

甘露糖结合凝集素清除 HBV 的相关机制研究

张影 张勇 杨爱平 张福奎

【摘要】 目的 探讨甘露糖结合凝集素(MBL)清除 HBV 的相关作用机制。**方法** 应用 ELISA 法检测甘露糖结合凝集素与 HBsAg 的结合及补体 C2、C4 在 MBL-HBsAg 复合物上的沉积。**结果** 不同浓度 MBL 重组蛋白相互作用后, MBL 与 HBsAg 的结合呈剂量依赖性增加, MBL 处理组显著高于空白对照组($P < 0.01$);而在用 BSA 替代 HBsAg 包被的阴性对照组中补体水平未增加。分别用 HBSS/ Ca^{2+} 、HBSS/EDTA 和含 2 mg/ml 聚甘露糖的 HBSS/ Ca^{2+} 溶液稀释 MBL(终浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)作用后,与 HBSS/ Ca^{2+} 组相比,HBSS/EDTA 组和含 2 mg/ml 聚甘露糖的 HBSS/ Ca^{2+} 组中 MBL 与 HBsAg 的结合显著减少,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。不同浓度 MBL 重组蛋白作用后,随着 MBL 与 HBsAg 的结合增加,MBL-HBsAg 复合物上沉积的补体 C2、C4 水平也显著增加($P < 0.01$),而平行对照组中未增加。**结论** MBL 以 Ca^{2+} 依赖方式通过糖基识别区直接结合 HBsAg,并激活补体系统,从而参与 HBV 的抑制与清除。

【关键词】 甘露糖结合凝集素;肝炎病毒表面抗原,乙型;补体

Research on related mechanism of mannan binding lectin involvement in the clearance of HBV

ZHANG Ying, ZHANG Yong, YANG Ai-ping, ZHANG Fu-kui. The First Department of Liver Diseases, Dalian Sixth People Hospital, Dalian 116031, China

Corresponding author: ZHANG Ying, Email: zy730302@yahoo.com.cn

【Abstract】 Objective To investigate the correlation of mannan binding lectin (MBL) involvement in the clearance of HBV. **Methods** The binding of MBL to HBsAg and complement C2, C4 deposition with HBsAg were detected by ELISA. **Results** Incubation with increasing amounts of MBL resulted in increasing levels of detected MBL bound to HBsAg with a dose-dependent manner. In contrast, MBL binding did not increase when wells were coated with BSA. To determine the nature of MBL binding to HBsAg, MBL was incubated in wells coated with HBsAg in the presence of either Ca^{2+} or EDTA. The binding of MBL and the antigen was reduced to baseline levels in the presence of EDTA, indicating that the interaction of MBL and HBsAg was dependent on Ca^{2+} . Preincubation of MBL with mannan at 2 mg/ml in the presence of Ca^{2+} also substantially reduced the binding of MBL and HBsAg. The wells of microtiter plates coated with HBsAg were incubated with increasing amounts of MBL and resulted in increasing levels of C4 and C2 deposition on HBsAg. In contrast, complement C4 and C2 deposition did not increased when wells were coated with BSA. **Conclusions** MBL could bind to HBsAg via its multiple carbohydrate recognition domains and activate complement on HBsAg-MBL complexes through the lectin complement pathway. Therefore, MBL may be involved in the process of HBV clearance.

【Key words】 Mannan binding lectin; HBsAg; Complement

甘露糖结合凝集素(mannan binding lectin, MBL)是一种由肝脏合成、存在于血清中的 C 型凝集素,这种急性时相蛋白能选择性地识别甘露聚糖,通过激活补体、调节吞噬作用达到清除病原体的作用。

MBL 在 HBV 感染中的作用主要与成人急性 HBV 感染后的病毒自然清除有关,然而相关作用机制尚不清楚^[1-2]。研究表明 HBsAg 前-S2 区存在 MBL 识别所必需的 N-乙酰葡萄糖胺和甘露糖等糖结构^[3-4]。本研究通过体外实验测定 MBL 与 HBsAg 的结合,结合后对补体 C2、C4 沉积的影响,以探讨 MBL 清除 HBV 的相关机制。

材料与方 法

一、主要试剂

重组 MBL 蛋白和纯化人补体 C2 蛋白均为美国

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2012.04.002

基金项目:大连市卫生局科研基金项目(No.2010-041)

作者单位:116031 大连市,大连市第六人民医院肝病一科(张影、张勇、杨爱平);首都医科大学附属北京友谊医院国际医疗中心(张福奎)

通讯作者:张影,Email:zy730302@yahoo.com.cn

R&D 公司产品, HBV 表面抗体测定试剂盒为美国 Diagnostic Automation 公司产品, 胎牛血清白蛋白和平衡盐溶液 (HBSS hank's balanced salt solution) 均购自美国 GIBCO 公司, 纯化人补体 C4 蛋白和小鼠抗人单克隆 C2、C4 抗体均为美国 Quidel 公司产品, 小鼠抗人单克隆 MBL 抗体为丹麦 Antibody shop 公司产品, 聚甘露糖为美国 Sigma 公司产品。

二、MBL 与 HBsAg 结合实验

HBsAg 包被的 96 孔板采用含 1% BSA/PBS 室温下封闭 2 h, 弃去液体, 每孔加入用 HBSS/ Ca^{2+} 稀释的不同浓度重组 MBL 蛋白 (0、2.5、5、7.5、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 体系为 100 μl , 同时为了研究 MBL 与 HBsAg 的天然结合特征, 96 孔板中分别加入 HBSS/ Ca^{2+} 、HBSS/EDTA 和含 2 mg/ml 聚甘露糖的 HBSS/ Ca^{2+} 溶液稀释的重组 MBL 蛋白作为对照, 其终浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 体系为 100 μl 。室温下孵育 2 h, 将板中液体弃去, 0.5% Triton/HBSS 清洗 3 次, 加入 50 μl 生物素标记的抗-MBL (1:200), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h。弃去液体, HBSS 漂洗 3 次后, 加入 80 μl 链亲和素-HRP (80 $\mu\text{l}/\text{孔}$), 轻轻振荡混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 30 min。弃去液体, HBSS 漂洗 3 次, 加入 TMB 底物溶液 (50 $\mu\text{l}/\text{孔}$), 10 min 后加入终止液, 底物由蓝色变为黄色, 酶标仪 450 nm 波长测定吸光度值 (A)。以 BSA 包被的 96 孔板作为阴性对照; 不添加 MBL 孔作为空白对照。

三、补体 C2、C4 沉积实验

HBsAg 包被的 96 孔板用含 1% BSA 的 PBS 室温下封闭 2 h, 弃去液体, 每孔加入用 HBSS/ Ca^{2+} 稀释的不同浓度重组 MBL 蛋白 (0、2.5、5、7.5、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 体系为 100 μl , 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 将板中液体弃去, 0.5% Triton/HBSS 清洗 3 次, 加入 50 μl 生物素标记的抗-MBL (1:200), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h。弃去液体, HBSS 漂洗 3 次后, 加入纯化人重组补体 C2、C4 蛋白 (100 $\mu\text{l}/\text{孔}$), 终浓度分别为 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 轻轻振荡混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 90 min, 弃去液体, 0.5%

Triton/HBSS 清洗 3 次, 然后每孔分别加入抗-C2 和抗-C4, 终浓度分别为 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 轻轻振荡混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 90 min, 弃去液体, 0.5% Triton/HBSS 清洗 3 次, 然后加入 100 μl HRP 标记的抗小鼠 IgG (1:1000), 轻轻振荡混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 30 min。弃去液体, HBSS 漂洗 3 次, 加入 TMB 底物溶液 (50 $\mu\text{l}/\text{孔}$), 10 min 后加入终止液, 底物由蓝色变为黄色, 酶标仪 450 nm 波长测定吸光度值 (A)。以 BSA 包被的 96 孔板作为平行对照。以 HBSS 替代 MBL 作为阴性对照。补体 C2、C4 的相对沉积率 = (A_{450} - 阴性对照的 A_{450}) / 阴性对照的 A_{450} 。

四、统计学处理

应用 SPSS 11.5 软件包进行统计学分析。数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组数据间的比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 两组数据间的比较采用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、MBL 与 HBsAg 的结合

不同浓度 MBL 重组蛋白作用后, 随着 MBL 浓度的增加, A_{450} 呈剂量依赖性增加, MBL 处理组的 A_{450} 显著高于空白对照组 (蓝色线条), 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$; $t_{2.5} = -10.235$, $t_5 = -17.531$, $t_{7.5} = -26.669$, $t_{10} = -34.938$)。相反, 在用 BSA 替代 HBsAg 包被的阴性对照组中, MBL 与 HBsAg 的结合未增加 (红色线条), 各组间差异无统计学意义 ($F = 1.618$, $P = 0.244$)。为明确天然状态下 MBL 与 HBsAg 的结合特征, 分别将用 HBSS/ Ca^{2+} 、HBSS/EDTA 和含 2 mg/ml 聚甘露糖的 HBSS/ Ca^{2+} 溶液稀释的 MBL, 使其终浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 结果发现与 HBSS/ Ca^{2+} 组比较, HBSS/EDTA 组和含 2 mg/ml 聚甘露糖的 HBSS/ Ca^{2+} 组中 MBL 与 HBsAg 的结合显著减少 ($P < 0.01$; $t_{\text{聚甘露糖}} = 21.473$, $t_{\text{EDTA}} = 23.061$), 提示 MBL 以 Ca^{2+} 依赖方式结合 HBsAg, 这一结合可被聚甘露糖所阻断, 见图 1。

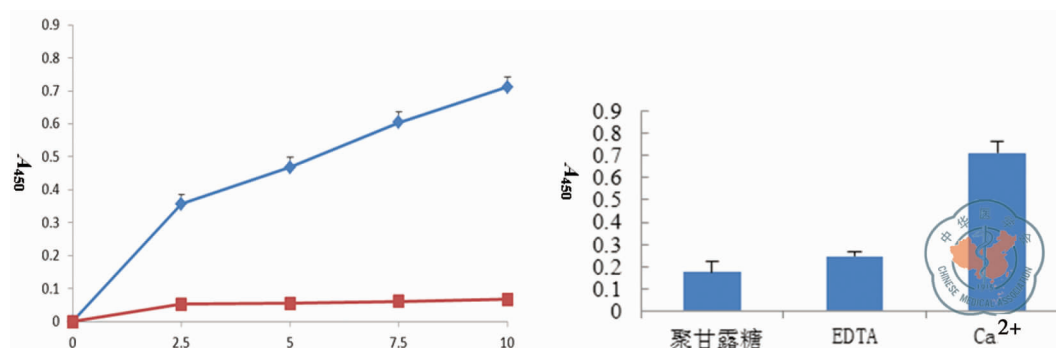


图 1 MBL 与 HBsAg 的结合

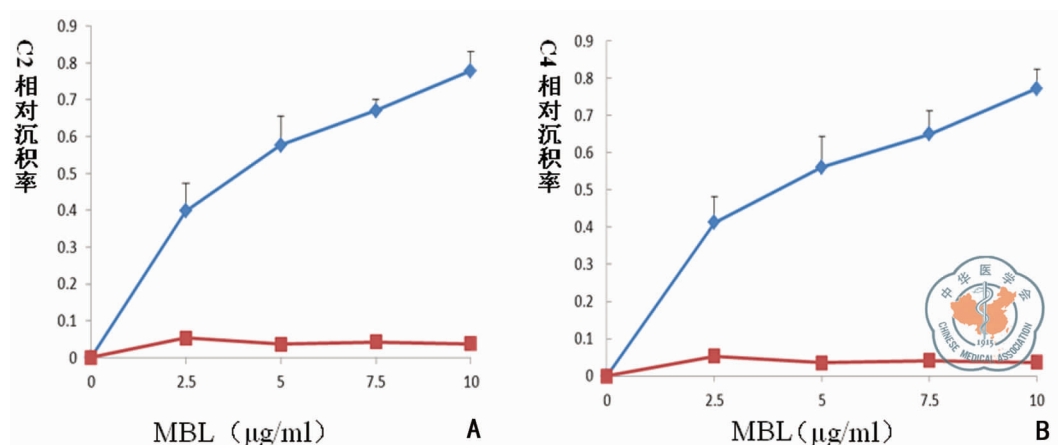


图2 补体 C2 和 C4 的沉积率

二、补体 C2 和 C4 的沉积率

为验证 MBL 与 HBsAg 结合后能否激活补体系统,本研究应用 ELISA 法检测补体 C2 和 C4 在 MBL-HBsAg 复合物上沉积率,结果表明随着 MBL 浓度的增加,MBL-HBsAg 复合物上沉积的补体 C4 以剂量依赖方式增加(蓝色线条),且差异具有统计学意义($P < 0.01$; $t_{2.5} = -6.708$, $t_5 = -9.899$, $t_{7.5} = -16.487$, $t_{10} = -24.968$); MBL-HBsAg 复合物上沉积的补体 C2 也以剂量依赖方式增加(蓝色线条),且差异具有统计学意义($P < 0.01$; $t_{2.5} = -5.850$, $t_5 = -10.753$, $t_{7.5} = -24.457$, $t_{10} = -31.164$)。相反,用 BSA 替代 HBsAg 包被的阴性对照组中补体水平并未增加(红色线条),各组间比较无统计学意义($F = 1.911$, $P = 0.185$),见图 2。

讨 论

MBL 是 Ca^{2+} 依赖的血清 C 型凝集素,具有胶原样区和 lectin 区域,其基因由 4 个外显子组成,分别编码 N-端富含半胱氨酸区、胶原区、颈区和糖基识别区,其间被 3 个内含子所间隔。糖基识别区形成球状结构,此结构是 MBL 发挥生理效应的基础。通过与病原微生物表面的糖基识别区结合,介导补体激活 MBL 途径,是机体天然免疫应答的关键分子^[5-6]。MBL 功能的发挥依赖于合适的 MBL 单体的多聚化水平,而 MBL 的血清水平和其结构则影响 MBL 功能的发挥。MBL 在 HBV 感染中的重要作用已得到广泛研究,主要与成人急性 HBV 感染后病毒的清除有关;血清 MBL 水平下降与成人 HBV 感染者的持续性病毒复制、疾病进展、暴发性肝炎的病死率增加显著相关^[7-9],然而 MBL 在 HBV 感染中如何发挥病毒清除的相关作用机制仍不清楚。当前认为可能类似于 HIV 感染时,MBL 能与 HIV gp120 蛋白上高表达的甘露糖基结合,结合后通过激活补体活

化的 MBL 途径,从而抑制和清除 HIV^[10-12], HBsAg 前-S2 区有 MBL 识别所必需的 N-乙酰葡萄糖胺和甘露糖等糖结构,因此,认为这种清除机制也有可能发生于 HBsAg 与 MBL 直接结合后。

目前,MBL 功能实验主要检测的是对吞噬的调理作用和对补体的活化作用。调控吞噬实验非常繁琐,且只能半定量,目前很大程度上已被补体活化实验所代替。补体活化作用可用 ELISA 法检测 MBL 补体活化途径的产物在固相载体上的沉积情况,以反映 MBL 的功能活性^[13-14]。本研究采用 ELISA 法测定 MBL 与 HBsAg 结合及补体 C2 和 C4 在 MBL-HBsAg 复合物上的沉积,结果表明 MBL 可以结合 HBsAg,这种结合是 Ca^{2+} 依赖方式,聚甘露糖可以阻断此结合,证实 MBL 能够与 HBsAg 结合并经糖基识别区,提示 MBL 可在功能上作为 HBV 的一种调理素,发挥其调节吞噬的作用。

MBL 作为补体激活 MBL 途径中的识别分子,MBL 在补体激活过程中发挥着重要作用。MBL 结合 MRSP2,激活补体 C4 和 C2,产生补体 C3 聚合酶 C4b2a,将补体 C3 转化为 C3b,激活补体系统^[15]。为研究 MBL 与 HBsAg 结合形成的复合物在补体激活中的作用,本研究采用 ELISA 法检测经 MBL 作用后补体 C2 和 C4 在 MBL-HBsAg 复合物上的沉积率,结果表明 MBL 与 HBsAg 结合可增加补体 C4 和 C2 在 MBL-HBsAg 复合物上沉积,提示 MBL 通过糖基识别区结合 HBsAg,且结合后能够活化补体 MBL 途径。

本研究证实体外 MBL 以 Ca^{2+} 依赖方式通过糖基识别区直接结合 HBsAg,这种结合还可增强补体 C2 和 C4 的沉积,表明 MBL 可以通过调节吞噬作用和 MBL 途径激活补体,进而参与 HBV 的清除和抑制作用,为下一步的深入研究提供理论依据。

参 考 文 献

- 1 Fletcher GJ, Gnanamony M, Samuel P, et al. Association of mannose-binding lectin polymorphisms and HBV outcome in a South Indian population. *Int J Immunogenet*, 2010, 37(3):177-184.
- 2 Ruseva M, Kolev M, Dagnaes-Hansen F, et al. Mannan-binding lectin deficiency modulates the humoral immune response dependent on the genetic environment. *Immunology*, 2009, 127(2):279-288.
- 3 Brown KS, Ryder SD, Irving WL, et al. Mannan binding lectin and viral hepatitis. *Immunol Lett*, 2007, 108(1):34-44.
- 4 Gabius HJ. Cell surface glycans: the why and how of their functionality as biochemical signals in lectin-mediated information transfer. *Crit Rev Immunol*, 2006, 26(1):43-79.
- 5 Sarter K, Mierke C, Beer A, et al. Sweet clearance: involvement of cell surface glycans in the recognition of apoptotic cells. *Autoimmunity*, 2007, 40(4):345-348.
- 6 Than NG, Romero R, Erez O, et al. A role for mannose-binding lectin, a component of the innate immune system in pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol*, 2008, 60(4):333-345.
- 7 Ratnam D, Visvanathan K. New concepts in the immunopathogenesis of chronic hepatitis B: the importance of the innate immune response. *Hepatol Int*, 2008, 2(Suppl 1):12-18.
- 8 Bertolotti A, Maini MK, Ferrari C. The host-pathogen interaction during HBV infection: immunological controversies. *Antivir Ther*, 2010, 15(Suppl 3):15-24.
- 9 Chang JJ, Lewin SR. Immunopathogenesis of hepatitis B virus infection. *Immunol Cell Biol*, 2007, 85(1):16-23.
- 10 Eisen S, Dzwonek A, Klein NJ. Mannose-binding lectin in HIV infection. *Future Virol*, 2008, 3(3):225-233.
- 11 Catano G, Agan BK, Kulkarni H, et al. Independent effects of genetic variations in mannose-binding lectin influence the course of HIV disease: the advantage of heterozygosity for coding mutations. *J Infect Dis*, 2008, 198(1):72-80.
- 12 Singh KK, Natham S, Adame A, et al. Expression of mannose binding lectin in HIV-1-infected brain: implications for HIV-related neuronal damage and neuro AIDS. *Neurobehav HIV Med*, 2011, 3(1):41-52.
- 13 Varga L, Széplaki G, Laki J, et al. Depressed activation of the lectin pathway of complement in hereditary angioedema. *Clin Exp Immunol*, 2008, 153(1):68-74.
- 14 Boxx GM, Nishiya CT, Kozel TR, et al. Characteristics of Fc-independent human antimannan antibody-mediated alternative pathway initiation of C3 deposition to *Candida albicans*. *Mol Immunol*, 2009, 46(3):473-480.
- 15 Medzhitov R, Janeway C. Innate immunity. *N Engl J Med*, 2000, 343(5):338-344.

(收稿日期:2011-10-08)

(本文编辑:孙荣华)

张影,张勇,杨爱平,等.甘露糖结合凝集素清除 HBV 的相关机制研究[J/CD].中华实验和临床感染病杂志:电子版, 2012, 6(4):268-271.