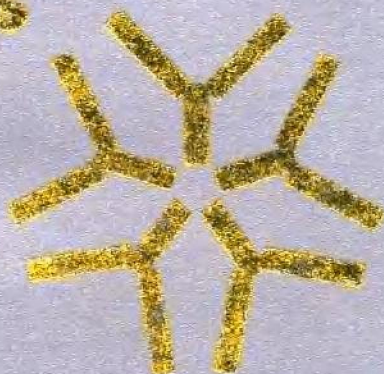


Basic and clinical of
Immunoglobulin
Abnormalities



免疫球蛋白异常的
基础和临床

沈克清 编著

上海科学技术文献出版社

Q511
KXT

免疫球蛋白异常的 基础和临床

孔宪涛 编著

上海科学技术文献出版社

责任编辑 蔡 平
封面设计 曹永泰
插 图

免疫球蛋白异常的基础和临床

孔宪涛 编著

*

上海科学技术文献出版社出版发行

(上海市武康路 2 号 邮政编码 200031)

全国新华书店经销

上海科技文献出版社昆山联营厂印刷

*

开本 850×1168 1/32 印张 9.5 字数 272 000

1997 年 10 月第 1 版 1997 年 10 月第 1 次印刷

印数: 1—1 200

ISBN 7 - 5439 - 0995 - 2/R · 279

定 价: 28.00 元

内 容 提 要

免疫球蛋白是体液免疫的重要组成部分,在某些情况下它又是病理性成分。本书共分三大篇,第一篇共七章,专门论述了免疫球蛋白基础,包括结构、功能、合成代谢、基因结构、多样性等;第二篇为方法学,共十三章,为本书的重要部分,详细介绍了纯化技术、抗体制备、异常免疫球蛋白检测和诊断方法。这些方法大多是本中心创建和常规应用的,可操作性强;第三篇为临床部分,共十二章,对多发性骨髓瘤、巨球蛋白血症、重链病、轻链病、半分子病以及各种罕见的浆细胞病等三十余种疾患的临床特点、免疫学异常的要点和诊断皆作了具体介绍。本书的特点,一是与免疫球蛋白有关的病种较集中,这是一般内科学所不及的;二是方法较具体,有较强的实用性。故是一本对临床免疫工作者,内、外科医师和实验室工作者有价值的参考书。

前 言

在数百种血浆蛋白中,免疫球蛋白与众不同,独树一帜,其兼有多种功能与特性,最突出的特点是三种“两重”性质。

其一,轻链构型一致,重链各自相异。五种免疫球蛋白以重链划分,而亚型则以轻链分为两型。同时,免疫球蛋白基本构型是一致的,即两条轻链和两条重链,但其独特型则多达 10^6 以上。可谓洋洋大观。

其二,免疫球蛋白既是抗体又是抗原。作为免疫球蛋白分子,是一种强抗原,用其免疫动物获得的抗体称谓“抗抗体”,广泛用于免疫测定系统中;作为抗体,是生物体抗御外来抗原的一种生理成分。在淋巴细胞表面称作 Smlg, 又是识别抗原的一个膜表面物质。两者皆是体液免疫的组成部分。

其三,免疫球蛋白是正常免疫活性分子,但也可作为病理成分出现。作为活性分子,五种 Ig 皆具有各自的功能,并具有相应的生理浓度;作为病理成分系指骨髓瘤蛋白,亦即 M 成分。以往,认为多发性骨髓瘤出现的“异常”免疫球蛋白是无功能的

病理成分。其实不然, M 蛋白无任何结构或功能上的缺陷, 只不过是大量出现的单一成分抑制了其他群体的多种功能, 失去了正常体液免疫网络功能。因此, 作为体液免疫, Ig 含量是个重要指标; 作为浆细胞恶性病, 单一 Ig 成分又是肿瘤的标志物。

本书作为“免疫球蛋白异常的基础和临床”定名, 其含义也在于这些特殊的性质和临床表现。

正常和异常免疫球蛋白研究涉及到细胞、蛋白质、分子直至基因的各项技术, 可谓系统工程, 靠某个人是不能完成本书编写的。聚沙成塔, 终于完成了这部基础与临床相结合的拙作。参加本书编写的是近十位有扎实基础和实践经验的博士、教授。这是集体的智慧、经验的结晶。

孔宪涛

于上海长征医院全军临床免疫中心

1997 年 8 月

目 录

第一篇 免疫球蛋白基础

第一章 免疫球蛋白的基本结构·····	连兆瑞(1)
第一节 免疫球蛋白分子的四肽链模式结构·····	(2)
第二节 免疫球蛋白分子的酶解片段·····	(3)
第三节 免疫球蛋白分子中的糖基·····	(5)
第四节 轻(L)链的结构和功能·····	(6)
第五节 重(H)链的结构和功能·····	(6)
第六节 绞链区及其功能·····	(9)
第七节 J链的结构和功能·····	(9)
第二章 各类免疫球蛋白的结构特点和功能·····	连兆瑞(11)
第一节 免疫球蛋白 G(IgG)·····	(11)
第二节 免疫球蛋白 M(IgM)·····	(12)
第三节 免疫球蛋白 A(IgA)·····	(13)
第四节 免疫球蛋白 E(IgE)·····	(14)
第五节 免疫球蛋白 D(IgD)·····	(15)
第三章 免疫球蛋白的合成和代谢·····	连兆瑞、孔宪涛(17)
第一节 免疫球蛋白合成的信号、受体和细胞间相互作用·····	(17)
第二节 免疫球蛋白合成的顺序、装配和分泌·····	(18)
第三节 免疫球蛋白的代谢·····	(20)
第四章 免疫球蛋白的基因结构和抗体的多样性·····	连兆瑞(21)
第一节 免疫球蛋白基因结构·····	(21)
第二节 免疫球蛋白基因的拼接·····	(23)
第三节 免疫球蛋白多样性的产生·····	(25)
第四节 免疫球蛋白类型的转换·····	(27)

第五节	免疫球蛋白合成时的等位基因排斥	(31)
第六节	抗原特异性免疫球蛋白的产生	(32)
第五章	免疫球蛋白合成的调节	连兆瑞(33)
第一节	反馈性调节	(33)
第二节	抑制性T细胞调节	(34)
第三节	抗独特型网络调节	(34)
第六章	免疫球蛋白的血清型	孔宪涛(36)
第一节	免疫球蛋白的同种型(isotypes)	(37)
第二节	免疫球蛋白的同种异型(allotypes)	(39)
第三节	免疫球蛋白的独特型(idiotypes)	(41)
第七章	免疫球蛋白的含量在地区、种族和年龄上的 差异	孔宪涛(41)
第一节	免疫球蛋白含量在种族健康人间的差异	(42)
第二节	免疫球蛋白含量在不同年龄组间的差异	(45)

第二篇 研究免疫球蛋白异常的方法学

第八章	蛋白质提取与纯化技术	王笑利、孔宪涛(47)
第一节	盐析(salt fractionation)技术	(47)
第二节	凝胶过滤(gel filtration)技术	(50)
第三节	离子交换层析(ion exchange chromatography) 技术	(59)
第四节	亲和层析(affinity chromatography)技术	(65)
第九章	免疫球蛋白纯化及其片段的制备技 术	王笑利、孔宪涛(68)
第一节	IgG的纯化方法	(69)
第二节	IgM的纯化方法	(72)
第三节	IgA的纯化方法	(73)
第四节	IgD的纯化方法	(75)
第五节	IgE的纯化方法	(76)
第六节	免疫球蛋白片段的制备技术	(77)
第七节	免疫球蛋白纯度的鉴定方法	(80)

第十章	单克隆抗体的制备技术·····王笑利、韩焕兴(82)
第一节	动物的选择与免疫·····(82)
第二节	细胞融合方法·····(83)
第三节	杂交瘤细胞的筛选·····(86)
第四节	杂交瘤细胞的克隆化·····(88)
第五节	单克隆抗体的鉴定·····(90)
第六节	单克隆抗体的大量制备技术·····(92)
第七节	杂交瘤细胞的冻存与复苏·····(94)
第八节	单克隆抗体的分离与纯化·····(95)
第九节	人源单克隆抗体的制备·····(97)
第十节	应用分子生物学技术制备单克隆抗体·····(98)
第十一节	单克隆抗体的应用·····(101)
第十一章	抗免疫球蛋白多克隆抗体制备··王笑利、孔宪涛(104)
第一节	抗血清制备的一般原则·····(105)
第二节	抗血清制备方案·····(109)
第三节	抗血清的鉴定·····(112)
第四节	抗血清的保存·····(113)
第十二章	抗体的标记技术·····王笑利、孔宪涛(114)
第一节	酶标记抗体技术·····(115)
第二节	荧光标记抗体技术·····(121)
第三节	生物素标记抗体技术·····(126)
第十三章	异常免疫球蛋白诊断方法之一:
	区带电泳技术·····仲人前、孔宪涛(128)
第一节	醋酸纤维膜电泳技术·····(128)
第二节	淀粉区带电泳技术·····(134)
第三节	聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)技术·····(135)
第四节	琼脂糖电泳技术·····(140)
第十四章	异常免疫球蛋白诊断方法之二:
	免疫球蛋白定量技术·····仲人前、孔宪涛(143)
第一节	单向(环状)免疫扩散法·····(144)
第二节	速率散射浊度测定法·····(146)

第三节	火箭免疫电泳法·····	(149)
第十五章	异常免疫球蛋白诊断方法之三: 免疫电泳技术·····	仲人前、孔宪涛(152)
第十六章	异常免疫球蛋白诊断方法之四: 免疫固定电泳技术·····	仲人前、孔宪涛(164)
第十七章	异常免疫球蛋白诊断方法之五: 本周蛋白定性与 kappa-Ig、lambda-Ig 定量技术·····	陈基岱、孔宪涛(168)
第一节	本周蛋白定性技术·····	(168)
第二节	κ -Ig 与 λ -Ig 定量技术·····	(170)
第十八章	异常免疫球蛋白诊断方法之六: 用 PCR 检测克隆性 IgH 基因重排技术···	吕鸣(176)
第十九章	异常免疫球蛋白诊断方法之七: κ^+ 细胞、 λ^+ 细胞标记和免疫组 织化学技术·····	陈基岱、孔宪涛(184)
第一节	κ^+ 和 λ^+ 细胞标记及计数法·····	(184)
第二节	免疫组化技术检查骨髓组织中肿瘤细胞的免疫 型·····	(186)
第二十章	异常免疫球蛋白诊断方法之八: 其他有关技术·····	陈基岱、孔宪涛(190)
第一节	血液粘度测定·····	(190)
第二节	超速离心测定免疫球蛋白沉降系数(S)·····	(191)

第三篇 免疫球蛋白异常的临床疾患

第二十一章	多发性骨髓瘤·····	王华梁(194)
第二十二章	巨球蛋白血症·····	王华梁(208)
第二十三章	重链病(heavy chain diseases)·····	孔宪涛(211)
第一节	α 型重链病·····	(211)
第二节	γ 型重链病·····	(214)
第三节	μ 型重链病·····	(218)
第四节	δ 型重链病·····	(220)

第二十四章	轻链病(light chain disease) … 陈基岱、孔宪涛(222)
第二十五章	半分子病(half-molecule immunoglobulin disease) ……高 锋(233)
第二十六章	恶性淋巴瘤 ……高春芳(235)
第一节	流行病学 ……(235)
第二节	病因及发病机制 ……(235)
第三节	病理分型及分期 ……(236)
第四节	临床表现 ……(237)
第五节	实验室检查 ……(238)
第六节	诊断 ……(239)
第七节	治疗 ……(239)
第二十七章	非特异性免疫球蛋白增殖症 ……高春芳(240)
第二十八章	免疫球蛋白缺陷和选择性缺陷症 ……高春芳(243)
第一节	低 γ 球蛋白血症(低丙球血症) ……(244)
第二节	选择性免疫球蛋白(Ig)缺陷症 ……(245)
第三节	继发性免疫球蛋白(Ig)缺陷症 ……(247)
第二十九章	免疫球蛋白 E、免疫球蛋白 G ₄ 与 I 型 变态反应 ……王杰军(248)
第一节	IgE 的结构和功能 ……(249)
第二节	I 型变态反应发生机制 ……(251)
第三节	LPR 的反应机制 ……(255)
第四节	IgG ₄ 在 I 型变态反应中的作用 ……(256)
第五节	IgE 应答的调节 ……(257)
第三十章	急性感染与免疫球蛋白 M 型抗体 的产生 ……王杰军(259)
第三十一章	良性 M 蛋白血症(benign monoclonal gammopathy, BMG) ……侯 健、孔宪涛(261)
第一节	BMG 的特征 ……(261)
第二节	BMG 的诊断与鉴别诊断 ……(262)
第三节	BMG 与衰老的关系 ……(263)
第四节	BMG 与 MM 的关系 ……(264)

第三十二章 其他罕见的与免疫球蛋白异常

有关的疾病 孔宪涛、侯 健、白 岚(265)

第一节 双 M 和多 M 多发性骨髓瘤(MMP).....(265)

第二节 非分泌型多发性骨髓瘤(NSM).....(269)

第三节 IgM 型多发性骨髓瘤(270)

第四节 Waldenström 型多发性骨髓瘤(271)

第五节 浆细胞白血病(PCL).....(272)

第六节 具有骨硬化病变的浆细胞病(273)

第七节 伴有周围多发性神经炎的浆细胞病(274)

第八节 Takatsuki 综合征(275)

第九节 伴 Fanconi 综合征的浆细胞病(275)

第十节 伴脂质异常的浆细胞病(276)

第十一节 伴代谢病的浆细胞病(277)

第十二节 伴冷凝集血症的临床征象(277)

第十三节 伴真性红细胞增多症的浆细胞病(280)

第十四节 伴恶性贫血的浆细胞病(281)

第十五节 伴热性球蛋白血症的浆细胞病(282)

第十六节 伴溶菌酶产生细胞恶性的浆细胞病(284)

第十七节 伴苔藓样皮肤粘液水肿的浆细胞病(286)

第十八节 伴坏疽性脓皮病的浆细胞病(287)

第十九节 伴系统性毛细血管渗漏综合征的浆细胞病(289)

主要参考文献(290)

后记(293)

第一篇 免疫球蛋白基础

免疫球蛋白是具有抗体活性蛋白分子的总称,而抗体则是能够同相应抗原发生特异性结合的蛋白质分子的总称。抗体的发现至今已有一个世纪。1890年德国学者 Behring 和日本学者北里用白喉减毒外毒素给动物注射后发现其血清中存在一种能中和毒素的物质,便称其为抗毒素,这是人类发现的第一个抗体。1938年, Kapat 和 Tiselieus 创立了血清蛋白区带电泳技术,并证明血清中抗体活性存在于 γ -球蛋白区,故又将抗体称之为 γ -球蛋白。此后不久又发现抗体活性,不但存在于 γ -球蛋白区,也存在于 β_2 区、 β 区甚至 α 区。并不是 γ 区的所有球蛋白都有抗体活性,提示抗体的存在有不均一性。1953年 Grabar 和 William 建立了免疫电泳技术,证实了抗体的不均一性。为了避免名称上的混乱,1964年 WHO 命名委员会统一将抗体及一些化学构造和抗原性同其有关的蛋白质统称为免疫球蛋白(immunoglobulin, Ig),并将 γ -球蛋白命名为 IgG, β_2A 命名为 IgA, β_2M 命名为 IgM。1965年 Rowe 和 Fahey 在骨髓瘤患者中发现了 IgD, 1966年石坂在枯草热患者中发现了 IgE。迄今为止,人类共发现有五种 Ig, 分别是 IgG、IgA、IgM、IgD 和 IgE。

第一章 免疫球蛋白的基本结构

Ig 由于存在异质性,分离、纯化较困难,限制了对其理化性质的深入研究。50年代由于从骨髓瘤及本周蛋白尿患者发现了均一

性的 Ig, 且结构均一, 易纯化, 才使得 Ig 性质的研究取得飞速进展。目前有关 Ig 结构和基本性质的知识, 绝大多数由此得来。

第一节 免疫球蛋白分子的四肽链模式结构

1959 年 Edelman 和 Porter 分别采用化学还原法和酶解法研究了免疫球蛋白分子的结构, 提出了 Ig 结构的四肽链模式。Ig 分子是由两条相同的重链(heavy chain, H 链)和两条相同的轻链(light chain, L 链)靠链内和链间二硫键连接而成的“Y”型分子。H 链分子量 50 000 ~ 77 000, L 链分子量 22 500。Ig 单体的分子量约 160 000 ~ 200 000, 分子量的差别主要是糖基化和功能区不同造成的。H 链由约 450 个氨基酸组成, L 链由约 210 个氨基酸组成。H 链和 L 链靠近 N-端部分的 110 个氨基酸序列变化较大, 称为可变区(variable region, V 区)。靠近 C-端部分的氨基酸序列比较稳定, 称稳定区(constant region, C 区)。H 链和 L 链的 V 区和 C 区分别简写为 V_H 、 C_H 和 V_L 、 C_L 。 V_H 和 V_L 中的某些部位, 氨基酸的变化更具多样性, 称为高变区(hypervariable region, HV), 如 V_L 中的 24 ~ 34、50 ~ 55 和 89 ~ 97 氨基酸和 V_H 中的 31 ~ 35、50 ~ 65、81 ~ 85 和 95 ~ 102 氨基酸。这些高变区都在 Ig 分子的抗原结合部位, 因此又叫互补决定区(CDR)。L 链和 H 链的 V 区是 Ig 分子同抗原的结合区, 并决定了抗体同抗原结合的特异性。高变区以外的 V 区序列称为框架区/framework region, FR)。每个 V 区有 4 个 FR 区。因此, V 区可以用 HV 和 FR 亚区表示为 FR_1 - HV_1 - FR_2 - HV_2 - FR_3 - HV_3 - FR_4 , 以后叙述拼接时将涉及这些亚区。L 链含有两个链内二硫键, 一个位于 V 区, 三个位于 C 区内。二硫键将周围的约 110 个氨基酸连接成一个环形的区段, 每个区段均有一定的功能。L 链具有两个功能区 V_L 和 C_L , H 链有四个功能区: V_H 、 C_H1 、 C_H2 和 C_H3 。IgM 和 IgE 多一个 H 链内二硫键, 因此多一个功能区 C_H4 。V 区中氨基酸排列顺序有一定的同源性, C_H 区的氨基酸排列顺序也具有一定的同源性, 但 V 区同 C 区无同源性。这种同源性不是偶然的, 而是反映了 Ig 分子在进化上来自同一祖系。

C_H1 和 C_H2 之间的区域称为绞链区(hinge region), 重链间的二硫链多集中在该区, 呈平行排列, 并含有相当多的脯氨酸, 而其他功能区中脯氨酸很少。绞链区短而柔曲, 赋予 Ig 分子一定的柔顺性, 使 Ig 分子可以更好地同抗原结合。由于该区含有二硫键及脯氨酸, 妨碍了螺旋结构的形成, 造成该区不能形成二级结构, 因而易被酶水解。

Ig 分子的基本结构和功能区见图 1-1。

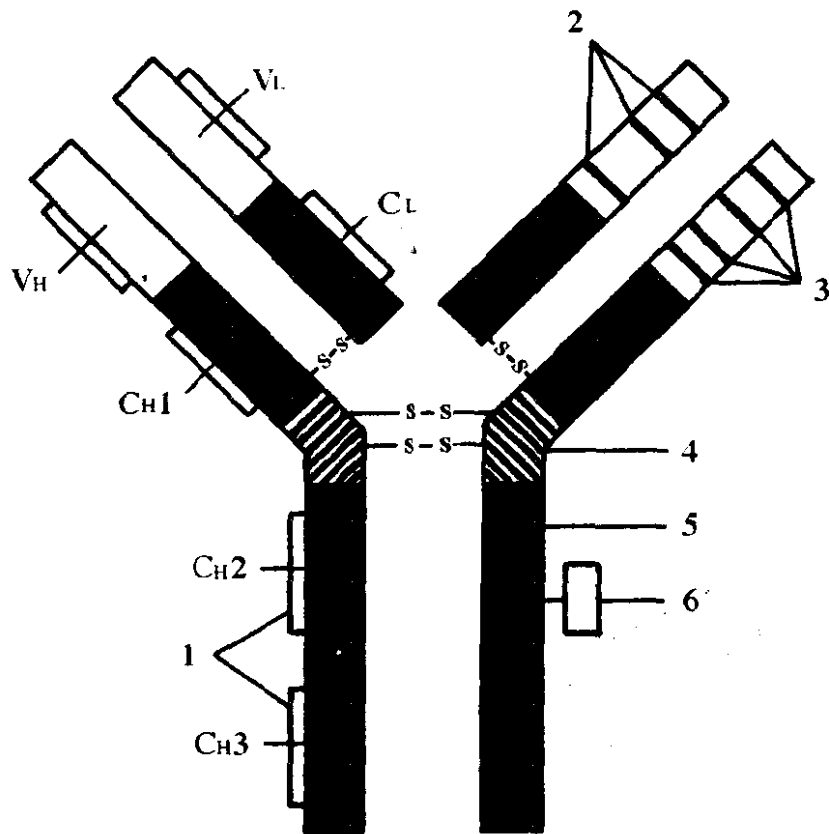


图 1-1 Ig 分子的基本结构和功能区

- 1: 链内二硫键; 2: 轻链高变区;
3: 重链高变区; 4: 绞链区;
5: 补体结合区; 6: 糖基

第二节 免疫球蛋白分子的酶解片段

用木瓜酶(papain)水解 Ig 分子, 可获得三个片段: 两个相同的 Fab 段和一个 Fc 段。Fab 段因具有抗原结合活性而得名(fragment

for antigen binding, Fab), Fc 段因可以结晶析出而得名(fragment crystallizable, Fc)。木瓜酶的作用部位在 H 链 N-端和连接两条重链的二硫键之间, 每个 Fab 段只有一个抗原结合位点(单价), 虽能结合抗原, 但只是简单的小分子复合物, 不能形成肉眼可见的凝集和沉淀。利用 Fab 段可封闭或阻断大分子复合物的形成。Fab 段的分子量约 45 000, 由一条完整的 L 链和 H 链的 V_H 和 C_{H1} 组成, V_H 和 C_{H1} 又称为 Fd(fragment d, Fd), d 代表水解片段顺序, 无特别含义。Fc 段的分子量为 50 000, 在冷的中性缓冲液中可以自身形成结晶, 它是由两条 H 链的 C 端(C_{H2} , C_{H3})组成的。Ig 分子的很多生物学活性(主要为非特异性的)同 Fc 段有关系, 如激活补体, 结合巨噬细胞、淋巴细胞和通过胎盘等。

Nisonoff 等在 pH4 ~ 4.5 条件下用胃蛋白酶(pepsin)水解 Ig 分子可产生两个片段, $F(ab')_2$ 和 Fc' , 其作用位点在连接两条 H 链的二硫键 C-端。若继续用还原剂, 如巯基乙醇处理, $F(ab')_2$ 可进一步还原为 Fab', 较木瓜酶水解产生的 Fab 略大一些。若重新氧化,

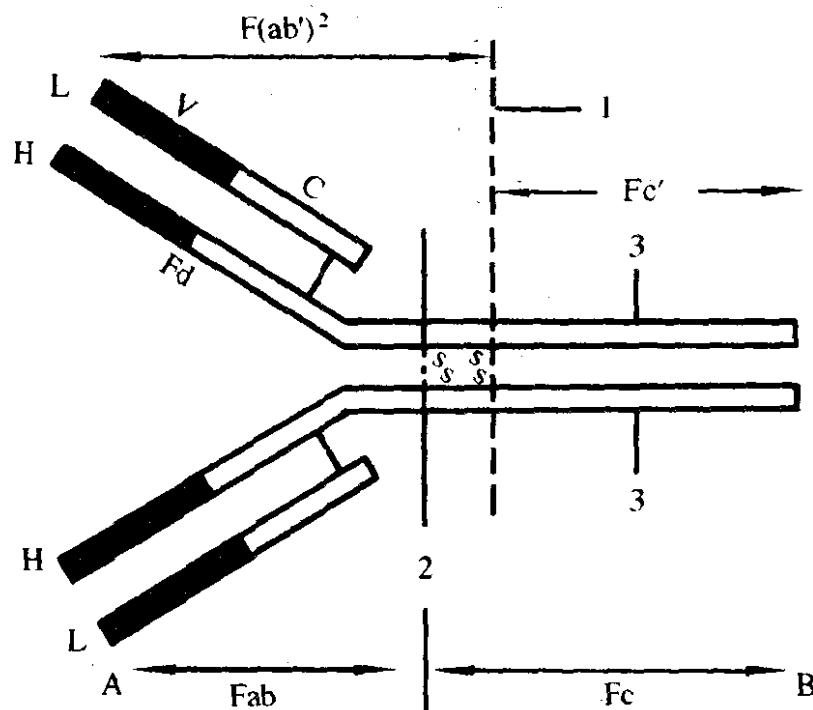


图 1-2 Ig 分子的酶解部位和片段
1: 胃蛋白酶; 2: 木瓜酶; 3: 糖
A: N 末端; B: C 末端

两个 Fab'可重新组成 F(ab')₂ 片段。F(ab')₂ 含有 2 个抗原结合位点, 而 Fc'则是没有生物学活性的小片段。酶解法或化学法获得的片段在研究 Ig 分子的结构、功能及免疫学诊断和治疗中均具有较大的实用价值。F(ab')₂ 保留了抗原结合活性, 但分子量减少近一半, 因而更有利于实验及临床应用。在间接血凝、酶联免疫、体内定位及导向治疗等方面的应用效果较完整 Ig 分子更好。有关的技术方法将在本书的第二篇加以介绍。Ig 分子的酶解部位及片段见图 1-2, 表 1-1。

表 1-1 不同酶水解 IgG 片段

酶 类	片 段	所含功能区
木瓜酶、胰酶	Fab	V _L +C _L +V _H +C _H 1
	Fc	(C _H 2+C _H 3) ₂
木瓜酶	Fd	V _H +C _H 1
胃酶	Fab'	V _L +C _L +V _H +C _H 1
溴化氢	Fab"	V _L +C _L +V _H +C _H 1
木瓜酶、胃酶	Fc'	C _H 3
血纤溶酶	Facb	(V _L +C _L +V _H +C _H 1+C _H 2) ₂
枯草溶菌酶	Fv	V _H +V _L

第三节 免疫球蛋白分子中的糖基

Ig 是一种糖蛋白分子, 各类 Ig 分子中含糖量不一, IgG 约为 2% ~ 3%, IgA 约为 7%, 而 IgM、IgD 和 IgE 则可高达 12%。糖基大多结合在 H 链的 C 区, 同 C_H2 中门冬酰胺-X-丝氨酸/苏氨酸组成的三联体中的门冬酰胺共价结合。常见的糖基有甘露糖、半乳糖、氨基葡萄糖和唾液酸, 也含有少量岩藻糖。Ig 分子上糖基的功能尚不清楚, 可能同其溶解度、分泌以及构象等有关。鉴于 Ig 分子的低聚糖基团位于分子中部, 因此推测可能参与结合补体以及同细胞的亲和功能。