

4.2 VEP 波形判别分析的优越性

本判别分析方法比常规在时域分析 VEP 三个波峰的潜伏期和振幅有下列优越性: 第一, 对一些不规则波形, 较难准确判断波峰的位置, 而本方法能利用波形整体的信息, 自动进行判别分类, 无需人工判别 (譬如, 本结果中表 3 的弱视眼数据). 第二, 对于波形属不同类型的 VEP, 有时用潜伏期和振幅参数均不能分辨其类型, 本判别方法也能判别其类型. 第三, 根据判别分析的理论, 如果在三类以上不同视觉系统状况 (如眼病类型或亚类型) 的受检者中记录到的 VEP 波形特征互不相同, 在积累这些类型 VEP 波形资料并用其建立判别函数组后, 同样可用本判别分析方法把 VEP 波形归类, 这点需要进一步用数据验证.

参 考 文 献

- 1 Yamazaki H. Pattern visual evoked cortical potential waveforms and spatial frequency characteristics in children. *Doc Ophthalmol*, 1988, **70** (1): 59~ 65
- 2 Previc F H. The neurophysiological significance of the N1 and P1 components of the visual evoked potential. *Clin Vision Sci*, 1988, **3** (3): 195~ 202
- 3 Maier J, Dagnelie G, Spekreijse H, *et al*. Principal components analysis for source localization of VEPs in man. *Vision Res*, 1987, **27** (2): 165~ 177
- 4 Breceelj J, Struel M, Hawlina M. Central fiber contribution to W-shaped visual evoked potentials in patients with optic neuritis. *Doc Ophthalmol*, 1990, **75** (2): 155~ 163
- 5 Sokol S. Visually evoked potentials: Theory, techniques and clinical applications. *Surv Ophthalmol*, 1976, **21** (1): 18 ~ 39
- 6 杨树勤, 郭祖超, 丁道芳, 等 (Yang S Q, Guo Z C, Ding D F, *et al*). 中国医学百科全书医学统计学. 上

海: 上海科学技术出版社, 1985, 184~ 185

- 7 郭祖超, 尹金焕, 史秉璋, 等 (Guo Z C, Yin J H, Shi B Z, *et al*). 医用数理统计方法. 北京: 人民卫生出版社, 1988, 437~ 474

Automatic Discriminatory Analysis of Waveforms of Visual Evoked Potential and Its Clinical Application. YU Mir-Zhong, WU De-Zheng (National Ophthalmological Laboratories, Ministry of Public Health, Zhongshan Ophthalmic Centre, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510060, China).

Abstract The amplitudes and the phases of first to sixth harmonics of P-VEP waveforms were calculated, thus 12 parameters of the P-VEP waveform were obtained for the discriminatory analysis. The P-VEP waveforms of thirty-two normal eyes, thirty-one amblyopic eyes and thirty eyes with retrobulbar neuritis (RBN) were used to establish the discriminatory system. In the test of the discriminatory system, thirty of the thirty-two normal P-VEP waveforms were classified into normal group, thirty-four of the thirty-five amblyopic P-VEP waveforms were classified into amblyopic group, and twenty-eight of thirty RBN P-VEP waveforms were classified into RBN group.

Key words visual evoked potentials, discriminatory analysis, Fourier transform, amblyopia, retrobulbar neuritis

肝靶向配体半乳糖基白蛋白和多聚谷氨酸

李崇辉 温守明¹⁾ 池木根 孙曼霁
(军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

摘要 化学合成两类去唾液酸糖蛋白受体 (ASGPR) 的人工配体——半乳糖基白蛋白 (Gal_nHSA) 和半乳糖基多聚-L-谷氨酸 (Gal_nPLGA), 并以 ¹²⁵I 标记的去唾液酸胎球蛋白 (ASF) 为标准配体, 测定

¹⁾空军总医院临床药理科, 北京 100036. 收稿日期: 1997-07-23, 修回日期: 1998-01-16

了合成配体抑制 $^{125}\text{F-ASF}$ 与大鼠肝细胞膜 ASGPR 结合的 IC_{50} 值. 结果表明, Gal₁₂HSA、Gal₁₅HSA、Gal₂₆HSA、Gal₃₀HSA 和 Gal₃₄PLGA 均能够有效地抑制 $^{125}\text{F-ASF}$ 与 ASGPR 的结合, 且前者与 ASGPR 的亲合力随半乳糖基化程度的增加而增加. 这些合成配体来源丰富、制备简单, 适合于作为药物或基因肝靶向运送的导向配体.

关键词 去唾液酸糖蛋白受体, 半乳糖基白蛋白, 半乳糖基多聚-L-谷氨酸

学科分类号 Q51, Q53

去唾液酸糖蛋白受体 (asialoglycoprotein receptor, ASGPR) 是哺乳动物肝实质细胞特有的一种高效内吞受体, 专一性识别、结合并内吞循环血液中一些带有末端半乳糖基的糖蛋白, 并使其在肝细胞内进行代谢. 可利用该受体介导的内吞机制进行药物或基因的肝靶向运送, 其中制备实用而高效的肝靶向配体是实现肝靶向运送的关键之一^[1].

ASGPR 的内源性配体与其亲和力较高, 但由于存在来源少、纯化复杂和产量低的不足, 使其作为肝靶向配体的应用受到限制. 因此以来源相对丰富的人血清白蛋白和多肽作为骨架, 化学合成半乳糖基化的人工配体, 并以内源性配体去唾液酸胎球蛋白 (asialofetuin, ASF) 作为标准配体, 利用竞争性放射配基结合实验对化学合成配体进行筛选, 可望找到更多实用而高效的肝靶向配体.

1 材料与方法

1.1 材料

α -乳糖 (Sigma L3625), 人血清白蛋白 (HSA, Fraction V, Sigma A1653), 氰硼氢化钠 (NaCNBH_3 , Sigma S8628), 多聚-L-谷氨酸钠 (PLGANa, Sigma P4761, 平均相对分子质量 32 500), 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基) 碳二亚胺盐酸盐 (EDC, Sigma E7750), 去唾液酸胎球蛋白 (ASF, Sigma A4781), Iodogen 试剂 (Sigma T0656), Na^{125}I (中国原子能研究所, 3.7×10^9 Bq/ml), γ -计数器 (LKB 公司).

1.2 半乳糖基白蛋白的制备

参考文献 [2], 将白蛋白和过量的乳糖溶于 0.2 mol/L 磷酸钠缓冲液 (pH 7.4) 中, 加

入 NaCNBH_3 , 于 37℃ 反应 1~5 d, 经 Sephadex G-25 柱分离纯化, 冷冻干燥得白色产物 Gal_nHSA (n 为平均每分子 HSA 连接的半乳糖基数). 以苯酚-硫酸比色法^[3]测定 n 值.

1.3 半乳糖基多聚谷氨酸的制备

将 PLGANa 和过量的 1- β -氨基乙基半乳糖 (自制) 溶于水, 用 2 mol/L HCl 调至 pH 5~6, 加入 EDC 于室温反应过夜, 经 Sephadex G-25 柱分离纯化, 冷冻干燥得白色产物 Gal_nPLGA. 以苯酚-硫酸比色法测定 n 值.

1.4 ASF 的标记

采用 Iodogen 标记法^[4]以 Na^{125}I 进行标记, 标记混和物经 Sephadex G-25 柱纯化. 所得 $^{125}\text{F-ASF}$ 的放射性计数为 $2.05 \times 10^5 \text{ min}^{-1} \cdot \text{pmol}^{-1}$.

1.5 大鼠肝细胞膜的制备

参考文献 [5] 的方法制备.

1.6 放射配基结合实验

参考 Lenten^[6] 的方法加以改进, 实验均以双管进行, 于 0.2 ml 反应缓冲液 (0.1 mol/L NaCl, 10 mmol/L Tris·HCl, pH 7.4, 10 mmol/L CaCl₂, 0.1% BSA) 中, 根据不同的实验设计加入不同浓度的 $^{125}\text{F-ASF}$ 和膜蛋白. 总结合管加样后于 37℃ 温育 3 h, 非特异结合管先加入 1 000 倍的非标记 ASF, 37℃ 温育 1 h 后再加入相应量的 $^{125}\text{F-ASF}$, 再于 37℃ 温育 3 h. 反应结束后均加入 4 ml 冰冷的反应缓冲液, 以国产 49 型玻璃纤维滤膜负压抽滤, 并以不含 BSA 的反应缓冲液冲洗 4 次, 每次 5 ml. 最后用 γ -计数器测定滤膜上的放射性强度.

1.7 竞争性抑制实验

每管均含 20 μg 膜蛋白及 30 nmol/L

¹²⁵I-ASF, 加不同浓度的合成配体作为竞争性抑制剂, 以不加抑制剂的管作为总结合管, 以加1 000倍非标记 ASF 的管作为非特异结合管, 二者之差为总特异结合, 其余管减去非特异结合管作为含相应浓度抑制剂时的特异结合.

2 结 果

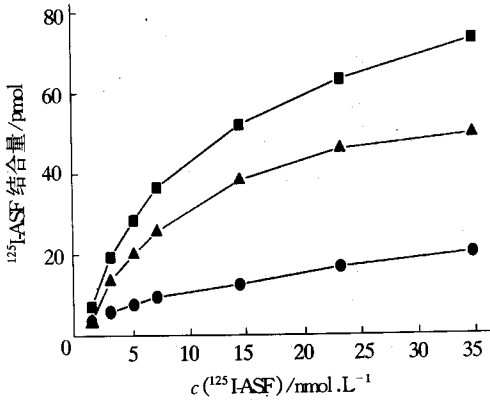


图1 ¹²⁵I-ASF 与大鼠肝细胞膜 ASGPR 的饱和结合曲线
■—■: 总结合; ▲—▲: 特异结合; ●—●: 非特异结合.

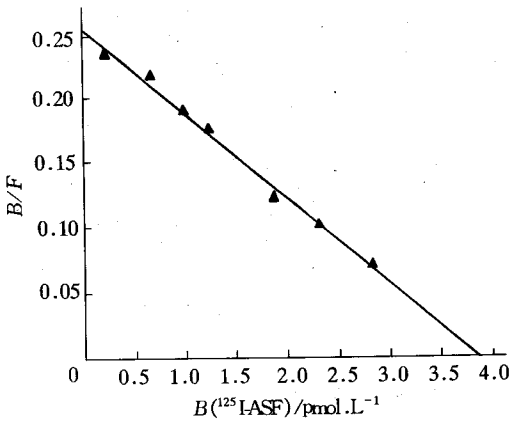


图2 ¹²⁵I-ASF 与大鼠肝细胞膜 ASGPR 的结合 Scatchard 分析图

$$r = 0.996; K_d = 14.16 \text{ nmol/L}^{-1};$$

$$B_{\text{max}} = 3.87 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1}.$$

2.1 半乳糖基配体的制备

用乳糖和 HSA 分别反应 1 d、1.5 d、3 d 和 5 d, 得到四种含不同数目半乳糖基的白蛋白即 Gal₁₂ HSA、Gal₁₅ HSA、Gal₂₆ HSA 和 Gal₃₀ HSA. 用半乳糖氨基衍生物和 PLGANA

反应过夜得到含 34 个半乳糖基的多聚-L-谷氨酸即 Gal₃₄PLGA.

2.2 饱和结合实验

20 μg 膜蛋白与 1~35 nmol/L ¹²⁵I-ASF 于 37℃ 反应 3 h 可达到饱和结合 (图 1), Scatchard 作图为线性 (图 2), 表明 ¹²⁵I-ASF 与大鼠肝细胞膜 ASGPR 的结合为特异的、可饱和的双分子反应过程. 其结合的 K_d 值为 (16.76 ± 3.06) nmol/L, B_{max} 值为 (6.92 ± 4.96) nmol/g 膜蛋白 (n = 3).

2.3 竞争性抑制实验

以 ¹²⁵I-ASF 作为标准配体, 分别测定了合成配体抑制 ¹²⁵I-ASF 与大鼠肝细胞膜 ASGPR 结合的能力. 竞争结合实验数据经 LIGAND 受体结合实验计算机分析软件 (军事医学科学院, 汤仲明) 处理求得 IC₅₀ 值见表 1. 结果表明四种半乳糖基白蛋白和半乳糖基多聚谷氨酸 Gal₃₄PLGA 均可特异地抑制 ¹²⁵I-ASF 与 ASGPR 的结合. 半乳糖基白蛋白类配体的 IC₅₀ 值随白蛋白糖基化程度的增加而减小, 表明配体分子上半乳糖基越多, 与 ASGPR 的亲合力越高.

表 1 合成配体对 ¹²⁵I-ASF 与 ASGPR 结合的抑制作用

合成配体	IC ₅₀ /mol·L ⁻¹
Gal ₃₀ HSA	(1.81 ± 0.18) × 10 ⁻⁶
Gal ₂₆ HSA	(3.02 ± 1.43) × 10 ⁻⁶
Gal ₁₅ HSA	(5.80 ± 2.52) × 10 ⁻⁶
Gal ₁₂ HSA	(6.66 ± 1.14) × 10 ⁻⁶
Gal ₃₄ PLGA	(1.93 ± 0.61) × 10 ⁻⁵

注: $\bar{x} \pm s, n = 3.$

3 讨 论

用乳糖中还原性葡萄糖上的醛基直接与白蛋白中的赖氨酸侧链氨基反应生成 Schiff's 碱, 经氰硼氢化钠还原为仲胺, 得到含有完整末端半乳糖基的糖基化白蛋白, 蛋白糖基化密度与反应时间成正比, 但在 7 d 后趋于饱和. 用这种还原胺化法制备半乳糖基白蛋白比文献中常用的 IME-硫代糖苷法^[7]简便易行, 反应条件温和, 产物水溶性和稳定性均好. 另外, 与

ASGPR 的内源性配体相比, 白蛋白的来源相对丰富, 因而具有更高的应用价值。

多聚-L-谷氨酸是人工合成的多肽, 具有生物降解性。用 1- β -氨基半乳糖的侧链氨基和 PLGA 的侧链羧基, 在 EDC 作用下经酰胺化反应制备得到半乳糖基多聚谷氨酸。全合成的多肽类配体可避免血源污染所带来的危险, 而且可根据需要控制反应程序, 进行大规模生产和质量控制。这种多肽配体的合成在国内外尚未见文献报道。

以肝细胞质膜测定 ASF 与 ASGPR 的亲合力尚未见文献报道。本文以大鼠肝细胞膜作为 ASGPR 的来源, 测得 ASF 与大鼠肝细胞膜 ASGPR 结合的 K_d 值为 $(16.76 \pm 3.06) \text{ nmol/L}$, B_{max} 值为 $(6.92 \pm 4.96) \text{ nmol/g}$ 。

文献报道 ASGPR 对半乳糖基配体的识别依赖于配体分子表面的半乳糖基密度^[8,9]。本文利用还原胺化法合成的四种半乳糖基白蛋白 Gal₁₂HSA、Gal₁₅HSA、Gal₂₆HSA 和 Gal₃₀HSA, 均能够特异地与 ASGPR 结合, 其亲合力随半乳糖基数目的增加而增加, 与文献报道的结果一致。

本文首次合成并证明半乳糖基多聚谷氨酸可特异地与大鼠肝细胞 ASGPR 结合。作为一类新的全合成配体, 特别是多聚谷氨酸为阴离子聚合物, 对细胞毒性作用小, 若经进一步研究和改造以提高其亲合力, 有望成为一类更具有实用价值的肝靶向运载体。

参 考 文 献

- 1 Spiess M. The asialoglycoprotein receptor: a model for endocytic transfer receptors. *Biochemistry*, 1990, **29** (43): 10009~ 10022
- 2 温守明, 王培, 金涛, 等 (Wen S M, Wang P, Jin T, *et al.*). 半乳糖受体的糖蛋白类配体的制备与分析. 空军总医院学报 (*Journal of General Hospital of Air Force, PLA*), 1994, **10** (4): 200~ 201
- 3 Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K, *et al.* Colorimetric methods for determination of sugars and related substances. *Anal Chem*, 1956, **28** (3): 350~ 356
- 4 Paus E, Borner O, Nustad K. Radioiodination of proteins with the Iodogen method. In: *RIA and related procedures in medicine*. Vienna: International Atomic Energy Agency, 1982. 161~ 170

- 5 Morell A G, Scheinber I H. Solubilization of Hepatic Binding Sites for ASGPs. *Biochem Biophys Res Commun*, 1972, **48** (4): 808~ 815
- 6 Lenten L V, Ashwell G. The binding of desialyated glycoproteins by plasma membranes of rat liver: development of a quantitative inhibition assay. *J Biol Chem*, 1972, **247** (14): 4633~ 4640
- 7 Lee Y C, Stowell C P, Krants M J. 2-Imino-2-methoxyethylthioglycosides: new reagents for attaching sugars to proteins. *Biochemistry*, 1976, **15** (18): 3956~ 3963
- 8 Vera D R, Krohn K A, Stadalnik C A, *et al.* Tc-99m galactosyl neoglycoalbumin: *in vitro* characterization of receptor mediated binding. *J Nucl Med*, 1984, **25** (7): 779~ 787
- 9 Nishikawa M, Miyazaki C, Yamashita F, *et al.* Galactosylated proteins are recognized by the liver according to the surface density of galactose moieties. *Am J Physiol*, 1995, **268** (5): G849~ G856

Liver Targeting Ligands: Galactosyl Albumin and Galactosyl Poly-L-glutamic Acid. LI Chong-Hui, WEN Shou-Ming¹⁾, CHI Mu-Gen, SUN Man-Ji (*Institute of Pharmacology and Toxicology, Beijing 100850, China;* ¹⁾ *Department of Clinic Pharmacology, General Hospital of Air Force, Beijing 100036, China*).

Abstract Two kinds of artificial ligand of asialoglycoprotein receptor (ASGPR), galactosyl human serum albumin (Gal_nHSA) and galactosyl poly-L-glutamic acid (Gal_nPLGA), were synthesized chemically. IC_{50} of synthetic ligands inhibiting the binding of ¹²⁵I-asialofetuin (¹²⁵I-ASF) to ASGPR of rat liver cell membrane were assayed. The results showed that Gal₁₂HSA, Gal₁₅HSA, Gal₂₆HSA, Gal₃₀HSA and Gal₃₄PLGA could all efficiently inhibit the binding of ¹²⁵I-ASF to ASGPR. The affinities of Gal_nHSA increased along with the increase of the coupling number of galactosyl. Here, the synthesis and the affinity identification of Gal₃₄PLGA with ASGPR were firstly reported. These synthetic ligands with abundant sources and simple preparations may be used as targeting ligands for the liver-targeting delivery of drugs or genes.

Key words asialoglycoprotein receptor, galactosyl albumin, galactosyl poly-L-glutamic acid