

聚乙二醇大分子化猪血红蛋白对其携氧特性的影响

洪 民 宋文俊 李士云 袁中一 *

(中国科学院上海生物化学研究所 上海 200031)

摘 要 用 PEG 共轭结合猪血红蛋白(pHb)以增大总分子量是延长它在血液循环系统中存留时间的有效方法。作为一种线性的亲水大分子,PEG 对 pHb 的共轭会对它的携氧特性产生显著影响。研究了 pHb 处于不同空间构象(脱氧的 T 构象或氧合的 R 构象),PEG 修饰程度的高低、修饰用 PEG 的分子量的大小、有无别构效应调节剂等不同条件下 PEG 修饰对 pHb 携氧能力的影响。进而又用了 PEG 修饰已经用双(3,5-二溴水杨酸)延胡索酸酯(DBBF)分子内交联的 pHb,考察修饰对这种内交联 pHb 携氧功能的影响。还比较了 4 种不同方法活化的 PEG 衍生物,对 pHb 修饰效率、对修饰产物携氧功能的影响及修饰产物稳定性等。本文认为,DBBF 分子内交联的 pHb,在有别构效应调节剂的存在下,再用 PEG 修饰,可以获得携氧能力好、分子量适宜、四聚体稳定的修饰产物。

关键词 聚乙二醇 猪血红蛋白 血液代用品

中图分类号 R977.8 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)01-0022-05

聚乙二醇(PEG),也叫聚氧乙烷(POE),具有良好的生物相容性。用它共价结合蛋白质后,一般对蛋白质自身的活性影响不大。它可以降低蛋白质的免疫原性,增加蛋白质在体内的稳定性,降低蛋白质在体内的代谢清除率,从而促进蛋白质在临床上的应用。因此,自 1977 年 Davis 首次报道用 PEG 修饰蛋白质的研究工作以来,有关这方面的研究已经在医学和生物工程领域成为热门课题。将无基质血红蛋白与可溶性有机高分子化合物共轭结合,是目前血红蛋白类血液代用品研究的方向之一。已经尝试过的高聚物材料包括右旋糖苷、菊粉、羟乙基淀粉、聚乙烯吡咯烷酮等^[1]。PEG 大分子化猪血红蛋白(pHb)是延长其在循环系统中的存留时间、降低免疫原性、减少肾脏毒性的有效办法。PEG 修饰一般都会使 pHb 携氧能力下降,具体的影响程度随修饰反应特性的影响,以寻找一种既可以维持 pHb 四聚体空间构象,增大它的分子量,又可以保持其氧结合特性的修饰方案。

1 材料与方 法

1.1 材 料

六磷酸肌醇(IHP)、吡哆醛-5-磷酸(PLP)、双(3,5-二溴水杨酸)延胡索酸酯(DBBF)和各种分子

量 PEG 及 mPEG 为 Sigma 公司产品。荧光胺为 Fluka 公司产品。新鲜猪血采自上海龙华肉联厂。其余试剂为国产分析纯。

1.2 方 法

1.2.1 无基质 pHb 的制备:按 Cheung 方法制备^[2]红细胞于低渗缓冲液溶血释放血红蛋白后,分别以超速离心、DEAE 纤维素吸附等步骤去除膜碎片等基质,于 -80℃ 低温冰箱保存。

1.2.2 氧解离曲线(又称氧结合曲线)、半饱和氧分压(P_{50})、希尔系数(Hill coefficients, n)的测定:按参考文献^[3]的方法用分光光度法测定。测定在 37℃,pH7.4 磷酸钠缓冲液中进行,pHb 的浓度为 0.02mmol/L。

1.2.3 pHb 和高铁 pHb 含量测定:分别按参考文献^[4]和参考文献^[5]方法以分光光度法测定。

1.2.4 PEG 的活化:分别用 4 种不同方法活化 PEG 所得的 PEG 衍生物结构如图 1)。BSS-PEG 的制备,按 Abuchowski^[6]方法制备,此法活化的 BSS-PEG 及 SS-MPEG 具有活化收率高,反应活性高以及修饰后蛋白质活力保留好等优点,近年来已成为流行的活化方法;EPO-PEG 的制备,按 Head^[7]法;NPC-PEG 的制备,按 Sartore^[8]等方法;SUGLY-PEG 的制备,将 NPC-PEG 与甘氨酸反应,所得产物

收稿日期:1998-10-08,修回日期:1999-06-28。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39880006)。

* 联系人。Tel (021) 64374430; Fax (021) 64338357; E-mail zhongyi@micro.jl.ac.cn 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

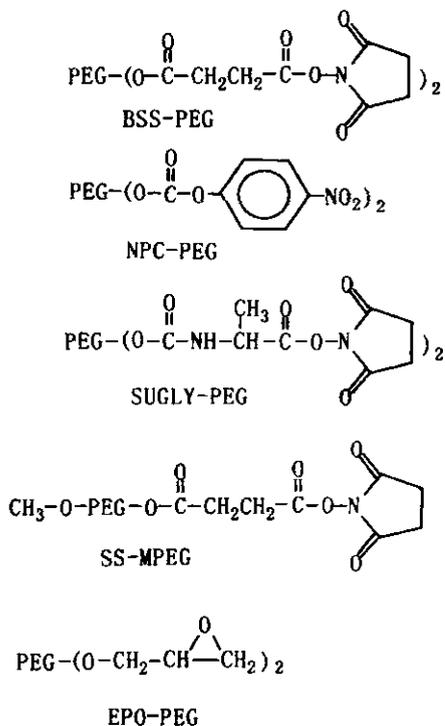


图1 不同活化 PEG 和 MPEG 衍生物的结构

Fig.1 Structures of various active PEG and MPEG derivatives

再在 DCCI 的作用下,与 N-羟基琥珀酸亚胺缩合即得。

1.2.5 pHb 的分子内交联:按 Chatterjee^[9]方法用 DBBF 交联。内交联 pHb 在本文中记为 pHbX。

1.2.6 pHbX 的分离纯化:DEAE-Sepharose 柱以 pH 8.0 的 0.1mol/L 甘氨酸缓冲液平衡,上样后以 0.04mol/L NaCl 溶液洗脱。先洗脱下来的峰为未修饰 pHb,后洗脱下来的峰为 pHbX。

1.2.7 PEG 对 pHb 的修饰:按 Xue 等^[10]方法进行。4℃下,0.25mmol/L pHb(或 pHbX)与 EPO-PEG 反应在 pH 8.5,0.2mol/L 磷酸钠缓冲液中进行,与其它活化 PEG 衍生物的反应在 pH 7.2,0.2mol/L 磷酸钠缓冲液中进行。

1.2.8 PEG-pHb 分子量的测定:用 Protein-Pak 300sw 凝胶过滤柱在 Gilson 714 HPLC 上测定 PEG-pHb 的分子量。平衡及洗脱液为 0.5mol/L Tris-HCl 缓冲液(含 0.1mol/L KCl, pH 7.5),流速:0.75mL/min。

1.2.9 PEG 对 pHb 修饰程度的测定:用荧光胺法测定^[11]。用 pH8.0 的磷酸缓冲液配制一系列 pHb 及 PEG-pHb 溶液,使蛋白质含量在 0~2.5μg 范围内,总体积为 1.5mL 在快速混匀下加入 0.5mL 荧光胺的丙酮溶液(0.3mg/L)。放置 7min 后测定荧

光强度。激发波长 390nm,发射波长 475nm。再以作图法求出修饰程度。

2 结果

2.1 别构效应调节剂对 pHb 氧结合特性的影响

血红蛋白的氧亲和力高低一般用 P_{50} 指标衡量,可以从氧解离曲线查得。 P_{50} 数值越大,表明血红蛋白的氧亲和力越低。氧亲和力降低对血红蛋白在高氧分压组织(肺部)结合 O_2 并无明显影响,但氧合血红蛋白流经低氧分压的组织时会更容易释放出 O_2 以满足组织需要。离开红细胞的血红蛋白失去了 2,3-二磷酸甘油酸(2,3-DPG)的别构效应调节作用,氧亲和力明显增加。在 1.0mmol/L 的 pHb 溶液中分别加入 5.0mmol/L PLP 和 IHP 来模拟红细胞内 2,3-DPG 的作用。 P_{50} 从高到低依次是 pHb (IHP) > pHb(PLP) > pHb(图 2)。表明 IHP 和 PLP 都对 pHb 有很好的别构调节作用,都可以降低 pHb 的氧亲和力,相应地增加 pHb 的递氧能力。其中 IHP 对 pHb 的调节作用更强。在 P_{50} 值一定的情况下,希尔系数越大,血红蛋白向组织递氧的能力也越强。希尔系数可以由希尔作图法求出(图 3 中直线的斜率便是)。可以看出,PLP 和 IHP 对 pHb 的希尔系数影响不大。

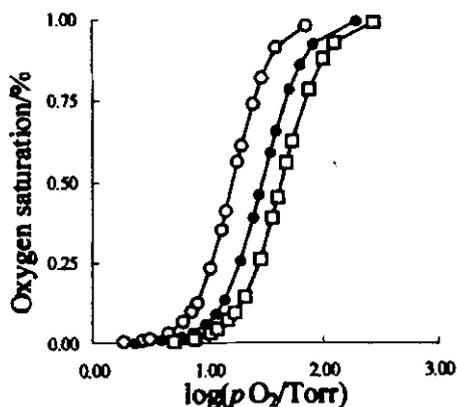


图2 不同别构效应调节剂对猪血红蛋白氧解离曲线的影响

Fig.2 Influence of various allosteric cofactors on oxygen dissociation curve of pHb (○)pHb;(●)pHb(PLP);(□)pHb(IHP)

2.2 PEG 修饰无基质 pHb

分别用 BSS-PEG 修饰处于氧合构象和脱氧构象的 pHb,在 BSS-PEG 活性酯与 pHb 的比例相同的情况下(图 4),修饰时 pHb 为 T 状态的产物 pHb (a)-PEG 的 P_{50} 和希尔系数都大于修饰时 pHb 为 R

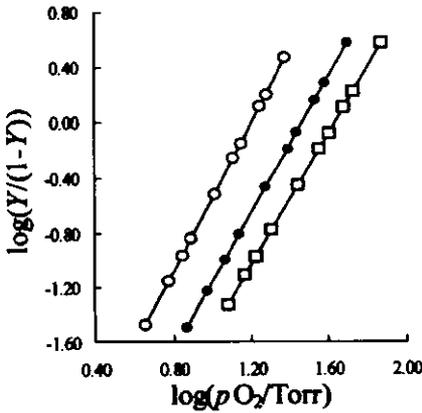


图 3 不同别构效应调节剂对希尔系数的影响

Fig.3 Influence of various allosteric cofactors on Hill plots of pHb
Y Represents oxygen saturation
(○)pHb; (●)pHb(PLP); (□)pHb(IHP)

状态的产物 pHb(b)-PEG 的相应指标,说明用 PEG 修饰处在 T 状态的 pHb 对提高其输氧能力更有利。另外,从图 4 还可以看出,不论 pHb 在修饰时处在 T 状态还是 R 状态,随着 PEG 修饰程度的增大,其 P_{50} 和希尔系数都显著下降,表明这时候它们的氧亲和力都上升了。

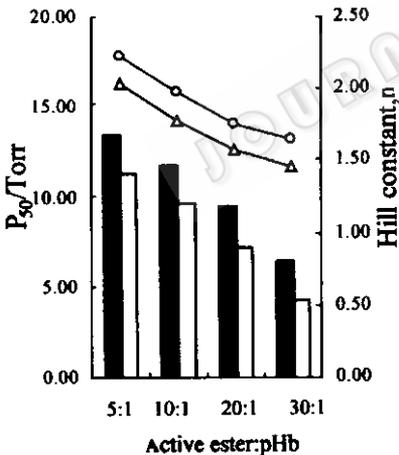


图 4 修饰时 pHb 处于脱氧状态或氧合状态时形成的 pHb-PEG 衍生物各自的携氧特性

Fig.4 Oxygen-carrying properties of pHb-PEG conjugates while pHb is modified in deoxy-state (T state) and oxy-state (R state)
(■) $P_{50}(T)$; (□) $P_{50}(R)$; (○) $n(T)$; (△) $n(R)$

2.3 反应混合物中有别构效应调节剂存在时 BSS-PEG 对 pHb 的修饰

用 BSS-PEG 修饰 pHb 会引起氧亲和力上升,这不利于提高 pHb 对 O_2 输送能力。在 IHP 存在的

情况下,用 PEG 修饰处在脱氧构象的 pHb,经纯化除去 IHP 后,再来考察修饰后 pHb 的氧结合特性。存在别构效应调节剂的情况下,BSS-PEG 修饰对 pHb 的氧亲和力影响大为减小(图 5)。但在 BSS-PEG 活性酯与 pHb 的比例达到 30:1 的情况下,氧亲和力仍有明显上升。说明 PEG 对 pHb 的修饰程度不宜过高,以免影响其向组织递氧能力。

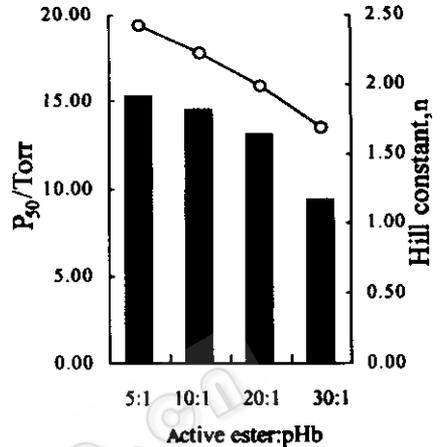


图 5 反应混合物中的肌醇六磷酸对 PEG-pHb 携氧特性的影响

Fig.5 The effect of IHP on oxygen-carrying properties of PEG-pHb(modified at T state)
(■) $P_{50}(T)$; (○) $n(R)$

2.4 BSS-PEG 和 SS-MPEG 对 DBBF 分子内交联猪血红蛋白(pHbX)的修饰

用 DBBF 分子内交联 pHb 之后,产物 pHbX 既有稳定的四聚体结构,不易解聚为二聚体, P_{50} 高达 33.8 Torr,具有很好的携氧特性。在 IHP 存在下,修饰反应过程中 pHb 处于 T 状态,BSS-PEG 和 SS-MPEG 活性酯含量与 pHbX 的比例定在 20:1,比较不同分子量 PEG 修饰对 pHbX 的修饰。可以看出,在其它条件一定的情况下,用于修饰 PEG 分子量越大,修饰后 pHb 的 P_{50} 和希尔系数越小,也即氧亲和力越大(表 1)。用 HPLC 凝胶过滤法测得的是 PEG-pHbX 的平均分子量,据此可以求得每个 pHbX 分子平均结合的 PEG 分子个数。总的看来,小分子量的 PEG 衍生物修饰效率略高些,而大分子量 PEG 衍生物对 pHbX 的氧亲和力影响更大,这可能与大分子量 PEG 的空间效应有关。从增大 pHbX 总分子量的角度来看,大分子量的 PEG 更有利,但考虑到携氧特性,则小分子量 PEG 更好。如表 1,分子量 4600 的 BS-PEG 修饰产物既保持了较高的 P_{50} (24.43Torr),又有较大的分子量(107kD),是一

表 1 PEG-pHbX 轭合物的性质

Table 1 Characteristics of the PEG-pHbX conjugates

Various PEG*	P ₅₀ /Torr	Hill coefficient n	Average MW	Attached PEG number
M2000	20.88	1.87	66.9	12.0
M5000	19.14	2.05	126	12.3
2000	27.36	1.81	81.3	8.39
3000	25.82	1.88	93.3	9.60
4600	24.43	1.93	107	9.27
6000	21.17	1.91	118	8.92
8000	20.68	1.72	1.32	8.42
12000	19.35	1.47	155	7.53

* pHb modified with BSS-PEG and SS-MPECO (active ester: pHb = 20:1)

种较理想的修饰方案。

2.5 不同活化 PEG 对 pHb 修饰

合成了 4 种 PEG 活性衍生物: EPO-PEG、NPC-PEG、BSSPEG 和 SUGLY-PEG, 并分别用于修饰内交联 pHb。结果如表 2, 合成 EPO-PEG 方法简便, 只需一步反应, 但合成收率低, 而且它修饰能力差, 修饰 pHb 所需反应时间较长(约 4 h)。NPC-PEG 合成简便, 也只需一步反应, 修饰效率较高, 但修饰使 pHb 氧亲和力增加较大。BSS-PEG 活化效率高, 修饰效率也高, 对氧亲和力改变不大, 是一种较理想

表 2 不同方法活化的 PEG 衍生物对内交联猪血红蛋白的修饰

Table 2 Various active PEG derivatives modified pHbX

	NPC-PEG	BSS-PEG	EPO-PEG	SUGLY-PEG
Synthetic product ratio/%	80	94	53	65
P ₅₀ /Torr	21.18	24.43	26.55	25.12
Hill coefficients n	1.82	1.93	2.02	1.97
Average MW	97	107	93	105
pH in reaction	7.2	7.2	8.5	7.2
Reactive time/min	40	30	240	30
Modification ratio/%	35	42	26	39

的活化 PEG 衍生物, 只是该分子中存在一个不很稳定的酯键(见图 1), 在生理条件下缓慢水解断键, 使已修饰上的 PEG 离去, 会增加实验的不可预知性。而另 3 种 PEG 衍生物都不会发生这种键的断裂, 这是它不利的一面。SUGLY-PEG 修饰效率高, 对 pHb 氧亲和力影响也不大, 且也不存在易于断裂的酯键, 是这几种 PEG 衍生物中最好的一种。不过, SUGLY-PEG 的合成反应步骤较多, 使合成 SUGLY-PEG 的最终收率不高, 这是它的缺点。

3 讨论

常规输血存在一些难以克服的困难, 如来源紧张、储存期短, 可能传播乙肝和 AIDS 等血源性疾病等。因此, 有必要研制一种安全有效的血液代用品。以血红蛋白为基础的血液代用品能体内代谢, 具有与天然红细胞类似的 S 形氧解离曲线等因素, 已成为血液代用品研究的主方向。

1967 年 Rabiner^[12] 等的实验证明裂解红细胞的毒副作用主要来自红细胞的基质部分, 并首次用无基质血红蛋白溶液给动物换血。然而, 去除了基质的血红蛋白仍有些缺陷, 主要是氧亲和力过高和在循环系统中的存留时间过短。近 20 年来, 人们用化学修饰来尝试解决这些问题。PEG 共轭结合血红蛋白既可以降低血红蛋白免疫原性, 又可以延长血红蛋白在循环系统中的存留时间。遗憾的是, PEG 修饰会引起血红蛋白的氧亲和力增高。好在已发现多种化合物修饰血红蛋白能降低其氧亲和力, 如 PLP^[13]、NFPLP^[14]、DBBF^[15] 等。DBBF 的优点是既可以分子内交联血红蛋白亚基, 抑制四聚体解聚, 又可以降低血红蛋白氧亲和力^[16]。但这种修饰没有增大总分子量, 在血液循环系统中的存留时间较短。因此, 我们考虑将两种修饰方法结合起来, 取长补短。通过考察, 认为选择分子量约 4600 的 PEG 以适当方法活化, 在 IHP 参与下, 活性成分与 pHb 定在 20:1, 修饰处在 T 状态的 pHb, 可以获得分子量适宜、氧亲和力接近天然红细胞、四聚体稳定的 PEG-pHb 轭合物。

参 考 文 献

[1] Harris J M, Poly(Ethene Glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications, Plenum, NY, 1992

[2] Cheung L C, Storm C B, Gabriel B W et al. Anal Biochem, 1984, 137: 481~484

[3] Grardina G, Amiconi G. Method in Enzymology, 1981, 76: 417~427

[4] Assendeff O W V, Spectrophotometry of Haemoglobin Derivatives, Assen: Royal Vangorcum Ltd., 1970

[5] Evelyn K A, Malloy H T. J Biol Chem, 1938, 126: 655~662

- [6] Abuchowski A ,Kazo G M ,Verhoest C R *et al.* *Cancer Biochem Biophys* ,1984 **7** :175~186
- [7] Head D M ,Andrews B A ,Asenjo J A. *Biotechnol Tech* ,1989 **3** :27~32
- [8] Sartore L ,Caliceti P ,Schiavon O *et al.* *Appl Biochem Biotechnol* ,1991 **27** :45~54
- [9] Chatterjee R ,Welty E V ,Walder R Y *et al.* *J Biol Chem* . 1986 **261** :9929~9937
- [10] Xue H , Wong J T F. *Methods in Enzymology* ,1994 **231** :309~323
- [11] Stocks S J ,Jones A J M ,Ramey C W *et al.* *Anal Biochem* ,1986 **154** :232~234
- [12] Rabiner S F ,Helbert J R ,Opas H L *et al.* *J Exp Med* ,1967 **126** :1127~1142
- [13] Benesch R E ,Benesch R ,Rethal R D *et al.* *Biochem* ,1972 **11** :3576~3582
- [14] Benesch R ,Benesch R E ,Yung S *et al.* *Biochem Biophys Res Comm* ,1975 **63** :1123~1129
- [15] Vandegriff K D ,Medina F ,Marini M A *et al.* *J Biol Chem* ,1989 **264** :17824~17827
- [16] Mondoro T H ,Alayash A I ,Ryan B A *et al.* *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* ,1998 **26** :1~16

The Influence on Oxygen-carrying Capacity of Porcine Hemoglobin while Attached PEG to Increase its Total Molecular Weight

HONG Min SONG Wen-jun LI Shi-yun YUAN Zhong-yi

(Shanghai Institute of Biochemistry ,The Chinese Academy of Science ,Shanghai 200031)

Abstract Increasing the total molecular weight of hemoglobin through PEG modification has been proved to be a better choice in prolonging vascular retention time. As a long ,linear ,hydrophilic molecular ,PEG exerts significant influence on the oxygen-carrying properties of porcine hemoglobin (pHb) when attached. PEG-hemoglobins exhibit a wide range of differences in their properties depending on which molecular weight PEG is selected ,how many PEGs are bound and whether the allosteric cofactors exist or not. Furthermore ,DBBF intracross-linked pHbs are bound to various active PEG. As a result ,with the combination of the three methods :DBBF intracross-linking ,allosteric cofactors involving and PEG conjugating a tetramer stable and high oxygen-carrying capacity pHb derivative with large molecular weight is obtained.

Key words PEG ,porcine hemoglobin ,blood substitutes