

Comparison of the Effects of two Synthesized Inhibitors of Respiratory Chain on Heart Muscle Preparation

Guo Dahai Xu Jianxing

(Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing 100101)

Gu Lianquan

(Department of chemistry, Zhongshan University, Guangzhou)

ABSTRACT

The inhibitory effects of two synthesized 3-nitrosalicyl-N-dodecylamide and 2-hydroxy-3-N-dodecylamide-pyridine on the respiratory chain had been compared by using heart muscle preparation from pig heart. 3-nitrosalicyl-N-dodecylamide showed stronger effect than 2-hydroxy-3-N-dodecylamide-pyridine on all the three Q-related enzymes of NADH-Q reductase, succinate-Q reductase and QH_2 -cytochrome c reductase. No any inhibitory effect of this two compounds on the terminal oxidase had been observed. The hydroxy groups in the rings of both compounds may be involved in the inhibitory effect through their disturbance on the hydration and dehydration of ubiquinone.

Key words respiratory chain, inhibitor, 3-nitrosalicyl-N-dodecylamide, 2-hydroxy-3-N-dodecylamide-pyridine

重组人超氧化物歧化酶化学修饰的初步研究

骆训懿 王晶翼 谢邦铁 李战青 刘晓琳 陈晓穗

(海军总医院分子生物学研究室, 北京 100037)

提 要

在高效表达重组人铜锌超氧化物歧化酶(rh Cu/Zn SOD), 并纯化得到比活大于4000单位的rh Cu/Zn SOD纯品的基础上, 采用活化酯法将聚乙二醇(PEG)与rh Cu/Zn SOD交联, 获得分子量约6万的PEG-SOD交联物。经PEG修饰的酶稳定性增强, 表现为对酸、碱和热的耐受力均较未交联酶高。修饰酶的生物半衰期为15h, 是天然酶的90倍, 酶活性保留80%以上。还实验观察了修饰剂用量与修饰酶保留活性之间的关系。

关键词 超氧化物歧化酶, 蛋白质化学修饰, 聚乙二醇, 基因工程

超氧化物歧化酶(SOD)作为超氧自由基的天然清除剂, 可抗炎、抗辐射、抗衰老、抗肿瘤以及抗缺血后再灌注损伤, 具有广泛的医用价值。但是因为生物半衰期短(仅10min左右)、异体蛋白免疫原性以及稳定性较差等缺点, 使其作为药用酶受到局限。基因工程SOD未解决生物半衰期短的问题, 并有报道, 从大

肠杆菌获得的重组人SOD(rh SOD)仍具有免疫原性, 故也限制了其临床应用。近年来, 国内外采用无毒、无免疫原性的高分子化合物如聚乙二醇(PEG)^[1]、右旋糖酐^[2]、淀粉^[3]等对天然SOD进行化学修饰, 得到生物半衰期延

长数小时至数十小时不等的修饰酶,其中以 PEG 修饰酶的半衰期最长.同时,由于酶分子表面抗原决定簇部分被修饰剂掩盖,还可降低以至消除免疫原性.

本文在高效表达 rh SOD,并纯化得到 rh SOD 纯品的基础上,用 PEG 对酶蛋白进行化学修饰,旨在探索长半衰期基因工程 SOD 的制备,并对制品的一些理化性质进行了初步观察,结果如下.

1 材料与方法

1.1 材料

菌种:本室构建的含 pCZS2 载体的大肠杆菌.铜螯合亲和层析柱填料:北京大学生物系提供. Sephadex G75: Pharmacia 公司产品. PEG4000: 日本进口分装.

1.2 方法

1.2.1 人 SOD 基因在大肠杆菌中的表达

将含 pCZS2 载体的大肠杆菌接种于 LB 培养基中, 32℃ 振荡培养,当细胞密度达 $A_{600} > 0.4$ 时,加入硫酸铜溶液,调温至 42℃,继续振荡,温度诱导一定时间后,培养液离心,弃上清留湿菌体称重.

1.2.2 rh SOD 的分离纯化 湿菌体溶于一定体积的蒸馏水中,超声破碎细胞,离心去细胞碎片,上清液经热变性、硫酸铵沉淀后透析除盐.铜螯合亲和层析柱 (1.6cm×25cm) 用 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液 pH7.0 (PBS) 平衡,经硫酸铵沉淀并透析后的 rhSOD 粗制品上柱,280nm 波长监测,先以平衡缓冲液淋洗,当杂蛋白峰洗下后,改用含 0.5mol/L 氯化钠的 0.02mol/L 柠檬酸盐缓冲液 (pH5.0) 洗脱 rhSOD 蛋白;测酶活性,收集 SOD 活性峰,透析除盐、浓缩、冻干,产品于 -20℃ 保存.

1.2.3 PEG 活性酯的制备 参照 Veronese 等^[4]的方法.将 PEG 溶于二氧六环中,加入琥珀酸酐,以吡啶为催化剂,在 100℃ 下回流 3—4h.反应液冷却后在剧烈搅拌下加无水乙醚至沉淀不再出现为止,继续于冰浴中搅拌 30min,过滤;沉淀溶于二氯甲烷,过滤除

去不溶物,在滤液中加入无水乙醚至沉淀不再产生后,冰浴中搅拌 15min;再次过滤得沉淀,真空干燥备用.该产物与 N-羧基琥珀酰亚胺按一定比例溶于二甲基甲酰胺 (DMF),将二环己基碳二亚胺 (DCC) 的 DMF 溶液加入其中,搅拌过夜,过滤除沉淀,滤液处理同上,所得沉淀即为 PEG 活性酯.

1.2.4 PEG 活性酯与 rh SOD 的交联

PEG 活性酯和 rh SOD 按一定比例加到 0.1mol/L 硼酸盐缓冲液 (pH8.5) 中,4℃ 下反应 4h.反应液立即上 Sephadex G75 层析柱,以 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH7.4) 洗脱,收集酶活性峰.

1.2.5 SOD 活性测定 样品的酶活性测定采用光化学扩增法,以人 Cu/Zn SOD 纯品制作标准曲线计算酶活性单位.

1.2.6 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 浓缩胶浓度 4.5%,分离胶浓度 15%,分子量标准为 Pharmacia 公司产品.蛋白质浓度用 Lowry 法测定.

1.2.7 生物半衰期测定 雄性 Waster 大鼠,体重 200—250g,乙醚吸入麻醉后从尾静脉注入待测样品 0.2ml (SOD 6000 活性单位).注射后于不同时间剪尾采血,分离血清,测酶活性.以时间为横坐标,酶活百分率为纵坐标绘制曲线.

2 结果与讨论

基因工程产品的后处理是生物工程技术中的一项重要内容.根据 SOD 的特性,我们采用金属螯合亲和层析.图 1 为经热变性和硫酸铵沉淀后的工程菌上清液再经铜螯合亲和层析柱的洗脱图谱.纯化各步样品的 SDS-PAGE 结果如图 2,亲和层析后大部分杂蛋白被除去,制品的比活达 4000U/mg 以上.本法经一次层析便可获得高纯度制品,且层析柱经 PBS 平衡后可反复使用,结果重复性好,并有较高回收率 (54%),从而使 SOD 基因工程批量生产流程较为简便快速,便于制备性应用.

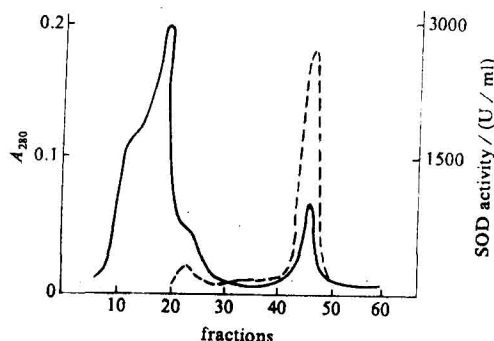


图1 rh SOD的铜整合亲和层析图谱

Fig. 1 Elution profile for rh SOD by Cu^{2+} -chelating affinity chromatography

—: 280nm 光吸收, ---: SOD 活性
—: Absorbance at 280nm, ---: SOD activity

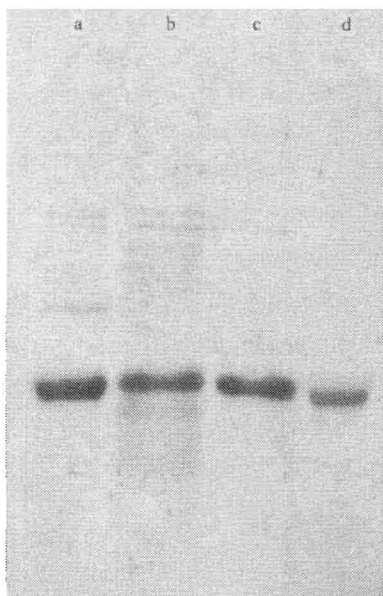


图2 rh SOD 纯化各步的 SDS-PAGE 图谱

Fig. 2 The profiles for different steps of purification of rh SOD on SDS-PAGE

- a. 工程菌破碎上清液, b. 65°C 热变性后,
c. 硫酸铵沉淀后, d. 铜整合亲和层析后
a. Supernatant of fragmented genetic engineering *E. coli*,
b. After thermal denaturation at 65°C
c. After salt precipitation by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
d. By Cu^{2+} -chelating affinity chromatography

图3为PEG与rh SOD的交联反应液经Sephadex G75柱层析的洗脱曲线。其中第1峰

为酶活性峰,第3峰为N-羧基琥珀酰亚胺峰;未交联的rh SOD在相同条件下层析,得第2峰。出峰顺序提示,第一峰为PEG-rh SOD交联物,因其分子量增大而先于未交联的rh SOD峰洗脱。SDS-PAGE结果显示,修饰酶的迁移率小于未修饰酶,分子量达6万以上,进一步证明第一峰为目的产物:PEG修饰的rh SOD。

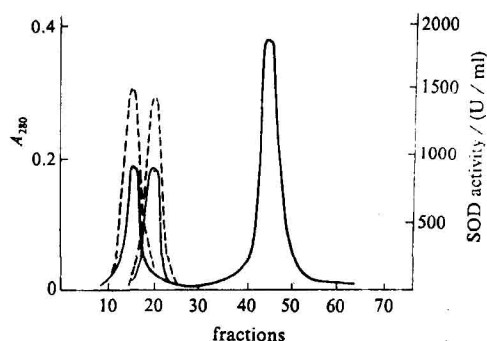


图3 PEG-rh SOD的Sephadex G75凝胶层析图谱

Fig. 3 A Sephadex G75 elution profile for PEG-rh SOD

—: 280nm 光吸收, ---: SOD 活性
—: Absorbance at 280nm, ---: SOD activity

为了解修饰酶的稳定性,测定了修饰酶对酸、碱和热的耐受力(图4)。从图4可见,与未修饰酶相比,修饰酶的耐酸、耐碱和耐热能力均有所提高,符合修饰酶理化性质改变的一般规律。

用大鼠实验检测修饰酶的生物半衰期为15h,比未修饰酶半衰期延长90倍(图5)。预试验中发现,修饰酶半衰期延长的程度因修饰剂用量不同而有较大差异。此差异是否还与酶的来源不同有关?有待试验探讨。

修饰剂用量与修饰酶保留活性之间的关系已有文献报道^[4]。本文实验结果见表1。对于修饰后酶活力下降的原因有多种推论,有人认为,可能由于引导底物超氧离子至酶活性部位的通道上的阳离子被掩盖所致^[5];也有人认为,虽然PEG是与SOD分子中非活性位赖氨酸的 $\epsilon\text{-NH}_2$ 缩合而形成共价交联物,酶活性部位结构受影响不大,但是随着连接到SOD分子上的

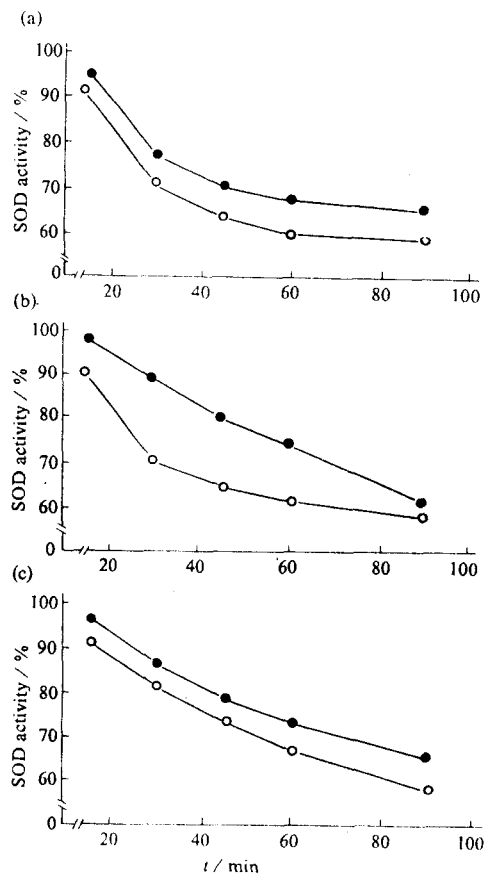


图 4 rh SOD, PEG-rh SOD 对酸、碱、热的耐受力
Fig. 4 The resistant ability of rh SOD and PEG-rh SOD to acid, alkali and heat

- (a) 对酸的耐受力, pH5.2, 25℃保温;
The resistant ability to acid at pH5.2, 25℃;
(b) 对碱的耐受力, pH10.5, 25℃保温;
The resistant ability to alkali at pH10.5, 25℃;
(c) 对热的耐受力, pH7.4, 62℃保温;
The resistant ability to heat at pH7.4, 62℃.
○ — ○ rh SOD, ● — ● PEG-rh SOD

表 1 PEG 用量与修饰酶保留活性的关系
Table 1 The relation between the amount of PEG used for modification and the remained enzyme activity

PEG 用量 amount of PEG used PEG : rh SOD (mol : mol)	修饰酶保留活性 remained enzyme activity /%
10	88
15	75
20	45

PEG 增多,可在酶分子表面形成 PEG 层,由此

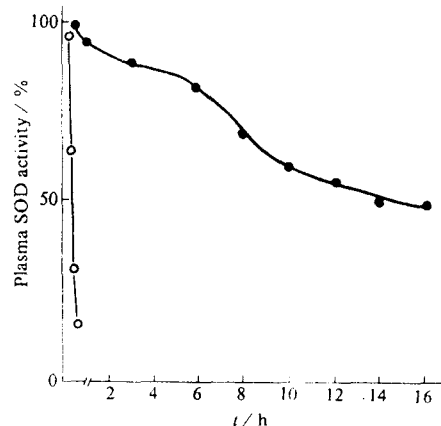


图 5 rh SOD, PEG-rh SOD 在血循环中的变化
Fig. 5 Fate of rh SOD, PEG-rh SOD in the circulation

○ — ○ rh SOD, ● — ● PEG-rh SOD

造成的空间位阻效应导致酶活性部分降低^[6]。鉴于此,需要寻找交联反应时修饰剂与酶用量的最佳比例,以获得保留较高酶活性的长半衰期修饰酶。

用 PEG 修饰 SOD 的方法有多种^[4-7],本文采用的 DCC 法虽因需要多步活化而费时,但由于反应条件温和,易于控制,产品较均一,且回收率较高,又无毒性,故综合比较不失为一种具有实用价值的方法。

本文所得长半衰期的基因工程 SOD 制品国内尚未见报道。其对于疾病动物模型的治疗效果有待继续实验观察,以便为该基因工程产品做为药用酶应用于临床提供实验和理论依据。

本文部分工作得到陈恬生教授的指导,特此致谢。

参 考 文 献

- 1 Beckman J S, Minor R L Jr *et al.* Superoxide dismutase and catalase conjugated to polyethylene glycol increases endothelial enzyme activity and oxidant resistance. *J Biol Chem*, 1988; **263**(15):6884
- 2 吴云,袁勤生,顾廖.右旋糖酐修饰超氧化物歧化酶在小鼠体内的代谢研究.生物化学与生物物理学报,1988; **20**(2):232
- 3 袁勤生,谢卫华,姚菊芳等.修饰 SOD-CTS 复合酶的制备及其性质研究.中国医药工业杂志,1989; **20**(8):351

- 4 Veronese F M, Boccu E, Schiavon O *et al.* Antiinflammatory and pharmacokinetic properties of superoxide dismutase derivatized with polyethylene glycol via active esters. *J Pharm Pharmacol*, 1983;**35**:757
- 5 Veronese F M, Startore L, Schiavon O *et al.* A comparative study of enzymatic, structural, and pharmacokinetic properties of superoxide dismutase isolated from two sources and modified by monomethoxy-polyethylene glycol using different methods of coupling. *Ann N Y Acad Sci*, 1990;**613**:468
- 6 区耀华, 吕冬, 周昕. 超氧化物歧化酶化学修饰的初步研究. *生物化学与生物物理进展*, 1989;**16**(3):203
- 7 Charles O, Steven L G, David P M *et al.* A new procedure for the synthesis of polyethylene glycol-protein adducts; effects on function, receptor recognition and clearance of superoxide dismutase, lactoferrin and α_2 -macroglobulin. *Anal Biochem*, 1983;**131**:25

A Preliminary Study on Chemical Modification of Recombinant Human Superoxide Dismutase

Luo Xunyi Wang Jingyi Xie Bangtie Li Zhanqing Liu Xiaoling Chen Xiaosui

(Laboratory of Molecular Biology, Naval General Hospital, Beijing 100037)

ABSTRACT

To overcome several disadvantages of the use of superoxide dismutase (SOD) in its native form the surface modification of therapeutically useful enzyme by covalent linkage of nontoxic, nonimmunogenic, and biocompatible polymers has been investigated. Recombinant human Cu/Zn SOD (rh Cu/Zn SOD) obtained from *E. coli* was coupled chemically with activated polyethylene glycol (PEG). The modified rhCu/Zn SOD, with apparent molecular weight about 60000 daltons, has longer half-life (15 hours), and the remaining enzyme activity is more than 80 per cent. Its stabilities against acid, alkali and heat were increased significantly. The relation between the amount of PEG used and the remained enzyme activity was also reported.

Key words superoxide dismutase, chemical modification, PEG, genetic engineering

[上接第 436 页]

参 考 文 献

- 1 Goldstein I J, Hughes R C, Monsigny M *et al.* What should be called a lectin? *Nature*, 1980;**285**:66
- 2 Kocourek J, Horejsi V. Defining a lection. *Nature*, 1981;**290**:181
- 3 Barondes S H. Bifunctional properties of lectins; lectin redefined. *TIBS*, 1988;**13**:480
- 4 Caron M, Bladier D, Joubert R. Soluble galactoside-binding vertebrate lectins; a protein family with common properties. *Int J Biochem*, 1990;**22**:1379
- 5 Bladier D, Joubert R, Avellana-Adalid V *et al.* Purification and characterization of a galactoside-binding lectin from human brain. *Archs Biochem Biophys*, 1989;**269**:433
- 6 Bladier D, Le Caer J P, Joubert R *et al.* β -Galactoside soluble lectin from human brain; complete amino acid sequence. *Neurochem Int*, 1991;**18**:275
- 7 Joubert R, Caron M, Bladier D. Distribution of β -galactoside specific lectin activities during pre-and post-natal mouse brain development. *Cell Molec Biol*, 1988;**34**:79
- 8 Eloumami H, Bladier D, Caruelle D *et al.* Human brain lectin immunoreactive materia in cerebrospinal fluids determined by enzyme immunoassay (EIA). *J Neurol Sci*, 1991;**105**:6