DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.02.027

活动增多,接触吸入性抗原的机会增加。5种吸入性抗原中,螨 IgE抗体阳性率最高,在> 7岁组杉花粉 IgE抗体阳性率急增,因为被杉花粉致敏需 6~ 7年,恰好小儿 7岁以后易发病。而且在> 7岁组螨 IgE抗体阳性率最高,对螨过敏后,对杉花粉的过敏起促进作用。

随着年龄增长,3种食物性抗原的 IgE抗体阳性率减少。原因是~ 3岁组婴幼儿以鸡蛋、牛奶为主食,食物性抗原是其哮喘的主要抗原。其他组接触这类抗原机会减少,因而食物性抗原的 IgE阳性率减少。加之,婴幼儿消化功能弱,食物性抗原经过消化后抗原性不减弱,因而仍产生致敏作用,造成婴幼儿对食物性抗原过敏。

小儿变态反应进行曲(Match)学说:小儿变态反应疾患,对于具有过敏性体质患儿,伴随着年龄增长,出现过敏性皮炎(湿疹)、小儿哮喘、花粉症(过敏性鼻炎、结膜炎)等一系列疾病移行,被称为小儿变态性反应进行曲(Match)。此次研究结果表明,随着年龄增长,哮喘患儿的过敏原从食物性向吸入性移行,相应的特异性 IgE抗体也从食物性向吸入性移行。此研究为小儿变态反应进行曲(Match)提供了病因学依据。小儿哮喘随着年龄增长,过敏原的 IgE抗体阳性率从食物性向吸入性移行,验证了变态反应进行曲(Match)学说。

哮喘患儿的总 IgE与特异性 IgE的关系:本结果提示 161例患儿中总 IgE阳性者 104例,其特异性 IgE全部阳性,而总 IgE阴性者 57例中,特异性 IgE阳性者 26例,说明特异性 IgE作为小儿哮喘过敏性的检测指标更敏感、更直接。

随着工业发展,小儿哮喘近年来有增加趋势,被称为文明病。为了减少哮喘的发病,对吸入性抗原如室内尘、螨、杉花粉等的暴露应减少,对食物性抗原也要引起高度重视。对于婴幼儿哮喘的过敏原,要注意到有一部分是由于食物性抗原引起的。

关键词 哮喘;过敏原;IgE抗体
中图法分类号 R725.5

参考文献

1 须甲,松伸.抗原特异的 IgEクラス抗体の新しい测定法.临床科学,1990,26:1316
2 全国儿科哮喘协作组.全国 90万 0~ 14岁儿童支气管哮喘患病情况调查.中华结核和呼吸杂志,1993,16(1):64
3 山田 节.气管支喘息 のスギ RASTに关する检讨.小 アレルギー学会 ,1987,11(1):17
4 森 郎子.小儿のスギ花粉症.小 科,1996,37:117
5 马场 实.アレルギーマーチとは马场 实(监修).アレルギーマーチの临床,东京:メデイカルレビエー社,1992.9~ 15

(收稿:1997-10-31;修回:1998-12-09)
(编辑 王 红)

天疱疮抗体的纯化与鉴定

The purification and identification of pemphigus antibodies

杨 卫兵* 刁 庆春 叶庆俏 (第三军医大学附属西南医院皮肤科)重庆,400038

提 要 目的:为纯化天疱疮患者血清中的天疱疮抗体,研究其在天疱疮发病机制中的意义。方法:利用 PI-1天疱疮抗独特型抗体,通过亲和层析法纯化了 1例天疱疮患者血清中的天疱疮抗体;用间接免疫荧光法(IIF)、SDS-PAGE免疫双向琼脂扩散试验对纯化的天疱疮抗体进行鉴定。结果:纯化的天疱疮抗体经鉴定为 IgG4亚类,分子量约为 15×10⁵u,其 IIF图像为表皮细胞间均一亮绿的线状荧光。结论:PI-1天疱疮抗独特型单抗特异性地针对于天疱疮抗体 IgG4亚类,为进一步对纯化的天疱疮抗体(IgG4亚类)在天疱疮发病机理中的意义打下了基础。

天疱疮是一种自身免疫性大疱性皮肤病,患者血清中的 IgG4亚类可能是天疱疮的病原性抗体[1]。抗独特型抗体已应用于多种自身免疫性疾病的临床诊断和实验性治疗[2],但在天疱疮方面的应用,国内外尚未见有关文献报道。本研究利用我科建立的 PI-1天疱疮抗独特型单克隆抗体[3],对患者血清中的天疱疮抗体,进行纯化和鉴定,期望能有助于今后对天疱疮发病机制的研究。

1 材料与方法

1.1 材料

天疱疮患者血清:患者女性,16岁,经临床、病理和直接免

* 杨卫兵,男,30岁,主治医师,医学硕士,现在桂林第 181医院皮肤科 桂林,541002

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

疫荧光(DIF)、间接免疫荧光(IIF)确诊为活动期寻常型天疱疮(PV)。收集其血清备用。

PI-1杂瘤细胞株:本科研制,于液氮冻存。

主要试剂:RPMI-1640培养基,美国 GIBCO公司;HRP标记兔抗鼠 IgG,华美生物制品公司;CNBr-Activated Sepharose 4B, Pharmacia公司;低分子量蛋白电泳标准品,军事医学科学院;羊抗人 IgG荧光抗体,华美生物制品公司;鼠抗人 IgG各亚类标准品,重庆医科大学。

1.2 方法

1.2.1 PI-1天疱疮抗独特型单克隆抗体的生产及其效价的检测　取本科研制的,经液氮冻存的 PI-1杂交瘤细胞株 1支,于 37℃水浴快速复温,用含 10%小牛血清的 RPMI-1640培养液按常规进行传代培养。取 8~12周龄的 Balb/c小鼠,腹腔内注入(1~2)×10^6个细胞/ml的处于对数生长期的 PI-1杂交瘤细胞,待小鼠腹部胀大后,收集腹水。

分别以天疱疮患者血清和正常人血清(均以 0.02 mol/L pH7.4 PBS稀释 100倍)包被酶联板孔,检测 PI-1单抗的效价。阴性对照孔一抗为 SP2/0瘤细胞小鼠腹水(1∶500稀释),阳性对照孔一抗为小鼠免疫血清(即建立 PI-1杂交瘤细胞时的小鼠免疫血清,以 1∶10 000稀释)。

1.2.2 亲和层析法纯化天疱疮抗体　参照产品说明及有关资料。先将 PI-1单抗和天疱疮患者血清分别以 0.22μm的微孔滤膜过滤,以除去溶液中的颗粒性物质;以 1 mmol/L HCl(pH2~3)溶液激活 CNBr-Activated Sepharose 4B的活性基团;将 Sepharose 4B与 PI1天疱疮抗独特型单抗混匀,于室温下平缓搅拌 2 h,使二者充分偶联,于布氏漏斗上用大量 0.1 mol/L $NaHCO_3$、0.5 mol/L NaCl缓冲液(pH8.3)反复过滤冲洗,至流出液于波长 280 nm的 D_{492}值≤0.02,以充分洗脱未偶联的蛋白质;将偶联后的 Sepharose 4B置于 1 mol/L乙醇胺溶液(pH8.0)中,于室温中静置 2 h,封闭 Sepharose 4B中未偶联蛋白的活性基团;然后先后用 0.1 mol/L醋酸钠(含 0.5 mol/L NaCl, pH4.0)、0.5 mol/L Tris-HCl(含 0.5 mol/L NaCl, pH8.0)缓冲液于布氏漏斗上过滤冲洗,以进一步洗脱未偶联的蛋白质和封闭剩余的活性基团,如此反复处理 3遍;将以上处理后的 Sepharose 4B装入层析柱中,用 0.1 mol/L $NaHCO_3$、0.5 mol/L NaCl缓冲液(pH8.3)缓冲液进行平衡;加入天疱疮患者血清于层析柱中,多次少量上柱,上柱完毕后于室温保持 2 h,使天疱疮患者血清与 PI-1抗独特型单抗充分反应;用 0.1 mol/L $NaHCO_3$、0.5 mol/L NaCl缓冲液(pH8.3)缓慢洗柱,至流出液于波长 280 nm的 D≤0.02;然后用 3 mol/L硫氰酸钾溶液洗脱,当流出液于 280 nm的 D值出现峰值时,收集洗脱液;合并洗脱液装入透析袋中,以生理盐水透析平衡,浓缩后用 Lowry法检测蛋白浓度。层析柱可反复使用多次。

1.2.3 纯化天疱疮抗体的鉴定　① SDS-PAGE浓缩胶和分离胶浓并分别为 5%和 12%;采用垂直板电泳槽对 2批亲和层析法纯化的天疱疮抗体进行电泳,浓缩胶中电压为 80V,分离胶中电压为 150V,电泳完毕后用银盐对凝胶进行染色。蛋白标准品的分子量分别为 94.7×10^3u, 66.2×10^3u, 43.0×10^3u, 31.0×10^3u, 20.1×10^3u, 14.4×10^3u;② 间接免疫荧光(IIF)检测:取环切后的正常人包皮,作冰冻切片,以此为底物;一抗为亲和层析法纯化的天疱疮抗体。阴性对照和阳性对照的一抗分别为正常人和天疱疮患者血清;③ 免疫双向琼脂扩散试验:以 1.5%琼脂加热后制板,其孔径为 2 mm,孔距为 3~5 mm,于中孔加入纯化的天疱疮抗体,周围各孔分别加入各抗体亚类鉴定标准试剂。于 37℃湿盒中扩散 24 h,观察抗原抗体沉淀线的位置,确定纯化天疱疮抗体的亚类。

2 结果

2.1 PI-1单抗的生产及其检测

液氮冻存的 PI-1杂交瘤细胞复苏后,于 Balb/c小鼠腹腔中分泌抗体,用间接 ELISA法测定抗体的效价为 1∶16 000;而 SP2/0瘤细胞腹水 1∶500稀释为阴性(D_{492}值为 0.01~0.05)。以正常人血清包被酶联板,PI-1单抗与之不反应(D_{492}值为 0.07~0.14)。

2.2 天疱疮抗体的纯化

PI-1天疱疮抗独特型单抗与 CNBr-Activated Sepharose 4B偶联,亲和层析法纯化天疱疮患者血清中的 PI-1单抗特异性的天疱疮抗体,Lowry法测得纯化的天疱疮抗体浓度为 0.69 mg/ml,稀释为 0.5 mg/ml。

2.3 纯化天疱疮抗体的鉴定

亲和层析法纯化的 2批天疱疮抗体经 SDS-PAGE后,用硝酸银对凝胶进行染色,结果均在分子量约为 50×10^3u 27×10^3u处各得一条清晰的染色带,见图 1,纯化的天疱疮抗体经双向琼脂免疫扩散试验,可见在 IgG4处有一清晰的沉淀线,见图 2,说明了纯化的天疱疮抗体为 IgG4亚类;纯化天疱疮抗体的 IIF图像为表皮细胞间有均一亮绿的线状荧光,天疱疮患者血清的 IIF图像也为表皮细胞间的线状荧光,而这种图像以正常人血清检测为阴性。



图 1 纯化 PAb的 SDS-PAGE

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

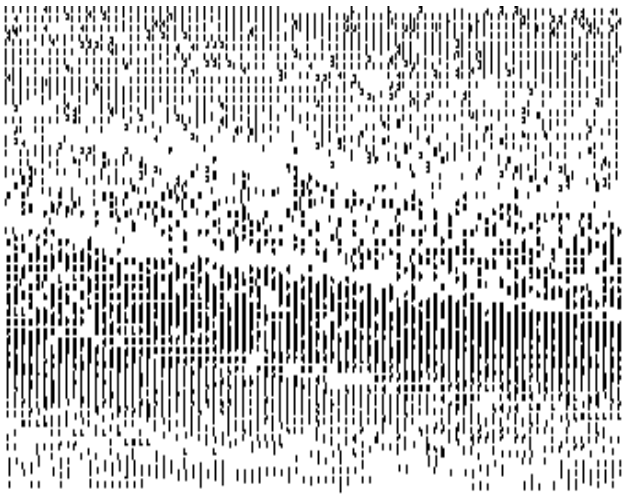


图 2 纯化天疱疮抗体的 IgG亚类测定

3 讨论

天疱疮抗原位于桥粒区,是一类桥粒性钙依赖性细胞粘附分子,寻常型天疱疮(PV)和落叶型天疱疮(PF)的抗原分别为 Dsg1、Dsg3,二者介导细胞的粘附功能,天疱疮是一种抗钙粘附素的自身免疫性疾病[4]。天疱疮抗体成分单一,主要为 IgG。本研究首次利用 PI-1天疱疮抗独特型单克隆抗体,特异性地将"纯"的天疱疮抗体从天疱疮患者的血清中纯化出来。

对纯化天疱疮抗体的鉴定结果表明:通过亲和层析法纯化的天疱疮抗体,经 SDS-PACE后,与分子量标准品相对照,在分子量约为 50× 10^3u和 27× 10^3u处各得一条清晰的蛋白染色带,二者分别为纯化天疱疮抗体的重链和轻链,纯化天疱疮抗体的分子量约为 154× 10^3u,达到了电泳纯;天疱疮患者血清作用于复层鳞状上皮棘层细胞间的天疱疮抗原,其 IIF图像为棘层细胞间的线状荧光,本研究纯化的天疱疮抗体的 IIF图像亦为表皮细胞间均一亮绿的线状荧光,且后者的荧光图像更为清晰、特异性更强。

研究表明[5,6],天疱疮抗体 IgG4亚类可能是天疱疮的致病性抗体,但天疱疮抗体各亚类在天疱疮发病机制中的意义尚未清楚。本研究利用天疱疮的抗独特型单抗纯化的天疱疮抗体,测定其亚类为 IgG4,符合上述结果,说明了 PI-1天疱疮抗独特型单抗是特异性地针对于天疱疮抗体 IgG4,但本研究纯化的天疱疮抗体 IgG4亚类是否导致棘层细胞松解有待实验证明。

Amagai等[7]分别用 PV和 PF抗原 Dsg3和 Dsg1的重组蛋白 PVIg、PFIg吸附 PV患者血清中的天疱疮抗体后,发现:用 PVIg吸附后的 PV血清只与表皮细胞的较上层反应;而 PFIg吸附后的 PV血清则只与表皮细胞的较低层反应,且正好处于水疱发生位置。因此指出,针对于 Dsg3的抗体可能是 PV的致病性抗体,而针对于 Dsg1的抗体在 PV则是非致病性的。本研究纯化的 PV患者血清中的天疱疮抗体为 IgG4亚类,但 IIF表明,这些 IgG4亚类天疱疮抗体与表皮细胞全层反应。因此针对于 Dsg3的天疱疮抗体与 IgG4亚类间有何联系,有待于进一步研究。

本研究利用 PI-1天疱疮抗独特型单抗,特异性地纯化了天疱疮患者血清中的天疱疮抗体,进一步证明纯化的天疱疮抗体为 IgG4,说明 PI-1单抗特异性地针对于天疱疮抗体 IgG4亚类,为进一步研究 IgG4在天疱疮发病机制中的意义提供了一种较好的手段。

关键词 天疱疮;抗独特型抗体;亲和层析,IgG亚类
中图法分类号 R753.2

参考文献

1 Bhol K, Natarakan K, Nagarwalla N, *et al*. Correlation of peptide specificity and IgG subclass with pathogenic and nonpathogenic autoantibodies in pemphigus: a model for autoimmunity. Proc Natl Acda Sci USA, 1995, 92(11): 5239
2 邓 军(综述).抗独特型抗体在自身免疫性疾病中的研究进展.国外医学:皮肤性病学分册,1996, 22(4): 213
3 张春明,刁庆春,叶庆佾.天疱疮抗独特型单克隆抗体的研制和鉴定.中华皮肤科杂志,1996, 29(4): 229
4 Amagi M. Adhesion molecules I: Keratinocyte-keratinocyte interaction cadherins and pemphigus. J Invest Dermatol, 1995, 104(1): 146
5 Tremeau M C, Oksman F, Bazex J. Immunoglobulin G subclass distribution of anti-intercellular aubstance antibodies in pemphigus. Ann Dermatol Venerol, 1995, 122(6~7): 409
6 Emery D J, Diaz L A, Fairley J A, *et al*. Pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus autoantibodies react with the extracellular domain of desmoglein-1. J Invest Dermatol, 1995, 104(3): 323
7 Amagai M, Koch P J, Nishikawa T. Pemphigus vulgaris antigen (desmoglein 3) is localized in the lower epidermis, the site of blister formation inpatients. J Invest Dermatol, 1996, 106(2): 351

(收稿: 1998-01-08;修回: 1998-11-06)
(编辑 张大春)

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