

唾液酸专一性凝集素的研究进展*

ADVANCE ON THE STUDY OF SIALIC ACID SPECIFIC LECTINS

蒋 琼 王 雷

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

人们是在近 30 a 来对凝集素进行广泛的研究的,在我国,则是在 80 年代中期以后。而由于人们对无脊椎动物免疫学的认识普遍肤浅,制约了对凝集素的研究,但是作为一种重要的体液免疫因子人们又迫切需要了解和利用它的功能。例如:人们在进行重要的水产经济动物中国对虾的免疫功能研究时发现:用弧菌诱导过的中国对虾,凝集素凝集活力明显增高,而在已发病的病虾体中的凝集素活力下降^[1,2]。这一升一降说明凝集素在对虾开始受感染时,发挥着免疫防御作用,而当对虾已发病时,会随着整个免疫系统功能的下降而下降。这说明凝集素与对虾的免疫防御有着密切的关系。

凝集素作为一种免疫活性蛋白, Boyd 和 Shapleigh 1954 年报道,凝集素是一类拥有专一性受体的识别因子,它们通过与糖蛋白或糖脂相互作用凝集细胞或沉淀糖缀合物的碳水化合物结合蛋白或糖蛋白。J. A. Qafsen 1996 年的研究表明它在调理细胞吞噬、宿主-病原相互识别、淋巴细胞导航方面发挥着重大的作用。凝集素的这种专一性识别类似于脊椎动物的免疫球蛋白,由此可以推测在缺乏免疫球蛋白的无脊椎动物体内,是依赖凝集素完成抗原与防御系统的识别的。

随着人们对凝集素的深入研究,它的作用不再局限于动物免疫功能中。医学上也在开发利用凝集素的专一特性^[3]。

唾液酸专一性凝集素就是这方面的很好的例子。人们从海洋动物体中提取的唾液酸专一性凝集素可以专一性地识别癌细胞,因为只有癌细胞中有唾液酸的羟基乙酰化的产物。这对于癌症的治疗和诊断有着重要的意义。

唾液酸几乎分布在所有节肢动物和软体动物体内,是一个包含有 40 多种九碳糖的家族,是从 N 乙酰神经氨酸演化生成而来, N 乙酰神经氨酸是一种最广泛分布的被取代的天然糖类。结构的不同是由于亚基在第 4,5,7,8,9 碳处而不同(如图 1)。唾液酸的氨基基团会由于乙酰基或糖基集团作用而酰基化。它的一个或多个羟基集团会被乙酰基、乳酰基、硫酸、磷酸基团酯化。唾液酸的羟基乙酰化是随着细胞环境中其他变化而进行的。羟基乙酰化会影响糖缀合物分解作用中的酶反应,它会减弱或抑制细菌和病毒的唾液酸酶,从而改变它们的免疫潜在力。唾液酸糖蛋白和糖脂在正常和变形细胞的生理功能上有非常重要的作用。在异化作用中乙酰化的程度也会发生变化。

本文希望通过对唾液酸专一性凝集素的研究方法的阐述,介绍一下有关凝集素的提取、检测等方面的研究方法以及它可能的免疫作用方式,希望对国内凝集素研究有所帮助,特别是对海洋水产动物凝集素的免疫功能的研究有所帮助。

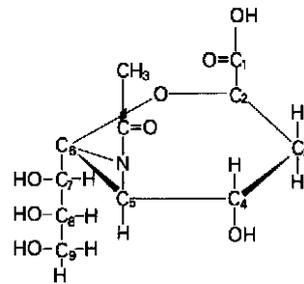


图 1 唾液酸结构

1 唾液酸专一性凝集素在海洋水产动物中的分布

海洋动物中广泛存在着凝集素,无论是在海藻、海洋无脊椎动物还是海洋脊椎动物中都有过报道。而在提取纯化出的唾液酸专一

* 国家重点基础研究发展规划项目(虾贝类的免疫反应特征及调节机理) G199901200 号。
 收稿日期:2000-09-11;
 修回日期:2001-02-16



性凝集素中,来源于海洋水产动物的占很大一部分。

Limulin 是一种已经成为商品的唾液酸凝集素,它是从鲨血淋巴中提纯出来的。凝集素最早也是在鲨血清中发现的,现已有多种鲨的凝集素被提纯出来,包括美国鲨、印度鲨、日本鲨。节肢动物门中的甲壳纲中也有多种凝集素被纯化,例如:斑节对虾 (*Penaeus monodon*)、螯虾、蟹等,其中在 *linacarcinus depuntor*^[4] 和锯缘青蟹 (*Scylla serrata*) 羟基乙酰化的凝集素被纯化了出来。并且,有学者认为 *linacarcinus depuntor* 中的凝集素是在肝胰脏中合成的^[4]。另外,C. Mandal 等 1990 年对节肢动物门的昆虫纲也进行了许多研究。

软体动物中也有多种凝集素被纯化,例如:太平洋牡蛎 (*Cm-sostrea gigas*), 马鲍贝 (*Mdiolus mdiolus*) 等。

2 唾液酸专一性凝集素的纯化

据 Zenteno E. 等 1988 年报道,由于这些凝集素表现出对唾液酸的高度亲和性,大部分已知的凝集素是通过使用唾液酸糖缀合物作为亲和层析的配体。即将小牛、羊、猪的颌下腺黏蛋白或胎球蛋白偶联到 CNBr 活化的琼脂糖凝胶上,也有人将血细胞膜基质作为亲和层析的配体,将其偶联到柱上。吸附和洗脱过程则是利用凝集素在与配体的结合过程中需要 Ca^{2+} 这一特性来完成的。一般来说,亲和层析柱先用合适 pH 下的含有 Ca^{2+} 的缓冲液平衡,上样,洗下未结合上的蛋白质后再用不含有 Ca^{2+} 的缓冲液洗脱凝集素。另外,在某些情况下,温度的升高和 pH

的变化会影响凝集素的结合。有些凝集素就是利用 pH 的改变来进行洗脱的。当然,也有使用唾液酸溶液进行洗脱的。例如:Vanderwall 1991 年利用多聚乙酰神经氨酸-琼脂糖作为亲和层析柱填料,用 D Mannac 洗脱从螯虾的血淋巴中纯化出一种凝集素。

3 凝集素活性的检测方法

一般来说,凝集素的活性是通过它与动物红细胞凝集反应的效价来测定的,这种方法很简单、易行。首先,将凝集素放在血凝板上进行倍比稀释,然后逐一添加适当体积 2% 动物红细胞悬液,在室温下放置 1~2 h 后观察,以能产生可见凝集的凝集素最大稀释度的倒数作为凝集素的效价。亦可用分光光度法测定,根据血球下沉的速度与凝集素浓度存在比例关系,凝集素与血球反应一定时间后,在 620 nm 处测吸光值,测定未下沉细胞悬液的光吸收,以光吸收值计算凝集素的凝集活力。但是这两种方法只能定性地表征它的活性,由于实验操作等人为因素的影响,往往造成实验结果的偏差。

Fati ma 等 1987 年研究出一种用 PEG 8000 定量测定凝集素与糖蛋白结合的方法。唾液酸与含 ¹²⁵I 标记的胎球蛋白作用形成凝集素-糖蛋白复合物,然后加入 7.5% PEG 8000 以稳定结合复合物,测定沉淀复合物的放射强度即可定量测定凝集素与糖蛋白的结合专一性了。这种方法的灵敏度较高,可以检测到 0.2 g 凝集素。

另外,还可以通过物理化学的方法,如:分光荧光测定法、旋光分光法和沉淀反应等,测定凝集素的糖结合常数。但是仅有几种凝集素

的结合常数已知。

4 唾液酸专一性凝集素的大分子特性

大部分唾液酸专一性的凝集素都有很高的分子量,一般包含几个分子量在 15~24 kDa 的亚基,有一些甚至包含 10~20 个亚基。对于这些亚基的特性以及相互作用以形成天然蛋白质等方面了解得不是很多。酸性氨基酸的含量较高似乎是这些凝集素的普遍特征。其中约有 20% 的氨基酸是天冬氨酸和谷氨酸以及它们的酰胺化物。但是这些凝集素的等电点范围变化是很大的,如:limulin(4.8) achatinin(6.2) Indian scorpion(9~9.5) frog eggs(12.2),出现碱性范围的 pH 值很可能是因为酸性氨基酸的酰胺化。大部分的这些凝集素在 pH 7~9 保持稳定以及生物活性也不发生变化。它们在室温条件下都很稳定,在 4 °C 可以保存 6~12 个月。

5 唾液酸含量的测定方法

在研究过程中发现,在牡蛎、斑节对虾等生物体中自由唾液酸,其含量足以抑制体内唾液酸专一性凝集素的作用。这说明唾液酸自身参与了唾液酸专一性凝集素的调节。所以研究生物体中自由唾液酸的含量对于理解不同生物体中凝集素的作用方式有很大的作用。以下列出了几种比较经典的唾液酸含量测定方法。

5.1 MBTH 分析法

此方法为最广泛采用的唾液酸测定法。样品先过离子交换层析柱以去除相互作用的单糖,洗脱液在 4 °C,黑暗中用氧化,然后加入 ZnSO₄ 和 NaOH,离心。上清液中加入 MBTH,室温下反应 20 min,加入 Fe-



Cl₃, 剧烈震荡 15 min 后加入蒸馏水, 625 nm 处测吸光值。

5.2 荧光光度分析法

由于在吡哆醇和 Zn²⁺ 存在下, α-氨基酸和 α-氨基糖与吡哆醛反应会产生一种荧光产物, 通过测量这种荧光产物的量可以推之唾液酸的含量。但这种方法只能测定自由唾液酸以及由糖蛋白上水解下来的唾液酸。

5.3 酶解法

利用神经氨酸酶和醛缩酶等, 因为神经氨酸酶和醛缩酶可以将全部唾液酸酶解下来, 以测定总量唾液酸; 而只加入醛缩酶则只能得到自由唾液酸。通过比较两者量上的差异, 可以得到结合在糖蛋白上的唾液酸的量。

另外, 可以利用 HPLC^[5], 精确测定唾液酸含量。

6 凝集素的可能作用方式

凝集素如果要起到“免疫”的功能, 那么它就需要能识别自我和非我物质。但是, 一方面, 没有确实的证据证明在无脊椎动物中, 它参与了自身识别; 另一方面, 无脊椎动物只能识别有限量的不同碳水化合物, 这就很难解释这些有限数目的凝集素是怎样识别病原表面千差万别的结构的, 怎样起到脊椎动物体内免疫球蛋白的作用的。

猜测可能是天然状态下的配体结合与实验室中颗粒或细胞的凝聚作用方式不同。也可能是血清中存在多种凝集素, 只是目前的研究方法所限, 还未能研究证实。

凝集素的结合位点有很强的

灵活性。Jenkin 和 Hardy 1975 年提出“多样性产生理论”, 认为不同的(凝集素)单体以随机的方式聚合或解聚, 从而产生了一定范围内的不同专一性。从已经研究过的无脊椎动物凝集素来看, 大多数正是带有相互结合位点的多聚体, 一般有 4, 5 个亚基, 多的有 20 多个亚基, 并有可能进一步形成大的聚合物。但现在还不知道, 血细胞应激反应会释放完整的凝集素, 还是亚基。

Clafèn 1986 年指出, 由于“多体性”的凝集素与抗原的结合可以通过弱的多位点相互作用得以进行。这样, 对异己的多重弱相互作用可以不断累加, 当超过一定阈值时, 就会产生对异己的识别。尽管对于自身血细胞来说, 凝集素只有很低的亲和力, 但当大量凝集素沉积到外来致病源上时, 亲和力就会增大到足以同血细胞发生反应的程度。由于凝集素的糖识别专一性, 很多学者认为凝集素是作为一种调理素, 介导病原和血细胞之间的识别。一个比较重要的证据是无脊椎动物体内的某些凝集素类似于脊椎动物的 CRP(C Reactive Protein)^[6]。

7 Ca²⁺对凝集素的影响

很多凝集素发生凝集的一个必不可少的条件就是 Ca²⁺ 的存在。在 limulin 中需要 Ca²⁺ 以类钙调素的方式进行; 而在 *Anthocidaris cms-sispina* 中, 凝集素则是需要 Ca²⁺ 影响它们的分子构型; Ca²⁺ 影响牡蛎 (*Cmsostrea gigas*) 凝集素 giganin 则

是通过改变蛋白质构型, 而不是直接参与配体结合, 当然配体的结合也同样会影响凝集素的构型。

Dorothe Spillmann 1996 年认为, Ca²⁺ 的这种作用可以解释为它通过离子键与羧基等作用, 以稳定结构增强氢键和疏水相互作用。

8 结语

从国外一些学者的报道和本实验室的工作证实凝集素具有某些糖结合的特性, 即使病原微生物能粘附或凝集在海洋水产动物的细胞表面, 从而被细胞表面的分泌物杀死, 这说明凝集素具有一定的免疫防病功能。基于这种观点, 深入研究海洋无脊椎动物凝集素分泌、激活和免疫功能, 有助于揭示海洋无脊椎动物免疫防病机理, 为治疗预防海洋养殖的无脊椎动物病害提供理论依据。

参考文献

- 1 罗日祥. 海洋学报, 1997, 19(4): 117 ~ 120
- 2 王克夷, 许强. 生物化学与生物物理学报, 2000, 32(3): 201 ~ 205
- 3 罗日祥. 海洋与湖沼, 1997, 28: 573 ~ 578
- 4 Fragkiadakis G. A. et al. . *Comp. Biochem. Physiol.*, 1997, 117B(4): 545 ~ 552
- 5 Tunkijjanukij S. et al. . *Comp. Biochem. Physiol.*, 1998, 119B: 705 ~ 713
- 6 Jane way C. A., Travers P. et al. . *Immuno Biology*. New York: Current Biology Ltd., 1997. Chapters 9, Sections 21

(本文编辑:刘珊珊)