

决定基因片段和 6 个组氨酸标记的基因片段, 以利于产物检测与纯化。由于欲纯化的重组抗菌肽 N 端含有 6 个组氨酸残基, 因此与配基的结合力非常大, 需要在洗脱液加入竞争性洗脱剂咪唑才能将其洗脱下来。经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测显示在 7.1 ku 处有一条带, 但含量较低, 与重组抗菌肽的理论分子质量相符, 经 *E. coli* K₁₂D₃₁ 抑菌活性检测证明为目标产物。末端多组氨酸标记的另一优点是其分子质量较小, 对蛋白质的完整性及活性影响很小^[8], 因此纯化后无需切除。*E. coli* K₁₂D₃₁ 抑菌活性检测表明纯化后的抗菌肽活性比纯化前有较大提高。

由此可见, 固定化金属螯合亲和膜具有亲和层析特异性高及膜分离技术流量大、产率高的优点, 分离纯化含有多组氨酸标记重组蛋白质是固定化金属螯合亲和层析最有前景的应用之一, 即使痕量的标记蛋白只需经过 IMAC 一步就能将其从复杂的细胞裂解物中分离出来。因此固定化金属螯合亲和膜有望在大规模分离纯化基因工程及发酵工程产物中发挥重要作用。

致谢 感谢中国热带农业科学院热作生物技术国家重点实验室的郑学勤先生和陈偿先生提供重组酵母菌株。

参 考 文 献

- 1 Poroth J, Carlsson J, Olsson I, *et al.* Metal chelate affinity chromatography: a new approach to protein fractionation. *Nature*, 1975, **258** (5536): 598~ 599
- 2 Beeskow T C, Kusharyoto K, Anspach F B, *et al.* Surface modification of microporous polyamide membranes with hydroxyethyl cellulose and their application as affinity membranes. *J Chromatography A*, 1995, **715**: 49~ 65
- 3 Serfica G C, Pimbley J, Belfort G, *et al.* Protein fractionation using fast flow immobilized metal chelate affinity membranes. *J*

Membrane Science, 1994, **88**: 292~ 300

- 4 Reif O W, Volker N, Bahr U, *et al.* Immobilized metal affinity membrane adsorbers as stationary phases for metal interaction protein separation. *J Chromatography A*, 1993, **654**: 29~ 46
- 5 Boman H G, Fink J. Inducible antibacterial defence system in *drosophila*. *Nature*, 1972, **237** (5354): 232~ 235
- 6 Boman H G. Antibacterial peptides: key components needed in immunity. *Cell*, 1991, **65** (2): 205~ 207
- 7 Craig A G, Trenczek T, Fries I, *et al.* Mass spectrometric identification of peptides present in immunized and parasitised hemolymph from honeybees without purification. *Biochem Biophys Res Commun*, 1989, **165** (2): 637~ 643
- 8 Fink J, Boman A, Boman H G, *et al.* Design synthesis and antibacterial activity of cecropin-like model peptides. *Int J Peptide Protein Res*, 1989, **33**: 807~ 813

Separate Recombinant Antibacterial Peptide With Immobilized Metal-chelated Affinity Chromatography Membranes. WEI Qi, YAO Ru-Hua (*Department of Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510641, China*); BAO Shi Xiang (*Biotechnology National Key Laboratory, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China*).

Abstract Immobilized metal-chelated affinity chromatography (IMAC) membranes were prepared for separating a recombinant fusion antibacterial peptide, which carried a polyhistidine sequence (HIS₆-tag) at the N-terminus. Low bleeding of metal ion was achieved. It was proved that the properties of IMAC membranes were better than conventional chelating sepharose fast flow column. The fractionation of recombinant proteins that carry a polyhistidine tag is currently perhaps the most promising application of IMAC.

Key words affinity chromatography, affinity membrane, antibacterial peptide

R-PIA 保护心肌影响钾通道和一氧化氮的研究

柏 华 卢景芬¹⁾ 颜振瀛²⁾ 古力努尔 张 敏³⁾

(北京医科大学天然药物与仿生药物国家重点实验室, 北京 100083)

摘要 就多种药物或措施改善心肌缺血/再灌注损伤的关键环节或信息通路进行了探讨。以大鼠心肌为材料, 选取腺苷 A₁ 受体激动剂 R-苯异丙基腺苷 (R-PIA) 为保护剂, 分别或同时加入 ATP 敏感性钾通道阻滞剂格列苯

¹⁾ 通讯联系人。 ²⁾ 首都医科大学宣武医院。 ³⁾ 北京医科大学病理生理学系。

Tel: (010) 62091517, E-mail: zdslij@mail.bjma.edu.cn 收稿日期: 1999-07-13, 修回日期: 2000-01-18

豚、蛋白激酶 C (PKC) 抑制剂等, 观察对氧自由基、一氧化氮、ATP 酶和一氧化氮合酶基因等的影响, 并与缺血预处理组比较, 结果显示: R-PIA 和缺血预处理后均有较好的保护作用, 这些作用依赖钾通道的开放与蛋白激酶 C (PKC) 的激活; 虽然钾通道的开放部分依赖 PKC 的激活, 但 ATP 敏感性钾通道可能是居于下游的、比 PKC 更关键的因素.

关键词 钾通道, 一氧化氮, 缺血/再灌注

学科分类号 Q51

多种药物或措施对心肌缺血/再灌注 (ischemia/reperfusion, I/R) 损伤通过不同的路径均能达到程度不同的保护作用, 但不同路径之间的相互关系探讨甚少. 目前有如下学说: 缺血刺激引起内源性介质的释放, 这种介质作用相应的膜受体后引起尚未阐明的信息传递系统激活, 进一步引起蛋白激酶 C (PKC) 激活及其向细胞膜的转移, 再通过相关蛋白的磷酸化使 ATP 敏感性钾通道 (PG-S_{ATP}) 开放, 导致心肌动作电位时程缩短, Ca²⁺ 内流减少, ATP 储备增加, 心肌细胞得以保护^[1]; 本实验基于这一假说试图阐明其中的某些未知环节.

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

Wistar 大鼠 24 只 (分 6 组, 每组 4 只), 体重 (217±23) g, 北京医科大学实验动物部提供; 钾通道阻滞剂格列苯脲 (Gly)、腺苷 A1 受体激动剂 R-苯异丙基腺苷 (R-PIA)、PKC 抑制剂 staurosporine (stas) 均购自 Sigma 公司; K-H 液、托马斯停跳液 (STS) 参照文献[2] 自配; AMV 逆转录酶、RT-PCR 试剂盒、TRIzol RNA 提取试剂购自 Promega 公司, RNasin pBR322/ *Msp* I 购自同正生物技术公司, iNOS 基因引物: 上游为 5'-AGATCCA-GATAAGTGACA-3'; 下游为 5'-TGACACGTCC-AGGTATACG-3', β -actin 引物, 参照 Genbank 资料, 由中国医学科学院基础医学研究所合成.

1.2 离体大鼠 I/R 心脏模型

常规麻醉大鼠, 开胸后取出心脏, 置 4℃ K-H 液, 主动脉插管后将心脏悬于 Langendorff 装置上, 恒速灌流, 心脏外罩保护帽以保持恒温 and 恒湿. 基础灌流液为 K-H 液, 灌流时冲以混合气 (5% CO₂ + 95% O₂); 实验分 6 组, 1 组: 常规灌流 10 min, 用 STS 液灌流 5 min, 然后再用 K-H 液灌流 30 min; 2 组: 灌流 10 min 后, 用 STS 液灌流 5 min, 然后再用 K-H 液灌流 30 min, 再灌时灌流液中加 0.15 mmol/L P-RIA; 3 组: 再灌时灌流液中加 P-RIA 和 40 mmol/L Gly. 其余同第 2 组; 4

组: 再灌时灌流液中加 P-RIA 和 10 μ mol/L stas, 其余同第 2 组; 5 组: 再灌时灌流液中加 P-RIA、Gly 和 stas, 浓度同上, 其余同第 2 组; 6 组缺血预处理组 (IPC): K-H 液灌流 10 min 后用 STS 液灌流 2 min, 再用 K-H 液灌流 3 min, 循环三次, 最后 K-H 液灌流 20 min; 实验结束后迅速将心脏剪成数块放入液氮中保存.

1.3 ATP 酶活力测定和 NO 活性检测

参照文献 [3] 测定 ATP 酶活力; 按 Node 的方法^[4]测定亚硝酸盐含量代表 NO 水平.

1.4 心肌 ESR 测定

再灌注后 10 min, 取心肌组织, 低温下装入内径为 3 mm 的测试管中, 填长 3 cm, 立即放入液氮中冻存待测; 在 Bruker ESP-300 ESR 波谱仪上记录波谱. 测试条件为: X 波段微波功率 10 mW; 调制频率 100 kHz; 调制幅度 0.5 mT; 中心磁场: 336 mT; 扫描幅度: 50 mT; 130 K 低温测定.

1.5 RT-PCR

用 TRIzol 试剂, 辅以氯仿、异丙醇、75% 乙醇等提取心肌 RNA. 用焦碳酸二乙酯 (DEPC) 处理已灭菌的小离心管, 依次加 10 ml dNTP 1 μ l, 10 $\times$ RT 缓冲液 1 μ l, 苜蓿花叶病毒 (AMV) 10 μ g, RNasin 20 μ g, RNA 5 μ g, iNOS (inducible nitric oxide synthetase) 和 β -actin 下游引物各 15 pmol/L, 加无 RNase H₂O 至 10 μ l 混匀. 42℃ 反应 35 min, 95℃ 处理 6 min 后冰浴, 加 PCR 缓冲液 5 μ l, NOS 和 β -actin 上游引物各 15 pmol/L, Taq 酶 2 U; 再加超纯水至 50 μ l 混匀, PCR 仪上 95℃ 变性 40 s, 58℃ 复性 50 s, 72℃ 延伸 60 s, 31 个循环后, 72℃ 延伸 7 min. 取 PCR 扩增产物 10 μ l, 琼脂糖电泳, 同时设 β -actin 作对照, EB 法染色, 紫外灯下照像.

1.6 统计学处理

用计量资料两均数比较的 *t* 检验.

2 结果

2.1 心肌组织氧自由基的 ESR 测定

各组均明显检测到心肌组织中存在的氧中心自

由基 ($g_{\parallel} = 2.026$, $g_{\perp} = 2.0034$) 及半醌自由基 ($g_{SQ} = 2.0012$) (图 1), 用氧中心自由基 ESR 信号的平行分量 ($H_{O\parallel}$) 除以样品的质量 (m), 即 $H_{O\parallel}/m$ 表征氧自由基的强度, 它与缺血/再灌注损伤呈正相关. 其结果为: I/R 组, (76.5 ± 19.4) au/g; PIA 组, (49.7 ± 21.3) au/g; PIA + Gly 组, (68.9 ± 24.2) au/g; PIA + stas 组, (58.6 ± 11.8) au/g; PIA + Gly + stas 组, (66.5 ± 16.9) au/g; IPC 组, (53.8 ± 26.7) au/g; 可见使用 PIA 和 IPC 后各组 $H_{O\parallel}/m$ 比值有所减低, 而加用 PKC 阻滞剂和钾通道开放剂后各组 $H_{O\parallel}/m$ 均有所增高, 差别明显.

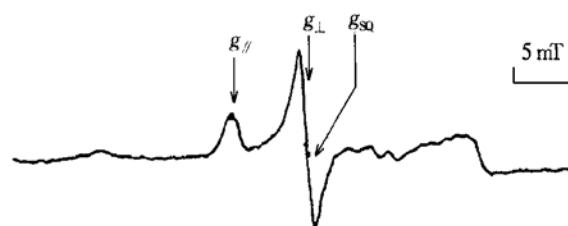


图 1 Wistar 大鼠心肌缺血/再灌注后的低温 ESR 图
测试条件见方法 1.4, $g_{\parallel}$, $g_{\perp}$ 为活性氧自由基信号的 g 因子, g_{SQ} 为半醌自由基的 g 因子.

2.2 各组心肌组织 NO 和 ATP 酶活性测定

各组心肌组织 NO 活性, Na^+ , K^+ -ATP 酶活性和 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP 酶活性的比较 (表 1).

表 1 各组心肌组织中 NO, ATP 酶活性的比较

组别	NO 活性/ $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$	Na^+ , K^+ -ATP 酶活性/ $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$	Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP 酶活性/ $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$
1 I/R (对照)	198.5 ± 31.6	0.84 ± 0.13	3.17 ± 0.68
2 PIA	$99.0 \pm 23.1^{1)}$	$1.53 \pm 0.24^{1)}$	$4.65 \pm 0.61^{2)}$
3 PIA + Gly	$189.2 \pm 32.8^{3)}$	$0.97 \pm 0.16^{3)}$	$3.31 \pm 0.52^{2)}$
4 PIA + stas	$158.7 \pm 32.5^{4)}$	1.31 ± 0.91	3.32 ± 0.63
5 PIA + Gly + stas	$159.1 \pm 19.4^{4)}$	$0.89 \pm 0.12^{3)}$	3.97 ± 0.54
6 IPC	$112.0 \pm 20.0^{1)}$	$1.18 \pm 0.17^{2)}$	3.48 ± 0.46

¹⁾ $P < 0.01$, ²⁾ $P < 0.05$ 相对于对照组; ³⁾ $P < 0.01$, ⁴⁾ $P < 0.05$ 相对于 PIA 组. $n = 4$, $r = 6$, $\bar{x} \pm s$.

2.3 一氧化氮合酶基因表达检测结果

RT-PCR 检测心肌组织 iNOS mRNA, 发现 I/R 组 3 例阳性 (+), PIA + Gly 组 3 例阳性 (+), PIA + Gly + stas 组 1 例阳性 (+), 其余组均为阴性 (-) (图 2).

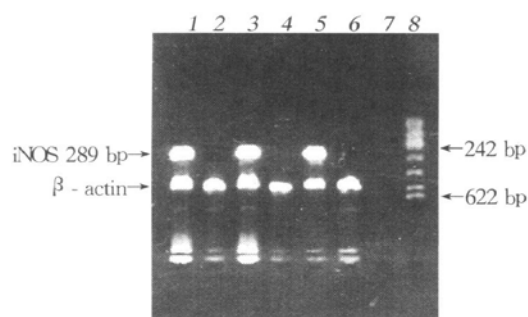


图 2 RT-PCR 检测大鼠心肌组织 iNOS mRNA

1: I/R 组 (+); 2: PIA 组 (-); 3: PIA + Gly 组 (+); 4: PIA + stas 组 (-); 5: PIA + Gly + stas 组 (+); 6: IPC 组 (-); 7: 阴性对照; 8: pBR322/*Msp* I.

3 讨 论

对心肌 I/R 损伤中氧自由基的作用是原因还

是结果仍有争论, 检测氧自由基水平的高低来判断再灌注损伤的轻重仍然是经典方法. 低温 ESR 技术被认为是检测组织中自由基变化的可靠手段, $H_{O\parallel}/m$ 能克服样品制作时质量的误差. 结果发现加 R-PIA 或经缺血预处理 (ischemia preconditioning, IPC) 后能使活性氧自由基的产生减少, 而加 staurosporine 或钾通道开放剂后又使自由基水平上升. 高钾停跳液 STS 通过减轻钙、钠及调节 ATP 酶而起保护作用; 心肌缺血早期细胞内 Ca^{2+} 和肾上腺类物质增多, 通过 cAMP 和蛋白激酶等使 Na^+ , K^+ -ATP 酶和 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP 酶增加^[5], 本实验中这两个酶的活力与 NO 水平呈负相关.

NO 与超氧阴离子自由基 (O_2^-) 反应生成过氧亚硝酸负离子自由基, 后者使依赖复合物 I 和 II 的线粒体有氧呼吸严重抑制, 并能抑制琥珀酸脱氢酶和 ATP 脱氢酶活性; 一方面 NO 的存在能改变甚至防止 O_2^- 及其衍生物的活性氧作用、能捕获 O_2^- 并能转化或清除其毒性作用; 另一方面过量产生的

NO 与 O_2^- 结合生成 $\cdot OONO$ ，后者能分解产生新的氧自由基 $HO\cdot$ 和 $NO_2\cdot$ ，促使细胞膜发生脂质过氧化而损伤心肌功能^[6]。本实验显示在 I/R 损伤时 NO 有所升高、iNOS 基因表达阳性；R-PIA 运用后 NO 下降明显、iNOS 基因表达阴性；而加用钾通道阻断剂和 PKC 阻滞剂后 NO 又明显升高，但 iNOS 基因表达并不同步；表明腺苷 A1 受体激动剂对心肌的保护作用受 NO、钾通道和 PKC 等的影响（其中 PKC 的作用涉及面广）；适当增加的 NO 对心肌 I/R 损伤可能具有保护作用，而过量产生的 NO 能通过强化 cGMP——减少钙内流路径、增加 GADPH——抑制糖酵解路径以损害心肌，不同种系生物中 NO 的临界值差别较大。

PKC 是联系那些与 $PC-S_{ATP}$ 相关受体的重要中介物，钾通道与 PKC 的激活在一定程度上受到细胞质内 ATP 的影响，当细胞质内 $ATP \leq 50 \text{ nmol/L}$ 时，PKC 则抑制 $PC-S_{ATP}$ 活性；而腺苷 A1 受体的启动可能是先使肌醇磷脂降解，然后再激活 PKC^[7]；本实验中格列苯脲可明显阻断、staurosporine 可部分阻断 R-PIA 的作用，两者共同作用时效果并未见加强，提示它们可能作用在同一路径的不同环节，PKC 处于信息传递的上游，钾通道居于信息交汇的下游，钾通道的开放可能部分依赖 PKC 的激活。早期的细胞酸化作用由 Ca^{2+} ， Mg^{2+} -ATP 酶介导，而碱化作用则完全依赖 Na^+ / H^+ 交换的激活，因此 PKC 可能在 I/R 损伤的心肌保护中更能起关键作用^[8]；本实验发现 IPC 对 I/R 损伤的保护作用明显，分别影响了 iNOS 基因表达、NO、自由基和 ATP 酶水平，推测参与 IPC 的多种因子中 PKC 的转位与激活是关键因素；进一步有必要探讨 IPC 过程中阻断 PKC 的激活与钾通道的开放对再灌注损伤保护作用的影响。

参 考 文 献

- 1 Light P E, Sabir A A, Allen B G, *et al.* Protein kinase C-induced changes in the stoichiometry of ATP binding activate cardiac ATP-sensitive K^+ channels. A possible mechanistic link to ischemic preconditioning. *Circ Res*, 1996, **79** (3): 399~ 403
- 2 Toombs C F, McGee D S, Johnston W E, *et al.* Protection from ischaemic reperfusion injury with adenosine pretreatment is reversed by inhibition of ATP sensitive potassium channels. *Cardiol Res*, 1993, **27** (4): 623~ 629
- 3 Kim M, Akera T. O_2 free radicals: cause of ischemia-reperfusion injury to cardiac Na^+ , K^+ -ATPase. *Am J Physiol*, 1987, **252** (2pt2): H252~ H257
- 4 Node K, Kitakaze M, Kosaka H, *et al.* Plasma nitric oxide end products are increased in the ischemic canine heart. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, **211** (2): 370~ 375
- 5 Edwards G, Dora K A, Gardener M J, *et al.* K^+ is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. *Nature*, 1998, **396** (6708): 269~ 271
- 6 Dinerman J L, Lowenstein C J, Snyder S H, *et al.* Molecular mechanisms of nitric oxide regulation. *Circ Res*, 1993, **73** (2): 217~ 221
- 7 Narayan P, Valdivia H H, Mentzer R M, *et al.* Adenosine A1 receptor stimulation antagonizes the negative inotropic effects of the PKC activator dioctanoylglycerol. *Mol Cell Cardiol*, 1998, **30** (5): 913~ 921
- 8 Rehling T F, Fricse R S, Cleveland J C, *et al.* Alpha-adrenergic preservation of myocardial pH during ischemia is PKC isoform dependent. *J Surg Res*, 1996, **63** (1): 324~ 327

Protection to Cardiac Muscle of R-PIA Involved in Potassium Channel and Nitric Oxide. BAI Hua, LU Jing-Fen, YAN Zher-Ying, GULI Nuer, ZHANG Min (*National Key Laboratory of Natural & Bionic Drug, Beijing Medical University, Beijing 100083, China*).

Abstract The key process and information gateway of ischemia/reperfusion injure after improved by drugs and way were researched. Langendorff installation and cardiac muscle of Wistar rats were used. The excitant of adenosine A1 receptor R-PIA was selected as protecting medicine; ATP sensitive potassium channel retarder glybenclamide and PKC inhibitor stauroprine were used simultaneously or separately. The changes of oxygen free radical, nitric oxide, ATPase and inducible nitric oxide synthetase gene were observed, which were compared with ischemia pretreatment at that time. The results showed that R-PIA and ischemia preconditioning had preferable protection and these effects depend on the opening of potassium channel and the activating of PKC. The opening of potassium channel depends on partly the activating of PKC, but opening of potassium channel may be a key factor even more than PKC at downriver position.

Key words potassium channel, nitric oxide, ischemia/reperfusion