DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.10.046
第24卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 10
2002年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2002

文章编号:1000-5404(2002)10-1229-02

论著

氯胺-T氧化C5、体外组装补体膜攻击复合物及其鉴定

周镜然,朱锡华,白 云,姜 曼,黎万玲 (第三军医大学基础医学部全军免疫学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 利用氧化的方法在无酶解反应发生的情况下获得活化形式的C5,进而实现以纯化的补体终末成分体外组装补体膜攻击复合物(MAC)。方法 以蛋氨酸氧化剂氯氨-T与纯化的C5相互作用后,加入C6组装具溶血活性的C56复合物。以此复合物与NHS或纯化的后续终末补体成分组装MAC,检测复合物的溶血活性。结果 反应性溶破实验证实,氯胺-T氧化C5与C6组装形成功能C56复合物,后者可与NHS或纯化的补体终末成分C7~C9体外组装具溶血活性的MAC,并且所形成的C56复合物在24 h达到最大的溶血活性,48 h仍保持稳定。结论 氯胺-T在不裂解C5的条件下产生了C5b样活性分子,该分子能与C6组装形成稳定的活性复合物,并可与其它补体终末成分组装产生活性MAC。

关键词:补体膜攻击复合物;补体终末成分;氯氨-T
中图法分类号:R392.11;R392.12 文献标识码:A

Assembling and identification of membrane attack complex after C5 activation *in vitro*

ZHOU Jing-ran, ZHU Xi-hua, BAI Yun, JIANG Man, LI Wan-lin (Department of Immunology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To form hemolytica membrane attack complex(MAC)with purified human terminal components of complement after activation of C5 with chloramine T(Ch-T), a methionine oxidizing agent. Methods Purified human C5 was incubated with Ch-T in barbital buffer. C6 was added to form a stable C56 complex 10 min later. After incubation with NHS or purified C7, C8 and C9, MAC formation and lysis of non-sensitized guinea pig red cells (reactive lysis) were assayed. Results Ch-T-treated C5 acquired a binding site for C6 to form C56; After it incubated with C6 and subsequent addition of NHS or C7, C8 and C9, a membrane attack complex was formed which lysed non-sensitized guinea pig red cells. The hemolytic activity was in a dose-dependent fashion. Conclusion Ch-T oxidating C5 leads to form C5b-like functional activity molecules which can bind to C6 and form hemolytic MAC.

Key words: Membrane attack complex; terminal component of complement; chloramine T

已经证实,亚溶破MAC的细胞非致死性效应在多种疾病的发生、发展中起着重要的作用[1~3],因此MAC的病理效应成为近年来补体领域研究中的一个热点。在体外组装MAC并建立MAC细胞亚溶破模型是这类研究的前提。但通过经典或替代途径活化正常人血清得到MAC的过程中,有多种具有不同生物学活性的补体活化产物如C3a、C5a等在体系中产生,严重干扰了对MAC病理效应的观察与判断。因此,利用纯化的补体终末成分的进行研究十分必要,其中如何活化补体C5分子从而启动MAC的组装是问题的关键。有研究显示,氧自由基或蛋氨酸氧化剂可在无酶解反应发生的情况下获得活化形式的C5[4]。因此,本研究利用氯胺-T作为蛋氨酸氧化剂,探索了在不裂解C5的条件下活化补体终末成分、组装MAC的条件,获得了真正功能纯的活性MAC,为进一步深入研究MAC的病理效应及其机制奠定了良好基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

纯化的补体终末成分C5~C9(CalBiochem);氯胺-T、蛋氨酸(Sigma)。其余化学试剂均为分析纯。

1.2 主要实验设备

3550型酶联检测仪(Bio-Rad)。

1.3 氯胺-T氧化法组装活性C56

参照文献[5]方法进行。10 μg C5中加入10 μl VBS,10 μl 0.32 mmol/L氯氨-T(Chloramin-T),混匀后室温反应10 min。加入10 μl 1 mmol/L蛋氨酸终止反应后,加入20 μg C6及200 μl无血清DMEM培养基,置37 ℃孵育,组装活性C56复合物。

1.4 反应性溶破实验鉴定组装C56分子的溶血活性

保存于阿氏液中的豚鼠红细胞经VBS洗涤后,以1×10^8/100 μl铺板,加入不同剂量C56,混匀后37 ℃孵育15 min,加入1∶10稀释NHS-EDTA,37 ℃孵育1 h,1 500× g离心10 min,小心吸出上清,上清在波长415 nm处测吸光度,计算各孔溶血情况。将能引起1×10^7的豚鼠红细胞发生溶破的C56量定义为1个溶血单位。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39789010);国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G1999054200)
作者简介:周镜然(1972-),女,四川省威远市人,博士,讲师,主要从事补体分子生物学方面研究 电话:(023)68752238
通信作者:白 云,E-mail:baiy26@yahoo.com.cn
收稿日期:2001-12-05;修回日期:2002-01-18

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.5 纯化的补体终末成分体外组装 MAC 及其对豚鼠红细胞的溶破效应

保存于阿氏液中的豚鼠红细胞经 VBS 洗涤后，以 1×10^8/100 μl 铺板。分别加入 C56 0.1、0.2、0.4、0.8、1.6、3.2 μg，再加入纯化的 C7 1 μg/孔，37 ℃孵育 15 min。加入 C8、C9 各 1 μg/孔，37 ℃孵育 30 min。1 500× g 离心 10 min，小心吸出上清，在波长 415 nm 处测吸光度，判断各孔溶血情况。

2 结果

2.1 C56 组装时间与其溶血活性的关系

以氯胺-T 氧化 10 μg C5，并与 C6 在 37 ℃共孵育，组装活性 C56 分子。在反应进行的不同时间从体系中取出 1 μg C56，以 NHS 作为其它终末补体成分来源，进行反应性溶破实验检测 C56 的溶血活性，结果见图 1。可以看到，C56 分子组装并显示出溶血活性所需时间较长，在反应后 24 h 达到最大的溶血活性，继续孵育至 48 h 仍保持稳定。

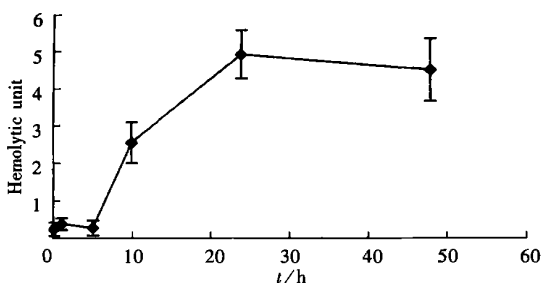
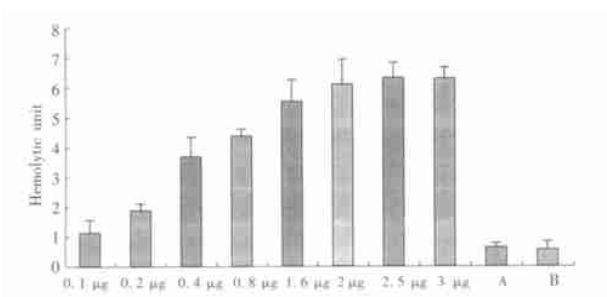


图 1 C56 组装时间与溶血活性的关系

Fig 1 Relationship of the assembling time of C56 complex with haemolytical activity

2.2 体外组装 MAC 对豚鼠红细胞的溶破作用

用氯胺-T 氧化 C5，并与 C6 37 ℃共孵育 24 h，组装活性 C56。以不同剂量的 C56 与后续的补体终末成分 C7～C9 体外组装 MAC，检测其对豚鼠红细胞的溶破情况。结果显示，活化的 C56 能与其它补体终末成分正确组装形成具有溶血活性的 MAC，并且其溶破作用呈剂量依赖关系，见图 2。



A: Without 9; B: Without complement

图 2 体外组装 MAC 对豚鼠红细胞的溶破效应

Fig 2 Hemolytic activity of assembled MAC with purified component of terminal complement on the lysis of guinea pig RBC

3 讨论

生理状态下 C5 活化的过程为一种裂解反应，即由 C5 转化酶从 C5 分子 α 链中裂解下一个小分子的肽 C5a，而所剩下的大分子片段 C5b 获得一个 C6 结合位点，成为活化的 C5。因此，在活化 C5 的过程中同时产生了两个具有重要生物学功能的活性分段。其中 C5a 是体内重要的趋化因子，对趋化白细胞及其它细胞参与局部炎症反应有重要作用，C5b 则是组装 MAC 的开端。本实验通过氧化剂氯氨-T 对纯化的 C5 分子进行氧化，在非酶解的条件下获得 C5b 样的功能形式。在该体系中加入 C6 后，两者即可结合形成具有生物学功能的 C56 分子。该分子能与后续的补体成分正确结合，组装形成 MAC，并可以剂量依赖方式溶破豚鼠红细胞。本实验所建立的以纯化补体终末成分体外组装真正功能纯 MAC 的方法为深入研究 MAC 的病理效应及其信号转导机制奠定了良好的基础。

与生理条件下的 C56 复合物相比较，氧化产生的活性 C5 分子是未被水解的完整分子形式。由于实验中所采用的氯氨-T 氧化条件只会导致蛋白分子中暴露于分子外部的蛋氨酸残基发生氧化，因此可以推断，氧化蛋氨酸残基、产生硫氧键可导致 C5 蛋白构象改变，进而产生与裂解活化相似的 C6 结合位点。

另外，本实验结果显示，氯氨-T 活化的 C5 与 C6 相结合并转变为具溶血活性的 C56 复合物需要较长的时间。这一现象产生的原因可能是 C5 分子内蛋氨酸残基氧化后，分子以很缓慢的速度进行变构，最终产生具 C6 结合能力的活化 C5，组装功能 C56 复合物。或者 C5 氧化后可以较快的速度结合 C6，但两者结合后并不具有功能活性，还需要进一步地缓慢变构，形成具溶血活性的 C56 复合物。Vogt 等[5] 的研究结果显示，氧化后的 C5 分子与 C6 的结合在不到 1 h 内即可完成，而形成的 C56 进一步变构、产生功能活性的复合物是一个缓慢的过程。

参考文献：

[1] Morgan B P. Complement membrane attack on nucleated cells: resistance, recovery and non-lethal effects[J]. Biochem J, 1989, 264(1): 1－4

[2] Hansch G M. The complement attack phase: control of lysis and non-lethal effects of C5b-9[J]. Immunolpharmacology, 1992, 24(1): 107－117.

[3] Liszewski M K, farries T C, Lublin D M, *et al*. Control of the complement system[J]. Adv Immunol, 1996, 61(2): 201－283

[4] Vogt W, Zimmermann B, Hesse D, *et al*. Activation of the fifth component of human complement, C5, without cleavage, by methionine oxidizing agents[J]. Mol Immunol, 1992, 29(2): 251－256

[5] Vogt W, Hesse D. Activation of the fifth component of human complement by oxygen-derived free radicals, and by methionine oxidizing agents: a comparison[J]. Immunobiology, 1992, 184(4－5): 384－391.

（编辑 陈聪连）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net