

上海第一医学院
师资进修教材

医用生物物理技术(三)

免疫学中若干生物物理学问题



1982

目 录

本院生物物理学教研组在本院印刷厂印刷的讲义有:

1. 细胞电泳
2. 血液流变学讲座
3. 医用生物物理技术(一)
4. 医用生物物理技术(二)……同位素技术在医学及生物学中应用
5. 本册

以上 1 ~ 3 已售完, 4 ~ 5 可向本院讲义室购买。

目 录

抗体分子生物物理学.....	1
细胞电泳技术在细胞免疫研究中的应用.....	11
免疫核糖核酸传递反应性的研究及其临床应用.....	26

抗体分子生物物理学

江世益*

分子免疫学是现代免疫学的一个分支、它是在分子水平上应用现代物理学的技术、如 X-射线晶体衍射、核磁共振、电子自旋共振等研究抗原和抗体分子的三维结构,进而阐明抗原与抗体特异性结合的分子基础,以及抗体分子的效应功能等分子运动规律。

抗体(免疫球蛋白, Ig)是免疫反应中主要分子,它既能识别抗原,又能发生效应功能(如激活补体C₁q和结合细胞)。尤其是抗体分子与抗原分子的特异性结合,它的专一性程度极高,抗体分子如何识别成千上万结构不同的抗原,如何完成对抗原或靶细胞的效应功能,曾是分子免疫学研究的中心课题。因此,只有先从抗体分子的结构研究着手,才能探明其实质。

60年代初, Porter 和 Edelman 等提出了抗体分子的四链结构模型,尤其至70年代初,有学者进行了人 IgG1 的全部一级结构测定,并在对Ig分子的一级结构进行了比较研究的基础上,提出了功能区学说,解释了Ig的一些功能。从此,分子免疫学得到迅速发展。目前,在抗原方面,业已阐明一种球蛋白(鲸肌红蛋白)的全部抗原结构,以及鸡卵清溶菌酶分子中一个抗原决定簇结构。在抗体方面,已弄清了各类Ig的一级结构和Ig分子的三维结构。尤其对抗体分子的抗原结合位点构造,进行了较多研究,这有助于弄清抗原与抗体特异性结合的本质。

一、抗原的免疫原性和专一性的分子结构

抗原是一种能引起机体发生免疫反应并产生抗体或形成致敏淋巴细胞的物质;且能与相应抗体或致敏淋巴细胞发生特异性结合。这种高度特异性结合是基于抗原分子表面上的某些基团的化学结构,即抗原决定簇的构象和特性。

如鲸肌红蛋白(图1)的抗原决定簇分布于分子表面,位于肽链转角处或末端(第16~21, 56~62, 94~99, 113~119, 146~151位氨基酸残基)。抗原决定簇的大小不超过6~8个氨基酸残基,与抗体分子的抗原结合位点大小相符。各决定簇在空间均保持一定的三维结构,并具有一定的免疫原性。

又如鸡卵清溶菌酶也有相似的结果(图2)溶菌酶分子由129个氨基酸组成,它的抗原决定簇是一个位于分子表面突出部分的“环肽”。“环肽”含有第64位至第83位氨基酸残基的一段肽链,在第64位与第80位残基之间有一二硫键相连成环状。而抗原专一性依赖这一“环肽”的构象与氨基酸组成。如环中第75位赖氨酸(Leu)与第78位异亮氨酸(Ileu)由丙氨酸(Ala)取代,抗原性不变;若以丙氨酸(Ala)取代第79位脯氨酸(Pro),抗原性降低;如以丙氨酸(Ala)取代第68位和73位精氨酸(Arg),抗原性明显降低。若破坏第64位与80位氨基酸残基之间的二硫键,环形打开,则抗原性消失。因此,二硫键在维持环肽空间结构起一定作

* 上海第一医学院化学教研室

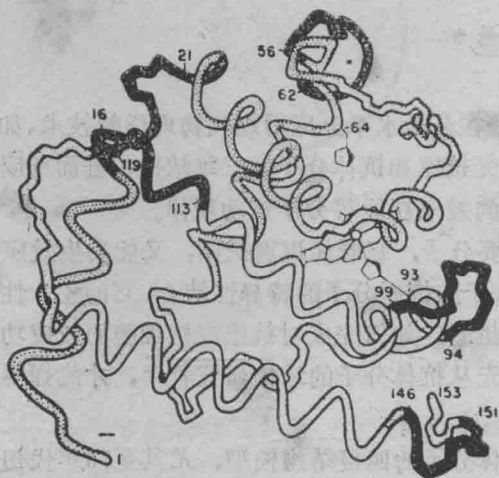


图1 鲸肌红蛋白空间折迭结构图。
图中黑色区段为抗原决定簇部分

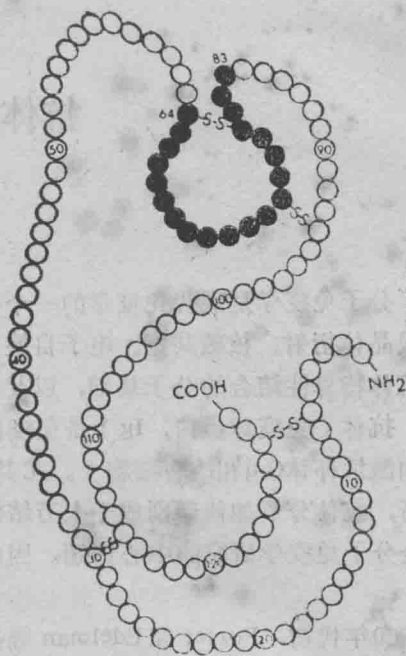


图2 鸡卵清溶菌酶分子结构，带
●—●者为“环肽”部分

用。总之，蛋白质分子免疫原性不但取决于位于大分子表面的抗原决定簇的化学构造，数目，而且还取决于它们在分子表面上的三维结构。也即抗原决定簇的专一性不仅依赖氨基酸组成和排列顺序，还依赖于分子的局部构象（如“环肽”）。

二、抗体分子结构

Porter 和 Edelman 提出的Ig结构为四链分子结构模型（图3）。它由两条轻链和两条重链组成，各链之间均由二硫键呈共价结合，加上分子内氢键，保持整个Ig结构的稳定。轻链

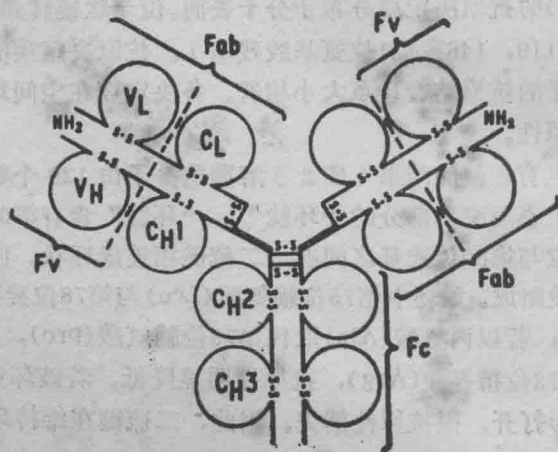


图3 Ig分子结构图

和重链各自均有可变区和恒定区，重链可变区 V_H 和轻链可变区 V_L 长度约相等。若将各种Ig可变区(V区)的氨基酸顺序，按最大同源性排列(即在各排列位置上有尽可能多的相同残基排列着)，留出一些缺失或插入的肽段，就可发现各种Ig的V区氨基酸排列顺序有高度变异性，但 V_H 与 V_L 仍有一定的同源性。 V_H 与 V_L 位于Fab的N-端，即在与抗原相结合的部位，由此可知抗体与抗原结合的专一性是抗体分子的抗原结合位点依赖于 V_H 与 V_L 的氨基酸顺序排列，这些顺序排列的多变性才是结合专一性的分子基础。此外，在重链与轻链中又有恒定区 C_H 与 C_L 。 C_H 上按链内二硫键位置又可分成 C_{H1} ， C_{H2} 与 C_{H3} 三段，它们之间的氨基酸排列又有高度同源性，且每一段又都与 C_L 同源，在恒定区内的氨基酸排列基本恒定。在 C_{H1} 与 C_{H2} 之间有一段区域称为绞链区，内富含脯氨酸(Pro)，可使重链弯曲易变。

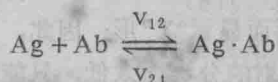
各同源区在空间又可互相摺迭成更为紧密的球状结构，而每一球状结构为具有特殊功能的区域，称为功能区，如轻链和重链的 V_L 和 V_H 组成V区，它可与抗原相结合， C_{H1} 与 C_L 组成 C_1 区，两个 C_{H2} 与两个 C_{H3} 分别组成 C_2 区与 C_3 区。 C_2 区有激活补体 C_1q 的功能； C_3 区具亲细胞性。

为了进一步研究Ig的功能，常将Ig酶解成较小分子的片段，如用木瓜蛋白酶裂解Ig成Fab和Fc两片段；用胃蛋白酶可裂解Ig成 $F(ab')_2$ 与 pFc' 两片段。

三、抗体与抗原分子间的亲和力

抗体与抗原分子之间的结合实属抗体分子上的Fab端的抗原结合位点与抗原分子上的决定簇之间结合。由于抗原分子上有较多决定簇，且非单价的。因此，常用半抗原与抗体分子上的抗原结合位点的专一性结合进行研究。

假设Ag为半抗原，Ab为抗体， $Ag \cdot Ab$ 为半抗原与抗体的复合物。则Ag与Ab之间的结合反应是可逆过程，服从质量作用定律，则



$$k_{12}[Ag][Ab] = k_{21}[Ag \cdot Ab]$$

$$\frac{[Ag \cdot Ab]}{[Ag][Ab]} = \frac{k_{12}}{k_{21}} = K$$

v_{12} 为结合反应速度常数， v_{21} 为解离反应速度常数。K为抗体分子的亲和力常数，其数值与温度有关，且对每一抗体是一特定常数。因此，K值大小可约略判断抗体的抗原结合位点与半抗原(或抗原决定簇)分子间结合力大小。由于抗体的不均一性，在抗体群体中并非所有抗体分子对半抗原具有相同的亲和力。因此，在实际测定中的K值为一平均值，以 $\bar{K}$ 表示。目前可用动力学方法测定K，如止流法和温度跳跃法。也可用平衡透析法测定K。 $\bar{K}$ 值一般在 10^4 至 10^{10} 之间。

抗体的亲和力大小也可用物理化学中热力学概念表示，常用最大自由能变化(ΔG°)衡量。

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K.$$

R为气体常数，数值为1.987卡/克分子·度；T为绝对温度。 ΔG° 值越负，表明抗原与抗体结合后放出能量越多，亲和力越大，它们的结合越牢固。表1中列出一些抗原(半抗原)与抗

表1 抗原(半抗原)与抗体结合的 K_a 和 ΔG° (25°C)

抗原(或半抗原)	抗 体	K_a (升·克分子 ⁻¹)	ΔG° (千卡·克分子 ⁻¹)
对-氨基苯肿酸	兔抗对-氨基苯肿酸	3.5×10^5	-7.7
2,4-二硝基苯基	兔抗2,4-二硝基苯基	2.3×10^5	-6.8
牛血清白蛋白	兔抗牛血清白蛋白	2.5×10^4	-5.5 ± 0.2
苯醋酸盐	兔抗苯醋酸盐	2.5×10^5	-7.25
苯肿酸-偶氮-牛血清白蛋白	兔抗苯肿酸	$7 \pm 3 \times 10^3$	-4.8 ± 0.2
氨基苯基 β -乳糖甙	兔抗 β -乳糖甙	1.5×10^5	-7.1
血型抗原B	血型抗B抗体	3.0×10^6	-9.2
胰岛素	胰岛素抗体	$1 \times 10^7 \sim 1.8 \times 10^{10}$	$-10.0 \sim -14.0$
血型抗原C	血型抗C抗体	$1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$	$-10.1 \sim -11.3$

体间结合的 K_a 与 ΔG° 值。

四、抗体子分的三维结构

70年代初, Sarma等用6 Å低分辨率X-射线晶体衍射法测定了人IgG1(Dob)的结构, 发现Ig的立体结构是由三个球状区组成呈“T”字形, 两边侧翼相当于Fab片段, 其水平部分约长142 Å, 垂直部分相当于Fc片段, 约长85 Å, 整个分子呈二重轴对称。同年, Labaw等用电子显微镜直接观察人IgG1(Dob)分子结构, 发现Ig结构呈“Y”字形排列, “Y”形中相应的两个Fab片段之间距离约为120 Å, 比X-射线晶体衍射法所计算出的距离为短。这可能当IgG1处于晶体状态时, 由于晶格力的作用而显示“T”形, 而在溶液中的IgG1或作电镜检查时用戊二醛固定后, 可导致IgG1分子变形而显示“Y”形。因此, 目前仍认为IgG分子的正常空间模型呈“T”字形。由于X-射线晶体衍射的分辨率太低, 只能看到分子的大致轮廓。至于分子结构中肽链的空间走向, 无法察见。

1976年, Deisenhofer等用3.5 Å的X-射线晶体衍射分析了人IgG的Fc片段, 发现它的四个球状区($C_{\gamma 2}, C_{\gamma 3}$)₂在空间排列有所不同。两个 $C_{\gamma 3}$ 区彼此紧靠; 而两个 $C_{\gamma 2}$ 区却彼此远离。这由于在 $C_{\gamma 2}$ 区上第297位的门冬酰胺(Asn)是有连结糖的结合点。由于与糖的结合, 而导致 $C_{\gamma 2}$ 区在空间彼此分开(图4)。

自1974年以来, 学者们曾先后开展了Fab片段或轻链二聚体的三维结构研究。如 Polhjak等用2 Å分辨率的X-射线晶体衍射研究人IgG(New)Fab'结构; Segal等研究小鼠IgA骨髓瘤McPC603Fab结构; Schiffer和Edmundson研究了Mcg λ -轻链二聚体晶体结构; Fehlhammer和Epp用2 Å X-射线分析了两个 κ -轻链二聚体(Au和Rei)的结构。以上所述结构, 无论是Fab片段或二聚体, 彼此均较相似。现以Mcg λ -轻链二聚体为例, 阐明其三维结构。

Mcg λ -轻链二聚体由两条 λ 轻链在其倒数第二位的半胱氨酸残基间以二硫键相联。用X-射线晶体衍射分析的结果表明该二聚体的四个功能区约呈正四面体的空间结构排列(图5)每一功能区约长40 Å, 整个二聚体约长77 Å, 而两个单体在三维结构中并不相等。 V_1 与 V_2 以及 C_1 与 C_2 均呈准二重轴对称, 它们的对称轴不在同一直线上, 相交成120°(图5(a)(b))。此外, 两个单体的V区和C区的空间关系也不相同, 单体₁中的二硫键之间距离为25 Å, V区

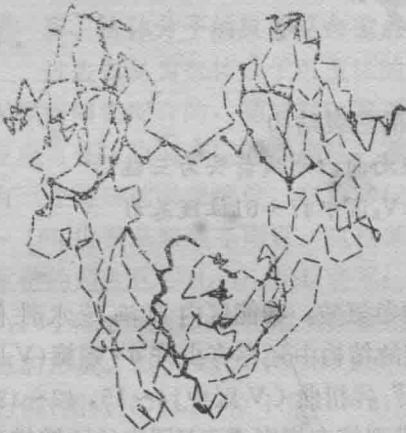


图4 人IgG的Fc片段立体结构

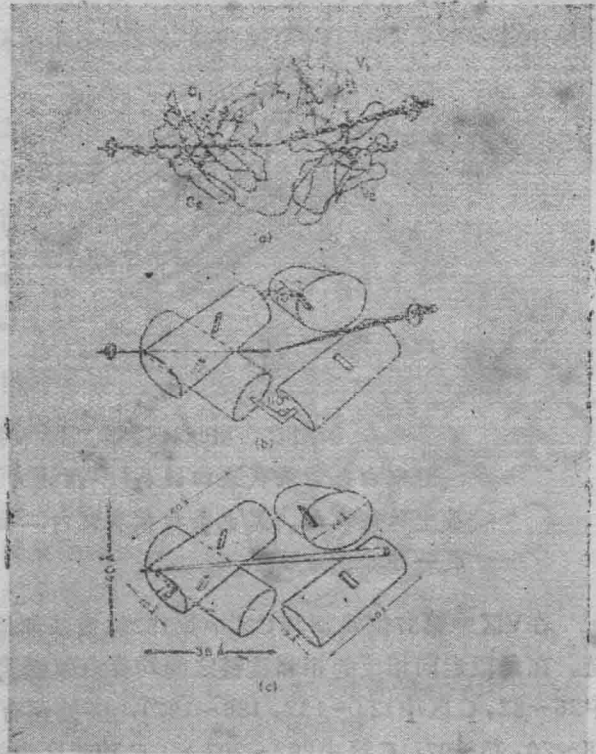


图5 (a) Mcg λ -轻链二聚体中的 V_1 与 V_2 以及 C_1 与 C_2 均呈准二重轴对称, 两对称轴互交成 120°

(b) V_1 与 C_1 的长轴间夹角为 70° ; V_2 与 C_2 长轴间夹角为 110°

(c) Mcg λ -轻链二聚体及其各功能区的大小

注: (b)、(c)中的圆柱状体分别代表 V_1 、 V_2 、 C_1 与 C_2 等功能区

与C区长轴间夹角为 70° , 单体 $_2$ 中的二硫键之间距离为 $43 \text{ \AA}$, 长轴间夹角为 110° (图5(b)). 整个二聚体在空间的大小范围见图5(c).

人IgG1(New)Fab'片段的空间排列结构基本上与 Mcg λ -轻链二聚体相似, Fab'(New)中的 V_H 与 C_H1 以及 V_L 与 C_L 相当于二聚体中的单体 $_1$ (V_1 、 C_1), 和单体 $_2$ (V_2 、 C_2).

进一步研究Mcg单体的V与C区, 发现它们在三维结构上具有相似性. 如图6是Mcg单体 $_2$ 的V与C区的三级结构. V_2 是由伸展的多肽链沿其功能区的长轴平行方向往返转折而形成两层 β -褶皱片, 其中一层由三段肽链(残基33~41, 86~94, 98~110)组成; 另一层由四段肽链(残基3~13, 16~25, 72~78, 64~69)组成; 而二硫键位于功能区中央, 将三链层的中间处和另一四链层中间处加以联结.

C_2 也有相似空间结构, 也由伸展的多肽链往返转折而组成两层 β -褶皱片, 一层由四段肽链(残基114~123, 133~141, 175~185, 161~170)组成; 另一层由三段肽链(残基147~155, 193~201, 204~211)组成. 在两层之间同样也由二硫键相联结.

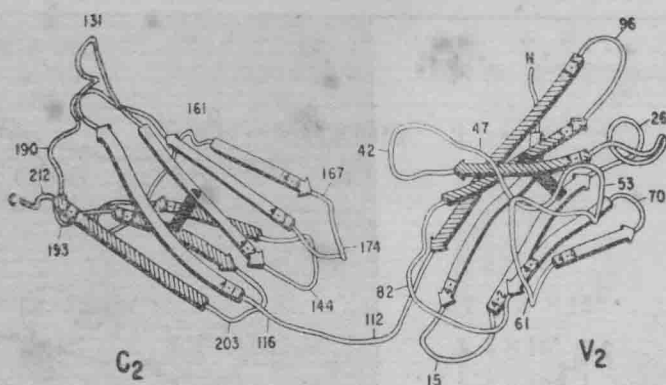


图6 McgA-轻链二聚体中单体₂的三级结构

图中白色箭头代表四链层(β-褶皱片)中肽链走向, 划线箭头为三链层中肽链走向。黑色条状代表链内二硫键。在V₂区中47~61位残基形成一额外多余肽环。

在V区中第37位残基与C区中第152位残基都是恒定的色氨酸。功能区内充满疏水性侧链。在每段走向相反的相邻肽链之间均存有氢键。在肽链的结构中还存有少许α-螺旋(V区中26~32, C区中124~132, 186~192), 多处存有“发夹”样扭曲(V区中14~15, 42~43, 68~70, 95~97; C区中202~203)。C功能区中的肽链排列较有规则, 而V区中的肽链排列却不太规则, 有一额外的环(在残基47~61之间的一个环), 它不参于两层β-褶皱片结构中。这一结果与V区中的一级结构按最大同源性排列时, 还留下一段多余的肽段的结果相符。因此, 同源区一级结构的相似性决定了它们空间构象的相似性。从而可推论出各种κ型或λ型轻链的V_L与C_L同源区应有相似空间构象, 各类重链(α、γ、μ等)的V_H与C_H等同源区也应有相似空间构象。

图7是Mcg二聚体的空间结构, 从图中可见C₁区与C₂区由四链层相峙, 而V₁区与V₂区却由三链层相峙。四链层表面间具有高度的互补, 而三链层表面间略具互补, 形成一个圆锥形

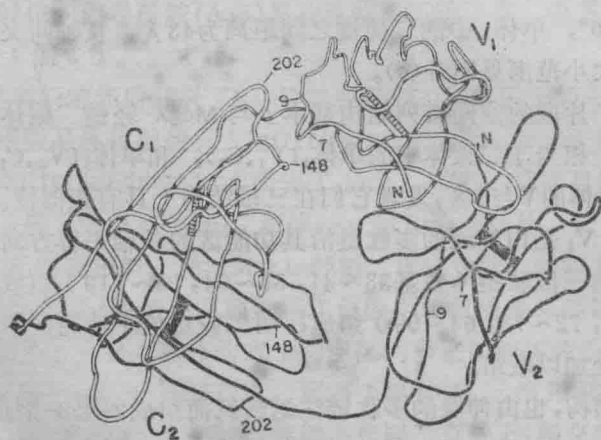


图7 Mcg 二聚体的三维结构

穴槽（在图7的右上方），槽入口处的口径为 $15\text{\AA}$ ，深 $10\text{\AA}$ ，底部仅 $5\sim 6\text{\AA}$ ，成为抗原结合位点（图8）。图8中可见穴槽底部由二聚体的两个第38位酪氨酸（Tyr）和两个第99位苯丙氨酸（Phe）残基组成。入口处由二聚体的两个第34位酪氨酸（Tyr）与两个第52位谷氨酸（Glu）残基组成。

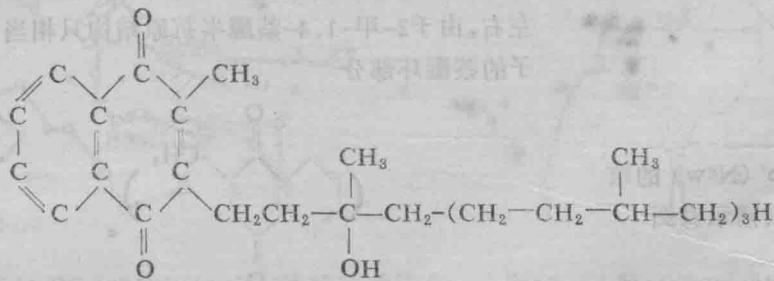
总之，实验结果表明各功能区的外形和大小不但相似，其内部的肽链盘曲式样也相似。这与功能区一级结构同源性相一致。由于可变区与恒定区的一级结构是同源的，所以它们的立体构象也大体相似。

五、抗体分子的抗原结合位点构造

过去曾认为抗体分子可变区的一级结构种类是无限而随机配合的，通过对Ig氨基酸顺序分析后，发现可变区也有一定的规律性。重链和轻链各自均有三个特殊的易变部位，在第30位， $50\sim 60$ 位和 $80\sim 100$ 位氨基酸残基附近，这些部位称为超变区。重链的超变区以 H_1 、 H_2 和 H_3 表示；轻链的超变区以 L_1 、 L_2 和 L_3 表示。这些超变区直接参与抗原结合位点的形成。以人IgG1（New）Fab'的抗原结合位点为例（图9、10）。 L_1 区位于第27~31残基（图上方）， L_3 区位于第89~95残基（图左方）， H_1 区位于第31~35残基（图下方）， H_2 区位于第47~58残基（图下方）， H_3 区位于第98~104残基（图右方）。

近来发现人IgG1 Fab'（New）片段可与维生素 K_1 的羟基衍生物，（Vit K_1 OH）、苕红素、尿嘧啶和2-甲-1,4-萘醌（维生素 K_3 ）等半抗原结合，这将有助于用X-射线晶体衍射分析探明抗原结合位点的构造。

实验的结果表明，半抗原Vit K_1 OH与IgG1 Fab'（New）的结合呈空间互补关系。Vit K_1 OH结构式为：



它的萘醌环和Fab'（New）抗原结合位点的穴槽上部结合，处于 L_3 第90位的酪氨酸（Tyr）的酚环上部（位于浅槽底部）、 H_3 的第103位甘氨酸（Gly）和 L_1 第29位甘氨酸（Gly）和第30位的门冬酰胺（Asn）等残基的骨架和侧链的包围之中。Vit K_1 OH的植基链向上蜿蜒伸展，先与 L_1 的第29位甘氨酸（Gly）、30位门冬酰胺（Asn）残基接触，然后转折向下，再与 L_3 的第93位丝氨酸（Ser），94位亮氨酸（Leu）残基接近，它的末端和 H_2 的第54位色氨酸（Trp）、 H_1 的第35位谷

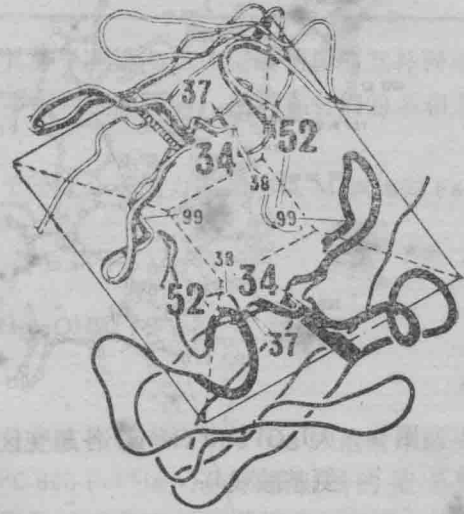


图8 Mcg二聚体的抗原结合位点穴槽结构

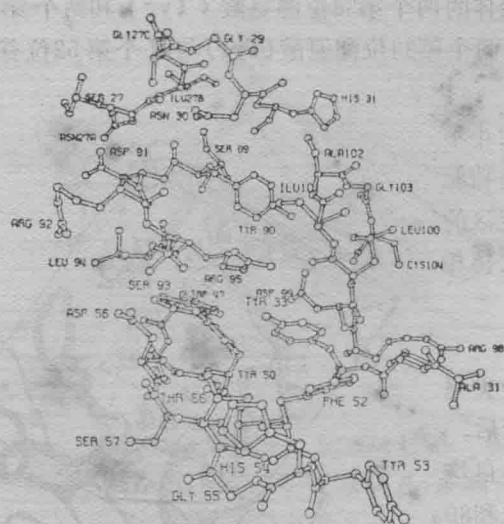


图9 人IgG1 Fab'(New)各超变区部位上的氨基酸残基

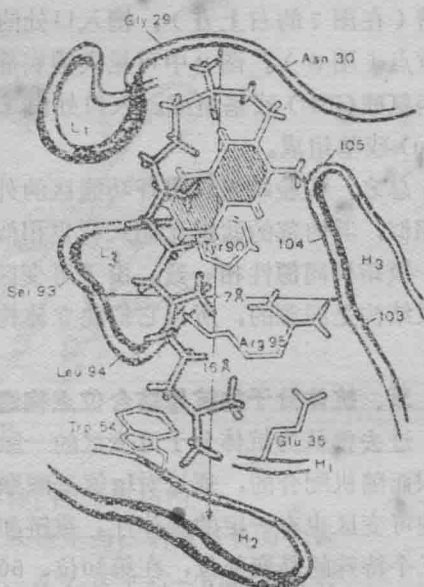


图10 IgG1 Fab'(New)和VitK₁OH的结合

氨酸(Glu)残基接近。由此可见, VitK₁OH 结合点分散在抗体的重链与轻链的超变区中约10~12个氨基酸残基所组成的浅槽中, 穴槽大小约 $15 \times 6 \times 6 \text{ \AA}$ 左右(图11)。

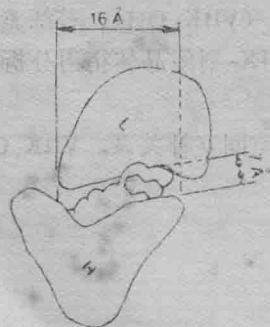
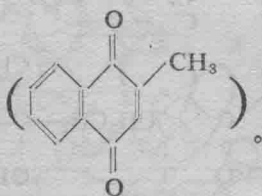


图11 IgG1 Fab'(New)的结合位点穴槽示意图

IgG1 Fab'(New)与半抗原复合物的X-射线晶体衍射分析, 还给半抗原与抗体复合物的亲和力以及结合的专一性的结构基础提供了有力证据。IgG1 Fab'(New)可与较多的半抗原相结合。它与VitK₁OH的亲和力常数 $K_o = 1.7 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ (20°C)而与苔红素、尿嘧啶以及2-甲-1.4-萘醌结合的亲和力常数就小得多, 约为 $K_o \approx 1 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ (20°C)左右。由于2-甲-1.4-萘醌半抗原结构只相当于VitK₁OH分子的萘醌环部分

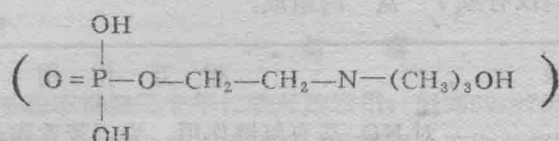


当IgG1 Fab'(New)与2-甲-1.4-萘醌结合后, 经X-射线衍射分析表明其萘醌环也占据浅槽上部同一位置。苔红素或尿嘧啶等一些亲和力常数较小的半抗原也在同一部位与Fab'(New)结合, 它们都缺少植基链部分, 所以它们的 K_o 均比VitK₁OH的小, 反映在它们的自由能中也有相应结果。

	$K_o(20^{\circ}\text{C})$	$\Delta G^{\circ}(20^{\circ}\text{C})$
VitK ₁ OH—IgG1Fab'(New)	$1.7 \times 10^5 \text{M}^{-1}$	-7.2千卡/克分子
VitK ₃ —IgG1Fab'(New)	$1 \times 10^3 \text{M}^{-1}$	-4千卡/克分子
植基链		-3千卡/克分子

因此,实验结果表明不同半抗原的化合物,只要其分子轮廓与抗体空间结构的互补程度不同,它们之间的范德华斯力(Van der waals)就有不同程度的强弱,反映在它们的亲和力和常数及自由能上也不相同。

半抗原与抗体复合物的X-射线晶体衍射法也用于研究分子间力。如小鼠 McpC 603 Fab(IgA)和磷酸胆碱



复合物的X-射线晶体分析,证明半抗原和抗原结合位点之间呈专一性结合,除范德华斯力以外,还存有氢键和静电库仑引力。图12是小鼠 McPC 603 Fab(IgA)与磷酸胆碱的结合形式。从图12中可见,抗原结合位点由H₁、H₂、H₃、L₁和L₃上的氨基酸残基构成一穴槽,整个槽深12Å,入口处有15Å阔,长约20Å,整个磷酸胆碱分子只占穴槽的重链超变区部分

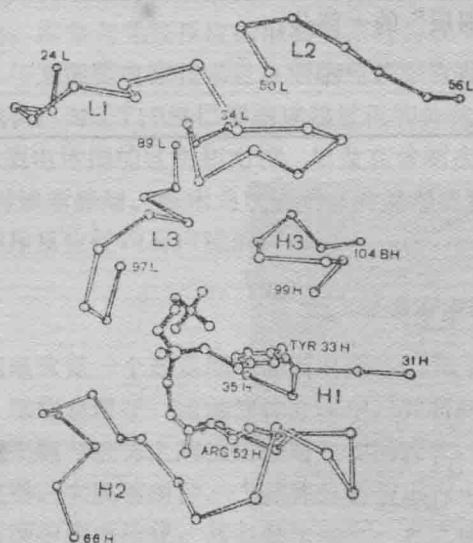


图12 小鼠McPC 603Fab(IgA)和磷酸胆碱结合

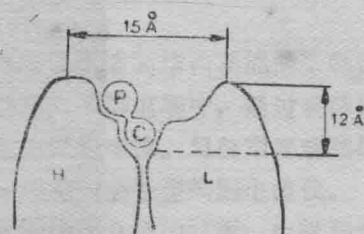


图13 小鼠McPC 603Fab(IgA)结合位点穴槽

(图13)。H₁的第33位酪氨酸(Tyr)残基中羟基与空间中相邻的磷酸中氧原子之间形成氢键。H₂上第52位精氨酸(Arg)残基中胍基与磷酸中另一氧原子之间又形成氢键。此外, H₂上的第52位精氨酸(Arg)胍基和54位赖氨酸(Lys)氨基均带有正电荷,它们与磷酸根的负电荷之间有静电库仑引力作用。这些分子之间都在半抗原和抗体之间的结合中起作用。而且胆碱基团和结

合位点的重、轻链上其它残基在空间很接近，约小于5 Å，也可发生静电作用或范德华斯力作用。

总之，用 X-射线晶体结构分析，表明抗原结合位点分散在重链与轻链的超变区内，分属各超变区10~20个氨基酸残基共同组成的穴槽中，其中一些氨基酸的高度变异性提供了各种各样的结合专一性。同时也解释了抗原结合专一性和亲和力大小的分子基础，也解释了抗原和抗体结合中分子间力的性质。

近年来已应用其它物理学方法，如核磁共振(NMR)、电子自旋共振(ESR)等研究小鼠骨髓瘤蛋白MOPC 315 (IgA)的抗原结合部位的构造(图14)。发现其抗原结合位点与半抗原二硝基苯基(Dnp)有较强的亲和力，其抗原结合位点由芳香族氨基酸，如色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸等组成一“芳香族盒”的构造，而Dnp处于“盒”中，“盒”外又由第二层芳香族氨基酸包围(见下表)，但L₂没有参于“盒”的组成。

超变区	氨基酸残基	相互作用
L ₁	Tyr34	对 NO ₂ 基有氢键作用，为“芳香族盒”的组成部分。
L ₃	Trp93	Dnp与Trp93环相平行，是“芳香族盒”组成部分，其与NO ₂ 基有氢键作用。
	Phe98	在结合位点入口处，为第二层芳香族氨基酸“包围层”组成部分。
H ₁	Phe34	“芳香族盒”的一部分，与Dnp存有范德华斯力。
	Tyr33	为“包围层”的一部分。
H ₂	Phe50	同上。
H ₃	Tyr104	同上。

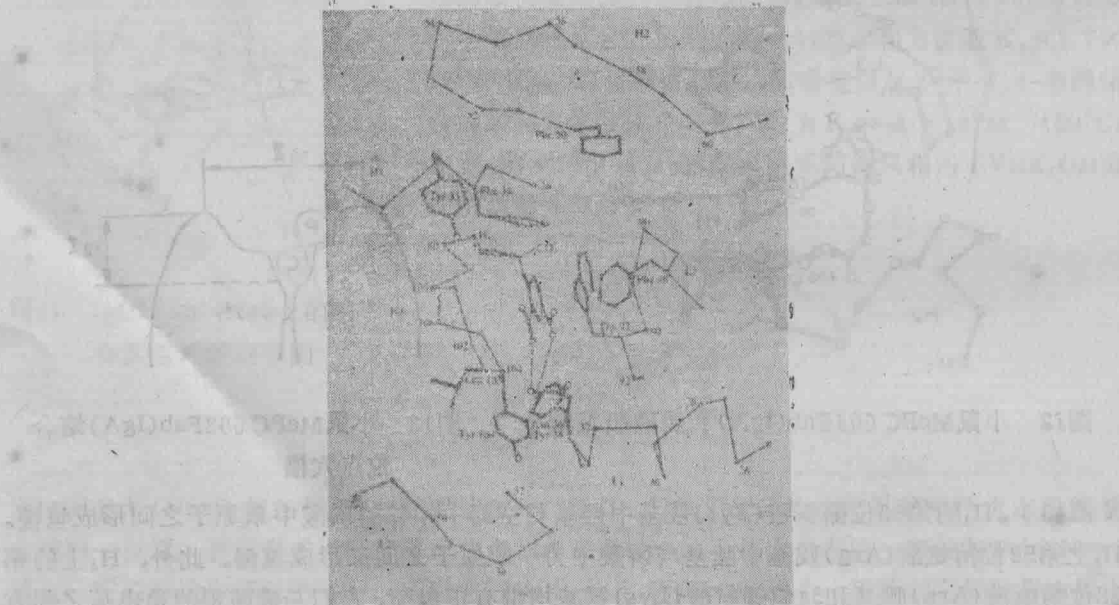


图14 小鼠MOPC315(IgA)与Dnp-Gly半抗原的结合

总之,随着近代物理学技术的发展,将有助于弄清抗体多样性起源和遗传控制等分子免疫学中心课题。

近来,分子免疫学已和细胞免疫学相互渗透,深入到以淋巴细胞为中心,从分子水平研究淋巴细胞对抗原的识别、抗体合成和分子进化等基本问题。这对生物学或医学都具有十分重要的理论和实践意义。

细胞电泳技术在细胞免疫研究中的应用

施永德* 章谷生** 梁子钧*

一、前言

细胞电泳技术早在本世纪二十年代就开始应用,但到60~70年代才引起学者们的很大兴趣,有关论文不断涌现,仪器设备不断更新。其原因一方面与细胞膜表面结构功能在生物学中的重要性愈来愈得到阐明有关,另一方面与免疫学的深入发展,发现很多免疫反应均发生于细胞表面,而细胞电泳技术又恰恰是研究活细胞的膜表面的简便工具。虽然细胞电泳仅仅只能测定细胞膜表面电荷的性质和多寡,但这一电学性质上的变化,却能反映细胞膜表面结构的细微变化。而且细胞电泳的对象是活细胞,经电泳以后,仍保持原有细胞的生物活力,这有利于分析细胞的真实情况。再则在细胞免疫研究中,已在很多实验证明,细胞膜表面电荷的变化,即参与免疫反应的细胞电泳行为改变,是反映细胞免疫反应性的良好工具,所以最近十几年来细胞电泳技术已在细胞免疫中有着广泛的应用。如T、B淋巴细胞的电泳分析、分离和制备,对于T、B淋巴细胞成熟过程和分化途径的研究,对于正常人体和病理状态下T、B淋巴细胞电泳图的区别和比较,以及在诊断疾病中的意义。又如应用巨噬细胞电泳试验(MEM)对诊断肿瘤、临床免疫诊断、淋巴细胞对于抗原的反应性及各种影响因素,器官移植中的排斥反应性均有广泛的应用。

二、细胞电泳的测定方法

细胞电泳是一个测定细胞表面电荷性质和多寡,用以分析细胞表面结构功能的生物物理学方法。细胞悬浮于一定的液体介质中,并将此细胞悬液处在一个静电场中,通过显微镜即可观察到细胞与液体之间发生相对运动的现象。这种现象称为细胞电泳。目前用来观察细胞电泳的仪器,大致有两种,一种称分析型细胞电泳仪,另一种称为制备型细胞电泳仪。

分析型细胞电泳仪,其主要构造有:直流电源,光学显微镜和合适的灯源,电极和观察小室,计时系统,恒温系统。国内最通用的有上海第一医学院试制的正方形细胞电泳仪。国外最为先进的有东德的PARMOQUANT型自动细胞电泳仪。这种仪器可以分析出,样品中细胞电泳率的数值,以及电泳率与细胞数之间的关系。

另一种制备型细胞电泳仪,不仅可以观察到细胞数量与电泳率的关系,而且还通过电泳

* 上海第一医学院生物物理学教研室, ** 上海生物制品所

的方法将不同电泳率的细胞相互分开，并获得不同电泳率的细胞样品。因此制备型细胞电泳仪，除了上述分析型所具有的结构组成以外，还具有特殊的收集取样装置。人们取得不同电泳率的样品以后，可以应用其他生物物理、生物化学和免疫学方法，试测这些细胞的性质和功能。

分析型细胞电泳仪自本世纪二十年代就开始出现，但制备型细胞电泳仪最近七十年代才开始出现。目前来说，试制方便可行制备型细胞电泳仪还是一个极为重要的任务。

三、T和B淋巴细胞表面的带电基团

在讨论 T和B淋巴细胞具有不同的电泳行为之前，先讨论一下这两群细胞在带电基团上有什么区别，这是造成这两群淋巴细胞具有不同电学性质的分子生物学的根本原因，一般说细胞表面上神经氨酸上的羧基是带负电荷的重要基团。Mayhew (1968)研究了多种细胞表面神经氨酸的含量及其与电泳率之间的关系。比较用神经氨酸酶处理前后细胞的电泳率的变化，结果经发现神经氨酸酶处理以后，红细胞电泳率下降65.1%，淋巴细胞下降42.2%，血小板下降55.9%，白细胞下降43.6%，巨噬细胞下降18.7%。如用RNase 处理各种细胞，观察细胞表面有无RNase 敏感的基团（如磷酸基团），如果发现血小板为零，而红细胞减缓1.7%，巨噬细胞减缓7.3%，白细胞减缓7.3%，而淋巴细胞减缓12.1%。这结果说明不同细胞表面所带负电荷的基团是是不同的。Mehrish 等(1974)曾对比了T和B淋巴细胞表面所带基团的区别，结果如表1。

表 1 T、B 淋巴细胞表面带电基团分析

基 团	T 细胞(10^5 个/ $100\mu M^2$)	B 细胞(10^5 个/ $100\mu M^2$)
α -COOH (神经氨酸酶敏感)	24	12
未知基团	76	43
-NH ₂	6	16
-SH	0	20
磷酸基 (RNase敏感)	0	16

从表1可见，T淋巴细胞所带基团与B淋巴细胞有很大区别，特别是 α -COOH基团要比B细胞高一倍左右。这与Weiss(1976)报导的结果较为一致，后者报导T淋巴细胞上神经氨酸酶的敏感基团约为21%，而B淋巴细胞仅为13%。此外，T淋巴细胞上查不出巯基，而B淋巴细胞上却有一定的数量。对于RNase 敏感基团，Mehrish 报导T淋巴细胞为阴性，而B淋巴细胞为阳性；而Weiss报导两者几乎都没有。Weiss还检测了T和B淋巴细胞接受胶体氢氧化铁的能力，这是带正电荷的胶体颗粒，当细胞表面吸附这种颗粒后，可使细胞电泳换向，朝负极移动。在这种情况下，再分别用神经氨酸酶处理，可见T和B淋巴细胞的区别更大，T淋巴细胞经神经氨酸酶和RNase 联合处理后，电泳率下降28%，而B淋巴细胞下降63%，根据电泳率测定结果，计算两群淋巴细胞在电学性质上的区别如表2所示。

表2 两群淋巴细胞的电学性质区别

	项 目	C	N	R	N+R
T	电荷数 $ e \times 10^{12}/\text{Cm}^2$	8.93	7.08	8.88	7.46
淋 巴	胶体氢氧化铁颗粒 $\times 10^{10}/\text{Cm}^2$	6.25	4.65	5.58	4.53
细 胞	电荷数/颗粒	143	152	159	165
B	电荷数 $ e \times 10^{12}/\text{Cm}^2$	7.41	6.48	7.68	6.42
淋 巴	胶体氢氧化铁颗粒 $\times 10^{12}/\text{Cm}^2$	10.83	4.00	9.78	3.98
细 胞	电荷/颗粒	68	162	79	161

C = 对照

N = 神经氨酸酶

R = RNase

从表2结果可见,经胶体氢氧化铁颗粒处理后,其表面所带电荷密度(电荷数/ Cm^2)、胶体氢氧化铁密度(颗粒/ Cm^2)和单位颗粒所具电荷数均T淋巴细胞不同于B淋巴细胞,而神经氨酸酶或RNase处理后,呈有所下降,但仍以T淋巴细胞大于B淋巴细胞。据此表明T和B淋巴细胞表面的电学性质的不同与其表面带电基因的种类和多少有关。

这些带电基因是长在细胞表面的蛋白质上,Fugita(1975)报告T和B淋巴细胞表面糖蛋白的组成不同、其中有一个分子量为30,000的仅与B淋巴细胞有关,而与T淋巴细胞无关。Anderson(1976)报导有一种GP₄蛋白,仅与正常人T淋巴细胞表面有关,而与B淋巴细胞无关。关于两群淋巴细胞表面的结构组成及其与免疫功能的关系,尚待进一步研究。

四、T、B淋巴细胞电泳率及其表面特征

(一)早期淋巴细胞、白细胞和巨噬细胞电泳率的测定和比较:

Maghew和Weiss(1968)报导在0.145 MNaCl 中细胞电泳率最快,为1.092微米/秒/伏特/厘米(以下单位同)。淋巴细胞为0.874,白细胞为0.799,巨噬细胞为0.572。我们测定人红细胞电泳率为1.30,淋巴细胞为1.2,白细胞为1.1,巨噬细胞为1.05。由于细胞电泳技术受干扰因素较多,而且各种细胞间电泳率分布有一定的离散度也比较大,故两系数值有一定差别。但将红细胞电泳作为1,并计算其他细胞电泳的相对值,两系实验结果大致相近(表3)。

表3 人红细胞、淋巴细胞、白细胞、巨噬细胞电泳率平均相对值的比较

作 者	红 细 胞	淋 巴 细 胞	白 细 胞	巨 噬 细 胞
Mayhew	1.00	0.800	0.731	0.509
上海第一医学院	1.00	0.923	0.846	0.80

关于离散度的问题,桥本信也(1972)测定了人的淋巴细胞电泳率平均值为0.992,最低值为0.749,最高值为1.47,SD为0.1832,变异系数为18.47%,提示了人淋巴细胞在电泳性质上并非统一。早期研究仅比较不同动物或同一动物的同来源的淋巴细胞的电泳率。由于淋巴细胞本身不均一性,各家结果难以比较,但对细胞免疫学深入研究有很大启发,但提供了一些大致电泳率的数值和较好的技术条件。

近年来很多作者根据淋巴细胞不同亚群所带表面负电荷不同,用细胞电泳方法进行了鉴

别。据Hanjan报导,人外周血淋巴细胞有三个电泳峰:快峰 1.28 ± 0.08 ,中峰 1.08 ± 0.08 ,慢峰 0.93 ± 0.03 。由于慢峰的淋巴细胞能形成EAC花环,且表面Ig阳性,故证明为B细胞;而快峰和中峰能与红细胞形成E花环,故证明为T细胞,但由于快峰仅10分钟即形成E花环,而中峰需24小时才形成E花环,故快峰和中峰似乎是T细胞中的两个亚群。根据电泳率和表面标记分析所得的百分率几乎一致(表4)。

表4 人外周血淋巴细胞电泳率和表面标记分析

组 别	红细胞电泳率		表面 标 记	
	EPM	%	方 法	%
慢峰(B)	0.93 ± 0.03	11.8	EAC花环/SIg ⁺	11.8/13.2
快峰(T _H)	1.98 ± 0.08	45.9	早期E花环	49
中峰(T _L)	1.08 ± 0.08	42.3	晚期E花环	38
总 计	1.15 ± 0.11	100	总 计	99.5

继之, Hanjan 将上述淋巴细胞用Wigzell柱(玻璃珠+人Ig+抗人Ig)过滤,除去B细胞,这时所得细胞悬液中,仅含有快峰和中峰,而慢峰几乎完全消失,快峰和中峰分别具有形成早期和晚期E花环的特征。如将早期形成E花环的细胞用梯度密度离心分开,并用NH₄Cl裂解和除去SRBC后,再进行电泳分析,仅见快峰,而慢峰和中峰完全消失。Hanjan对16份人的外周血淋巴细胞进行电泳和表面标记分析,发现B淋巴细胞约占17%,T_H约占40%,T_L约占43%,T_H+L为83%,与表面标记分析几乎一致(表5)

表5 人外周血淋巴细胞表面的电学性质和表面标记特征

组 别	%		电泳率 $\pm$ SD	表面电荷密度 (静电单位/厘米)
	表面标记	电泳分析		
EAC/SIg ⁺ (B)	14.4/16.6	16.9 ± 4.2	0.94 ± 0.05	3155 ± 167
早期E花环(T _H)	39.0 ± 11.8	40.6 ± 8.3	1.26 ± 0.04	4230 ± 134
晚期E花环(T _L)	35.6 ± 12.6	43.0 ± 6.8	1.11 ± 0.03	3726 ± 100
总计(T _H +T _L)	74.6 ± 8.0	83.0 ± 3.6	1.18 ± 0.06	3961 ± 201
总 计	90.2 ± 9.8	100	1.14 ± 0.08	3827 ± 269

从表5明显可见,T和B淋巴细胞既具有不同的标记且显示不同的电学性质,即表现为T淋巴细胞电泳快,表面所带负电荷密度大;而B淋巴细胞电泳慢,表面所带负电荷密度小。T淋巴细胞又可根据电泳速度快慢,分为两个亚群,电泳更快者,只需10分钟即形成E花环,而电泳中等速度者,需较长时间才形成E花环。

我们还报导了人外周淋巴细胞的电泳率,从10个健康人1000个淋巴细胞的电泳率与人数的分布图来看,显示两个峰(图1),如以电泳率为1.00微米/秒/伏特/厘米为界,凡大于或等于此值者,平均占 $64.75 \pm 8.9\%$ (平均值 $\pm$ 标准差),而小于此值者为 $32.25 \pm 8.9\%$ 。