

氨基酸修饰大孔吸附树脂 NK-110 对肿瘤坏死因子吸附性能的研究

魏佼 俞耀庭* 孔德领

(南开大学生物活性材料教育部重点实验室 天津 300071)

摘 要 应用医用吸附剂直接吸附血浆中的 $\text{TNF}\alpha$ 是一种高效的分离方法。选用 8 种不同结构和性质的氨基酸修饰大孔吸附树脂 NK-110, 通过对 $\text{TNF}\alpha$ 吸附量的测定, 吸附动力学曲线和吸附等温线的描述等方法, 研究了经修饰后大孔吸附树脂对血浆中 $\text{TNF}\alpha$ 的吸附性能。结果表明: 1. 半胱氨酸修饰的 NK-110 对 $\text{TNF}\alpha$ 的吸附量高, 静态吸附 120min 时达 7683.80u/mL。2. 其吸附动力学曲线表明, 经半胱氨酸修饰后, 相同时间内吸附量更高, 且二者吸附量有差别 ($P < 0.01$)。3. 由吸附等温线可见 NK-110 对血浆中 $\text{TNF}\alpha$ 的吸附量随着溶液浓度的升高而升高, 但其吸附率随之呈降低趋势。经半胱氨酸修饰后, 其吸附量随着 $\text{TNF}\alpha$ 浓度的升高而升高, 吸附率基本不变。

关键词 氨基酸 NK-110, 肿瘤坏死因子, 吸附

中图分类号 O647 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)04-0432-04

肿瘤坏死因子 (α Tumor Necrosis Factor α) ($\text{TNF}\alpha$) 是由人体内巨噬细胞和活化 T 细胞等产生的一种细胞因子^[1], 其作为一种炎症介质, 对人体的作用具有双重性。适量的 $\text{TNF}\alpha$ 对机体呈现保护性反应。正常情况下, 血浆中有较低水平的 $\text{TNF}\alpha$ 存在, 这时维持机体内环境的稳定及组织的更新、改建, 都起着重要的调节作用^[2]。但另一方面, 过量的 $\text{TNF}\alpha$ 对机体产生不利的作用: 1. $\text{TNF}\alpha$ 是内毒素血症和感染性休克发病机理中主要的致病介质, 它的释放早于其他细胞因子, 对革兰氏阴性菌诱发的内毒素休克起了重要的内分泌调节作用^[3]。 $\text{TNF}\alpha$ 可引起心血管功能紊乱, 心输出量降低, 肝脏损害, 甚至引起弥漫性血管凝血, 多器官功能衰竭等。2. 高浓度 $\text{TNF}\alpha$ 与肿瘤患者的食欲减退、进行性消瘦、氮平衡失调等恶液质综合征的表现密切相关^[4,5]。

目前认为, 肿瘤坏死因子 α 及其它一系列炎症介质共同介导了内毒素休克时的多器官疾病生理改变, 且 $\text{TNF}\alpha$ 在其发病过程中所起的主导作用^[6,7]。已有一些实验证据表明, 具有中和作用的抗 $\text{TNF}\alpha$ 单克隆抗体能够预防和治疗因 $\text{TNF}\alpha$ 过量产生而导致的炎症等疾病状态^[8]。本文通过选择特定的吸附剂直接吸附血浆中的 $\text{TNF}\alpha$, 使其浓度迅速降低, 设法阻断 $\text{TNF}\alpha$ 在致病过程中的作用环节。而早期降低 $\text{TNF}\alpha$ 活性亦能减少其它细胞因子的释

放, 这样既减少了 $\text{TNF}\alpha$ 本身的直接作用; 又减弱了由其激活介质所产生的继发性效应, 从而达到阻断或减弱致病介质发挥作用的目的。本实验研究了 8 种氨基酸修饰的 NK-110 对血浆中 $\text{TNF}\alpha$ 的吸附性能, 为深入研究适用于全血灌流的高效 $\text{TNF}\alpha$ 亲和吸附剂提供了理论依据。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

NK-110(南开大学分子生物学研究所); 甘氨酸、L-组氨酸(第二军医大学政翔化学试剂研究室); L-异亮氨酸(中国科学院上海生物化学研究所); L-半胱氨酸(上海草场第二中学化工厂); 重组人肿瘤坏死因子(北京邦定泰克生物技术公司(10u = 1ng)); 人新鲜冰冻血浆(天津市血液中心); 夹心法 ELISA 检测 $\text{TNF}\alpha$ 检测盒(北京邦定泰克生物技术公司); TNZ-82 型恒温振荡器(上海跃进医疗器械一厂); 酶标仪(Σ -960)。

1.2 氨基酸修饰 NK-110 的制备

NK-110 树脂用 95% 乙醇充分浸泡后, 蒸馏水反复洗涤, 去除杂质。尽量吸干水分, 加入饱和浓度的 8 种氨基酸(Gly, Glu, His, Trp, Phe, Leu, Ile, Cys)溶液, 室温振荡吸附 20h, 以结合不同的氨基酸配体, 制得氨基酸系列吸附剂。再用蒸馏水反复洗去残留

氨基酸,然后用生理盐水平衡。

1.3 氨基酸修饰量的测定

取所制得的氨基酸系列吸附剂各 1mL,烘干水分,加入 0.5% 茚三酮-乙醇溶液 5mL,100℃ 15min,570nm 可见分光光度计比色。

1.4 静态吸附量和吸附率的测定

准确量取 1.0mL 生理盐水平衡的氨基酸修饰 NK-110 树脂,尽量吸干水分,加入 3000u/mL 浓度的 TNFα 血浆,于 37℃ 恒温振荡至吸附平衡,夹心法 ELISA 检测吸附前后的 TNFα 浓度^[9]。按下式计算树脂的吸附量和吸附率:

$$Q = \frac{(C_0 - C_e) \times V_1}{V_2} \quad E\% = \frac{(C_0 - C_e)}{C_0} \times 100\%$$

式中:Q-吸附量;C₀-起始浓度;C_e 平衡浓度;V₁-溶液体积;V₂-树脂体积;E%-吸附率

1.5 静态吸附动力学

量取 1mL 湿树脂,加入 3mL 的 TNFα(3000u/mL) 血浆,于 37℃ 恒温振荡,分别于吸附 15、30、60、120、180、240min 取样,夹心法 ELISA 试剂盒检测体系的 TNFα 浓度。

1.6 吸附等温线

配制 3000u/mL,2500u/mL,2000u/mL,1500u/mL,1000u/mL 5 种浓度的 TNFα 血浆,在 37℃ 进行吸附

实验,测定 TNFα 的吸附量。

2 结果与讨论

2.1 不同氨基酸修饰对 NK-110 吸附性能的影响

选用 8 种不同结构和性质的氨基酸修饰 NK-110 树脂,经静态吸附实验,比较吸附量和吸附率的大小(图 1)。8 种吸附剂均有不同的吸附功效(图 1)。经单因素方差分析,8 者吸附量有差别(P < 0.01),其中以半胱氨酸修饰的 NK-110 吸附量最高,达 7683.80u/mL,吸附率为 85.38%。氨基酸的性质^[10]、固定量、对吸附性能的影响见表 1。

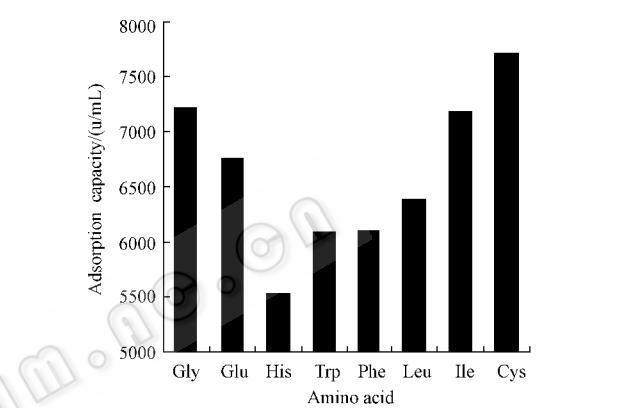


图 1 氨基酸修饰 NK-110 对肿瘤坏死因子的吸附作用
Fig.1 Adsorption of TNF by amino acid modified NK-110

表 1 氨基酸的特性和固定量对吸附能力的影响													
Table 1 Effect of character and quantity of amino acid immobilized on adsorption capacity													
Amino acid	Molecular weight	Character		R-group charge	Solubility/ (g/100mL)	pK			PI	Immobile quantity (μg/mL)	Adsorption Capacity (u/mL)	E%	
						COOH	NH ₂	R-group					
Gly	75	hydrop	hilic	polar	0	25	2.35	9.78	—	6.06	149.86	7189.84	79.89
Glu	147	hydrop	hilic	acidic	—	0.86	2.1	9.47	4.07	3.08	149.53	6743.67	74.92
His	155	hydrop	hilic	alkaline	+	4.16	1.8	9.33	6.04	7.64	151.78	5524.25	61.38
Trp	204	hydrop	hobic	non-polar	0	1.14	2.46	9.41	—	5.88	156.21	6070.44	67.45
Phe	165	hydrop	hobic	non-polar	0	2.96	2.2	9.31	—	5.76	154.81	6085.10	67.61
Leu	131	hydrop	hobic	non-polar	0	2.43	2.33	9.74	—	6.04	151.49	6383.03	70.92
Ile	131	hydrop	hobic	non-polar	0	4.12	2.32	9.76	—	6.04	152.77	7148.16	79.42
Cys	121	hydrop	hilic	polar	0	easy	1.92	10.7	8.37	5.15	624.54	7683.80	85.38

经多因素相关分析,表明其吸附量的差异与 pKa-NH₂ 呈正相关,相关系数 0.825(P < 0.05),与氨基酸其它特性及固定量无明显相关性(P > 0.05)。从解离公式可知^[11],pK₂(pKa-NH₂)表示 H₃⁺N-CH₂-COO⁻和 H₃⁺N-CH₂-COOH 的摩尔浓度相等,即[R⁻] = [R⁰]。如果利用 Handerson-Hasselbalch 公式:pH = pK + lg^[质子受体]^[质子供体],以及 pK₁¹和 pK₂¹,即可计算出在 pH = 7.4 条件下此 8 种氨基酸的各种离子的比例。此 8 种氨基酸 H₂N-CH₂-COO⁻和 H₃⁺N-CH₂-COO⁻的

比例分别为 0.004169(Gly)0.008511(Glu)0.011749(His),0.009772(Trp),0.012303(Phe),0.004571(Leu)0.004365(Ile)0.000501(Cys)。经相关分析,此比例与吸附量呈负相关,相关系数为 -0.88(P < 0.01)。由此可知,在体液 pH 值条件下,H₂N-CH₂-COO⁻离子数相对越少,越有利于吸附。

2.2 静态吸附动力学

经静态吸附筛选,可见 Cys 修饰 NK-110 吸附效果最好,故进一步研究其吸附特性。半胱氨酸修饰 NK-110 的静态吸附动力学曲线反映了 TNFα 的吸附

量随时间的变化关系(图2)。

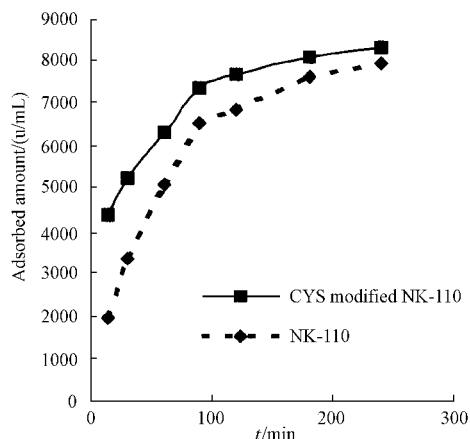


图2 吸附时间对吸附量的影响

Fig.2 Change of amount adsorbed with time

从图中可见,经半胱氨酸修饰的 NK-110 与未修饰 NK-110 大孔树脂相比,二者的吸附动力学曲线相似。但经半胱氨酸修饰后,相同时间内吸附量更高,其静态吸附率可在 60min 之内达到 70.19% (6317.45u/mL gel),在 120min 时,已达到 85.38% (7683.80u/mL gel),在 240min 时为 92.24% (8301.71u/mL gel)。而未经 Cys 修饰的 NK-110 吸附量与吸附率分别为 56.59% (5093.03u/mL gel), 76.53% (6888.02u/mL gel) 88.40% (7956.12u/mL gel)。

经单因素方差分析,二者吸附量有差别 ($P < 0.01$)。吸附剂的化学组成及其表面性质对吸附作用的影响很大。即使同一类吸附剂,当其比表面积、孔结构、后处理条件不同时,吸附能力也可能有很大差异。而且还要考虑到吸附剂表面基团与吸附质相互作用的性质。NK-110 为非极性树脂,比表面积 $450 \sim 500 \text{ m}^2/\text{g}$,平均孔径 160 \AA 。比较其吸附量和吸附率的差异,可能与半胱氨酸的结构特征及 $\text{TNF}\alpha$ 的性质有关。半胱氨酸是含硫氨基酸, R 基中的巯基 (-SH) 呈极性。文献报道,在体内 TNF 发挥生物学效应必须先与靶细胞上的 TNF 受体相结合,二者具有较高的亲和力,其亲和常数约为 3×10^{-9} 。然而, TNF 受体的胞外结构区是由 4 个富含半胱氨酸的功能区组成^[12],此功能区的结构为 Cys- $\times-\times-\text{Cys}-\times-\times-\text{Cys}$,说明半胱氨酸在 TNF 与其受体的结合中可能发挥着重要作用。这表明,用半胱氨酸修饰 NK-110 树脂亦可提高其对血浆中 $\text{TNF}\alpha$ 的吸附量。

2.3 吸附等温线

一系列浓度的 $\text{TNF}\alpha$ 血浆,在 37°C 进行静态吸附,以吸附量对溶液平衡浓度作图,得吸附等温线

(图3)。

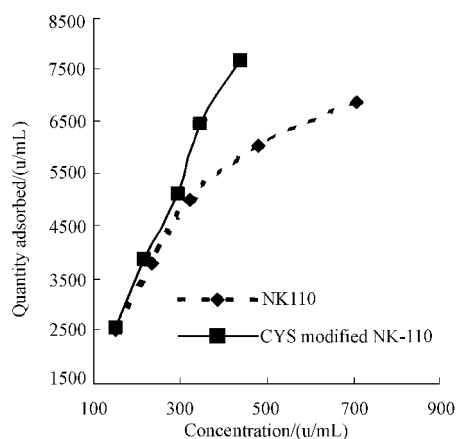


图3 吸附等温线

Fig.3 Adsorption isotherm

由图3、4可见, NK-110 对血浆中 $\text{TNF}\alpha$ 的吸附量随着溶液浓度的升高而升高,但其吸附率随之呈降低趋势。经半胱氨酸修饰后,其吸附量随着 $\text{TNF}\alpha$ 浓度的升高而升高,吸附率基本不变。

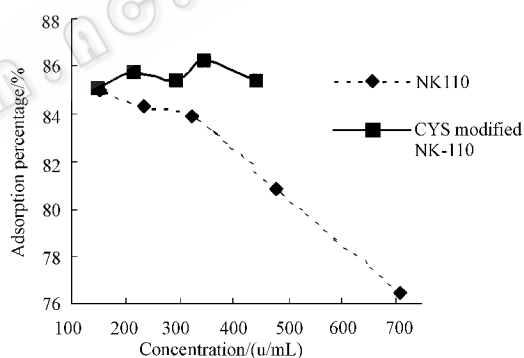


图4 浓度对吸附率的影响

Fig.4 Change of adsorption percentage with concentration

对于固-液吸附过程,由于真实液体体系的非理想性,一直缺乏合理的模型描述平衡,对平衡模型的研究主要是沿用气-固吸附过程的一些表达式。在稀溶液吸附平衡的研究中,由于稀溶液更接近理想状态,人们应用较多的平衡方程是 Langmuir 方程,该方程是基于均一表面单层吸附这一假设的^[13]。其一般形式为:

$$q^* = \frac{q_m c}{K_d + c} \text{ 或 } q^* = \frac{q_m K_b c}{1 + K_b c}$$

式中: q_m 为饱和吸附容量, K_d 为吸附平衡的解离常数, K_b 为结合常数。根据 Giles^[14] 等的等温线分类,二者的吸附等温线形态均呈“L”型,表示在溶液中 $\text{TNF}\alpha$ 比溶剂分子更易被吸附,即溶剂没有强烈的竞争吸附能力。但经半胱氨酸修饰后,其起始部分斜率大于 NK-110,表明溶剂分子对 $\text{TNF}\alpha$ 的竞

争吸附更小。当平衡浓度增大时,半胱氨酸修饰的 NK-110 吸附等温线有一较快的上升阶段,这可能是由于被吸附的 $\text{TNF}\alpha$ 分子对液相中的 $\text{TNF}\alpha$ 吸引作用,或吸附分子形成更紧密的排列也可能有多层吸附的发生。

3 小 结

本文选用了 8 种不同结构和性质的氨基酸修饰大孔吸附树脂 NK-110 吸附血浆中的 $\text{TNF}\alpha$,通过树脂的筛选、静态吸附动力学曲线和吸附等温线的描述,结果表明经半胱氨酸修饰后 NK-110 树脂对血浆中的 $\text{TNF}\alpha$ 具有良好的吸附能力。虽然经 Cys 修饰后的 NK-110 不易再生,较难重复使用,但本实验所得规律为深入研究 $\text{TNF}\alpha$ 亲和吸附剂的配基,提供了依据。且本文采用物理吸附方法进行修饰,操作简便,条件温和,而且载体与配基之间不发生化学反应,配基的结构和活性改变较小,有一定的理论意义,为进一步研制新型的、高特异性和高吸附量的 $\text{TNF}\alpha$ 吸附剂提供了理论依据。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Xuan D ,Nicolau D P ,Nightingale C H *et al* . Circulating tumor necrosis factor- α production during the progression of rat endotoxic sepsis. *Chemotherapy* ,2001 **47** (3) :194 ~ 202
- [2] Jean E M .Tumor necrosis factor α ,interleukin 1 and related cytokines in brain development :normal and pathological. *Dev Neuro* . 1992 **14** :1 ~ 10
- [3] Aguillon J C ,Escobar A ,Ferreira V *et al* . Daily production of human

- tumor necrosis factor in lipopolysaccharide(LPS)-stimulated *ex vivo* blood culture assays. *Eur Cytokine Netw* ,2001 **12** (1) :105 ~ 110
- [4] Hei D J ,Elkalay M A ,Lin A T T *et al* . Removal of cytokines from HAS-containing solutions by adsorption onto silica. *Biotechnology and Bioengineering* ,1994 **44** (9) :1023 ~ 1030
- [5] Nagaki M ,Hughes R D ,Keane H M *et al* . *In vitro* plasma perfusion through adsorbents and plasma ultrafiltration to remove endotoxin and cytokines. *Circulatory Shock* ,1992 **38** :182 ~ 188
- [6] Tetta C ,Cavaillon J M ,Camussi G *et al* . Continuous plasma filtration coupled with sorbents. *Kidney International* ,1998 **53** :s-186 ~ s-189
- [7] Akassoglou K ,Probert L ,Kontogeorgos G *et al* . Astrocyte-specific but not neuron-specific transmembrane TNF triggers inflammation and degeneration in the central neurons system of transgenic mice. *The Journal of Immunology* ,1997 **158** :438 ~ 445 .
- [8] Abraham E ,Wunderink R ,Silverman H *et al* . Efficacy and safety of monoclonal antibody to human tumor necrosis factor α in patients with sepsis syndrome : A randomized ,controlled ,double-blind ,multicenter clinical trial. *JAMA* ,1995 **273** :934 ~ 941
- [9] Borman C S C ,Olden R W V ,Stoutenbeek C P ,Cytokine filtration and adsorption during pre- and postdilution hemofiltration in four different membranes. *Blood Purification* ,1998 **16** :261 ~ 268
- [10] Wu G Y (吴冠芸) ,Pan H Z (潘华珍) ,Wu H (吴辉) . Common experimental data manual in biochemistry and molecular biology (生物化学与分子生物学实验常用数据手册) ,Beijing :Science Press , 1999 pp. 155 ~ 156
- [11] SHEN T (沈同) ,WANG J Y (王镜岩) ,ZHAO B T (赵邦梯) . Biochemistry (生物化学) ,Beijing :Higher Education Press ,1990 pp. 88 ~ 93
- [12] Banner D W ,D 'Arcy A ,Janes *et al* . Crystal structure of the soluble human 55kD TNF receptor-human TNF β complex : implications for TNF receptor activation. *Cell* ,1993 **73** :431 ~ 445
- [13] Sun Y (孙彦) . Engineering of biological separation (生物分离工程) ,Beijing :Chemistry industry Press ,1998 pp. 136 ~ 137
- [14] GU T H (顾惕人) ,ZHU S Y (朱涉瑶) ,LI W Q (李外郎) . Interface Chemistry (表面化学) ,Beijing :Science Press ,1999 pp. 309 ~ 345

Adsorption of $\text{TNF}\alpha$ onto the Amino Acid-modified NK-110 Resin

WEI Jiao YU Yao-Ting* KONG De-Ling

(The key Laboratory of Bioactive Materials ,Ministry of Education ,Nankai University ,Tianjin 300071 ,China)

Abstract It is a effective way to remove Tumor Necrosis Factor($\text{TNF}\alpha$) from plasma by adsorbent. In the present study ,NK-110 was modified by 8 amino acids to prepare the adsorbents to be used in the static adsorption experiments of $\text{TNF}\alpha$. We have studied the adsorption capacity ,kinetic profiles and adsorption isotherm of Cys modified NK-110 ,and some comparison were made between Cys modified NK-110 and unmodified one. The experimental results show that the Cys modified NK-110 exhibited superior adsorption capacity which is 7683.80 u/mL ,and the adsorption percentage is 85.38% at 120min in stable adsorption. Compared with unmodified NK-110 ,the Cys-modified one with high adsorption velocity. Furthermore ,adsorption isotherms were also studied on Cys-modified and bare NK-110 ,but showed to be of " L " shape at 37 $^{\circ}\text{C}$. The adsorption amount increased as the concentration of $\text{TNF}\alpha$ increased ,however ,the adsorption percentage is stable adsorbed by Cys-modified NK-110 ,whereas it is decreased by bare one. The results demonstrating that Cys can significantly raised the adsorption capacity.

Key words amino acid , NK-110 , adsorption , $\text{TNF}\alpha$

Received :December 5 ,2000

This work was supported by grant from Cooperation of China and Austria and National Natural Science Foundation of China(30000042) .

* Corresponding author .Tel 86-22-23508626 ,Fax 86-22-23501393 ,E-mail :Yaotir_@Publics.tpt.tj.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>