论著

文章编号:1000-5404(2006)10-1084-03

晚期氧化蛋白产物的分离纯化和鉴定

孙 岩,吴雄飞,金锡御 (第三军医大学西南医院肾科,重庆 400038)

提 要: 目的 分离纯化以人血清白蛋白(human serum albumin,HSA)为原料生成的晚期氧化蛋白产物(advanced oxidation protein products,AOPP),即AOPP-HSA,并对其进行鉴定,以寻求一种制备高纯度且具生物活性的AOPP-HSA的方法。**方法** 采用HSA-HOCl孵育法体外制备AOPP-HSA粗纯品,经凝胶层析和离子交换高压液相层析(high performance liquid chromatography, HPLC)两步层析分离纯化其中的AOPP-HSA,并经紫外和荧光光谱、SDS-PAGE、单核细胞TNF-α分泌实验鉴定其结构特征和生物学活性。**结果** 分离的蛋白质纯度达99.4%,分子质量为700×10^3,是含有双酪氨酸的蛋白交联聚合物,能够显著刺激单核细胞TNF-α的分泌。**结论** 采用上述两步层析方法能够由粗纯品中成功分离出高纯度并具生物活性的AOPP-HSA,为AOPP的进一步研究奠定了基础。

关键词: 晚期氧化蛋白产物;尿毒症毒素;色谱法,凝胶;离子交换;单核细胞

中图法分类号: Q503;Q51;Q591.2 **文献标识码:** A

Isolation and identification of advanced oxidation protein products

SUN Yan, WU Xiong-fei, JIN Xi-yu (Department of Kidney, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To isolate and identify advanced oxidation protein products from human serum albumin (AOPP-HSA), expecting to search for a method of preparing highly purified and bioactive AOPP-HSA. **Methods** AOPP-HSA crude products were prepared *in vitro* by exposing HSA to HOCl. AOPP-HSA was isolated by gel chromatography and ion-exchange HPLC. Its structural features and biological activities were characterized by UV and fluorescence spectrum, SDS-PAGE, and the experiment of TNF-α release from monocytes. **Results** The isolated protein was purified up to 99.4% and was dityrosine-containing protein cross-linking products with molecular weight of 700×10^3. It possessed the ability of triggering the considerable release of TNF-α from monocytes. **Conclusion** Highly purified and bioactive AOPP-HSA can be successfully prepared by above-mentioned two-step chromatography from AOPP-HSA crude products, which builds a basis for further study of AOPP.

Key words: advanced oxidation protein products; uremic toxin; gel chromatography; ion-exchange chromatography; monocyte

晚期氧化蛋白产物(advanced oxidation protein products,AOPP)是Witko-Sarsat等[1]于1996年首先由慢性肾衰竭(chronic renal failure,CRF)患者血浆中分离出的含有双酪氨酸的蛋白交联产物,系由氧化应激导致体内各种蛋白质氧化损伤所形成的终末产物的总称。AOPP在CRF患者的循环和组织中潴留,是一类新的尿毒症毒素[2],作为炎症介质,能够刺激单核细胞释放TNF-α、IL-6、IL-1等炎症细胞因子,参与引发CRF患者的全身微炎症状态,是CRF免疫功能紊乱、加速性动脉粥样硬化、透析相关性淀粉样变等长期并发症的重要致病环节[3],严重影响患者的生存率和生活质量,但其作用机制尚不明确。现国内外多以人血清白蛋白(human serum albumin,HSA)为原料,次氯酸(HOCl)或次氯酸钠(NaOCl)为氧化剂,采用HSA-HOCl孵育法体外制备AOPP(AOPP-HSA)作为研究对象,但其成分并不单一,我们称之为粗纯品,无法用于作用机制的研究,这使获得高纯度且具有生物活性的AOPP显得尤为迫切和重要。本研究旨在寻求一种由粗纯品中分离高纯度且具有生物活性的AOPP-HSA的方法,为深入研究AOPP在CRF并发症中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂及来源 HSA、双酪氨酸(Sigma),人TNF-α

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30470807)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30470807)

作者简介:孙 岩(1976-),女,吉林省长春市人,博士,医师,主要从事尿毒症毒素、血液净化基础和临床方面的研究。电话:(023)68754000-773085,E-mail:gsunyan@163.com

通讯作者:吴雄飞,电话:(023)68754188,E-mail:wuxfei@126.com

收稿日期:2006-03-27;修回日期:2006-04-30

ELISA 试剂盒(上海生工),Sephadex G-100 葡聚糖凝胶、Mono-Q HR 5/5 阴离子交换柱(Pharmacia),C_8分析柱(戴安)。

1.1.2　主要实验仪器　　低压层析系统(Bio-Rad),高压液相层析系统(Waters HPLC、戴安 HPLC),紫外/可见分光光度计(Ultrospec),荧光分光光度计(HITACHI),凝胶成像分析系统(Bio-Rad)。

1.2　实验方法

1.2.1　AOPP-HSA 粗纯品制备　　100 mg/ml HSA 与 100 mmol/L NaOCl 室温共孵育 30 min,4 ℃对 PBS(0.01 mol/L,pH 7.4)透析 24 h,直至以碘量法检测透析液中无 NaOCl,得到 AOPP-HSA 粗纯品。以 PBS 代替 NaOCl 同法处理的 HSA 作对照。取 AOPP-HSA 粗纯品或对照样品 100 μl,加入 1.16 mol/L 碘化钾 5 μl、醋酸 10 μl,混匀后立即于 340 nm 测定吸光度,以 0 ~ 100 μmol/L 氯胺-T 为标准品,计算粗纯品和对照样品中 AOPP 的浓度(μmol/L)。

1.2.2　凝胶层析和离子交换 HPLC　　在 Bio-Rad 低压层析系统中,使用 Sephadex G-100 凝胶对 AOPP-HSA 粗纯品进行凝胶层析,PBS-EDTA(0.01 mol/L EDTA,pH 7.4)洗脱,流速 40 ml/h,分部测定 AOPP 浓度,收集具有 AOPP 浓度峰的蛋白质组分,参照蛋白质分子质量标准的选择曲线确定其分子质量。随后在 Waters HPLC 系统中,使用 Mono-Q 柱对上述获得的蛋白质组分进行 HPLC,Tris-HCl(0.05 mol/L,pH 7.4)中逐步加入 1 mol/L NaCl 进行梯度洗脱,流速 1 ml/min,收集具有 AOPP 浓度峰的蛋白质组分,并在戴安 RP-HPLC 系统上,使用 C_8分析柱检测其纯度。

1.2.3　紫外和荧光光谱学分析　　经上述两步层析纯化的蛋白以 PBS 溶解,行 190 ~ 450 nm 紫外吸收光谱扫描,随后以 PBS-尿素(6 mol/L 尿素,pH 7.5)溶解,行 350 ~ 550 nm 荧光发射光谱扫描(320 nm 激发)和 220 ~ 450 nm 激发光谱(固定于 410 nm 发射)扫描,分别与同样条件下 HSA 和双酪氨酸的扫描曲线进行对照,观察蛋白中是否含有双酪氨酸结构。

1.2.4　SDS-PAGE　　采用 12% 分离胶和 5% 浓缩胶对纯化的蛋白进行 SDS-PAGE,观察蛋白是否为聚合物。

1.2.5　单核细胞 TNF-α 分泌实验　　以两次密度梯度离心法分离人外周血单核细胞[4],以含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基重悬细胞,24 孔板内每孔加入 1.5×10^6 细胞和 1 ~ 5 mg 纯化蛋白培养 24 h,或加入等量细胞和 5 mg 蛋白培养 0.5 ~ 24 h,使用人 TNF-α ELISA 试剂盒检测培养上清中 TNF-α 的浓度(pg/ml),以加入等体积 PBS 为阴性对照,加入等量 HSA 为阳性对照,观察蛋白刺激单核细胞释放 TNF-α 的量效和时效作用。

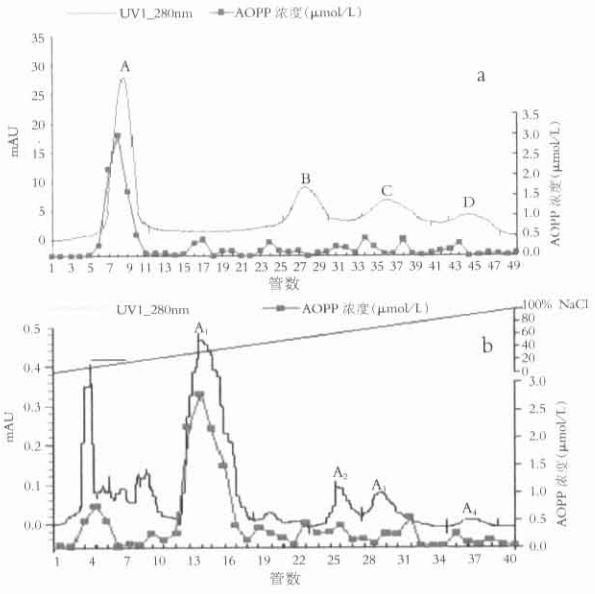
1.3　统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 软件进行 t 检验。

2　结果

2.1　AOPP-HSA 的分离纯化

AOPP-HSA 粗纯品中 AOPP 浓度为2 347 μmol/L,远远高于对照 HSA(103 μmol/L,$P<0.05$)。粗纯品经凝胶层析,获得 A、B、C、D 4 个蛋白峰,其中 A 峰与 AOPP 浓度峰重叠,A 峰再经离子交换 HPLC,进一步获得的 A_1 ~ A_4 4 个蛋白峰中,A_1 峰与 AOPP 浓度峰重叠,为最终分离纯化的蛋白,其 AOPP 浓度为 0.14 μmol/L,凝胶层析确定其分子质量为 700×10^3,RP-HPLC 测得其纯度为 99.4%(图 1)。

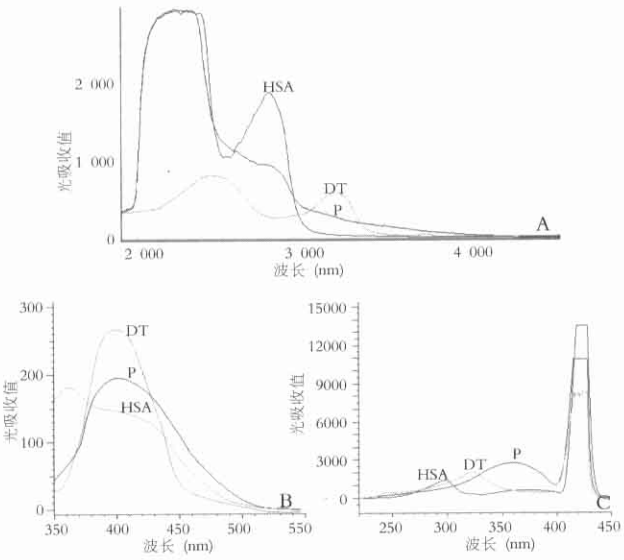


a:凝胶层析洗脱曲线; b:离子交换 HPLC 洗脱曲线

图 1　AOPP-HSA 的凝胶层析和离子交换 HPLC 两步分离纯化

2.2　结构特征鉴定

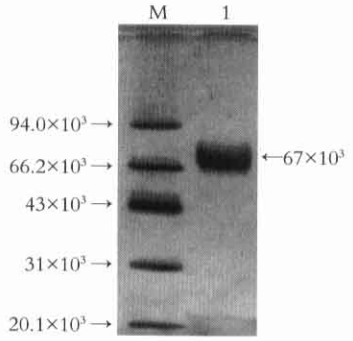
紫外吸收光谱中,纯化的蛋白质在 280 nm 处原本由酪氨酸等芳香族氨基酸残基引起的吸收峰消失,而在双酪氨酸的吸收峰 320 nm 左右出现明显吸收;320 nm 激发的荧光发射光谱中,发射峰与双酪氨酸一致,为 410 nm;固定于 410 nm 发射的激发光谱中,激发曲线与双酪氨酸在 320 ~ 350 nm 范围内存在重叠。以上证明蛋白质中有双酪氨酸形成(图 2)。



A:紫外吸收光谱; B:荧光发射光谱; C:荧光激发光谱

图 2　纯化蛋白(P)、双酪氨酸(DT)、HSA 的光谱学分析

SDS-PAGE 能打开氢键和疏水键，显示聚合物解离成单链或亚基的形式。此蛋白在 SDS-PAGE 中表现为 67×10^3 的单一条带，而由凝胶层析确定其分子质量为 700×10^3，证明蛋白是由 67×10^3 的单体交联而成的蛋白聚合物（图3）。



M：中分子质量蛋白质标准；1：纯化蛋白

图3 纯化蛋白的 SDS-PAGE 分析

2.3 体外生物学活性鉴定

纯化的蛋白质刺激人外周血单核细胞 TNF-α 释放的量效作用显示，蛋白仅 1 mg 即能显著刺激 TNF-α 释放（$P<0.05$，与 PBS、HSA 比较），随着蛋白量的增加，TNF-α 释放增加，2 mg 起 TNF-α 的释放即非常显著（$P<0.01$，与 PBS、HSA 比较）。时效作用显示，蛋白与细胞培养 1 h 即能显著刺激 TNF-α 释放（$P<0.05$，与 PBS、HSA 比较），并随培养时间的延长，TNF-α 释放增加，6、12、24 h 较 PBS 和 HSA 均增加非常显著（$P<0.01$，与 PBS、HSA 比较）。以上说明蛋白能够呈剂量依赖性和时间依赖性地刺激单核细胞释放 TNF-α。

3 讨论

Witko-Sarsat 等[1]最先报道的 AOPP 是采用一步凝胶层析由 CRF 血液透析患者血浆中分得的。为得到更高纯度的 AOPP，本研究借鉴此方法并加以改进，在凝胶层析基础上，进行离子交换 HPLC 二次层析。考虑到血浆中蛋白成分复杂，每一步层析丢失量大，而 AOPP-HSA 粗纯品获得较为容易，来源单一，成分相对简单，分离条件易于控制，因此选择 AOPP-HSA 粗纯品作为分离的对象。经过上述两步层析，最终分离出纯度达 99.4%、具 AOPP 浓度峰的蛋白质，将 AOPP 纯化了16 482倍。

既往研究对 AOPP 的定义包括两个主要方面：①在结构特征上，是含有双酪氨酸的蛋白交联聚合物；②在生物活性上，是一种炎症介质，能够促发单核细胞的炎症反应，如 TNF-α 的释放。因此，只要鉴定纯化的蛋白满足上述两方面，就可被认定为 AOPP[5]。本研究经紫外和荧光光谱分析、SDS-PAGE、单核细胞 TNF-α 分泌实验，证明所获蛋白质具有 AOPP 典型的结构特征和生物学活性，符合 AOPP 定义的两个方面。这是首次通过多步层析方法分离高纯度并具生物活性的 AOPP-HSA，为高质量 AOPP 的制备提供了值得借鉴的方法，使针对 AOPP 的研究更具特异性和可靠性，有助于更好地了解 AOPP 在 CRF 并发症中的作用。

值得注意的是，Witko-Sarsat 由血液透析患者血浆中分离的 AOPP 分为 700×10^3 的高分子质量 AOPP（high molecular weight AOPP，HMW-AOPP）和 67×10^3 的低分子质量 AOPP（low molecular weight AOPP，LMW-AOPP）两种形式，本研究所分离的 AOPP-HSA 分子质量为 700×10^3，对应于 HMW-AOPP，其 67×10^3 的单体则是 LMW-AOPP。HMW-AOPP 只能存在于非变性条件下，在变性条件下（如 SDS-PAGE）即被完全解离成 LMW-AOPP。我们未分离出 LMW-AOPP 可能是因分离方法不同，或粗纯品与血浆中 HMW-AOPP 和 LMW-AOPP 组成比例不同所致。另外，回顾 AOPP-HSA 的分离纯化过程，基本上都是在接近生理性的条件下完成，说明 AOPP-HSA 的聚合物形式在生理条件下不会解聚。此种结构特征和生物学活性之间的关系还有待进一步研究。

参考文献：

[1] WITKO-SARSAT V, FRIEOLANOER M, CAPEILLERE-BLANDIN C, *et al*. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia[J]. Kidney Int, 1996, 49(5): 1304-1313.

[2] WITKO-SARSAT V, GAUSSON V, DESCAMPS-LATSCHA B. Are advanced oxidation protein products potential uremic toxins? [J]. Kidney Int Suppl, 2003, (84): S11-S14.

[3] WITKO-SARSAT V, GAUSSON V, NGUYEN A T, *et al*. AOPP-induced activation of human neutrophil and monocyte oxidative metabolism: a potential target for N-acetylcysteine treatment in dialysis patients[J]. Kidney Int, 2003, 64(1): 82-91.

[4] SEAGER-DANCIGER J, LUTZ M, HAMA S, *et al*. Method for large scale isolation, culture and cryopreservation of human monocytes suitable for chemotaxis, cellular adhesion assays, macrophage and dendritic cell differentiation[J]. J Immunol Methods, 2004, 288(1-2): 123-134.

[5] VANHOLDER R, GLORIEUX G, DE-SMET R, *et al*. New insights in uremic toxins[J]. Kidney Int Suppl, 2003, (84): S6-S10.

（编辑 栾 嘉）