

天花粉凝集素对红细胞补体敏感溶血作用的影响

潘华珍 李彩华

(中国医学科学院基础医学研究所)

王克夷 李士云

(中国科学院上海生物化学研究所)

被激活的补体与红细胞作用产生溶血,补体 C_3 与其在红细胞膜上的受体反应,是红细胞产生溶血的关键步骤。Mussel^[1] 提纯了红细胞膜 C_3 受体,并鉴定其为糖蛋白。近年来,许多人对 C_3 的组成进行了研究,证明 C_3 是糖蛋白,推测 C_3 与红细胞膜上的 C_3 受体反应时,糖基起主要作用。我们用专一与半乳糖结合的天花粉凝集素与人工补体敏感的红细胞保温,可以降低溶血,同时进一步探讨半乳糖在补体溶血反应中的作用。

一 材料与方法

1. 天花粉凝集素的制备 取 Sepharose 6B 100ml 以 0.2N HCl 浸泡 12 小时后,换 0.02N HCl, 55℃,保温 4 小时,用蒸馏水洗去酸,装柱 (3.8 × 5cm), 即为 AT (Active)-Sepharose-6B 柱。用 pH 7.0 的 0.005M 磷酸缓冲液平衡柱,并用同一缓冲液 10ml,溶解天花粉 0.5 克(取自上海生化所三室),上样,用同一缓冲液洗脱杂质,弃去。换 0.1N HCl 洗脱,出现一个峰,即为纯的凝集素。用 Tris 调 pH 到中性,控制浓度 2.5mg/ml,用时 1:3200 稀释。

2. 人工补体敏感红细胞的制备 正常人红细胞用生理盐水洗涤,3000 转/分离心后,1:5 稀释,做成悬液。取悬液 1ml,加 8mM 马来亚胺 (NEM) 1ml, 37℃, 60', 用生理盐水洗三次,即得人工补体敏感红细胞,用于蛇毒溶血实验

3. 天花粉凝集素处理红细胞 正常人红细胞(或人工补体敏感红细胞)用生理盐水洗净,作成红细胞悬液(溶液浓度以取 0.1ml 悬液,加

0.05% NH_4OH 4.3ml 全溶血,在 415nm 处, O.D 值为 0.7 左右为准)。取此悬液 0.4ml, 加天花粉凝集素 0.4ml, 37℃ 保温 30', 用生理盐水洗三次,取红细胞悬液做蛇毒因子溶血实验。

4. ^{125}I 标记天花粉凝集素 按 Hunter-Greenwood 氯胺 T 法^[2], 依次加入 pH 7.0 的 0.5M 磷酸缓冲液 50 μ l, 天花粉凝集素 15 μ l (2.5mg/ml), 1 毫居 ^{125}I , 氯胺 T 50 μ l, 含 500 μ g (新鲜配制,电磁搅拌 2 分钟后,加入新鲜配制的偏重亚硫酸钠 200 μ l, (含 1000 μ g), 1% 碘化钾 100 μ l, 反应后,加到 AT-Sepharose-6B 柱 (1 × 25cm) 上。AT-Sepharose-6B 柱先用 pH 7 的 0.005M 磷酸缓冲液(内含 0.1% 牛血清清蛋白)平衡,加样后,用同样缓冲液洗脱过夜,加 0.1N HCl 洗脱,流速 0.5ml/分,分管收集,每管 0.5ml, 收集脉冲数高的管,放冰箱内保存。

5. C_3 的提纯 利用制备电泳法提纯,详见文献[3]

6. 红细胞膜与凝集素结合实验 利用红细胞膜—SDS—聚丙烯酰胺凝胶电泳胶条,与 ^{125}I -天花粉凝集素结合法,详见文献[4]。

7. C_3 与凝集素结合实验 利用 C_3 —PAGE 胶条与 ^{125}I -天花粉凝集素结合法,详见文献[4]

8. 酶标天花粉凝集素 用过氧化物酶标记天花粉凝集素,详见文献[3]

9. 琼脂糖双扩散实验 将正常红细胞 (2mg/ml) 1ml, 加 4% TritonX-100 溶解后与酶标天花粉凝集素在 1.5% 的琼脂糖板上做双扩散,室温放置 48 小时,用生理盐水漂洗,加入联苯胺及过氧化氢显色。

10. C_3 与酶标天花粉凝集素的琼脂糖双扩

表 1 正常红细胞用天花粉凝集素处理前后的溶血度

例 号 溶血度(%)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	均值±标准误
处 理 前	3.1	4.6	6.1	3.2	3.2	4.5	3.8	8.6	6.3	8.0	5.14±2.01
处 理 后	2.5	3.9	1.0	2.5	1.6	1.4	1.9	5.5	5.7	4.3	3.03±1.70

注: $p < 0.01$

表 2 NEM 处理的对补体敏感的红细胞,经天花粉凝集素处理前后的溶血度

例 号 溶血度(%)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	均值±标准误
处 理 前	67.7	63.2	58.6	55.7	42.4	43.1	26	31.2	24.2	31.5	42.02±20.2
处 理 后	58.2	33.6	46.6	45.9	33.8	30.8	8.7	15.3	3.2	9.7	28.58±18.7

注: $p < 0.01$

散实验 同上法 9。

二、结 果

1. 正常及人工补体敏感红细胞加天花粉凝集素处理前后,对补体敏感的溶血度变化见表 1 及 2。从表中看出,加入天花粉凝集素后正常及人工补体敏感红细胞溶血度均有降低,分别为 $p < 0.05$ 与 $p < 0.01$ 。

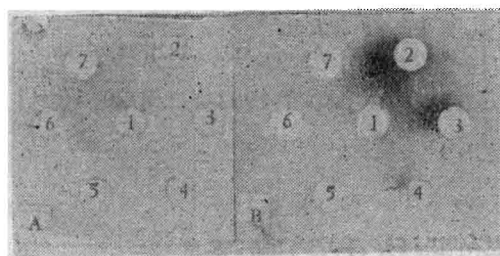


图 1 C_3 与酶标记的天花粉凝集素的琼脂糖双扩散图谱

A 为对照(1)纯 C_3 , (2) 0.1mg/ml 的过氧化物酶原液, (3—7) 分别为 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 的过氧化物酶原液
B 为样品(1)纯 C_3 , (2) 2mg/ml 的酶标天花粉凝集素, (3—7) 分别为 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 的酶标天花粉凝集素

2. C_3 与酶标记的天花粉凝集素的琼脂糖双扩散实验见图 1。从图中可看出, C_3 与酶标天花粉凝集素无结合。

3. 正常红细胞膜用 TritonX-100 溶解与酶标天花粉凝集素的琼脂双扩散图谱见图 2。从图中可看出, 红细胞膜与酶标天花粉凝集素有

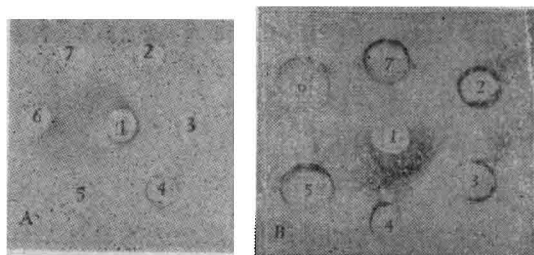


图 2 正常红细胞膜与酶标天花粉凝集素的琼脂糖双扩散图谱

A 为对照(1)TritonX-100 溶解的红细胞膜(2) 同图 1, (3—7)同图 1
B 为样品(1)TritonX-100 溶解的红细胞膜, (2) 同图 1, (3—7) 同图 1

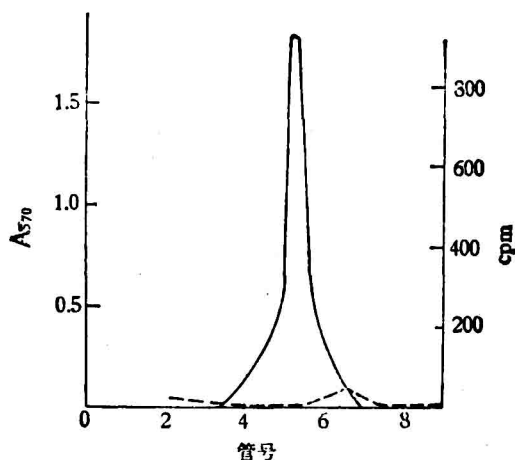


图 3 C_3 -PAGE 与 ^{125}I 放射活性图谱

—— C_3 -PAGE 扫描图谱
---- ^{125}I 放射活性图谱

明显的两条沉淀线。

4. 从 C_3 -PAGE 与 ^{125}I 放射活性图谱。(图 3) 可看出, C_3 与 ^{125}I -天花粉凝集素无结合。

5. 从红细胞膜的 SDS-PAGE 与 ^{125}I 放射活性图谱(图 4)。可看出, 在区带 3 与 4 的部位有两个明显的放射峰。

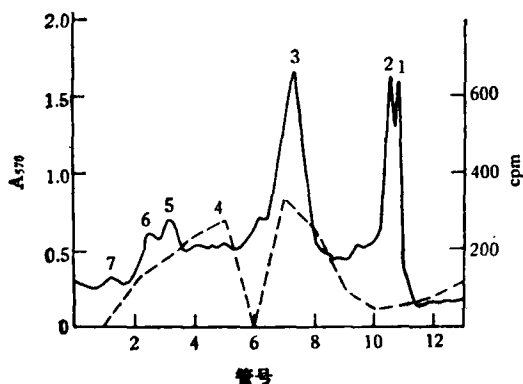


图 4 红细胞膜的 SDS-PAGE 与 ^{125}I 放射活性图谱

——红细胞膜 SDS-PAGE 扫描
-- ^{125}I 的放射性

三、讨 论

以上结果初步表明, 被激活的补体与红细胞作用产生溶血, 其溶血可能与半乳糖基有关。当用天花粉凝集素封闭半乳糖后, 正常及人工补体敏感红细胞溶血度都有所降低。天花粉凝集素可降低补体溶血作用, 其作用机制可能有二: (1)凝集素可能封闭 C_3 的半乳糖基, 使其

不能与红细胞膜的 C_3 受体结合。从本文的 C_3 与酶标记的天花粉凝集素的琼脂糖双扩散实验与 C_3 -PAGE 与 ^{125}I 放射活性图谱看, 天花粉凝集素未与 C_3 结合, 所以降低溶血不是由于 C_3 的半乳糖基被封闭的结果。(2) 天花粉凝集素作用于红细胞膜, 影响 C_3 与 C_3 受体的结合, 本实验中, 从正常红细胞膜与酶标天花粉凝集素的琼脂糖双扩散图谱与红细胞膜的 SDS-PAGE 与 ^{125}I 放射活性图谱看, 天花粉凝集素主要结合于红细胞膜蛋白的区带 3 及 4 部位, 据 Mechasi 电泳图谱分析, 区带 3、4 分子量分别为 88,000 及 78,000 道尔顿的糖蛋白。Fearn^[5] 曾报道, 红细胞膜 C_3 受体是糖蛋白, 分子量为 205,000, 区带 3 及 4 部位不是 C_3 受体部位。所以天花粉凝集素降低补体溶血, 可能是由于结合膜上区带 3 及 4 的半乳糖后, 使膜上糖蛋白结构发生变化, 从而改变了 C_3 受体本身的构型; 也可能 C_3 受体周围糖蛋白的变化, 影响 C_3 受体与 C_3 的结合, 致使溶血度降低。 C_3 受体的结构是否确有变化, 还有待进一步阐明。

参 考 文 献

- [1] Mussel H. H. et al: *Immunology letters*, 4,1,1982.
- [2] 王世中:《免疫化学技术》141 页, 1980.
- [3] 潘华珍等:《中华血液学杂志》2 期 114 页, 1981.
- [4] 潘华珍等:待发表.
- [5] Fearn D. T. *J Exp. Med.*, 152, 20, 1980.

[本文于 1983 年 5 月 20 日收到]

DNA 聚合酶 β 在分离细胞核中的激活*

施 产 甫

(南京铁道医学院科研所)

DNA 聚合酶 α 的活性与细胞增殖的速率及细胞周期的变化有良好的平行关系^[1]。并且当 DNA 聚合酶 β 的特异抑制剂 ddTTP 存在时, 复制样 DNA 合成的所有步骤并不受影响^[2]。DNA 聚合酶 β 并不参予 DNA 复制过程中任何重要的步骤, 但可能与 DNA 的修复或 DNA

重组有关。DNA 聚合酶 β 的一个特点是无论在快速增生或是静止的组织细胞中, 它的活性均很低^[1]。由下文可以看到, 在分离的艾氏腹水

* 本文是作者在西德海德堡市西德全国肿瘤研究中心肿瘤及细胞生物所所作博士论文的第一部分。