

·论著·

肺表面活性物质蛋白 A 的提纯
及其表面活性功能分析

杨琳琳¹, 封志纯²

(1. 广东省妇幼保健院新生儿科, 广东广州 510010; 2. 第一军医大学珠江医院儿科, 广东广州 510000)

[摘要] 目的 为了提取肺表面活性物质蛋白 A, 提高人工合成表面活性物质的疗效。方法 采用萃取和透析的方法提纯肺表面活性物质蛋白 A, 并用膜天平检测其生物活性。结果 蛋白质聚丙烯酰胺凝胶电泳显示, 提纯后的肺表面活性物质蛋白 A 分子量为 29.7×10^3 , 其杂蛋白条带明显减少, 将其加入人工合成的磷脂中表现为表面活性明显增加, γ_{min} 由 7.9 ± 0.9 降至 2.6 ± 1.2 。结论 用萃取和透析的方法能较好地提纯肺表面活性物质蛋白 A, 且能较好地保持其生物活性。

[关键词] 肺表面活性物质蛋白 A; 提纯; 表面活性; 猪

[中图分类号] R - 332 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008 - 8830(2000)04 - 0260 - 03

Isolation and Purification of Surfactant Protein A
and Its Biological Activity

YANG Lin-Lin, FENG Zhi-Chun

Department of Neonatology, Maternity and Child Health Hospital of Guangdong Province, Guangzhou 510010, China

Abstract: **Objective** To improve the isolation effect of the pulmonary surfactant protein A. **Methods** We isolated and purified pig pulmonary surfactant protein A. The pig lungs were washed with saline. The mixture was centrifugalized and protein sediments were obtained. The sediments were isolated and purified by dialysis. We detected their biological activity by MTP - 1 balance. **Results** The samples upon SDS/polyacrylamide gel electrophoresis showed that the molecular weight was 29.7×10^3 and the number of bands was reduced. When added to artificial phospholipids, its biological activity was enhanced ($P < 0.01$). **Conclusions** The method of dialysis can effectively purify the pig pulmonary surfactant protein A. The method can also keep its biological activity well.

Key words: Pulmonary surfactant protein A; Isolated and purified; Biological activity; Pig

肺表面活性物质蛋白 A (Surfactant protein A, SP - A) 是由 II 型肺泡上皮细胞合成的, 属糖结合蛋白质, SP - A 单位由 248 个氨基酸组成, 分子量范围 $28 \sim 36 \text{ kDa}^{[1]}$ 。近年来国内外许多学者对其进行了大量研究, 发现其具有维持肺表面活性物质 (pulmonary surfactant, PS) 正常生理功能, 参与并调节局部免疫及炎症反应等广泛生理功能^[2]。为了提高人工合成的肺表面活性物质的疗效, 我们从猪肺中提纯了肺表面活性物质蛋白 A, 并用膜天平检测了其表面活性。

1 材料和方法

1.1 材料

新鲜猪肺。

1.2 试剂

B - D - 吡喃糖 (B - D - OGP), 低分子量蛋白质标准为 Sigma 公司产品, 其他试剂为国产分析纯。Exsurf 为美国生产的人工合成 PS, 主要成分为磷脂二棕榈卵磷脂 (DPPC)。

[收稿日期] 1999 - 01 - 25; [修回日期] 2000 - 04 - 26
[作者简介] 杨琳琳 (1964 -), 女, 硕士, 副主任医师。

1.3 方法

1.3.1 猪肺表面活性物质的提取 将新鲜完整猪肺组织置于方盘中,用生理盐水少许洗涤猪肺表面以清除血污,自支气管分叉上方 2 cm 处将气管剪断,倒出肺内污水。再从气管灌入生理盐水,轻轻拍打,可见有泡沫状液体流出,将肺内液体收集到小桶内,重复灌洗约三次,至泡沫明显减少。将灌洗液平衡后,3 000 r/min,4 离心 5 min,取上清液,然后将上清液 8 000 r/min,4 离心 30 min,收集取沉淀物,得到肺表面活性物质的粗提取物。

1.3.2 肺表面活性物质蛋白 A 的提纯 将收集到的 PS 粗提物置于烧杯中,用少量生理盐水溶解后,按 PS 液与正丁醇 1 50(V/V)比例,把 PS 与正丁醇在室温下搅拌 60 min,13 000 r/min,20 min 离心两次,然后将沉淀用氮气吹干^[3],从而提取到 SP - A。在将提取到的 SP - A,用含 20 mmol/L B - D - OGP,5 mmol/L hepes,100 mmol/L 氯化钠 (pH 7.4)的缓冲液溶解,用透析袋透析 48 小时,再经 15 000 r/min,离心 60 min,去除不溶物质,收集上清液,吹干后得到纯化的 SP - A^[4]。

1.3.3 用 MTP - 1 型模式天平测定提纯的 SP - A 表面活性 在 MTP - 1 型膜天平液槽中加满生理盐水,使水面高出槽边缘约 1 mm,水温维持在 30 。分别将被测的人工合成 PS(DPPC)与提取的猪肺表面活性物质蛋白 A,按 1 100(W/W)混合后,溶于溶液中,再将等量的 DPPC 溶于溶解液中,分别滴加在液面上。开动液槽表面滑尺,使液面的单分子层表面膜在最大表面积和最小表面积之间改变^[5]。由于表面张力的作用,液体吸附在玻片上产生垂直向下的拉力,后者和滑尺移行的距离分别经传感器转换成相应的电信号。在 X/Y 函数记录仪上绘出表面张力—表面积等温曲线,得出最大表面张力和最小表面张力。

1.3.4 检测提纯的 SP - A 分子量 在样本蛋白中加入染色剂摇匀,然后用 756 MC 型紫外分光光度计进行蛋白检测,根据测出的 OD 值与标准曲线比较得出样本蛋白的含量。不同浓度的小牛白蛋白的检测用来建立标准曲线。待上样的蛋白质浓度控制在 1~2 mg/ml,取 10 μl 蛋白样品,加入 10 μl 样品处理液,100 水浴加热 5 分钟,冷至室温。加热 1 %琼脂(以缓冲液稀释)溶解后用于封缝。分别配置分离胶和浓缩胶。在制好的胶槽内分别加入低分子量蛋白质标准,纯化过程中间产物,纯化最终产物^[6]。电泳后用考马斯亮蓝 R - 250 染色。

因 SP - A 的单抗价格昂贵且国内未能购买得到,所以没有对所提取的 SPA 进行免疫印迹反应实验,以便更好地与白蛋白等蛋白质鉴别。但在 DPPC 中加入白蛋白后,实验显示 γ_{min} 值和 γ_{max} 值没有明显变化,统计学分析差异无显著性意义, $P > 0.05$ 。

2 结 果

2.1 蛋白质聚丙烯酰胺凝胶电泳推算 SP - A 分子量

采用不连续 SDS - PAGE,不连续 SDS - PAGE 考马斯亮兰 R - 250 染色,分别在电泳槽中加入低分子量蛋白质标准,纯化过程中间产物,纯化最终产物。如图所示:条带 1 是低分子量蛋白标准,条带 2 是纯化最终产物,条带 3 是纯化过程中间产物,条带 4 是 SP - A 标准品。本实验得到的肺表面活性物质蛋白 A 的分子量是 29.2×10^3 。

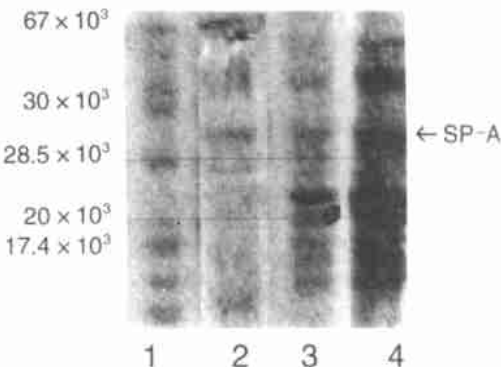


图 1 SP - A 纯化过程中不同产物的 SDS + PAGE
Fig 1. Difference of SP - A on the SDS - PAGE

2.2 SP - A 体外表活性分析

用 MTP - 1 型膜式天平分别测定 DPPC 和 DPPC + SP - A 的表面活性,计算出最小表面张力 γ_{min} 和最大表面张力 γ_{max} 。比较两组的 γ_{min} , DPPC 组(A 组)明显比加入 SP - A 的 DPPC + SP - A 组(B 组)大, t 值为 18.276, $P < 0.05$,差异有显著意义,见表 1。

表 1 人工合成磷脂与加入 SP - A 组的表面活性比较
Table 1. Compared with DPPC and DPPC + SPA in the surface - activity ($\bar{x} \pm s$)

分组	γ_{max}	γ_{min}
A 组	47.5 $\pm$ 5.3	7.9 $\pm$ 0.9
B 组	42.3 $\pm$ 3.1	2.6 $\pm$ 1.2 ^a

注:A 组为人工合成 PS,B 组为人工合成 PS + SP - A
a:与 A 组相比 $P < 0.05$

3 讨 论

肺表面活性物质(PS)存在于肺泡和终末呼吸道表面,由Ⅱ型细胞分泌,其可以随呼吸时肺泡表面积变化来改变气液界面的张力,使肺泡在呼气时不致萎陷。50年代后期,人们证实了新生儿呼吸窘迫综合征(NRDS)是由于缺乏PS引起的。在80年代应用外源性PS治疗NRDS取得了成功。并随之掀起了应用各种方法取得外源性PS的高潮。由于人工合成磷脂配方(DPPC:PG)缺乏肺表面活性物质蛋白,故其疗效远没有天然PS好。而天然PS是从人羊水中得来,但要获得大量的羊水较为困难。因此,我们采用从猪肺中获得肺表面活性蛋白,并对其进行纯化,以减少异性蛋白进入人体。

肺表面活性物质蛋白A是水溶性蛋白,其分子量约为 28×10^3 至 36×10^3 ,是目前发现的四种肺表面活性物质蛋白中分子量最大的。本实验将PS经由正丁醇抽提后,去除了脂类和脂溶性蛋白质,往往还有较多的杂蛋白和白蛋白,与SP-A结合在一起。本研究先用半透明膜将离子和低分子量化合物与大分子量的物质分开,再用分子量较大的透析袋将分子量相对较小的SP-A在含有OPG的缓冲液中透析出来,最后低温超速离心得到纯化了了的SP-A。

将纯化过程中含有SP-A的不同中间产物,经蛋白质聚丙烯酰胺电泳(SDS-PAGE)分离,考马斯亮蓝染色,显示纯化后的产物所含有的其他蛋白条带较少,表明纯化程度较前提高,并计算出所提纯的SP-A分子量为 29.2×10^3 ,与国内外报导的结果相仿^[1]。

SP-A具有增加肺表面活性物质活性的作用,其不仅可与去蛋白的PS的脂质很容易地结合,也能和合成的人工磷脂迅速作用。为了测定本研究从猪肺中提纯到的肺表面活性物质蛋白的表面活性,

我们采用MTP-1膜天平来检测,结果表明加入本研究提纯的猪肺表面活性物质蛋白后,体外表面活性较未加入组表面活性有明显增强,经统计学分析有显著性差异。

目前研究已经知道SP-A的生物功能最广泛,也最重要。它具有增强肺表面活性物质活性,调节肺泡Ⅱ型细胞对PS的分泌,重摄取,担负着细胞内合成PS的负反馈调节信号作用,广泛参与肺的生理和病理活动^[7]。本研究采用萃取和透析的方法,此方法的实验条件温和,能较好地保存SP-A的生物活性,且操作简单。而我国人习惯食用猪肉,所以较易得到大量廉价的猪肺,因此,这种提纯SP-A的方法值得推广。

[参 考 文 献]

- [1] 胡明耀,张亚霏. 小牛肺表面活性物质的提取及化学成分理化特性的测定[J]. 第二军医大学学报,1986,7(5):327-331.
- [2] Smyth JA. Hyaline membrane disease treated with bovine surfactant[J]. Pediatrics, 1983, 71(6):918-920.
- [3] Folch J. A simple method for the isolation and purification of total lipid from animal tissues[J]. Biol Chem, 1956, 226:497-499.
- [4] 章红志,杨毅,邢泉生,等. 用免疫印迹法测定肺表面活性蛋白A及其临床应用[J]. 上海医学检验杂志,1997,12(4):211-212.
- [5] Haagsman HP, Hawgood S, Sargeant T, et al. The major lung surfactant protein. SP 28-36, is a calcium-dependent, carbohydrate linking protein[J]. J Biol Chem, 1987, 262(3):13877-13879.
- [6] McMahan MJ, Mimouni F, Miodornik M, et al. Surfactant-associated 35 K dalton protein in amniotic fluid gestational age and pulmonary maturity[J]. Pediatr Res, 1986, 20(5):435A-438A.
- [7] 金勤立,洪列列,金汉珍,等. 人羊水中肺表面活性物质的提取和理化分析[J]. 上海医科大学学报,1988,15(1):9-12.

(本文编辑:岳少杰)

敬告作者

为适应我国信息化建设需要,扩大作者学术交流渠道,本刊已入网《万方数据资源系统(China Info)数字化期刊群》,作者著作权使用费与本刊稿酬一次性给付。如作者不同意将文章编入该网,请在来稿时声明,本刊将做适当处理。