

机体的备解素系統

A. A. 巴格达萨罗夫
И. Л. 车尔特科夫 著
М. О. 拉乌申巴赫

王 正 国
陈 家 佩 译
张 永 和

人民卫生出版社

机体的备解素系統

著 者

A. A. 巴格达薩罗夫 И. Л. 車尔特科夫

M. O. 拉烏申巴赫

譯 者

王正国 陈家佩 張永和

審 校 者

傅杰青 周佳敏

人民卫生出版社

一九六三年·北京

內 容 提 要

机体的备解素系統是近几年来病理生理学和免疫学中新
的研究課題之一。

在本書中，作者搜集和綜述了世界各国有关备解素系統
的文獻約 400 篇，并且結合自己的研究成果，詳細地介紹了
备解素系統发现的历史、理化性质、分离和測定的方法、正
常情况下的含量和变动以及各种病理条件下的变化和意义，
尤其对于放射病和紧张状态(stress)条件下备解素系統的变
化和意义，还作了專門的闡述。

本書搜集的材料全面而丰富，其中还包括不少作者自己
的研究成果和有价值的学术見解。

本書可供放射医学研究工作者、病理生理学、免疫学、
生理学等科学研究和教学人員、各科临床医师、生化檢驗人
員及医学生等参考。

А. А. БАГДАСАРОВ, И. Л. ЧЕРТКОВ,

М. О. РАУШЕНБАХ

ПРОПЕРДИНОВАЯ

СИСТЕМА ОРГАНИЗМА

ГОСУДАРСТВЕННОЕ ИЗДАТЕЛЬСТВО

МЕДИЦИНСКОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

МЕДГИЗ—1961—МОСКВА

机体的备解素系統

开本: 850×1168/32 印張: 6¹⁰/16 插頁: 1 字数: 150 千字

王正国 陈家佩 张永和 譯

人 民 卫 生 出 版 社 出 版

(北京書刊出版業營業許可証出字第〇四六號)

• 北京崇文區錢子樹同三十六號 •

人 民 卫 生 出 版 社 印 刷 厂 印 刷

新华书店北京发行所发行 • 各地新华书店經售

統一書号: 14048·2882

1963 年 9 月第 1 版—第 1 次印刷

定 价: 1. 10 元

印 数: 1—4,300

目 录

绪论·····	1
备解素的发现、分离、提纯及某些物理化学和化学性质·····	3
测定备解素的方法·····	11
人及动物备解素的含量·····	25
备解素的性质·····	28
备解素系统的杀菌、中和病毒及抗原虫活性·····	33
备解素系统在发生某些溶血过程中的作用·····	44
备解素系统同多糖的相互作用·····	50
放射病时的备解素系统·····	89
紧张状态时的备解素系统·····	135
各种疾病时人血液中备解素的含量·····	147
移植恶性肿瘤和正常组织时备解素系统的作用·····	159
结束语·····	169
参考文献·····	175

緒 論

1954 年 Pillemer 及其同事报导了从人及动物血液中分离的一种新的蛋白质,称之为备解素 (properdin——来自拉丁文 *perdere*, 为破坏、杀死之意)。备解素只有在镁离子及 4 种补体成分存在的情况下才具有活性,能杀死许多种细菌,中和某些病毒,溶解阵发性夜间血红蛋白尿病人的红细胞。此外曾发现,急性放射病时血液中备解素含量明显降低,根据 Pillemer 及其同事的意见,这在很大程度上说明一个已知的事实;即放射损伤时机体对感染的抵抗力是降低了。

这些初步资料已经可以做出结论,所发现的这种蛋白质是一种新的、很可能是十分重要的自然免疫因素;因此 Pillemer 的工作很自然地引起了世界各国学者的极大注意。在过去一个短时间内,文献中发表了 400 多篇关于备解素问题的文章。

现在已经积累了极大量的实验和临床材料,这些材料在很多方面证实了 Pillemer 的基本论点。而且还发现了一些新的有趣的事实和规律。

与此同时, Pillemer 的某些论点还值得怀疑。

所有这一切使我们认为有必要总结和批判地探讨所积累的资料,因为还没有关于这一问题的很全面的著作。其所以必须给苏联读者综述有关备解素方面的著作,还因为绝大多数的著作都是在使用英语、德语、法语及意大利语的国家内发表的,这就为利用这些文献带来困难。

本书企图对备解素问题加以批判性探讨,并叙述近年来我们

自己在荣膺列宁勋章的中央血液学及输血研究所所获得的资料。

当然，这第一部关于备解素文献的综述性专著不可能没有缺点，作者将诚恳地接受一切批评和指正。

备解素的发现、分离、提纯及某些

物理化学和化学性质

1954年,美国卓越的免疫生物学家及免疫化学家 Pillemer 及其同事,在企图分离纯净的补体第三种成分(C'_3)时发现,在血清中有一种新的蛋白质——备解素。这一发现的经过如下:在 37°C 下用食母生(Зимозан,从酵母细胞膜分离出来的不溶解的多糖)处理人的新鲜血清,能选择地使 C'_3 灭活。在 17°C 下用食母生处理血清则不引起 C'_3 或其他任何一种补体成分(C'_1 , C'_2 , C'_4)灭活。但是,这种血清进一步在 37°C 下用食母生培育,仍然不会丧失 C'_3 的活性。由此他得出结论,认为血清中有一种在 37°C 下能和食母生结合的因子。在 37°C 下形成的复合体会使 C'_3 破坏。从血清中提出复合体以后,该血清在 37°C 下对食母生的作用就不敏感了。

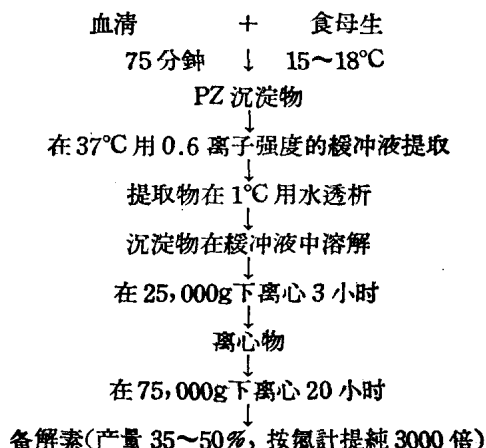
复合体的形成不是简单的吸附,因这些反应需要一定的温度、pH值、有镁离子的存在等等。还有一点足以说明该反应的酶的性质即备解素从复合体中提取出来之后,食母生就再不能用于形成复合体。

食母生同血清相互作用的方式如下:

血清+食母生	$\frac{+ \text{食母生}}{1 \text{ 小时} \times 37^\circ\text{C}}$ 没有 C'_3 或使其轻微灭活
$\frac{1 \text{ 小时} \times 17^\circ\text{C}}{\text{离心液(没有备解素的血清)}}$	
PZ (备解素-食母生复合体)	$\frac{+ \text{备解素} + \text{食母生}}{1 \text{ 小时} \times 37^\circ\text{C}}$ C'_3 完全灭活
沉淀物	$\frac{+ \text{PZ}}{1 \text{ 小时} \times 37^\circ\text{C}}$ 同上
	$\frac{+ \text{PZ}}{1 \text{ 小时} \times 17^\circ\text{C}}$ C'_3 没有灭活

食母生-备解素复合体是以化学计量关系形成的。复合体的形成是在低离子强度介质中进行的。当离子强度为 0.2 时其形成停滞。如果离子强度达到 0.4 或更高时，所形成的复合体会发生分解，并释出有活性的备解素。这种反应 (PZ 复合体的形成和分离) 是学者们分离、浓缩及提纯备解素的基础。

备解素的制取可概略地表示如下：



Pennel 及其同事(1957a, 1957b), Rothstein 及 Pennel(1957) 为了能够从血浆中获得备解素，曾改变了 Pillemer 的方法。为了形成 PZ 复合体必须向血浆中加镁离子。当用阳离子交换血液时加 1mM 的 Mg^{+} 就够了，此时 PZ 复合体形成得很好，而血浆则不凝固。当用枸橼酸血浆时为了结合枸橼酸盐应加到 20mM 的 Mg^{+} 。为了防止血浆凝固应迅速加硫酸钡(100 克/升)，以便吸附凝血酶原及血液凝固系统的其他成分。

然后基本上按照 Pillemer 方法分离备解素，并且在获得备解素之后可以把血浆分离，以便取得白蛋白， γ 球蛋白， β 脂蛋白，纤维蛋白原及抗溶血球蛋白。Pillemer 方法的简化主要是用锌离子

(25mM) 使备解素从提取物中沉淀。用这种方法时备解素的产量和用 Pillemer 方法一样。

学者们指出,不仅从新鲜血浆中可以获得备解素,从保存 1~4 周的血浆中也可获得备解素。诚然,此时备解素的产量要少 50~75%。

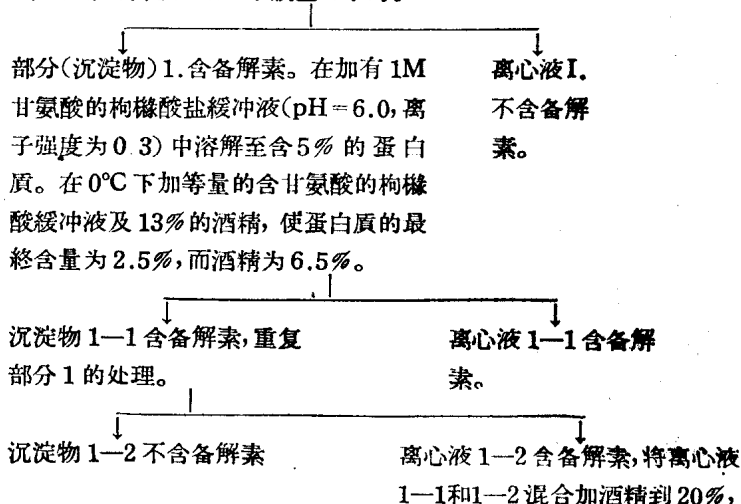
为了使 PZ 复合体分解得更为完全和迅速,曾有人 (Leon, 1957c) 建议在缓冲液中加入乙二胺四醋酸盐。

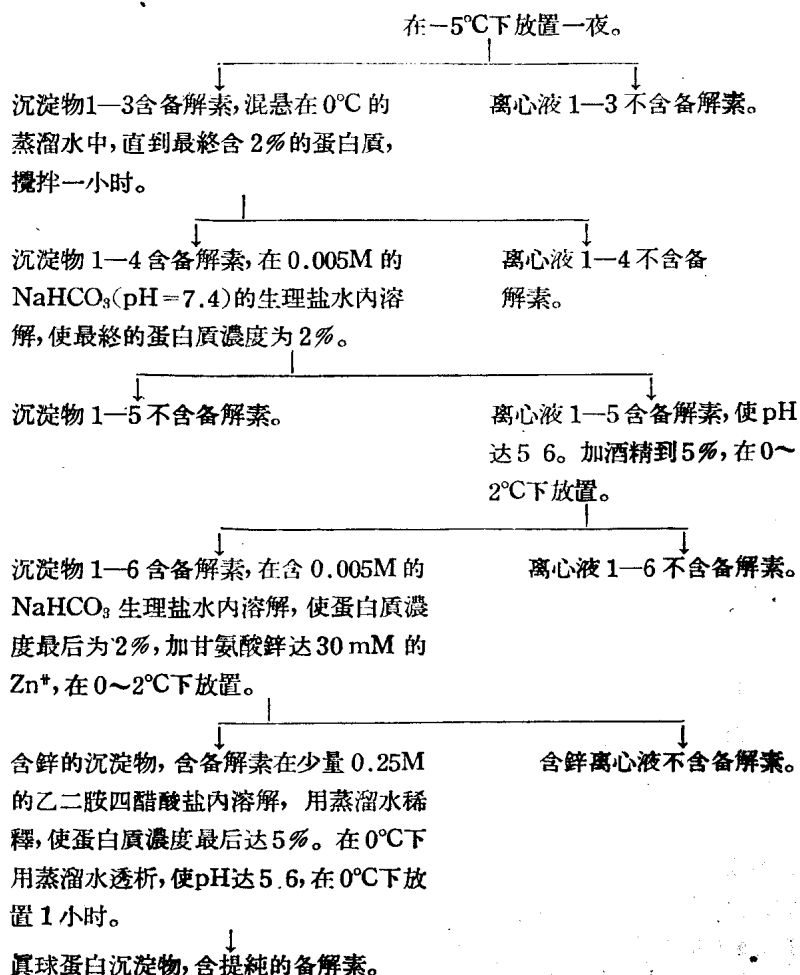
目前有人提出不用食母生获得备解素的方法。

Pondman 及 Prins (1957) 在热水器里用琥珀石 IRC-50 从 100 名供血者血清混合物中吸附备解素,随后用 0.1M 醋酸镁溶液 ($\text{pH}=7.0$) 洗提备解素。所得备解素的产量和 Pillemer 的一样,亦为 50%。

为获得提纯的备解素, Rothstein 及 Pennel (1958 年) 曾设计一种分离血浆的方法,其示意图如下:

使枸橼酸盐或阳离子交换血浆的 pH 达到 6.8~6.9, 冷冻 3 小时, 加 8% 乙醇, 再在 $0\sim 2^{\circ}\text{C}$ 下放置 1 小时。





Sanders 及其同事(1958)利用了 Blombäck 变法从部分1的浸出液中获得了高产量的备解素, 然后用醋酸锌将其沉淀, 随着(将锌取出并将备解素溶解之后)再用四聚偏磷酸钠将惰性蛋白质取出。在 Spicer 等的工作(1959)中详细描述了这种方法。用甘氨酸枸橼酸盐缓冲液使部分1中的纤维蛋白原沉淀。用醋酸锌(0.02M 的 Zn²⁺)使留在上清液中的备解素沉淀, 并放在0.25M 的

乙二胺四醋酸盐中溶解。用透析法除去锌及乙二胺四醋酸盐离子,然后加四聚偏磷酸盐至1%。以后经过多次酒精沉淀便可从溶液中获得了备解素。所获得的备解素具有很高的活性——2,000单位/毫升(1毫克蛋白氮达1,500单位)。Spicer 等的备解素对小鼠的LD₅₀大于3,000单位/公斤体重。临床上当静脉注射4,000单位/公斤体重剂量时该制剂不引起反应。Miya 和 Marcus(1958)报导过一种制取部分提纯的备解素的简单方法,其纯度足够用于研究其治疗作用。根据此法,在1升新鲜牛血清内加入53.3%—5°C的乙醇601毫升,10M的醋酸(25°C)0.88毫升,4M醋酸钠(25°C)0.44毫升,95°的酒精(—5°C)2.3毫升。将所有成分搅拌并使温度达—5°C。一面搅拌一面以每分钟5~6毫升的速度将混合物加至保存在0°C的血清中。将各种成分加至1升血清内的时间约为2小时,酒精的最终浓度为20容积%。将混合物在—5°C下培育60分钟,同时搅拌,然后在0°C下离心沉淀。将沉淀物溶解于巴比妥缓冲液内(缓冲液的pH=7.4,按每升血清含250毫升缓冲液计算)。在室温负压下从溶解的蛋白质部分中除去酒精。然后将溶液在0°C下放置24小时,用离心法分离出沉淀物,溶解于缓冲液内(每毫升沉淀物用3毫升缓冲液)。纸上电泳所得到的产物具有γ球蛋白的活动性。备解素的活性大约为100单位/毫升,产量约为40%。

根据 Pillemer 及其同事的资料(1954),人的备解素——真球蛋白的分子量大约比γ球蛋白高7倍(100万左右)。其在血液中的含量总共为0.02~0.03%。

备解素与其它血清蛋白在量上的比例见表1。

用 Dessi 方法分离的血清部分Ⅲ中能够找到备解素。在pH=5.5及离子强度较低的条件透析时它同多种真球蛋白一起沉

表 1 (根据 Auerswald 的資料, 1957b)

蛋白質的种类	相对的含量%	毫克/容积%	总量(克)
血清总蛋白	100	7000	175
白蛋白	60	4200	105
γ 球蛋白	15	1050	25
补体第一成分(C'_1)	0.6	42	0.1
补体第二及第四成分($C'_2 + C'_4$)	0.18	12	0.3
备解素	0.13	2	0.05

淀。当溫度在 48°C 以下时备解素是稳定的, 但是溫度只要升到 50°C , 它就会被破坏; 56°C 下保存 30 分钟, 能使血清中备解素完全灭活。提纯的备解素比较稳定, 在 66°C 下加溫能耐受 20 分钟, 但在 100°C 下仍迅速灭活。当 pH 值为 $4.8 \sim 8.4$ 及离子强度为 0.15 时备解素稳定; 当 pH 为 $6.5 \sim 7.5$ 时备解素系统的活性最高(尤以 6.8 为最适宜); 最适宜的离子强度为 0.13, 而当离子强度值高于 0.18 或低于 0.05 时备解素的活性就明显降低 (Wedgwood, 1958)。在冷冻 ($0 \sim 20^{\circ}\text{C}$) 条件下备解素可以长期保存。

在 -20°C 条件下备解素在血清中保存得更好些; 根据我们的资料, 在普通枸橼酸血清中保存于 $4 \sim 6^{\circ}\text{C}$ 时其活性于 $10 \sim 15$ 天内减少一半, 而在室温条件下只要几个小时就能减少一半。备解素在血清中不被胰及胰蛋白酶所破坏; 当除掉两价阳离子时它就能被保存下来。备解素不被抗原-抗体复合体灭活和消除。它和凝血系统内所包括的一切蛋白质(加速凝血酶、转变素、血浆素等的球蛋白)都不同。

备解素通常不是特异性免疫系统作用所必需的。同样地, 备解素作用时也不需要特异性抗体, 但需要鎂离子和补体(备解素、鎂离子和补体即为机体的备解素系统)。

表 2 中列举了除去备解素后血清所表现的效果。

表 2

活 性 的 种 类	正 常 血 清	没有备解素的血清(RP)
对致敏了的绵羊红细胞的溶血作用	有	有
补体的各种成分	有	有
对补体结合的敏感性	有	有
血浆凝血酶原	有	有
血浆素抑制剂	有	有
凝血系统因子	有	有
凝集素	有	有
用食母生使补体第三种成分灭活的敏感性	有	无
不耐热的杀菌活性	有	无
不耐热的中和病毒活性	有	无
对非致敏的红细胞的溶血活性	有	无

在后来的工作中 Pillemer (1956) 指出, 备解素的等电点在 5.5~5.8 之间, 备解素的沉降常数为 24~30 S。Pondman 及 Prins(1957)在分离备解素时, 所测得的沉降常数远较前者为低; 而根据另一些学者的资料(Isliker, Linder, 1956) 则为 23~25 S。用 Spicer 等(1959)的方法制取备解素时, 所得的材料中约 26% 的沉降常数为 1.54 S, 约 70% 为 6 S, 只有 4% 为 18 S。很明显, 部分备解素在用酒精沉淀时离解。保存时备解素分解成许多碎片, 其沉降常数分别为 18、12、9、6 及 3 S。同时, 只是 3 S 的碎片未发现有特异性活性。备解素不具有脲、脂肪酶、淀粉酶、脂酶及磷酸酶活性。诚然, 根据 Rowley(1958)等的资料, 备解素具有使磷酸盐离子脱离脂多糖的能力——硷性磷酸酶所特有的活性。但是, Rowley 等自己也不能肯定, 这种效果是由备解素本身, 还是由其所含的杂质所致。

备解素同 Cohn 氏法部分 III—1 (Isliker, 1956) 或 Cohn 氏 6 和 10 法的部分 1 中的脂蛋白和同种凝集素一起沉淀 (Rothstein,

Pennel, 1958; Conte-Marotta, 1958; Wedgwood, Pillemer, 1958)。电泳时备解素的活动性大约和 γ 球蛋白相同, 但还有 30~40% 和 α 及 β 球蛋白相同 (Isliker, 1956; Isliker, Linder, 1956; Lowbury, Ricketts, 1957a, b) 在纸电泳上只发现备解素有一段 γ 球蛋白的活动性 (Isliker, 1956), 而在琼脂的免疫电泳中 (Scheit-tarth 等, 1958a) 备解素的活动性与 β 球蛋白近似。

当把备解素冷冻干燥时其活性丧失可达 75%, 在乳糖溶液中干燥备解素能使活性的丧失减少到 25% (Lowbury, Ricketts, 1957a)。Sanders 等 (1958) 报导, 如用他们的方法制得的备解素来干燥保存, 其活性并不丧失。

备解素含有脂类、碳水化合物、磷 (Pillemer, 1956)。曾经在牛的备解素成分中发现有: 氮 12.5~14.2%, 磷 0.1~0.28%, 碳水化合物 0.5~4.3% (В. И. Товарницкий, 1958; Е. Н. Волуйская 等, 1959a, 6)。

在备解素的碳水化合物成分中发现有神经氨基酸 (нейраминовая кислота)。因此 В. И. Товарницкий 等认为, 备解素具有一种粘蛋白性质。曾查明在备解素成分中有如下氨基酸: 胱氨酸、赖氨酸、组氨酸、精氨酸、天门冬氨酸、甘氨酸、丝氨酸、谷氨酸、苏氨酸、丙氨酸、脯氨酸、酪氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸、白氨酸的总合; 未确定是否有色氨酸。

必须指出, 食母生不仅吸附备解素, 而且还吸附许多其他蛋白质, 特别是硷性磷酸酶 (Lowbury, Ricketts, 1957a, Rowley, 1956 b)。因此, В. И. Товарницкий 用食母生所获得的备解素也许含有其他蛋白质的杂质, 这当然就会影响到它的化学成分。

測定备解素的方法

食母生法(Pillemer 及其同事, 1956) 及其许多改进的方法是测定备解素活性的基本方法。

如前所述, 食母生在 17°C 时和备解素结合而成不溶性的备解素——食母生复合体(PZ), 这种复合体能在 37°C (而不是在 17°C) 时使补体的第三种成分灭活。无论在什么样的温度条件下, 食母生作用于没有备解素的血清(Rp) 时都不能改变 C'_3 的活性; Rp 中的 C'_3 只有在 37°C 下同时加入备解素及食母生或 PZ 复合体时才被灭活。正常血清与 Rp 血清在性质上的这一差异就被利用来测定备解素的生物活性。这一方法的原理是, 测定与标准量食母生和 Rp 血清在 37°C 下培育一小时后, 能使混合液中的 C'_3 完全灭活时所需最小量的检样(实验血清或提纯的备解素)。备解素以单位计算, 在标准条件下有适宜量的食母生存在时, 在 37°C 下一小时内能使一毫升 Rp 中 120 ± 30 单位的 C'_3 完全灭活的量即为一单位。

为了用 Pillemer 的食母生法来进行滴定, 必须制备 3 种基本试剂并使之标准化, 即食母生, 除去备解素的血清(Rp) 和除去备解素和补体第三种成分的血清(R_s)。食母生的制法是, 用胰蛋白酶消化酵母细胞, 再用热水洗去可溶性产物, 最后用无水酒精脱水。为了制备 Rp , 从数名供血者取得的血清混合后, 在 17°C 下用食母生两次处理, 这样大约有 20% 的机会能获得适用的 Rp 。为了获得 R_s , 从数名供血者取得的血清混合后, 在 37°C 下用食母生加以处理, 约有 10~15% 的机会可获得适用的 R_s 。当滴定备解

素时,在试管内放入需要量的食母生、Rp、缓冲液和逐渐减量的被测定血清。在 37°C 下培育一小时以后,将混合液加以离心,并用与致敏的绵羊红细胞作溶血反应以测定存留于离心液中的补体第三种成分(C'_3)之含量。当作溶血反应时,在离心液和致敏红细胞的混合液中要加入 R_s ,以便有过量的补体第一、第二及第四种成分,这样就可以只测定混合液中 C'_3 的效价了。

如此看来,食母生法是相当复杂的。这首先是因为获得这些试剂(尤其是 R_s)并使之标准化颇为繁重,而所获得的制剂却又不易保存。另一方面,用食母生法作滴定时,只注意 Rp 中所含的 C'_3 ,而对被测定血清中的 C'_3 含量却不予注意,因此在某些情况下严重地影响了滴定结果。

对食母生法所提出的多种多样改进办法都是为了消除上述缺点。

曾经证明,滴定备解素可应用以水和酒精洗过的未经胰蛋白酶消化的酵母细胞残渣(И. Л. Чертков 和 Н. Л. Самойлина 1959);也可以在 75°C 下用酸处理或用石炭酸-水的浸出法来代替胰蛋白酶的消化(Isliker 和 Linder, 1958);或者用吡啶处理来代替胰蛋白酶消化,吡啶能在六小时内分解酵母而用胰蛋白酶消化时却需要 16 天(Scevola, 1957~1958)。必须指出,这种食母生只适宜于滴定备解素。用这种食母生来制备备解素是不适宜的,因为上述食母生从血清中吸附备解素的同时,也吸附了大量其他蛋白质,也就是说这些食母生的特异性较差。

为了制备 Rp 和 R_s ,许多学者应用了豚鼠的血清。大家知道,在豚鼠血清中限制致敏红细胞溶解的因素就是补体第三种成分(Fischer 等, 1956; Eyquem 和 Tullis, 1957 b; DeWitt 等, 1958; McNall, 1957)。

用豚鼠血清代替人血清可避免使用复杂而又不稳定的试剂—— R_s , 因为在这种 R_p 中已有过量的补体第一、第二及第四种成分(Isliker 和 Linder, 1958; Soulier 等, 1957), 因此不需要另加 R_s 来特意地增加其含量。用 80% 人血清和 20% 豚鼠血清混合液中制备的 R_p 也可得到良好效果。在这种情况下没有 R_s 也可以进行滴定(И. Л. Чертков 和 Н. Л. Самойлина 1959)。不用 R_s 的另一种滴定法是利用绵羊红细胞, 因为在一定条件下, 绵羊红细胞能吸附补体第一、第二和第四种(但非第三种)成分。用这种红细胞作滴定时, 在红细胞上有过量的补体第一、第二和第四种成分, 这为测定补体第三种成分的溶血活性创造了条件, 故而排除了应用 R_s 的必要性(Leon, 1956 a)。

К. М. Розенталь 和 Г. Б. Савельвольф(1959 a, 1959 b)在高度稀释的血清中测定备解素时, 干脆就把稀释的豚鼠血清作为 R_p 来使用。看来, 他们的方法的相对敏感性是不高的, 因此保留在豚鼠血清中的备解素并不影响滴定的结果。

用豚鼠血清来制备 R_p , 并且又可不用 R_s , 这样就大大地简化了标准试剂的获得。此外, 有人(Isliker 和 Linder, 1958; И. Л. Чертков 和 Н. Л. Самойлина, 1959)建议用食母生在 17°C 下处理 R_p 后, 在 37°C 下再用食母生处理, 可以除去残存的备解素, 提高适用的 R_p 的产量。为了提高补体的活性也可在 R_p 中加入牛的白蛋白(DeWitt 等, 1958)或者向红细胞中加入大量的溶血素来达到所需要的活性(Eyquem 和 Tullis, 1957 b)。用富有补体第三种成分的猪血清所得到的 R_p 来滴定备解素也获得满意的结果(Dressler, 1958 b)。用于滴定备解素的试剂必须保存在 -20°C 温度下。在冷冻干燥状态时甚至保存在一般条件下也不丧失活性(DeWitt 等, 1958)。