

聚乙二醇修饰羊生长激素的初步研究

裴 磊 麦荫乔*

(生化教研室)

赵秋宇 王树歧 程玉华

(吉林大学酶工程实验室)

提 要 使用非抗原性聚乙二醇 (PEG) 修饰羊生长激素 (ovine growth hormone, oGH), 分别获得氨基修饰率为 35% 和 86% 的 PEG-oGH。氨基修饰率为 35% 的 PEG-oGH 仍保留了与天然 oGH 抗血清的反应性, 但修饰率为 86% 的 PEG-oGH 则丧失了。荧光光谱分析表明, 与天然 oGH 比较, 修饰率为 35% 的 PEG-oGH 仅其荧光强度有所减弱, 光谱图并未改变, 但修饰率为 86% 的 PEG-oGH 则发生了明显的图谱变化。体内结合试验表明, 两种修饰 oGH 与肝受体结合之能力均有明显降低。

关键词 羊生长激素; 聚乙二醇修饰; 抗原性与生物活性; 荧光光谱; 体内结合试验

中图分类号 Q575.11; R392.11

近年来, 使用水溶性非抗原性大分子物质作为修饰剂来改造生物大分子的性质已成为酶或蛋白质工程之最为活跃的研究领域之一。这类常用的修饰剂有聚乙二醇 (PEG), 甲基纤维素、右旋糖酐和肝素等。迄今为止, 利用这类修饰剂修饰和改造了尿激酶、天门冬酰胺酶、弹性蛋白酶、链激酶等。修饰的结果使得这些酶的抗原性和免疫原性减弱, 但仍然保留大部分生物活性, 而且使其半衰期延长, 抗酶解能力和耐热性增强。最近, 对激素分子的改造方面的研究也取得了可喜的进展。李逢春^[1]等使用右旋糖酐对胰岛素进行了共价修饰。结果表明, 修饰胰岛素较天然胰岛素之降血糖活性明显提高, 并增强了热稳定性和抗酶解能力。

生长激素 (GH) 为大分子蛋白质激素, 分子量约为 21~22 kDa, 远高于胰岛素。目前 GH 基因工程取得了突破性进展, 使 GH 能广泛应用于农业生产和临床治疗成为可能。但是, 由于 GH 本身的抗原性, 连续注入机体可产生特异性抗体而使之失效。在以往的报道中, GH 的化学修饰均采用小分子物质作为修

饰剂。据悉尚未有使用大分子修饰剂进行修饰以求解除其抗原性的研究报道。为此, 作者选用了线形无抗原性、无电荷的 PEG 分子作为修饰剂来修饰羊垂体生长激素 (oGH) 的游离氨基, 以期解除其抗原性, 减弱免疫原性而最大限度地保留生物活性。这仅是个初步实验。

材 料 与 方 法

oGH 的制备 按 Reichert^[2]的方法进行。纯度鉴定: ①聚丙烯酰胺凝胶电泳 (T=7.5%) 为 3 条带, 与以往报道的结果一致^[3]; ② HPLC (TSKG-3 000 SWcolumn, LKB) 分析表明, 产品纯度大于 94%; ③体重法检定其生物活性为 0.9 U/mg。

PEG 的活化 采用三聚氯氰法。活化的过程大致如下: 取单甲基聚乙二醇 (MW5.000, 日本进口分装) 5 g, 无水 Na₂CO₃ 2.5 g, 三聚氯氰 (四平化工厂生产) 91 mg, 无水苯 20 ml, 混合。再加入分子筛 3 A 1.5 g, 于 80℃ 条件下激烈搅拌, 回流 44 小时。反应完毕经 G₂ 漏斗抽滤以除去反应液中杂物, 再用石油醚抽提活化 PEG (PEG₂) 2~3 次, 干燥后密封保存。

* 白求恩医科大学

oGH 游离氨基的修饰 oGH 溶于 0.05 mol/L pH 10.0 的硼酸/氢氧化钠缓冲液中,按 PEG₂/游离氨基=3:1 和 6:1 加入 PEG₂,于 37℃ 水浴中振荡反应 30 分钟。然后,加入 10 倍于反应液体积的预冷磷酸缓冲液(0.1 mol/L, pH 7.0)以终止反应。经超滤去除未反应的 PEG₂ 和盐分后,冻干备用。

蛋白质浓度的测定 用考马斯亮蓝法^[4]。以电泳纯牛血清白蛋白为标准。

游离氨基的测定 采用三硝基苯磺酸(TNBS)法。

oGH 抗血清的制备 选用新西兰大白兔(雄性,体重为 2.5~3.0 kg),首次于脚掌注射 1 mg oGH 加完全福氏佐剂。两周后,于背部皮下多点注射 0.5 mg oGH 加不完全福氏佐剂。再过两周后,取 2.0 mg oGH 溶于生理盐水,分两次隔周皮下注射。最后,用含 0.2 mg oGH 生理盐水耳静脉强化注射 1 次,1 周后颈动脉切开取血。制得的抗血清效价大于 1:32。

抗原性测定 用 1% 离子琼脂双向扩散法。

¹²⁵I-oGH 的制备 参照 Roth^[5] 方法,略加修改。取 2 mCi NaI¹²⁵ (北京原子能研究所提供)加入尖底小塑料离心管内,加入 5 μl 0.1 mol/L NaOH, 5 μl 0.2 mol/L NaH₂PO₄, 混匀。然后,加入 10 μg oGH 和 300 μg 氯胺 T (反应总体积应小于 25 μl)。振荡反应 1.5 分钟后加入适量 Na₂S₂O₆ 和 KI 以终止反应。¹²⁵I-oGH 的分离使用预先用 1% 牛血清白蛋白-磷酸盐缓冲液(0.03 mol/L, pH 7.4)平衡好的 sephadex G-50 柱层析。收集 ¹²⁵I-oGH 单体峰用于实验,其比放射性约为 41 μCi/μg。

体内特异性结合实验 参照 Turyn 和 Dellacha^[6] 所述方法进行。Wistar 雌性大鼠随机分组,每只动物经股静脉准确注射 30 ng ¹²⁵I-oGH,竞争组加竞争物 oGH 或 PEG-oGH。注射后 20 分钟眼球摘除取血,分别从 4 个肝叶切取肝片,总重量约为 0.3 g。测定每克血清和肝片的 cpm 值,以肝和血清的 cpm 比

值(L/S)表示肝对 oGH 特异结合率。

荧光光谱分析 样品溶于磷酸缓冲液,蛋白质浓度为 0.01~0.02 mg/ml,使用日立 Fg 3000。荧光光度计测定其荧光光谱和荧光强度。激发光波长为 286 nm。

结果与讨论

游离氨基的修饰率与抗原性 根据业已确定的 oGH 一级结构,该分子含有 11 个赖氨酸游离氨基,另加 N-末端的 α-氨基即总共有 12 个。PEG₂ 为一种线性游离氨基修饰剂,通常只与 α-氨基和赖氨酸的 ε-氨基反应。在本实验室条件下,oGH 游离氨基的修饰率分别为 35% 和 86% (表 1)。

表 1 oGH 游离氨基的修饰率与抗原性变化

	游离氨基总数	修饰率 (%)	与抗血清反应*
天然 oGH	12		++
修饰 oGH (PEG ₂ /NH ₂)			
3:1	7.8	35	+
6:1	1.7	86	-

* ++ 深沉淀线; + 浅沉淀线; - 无沉淀线

当使用离子琼脂双向扩散法检测修饰前后的抗原抗体反应时,结果发现,修饰率为 35% 的 PEG-oGH 与天然 oGH 免疫兔产生的抗血清仍出现了沉淀线,提示这一修饰程度并未将 oGH 与抗体结合的抗原决定簇完全掩埋起来;但是,修饰率为 86% 的 PEG-oGH 则完全不出现沉淀线,表明此时已将针对天然 oGH 抗体的抗原决定簇完全掩盖起来了,使之抗原性消失。

荧光光谱 如图 1 所示,比较天然 oGH 与 PEG-oGH 之荧光图谱(修饰 oGH 图谱经放大处理),我们发现修饰率为 35% 的 PEG-oGH 与天然 oGH 基本一致,而修饰率为 86% 的 PEG-oGH 则发生了显著变化。这种变化表明分子构象发生了改变。虽然修饰率为 35%

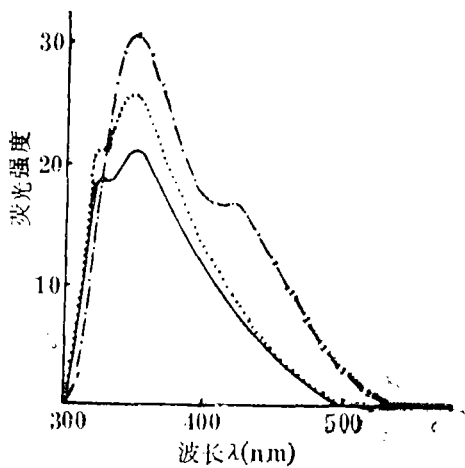


图1 天然和修饰 oGH 的荧光光谱
—天然 oGH;修饰率为35%的 PEG-oGH; ·—·修饰率为86%的 PEG-oGH

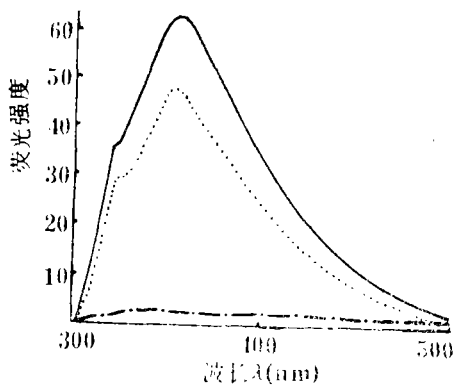


图2 天然与修饰 oGH 荧光强度的比较
—天然 oGH;修饰率为 35%的 PEG-oGH; ·—·PEG₂

的 PEG-oGH 之荧光图谱未发现明显改变,但其荧光强度明显减弱,约为天然 oGH 的72.4% (图2)。这就提示,某些赖氨酸残基的修饰尽管未改变整个分子的构象,但至少改变了酪氨酸等荧光基团的微环境。另外, PEG₂ 分子的包埋作用也可能会使荧光基团的荧光强度减弱。

体内结合实验 为了检测 oGH 修饰后的生物活性,我们采用 Turyn 和 Dellacha^[6] 所述方法进行了体内大鼠肝受体特异结合试验,

结果见表2。

显然,与天然 oGH 比较,PEG-oGH 竞争与受体结合之能力大减。但这种结合能力降低程度与游离氨基修饰程度并非平行关系,从表2中我们可以发现,修饰率为35%和86%的 PEG-oGH 其结合能力约相当于天然 oGH 的1/3,亦即只保留原有生物活性的30%左右。在牛和马 GH 游离氨基修饰研究中也发现了这种活力降低与氨基修饰度不相平行的现象^[7]。Nowick 和 Santome^[8] 报道使用 TNBS 选择地修饰牛 GH 第69位赖氨酸的 ε-氨基,便可使激素分子与细胞受体结合能力和生长活性显著降低,故这个赖氨酸可能位于结合部位附近。由于牛和羊 GH 在一级结构上仅相差一个氨基酸残基,在空间结构上几乎完全一致^[9],据此,对上述现象就有了一个可能的解释: oGH 的11个赖氨酸残基中有几个为激素分子所必需(其中包括69位赖氨酸),其余为非必需。而已知69位赖氨酸极易被修饰,因此,它在较低修饰率时就被 PEG₂ 修饰,这样,修饰后的 oGH 生物活性便显著下降。非必需赖氨酸残基因其修饰多寡与活性无关,所以就出现了生物活性降低程度与游离氨基修饰率不相平行的现象。Martal^[10] 指出, GH 分子中的赖氨酸残基在进化中相当保守,其正电荷与受体结合密切相关,因此,当使用 PEG 修饰赖氨酸残基时,既解除了它(们)的正电荷,同时也产生了空间位阻,使之与受体结合困难,即活力下降。

综上所述,我们可以得出如下推论:在本实验条件下,游离氨基修饰率分别为35%和86%的 PEG-oGH 均使激素分子与其受体结合部位的必需或相邻的某个(几个)赖氨酸残基发生了反应,从而使其活性降低;非必需赖氨酸残基修饰的多寡并不影响生物活性。然而,激素分子的抗原性是随修饰率的增大而减弱甚至消失。本实验的结果证实,与 oGH 结合部位密切相关的赖氨酸残基属于“敏感型”,易与 PEG₂ 发生反应。这就为 GH 游离氨基的选择性修饰研究提供了有用的信息,即

表2 体内肝 oGH 受体竞争结合试验

批别	注射物	竞争物剂量(μg)	大鼠数	cpm L/S
1	^{125}I -oGH		4	1.83 ± 0.05
	^{125}I -oGH + oGH	15	4	1.18 ± 0.48
	^{125}I -oGH + PEG-oGH	15	4	$1.79 \pm 0.08^*$
	(35%) ^A	75	5	1.37 ± 0.16
2	^{125}I -oGH		4	1.33 ± 0.23
	^{125}I -oGH + oGH	3	3	0.97 ± 0.18
		15	4	0.85 ± 0.07
	^{125}I -oGH + PEG-oGH	10	4	$1.06 \pm 0.06^{**}$
	(86%) ^A	75	3	0.88 ± 0.07

注:与未加竞争物组比较,使用 t 检验: * $t=0.869, P>0.20$; ** $t=2.31, P>0.05$; ^A括号内百分数为氨基修饰率

在修饰之前先将这些敏感型必需氨基保护起来,修饰之后使之重新游离,这样既可消除抗原性又可最大限度地保留生物活性。

参 考 文 献

- 李逢春,等.右旋糖酐对胰岛素共价修饰的研究.吉林自然科学学报 1986; 1(1):109
- Reichert LE. Purification of anterior pituitary hormones. Methods Enzymol 1975; 37:376
- Graf L, et al. Action of thrombin on ovine, bovine and human pituitary growth hormones. Eur J Biochem 1976; 64(2):333
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976; 72(1-2):248
- Roth J. Methods for assessing immunologic and biologic properties of iodinated peptide hormones. Methods Enzymol 1975; 37:223
- Turyn D, Dellacha JM. [Specific binding of iodinated growth hormone to rat liver in vivo. Endocrinology 1978; 103(4):1190
- Paladin AC, et al. Structure-activity relationships of growth hormones. In: Growth hormone and other biologically active peptides. Pecile A, Miler EE. eds. Amsterdam: Excerpta Medica, 1980:37
- Nowicki C, Santome JA. Modification of lysine 69 reactivity in bovine growth hormone by carbamylation of its N-terminal group. Int J Pept Protein Res 1981; 18(1):52
- Holladay LA, et al. Growth hormone conformation and conformational equilibria. Biochemistry 1974; 13(8):1653
- Martal J, et al. Involvement of lysine residues in the binding of hGH and bGH to somatotrophic receptors. FEBS Lett 1985; 180(2):295

(1991-04-24收稿 1991-11-24修回)

PRELIMINARY STUDY ON MODIFICATION OF OVINE GROWTH HORMONE WITH POLYETHYLENE GLYCOL

Nie Lei Mai Yingqiao*

(Department of Biochemistry)

Zhao Qiuyu Wang Shuqi Cheng Yuhua

(Laboratory of Enzyme Engineering, Jilin University)

Polyethylene glycol (PEG), a non-antigenic polymer, has been used to modify ovine growth hormone (oGH), and two modified oGH, whose free amino groups have been modified by 35% and 86% respectively were produced under the chosen condition. The 35% modified PEG-oGH reacted slightly with antibodies raised against native oGH, but the 86% modified portion could not, ie its antigenicity was lost. Fluorescent spectrum analysis showed the spectral pattern of the 35% modified PEG-oGH, as compared with native oGH, did not change except for a slight decreased fluorescent intensity; the spectral pattern of the 86% modified one changed a great deal. Rat hepatocytes binding assay in vivo showed both modified oGH decrease considerably their original binding capacity to the hepatocytes.

Key words ovine growth hormone; modification with polyethylene glycol; antigenicity and bioactivity; fluorescent spectrum; binding assay in vivo

* Bethune University of Medical Sciences

玻璃体视网膜显微手术在复杂性 视网膜脱离治疗中的应用研究

课题负责 高汝龙(中心眼科)

作者采用70年代末、80年代初在国外兴起的现代玻璃体、视网膜显微手术方法,治疗以前认为是不治之症的复杂性视网膜脱离,取得一定成果。本研究所进行的玻璃体视网膜显微手术不仅是玻璃体切除,还包括视网膜剥离、眼内排液、气/液交换、油/液交换、眼内填充等眼内操作,它克服了以前外填压术以外路进行的盲目性,而且使以前手术无法进行的操作成为可能。表明封闭裂孔不再是治疗视网膜脱离的唯一原则,而松解玻璃体牵引,减少眼内液流的影响及利用脉络膜、色素上皮抽吸力,可能是治疗视网膜脱离的新原则。通过数百例病人的实践,手术成功率为62.9%,接近国外学者报告的33~75%的成功率,使该研究在玻璃体视网膜显微手术这一领域在国内处于领先地位、接近国际水平。研究成果已通过鉴定。本成果对我国今后推广视网膜玻璃体手术有指导作用。

(科 学)