

Mg^{2+} 诱导脂质体融合,使体积较大的脂质体的量稍有增加,从而形成更多的脂酶体。但是这微小的变化似乎很难解释 $1mM Mg^{2+}$ 对重建 H^+-ATP 酶酶活会明显提高^[2,4]。何况小于 $12.5 mM Mg^{2+}$, 对脂质体大小与形成脂酶体的量并没有产生明显的影响。

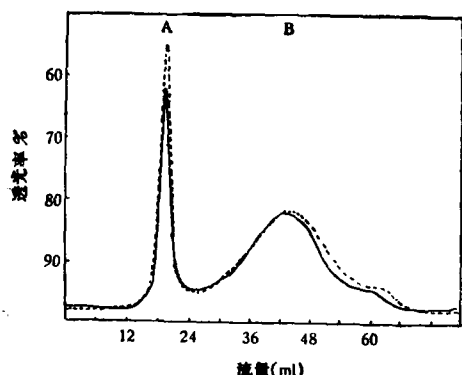


图8 Mg^{2+} 对嵌有 H^+-ATP 酶的脂酶体重建的影响
——不含 Mg^{2+} ----含 $12.5mM Mg^{2+}$

综上所述, H^+-ATP 酶重建对脂质体大小有一定的选择性, 它倾向于在较大脂质体上进行重建。 Mg^{2+} 提高重建 H^+-ATP 酶酶活, 看

来主要并不是影响脂质体大小,从而增加脂酶体的形成。

本文所用的猪心线粒体 H^+-ATP 酶系本所张淑秀同志制备提供,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] 杨福愉等:《生物化学与生物物理学报》, 12, 193—2000, 1980。
- [2] 杨福愉等:《中国科学》, 1, 86—91, 1981。
- [3] Kagawa, Y. et al., *J. Biol. Chem.*, 246, 5477 1971.
- [4] Eytan, G. D. et al. *J. Biol. Chem.*, 251, 6831—6837, 1976.
- [5] Sone, N. et al., *J. Biochem.*, 81, 519, 1977.
- [6] 李才元等《膜分离科学与技术》, 11, 1—7, 1982。
- [7] Bartlett, G. R.: *J. Biol. Chem.*, 234, 466—468, 1959.
- [8] 潘家秀等《蛋白质化学技术》, 28, 1973, 科学出版社。
- [9] Nejat Duzgnes, et al.: *J. Membr. Biol.*, 59, 115, 1981.
- [10] Rehfeld, S. J. et al.: *FEBS Letters*, 123, 249, 1981.
- [11] Kagawa, Y. et al.: *J. Biol. Chem.*, 241, 2475, 1966.
- [12] Eytan, G. D. et al.: *FEBS Letters*, 85, 175, 1978.

[本文于1983年3月25日收到]

两种不同蛋白质在兔体内代谢率及免疫性的比较

李 刚 杜 国 光 刘 思 职

(北京医学院生化教研室)

抗原性何以有强有弱,一向受到生物学家和医学家的重视。众所周知,同一抗原在甲种动物中为一强抗原,而在乙种动物中可为弱抗原;不仅同种动物的不同个体对同一抗原的反应可表现强弱程度不同,甚至同一个体在不同生理、病理状态,也可表现有不同强弱的反应。究其原因是多方面的。早年人们多认为抗原性的强弱只与抗原本身的结构特征有关。最近,又多侧重于机体反应性的差异,认为主要和机体的免疫识别机制,以及抗体生成的调节机构有关。我们认为引起抗原性强弱的原因很复

杂,事物的两个方面——抗原与抗体,均不容忽视。说明这个问题,在理论上和实践上都有一定的意义。我们拟从不同抗原在体内代谢率的高低着手进行探讨。

我们以兔为对象,选择两种结构不同的蛋白质,即鸡蛋清蛋白(下简称EA),和狗血红蛋白(下简称Hb)进行对比研究。人们早已熟知,EA对兔是一种强抗原;而Hb乃系弱抗原^[1,2]。比较它们在兔体内代谢率的差异,将有助于进一步探讨抗原性强弱与其在体内存留的关系。

检测兔体内存留抗原的方法甚多,早年用免疫沉淀法,特异性强,但其灵敏性低,不能追踪检出微量存积抗原。用的是同位素示踪法,方法灵敏,但体内同位素放射性的显示也未必能完全代表该特异抗原的存在。我们先试用特异荧光抗体沉淀相应抗原,以荧光分光光度计进行定量检测。可惜只能检测到微克水平,不能满足本实验全部要求。本文采用反向被动血凝法进行检测,反应特异,灵敏性高(可检测到 10^{-8} — 10^{-9} 克水平)。定量关系也还好。

一、材料与方 法

1. 实验动物

选用青蓝色雄性成年健康家兔,体重2.5公斤左右。

2. 化学试剂

均为分析纯。

3. 抗原

(1) 结晶鸡蛋清蛋白 按吴宪氏等^[3]的方法制备,重结晶三次。

(2) 结晶狗血红蛋白按 Kabat 氏方法^[4]制备,重结晶三次。

4. 抗 EA-IgG 及抗 Hb-IgG 的制备

分别用 EA 和 Hb 免疫家兔后,将得到的相应家兔抗血清按王世中氏方法^[5]经盐析和 DEAE-纤维素柱,收集 $OD_{280} > 0.4$ 的洗脱液,冷冻干燥后放冰箱保存。

5. 间接血球凝集试验

(1) 血球的醛化 根据《实验免疫学》的方法^[6],并稍加改良,醛化绵羊红血球最后以 PBS 配制成 10% 悬液,分装小安瓶中,熔封后放 -20°C 冰箱保存,临用时以生理盐水配制成 2.5% 醛化血球液。

(2) 间接血凝法测抗体 血球的致敏:采用 Gold 氏^[7]的三氯化铬法,并加改良。取抗原液(0.5 毫克 EA/毫升 PBS 或 1 毫克 Hb/毫升 PBS)1 毫升,加 1:20,000 CrCl_3 液 0.5 毫升,置 37°C 水浴 10 分钟,时加振荡。再依次加入 2.5% 醛化血球液 0.4 毫升和 1:3,000 鞣酸液 0.5 毫升,继续温育 15 分钟,离心弃上清。沉淀

以 PBS 洗两次,再用含 2% 灭活正常兔血清的 PBS 洗一次,最后将沉淀悬于稳定液 2.5 毫升中(稳定液为含 10% 蔗糖,2% 灭活正常兔血清的 PBS 液),即配制成 0.4% 致敏醛化血球悬液。

抗体的检测:取 96 孔 V 形有机玻璃凹板,每孔先滴加 PBS 0.1 毫升。第一孔加待测样品(如血清)0.1 毫升,然后依次成倍递减稀释。系列稀释的总孔数根据需要而定。每孔加入 0.4% 致敏醛化血球悬液 0.1 毫升,放微量振荡器上振荡混匀。12 小时后观察结果。严密的对照实验为间接血凝法所必需。本实验同时做四组对照。(a) 0.1 毫升 PBS 加 0.1 毫升未致敏血球悬液,以排除在既无特异抗原,又无特异抗体存在下,该血球的可能自身凝集所致的假阳性反应。(b) 0.1 毫升 PBS 加 0.1 毫升致敏醛化血球悬液,以排除在无特异抗体存在下,经特异抗原致敏后血球可能自身凝集而产生的假阳性反应。(c) 按上系列稀释的待测样品 0.1 毫升中,各加未致敏的血球悬液,以排除未经特异抗原致敏的血球,与抗血清的可能非特异性凝集。(d) 按上系列稀释的正常兔血清 0.1 毫升中,各加致敏醛化血球 0.1 毫升,以排除可能存在于正常兔血清中的非特异性凝集因子,因为它能导致致敏血球的非特异性凝集,而产生假阳性反应。

结果的判定 阴性结果为血球在凹孔中心凝集成一小点。阳性结果为血球呈模糊一片,或呈散在点彩状。

(3) 反向间接血凝法测抗原 血球的致敏:方法基本同间接血凝法。唯抗原液改为含 20 微克的抗 EA-IgG (或抗 Hb-IgG) 醋酸缓冲液 1 毫升(醋酸缓冲液 0.075M, pH5.0)。鞣酸浓度减至 1:40,000。

抗原的检测:方法基本同间接血凝法。唯样品为实验兔组织(肝、脾或淋巴结)匀浆上清或血清。故第(d)组对照中的正常兔血清有的需要改为正常兔的相应组织匀浆上清。

“标准孔”:为使每批实验结果准确可靠,互可对比。我们采用“标准抗原”,每次用标准抗原平行作一系列“标准孔”,以其最高稀释度

呈阳性孔所含的抗原微克数为标准,即相当于样品测定中,呈阳性反应之最高稀释度孔所含的抗原微克数。然后换算成每克组织或每毫升血清所含抗原的微克数。

抗原回收率测定:为排除兔各组织匀浆对待测抗原的可能影响,另取正常兔各组织匀浆上清0.1毫升,加已知量的抗原液(EA或Hb)0.1毫升,依次稀释。放置1小时后,每孔加入与抗原相应的IgG致敏的醛化血球0.1毫升,混匀。同时作“标准孔”。实验结果回收率均为100%左右。

6. 免疫家兔抗体生成的检测

取兔7只编号。分别静脉注入EA(3只兔)和Hb(4只兔)各30毫克。一周后用间接血凝法检测血中抗体滴度。每3—5天测一次,两周后,再分别静脉注入EA和Hb各30毫克强化之,相继每隔3—5天测抗体滴度,记录结果,历时共35天。

7. 组织中存留抗原的检测

分别将抗原(EA或Hb)用生理盐水配成15毫克/毫升的溶液,每兔2毫升(相当于30毫克),由耳缘静脉注入。于不同时间(5、20、40、60、120和360分钟)分别用剪刀剪断颈动脉放血致死。每一抗原、每一时间用兔3只。收集部分血液,以分离血清。立即取出肝、脾(用冷生理盐水灌洗以除去血液)和淋巴结(主要是颌下淋巴结)用滤纸吸干,称重(脾脏则在灌洗前先称重),分别制成50%的匀浆。经冷冻离心(20,000转/分)后,取上清。用反向间接血凝法分别检测肝、脾、淋巴结和血清中的抗原含量。

二、结果与讨论

1. EA和Hb在兔体内产生抗体能力的比较

众所周知,对于兔,EA的抗原性甚强,而Hb的抗原性极弱,但尚未在相同实验条件下进行平行对比。本实验用同样剂量的两种抗原EA和Hb,分别经静脉注入各兔体内,在不同时间同时取血,用间接血凝法检测相应抗体的滴度(见表1)。实验结果表明,注射后第29

天时,3只接受EA注射的家兔全部产生抗体,且滴度较高(1:256—1:2056);而4只接受Hb注射的家兔,只有1只有微量滴度(1:32)。在第35天后,血清抗体的滴度即趋下降。可见在兔体内,EA的抗原性确较Hb者为强。另外,我们用荧光偏振法测定了同一时间内两种不同抗体对其相应抗原的亲合力,发现抗Hb的亲合力比抗EA者大,这或许与这两种蛋白质的抗原性强弱有关^[2]。

表1 兔静脉注射EA或Hb后血中抗体滴度的动态变化

兔号	注射抗原*	抗 体 滴 度							
		7天	10天	14天**	19天	24天	29天	35天	
1	Hb	—	—	—	—	—	—	—	
2	EA	1	—	1	2	128	256	32	
3	EA	—	—	—	8	64	512	64	
4	EA	32	32	64	1	1028	2056	1028	
5	Hb	—	8	2	—	—	32	16	
6	Hb	—	—	—	4	—	4	2	
7	Hb	—	—	—	—	—	—	—	

* 每兔注射抗原30毫克
** 第15天时各兔再静注相应抗原30毫克强化

2. EA和Hb在兔体内不同组织中存留的比较

各兔在分别静脉注入EA或Hb后,于不同时间(5、20、40、60、120和360分钟)用反向间接血凝法检测肝、脾、淋巴结和血清中相应抗原的含量(微克/克组织)。分别将EA和Hb在各组织中存留量的几何均数对时间作图(见图1和图2)。从图中可见,不论EA还是Hb,均于20—40分钟,在这些组织中摄取达到最高值,然后逐渐下降。抗原在各组织中存留的多少也不相同,EA和Hb在肝脏中含量均高于其它组织。峰值分别为EA3.12微克/克组织(40分钟时)和Hb8.68微克/克组织(20分钟时)。在脾脏中的存留量,峰值分别为EA3.098微克/克组织(20分钟时)和Hb8.227微克/克组织(40分钟时)。在淋巴结中存留量,峰值分别为EA2.516微克/克组织(20分钟时)Hb4.875微克/克组织(20分钟时)。这与早先人

们的实验结果是一致的,即肝脏是抗原存留较多的器官,其次是脾脏和淋巴结。在我们的实验中,抗原注入体内后6小时,各组织中仅有微量(0.02—4.62 微克/克组织)可被检测到。按照它们的代谢衰变率,我们很难想象抗原能在体内成年甚至终身保留。这与从前人们用同位素示踪等方法证明抗原可以在体内存留数年的结论不同^[5,8,10]。

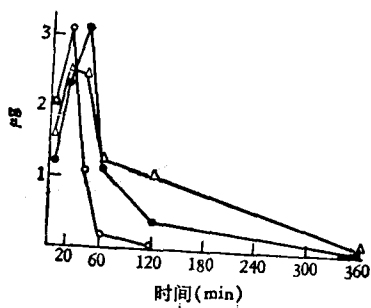


图1 兔静脉注射EA后,EA在肝、脾、淋巴结中衰变的比较
—·—·— 肝, ○—○脾, △—△淋巴结

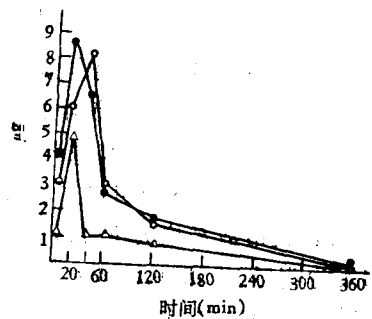


图2 兔静脉注射Hb后,Hb在肝、脾、淋巴结中衰变的比较
--- 肝, ○—○脾, △—△淋巴结

3. EA 和 Hb 在同一组织中含量的比较

从图1、图2中可以看出,Hb在肝、脾和淋巴结中的最高存留量均高于EA(相差1.96—2.8倍)。由此可见,Hb较EA容易被组织摄取。值得注意的是,Hb在血液和组织中的存留均高于EA,这可能是由于Hb虽易被组织摄取,但却不易被组织分解处理。也可能是因为EA的分子量较小,较易由肾等途径排出,使血中廓清较Hb为快。我们在兔静注EA30毫克后4小时,确在其尿中检测到微量EA。

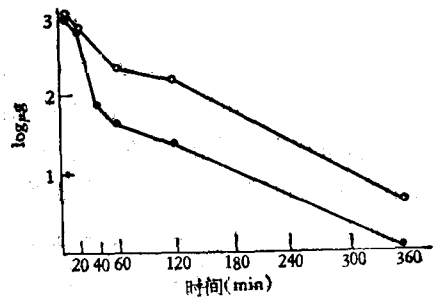


图3 EA 和 Hb 在兔血液中的廓清的比较
●—● EA ○—○ Hb

但却不能在相应注Hb兔的尿中测到Hb。另外,两种抗原在组织中分解情况不同,在肝和脾中,当抗原摄取达到最高量后(20—40分钟),开始下降,但Hb的存留量相应地高于EA。表明EA在脾组织中的分解代谢快于Hb。而在淋巴结中,Hb在20分钟时达到峰值后,即急剧下降,甚至在40分钟时已低于EA的存留,以后逐渐下降。EA在淋巴结中的降解为何反较Hb慢,我们已另做进一步探讨。从图3可以看出,EA在血中廓清稍快于Hb,二者在注入后1小时之内,血中含量很快下降,这可能是由于抗原快速进入组织所致。在抗原循环廓清的三个时相中。这正是第一相快速平衡期。如以五分钟时血中抗原的含量为100%,则在1小时时,血中EA和Hb分别丢失95%和80%左右。这个结果同以前Pratt^[11]等的结果相似。他们把偶氮染料标记到EA上,观察抗原在兔循环中的消失速率,发现大剂量抗原注入和小剂量抗原注入,在循环中的廓清是不同的。当注入19毫克抗原时,在第一个小时丢失80%;而注入150毫克时,同一时间只丢失30%。本实验注天然蛋白质-EA30毫克,在第一个小时丢失95%以上。这个差别可能是由于天然EA和经偶氮染料标记的EA代谢未必相同;也可能由于兔的个体差异引起。Pratt的实验是用1只兔子,本文各时间的数据均是取3只兔的平均值。Richter^[12]曾将EA和牛血清清蛋白(分子量69,000)静脉注入兔体内,比较二者的循环廓清,发现EA的廓清快,并认为

是由于 EA 分子量较小的缘故。但以后其他实验又认为分子量较大者易于廓清^[13,14]。我们实验中的 Hb 分子量为 68,000 与 BSA 相仿, 大于 EA (分子量 45,000), 而其廓清则稍慢于 EA, 说明抗原在循环中的廓清不完全与分子量的大小有关, 也可能与抗原蛋白质的异源性有关。狗 Hb 在一级结构上较接近于兔 Hb (见表 2)^[15], 这可能也是 Hb 抗原性弱的一个原因。

表 2 狗 Hb 与兔 Hb 氨基酸组成比较

Hb 来源	α -链氨基酸数	不同数	β -链氨基酸数	不同数
狗	143	25	146	16
兔	143		146	

4. EA 和 Hb 在各组织中代谢率的比较

图 4 至 6 表示在不同时间, 两种抗原在同一组织中的存留量。通过比较这两抗原在组织中的衰变常数 K , 即可知抗原在组织中的代谢速率。抗原在体内的衰变可表示为:

$$\frac{dA}{dt} = -KA \quad (1)$$

式中 K 是衰变常数。 A 是抗原含量。 t 是时间(分)。对上式分离变量并积分

$$\int \frac{dA}{A} = \int -K dt \quad (2)$$

得到

$$\ln A = -Kt + C \quad (3)$$

式中 C 是常数。

$$\text{或 } A = Ce^{-Kt} \quad (4)$$

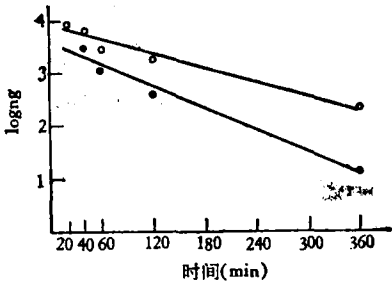


图 4 EA 和 Hb 在肝中衰变率的比较

●—● EA ○—○ Hb

首先用抗原在不同时间存留量几何均数

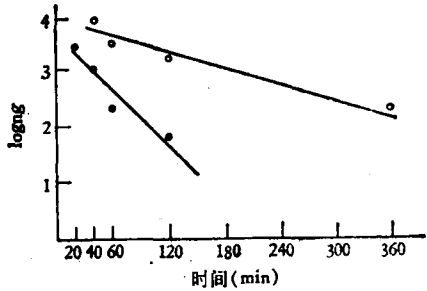


图 5 EA 和 Hb 在脾中衰变率的比较

●—● EA ○—○ Hb

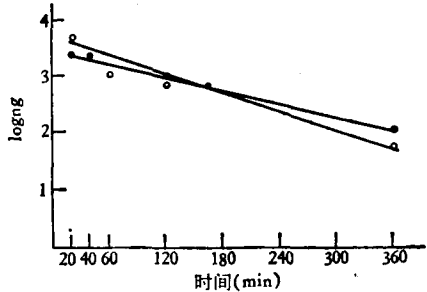


图 6 EA 和 Hb 在淋巴结中衰变率的比较

●—● EA ○—○ Hb

(纤克/克组织)的对数对时间作图,用最小二乘法分别计算两种抗原在各组织中衰变率,求出衰变常数 K 。根据式(4), K 越大者 A 越小,则分解代谢越快。从表 3 中可见。在肝、脾组织中 EA 的衰变常数 K 均大于 Hb 的,其中脾组织中的尤为明显。其 EA 的 K 值为 0.038, 而 Hb 的 K 值为 0.01067, EA 的 K 值比 Hb 的约大 3.5 倍。 K 值在肝和淋巴结也有差别,但均无成倍的变化。上述结果说明 EA 在脾脏中的分解代谢快于 Hb。一般认为,如果抗原由静脉引入,则大部分抗体系由脾脏产生。EA 在脾脏组织中衰变快,可能正是其抗原性强的表现。有人认为,抗原必须先经巨噬细胞的处理,方能提供给淋巴细胞,以刺激相应抗体的生成,也有人认为,有些抗原的决定基处于抗原分子内部,只有分解成碎片后才能暴露其决定基而显示抗原性。另外发现,不易产生抗体的抗原常可在体内较长期地被保留。如肺炎球菌多糖对兔是个非抗原性物质,其在体内的存留时间很长,多聚 D-氨基酸的循环半衰期也很长,它也不能产生

表3 EA 和 Hb 在兔体内各组织中衰变
常数 (K) 的比较

抗 原	肝	脾	淋巴结
EA	0.01587	0.0380	0.00825
Hb	0.0103	0.01067	0.01235

抗体。所以,狗 Hb 在兔脾脏中衰变较慢,可能与其抗原性较弱有关。我们并不试图由此作出推断:“强抗原较弱抗原更快地被机体处理掉”。但通过本文的实验结果,将提示我们研究更广泛的抗原材料,以进一步探讨抗原性的强弱与其在体内代谢衰变率的关系。

参 考 文 献

- [1] Opie, E. L.: *Immunol*, 8, 55, 1923.
[2] 李 刚、杜国光、聂松青《生物化学与生物物理进展》5, 1982。

- [3] 吴宪、周启沅《生物化学试验》中华医学会编译部出版, 1939。
[4] Kabat, E. A.: *Experimental Immunochemistry*, 464, 1948.
[5] 王世中《免疫化学技术》科学出版社, 1980。
[6] 北京医学院微生物教研组:《实验免疫学》人民卫生出版社, 1980。
[7] Gold, E. R., et al.: *J. Immunol.*, 99, 859, 1967.
[8] Ingraham, J. S.: *J. Infect. Dis.*, 89, 117, 1951.
[9] Garvey, J. S. et al.: *J. Exptl. Med.*, 107, 497, 1958.
[10] Compbell, D. H., et al.: *Intern. Arch. Allergy. Appl. Immunol.*, 12 70, 1958.
[11] Pratt, H. N. et al.: *J. Immunol.*, 40, 163, 1941.
[12] Richter, M. et al.: *J. Immunol.*, 84, 420, 1960.
[13] Nakamura, R. M., et al.: *J. Immunol.*, 100, 376, 1968.
[14] Stark, J. M.: *J. Immunol.*, 108, 800, 1972.
[15] Gerald, D.: *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology*, 3rd. ed. Chemical Rubber Co. 1976.

[本文于 1983 年 3 月 7 日收到]

ADP 诱导血小板凝聚的动力学和热力学 及其临床应用的研究

施永德

陈松鹤

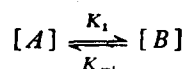
(上海第一医学院生物物理学教研室) (上海第一医学院中山医院血液科)

用 ADP 诱导血小板发生凝聚反应及反应过程中表面电荷的下降^[1,2],是目前临床检验血小板功能的较新方法之一,可用它进行缺血性疾病的诊断及治疗中的动态观察,它也是一种筛选改善血小板功能药物的方法。血小板凝聚过程可用血小板比浊仪在 X、Y 记录仪上描出来。判断所描绘的曲线是否正常,一般用最大聚集强度和反应时间、平均速率、速率变化率及曲线的坡度、半反应时间、每分钟聚集度等^[2-4]指标。这些方法的特点都是以静止的,某一特定时间的数据进行描述。而动力学和热力学则从其动态的和平衡的观点进行分析,国内外对此未见报道。本文试图以动力学和热力学的方法描述 ADP 诱导血小板的凝聚反应性。结果

表明,它一方面能用动力学和热力学原理阐明血小板功能异常的原因,又可能为临床诊断提供简便的方法。

一、动力学模型的假设

如系统中血小板的起始浓度为 $[A]_0$,当 ADP 加入后,即发生凝聚。血小板从 A 的分散形式转变为 B 的凝聚形式。假定此反应为可逆反应:



式中 k_1 和 k_{-1} 分别示正、逆反应速度常数,从动力学可知: