

胃癌相关寡糖蛋白纯化及对正常人NK和 LAK细胞活性的影响

第一军医大学珠江医院肿瘤科 汪森明 张积仁

【摘要】 本文采用一种植物血凝素- PHA亲和层析法从胃癌组织中提取胃癌相关寡糖蛋白, SDS-PAGE示纯化后胃癌相关寡糖蛋白以分子量40-45KD的成分含量最高; ELISA结合抑制法检测59例胃癌患者及33例良性消化道疾病患者血清, 发现胃癌患者血清中胃癌相关寡糖蛋白表达水平明显增高, 阳性率达71.2%; 探索其对细胞免疫功能影响时, 显示胃癌相关寡糖蛋白对正常人NK细胞及LAK细胞活性呈现显著的抑制作用, 在1.0 μ g/ml浓度下, 抑制率分别为40.84 \pm 6.21%和35.47 \pm 4.21%, 推测在胃癌患者血清中测高的胃癌相关寡糖蛋白可能是一种使机体细胞免疫功能受损的免疫抑制因子。

关键词: 寡糖蛋白; 凝集素; 细胞免疫; 免疫抑制因子; 胃肿瘤

外源性凝集素 PHA识别的寡糖蛋白分子在胃癌组织中明显增多^[1], 近年来研究表明, 胃癌患者血清中也有较高含量^[2], 此类高表达的胃癌相关的寡糖蛋白(Gastrocarcinoma Associated oligosaccharides-Protein, GAO)存在于体内意义, 尤其是对机体免疫功能有无影响, 尚未见报道。本文根据外源性凝集素能专一识别不同寡糖原理, 采用亲和层析法从胃癌组织中纯化出GAO, 鉴定其特性并探讨其对正常人NK及LAK细胞活性的影响。

材料和方法

一、胃癌组织中GAO的纯化: 取经亲和组织化学ABC法证实PHA识别的GAO表达阳性的胃癌组织, 去除坏死组织及正常粘膜, 生理盐水洗净、剪碎, 加入抽提缓冲液(0.01mol/L PBS, 0.5mol/L NaCl PH7.4), 匀浆后4 $^{\circ}$ C离心10000g, 1h, 取上清, 充分透析, 再次离心20000g, 30', 取上清按5:1体积与偶联PHA的Sephrose 4B混合反应4h^[3], 装柱(ϕ 2.5 \times 25cm), 0.02mol/L pH7.4 Tris-HCl缓冲液充分洗脱杂蛋白, 改用150mmol/L的Nacetylglucosamine洗脱, 收集解离峰, 进一步过Sephacryl S-300柱, 收集首峰, 透析、浓缩, Bradford法规定含量^[4]。

二、SDS-PAGE分析及辣根过氧化物酶标记,

取纯化的GAO常规方法^[5]行SDS-PAGE, 分离胶浓度7.5%, 浓缩胶浓度5%, 电泳对照用粗提液, 并按常规方法^[6]用辣根过氧化物酶标记纯化GAO。

三、胃癌患者血清GAO检测: 研究对象为本院及外院经病理确诊的胃癌患者血清59例, 良性消化道疾病患者(包括胆囊炎、慢性胃炎和胃、十二指肠溃疡)33例, 标本收集后于-20 $^{\circ}$ C保存待测。

取外源性凝集素E-PHA(pharmacia产品), 溶于0.01mol/L PBS, 浓度0.3mg/ml, 包被于40孔微板, 每孔100 μ l, 4 $^{\circ}$ C过夜, PBS洗一次, 分别加入待测血清及不同稀释度纯化的GAO, 4 $^{\circ}$ C反应6h, PBS洗涤后, 加入辣根过氧化物酶标记GAO, 4 $^{\circ}$ C反应6h, OPD-H₂O₂显色, 2mol/L H₂SO₄终止反应, 测A490值。

四、GAO对正常人NK和LAK活性影响: rhIL-2为美国Cetus公司产品, 人红白血病细胞系K562作为NK靶细胞, 肝癌细胞系H7402作为LAK靶细胞。正常人外周血取自本院血库供血员, 按本院常规方法分离、制备人外周血单个核细胞及诱导LAK细胞, 分别采用微量乳酸脱氢酶释放法^[7]及³H-TdR释放法^[8]测定NK及LAK细胞活性。

结果

一、胃癌组织GAO的纯化及初步鉴定: 胃癌组

织粗提液经PHA-Sepharose 4B亲和层析及 Se^{3+} phacryl S-300进一步层析后,得到了纯化的GAO, Bradford法测定结果显示每克胃癌组织可



附 图 S DS-PAGE图(A为粗提液、B标为准分子量、C是纯化的GAO)

附表.

不同浓度的GAO对正常人NK及LAK细胞活性的影响*

GAO浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	NK细胞		LAK细胞	
	%杀伤活性	抑制率(%)	%杀伤活性	抑制率(%)
0	39.12 \pm 8.87	—	48.76 \pm 4.23	
0.5	28.03 \pm 7.21	28.34 \pm 6.53	40.23 \pm 5.31	17.49 \pm 5.84
1.0	23.14 \pm 6.87	40.84 \pm 6.21	31.46 \pm 4.78	35.47 \pm 4.21
2.0	20.21 \pm 8.13	48.33 \pm 5.89	27.13 \pm 3.98	44.36 \pm 5.32

*本实验效靶比为50:1

讨 论

外源性凝集素PHA能比较专一地与细胞表面寡糖基特异地结合^[1,2],根据这一原理,我们采用亲和层析方法成功地从胃癌组织中分离纯化出分子量为40-45KD的胃癌相关寡糖蛋白,同时证实胃癌患者血清中GAO表达水平比较高,在59例胃癌患者中,强阳性达42例,其中分化性腺癌占78.1%,且观察到胃癌组织经手术切除后,血清GAO渐转为阴性,提示其可作为一种标志物用于胃癌的血清学诊断及预后的判断,具有一定的意义。

Durdik^[3]等人曾提出,杀伤性淋巴细胞杀灭肿瘤靶细胞是通过识别靶细胞表面的某种寡糖分子而起作用。本研究在探讨GAO的基本特性时,发现GAO与正常人外周血分离得到单个核细胞或IL-2诱导的杀伤细胞预先孵育后,它们对肿瘤靶细胞杀伤能力受到明显抑制,估计GAO可能阻断效应细胞表面的识别位点,使其对靶细胞的接触和杀伤失去

得到约1mg的GAO; SDS-PAGE表明胃癌组织粗提液中蛋白质成份异常复杂,亲和层析等纯化后GAO分子量以40-45KD成份含量最高(见附图)。GAO与辣根过氧化物酶标记后效价为1:250。

二、GAO在胃癌患者血清中表达: ELISA结合抑制法的检测结果以正常人组平均含量加2个标准差之和作为判断胃癌的阳性阈值,胃癌患者阳性率为71.2%,良性胃病组为15.2%,正常人为7.7%; 14例检测阳性的胃癌患者行根治性切除术后半个月后,有12例患者GAO血清表达转为阴性。

三、GAO对正常人NK和LAK活性的影响: 杀伤细胞诱导后立即加入不同浓度GAO,从附表可以看出,各个浓度对正常人外周血NK细胞及rhIL₂诱导的LAK细胞的杀伤活性均有明显的抑制作用(经统计学处理P均小于0.01),且这种抑制作用与所加GAO浓度呈负相关(r分别为-0.8和-0.9, P<0.01)。

引导作用,此结果初步证实了上述学者的推论,提示胃癌患者细胞免疫功能受损可能与GAO存在有关,推测血清中及肿瘤局部组织中GAO也许是一种免疫抑制因子;关于GAO其他特性,我们将进一步加以探讨。

参 考 文 献

1. 朱无难,等. PHA标记在胃癌诊断中价值. 中华内科杂志, 1986, 25(11): 652
2. 张积仁,等. 胃癌直肠癌血清PHA识别糖蛋白表达的初步研究. 上海免疫学杂志, 1991, 11(1): 25
3. Zhang Jiren, et al. Diagnosis significance of a new group of gastric cancer associated antigen in serum, ascitic fluid and gastric juice of patients with malignancies. Chin Med J 1991, 104(3): 300
4. Bradford, et al. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the princi-

(下转第107页)

少数病例的数值有重叠现象。我们的分析发现Ag-NORs与S期百分率具有显著相关性,但是Ag-NORs与DNA倍体无关。推测后者代表核染色体倍体状态;而前者反映瘤细胞增殖活跃程度。由于Ag-NORs计数方法简便,采用银染一步法,用于福马林或酒精固定的常规石蜡切片,无疑也是肿瘤病理诊断的重要辅助指标之一。

参 考 文 献

1. Friedlander ML, et al. Clinical and biological significance of aneuploidy in human tumors. *J Clin Pathol*, 1984, 37: 961
2. Kajiwara K, et al. Silver colloid staining technique for analysis of glioma malignancy. *J Neurosurg*, 1990, 73: 113
3. Hoshino T, et al. The distribution of nuclear DNA from human brain-tumor cells, Flow cytometric studies. *J Neurosurg*, 1978, 49: 13
4. Sverre J, et al. Modal DNA content of human intracranial neoplasm studied by flow cytometry. *J Neurosurg*, 1980, 53: 198
5. 刘建民,等.星形细胞瘤细胞DNA定量研究的临床生物学意义. *中华神经外科杂志*, 1990, 6: 264
6. Crocker J, et al. Nuclear organizer regions in lymphomas. *J Pathol*, 1987, 151: 111
7. Crocker J, et al. How should we count Ag-NORs? Proposals for a standardized approach. *J Pathol*, 1989, 158: 185

(上接第133页)

- ple of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248
5. Zhang Jiren, et al. A new gastric cancer antigen associated glycolipid and glycoprotein. *J Med Coll PLA*, 1990, 5(1): 63
 6. Nilsson NR, et al. A technique for preparing defined conjugates of horseradish peroxidase and immunoglobulin. *J Immunol Methods*, 1989, 41: 81
 7. Korzeniewski S, et al. An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. *J Immunol Methods*, 1983, 64: 313
 8. 吴厚生,等. ^3H -TdR释放法测量细胞介导的细胞毒功能. *上海免疫学杂志*, 1987, 7(4): 230
 9. 陈惠黎. 糖链结构不同次生性同功酶(综述). *国外医学分子生物学分册*, 1985, 7(6): 251
 10. Durdik JM, et al. Characterization of a lymphoma cell variant selectively resistant to natural killer cells. *J Immunol*, 1980, 125: 683

(上接封3)

毒、水肿等副反应是由高剂量IL-2及其继发性淋巴因子和效应细胞所分泌的IFN- γ 、TNF- α 所致;致毒的病理生理学机理是毛细血管渗漏综合征。降毒的可能途径有:(1)降低高剂量IL-2所致的毒性;改变 γ IL-2构型(如应用甲硫氨酰 γ IL-2),用低剂量 γ IL-2和其它生物反应调节

剂(如 γ IFN- β 、IFN- γ 、IL-1、黄酮乙酸、多核苷酸和C-反应蛋白等)联用输注代替高剂量IL-2输注,高剂量IL-2注入前用环磷酰胺预处理病人。(2)纯化LAK细胞。(3)对症治疗。

(本文参考文献27篇从略)