

研究生毕业论文

第二军医大学

一九八五年九月

第二军医大学
八二届研究生毕业论文

论文题目：人SIGA分泌成分（SC）的基础
和临床研究

部 别：第二附属医院

专 业：消化免疫（肝脏疾病免疫）

研 究 生：张鲁榕

导 师：	张国治	职称	教授
	孔宪涛	职称	副教授
	李 石	职称	副教授

指导小组：实验科：谢映华 杨宗岳 沈新义
耿培兰

内 科：陈士葆 张贤康 黄品忠

研究起止日期：1984.5~1985.5

交稿日期：1985.9

前 言

肝脏是人体最大的实质性脏器，是人体物质代谢的中心，具有参与糖、蛋白质、脂肪、维生素、激素代谢；解毒；合成排泌胆汁；制造凝血物质等功能。在感染、异常免疫反应、药物毒物等因素影响下，易发生肝细胞损害、胆汁淤滞、炎症反应等病理变化，肝胆疾病是临床最常见疾病。血清酶和蛋白质的变化是诊断肝胆疾病的主要实验指标。

随着免疫学的迅速发展，近年国外研究证实，肝脏在分泌型IgA免疫系统中起重要作用，人体存在p-IgA的肠肝循环，肝胆每日排泌160~400mg SIgA入肠，既加强肠道抗菌抗病毒抗食物抗原的免疫力，又清除体循环的免疫复合物，保持血清p-IgA的动态平衡。当肝胆病患时，血清SIgA含量显著变化。鉴于国内尚未开展此项研究，本文先提纯SIgA的分泌成分—SC (Secretory Component)，建立血清测定SIgA含量的双抗体RIA方法，证实SC在肝内的组织学定位，探讨我国肝胆疾病患者血清SIgA变化情况及其检测的临床意义，旨在为肝胆疾病的诊疗提供新的血清学指标。

目 录

前 言

摘 要.....	1
----------	---

I、人 SIgA 分泌成分 (S C) 的提纯及其抗血清制备

一、材料与方法.....	5
二、结果.....	8
三、讨论.....	12

(一) S C 纯化方法问题

(二) 抗 S C 血清制备及特异性问题

(三) 抗 S C 血清的亲合力

(四) S C 及其抗血清的应用范围

II、血清 SIgA 液相 R I A 测定法的建立及正常人血清 SIgA 含量

一、材料与方法.....	16
二、结果.....	18
三、讨论.....	27

(一) 液相 R I A 法的选择

(二) 最适抗体稀释度的特殊性

(三) 血清 SIgA 的正常值及其来源

III、S C 在肝组织中的定位

一、材料与方法.....	30
二、结果与讨论.....	32

IV、血清 SIgA 水平与肝胆疾患

一、材料与方法.....	35
--------------	----

二、结果.....	38
三、讨论.....	54
(一) 肝胆疾患血清 SIgA 特异性升高及其机制	
(二) 血清 SIgA 与 BIL、AKP、 γ -GT 的比较	
(三) 血清 SIgA 对慢活肝与慢迁肝鉴别诊断上的价值	
参考文献.....	60
综 述.....	69
致 谢.....	83

摘 要

本文通过提纯人 SIgA 的分泌成分 (S C)、制备抗 S C 血清、建立血清 SIgA 含量的双抗体 R I A 检测法, 探讨血清 SIgA 在肝胆疾病中的变化及其临床价值。

用 DEAE-Cellulose 32、CM-Sephadex C50、IgM-Sepharose 4B、抗乳铁蛋白 Ig~Sepharose 4B 及 Sephadex G-200 提纯人乳清游离型 S C, 经 PGAE、免疫电泳法证实为免疫纯, 分子量约为 75, 500。所制备的兔抗人 S C 血清对 S C 效价为 1: 32, 对 SIgA 为 1: 8~16。所建立的血清 SIgA 含量的双抗体 R I A 检测法在精确度、准确性、灵敏度、线性、特异性及稳定性方面均良好, 操作简便可靠, 3 小时出结果。

69 名正常成人血清 SIgA 均值为 $13.14 \pm 7.6 \mu\text{g/ml}$, 正常值范围为 $0 \sim 28.04 \mu\text{g/ml}$, 正常实测范围 $2 \sim 42 \mu\text{g/ml}$, 与国外报道相近。

132 例肝功能正常的非肝胆疾病患者血清 SIgA 无明显升高 ($P > 0.05$), 而 397/435 例肝胆疾病患者明显升高, 提示该指标有高度肝胆疾病特异性。

免疫荧光法证实, S C 分布于正常人肝的小胆管及小叶间胆管上皮细胞。多元逐步回归的因素挑选分析表明, B I L (血清总胆红素)、SGPT (血清谷-丙转氨酶) 与 SIgA 之间作用显著。这些提示, 血清 SIgA 升高与肝内炎变时细胞受损及胆汁返流有关。

简单相关分析表明, 在不同肝胆疾病, 血清 SIgA 与 SGPT、B I L、AKP、 γ -G T 的相关性不同。阳性检出率比较提示, 血清 SIgA 的检测有助于检出 B I L、AKP 阴性的肝胆疾患。

黄疸型肝炎恢复期，该指标延滞恢复，可用于协助诊断肝炎是否痊愈。血清 SIgA 持续性升高提示预后不好。

慢活肝 (CAH) 活动期组血清 SIgA 均值较慢迁肝 (CPH) 组高 2.83 倍以上 ($P < 0.01$)，且重复性较小，提示该指标反映肝内炎变部位及程度，有助于 CAH (尤其无黄疸的 CAH) 与 CPH 的鉴别诊断。

Abstract

The purpose of this study is to evaluate the diagnostic value of serum SIgA levels as determined by radioimmunoassay for hepatobiliary diseases.

Human free secretory component (SC) was purified from human whey *using* DEAE-cellulose 32, CM-Sephadex C50 IgM-sepharose 4B, anti-lactoferrin IgG -Sepharose 4B and Sephadex G-200. The purified SC was shown to be a single band on both PAGE and immunoelectrophoresis and to have a molecular weight of 75,500 on SDS-PAGE. The rabbit antihuman SC antibodies had an anti-SC titer of 1:32 and anti-SIgA titer of 1:8-16 in double immunodiffusion tests. The results of methodological appraisal indicated that the double antibody radioimmunoassay for human SIgA was *specific*, reproducible, sensitive and rapid, and could give results in three hours.

In 69 healthy individuals the range of serum SIgA was 2-42 $\mu\text{g}/\text{ml}$, the $\bar{x} \pm \text{SD}$ was $13.14 \pm 7.6 \mu\text{g}/\text{ml}$, the normal value was 0-28.04 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

In 132 patients with non-hepatobiliary disease, there was minor and infrequent elevation of serum SIgA (χ^2 test, $p > 0.05$). By contrast, marked and the

frequent increases of it were found in 397 out of 435 cases of hepatobiliary diseases (χ^2 test, $p < 0.01$).

The SC was localized in the cells of portal bile duct and bile canliculi by the indirect immunofluorescence technique. The multiple stepwise regression analysis indicated that the elevation of serum SIgA might relate to the lesions of liver and to the back-flow of biliary SIgA and SC.

There were different coefficients of correlation between SIgA and SGPT, BIL, AKP and r-GT in different hepatobiliary diseases. According to the rates of the positive test, serum SIgA might be an useful mark for diagnosis of the patients with hepatobiliary disease without positive BIL or AKP.

The mean level of serum SIgA in CAH (in active period) was 2.83 times as high as that of CPH, and the overlap of SIgA between CAH and CPH was much less than that of r-GT, which suggests that serum SIgA might be used as a new index for differential diagnosis between CAH and CPH, and for judging the degrees of portal inflammation.

I. 人SIgA分泌成分(SC)的提纯及其抗血清制备

分泌成分(Secretory Component, SC)是一种在粘膜免疫中具有重要生物活性的糖蛋白,含糖量18~19%⁽¹⁾,分子量约75,500,等电点为4.7~5.3⁽²⁾。近十多年,国外对SC的研究甚多,提出了SCA(分泌型免疫球蛋白A)形成过程及pIgA(多体IgA)的肠肝循环等理论⁽³⁾;临床上,用抗SC血清检测血中SIgA,发现SIgA特异性地在肝胆疾病患者血清中显著升高⁽⁴⁾;激素对子宫液、泪液SC水平有影响^(5,6);还发现组织SC的免疫反应性对直肠结肠癌的诊断和预后估计有一定价值⁽⁷⁾。为开展对SC、血清SIgA与肝胆疾病的研究,我们提纯了SC,制备了抗SC血清,兹介绍如下。

材 料 和 方 法

一、材料

(一) 乳清:收集健康、无乳腺疾患的孕妇产后2~5天内新鲜乳汁,4℃下100,000g离心30分钟,弃上层黄色结块乳脂和下层白色沉淀的酪蛋白,取中层清液,存于-20℃,待提纯。

(二) IgM~Sephadex 4B亲和层析柱制备:取Waldenström巨球蛋白血症患者血浆200ml,用蒸馏水沉淀优球蛋白法⁽⁸⁾反复提取数次,得到高纯度IgM。用0.12M NaCl、0.1M pH7.2 Na-PO₄ PBS₁溶解提取物,使蛋白浓度为50~60mg/ml,取1.5g IgM,与100ml CNBr活化的50% Sephadex 4B悬液按Underdown方法⁽⁹⁾偶联。

(三) 抗乳铁蛋白IgG~Sephadex 4B亲和层析柱制备:取效价为1:32兔抗人乳铁蛋白血清(本室自制),以QAE~

Sephadex A50 法⁽⁸⁾提取其中 IgG, 将 1 g IgG 与 50 ml CNBr 活化的 Sepharose 4 B 按常规方法交联⁽⁸⁾。

(四) DEAE-Cellulose 32 和 Sephadex G-200 按本室常规⁽⁸⁾处理后, 分别以 0.01 M、pH 7.6 PB 和 PBS 1 充分平衡。

(五) CM-Sephadex C50 干粉。

(六) 抗血清: 抗人全乳血清由本院放免室提供; 抗人 SIgA 血清由上二医附属新华医院同位素室惠赠; 抗正常人全血清、抗 IgA、抗 IgM 购自上海生物制品所。

二、SC 提纯方法

参照文献报告^(2, 9, 10, 11), 经本文改良的方法如下: 取乳清 200 ml, 对 0.01 M、pH 7.6 PB 充分透析平衡后, 以 40~50 ml/小时流速过 DEAE-Cellulose 32 层析柱 (2.5×30 cm), 用 0.01 M、pH 7.6 PB 洗脱。收集穿过峰液, 加入 $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ 固体至浓度为 4 mg/L, 电动搅拌下加入 CM-Sephadex C50 干粉 (2 g/L), 4℃ 下缓慢搅拌 2 小时。置冰箱过夜后, II 号砂蕊漏斗过滤, 取滤过夜, 用枸橼酸调至 pH 6.8 后加入交联好的 IgM~Sepharose 4 B, 4℃ 搅拌 3 小时, 装柱 (2.5×30 cm), 以 PBS 1 洗脱杂蛋白, 至流出液无蛋白为止 ($A_{278} < 0.02$), 亲和柱再用 1 M、pH 7.0 KSCN 洗脱结合蛋白, 收集蛋白峰液, 对 PBS 1 充分透析至无 KSCN 后 (用 FeCl_3 检测), 过抗乳铁蛋白 IgG~Sepharose 4 B 亲和层析柱, 用 PBS 1 洗脱, 收集穿过峰, 4℃ 下超滤浓缩至 10 ml。过 Sephadex G-200 柱 (2.5×100 cm), 用 PBS 1 洗脱, 收集第二峰, 即为 SC 纯品。

S C 提纯的流程图

新鲜初乳

↓ 100,000g × 30 分钟

取中层乳清

↓ 对 0.01M pH7.6PB 充分透析平衡

DEAE-Cellulose 32 (用 0.01M, pH7.6PB 平衡)
(2.5 × 30cm)

↓ 0.01M, pH 7.6PB 洗脱

收集穿过峰

↓ 加入固体 $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ 至浓度为 4 mg/L

↓ 电动搅拌, 4°C 下

加入 CM-Sephadex C50 干粉 (2 g/L)

↓ 4°C 下, 缓慢搅拌 2 小时

↓ 4°C 过夜

↓ II 号砂蕊漏斗过滤

取滤液

↓ 枸橼酸调至 pH6.8

加入 IgM-Sephrose 4B

↓ 4°C 下搅拌 3 小时, 装柱 (2.5 × 30cm)

↓ PBS1 洗脱杂蛋白至 $A_{278} < 0.02$

↓ 1M, pH7.0KSCN 洗脱结合蛋白

收集结合蛋白洗脱峰

↓ 对 PBS1 充分透析

↓ 10% FeCl₃, 鉴定无 KSCN

过抗乳铁蛋白 IgG-Sephrose 4B 柱
(1.2 × 30cm)

↓ PBS1 洗脱

收集穿过峰

↓ 4°C 超滤浓缩至 10 ml

过 Sephadex G-200 柱 (先以 PBS1 平衡)

(2.5 × 100cm)

↓ PBS1 洗脱

收集第二峰, 即为 S C

三、S C 纯度鉴定方法

(一) 聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳⁽⁸⁾：加样量为 $100\mu\text{g}/\text{柱}$ 。

(二) SDS—聚丙烯酰胺凝胶水平板电泳⁽⁸⁾：不同批之 S C 各取 20 、 25 、 $12\mu\text{g}/\text{孔}$ ；乳铁蛋白 $30\mu\text{g}/\text{孔}$ ；混合标准蛋白 $80\mu\text{g}/\text{孔}$ ；SIGA $13\mu\text{g}/\text{孔}$ 。

(三) 免疫电泳⁽⁸⁾：载体为 $0.8\text{g}/\text{d}$ 琼脂糖，电泳液为 0.05M 、 $\text{pH}8.2$ 的巴比妥缓冲液。板中各孔抗原均为提纯的 S C，槽中加抗血清（自上而下）为抗全乳清、抗乳铁蛋白、抗人全血清、抗 SIGA，抗 IgA、抗 IgM。

四、S C 抗血清制备及特异性鉴定方法

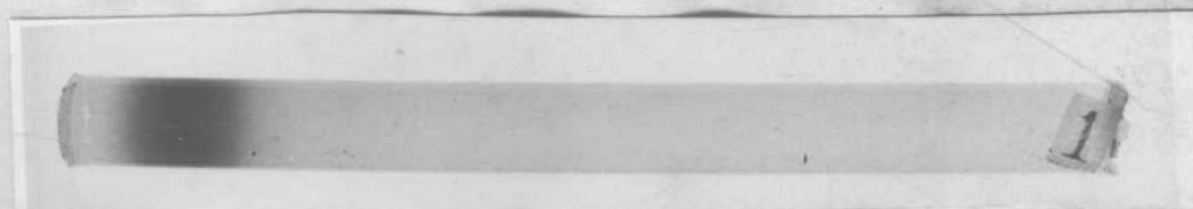
(一) 抗 S C 血清的制备：取提纯的 S C 0.25mg 加入等量福氏完全佐剂，乳化后注射于新西兰纯种兔足趾皮内，三周后再以 0.5mg S C 加等量不完全福氏佐剂注射于腋窝肿大的淋巴结及四肢内侧皮内皮下多点。以后每隔七天同法于四肢、背部皮内皮下多点加强注射，至产生满意效价时颈动脉放血，分离血清，用戊二醛交联的人脐血清吸附⁽⁸⁾。

(二) 抗 S C 血清的特异性和效价鉴定：用双向扩散法鉴定抗 S C 血清效价；以乳清、乳铁蛋白、正常人血清、IgA 骨髓瘤血清、SIGA、S C 为抗原，用免疫电泳法鉴定抗血清特异性。

结 果

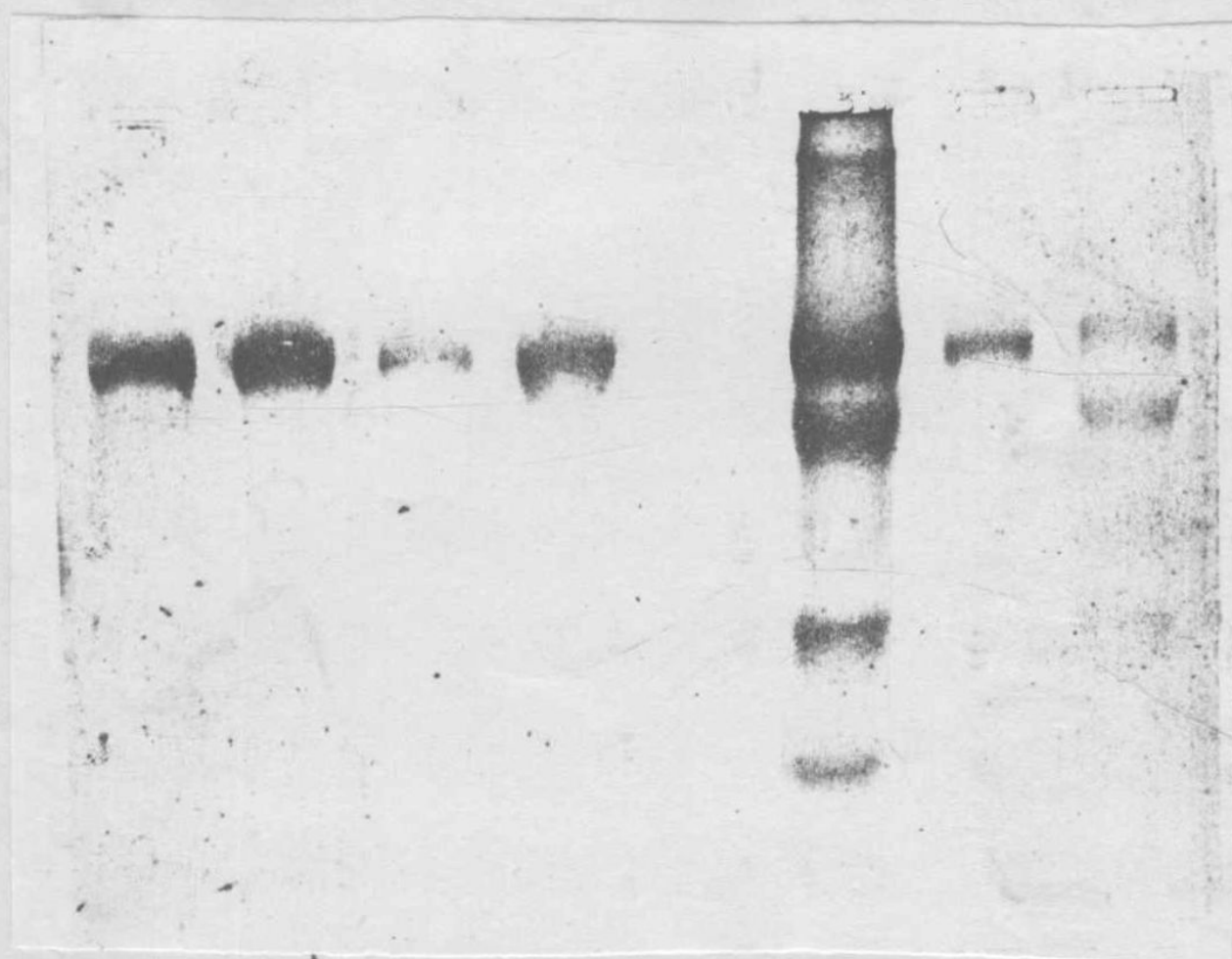
一、S C 的纯度和分子量

1. 聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳显示提取的 S C 为单一区带。（图一）

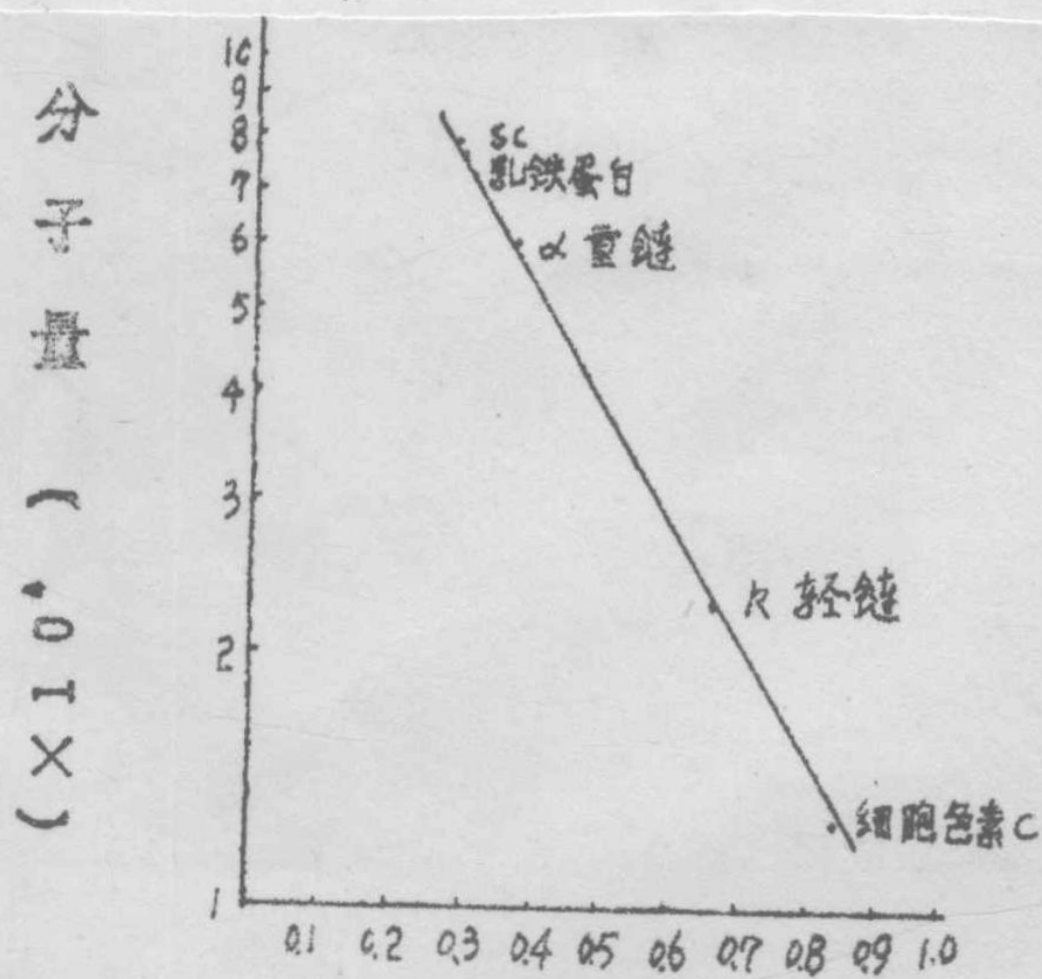


图一：PAGE 示单一区带

2. SDS—聚丙烯酰胺凝胶电泳法测得纯化的 SC 分子量约为 75,500, 且呈单一区带。(图二、三、表 1)。



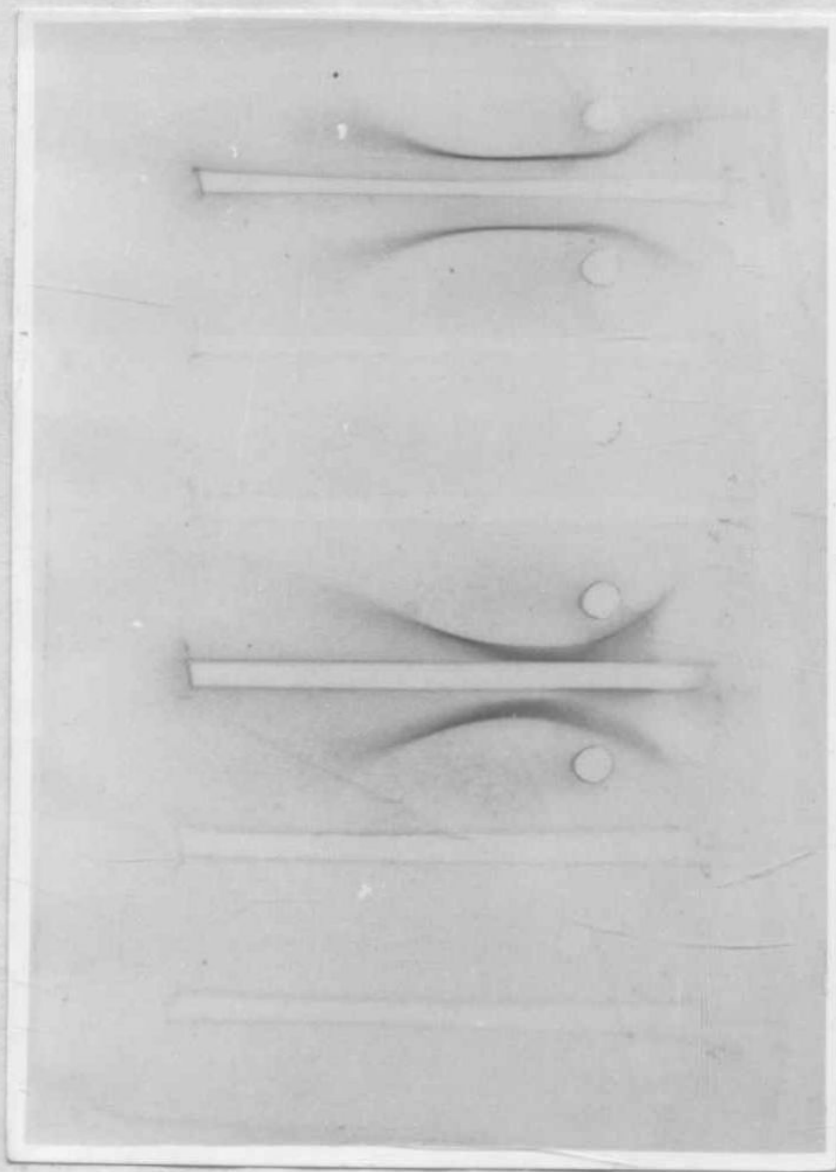
图二：SDS—PAGE
(自左至右：SC、
SC₂、SC₃、
乳铁蛋白、混合标
准蛋白、SC、
Sigma)。



图三、SC、标准蛋白分子量与
相对迁移率的关系

3. 免疫电泳显示纯化的S C与抗全乳、抗SIgA血清呈单一沉淀线，与抗人全血清、抗乳铁蛋白、抗IgA、抗IgM不反应。

(图四)



图四、免疫电泳。孔内均加S C为抗原，槽中加抗血清（自上而下）为抗全乳清、抗乳铁蛋白、抗人血血清、抗SIgA、抗IgA、抗IgM

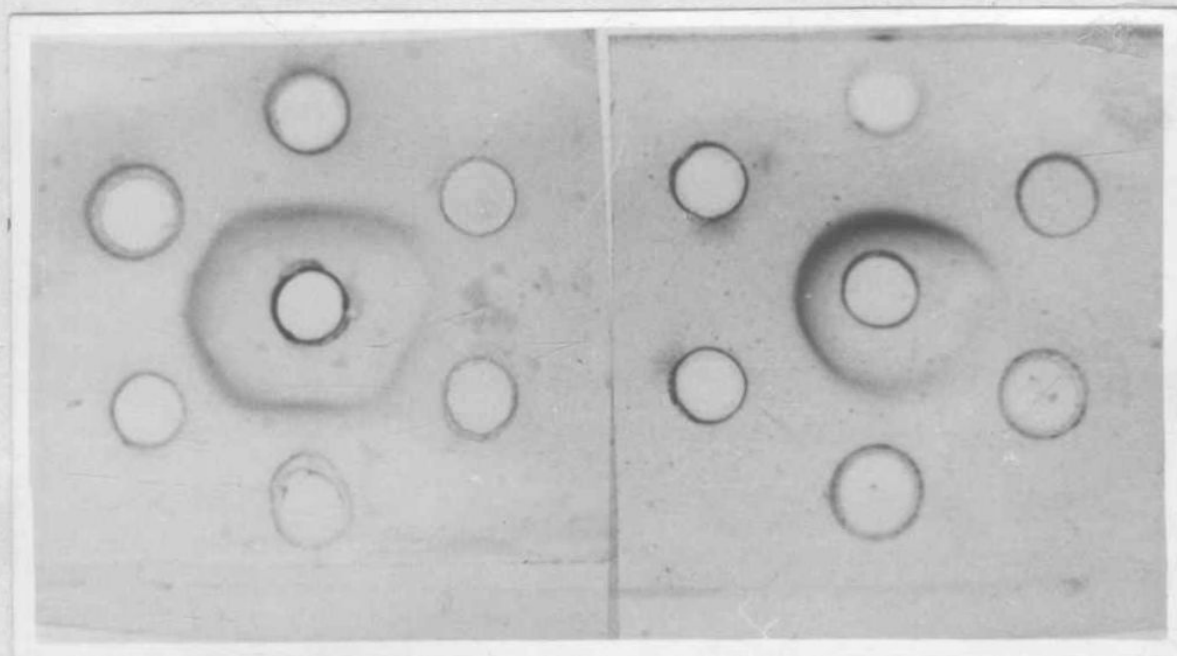
表1 标准蛋白、S C的迁移率与分子量关系

标准蛋白	染料迁移距离 (cm)	样品迁移距离 (cm)	相对迁移率	分子量 (dalton)
细胞色素C	6.0	5.05	0.84	13,370
k轻链	6.0	3.95	0.66	22,500
α重链	6.0	2.35	0.39	58,000
乳铁蛋白	6.0	1.80	0.30	75,000
S C	6.0	1.78	0.297	75,500

$$r = -0.999 \text{ (x 为相对迁移率, y 为 } \log MW \text{)}$$

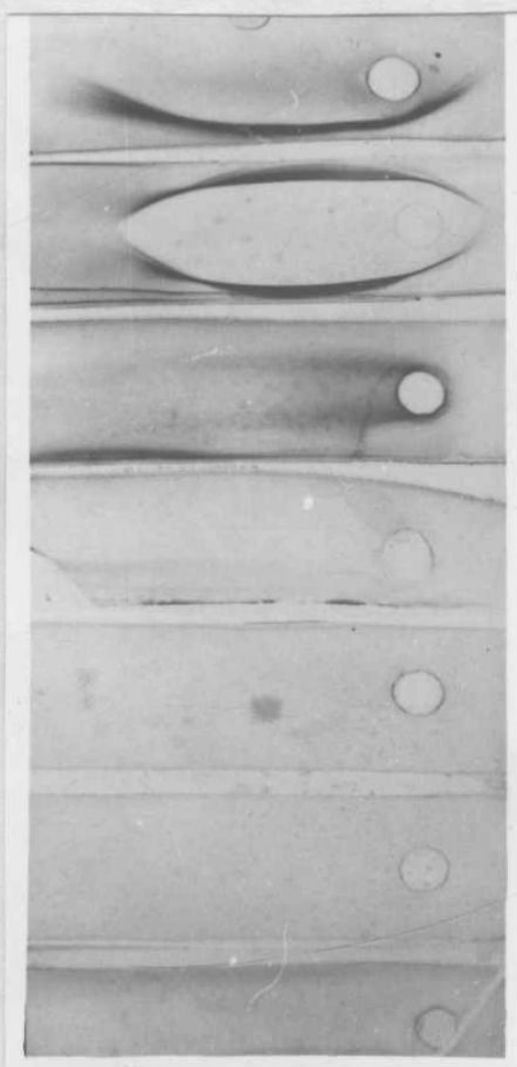
二、抗S C血清的效价及特异性

1. 双扩散法测得抗S C血清与S C反应效价为1:16—1:32; 与SIgA反应效价为1:8~1:16(各批抗血清稍有差异)。(图五)。



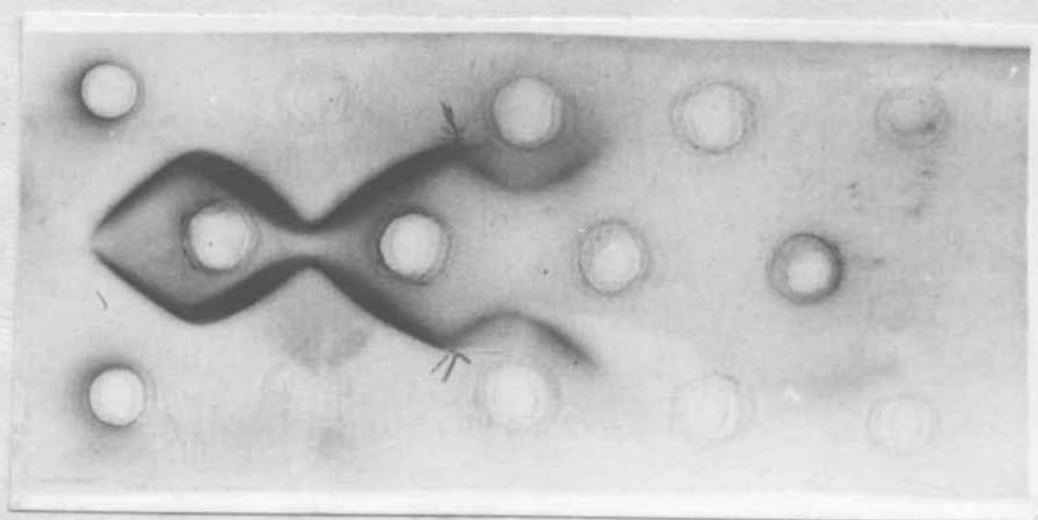
图五、免疫双扩散测得对S C(左)效价为1:32;
对SIgA(右)效价为1:16。

2. 免疫电泳显示出抗S C血清与乳清、纯化S C及SIgA均呈单价特异沉淀线,与乳铁蛋白、正常人血清、IgA及IgM二种骨髓瘤血清均无反应。(图六)



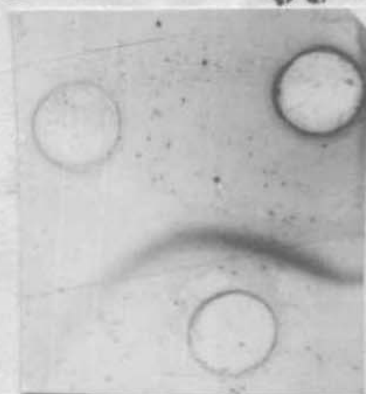
图六、免疫电泳。槽中均加抗S C。孔中(自上而下)为乳清、S C、SIgA、乳铁蛋白、正常人血清、IgA骨髓瘤血清、IgM骨髓瘤血清

3. 免疫双扩散法见抗S C与乳清、S C之间形成的沉淀线完全融合，而抗S C与SIgA、S C之间形成的沉淀线呈现部分融合（图七）。抗S C、抗IgA与SIgA之间形成的沉淀线完全融合（图八）。



图七 免疫双扩散。中行孔均加抗S C血清；上下行孔（自左至右）加乳清、S C、SIgA、乳铁蛋白、正常人血清。箭头示S C与SIgA之间呈部分交叉。

抗S C 抗SIgA



SIgA

图八、免疫双扩散。上左孔为抗S C、上右孔为抗IgA，下中孔为SIgA。两条沉淀线完全融合

讨 论

一、S C纯化方法问题

1966年以来，欧美学者先后发表多篇有关S C纯化文章，基本可归为三类：1. 藉离子交换、分子筛直接分离提纯⁽²⁾S C。2. 先提取SIgA，用巯基乙醇处理，使S C从SIgA分子上游离出，烷基化