

线粒体 Ca^{2+} 转运和通透转变孔道的 开放与能量状态*

黄行许 翟大勇 黄有国 杨福愉**

(中国科学院生物物理研究所生物大分子国家重点实验室, 北京 100101)

摘要 对大鼠肝线粒体 Ca^{2+} 转运与通透转变孔道(PTP)开放之间的关系, 以及线粒体能量状态对 Ca^{2+} 转运和 PTP 开放的影响进行研究。结果显示, Ca^{2+} 诱导的线粒体 Ca^{2+} 释放(mCICR)能介导 PTP 开放, 呼吸链电子传递抑制剂抑制 mCICR 和 PTP 的开放, 使呼吸链的电子传递局部恢复, mCICR 和 PTP 开放也可部分恢复。mCICR 和 PTP 的开放也能被清除跨膜质子梯度的 CCCP 抑制, 表明线粒体 Ca^{2+} 转运和 PTP 的开放都紧密依赖电子传递和能量偶联。

关键词 线粒体 Ca^{2+} 转运 通透转变孔道 电子传递 能量偶联

线粒体 Ca^{2+} 转运既可影响线粒体基质内 Ca^{2+} 敏感代谢酶的活性, 调控线粒体能量代谢, 也可通过摄取或释放 Ca^{2+} 而调控细胞的 Ca^{2+} 浓度^[1]。最近发现, 线粒体还通过通透转变孔道(permeability transition pore, PTP)进行一种特殊的 Ca^{2+} 转运, 即 Ca^{2+} 的内流诱导线粒体 Ca^{2+} 的释放(Ca^{2+} -induced release of Ca^{2+} from mitochondria, mCICR)。在 mCICR 过程中, 线粒体是一种可发送和传递 Ca^{2+} 信号的细胞器, 并积极参与与细胞生理功能的调节^[2,3]。

PTP 是一种位于线粒体内外膜连接处的蛋白性孔道。PTP 的确切组成仍不清楚, 现在认为它至少由胞浆部分的己糖激酶(hexokinase)、外膜部分的电压依赖性阴离子通道(voltage-dependent anion channel)、膜间隙部分的肌酸激酶(creatine kinase)、内膜部分的腺嘌呤核苷酸转位蛋白(adenine nucleotide translocator)和基质部分的亲环蛋白 D(cyclophilin D)组成。PTP 有可逆低通透性及不可逆高通透性开放两种方式^[4]。PTP 低通透性开放是线粒体内 Ca^{2+} 释放的生理性通道; PTP 高通透性开放, 即通常所说的 PTP 开放则与细胞坏死和细胞凋亡密切相关^[5]。因而, 线粒体 Ca^{2+} 转运和 PTP 开放的研究受到了更多关注。在对 Ca^{2+} 转运和 PTP 开放的研究过程中, 人们发现 Ca^{2+} 转运和 PTP 开放既改变线粒体的代谢状态, 也受线粒体能量代谢的影响。曾有报道, 氧化底物能影响线粒体 Ca^{2+} 转运^[6-7], 电子传递链的氧化还原状态可以调节 PTP 的一种亚状态^[8], 氧化底物也会影响 PTP 开放^[9]。但对线粒体 Ca^{2+} 转运与 PTP 开放的关系, 以及线粒体电子传递影响 Ca^{2+} 转运和 PTP 开放等问题还缺乏深入的了解。本文就这些问题进行了研究, 初步的研究结果表明, 线粒体经 mCICR 能使 PTP 开放, 线粒体 mCICR 和 PTP 开

1999-09-03 收稿, 2000-01-20 收修改稿

* 国家自然科学基金(批准号: 39730130)、中国科学院“九五”重大课题(批准号: KJ951-B1-609)和中国博后基金资助项目

** 联系人 (E-mail: yangly@sun5.ibp.ac.cn)

放都紧密依赖于电子传递和能量偶联。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 200 g 雌性 Wistar 大鼠。

1.1.2 主要试剂 鱼藤酮, 抗霉素 A, 寡霉素, 钌红(ruthenium red, RR), CsA (cyclosporin A), CCCP (carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone), TMPD(N,N,N', N'-tetramethyl-1, 4-phenylenediamine dihydrochloride), Rhodamine 123(Rh123)购自 Sigma 公司, 甘露醇、牛血清白蛋白为 Serva 产品, 其他试剂为国产分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 线粒体制备 鼠肝线粒体制备按 Broekemeier 等人^[8]的方法进行, 分离介质中含 225 mmol/L 甘露醇, 75 mmol/L 蔗糖和 20 mmol/L Hepes, 0.5 mmol/L EGTA 和 1%牛血清白蛋白(pH 7.4), PTP 测试介质含 230 mmol/L 甘露醇、70 mmol/L 蔗糖和 3 mmol/L Hepes (pH 7.4), 得到的线粒体按 12 mg/mL 蛋白浓度用 PTP 测试介质悬浮并置冰上保存。

1.2.2 线粒体 Ca^{2+} 转运检测 参照 Frei 等人^[10]的方法, 取线粒体用测试介质稀释至 0.3 mg/mL 蛋白浓度, 加入 50 $\mu\text{mol/L}$ 偶氮砷 III(A III)作 Ca^{2+} 指示剂, 在 557 双波长双光束紫外分光光度计(Shimadzu, 日本)上测定 A III 在 675-685 nm 处的光吸收变化, 测试温度为 20℃。

1.2.3 线粒体 PTP 开放检测 取线粒体用测试介质稀释至 0.3 mg/mL 蛋白浓度, 在 20℃下测定 PTP 开放, 本研究利用紫外和荧光分光光度法以及流式细胞术 3 种方法分别测定 PTP 开放, 以相互验证。

(i) 紫外分光光度仪检测, 参照 Petronilli 等人^[11]的方法, 通过检测线粒体的光密度(optical density, A)减小测定 PTP 开放, 取线粒体在 UV-2101 紫外分光光度计(Shimadzu, 日本)上检测 A 值在 540 nm 处的变化。

(ii) 荧光分光光度仪检测, 参照 Fontaine 等人^[9]的方法, 通过检测线粒体膜电位的消失测定 PTP 开放, 取线粒体, 加入 0.2 $\mu\text{mol/L}$ Rh123 为膜电位指示剂, 在 F-4010 荧光分光光度计(Hitachi, 日本)上检测体系中 Rh123 荧光强度的变化(激发波长-发射波长为 488-525 nm)。

(iii) 流式细胞仪检测, 参照 Macouillard-Poullietier 等人^[12]的方法, 通过检测线粒体前散射增大, 荧光强度降低来测定 PTP 开放, 用 0.2 $\mu\text{mol/L}$ Rh123 培育线粒体 5 min 后在 FACS420 流式细胞仪(Becton Dickinson, 美国)上同时检测线粒体前散射和荧光强度变化。

2 结果

2.1 mCICR 诱发 PTP 开放

2.1.1 低浓度 Ca^{2+} 只诱发 mCICR, 高浓度 Ca^{2+} 引起 mCICR 和 PTP 开放 A III 是一种 Ca^{2+} 指示剂, 具有灵敏度高、对 Ca^{2+} 选择性强、膜不通透等特点, 通过检测体系内 A III 吸光度在 675-685 nm 处的变化, 反映测试介质内 Ca^{2+} 浓度的变化, 从而了解线粒体 Ca^{2+} 摄取和释放的功能^[10]。结果如图 1 所示, 用 200 $\mu\text{mol/L}$ Ca^{2+} 刺激, A III 吸光度快速下降后逐渐上升到基质以上水平, 反映了线粒体快速摄取 Ca^{2+} 后, 诱发线粒体内 Ca^{2+} 释放, 表明 Ca^{2+} 介导 mCICR, 即 Ca^{2+} 内流诱导线粒体内 Ca^{2+} 释放。

PTP 开放造成线粒体膜电位消失, 从而使储积在线粒体内的膜电位特异性荧光探针 Rh123 释放出来, 造成线粒体的荧光强度降低, 而体系内荧光强度增高; PTP 开放使得内膜通透性增大, 介质进入线粒体, 线粒体膨胀, 体积增大, 反映颗粒大小的前散射(FSC)增大, 反映线粒体密度的光密度值(A)下降^[4,12]。经 $200 \mu\text{mol/L}$ Ca^{2+} 处理后, 紫外分光光度仪检测结果显线粒体 A 值降低(图2); 荧光分光光度仪检测结果显测试介质内荧光强度升高(图3); 流式细胞仪检测结果显线粒体 FSC 增大, 线粒体荧光强度降低, 表明 Ca^{2+} 介导 PTP 开放。

检测 Ca^{2+} 浓度对 mCICR 和 PTP 开放的影

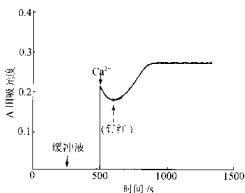


图1 Ca^{2+} 诱发大鼠肝线粒体 mCICR

$200 \mu\text{mol/L}$ Ca^{2+} 引起体系中 A 值光度升降变化 (Ca^{2+} 刺激后 2 min 加入 $1 \mu\text{mol/L}$ 钇红处理)

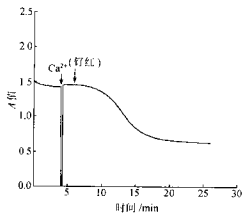


图2 Ca^{2+} 诱导大鼠肝线粒体 PTP 开放

$200 \mu\text{mol/L}$ Ca^{2+} 引起线粒体 A 值降低 (Ca^{2+} 刺激后 2 min 加入 $1 \mu\text{mol/L}$ 钇红处理)

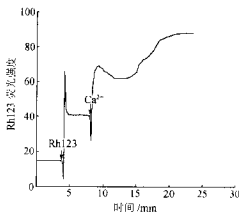


图3 Ca^{2+} 诱导大鼠肝线粒体 PTP 开放

$200 \mu\text{mol/L}$ Ca^{2+} 引起体系内 Rh123 荧光强度先出现一个短暂的中等强度的波峰, 然后逐渐升高

响发现, 经 $< 1 \mu\text{mol/L}$ Ca^{2+} 处理 A 值吸光度和 A 值均不发生明显改变; $2 \sim 20 \mu\text{mol/L}$ Ca^{2+} 处理, A 值吸光度出现下降后又升高, 但 A 值稳定; $50 \mu\text{mol/L}$ 以上 Ca^{2+} 处理, 不仅 A 值吸光度改变, A 值也降低。随着 Ca^{2+} 浓度增高, A 值吸光度升降变化和 A 值下降都加快, 表明 mCICR 和 PTP 开放与 Ca^{2+} 处理的浓度密切相关。低浓度处理, 不能引起 mCICR 和 PTP 开放; 适当浓度处理, 仅诱发 mCICR 现象, 但不使 PTP 开放; 高浓度处理, mCICR 和 PTP 开放同时发生。如图 3 所示, $200 \mu\text{mol/L}$ Ca^{2+} 不仅使测试介质内荧光强度由于 PTP 开放而升高, 而且在此之前, 由于加入 Ca^{2+} 会马上出现一个短暂的中等强度的波峰, 表明线粒体发生了 Ca^{2+} 内流和外排, 即线粒体先发生了 mCICR。比较图 1 和 2 也可发现, mCICR 在前, PTP 开放在后。上述结果表明, mCICR 现象早于 PTP 开放。此外, 用线粒体 Ca^{2+} 单通道 (Ca^{2+} 内流的唯一途径) 的特异性抑制剂钇红(RR)处理后, 虽经 $200 \mu\text{mol/L}$ Ca^{2+} 处理, 也不能使 A 值吸光度、线粒体和测试介质内荧光

强度、线粒体 FSC 和线粒体 A 值发生变化, 表明 RR 可抑制 mCICR 和 PTP 开放, 提示 Ca^{2+} 介导 mCICR 和 PTP 开放是 Ca^{2+} 经 Ca^{2+} 单通道内流的结果。

2.1.2 抑制 mCICR 后 PTP 不开放 检测发现, Ca^{2+} 处理之前 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0 min 和

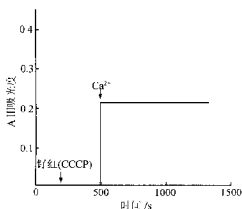


图 4 抑制 Ca^{2+} 内流(解偶联), mCICR 被抑制
加入 200 $\mu\text{mol/L}$ Ca^{2+} 前, 加入 1 $\mu\text{mol/L}$ 钐红抑制 Ca^{2+} 内流(或
1 $\mu\text{mol/L}$ CCCP 抑制电子传递), A III 吸光度升降变化被抑制

Ca^{2+} 处理之后 0.25 min 加入 RR, A III 吸光度不发生改变(图 4)。 Ca^{2+} 处理之后 0.5 min 加入 RR, A III 吸光度发生变化, 并随着 RR 加入时间的后延, A III 吸光度变化越明显。到 Ca^{2+} 处理之后 2 min, A III 吸光度降到最低点, 加入 RR, A III 吸光度变化和对照相似(图 1)。与此相应, 线粒体 A 值也呈现同样的变化(图 2)。上述结果表明, mCICR 完全被抑制后, PTP 就完全不开放, 部分抑制 mCICR, PTP 部分开放。

$\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$ 交换器是线粒体 Ca^{2+} 外排的途径之一^[1]。经 $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$ 交换器抑制剂 trifluoperazine (1 $\mu\text{mol/L}$) 处理, A III 吸光度上升速度明显减慢, 线粒体 A 值下降速度减慢, 幅度减小。这一结果也表明, 部分抑制 mCICR, 也使 PTP 开放受到部分抑制。

2.1.3 抑制 PTP 开放 mCICR 仍发生 环孢素 A(CsA) 是 PTP 的特异性抑制剂^[4]。经 CsA 处理后, PTP 不开放, 线粒体 A 值(图 5)、线粒体和测试介质内荧光强度均不发生改变。荧光分光光度仪检测结果显示, 1 $\mu\text{mol/L}$ CsA 作用后, 200 $\mu\text{mol/L}$ Ca^{2+} 不引起测试介质内荧光强度最后升高, 但仍出现短暂的中等强度的波峰, 表明 CsA 虽抑制 PTP 开放, 但 mCICR 仍发生。A III 吸光度检测显示 CsA 作用后 Ca^{2+} 仍引发 A III 吸光度升降变化(图 6)。进一步肯定 PTP 开放被抑制

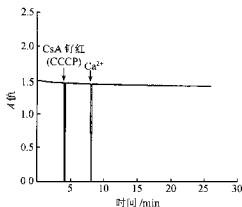


图 5 抑制 PTP 开放(抑制 Ca^{2+} 内流、解偶联), A 值
下降被抑制

加入 200 $\mu\text{mol/L}$ Ca^{2+} 前, 加入 1 $\mu\text{mol/L}$ CsA 抑制 PTP 开放(或
1 $\mu\text{mol/L}$ 钐红抑制 Ca^{2+} 内流, 1 $\mu\text{mol/L}$ CCCP 抑制电子传递),
A 值下降被抑制

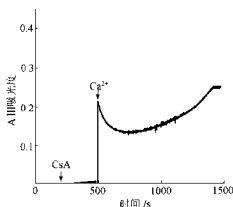


图 6 抑制 PTP 开放, mCICR 仍发生
加入 200 $\mu\text{mol/L}$ Ca^{2+} 前, 加入 1 $\mu\text{mol/L}$ CsA 抑制 PTP 开
放, A III 吸光度升降变化仍发生

后 mCICR 仍发生。

2.2 mCICR 和 PTP 开放与线粒体呼吸链的电子传递

2.2.1 阻断电子传递, 导致 mCICR 和 PTP 开放的抑制 鱼藤酮和丙二酸分别是复合物 I 和 II 的抑制剂, 在丙二酸或鱼藤酮存在条件下, 琥珀酸氧化和 NADH 氧化分别被抑制, 但加入 Ca^{2+} 后线粒体虽仍发生 A 值(图 7)和 A III 吸光度变化, 不过变化幅度明显减小, 表明 mCICR 和 PTP 开放均受到部分抑制。这可能是由于线粒体内存在内源底物(endogeneous substrates), 因此一种抑制剂尚不足以全部抑制电子的传递, 只能部分抑制 mCICR 和 PTP 开放。如果同时用鱼藤酮和丙二酸, 或分别用复合物 III 抑制剂抗霉素 A 和复合物 IV 抑制剂 KCN 使线粒体的电子传递完全中断, $200 \mu\text{mol/L Ca}^{2+}$ 也不能引发线粒体 A III 吸光度和 A 值变化, 表明 mCICR 和 PTP 的开放均依赖于线粒体呼吸链的电子传递。

2.2.2 局部恢复电子传递, mCICR 和 PTP 的开放也得以部分恢复 TMPD/维生素 C 是常用的人工电子供体, 可在抗霉素 A 阻断位点后提供电子给呼吸链, 局部恢复电子传递^[13]。结果显示, 当电子传递被鱼藤酮和丙二酸或抗霉素 A 抑制后, 加入 $0.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ TMPD/ $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 维生素 C, $200 \mu\text{mol/L Ca}^{2+}$ 又可引发线粒体 A 值(图 8)和 A III 吸光度(图 9)变化, 但变化幅度减小, 表明局部恢复电子传递, mCICR 和 PTP 的开放也得到部分恢复。

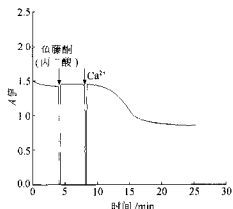


图7 部分抑制电子传递, PTP 开放部分抑制。加入 $200 \mu\text{mol/L Ca}^{2+}$ 前 4 min, 加入 $1 \mu\text{mol/L}$ 鱼藤酮(或丙二酸)部分抑制电子传递, A 值下降幅度部分抑制。

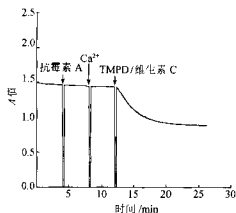


图8 局部恢复电子传递可恢复 PTP 开放。加入 $200 \mu\text{mol/L Ca}^{2+}$ 前 4 min, 加入 $1 \mu\text{mol/L}$ 抗霉素 A 抑制电子传递, A 值下降被抑制, Ca^{2+} 处理后 4 min 加入 $0.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ TMPD/ $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 维生素 C 局部恢复电子传递, A 值下降又恢复。

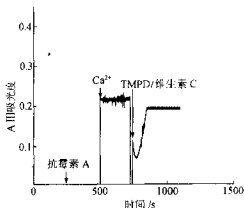


图9 局部恢复电子传递, mCICR 也可恢复。加入 $200 \mu\text{mol/L Ca}^{2+}$ 前 4 min, 加入 $1 \mu\text{mol/L}$ 抗霉素 A 抑制电子传递, A III 吸光度升降变化受到抑制, Ca^{2+} 处理后 4 min 加入 $0.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ TMPD/ $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 维生素 C 以恢复电子传递, A III 吸光度升降变化也可以恢复。

2.3 mCICR 和 PTP 开放的能量偶联依赖性

线粒体氧化呼吸链的质子与电子交换传递使质子从内膜内侧向外侧定向转移, 形成跨膜的质子电势差, 并经 ATP 合成酶生成 ATP。质子载体 CCCP 使得电子传递释放的能量不能转换为跨膜质子动力势, 造成能量不能偶联。实验结果显示, $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CCCP 处理后, $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Ca^{2+} 不能诱发线粒体 A 值和 A III 吸光度变化, 表明线粒体能量偶联是 mCICR 和 PTP 开放的必要条件。

3 讨论

线粒体通过 Ca^{2+} 转运摄取和释放 Ca^{2+} 调节细胞的生理反应^[1], PTP 在线粒体实现其调节过程中具有重要作用。PTP 低通透性开放是线粒体内 Ca^{2+} 释放的生理性通道; PTP 高通透性开放, 即通常所说的 PTP 开放引起线粒体膜电位消失, 基质渗透压改变, 线粒体膨胀^[3,4], 线粒体 Ca^{2+} 转运或者介导 PTP 低通透性开放实现其生理性调控作用, 或者介导 PTP 高通透性开放导致病理性变化。Ichase 等人认为, 当线粒体快速摄取 Ca^{2+} 时, PTP 以低通透性方式开放, 线粒体发生 mCICR; 当线粒体慢速摄取 Ca^{2+} 时, PTP 以高通透性方式开放, 即 PTP 开放^[3]。本研究结果显示, 很低浓度 Ca^{2+} 不能引起 mCICR 和 PTP 开放; 适当浓度 Ca^{2+} 仅诱发 mCICR, 但不使 PTP 开放; 高浓度 Ca^{2+} 引起 mCICR 和 PTP 开放。结果还显示, 经一定浓度 Ca^{2+} 处理后 mCICR 立即发生, 而 PTP 开放滞后。此外, 用 RR 完全抑制 mCICR 后, PTP 即不能开放; 部分抑制 mCICR, PTP 部分开放; Ca^{2+} 内流一旦发生, RR 不能抑制 mCICR, PTP 也不受抑制。相反, 用 PTP 特异性抑制剂 CsA 抑制 PTP 开放的情况下 mCICR 仍然发生, 提示 mCICR 发生先于 PTP 开放发生, 而且后者可能是前者诱发的结果。

Ichase 等人^[2]发现 mCICR 是一种线粒体调节细胞生理活动的主动的 Ca^{2+} 转运方式。本研究结果显示 mCICR 诱发 PTP 开放, 表明它可能也与线粒体导致细胞病理变化相关, 线粒体可能在一定条件下通过 mCICR 实现其生理调节作用, 在另一些条件下则通过 mCICR 诱发 PTP 开放, 导致病理变化。

线粒体 Ca^{2+} 可增强线粒体能量代谢, 也可破坏线粒体能量代谢^[1], 另外, 线粒体能量代谢也制约线粒体 Ca^{2+} 转运^[14], mCICR 是线粒体进行的一种特殊的 Ca^{2+} 转运。本研究的检测结果表明, 阻断电子传递, mCICR 就不再发生, 局部恢复电子传递, mCICR 也能部分恢复, 反映了 mCICR 的电子传递依赖性。

同样, PTP 的开放与线粒体能量状态有关, 一方面, PTP 开放造成线粒体膜电位消失, 从而改变线粒体的能量状态^[4]; 另一方面, Broekemeier 报道 PTP 的一种亚状态受电子传递链的氧化还原状态调节^[6], 表明 PTP 的低通透性开放受线粒体能量状态的影响。线粒体状态是否也影响 PTP 开放呢? 在大鼠骨骼肌线粒体, 氧化底物显著影响 PTP 开放, 使用线粒体复合物 I 底物时的 PTP 开放明显快于复合物 II 和 III 的底物^[6]。本实验结果显示, 同时阻断复合物 I 和 II, 或分别阻断复合物 III, IV 使线粒体呼吸链电子传递不再进行, PTP 就不能开放。

有报道大鼠骨骼肌线粒体 PTP 开放主要取决于复合物 I 的电子传递^[9], 但我们发现, 阻断复合物 II, III 或 IV 的电子传递, 都能使 PTP 开放受到抑制。进一步检测发现, 如果用人工电子供体 TMPD/维生素 C 在抗霉素 A 阻断位点后提供电子给呼吸链以恢复电子传递, PTP 开放又重新发生, 这就表明, 只要有电子传递(即使是局部的), 就能使 PTP 开放。

mCICR 和 PTP 的开放不仅取决于电子传递, 还依赖能量的偶联, 如果加入质子载体 CCCP 使得电子传递释放的能量不能转换为跨膜质子动力势, mCICR 和 PTP 开放都不能发生。检测还发现, ATP 合成酶抑制剂寡霉素对 mCICR 和 PTP 开放影响不明显, 说明 ATP 合成并不是 mCICR 和 PTP 开放所必需的。

值得指出的是, 在细胞凋亡, 特别是经 Ca^{2+} 介导的细胞凋亡过程中, 线粒体 Ca^{2+} 转运受损, 细胞 Ca^{2+} 失衡, 引起 PTP 开放, 线粒体外膜破裂, 释放细胞色素 C 和凋亡介导因子, 诱发凋亡过程^{115,161}。改变线粒体能量代谢可调节线粒体 Ca^{2+} 转运和 PTP 开放的事实提示, 有可能通过改变线粒体能量状态促进或抑制凋亡发生, 达到控制细胞凋亡的目的。

参 考 文 献

- 1 Gunter T E, Gunter K K, Sheu S S, et al. Mitochondrial calcium transport: physiological and pathological relevance. *Am J Physiol*, 1994, 267: C313-C319
- 2 Ichas F, Jouaville L S, Mazat J P. Mitochondria are excitable organelles capable of generating and conveying electrical and calcium signals. *Cell*, 1997, 89: 1 145-1 153
- 3 Ichas F, Mazat J P. From calcium signaling to cell death: two conformations for the mitochondrial permeability transition pore. Switching from low- to high-conductance state. *Biochem Biophys. Acta*, 1998, 1 366(1-2): 33-50
- 4 Zoratti M, Szabo I. The mitochondrial permeability transition. *Biochem Biophys Acta*, 1995, 1 241: 139-176
- 5 Jouaville L S, Ichas F, Hoinahmedov E L, et al. Synchronization of calcium waves by mitochondrial substrates in *Xenopus laevis* oocytes. *Nature*, 1995, 377: 438-441
- 6 Babcock D F, Herrington J, Goodwin P C, et al. Mitochondrial participation in the intracellular Ca^{2+} network. *J Cell Biol*, 1997, 136(4): 833-844
- 7 Jouaville L S, Ichas F, Mazat J P. Modulation of cell calcium signals by mitochondria. *Mol Cell Chem*, 1998, 184: 371-376
- 8 Broekemeier K M, Klocek C K, Pterfer D R. Proton selective substrate of mitochondrial permeability pore: regulation by the redox state of the electron transport chain. *Biochemistry*, 1998, 37(38): 13 059-13 065
- 9 Fontaine E, Eriksson O, Ichas F, et al. Regulation of the permeability transition pore in skeletal muscle mitochondria. *J Biol Chem*, 1998, 273(20): 12 662-12 668
- 10 Frei B, Winterhalter K H, Richter C. Mechanism of alloxan-induced calcium release from liver mitochondria. *J Biol Chem*, 1985, 260: 7 394-7 401
- 11 Petronilli V, Szabo I, Zoratti M. The inner mitochondrial membrane contains ion conducting channels similar to those found in bacteria. *FEBS Lett*, 1989, 259: 137-143
- 12 Macouillard-Poulliet de Gann, Belaud-Rotureau M A, Voisin P, et al. Flow cytometric analysis of mitochondrial activity *in situ*: application to acetylceramide-induced mitochondrial swelling and apoptosis. *Cytometry*, 1998, 33(3): 333-339
- 13 Cornely K. The electron transport game. *Biochem Edu*, 1999, 27: 74-76
- 14 Hajnoczky G, Robb-Gaspers L D, Seitz M B, et al. Decoding of cytosolic calcium oscillations in the mitochondria. *Cell*, 1995, 82: 415-424
- 15 Green D R, Reed J C. Mitochondria and apoptosis. *Science*, 1998, 281: 1 309-1 312
- 16 Simpson P B, Russell J T. Role of mitochondrial Ca^{2+} regulation in neuronal and glial cell signaling. *Brain Res Rev*, 1998, 26: 72-81

血管内皮生长因子人单链抗体*

——基因克隆、高效表达、亲和力成熟及生物活性鉴定

阎锡蕴** 汤 健 吴小平 王凤采¹⁾ 李建生²⁾ 杨东玲

(中国科学院微生物研究所微生物资源前期开发国家重点实验室, 北京 100080)

摘要 利用抗体噬菌体展示技术, 克隆了血管内皮生长因子人基因工程单链抗体, 抗体表达量达菌体总蛋白的 45%。用层析柱复性技术同步完成抗体的纯化和复性。生物活性实验表明, 该抗体不仅特异结合人 VEGF₁₆₅, 而且竞争抑制 VEGF₁₆₅ 与其受体的结合。为了提高单链抗体的亲和力, 采用错配 PCR 法, 随机突变抗体重链可变区基因, 建立抗体突变库, 并从中筛选出高亲和力突变株。研究了抗体突变株蛋白质三维结构特点及其与亲和力的关系, 这些结果不仅为肿瘤血管靶向治疗奠定了基础, 而且抗体的高效表达及其亲和力体外成熟提供了参考模型。

关键词 血管内皮生长因子 人单链抗体 高效表达 亲和力

肿瘤血管生成是目前肿瘤治疗研究的一个新策略^[1, 2], 比传统肿瘤细胞药物更具有应用价值。因为血管内皮细胞遗传比较稳定, 不易产生耐药性^[3]。尽管不同肿瘤细胞的特征不同, 但多数肿瘤都刺激新血管生成, 后者表现出一些不同于正常血管的共同特征, 因此血管具有特异性和广谱性。另外, 血管靶向药物直接作用于新生血管, 无需穿透到肿瘤深处, 少量药物损伤血管也会引起血栓造成大片肿瘤缺血坏死。目前研究上的研究热点是发现和开发新生血管特异刺激因子和抑制剂。在已发现的肿瘤血管生成因子中, 血管内皮生长因子(VEGF)^[4]是唯一特异地作用于血管内皮的多功能细胞因子。在肿瘤组织中过度表达, 已成为肿瘤血管的有效靶点。自从 Kim 等人^[5]首次报道以来, 许多研究证明抗 VEGF 鼠单克隆抗体或人源化抗体能够抑制动物体内的肿瘤生成和转移^[6, 7]。然而, 抗体在临床应用时或多或少地引起人抗鼠抗体免疫排斥反应。为了避免鼠抗体在应用中的局限性, 我们利用抗体噬菌体展示技术, 从人抗体文库中克隆了抗 VEGF 人单链抗体, 完成抗体的高效表达和亲和力成熟, 这将为 VEGF 人基因工程抗体的研究奠定良好的基础。

1 材料与方法

1.1 材料

噬菌体半合成抗体文库^[8]由英国剑桥大学 MRC 中心赠送; 抗 VEGF 抗体以及重组

1999-08-18 收稿, 1999-10-27 收修稿

* 国家“八六三”计划(批准号: 102-09-0204)和中国科学院百人计划基金资助项目

** E-mail: yanxy@sun.im.ac.cn

1) 河南安阳师范学院专科学校进修人员

2) 同济医科大学代培博士生