

- tions, 1988, **127** (3): 66~ 68
- 6 Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dyebinding. *Anal Biochem*, 1976, **72** (1~ 2): 248~ 254
 - 7 Shibata S, Norton T R. Isolation and characterization of the cardiotoxic polypeptide anthopleurir A from the sea anemone *Anthopleura xanthogrammica*. *J Pharm Sci*, 1976, **65** (9): 1368~ 1373
 - 8 Reimer N S, Yasunobu C L, Yasumobu K T, *et al.* Amino acid sequence of the *Anthopleura xanthogrammica* heart stimulant, anthopleurir B. *J Biol Chem*, 1985, **260** (15): 8690~ 8693
 - 9 Gallagher M J, Blumenthal K M. Cloning and expression of wild type and mutant forms of the cardiotoxic polypeptide anthopleurir B. *J Biol Chem*, 1992, **267** (20): 13958~ 13963
 - 10 Romanose M A, Scorer C A, Clare J J. Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast*, 1992, **8** (6): 423~ 488
 - 11 Screelrishna K, Nelles S, Potenz R, *et al.* High level expression, purification, and characterization of recombinant human tumour necrosis factor synthesized in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Biochemistry*, 1989, **28** (9): 4117~ 4125

Cloning of a Synthetic Gene Coding for Cardiotoxic Polypeptide Anthopleurir-QD2 and Its Expression in *Pichia pastoris*. WANG Wei Rong, LIU Ai Min, QIAN Zhi Kang, HUANG Wei Da (*School of Life*

Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China).

Abstract Venom of sea anemone *Anthopleura qingdaoensis* contains at least two cardiotoxic polypeptides capable of enhancing cardiac contraction (a positive inotropic effect). An artificial gene encoding anthopleurir-QD2 (Ap-QD2), which consists of 49 amino acid residues, was cloned and transferred into pPICZαA, a secretory expression vector for *Pichia pastoris*. The construct was linearized and was integrated into the yeast chromosome by electroporation under the selection of zeocin. Approximately 20 mg/L of biologically active Ap-QD2 was produced from one of the KM71 (Mut^s) transformants, and about 7 mg of pure Ap-QD2 was obtained after chromatography purification.

Key words cardiotoxic polypeptide anthopleurir-QD2, sea anemone, *Pichia pastoris*, secretory expression

羧甲基化虎奶多糖的制备及抗氧化性研究

王 雁 杨祥良 邓成华 顾小曼 周井炎 徐辉碧¹⁾

(华中理工大学药物研究所, 武汉 430074)

摘要 通过对从虎奶菌菌核中提取的虎奶多糖 (HNP) 进行羧甲基化修饰, 制备了一种水溶性羧甲基化虎奶多糖 (CM-HNP), 并对其抗氧化性进行了初步研究. 结果表明 CM-HNP 能有效抑制 Fe²⁺-Vit C 引起的大鼠肝线粒体脂质过氧化、膜流动性的降低和线粒体的肿胀, 清除邻苯三酚自氧化产生的超氧自由基 O₂⁻ 并呈一定的剂量-效应关系.

关键词 虎奶多糖, 抗氧化性, 羧甲基化

学科分类号 R284.1, Q539

虎奶, 学名菌核侧耳或地核侧耳, 为担子菌纲 (Basidiomycetes) 侧耳科 (Pleurotaceae) 植物虎奶菌 (*Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Sing.) 之菌核, 主要分布于我国云南、缅甸及其他一些东南亚国家. 据《中药药名辞典》^[1] 载: 虎奶菌, 甘, 温, 补气益血, 治气血虚弱症. 但是虎奶作为一种中药材在我国药典和各地地方标准中未被收载, 对其化学成分和生物活性的研究迄今在国内外未见报道.

初步研究表明虎奶的主要成分为一种均一的多

糖 (HNP), 约占菌核干重的 60%. 根据凝胶渗透色谱、高碘酸氧化及 Smith 降解等研究结果, 推测 HNP 为单一的 (1→3)-β-D-葡聚糖, 平均每三个葡萄糖残基上有一个 O-6 位分支的葡萄糖残基.

由于 HNP 几乎不溶于水, 因此本文对其进行羧甲基化修饰, 得到一种水溶性的羧甲基化虎奶多糖 (CM-HNP), 并对其抗氧化性进行了初步研究.

¹⁾ 通讯联系人.

Tel: (027) 87543532, E-mail: hbxu@email.hust.edu.cn

收稿日期: 1999-07-20, 修回日期: 1999-11-18

1 材料与方法

1.1 试剂

HNP 由本实验室制备; SDS (sodium dodecyl sulfate) 为 Serva 进口分装; DPH (1, 6-diphenyl-1, 3, 5-hexatriene) 为 Sigma 产品; 1, 1', 3, 3'-四乙氧基丙烷 (TEP) 为 Fluka 产品; 硫代巴比妥酸 (TBA) 为上海试剂二厂生化试剂. 其余试剂均为国产分析纯产品.

1.2 仪器

Waters 高效液相色谱仪; Nicolet Impact 420 傅立叶变换红外光谱仪; 日本岛津 RF-540 荧光分光光度计、UV-240 紫外-可见分光光度计; 国产 721 型分光光度计、高速冷冻离心机.

1.3 实验动物

SD 大鼠, 雄性, (200 ± 20) g, 广州军区武汉总医院实验动物中心提供.

1.4 羧甲基化虎奶多糖 (CM-HNP) 的制备

参照文献 [2] 进行, 将 5 g HNP 溶于 250 ml 2.0 mol/L NaOH 溶液中, 剧烈搅拌下加入 25 g 氯乙酸, 于 60 °C 继续剧烈搅拌反应 3 h. 冷却, 冰乙酸中和至 pH 为 7.0, 过滤, 滤液用自来水透析 3 d, 蒸馏水透析 1 d. 浓缩至 50 ml, 加入 4~5 倍 95% 乙醇沉淀出多糖, 依次用无水乙醇、丙酮各洗涤两次, 真空干燥得 CM-HNP 3.8 g. KBr 压片, 测 FT-IR 谱. 在带有 TSK-5000PW 凝胶渗透色谱柱的 Waters 高效液相色谱仪上, 以聚氧化乙烯 (SE-系列) 为分子质量标准, 测定 CM-HNP 的相对分子质量及其分布.

1.5 脂质过氧化产物硫代巴比妥酸复合物 (TBARS) 测定

含 0.6 g/L (蛋白质含量) 的鼠肝线粒体悬液^[3]与不同浓度药物于 37 °C 温育 10 min 后加入 50 μmol/L Vit C 及 25 μmol/L Fe²⁺ (空白组不含引发剂), 用二次水调整总体积至 0.5 ml, 于 37 °C 温育 30 min. TBA 法^[4]测定脂质过氧化产物 TBARS 含量, 以 1, 1', 3, 3'-四乙氧基丙烷 (TEP) 为标准, 以每克蛋白质中 TBARS 的微摩尔数表示 (μmol·g⁻¹).

1.6 线粒体肿胀度测定

含 0.5 g/L (蛋白质含量) 的鼠肝线粒体悬液与不同浓度药物、50 μmol/L Vit C 及 25 μmol/L Fe²⁺ 于 37 °C 恒温水浴条件下观察 30 min 内 520 nm 处 A 值的变化^[5].

1.7 膜流动性的测定

含 1.0 g/L (蛋白质含量) 的鼠肝线粒体悬液与不同浓度的药物 37 °C 温育 10 min 后, 加入 1.5 中相同的引发体系及 1 μmol/L 的 DPH, 37 °C 温育 30 min 后在 361 nm 激发波长, 431 nm 发射波长条件下分别测定偏振器处于平行和垂直时的荧光强度 I_{\parallel} 、 I_{\perp} , 由 I_{\parallel} 与 I_{\perp} 计算荧光偏振度 P , 根据 P 值计算膜的微粘度 η_s , $\eta_s = 2 \times P / (0.46 - P)^{[6]}$.

1.8 CM-HNP 对 O₂ 的清除作用

pH 8.2 Tris-HCl 缓冲体系和不同浓度药物^[7], 于 25 °C 平衡 20 min 后, 立即加入 0.1 mmol/L 邻苯三酚的 10 mmol/L HCl 溶液, 摇匀, 于 25 °C 下, 每隔 30 s 测定 319 nm 处的 A 值, 持续 6 min.

2 结果与讨论

2.1 虎奶多糖经羧甲基化后, 水溶性大大提高. 原 HNP 在水中几乎不溶, 羧甲基化后 CM-HNP 溶解度可达到 30 g/L 以上. 凝胶渗透色谱 (GPC) 结果表明 CM-HNP 呈一单峰, 相对分子质量为 7.9×10^5 , 证明得到的多糖为均一纯品. 红外光谱扫描表明有多糖特征吸收: 3 700~3 000 cm⁻¹ (强宽峰) 由分子内和分子间羟基形成多种方式的氢键所致; 2 893 cm⁻¹ (中) 为 C-H 伸缩振动吸收峰; 1 595 cm⁻¹ (强) 为羧酸盐的 C-O 伸缩振动吸收峰; 1 428 cm⁻¹ (中) 为与羧基相连的次甲基的剪式振动吸收峰. 此外, 在 904 cm⁻¹ 处的吸收则说明多糖以 β-吡喃糖苷键连接.

2.2 Fe²⁺-Vit C 引发的大鼠肝线粒体损伤表现为线粒体的 TBARS 量大大提高, 而 0.4~6.0 g/L 浓度下 CM-HNP 对此具有保护作用, 且有一定的量效关系. 结果见表 1.

表 1 CM-HNP 对 Fe²⁺-Vit C 诱导的肝线粒体脂质过氧化的抑制作用

	空白 ¹⁾	对照 ²⁾	ρ (CM-HNP) / g·L ⁻¹			
			0.4	0.8	1.5	3.0
ρ (TBARS) / μmol·g ⁻¹	1.42	21.46	16.87	14.83	10.91	8.27

¹⁾ 未加入多糖保护剂也未加入损伤剂的正常情况; ²⁾ 没有加入多糖保护剂但加入损伤剂的完全受损情况.

2.3 线粒体氧化损伤后发生肿胀, 表现为其悬液混浊度下降, 在 520 nm 处的吸收值降低. 不同浓度的 CM-HNP 能有效抑制 Fe²⁺-Vit C 引起的线粒

体肿胀, 结果见图 1.

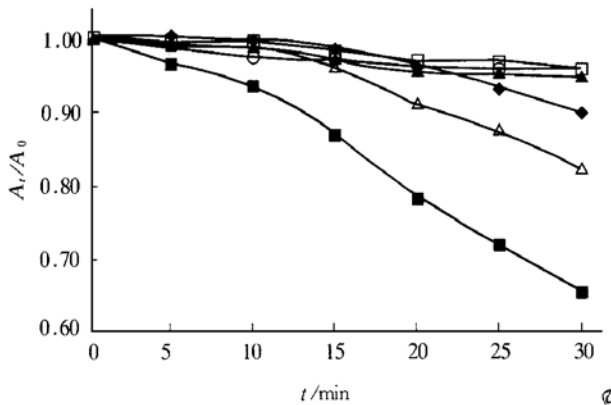


图 1 不同浓度的 CM-HNP 对 Fe^{2+} -Vit C 诱导的肝线粒体肿胀的抑制作用

A_t : t 时刻的 A_{520} ; A_0 : 初始时刻的 A_{520} . ○—○: 空白; ■—■: 对照; △—△: 0.25 g/L; ◆—◆: 0.5 g/L; □—□: 1 g/L; ▲—▲: 2 g/L.

2.4 线粒体膜的流动性对维持线粒体的生物功能具有重要意义, 为膜上受体、离子通道、钙泵等发挥正常功能所必需. 荧光偏振度的大小反映了膜脂区的微粘度, P 值越大, 微粘度越大, 膜的流动性越小. 氧化损伤导致膜的流动性显著降低. 加入不同浓度的 CM-HNP 对氧化损伤导致的线粒体膜流动性降低有明显的抑制作用. 结果见表 2.

表 2 CM-HNP 对 Fe^{2+} -Vit C 诱导的肝线粒体膜流动性降低的抑制作用

	空白	对照	ρ (CM-HNP) / $g \cdot L^{-1}$			
			0.42	0.83	1.67	3.33
微粘度 (η)	0.754	2.208	2.461	1.838	1.245	1.020

2.5 邻苯三酚在碱性条件下迅速发生自氧化链反应, 其反应速度依赖于超氧自由基 $O_2^{\cdot-}$ 的浓度, 并生成有色中间物. 不同浓度的 CM-HNP 能有效清除反应产生的 $O_2^{\cdot-}$ 从而抑制上述反应. 结果见图 2.

2.6 目前对多糖的研究开展较多, 对其抗氧化性的研究近年来亦有不少报道, 但多糖的抗氧化机理仍未能明确. 多糖的抗氧化能力可能与其多羟基结构有关. 因此对生物膜如线粒体膜等, 预先以多糖进行保护, 就可能防止自由基 (如 Fe^{2+} -Vit C 体系产生的 $\cdot OH$) 直接损伤生物膜, 从而起到保护作用.

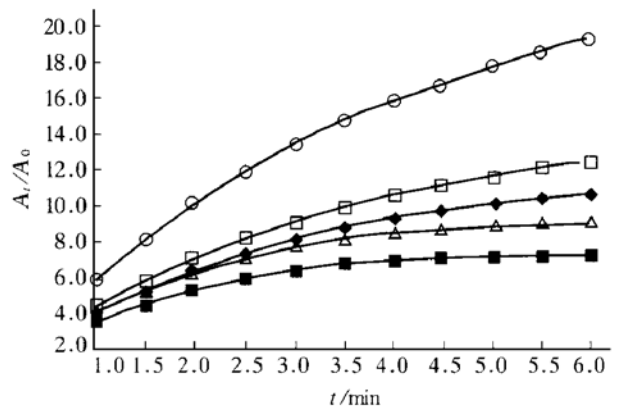


图 2 CM-HNP 对邻苯三酚自氧化的抑制作用

A_t : t 时刻的 A_{319} ; A_0 : 初始时刻的 A_{319} . ○—○: 对照; ■—■: 7 g/L; △—△: 4 g/L; ◆—◆: 1 g/L; □—□: 0.1 g/L.

参 考 文 献

- 1 蔡永敏. 中药药名辞典. 北京: 中国中医药出版社, 1996. 198
- 2 Cai Y M. The Dictionary of Chinese Traditional Herbs. Beijing: Chinese Medicine and Pharmacology Press, 1996. 198
- 3 Ohno N, Kurachi K, Yadomae T. Physicochemical properties and antitumor activities of carboxymethylated derivatives of glucan from sclerotinia sclerotiorum. Chem Pharm Bull, 1988, 36 (3): 1016 ~ 1025
- 4 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术. 北京: 高等教育出版社, 1997. 137~ 138
- 5 Zhang L X, Zhang T F, Li L A. Experimental Methods and Technique in Biochemistry. Beijing: Higher Education Press, 1997. 137~ 138
- 6 向荣, 王鼎年. 过氧化脂质硫代巴比妥酸分光光度法的改进. 生物化学与生物物理进展, 1990, 17 (3): 241~ 242
- 7 Xiang R, Wang D N. Prog Biochem Biophys, 1990, 17 (3): 241~ 242
- 8 Hunter F E, Gebicki J M Jr, Hoffsten P E, et al. Swelling and lysis of rat-liver mitochondria induced by ferrous ions. J Biol Chem, 1963, 238: 828~ 835
- 9 林克椿, 聂松青, 薄惠卿, 等. 用荧光探针 DPH 研究腹水癌细胞膜脂流动性. 生物化学与生物物理进展, 1981, (6): 32 ~ 35
- 10 Lin K C, Nie S Q, Bo H Q, et al. Prog Biochem Biophys, 1981, (6): 32~ 35
- 11 邹国林, 桂兴芬, 钟晓凌, 等. 一种 SOD 的测活方法——邻苯三酚自氧化法的改进. 生物化学与生物物理进展, 1986, (4): 71~ 73
- 12 Zou G L, Gui X F, Zhong X L, et al. Prog Biochem Biophys, 1986, (4): 71~ 73

Preparation of Carboxymethylated Hunai Polysaccharide and Study on Its Antioxidative Activities.

WANG Yan, YANG Xiang-Liang, DENG Cheng-Hua, GU Xiao-Man, ZHOU Jing-Yan, XU Hui-Bi

(*Institute of Materia Medica, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan 430074, China*).

Abstract A water-soluble carboxymethylated derivative (CM-HNP) of Hunai polysaccharide (HNP) from the sclerotia of *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Sing. was prepared by the reaction of HNP with monochloroacetic acid. The antioxidative activities of CM-HNP were also studied. The results showed that CM-HNP can protect liver mitochondria from lipid

peroxidation induced by Fe^{2+} -Vit C including the increase of TBARS contents, the swelling of mitochondria and the decrease of membrane fluidity with a dosage-effect manner. In addition, CM-HNP can effectively scavenge O_2^- generated by the self-oxidation of pyrogallol acid.

Key words Hunai polysaccharide, antioxidation, carboxymethylation

IGF 受体 1 分子上 IGF-1 结合位点的探讨

杜清友 刘宝英 薛沿宁 王会信 丁红梅

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850)

摘要 为了探讨胰岛素样生长因子受体 1 (IGF-R1) 分子上的胰岛素样生长因子 1 (IGF-1) 结合位点, 建立了研究 IGF-1 与 IGF-R1 相互作用的酵母双杂交模型; 利用基因体外定点突变的方法, 构建了 7 种 IGF-R1 突变体; 然后通过报告基因活性的定量分析, 在酵母双杂交模型中检测了 IGF-1 与各种 IGF-R1 突变体之间相互作用的大小, 初步确定了 IGF-R1 分子中 IGF-1 的结合位点, 并且 IGF-R1 分子上 N237、T238 在与 IGF-1 结合中起着重要作用。

关键词 胰岛素样生长因子, IGF 受体, 酵母双杂交系统

学科分类号 R373

胰岛素样生长因子 (IGFs) 是一类多功能的细胞增殖因子, 具有广泛的生物学效应, 在胚胎和个体发育过程中起着重要作用^[1]。IGF-1 是由 70 个氨基酸残基组成的单链多肽, 分子质量在 7.5 ku 左右, 含有 3 个链内二硫键。IGF 通过细胞表面两种类型的 IGF 受体 (IGF-R1, IGF-R2) 发挥生物学作用。IGF-1 与 IGF-R1 相互作用的研究, 对于认识 IGF-1 的分子作用机理和相关药物的研制具有重要意义, 因而引起人们的关注。IGF-1 的空间结构已经清楚, 它与 IGF-R1 结合的位点以及关键氨基酸残基的组成也已确定^[2]。最近, IGF-R1 分子的晶体结构得以阐明^[3], 初步确定胞外区 α 链上的 Cys 富含区即 His223 与 Met274 之间为 IGF-1 的结合区域, 但 IGF-1 的结合位点或者结合区中的关键氨基酸组成还不清楚。

酵母双杂交技术 (yeast two-hybrid system) 是一种直接在细胞内检测蛋白质相互作用的分子遗传学方法, 与以往的各种生化手段比较明显的优势在于, 不必经过繁杂的蛋白质纯化过程, 而且其灵敏

度很高, 从而为研究蛋白质的相互作用提供了很大的方便, 特别是用来确定蛋白质之间相互作用的位点^[4]。酵母双杂交技术已成功地用于分析 IGF-1 与 IGF-R1 的相互作用, 并探讨了 IGF-1 分子上与 IGF-R1 相互作用的位点^[5]。我们曾利用噬菌体表面展示技术推断出 IGF-R1 分子上可能的 IGF-1 结合位点^[6], 在此基础上, 对 IGF-R1 分子中 IGF-1 结合位点的氨基酸定点突变, 获得 IGF-R1 突变体, 在酵母双杂交模型中探讨了 IGF-R1 突变体与 IGF-1 的相互作用, 分析了各个氨基酸残基的作用大小。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒: *E. coli* JM109 为本室保存; 酵母菌 Y153 由 Joslin Diabetes Center 的 Kohjiro Veki 博士惠赠; 酵母表达载体 pGBT9、pACT2 为

Tel: (010) 66933333

收稿日期: 1999-07-22, 修回日期: 1999-11-16