

多肽调控因子 AcSDKP的生物学活性及构效关系研究进展

韩 香, 王德心*

(中国医学科学院·中国协和医科大学 药物研究所, 北京 100050)

摘要: AcSDKP是从胎牛骨髓中提取的一种以细胞生长抑制作用为主的多功能生理调控因子, 不仅具有抑制造血干细胞生长的生物学功能, 对淋巴细胞、肝细胞、肾间质成纤维细胞及心肌成纤维细胞等多种细胞均有增殖抑制作用。同时还能介导血管的生成, 对生殖系统也有明显刺激作用, 可促进精子生成。本文就 AcSDKP的多种生物学活性及最新研究进展作一综述。

关键词: AcSDKP; 多肽因子; 生物学活性; 构效关系

中图分类号: R916 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2007)08 - 0810 - 07

Advances in the study of bioactivity and structure-function relationship of regulatory peptide AcSDKP

HAN Xiang, WANG De-xin*

(Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: As a negative regulator of hematopoiesis, AcSDKP is well known to inhibit the proliferation of hematopoietic stem cells and reported to have a biological function in non-hematopoietic cells recently. Its biological activities and structure-function relationship are reviewed in this paper.

Key words: AcSDKP; peptide regulator; bioactivity; structure-function relationship

N-乙酰基-丝氨酸-天冬氨酸-赖氨酸-脯氨酸 (N-acetyl-Ser¹-Asp²-Lys³-Pro⁴, AcSDKP), 这个四肽链是 Frindel 等在 1977 年首次从胎牛骨髓中提取的一种生理性造血细胞生长抑制因子。最初将 AcSDKP 作为造血调节肽进行了广泛而深入地研究, 并期望将其作为癌症放、化疗过程中的骨髓保护剂应用于临床。随后的研究发现 AcSDKP 的生长抑制作用不仅局限于造血干细胞, 对肝细胞、淋巴细胞等多种细胞均具有抑制增殖的作用, 并且与抗器官纤维化联系在一起, 是一种以细胞生长抑制作用为主的多功能生理调控因子, 临床应用潜力显著。本文就其生物学活性及最新研究进展作一综述。

1 AcSDKP的生物学性质

1.1 AcSDKP的来源 AcSDKP 是人体胸腺素 β_4 ($T\beta_4$) 氨基端的四肽段^[1], 分子质量为 487.51 kD,

它首先在骨髓中合成、贮存, 然后持续缓慢释放入血, 分布到特定的组织和器官中, 如肾脏、心脏、肝脏、睾丸等, 在人外周血单核细胞、血浆、尿液内都能检测到该因子。有两种酶能够从 $T\beta_4$ 中水解出 AcSDKP: 脯氨酸寡肽酶 (prolyl oligopeptidase, POP) 和 N-天冬氨酸内肽酶 (Asp-N)。哺乳动物体内的 Asp-N 可以将 $T\beta_4$ 中 Pro⁴-Asp⁵ 之间的肽键断裂而生成 AcSDKP。同时, POP^[2] 也可以通过水解 $T\beta_4$ 生成 AcSDKP, 是参与多肽 AcSDKP 合成的主要酶。进一步研究发现, 骨髓微环境中的巨噬细胞能合成并释放 AcSDKP, 并通过旁分泌的途径以分子的形式储存于骨髓基质^[3]。体内和体外实验表明, AcSDKP 通过使多功能造血干细胞和正常的早期祖细胞停留在 G_0 期 (静止期), 从而可逆性地阻止了它们进入细胞周期的 S 期 (DNA 合成期), 发挥其生长抑制作用, 如果停止在培养体系中加入或从中撤除该因子后, 这些干、祖细胞的生长恢复良好。正常情况下, 大多数造血干细胞处于细胞周期的 G_0 期,

收稿日期: 2007-02-01.

* 通讯作者 Tel: 86 - 10 - 63165251, Fax: 86 - 10 - 63017757, E-mail: wangdx@imm.ac.cn

仅有一小部分供给所有造血细胞的需要。一般认为,造血干细胞在 G_0 期进行 DNA 损伤修复,并且处于 G_0 期的造血干细胞对放疗、化疗均不敏感。因此,维持造血干细胞的静止态和保护造血功能密切相关。现在主要通过化学合成获得该四肽因子,人工合成的 AcSDKP 与天然的 AcSDKP 生物活性完全一致^[4,5]。

1.2 AcSDKP 多功能生理调节作用 AcSDKP 的增殖抑制作用并不仅限于造血系统,对非造血细胞也有抑制作用。例如,它抑制淋巴细胞、肝细胞、骨髓间充质干细胞 (MSC)^[6]、近曲肾小管上皮细胞系 (LLC-PK1) 和肾间质成纤维细胞系 (NRK 49F) 的生长^[7];抑制心肌成纤维细胞增殖及其合成胶原,对心肌纤维化有逆转作用^[8,9];还抑制骨髓基质细胞系 (MS-1-T) 的增殖,以及调节基质细胞的功能,促进造血细胞与基质细胞的黏附,骨髓基质细胞在调节造血细胞的增生和分化中起活性作用,而造血细胞黏附到基质是其作用的第一步。曾有报道 AcSDKP 对异常细胞如急性和慢性白血病细胞以及其他癌细胞 (例如 HL-60) 增殖无明显抑制作用。但最近又有研究表明,AcSDKP 可以抑制 HL-60 细胞的增殖并诱导其分化和凋亡^[10,11]。此外,AcSDKP 是血管生成的诱导因子,该因子对血管平滑肌细胞的增殖还有明显的刺激效应,有望用于心脏损伤后血管的修复和缺血状态下新血管的生成^[12,13]。

1.3 AcSDKP 的代谢机制与 ACE 酶 药代动力学研究发现,AcSDKP 经静脉注入人体后,很快被降解,半衰期仅为 4.5 min。AcSDKP 通过两种机制从血浆中清除^[14]: (1) 血管紧张素 I 转化酶 (angiotensin I-converting enzyme, ACE) 介导的水解作用,ACE 能切断其 Asp^2-Lys^3 之间的肽键,这可能是 AcSDKP 降解的第一步反应; (2) 肾小球滤过清除。AcSDKP 是 ACE 的底物,ACE 有两个同源活化结构域: N 端和 C 端,研究证实 ACE 的 N 端活性位点优先特异性地降解 AcSDKP, N 端水解的速率是 C 端的 50 倍。Michaud 等^[15]合成了一系列由 3~5 个氨基酸组成的 AcSDKP 类似物,如 Bz-Asp-Lys-Pro, Bz-Gly-Asp-Lys-Pro, Bz-Gly-Ser-Asp-Lys-Pro 及 Bz-Gly-Ser-Asp 作为底物,发现分子中的 Asp 对 ACE 的 N 端选择性起到至关重要的作用。若底物超过 5 个氨基酸残基,则可能出现各作用位点间的相互依赖。AcSDKP 的水解可被 ACE 抑制剂 (ACEI, 如卡托普利 captopril, 赖诺普利 lisinopril) 阻断^[16,17],使其在体内的浓度大大提高。实际上 AcSDKP 与人工合成

的 ACEI——赖诺普利 (利生普利) 结构十分相似。

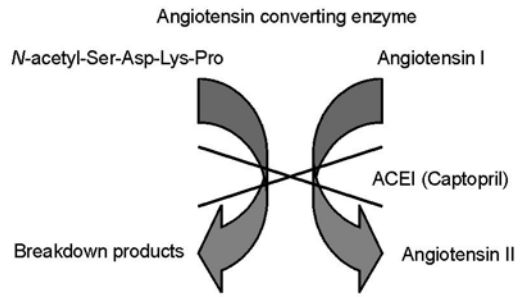
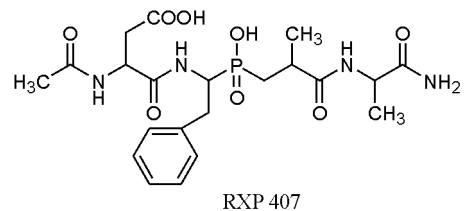


Figure 1 Captopril block the hydrolysis of AcSDKP

Junot 等^[18]给自发性高血压大鼠静注不同剂量 (0.01~10 $mg \cdot kg^{-1}$) 的卡托普利,在 90 min 内观察其药物效应,发现卡托普利在剂量为 0.01~0.3 $mg \cdot kg^{-1}$ 能选择性地抑制 AcSDKP 水解,当剂量为 0.3 $mg \cdot kg^{-1}$ 时,AcSDKP 在血浆和尿液中的浓度为基础水平的 4 倍。磷酸化多肽 RXP 407 是第一个体外被证实的 ACE N 端特异性抑制剂。Junot 等^[19]给小鼠注射不同浓度的 RXP 407 (0.1~30 $mg \cdot kg^{-1} / 30$ min),血浆 AcSDKP 的浓度同样可随之升高到基础水平的 4~6 倍,进一步证实了 AcSDKP 是 ACE 的 N 端活性位点的特异性底物。此外,AcSDKP 还可通过肾小球滤过,而从尿中排出。



2 AcSDKP 的造血调节功能

2.1 骨髓损伤中保护造血功能 四肽化合物 AcSDKP,产生于骨髓,在血液中以纳克量的浓度存在,被认为是生理性造血调节剂。体内和体外实验表明,它能减轻化疗药、离子辐射、高热或光疗引起的骨髓特定成分的伤害,保护机体的造血功能。戈雷拉肽 (goralate, 即化学合成的 AcSDKP) 能降低化疗药物多柔比星 (doxorubicin) 引起的小鼠死亡率,避免多柔比星毒性。对长期重建细胞 (long-term reconstituting cell, LTRC)、高增殖潜能集落形成细胞 (high proliferative potential colony-forming cell, HPP-CFC)、脾集落形成单位 (colony-forming unit-spleen, CFU-S) 和粒细胞-巨噬细胞集落形成单位 (colony-forming unit-granulocyte/macrophage, CFU-GM) 均具有保护作用^[20]。在接受半数致死剂量多

柔比星之前 48 h, 经皮下注入剂量为 $2.4 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1} \times 3 \text{ d}$ 的戈雷拉肽。18 d 后, 单给多柔比星组小鼠 67% 死亡, 而戈雷拉肽 + 多柔比星组仅死亡 27%, $P < 0.05$ 。以 AcSDKP 多柔比星处理过的小鼠, 随后注射粒细胞集落刺激因子 (G-CSF), 可进一步促进 CFU-GM 的恢复^[21]。AcSDKP 加速造血干细胞的恢复, 极可能是通过保护这些细胞避免化疗药物诱导的凋亡来降低正常造血细胞的化疗敏感性。在辐射损伤实验中, AcSDKP 可保护小鼠红系祖细胞, 加速狗、猴等大动物体内全身照射后造血系统的恢复^[22], 当照射中和照射后给予 AcSDKP 和生长因子, 对抗辐射的作用明显提高。因此, AcSDKP 可作为癌症放、化疗期间的辅助治疗手段, 保护造血干细胞, 在治疗期间迅速恢复血象, 减少感染、出血等副作用的发生。另有研究显示, ACEI 类药物可通过降低 ACE 浓度及增加内源性 AcSDKP 浓度影响造血细胞的细胞周期^[23]。在小鼠给予 2 Gy γ 线照射或阿糖胞苷 (cytarabine) 注射后 1 h 给予卡托普利 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 阻止 HPP-CFC 进入 S 期, 抑制小鼠造血干祖细胞增殖。因此长期服用 ACEI 类药物的病人应注意可能导致干细胞抑制^[24]。

2.2 造血干细胞移植中造血重建 随着人们对干细胞研究的不断深入, 干细胞移植逐渐成为治疗造血及免疫系统疾病的一个重要手段。AcSDKP 可提高静脉输注造血干细胞给受辐射鼠的移植能力。当 5×10^4 个骨髓细胞被移植前给予 10 mg AcSDKP 治疗的接受致死量照射的小鼠, 移植 4 周后, 小鼠存活率从 $(20.0 \pm 4.4)\%$ 增加到 $(86.1 \pm 4.8)\%$, 而未提前给予 AcSDKP 治疗的小鼠, 移植 5×10^5 个骨髓才能获得同样的结果。而且 AcSDKP 治疗组较未治疗的受移植小鼠的外周血白细胞恢复快^[25]。自体干细胞移植净化造血干细胞时, 在 37°C 与 $1 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 戈雷拉肽孵育 21 h, 可减少正常造血祖细胞在 S 期数量, 同时降低了它们对高热的敏感性。而提前与戈雷拉肽一起孵育的白血病祖细胞的细胞周期进展不受影响, 因此, 这些细胞不能避免高热诱导的细胞杀伤^[26]。脐血移植中将 AcSDKP 同造血干细胞一起输注给致死量照射的小鼠, 造血重建和骨髓恢复同样较单纯造血干细胞输注组明显增快。以上发现为将 AcSDKP 应用于临床造血干细胞移植病人提供了理论依据。

3 AcSDKP 的其他生物学功能

3.1 AcSDKP 对肾间质成纤维细胞的作用 肾间质纤维化是各种肾脏疾病发展的最终结果, 它的特

征是成纤维细胞增殖, 细胞外基质合成增加, 降解减少并沉积于肾间质中。在肾间质中成纤维细胞起骨架作用, 而且通过自分泌及旁分泌机制参与了肾小球纤维化及硬化过程。Xiao 等^[27] 将大鼠肾间质成纤维细胞在不同浓度的 AcSDKP 中孵育 48 h 后, 测定其吸收度 (A 值), 发现 A 值明显减小, 吸收率与对照组比较有显著差异 ($P < 0.01$)。而且 AcSDKP 对肾间质成纤维细胞的生长抑制作用具有浓度依赖性: 当 AcSDKP 的浓度高于 $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 或低于 $1 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 抑制作用消失, 最大抑制浓度为 $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 最大抑制率约 33%。这项研究表明, AcSDKP 对肾脏间质中的成纤维细胞也有生长抑制作用, 因此可能会阻滞肾脏细胞增生和纤维化。

3.2 AcSDKP 对心血管系统的作用 心脏间质成纤维细胞增殖和细胞外基质 (包括胶原) 成分的增多是心脏纤维化形成的重要因素。最近研究发现, AcSDKP 能够通过抑制大鼠心脏间质成纤维细胞增殖及胶原的沉积, 减轻高血压和心肌梗死后大鼠心脏纤维化程度。对于心肌梗死继发性心力衰竭的大鼠, AcSDKP 作为一种抗炎因子, 可以预防和逆转未发生梗死区域心肌的纤维化。Yang 等^[9] 发现, 在预防组大鼠中, AcSDKP 能使心肌总胶原量从 $(23.7 \pm 0.9) \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ 减少到 $(5.0 \pm 0.7) \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$, 而在逆转组中, 心肌总胶原量从 $(22.6 \pm 2.2) \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ 减少到 $(14.4 \pm 1.6) \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ ($P < 0.01$), 并且组织间隙和血管周围的胶原也同样明显地减少。然而, AcSDKP 抗心脏纤维化作用的机制并不清楚。进一步研究发现^[28], AcSDKP 通过抑制血小板源性生长因子 (PDGF) 介导的心脏成纤维细胞增殖和胶原的合成, 上调金属蛋白酶 (MMPs) 活性或表达, 以促进胶原的降解, 这些可能是 AcSDKP 抗心脏纤维化的重要环节。Pokharel 等^[29] 在用流量血细胞计数法测量 AcSDKP 处理后的大鼠的心肌成纤维细胞, 结果表明 AcSDKP 能显著抑制心肌成纤维细胞于 G_0 期, 从而阻止其进入 S 期。AcSDKP 能抑制肾血管性高血压大鼠左心室转化生长因子 β (TGF- β) 和连接组织生长因子 (CTGF) 的增加^[30]。因而可以推测, 在高血压时, AcSDKP 抑制心肌纤维化可能与心脏 TGF- β 和 CTGF 的减少有关。同时, Cingolani 等^[31] 发现在高血压大鼠中, AcSDKP 能使左心室的收缩功能显著下降, 而不影响其舒张功能, 这说明 AcSDKP 不能改善心脏功能, 因而不能用于高血压治疗。

3.3 AcSDKP介导血管的生成 最近研究发现,造血因子除了对造血系统有作用外,还能引导血管内皮细胞的生成^[32,33],同时有报道血管生成因子影响造血干细胞的许多功能^[34]。事实上,同一因子对造血系统和血管生成系统所产生的作用很可能反映了造血干细胞和血管内皮细胞的同源性^[35]。AcSDKP就具有显著的促进血管生成的活性。Liu等^[36]发现,AcSDKP可以诱导血管平滑肌的形成,在血管形成过程中起介导作用。体外培养内皮细胞,AcSDKP在纳摩尔浓度即能刺激内皮细胞迁移,分化形成血管样的结构,同时内皮细胞分泌基质 MMP-1 增加。Fromes等^[37]采用背部和腹部表皮撕除的动物模型研究 AcSDKP对皮肤损伤修复的影响,从而考察组织修复过程中血管血液补给的重要性。手术后皮下注射 AcSDKP $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (每天注射 2 次,持续 3 d),有效阻止了皮肤边缘区域的坏疽,同时腹部和背部外皮平均存活面积分别由对照组的 $(50.9 \pm 19.3)\%$ 和 $(53.4 \pm 4.2)\%$,提高到 $(66.4 \pm 7.5)\%$ 和 $(74.7 \pm 6.6)\%$ 。研究还发现,AcSDKP通过促进血管的生成可以提高表皮的再植能力,加速受损的无血管表皮移植的伤口愈合。以上实验结果提示,AcSDKP介导血管生成可能成为临床上治疗血管生成障碍的有效方法,对胚胎发生、外皮移植、组织损伤修复过程均有一定意义。

3.4 AcSDKP对生殖系统的作用 AcSDKP 也存在于人体的睾丸组织中,与 ACE 相互作用来调节生殖系统功能^[38]。Stephan 等^[39]对大鼠睾丸内 AcSDKP 的作用做了比较深入的研究。首先,用特异性免疫反应进行鉴定,发现睾丸发生各个阶段的间质细胞以及成年大鼠的精子细胞内均可见 AcSDKP。同时培养了睾丸内的各种细胞,发现睾丸间质细胞和睾丸巨噬细胞的培养上清液和细胞裂解液中的 AcSDKP 以及睾丸间液 (TIF) 的 AcSDKP 浓度最高,管周细胞和支持细胞的 AcSDKP 浓度较低,精母细胞和精子细胞的 AcSDKP 最低。研究人员还分析了 AcSDKP 在几种细胞及组织中的降解。发现精母细胞和精子细胞的 AcSDKP 有少量降解,而睾丸内的体细胞几乎不见其降解。此外 TIF 的 AcSDKP 降解速度比外周血浆要低很多。然而,选择性破坏大鼠睾丸间质细胞和睾丸巨噬细胞并不能造成 TIF 和外周血浆 AcSDKP 的减少,这说明睾丸内除了睾丸间质细胞和睾丸巨噬细胞能够产生 AcSDKP 外,或许存在着某种代偿机制,仍能通过某种方式维持 AcSDKP 在局部的浓度并发挥一定的生

理作用。最后用 AcSDKP 孵育体外培养的精原细胞,³H 胸腺嘧啶掺入测定细胞增殖情况,发现 AcSDKP 极大地刺激了精原细胞的增殖。以上研究结果证明,大鼠睾丸内的 AcSDKP 浓度较高,可能由睾丸间质细胞和睾丸巨噬细胞生成,并对精母细胞的增殖有明显的刺激效应,即睾丸的 AcSDKP 可能通过旁分泌促进精子发生。

4 AcSDKP的结构改造及开发进展

多肽 AcSDKP 作为造血干细胞增殖抑制因子,在体内或体外可减少由放、化疗所引起的干细胞损伤。因此,癌症治疗中应用 AcSDKP 作为造血干细胞保护剂,可以增加化疗药物的剂量以提高肿瘤的应答或治愈。1992 年法国开始将其应用于临床,AcSDKP 和阿糖胞苷或异环磷酰胺联合化疗方案治疗恶性肿瘤的 I、II 期临床试验结果表明,同时使用能显著减轻癌症患者的嗜中性白血球减少症。但至今 AcSDKP 仍未正式成为临床新药,阻碍其顺利通过临床试验的主要原因是体内分解太快。如前所述,当 AcSDKP 进入人体后,在 ACE 酶等作用下迅速降解,使其在血中浓度大大降低,限制了生物学效应的发挥。因此在实验性治疗中,一天只注射 1 次基本无效,必需经微型泵连续注入或每天注射多次,才能发挥药效,这种给药方式限制了其临床应用。因此将 AcSDKP 作为先导物而进行的结构改造,以克服上述缺点,具有实际意义。

为了确定最小的活性片段以及每个氨基酸残基对生物活性的作用,Thierry 等^[40]合成了一系列小肽片段和结构改造物: AcSDK, SDK, AcSD, SD, DKP, DK, AcSEKP, AcSDOmP, AcADKP, AcS(D)DKP, AcSD β KP 和 SDKP。结果表明,脱乙酰基类似物 SDKP 活性增强;三肽 AcSDK 及 SDK 也有很高活性,尤其后者活性最高 ($1 \times 10^{-14} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$),高于 AcSDKP ($1 \times 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$);二肽 SD 和 DK 均无活性;三肽 DKP 无活性而二肽 AcSD 有微弱活性 ($1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$);以其他氨基酸替换原极性氨基酸则活性几乎丧失,因此以 Ala 替代 Ser,或 Om 替代 Lys,(D) Asp 替代 Asp,以及 (β) Lys 替代 Lys 而得到的四肽类似物完全没有活性,以 Glu 替代 Asp 则活性减小 ($1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。说明原序列中极性氨基酸的侧链基团非常重要,特别是 Ser,而 SDK 是保持活性的最小序列。

Gaudron 等^[41,42]以还原伪肽键 $\phi(\text{CH}_2\text{NH})$ 分别代替原序列中的肽键 (CONH) 得到 3 个伪肽: Ac-Ser ϕ Asp-Lys-Pro 2, Ac-Ser ϕ Asp ϕ Lys-Pro 3, Ac-Ser

Asp-Lys-Pro 4(图 2);将 Pro的 -COOH以 -CONH₂或 -H 取代,进行 C 末端修饰得到 2 个类似物: AcSDKP-NH₂ 5和 AcADKPyr 6(图 3)。3 个伪肽以及 AcSDKP-NH₂ 均能对抗 ACE 降解,体内代谢时间明显延长,同时保持了与 AcSDKP 相似的生物学作用,说明肽骨架和 C 端 Pro 并不是保持活性所必需的。

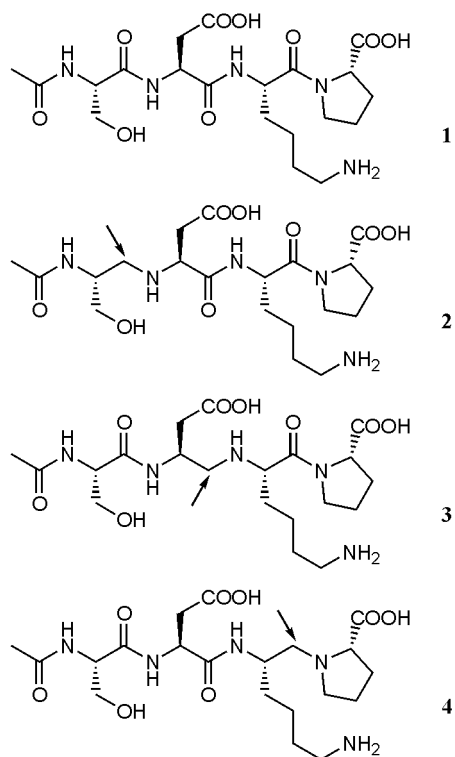


Figure 2 伪肽 (Pseudopeptides)

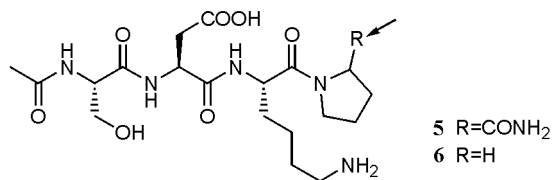


Figure 3 AcSDKP 的 C 末端修饰

Thierry 等^[43, 44]在前期工作基础上,为了更好地阐明构效关系,又设计合成了如下系列类似物。

采用高丝氨酸 Hse 替换 Ser 得到化合物 7 AcHseDKP,采用 Arg 替换 Lys 得到化合物 8 AcSDRP, 7 和 8 属于侧链修饰物(图 4),以及 N 末端修饰物 9 ~ 13 BocSDKP, FmocSDKP, AntSDKP, SucSDKP 和 CoumSDKP(图 5),还合成了串联二聚体加合肽 14 (head-to-tail) 以及并联二聚体加合肽 15 (head-to-head)(图 6)。

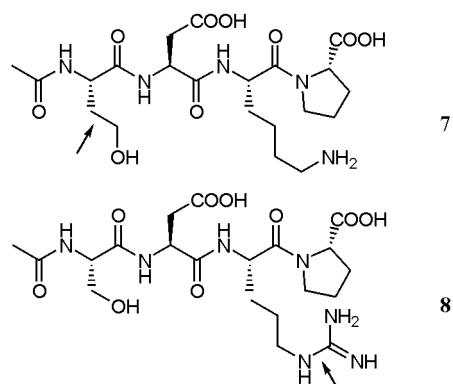


Figure 4 AcSDKP 侧链修饰

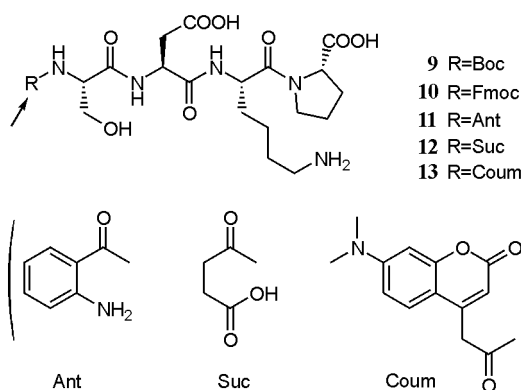


Figure 5 AcSDKP 的 N 末端修饰

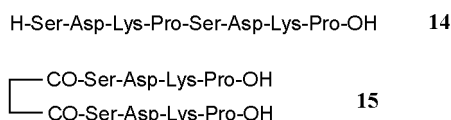
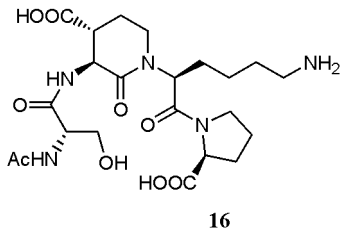


Figure 6 AcSDKP 加合肽

考虑到 AcSDKP 的分子较小,采用不同大小和极性的 N 端保护基进行修饰,活性采用 CFU-GM 和 HPP-CFC 实验。化合物 9 ~ 12 仍保持原有活性,化合物 13 活性稍有减弱,表明以大的亲脂基团取代乙酰基,活性基本保持。化合物 7 活性与母体一致,化合物 8 对 CFU-GM 活性稍有减弱。加合肽 14 和 15 活性与母体基本相当,14 的 HPP-CFC 活性甚至高于 AcSDKP,实际上这两个化合物也可以看作是 N 端或 C 端的改造物,因此也印证了上述结论: C 端 Pro 和 N 端 Ac 对化合物活性影响不大。而且,所有上述类似物均不具有细胞毒性,因此可作为临床药物的后选化合物,值得进一步研究。

至今,对 AcSDKP 进行有效的结构改造和构效关系研究还在进行。大量研究表明,具有限定构型的环状多肽比线性多肽有更好的代谢稳定性和生物

选择性, Kumar等^[45]合成了构型限定的具有六元内酰胺局部环状结构的 AcSDKP类似物,即“Freidinger肽”16,期望获得更高的活性和对抗酶降解能力:



综上所述,多肽因子 AcSDKP对造血干细胞的抑制作用有着十分重要的应用前景,如肿瘤治疗和干细胞移植。同时 AcSDKP对多器官内的细胞增殖及器官纤维化具有明显调节作用,使它可能成为新型有效的抗增殖、抗纤维化药物,应用于未来的防治工作。但 AcSDKP在体内的半衰期太短,利用度不高,从而影响其发挥临床效用。因此对其进行合理的结构改造,以增强对酶的稳定性,提高生物利用度及生物活性,是很有前景的研究方向。

References

- [1] Leeansaksiri W, DeSimone SK, Huff T, et al. Thymosin β_4 and its N-terminal tetrapeptide, AcSDKP, inhibit proliferation, and induce dysplastic, non-apoptotic nuclei and degranulation of mast cells [J]. Chem Biodivers, 2004, 1: 1091 - 1100.
- [2] Cavasin MA, Rhaleb NE, Yang XP, et al. Prolyl oligopeptidase is involved in release of the antifibrotic peptide AcSDKP [J]. Hypertension, 2004, 43: 1140 - 1145.
- [3] Huang WQ, Wang QR. Bone marrow endothelial cells secrete thymosin β_4 and AcSDKP [J]. Exp Hematol, 2001, 29: 12 - 18.
- [4] Zikos C, Livaniou E, Leondiadis L, et al. Comparative evaluation of four trityl-type amidomethyl polystyrene resins in Fmoc solid phase peptide synthesis [J]. J Pept Sci, 2003, 9: 419 - 429.
- [5] Junot C, Theodoro F, Thierry J, et al. Development of an enzyme immunoassay for a stable amidated analog of the hemoregulatory peptide acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro [J]. J Immunoassay Immunochem, 2001, 22: 15 - 31.
- [6] Dai G, Huang C, Li Y, et al. Inhibitory effects of AcSDKP on proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells *in vitro* [J]. Acta Physiol Sin (生理学报), 2006, 58: 110 - 115.
- [7] Iwamoto N, Xano HJ, Yoshioka T, et al. Acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline is a novel natural cell cycle regulator of renal cells [J]. Life Sci, 2000, 66: PL221 - 226.
- [8] Rhaleb NE, Peng H, Harding P, et al. Effect of N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline on DNA and collagen synthesis in rat cardiac fibroblasts [J]. Hypertension, 2001, 37: 827 - 832.
- [9] Yang F, Yang XP, Liu YH, et al. AcSDKP reverses inflammation and fibrosis in rats with heart failure after myocardial infarction [J]. Hypertension, 2004, 43: 229 - 236.
- [10] Huang WQ, Wang BH, Wang QR. Thymosin β_4 and AcSDKP inhibit the proliferation of HL-60 cells and induce their differentiation and apoptosis [J]. Cell Biol Int, 2006, 30: 514 - 520.
- [11] Boutonnat J, Faussat AM, Marie JP, et al. Usefulness of PKH fluorescent labelling to study leukemic cell proliferation with various cytostatic drugs or acetyl tetrapeptide—AcSDKP [J]. BMC Cancer, 2005, 5: 120.
- [12] Waeckel L, Bignon J, Liu JM, et al. Tetrapeptide AcSDKP induces postischemic neovascularization through monocyte chemoattractant protein-1 signaling [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006, 26: 773 - 779.
- [13] Smart N, Risebro CA, Melville AA, et al. Thymosin β_4 induces adult epicardial progenitor mobilization and neovascularization [J]. Nature, 2007, 445: 177 - 182.
- [14] Azizi M, Junot C, Ezan E, et al. Angiotensin I-converting enzyme and metabolism of the haematological peptide N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2001, 28: 1066 - 1069.
- [15] Michaud A, Chauvet MT, Corvol P. N-domain selectivity of angiotensin I-converting enzyme as assessed by structure-function studies of its highly selective substrate, N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline [J]. Biochem Pharmacol, 1999, 57: 611 - 618.
- [16] Chisi JE, Briscoe CV, Ezan E, et al. Captopril inhibits *in vitro* and *in vivo* the proliferation of primitive haematopoietic cells induced into cell cycle by cytotoxic drug administration or irradiation but has no effect on myeloid leukaemia cell proliferation [J]. Br J Haematol, 2000, 109: 563 - 570.
- [17] Caires AC, Oliveira CR, Smith MC, et al. Effects of palladacycle complex on hematopoietic progenitor cells proliferation *in vivo* and *in vitro* and its relation with the inhibitory properties of this compound on the angiotensin-I converting enzyme activity [J]. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2004, 26: 487 - 500.
- [18] Junot C, Menard J, Gonzales MF, et al. *In vivo* assessment of captopril selectivity of angiotensin I-converting enzyme inhibition: differential inhibition of acetyl-ser-asp-lys-pro and angiotensin I hydrolysis [J]. J Pharmacol Exp Ther, 1999, 289: 1257 - 1261.
- [19] Junot C, Gonzales MF, Ezan E, et al. RXP 407, a selective inhibitor of the N-domain of angiotensin I-converting enzyme, blocks *in vivo* the degradation of hemoregulatory peptide acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro with no effect on angiotensin I hydrolysis [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2001, 297: 606 - 611.
- [20] Jackson JD, Ozerol E, Yan Y, et al. Activity of acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro (AcSDKP) on human hematopoietic

- progenitor cells in short-term and long-term bone marrow cultures [J]. *J Hematother Stem Cell Res*, 2000, 9: 489 - 496.
- [21] Masse A, Ramirez LH, Bindoula G, et al. The tetrapeptide acetyl-N-Ser-Asp-Lys-Pro (Goralatide) protects from doxorubicin-induced toxicity: improvement in mice survival and protection of bone marrow stem cells and progenitors [J]. *Blood*, 1998, 91: 441 - 449.
- [22] Watanabe T, Brown GS, Kelsey LS, et al. *In vivo* protective effects of tetrapeptide AcSDKP, with or without granulocyte colony-stimulation factor, on murine progenitor cells after sublethal irradiation [J]. *Exp Hematol*, 1996, 24: 713 - 721.
- [23] Rousseau-Plasse A, Wdzieczak-Bakala J, Lenfant M, et al. Lisinopril, an angiotensin I-converting enzyme inhibitor, prevents entry of murine hematopoietic stem cells into the cell cycle after irradiation *in vivo* [J]. *Exp Hematol*, 1998, 26: 1074 - 1079.
- [24] Azizi M, Menard J, Peyrard S, et al. Assessment of patients' and physicians' compliance to an ACE inhibitor treatment based on urinary N-acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro determination in the noninsulin-dependent diabetes, hypertension, microalbuminuria, proteinuria, cardiovascular events, and Ramipril (DIABHYCAR) study [J]. *Diabetes Care*, 2006, 29: 1331 - 1336.
- [25] Suzuki A, Aizawa S, Araki S, et al. Enhanced engraftment of intravenously transplanted hematopoietic stem cells into bone marrow of irradiated mice treated with AcSDKP [J]. *Exp Hematol*, 1998, 26: 79 - 83.
- [26] Wierenga PK, Brenner MK, Konings AW. Enhanced selectivity of hyperthermic purging of human progenitor cells using goralatide, an inhibitor of cell cycle progression [J]. *Bone Marrow Transplant*, 1998, 21: 73 - 78.
- [27] Xiao HJ. Antiproliferative effects of the hemoregulatory inhibitor N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline on rat renal interstitial fibroblasts [J]. *Chin J Contemp Pediatr (中国当代儿科杂志)*, 2001, 3: 158 - 160.
- [28] Yang F, Zhu XL, Wang LP, et al. Role of AcSDKP on collagen synthesis and degradation in cultured rat cardiac fibroblast [J]. *Chin J Cardiol (中华心血管病杂志)*, 2006, 34: 843 - 846.
- [29] Pokharel S, Rasoul S, Poks AJ. N-acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro inhibits phosphorylation of Smad2 in cardiac fibroblasts [J]. *Hypertension*, 2002, 40: 155 - 161.
- [30] Peng H, Carretero OA, Brigstock DR. AcSDKP reverses cardiac fibrosis in rats with renovascular hypertension [J]. *Hypertension*, 2003, 42: 1164 - 1170.
- [31] Cingolani OH, Yang XP, Liu YH, et al. Reduction of cardiac decreases systolic performance without affecting diastolic function in hypertensive rats [J]. *Hypertension*, 2004, 43: 1067 - 1073.
- [32] Ribatti D, Vacca A, De Falco G, et al. Role of hematopoietic growth factors in angiogenesis [J]. *Acta haematol*, 2001, 106: 157 - 161.
- [33] Wyczolkowska J, Walczak-Dziewiecka A, Wagner W, et al. Thymosin β_4 and thymosin β_4 -derived peptides induce mast cell exocytosis [J]. *Peptides*, 2007, 28: 752 - 759.
- [34] Gerber HP, Malik AK, Solar GP, et al. VEGF regulates hematopoietic stem cell survival by an internal autocrine loop mechanism [J]. *Nature*, 2002, 417: 954 - 958.
- [35] Ribatti D, Vacca A, Roncali L, et al. Hematopoiesis and angiogenesis: a link between two apparently independent processes [J]. *J Hematother Stem Cell Res*, 2000, 9: 13 - 19.
- [36] Liu JM, Lawrence F, Kovacevic M, et al. The tetrapeptide AcSDKP, an inhibitor of primitive hematopoietic cell proliferation, induces angiogenesis *in vitro* and *in vivo* [J]. *Blood*, 2003, 101: 3014 - 3020.
- [37] Fromes Y, Liu JM, Kovacevic M, et al. The tetrapeptide acetyl-serine-aspartyl-lysine-proline improves skin flap survival and accelerates wound healing [J]. *Wound Repair Regen*, 2006, 14: 306 - 312.
- [38] Franke FE, Pauls K, Metzger R, et al. Angiotensin I-converting enzyme and potential substrates in human testis and testicular tumours [J]. *APMIS*, 2003, 111: 243 - 244.
- [39] Stephan J, Melaine N, Ezan E, et al. Source, catabolism and role of the tetrapeptide N-acetyl-ser-asp-lys-pro within the testis [J]. *J Cell Sci*, 2000, 113 (Pt 1): 113 - 121.
- [40] Thierry J, Papet MP, Saez-Servent N, et al. Synthesis and activity of NacSerAspLysPro analogues on cellular interactions between T-cell and erythrocytes in rosette formation [J]. *J Med Chem*, 1990, 33: 2122 - 2127.
- [41] Gaudron S, Grillon C, Thierry J, et al. *In vitro* effect of AcSDKP analogs resistant to ACE-I on hematopoietic stem cell and progenitor cell proliferation [J]. *Stem Cells*, 1999, 17: 100 - 106.
- [42] Gaudron S, Adeline MT, Potier P, et al. NAcSDKP analogues resistant to angiotensin-converting enzyme [J]. *J Med Chem*, 1997, 40: 3963 - 3968.
- [43] Thierry J, Grillon C, Gaudron S, et al. Synthesis and biological evaluation of analogues of the tetrapeptide N-Acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro (AcSDKP), an inhibitor of primitive hematopoietic cell proliferation [J]. *J Pept Sci*, 2001, 7: 284 - 293.
- [44] Cheviron N, Rousseau-Plasse A, Lenfant M, et al. Coumarin-Ser-Asp-Lys-Pro-OH, a fluorescent substrate for determination of angiotensin-converting enzyme activity via high-performance liquid chromatography [J]. *Anal Biochem*, 2000, 280: 58 - 64.
- [45] Kumar S, Flamant-Robin C, Wang Q, et al. Synthesis of 4-substituted-3-aminopiperidin-2-ones: application to the synthesis of a conformationally constrained tetrapeptide N-Acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro [J]. *J Org Chem*, 2005, 70: 5946 - 5953.