

刀豆球蛋白A对红细胞及肿瘤细胞的凝集作用

微生物教研室 王纯香 兰茂功 黄务昌

广州医药工业研究所 于燕荪 李素芬 孙 宏 梁伟文

外源凝集素 (Lectin) 是一种蛋白质, 它具有凝集红细胞及其它肿瘤细胞的能力, 并具有多种生物化学特性, 因而被广泛应用。如: 一、应用于人类血型、血族特异性的化学基础研究^(1, 2); 二、某些外源凝集素能刺激淋巴细胞转化, 而应用于非特异性细胞免疫功能的检测及人类染色体异常疾病的研究⁽³⁾; 三、外源凝集素能特异地与细胞表面某种糖结合, 因而为研究细胞表面结构提供了新的工具⁽⁴⁾; 四、外源凝集素小剂量时能选择性地凝集癌细胞和被致癌病毒或化学致癌剂所转化的细胞⁽⁵⁾。因而为癌细胞表面物质结构和化学成份的分析、肿瘤特异性抗原的提取、癌细胞分裂的调节及接触抑制的丢失等研究展望出可喜的前景。

外源凝集素中应用较多的是蓖麻蛋白 (ricin), 植物血凝素 (PHA), 刀豆球蛋白A (ConA) 和麦芽凝集素 (WGA)。我们实验室试图用ConA提取肿瘤抗原。现将ConA对血细胞及肿瘤细胞的凝集效果观察报道如下。

ConA对红细胞的凝集作用

材料与方法

刀豆球蛋白A: 系由广州市医药工业研究所从刀豆 (Jack bean) 提取 “S”型ConA溶于生理盐水中, 浓度为10毫克/毫升, 贮存于4℃冰箱备用 (1周内用完)。

红细胞: 兔、大白鼠、小白鼠、豚鼠、狗、恒河猴、猫、鸡、绵羊和鸽子等10种动物 (除恒河猴外, 各种动物用3只以上) 以

及人的红细胞, 有 “O”型, “A”型, “B”型, “AB”型4种。各种红细胞分别用生理盐水洗涤3次后, 再以生理盐水配成2.5%悬液备用。

血凝试验在塑料凹孔板中进行。除第1孔不加生理盐水外, 其余各孔均先加生理盐水0.25毫升, 直到第20个凹孔。第1、2孔各加入浓度1毫克/毫升的ConA 0.25毫升 (相当于250微克) 混合后从第2孔中吸出0.25毫升放入第3孔, 待混匀后吸取0.25毫升放于第4孔, 以此类推, 倍比稀释至19孔, 第20孔为对照。各凹孔所含ConA浓度: 第1孔250微克, 第2孔125微克, 第3孔62.5微克……。然后每孔再加入2.5%红细胞悬液0.25毫升, 充分混匀后静置室温 (25℃左右) 2小时或37℃半小时取出, 待对照管红细胞完全沉入孔底成一圆点后观察结果。先用肉眼作初步观察, 随之将其摇匀, 取一小滴置于载玻片上, 用低倍镜观察, 并记录结果。

判断标准

根据红细胞发生凝集作用的不同程度, 分别以 “++++” (完全凝集成块状)、 “+++” (几乎全部凝集成块状)、 “++” (大多数细胞明显凝集成块状)、 “+” (部份红细胞凝集成小块)、 “±” (极少数细胞, 偶有3~5个聚集)、 “-” (不凝集)。其中以呈现 “+” 者判定其最终凝集效价。

结 果

一、不同种类动物红细胞与ConA的凝集试验结果表明, 以猫红细胞凝集力最强,

当ConA浓度为0.0005微克/0.25毫升时就发生凝集,其次为豚鼠红细胞,而公鸡红细胞的凝集力最差(表1)。

表1 ConA对不同动物红细胞凝集反应结果

动物名称	产生红细胞凝集的ConA浓度(微克/0.25毫升)	动物名称	产生红细胞凝集的ConA浓度(微克/0.25毫升)
小白鼠	0.488~0.244	狗	0.122~0.017
大白鼠	1.953~0.976	羊	3.906~0.122
家兔	0.244~0.061	公鸡	125~62.5
豚鼠	0.0087~0.001	猴	3.906~0.976
猫	0.0005	鸽子	0.035

表2 不同浓度ConA对不同血型人红细胞凝集反应结果*

血型	检查人数	阳性数	ConA浓度(微克/毫升)								
			125	62.5	31.5	15.6	7.8	3.9	1.9	0.95	0.5
A	10	7/10	1	1	1	2	2				
B	10	7/10	2		1		1		1	1	1
O	10	5/10	3				1		1		
A B	10	6/10		1		1		1	1	1	1

*本试验是在室温下试验结果,如在37℃条件下则较室温凝集力强

实验方法基本同前。第1孔ConA浓度为100微克/0.1毫升,以后倍比稀释,最后1孔以生理盐水代替稀释ConA作对照。稀释完毕立即加入0.1毫升浓度为 3×10^6 /毫升左右待反应的细胞,摇匀后放37℃1小时。用吸管轻轻将沉下的细胞吹打,取1滴放在载玻片上,镜检,记录结果。判断标准同前。实验结果见表3。

表3 ConA对4种不同细胞株的凝集作用*

细胞株	ConA浓度(微克/0.1毫升)									对照
	100	50	25	12.5	6.25	3.1	1.5	0.75		
S180	++++	++++	++++	↓ ++	++	↓ -	↓ -	-	-	
05*肝癌	++++	++++	+++	++	+	-	-	/	-	
04*肝癌	++++	++++	++++	+++	+	±	-	/	-	
正常淋巴 细 胞	++	↓ +	↓ +	-	-	/	/	/	-	

*每种细胞株的试验结果皆重复3次

二、不同血型人红细胞皆可与ConA呈现凝集,无特异性(表2)。

ConA对肿瘤细胞的凝集作用

材料与方法

细胞株: S180(淋巴肉瘤细胞)由北京动物所引进。04*及05*(皆肝癌细胞株)、正常淋巴细胞传代株,此三株细胞自上海药物所及上海第二医学院引进。该细胞按常规用1640培养基传代保存,应用时将细胞消化取出, Hank's液洗2次,再以生理盐水配成 $3 \pm \times 10^6$ /毫升浓度的细胞悬液备用。

从表3观察到,3种肿瘤细胞株,当ConA浓度为6.25微克时皆可呈现明显凝集,而正常淋巴细胞株在ConA浓度25微克时才出现明显凝集。

讨论

外源凝集素对不同种动物及不同血型人的红细胞凝集性不同,从不同来源(植物种子或无脊椎动物)所提取的外源凝集素中,有的具有特异性的如草屯(vicia cracca),利马豆(phaseolus limensis)等能特异地与A型红细胞发生凝集。日本产中国槐(saphora japonica)则与AB型红细胞凝集。欧洲百脉根(laburnum alpinum)等能特异地与H(O)型红细胞凝集^(1,2)。此乃由于不同血型人的红细胞抗原决定簇不同的缘故。有的外源凝集素对不同的血型红细胞皆能发生凝集,称之无特异性外源凝集素或全凝集素,例如ConA。Goldstein氏将ConA与糖进行沉淀试验时,发现糖类中凡含有非

还原的 α -D-吡喃葡萄糖基、 α -D-吡喃甘露糖基、 β -D-呋喃果糖基及 α -D-阿拉伯呋喃糖基,甚至与分枝杆菌的阿拉伯半聚糖皆可形成沉淀线^(4,6,7)。

在我们实验室中观察到ConA对人的不同A、B、O血型的红细胞以及所试的10种动物的红细胞皆可凝集,只是凝集力不同而已。其中以猫与豚鼠的红细胞凝集力最强,猫红细胞在ConA 0.0005微克/0.25毫升浓度时即可发现明显凝集现象,据Sumner⁽⁸⁾的实验,当ConA含0.1微克/毫升浓度时能凝集马红细胞,看来猫红细胞较之马红细胞要敏感得多,不过我们用的制品不同,但也可以看出我国自制的ConA完全可以用于细胞凝集试验。

除上述外,ConA小剂量能选择性地凝集肿瘤细胞或转化细胞,而对正常细胞不凝集,其机理尚不够清楚。较早认为肿瘤细胞表面含外源凝集素的受体较正常细胞多,后来证明并非如此,两者细胞膜表面受体数量并无大差别,只是受体在膜表面分布情况不同。Nicholson等用电镜观察到正常细胞表面的ConA受体呈均匀分布,而转化细胞膜

上受体却汇集成团簇状或斑点状,因而提出凝集性不同是由于受体分布状态不同所致。但也有人反对此种看法,认为团簇状的产生是一种续发现象,而不同细胞表现不同的凝集作用,是与细胞的流动性密切相关。Huet等实验证明转化细胞膜流动性较正常细胞膜大,当ConA与之结合后易形成斑点而凝集。同时细胞膜的流动性又与微丝功能有关,若在细胞培养液中加入一种微丝功能阻断剂,即细胞松弛素B(Cytochalasin B)则可抑制ConA在转化细胞膜上形成团簇状。此外也有作者提出肿瘤细胞表面含有较多的微绒毛,故易被ConA所凝集。总之,外源凝集素对正常细胞和肿瘤细胞的凝集力不同,是与细胞表面结构不同有关。

小 结

本文以国产外源凝集素刀豆球蛋白A(ConA)对不同血型人的红细胞及多种动物红细胞进行凝集试验观察,证实ConA能广泛地对人或动物红细胞发生凝集,但凝集力却不同,其中以猫和豚鼠红细胞最为敏感。当使用小剂量ConA时可(下转第226页)

(上接227页)与此例所见基本相同,而此例右心房反较左心房扩大,推知可能与死前心力衰竭有关。心内膜垫缺损使血液由压力较高的左心经房室共道注入右心。患者经心导管检查,左向右的心内分流量达肺循环血流量的30~90%⁽²⁾。此例右心内腔扩大,右心室壁肥大与肺动脉管径增粗,均为生前存在左向右的心内分流的结果。在心腔中动静脉血混杂,血中缺氧,可导致患者出现不同程度的呼吸困难和发绀等症状。

二尖瓣的前瓣和三尖瓣的隔侧瓣,由腹、背两组心内膜垫汇合而成⁽⁶⁾,在发育缺陷时,可使瓣膜形成部分或完全性裂隙,分别导致二尖瓣与三尖瓣闭锁不全,使部分血液倒流。Lillehei等指出以二尖瓣闭锁不全较常见,接近半数,此可能与二尖瓣前瓣位于左心室流入道与流出道之间有关。卵圆孔未闭常与完全型心内膜垫缺损合并存在,出现率达62%⁽⁴⁾。此例所见为管状卵圆孔未闭,虽

可斜向通过探针,但在机能上是关闭的。

房室结动脉与希氏束在心内膜下沿第一房间孔的下缘经过^(7~9),当进行第一房间孔或心内膜垫缺损修补术时,宜加注意,以免损伤此动脉和希氏束而导致心律失常。

此型心内膜垫缺损,由于充血性心力衰竭,多早期夭亡⁽⁴⁾,本例也同。(图见封3)

参 考 文 献

1. Arey L B. : Developmental anatomy, 5-th ed. P326. 1947
2. Lillehei C W. et al; J thoracic and Cardiovas Surg 57: 83. 1969
3. 引自2
4. Wakai C S. et al; Am Heart J 56: 779. 1958
5. 薛淦兴等; 中华外科杂志 12(30): 203. 1964
6. Van Mierop LHS. et al; J Thoracic and Cardiovas Surg 43: 71. 1962
7. Reemtsma K. et al; Cir 24: 782. 1961
8. Reemtsma K. et al; Surgery 44: 99. 1958
9. Watkins E. et al; J Thoracic surg 30: 469. 1955

肿块。

X线征象(片号33765):两肺野清晰,右侧横膈圆顶升高至第6后肋间,肋膈角锐利。钡餐检查见右膈下呈钡糊充盈羽毛状肠曲。纵隔障、气管、心脏均左移。侧位胸片见肺门相近呈边缘光滑弧形穹窿膈顶,前后肋膈角变钝,膈下前方充盈钡糊肠曲,误诊为右膈疝。

例6:男,5岁,住院号137089,生后一直易患咳嗽,发热。当地医院诊断为“肺炎”。转来我院。体检:右肺下呼吸音低,心无杂音,腹软无肿块。

X线征象(片号34183):两肺清晰。见右下肺大片密度增高阴影,右膈升高至第5后肋间,肋膈角模糊。钡餐检查见右膈下有充盈钡糊肠曲。误诊为右膈疝

讨 论

小儿膈肌发育在胚胎期由中胚层及背侧部第4,5颈节部分化而来,中心为腱性,周围为肌性的广阔薄板组织。当分化过程发生异常时,导致膈肌发育过弱,即发生先天性横膈膨升症;或完全缺如,则发生先天性横膈疝。

本组6例经手术证实,因横膈结构菲薄,软弱无力,致腹内脏器的推挤使膈膨升。由于膈肌的胸骨部(前部),肋骨部(侧部)附着点的牵拉,故形成锐利的心膈角和肋膈角,而呈显著升高幕状穹窿光滑的膈顶。在胸片上较易识别和诊断。但有时升高膈顶轮廓不够清晰,随膈升高腹内脏器阴影占据下胸部,则易误诊肺炎,如例1、5、

为右侧横膈膨升,膈下为肝脏侵占了右下肺野,状如大叶肺实变阴影;如例3为左侧横膈膨升,当胃腔大量充气时膈下为胃泡顶替,其中无肠襻夹杂(图1),但当胃腔无气体充盈时,膈下可见不规则状致密肠襻,状似散在之融合性支气管肺炎。也能误诊为膈疝,如例5、6,一般是未仔细检查,注意分析的结果,膈疝因腹内脏器通过食道裂孔或Morgagni氏孔或胸腹裂孔膈,在胸部平片上看不见围绕的膈顶轮廓和心膈角或肋膈角。钡餐检查患侧肺野可见充钡的部份胃泡或蜿蜒肠曲,膈顶消失。当此疑难之际,必须钡餐造影鉴别,同时还可表现左或右横膈膨升的胃肠道改变;如发生左侧,钡餐检查,胃形态呈圆锥状垂直,排空延迟,如例2、3、4(图2、3)。如发生右侧胃形态和排空都无变化,可见充盈钡糊的肠曲升高,如例1、5、6,这些腹内脏器X线征象都明显限制于膨升的膈下。本文例5、6手术前X线诊断曾误诊为膈疝,主要原因对这两种疾病发生机理缺乏足够认识,主观臆测造成,通过这一教训,提高了认识。除上述本病的主要X线征象外,次要的征象如患侧肺纹理麤集,纵隔障、气管、心脏推向健侧;侧位胸片有气球状突入肺野的阴影。这些主次要X线征象与Masison氏描述的7点特征大体上是一致的,但我们将本病的X线征象分为主次二方面,有了主要X线征象已够诊断条件,遇疑诊时再作钡餐造影检查,既可缩短诊断时间,又可减轻经济负担。(图见插页12)

(上接第211页)与淋巴肉瘤S180株、肝癌细胞株发生凝集,而对正常淋巴细胞株不凝集,为应用ConA提取肿瘤抗原提供实验依据。

(承生理教研室协助取猫血特此致谢)

参 考 资 料

1. Bird G W G: Brit Med J 15: 165, 1959
2. Boyd W C: Ann N Y Acad Sci 169: 166, 1970

3. Robbins J H: Science 146: 1648, 1964
4. Goldstein I J, et al: Biochemistry 4: 876, 1965
Arch Biochem Biophys 121: 88, 1967
5. Aub J C et al: Proc Nat Acad Sci U S A 50: 613, 1963. Ibid 54: 396, 1965
6. Sharom HL, et al: Biol chem 242: 684, 1966
Biochim Biophys Acta 192: 364, 1969
7. Goldstein I J, et al: J Immunol 103: 695, 1969
8. Sumner J B, et al: J Bacteriol 32: 227, 1936