

简 报

天花粉蛋白裂解片段对补体系统的作用

曹 鹤 年 马 宝 骊

(上海第二医科大学免疫学教研室, 上海市免疫研究所基础免疫一室, 上海 200025)

关键词 天花粉蛋白裂解片段, 补体激活, 单克隆抗体封闭试验

天花粉蛋白是我国独特的抗早孕和中期引产药物, 对绒毛、葡萄胎也有治疗作用。近年来发现天花粉蛋白对 AIDS 病毒感染的细胞有杀伤作用, 并且已将其试用于临床治疗 AIDS 患者初见疗效, 因而引起国内外学者的关注^[1-4]。然而临床使用天花粉蛋白的一个最主要问题是它的副反应, 严重者可发生脑水肿及休克^[5]。这些副反应与补体系统被激活有关, 补体激活后产生的 C_{3a} 、 C_{5a} 等裂解产物参与一系列病理过程, 导致上述临床副反应的产生^[6]。已证明天花粉蛋白可以通过替代途径直接激活补体系统, 且这种激活作用可被抗天花粉蛋白单抗所封闭^[7], 提示天花粉蛋白引起机体过敏反应和类过敏反应与激活补体有关, 而激活补体的功能与其分子表面的抗原决定基结构也有一定联系, 但到目前为止, 对天花粉蛋白结构与功能关系的研究只限于完整的天花粉蛋白。

本文采用作者自制已知氨基酸序列的天花粉蛋白裂解片段, 通过交叉免疫电泳法观察其对抗补体系统的作用, 同时采用抗天花粉蛋白单抗做封闭实验, 进一步寻找天花粉蛋白激活补体功能的分子基础, 为彻底消除天花粉蛋白的副反应和蛋白质工程改造天花粉蛋白提供重要的实验依据。

1 材料与方 法

1.1 天花粉蛋白裂解片段 CBT_{11} 、 CBT_{12} 自制, 其纯化、鉴定及氨基酸序列将另文发表。

1.2 天花粉蛋白 上海市金山制药厂生产, 批号 870317。

1.3 正常人血清 18—20 岁健康人抽血后当即离心吸取上清, 置塑料管保存于 -80°C 。

1.4 抗人 C_3 血清 卫生部上海生物制品研究所产品, 批号 881201。

1.5 巴比妥缓冲液 pH 7.4 巴比妥缓冲液 (0.145mol/L NaCl 、 3.1mmol/L 巴比妥、 0.18mmol/L 巴比妥钠、 2.0mmol/L EDTA)。

1.6 抗天花粉蛋白单克隆抗体 本室自制。参

照罗玉芳等的方法对腹水中 Ig 定量^[8]。

1.7 交叉免疫电泳 参照 Laurell 的方法^[9], 用 pH 8.6 巴比妥缓冲液配制 $8 \times 6\text{cm}$ 大小的琼脂糖凝胶板, 厚度 0.5mm, 巴比妥终浓度 0.025mol/L , 琼脂糖凝胶浓度 1%。待凝胶板冷却成形后, 打直径 5mm 的加样孔, 每孔约加 $5\mu\text{L}$ 样品, 于 110V 电泳 1.5h 后, 中止电泳并切下带有已电泳分离的样品凝胶条, 以垂直方向嵌入含 1:60 抗人 C_3 血清的凝胶板, 作第二向电泳, 电压 40V, 10h 后取下凝胶板, 经漂洗、染色、脱色后, 测定各组分沉淀峰的高度, 计算 C_3 转化率。

补体 C_3 转化率 = $\frac{C_3 \text{ 裂解片段}(\beta 1A) \text{ 的峰高}}{C_3 \text{ 成分的峰高}} \times 100\%$

样品的处理: $50\mu\text{L}$ 正常人血清加 $50\mu\text{L}$ 天花粉蛋白裂解片段 ($300\mu\text{g/ml}$), 用生理盐水稀释。混匀后 37°C 水浴震荡 30min, 加入 $100\mu\text{L}$ pH 7.4 含 0.02mol/L EDTA 的巴比妥缓冲液, 吸取上清作交叉免疫电泳。天花粉蛋白及生理盐水组分别为阳性及阴性对照。单抗封闭试验在样品中再加入抗天花粉蛋白单抗 ($300\mu\text{g/ml}$) 共同温育。

2 实验结果

2.1 天花粉蛋白裂解片段 (CBT_{11} 、 CBT_{12}) 对抗补体系统的作用

CBT_{11} 、 CBT_{12} 与正常人血清共同温育 30min 后, CBT_{12} 组和天花粉蛋白组一样, 在交叉免疫电泳凝胶板上出现一个位于 $\beta 1A$ 位置上的 C_3 峰, 说明补体成分被激活; 而 CBT_{11} 组则没有变化, 仍为一个 C_3 峰, 见图 1。

各组的 C_3 转化率见表 1。

2.2 抗天花粉蛋白单抗对 CBT_{12} 致补体激活作用的影响

4 株单抗封闭试验表明, 3 株单抗均有不同程度的抑制 CBT_{12} 致补体激活作用, 而 1 株单抗却可以增强



图 1 天花粉蛋白裂解片段对补体的激活作用

A. 血清+天花粉蛋白; B. 血清+生理盐水; C. 血清+CBT₁₂ D. 血清+CBT₁₂+CBT₁₁; E. 血清+CBT₁₁

表 1 天花粉蛋白裂解片段对 C₃ 转化率的作用

组 别	C ₃ 转化率(%)
1. 血清+生理盐水	14±3
2. 血清+天花粉蛋白	41±5 ¹⁾
3. 血清+CBT ₁₂	43±5 ¹⁾
4. 血清+CBT ₁₁	18±5

n = 7

1) 与第 1 组比, P<0.01

图 2 4 株单抗对 CBT₁₂ 致补体激活作用的影响

A. 血清+CBT₁₂; B. 血清+生理盐水; C. 血清+CBT₁₂+3 号单抗 D. 血清+CBT₁₂+6 号单抗; E. 血清+CBT₁₂+17 号单抗; F. 血清+CBT₁₂+18 号单抗

表 2 4 株单抗对 CBT₁₂ 诱导的 C₃ 转化率的作用

组 别	C ₃ 转化率(%)
1. 血清+CBT ₁₂	35±4
2. 血清+CBT ₁₂ +3 号单抗	12±2 ¹⁾
3. 血清+CBT ₁₂ +6 号单抗	23±8
4. 血清+CBT ₁₂ +17 号单抗	16±2 ¹⁾
5. 血清+CBT ₁₂ +18 号单抗	59±5 ¹⁾

n = 7

1) 与第一组比, P<0.01

CBT₁₂ 的致补体激活作用。见图 2 及表 2。

3 讨 论

在补体系统被激活时,补体成分可因活化而改变其电泳谱,具有代表性的是 C₃,可由 β1C 变为 β1A,如果在新鲜血清中见到 C₃ 的 β1C 变为 β1A,就表明 C₃ 已在体内活化^[10]。我们利用这一原理采用交叉免疫电泳法来检测有无补体的激活。CBT₁₁,CBT₁₂ 对

补体系统激活作用的结果显示, CBT₁₂ 对补体系统有明显的激活作用(C₃ 转化率为 43%, P<0.01); CBT₁₁ 对补体系统无激活作用(C₃ 转化率 18%, P>0.05),提示天花粉蛋白在激活补体的过程中, CBT₁₂ 可能起重要作用,激活补体的活性基团很可能在 CBT₁₂ 序列内(107—158 氨基酸残基)^[11]。CBT₁₁ 对补体系统无激活作用,使我们很感兴趣;如果它具有完整天花粉蛋白的功能,就可以该片段取代完整的天花粉蛋白,降低副反应。

为研究 CBT₁₂ 激活补体的功能是否与该片段的抗原决定基有关,我们采用 4 株抗天花粉蛋白单抗作封闭试验,这 4 株单抗已被证明能抑制完整天花粉蛋白分子对补体的激活作用^[7],可见 3 株单抗在不同程度上可抑制 CBT₁₂ 对补体系统的激活(C₃ 转化率分别为 12%, 23%, 16%),这一结果与完整天花粉蛋白的实验结果相符,提示天花粉蛋白裂解片段 CBT₁₂ 对补体的激活作用与它的抗原决定基有关,当抗天花粉蛋白单抗与 CBT₁₂ 的抗原决定基结合后,封闭了其激活补体的功能;同时也证明了天花粉蛋白致补体激活作用的活性基团可能在 CBT₁₂ 序列内。而有 1 株单抗不仅不能抑制 CBT₁₂ 对补体的激活,反而起增强作用(C₃ 转化率 59%; P<0.01),可能解释为该单抗结合的是 CBT₁₂ 上的另一决定基,当单抗与之结合后,反而增强了 CBT₁₂ 的致补体激活作用,这一推测的合理性还有待于作这些单抗间的竞争抑制实验来证实。

本研究使我们对天花粉蛋白激活补体的分子基础有了深入一步的认识,并促进以下的研究:采用人工合成多肽或氨基酸置换实验对 CBT₁₂ 进行研究,更精确的确定是哪几个氨基酸残基在激活补体中起作用;探索一种采用单抗或配基封闭 CBT₁₂ 或天花粉蛋白分子表面活性基团的方法,使其对补体系统激活的作用降低;通过一些生物学检测系统,对不能激活补体的天花粉蛋白裂解片段检测其生物学功能,力争找到副反应小,具有完整天花粉蛋白生物学活性的片段。

参 考 文 献

- 1 Chang M C et al. *Contraception*, 1979; 19 (2): 175
- 2 金毓翠等,生殖与避孕,1981;1(2):9
- 3 Michael S M et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989; 86: 2844
- 4 Dlane G. *Nature*, 1990; 344: 183
- 5 刘国武等,生殖与避孕,1980;(12):11
- 6 Frank M M et al. *N Engl J Med*, 1987; 316: 1525
- 7 陈汉,马宝璐. 中国免疫学杂志,1990;6(5):272
- 8 罗玉芳等,中国免疫学杂志,1988;4(3):166
- 9 Killingsworth L M et al. In: Ritzman ed: *Physiology of immunoglobulins, diagnosis and clinical aspects*. New York: Alan R. Liss, Inc, 1982:89—96
- 10 Lambris J D et al. *Mol Immun*, 1986; 23: 1237
- 11 Wang Y et al. *Pure and Appl Chem*, 1986; 58(5): 789