

生物活性环肽及其药学研究进展

段慧明(广西中医药大学, 广西中医药科学实验中心, 广西中医基础研究重点实验室, 南宁 530200)

摘要: 环肽是植物来源的超稳定肽, 由头至尾环化骨架和形成胱氨酸结的 3 个二硫键非常稳定。与其他类似大小的肽相比, 环肽的这种独特的拓扑学结构使它们对化学、热和生物降解异常稳定, 它们出色的稳定性和对序列替换的耐受性可使它们用作药物设计的框架。本文主要介绍了环肽在药学研究领域 3 个方面的应用, 特别是近年来在将生物活性肽序列嫁接到环肽的框架上, 以产生新的生物学活性方面的研究进展。

关键词: 生物活性; 环肽; 嫁接; 药学研究

中图分类号: R915 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2019)05-0633-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.05.024

引用本文: 段慧明. 生物活性环肽及其药学研究进展[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(5): 633-638.

Biologically Active Cyclotides and Their Pharmaceutical Progress

DUAN Huiming(Guangxi University of Chinese Medicine, Guangxi Scientific Experimental Center of Traditional Chinese Medicine, Guangxi Key Laboratory of Chinese Medicine Foundation Research, Nanning 530200, China)

ABSTRACT: Cyclotides are plant-derived ultrastable peptides that are stabilized by head-to-tail cyclization backbone and three disulfide bonds that form cystine knots. This unique topology allows them to be exceptionally stable against chemical, thermal and biodegradability compared to other similarly sized peptides. Their excellent stability and tolerance to sequence substitution enable them to be used as frameworks for drug design. This article mainly introduces the application of cyclotides in three areas of pharmaceutical research, especially the recent progress in grafting bioactive peptide sequences onto the framework of cyclotides to generate new biological activities.

KEYWORDS: biological activity; cyclotides; grafting; pharmaceutical research

目前, 蛋白质结构与功能分析正为药物研发带来革命性变化。人类疾病中许多治疗靶标主要是蛋白-蛋白相互作用(protein-protein interaction, PPI), 由于大部分 PPI 的交界面是平的, 小分子药物很难与其特异性紧密结合, 因此难以阻断该类型的相互作用, 并且由于小分子不能排出体外, 频繁产生的毒性代谢物积聚在器官可导致不良反应。相反, 蛋白药物是由天然成分组成, 毒性低; 并且由于它们和作用靶标具有更多更强的相互作用, 对分子靶标具有精准特异性, 从而具有更高的作用效力, 因此具有更少的不良反应; 但它们通常代谢不稳定, 没有口服生物利用性, 膜通透性差, 只能靶向胞外分子, 而且制造成本昂贵, 从而导致人们转而寻求蛋白质支架的替代物, 以作为新型治疗剂的来源^[1-2]。

近年来, 人们对富含二硫键的环状肽产生兴趣是由于它们这种受限结构对热、化学和酶的异常稳定性。小的富含二硫键的肽包括防御素抗菌

肽、knottins、环肽、毒液来源肽以及 ST 肠毒素, 它们都是具有治疗应用的高度受限肽。特别是环肽, 其显著特征不仅包含一个头-尾环状骨架, 而且合并了一个由 3 个保守二硫键组成的具有复杂拓扑学结构的胱氨酸结^[3]。然而, 这其中任何一个特征都不是环肽独有的: 不仅环状骨架存在于天然产物中(如环孢霉素等), 胱氨酸结也存在于人的生长因子(如 TGF- β 等), 但是环肽却是唯一同时具有这 2 个特征的。实际上, 正是这 2 个结构特征的结合, 使环肽产生的独特肽折叠成为非常稳定的受限肽, 这是个有前途的药物开发平台。

1 环肽的结构及分类

环肽是植物体内一类富含二硫键, 由 28~37 个氨基酸残基通过肽键首尾连接的大环肽。环肽在结构上不同于传统的线状富含 Cys 肽, 由于它们是环状的, 其分子中除了含有首尾相连的环状骨架外, 还存在 6 个非常保守的 Cys 残基, 分别被标记为 I~VI, 与之相对应的相邻 2 个 Cys 残基

基金项目: 广西中医基础研究重点实验室系统课题(16-380-58-03); 广西中医药大学校级课题面上项目(2018MS010)

作者简介: 段慧明, 男, 博士, 副教授 Tel: 13471012649 E-mail: 1833474187@qq.com

之间的环则被标记为环 1~环 6, 这些 Cys 残基两两之间形成三对二硫键, 其中 2 对二硫键和环状骨架形成一内环, 而第 3 对二硫键则穿过这一内环形成独特的环状胱氨酸结(cyclic cystine knot, CCK)^[4]。环肽的这种保守结构特征使其特别稳定^[4], 并且这种环状半胱氨酸结构框架赋予环肽一个致密的高度坚硬的结构^[5], 这种结构对热、化学变性和酶降解具有异常的抗性^[6]。骨架环化加上没有末端也使得环肽更抗蛋白酶降解, 特别是抗外肽酶^[7], 并赋予它们在生理环境(如血清)中可以持续存在的能力。环肽按照结构可划分成 3 个亚科: Möbius、bracelet 和胰蛋白酶抑制剂亚科(McoT I - I 和 McoT I - II)。其中, bracelet 亚科虽然在自然界中占大多数, 但比其他 2 种亚科更难折叠、更难用固相肽化学合成方法合成, 因此它们更少用于蛋白工程或药物设计应用。

2 环肽的药学应用

环肽的天然功能被认为是植物的防御分子, 因为它们在植物组织中广泛表达并具有抗昆虫、线虫和软体动物的活性。但是, 环肽的异常稳定性已经引起人们额外的兴趣——用于蛋白质工程和药物设计^[8]。环肽在药学研究方面的应用可以按照环肽在结构上是否有被置换以及被置换的程度分为 3 类: 天然环肽、点突变环肽、“嫁接”环肽^[3]。

2.1 天然环肽

天然发生的环肽具有很多潜在的生物学活性, 包括子宫收缩、溶血、抗菌、抗 HIV、抗肿瘤活性等。

第一个报道的是环肽的溶血活性, 该活性只在环状条件下才具有, 一旦线性化后就会失去, 表明完整的环状骨架对溶血活性很重要。其次, 该活性也取决于氨基酸序列组成, 例如同样来源于 *Viola odorata* 的 2 种环肽 cycloviolacins O2 和 O13 却具有不同的溶血活性, 虽然它们之间只有一个氨基酸差异: O2 是丝氨酸, 而 O13 在同一个位置是丙氨酸, 但仅失去一个羟基活性改变就超过 3 倍^[9]。对溶血活性的研究更多关注的是如何将此活性去掉, 以便将环肽框架用作制药设计模板。例如丙氨酸扫描鉴定环肽 Kalata B1(KB1)的表面区, 用丙氨酸取代 9 个氨基酸中的任何一个时, 都能显著减少溶血活性^[10]。

环肽的天然活性中, 研究最广泛的是抗 HIV 活性。最先报道该活性的是来自非洲树皮 bracelet 亚科的 2 种大环肽(circulins A 和 B)能抑制不同宿主细胞的 HIV 感染, 但它们对靶细胞具有细胞毒性。而来自 Möbius 亚科的 KB1 具有类似的 HIV 抑制活性, 但其对靶细胞的毒性较低, 因此它和其他 Möbius 环肽可能比 bracelet 环肽在抗 HIV 治疗中更有前景。然而, 环肽目前在临床上并没有被用作抗艾滋病药物, 原因是它们的治疗指数(治疗与毒性效应的比率)太窄^[11]。

抗肿瘤方面, 来自 *Viola ignobilis* 的环肽 vingo 5 对 HeLa 细胞的细胞毒、活性显示出凋亡依赖性^[12]。另外, 从白花蛇舌草中分离出的 3 个新环肽均显示能诱导细胞凋亡和抑制几种前列腺癌细胞的增殖和迁移^[13], 其中最活跃的环肽 DC3 能够抑制小鼠异种移植模型中的肿瘤生长。总体而言, 治疗指数都不是很高, 因此需要在这些化合物被开发成有效抗癌剂之前对其进行优化。

然而, Ravipati 等^[14]最近发现了一组来自堇菜科富含 Lys 的环肽, 它们对肿瘤细胞具有细胞毒性, 但对红细胞毒性较低, 这对于潜在的治疗应用是有利的。鉴于富含 Lys 的环肽具有较低的溶血活性, 它们可能具有药物设计的潜力。

2.2 点突变环肽

天然环肽虽然具有以上广泛的生物学功能, 但部分环肽由于具有溶血作用, 在医学治疗方面的发展潜力有限, 而对环肽结构进行最小程度的单个点突变, 既不影响其结构上的稳定性和生物活性, 又能降低它们在制药用途上不受欢迎的溶血活性, 因此探索单个氨基酸对环肽的结构完整性和生物活性的影响, 对促进它们在蛋白工程和制药上的应用至关重要。例如, KB1 具有杀虫和溶血活性, Simonsen 等^[15]采用丙氨酸扫描突变法将环肽 KB1 结构上所有的(23 个)非 Cys 残基用丙氨酸取代, 来研究结构对活性的影响, 发现 KB1 存在与它的作用方式相关的 3 个清晰的亚区: 第 1 个是以 Glu-7 为中心, 并与相邻残基组成亲水面, 这些残基对生物活性特别重要, 虽然存在于不同的环上, 但它们在三维结构上丛集在一起, 形成一个“生物活性面”, 即亲水面, KB1 的活性取决于表面占主要的亲水残基区; 第 2 个是表面暴露

的疏水残基区,疏水表面区与膜结合相关^[16],生物活性面和疏水区位于分子的同侧;第3个面是活性可修正提高区,位于生物活性面和疏水区相反的一侧。

KB1 的生物活性(杀虫活性和溶血活性)和亲水区及疏水区的完整都有关系,亲水区负责与膜的磷脂结合,疏水区则插入膜的疏水核。亲水区突变(疏水区不变),这2种活性会同时骤减。如果亲水区不发生变化,在疏水区引入一个高度亲水的赖氨酸,同样会引起这2种活性的骤减,因为亲水残基阻碍了与膜的疏水相互作用,因此造成活性的损失。相反,亲水区不变,而只是在疏水区的某些位置引入一个不同的疏水氨基酸(例如突变成 Ala),则不会减少太多杀虫活性,由于丙氨酸也是疏水氨基酸,它取代一个疏水区的氨基酸不会严重影响膜的结合,因此不会干扰环肽的杀虫功能,而溶血活性就会受到影响,因为溶血活性还与疏水性(表面暴露的疏水区的大小)强烈相关^[17](即溶血活性既取决于亲水区,还与疏水区的疏水性相关)。肽的疏水性越强,它的溶血性就越强,一般具有溶血特性的肽通过疏水相互作用插入红细胞膜的疏水核,如果氨基酸突变使疏水区的完整性破坏后,肽就不能作用于细胞膜,溶血活性也就失去^[18]。并且对于疏水区,溶血活性与取代氨基酸侧链的疏水性相关,也就是取代氨基酸的疏水性越弱,肽的溶血活性就越弱。具有更高疏水性的肽穿透红细胞膜的疏水核就越深,从而在细胞膜上形成孔,造成更强的溶血^[19]。

以上通过将 KB1 疏水区的氨基酸突变成丙氨酸可以保持其杀虫活性,且大幅减少溶血效应。由于抗肿瘤活性和杀虫活性的作用机制类似,因此也可以将具有抗癌作用的环肽疏水区进行类似氨基酸突变,从而将制药上不受欢迎的溶血作用降到最小,而抗肿瘤活性不会受到较大影响,这样原来有溶血作用的抗癌环肽的治疗潜力就可重新得到挖掘。

除了单个点突变外,Craig 等^[20]合成并鉴定了2种在多个位点同时进行突变的环肽[W19K/P20N/V21K]KB1 和[P20D/V21K]KB1,其中构成天然 KB1 中的疏水区的一部分残基用含极性或带电残基的表位替代。尽管残基类型发生了

实质性改变,并且由于将新表位移植到环中而引起疏水性质的改变。这2种突变后的环肽仍有天然折叠,这项研究证实外来表位可以成功移植到环肽框架中而不破坏 CCK 的折叠。此外,更重要的是,通过增加突变肽表面的极性和电荷可去除溶血活性,表明环肽框架适合于能促进其生物制药特性形成的突变。

2.3 “嫁接”环肽

环肽作为治疗剂,最有前景的应用既不是对环肽的天然活性进行开发,也不是对环肽结构进行点突变,而是对其原有活性进行局部改变,在点突变的基础上,利用环肽对序列变化的高度耐受性,使它们能用作框架进行片段更长的分子“嫁接”,以产生具有新的生物学活性的环肽。

虽然线状生物活性肽可能非常具有潜力,但它们通常易受蛋白酶降解,因此如果全身给药则可能无法到达其作用目标;相反,将生物活性表位掺入环肽支架,则可以保护其免于降解^[21],这一过程又称为“嫁接”,是指一段生物活性肽序列取代环肽支架的一个或多个天然环,以形成具有“量身定做”特性的一个环状杂合分子。生物活性表位来源广泛,可以是肽(包括天然或合成肽);也可以是来源于一个更大蛋白的一段肽序列(即蛋白片段);或者基于一个噬菌体文库的一段肽序列。一般这种环肽支架不应有任何不受欢迎的天然活性,例如在大多数情况下,嫁接可以去除天然 KB1 的溶血活性,这是环肽用于制药领域需要重点考虑的方面^[22]。

植物环肽包含6个环域,其中一些环比较保守,例如环1和4一起形成半胱氨酸结的核心,其序列高度保守,不能被替换;另一些环则允许序列高度变化,因此可以在植物环肽上嫁接具有生理活性的多肽片段,利用植物环肽在体内的稳定性和较高的生物利用率,以提高多肽片段在体内的稳定性和存留时间。大多数嫁接研究集中在单个环上,典型的活性表位大小为6~8个氨基酸。其中,环6是最常见的嫁接环,环6嫁接的环肽无论是对于 Mobius 还是胰蛋白酶抑制剂亚科的框架,通常都能很好地折叠;环1迄今仅被用作胰蛋白酶抑制剂环肽的嫁接位点^[8],胰蛋白酶抑制剂 MCoTI-II 是一种有价值的环肽支架,总共有5个

环, 其中环 1 通常负责胰蛋白酶的结合^[23], 而且它是 MCoT I 肽的反应位点环, 因此可以将之改造成能抑制各种不同蛋白酶活性的抑制剂, 从而能对相当广范围的蛋白酶活性进行调节。例如, 环 1 嫁接能够抑制不同的蛋白酶, 如蛋白裂解酶、口蹄疫病毒 3C 蛋白酶、 β 胰蛋白酶等; 环 2 和环 3 相对较少用于嫁接研究, 可能是由于嫁接中会出现非天然的手性结构^[8]。

尽管大多数嫁接研究都涉及单个环的替换, 但是也可以同时嫁接 2 个或更多的环, 并且已经用于靶表位特别大或者在需要双重靶向或双重功能的情况。例如, 多发性硬化(multiple sclerosis, MS)是中枢神经系统的一种炎症性疾病, 其特征是髓鞘和轴突的破坏导致渐进性残疾。中枢神经系统蛋白的肽表位, 如髓鞘少突胶质细胞糖蛋白(myelin oligodendrocyte glycoprotein, MOG), 具有良好的免疫调节潜能, 但其稳定性和生物利用率差是临床应用的主要障碍。为了克服这个问题, 将 MOG 序列嫁接到 KB1 中, 用于多发性硬化药物的开发, 其中 22 个氨基酸的大表位跨越了 KB1 的环 5 和 6^[24]。其中一种嫁接多肽 MOG3 在 MS 模型中显示出有效的预防疾病发展的能力, 这些结果证明了工程化环肽用于治疗 MS 的潜力。后者是指多靶向治疗将成为开发下一代癌症治疗药物的新方向, 它的出现是由于传统的单一靶向治疗经常遇到耐药性问题, 为了解决这个问题, Chan 等^[25]将 2 种抗血管生成表位 YwKV(‘w’表示 D-Trp)和 YHLNQP 分别嫁接到 MCoTI-II 的环 5 和 6 上, 以生成有效的具有双靶向血管生成的抑制剂。这 2 个表位的组合将通过靶向不同的血管生成途径而引起协同效应, 并与单一表位相比, 提高了效力。因此, MCoTI-II 有望用作一种针对广泛癌症的联合治疗形式。这种双重靶向将来或许会成为一个越来越广泛的应用领域, 并且相对于其他一些基于肽的模式, 双重靶向体现了环肽框架的特殊优势。

目前只有 KB1、MCoT I - I 以及 MCoT I - II 3 种环肽已成功用于嫁接, 其中 KB1 框架倾向于胞外靶标以及对膜结合可能有利的情况, 而 MCoT I - I 和 MCoT I - II 用于胞内靶标或涉及酶抑制的情况(见前述)^[8]。前者如肿瘤生长通常与不

受调节的血管生成相关, 因此能抗血管生成的活性分子在癌症治疗中具有潜在的应用价值, Gunasekera 等^[26]将能拮抗血管内皮生长因子 A(VEGF-A)及其受体相互作用的一段富含 Arg 的六肽嫁接到 KB1 的几个环上, 产生了具有抗 VEGF 活性的环肽, 像大多数线状肽一样, 这样的六肽序列易于蛋白水解、生物利用率差, 本身不太可能用作药物, 为克服这些缺陷, 需要将这个多精氨酸肽序列分别嫁接到 KB1 的环 2、3、5、6 上, 其中嫁接到环 3 的环肽显示出阻断 VEGF-A 和受体结合的最高活性, 而且嫁接后天然 KB1 的溶血活性没有了, 六肽序列本身对蛋白水解的敏感性也减少了, 此实验证明了环肽框架对外源肽序列替换的耐受性。类似的方法最近已用于靶向缓激肽(治疗疼痛)^[27]和黑皮质素 4 受体(melanocortin receptor-4, MC4R, 治疗肥胖症)^[28]。值得注意的是, 基于 KB1 的缓激肽拮抗剂被证明可口服生物利用, 突出了环肽支架具有可用于开发口服生物利用肽治疗的潜力; 另外, 嫁接环肽框架可用于选择性靶向结构上密切相关的受体, 例如黑皮质素受体, Eliassen 等^[28]设计了一个选择性的 MC4R 兴奋剂, 可以治疗肥胖症, 环肽 KB1 在合并了一个生物活性四肽 HFRW 后, 对 MC4R 具有高亲和性, 选择性至少是 MC1R、MC3R、MC5R 的 300 倍, 预计未来会有越来越多使用环肽作为工具, 探索选择受体亚型。

以上大多数嫁接 KB1 环肽结合的是胞外靶标, 然而最近发现一些环肽可以穿透细胞, 因此将活性分子运送到细胞内是一个有吸引力的策略。例如 MCoT I - II 是第一个被发现能进入细胞的环肽, 此外 MCoT I - I 也能穿过细胞膜, 这使得嫁接 MCoT I 靶向胞内 PPI 成为可能, 而且胰蛋白酶抑制亚科环肽浓度即使高达 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 也对哺乳动物细胞也没有毒性^[29], 因此有越来越多兴趣用它们靶向胞内受体。例如 SET 蛋白, 由于它具有抑制肿瘤、抑制基因蛋白磷酸酶 2A(pp2a)的功能, 是癌症治疗中一种很有前景的药物靶点。而来自载脂蛋白 E 的 COG 肽是 SET 的强效拮抗剂, 它们在与胞内 SET 结合后能诱导肿瘤细胞内的细胞毒性, 并调节核因子 κB (NF- κB)信号传导途径。然而 COG 肽的治疗潜力有限, 因为它们的蛋

白水解稳定性差,且生物利用率低,但可嫁接到 McoTI-II,并将其递送到细胞内,调节参与癌症进展的细胞内途径。嫁接后的 MCoTI-II 肽对肿瘤细胞具有细胞毒性,并且在人血清中具有高稳定性。McoTI-II 的这种稳定性和细胞穿透能力在药物开发中具有重要的作用,特别是靶向细胞内 PPI^[30]。至今,细胞内靶向大多是在癌症治疗中靶向 PPI 或细胞内酶。例如使用嫁接环肽来阻断 p53-HDM2 相互作用^[29]以及靶向 BCR-ABL 激酶(与慢性髓系白血病密切相关)^[31]。总之,环肽对氨基酸替换的耐受性、突出稳定性和细胞穿透特性使其特别有潜力用作支架运送活性表位作用于胞内位点^[32]。

迄今为止,McoTI-I 和 McoTI-II 是药物设计中 2 个偏爱的支架,具有细胞穿透特性,不过比起典型的线状细胞穿透肽 TAT,它们的内化效率还很低。Huang 等^[33]设计了 McoTI-II 的几个类似物 Mco-RM1、Mco-RM2、Mco-RM3、Mco-CTP,其中 Mco-RM1 的正电荷区的所有 Lys 都用 Arg 取代,Mco-RM2 的所有酸性残基都用碱性残基取代,Mco-CTP 包括 CPP 序列的一部分(这一序列能更好的内化,在细胞质具有更高的分配)。结果 Mco-RM1 吸收效率提高了 20%,Mco-CTP 提高了 240%,而且 Mco-RM1 和 Mco-CTP 都保留了 McoTI-II 的整个结构,并在血清中稳定存在,修饰的环肽也保持了整个折叠稳定性。

3 结论

环肽现在是一个被广泛研究的植物多肽家族,并且正在被人们接受为具有潜力的药物设计支架。虽然具有与制药相关的潜力,但由于一些环肽存在截然不同的活性,例如对癌细胞生长具有理想的抑制活性,常伴随着对正常细胞的毒性,因此迄今为止没有任何一种环肽已经进入人体临床试验阶段。虽然如此,由于该领域研究目前尚处在起步阶段,而且环肽在动物模型中获得的实验结果意味着这种情况很可能在不久的将来就会实现。目前该领域面临的最大挑战是如何提高环肽的口服生物利用率,虽然有些环肽已被证明具有口服活性,但是关于实际口服生物利用率的文献还很少,因此预计未来几年会出现更多的关于这些参数的定量研究报道^[5,8]。

REFERENCES

- [1] CAMARERO J A. Cyclotides, a versatile ultrastable micro-protein scaffold for biotechnological applications [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2017, 27(23): 5089-5099.
- [2] GONGORA-BENITEZ M, TULLA-PUCHE J, ALBERICIO F. Multifaceted roles of disulfide bonds: peptides as therapeutics [J]. *Chem Rev*, 2014(114): 901-926.
- [3] IDMANN J, CRAIK D J. Discovery, structure, function, and applications of cyclotides: circular proteins from plants [J]. *J Exp Bot*, 2016, 67(16): 4801-12.
- [4] WHITE A M, CRAIK D J. Discovery and optimization of peptide macrocycles [J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2016, 1(12): 1151-1163.
- [5] GOULD A, CAMARERO J A. Cyclotides: Overview and Biotechnological Applications [J]. *Chembiochem*, 2017, 18(14): 1350-1363.
- [6] COLGRAVE M L, CRAIK D J. Thermal, chemical, and enzymatic stability of the cyclotide kalata B1: the importance of the cyclic cystine knot [J]. *Biochemistry*, 2004, 43(20): 5965-5975.
- [7] NGUYEN G K, KAM A, LOO S. Butelase 1: a versatile ligase for peptide and protein macrocyclization [J]. *J Am Chem Soc*, 2015, 137(49): 15398-15401.
- [8] CRAIK D J, DU J. Cyclotides as drug design scaffolds [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2017(38): 8-16.
- [9] IRELAND D C, COLGRAVE M L, CRAIK D J. A novel suite of cyclotides from *Viola odorata*: sequence variation and the implications for structure, function and stability [J]. *Biochem J*, 2006, 400(1): 1-12.
- [10] MOLESINI B, TREGGIARI D, DALBENI A, et al. Plant cystine-knot peptides: pharmacological perspectives [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2017, 83(1): 63-70.
- [11] CRAIK D J. Host-Defense Activities of Cyclotides [J]. *Toxins (Basel)*, 2012, 4(2): 139-156.
- [12] ESMAEILI M A, ABAGHERI-MAHABADI N, HASHEMPOUR H, et al. *Viola* plant cyclotide vigno 5 induces mitochondria-mediated apoptosis via cytochrome C release and caspases activation in cervical cancer cells [J]. *Fitoterapia*, 2016(109): 162-168.
- [13] HU E, WANG D, CHEN J. Novel cyclotides from *Hedyotis diffusa* induce apoptosis and inhibit proliferation and migration of prostate cancer cells [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(3): 4059-4065.
- [14] RAVIPATI A S, HENRIQUES S T, POTH A G, et al. Lysine-rich cyclotides: a new subclass of circular knotted proteins from violaceae [J]. *ACS Chem Biol*, 2015, 10(11): 2491-500.
- [15] SIMONSEN S M, SANDO L, ROSENGREN K J, et al. Alanine scanning mutagenesis of the prototypic cyclotide reveals a cluster of residues essential for bioactivity [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(15): 9805-9813.
- [16] TROEIRA HENRIQUES S, CRAIK D J. Cyclotide Structure and Function: The Role of Membrane Binding and Permeation [J]. *Biochemistry*, 2017, 56(5): 669-682.
- [17] ABOYE T, MEEKS C J, MAJUMDER S, et al. Design of MCoTI-Based cyclotide with angiotensin (1-7)-like activity [J]. *Molecules*, 2016, 21(2): 152. Doi: 10.3390/molecules 21020152.
- [18] HENRIQUES S T, HUANG Y H, et al. Decoding the membrane activity of the cyclotide kalata B1: the importance of phosphatidylethanolaminephospholipids and lipid

- organization on hemolytic and anti-HIV activities [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(27): 24231-24241.
- [19] CHEN Y, GUARNIERI M T, VASIL A I, et al. Role of peptide hydrophobicity in the mechanism of action of alpha-helical antimicrobial peptides [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, 51(4): 1398-406.
- [20] CLARK R J, DALY N L, CRAIK D J. Structural plasticity of the cyclic-cystine-knot framework: implications for biological activity and drug design [J]. *Biochem J*, 2006, 394(pt 1): 85-93.
- [21] DE VEER S J, WEIDMANN J, CRAIK D J. Cyclotides as Tools in Chemical Biology [J]. *Acc Chem Res*, 2017, 50(7): 1557-1565.
- [22] QU H, SMITHIES B J, DUREK T, et al. Synthesis and protein engineering applications of cyclotides [J]. *Australian J Chem*, 2017, 70(2): 152-161.
- [23] LOKTEV A, HABERKORN U, MIER W. Multicyclic Peptides as Scaffolds for the Development of Tumor Targeting Agents [J]. *Curr Med Chem*, 2017, 24(20): 2141-2155.
- [24] WANG C K, GRUBER C W, CEMAAR M, et al. Molecular grafting onto a stable framework yields novel cyclic peptides for the treatment of multiple sclerosis [J]. *ACS Chem Biol*, 2014, 9(1): 156-163.
- [25] CHAN L Y, CRAIK D J, DALY N L. Dual-targeting anti-angiogenic cyclic peptides as potential drug leads for cancer therapy [J]. *Sci Rep*, 2016(6): 35347.
- [26] GUNASEKERA S, FOLEY F M, CLARK R J. Engineering stabilized vascular endothelial growth factor-A antagonists: synthesis, structural characterization, and bioactivity of grafted analogues of cyclotides [J]. *J Med Chem*, 2008, 51(24): 7697-7704.
- [27] WONG C T, ROWLANDS D K, WONG C H, et al. Orally active peptidic bradykinin B1 receptor antagonists engineered from a cyclotide scaffold for inflammatory pain treatment. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2012, 51(23): 5620-5624.
- [28] ELIASSEN R, DALY N L, WULFF B S, et al. Design, synthesis, structural and functional characterization of novel melanocortin agonists based on the cyclotide kalata B1 [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(48): 40493-40501.
- [29] JI Y, MAJUMDER S, MILLARD M, et al. In vivo activation of the p53 tumor suppressor pathway by an engineered cyclotide [J]. *J Am Chem Soc*, 2013, 135(31): 11623-11633.
- [30] D'SOUZA C, HENRIQUES S T, WANG C K, et al. Using the MCoTI-II cyclotide scaffold to design a stable cyclic peptide antagonist of SET, a protein overexpressed in human cancer [J]. *Biochemistry*, 2016, 55(2): 396-405.
- [31] HUANG Y H, HENRIQUES S T, WANG C K, et al. Design of substrate-based BCR-ABL kinase inhibitors using the cyclotide scaffold [J]. *Sci Rep*, 2015(5): 12974. Doi: 10.1038/srep12974.
- [32] HENRIQUES S T, CRAIK D J. Importance of the cell membrane on the mechanism of action of cyclotides [J]. *ACS Chem Biol*, 2012, 7(4): 626-636.
- [33] HUANG Y H, CHAOUSIS S, CHENEVAL O, et al. Optimization of the cyclotide framework to improve cell penetration properties [J]. *Front Pharmacol*, 2015(6): 17. Doi: 10.3389/fphar.2015.00017.

收稿日期: 2018-4-10

(本文责编: 曹粤锋)