

技术与方法

从癌性腹水中分离 III 型前胶原氨基末端肽

李新民 殷蔚蕙 李忆梅 薛竹马 兰

(北京友谊医院消化研究室, 北京 100050)

提 要

采用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀, 二次不同 pH 的 DEAE-Sephacel 离子交换柱层析及 Sephacryl S-200 分子筛柱层析从人癌性腹水中分离并纯化了 PIIP, 并制备了抗血清。经 SDS-PAGE 鉴定为均一蛋白带, 分子量约为 47kD。经西德药盒测定, 与西德、芬兰 PIIP 抑制曲线平行关系良好。氨基酸组成测定亦与文献报道基本一致。抗血清效价较高, 特异性强。本研究在方法学上有一定创新, 提纯方法简便易行。

关键词 人, 腹水, III 型前胶原肽, 纯化

大量胶原沉积于肝组织中造成的肝纤维化是慢性肝病及肝硬化肝功能障碍及多种并发症的原因。以前采用肝组织活检方法确定肝纤维增生程度, 由于其创伤性及难以反复进行而无法广泛应用。七十年代后期国外开展了血清学诊断方法的研究。1979 年 Rohde^[1] 第一个从胎牛皮中分离提纯了 III 型前胶原氨基末端肽 (PIIP, 45kD), 并建立了 RIA 检测方法, 证明血 PIIP 含量在肝病中的诊断意义。1983 年, 西德贝林格厂制成 PIIP 药盒出售。大量文献证明为一较好的肝纤维化血清检测指标^[2-4], 在国外已被广泛应用。由于其价格昂贵, 在我国难以广泛使用。为给肝纤维化的诊断及研究提供手段, 我们从人腹水中提取 PIIP 并制备抗血清, 建立了血清 PIIP 检测方法。

材料及方法

1. 材料

(1) 人癌性腹水 畸胎瘤腹腔转移患者的腹水

(2) 主要试剂 N-乙基顺丁烯二酰亚胺 (NEM), 苯甲磺酰氟化物 (PMSF), 对氯汞苯甲酸 (PMB), RIA-Gnost Procollagen-III-Peptide, Procollagen PIIP [¹²⁵I] Radioimmunoassay Kit、DEAE-Sephacel、Sephacryl S-200。

(3) 实验动物 新西兰白兔 (北京实验动物中心提供), 雄性, 体重 2.5kg。

2. 方法

(1) PIIP 的提取与纯化 取癌性腹水 3L, 加固体 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 到 40% 饱和度, 搅拌

参 考 文 献

- 1 Gabelli C *et al.* J Lipid Res, 1986; 27: 326
- 2 Utermann G. Am Heart J, 1987; 113: 433

3 解用虹等. 生物化学与生物物理学报, 1987; 19: 277

[本文于 1991 年 6 月 17 日收到, 7 月 24 日修回]

过夜。静置 4h, 16000g 离心 20min, 弃上清液。将沉淀溶于 50mmol/L Tris-HCl, 2mmol/L EDTA, 2mmol/L NEM, 2mmol/L PMB, 1mmol/L PMSF, 2mmol/L ICH_2COONa , 2mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 的缓冲液中, pH 8.6. 并与该缓冲液作充分透析, 以除去样品中 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 。经 DEAE-Sephacel 离子交换柱层析 (4.5cm × 5cm), 用上述缓冲液做 NaCl 阶段洗脱。洗脱后的活性峰部分与 10mmol/L 柠檬酸盐缓冲液 pH4.5 充分透析后, 25000g 离心 60min。取上清液, 再经 DEAE-Sephacel 离子交换柱 (1.5cm × 40cm), 用 0—0.6mmol/L NaCl, 10mmol/L 柠檬酸盐缓冲液 pH4.5 作线性梯度洗脱, 在 232nm 处监测蛋白峰。用西德 PIIP 药盒检测 PIIP 活性峰。合并活性峰部分, 与 10mmol/L NH_4HCO_3 充分透析后, 冷冻干燥。经 Sephacryl S-200 分子筛柱层析 (2.6cm × 100cm), 收集 PIIP 活性峰, 合并, 与 10mmol/L NH_4HCO_3 充分透析。分装, 冷冻干燥, 置 -20℃ 保存。全部提纯过程均在 4—8℃ 下进行。

(2) PIIP 鉴定

(a) SDS-PAGE 电泳: 采用改良的 Miller 不连续缓冲体系, 凝胶浓度为 10%, 电泳条件为电流 30mA, 稳流。电泳后, 经考马斯亮蓝 R_{250} 染色。

(b) 免疫活性鉴定: 用西德单克隆抗体药盒分别测定西德、芬兰及本室标准品以便进行对比。

(c) 氨基酸分析: 由北京市中药所检测。

(d) 蛋白质含量测定: 采用 Folin-酚法

(3) 抗血清制备

取提纯的 PIIP 200 μg 溶于 2ml NH_4HCO_3 , pH7.4 溶液, 加等量的弗氏完全佐剂, 给新西兰白兔作皮下多点免疫注射。两周后, 取同量抗原与等量不完全弗氏佐剂混合。作加强免疫注射。加强免疫注射后两周, 取同量抗原溶于 2ml 20mmol/L NH_4HCO_3 , pH7.5 溶液中, 取 1ml 加 4ml 生理盐水作耳缘静脉注射, 另 1ml 作皮下多点注射。10 天后, 耳缘静脉取血。

实验结果

1. PIIP 的回收率及纯化倍数

于各操作分离步骤后, 采用 Folin-酚法测定蛋白质含量。用西德 PIIP 药盒测定 PIIP 含量, 并计算回收及纯化倍数, 结果见表 1。

表 1 PIIP 的回收率及纯化倍数

步骤	蛋白质含量 mg	PIIP 含量 mg	比活性 mg PIIP/ mg 蛋白	PIIP 回收率 %	纯化倍数
腹水	835200	12	1.4×10^{-5}	100	1.0
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀	327700	11.5	3.5×10^{-5}	95.7	2.5
DEAE-Sephacel pH8.6	3230	10.2	3.2×10^{-5}	85.2	228.6
高速离心	283.5	7.5	2.6×10^{-5}	62.3	1857.1
DEAE-Sephacel pH4.5	67.5	4.9	7.3×10^{-5}	40.8	5214.3
Sephacryl S-200	4.3	4.3	1.0	35.7	71428.6

2. PIIP 的纯化

癌腹水中 PIIP 经 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 盐析初步分离后, 在 DEAE-Sephacel 上层析, 用 50mmol/L Tris-Cl, 2mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 缓冲液 pH8.6 阶段洗脱, 除去 96% 以上的杂蛋白, 而保留大部分的 PIIP (66.3%) 活性(表 1)。然后直接上 DEAE-Sephacel pH4.5 柱, 其结果如图 1 所示。可见大量杂蛋白在线性洗脱的前部分洗去, 在后半部分可见一个单一的 PIIP 活性峰。再经 Sephacryl S-200 凝胶过滤, 可见 3 个蛋白峰, 第 1 峰为 PIIP 活性峰(见图 2)。

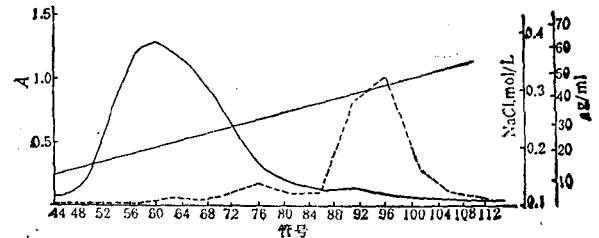


图 1 DEAE-Sephacel-pH4.5 柱

样品为 DEAE-Sephacel-pH8.6 柱后活性峰部分

3. PIIP 鉴定

经上述纯化分离步骤后, SDS-PAGE 电泳图上显示为一均一的蛋白带, 与标准分子量相

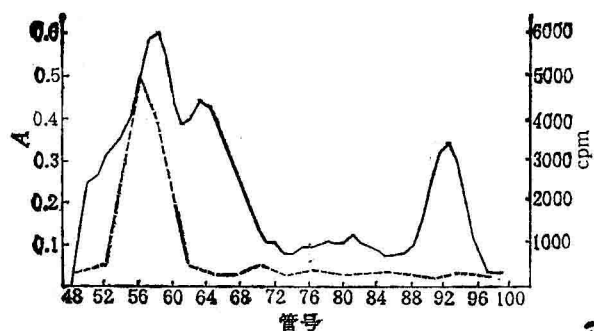


图2 Sephaeryl S-200 柱
样品为 DEAE-Sepñacel 柱后活性峰部分
——: 232nm ----: PIIP 活性

比,其分子量约为 47kD。经2-巯基乙醇还原后
为一条单一的蛋白带。见图 3。

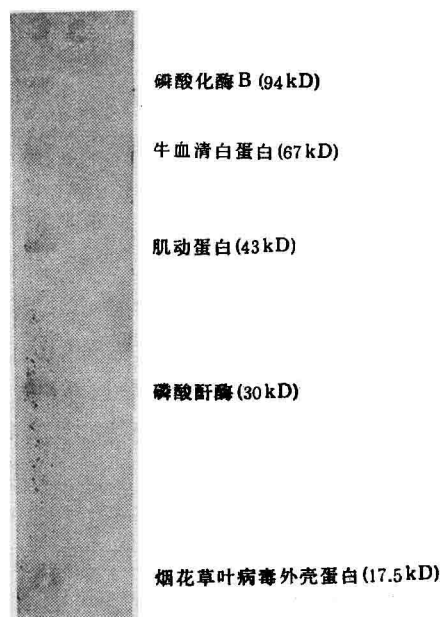


图3 SDS-聚丙烯酰胺凝胶(10%)电泳
B: 低分子量标准蛋白; C: PIIP

用西德的 PIIP 药盒,对西德,芬兰及本
室的 PIIP 标准品进行测定,结果表明三者抑
制曲线平行关系良好(见图 4)。

氨基酸分析结果表明,主要含有门冬氨酸、
丝氨酸。谷氨酸、脯氨酸及甘氨酸,而缺少蛋
氨酸及色氨酸(见表 2)。

4. 抗血清效价

用酶联免疫方法检测,抗体效价为 1:
25600。

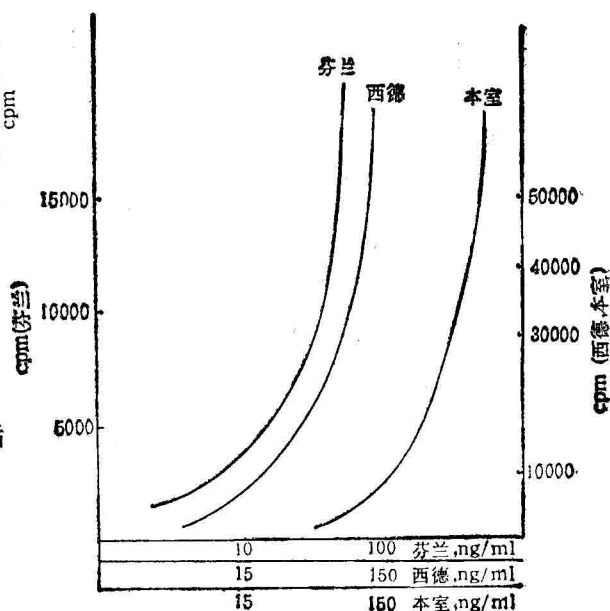


图4 应用西德 PIIP 药盒测定芬兰、西德及本室
PIIP 标准曲线

表 2 III 型

氨基酸	氨基酸组成(残基/分子)		
	牛皮 ¹⁾	人 ¹⁾	本 品
Hyp (羟脯)	9	8	未 测
Asp (门冬)	15	13	14
Thr (苏)	4	5	10
Ser (丝)	8	9	13
Glu (谷)	15	21	18
Pro (脯)	18	15	9
Gly (甘)	21	19	12
Ala (丙)	4	5	9
Val (缬)	5	5	8
Met (蛋)	0	0	0
Ile (异亮)	6	5	5
Leu (亮)	3	4	7
Tyr (酪)	2	2	1
Phe (苯丙)	1	2	4
His (组)	1	1	2
Lys (赖)	2	3	4
Arg (精)	3	4	4
Cys (胱)	12	13	1
Trp (色)	1	未测	0

1) Niemelä O. *Biochem J*, 1985; 232: 145.

讨 论

III 型胶原是一种间质胶原,在合成时先生

成前胶原,其两端各有一个延伸的附加肽,形成胶原时将两端的肽切去。III型前胶原肽为III型前胶原的氨基末端肽,在血中可以测到其含量。胶原合成旺盛时,III型前胶原肽在血中含量升高。文献报道血中PIIIP含量可以反映胶原合成状态^[2-5]。

西德贝林格厂于1983年推出PIIIP的放免药盒。该厂采用Rohde方法,从胎牛皮中分离III型前胶原,经胶原酶裂解切下氨基末端肽作为抗原。

由于人血清中至少有三种PIIIP分解产物与其抗血清起反应,造成血清稀释曲线与标准曲线斜率上的差异。因此,在测定时需要采用三种稀释浓度,以寻找50%结合率方法才能准确地定量,因而手续繁杂。芬兰学者从人癌性腹水中直接分离PIIIP^[9],并制备了放免检测药盒^[10],解决了上述问题,简化了操作程序,并减少了从牛皮前胶原上用胶原酶分解PIIIP的繁杂手续。我们在该文基础上做了一些改进,使提纯方法更加简便、易行。

Niemela的方法系将癌性腹水经 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀后,在pH8.5的条件下过DEAE-Sephacel柱作0—0.3mol/L NaCl线性洗脱。取活性峰经Sephacryl S-300柱层析,用NaCl线性洗脱。对此我们做了如下改进:(a) Niemela等采用pH8.5条件下,经DEAE-Sephacel柱,用NaCl线性洗脱法,虽能除去大量蛋白质,但亦损失50%以上的PIIIP,还需用PIIIP药盒监测其活性峰。我们改用NaCl阶段洗脱,取0.1—0.15mol/L部分,可除去96%以上的杂蛋白,并获得66.3%的PIIIP,且节省了活性峰的检定步骤。(b) 原文中采用Sephacryl S-300柱,经PBS洗脱步骤,经本实验证明纯化效率不高,杂蛋白与活性峰分不开,故减去此步。(c) 将第一步所得活性峰经透析,高速离心,

除去大量不溶于酸的杂蛋白,直接经DEAE-Sephacel柱pH4.5用NaCl线性洗脱,再次除去大量杂蛋白。(d) 经上述步骤后,再经Sephacryl S-200进一步纯化,采用pH8.6 NH_4HCO_3 及 $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ 作为洗脱液,取得了良好的分离效果。

应用本方法纯化的PIIIP,经SDS-PAGE证明为一条均一的蛋白带,分子量为47kD,较Niemela所报道的人PIIIP 42kD及牛PIIIP 45kD略高,其他作者有关PIIIP分子量的报道为43.3kD—70.0kD^[6-8]。经还原后为一条单一的蛋白带。氨基酸分析表明与牛及人的PIIIP大致相同^[6]。由于PIIIP是由三股 α -肽链组成,含有三个部分,即一个球形部分(Col1),一个短的三股螺旋部分(Col3)及一个非胶原部分(Col2)。Niemela所报道的氨基酸组成材料为PIIIP的单股成份,而我室系采用完整PIIIP,虽取其三分之一量作为单股计算,但由于二者结构上的差异及测定仪器的不同,可能造成个别氨基酸数量的差别。经免疫活性对比实验,本品与西德及芬兰药盒相同,可作为建立检测药盒的抗原应用。

参 考 文 献

- 1 Rohde H. *Eur J Clin Invest*, 1979; 9: 451
- 2 殷蔚莢,临床肝胆杂志,1987;3(4): 190
- 3 丸山勝也,肝脏,1984;24(1): 24
- 4 Colombo M. *Hepatology*, 1985; 5(6):474
- 5 上野隆登,肝脏,1989;30(4): 429
- 6 Nouark H. *Eur J Biochem*, 1976; 70: 205
- 7 Bruckner P. *Eur J Biochem*, 1978;90: 595
- 8 Pierard D. *Anal Biochem*, 1984; 141: 127
- 9 Niemela O. *Biochem J*, 1985;232: 145
- 10 Risteli J. *Clin Chem*, 1988; 34(1): 715

[本文于1990年9月25日收到,

1991年1月23日修回]