

人血超氧化物歧化酶的化学修饰

胡梅清 陈 彤 方 胜 吴梧桐¹ 李继珩¹

(南京铁道医学院生化教研室; ¹生化教研室)

摘 要 应用右旋糖苷及聚蔗糖对人血 SOD 进行化学修饰。人血 SOD 分别经右旋糖苷及聚蔗糖两种修饰剂共价修饰后,仍保留其紫外、荧光吸收特性及 SOD 的酶活性。人血 SOD 修饰物的抗胃蛋白酶酶解能力、热稳定性、耐酸性均有显著提高。

关键词 人血超氧化物歧化酶;右旋糖苷;聚蔗糖

超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase, 简称 SOD)广泛存在于生物体内,能催化超氧阴离子($\cdot O_2^-$)产生歧化反应,是一种重要的氧自由基清除剂,具有消炎、抗辐射、抗肿瘤及延缓衰老的作用^[1-3],作为消炎药已应用于临床。SOD 作为药物,在体内稳定性较差,半衰期短,而且从非人体来源制备的 SOD 对人体可能产生免疫原性反应。使用人血 SOD(hSOD)虽然能消除免疫原性反应,但存在稳定差等缺点,通过改变酶结构借以提高稳定性,延长在体内的半衰期是人们所希望的。鉴于对人血 SOD 的化学修饰研究工作至今少见报道,为此我们采用右旋糖苷及聚蔗糖对人血 SOD 进行共价修饰的研究。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

人血 SOD(由中国药科大学生化教研室提供);右旋糖苷(分子量 40 000,Pharmacia 进口分装);聚蔗糖(分子量 400 000,Pharmacia 进口分装);邻苯三酚(遵义第二化工厂)。

UV-2100 型分光光度计(日本岛津);752C 型分光光度计(上海第二分析仪器厂);RF-540 型荧光分光光度计(日本岛津);Power-150 型电泳仪(北京新技术应用研究所)。

1.2 方 法

1.2.1 SOD 酶活性测定 采用胡梅清等报道的邻苯三酚标准曲线法^[4]。

1.2.2 人血 SOD 的右旋糖苷修饰 参照 Siu-cheung 等方法^[5]。将 1 克右旋糖苷溶于 5 ml 蒸馏水中,加入 0.5 mol/L NaIO₄ 溶液 1 ml,置暗处,4℃ 搅拌 16 h,滴加 0.1 mol/L NaHSO₃ 还原,经透析获得右旋糖苷二醛活化液。hSOD 以少量 0.1 mol/L Na₂CO₃-H₂CO₃ 缓冲液溶解,加入右旋糖苷二醛活化液,暗处 4℃,于 pH 9.0 的条件下反应 20 h,然后以甘氨酸终止反应。经透析、冰冻干燥获得人血 SOD 右旋糖苷共合物(hSOD-D)。

1.2.3 人血 SOD 的聚蔗糖修饰 取聚蔗糖溶于适量蒸馏水内,分别加入一定量的 0.4 mol/L NaIO₄ 和 HIO₄ 溶液,暗处 4℃ 反应 14 h,滴加 NaHSO₃,透析后获得活化液,聚蔗糖活化液对 hSOD 的修饰反应在 pH 9.5 条件下进行,其余操作同右旋糖苷二醛的修饰,经冻干得人血 SOD 聚蔗糖共合物(hSOD-F)。

2 结果与讨论

2.1 电泳分析

以未经修饰的 hSOD 作对照,对修饰物进行聚丙烯酰胺凝胶电泳。分离胶总浓度为 1.0 mol/L,交联度 2.7%,pH 8.9;浓缩胶总浓度 0.4 mol/L,交联度 20%,pH 6.7。电极

收稿日期 1992-04-01

缓冲液为 0.05 mol/L Tri-HCl 缓冲液 (pH 8.3), 电泳后以考马斯亮蓝 R-250 染色。

天然 hSOD 在电泳图中呈现两条区带, 经修饰后的 hSOD-D 及 hSOD-F 分别都是接近原点的呈不均一的区带, 迁移速度明显降低, 而在原天然 hSOD 的区段没有出现电泳带 (见图 1)。其原因是 hSOD 与大分子量的不均一多糖修饰剂结合后, 分子量显著增大, 同时修饰 SOD 表面电荷可能产生变化, 因而在一般的电泳条件下移动缓慢。结果表明修饰反应进行比较完全。

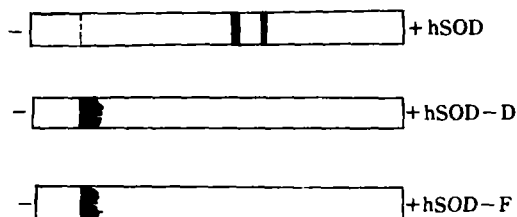


Fig 1. PAGE pattern of modified and native SOD

2.2 荧光光谱分析

将 hSOD 及 hSOD-D、hSOD-F 在 RF-540 荧光分光光度计进行荧光光谱分析。从荧光发射光谱图上可见 hSOD 经两种修饰剂修饰后, 荧光强度出现变化, hSOD-D 荧光强度增大显著, hSOD-F 较 hSOD 略为增高。从荧光激发光谱图可见在 350nm 波长处 hSOD-D 及 hSOD-F 的荧光强度均明显高于 hSOD。光谱分析结果显示三者为不同物质。

2.3 紫外吸收

对 hSOD、hSOD-D、hSOD-F 在 UV-2100 型分光光度计从 190~700 nm 波长范围进行全波段扫描, 在 260~290 nm 波长范围出现三个紫外吸收峰, 并出现不同的光吸收。结果表明修饰后 hSOD 仍保留了天然 hSOD 紫外吸收特征。

2.4 修饰 hSOD 的热稳定性

将修饰前后的 hSOD 稀释成 140U/ml, 置于 80℃ 保温, 分别在不同时间同时取样测定其残余活力, 重复五次以其平均值作图, 结

果见图 2。

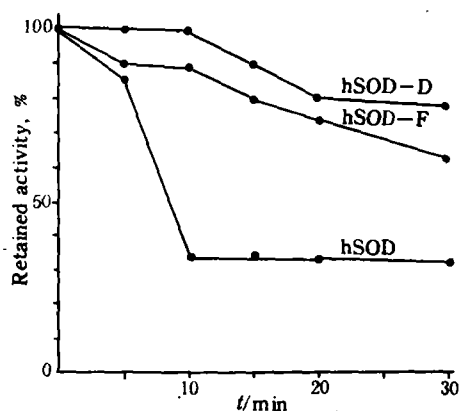


Fig 2. Heat stability of modified and native SOD (T=80°C)

上述结果表明, 保温 30 分钟后天然 hSOD 的残余活力为 33%, hSOD-D 和 hSOD-F 的残余活力分别为 72%、62%。因此 hSOD 被共价修饰后其热稳定性高于天然 hSOD。

2.5 修饰 hSOD 的耐酸性

将天然 hSOD 与修饰 hSOD 溶液调至 pH 1.5, 置 25℃ 保温, 在不同时间分别取样检测残余活力, 重复五次取平均值作图 (见图 3)。

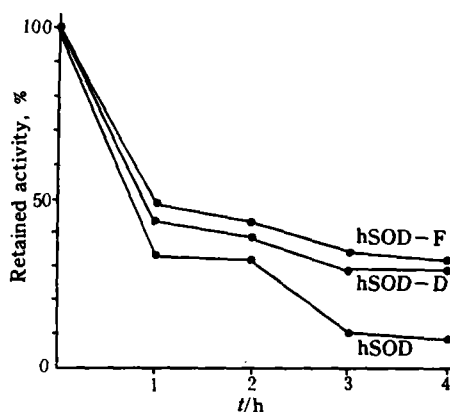


Fig 3. Acid stability of modified and native SOD (pH=1.5)

实验结果表明, hSOD-D 和 hSOD-F 的耐酸性均比天然 hSOD 有明显增强。

2.6 修饰 hSOD 抗胃蛋白酶的酶解作用

将等量的胃蛋白酶溶液分别加入修饰前后的 hSOD 溶液中, 置 25℃ 保温, 定时取样检

测残余活力,重复五次取平均值作图(见图4)。

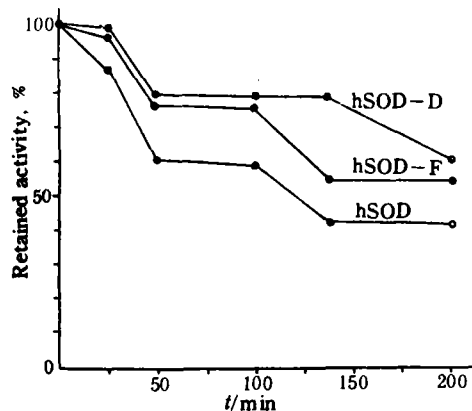


Fig 4. Pepsin hydrolytic stability of modified and native SOD

结果表明 hSOD-D 和 hSOD-F 的抗胃蛋白酶水解能力均比天然 hSOD 增强。

3 结论

由人红细胞分离纯化的 SOD 与人体内

的 SOD 是同源蛋白,在临床应用上对人体没有免疫原性作用。其右旋糖苷和聚蔗糖修饰物仍有 SOD 的天然酶活性,而且其抗酶作用、热稳定性、耐酸性等性质均有显著提高,其中,以右旋糖苷修饰的 hSOD 更有临床应用价值。我们正在进一步研究其体内稳定性和有关药理作用,以开发出一种性质优异的人血 SOD 制品供临床应用。

参考文献

- 1 李文杰. 超氧化物歧化酶在治疗超氧阴离子自由基所引起的疾病上的应用. 生化药物杂志, 1988; 2: 9
- 2 中迟透. 过氧化脂质的生物学与医学. 蛋白质、核酸、酶素, 1981; 20(6): 954
- 3 Takada Y, Noguchi T, Okabe T. Superoxide dismutase in various tissues from rabbits bearing the Vx-2 carcinoma in the maxillary sinus. *Cancer Res*, 1982; 42: 4233
- 4 胡梅清, 李继珩, 吴梧桐. 超氧化物歧化酶活力测定改良法. 中国药科大学学报, 1988; 19(3): 213
- 5 Siu-Cheung T, Jan B, Tze-Fei W. Soluble dextran-hemoglobin complex as a potential blood substitute. *Proc Natl Acad Sci (USA)*, 1976; 73(6): 2128

Study on Modification of Human Superoxide Dismutase

Hu Meiqing, Chen Tong, Fang Sheng, Wu Wutong¹, Li Jiheng¹

Department of Biochemistry, Nanjing Railway Medical College, 210009

¹Department of Biochemistry

The chemical modification of human superoxide dismutase (hSOD) with dextran and ficoll was performed. The modified hSOD still remains native SOD activity with similar characteristics of ultraviolet and fluorescent absorption. The modified hSOD shows greater resistance to pepsin degradation, enhanced heat and pH changes.

Key words Human superoxide dismutase (hSOD); Dextran; Ficoll