250 r/min 快速摇瓶培养 4~5 h, 全部转入离心管中. 经 4 次离心(4℃, 10 000 r/min, 15 min, 弃上清, 2 min)纯化, 留取最终上清即得扩增产物, 用于下一轮筛选.

d. 噬菌体原种的制备: 用 LB 培养基按 1:100 比例稀释对数生长期的 ER2738, 2 ml/管分装到试管中, 随机挑取第三轮滴度板上的蓝色噬菌斑接种到菌液中, 37℃ 快速摇瓶培养 4~5 h. 转入离心管, 离心 2 次(4℃ 8 000 r/min, 15 min)留取上清; 即得噬菌体原种上清, 于 -20℃ 保存.

e. 噬菌体克隆单链 DNA 的提取: 取 500 μ l 噬菌体原种上清, 混匀于 200 μ l PEG/NaCl, 室温, 10 min, 离心 2 次(4℃ 10 000 r/min, 15 min)去上清; 加入 100 μ l 碘离子缓冲液充分悬浮沉淀, 再加入 250 μ l 无水乙醇, 室温, 10 min; 离心得沉淀; 乙醇洗涤, 真空吸干, 悬于 30 μ l TE 溶液中, 电泳鉴定 DNA 条带; 保存于 -20℃, 用于测序.

1.2.5 噬菌体克隆鉴定.

a. 噬菌体克隆与 H22 多肽结合实验. H22 (25 mg/L)和 0.1 mol/L Tris-HCl(pH 8.8)各 50 μ l/孔包被酶标板, 10%脱脂奶封闭, 将噬菌体克隆(50 μ l/孔)分别加入 H22 包被与仅包被 Tris-HCl 的孔中, 37℃ 1 h, 加入 HRP-抗 M13 单抗, 37℃ 1 h, OPD 显色, 2 mol/L H₂SO₄ 终止反应, 测 A₄₉₀.

b. 游离 H22 多肽阻断实验. 链亲和素(5 mg/L)以 50 μ l/孔包被, 10%脱脂奶封闭后加入 Bio-H22 (10 mg/L) 37℃ 1 h, 同时将不同浓度游离 H22 与 No.5 噬菌体等体积混合 37℃ 孵育 30 min. 将上述混合物加入孔中 37℃ 作用 1 h, 加 HRP-抗 M13 单抗, OPD 显色, 2 mol/L H₂SO₄ 终止反应, 测 A₄₉₀.

c. HUMAN MIP-1 β 竞争抑制实验. 5 mg/L 亲和素 50 μ l/孔包被酶标板, 封闭后加入 Bio-H22 (10 mg/L) 37℃ 孵育 1 h, 加入等体积 No.5 克隆和不同浓度的 MIP-1 β , 37℃ 孵育 1 h 后依次加 HRP-抗 M13 单抗, OPD 显色, 2 mol/L H₂SO₄ 终止反应, 测 A₄₉₀.

d. DNA 测序及氨基酸序列. 使用商品肽库自带引物送交广州 Invitrogen 公司测序, 根据 DNA 序列推导氨基酸序列.

1.2.6 生物学活性检测.

a. 外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)的分离纯化. 参照 Ficoll 密度梯度离心法分离^[13]. 采集新鲜的肝素(20 U/ml)

抗凝血 5 ml, 用等体积 PBS 稀释, 缓缓铺于含等体积淋巴细胞分离液的试管中, 400 g 离心 20 min, 吸出淋巴细胞层, 用 Tris-NH₄Cl 溶解残存红细胞, 再用 PBS 洗涤 2 次. 即可得到较为纯净的 PBMCs. 用 1640 完全培养基调整细胞数为 2 $\times$ 10⁶ 个/ml 备用.

b. 体外趋化活性分析. 24 孔(0.5 μ m 孔径) Transwell 趋化小室, 下室以 600 μ l 不同浓度 H22 为趋化溶液, hMIP-1 β (10 μ g/L)为阳性对照, 1640 培养基为阴性对照, 上室加入 100 μ l 细胞悬液进行趋化. 2 h 后取出上室, 收集下室细胞转移到 96 孔板中, MTT 比色法^[14]以检测波长 570 nm, 参考波长 630 nm, 测定各孔吸光度 A 值, 并按下式计算趋化指数. 趋化指数=(实验组 A 值均数/阴性组 A 值均数)^[15].

c. 趋化抑制作用实验. 24 孔 Transwell 板下室以 hMIP-1 β (10 μ g/L) 600 μ l 为趋化溶液, 上室加入 100 μ l 经不同浓度 H22 或 vMIP 预处理(4℃, 30 min)的细胞悬液, vMIP 为阳性对照, 1640 培养基为阴性对照, 同上方法进行. 检测 A₅₇₀/A₆₃₀ 值, 并按下式计算细胞迁移抑制率. 抑制率=(1-实验组 A 值均数/阴性组 A 值均数) $\times$ 100%.

1.2.7 细胞内钙离子浓度的影响. 将 PHA(5 mg/L)加入细胞悬液, 37℃, 5% CO₂ 中培养 24 h, 按实验分组分别加入 hMIP-1 β 或 H22, 4℃ 处理 30 min, 加入 Fluo-3(6 mmol/ml)探针, 室温避光孵育 30 min 后用 PBS 洗涤, 过滤上样流式细胞仪, 激发波长 488 nm, 检测波长 530 nm, 每管样品检测 10 000 个细胞, 获取数据用 CELL Quest 分析结果^[16].

2 结 果

2.1 多肽固相合成和纯度检测

2.1.1 H22 和 Biotin-H22 的固相合成和纯度检测. 通过 Fmoc-固相合成法成功合成了来源于 US28 的多肽 H22, 用试剂盒进行 5' 标记 Biotin. 利用 HPLC 进一步检测合成的多肽 H22 和 Biotin-H22 的纯度分别为 93.618%和 84.753%, 即合成纯化后的多肽已达到进行筛选噬菌体肽库所需的纯度.

2.1.2 多肽合成的准确性检测. 经过质谱图对合成多肽和 Biotin 标记合成多肽分析所得, 检测数值分别与其对应理论值相符, 证明合成的多肽 H22 和 Biotin-H22 多肽无误(图 1, 2).

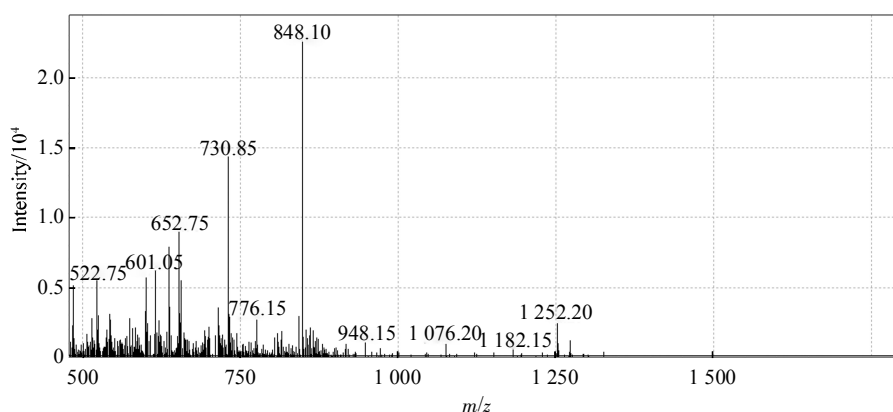


Fig. 1 Mass-spectrum analysis of H22 peptide

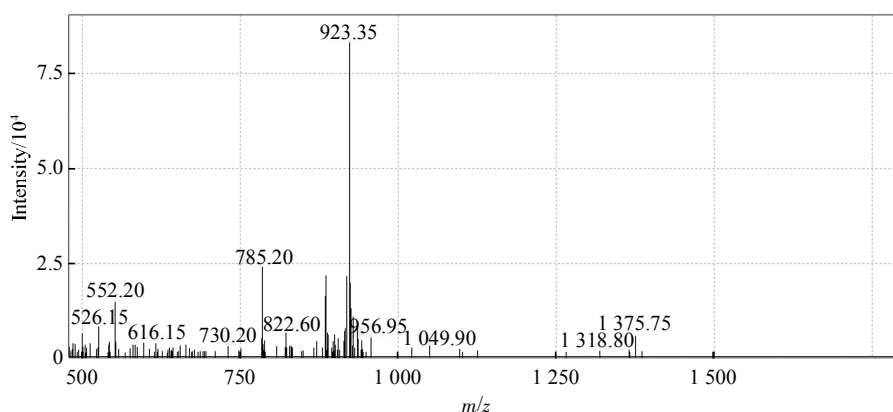


Fig. 2 Mass-spectrum analysis of Biotin-H22 peptide

2.2 肽库筛选

2.2.1 R. Ch-12 噬菌体肽库的鉴定. 连接产物电转化后, 取样进行平板计数, 结果表明含有 2.4×10^6 个原始克隆, 即该随机肽库的库容量为 2.4×10^6 . 原始肽库扩增后再次进行平板计数为 1.6×10^8 , 所构建肽库的库容量可基本满足筛选的要求.

2.2.2 R. Ch-12 噬菌体肽库的滴度测定. 在 LB 培养液中进行 10 倍系列的噬菌体稀释, 稀释范围: 扩增的噬菌体培养物上清为 $10^{-8} \sim 10^{-11}$; 未扩增的淘选洗脱物为 $10^{-1} \sim 10^{-4}$. 只有蓝色噬菌斑才是实验所需的文库噬菌体. 图 3 显示 LB/IPTG/Xgal 平板进行滴度测定结果.

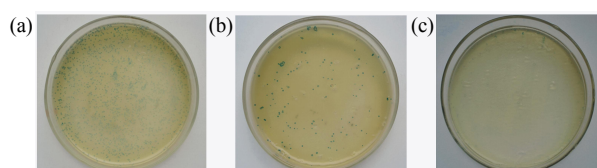


Fig. 3 Titering of phage of 10-fold serial dilutions

(a), (b), (c) corresponding to 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} of dilution consistency.

2.2.3 游离 H22 多肽筛选肽库(PL+S 法). 以 PL+S 法筛选肽库, 在三轮筛选中, 逐轮降低 Bio-H22 投入量, 增加筛选压力. 以 HUMAN MIP-1 β 为特异性配基, 竞争洗脱结合 H22 多肽的噬菌体克隆. 结果显示回收率逐轮提高, 富集效果明显(表 1).

Table 1 Affinity panning of phage library
by using free peptide H22 as target

Round of biopanning	Input phage (pfu)	Output phage (pfu)	Yield
1	2×10^{11}	0.8×10^5	4×10^{-7}
2	1×10^{11}	1×10^5	1×10^{-6}
3	1×10^{11}	0.9×10^7	9×10^{-5}

2.2.4 噬菌体单链 DNA 电泳鉴定. 阳性噬菌体经扩增、纯化后提取单链 DNA, 1% 琼脂糖凝胶电泳分析可见 DNA 带型基本一致, 且条带处于同一水平, 大小与噬菌体 DNA 大小一致, 确证为噬菌体单链 DNA(图 4, 5).

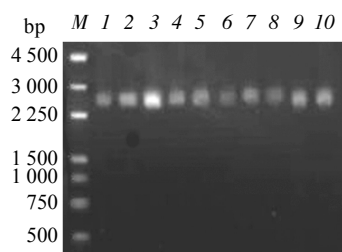


Fig. 4 Electrophoresis of No.1~10 phage single-stranded DNA

M: 250 bp DNA ladder marker; 1~10: ssDNA of No.1~10 phage clone.

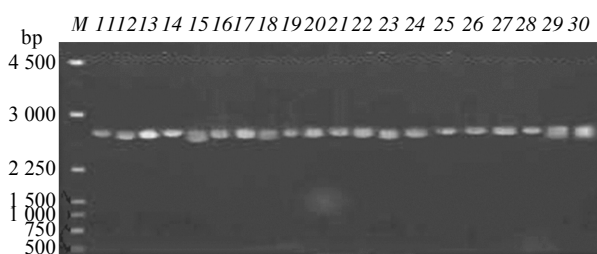


Fig. 5 Electrophoresis of No.11~30 phage single-stranded DNA

M: 250 bp DNA ladder marker; 11~30: ssDNA of No.11~30 phage clone.

2.3 阳性噬菌体克隆的鉴定

2.3.1 噬菌体克隆与 H22 多肽的结合. 利用 ELISA 方法对第三轮筛选后随机挑选的 30 个噬菌体克隆进行鉴定, 以确定噬菌体克隆与 H22 的特异性结合, 实验中设立仅 Tris 包被的平行对照, 以排除非特异性吸板克隆. 结果显示, 共有 18 个克隆与 H22 具有较强结合, 为阳性克隆. 阳性率为 60%, 证明亲和筛选方案可行.

2.3.2 噬菌体克隆特异性鉴定. 为鉴定所得的阳性克隆为 HCMV US28 N 端结合序列, 用游离 H22 多肽阻断阳性噬菌体克隆 No.5 与固定的 H22 结合. 结果显示(图 6), H22 可特异性抑制 No.5 克隆与固定化 N 肽结合(无关肽对照不能抑制噬菌体克隆与 N 肽结合, 因此在图中未体现). 上述结果提示 No.5 所展示序列为特异性结合 N 肽序列.

2.3.3 HCMV US28 N 端模拟位的鉴定. 在已证明 No.5 噬菌体所展示序列为 US28 N 端结合序列后, 为进一步验证该噬菌体表达寡肽为 Human MIP-1 β 模拟位, 用 HUMAN MIP-1 β 抑制 No.5 克隆与

H22 多肽结合. 结果显示(图 7)随着 HUMAN MIP-1 β 浓度降低, 其抑制率也降低, 提示 No.5 克隆呈现的序列可模拟 Human MIP-1 β 表位.

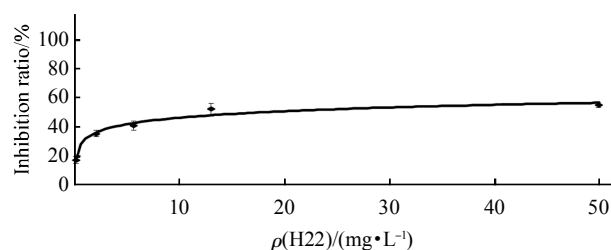


Fig. 6 Blocking of the binding between No.5 phage and Bio-H22 by free peptide H22

◆: Observed; —: Logarithmic.

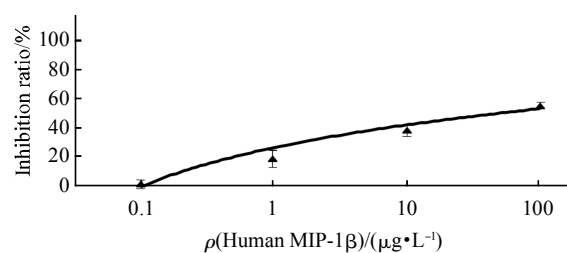


Fig. 7 Competitive inhibition of the binding between No.5 phage and peptide Bio-H22 by MIP-1 β

▲: Observed; —: Logarithmic.

2.4 DNA 测序并推导氨基酸序列

使用游离 N36 肽筛选肽库对其中 10 个阳性克隆进行 DNA 测序, 推导其氨基酸序列, 结果得到保守序列 LNAHCAL(表 2), 其中 8 个克隆都表达 LNAHCAL 序列(占 80%), 提示可能模拟 Human MIP-1 β 与 US28 N 端的结合位, 从而与合成多肽 H22 结合.

Table 2 Amino acid sequences deduced from the DNA sequences

Phage clone	Amino acid sequence	Number of hydrophobic residues(L, W, V, Y)
1	GSESLNAHCALW	3
2	EIDGFNAHCALL	2
3, 9	VIARLNAHCALR	3
4	ATECLNAHCALW	3
5, 7, 10	VIESLNAHCALW	4
8	DNGSINAHCALL	2
16	VKKTLNAHCALR	3

2.5 生物学活性分析

2.5.1 多肽 H22 的体外趋化效应. 相对于正常对照

照组, 0.1~1 000 μg/L 的 H22 趋化作用不显著, 差异无统计学意义($P>0.05$, 表 3, 图 8).

Table 3 The result of peripheral blood mononuclear cells migration caused by H22

Groups	Control	$\rho(\text{hMIP-1}\beta)/(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$		$\rho(\text{H22})/(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$			
	-	10	0.1	1	10	100	1 000
A_{570}/A_{630}	0.217 ± 0.081	0.883 ± 0.069	0.319 ± 0.095*	0.438 ± 0.096*	0.376 ± 0.071*	0.284 ± 0.094*	0.35 ± 0.062*
Chemotaxis index	-	4.08	1.47	2.01	1.73	1.31	1.64

Compared with control group, * $P>0.05$.

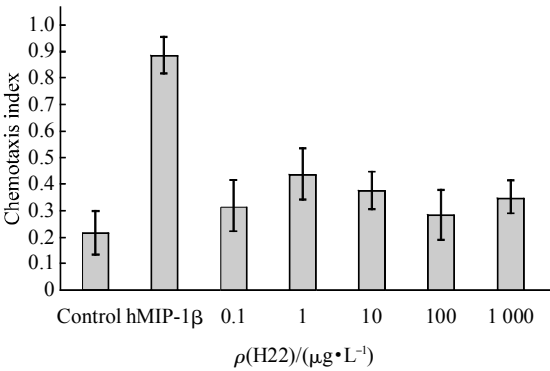


Fig. 8 The migration effects of peptide H22 shows on peripheral blood mononuclear cells

引起的 PBMCs 趋化迁移作用, 并呈计量依赖型, EC_{50} 为 30.9 μg/L($P<0.01$, 表 4, 图 9).

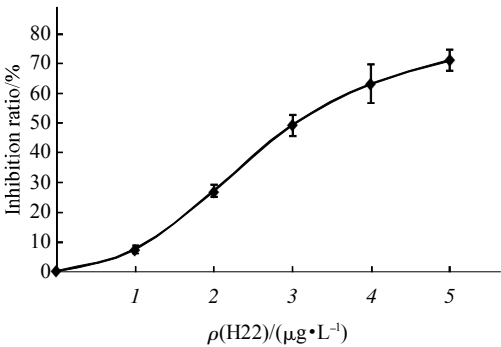


Fig. 9 The inhibition effects of peripheral blood mononuclear cells migration

2.5.2 对生理性趋化因子的趋化抑制作用. 多肽 H22 在 0.1~1 000 μg/L 浓度间能明显抑制 hMIP-1β

Table 4 The result of peptide inhibitor effecting on cell migration caused by hMIP-1β

Groups	Control	$\rho(\text{vMIP})/(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$		$\rho(\text{H22})/(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$			
	-	10	0.1	1	10	100	1 000
A_{570}/A_{630}	0.889 ± 0.084	0.215 ± 0.037	0.821 ± 0.088	0.649 ± 0.146*	0.459 ± 0.062*	0.320 ± 0.075*	0.270 ± 0.082*
Inhibition Ratio(%)	-	-	7.64	27.30	49.40	63.30	71.30

Compared with control group, * $P<0.05$.

2.6 多肽 H22 对钙离子信号通路的影响

相对于正常对照组, H22 能明显诱导细胞内钙离子浓度的升高($P<0.01$), 同时, 相对于阳性对照组, H22 预处理细胞可使 hMIP-1β 诱导的钙离子浓度明显下降($P<0.01$, 表 5, 图 10, 11).

Table 5 Fluorescence of calcium caused by peptide H22 and chemokine

Groups	Fluorescence
Control	861 ± 70.61
hMIP-1β(10 μg/L)	1 208 ± 47.25 ¹⁾
H22 (100 μg/L)	1 271 ± 80.41 ¹⁾
H22 Handled	950 ± 87.32 ²⁾

Compared with control group, ¹⁾ $P<0.01$; Compared with positive group, ²⁾ $P<0.05$.

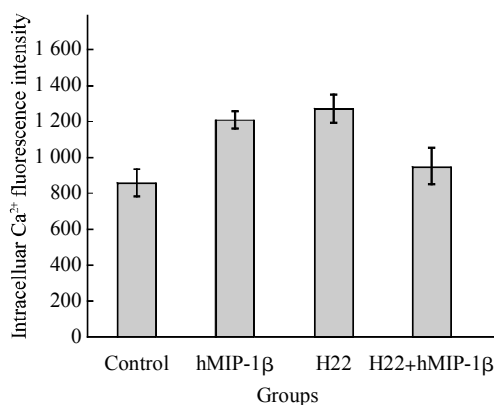


Fig. 10 The influence of H22 effecting on intracellular calcium

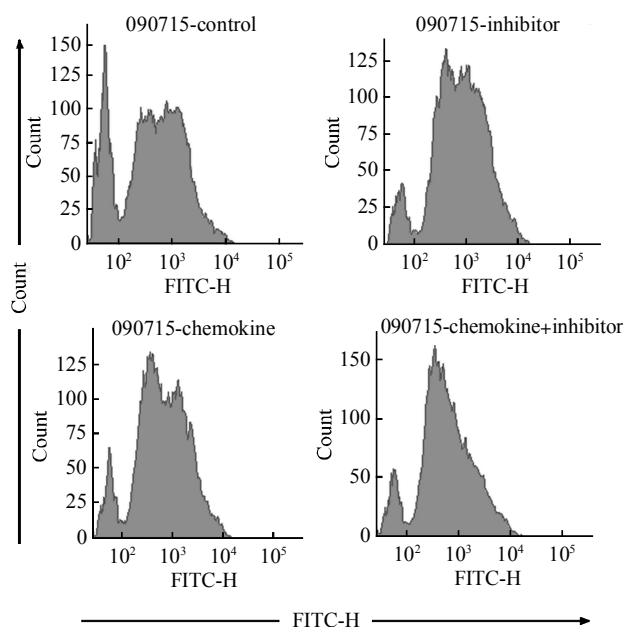


Fig. 11 Flow cytometric analysis shows the peak value of calcium fluorescence

3 讨 论

通过以往的研究我们了解到,要使趋化因子及其受体相互作用产生信号,必须要让趋化因子受体发生变构效应,趋化因子与其受体胞外环结合是非常关键的一步,而信号的产生,又依赖于跨膜螺旋上的高度保守序列^[17-20].研究有关趋化因子受体的胞外环和跨膜螺旋的文献占多数,因为变构与信号产生对研究趋化因子及其受体作用的整个信号体系有基础和关键的意义.相反,趋化因子受体N端的研究相对较少,由于它多是关于与趋化因子间最初的相互作用,而作为趋化因子及其受体结合的

第一步对于研究整个信号体系略显次要.但是,在药物靶点筛选方面,可以尝试从趋化因子及其受体之间N端相互作用入手,起到拮抗剂的作用,从而达到筛选目的.

在设计多肽序列时我们采用了生物信息学的方法,避免了随机合成法的盲目性以及巨大的成本.在获得HCMV国际标准株AD169的US28完整氨基酸序列之后,我们需要对US28进行跨膜结构域的预测,从而获得其胞外的N端序列.由于膜蛋白难以结晶,因此只有借助鉴定膜蛋白和研究膜蛋白结构和拓扑排列的计算方法来对其结构进行预测.TMHMM、DAS、TopPred以及PHDhtm和PHDtopology等跨膜螺旋预测器都是通过组合精巧的统计量或人工神经网络(artificial neural networks, ANN)探索出潜在的跨膜螺旋.通常建议用共识的解决方案来预测蛋白质的跨膜结构域^[21-22],因此我们选用了TMHMM、DAS和TopPred来共同预测.另外,对US28N端结合模拟位点进行预测,可进一步精确有效肽段的范围.哈佛大学在线抗原性指数预测软件是用Kolaskar and Tongaonkar方法进行分析的,它使用了物理化学方法对氨基酸残基分析并且通过一个半经验的模块(归纳了试验得到的抗原决定簇数据)来预言蛋白质的抗原决定部位.BioEdit软件以Kyte & Doolittle Mean Hydrophobicity Profile方法是通过R基团特性来预测多肽的亲水性和疏水性强弱,一般亲水性高的序列抗原性也高.最后,利用DNASTar软件以Antigenicity-Jameson Wolf方法对US28序列进行抗原性预测^[23],Jameson和Wolf根据前人成果,建立了抗原性预测分式: $A_i = \sum 0.3(H_i) + 0.15(S_i) + 0.15(F_i) + 0.2(cFi) = 0.2(RGi)$, A_i 值高即抗原位点可能性高.

应该指出的是,在竞争抑制实验中,我们发现,用HUMAN MIP-1β抑制分子,最终所得的曲线均较平滑,抑制率最高未达到60%以上,最低未下降到1%以下,考虑可能有如下原因:a.所得到的阳性序列所模拟的位点尚且不理想,推测与H22多肽在筛选中构象发生微弱变化有关.H22多肽在液相中极不稳定,容易聚集,这可能会影响噬菌体(展示在噬菌体载体上的模拟短肽)的获得.b.用短肽作为筛选的靶分子尚不完善,因短肽特性不同于普通蛋白和单克隆抗体,筛选及鉴定中各种缓冲液的变化均有可能影响肽的结合特性.

自Smith^[24]建立噬菌体展示技术(phage display technique, PDT)以来,该技术因操作简便、高效,

应用范围已从最初的确定抗原表位, 发展到目前用于新型药物和疫苗的高通量筛选, 是理想的实验方法. Hartley 等^[25]对于 HIV 抑制剂的筛选已取得成功. 本研究中为了筛选到位点专一、能模拟 HCMV 的 US28 N 端、可准确地与 Human MIP-1 β 结合的寡肽, 我们选择具有针对性的 4 类 25 种趋化因子构建随机肽库, 运用噬菌体展示肽库得到了可与 HCMV US28 N 端结合的阳性序列, 为探索开发趋化因子炎症药物的可行性提供试验依据. 在此基础上进行改造则有望获得炎症和免疫排斥抑制类的趋化因子短肽, 所得短肽是否具有病毒抑制和清除的作用还有待进一步证实.

通过观察多肽 H22 对该受体特异的生理性趋化因子所引起的外周血单个核细胞定向趋化和阻断, 我们发现, 经过 H22 预处理的细胞相对于未处理组能够剂量依赖性地降低 hMIP-1 β 导致的迁移, 证明了 H22 可以阻断生理性趋化因子的趋化作用. 细胞内游离钙离子浓度能反映细胞的状态及药物和环境等对细胞的影响. 研究发现, H22 与受体结合后阻止了内源性趋化因子诱导的快速钙流, 从而封闭了钙离子作为第二信使的通道, 而 H22 本身又可引起胞内钙浓度升高, 可知对正常机体的细胞免疫功能无降低作用, 表明其可作为内源性趋化因子抑制剂的准确性, 并由此推断 H22 可作为广谱炎症反应拮抗肽的可能性.

综上所述, 在本研究中, 我们利用生物信息学的方法寻找 US28 的 N 端与趋化因子激动的部位, 合成相应部位的多肽, 通过建构噬菌体肽库筛选鉴定出趋化抑制性短肽, 并且利用 ELISA 方法验证短肽, 进一步验证了短肽的趋化抑制活性、细胞内通路等作用. 这些工作为大通量筛选广谱抗炎作用先导物和有效寻找阻断剂药物靶点提供了有力实验依据并建立了一个较完善的技术平台, 此后将有利于我们对此趋化抑制性短肽潜在的对免疫排斥抑制和炎症的拮抗作用机理, 以及病毒抑制作用的进一步深入研究.

参 考 文 献

- [1] Preiksaitis J K, Larke R P, Froese G J. Comparative seroepidemiology of cytomegalovirus infection in the Canadian Arctic and an urban center. *J Med Virol*, 1988, **24**(3): 299-307
- [2] Doniger J, Muralidhar S, Rosenthal L J. Human cytomegalovirus and human herpesvirus 6 genes that transform and transactivate. *Clin Microb Rev*, 1999, **12**(3): 367-382
- [3] Thompson J, Doniger J, Rosenthal L J. A 79 amino acid oncogene is responsible for human cytomegalovirus mtrI induced malignant transformation. *Arch Virol*, 1994, **136**(1): 161-172
- [4] Mantovani A, Locati M, Vecchi A, *et al.* Decoy receptors: a strategy to regulate inflammatory cytokines and chemokines. *Trend Immun*, 2001, **22**(6): 328-336
- [5] Berczi I, Szentivanyi A. Cytokines and chemokines. *NeuroImmune Biology*, 2003, **3**: 191-220
- [6] Alexander J M, Nelson C A, van Berkel V, *et al.* Structural basis of chemokine sequestration by a herpesvirus decoy receptor. *Cell*, 2002, **111**(3): 343-356
- [7] Chee M S, Bankier A T, Beck S, *et al.* Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Curr Top Microbiol Immun*, 1990, **154**: 125-69
- [8] Waldhoer M, Casarosa P, Rosenkilde M M, *et al.* The carboxyl terminus of human cytomegalovirus-encoded 7 transmembrane receptor US28 camouflages agonism by mediating constitutive endocytosis. *J Biol Chem*, 2003, **278**(21): 19473-19482
- [9] Kuhn D E, Beall C J, Kolattukudy P E. The cytomegalovirus US28 protein binds multiple CC-chemokines with high-affinity. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, **211**(1): 325-330
- [10] Streblow D N, Soderberg-Naucler C, Vieira J, *et al.* The human cytomegalovirus chemokine receptor US28 mediates vascular smooth muscle cell migration. *Cell*, 1999, **99**(5): 511-520
- [11] Casarosa P, Waldhoer M, Patricia J, *et al.* CC and CX3C chemokines differentially interact with the N terminus of the human cytomegalovirus-encoded US28 receptor. *J Biol Chem*, 2005, **280**(5): 3275-3285
- [12] Scott J K, Smith G P. Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science*, 1990, **249**(4967): 386-390
- [13] Gazzinelli G, Katz N, Rocha R S, *et al.* Immune response during human schistosomiasis mansoni: X. Production and standardization of an antigen-induced mitogenic activity by peripheral blood mononuclear cells from treated but not active cases of schistosomiasis. *J Immunol*, 1983, **130**(6): 2891-2895
- [14] Yeap S K, Alitheen N B, Ali A M, *et al.* Effect of *Rhaphidophora korthalsii* methanol extract on human peripheral blood mononuclear cell (PBMC) proliferation and cytolytic activity toward HepG2. *J Ethnopharmacology*, 2007, **114**(3): 406-411
- [15] Enioutina E Y, Bareyan D, Daynes R A. TLR ligands that stimulate the metabolism of vitamin D3 in activated murine dendritic cells can function as effective mucosal adjuvants to subcutaneously administered vaccines. *Vaccine*, 2008, **26**(5): 601-613
- [16] Pia Kivisäkk, Liu Z G, Corinna Trebst, *et al.* Flow cytometric analysis of chemokine receptor expression on cerebrospinal fluid leukocytes. *Methods*, 2003, **293**(4): 319-325
- [17] Wang J B, Babcock G J, Choe H, *et al.* N-linked glycosylation in the CXCR4 N-terminus inhibits binding to HIV-1 envelope glycoproteins. *Virology*, 2004, **324**(1): 140-150
- [18] Moria M, Liua D, Kumara S, *et al.* NMR structures of anti-HIV D-peptides derived from the N-terminus of viral chemokine vMIP-II. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, **335**(3): 651-658
- [19] Palladino P, Tizzano B, Pedone C, *et al.* Structural determinants of unexpected agonist activity in a retro-peptide analogue of the SDF-1 α N-terminus. *Fed Euro Biochem Soc*, 2005, **579** (24): 5293-5298
- [20] Farzan M, Chung S, Li W H, *et al.* Tyrosine-sulfated peptides

- functionally reconstitute a CCR5 variant lacking a critical amino-terminal region. *J Biol Chem*, 2002, **277**(43): 40397–40402
- [21] Simpson R J. Protein and Proteomics: A Laboratory Manual. Beijing: Science Press, 2006: 245–249
- [22] 胡松年. 基因表达序列标签(EST)数据分析手册. 浙江大学出版社, 2005: 195–215
- Hu S N. Handbook of Expressed Sequence Tag (EST) Data Analysis. Hangzhou: University of Zhejiang Press, 2005: 195–215
- [23] 刘旭光, 张 杰. 分子生物学软件应用. 北京大学医学出版社, 2007: 第一版, 149–172
- Liu X G, Zhang J. Application of Molecular Biology Software. Beijing: Peking University of Medicine Press, 2007: 149–172
- [24] Smith G P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, 1985, **228**(4705): 1315–1317
- [25] Hartley O, Dorgham K, Perez-Bercoff D, *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 entry inhibitors selected on living cells from a library of phage chemokines. *J Virol*, 2003, **77**(12): 6637–6644

Biological Functions, Screen and Identify Research on Chemokine Receptor Antagonist Encoded by US28 of Human Cytomegalovirus*

LI Lu**, HE Tao**, MO Xue-Mei, LI Xiu-Ying, ZHANG Guang, SUN Han-Xiao***

(Institute of Genomic Medicine, College of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract Based on a large spectrum of US28, planning to find out new antagon. Membrane spanning domain and epitopes were used to predict a binding mimotope that US28 bound with CC chemokines, the result of which were used to design and synthesize the peptide. The 12 peptide phage library was built sourcing from 25 different chemokines random phages including four families. The binding mimotope of synthesized peptide was screened by phage display technique, and assessed by ELISA assay. PL+S method was used to screen the 12 phage library with the target as biotinylated soluble form peptide H22. Biological activity of H22 were measured with cellular chemotaxis assays and calcium mobilization. Amino acid sequences of the displayed peptides in 10 phage clones were deduced from DNA sequences. They are GSESLNAHCALW, EIDGFNAHCALL, VIARLNAHCALR, ATECLNAHCALW, VIESLNAHCALW, DNGSINAHCALL and VKKTLNAHCALR. Every peptide sequence contains at least 2 hydrophobic residues. Eight of the 10 clones have a conservative sequence LNAHCAL. Chemotaxis assays showed that H22 induced migration of peripheral blood mononuclear, and H22 suppressed PBMCs' migration induced by hMIP-1 β and EC_{50} =30.9 μ g/L. H22 itself was not remarkably associated with the normal, rapid mobilization of calcium from intracellular stores. Instead, it blocked calcium mobilization induced by endogenous chemokines. It proves that using chemokine sequence of human source to build a peptide library and screen effective sequence is available. The conservative sequence could simulate the binding mimotope of Human MIP-1 β interacting with HCMV US28 N-terminus to bind with synthesized peptide H22. The study has demonstrated that peptide H22 cannot stop the biological function of hMIP-1 β and block the signal transduction from hMIP-1 β by the way of calcium pathway, but itself did not affect cells activity.

Key words human cytomegalovirus, US28, binding mimotope, chemotaxis inhibition assay, antagon

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00771

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (3087221), Major Projects in Key Area of Guangdong Province (No.162 Guangdong Scientific Characters[2005]) and Key Project of Science & Technology of Guangzhou City (2005Z1-E4081).

**These authors contributed equally to this work.

***Corresponding author.

Tel: 86-20-38375022, E-mail: sunhx718@yahoo.com.cn

Received: December 31, 2009 Accepted: March 10, 2010