·论 著·

^{125}I 标记重组融合蛋白 dTMP-GH 在小鼠体内分布的实验研究

申明强,陈 默,王 崧,粟永萍,王军平 (第三军医大学预防医学院全军复合伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆市纳米医药工程技术研究中心,重庆 400038)

[摘 要] **目的** 研究重组融合蛋白 dTMP-GH 在小鼠体内的分布情况,明确其是否具有靶向分布特点。**方法** 实验室制备 dTMP-GH 重组融合蛋白;用放射性^{125}I 标记融合蛋白 dTMP-GH 后,按 100 μg/kg 的标准小鼠尾静脉注射^{125}I-dTMP-GH,分别于给药后 5 min、15 min、30 min、1 h、2 h、4 h、8 h、12 h、24 h 取心、肝、脾、肾、股骨、甲状腺等进行放射性计数。**结果** 制备得到纯度大于 98% 的重组融合蛋白 dTMP-GH;^{125}I 标记率为 71.53%,放化纯度为 96.53%,比活度为 0.22 MBq/μl;尾静脉注射^{125}I 标记的 dTMP-GH 后 30 min 股骨的放射性计数占到注射总量的 10%,并随时间推移经肝脏和肾脏代谢。**结论** 融合蛋白 dTMP-GH 经尾静脉注射后在小鼠体内主要分布于骨髓,具有骨髓组织偏向分布特点。

[关键词] ^{125}I 标记;dTMP-GH;血小板;小鼠

[中图分类号] R329.28;R558.2;R331.143 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2014)03-0221-04

Experimental research on distribution of ^{125}I labeled recombinant fusion protein dTMP-GH in mice

SHEN Ming-qiang, CHEN Mo, WANG Song, SU Yong-ping, WANG Jun-ping (Institute of Combined Injury, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University; State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury; Chongqing Engineering Research Center for Nanomedicine, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To assess the distribution of recombinant fusion protein dTMP-GH in mice and to determine whether it is of targeted distribution characteristics. **Methods** A laboratory scale preparation of dTMP-GH recombinant fusion protein was obtained. Protein dTMP-GH was labeled with radioactive ^{125}I, then mice were sacrificed at 5 min, 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 12 h, 24 h after tail vein injection of ^{125}I-dTMP-GH at a dose of 100 μg/kg, and the organs and tissues (heart, liver, spleen, kidney, bone and thyroid) were collected for radioactive counting. **Results** Preparation of purified (>98%) dTMP-G was obtained. ^{125}I labeling rate was 71.53%, radiochemical purity was 96.53%, and specific activity was 0.22 MBq/μl. 30 min after tail vein injection of ^{125}I labeled dTMP-GH, radioactivity accounted for 10% of the total injected in femoral, and metabolism was carried via liver and kidney over time. **Conclusion** Fusion protein mainly distributed in bone marrow via tail vein injection in mice, which expressed that dTMP-GH has the characteristics of selective distribution in bone marrow tissue.

Keywords: ^{125}I labeled; dTMP-GH; blood platelet; mice

血小板减少症常见于放疗、化疗和骨髓移植患者,严重的血小板降低直接威胁到人们的生命安全[1]。目前,临床上治疗血小板减少症的主要方法为直接输注血小板,但因治疗费用昂贵导致使用受到限制。因此,寻找高效、廉价的升血小板药物就显得非常迫切和重要。我室通过基因重组技术成功将血小板生成素模拟肽(thrombopoietin mimetic peptide, TMP)和人生长激素(human growth hormone, hGH)进行融合,研制出重组融合蛋白dTMP-GH[2-3]。在此基础上,我室对该融合蛋白的发酵和纯化制备工艺进行了细致的研究,现已能获得纯度大于 98% 的重组融合蛋白 dTMP-GH。作为一种新型升血小板因子,dTMP-GH 具有显著的刺激巨核细胞增殖、分化的作用,以达到促进血小板生成的生物学活性[4],有望成为治疗造血功能障碍引起的血小板减少症的一种新方式。为了研究 dTMP-GH 在体内的分布情况,本研究制备了^{125}I-dTMP-GH,并对其在小鼠体内的分布进行研究,证实 dTMP-GH 融合蛋白具有骨髓偏向性分布的特点,为进一步探索 dTMP-GH 促血小板生成作用的分子机制奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

融合蛋白 dTMP-GH 由本室自行制备,Na^{125}I 购自中国原子能科学研究院同位素研究所,快速薄层层析-硅胶纸(ITL-SG)

doi:10.11659/jjssx.1672-5042.201403001

[基金项目] 国家自然科学基金(31071025);广东省科技计划项目(2012A080202001)

[通讯作者] 王军平, E-mail: pingsw2005@126.com

[收稿日期] 2014-01-21 [修回日期] 2014-02-04

购自美国 Gelman 公司,Sepdex 75 层析柱购自美国 GE 公司,Iodogen(1,3,4,6-四氯 3,6-二苯-甘脲)购自美国 Sigma 公司,偶联剂 DOTA 购自美国 Macrocyclics 公司,TRIS 购自美国 Angus 公司,其他试剂均为国产分析纯。γ 免疫计数仪 购自美国 Perkin Elmer,电子天平购自沈阳龙腾电子,蛋白纯化仪 AKTA prifier 10 购自美国 GE 公司,紫外分光光度计购自 BECKMAN 公司。Bal b/c 小鼠购自第三军医大学实验动物中心。

1.2 方法

1.2.1 dTMP-GH 的制备 取 dTMP-GH 接种于 Amp + LB 平板,在 37 ℃中培养 18 h 后挑取单克隆接种于 Amp + LB 液体培养基中培养过夜。将培养的 dTMP-GH 菌液接种到发酵罐中 32 ℃扩增培养,5 h 后变温至 42 ℃诱导表达,诱导 5 h 后离心收取菌体。

1.2.2 dTMP-GH 的纯化 将表达的 dTMP-GH 菌体按 100 g/L用双蒸水重悬后进行高压匀浆破菌。破菌后,8 000 r/min离心弃去上清,沉淀用 Buffer A(Tirs 碱0.02 mol/L,尿素 8 mol/L,pH 8.0)溶解。取 dTMP-GH 的溶解液过 SP 柱并收集穿透液,用透析法除去穿透液中的尿素。将透析完毕的 dTMP-GH 上 Q 柱,分别用浓度为 0.05 mol/L、0.15 mol/L、0.5 mol/L和 1 mol/L 的 NaCl 进行洗脱,收集各洗脱组分电泳。选取电泳中纯度最高的 dTMP-GH 过分子筛 Sepdex 75,收取目的蛋白用 Bradford 法测定浓度。

1.2.3 ^{125}I-dTMP-GH 的标记 利用氯胺-T 法对 dTMP-GH 进行放射性碘标记。标记管中依次加入 50 μl 融合蛋白 dTMP-GH(1.5 mg/mL),5 μl $Na^{125}I$(19.6 MBq),10 μl 氯胺-T(3 mg/mL,50 mmol/L PBS,pH 7.5),震荡反应 5 min,加入 20 μl $Na_2S_2O_3$(8 mg/mL,50 mmol/L PBS,pH 7.5)终止反应。

1.2.4 ^{125}I-dTMP-GH 的纯化 采用 Sepdex 75 柱除去未结合的放射性碘。先用含 1% BSA 的 PBS 进行柱平衡过夜,再用 PBS 洗 20 个柱体积,加入样品,用 PBS 洗脱,分管收集,每管 0.5 mL,共收集 30 管,分别取 2 μl 加入塑料测量管中用免疫计数仪测量每管放射性计数,并测定每管蛋白含量。将上述测量管中计数率高并且蛋白浓度大于 20 μg/mL 的混合,用 PBS 调整蛋白浓度至 20 μg/mL,放置于 4 ℃备用。

1.2.5 ^{125}I-dTMP-GH 生物学活性测定 将 MO7e 细胞培养至生长旺盛期时采取 rhGM-CSF 饥饿 24 h 后按 2×10^5/mL 浓度转接至 96 孔 U 型板中,每孔 100 μl。按照 10 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL 的药品终浓度分别加入^{125}I-dTMP-GH 和 dTMP-GH 每个孔 6 个复孔再培养 48 h。培养完毕后每孔加入 CCK-8 试剂 10 μl,再培养 6 h 后使用酶标仪于 490 nm 波长检测细胞光密度值。

1.2.6 ^{125}I-dTMP-GH 在小鼠体内分布 将 5 ~ 7 周龄 20 g 左右的 Bal b/c 小鼠随机分为 3 组,每组 9 只,腹腔注射 0.1 mL 1 mg/mL 的 KI,其目的是抑制^{125}I 与甲状腺的结合。30 min 后按 100 μg/kg 的^{125}I-dTMP-GH 经小鼠尾静脉注射给药。给药后 5 min、15 min、30 min、1 h、2 h、4 h、8 h、12 h、24 h 断颈处死小鼠,分别取心、肝、脾、肾、股骨、甲状腺等器官,称重,测量各样品放射性计数。另取 2 μg 的^{125}I-dTMP-GH 作为注射总计数。

2 结果

2.1 融合蛋白 dTMP-GH 的纯化

收集流穿 SP 柱的 dTMP-GH 包涵体溶液,透析完毕再过 Q 柱,经分子筛 Sepdex 75 纯化后可得纯度大于 98% 的 dTMP-GH(图 1)。

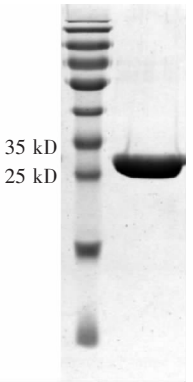


图 1 dTMP-GH 的 12%SDS-PAGE 电泳图

2.2 ^{125}I-dTMP-GH 的标记效果

^{125}I-dTMP-GH 标记物经 Sepdex 75 柱纯化后(图 2),标记率为 71.53%,放化纯度为 96.53%,比活度为 0.22 MBq/μl。

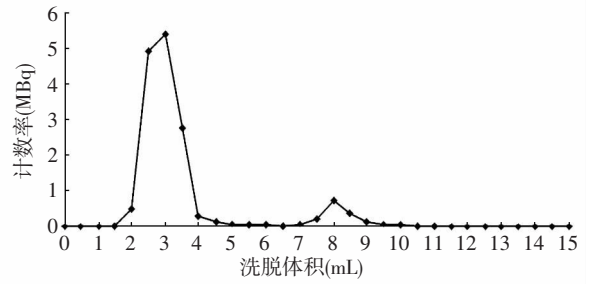


图 2 ^{125}I-dTMP-GH 经 Sepdex 75 柱纯化

2.3 ^{125}I-dTMP-GH 对 MO7e 细胞体外增殖活性

将 dTMP-GH 和^{125}I-dTMP-GH 同时通过 CCK-8 法检测对 MO7e 细胞体外增殖活性作用(图 3)。^{125}I-dTMP-GH 和 dTMP-GH 在 10 ng/mL 至 100 ng/mL 都呈现出随用药量的增加增殖效果越好,在 100 ng/mL 至 200 ng/mL 随用药量的增加增殖效果无明显变化。以 100 ng/mL 点为对比标记后比活性为标记前的 93%,表明标记对 dTMP-GH 活性的影响不会影响实验结果。

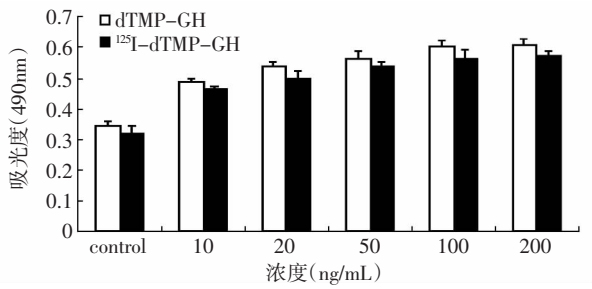


图 3 不同浓度 dTMP-GH 与^{125}I-dTMP-GH 对 MO7e 细胞增殖效果的对比

2.4 ^{125}I-dTMP-GH 在小鼠体内分布

尾静脉注射^{125}I 标记的 dTMP-GH 后，分别于各时间点取材、称重、检测放射性计数，并计算出每克组织含放射性计数量。如图 4 所示：小鼠注射^{125}I-dTMP-GH 后被迅速吸收和代谢，在 30 min 时股骨中放射性计数达到最高，之后随机体代谢含量逐渐降低，同时也提示肾脏是 dTMP-GH 主要代谢器官。

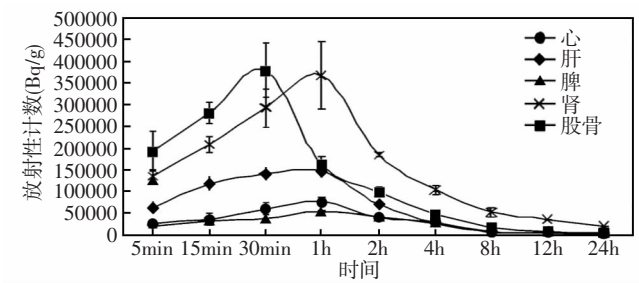


图 4 ^{125}I-dTMP-GH 在各组织不同时间分布

3 讨论

血小板生成素(thrombopoietin TPO)，也称为巨核细胞生长发育因子(megakaryocyte growth and development factor，MGDF)，是影响巨核细胞增殖、分化和血小板生成的重要细胞因子[5]，可与巨核细胞的受体 c-Mpl 特异性结合，调节巨核细胞的分化和血小板的生成[6-9]。Cwirla 等人[10]通过噬菌体表面展示技术筛选得到与天然 TPO 具有相似生物学活性的蛋白多肽 TMP。TMP 由 14 个氨基酸组成与天然 TPO 无同源序列，但可以与 TPO 受体(c-Mpl)高亲和力结合。已有实验证实，通过化学合成的 TMP 能够刺激依赖细胞株(Ba/F3/c-Mpl)的增殖分化，与 rhTPO 有相似生物学效性[9-12]。但由于 TMP 只有 14 个氨基酸组成，自身分子量太小，用基因工程方法制备难度较大，而进行大量的化学合成成本非常高。并且 TMP 是一条线性多肽，在体内循环过程中极易被降解、半衰期过短，所以 TMP 单体很难直接成药。本实验室在前期工作中通过基因重组技术将 TMP 分子与人生长激素进行融合，不仅可以增大分子量，使其能够进行基因工程制备，并使其体内半衰期得到延长。现已实现，融合蛋白 dTMP-GH 在成本低廉的大肠杆菌系统中高效表达，并已能获得纯度大于 98% 的 dTMP-GH 融合蛋白。本课题前期研究中已经发现 dTMP-GH 能够促进小鼠血小板升高，并对巨核细胞增殖作用明显[4]。

本文通过用放射性^{125}I 标记 dTMP-GH 的方法，进一步研究融合蛋白 dTMP-GH 在小鼠体内主要脏器动态分布情况。结果表明：被放射性碘标记的 dTMP-GH 经尾静脉注射入小鼠体内后，dTMP-GH 经血液循环立即向骨髓聚集，在 30 min 时达到最高值(仅股骨的放射性计数就占到注射总量的 10%)，并随着时间推移逐渐降低。促使 dTMP-GH 具有骨髓偏向分布特性原因可能来自两个方面：一个方面来自 dTMP-GH 中的 TMP，TMP 是 TPO 的模拟物，要发挥其自身促血小板生成的生物学活性就必须要结合巨核系祖细胞表面的 TPO 受体 c-Mpl。巨核系祖细胞是通过造血干细胞分化而来，而机体中富含造血干细胞最多的地方就是骨髓腔。另一个方面来自 dTMP-GH 中的 GH，GH 在临床主要用于烧伤患者和矮小症患者，它其中一个重要的生理功能就是能够促进骨骼生长；GH 进入血液后可以高亲和结合人生长激素结合蛋白(growth hormone binding proteins，GHBP)[13-15]，并通过 GHBP 将其运送至骨髓发挥生理功能。还有文献报道指出，rhGH 对多系造血祖细胞的存活和增殖有直接作用[16]，并能够促进辐射损伤小鼠骨髓造血功能重建[17]，这说明 GH 与 TPO 有着相似或相关的信号通路。可能是 GH 通过与其受体(growth hormone receptor，GHR)的结合激活了这一生物学活性；该受体与 c-Mpl 为同一类细胞因子，都是巨核细胞表面受体，所以能够激活相似的信号通路。

血小板的体内生成过程主要有：造血干细胞→髓系造血祖细胞→巨核系祖细胞→前巨核细胞→成熟巨核细胞→血小板；体外实验证实，融合蛋白 dTMP-GH 可以促进巨核细胞生成血小板[4]。产生这一生物学效应的原因可能是：融合蛋白 dTMP-GH 进入机体后，通过与 GHBP 的结合将其运送至骨髓；在骨髓中 TMP 与 c-Mpl 结合，GH 与 GHR 结合，而 c-Mpl 和 GHR 都是巨核细胞表面受体，二者共同刺激巨核细胞增殖、分化、产生血小板。本实验结果表明融合蛋白 dTMP-GH 具有显著的骨髓偏向分布特性，该特性可以提高 dTMP-GH 促巨核细胞增殖分化和血小板生成的生物利用度，降低使用用量和产生毒副反应危险，从一个侧面证实了前面提到的融合蛋白 dTMP-GH 促巨核细胞增值、产生血小板这一生物学效应的推测，并为今后深入研究 dTMP-GH 促血小板生成的分子作用机制提供了思路。同时，在实验中检测到在肾脏中放射性计数也比较高，肝脏的放射性计数第三，说明 dTMP-GH 在体内主要通过肝脏进行代谢，再由肾脏排出到体外或者部分直接由肾脏排出。通过本实验可以看出，骨髓是 dTMP-GH 在体内的重要靶器官之一，在体内时 dTMP-GH 通过肝脏进行主要的代谢，并且肾脏是其重要排泄器官。本实验为我们今后进一步研究重组融合蛋白 dTMP-GH 的分子作用机制奠定了基础。

雌激素对大鼠脑缺血再灌注后血脑屏障作用研究

侯进义,沈 霞,孙菊光 (徐州市中医院神经内科,江苏 徐州 221000)

[摘 要] **目的** 观察雌激素对大鼠脑缺血再灌注后血脑屏障(blood-brain barrier,BBB)的通透性、Occludin 表达的影响,探讨雌激素在脑缺血中的作用。**方法** 随机将去势雌性大鼠分为假手术组、模型组、雌激素预处理组,选取缺血再灌后 4 h,24 h,3 d 3 个时间点作为观察点,对各个时间点脑水肿情况、Occludin 蛋白表达、血脑屏障通透性改变进行考察分析,并选取 24 h 和 3 d 作 BBB 超微结构电镜观察,脑水肿改变情况采用脑含水量百分数测定;蛋白质表达采用 western blot 方法;血脑屏障通透性改变采用伊文思蓝(EB)比色法。**结果** 与假手术组比较,局灶性脑缺血再灌 4 h 模型组大鼠脑组织含水量及 EB 含量均增加($P<0.05$),随缺血再灌时间延长,脑组织含水量、脑组织 EB 含量持续增加,至 24 h,达到高峰($P<0.01$),与同时间点模型组比较,各治疗组大鼠脑组织含水量、EB 含量均有不同程度降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),以 24 h 组降低最为显著($P<0.01$)。电镜观察雌激素预处理组较模型组同时间点比较 BBB TJ 开放减轻,星形胶质细胞足突及毛细血管管周水肿较轻,以 3 d 组显著。Western blot 检测 Occludin 蛋白表达,发现模型组 4 h 时 Occludin 蛋白表达较假手术组减弱,但无显著性差异($P>0.05$),24 h 组 Occludin 蛋白表达较假手术组减弱,有显著性差异($P<0.05$),3 d 组 Occludin 蛋白表达进一步减弱,有明显差异($P<0.01$),雌激素组 4 h 时 Occludin 蛋白表达较同时间点模型组比较无显著性差异($P>0.05$),雌激素 24 h 及 3 d 组 Occludin 蛋白表达较同时间点模型组比较均升高,有显著性差异($P<0.05$)。**结论** 局灶性脑缺血大鼠动物血脑屏障超微结构可见紧密连接发生断裂,内皮细胞内小泡数量增加及星形胶质细胞足突肿胀,可能是大鼠局脑缺血时血管源性脑水肿的重要因素。大鼠局灶性脑缺血,随缺血再灌时间延长,紧密连接相关蛋白 occludin 的表达明显下降,提示 occludin 在调节紧密连接通透性变化的过程中有重要作用。雌激素上调紧密连接 Occludin 蛋白的表达,有可能是其维护血脑屏障完整性减轻脑水肿的机制之一。

doi:10.11659/jjssx.1672-5042.201403002

[**收稿日期**] 2014-03-20 [**修回日期**] 2014-04-03

[参考文献]

[1] Greenberg EM, Kaled ES. Thrombocytopenia[J]. Crit Care Nurs Clin North Am, 2013, 25(4): 427 – 434.

[2] Wang S, Shen M, Xu Y, et al. Rational and efficient preparation of a chimeric protein containing a tandem dimer of thrombopoietin mimetic peptide fused to human growth hormone in Escherichia coli[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2013, 97(7): 2885 – 2894.

[3] 王 崧,王军平,陈 默,等. 重组融合蛋白 rTMP-GH 在巴斯德毕赤酵母中表达的研究[J]. 第三军医大学学报,2008,30(21):2037 – 2040

[4] 许 杨,王军平,赵景宏,等. 重组融合蛋白 rTMP-GH 对体外培养巨核细胞增殖的影响[J]. 第三军医大学学报,2008,30(1):1 – 4.

[5] 叶祥忠,郭 强,李 朝,等. TPO 模拟肽与人 IgG1 的 Fc 融合蛋白在毕赤酵母中的表达及活性鉴定[J]. 生物工程,2002,18(4):424 – 430.

[6] Tecuceanu N, Dardik R, Rabizadeh E, et al. A family with hereditary thrombocythaemia and normal genes for thrombopoietin and c-Mpl[J]. Br J Haematol, 2006, 135(3): 348 – 351.

[7] Cohn CS, Bussel JB. Romiplostim: a second-generation thrombopoietin agonist[J]. Drugs Today (Barc), 2009, 45(3): 175 – 188.

[8] Sakai R, Nakamura T, Nishino T, et al. Xanthocillins as thrombopoietin mimetic small molecules[J]. Bioorg Med Chem, 2005, 13(23): 6388 – 6393.

[9] Dower WJ, Cwirla SE, Balasubramanian P, et al. Peptide agonists of the thrombopoietin receptor[J]. Stem Cells, 1998, 16(2): 21 – 29.

[10] Cwirla SE, Balasubramanian P, Duffin DJ, et al. Peptide agonist of the thrombopoietin receptor as potent as the natural cytokine[J]. Science, 1997, 276(5319): 1696 – 1699.

[11] Kuter DJ. Biology and chemistry of thrombopoietic agents[J]. Semin Hematol, 2010, 47(3): 2743 – 2748. doi: 10.1053/j.seminhematol.2010.02.005.

[12] 袁志宏,奚永志,孔繁华. 细胞因子模拟肽/非肽刺激造血的研究进展[J]. 中国实验血液学杂志,2002,10(1):73 – 76.

[13] Kratzsch J, Selisko T, Birkenmeier G. Transformed alpha 2-macroglobulin as a low-affinity growth hormone-binding protein[J]. Acta Paediatr Suppl, 1996, 417: 108 – 110.

[14] Lim L, Spencer SA, McKay P, et al. Regulation of growth hormone (GH) bioactivity by a recombinant human GH-binding protein[J]. Endocrinology, 1990, 127(3): 1287 – 1291.

[15] Woods KA, Fraser NC, Postel-Vinay MC, et al. A homozygous splice site mutation affecting the intracellular domain of the growth hormone (GH) receptor resulting in Laron syndrome with elevated GH-binding protein[J]. J Clin Endocrinol Metab, 1996, 81(5): 1686 – 1690.

[16] Hanley MB, Napolitano LA, McCune JM. Growth hormone-induced stimulation of multilineage human hematopoiesis[J]. Stem Cells, 2005, 23(8): 1170 – 1179.

[17] Carlo-Stella C, Di Nicola M, Milani R, et al. Age and irradiation-associated loss of bone marrow hematopoietic function in mice is reversed by recombinant human growth hormone[J]. Exp Hematol, 2004, 32(2): 171 – 178.

(编辑:周小林)