

人 T 细胞系 Jurkat 表达特异性的 C1q 受体^{*}

陈政良¹⁾ 谢佩蓉

(第三军医大学全军分子免疫学重点实验室, 重庆 630038)

摘要 采用酶联免疫吸附试验、流式细胞术、放射配体结合试验及蛋白质印迹等方法, 首次证实了人 T 细胞系 Jurkat 表达特异性 C1q 受体, 并对其特性进行了分析. Jurkat 可为 C1q 或抗人 C1q 受体抗体 112 识别, 其对异硫氰酸荧光黄标记 C1q 的结合能被未标记 C1q 所抑制. 在生理离子强度和温度条件下, Jurkat 与¹²⁵I-C1q 的结合呈特异、剂量依赖、可饱和及可逆性, 每个细胞 C1q 结合位点数为 1.1×10^6 , 对 C1q 的 K_d 值为 $1.5 \times 10^7 \text{ mol}^{-1}$, Hill 系数为 0.9643. Jurkat C1q 受体识别 C1q 的胶原样区. 该受体是分子量约 70 000 的膜蛋白分子.

关键词 C1q 受体, 特性, Jurkat 细胞

C1q 是分子量 46 000 的糖蛋白, 为补体经典激活途径的始动分子. 近年发现, 单核/巨噬细胞、粒细胞、B 细胞、血小板及内皮细胞等表达特异性的 C1q 受体 (C1q receptor, C1qR), 与 C1q 相互作用, 可诱导广泛的生物学应答^[1], 因而该受体引起了人们极大的兴趣. 关于 T 细胞是否具有 C1qR, 各家报道不尽一致^[2]. 本文应用酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)、流式细胞术 (flow cytometry, FCM)、放射配体结合试验 (radioligand binding assay, RBA) 及蛋白质印迹 (Western blotting, WB) 等技术, 首次证实人 T 细胞系 Jurkat 表达特异性 C1qR, 并分析了其有关特性.

1 材料与方法

1.1 细胞系

Jurkat IL-2 高产株 J6.8.9.15 由第四军医大学金伯泉教授惠赠. 细胞于含 10% 新生牛血清的 RPMI 1640 (Gibco) 中培养传代, 实验前用 pH 7.4、0.01 mol/L PBS 洗涤, 以台盼蓝排除法检查, 细胞活力高于 90%.

1.2 蛋白质和抗体

人 C1q 按本室常规方法^[3]纯化并鉴定, 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA)

购自上海化学试剂供应站. 纯化的单特异性兔抗人 C1qR 抗体 112 (IgG)^[4]由纽约州立大学 Ghebrehiwet 惠赠, 抗人 C1q 单抗 A₄^[5]和兔抗人 C1q 抗体为本室制备. 抗人 C1q 抗体及正常人、鼠 IgG 均按常规方法分离纯化.

1.3 HRP 标记兔抗人 C1q 抗体

按文献 [6] 方法, 制备 HRP (Boehringer Mannheim) 标记兔抗人 C1q 抗体.

1.4 异硫氰酸荧光黄标记 C1q

参照文献 [7], 采用透析法, 以异硫氰酸荧光黄 (FITC, Sigma) 标记 C1q, 标记产物 F/P 值为 2.4.

1.5 ¹²⁵I 标记 C1q

参照文献 [8], 采用 LPO 法, 以 Na ¹²⁵I (中国科学院原子能研究所) 标记 C1q, 标记率为 20.94%, 标记蛋白比活度为 $1.78 \times 10^{15} \text{ Bq/mol}$.

1.6 细胞酶联免疫吸附测定

参照文献 [9] 进行. Jurkat 细胞包被微量滴定板后, 相继以不同浓度的 C1q 或抗人 C1qR 抗体 112 和 HRP-兔抗人 C1q 抗体或 HRP-羊抗兔 Ig (军事医学科学院生物制剂发

^{*} 全军“八五”医药卫生科研基金资助项目.

¹⁾ 第一军医大学免疫学教研室, 广州 510515.

收稿日期: 1995-06-12, 修回日期: 1995-12-04

展中心) 反应, 最后显色并测定 A_{490} 值. 细胞对照为人红细胞和绵羊红细胞, 反应物对照为正常人 IgG 或正常兔血清.

1.7 FCM 分析

细胞用含 5% 新生牛血清的 PBS 配成 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 悬液, 加入微量滴定板, $200 \mu\text{l}/\text{孔}$. $1000 \text{ r}/\text{min}$ 离心 1 min 后, 加或不加 $500 \text{ mg}/\text{L}$ C1q $100 \mu\text{l}/\text{孔}$, 4°C 反应 30 min . 洗涤, 加入 $50 \text{ mg}/\text{L}$ FITC-C1q $100 \mu\text{l}/\text{孔}$. 如前反应并洗涤后, 移入测试管, 上机 (FACStar plus) 检测.

1.8 RBA 分析

实验前, ^{125}I -C1q、抗人 C1q 单抗 A_4 、正常人 IgG 和正常鼠 IgG 均经 $40\,000 \text{ g}$ 离心 90 min , 以去除凝聚物, 获得单体形式的蛋白质分子. 在 0.1% BSA 预处理过的塑料小管中加入细胞 $1 \times 10^5/\text{管}$, 再加入已知量的用 RPMI 1640-0.5% BSA 稀释的 ^{125}I -C1q, 总体积 $100 \mu\text{l}$, 设复管. 37°C 温育一定时间后, 按文献 [10] 方法分离细胞并测 cpm 值, 非特异对照管加入 100 倍以上过量未标记 C1q. 抑制实验中, 1×10^5 细胞与 $1 \text{ mg}/\text{L}$ ^{125}I -C1q 在递增浓度的 C1q、人 IgG、抗人 C1q 单抗 A_4 或鼠 IgG 存在条件下进行反应. 采用 RBA 软件系统 (上海第二医科大学核医学教研室) 进行资料分析.

1.9 WB 分析

按文献 [9] 方法, 制备 Jurkat 细胞粗提膜蛋白样品. 用不含还原剂样品处理液处理后, 按常规进行 SDS-PAGE (10% 凝胶) 和电转移. 硝酸纤维素膜以 3% 明胶封闭后相继与 $10 \text{ mg}/\text{L}$ 抗人 C1qR 抗体 112 和 1:100 HRP-羊抗兔 Ig 反应, 然后显色. 对照为正常兔血清. 采用预染低分子量标准 (Bio-Rad) 同时电泳和转移.

2 结 果

2.1 细胞酶联免疫吸附测定结果

Jurkat 细胞可为 C1q 和抗人 C1qR 抗体 112 所识别, 其 A_{490} 值与 C1q 或抗体 112 有

浓度依赖关系, 但人红细胞和绵羊红细胞不结合 C1q 或抗体 112 (数据略), 证实 Jurkat 细胞表达 C1qR.

2.2 FCM 分析细胞表面 C1qR

荧光染色阳性率为 72.00%, 平均荧光强度 (mean intensity of fluorescence, MIF) 为 56.48. 加入 10 倍过量未标记 C1q 后, 阳性率和 MIF 分别降至 62.56% 和 23.83. 虽然由于未标记配体用量低而对阳性率的竞争抑制不完全, 但对 MIF 有显著抑制作用, 提示每一细胞结合的 FITC-C1q 大为减少.

2.3 C1q 与细胞结合和解离的动力学

$1 \text{ mg}/\text{L}$ ^{125}I -C1q 与 Jurkat 细胞在生理条件下反应, $30 \sim 40 \text{ min}$ 即达平衡, 该反应遵循假一级动力学 (图 1). 此实验应用低浓度 ^{125}I -C1q, 以便对现象的分析较为容易. 如果配体

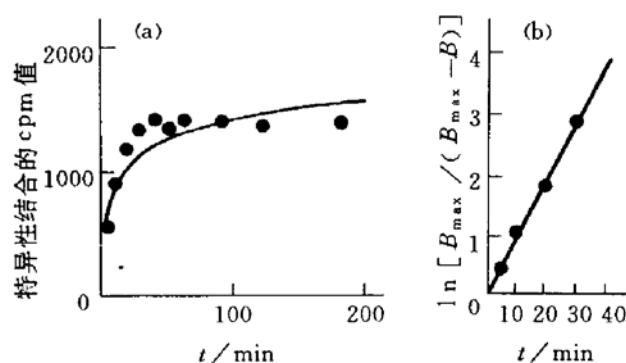


图 1 ^{125}I -C1q 与 Jurkat 细胞结合的动力学

(a) 时间过程; (b) 一级反应作图.

浓度增高, 其与受体结合达平衡的时间将缩短, 故在后面的结合反应中, 反应时间均为 1 h . 对饱和实验资料进行 Hill plot 分析 (图 2), r 为 0.9788, Hill 系数 (Hill number, n_H) 为 0.9643. 后者表明, 细胞表面每个 C1qR 只有 1 个配体结合位点, 配体与其结合所达到的平衡只是简单的平衡, 不存在受体亚基间的协同作用, 也提示 C1qR 可能并非多亚基的蛋白质分子.

为探明 C1q 与 Jurkat 细胞 C1qR 的结合反应是否可逆, 细胞与 $1 \text{ mg}/\text{L}$ ^{125}I -C1q 反应 1 h 达平衡后, 洗去未结合 ^{125}I -C1q, 再加入新鲜

培养基, 定时取标本测定分析, 其解离时间过程见图 3. 60 min 时, 结合的 ^{125}I -C1q 已解离约 61%.

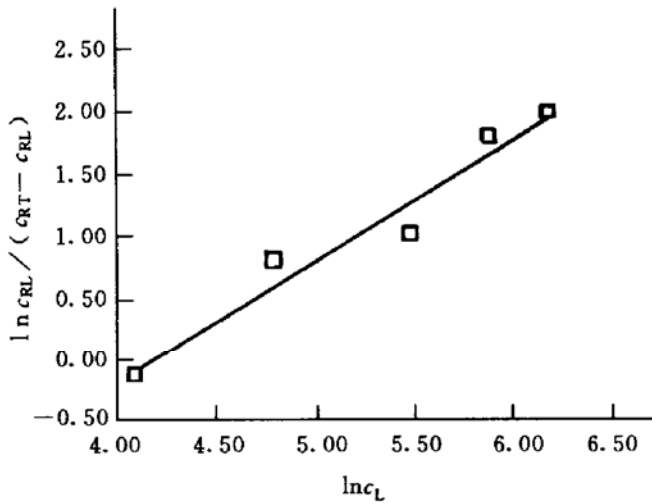


图 2 Hill 作图分析 ^{125}I -C1q 与 Jurkat 细胞的结合
RT: 总受体; RL: 与受体结合的配体; L: 配体.

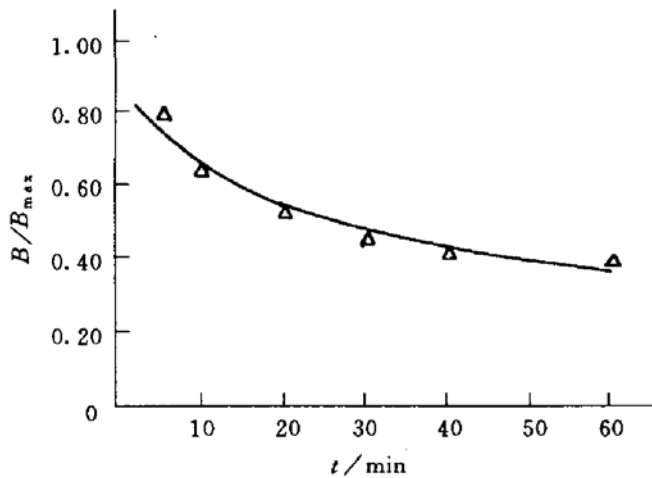


图 3 ^{125}I -C1q 从 Jurkat 细胞解离的时间过程

2.4 细胞 C1q 结合位点数和结合亲和力

饱和实验资料用质量作用定律基本公式 (即 Goldstein 模型) 进行直接曲线拟合, 证明 Jurkat 细胞与 ^{125}I -C1q 的结合是剂量依赖及可饱和的 (图 4), 每个细胞平均 C1q 结合位点数为 1.1×10^6 , 亲和力 (K_a) 为 $1.5 \times 10^7 \text{ mol}^{-1}$.

2.5 C1q 结合位点的特异性

Jurkat 细胞与 1 mg/L ^{125}I -C1q 在有或无不同浓度单体竞争蛋白人 IgG (HuIgG)、鼠

IgG (MoIgG)、抗人 C1q 单抗 A_4 或未标记 C1q 存在下反应 1 h, 分离结合与游离 ^{125}I -C1q, 以 $B/B_{\max}$ 对竞争蛋白浓度作图. 发现 6.25~100 倍过量人或鼠 IgG 对结合无影响 (图 5、6), 表明 C1qR 与 IgG Fc 片段受体无关; 而过量未标记 C1q 剂量依赖性地竞争抑制细胞与 ^{125}I -C1q 结合 (图 5), 证实这种结合是 C1q 特异的, FCM 分析亦表明了这一点.

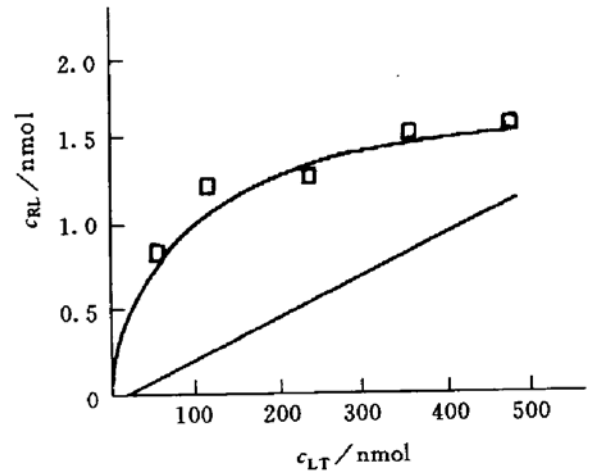


图 4 Goldstein 分析 ^{125}I -C1q 与 Jurkat 细胞的结合

□—□: 特异性结合; —: 非特异结合;
LT: 总配体; RL: 与受体结合的配体.

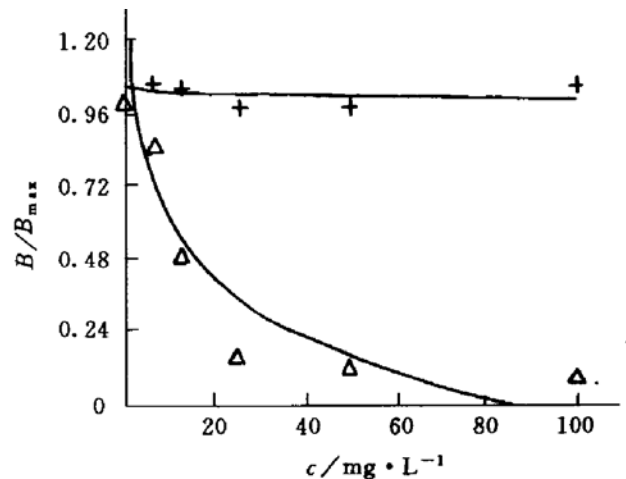


图 5 Jurkat 细胞与 C1q 结合的特异性

+—+: HuIgG; △—△: C1q.

本室先前研究^[11]证明抗人 C1q 单抗 A_4 的作用部位是 C1q 的胶原样区 (collagen-like region, CLR). 本实验用 A_4 与 ^{125}I -C1q 反应

30 min 后加入 Jurkat 细胞, 发现 A_4 可有效抑制 ^{125}I -C1q 与细胞结合 (图 6), 揭示该细胞 C1qR 的配体结合位点是 C1q CLR 特异的。

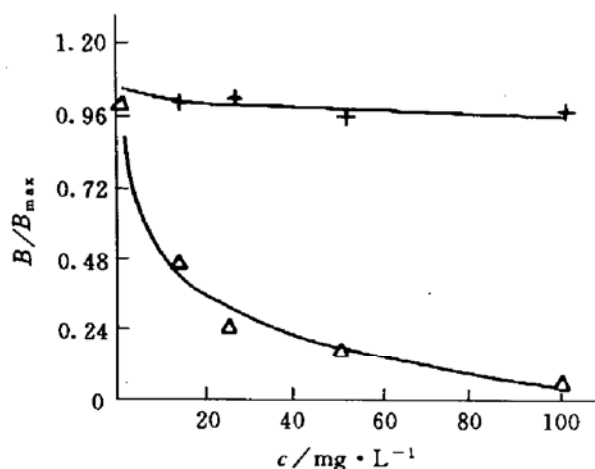


图 6 Jurkat 细胞 C1qR 识别 C1q 的胶原样区

+—+: MoIgG; Δ—Δ: A₄.

2.6 WB 分析 C1qR 蛋白

去污剂抽提的 Jurkat 细胞膜蛋白经电泳分离并转移至硝酸纤维素膜上, 以抗人 C1qR 抗体 112 印染, 在分子量约为 70 000 处出现染色带。

3 讨 论

早期关于 T 淋巴细胞是否具有 C1qR 的报道互相矛盾^[2]. 后来 Ghebrehiwet 等^[12]发现 T 细胞系 Molt₄ 可结合 C1q, Chen 等^[13]也以摘要形式报道过人外周血 T 细胞和 Molt₄ 表达特异性的 C1q 结合位点, 但未见有关 T 细胞或 T 细胞系 C1qR 特性的系统研究报道. 本文采用多种技术, 确证人 T 细胞系 Jurkat 表达特异性的 C1qR. 这一结论的根据是: a. 在 Cell-ELISA 中, Jurkat 细胞能结合 C1q, 且可为抗人 C1qR 抗体 112 识别; b. FCM 分析发现, FITC-C1q 可与 Jurkat 细胞结合, 该结合能为过量未标记 C1q 所阻断; c. 单体 ^{125}I -C1q 定量结合资料显示, Jurkat 细胞与 C1q 的结合是特异、剂量依赖、可饱和及可逆的; d. 抗人 C1qR 抗体 112 识别 Jurkat 细胞膜上分子量约 70 000 的蛋白质分子; e. 识别 C1q CLR 的单

抗 A₄ 可有效阻断 ^{125}I -C1q 与 Jurkat 细胞结合, 进一步揭示该受体是 CLR 特异的. 这些资料也支持人 T 淋巴细胞具有特异性 C1qR 的概念.

受体-配体结合服从质量作用定律. 因此, 对于这样的结合资料, 质量作用定律基本公式 (Goldstein 模型) 是目前最合理的分析方法. 本文采用此法对饱和实验资料进行直接曲线拟合得出每个 Jurkat 细胞平均 C1q 结合位点数为 1.1×10^6 , 对 C1q 的平均亲和力 (K_a) 为 $1.5 \times 10^7 \text{ mol}^{-1}$. 在生理离子强度中, 多数 C1qR⁺ 细胞与单体 C1q 的结合很弱^[2], 故一般都在低离子强度 ($I = 0.07$) 条件下进行结合实验研究. 也有血小板^[14]、肾小球系膜细胞^[15]在生理条件下与 C1q 结合的报道. 本文上述参数得自生理离子强度 ($I = 0.15$) 和温度 (37℃) 中的实验, 证实在生理条件下, Jurkat 细胞 C1qR 可与单体 C1q 结合.

C1qR 的结构尚未明了, 但显然存在异质性. Ghebrehiwet 和 Malhotra 两个实验室用 C1q-Sepharose 或其他层析方法分离纯化的 C1qR 蛋白均约 70 000, 而 Tenner 实验室以 c-C1q (C1q 的胶原样片段)-Sepharose 提纯的 C1qR 则为约 120 000 的分子^[1], 两者性质完全不同 (Tenner, 私人通信). 本实验中, 抗人 C1qR 抗体 112 识别 Jurkat 细胞, 与分子量约 70 000 的膜蛋白反应, 表明本文所鉴定 C1qR 属于前一类蛋白质分子. 本文还首次将 Hill 分析应用于 C1qR 与配体反应动力学研究, 所得 n_H 接近于 1, 提示 C1qR 可能是单肽链的膜蛋白质分子或是只具有单一配体结合位点的膜受体复合体.

T 淋巴细胞是机体极为重要的免疫细胞, 在免疫应答, 特别是免疫调节中起关键作用. Jurkat 为 T 细胞系, 具有 Th 细胞的许多结构及功能特征, 如其亚株 J6.8.9.15 即为 IL-2 高产株. 本文除确证其 C1qR 的存在外, 还对其在生理条件下的特性作了较全面的鉴定. 所得到的一些有意义的参数, 既提示了 T 细胞 C1qR 在体内发挥作用的可能性, 又提供了体

外模拟生理条件对其生物学功能及跨膜信号转导分子机制进行研究的前提。

参 考 文 献

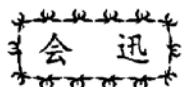
- 1 陈政良, 谢佩蓉, 朱锡华. 国外医学免疫学分册, 1993; 16: 65
- 2 Erdei A, Reid K B M. Mol Immunol, 1988; 25: 1067
- 3 谢佩蓉, 王剑平, 王雪峰等. 第三军医大学学报, 1986; 8: 209
- 4 Ghebrehewet B, Bossone S, Erdei E *et al.* J Immunol Methods, 1988; 110: 251
- 5 谢佩蓉, 王雪峰, 陈云亮等. 免疫学杂志, 1985; 1 (2): 1
- 6 武建国. 实用临床免疫学检验. 南京: 江苏科学技术出版社, 1989: 97~98
- 7 Alvarez D C, Carrasco M E, Leyva C F. Infect Immun, 1993; 61: 3664
- 8 Arvieux J, Reboul A, Bensa J C *et al.* Biochem J, 1984; 218: 547
- 9 Ghebrehewet B. Methods Enzymol, 1987; 150: 558
- 10 Ghebrehewet B. J Immunol, 1981; 126: 1837
- 11 曹建平, 朱锡华, 谢佩蓉. 免疫学杂志, 1988; 4: 218
- 12 Ghebrehewet B, Habicht G S, Beck G. Clin Immunol Immunopath, 1990; 54: 148
- 13 Chen A. Complement Inflamm, 1991; 8: 135A
- 14 Peerschke E I B, Ghebrehewet B. J Immunol, 1987; 138: 1537
- 15 van der Dobbels M E A, van der Woude F J, Schroeijs W E M *et al.* J Immunol, 1993; 151: 4315

Human T Lymphocyte Line Jurkat Cells Express Specific Receptors for C1q. Chen

Zhengliang, Xie Peirong (Department of Immunology, The Third Military Medical University, Chongqing 630038, China).

Abstract The C1q receptor (C1qR) on the human T lymphocyte line Jurkat cells was demonstrated and characterized. Cell-ELISA showed that Jurkat cells are able to bind exogenous C1q and recognized by the anti-C1qR antibody 112. FCM analysis indicated that the binding of FITC-C1q to Jurkat cells is blocked by an excess of unlabelled C1q. Quantitative binding studies with monomeric ^{125}I -C1q showed a specific, dose-dependent, saturable and reversible binding involving specific membrane receptors on Jurkat cells. Goldstein analysis and Hill plot of C1q binding showed 1.1×10^6 binding sites per cell with an average affinity of $1.5 \times 10^7 \text{ mol}^{-1}$ and a Hill number of 0.9643 at normal ionic strength ($I = 0.15$) and temperature (37°C). The experiment with the anti-C1q monoclonal antibody A₄, which recognizes the collagen-like region (CLR) of C1q, established that it is via its CLR that C1q binds to Jurkat cell receptors. Western blotting with the anti-C1qR antibody 112 revealed that the C1qR on Jurkat cells is a membrane protein of 70 ku.

Key words C1q receptor, characteristics, Jurkat cells



由中国生物化学与分子生物学会、中国生物物理学会和中国细胞生物学学会联合召开, 由中国生物化学与分子生物学会主办的“第六届全国生物膜学术讨论会”定于 1996 年 8 月 2 日至 8 月 7 日在延边医学院 (吉林省延吉

市) 召开. 有意参加会议者, 请向中国生物化学与分子生物学会秘书处索取第二轮通知. 地址: 北京朝阳区大屯路 15 号, 邮编: 100101, 电话: (010) 2020077 转 279.