

系统性红斑狼疮(SLE)患者血清免疫复合物中DNA的提取及电镜观察

杨彦、孙莉*、何炳林

(南开大学 分子生物学研究所
高分子化学研究所)

摘要

从活动期SLE患者血清DNA/抗-DNA免疫复合物中分离DNA,用电镜观察结果表明:这些DNA是很不均质的双链片段。它们的分子量范围很宽,镜下可见的最小片段长553Å(约150 bp),最大片段长10431Å(约2800 bp),多数DNA片段长约200—400 bp,与正常对照相比较有明显区别。另外,还观察到具有单链末端的双链DNA片段。

关键词: SLE、DNA/抗-DNA、双链不均质DNA片段。

前言

系统性红斑狼疮(Systemic Lupus Erythematosus简称SLE)是一种原因不明的自身免疫病,多见于青壮年女性。临床典型症状为皮疹、脱发、光敏、狼疮肾炎、血管炎、关节炎、心包炎等,患者体内抗双链DNA(ds-DNA)抗体具有高特异性。近几年来尽管已证明这种抗体与DNA抗原结合形成的DNA/抗-DNA免疫复合物在导致SLE肾炎病情恶化起重要作用^[1,2],但真正病因仍不清楚。因此人们在研究抗体的同时也积极注意到血清免疫复合物中实际结合着抗体的DNA抗原性质,大小及来源等问题^[3-6]。但从凝胶电泳的放射自显影图谱中,由片段长度说明小片段为其主要特征。我们用微量直观的电镜方法对分离的复合物中DNA分子量大小和形态特征进行了研究,将为SLE病因的探讨提供有用的资料。

材料和方 法

一、血样标本的选择:

1. SLE血样:选择活动期肾炎型SLE新鲜肝素抗凝全血,由天津市中医学院附属医院内科,天津市南开医院皮肤科提供。患者共三名,女性,年龄在28—35岁,具有明显SLE临床症状,其中1*血样中查见狼疮细胞。所有血清经放射免疫法测定抗体的DNA结合率在28—

* 本校八三届本科毕业生。
本文于1985年8月30日收到

40%，属SLE阳性。

2. 正常对照血样：健康献血员新鲜枸橼酸抗凝全血。从天津市第一中心医院血库购买。

二、循环免疫复合物中DNA的分离

分别取患者抗凝血18—20ml，经2000rpm离心10分钟，在终浓度为21%的饱和硫酸铵溶液中除去纤维蛋白后得8ml血清。然后在终浓度为40%的饱和硫酸铵溶液中沉淀免疫复合物（4℃ 10,000 rpm 离心10分钟），反复二次，集中沉淀，用3.5ml PBSE（10mM K_3PO_4 ，0.15M NaCl，1mM Na_2-EDTA ，pH7.1）溶解并对PBSE透析27小时（4℃）。继用含0.15M NaCl的Tris-HCl，pH7.4的缓冲溶液饱和的酚及氯仿-异戊醇（24:1，v/v）反复六次振荡，然后在3000 rpm离心10分钟，除尽蛋白质。最后水相在4℃对重蒸馏水透析24小时，冰冻干燥后所得核酸样品溶解在1ml 10mM Tris-HAC，pH8.0的缓冲溶液中，加入200μg 胰RNase（Sigma产品，90℃预热10分钟以除去残留的DNase），在37℃恒温水浴中温育30分钟消化RNA，再经酚化和氯仿-异戊醇（24:1，v/v）除蛋白质，水相对重蒸馏水再透析（4℃），冰冻干燥得DNA。

正常血样分离程序同上，只是取样量大10倍。

三、电镜样品的制备

将冻干的各份DNA样品分别用50μl重蒸馏水溶解。根据微量电镜技术的展层法^[7]使DNA在细胞色素c单分子蛋白膜上展开并载于Formvar铜网支持膜上，用 $5 \times 10^{-5}M$ 醋酸双氧铀-丙酮溶液染色，酒精脱水干燥，经高真空钨钨合金喷镀后即可作电镜观察。

四、DNA长度的测量及其碱基对（bp）数和分子量的计算

测量长度的标准样是采用pBR322环状质粒DNA（bp为4361，实测线度长16134Å）。将电镜照片中不同DNA片段用测长仪进行线度扫描，微处理机计算得出各片段长度，经与上述已知长度和bp数的标准相比即可求得片段的bp数和分子量。计算公式如下：

$$\frac{X}{L_x} = \frac{X_p}{L_p}$$

式中X为未知DNA片段的bp数

X_p 为pBR322 DNA的bp数

L_x 为未知DNA片段的长度

L_p 为pBR322 DNA的长度。

根据上式计算所测片段的bp数，乘以650 dalton（DNA核苷酸对的平均分子量），即得其分子量。

结 果

一、电镜观察结果

我们在电镜中观察到肾炎型SLE患者血清中DNA/抗-DNA免疫复合物中的DNA是大小不均质的双链片段，从1*样品中还观察到带有单链末端的双链DNA片段。

各样品是不同时间分别在两台仪器上喷镀的，照片中反映出有角度和方向的差别，但并未影响结果的测量。对照的正常血清分离的DNA片段较患者长许多，以致只能缩小放大倍数摄取全长。所有的长度和分子量计算均按标准样的放大倍数进行换算的。Fig.1—8是部分代表性电镜照片。

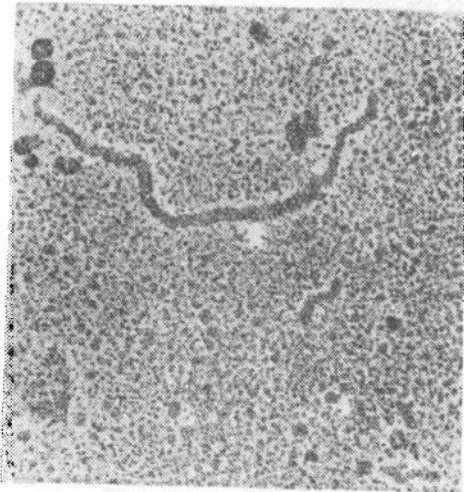


Fig.1. The largest fragment
(1° sample) .

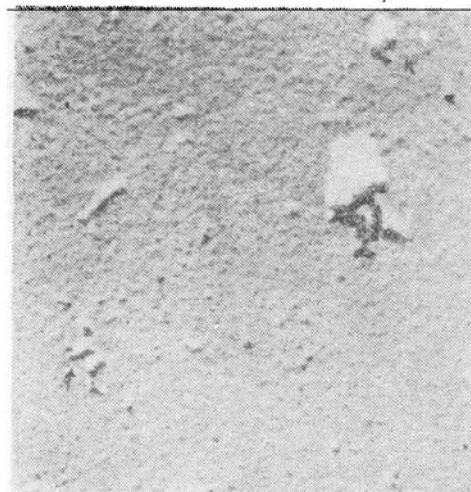


Fig.2. The smallest fragment
(2° sample) .

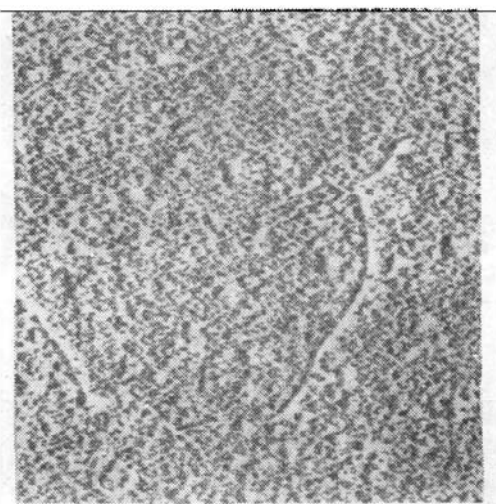


Fig.3. The large fragment
(3° sample) .

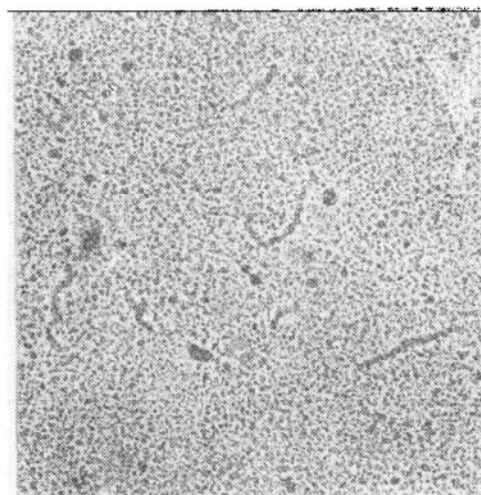


Fig.4. The small fragment
(1° sample) .

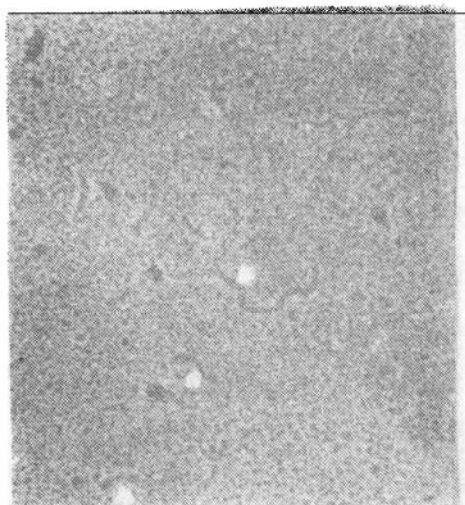


Fig.5. The richest about fragments
200—400 bp (1° sample).

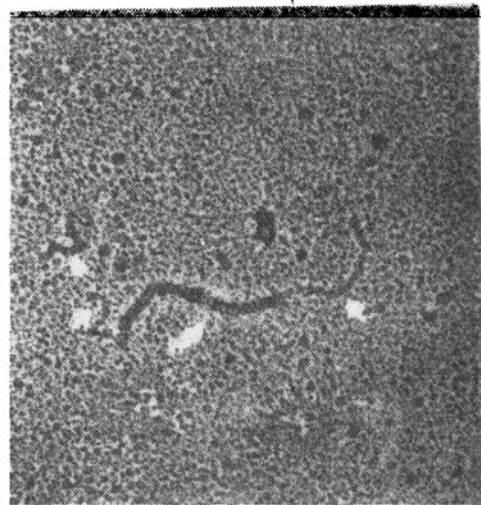


Fig.6. The double stranded DNA
fragment with terminal single-
strands (1° sample) .

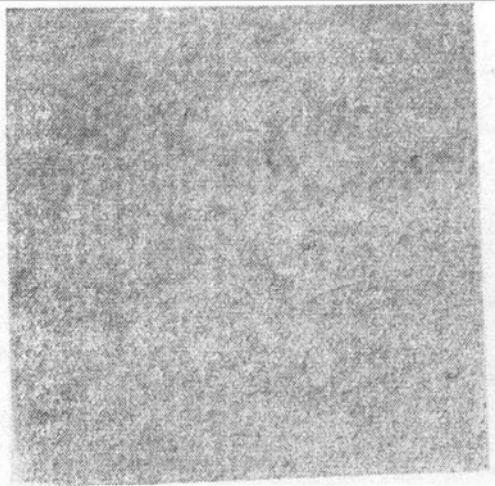


Fig.7. The large fragment of normal control.



Fig.8. The largest DNA fragment of normal control.

二、长度测定与分子量计算结果

将SLE和正常DNA的电镜照片用测长仪随机测量，从微处理机得到的各种片段的长度数据和计算的bp数及分子量结果列于Table 1 和Table 2。

Table 1. The length, base pairs and Molecular weight of DNA fragment (SLE Serum)

No.	length (Å)	base pairs (bp)	M.W. ($M \times 10^5 \text{dal.}$)	No.	length (Å)	base pairs (bp)	M.W. ($M \times 10^5 \text{dal.}$)
PBR322	16134	4361	28.3	23	1029	326	2.1
1	1661	448	2.9	24	727	196	1.2
2	1734	468	3.0	25	943	255	1.6
3	5192	1402	9.1	26	1680	454	2.9
4	1733	468	3.0	27	764	206	1.3
5	945	225	1.7	28	1002	270	1.7
6	1525	412	2.7	29	553	150	0.97
7	1202	324	2.1	30	600	162	1.0
8	1745	471	3.1	31	1729	467	3.0
9	1185	320	2.1	32	3183	860	5.5
10	803	217	1.4	33	2562	692	4.5
11	10431	2819	18.3	34	1557	421	2.7
12	2049	553	3.6	35	767	207	1.3
13	5496	1484	9.6	36	3207	866	5.6
14	2489	672	4.4	37	1929	521	3.3
15	760	205	1.3	38	741	200	1.3
16	4223	1140	7.4	39	4501	1216	7.9
17	5327	1438	9.3	40	4531	1224	7.9
18	4648	1255	8.2	41	1298	351	2.2
19	5744	1550	10.1	42	1425	385	2.5
20	3061	827	5.4	43	4322	1168	7.6
21	1303	352	2.2	44	4311	1164	7.6
22	1465	396	2.5				

Table 2. The length, base pairs and Molecular weight of DNA fragment (Normal serum)

No.	length (Å)	base pairs (bp)	M. W. ($M \times 10^5 \text{dal.}$)
1	104809	28329	184.1
2	19365	5234	34.0
3	15059	4070	26.4
4	23144	6256	40.6
5	92903	25111	163.2
6	25524	6899	44.8
7	4613	1247	8.1

讨 论

本实验参考 Sano 等^[3]的方法从患者的循环免疫复合物中分离提纯DNA, 其优点在于所得样品是直接和抗体结合的DNA而排除了血清中的游离DNA。由我们的研究结果表明, SLE患者循环血中确实存在 DNA/抗-DNA 免疫复合物, 为该免疫复合物存在场所的争论提供了一个明确答案, 并以直观的形态展现了血清免疫复合物中 DNA 的基本特征, 进一步支持了 Sano 等^[3]的研究。从我们的实验结果清楚看到, 结合在复合物中的 DNA 是很不均质的双链片段, 其分子量范围很宽。患者血液中最长DNA片段长度为 10431 Å (约2800bp), 分子量是 $18.3 \times 10^5 \text{dal.}$; 最短片段长度是 553 Å (约150 bp), 分子量是 $0.97 \times 10^5 \text{dal.}$ 。正常血清对照实验中, DNA片段的最大长度为 104809 Å (约 28329 bp), 分子量是 $184 \times 10^5 \text{dal.}$, 最小长度为 4613 Å (约1247bp), 分子量是 $8 \times 10^5 \text{dal.}$ 。另外, 各观察视野中正常样品密度很小, 虽用10倍于患者的血清量提取, 其浓度仍是很低的。

从Table 1 中还可看出, 占比例较大的片段是在200—400 bp左右。Sano^[3]及 IKebe^[6]等作者用聚丙烯酰胺凝胶电泳和放射自显影方法, 鉴定得到的结果是20—40 bp的居多。我们考虑不同的原因是受电镜分辨率的局限, 但电镜对揭示更大 DNA 片段的存在及其形态的直观性等好处是不能否定的。IKebe在鉴定小片段的同时, 也提到150—240及370—470 bp这两种DNA片段在SLE患者中是特别显著的。我们的结果除与这种片段有相似性外, 在表中还可看到大于500 bp的大片段也是在患者中明显存在的。

Papalian^[8]曾用不同长度的 DNA 片段在体外与 SLE 血清抗-DNA 抗体作竞争性结合试验, 其结果证明DNA片段与抗体的结合能力存在两个竞争性转变区间, 其一是200 bp以下, 即20—25 bp的片段已可表现竞争结合能力, 但以40—50 bp (160 Å长度) 的片段表现竞争力最强, 其二是竞争力增强的第二个转变区间是200—400 bp片段, 我们的结果是与第二个转变区间相一致。因此, 可以这样认为, SLE 病患者血清中 DNA/抗-DNA 免疫复合物的DNA以20—50 bp及200—400 bp左右的片段居多, 但结合 500 bp 以上的次大片段也很显著, 其形态特征是双链性质的。考虑以上区段 DNA 片段的高结合特点在肾炎型 SLE 中可能是具普遍性的。

Lennek^[9]从研究免疫复合物固定补体能力的角度也证明, 当高抗体水平的 SLE 血清与 DNA 结合反应时, 其结合的量明显地与DNA分子量的增加相一致。我们在SLE样品中观察到

的大于500 bp 的片段，在体内可能组成更大的不溶性复合物，在过度活化补体方面也不该被忽略。

正常血清对照的片段长度几倍甚至十几倍于患者，而其浓度则远远低得多。这样的大片段在血清中主要是与 IgM 的抗-DNA 抗体结合（资料未发表），这类结合可认为它更易于被网织内皮细胞识别而迅速被清除。但患者中 DNA 被更多地降解成 200—400 bp 片段的原因尚待进一步工作来阐明。

应该提到的是，在我们的¹²⁵I 样品中还观察到带有单链末端的双螺旋 DNA 片段。其中单链部分长约 3035 Å，双链区域长约 4311 Å。这种形状的 DNA 虽不算多，但镜下所见确为事实。对此暂还不能解释。过去这种形态的 DNA 片段仅见动物实验中有报道^[10]，如患自发性 SLE 的 NZB/W 小鼠脾细胞培养物的上清液中，分离到由该细胞排出的带单链尾巴的双螺旋 DNA 片段，已证明是具有免疫原性的。Samaha^[11]曾假设过一种具有免疫原性的 DNA 抗原模型是带有单链末端的双链 DNA。似乎我们记实的这一形态信息与该假设模型有相似性，但要进一步证实它是否在人类 SLE 中具有普遍性和免疫原性还须继续做大量工作。

致谢： 本工作得到宓怀风，范庭玉，崔同昌，郭世宜，张鸿德等同志协助，特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Koffer D. et al. (1980), 《科学》, 10月号, p.9.
- [2] Gilliam A. C. et al. (1980), *J. Immunol.*, 125, 2, 874.
- [3] Sano H. et al. (1981), *J. Immunol.*, 126, 2, 538.
- [4] Sano H. et al. (1982), *ibid.*, 128, 3, 1341.
- [5] Sano H. et al. (1983), *ibid.*, 130, 1, 187.
- [6] Ikebe K. et al. (1983), *Clin. Exp. Immunol.*, 53, 169.
- [7] Lang D. et al. (1967), *J. Mol. Biol.*, 23, 163.
- [8] Papalian M. et al. (1980), *J. Clin. Invest.*, 65, 469.
- [9] Lennek R. et al. (1981), *J. Immunol.*, 127, 2, 602.
- [10] Pancer L. B. et al. (1981), *J. Immunol.*, 127, 1, 98.
- [11] Samaha R. f. et al. (1975), *J. Clin. Invest.*, 56, 446.

**ELECTRON MICROSCOPIC STUDY OF THE DNA ISOLATED
FROM DNA/ANTI-DNA ANTIBODY IMMUNE COMPLEXES
IN SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS**

Yang, Yan Sun, Ley Ho, Ping-Lin

*(Institute of molecular biology, Institute of polymer
chemistry, Nankai University)*

ABSTRACT

DNA antigen was isolated from DNA/anti-DNA antibody immune complexes in the serum of patients with active systemic lupus erythematosus (SLE) and observed under electron microscope. The result showed that these DNA were heterogeneous doublestranded fragments. The molecular size of these fragments, as observed under the electron microscope ranged from 553 Å (about 150 bp) to 10,430 Å (about 2,800 bp). Most of these DNA fragments were in length of about 200—400 bp. In addition, single-stranded termini were found in some of the double-stranded DNA fragments.

DNA fragments isolated from normal blood were markedly different in shape from those of the SLE DNA antigen.

Key words: SLE, DNA/anti-DNA, Heterogeneous double-stranded fragments of DNA.