

鲎血细胞提取物生物活性的初步研究*

张海涛 梁景耀 翁云 祝其锋

(广东医学院生物化学与分子生物学研究所 湛江 524023)

提要 采用酸抽提法和 Sephadex G50 凝胶层析从鲎血细胞中分离出含有一低分子量组分的提取物, SDS-PAGE 显示一条区带。提取物可以抑制内毒素诱导的鲎试剂(TAL) 反应, 抑制金色葡萄菌和大肠杆菌的生长, 并发现 25 mg/ L 的提取物对 HL-60 细胞的生长有强烈的抑制作用。

关键词 鲎血细胞, HL-60 细胞, 抗菌组分, 内毒素

节肢动物门的淋巴细胞中存在一类低分子量的抗菌多肽, 该类多肽作为动物免疫防卫系统中的重要成员, 在动物抵抗微生物的感染中发挥着重要作用^[1]。Nakamura 在 1988 年报道从肢口纲动物鲎血细胞中发现一种低分子量的抗菌多肽 Tachyplesins, 该物质能够抑制革兰氏阴性细菌(G^-) 和革兰氏阳性细菌(G^+) 的作用, 并可抑制某些真菌的生长, 拮抗内毒素引起的鲎试剂(TAL) 反应。本文研究从中国鲎血细胞中提取的低分子量组分, 对细菌、TAL 反应及 HL-60 细胞生长的影响。

1 材料与方法

1.1 试剂

Sephadex G50(Pharm.), 噻唑蓝(MTT) (Serva 公司), 四甲基乙二胺, 丙烯酰胺, N, N'- 甲叉双丙烯酰胺, 考马斯亮蓝, 二甲基甲酰胺, 十二烷基硫酸钠(Sigma 公司), 甘氨酸, 低分子量标准蛋白(国产), 小牛血清(杭州四季清公司), 鲎试剂(湛江安度斯生物有限公司, 批号 990115, 灵敏度 $\lambda = 0.25$ Eu/ ml), 内毒素(中国生物制品检定所, 批号: 981)。

1.2 仪器

M450 型 ELISA Reader 酶标仪(美国 Bio Rad 公司); 日立冷冻高速离心机(日本日立公司); CO_2 孵箱(Precision 公司); Toxinometer EF201 浊度仪(Wako Pure Chemical Industries, Ltd.); LGJ 型真空冷冻干燥机(军事医学科学院制); 核酸蛋白质检测仪(永嘉侨联科学生物公司)。

1.3 鲎血细胞的分离和处理

鲎采自中国北部湾海域, 采集鲎血细胞, 离心收集, 将鲎血细胞悬浮于含 50 mmol/ L NaCl, pH8.0, 20 mmol/ L Tris-HCl 缓冲液中裂解, 8 000 r/ min 离心 30 min, 沉淀用 20 mmol/ L HCl 悬浮, 充分抽提, 离心 30 min, 收集上清液。将上清液用 Sephadex G50(1.5 cm $\times$ 90 cm) 分离, 20 mmol/ L HCl 洗柱, 流速 1.0 ml/ min, 收集低分子量组分, 冷冻干燥备用。

1.4 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳^[2]

样品用含 8 mmol/ L 尿素的电泳变性液处理。低分子量标准蛋白对照。

1.5 拮抗内毒素引起的 TAL 反应

按内毒素检测法, 用动态浊度法测定样品对内毒素介导的 TAL 凝胶反应的抑制。

1.6 抗菌活性

将冻干的样品用 pH 7.2 PBS 溶解, 等倍稀释, 按 80 μ l 培养基(蛋白胨 10 g + 酵母提取物 5 g + NaCl 5 g 溶于 1 000 ml 蒸馏水) + 10 μ l 样品 + 10 μ l 菌种(金色葡萄菌和大肠杆菌, 中国生物制品检定所), 细菌浓度 2.4×10^9 / L, 96 孔培养板 37 $^{\circ}$ C 培养 20 h, 630 nm 测吸光值($A_{630\text{ nm}}$)。采用方差分析进行统计。

* 广东医学院青年基金资助项目 9804。

TAL 反应分析工作得到湛江安度斯公司韦群、陈瑜、朱焕杰等同志的帮助, 特此感谢。

收稿日期: 1999-07-14; 修回日期: 2000-06-01

1.7 对 HL-60 细胞生长的影响

按 Hansen 1989 年报道方法,将样品用 pH 7.2 PBS 溶解,收集生长状况良好的 HL-60 细胞(军事医学科学院赠),用含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养基培养,细胞浓度 1.0×10^5 /L,加入样品,使之终浓度为 5, 15, 25 mg/L,用 96 孔培养板 37 °C, 5% CO₂ 孵箱中培养 24 h,用 MTT 法测细胞活性。采用方差分析进行统计。

2 结果

2.1 Sephadex G-50 凝胶层析

见图 1, 酸处理后经 Sephadex G-50 凝胶层析,可分为三组分,收集第三洗脱峰(含低分子量组分)。

2.2 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

见图 2,样品用含 8 mol/L 尿素的电泳变性液处

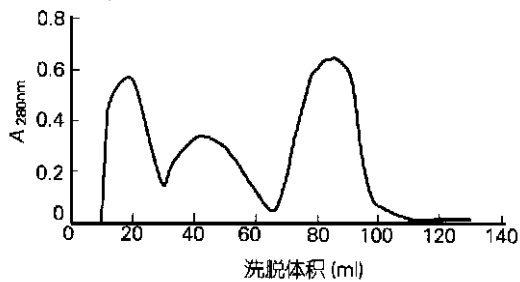


图 1 Sephadex G50 层析谱

Fig.1 Chromatogram of Sephadex G50

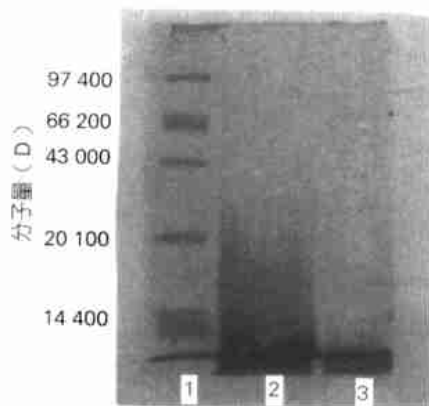


图 2 提取物 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳

Fig.2 SDS PAGE of purified samples

1. 标准分子量蛋白样品; 2. 提取物经 8 mol/L 尿素电泳变性液处理; 3. 提取物不经 8 mol/L 尿素的电泳变性液处理
1. The proteins mark; 2. Purified samples treated by 8 mol/L urea;
3. Purified samples untreated by 8 mol/L urea

理, SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳显示一条带, 分子量小于 14 400 D, 不经 8 mol/L 尿素的电泳变性液处理, 则无显色带。

2.3 拮抗内毒素引起的 TAL 反应

结果见图 3, TAL 反应浊度分析显示, 样品对 TAL 反应具有强烈抑制作用。

表 1 提取物对金色葡萄菌和大肠杆菌生长抑制的影响

Tab.1 Inhibition of purified samples on growth of *Staphylococcus* and *Escherichia coli*

提取物浓度 (mg/L)	$A_{630\text{ nm}}$	
	金色葡萄菌	大肠杆菌
0	0.782 ± 0.106	0.737 ± 0.078
5	0.664 ± 0.080	0.731 ± 0.142
10	$0.178 \pm 0.096^{**}$	$0.311 \pm 0.123^{**}$
15	$0.022 \pm 0.010^{**}$	$0.292 \pm 0.087^{**}$
20	$0.003 \pm 0.003^{**}$	$0.128 \pm 0.127^{**}$
25	$0.003 \pm 0.002^{**}$	$0.003 \pm 0.002^{**}$

注: 与 0 mg/L 提取物比较, $** P < 0.01$ 。

表 2 提取物对 HL-60 细胞生长的影响

Tab.2 Effect of purified samples on growth of HL-60 cells

提取物浓度 (mg/L)	$A_{m570, 450}$	抑制率 (%)
加样品前	0.119 ± 0.013	/
0	$0.209 \pm 0.007^{* \#}$	0.00
5	$0.195 \pm 0.009^{*}$	6.70
15	$0.140 \pm 0.012^{**}$	33.01
25	$0.051 \pm 0.021^{**}$	75.60

注: 与加样品前比较, $\# P < 0.01$; 与 0 mg/L 提取物比较, $* P < 0.05$, $** P < 0.01$; $A_{m570, 450}$: 主波长 570 nm, 参照波长 450 nm, 双波长测得吸光值。

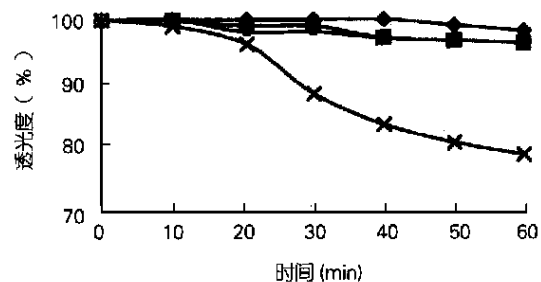


图 3 TAL 反应浊度变化

Fig.3 Change of TAL kinetic turbidimetric assay

◆: 250 mg/L; ■: 125 mg/L; ▲: 62.5 mg/L; ×: 0 mg/L

2.4 对细菌生长抑制

结果见表 1。

2.5 提取物对 HL-60 细胞生长的影响

见表 2。

3 讨论

从鲎血细胞中可提取多种生物活性物质,如目前广泛用于检测输液中内毒素的鲎试剂。本文采用酸抽提法和 Sephadex G50 凝胶层析分离出一活性组分的提取物,实验结果证明该物质具有抗菌、抑制内毒素引起的鲎试剂反应,其中最小抑菌浓度:金黄葡萄球菌为 15 mg/L,大肠杆菌为 25 mg/L。提取物在 62.5 mg/L 时尚对内毒素诱导的 TAL 反应具强烈抑制作用。提示提取物和鲎血细胞中存在的一类抗菌肽类 Tachyplesins 具有相似作用。

本文结果显示提取物对 HL-60 细胞具有一定的毒性,提取物浓度为 25 mg/L 时,对 HL-60 细胞有抑制作

用,抑制率为 75.60%。

Tachyplesins 对细菌抑制作用是通过改变细菌的通透性,提高细菌对 K^+ 的渗透性,从而抑制细菌的生长^[3,4], Yonezawa 在 1992 年证实 Tachyplesins 可以与 DNA 结合从而抑制 DNA 复制。本文提取物与 Tachyplesins 是否为同一物质?提取物对癌细胞的抑制机理是否是通过改变细胞通透性或抑制 DNA 复制有关?尚待进一步研究证实。🌿

参考文献

- 1 Hancock, R. Lehrer, R. *Trends Biotechnol*, 1998, **16**(2): 82 ~ 88
- 2 Galazka, M, Keil, L.B., Kohles, JD *et al.* *Thromb Res*, 1998, **90**(3): 131 ~ 137
- 3 Matsuzaki, K. Yoneyama, S. Fujii, N. *et al.* *Biochemistry*, 1997, **36**(32): 9 799 ~ 9 806
- 4 Mita, T. Iwanaga, S. *Methods Mol Biol*, 1997, 78: 63 ~ 71

PURIFIED SUBSTANCE FROM HORSESHOE CRAB HEMOCYTES AND ITS BIOLOGICAL ACTIVITIES

ZHANG Hai-ao LIANG Jing-yao WENG Yun ZHU Qi-feng

(Institute of Biochemistry and Molecular Biology, Guangdong Medical College, Zhanjiang, 524023)

Received: Jul. 14, 1999

Key Words: Horseshoe crab hemocytes, HL-60 cells, Antimicrobial fraction, Endotoxin

Abstract

Substance was purified from horseshoe crab blood cells by treated with acid and sephdex G50 gel filtration. The SDS-PAGE appeared one band after gel filtration, the molecular of the substance is lower than 14 400D. It can inhibit the TAL test and the growth of G^+ and G^- , and strictly inhibit the HL-60 cells growing in 25 mg/L.

(本文编辑:刘珊珊)