

经酶修饰和未经酶修饰的鹌鹑红细胞对甲壳动物血清凝集素凝集活性的差异研究

戴聪杰^{1,2}, 陈寅山³, 谢进金², 吴文林²

(1. 厦门大学 海洋学系, 近海海洋环境科学国家重点实验室, 福建 厦门 361005; 2. 泉州师范学院 生物系, 福建 泉州 362000; 3. 福建师范大学生物工程学院, 福建 福州 350007)

摘要: 为寻找凝集素作为分子探针提供基础资料, 用 12 种甲壳动物血清抽提液对天然的或经酶修饰的鹌鹑红细胞进行凝集试验。实验结果表明, 经蜗牛酶修饰后的鹌鹑红细胞的凝集作用发生了变化, 与未经酶处理的鹌鹑红细胞相比, 凝集活性提高的有日本沼虾 (*Macrobrachium nipponense*) 等 7 种, 凝集活性下降的有罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergi*) 等 2 种。凝集素对动物红细胞的凝集可看作是与这些细胞表面的多糖或糖蛋白——即受体的识别性结合, 这表明鹌鹑红细胞表面具有 12 种凝集素的受体, 且大多数受体都受到酶修饰的影响, 从而在凝集活性上表现出差异。

关键词: 甲壳动物; 凝集素; 酶修饰; 凝集活性

中图分类号: Q959.233 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3096(2005)12-0035-03

凝集素 (Lectin) 是一类具有糖结合专一性、可促使细胞凝集的蛋白质或糖蛋白。凝集素广泛存在于生物体中, 在植物、动物、微生物及病毒中均有发现。凝集素不但分布广泛, 而且功能多种多样, 其主要功能有: 促细胞有丝分裂作用; 免疫调节作用; 与细胞结合作用^[1]。凝集素除了具有上述的主要功能外, 还具有细胞毒作用, 与肿瘤细胞结合, 抑制肿瘤细胞等功能。由于凝集素的独特生化性质, 作为科研工具的广泛应用, 以及在医药方面的诱人前景, 近十几年来, 凝集素的研究十分兴旺。目前, 凝集素已经应用于血型的鉴定; 评价机体细胞免疫功能状况; 骨髓移植^[2]; 鉴别变异细胞, 特别是肿瘤细胞; 分离含糖高分子, 特别是利用凝集素与糖结合的专一性作为分子探针, 研究细胞膜表面糖链结构, 探索细胞发育、衰老、分化和癌变时膜上糖链的变化等等。

凝集素能与多种细胞结合, 并使细胞发生凝集, 如红细胞^[3-5]、脾细胞、淋巴细胞、肿瘤细胞、精子细胞^[6]、微生物细胞^[7]、藻类细胞^[8]等等。通常采用脊椎动物红细胞来检测凝集素的活性, 这是一种简单、快捷的方法。作者用正常鹌鹑红细胞来检测甲壳动物血清提取物的凝集活性时, 发现 12 种甲壳动物血清抽提液对正常鹌鹑红细胞表现出不同的凝集活性, 经蜗牛酶修饰后的鹌鹑红细胞对甲壳动物血清抽提液的敏感性发生变化, 提示鹌鹑红细胞表面具有多种不同受体, 这为利用凝集素与糖结合的专一性作为分子探针, 研究细胞膜表面糖链结构提供理论基础。

1 实验材料和方法

1.1 材料和试剂

各种甲壳动物均购自厦门农贸市场, 带回实验室洗净、分类鉴定、备用。鹌鹑血由厦门农贸市场屠宰场提供, 取全血, 用 3.8% 枸橼酸钠抗凝, 置于 4℃ 冰箱中备用。其余试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 实验方法

1.2.1 甲壳动物血清的制备

选取健康的日本对虾 (*Penaeus japonicus*)、凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*)、罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergi*)、日本沼虾 (*Macrobrachium nipponense*)、脊条褶虾蛄 (*Lop hosquilla costata*)、斑纹蛄 (*Charybdis feriatius*)、日本绒螯蟹 (*Eriocheir japonicus*)、红星梭子蟹 (*Portunus sanguinolentus*)、三疣梭子蟹 (*P. trituberculatus*)、远海梭子蟹 (*P. pelagicus*)、锯缘青蟹 (*Scylla serrata*)、相手蟹 (*Sesarma* sp.) 等 12 种甲壳动物, 带回实验室洗净, 分类

收稿日期: 2004-02-12; 修回日期: 2004-04-20

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目 (B0410027); 泉州市科学技术局重点科技计划资助项目 (Z200239)

作者简介: 戴聪杰 (1966-), 男, 福建南安人, 博士生, 副教授, 从事动物生理生化研究, 电话: 0592-2188471, E-mail: Congjiedai501@163.com

鉴别。虾类用经过高压灭菌的 1 mL、5 号针头注射器从围心室内抽取血样。蟹类剪肢放血。收集各种甲壳动物血淋巴液经 4 500 r/min 离心 10 min, 上清液为血清提取液样品, 在血清提取液中加入等体积 2 倍浓度的 TBS- Ca^{2+} 溶液(TBS 溶液: 0. 14 mol/L NaCl, 0. 01 mol/L Tris-Cl, pH7. 4; TBS- Ca^{2+} 溶液: TBS 溶液+ 0. 01 mol/L CaCl_2 , pH7. 4) 然后经凝集活力测定, 方法参照文献[3], 并进行蛋白质浓度测定后, 放冰箱备用。

1. 2. 2 细胞样制备

从冰箱取出加入抗凝剂的鹌鹑全血血样, 经 2 000 r/min 离心 10 min 除去血浆, 加 10 倍体积的 TBS 充分洗涤, 然后经 1 000 r/min 离心 3min 去上清液, 重复 4 次, 最后经 2 500 r/min 离心 3 min, 配成体积分数为 2% 的 TBS- Ca^{2+} 鹌鹑红细胞悬浮液; 另一部分鹌鹑红细胞加入含蜗牛酶(1 mg/L) 的 TBS 溶液中, 配成 2% 悬浮液在室温孵化 60 min, 然后离心去除上清液, 再用 TBS 洗涤 6 次, 离心 3 min 去除上清液, 最后加入 TBS- Ca^{2+} 溶液配成经酶修饰的体积分数为 2% 的 TBS- Ca^{2+} 鹌鹑红细胞悬浮液。

1. 2. 3 血凝活力测定

活力测定在 96 孔 V 型微量血凝板中进行。先在每孔中加入 25 μL TBS- Ca^{2+} , 再往第 1 孔中加入表 1 甲壳动物血清凝集鹌鹑红细胞的活力

Tab. 1 Hemagglutinating activity of crustacean serums of quail erythrocytes

甲壳动物种名	凝集效价		壳动物种名	凝集效价	
	<i>N</i>	<i>T</i>		<i>N</i>	<i>T</i>
日本对虾	2 ⁵	2 ⁵	日本绒螯蟹	2 ⁶	2 ⁸
凡纳滨对虾	2 ⁰	2 ²	红星梭子蟹	2 ¹	2 ¹
罗氏沼虾	2 ⁴	2 ³	三疣梭子蟹	2 ⁰	2 ¹
日本沼虾	2 ³	2 ⁸	远洋梭子蟹	2 ⁸	2 ⁹
脊条褶虾蛄	2 ³	2 ⁵	锯缘青蟹	2 ⁸	2 ⁸
斑纹蛄	2 ²	2 ¹	相手蟹	2 ⁸	2 ⁹

注: *N* 为甲壳动物血清对天然红细胞的凝集活力, *T* 为对经酶修饰后红细胞的凝集活力

实验结果表明, 对天然的鹌鹑红细胞的凝集活性, 最高的是远洋梭子蟹、锯缘青蟹、相手蟹等 3 种甲壳动物血清提取液, 凝集效价均为 2⁸; 最低的是凡纳滨对虾和三疣梭子蟹等 2 种甲壳动物血清提取液, 凝集效价均为 2⁰。对经酶修饰的鹌鹑红细胞的凝集活性, 最高的是远海梭子蟹和相手蟹等 2 种甲壳动物血清提取液, 凝集效价均为 2⁹; 最低的是斑纹蛄、三疣梭子蟹和红星梭子蟹等 3 种甲壳动物血清提取液, 凝集效价均为 2¹。酶修饰前后的鹌鹑红

25 μL 血清样品, 混匀后, 再从第 1 孔中吸取 25 μL 加入第 2 孔, 以此类推作倍比稀释, 最后在每孔中加入 25 μL 2% 的天然鹌鹑红细胞-TBS- Ca^{2+} 悬浮液或经酶修饰的 2% 鹌鹑红细胞 TBS- Ca^{2+} 悬浮液, 振荡摇匀, 在室温放置 2~ 3 h, 肉眼观察。以有红细胞凝集活力的最大稀释度为该凝集素样品的活力, 记为 2^{*n*}, 以 TBS- Ca^{2+} 作空白对照。

2 结果与讨论

2. 1 12 种甲壳动物血清的凝集活力

采用天然或经酶修饰的鹌鹑红细胞对(1) 日本对虾、(2) 凡纳滨对虾、(3) 罗氏沼虾、(4) 日本沼虾、(5) 脊条褶虾蛄、(6) 斑纹蛄、(7) 日本绒螯蟹、(8) 红星梭子蟹、(9) 三疣梭子蟹、(10) 远洋梭子蟹、(11) 锯缘青蟹、(12) 相手蟹等 12 种甲壳动物的血清进行检测。

这 12 种甲壳动物的血清提取液的初始浓度按(1) 到(12) 顺序依次为: 2. 14, 2. 96, 8. 08, 8. 70, 2. 99, 2. 32, 4. 63, 2. 64, 4. 30, 5. 62, 6. 47, 4. 00 g/L。12 种甲壳动物的血清凝集天然或经蜗牛酶修饰的鹌鹑红细胞的情况见表 1。

胞的凝集活性除日本对虾、红星梭子蟹、锯缘青蟹 3 种不发生改变外, 其余 9 种都发生不同的变化, 其中凡纳滨对虾、日本沼虾、脊条褶虾蛄、日本绒螯蟹、三疣梭子蟹、远洋梭子蟹、相手蟹 7 种血清的凝集活性都有不同程度的提高, 提高幅度最大的是日本沼虾, 凝集效价提高 32 倍, 提高幅度最小的是三疣梭子蟹和相手蟹, 凝集效价均只提高 2 倍; 而罗氏沼虾和斑纹蛄的凝集效价均降低为原来的 1/ 2。

2.2 12 种红细胞对甲壳动物血清凝集素的敏感性

实验结果表明(表 2),与天然红细胞相比,经酶修饰的红细胞对甲壳动物血清凝集素的凝集反应,

表 2 鹌鹑红细胞对甲壳动物血清凝集素的敏感性

Tab. 2 Hemagglutinating sensitivity of quail erythrocytes to crustacean serums

参数	呈阳性凝集反应的甲壳动物种数									
凝集效价(2 ⁿ)	2 ⁰	2 ¹	2 ²	2 ³	2 ⁴	2 ⁵	2 ⁶	2 ⁷	≥2 ⁸	≥2 ¹
N	2	1	1	2	1	1	1	0	3	10
T	0	3	1	1	0	2	0	0	5	12

注: N 为甲壳动物血清对天然红细胞的凝集活力, T 为对经酶修饰后红细胞的凝集活力

国外有人采用经胰蛋白酶或神经氨酸苷酶处理后的红细胞来检测凝集素的活性^[9-11]。国内有人报道用胰蛋白酶修饰兔红细胞对几种豆科植物凝集素活性的影响^[12],发现兔红细胞经酶修饰后,对几种豆科植物凝集素的敏感性都明显提高,认为兔红细胞表面凝集素的受体被膜外周蛋白或糖肽所遮挡,从而抑制了受体与凝集素的结合。胰蛋白酶通过对肽链的温和水解,使这种遮挡得以解除,从而使修饰后的兔红细胞的凝集作用加强。作者采用蜗牛酶(内含纤维酶、甘露聚糖酶、葡糖酸酶、几丁质酶和脂酶等 30 余种酶)对 12 种人或动物红细胞进行修饰,发现经酶修饰后,并非所有红细胞对甲壳动物血清凝集素的敏感性都提高,有的甚至下降。这种现象 Hori^[13]在研究经酶修饰的红细胞对海藻凝集素敏感性的影响时也有提到,但对甲壳动物凝集素这方面的研究尚未见报道。这可能是蜗牛酶把红细胞表面的糖链受体水解,从而使凝集素无法与红细胞结合的缘故。

参考文献:

[1] 王少元,吕联煌.凝集素及作为血液学研究的一种工具[J].国外医学输血及血液学分册,1992,15(1):4 K-6.

[2] 孙册,朱政,莫庆汉.凝集素[M].北京:科学出版社,1986,43-52.

[3] 赵景东,高翔,苏拔贤.文蛤(*Meretrix meretrix*)凝集素(MML)的初步分析I MML 在文蛤体内的分布及纯化[J].中山大学学报(自然科学版),1992,31

敏感性提高的占 58.33%,敏感性不变的占 25.00%,敏感性下降的占 16.67%。但总体上凝集效价是上升的,凝集效价 ≥2¹ 由 10 种提高到 12 种,凝集效价 ≥2⁸ 由 3 种提高到 5 种。

(1):86-91.

[4] 戴聪杰,陈寅山.日本对虾血清和肌肉提取液凝集活力初步研究[J].福建师范大学学报(自然科学版),2002,18(4):81-85.

[5] 梁宋平,林莉.虎纹捕鸟蛛凝集素 I (SHL-I) 的细胞凝集活性分析[J].中国生物化学与分子生物学报,2000,16(1):92-95.

[6] 黄德棋,余萍,朱闽,等.花椰菜(*Brassica oleracea* Var. *botrytis* L.)凝集素的细胞凝集和糖抑制作用的研究[J].福建师范大学学报(自然科学版),1992,8(2):72-77.

[7] 戴聪杰.甲壳动物血清凝集对微生物细胞的凝集性能[J].海洋科学,2003,27(10):63-68.

[8] 戴聪杰,陈寅山.甲壳动物血清中凝集素的凝集作用及影响因素[J].泉州师范学院学报(自然科学版),2002,20(6):76-81.

[9] Ainouz L. Agglutination of enzyme treated erythrocytes by Brazilian marine[J]. Bot Mar, 1992, 35: 475-479.

[10] Pueppke S G. Distribution of lectins in the jumbo virginia and spanish varieties of the peanut, *Arachis hypogaea* L. [J]. Plant Physiol, 1979, 64: 575-580.

[11] Kishinevsky B D, Law I J, Strijdom B W. Detection of lectin in nodulated peanut and soybean plants[J]. Planta, 1988, 176: 10-18

[12] 彭建宗,陈兆平.胰蛋白酶修饰兔红细胞对几种豆科植物凝集素活性的影响[J].华南师范大学学报(自然科学版),1999,3:59-62.

[13] Hori K, Ogata T, Kamiya H, et al. Lectin-like compounds and lectin receptors in marine algae: hemagglutination and reactivity with purified lectins [J]. Journal of Phycology, 1996, 32: 783-790.

(下转第 55 页)

The difference between enzyme-treated and untreated quail erythrocytes on hemagglutinating activity of quail erythrocytes with lectins

DAI Cong-jie^{1,2}, CHEN Yin-shan³, XIE Jin-jin², WU Wen-lin²

(1. Oceanographic Deptment, State key Laboratory of Marine Environmental Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 2. Department of Biology Quanzhou Normal College, Quanzhou 362000, China; 3. Bioengineering College, Fujian Normal University, Fuzhou 350007, China)

Received: Feb., 12, 2004

Key words: crustacean; lectins; enzyme treated; hemagglutinating activity

Abstract: As to offer basic data for searching for lectins as molecular probe, the serums of twelve species of crustaceans are detected for hemagglutinating activity with untreated and enzyme-treated quail erythrocytes. The results showed that hemagglutinating activity had changed when erythrocytes were treated by enzyme. Compared with untreated quail erythrocytes, the hemagglutinating activity of enzyme-treated quail erythrocytes of seven lectins from crustaceans such as *Macrobrachium nipponense* was increased, and those of two lectins from crustaceans such as *M. rosenbergi* were declined. The hemagglutination was regarded as discriminating combination between lectins and acceptors on the erythrocyte surface. It indicated that there are different types of acceptors on the quail erythrocyte, and most of them were effected by enzyme treated and show difference in hemagglutinating activity.

(本文编辑:张培新)