

含 RGD 的配基与其受体相互作用研究进展

孙迎庆 郭 雁 茹炳根

(北京大学蛋白质工程及植物基因工程国家重点实验室, 北京 100871)

摘要 RGD 配基与其受体相互作用目前已成为一个研究热点, 许多粘附蛋白是通过 RGD 序列与其整合素结合的, 它参与许多生物学过程. 文章主要就 RGD 序列肽与糖蛋白 IIb/ IIIa 的相互作用及其在抑制血小板聚集上进行了较为全面的综述, 并介绍了 RGD 序列肽在基础科学及医疗上的应用前景.

关键词 RGD, 整合素, 糖蛋白 IIb/ IIIa, 血小板聚集

早在 80 年代初期, 人们从细胞外基质 (ECM) 中分离出大量的糖蛋白, 这些糖蛋白中有些已被纯化并测定了一级结构, 但是一直到现在也没有全部被纯化. 大多数 ECM 糖蛋白在细胞粘附中起重要作用, 因此称为粘附蛋白 (adhesive protein), 它们中的不少成员有一个共同的特点, 含有一个三肽序列 Arg-Gly-Asp, 简称 RGD, 它是粘附蛋白与细胞表面特异受体蛋白相互作用的识别位点. 这些细胞表面膜蛋白是广泛分布的超级家族——粘附受体的成员, 被称为整合素 (integrin), 介导着许多种类的细胞与细胞以及细胞与底物之间的相互作用, 参与许多生物学过程, 如: 体内平衡调节、吞噬作用、细胞迁移、细胞信号传递、细胞通讯和淋巴细胞的识别、血小板的聚集等等. 因此, 许多病理学过程是与不正常的 ECM 作用相关的^[1], 正是这一点使含 RGD 的多肽或化合物可用于治疗一些疾病, 在此我们只从 RGD 序列肽用于抑制血栓的形成研究方面来探讨 RGD 与其配体的相互作用.

1 与血小板聚集相关的含 RGD 的蛋白

由于血小板在细胞外基质上的粘附、扩展和凝聚是血栓形成过程中非常重要的步骤, 因此如何减弱血小板的聚集是抗栓剂研究的重要内容. 在凝血过程中, 在凝血酶、肾上腺素、胶原等刺激下, 血小板被活化, 其膜受体的结合位点暴露, 从而结合纤维蛋白原, 进而促进

血小板凝聚反应, 这些步骤可由一族叫做血小板粘连糖蛋白来控制, 包括纤维蛋白原 (fibrinogen, Fg)、纤维连接蛋白 (fibronectin, Fn) 和冯·维勒布兰德因子 (von Willebrand Factor, vWF, 遗传性假性血友病因子), 它们都含有保守氨基酸序列 Arg-Gly-Asp (RGD) 区. 血小板膜上的糖蛋白 Gp IIb/ IIIa 复合体是纤维蛋白原、纤维连接蛋白、冯·维勒布兰德因子和玻璃粘连蛋白 (vitronectin) 的受体蛋白, 是最丰富的血小板细胞表面蛋白, 大约有 70% 的复合体随机分布于暴露的血小板表面. 在这些粘连蛋白与其血小板上膜受体识别中, 一些保守氨基酸序列如 RGD 序列及其构象起着重要的作用.

在纤维蛋白原中, 纤维蛋白 A α 链中有两个 RGD 序列, 残基 95~ 97 和 572~ 574, 但只有一个参与受体的结合. RGD (572~ 574) 位于 α 链的 ZC 区, 可与糖蛋白 (Gp IIb/ IIIa) 中 IIIa 的 217~ 302 残基区域结合^[2]. 通过细胞与纤维连接蛋白的结合表明, 对于细胞识别来说 RGD 序列的存在十分必要, 其 RGDSP (Arg-Gly-Asp-Ser-Pro) 位于一个 β 转角, 在分子表面形成一个亲水环^[3]. 冯·维勒布兰德因子的 RGD 序列位于 C 端, 具有抑制血小板凝聚的活性^[4]. 此外, 玻璃粘连蛋白, 骨桥蛋白 (osteopontin), 胶原 (collagen) 和血小板反应

蛋白 (thrombospondin) 中都存在保守序列 RGD, 而且起着不可缺少的作用^[5]. 因此 RGD 序列在血小板的聚集方面有重要作用.

含有 RGD 识别序列的纤维蛋白在血液中含量很高, 是血液循环中与血小板聚集有关的最重要的蛋白质之一, 因此研究 RGD 序列识别机理有利于阐明与血小板聚集有关的血栓的形成.

2 RGD 序列肽研究进展

RGD 三肽在已知的蛋白质序列中应该可出现 400 多次 (1987 年), 而事实上在已知的蛋白质序列中, 用计算机在 NBRF (National Biomedical Research Foundation) 的蛋白质数据库中检索, 只发现了 183 个 RGD 序列, 其中还包括 33 种重复序列^[6], 但只有很少的蛋白质具有细胞粘附活力, 因此只有具有一定构象的 RGD 序列才有与细胞粘附受体特异性结合的特征. 而同一或不同的细胞粘附受体与不同的含 RGD 蛋白结合的特异性有很大的差异. 因此, 自 1984 年 Pierschbacher 和 Ruoslahti^[1]首次确定了 RGD 序列为人纤维连接蛋白与其受体结合位点以来, 对于 RGD 配基与其受体相互作用的特异性的研究就成为一个研究热点.

2.1 RGD 序列肽的分类

目前可用来抑制纤维蛋白原与活化血小板结合的含 RGD 序列的肽可分为五类: a. 人工合成的 RGD 肽, 包括线性小肽、环肽及具有稳定二级结构的多肽; b. 一些天然蛇毒分子, 如蛇毒锯鳞蝥素 (echistatin), 红嘴蝥蛇毒素 (kistrin), 黄绿烙铁头毒素 (flavoridin), decorsin 及 ornatins 等; c. 人工改造的天然蛋白的突变体; d. 抗 Gp II b/ IIIa 的单抗; e. 模仿 RGD 三肽顺序的非肽分子 (nonpeptide molecules that mimic RGD tripeptide sequence).

2.2 RGD 配基与其受体相互作用研究进展

人们合成了一些含 RGD 序列的小肽, 如 RGDS、DRGDW、GRGDSPA 等它们都可抑制纤维蛋白原与血小板的结合, 抑制血栓形

成, 其中 RGD 序列是高度保守的, 是识别受体必需的^[7]. 和 RGD 序列相连的第四位的氨基酸对其活性影响较大, 以疏水氨基酸为佳, 如 Trp、Leu 等, 疏水性越强, 其抑制纤维蛋白原与 Gp II b/ IIIa 结合力越强, RGDW 比 RGDS 对 Gp II b/ IIIa 的亲和力强 200 倍^[8], 此疏水残基可与 Gp II b/ IIIa 的特定区域结合. 此外, 第五位的氨基酸对肽的结合专一性也起重要作用, 用中性氨基酸及 Lys 分别取代 Arg 表明, 第五位残基为 Arg 时对 Gp II b/ IIIa 活力最高, Lys 次之, 中性氨基酸最低, 说明 Arg 很可能是通过胍基与 Gp II b/ IIIa 上的结合口袋结合, Arg 不仅对 Gp II b/ IIIa 亲和性极为重要, 而且不延长 template bleeding time, 即它是将抑制血小板聚集与控制 template bleeding 作用分开的重要因素^[9].

这些小肽虽然具有抑制细胞粘附作用, 但其抑制活性比含同样序列的天然蛋白质低得多, 所以 RGD 在天然蛋白质中的构象以及其附近的氨基酸组成对识别过程极为重要. Ruoslahti 等^[10]报道了环肽 G—Pen—G—R—G—D—S—P—C—A (在 Pen 与 Cys 之间引入了一—S—S—, Pen 为青霉胺), 其抑制大鼠肾细胞与玻璃粘连蛋白的结合能力比线性肽 GRGDSPC 强. 最近, Kumagai 等^[11] (1991 年) 的研究表明环肽 (GRGDSPA) 比线性肽更好地抑制 B16 黑色素瘤细胞与玻璃粘连蛋白或纤维连接蛋白的结合. 这些结果表明在含有 RGD 序列的肽中引入构象限制可提高其与整合素受体的亲和性.

现在的研究表明不仅 RGD 序列周围的一级结构而且它的空间构象对表现出去整合素活性都是必需的. Pierschbacher 和 Ruoslahti^[1]推测粘附蛋白的 RGD 序列可能位于 β 转角的顶端, 近来通过对抑制血小板凝聚的蛇毒红嘴蝥蛇毒素^[12], 蛇毒锯鳞蝥素^[13] 和黄绿烙铁头毒素^[14] 的 ¹H-NMR 研究证明了这点. 这些蛋白的保守 RGD 序列位于一个较大环的尖端, 即位于两个反平行折叠片层形成的 β 转角尖端, 这个环远离分子核心部位, 非常暴露并呈动态

构象,即具有高度的柔性,这种柔性可使 RGD 的构象诱导契合整合素受体的结合“口袋”,就象抗原-抗体结合一样.而且在三肽中氨基酸残基的位置也是不一样的,例如在 FMDV (RGD-containing foot-and-mouth disease virus) 中 RGD 三肽中酸性和碱性侧链的构象位于主链的不同侧^[15]. 由于不同的整合素可与含 RGD 的蛋白配体以不同的选择方式结合,所以所有有功能的 RGD 的构象并不是呈单一的构象状态.

由于 RGD 序列肽具有重要的生物学功能,而人工合成的一些含 RGD 小肽因脱离了周围的构象,而使配基与其受体结合活性大大降低.因此人们将生物活性肽序列 (RGD) 插入到已知三维结构的分子中,研究与其受体相互作用的变化.

免疫球蛋白 (Ig) 轻链可变区、白介素 1 和溶菌酶的三级结构都是了解的比较清楚的经典蛋白. Lee 等^[16]将含有 RGD 序列的肽插入到两种已知结构的 Ig 轻链可变区 (VL) domain REI 和白介素 1 β (IL-1 β) 的环区中,若用 RGD 分别取代三个环区的三个氨基酸而不改变环的长度,则突变体都观察不到与纤维蛋白原竞争 GP II b/III a 受体,而在 Ig 的 CDR3 (complementary determining region 3) 上插入不同长度的含 RGD 序列的蛇毒红嘴蝮蛇毒素 42~57 或 44~55 序列得到三种突变体其 IC_{50} 可在 nmol/L 范围内呈现强的结合 GP II b/III a 的特性,与纤维蛋白原和红嘴蝮蛇毒素相当,而比相应线性肽活力高 100 倍,这个结果表明,REI 支架对 RGD 的构象有好的影响,它对环区改变的容忍性高一些,而取代突变体活力不高是因为支架周围的顺序对结合不利.加上蛇毒 RGD 周围序列后,有利于活性构象的形成,而且使环具有充分的柔性.

Yamada (1994 年)等在人溶菌酶 Val74 和 Asn75 间插入了人玻璃粘连蛋白的 RGD 区域的 4~12 个氨基酸残基,在酵母中表达后都表现出高的细胞粘附性,但只有人玻璃粘连蛋白活力的 10%. 随后他们又在这个位置插入了

另一类含 RGD 的序列,这些序列两侧为 2 个 Cys,两个 Cys 间形成二硫键,三个插入序列为 $-\text{CRGDC}-$, $-\text{CRGDSC}-$, $-\text{CGRGDSC}-$, 这些插入突变体的细胞粘附活性即与整合素 $\alpha_V\beta_3$ 结合力比没有二硫键的突变体高 2~3 倍.这几个突变体也可抑制纤维蛋白原与 GP II b/III a 的结合,这个实验表明 RGD 区中引入适当的构象限制可明显提高细胞粘附活力,这与环状 RGD 肽比相应线性肽对受体有更高亲和性相符,我们先前说,活性的 RGD 构象应该有充分的柔性,但天然的 RGD 序列虽具有高度柔性,但其周围的氨基酸残基限制了其构象,因此,RGD 序列若要与整合素受体具高度的亲和性,既要有一定的柔性,又要有一定的合适构象即构象限制 (conformation restriction)^[17,18].

除了用已知三级结构的蛋白质做为 RGD 序列的支架以外,人工合成的含 RGD 多肽也常用于研究 RGD 与其配体的相互作用. Myszkka 等^[19]合成了一个 56 肽,它折迭成稳定的分子内反平行的卷曲螺旋 (coiled coil) 结构,即杆状螺旋卷曲环结构 (coiled coil stem loop, CCSL). 两个螺旋之间有 6 个氨基酸残基的环相连 (含 RGD 序列),这个 56 肽可与纤维蛋白原竞争 GP II b/III a 受体,其 IC_{50} 为 180 nmol/L,比线性肽 ($IC_{50} = 150$ nmol/L) 抑制活性低,可能是茎环结构对 RGD 构象的限制引起的,失去了充分的柔性.

人工合成多肽也可做为受体粘附模型蛋白 (receptor-adhesive modular proteins, RAMPs) 来研究粘附受体上两个配体结合位点的距离. Slate 等^[20]设计合成了几个 88 残基蛋白,它们均为二聚体,每一单体为 44 残基,含配体、间隔物及卷曲结构,配体上含 RGD 序列,这几个二聚体中 RGD 在空间上的距离不同,虽然距离已至少达 50 nm,但其两 RGD 仍不可同时与 A2058 黑色素瘤细胞结合,说明仍然存在构象限制.

继发现一系列含 RGD 的蛇毒肽抑制血小板的凝集以来,人们又发现了一系列含 RYD

的抗受体抗体 (antireceptor antibody), 包括 PAC-1 (IgM), OP-G2 (IgG1 κ), LJ-CP3 (IgG1 κ). 这些抗体都是抗整合素抗体, 其共同特点是在其重链 CDR3 含有 RYD 序列, 而且证明 RYD 序列具有和 RGD 肽相似的与受体结合的功能, 参与与整合素的结合. 但这几个抗体彼此之间存在着不同的专一性. PAC-1 只结合活化的血小板, 而 OP-G2 及 LJ-CP3 却还可以结合非活化的血小板^[21]. 这与各种 RGD 肽存在不同的专一性相似, 于是人们自然联想到通过对这些抗体的研究发现或揭示出 RGD 肽与受体结合的模式. Kodandapani 等^[22]通过对 OP-G2 晶体结构的研究发现 OP-G2 的 RYD 存在两个构象, 他们认为这两个构象可能代表着自由态及受体结合态. 他们认为精细的 Asp 的侧链的定向影响着整合素的识别, 同时 Asp 也可能与整合素的钙结合位点配位. 而第二位的氨基酸在整合素的识别中是不重要的, 因为 OP-G2 抗体上 RYD 到 RGD 的点突变发现 Y 到 D 的突变并不改变其专一性, 在 OP-G2 中 Tyr 参与了 RYD 的构象稳定. Kunicki 等^[23]的实验看到 OP-G2 或 AP7 (OP-G2 的 Y104 $\rightarrow$ G104 突变体, 将 RYD 变为 RGD) 的 Fd 片段或其 κ 链 (轻链) 都不能单独与 GP IIb/ IIIa 结合. Fab 片段无论是 OP-G2 或 AP7 都可以与 GP IIb/ IIIa 结合, 且两者对活化或非活化血小板的结合都一样. 这似乎暗示着 RYD 自身并不能完成与受体结合, 可能还有其他的因素参与辅助或协同. Deckmyn 等^[24]在研究分析单抗 MA-16N7C2 (这一单抗是首次发现的含有 RGD 的抗体) 时, 他们在发现抗体的 RGD 两侧序列与蛇毒锯蝗鳞素非常相似的同时, 在 CDR1 上发现了另一个序列 EYTI, 它与蛇毒锯蝗鳞素上的保守的 EGTI 和纤维连接蛋白上的 DYTI 同源. EGTI 非常接近蛇毒锯蝗鳞素的 RGD 区, 且它是不同种去整合素上非常保守的一段序列的一部分, 而在纤维连接蛋白中 RGD 前的一段序列上有 DYTI. 但是抗体上是否存在另外的识别序列仍不清楚.

3 应用前景

如前所述, RGD 序列肽与其受体的相互作用, 不仅是蛋白受体与配体相互作用的一个极好的范例, 由此可以揭示蛋白质结构与功能的相互关系, 同时也为药物的设计及在医疗上的应用提供了理论基础. RGD 序列肽如人工合成肽以及一些蛇毒可竞争性抑制各种粘附蛋白与细胞的结合^[1]. 作为拮抗剂, 可用于治疗的疾病很多, 包括心血管疾病、骨质疏松和炎症, 还可以预防和治疗由细胞粘连异常而导致的肿瘤尤其是恶性肿瘤的转移; 另一方面, RGD 序列肽又可作为兴奋剂 (agonist), 促进损伤的器官与组织的再生、伤口的愈合等, 具有广泛的生物学功能. 要使 RGD 序列肽或蛋白成为治疗剂, 必须考虑其分子专一性, 大多数细胞可产生几种不同的整合素, 而个别整合素存在于许多细胞上, 若对目标无合适选择性, 用 RGD 化合物或蛋白治疗某种疾病可能影响其他身体系统. 事实上, 由于一些天然的及合成的含 RGD 序列的肽或多肽对活化的血小板受体 Gp IIb/ IIIa 具有亲和性, 在一定剂量内可以有效抑制血小板的聚集或体内血栓的形成而不影响血小板的其他功能. 由此来看, 获得只对个别整合素或整合素家族的小部分成员有活性的药物有可能且极有希望减小其副作用, 用于预防和治疗与 ECM 相关的疾病^[25].

作为当今发病率较高的心血管疾病, 除了应用小分子 RGD 序列肽抑制血栓形成外, 我们还可以设想将含 RGD 序列的活性小肽与溶栓分子结合组成嵌合分子, 那么嵌合分子就可以通过插入的这些序列与血栓附近活化的血小板结合, 竞争性抑制纤维蛋白原与血小板的结合, 抑制血小板的凝聚, 阻止血栓的形成. 另一方面, 嵌合分子与血栓附近血小板结合后, 由于邻近效应也可以增加对纤维蛋白的亲合性, 这样含有活性小肽的嵌合分子既有溶栓作用, 又有抗栓作用. Knapp 等^[26]将 RGDS 取代水蛭素 32~35 位氨基酸使其既有抗栓作用又有去整合素作用, 使其抗栓能力提高约 2

倍。这也许是今后发展的趋势之一,也需要更好地弄清含 RGD 序列肽与其配体相互作用的机制。

参 考 文 献

- Pierschbacher M D, Ruoslahti E. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature*, 1984, **309**: 30~ 33
- Calvete J J, McLane M A, Stewart G J *et al.* Characterization of the cross-linking site of disintegrins albolabrin, bitirsatin, echistatin Gp II b/ III a. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994, **202** (1): 135~ 140
- Wagner E A, GarciaPardo A, Humphries M J *et al.* Identification and characterization of the T lymphocyte adhesion receptor for an alternative cell attachment domain (CS-1) in plasma fibrinogen. *J Cell Biol*, 1989, **109**: 1321~ 1330
- Plow E F, Pierschbacher M D, Ruoslahti E *et al.* The effect of Arg-Gly-Asp containing peptides on fibrinogen and von Willebrand factor binding to platelets. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, **82**: 8057~ 8061
- Zhao Y, Sane D C. The cell attachment and spreading activity of vitronectin is dependent on the Arg-Gly-Asp sequence. Analysis by construction of and domain deletion mutants. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993, **192** (2): 575~ 582
- Ruoslahti E, Pierschbacher M D. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science*, 1987, **238**: 491~ 497
- Samanen J, Ali F, Romoff T *et al.* Development of a small RGD peptide fibrinogen receptor antagonist with potent anti-aggregatory activity *in vitro*. *J Med Chem*, 1991, **34**: 3114 ~ 3125
- Tomiyama Y, Brojer E, Ruggeri Z M *et al.* A molecular model of RGD ligands antibody D gene segments that direct specificity for the integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. *J Biol Chem*, 1992, **267**: 18085~ 18092
- Cheng S, Craig W S, Mullen D *et al.* Design and synthesis of novel cyclic RGD-containing peptides as highly potent and selective integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ antagonists. *J Med Chem*, 1994, **37**: 1~ 8
- Ruoslahti E, Pierschbacher M D. Influence of stereochemistry of the sequence Arg-Gly-Asp Xaa on binding specificity in cell adhesion. *J Biol Chem*, 1987, **262**: 17294~ 17298
- Kumagai H, Tajima M, Veno Y *et al.* Effect of cyclic RGD peptide on cell adhesion and tumor metastasis. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991. **177**: 74~ 82
- Adler M, Lazarus R A, Dennis M S *et al.* Solution structure of kistrin, a potent platelet aggregation inhibitor and Gp II b/ IIIa antagonist. *Science*, 1991, **253**: 445~ 448
- Chen Y, Suri A K, Kominos D *et al.* Three dimensional structure of echistatin and dynamics of the active site. *J Biol Mol NMR*, 1994, **4** (30): 307~ 324
- Sean H, Klaus W. The nuclear magnetic resonance solution structure of flavoridin, an antagonist of platelet Gp II b/ IIIa receptor. *J Mol Biol*, 1993, **232**: 907~ 925
- Hass T, Plow E F. Integrin ligand interaction: a year review. *Curr Opin Cell Bio*, 1994, **6**: 656~ 662
- Lee G, Chan W, Hune M R *et al.* Strong inhibition of fibrinogen binding to platelet receptor $\alpha_{IIb}\beta_3$ by RGD sequences installed into a presentation scaffold. *Protein Engineering*, 1993, **6** (7): 745~ 754
- Yamada T, Matsushima M, Inaka K *et al.* Structure and functional analysis of the Arg-Gly-Asp sequence introduced into human lysozyme. *J Biol Chem*, 1993, **268** (14): 10588~ 10592
- Yamada T, Ureda A, Kidera A *et al.* Functional analysis and modeling of a conformational constrained Arg-Gly-Asp sequence inserted into human lysozyme. *Biochemistry*, 1994, **33**: 11678~ 11683
- Myszka D G, Chaiken I M. Design and characterization of an intramolecular antiparallel coiled coil peptide. *Biochemistry*, 1994, **3**: 2363~ 2372
- Slate C A, Weninger S C, Church F C *et al.* Engineering of five 88-residue receptor-adhesive molecular proteins containing a parallel α -helical coiled coil and two RGD ligand sites. *Int J Peptide Protein Res*, 1995, **45**: 290~ 298
- Yoshiaki T, Brojer E, Ruggeri M Z *et al.* A molecular model of RGD ligands. *J Biol Chem*, 1992, **267** (25): 18085~ 18092
- Ramadurgam K, Veerapandian B, Kunicki J *et al.* Crystal structure of the OPG2 Fab. *J Biol Chem*. 1995, **270** (5): 2268~ 2273
- Kunicki T J, Ely K R, Kunicki T C *et al.* The exchange of Arg-Gly-Asp (RGD) and Arg-Tyr-Asp (RYD) binding sequences in a recombinant murine Fab fragment specific for the integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ does not alter integrin recognition. *J Biol Chem*, 1995, **270**: 16660~ 16665
- Hans D, Patrick S, Bernard H *et al.* An echistatin Arg-Gly-Asp (RGD) -containing sequence in the heavy chain CDR3 of a murine monoclonal antibody that inhibits human platelet glycoprotein II b/ III a function. *British J Haematology*, 1994, **87**: 562~ 571
- Craig W S, Cheng S, Mullen D G *et al.* Concept and progress in the development of RGD-containing peptide pharmaceuticals. *Biopolymers (Peptide Science)*, 1995, **37**: 157 ~ 175
- Knapp A, Degenhardt T, Dodt J. Hirudins: hirudin derived thrombin inhibitors with disintegrin activity. *J Biol Chem*, 1992, **267** (34): 24230~ 24234

Recent Advances in Interaction Between RGD-containing Ligands and Their Receptor Research. SUN Yingqing, GUO Yan, RU Binggen (*National Laboratory of Protein Engi-*

neering and Plant Genetic Engineering, Peking University, Beijing 100871, China).

Abstract At present, more and more people are interested in studying the interaction between the receptors and their RGD-containing ligands. It is generally thought that the interaction between integrins and adhesive proteins is mediated through the RGD sequence within the adhesive proteins, which may participate in many physiologic process. A major description is given

on the interaction between RGD-containing peptide and Gp II b / III a and its inhibition on platelet aggregation. Also presented is the perspective of RGD-containing peptides or proteins in the study of the relationship of the structure and function of protein and in the pharmaceutical field.

Key words RGD, integrin, GP II b/ III a, platelet aggregation

外源基因在大肠杆菌中表达的研究进展

龙建银 王会信

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850)

摘要 大肠杆菌是外源基因表达的首选体系. 大肠杆菌中外源蛋白可定位于胞内、周质或胞外培养基中. 按照重组蛋白的可能命运, 综述了最近几年大肠杆菌表达体系的研究进展.

关键词 大肠杆菌, 基因表达, 分子伴侣, 分泌

在过去的 20 多年内, 人们已经发展了多种原核、真核表达系统生产外源重组蛋白. 重组蛋白除用于科研外, 也直接用作诊断试剂和蛋白类药物. 迄今为止, 大肠杆菌以其易于操作、遗传背景清楚、发酵成本低等优点依然是重组蛋白生产的首选体系.

作为革兰氏阴性菌的大肠杆菌, 被内膜 (又称质膜) 和外膜隔开形成三个腔 (compartment): 胞内、周质和胞外. 相应地, 在大肠杆菌中表达的外源重组蛋白也可定位于胞内、周质空间或胞外培养基中; 此外, 近年发展起来的表面显示 (surface display) 技术, 还可使重组蛋白定位在大肠杆菌的表面. 这种外源蛋白表达场所的选择主要取决于目的蛋白的类型、数量和纯化要求; 它们有着各自的优势和缺陷. 下面按重组蛋白的可能命运, 综述最近几年大肠杆菌表达体系的研究进展.

1 在胞内直接表达重组蛋白

这是研究最早、采用最多的表达策略, 目前已经积累了许多成功的经验, 具有较丰富的理论指导. 采用较强的启动子, 如 λP_L 、 T_7 或串联启动子, 外源基因可在胞内获得高效表达, 一般占细菌总蛋白的 10% ~ 70%.

1.1 包涵体的形成

胞内表达的最大问题是不溶性包涵体的形成, 虽然这可能为后续的分离纯化带来方便. 通常要采用强变性剂才能溶解包涵体, 溶解后还需复性才能回收正确折叠的重组蛋白; 复性时体积很大, 不易处理, 而且复性效率很低 (< 20%).

包涵体的形成是外源蛋白高效表达时的普