

肿瘤坏死因子- α 的光化学修饰及其固定化研究*

关燕清^{1, 2 Δ} 钟辉珍¹ 王笑春¹ 周天鸿²

1(华南师范大学 生命科学学院 生物技术研究所, 广州 510631)

2(暨南大学 生命科学技术学院, 广州 510632)

摘要 肿瘤坏死因子- α (TNF- α)是具有强大抗肿瘤作用的蛋白质型的细胞因子,与4-叠氮苯甲酸反应,经红外光谱确认生成物在 2127 cm^{-1} 处有叠氮基团的典型吸收,证明合成得到了光活性的肿瘤坏死因子。采用光固定法将这种光活性蛋白质固定到组织培养聚苯乙烯膜上,制成生物材料。实验进一步表明,种植TNF和固定化TNF量之间的关系以及紫外辐射时间对固定化的影响。通过扫描电子显微镜(SEM)和原子力显微镜(AFM),对光固定化TNF的微观形态的观察结果表明,光活性的肿瘤坏死因子在聚苯乙烯膜表面处于高度有序状态,且固定化的肿瘤坏死因子的粗糙度约为 $200\sim 300\text{ nm}$ 。

关键词 肿瘤坏死因子- α N-(4-叠氮苯甲酰基)琥珀亚酰胺 聚苯乙烯 光固定化

Synthetic and Photo-immobilization of Photo-active Tumor Necrosis Factor-alpha

Guan Yanqing^{1,2} Zhong Huizhou¹ Wang Xiaochun¹ Zhou Tianhong²

1(Biotechnology Research Institute, College of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China)

2(College of Life Science & Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract Tumor Necrosis Factor is one of the cell factors with much stronger anti-tumor activity. In this study, photoactive arylazide-4-azidobenzoic acid was modified to Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α). The IR data (2127 cm^{-1}) was given to confirm the modification. By photo-immobilization, this modified TNF- α was immobilized on cell culture polystyrene. Both the relation between the amount of TNF- α in feed and immobilized TNF- α and the influence of different UV irradiation time on photo-immobilization are discussed. Microscopic observations of the photo-immobilization TNF- α were made by use of scanning electron microscope and atomic force microscope.

Key words Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) N-(4-azidobenzoyloxy) succinimide Polystyrene (PSt) Photo-immobilization

1 引言

宫颈癌是发生在子宫颈部的恶性肿瘤,多见于40多岁以上的妇女。随年龄增长,其发病率增加,占妇女生殖器恶性肿瘤的首位,是严重危害妇女健康的常见病。在临床上常见的宫颈癌治疗方法有手术疗法,药物疗法和物理疗法。化学药物和放射药物的选择性不高,既能抑制和杀伤肿瘤细胞,也可损伤体内正常组织和细胞,在治疗中出现明显的毒副作用;而物理疗法,如激光、冷冻、电灼等治疗较多出现活

动性渗血,造成下腹隐痛不适,出现阴道流液甚至感染等副作用,给病人带来极大的生理上和心理上的痛苦。随着生物工程技术的发展,发现一些多肽,蛋白药物具有明显的抑癌治癌效果,但在体内半衰期短且不易透过生物膜。因此,对抗肿瘤药物的长效缓释、控释制剂,尤其是靶向制剂研究,降低化学和放射药物对正常组织的毒性,延缓机体耐药性的产生,提高生物工程药物的稳定性和疗效,是癌症药物治疗研究的主要目标。

各种细胞因子是生物治疗的重要方面。肿瘤坏死因子- α (TNF- α),干扰素- γ (IFN- γ)均是有着广泛生物学作用的蛋白质性的细胞因子。其中,肿瘤坏死因子- α 是由激活的单核细胞和巨噬细胞产生的,是

* 中国博士后科学基金资助项目(2004035588)

Δ 通讯作者, E-mail: gyq69@163.com

直接杀伤肿瘤的最强生物因子之一, 体内外实验均显示野生型 TNF- α 能杀伤多种肿瘤细胞, 但全身给药的副毒作用严重, 降低给药量又很难在局部达到有效的治疗浓度, 从而影响其抗肿瘤效果。因此, 如何降低 TNF- α 用药剂量, 减少副作用, 增强抗肿瘤疗效成为人们研究的焦点。IFN- γ 是由淋巴细胞分泌的一种糖蛋白, 研究证实^[1] 它可增强 TNF 诱导的细胞凋亡, 有协同促进 TNF- α 杀伤肿瘤细胞的功能, 可在一定程度上减轻 TNF 的副毒反应。

合成高分子化合物不具有免疫原性, 具有丰富的链结构, 以及链结构的可设计性、修饰性, 同时一些聚合物被证明具有良好的生物相容性, 广泛应用于生物领域。生物相容性是生物材料能否应用于临床最重要的一个环节。90 年代, 由 Matsuda 等^[2-5] 为代表的几个研究小组首先提出的光化学固定法, 是所有用于生物医用高分子材料表面改性的方法中, 生物相容性最理想、通用性最强、最简单实用的一种新方法。这种光化学固定方法及其固定的新的生物材料已成为生物材料科学家所关注和研究。它是指利用紫外或可见区域(300~800nm) 光线, 将具有特定性质的组分或生物分子偶联到材料表面的方法。其原理是用带有热活性基团和光活性基团的化学连接组分将各种类型化合物的分子偶联到材料表面达到改性表面的目的。

采用用于生物医用高分子材料表面改性的光化学固定法将 TNF- α 与 IFN- γ 共同偶联具有良好生物相容性的聚苯乙烯(PSt) 等几种高分子材料上, 制备杀伤宫颈癌细胞的载体药物。TNF- α 通过光固定化修饰, 其杀伤肿瘤细胞的活性可因固定化而明显增强, 且只需很小的剂量(可降低毒副作用)。IFN- γ 的共固定化, 与 TNF- α 产生协同杀伤作用, 可进一步增强对宫颈癌细胞的杀伤力。经固定有干扰素和肿瘤坏死因子的生物材料, 可以研制一种具有抗肿瘤活性的宫颈帽, 戴在人类宫颈上, 直接与宫颈癌细胞表面接触发挥药效。这类载体药物经临床应用后, 可望成为一种理想的治疗宫颈癌的载体药物。

本论文首先研究了肿瘤坏死因子的光化学修饰及光固定化, 通过红外光谱、扫描电镜、原子力显微镜检测肿瘤坏死因子在 PSt 基板上光固定化情况。

2 材料与方法

2.1 试剂和仪器

肿瘤坏死因子(TNF- α), DMF, N-(4-叠氮苯甲酸基)琥珀酰亚胺, 均购自 Sigma 公司。78-1 磁力

搅拌器(江苏金坛); HY-5 调速多用振荡器(江苏金坛); 超速冷冻离心机(Mikro22R, BECKMAN 公司); 紫外光谱仪(日本岛津 SHIMADZU UV2450); 冷冻干燥仪(25SL)(美国 VIRTIS COMPANY NC.); XL-30ESEM 型扫描电子显微镜(荷兰飞利浦公司); WQF-300 型傅立叶变换红外光谱仪(北京第二光学仪器厂); SPM-3000 原子力显微镜(北京本原)。

2.2 光活性 TNF- α 的制备与检测^[6]

在冰浴搅拌下, 将 TNF- α ($5\mu\text{g}$, 2.94×10^{-7} mmol) 加入 N-(4-叠氮苯甲酸基)琥珀酰亚胺 ($7.65\mu\text{g}$, 2.94×10^{-5} mmol) 的二甲基甲酰胺 DMF/PBS (pH 7.4) (4, 1, 2 ml) 溶液中, 4, 48 h 反应。合成结束后, 用超过滤膜(Milipore Molecut II, 5KDa) 纯化叠氮苯基衍生的 TNF- α , 冷冻干燥。对 TNF- α (对照) 和光合 TNF 作 IR 分析。

2.3 光固定化

光固定化反应如图 1 所示。将蛋白质以各种浓度(0.1~0.7 ng/well) 加入 24 孔组织培养聚苯乙烯(PSt) 基板 A 上。另一基板 B 同 A 处理, 冰冻干燥后, 在紫外灯(15 w) 下 2 cm 处照射(A 板 5 min) B 板 10 min), 利用叠氮基十分活泼的特点, 将蛋白质固定在 PSt 材料上。光固定化后用 PBS(-) (pH 7.4) 溶液反复洗涤基板, 直至漏出 PBS(-) 溶液紫外吸收为零。

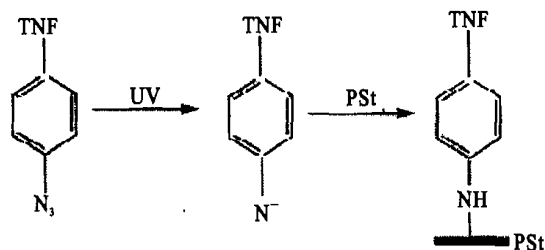


图 1 紫外光辐射光化学反应图解

Fig 1 Schematic diagram of photochemical reaction upon UV light

2.4 聚苯乙烯基板上 TNF- α 的定量

采用分光光度法测定 PBS(-) 洗涤液中所含未固定化 TNF 的量, 计算聚苯乙烯基板每孔实际固定的 TNF 的量。

2.5 聚苯乙烯基板上 TNF- α 形态

用扫描电子显微镜(SEM) 和原子力显微镜(AFM) 观察光固定化 TNF 的形态。

3 结果与讨论

3.1 TNF- α 的红外光谱图

图2、3分别为光合反应前和反应后的TNF- α 红外光谱图。TNF- α 的分子量17 KD,由157个氨基酸残基组成。其中的自由氨基可以和活化的羧基发生亲核取代反应,形成酰胺键,从而使TNF- α 链被叠氮基团修饰。由于芳香叠氮化合物和赖氨酸的反

应活性很高,与其它氨基酸的反应活性却很低,所以修饰位点都在赖氨酸的氨基上。从图3可以看出,在 2126.59 cm^{-1} 出现了叠氮基的吸收峰,这表明TNF- α 已经被叠氮基团修饰,通过合成我们得到带有叠氮基团的光活性肿瘤坏死因子。

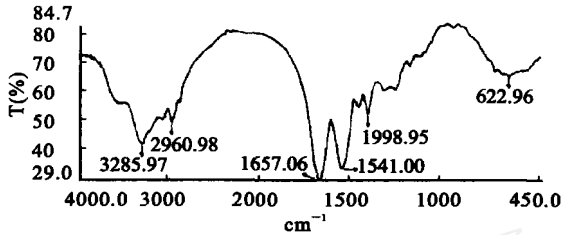


图2 光反应前TNF的红外吸收光谱

Fig 2 IR spectra of TNF before photo-reaction

3.2 聚苯乙烯板上TNF- α 的定量

芳香叠氮基团是改性高分子材料的光化学固定法所使用的一种光活性基团,经辐照发生不可逆光解,产生氮气和活性十分高的氮烯中间物。这种中间物具有加入到C—C双键的能力,能形成氮杂环丙烷系物质,而且可以直接插入到C—H键形成仲胺。无论那种形式,均能导致目的分子共价键合到高分子材料表面。

将合成的光活性TNF- α 以各种含量加入到24孔聚苯乙烯培养板,经干燥、紫外光照射、缓冲液振荡洗涤,紫外光谱仪检测洗涤液中的蛋白质。参照TNF- α 的点样量,计算固定化TNF- α 的量。比较紫外辐照5 min和10 min种植TNF- α 和固定TNF- α 的关系,如图4所示。图4显示了TNF- α 的固定化量随着初始添加TNF- α 量的增加而增加。在低于 0.36 ng/well 情况下,5 min和10 min两种紫外照射时间的光固定效果接近一致。

因此,可以分析认为低浓度时,TNF- α 与PSt基板反应充分,固定效果较好。在高于 0.36 ng/well 浓度下,5 min、10 min紫外照射的固化作用不同。10 min照射下,TNF- α 固定化量继续随种植浓度增加而增加。但种植浓度超过 0.65 ng/well 时,固定量增幅变小并趋于稳定。而5 min照射下,固定量与种植量关系不稳定,这说明对较高种植浓度,采用5 min照射,由于照射时间短可能会造成光合反应不充分,影响光固定化的效果。

3.3 扫描电镜观察光固定化TNF- α 的形态

光化学固定法大大降低了目的涂层试剂在医用

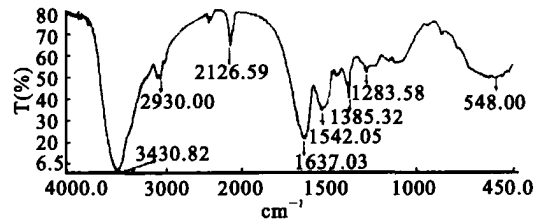


图3 光反应后TNF的红外吸收光谱

Fig 3 IR spectra of TNF- α after photo-reaction

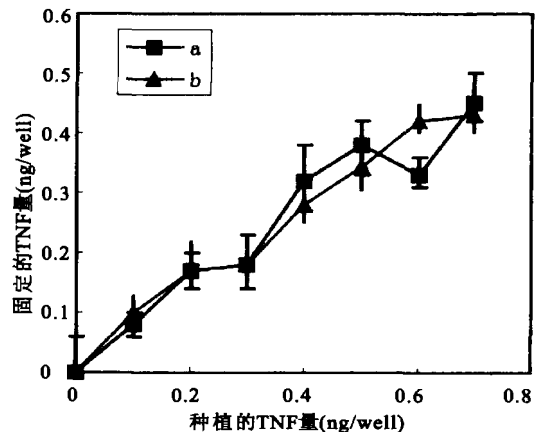


图4 固定TNF- α 与种植TNF- α 量的关系

Fig 4 Relation between amount of TNF- α in feed and immobilized TNF

(Time: a 5 min; b 10 min)

高分子材料表面产生的无序交联,且提高了分子材料的表面性能而不影响材料的本体性质^[5]。在本实验中,紫外光的能量引发活性TNF- α 分子和聚苯乙烯基板(以及TNF- α 分子之间)的交联反应。

图5(a)为扫描电子显微镜下观察到聚苯乙烯膜表面,图5(b)、(c)为光固定化TNF- α 后聚苯乙烯膜表面,如图可知,TNF- α 经固定化后,在聚苯乙烯表面形成一层分布均匀的蛋白质层,表明通过共价键合,线形高分子TNF- α 在聚苯乙烯材料表面处于相对有序的状态。

3.4 用原子力显微镜观察光固定化TNF- α 的形态

图6是原子力显微镜下PSt的表面。可以见到

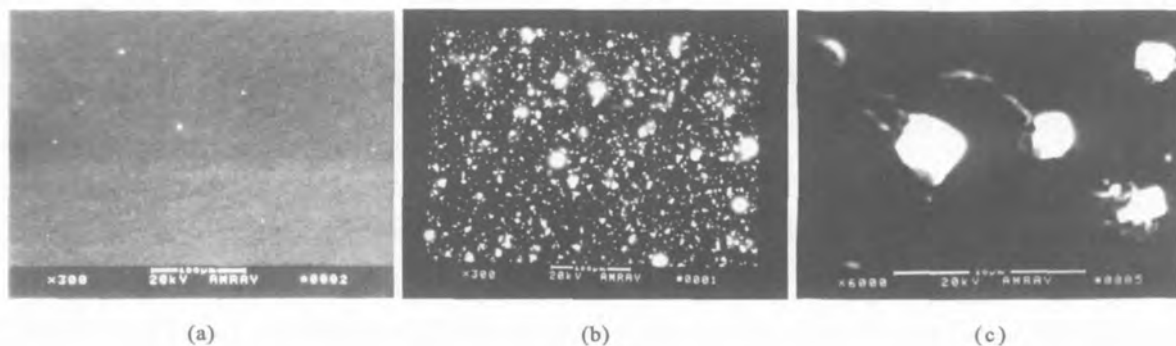


图5 电镜下PSt及接枝TNF- α 的PSt表面

(a) 聚苯乙烯表面; (b) 固定化肿瘤坏死因子($\times 300$); (c) 固定化肿瘤坏死因子($\times 6000$)

Fig 5 SEM images of PSt film surface and TNF- α graft surface

(a) polystyrene surface; (b) immobilized TNF($\times 300$); (c) immobilized TNF($\times 6000$)

没有处理的PSt表面是相对平滑的表面,粗糙度大约20~30 nm。接枝TNF- α 的PSt表面覆盖了接枝聚合物,粗糙度大约200~300 nm。

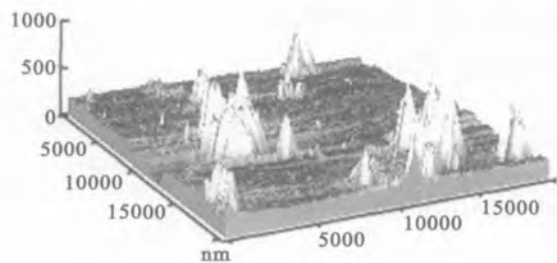


图6 原子力显微镜下的PSt膜平面及接枝的TNF- α

Fig 6 AFM images of PSt surface and TNF- α graft surface

4 结论

4-叠氨基苯甲酸被修饰到TNF- α 的多肽链后,TNF- α 获得了光反应性。光固定化量随种植浓度增加而增加,浓度达到0.65 ng/well时固定化量趋于稳定。随种植浓度增加,延长紫外照射时间能达到较好固定效果。SEM和AFM检测表明,TNF- α 经固定化后,在聚苯乙烯表面形成有序状态。

参考文献

- 1 Suk K, Chang I, Kim YH, *et al*. Interferon gamma (IFN gamma) and tumor necrosis factor alpha synergis in ME-180 cervical cancer cell apoptosis and necrosis. *J Biol Chem*, 2001; 276(16): 13153
- 2 Matsuda T, Sugawara T. Photochemical protein fixation on polymer surface via derivatized phenylazido group. *Langmuir*, 1995; 11: 2267
- 3 Matsuda T, Sugawara T. Development of surface photochemical modification method for micropatterning of cultured cells. *J Biomed Mater Res*, 1995; 29: 749
- 4 Matsuda T, Sugawara T. Control of cell adhesion, migration and orientation on photochemically micropatterned surfaces. *J Biomed Mater Res*, 1996; 32: 165
- 5 Sugawara T, Matsuda T. Novel surface graft copolymerization method with micron-order regional precision. *Macromolecules*, 1994; 27: 7809
- 6 Guan YQ, Guo BJ. Inhibition activity of phycocyanin immobilization biomaterial on proliferation of liver cancer cells 7402. *Ion Exchange and Adsorption*, 2000; 16(6): 547 [关燕清, 郭宝江. 光固定化藻蓝蛋白对体外肝癌细胞7402的抑制作用. *离子交换与吸附*, 2000; 16(6): 547]

(收稿: 2004-05-18 修回: 2005-04-07)