



家蝇蛹凝集素的纯化及对巨噬细胞免疫活性的影响

周明慧, 王春玲, 赵旭荣, 曹小红

(食品营养与安全教育部重点实验室, 天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457)

摘要: 采用缓冲液浸提、亲和层析、超滤和离子交换 4 种方法, 从家蝇蛹中分离纯化出一种 D-半乳糖特异性结合的凝集素(MPL-1), 该组分具有明显的凝血活性和免疫调节活性。聚丙烯酰胺凝胶电泳和高效液相色谱分析结果表明, MPL-1 为单一成分的蛋白, 其分子质量为 80 ku。中性红吞噬实验结果显示, 此种凝集素能提高巨噬细胞的吞噬活性, 其作用效果具有时间和浓度依赖性。扫描电镜(SEM)观察结果表明, MPL-1 作用后的巨噬细胞呈现明显的活化状态, 证明 MPL-1 对巨噬细胞具有明显的免疫调节作用。

关键词: 家蝇蛹; 凝集素; 纯化; 巨噬细胞; 免疫调节

中图分类号: S186; Q247 文献标志码: A 文章编号: 1672-6510(2010)03-0005-04

Purification and Macrophage Immunomodulatory Activity of Lectin from *Musca domestica* Pupae

ZHOU Ming-hui, WANG Chun-ling, ZHAO Xu-rong, CAO Xiao-hong

(Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Ministry of Education, College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: A D-galactose specific lectin was purified from *Musca domestica* pupae(MPL-1) by crude extract in buffer, affinity chromatography, ultra-filtration and ion exchange process, subsequently. Its macrophage immunomodulatory activity in vitro was studied. Detection of PAGE and HPLC show that MPL-1 is homogeneous with the molecular weight of 80 ku. Pinocytic activity of macrophage can be obvious enhanced by MPL-1 in a time and dose dependent manner, and the macrophages are shown to be activated by observation of the microstructures of cells scanning electron microscope (SEM).

Keywords: *Musca domestica* pupae; lectin; purification; immunomodulator; macrophage

家蝇出没于杂菌丛生的环境, 是传播各种致病菌的主要害虫, 而自身却很少感染, 并且具有很强的富集能力和免疫功能, 能够抵制各种病原体对自身的侵入^[1]。研究发现, 家蝇的此种特性与蝇蛆体内分泌多种抗菌体, 如抗菌肽、凝集素、干扰素等物质相关^[2-4]。

家蝇凝集素是家蝇体内的糖蛋白, 能可逆地结合糖或糖衍生物, 在其非专一性防御与异物识别机制中起重要作用, 是家蝇体内参与免疫防御不可缺少的物质。随着对蝇类凝集素的研究日益深入和扩展, 其免疫调节功能备受瞩目, 成为研究热点^[5-8]。本文在研究家蝇蛹凝集素分离纯化的基础上, 分析探讨了家蝇蛹

凝集素对小鼠腹腔巨噬细胞免疫调节活性的影响, 为其免疫调节机理的进一步研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

家蝇(*Musca domestica*), 蝇种由天津市卫生防病中心提供, 食品营养与卫生研究室饲养; 昆明鼠, 体重(18.5±1.0)g, 雌雄各半, 由天津动物研究所实验中心提供; 兔红细胞, 新西兰大耳白兔购自天津医科大学动物中心, 红细胞由食品营养与卫生研究室

收稿日期: 2009-11-04; 修回日期: 2010-03-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20676103); 国家高技术研究计划(863计划)基金资助项目(2007AA10Z319)

作者简介: 周明慧(1984—), 女, 天津人, 硕士研究生; 通信作者: 王春玲, 副教授, wangchunling@tust.edu.cn.

采集。

琼脂糖凝胶 Sepharose 4B 和离子交换剂 DEAE-Sepharose Fast Flow, 美国 Sigma 公司; 标准分子质量蛋白, 上海生工生物工程技术有限公司; RPMI-1640 培养基, 美国 Hyclone 公司; 新生牛血清, 北京鼎国生物技术有限公司; 其余试剂均为分析纯。

LC-20A 型高效液相色谱仪, 日本岛津公司; 垂直电泳系统, 美国 Bio-rad 公司; FL340 型酶联检测仪、CO₂ 培养箱, 美国 Thermo 公司; XL 30 ESEM 型扫描电镜, 荷兰 Philips 公司。

1.2 方法

1.2.1 蝇蛆的养殖

参照文献[9]的方法养殖。

1.2.2 家蝇蛹凝集素的分离纯化

(1) 家蝇蛹血淋巴制备

三龄幼虫用5号昆虫针针刺, 以刺破表皮为宜。取针刺诱导后的蛹 100 g, 加入 100 mL 昆虫生理盐水 (BIS, 10 mmol/L Tris/HCl, 130 mmol/L NaCl, 5.0 mmol/L KCl, pH 7.4) 和 1.0 g 苯硫脲, 充分研磨。4 °C 抽提过夜, 用纱布过滤, 8 000 r/min 离心 15 min 后, 用纱布过滤, 重复 3 次, 上清液为家蝇蛹血淋巴粗提液。

(2) 亲和层析

将粗提液与 Sepharose 4B 等体积于 4 °C 混合 2 h, 将混合物装于 1.6 cm×40 cm 的层析柱中, 待吸附完全, 用 BIS 以流量 1 mL/min 冲洗杂蛋白组分至 280 nm 吸光度值不变。换用 0.2 mol/L D-半乳糖/BIS 溶液解吸附, 将其在 280 nm 吸收峰的组分收集。

(3) 超滤浓缩

将亲和层析后的溶液以截留分子质量 50 ku 的超滤膜进行超滤, 除去溶液中的 D-半乳糖和盐, 同时除去分子质量 50 ku 以下蛋白, 浓缩至 1 mL 后进行冷冻干燥。超滤压力 0.1 MPa, 流量 0.2 mL/min。

(4) 离子交换

处理好的凝胶抽气 2 h 后装入 1.6 cm×10 cm 的离子交换柱。离子柱用双蒸水平衡, 流量 0.3 mL/min, 上样平衡至流出液中无蛋白检出, 用浓度为 0.05 ~ 0.3 mol/L 的 NaCl 溶液进行梯度洗脱, 流量为 1 mL/min, 用核酸蛋白检测仪检测蛋白峰, 并分别收集各阶段洗脱峰, 超滤, 冻干。

1.2.3 家蝇蛹凝集素凝血活性的检测

在 V 形血凝板上, 采用倍比稀释方法, 每孔加 25 μL 的 BIS 和 25 μL 的离子交换色谱分离后的样品溶液 (1 mg/mL), 第 1 孔混匀后取 25 μL 加入第 2 孔,

混匀后取出 25 μL 加入第 3 孔, 以此类推作倍比稀释。凝血板在微型混合仪上振动, 同时每孔加入 25 μL 体积分数为 2% 的兔红细胞悬液, 继续振动 5 min, 37 °C 放置 1 h 后, 镜下观察凝血现象, 凝血效价以镜检不到凝血现象所对凝集素稀释的最大倍数的倒数来表示。

1.2.4 MPL-1 的纯度鉴定

(1) 聚丙烯酰胺凝胶电泳

聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析是采用聚丙烯酰胺垂直平板不连续凝胶电泳方法, 制胶、电泳、染色过程参照董晓燕^[10]的方法。蛋白质标准样分子质量自下而上分别为: 14.4、20.1、31.0、43.0、66.2、97.4 ku, 通过标准蛋白质相对分子质量的对数与其电泳相对迁移率之间关系标准曲线推算样品分子质量。

(2) 高效液相色谱

将冻干后的 MPL-1 组分用 pH 6.7 的 PBS 配成 1 mg/mL 的溶液, 用 0.22 μm 的滤膜过滤备用。TSK gel Super SW 3000 凝胶过滤, 液相色谱柱先用流动相 BIS (pH 6.7) 平衡, 流量 0.1 mL/min, 检测波长 280 nm, 待基线平稳后, 进样 5 μL。

1.2.5 MPL-1 对小鼠腹腔巨噬细胞免疫调节活性的影响

(1) 巨噬细胞的分离与纯化

参考文献[11]的方法分离纯化小鼠腹腔巨噬细胞, 经台盼兰染色证实细胞存活率在 95% 以上。

(2) 中性红吞噬实验

调节巨噬细胞的浓度为 1×10^6 mL⁻¹, 并接种细胞于 96 孔细胞培养板, 每孔加入不同浓度的样品, 使终体积为 200 μL, MPL-1 的最终质量浓度分别为 5、10、20、40、80 μg/mL, 分别以 PBS (pH 7.2 ~ 7.4) 作为空白对照孔, 每一浓度设 3 个复孔。将细胞培养板置 37 °C、5% CO₂ 的饱和水蒸汽培养箱中培养 48 h, 培养结束后, 每孔加入 0.1% 中性红-生理盐水溶液 100 μL, 继续培养 4 h, 倾去上清液, 用 PBS 洗 3 遍, 每孔加入细胞溶解液 ($V_{\text{冰醋酸}} : V_{\text{乙醇}} = 1 : 1$) 100 μL, 4 °C 下放置 2 ~ 3 h, 待细胞溶解后在酶标仪上测定 540 nm 处吸光度^[12]。

(3) 凝集素作用后巨噬细胞的形态观察

先将合适大小盖玻片进行酸泡, 超纯水清洗, 高压灭菌处理。把盖玻片小心地水平放入 6 孔细胞培养板的每个培养孔中, 然后加入质量浓度为 20 μg/mL 的 MPL-1 和细胞密度为 1×10^6 mL⁻¹ 的培养液, 培养 48 h。培养结束后, 小心地取出盖玻片, PBS (pH 7.2 ~ 7.4) 充分冲洗后, 先以 2.5% 戊二醛固定, 后按常

规扫描电镜样品制备法,1%锇酸固定后,逐级酒精脱水,叔丁醇干燥,离子喷镀仪喷金,扫描电镜观察。

1.3 统计学处理

使用 SPSS 10.5 软件统计分析所得结果,各组数据均以平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示. 进行方差分析和 t 检验。

2 结果与讨论

2.1 家蝇幼虫凝集素分离纯化

收集亲和层析后的蛋白峰 MPLs(图 1)经离子交换色谱柱分离(图 2)后,得到 3 个蛋白峰,分别命名为 MPL-1、MPL-2 和 MPL-3. 凝血活性实验的结果表明,MPL-1 的凝血活性最高,显微镜下观察可见,兔血红细胞之间粘连在一起,呈簇拥状. 因此,选择 MPL-1 作进一步研究。

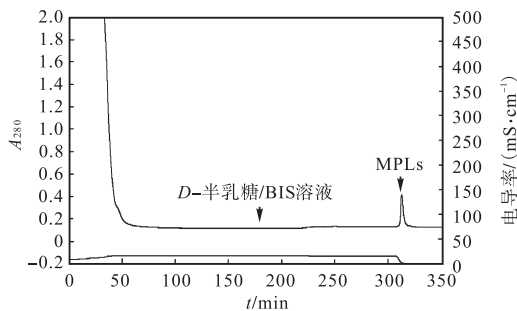


图 1 家蝇蛹提取液的亲和层析图

Fig.1 Affinity chromatography of crude extract of *Musca domestica* pupae on Sepharose 4B

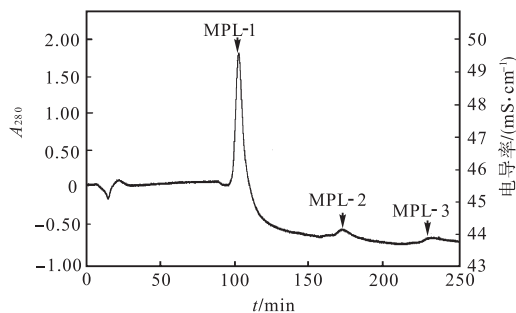


图 2 亲和层析后的 MPLs 的离子交换色谱图

Fig.2 Anion exchange chromatography of MPLs

2.2 MPL-1 纯度鉴定

离子交换后的蛋白峰 MPL-1 在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳中显示一条明显的条带,如图 3 所示,其分子质量为 80 ku,说明 MPL-1 已达到电泳纯级别. 离子交换后的峰 MPL-1 在高效液相色谱中同样显示一个较为明显的对称峰,如图 4 所示,SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和高效液相色谱的结果表明,经过

DEAE-Sepharose Fast Flow 离子交换收集到的峰 MPL-1,是单一成分的蛋白。

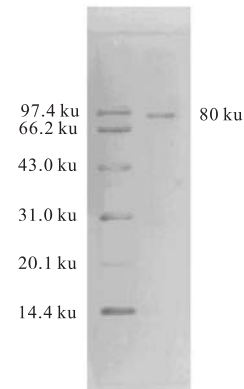


图 3 SDS-PAGE 电泳图

Fig.3 SDS-PAGE electrophoresis

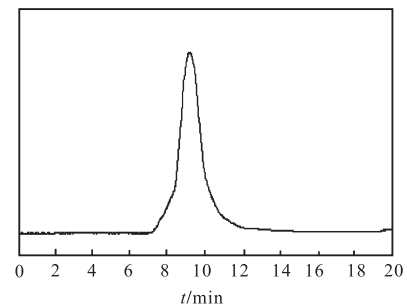
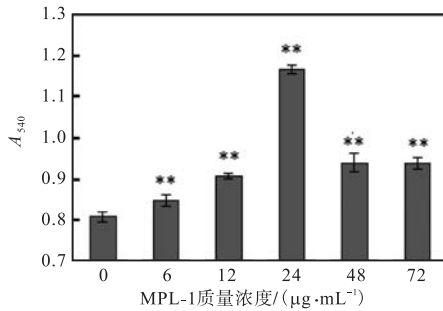


图 4 MPL-1 的高效液相色谱图

Fig.4 HPLC of MPL-1

2.3 中性红吞噬实验结果

非特异性免疫应答是机体与生俱来的免疫特性. 巨噬细胞参与非特异性免疫,其吞噬功能是免疫系统维持自身内环境稳定的重要手段,也是机体产生免疫应答的基础,是非特异性免疫的关键环节^[13]. 本文通过测定巨噬细胞吞噬中性红的能力,根据测定吸光度的大小来判定 MPL-1 对巨噬细胞吞噬能力的影响. 结果表明(图 5),MPL-1 处理后各组的吸光度均极显著高于空白对照 PBS 组($P<0.01$),表明小鼠巨噬细胞在 MPL-1 的诱导下,吞噬中性红的能力明显提高,并且随着药物添加浓度的增加,巨噬细胞的吞噬能力也明显增加. 当 MPL-1 的质量浓度为 24 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,巨噬细胞的吞噬能力最强,而当浓度增加时,巨噬细胞的吞噬活性呈降低趋势,这可能是由于机体对于异源物的免疫耐受等调控机制引起的,但是较空白对照组,细胞的吞噬能力仍有所增强. 这说明 MPL-1 能够刺激巨噬细胞,使巨噬细胞进一步分化成熟,成为活化的巨噬细胞,巨噬细胞的吞噬能力极显著增强。



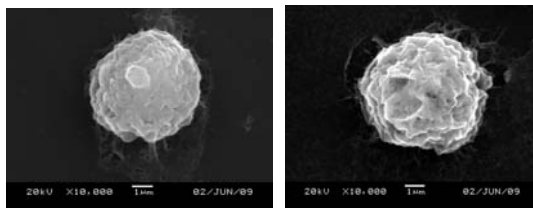
** $P < 0.01$ 表示不同浓度 MPL-1 处理组与空白对照 PBS 组比较。

图 5 MPL-1 对巨噬细胞吞噬活性的影响

Fig.5 Effects of MPL-1 on pinocytotic activity of macrophages

2.4 电镜扫描结果

在体内通过外源性因素的作用,巨噬细胞的形态和功能会发生影响^[14]。本实验通过在巨噬细胞中添加 20 µg/mL 的 MPL-1,扫描电镜观察巨噬细胞的外部形态,发现空白对照未经激活的细胞一般呈圆形、椭圆形,很少见有突起(图 6(a));添加凝集素的细胞体积明显增大,呈椭圆、菱形、梭形等不规则形态,可见较多的突起(图 6(b))。表明巨噬细胞在 MPL-1 作用下,外部形态已经呈现明显的活化特征。



(a) 正常细胞 (b) MPL-1 作用 48 h 后细胞

图 6 巨噬细胞的电镜扫描

Fig.6 SEM observations of macrophage structure

3 结 语

本文经分离纯化得到的家蝇蛹凝集素(MPL-1)是一种对 D-半乳糖特异性结合的凝集素,其分子质量为 80 ku,且对兔红细胞有较明显的凝集作用,已达到电泳纯度。本文研究 MPL-1 作用后的巨噬细胞中性红吞噬能力的改变,同时观察药物作用后巨噬细胞的外部形态变化。结果证明,家蝇蛹凝集素 MPL-1 能够显著提高巨噬细胞的吞噬活性并使巨噬细胞呈现活化状态,而 MPL-1 激活巨噬细胞的机理以及信号通路有待进一步研究。

参考文献:

[1] Spray F J, Christensen B M. Acedes aegypti: Characterization of hemocyte polypeptide synthesis dur-

ing wound healing and immune response to inoculated microfilariae[J]. Exp Parasitol, 1991, 73:481-488.

- [2] 王妮,冯江,王振堂,等. 对虾暴发性流行病的群体感染及投饲蝇幼的抗病机制研究[J]. 应用生态学报, 2002, 13(6):728-730.
- [3] Meylaers K, Clynen E, Daloz D, et al. Identification of 1-lysophosphatidyl ethanolamine(C16:1) as an antimicrobial compound in the house-fly, *Musca domestica*[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2004, 34(1):43-49.
- [4] 曹小红,陈一,张燕,等. 家蝇蛹凝集素的分离工艺和性质的初步研究[J]. 生物化学与生物物理进展, 2003, 30(3):442-446.
- [5] AO Jing-qun, LING Er-jun, YU Xiao-qiang. *Drosophila* C-type lectins enhance cellular encapsulation[J]. Molecular Immunology, 2007, 44(10):2541-2548.
- [6] Hirayama E, Maekawa H, Hiraki A, et al. Biological activities of a novel lectin derived from silkworm faeces: Characteristic changes of mouse peritoneal macrophages by the lectin[J]. Cell Structure Function, 1998, 23(5):303-313.
- [7] 曹小红,陈一,张燕,等. 家蝇蛹凝集素的纯化及其免疫调节和抑菌作用[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2005, 23(10):805-808.
- [8] CAO Xiao-hong, MAO De-zhi, WANG Chun-ling, et al. A D-galactose-binding lectin with mitogenic activity from *Musca domestica* pupae[J]. Zoological Science, 2009, 26(4):249-253.
- [9] 安瑞军,邢昌龄,王振宇,等. 家蝇饲养技术[J]. 哲里木畜牧学院学报, 1999, 9(2):49-52.
- [10] 董晓燕. 生物化学实验[M]. 北京:化学工业出版社, 2002:98-102.
- [11] CHENG An-wei, WAN Fa-chun, WANG Jia-qi, et al. Macrophage immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from *Glycyrrhiza uralensis* Fisch[J]. Int Immunopharmacol, 2008, 8(1):43-50.
- [12] 王晓京,丁桂凤,范少光. 几种阿片肽及 ACTH 对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的作用[J]. 中国免疫学杂志, 1987, 37(4):211-213.
- [13] Oh J Y, Cho K J, Chung S H, et al. Activation of macrophages by GLB, a protein-polysaccharide of the growing tips of *Ganoderma lucidum*[J]. Yakhak Hoeji (Korean), 1998, 42:302-306.
- [14] 陈诗芸,廖运掌,卓光祖,等. 党参花粉多糖对小鼠腹腔巨噬细胞的非特异性激活[J]. 中国免疫学杂志, 1991, 7(3):187.