

的方式作为阴性对照, 取得了令人满意的效果。

从该实验可以看出, FCM 简便、迅速、直观以及无放射性污染和损伤的特性使其在进行诸如配体的筛选, 靶细胞的寻找等初期工作方面有着放射配体结合分析方法所不及的优势, 这为在受配体领域开展一些于基础研究和临床工作都有指导意义的前瞻性研究提供了便利条件。

参 考 文 献

- 1 Stockert R H. The asialoglycoproteins receptor: relationships between structure, function and expression. *Physiol Rev*, 1995, **75** (3): 591~ 609
- 2 Kurtaran A, Muller C, Novacek G, *et al.* Distinction between hepatic focal nodular hyperplasia and malignant liver lesions using technetium-99m-galactosyl-neoglycoalbumin. *J Nucl Med*, 1997, **38** (12): 1912~ 1915
- 3 Vera R, Krohn K A, Stadlnik R C, *et al.* Tc-99m-galactosyl-neoglycoalbumin: *In vitro* characterization of receptor-mediated binding. *J Nucl Med*, 1984, **25** (7): 779~ 787
- 4 Yen C F, Kalunta C I, Chen F S, *et al.* Flow cytometric evaluation of LDL receptors using DiI-LDL uptake and its application to B and T lymphocytic cell lines. *J Immunol Methods*, 1994, **177** (S1~ 2): 55~ 67
- 5 Zhong R J, Jin J, Liang G L, *et al.* Preparation and preclinical studies of a hepatic receptor imaging agent. *Nucl Sci tech*, 1998, **9** (2): 189~ 192
- 6 Casey C A, Kragoskow S L, Sorrel M F, *et al.* Chronic ethanol administration impairs the binding and endocytosis of asialo-orosomucoid in isolated hepatocyte. *J Bio Chem*, 1987, **262** (6): 2704~ 2710
- 7 Chianelli M, Signore A, Hicks R, *et al.* A simple method for the evaluation of receptor binding capacity of modified cytokines. *J Immunol Methods*, 1993, **166** (2): 177~ 182
- 8 Hazama H, Sawamura T, Kumada H, *et al.* Delayed hepatic clearance of technetium-99m-galactosyl-neoglycoalbumin with decrease of asialoglycoprotein receptor in tetrachloromethane-induced cirrhosis. *Acte Academiae Medicinae Kansai*, 1990, **41** (suppl): 131~ 141

Flow Cytometric Evaluation of Asialoglycoprotein Receptor on the Surface of Hepatocytes. LI Wen-Xin, ZHANG Rong-Jun, TAN Cheng, TAO Yong-Hui, JIN Jian (*Jiangsu Institute of Nuclear Medicine, National Laboratory of Nuclear Medicine, Wuxi 214063, China*).

Abstract To establish a flow cytometric method (FCM) for simultaneous evaluation of asialoglycoprotein receptor (ASGPR) on the surface of normal rat hepatocytes, injured rat hepatocytes and hepatoma cells (BEL-7402). FCM for ASGPR was established using normal hepatocytes (L-02) and FITC-conjugated galactosyl-neoglycoalbumin (FITC-NGA), the specific ligand for ASGPR. The mean intensity of fluorescence (*MIF*) of the three different hepatocytes were determined and calculated after simultaneously incubated with FITC-NGA at the same concentration. The concentration of FITC-NGA for saturating ASGPR on the surface of L-02 was 0.4 mg/L, at which the *MIF* of the three different hepatocytes were 228.7, 5.81 and 1.13 respectively. The saturated combination can be completely inhibited by 50-fold NGA or 10mmol/L EDTA. FCM can display soundly the characteristic of the receptor-ligand combination between ASGPR and FITC-NGA. Compared with normal rat hepatocytes, there is no ASGPR on the surface of BEL-7402, and the quantities of ASGPR on the surface of injured rat hepatocytes decreases significantly.

Key words hepatocyte, galactosyl-neoglycoalbumin, asialoglycoprotein receptor, flow cytometry, mean intensity of fluorescence

五氯酚对人胎盘碱性磷酸酶抑制的研究*

耿芳宋 王秀丽 童家明¹⁾ 刘洪明

(青岛大学医学院生物化学教研室, 青岛 266021)

摘要 监测人胎盘碱性磷酸酶在不同浓度五氯酚溶液中活力与荧光光谱的变化; 测定五氯酚对其抑制的类型及 pH 对其抑制的影响。结果显示: 低浓度的五氯酚 (< 1.0 mmol/L) 使酶活力及其荧光强度迅速下降, 发射峰位

* 山东省卫生厅资助项目 (95036). ¹⁾ 青岛大学医学院物理教研室。

Tel: (0532) 3839121, E-mail: mcqd@public.qd.sd.cn 收稿日期: 1999-07-20, 修回日期: 2000-03-08

明显红移; 继续提高五氯酚浓度, 其活力与荧光强度逐渐下降, 发射峰位仍在红移; 五氯酚浓度为 5.0 mmol/L 时, 荧光淬灭, 但酶仍保留 51.4% 的活力; 五氯酚浓度高达 10.0 mmol/L 时, 酶剩余活力为 30.0%。进一步实验表明五氯酚使 L-色氨酸的荧光强度降低, 并伴有发射峰位的红移, 当五氯酚浓度为 5.0 mmol/L 时, L-色氨酸的荧光淬灭。五氯酚是人胎盘碱性磷酸酶的反竞争性抑制剂, 其抑制常数 (K_i) 为 3.86 mmol/L。其抑制也受溶液 pH 影响, pH < 7.5 时, 对酶无抑制; pH 为 7.5~10.5 时, 随 pH 的增加, 抑制作用逐渐增强。提示五氯酚能够进入酶分子内部使其荧光淬灭, 并抑制了酶活力; 表明酶活力抑制与五氯酚的解离状态有关。

关键词 五氯酚, 碱性磷酸酶, 荧光光谱, 活力, 抑制

学科分类号 Q566

五氯酚 (PCP) 广泛用于血防灭钉螺、木材防腐、杀菌消毒及防霉等。其性质稳定, 有剧毒, 是一种环境污染剂^[1,2]。毒理研究表明, PCP 是一种很强的线粒体解偶联剂; 它可降低质膜的流动性, 对红细胞膜上的乙酰胆碱酯酶也有抑制作用^[3]。人胎盘碱性磷酸酶 (PLAP, E.C. 3.1.3.1) 是位于晚期胎盘细胞膜上的一种金属糖蛋白, 是一个新进化的基因产物^[4]。除了其催化功能外, PLAP 还是某些物质 (如 IgG、补体因子 B、软骨基质蛋白等) 由母血进入胎儿的受体, 与胎儿的生长发育有关^[5]。本文研究了 PCP 对 PLAP 的作用, 并对其抑制机制进行了探讨, 旨在为 PCP 中毒的防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试剂

DEAE-纤维素为上海试剂二厂产品; DEAE-Sephadex A-50 为 Pharmacia 公司产品; Tris 为 Sigma 公司产品; 对硝基酚磷酸二钠 (PNPP) 为 Merck 公司产品; L-色氨酸为上海政翔化学试剂研究所进口分装, 层析纯; PCP 为上海试剂一厂产品, 分析纯, 用无水乙醇配制; 其他试剂均为国产分析纯, 用双蒸水配制。

1.2 PLAP 的提纯及其纯度鉴定

PLAP 按文献[6]的方法提纯。纯化酶经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 鉴定为单一区带; 反相高效液相层析 (HPLC) 分析为单一对称峰。纯化酶的比活力为 6.44 mmol/(min·mg)。酶浓度用紫外吸收法 ($A_{280}^{0.1\%} = 1.0 \text{ g/L} \cdot \text{cm}$) 测定。

1.3 平衡态酶荧光光谱的监测

测定体系中含酶 22.4 mg/L、100 mmol/L, pH 9.9 Tris-HCl 缓冲液及指定浓度的 PCP, 混匀, 20℃保温 4 h 使酶稳定, 此为平衡态酶。平衡态酶荧光发射光谱的测定在 LS-50 型荧光光度仪上进行, 激发波长为 280 nm, 激发和发射狭缝均为 5 nm, 25℃恒温下, 监测 300~410 nm 的荧光发

射光谱。用含相应浓度的 PCP 缓冲液进行校正。

1.4 平衡态酶活力的测定

按文献[7]的方法进行。测活体系中含 5 mmol/L PNPP、100 mmol/L, pH 9.9 Tris-HCl 缓冲液、2 mmol/L MgCl_2 及指定浓度的 PCP 于 25℃, 用岛津 UV-260 型分光光度计测定, 比色皿光径为 1 cm, 测定波长为 405 nm。酶的终浓度为 0.36 mg/L。测定时, 测活体系于 25℃保温 5 min, 加入相应浓度 PCP 处理的平衡态酶液后, 混匀, 监测其吸光度的变化, 按其吸光度的变化值计算酶活力。

2 结果

2.1 PCP 对 PLAP 荧光光谱的影响

图 1 表示 PLAP 分别在 0.00、0.25、0.50、0.75、1.0、2.5、5.0、7.5、10.0 mmol/L PCP 溶液中, 20℃保温 4 h, 测得酶的内源荧光发射光谱。

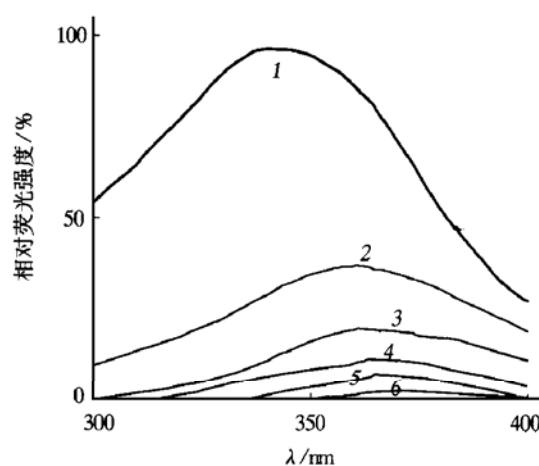


图 1 PLAP 在不同浓度 PCP 溶液中的荧光发射光谱
1: 0.00 mmol/L; 2: 0.25 mmol/L; 3: 0.50 mmol/L; 4: 0.75 mmol/L; 5: 1.0 mmol/L; 6: 2.5 mmol/L。

由图 1 可见, PCP 使酶荧光强度迅速下降, 峰位明显红移。当 PCP 浓度为 2.5 mmol/L 时, 酶

荧光强度降至 2.5%，最大发射峰位由 342.0 nm 红移至 372.0 nm；当 PCP 浓度为 5.0 mmol/L 时，荧光淬灭。

2.2 PCP 对 L-色氨酸荧光光谱的影响

PCP 使 PLAP 荧光光谱的变化，可能是色氨酸残基的变化所致，也可能是酪氨酸残基的变化所致。为了探讨 PCP 对 PLAP 荧光光谱影响的机制，测定了 PCP 对 L-色氨酸荧光光谱的影响。

在含 0.00、0.25、0.50、0.75、1.0、2.5、5.0、7.5、10.0 mmol/L PCP 的 PLAP 荧光光谱测定体系中，用 0.1 mol/L NaOH 溶解的 L-色氨酸代替酶液，L-色氨酸的终浓度为 33.3 $\mu\text{mol/L}$ ，分别测定其荧光发射光谱如图 2。结果与 PCP 对 PLAP 荧光光谱的影响所得结果十分相似。随 PCP 浓度的增加，L-色氨酸的荧光强度迅速下降，峰位明显红移；当 PCP 浓度为 2.5 mmol/L 时，L-色氨酸荧光强度降至 2.0%，最大发射峰位由 362.9 nm 红移至 371.7 nm；当 PCP 浓度为 5.0 mmol/L 时，荧光淬灭。提示 PCP 所致 PLAP 荧光光谱的改变是色氨酸残基变化的结果。

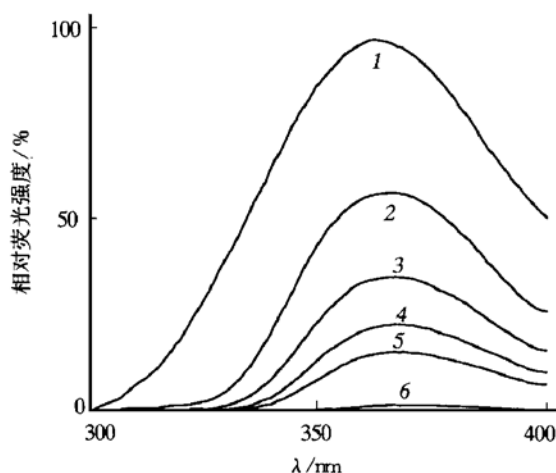


图 2 L-色氨酸在不同浓度 PCP 溶液中的荧光发射光谱
1: 0.00 mmol/L; 2: 0.25 mmol/L; 3: 0.50 mmol/L; 4: 0.75 mmol/L; 5: 1.0 mmol/L; 6: 2.5 mmol/L.

2.3 平衡态酶活力与荧光光谱变化的比较

在指定的不同浓度 PCP 溶液中，所测得的平衡态酶活力、荧光强度与最大发射波长的变化如图 3 所示。

由图 3 可见，当 PCP 浓度小于 1.0 mmol/L 时，酶活力和荧光强度迅速下降，发射峰位明显红移；继续提高 PCP 浓度，酶活力与荧光强度逐渐下降，峰位仍在红移；当 PCP 浓度为 5.0 mmol/L

时，荧光淬灭，但酶仍保留 51.4% 的活力；PCP 浓度为 10.0 mmol/L 时，酶的相对活力为 30.0%。

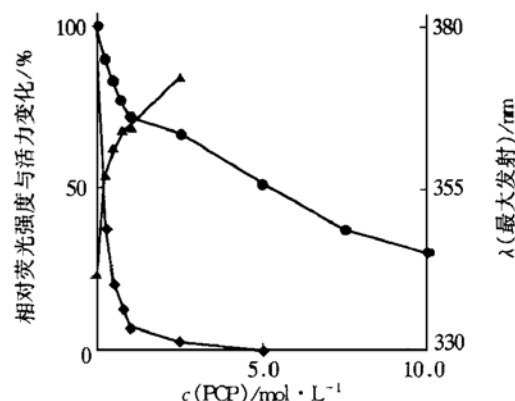


图 3 PLAP 在不同浓度 PCP 溶液中的活力、荧光强度及最大发射波长的变化

●—●: 活力; ◆—◆: 荧光强度; ▲—▲: 最大发射波长.

2.4 PCP 对 PLAP 的抑制类型及 K_i 的测定

固定 PCP 浓度，分别测定不同底物浓度 (PNPP 终浓度分别为 0.10、0.15、0.20、0.30、0.40、0.50 mmol/L) 时的平衡态酶活力，酶活力用吸光度变化值 (ΔA) 表示，以吸光度变化值的倒数 (ΔA^{-1}) 对底物浓度的倒数 ($[S]^{-1}$) 作图 (图 4)。

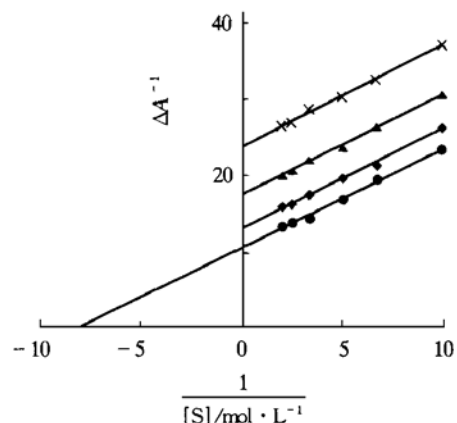


图 4 PCP 对 PLAP 的抑制类型

●—●: 0.00 mmol/L; ◆—◆: 1.0 mmol/L; ▲—▲: 2.5 mmol/L; ×—×: 5.0 mmol/L.

由图 4 可知，PCP 是 PLAP 的反竞争性抑制剂；求得该测定条件下的 K_i 为 3.86 mmol/L，PLAP 的米氏常数 (K_m) 为 0.125 mmol/L。

2.5 pH 对抑制作用的影响

当 PCP 浓度为 2.5 mmol/L 或无 PCP 存在的

条件下, 分别测定不同 pH (测活液的 pH 值分别为 7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0、10.5) 时的平衡态酶活力; 根据同一 pH 时, 有或无 PCP 存在下的酶活力变化求其剩余活力分数对 pH 作图 (图 5)。

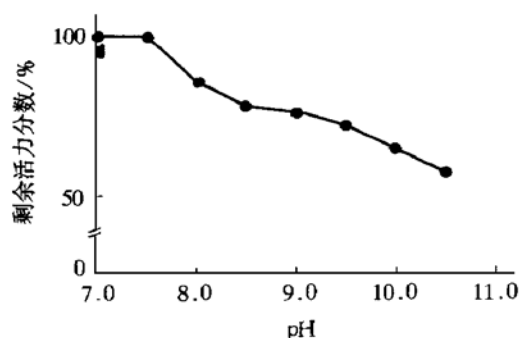


图 5 剩余活力分数与 pH 的关系

由图 5 可见, 测活液 pH 小于 7.5 时, PCP 对 PLAP 无抑制; 当 pH 大于 7.5 时, 随 pH 值的增加, 其剩余活力逐渐降低, 抑制逐渐增大; pH 为 10.5 时, 其剩余活力为 56.9%。提示 PCP 对 PLAP 的抑制受溶液 pH 影响。

3 讨 论

观测 PLAP 在不同浓度的 PCP 溶液中荧光光谱的变化, 可以帮助了解其构象变化的概况。结果表明, PCP 使酶荧光强度下降, 发射峰位红移; PCP 浓度为 5.0 mmol/L 时, 荧光淬灭; 与 L-色氨酸对照实验所得结果一致。这是因为 PCP 是一种脂溶性物质, 能够进入酶分子的内部, 改变了其分子内部 Trp 残基的微环境, 导致 Trp 荧光强度下降, 发射峰位红移, 并最终使其荧光淬灭。由于 PCP 进入酶分子的内部使其局部构象发生了改变, 故酶活力下降。但酶的整体构象并未破坏, 其理由有二: 一是在此测定条件下, 若酶整体构象破坏, 除了发射峰位红移外, 还应伴有荧光强度的增加^[7]; 二是当 PCP 浓度大于 2.5 mmol/L 时, 酶虽荧光淬灭, 但其仍保留了部分的活力。

测定 PCP 对 PLAP 的抑制类型及 pH 对抑制作用的影响, 对于阐明其抑制机理是至关重要的。结果显示, PCP 是 PLAP 的反竞争性抑制剂; 其抑制受 pH 的影响, pH 小于 7.5 时, 对酶无抑制, pH 大于 7.5 时, 随 pH 的增加, 其抑制作用逐渐增强。提示 PCP 是以负离子形式与 ES 复合物结合而抑制酶活性的。PLAP 不仅催化底物中磷酸单酯

键的水解, 亦可催化底物中磷酸基团的转移, 在催化中生成磷酸化酶 (E-P) 中间复合物。该酶活性中心是由 Asp-91、Ser-92、Arg-166、二个 Zn^{2+} ($Zn^{2+}-1$ 与 $Zn^{2+}-2$) 和一个 Mg^{2+} 所组成, 其中 Arg-166 和二个 Zn^{2+} 与底物中磷酸基团的定向结合有关; $Zn^{2+}-1$ 除了定向结合磷酸基团外, 还参与催化作用^[8,9]。据此可以认为 PCP 对 PLAP 反竞争性抑制的机制是 PCP 酚羟基负离子与 $Zn^{2+}-1$ 以离子键可逆结合后, 阻碍了磷酸化酶的水解或磷酸基团的转移, 从而抑制了催化循环, 呈现反竞争性抑制作用。

由于 PLAP 是胎盘细胞膜上的一个组分, 其构象的改变, 不仅可使其功能发生改变, 亦可导致胎盘细胞膜的结构与功能发生改变。这些变化对胎儿的正常发育必然产生某些不良影响, 另一方面由于 PCP 是一种脂溶性物质, 能够通过胎盘进入胎儿体内, 对胎儿直接产生毒性作用, 为此孕妇应避免接触 PCP。

参 考 文 献

- 1 拓培祥, 于广英, 胡世和. 一起五氯酚钠引起的急性中毒. 解放军预防医学杂志, 1990, 8 (2): 172~173
Tuo P X, Yu G Y, Hu S H. J Prev Med Chin PLA, 1990, 8 (2): 172~173
- 2 周岳溪, 张寒霜, 郝丽芳. 升流式厌氧污泥床处理含五氯酚废水工艺的研究. 环境科学, 1998, 19 (4): 33~35
Zhou Y X, Zhang H S, Hao L F. Envi Sci Sin, 1998, 19 (4): 33~35
- 3 Igisu H, Hamasaki N, Ikeda M. High cooperative inhibition of acetylcholinesterase by pentachlorophenol in human erythrocytes. Biochem Pharmacol, 1993, 46 (1): 175~177
- 4 Fishman W H. Alkaline phosphatase isozyme: recent progress. Clin Biochem, 1990, 23 (1): 99~104
- 5 Makiya R, Stigbrand T. Placental alkaline phosphatase as the placental IgG receptor. Clin Chem, 1992, 38 (12): 2543~2545
- 6 耿芳宋, 王秀丽, 张金玉, 等. 人类胎盘碱性磷酸酶的分离纯化. 青岛医学院学报, 1998, 34 (2): 84~86
Geng F S, Wang X L, Zhang J Y, et al. Acta Acad Med Qingdao, 1998, 34 (2): 84~86
- 7 耿芳宋, 王秀丽, 童家明, 等. 盐酸胍对人类胎盘碱性磷酸酶构象与活力的影响. 生物物理学报, 1998, 14 (3): 385~390
Geng F S, Wang X L, Tong J M, et al. Acta Biophys Sin, 1998, 14 (3): 385~390
- 8 Hoylaerts M F, Manes T, Millan J L. Molecular mechanism of uncompetitive inhibition of human placental and germ-cell alkaline phosphatase. Biochem J, 1992, 286 (1): 23~30
- 9 Kim E E, Wyckoff H W. Structure of alkaline phosphatase. Clin Chim Acta, 1989, 186 (2): 175~188

Study of Inhibition by Pentachlorophenol on Human Placental Alkaline Phosphatase. GENG Fang-Song, WANG Xiur-Li, TONG Jia-Ming¹⁾, LIU Hong-Ming

(Department of Biochemistry, Qingdao Medical College, Qingdao 266021, China; ¹⁾ Department of Physics, Qingdao Medical College, Qingdao 266021, China).

Abstract The change of conformation and activity of human placental alkaline phosphatase (PLAP, E. C. 3. 1. 3. 1) in pentachlorophenol (PCP) solutions of different concentrations were studied by enzymic activity measurement and fluorescence spectra. The inhibition type of PLAP by PCP and the effect of pH on the enzyme inhibition were simultaneously measured. In the PCP concentrations lower than 1.0 mmol/L, the enzyme activity and fluorescence intensity rapidly decreases with a marked red shift of emission maximum. In the PCP concentrations higher than 1.0 mmol/L, the enzyme activity and fluores-

cence intensity gradually decreases with a continuous red shift of emission maximum. At 5.0 mmol/L PCP, the enzyme intrinsic fluorescence quenched and the enzyme activity is 51.4% of original activity. At 10.0 mmol/L PCP, the enzyme residual activity is 30.0%. PCP is an uncompetitive inhibitor of PLAP. The inhibition constant (K_i) is 3.86 mmol/L. The activity inhibition of PLAP also affected by the pH, its activity inhibition disappeared below pH 7.5, but gradually increasing between pH 7.5 ~ 10.5. The results suggest that the activity inhibition and the conformation changes of the enzyme were caused by PCP. The inhibition of PLAP activity correlates with the dissociation state of PCP.

Key words pentachlorophenol, alkaline phosphatase, fluorescence spectra, activity, inhibition

固定化金属螯合亲和膜纯化重组抗菌肽研究*

魏琪 姚汝华

(华南理工大学生物工程系, 广州 510641)

鲍时翔

(中国热带农业科学院生物技术国家重点实验室, 海口 571101)

摘要 用自行制备的固定化金属螯合亲和膜对 N 端含六个组氨酸标记的重组抗菌肽进行了分离纯化, 并较好地解决了金属离子泄露问题。实验表明, 固定化金属螯合亲和膜性能优于传统琼脂糖凝胶介质, 完全适用于分离纯化含有多组氨酸标记的重组蛋白质。

关键词 亲和层析, 亲和膜, 抗菌肽

学科分类号 Q814

固定化金属螯合亲和层析 (immobilized metal-chelated affinity chromatography, IMAC) 是一种新兴的亲和色谱技术, 其原理是利用 Cu^{2+} 、 Co^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ni^{2+} 等过渡金属离子与蛋白质表面的组氨酸、色氨酸或半胱氨酸配位结合, 由于蛋白质表面这些氨基酸的种类、数量、位置和空间构象不同, 因而与金属螯合物的亲和力大小不同, 从而可选择性地加以分离纯化^[1]。基因工程的发展极大地促进了 IMAC 技术的应用^[2]; 利用基因工程技术在目标重组蛋白质的末端接上一亲和多肽链, 以提高其结合力及分辨率, 然后用酶或化学方法将融合的多肽链切除并与目标蛋白质分离, 从而得以纯化。传统的 IMAC 固定相多为偶联有亚氨基二乙酸的软性或半刚性琼脂糖凝胶或硅基介质。近年来, 人

们结合亲和和色谱特异性高和膜技术分离快、处理量大的优点, 研制成功了亲和膜^[3,4]。

抗菌肽类物质是 70 年代研究昆虫免疫系统时发现的一类具有抗菌特性的小分子多肽^[5]。昆虫抗菌肽具有分子小、热稳定、水溶性好、杀菌力强、抗菌谱广等优点, 对细菌、真菌、昆虫及某些病毒、肿瘤细胞均有明显的杀伤作用, 而对正常真核细胞无伤害作用^[6,7], 所以抗菌肽的发现与利用将为人类与各种病原菌的斗争提供一个有利的武器。由于对抗菌肽结构与功能及杀伤机理的研究进展, 新型高效、广谱低毒抗菌肽已成为抗菌肽研究

* 国家自然科学基金资助项目 (29606004)。

Tel: (020) 87113842, E-mail: weiqiscut@163.net

收稿日期: 1999-09-07, 修回日期: 1999-11-01