

小牛胸腺新胸腺活性因子(TAF⁻)的纯化和鉴定

刘希成²⁾, 刘征¹⁾, 马红¹⁾, 梁荣¹⁾, 张彦明²⁾, 郑昌学¹⁾, 段明星¹⁾*

(¹⁾清华大学生物科学与技术系,北京 100084; (²⁾西北农林科技大学畜牧兽医学院,杨凌 712100)

摘要 以小牛胸腺为原料,通过匀浆、冻融、超滤、Sephadex G15 凝胶过滤、DEAE-Sephadex A-25 阴离子交换层析和反相高效液相色谱等步骤,分离得到了胸腺活性因子 (thymus activity factor, TAF⁻). 500 g 小牛胸腺组织中纯化得到了 0.92 mg 胸腺活性因子. 经 ES/MS 质谱鉴定,结果显示其分子量为 618.8. 氨基酸组成分析显示它由 Ala、Gly、Glu、Gln、Lys、Ser 6 种氨基酸残基组成. 体外生物学活性实验证明,TAF⁻ 能显著促进人外周血淋巴细胞的 E-玫瑰花结的形成率和促进小鼠脾淋巴细胞的分裂增殖.

关键词 胸腺,胸腺活性因子,纯化与鉴定,生物活性

中图分类号 Q 51, Q 517

Purification and Characterization of Thymus Activity Factor from Calf Thymus

LIU Xi-cheng²⁾, LIU Zheng¹⁾, MA Hong¹⁾, LIANG Rong¹⁾,
ZHANG Yan-ming²⁾, ZHENG Chang-xue¹⁾, DUAN Ming-xing¹⁾*

(¹⁾ Department of Biological Science & Biotechnology, Tsinghua University, Beijing 100084, China;

(²⁾ College of Animal Science and Veterinary Medicine, Northwest Science and Technology University of Agriculture and Forest, Yangling 712100, China)

Abstract A new thymus activity factor (TAF⁻) was isolated and purified from calf thymus by ultrafiltration, Sephadex G15 gel filtration, DEAE-Sephadex A-25 ion-exchange chromatography and reverse-phase HPLC. 0.92 mg TAF⁻ was obtained from 500g calf thymus tissue. TAF⁻ exhibited a molecular mass of 618.8 by ES/MS. Amino acid composition analysis showed that this peptide consisted of alanine, glycine, glutamic acid, glutamine, lysine and serine residues. The results of biological activity showed that TAF⁻ specifically increased E-rosette formation of human peripheral blood lymphocytes and increased the proliferative respond of the mitogen ConA-induced mice splenocytes.

Key words thymus, thymus activity factor, purification and characterization, biological activity

胸腺是机体的中枢免疫器官,它不仅是 T 细胞发育分化和成熟的场所,而且还可以分泌多种胸腺激素,调节机体的免疫功能,特别是细胞免疫功能. 1966 年,Goldstein 等^[1]从小牛胸腺中提取了具有生物学活性的物质,命名为胸腺素(thymosin). 之后,相继有文献报道了纯化胸腺激素的方法,先后分离出胸腺素₁ (thymosin alpha 1)^[2]、胸腺素₄ (thymosin beta 4)^[3]、血清胸腺因子(thymulin)^[4]等多种具有免疫生物学活性的蛋白和多肽因子. 胸腺激素在疾病诊断和治疗中有重要作用,现已广泛应用于治疗乙肝、丙肝、肿瘤、癌症和免疫缺陷等的研究中^[5,6],是一类免疫增强剂或免疫调节剂. 我们从小牛胸腺中分离得到了一种新型胸腺多肽活性因子 (thymus activity factor, TAF⁻),能显著提高人外周血淋巴

细胞的 E-玫瑰花结的形成率和促进小鼠脾淋巴细胞的分裂增殖.

1 材料和方法

1.1 材料

新鲜小牛胸腺购于北京市屠宰场, - 20 °C 下冰冻保存. Sephadex G15, Sephadex G10 和 DEAE-Seph-

收稿日期:2001-11-16,接受日期:2002-01-11

*联系人:Tel:(010)62773255,

E-mail:duanmx@mail.tsinghua.edu.cn

刘希成,男,1974年5月生,硕士研究生

Received: November 16, 2001; Accepted: January 11, 2002

*Corresponding author Tel:(010)62773255,

E-mail:duanmx@mail.tsinghua.edu.cn

adex A-25 均为 Pharmacia 公司产品;色谱纯乙腈为 Fisher 公司产品;三氟乙酸 (TFA) 噻唑蓝 (MTT) 和刀豆球蛋白 A (ConA) 为 Sigma 公司产品;RPMI 1640 培养基为 GIBCO 公司产品;其余试剂皆为国产分析纯。

高效液相色谱 HPLC600E 系统为 Waters 公司; Esquire-LC 离子阱质谱仪为 Bruker 公司;蛋白质氨基酸组成分析 121MB 系统为 Beckman 公司;U-2001 紫外分光光度计为 Hitachi 公司;Model 550 型酶标仪为 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 TAF⁻ 的制备及分离纯化 取小牛胸腺 500 g,匀浆后反复冻融,离心,超滤,超滤液依次经过 Sephadex G15 凝胶层析柱,DEAE Sephadex A-25 阴离子交换柱,再经 Sephadex G10 柱脱盐浓缩,反相 HPLC 层析得到 TAF⁻。

1.2.2 蛋白质浓度的测定 按 Lowry 法^[7]测定蛋白质的浓度,以牛血清白蛋白为标准蛋白。

1.2.3 质谱分析 用 ES-MS 质谱法测定 TAF⁻ 分子量,由清华大学化学系开放实验室完成。

1.2.4 氨基酸组成分析 将 TAF⁻ 纯品溶于 6.0 mol/L HCl 中,真空条件下 110 °C 水解 24 h,分析水解产物中氨基酸组成,计算氨基酸相对百分含量。

1.2.5 E-玫瑰花结实验 参照文献^[8]并加以改进。常规制备人外周血淋巴细胞,45 °C 恒温水浴温育 30 min,连续 2 次,用 Hank's 液调细胞浓度至 5.0×10^6 个/ml。将 50 μ l 不同浓度的样品和 200 μ l 细胞悬液混合,每组设 3 个复孔,设对照组。37 °C 温育 1 h,加入绵羊红细胞 0.2 ml,离心,37 °C 条件下放置 4 h,弃上清,加入戊二醛固定,染色,盖片镜检。淋巴细胞周围附着 3 个以上红细胞者为阳性,观察 200 个淋巴细胞,算出阳性率。

$$\text{样品活力 (U)} = \frac{\text{样品组阳性率} - \text{对照组阳性率}}{\text{对照组阳性率}} \times 100$$

1.2.6 细胞增殖实验 参照 Russell 的 MTT 方法进行^[9]。无菌条件下取小鼠脾脏,用钢筛研磨后用淋巴细胞分离液分离出单个核细胞,37 °C,5% CO₂ 条件下在细胞培养皿温育 1 h,收集非粘附细胞,悬浮于含 10% 小牛血清的 1640 培养液中。向 96 孔细胞培养板中加入脾细胞 4×10^5 细胞/孔和 0.75 μ g/ml 终浓度的 ConA,每组设 3 个复孔,并设对照组。37 °C,5% CO₂ 温育 24 h,再加入 50 μ l 倍比稀释的 TAF⁻,起始浓度为 0.02 mg/ml,温育 48 h,每孔加入 10 μ l MTT 溶液,37 °C 培养 6 h,加入 100 μ l 酸性 SDS 溶

液,37 °C 过夜,570 nm 测 A₅₇₀ 值。

2 结果

2.1 TAF⁻ 的分离纯化

500 g 小牛胸腺经匀浆、反复冻融、离心和超滤后,用 Sephadex G-15 凝胶柱 (1.5 cm \times 100 cm) 层析,双蒸去离子水洗脱,得到 6 个洗脱峰 (Fig. 1)。用 E-玫瑰花结试验检测各个峰的生物学活性,发现第 I 峰有较高活性,收集第 I 峰,浓缩后通过 DEAE-Sephadex A-25 阴离子交换柱 (1.5 cm \times 10 cm),以 0.05 ~ 0.5 mol/L NH₄Ac-HAc (pH 5.8) 缓冲液线性洗脱,得到 7 个洗脱峰 (Fig. 2),活性峰 6 浓缩后进行

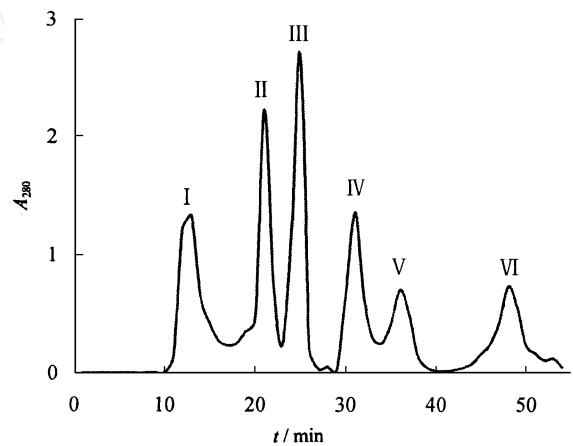


Fig. 1 Sephadex G-15 gel filtration of calf thymic ultrafiltrate. The column was eluted with deionized water at the flow rate of 12 ml/h. The peak with Erosette⁻ activity was pooled and concentrated.

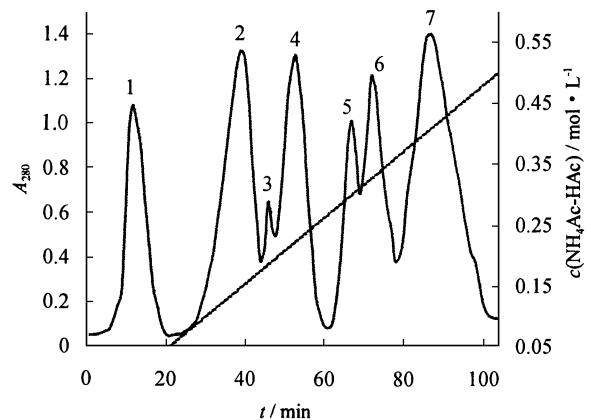


Fig. 2 DEAE-Sephadex A-25 ion-exchange chromatography of the peak from Sephadex G-15 gel filtration. The column was eluted with a linear gradient of 0.05 ~ 0.5 mol/L NH₄Ac-HAc buffer (pH 5.8) at the flow rate of 30 ml/h. The peak 6 with Erosette⁻ activity was pooled, concentrated and lyophilized.

Sephadex G10 柱脱盐,浓缩后通过 HPLC 柱(ZORB-AX Extend-C18 反相柱,4.6 mm ×250 mm)纯化.流动相:A 相为含 0.1% TFA 的水溶液;B 相为含 0.1% TFA 的乙腈溶液;线性梯度洗脱,流速为 0.6 ml/min,紫外全波长检测(Fig. 3).收集活性峰,浓缩冻干后得到 0.92 mg 白色粉末,即为 TAF⁻.纯化总结表见表 1.

2.2 分子量测定

经 ES/MS 质谱分析(Fig. 4),TAF⁻ 为单一分子组分, $M/Z619.8$ 为 TAF⁻ 的单电荷峰 $[M + H]^+$,所以其分子量为 618.8.

2.3 氨基酸组成分析

TAF⁻ 氨基酸组成分析结果表明含有 6 个氨基酸残基,结合质谱分析结果,TAF⁻ 由 Ala、Gly、Glu、Gln、Lys 和 Ser 组成.

Table 1 Purification of TAF⁻ from calf thymus

Step	Total protein/mg	Total activity/U	Specific activity/ $U \cdot mg^{-1}$	Purification factor	Yield (%)
Crude extract	61 450	141 335	2.3	1	100
Ultrasonication	1 950	46 800	24	10.4	33.1
Sephadex G15	278.6	30 646	110	47.8	21.7
DEAE-Sephadex A-25	8.3	5 170.9	623	270.9	3.7
RP-HPLC	0.92	1 749.8	1 902	827	1.2

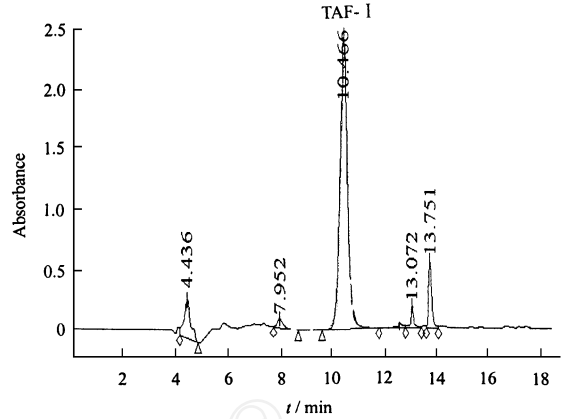


Fig. 3 Reversed-phase HPLC chromatography after Sephadex G10 gel filtration

The column was eluted with a linear gradient of 0%–50% acetonitrile in 0.06% trifluoroacetic acid in water. The eluted peak at 10.46 min was TAF⁻.

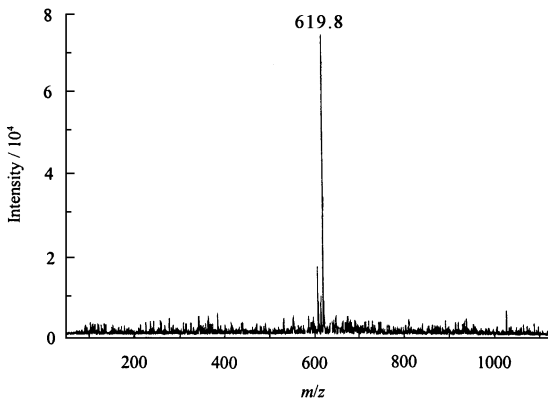


Fig. 4 ES/MS spectra of TAF⁻ illustrating m/z 619.8 as the protonated molecule $[M + H]^+$ of TAF⁻. The result displayed that the molecular weight of TAF⁻ was 618.8

2.4 TAF⁻ 对 E-玫瑰花结形成率的促进效应

TAF⁻ 与脱受体的人外周血淋巴细胞温育后,用 E-玫瑰花结形成实验检测(Table 2).结果显示,TAF⁻ 能显著提高淋巴细胞的 E-玫瑰花结形成率,具有明显的剂量-效应依赖关系.与胸腺肽(thymopeptidum)相比较,2 $\mu g/ml$ 剂量的 TAF⁻ 对 E-玫

瑰花结形成率的促进效应比 1 mg/ml (胸腺肽的最适作用浓度,该实验由本室完成.)的胸腺肽强,显示了良好的研究开发价值.

2.5 TAF⁻ 对淋巴细胞分裂增殖的促进效应

小鼠脾淋巴细胞先与 ConA 37 $^{\circ}C$ 温育 24 h,激活后加入 TAF⁻,用 MTT 方法检测(Fig 5).结果表明,TAF⁻ 与对照组相比具有显著性差异,与 E-玫瑰花结实验结果相符合,有明显的剂量-效应依赖关系.

Table 2 Effect of TAF⁻ activity in E-rosette assay (n = 3)

Concentration / $mg \cdot ml^{-1}$	ERFC (%)	Increase rate	P
Control	29.4 \pm 3.3	-	-
TP* (1.0)	48.5 \pm 1.7	65.0	$P < 0.01$
TAF ⁻ (1.0)	29.7 \pm 2.3	1.0	$P > 0.05$
TAF ⁻ (0.4)	33.3 \pm 3.2	13.3	$P > 0.05$
TAF ⁻ (0.2)	36.7 \pm 2.1	24.8	$P < 0.05$
TAF ⁻ (0.01)	46.5 \pm 4.3	58.2	$P < 0.01$
TAF ⁻ (0.002)	55.7 \pm 5.2	89.5	$P < 0.01$
TAF ⁻ (0.001)	38.1 \pm 6.7	29.6	$P < 0.01$

* TP: thymopeptidum

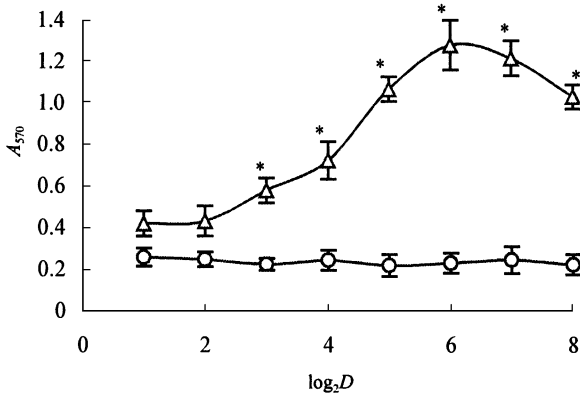


Fig. 5 The dose dependent effect of TAF⁻¹ on the proliferation of ConA-induced mice splenocytes in MTT

Splenocytes were pre-incubated with ConA for 24 hours prior to a 48 hours incubation of varying concentrations of TAF⁻¹ (* $P < 0.01$, $n = 3$, D : dilution of TAF⁻¹ sample)

— Δ —TAF⁻¹ ; — \circ —Without TAF⁻¹

3 讨论

本文以小牛胸腺为原料,通过匀浆、超滤、凝胶过滤、阴离子交换层析和高效液相色谱等层析方法,得到了胸腺活性因子 I(TAF⁻¹),分子量为 618.8,能显著提高人外周血淋巴细胞的 E 玫瑰花结的形成率和促进小鼠脾淋巴细胞的分裂增殖.从已知的性质来看,TAF⁻¹ 同文献已报道的胸腺活性多肽在结构上都有一定差别,因而认为 TAF⁻¹ 可能是一种新胸腺活性因子.目前已从动物胸腺中提取了血清胸腺因子(thymulin)、胸腺体液因子(THF2)^[10]、胸腺五肽(TP5)^[11]和我们纯化的胸腺活性因子(TAF⁻¹)等活性肽,它们虽然都具有促 T 淋巴细胞分化和成熟的功能,但其结构却无相似之处.可能是由于 T 淋巴细胞成熟的复杂性和免疫分型的多样性,在其分化过程中,受多种环境因素控制,其功能的成熟涉及多种胸腺因子及其他分子的相互作用,使其分化为不同的功能亚群.胸腺分泌多种不同的肽类在 T 淋巴细胞成熟和分化的各个阶段起作用,从而诱发和维持免疫功能.

在进行 TAF⁻¹ 活性研究时,我们发现 TAF⁻¹ 对 E 玫瑰花结形成率的促进作用和对淋巴细胞分裂增殖的促进效应都具有明显的剂量-效应依赖关系,即在低浓度时对其活性有促进作用,随着浓度的升高逐渐转变为对活性的抑制作用. Spangelo 等^[12]发现胸腺组分在低浓度时能诱导神经内分泌肿瘤细胞的凋亡,这一功能随着浓度的升高而降低. Baumann 等^[13]发现,胸腺素₁抑制氢化可的松引起的鼠胸腺

细胞凋亡实验也有明显的剂量-效应依赖关系.这一双向调节作用是胸腺激素本身具有这种效能,还是胸腺激素中同时含有淋巴细胞抑制因子和胸腺细胞特异生长因子等成分在不同浓度时所占的主导地位不同而产生的还有待进一步研究.我们的实验结果表明,TAF⁻¹ 的生物活性具有明显的剂量依赖关系,提示在胸腺激素中可能存在一些多肽因子具有双向调节的生物学活性.关于 TAF⁻¹ 与大分子量胸腺多肽结构和功能上的联系及其免疫调节机制,我们正在进行深入研究.

动物胸腺含有大量高生物活性的多肽因子,且许多因子分子量较小,可以人工合成,具有极大利用价值. TAF⁻¹ 是其中生物活性较高的一种,与目前临床应用的胸腺肽制剂相比,TAF⁻¹ 极微量的剂量就能得到相当的促进效应,值得进行深入研究和开发应用.

参考文献 (References)

- 1 Goldstein A L, Slater F D, White A. Preparation, assay, and partial purification of a thymic lymphopoietic factor (thymosin). *Proc Natl Acad Sci USA*, 1966, **56**(3): 1010 ~ 1017
- 2 Goldstein A L, Low T L, Mc Adoo M, Mc Clure J, Thurman G B, Rossio J, Lai C Y, Chang D, Wang S S, Harvery C, Ramel A H, Meienhofer J. Thymosin alpha: isolation and sequence analysis of an immunologically active thymic polypeptide. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977, **74**(2): 725 ~ 729
- 3 Low T L K, Goldstein A L. Chemical characterization of thymosin b4. *J Biol Chem*, 1982, **257**: 1000 ~ 1006
- 4 Bach, J F. Thymulin FTS-Zn. *Clinics Immunol Allergy*, 1983, **3**: 133 ~ 157
- 5 Tang J H, Yeh C T, Chen T C, Hsieh S Y, Chu C M, Liaw Y E. Emergence of a gene mutant during thymosin alpha 1 therapy in a patient with chronic hepatitis B. *J Infect Dis*, 1998, **178**(3): 866 ~ 869
- 6 Bela Bodey, Bela Bodey Jr, Stuart E. Siegel, Hans E. Kaiser. Review of thymic hormones in cancer diagnosis and treatment. *Internat J Immunopharmacol*, 2000, **22**: 261 ~ 273
- 7 张龙翔,张庭芳,李令媛主编.生化实验方法与技术,第 2 版.北京:高等教育出版社(Zhang Long-xiang, Zhang Ting-fang, Li Ling-yuan ed. *Experimental Methods and Techniques in Biochemistry*, 2nd ed. Beijing: Higher Education Press), 1997: 314 ~ 319
- 8 Xu Cheng-su, Tao Kai, Zheng De-xian, Zheng Cheng-xue, Liu Shi-lian. Isolation and purification of a small peptide with activity of increasing E-receptor expression from calf thymus. *Immunol Invest*, 1985, **14**(4): 355 ~ 365
- 9 Russell C A, Vindelov L L. Optimization and comparison of the MTT assay and the 3H TdR assay for the detection of IL-2 in helper T cell precursor assays. *J Immunol Methods*, 1998, **217**: 165 ~ 175
- 10 Barak Y, Hahn T, Pecht M, Karov Y, Berrebi A, Zaizov R, Stark B, Buchner V, Burstein Y, Trainin N. Thymic humoral factor-gamma 2,

- an immunoregulatory peptide, enhances human hematopoietic progenitor cell growth. *Exp Hematol*, 1992, **20**(2):173 ~ 177
- 11 Goldstein, G, Scheid, M P, Boyse, E A, Schlesinger, D H., Van Wauwe, J. A synthetic pentapeptide with biological activity characteristic of the thymic hormone thymopoietin. *Science*, 1979, **204**:1309 ~ 1310
- 12 Spangelo B L, Farrimond D D, Thapa M, Bulathsinghala C M, Bowman K L, Sareh A, Hughes Jr FM, Goldstein A L, Badamchian M. Thymosin fraction 5 inhibits the proliferation of the rat neuroendocrine MMQ pituitary adenoma and C6 glioma cell lines *in vitro*. *Endocrinology*, 1998, **139**:2155 ~ 2162
- 13 Baumann C A, Badamchian M, Goldstein A L. Thymosin 1 is a time and dose-dependent antagonist of dexamethasone-induced apoptosis of murine thymocytes *in vitro*. *Internat J Immunopharmacol*, 2000, **22**:1057 ~ 1066

治疗单纯性疱疹的新药

众所周知,单纯性疱疹病毒(HSV)可引起间歇性口腔与生殖器溃疡,但对其危害性之大人尚未充分认识。HSV对免疫系统虚弱的人,如新生儿、老人或艾滋病患者可致盲甚至致死。20世纪70年代开发了无环鸟苷,作为治疗许多类型的HSV的标准药物。当无环鸟苷进入感染细胞,HSV的一种酶便活化该药物,使HSV用于拷贝其本身的DNA的一种蛋白质受到抑制。然而用无环鸟苷治疗的感染会复发,并且有几个品系的HSV对无环鸟苷发生抵抗作用。研究者于是寻觅抗HSV的新药,他们试验了HSV赖以复制其DNA的其他蛋白质。在10多年以前,有研究者发现了能与一种称为解旋酶-引发酶相结合的3种HSV蛋白质的复合物。HSV利用解旋酶-引发酶来解开DNA双螺旋结构,并履行复制所必需的其他任务。研究者开发出一种分析方法,可在数千种化合物中筛选出一些抑制HSV的解旋酶-引发酶活性的化合物。用这种方法,他们鉴定出几种化合物,其阻碍HSV解旋酶-引发酶沿DNA链推进而履行复制任务。他们在四月份的*Nature Medicine*上报道,以上所述的抑制剂在HSV感染细胞中阻断HSV复制,从而使受HSV感染的啮齿类得以存活。在生殖器感染了HSV的小鼠中,上述的有一种抑制使小鼠死亡率从60%下降到10%。再者,这种化合物在小鼠开始感染HSV过65小时后仍有效力。相对照地,无环鸟苷仅在首次症状出现后数小时以内发生效力。另有研究者也鉴定了一种HSV复制的抑制剂。他们在筛选了400000种化合物后,获得了一些干预解旋酶-引发酶的化合物。他们甚至报道他们找到了化合物可减少后发病的数目——这种后发病是在首次感染后发生的溃疡的继发证。研究者都断言解旋酶-引发酶抑制剂的效力比无环鸟苷及其衍生物的效力大。但是在此刻都无在人身上开展解旋酶-引发酶抑制剂试验的计划。遗憾的是,这些化合物看上去很令人感兴趣,但是药物公司却不肯立即投资来进行试验,因为他们尚未认识到这种药物是有利可图的。而研究者认为,解旋酶引发酶抑制剂总有一天会投入治疗单纯性疱疹的临床试验。

(李潇 摘译自 J. Travis: *Science News*, Vol. 161, April 13, 2002, p227)