

补体与红细胞膜的结合作用

潘华珍 李彩华 靳 艳

(中国医学科学院基础医学研究所, 北京)

被激活的补体 $3(C_3)$, 能与红细胞膜结合; C_{3b} 与红细胞膜形成的复合物, 又激活一系列补体 (C_5-C_9), 使细胞溶解。有些溶血性疾病与此种补体溶血有关。我们实验曾证明, 阵发性睡眠性血红蛋白尿症 (PNH) 红细胞对补体溶血敏感^[1]。为了探讨 PNH 补体溶血反应的机理, 我们曾用对唾液酸专一结合的鲨鱼凝集素处理 PNH 红细胞, 表明它能降低补体溶血, 并证明它与红细胞膜血型糖蛋白结合^[2]。看来鲨鱼凝集素可能影响红细胞膜与 C_{3b} 的结合, 从而降低溶血。本文探讨 C_{3b} 与红细胞膜结合部位与结合的基团。

一、试剂

1. 酶标底物溶液: pH 7.4, 0.04M PBS 100ml; 二胺基联苯胺 50mg(3'3'-diaminobenzidine), Sigma 产; 3% H_2O_2 100 μ l。

2. 唾液酸酶: Behringwerke AG,

3. 唾液酸酶稀释液: 0.145M NaCl, 2mM $CaCl_2$,

4. 1mM 的二硫二尼克酸 (6,6'-dithiodinitrocinic acid), Sigma 产。

二硫二尼克酸(CPDS) 3.08mg } 加 1.5 ml PBS
NaHCO₃ 1.68mg } 调 pH 7.3

5. 终止试剂: 0.25M Tris 3.02g, 5% SDS 25ml(25%), 1.25M 蔗糖 48.8g, 0.1M 巯基乙醇 1.5g, 用 HCl 调 pH7.5。10mM EDTA 50ml(0.2M pH7.4)

二、方法

1. C_3 与 C_{3b} 的提纯, 鉴定 见潘华珍法^[3]。

2. 辣根过氧化物酶标记 C_{3b} 将冷冻干燥的 C_{3b} 2mg, 加 pH 6.8, 0.1M PBS 0.6ml, 于 4℃ 下, 用 PBS 透析 12 小时, 加入过氧化物酶

3mg 和 1.25% 戊二醛 30 μ l, 室温放置 8 小时后, 4℃ 过夜。再经 Sephadex G-200 柱层析分离, 在 280nm 与 403nm 分别测其 O.D 值。存冰箱内备用。

3. 红细胞膜 SDS-PAGE 方法 见文献[4]。用考马氏亮蓝染蛋白; 用 PAS 法染糖蛋白^[5]。

4. 硝酸纤维膜电转移实验 硝酸纤维膜 (4 × 6cm), 在 pH 8.3, 0.005M Tris-甘氨酸电泳液浸泡 30 分钟以上, 待红细胞膜的 SDS-PAGE 完毕后, 纵向切下胶条 (3 × 6cm), 立即转至硝酸纤维膜上, 电泳; 电流 60mA, 电压 200V, 4℃, 8 小时。电泳完毕后, 取膜置于试管中, 用 pH 7.4, 0.01M PBS-T (用 PBS 配成 0.3% Tween 20 溶液), 37℃, 洗三次, 每次 10 分钟。

5. 硝酸纤维膜-酶标 C_{3b} 染色实验 上述硝酸纤维膜纵向切成二条, 分别置于两管中; 一管加入酶标 C_{3b} , 另一管加入 PBS 为对照; 放 37℃, 60 分钟, 弃上清, 用 PBS-T 洗三次, 每次 10 分钟; 加入酶标底物溶液, 待硝酸纤维膜上区带显色后, 换 H_2O , 终止反应。

6. C_{3b} 与红细胞膜结合曲线 取试管 6 支, 分别加入 0.2ml 红细胞膜 (2mg 1ml) 及不同浓度的酶标 C_{3b} 0.2ml, 蛋白含量分别为 0.15 γ , 0.25 γ , 1.0 γ , 2.0 γ , 4.0 γ , 0 (加 0.2ml PBS 为对照), 37℃, 保温 60 分钟; 离心, 弃上清, 用 PBS 洗三次, 加入酶标底物溶液 50 μ l, 反应 10 分钟, 加入终止试剂 100 μ l, 终止反应; 在 492nm 比色。

7. 唾液酸酶水解红细胞膜 将唾液酸酶 (1 单位) 用酶稀释液稀释 (酶: 酶稀释液 = 0.08:0.92), 加等体积的红细胞膜, 37℃, 保

温 2 小时;离心,弃上清液,用 pH 7.4, 0.01M PBS 洗三次;置冰箱内备用。

8. CPDS 处理红细胞膜 红细胞 0.2ml, 加 0.4ml CPDS 溶液, 25℃ (室温) 15 分钟, 再用 PBS 洗三次, 置冰箱内备用。

9. 唾液酸酶, CPDS 对 C_{3b} 与红细胞膜结合的影响 取三组试管, 每组 6 管。第一组各加入 0.2ml 的红细胞膜为对照; 第二组各加入唾液酸酶水解的红细胞膜 0.2ml; 第三组各加入 CPDS 处理的红细胞膜 0.2ml, 每管含蛋白量相同。以下步骤按本文方法[6]进行。

结 果

1. 电泳 PAS 染色及硝酸纤维膜与酶标 C_{3b} 反应图谱见图 1 (见封 3)。从图 1a 中可见五条明显区带, 为血型糖蛋白 A 及其二聚体 A_2 , B 及 C。图 1b (见封 3) 可明显地看到在血型糖蛋白 A 及 A_2 处有区带, 说明 C_{3b} 与红细胞的血型糖蛋白 A 结合。

2. C_{3b} 与红细胞膜结合曲线见图 2。从图中可以看出, C_{3b} 与红细胞膜结合随着加入 C_{3b} 量增加而增加。

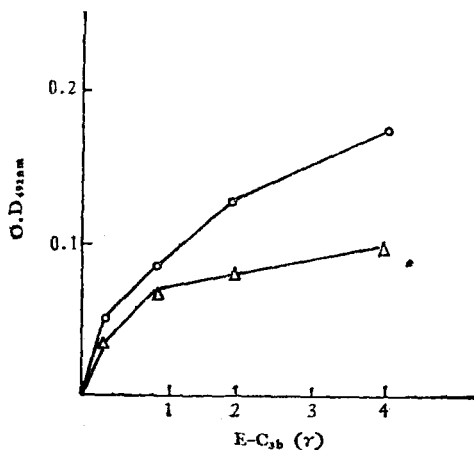


图 2 C_{3b} 与红细胞膜结合曲线

3. 经唾液酸酶处理的红细胞膜, PAS 染色的电泳图谱见图 3 (见封 3)。由图可见, 经唾液酸酶水解后的红细胞膜染色明显变浅, 说明唾液酸已被水解。将唾液酸酶水解后的红细胞膜与 C_{3b} 作结合曲线, 结果见图 4。由图可知, 红

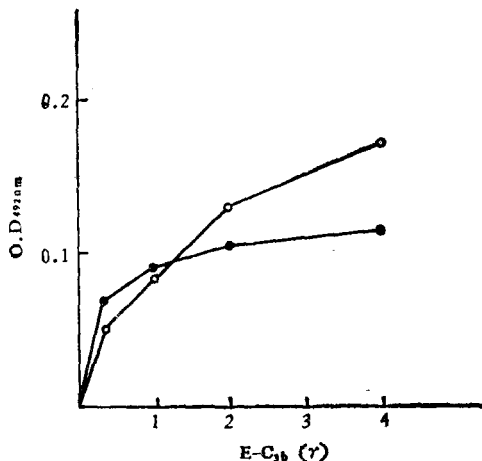


图 4 唾液酸酶处理与未处理的红细胞膜与 C_{3b} 结合曲线

○—○ 未经处理 ●—● 经酶处理

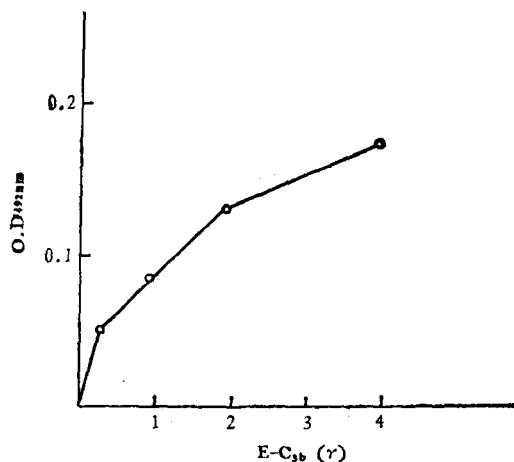


图 5 经二硫二尼克酸处理后及未处理的红细胞膜与 C_{3b} 结合曲线

○—○ 未处理 △—△ 经二硫二尼克酸处理后

细胞膜上唾液酸大部分被水解之后, 它与 C_{3b} 结合的量比未处理者低。

4. 二硫二尼克酸处理红细胞膜后, 与 C_{3b} 结合曲线见图 5。由图中可知, 处理后红细胞膜结合 C_{3b} 的量较未处理者少。

讨 论

从结果图 1 可见, C_{3b} 是与红细胞膜血型糖蛋白 A 结合。(A, A_2), A_2 是 A 的二聚体。可能红细胞膜内 A 与 A_2 是互相转换的; 在一定条件下, 可趋于平衡。膜内单体形式多于二聚体, 所以 A 的区带较深, A_2 较浅。

钙通道阻滞剂和 β -肾上腺阻滞剂在 双层脂膜上诱导的跨膜电势

沈霞昌

石彪

(山东医学院物理教研组, 济南) (四川大学微生物教研组, 成都)

H. Ti Tien

(美国密执安州立大学生理和生物物理系)

钙通道和 β -肾上腺阻滞剂是治疗心血管疾患的两大类药物, 它们能够缓解一些心血管疾病的症状, 如心律不齐、心绞痛和高血压等, 因而在临床上已得到广泛应用, 但其作用机理却至今不清楚。通过本实验, 我们发现: 这些药物可在人工双层脂膜上建立跨膜电场。可能正是这个跨膜电场与膜中带电的离子通道发生电作用, 改变离子通道的开闭状态, 因而触发一系列的生理学效应, 这可能是这些药物发挥药理学作用的一个重要方面。

很多 β -肾上腺阻滞剂都是局部麻醉剂, 这些局麻剂与脂膜的相互作用已得到广泛研究。Schlieper 等对 propranolol 一类 β -肾上腺阻滞剂在 BLM 上的效应已作了系统的研究^[1]; Phadke 等根据核磁共振研究提出了解释 propranolol 与脂膜发生相互作用的机制^[2]。与此相反, 迄今对钙通道阻滞剂的研究并不多见, 而以

人工膜为材料加以研究的就为数更少。本实验正是侧重这类药物的 BLM 研究。

一、材料与方法

1. 按 H. Ti Tien^[3] 方法形成双层脂膜。测量电极为甘汞电极。药物所诱导的跨膜电势用 610 B 型静电计测量。膜形成液的成分(除特殊注明处外)为:

磷脂酰胆碱 (PC) 3.1 % (W/W)

磷脂酰乙醇胺 (PE) 1.7 % (W/W)

磷脂酰丝氨酸 (PS) 1.0 % (W/W)

氧化胆固醇 (C) 1.1 % (W/W)

上述药品均为美国 Sigma 产品。

2. 三种钙通道阻滞剂 (verapamil, diltiazem, nifedipine) 和五种 β -肾上腺阻滞剂 (propranolol, sotalol, labetalol, lopressor, transcor), 均由美国制药公司提供。为避免因药物仅加入

从图 2 可看出, 红细胞膜结合 C_{3b} 的量随着 C_{3b} 量增加而增高。经唾液酸酶水解与 CPDS 处理的红细胞膜结合 C_{3b} 量较未处理者明显降低(图 4, 5), 说明 C_{3b} 与血型糖蛋白结合, 与糖基唾液酸及蛋白的巯基有关。血型糖蛋白含唾液酸量较多, 而且都在糖蛋白寡糖链末端, 所以 C_{3b} 与唾液酸结合是可能的。CPDS 是特异与巯基结合的化合物, 在较短时间内 (2 小时以内) 不通过膜只与膜外侧巯基结合^[6]。CPDS 处理的红细胞膜与 C_{3b} 结合减少, 可能有两种原因: 一是直接影响红细胞膜与 C_{3b} 结合, 巯基

是结合基团; 另一是 CPDS 结合, 使红细胞膜蛋白发生空间构型的变化, 从而影响它与 C_{3b} 的结合。

参 考 文 献

- [1] 张之南等: 《中国医学科学院院报》, 1(1), 57, 1979.
- [2] 王克夷等: 《中国医学科学院院报》, 6(1), 1984.
- [3] 潘华珍等: 《中国血液学杂志》, 2(2), 1981.
- [4] Tairbanks: *Biochemistry*, 10(2), 4406, 1969.
- [5] 王世中主编: 《免疫化学技术》, 科学出版社, 1980.
- [6] Mehrishi, J. N. et al.: *Nature*, 224, 563, 1969.

[本文于 1984 年 12 月 26 日收到]

“补体与红细胞膜的结合作用”一文的图 1, 3

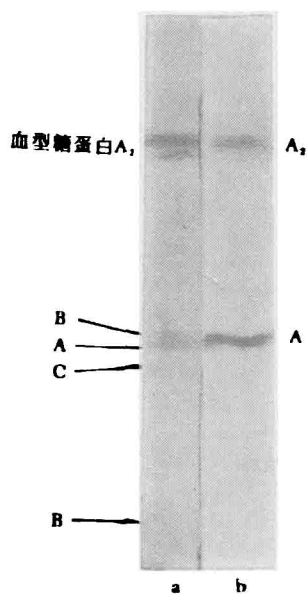


图 1 PAGE 糖蛋白染色及硝酸纤维膜电转移酶标 C_{1b} 染色图谱

1a: PAGE 糖蛋白染色图谱

1b: 硝酸纤维膜电转移酶标 C_{1b} 染色图谱



图 3 经唾液酸酶处理与未处理的红细胞膜聚丙烯酰胺 PAS 染色图谱

3a 经唾液酸酶处理

3b 未经酶处理

~~~~~

“叶绿体核糖体的简易制备法”一文的图 1—2

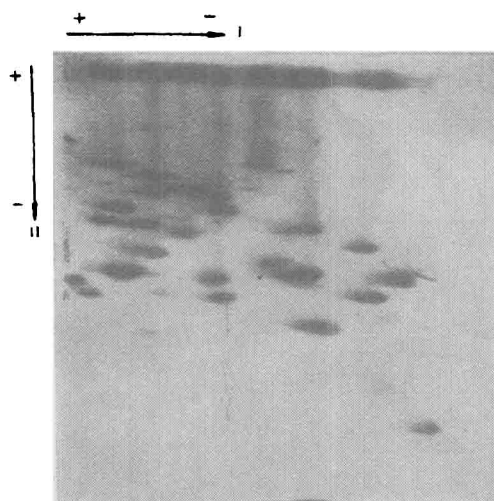


图 1 甜菜叶绿体核糖体双向电泳

I: Tris-硼酸, pH8.6 缓冲系统  
II: 乙酸-KOH pH4.5 缓冲系统

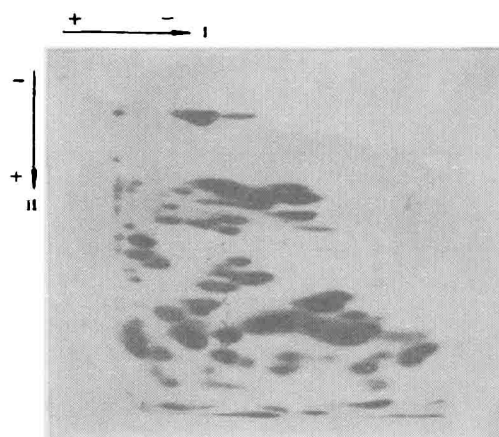


图 2 番茄细胞质核糖体双向电泳系统

I: Tris-硼酸 pH8.6 系统  
II: SDS-PAGE pH8.8 系统