

ĐẶC TÍNH KÍCH THÍCH PHÂN BÀO ĐỐI VỚI LYMPHO T CỦA NGƯỜI CỦA CÁC LECTIN Ở HAI LOẠI MÍT HOANG ĐẠI (ARTOCARPUS ASPERULUS, ARTOCARPUS MASTICATA)

Đỗ Ngọc Liên

Khoa sinh học-Đại học khoa học tự nhiên-ĐHQG HN

MỞ ĐẦU

Lectin có trong hạt mít (*Artocarpus heterophyllus* Lamk hoặc *A. integrifolia* Linn) là một glycoprotein có phân lượng khoảng 50 kDa (Aucouturier và cộng sự [1]), được hình thành từ hai tiểu đơn vị α và β kết hợp với nhau không cộng hóa trị (Young và cộng sự [7]). Các tiểu đơn vị α và β đã được tinh chế bằng sắc ký lỏng cao áp (HPLC) và bằng điện di trên gel polyacrylamit (SDS-PAGE) sau đó trình tự sắp xếp axit amin đầu N và trình tự toàn bộ của chúng đã được xác định (Young và cộng sự [7], Liên Do Ngọc và cộng sự [5]). Những đặc tính miễn dịch của lectin hạt mít như kích thích phân bào lympho T CD [4], kết tủa đặc hiệu các IgA1 và IgD của người [1, 2, 6], có khả năng kìm hãm in vitro sự nhiễm một số chủng virus HIV1 truyền bệnh AIDS cho loài người [4] đã tạo cho lectin khả năng được sử dụng rộng rãi trong nghiên cứu miễn dịch và y học.

Việc nghiên cứu đặc tính và khả năng khai thác lectin từ các loài mít hoang dại đang phổ biến ở Việt Nam [3], hầu như chưa có tài liệu nào đề cập tới. Những nghiên cứu này nhằm mục đích trên được thực hiện ở phòng thí nghiệm miễn dịch học và miễn dịch bệnh lý, đơn vị URA 1172 thuộc trung tâm nghiên cứu khoa học quốc gia Pháp và đại học Poitiers.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Tách và tinh chế lectin mít hoang dại:

Hạt mít hoang dại của hai loài *Artocarpus asperulus* và *Artocarpus masticata* được thu hái ở các rừng phía Tây Quảng Bình và ở một vườn cây Hà Nội đã được giáo sư Vũ Văn Chuyên định loại theo Lecomte [3], được nghiền thành bột mịn. Việc chiết rút và tinh chế lectin đã được chúng tôi mô tả trước đây [5,8]. Kiểm tra độ tinh khiết của chế phẩm lectin được thực hiện bằng điện di SDS - PAGE theo Laemmli [5] và kỹ thuật điện di chuyển thấm miễn dịch (trans blotting) "Westernblot".

Kháng thể đơn dòng chống lại chuỗi α của lectin mít (*A. heterophyllus*) thu hái ở đảo La Réunion đã được điều chế ở phòng thí nghiệm miễn dịch bệnh lý URA 1172 Đại học Poitiers.

2- Nghiên cứu khả năng kích thích phân bào :

Các tế bào đơn nhân của máu ngoại vi (PBMC) được nhận từ những người cho máu khỏe trưởng thành (thí nghiệm lặp lại đối với 8 người cho máu khác nhau) Máu được thu cùng với heparin, li tâm với Ficoll Hypaque (Lymphoprep, Nycomed, Oslo - Norway) ở 1200g trong 30 phút. Tế bào đơn nhân ở giữa hai lớp phân chia được rửa 2 lần trong môi trường RPMI 1640 (GIBCO, cergy, Pomtoise, France). Sau đó các tế bào được nuôi cấy ở nồng độ 10^6 tế bào/ml

trên các bản nhựa 96 giếng có đáy phẳng (Nunc- intermed - Đan Mạch) trong 100 microlit môi trường RPMI 1640 có thêm 10% huyết thanh phôi bê, 100 microgam/ml streptomixin, 100 u/ml penixilin, 1% L.glutamin và $5.10^{-5}M$ 2- Mercaptoetanol (GIBCO). Các bản nhựa nuôi cấy được ủ trong tủ ấm 37°C từ 1 đến 5 ngày dưới điều kiện khí quyển 5% CO₂. Sự sinh sản của các tế bào máu được nghiên cứu bằng sự xâm nhập Timidin đánh dấu (³H-Thymidine của hãng CEA Gif sur Yvette, France) vào ADN của các tế bào trong khi chúng phân chia. ³H-thymidin (ở nồng độ 1 μ Ci/giếng) được thêm vào sau 18 giờ nuôi cấy khi có mặt lectin hoặc không cho thêm lectin sẽ thu lại sau 48 giờ, 72 giờ và 96 giờ, được hấp thụ trên giấy lọc sợi thủy tinh bằng máy thu tế bào. Các giấy lọc được sấy khô và cho vào lọ chứa 2 ml dung dịch có hóa chất nhấp nháy. Máy đếm nhấp nháy (Intertechnique SL 2000) sẽ cho các số đếm nhấp nháy trong một phút (cpm). Các biểu hiện kháng nguyên bề mặt biệt hóa của các lympho bào B và T được xác định sau 4 và 7 ngày nuôi cấy nhờ ủ tế bào nuôi cấy với các kháng thể khác nhau gắn với fluorescein (FITC) hoặc với phycoerythrin (Coulter diagnostic, USA), anti - CD3FITC (Coulter). Sau 10 phút ủ và cố định, các tế bào được phân tích bằng máy đo tế bào (Cytometric en Flux FACS, Coulter, Epics, Elite, USA).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Tinh chế các lectin :

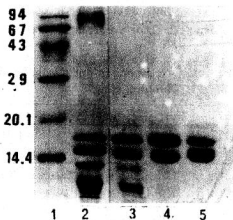
Các lectin từ hạt của hai loài mít hoang dại *A. asperulus* và *A. Masticata* đều được tinh chế trên cột sắc ký ái lực Muxin - CNBr - sepharose 4B đã mô tả trước đây [5,8] đều cho hai băng protein tương ứng với khối lượng phân tử 17 và 14 kDa khi điện di trên gel polyacrylamit 15% có mặt SDS và 2 - mefcaptoetanol. Trong khi đó, ở kết tủa dịch chiết bằng (NH₄)₂SO₄ 60% bão hòa có chứa nhiều băng protein không phải lectin (ảnh trình bày ở hình 1). Số lượng các tiểu đơn vị lectin của mít hoang dại và khối lượng phân tử của chúng gần giống với lectin của mít thường (*A.heterophyllus*) và mít tố nữ (*A.champeden*) đã được nghiên cứu trước đây [5,8].

Kết quả nghiên cứu về khả năng nhận biết một kháng thể đơn dòng chống lại chuỗi α của lectin mít thông thường (*A.heterophyllus*) của các lectin mít dại đã chứng minh các lectin đã tinh chế đều có phản ứng chéo miễn dịch với kháng thể này. Điều đó chứng tỏ sự giống nhau rất cao của các quyết định kháng nguyên của các phân tử lectin hạt mít thông thường và lectin mít hoang dại (hình 2).

2. Khả năng kích thích phân bào :

Vào năm 1989, Aucouturier và các cộng sự [1] đã chứng minh hoạt động kích thích sự phân bào của lectin hạt mít (*A.heterophyllus*) thu hái ở đảo La Réunion (Đông châu Phi) đối với các tế bào lympho T của máu ngoại vi của người, liên quan chủ yếu tới quần thể lympho bào T - CD₄⁺. Những kết quả chúng tôi nhận được trong công trình này cũng chứng minh các lectin mít hoang dại có khả năng kích thích sự sinh sản của các tế bào đơn nhân máu ngoại vi của người (đồ thị hình 3). Khi so sánh khả năng kích thích phân bào của bốn loại lectin gồm : hai loại mít thông thường của Việt Nam và đảo La Réunion (*A.heterophyllus*), hai loại mít dại (*A.asperulus* và *A.masticata*), chúng tôi nhận thấy hình như lectin của *A. heterophyllus* Việt Nam và *A. masticata* có hoạt tính kích thích phân bào cao hơn so với các lectin loài khác ở nồng độ thí nghiệm : 100 microgam/ml (hình 3). Hơn nữa, chúng tôi cũng nhận thấy sự sai khác đáng kể về khả năng kích thích phân bào của các lectin khi có sự thay đổi máu của những

người cho máu khác nhau (bảng 1). Khi dùng phương pháp đo huỳnh quang tế bào để nghiên cứu các kháng nguyên biệt hóa của tế bào đơn nhân máu ngoại vi được kích thích bằng các lectin của các loài khác nhau (mít thường của Việt Nam và của đảo La Réunion, 2 loài mít đại),



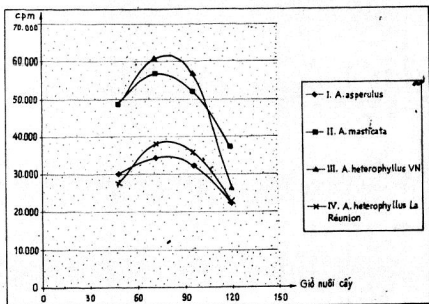
Hình 1 : Ảnh điện di SDS - PAGE (15%) đối với các lectin đã tinh chế và định chiết từ 2 loài mít hoang dại.

- 1 - Các protein tiêu chuẩn kDa (Hàng LKB - Thủy Điện)
- 2 - Dịch chiết thô của *A.asperulus*
- 3 - Dịch chiết thô của *A.masticata*
- 4 - Lectin đã tinh chế của *A.asperulus*
- 5 - Lectin đã tinh chế của *A.masticata*



Hình 2: Điện di chuyển thấm miễn dịch (Western Blot) phát hiện bằng kháng thể đơn dòng chống chuỗi α , lectin mít (*A.heterophyllus*, đảo La Réunion)

- 1 - Lectin *A.heterophyllus* của VN
- 2 - Lectin *A.masticata*
- 2 - Lectin *A.asperulus*



Hình 3 : Sự xâm nhập H3_timidin vào PBMC của người trong quá trình sinh sản được kích thích bằng lectin của các loài mít khác nhau

chúng tôi nhận thấy tất cả các quần thể lympho T đều được kích thích bằng các lectin của mít hoang dại. Hơn nữa các dưới quần thể (subpopulation) lympho T CD₄⁺ đều có khả năng sinh sản cao hơn so với các lympho T - CD8⁺ dưới ảnh hưởng của các lectin mít hoang dại. Cụ thể là sự sinh sản của lympho T CD₄⁺ tăng từ 13,1% (đối với *A.masticata*) đến 19,5% (đối với *A.asperulus*) so với môi trường không thêm lectin. Trong khi đó, sự sinh sản của lympho T - CD8⁺ giảm xuống từ 3,4% (đối với *A.asperulus*) đến 4,2% (đối với *A.masticata*) so với môi trường đối chứng không thêm lectin (bảng 2)

Bảng 1 : Đáp ứng sinh sản của PBMC của người đối với các lectin mít tùy thuộc vào các cá nhân cho máu. (Sự xâm nhập H³-timidin, cpm.)

Loài	Giờ Người cho máu	Thời gian nuôi cấy			
		48	72	96	120
I.A.asperulus	1	17.401	11.226	10.250	8.250
	2	47.748	38.181	21.019	20.500
	3	19.113	12.124	7.218	6.500
	4	18.829	30.050	30.348	20.680
	5	40.594	24.561	36.039	20.510
	6	27.289	62.364	76.198	37.037
	7	44.254	65.787	66.424	60.461
	8	25.980	30.286	10.477	4.945
II.A.masticata	1	41.409	24.293	22.737	18.400
	2	69.389	69.770	70.446	60.280
	3	61.791	50.428	25.526	15.200
	4	15.810	34.480	68.702	40.500
	5	48.075	51.423	23.728	18.540
	6	22.624	65.825	77.637	37.143
	7	79.956	104.376	112.475	103.697
	8	50.907	54.980	16.631	8.218
III.A.heterophyllus VN	1	49.260	38.082	31.230	25.500
	2	69.400	91.606	91.228	50.600
	3	74.867	72.600	21.901	15.500
	4	29.705	64.435	115.314	10.200
	5	79.751	77.990	47.678	25.500
	6	26.546	51.623	69.606	38.364
	7	29.650	34.689	14.605	8.425
	8	28.846	54.643	64.606	36.687
IV.A.heterophyllus La Réunion	1	15.345	14.398	12.796	8.500
	2	50.086	51.809	30.687	20.500
	3	23.533	17.051	8.811	6.500
	4	12.450	45.346	68.271	38.364
	5	33.763	30.489	15.462	7.889
	6	32.568	58.525	64.456	50.612
	7	31.487	38.140	17.497	10.540
	8	21.681	48.883	68.569	41.029

Bảng 2 : Biểu hiện phenotyp bề mặt của PBMC của người dưới ảnh hưởng của các lectin mít hoang dại (% biểu hiện biểu đồ tế bào máy FACS, USA)

Dấu hiệu kháng nguyên	Tế bào được nuôi cấy với				
	Tế bào tươi	PHA	lectin A.m	Lectin A.a	Môi trường đối chứng
CD2 (T)	90,0	99,9	97,2	93,3	96,3
CD20 (B4)	6,3	0,3	4,1	4,3	2,8
CD4 (T4)	43,6	38,0	63,7	70,1	50,6
CD8 (T8)	31,0	70,7	31,7	32,5	35,9

Nếu so sánh với kết quả nuôi cấy có thêm lectin PHA (Phytohemagglutinin của hạt đậu *Phaseolus vulgaris*) là một mitogen (tác nhân gây phân bào) điển hình, chúng tôi nhận thấy lectin PHA chỉ kích thích sự sinh sản của các dưới quần thể lympho T CD₈. Điều này trái ngược với kết quả khi sử dụng lectin mít hoang dại (bảng 2). So sánh với các kết quả nghiên cứu trước đây đối với lectin mít thường [8], chúng tôi cũng thấy có sự tương tự.

Tóm lại, các nghiên cứu ở trên có thể cung cấp những dẫn liệu khoa học quan trọng cho việc nghiên cứu khả năng ứng dụng các lectin mít hoang dại trong lĩnh vực y học và miễn dịch tế bào.

KẾT LUẬN

1. Các lectin của hai loài mít hoang dại *Artocarpus asperulus* và *Artocarpus masticata* đã được tinh chế cho hai tiểu đơn vị 14 và 17 KDa khi kiểm tra SDS-PAGE, có phản ứng chéo miễn dịch đối với kháng thể đơn dòng chống lại chuỗi α của lectin mít thường (*A.heterophyllus*) thu hái ở đảo La Réunion.)

2. Các chế phẩm lectin tinh khiết của hai loài mít hoang dại nói trên đều có khả năng kích thích sự sinh sản của các quần thể lympho T của tế bào đơn nhân máu ngoại vi của người, đặc biệt là lympho T - CD₄⁺.

Lời cảm ơn : Công trình này được thực hiện nhờ dự án hợp tác giữa trung tâm nghiên cứu khoa học quốc gia Pháp (CNRS), Trung tâm khoa học tự nhiên và công nghệ quốc gia Việt Nam và trường Đại học tổng hợp Hà Nội.

Tác giả xin chân thành cảm ơn sự giúp đỡ của GS. Vũ Văn Chuyên, đại học Dược Hà Nội và PTS Nguyễn Đình Hưng, Viện khoa học Lâm nghiệp Việt Nam đã cung cấp mẫu vật và giúp cho sự định loại.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Aucouturier P, Pineau N, Brugier J.C, Michaesco. E, Duarte.F, Skvaril.F and Preud'homme J. Jacalin : A New laboratory tool in immunochemistry and cellular immunology. *J. Clin.Lab. Anal* 3 : (1989) 244 - 251.
2. Bunn - Moreno. M. M and Campos - Neto. A
Lectin extracted from seeds of *Artocarpus in integrifolia* (jack fruit) : Potent and selective stimulator of distinct human T and B cell function. *J. Immunol* . 127 (1981) : 427 - 429.

3. Lecomte M.H

Flore générale de l'Indochine. Tom V. Paris 1910

Moracees par F. Ganepain 1910 : 694 - 740.

4. Favero. J. Corbeau. P. Nicolas. M. Benkirance M.Dixon J.F.P, Aucouturier.P.

Rasheed. S, Parher J.W. Deveau. C, and Dornand J.

Jacalin, a lectin from *Artocarpus heterophyllus*, interacts with the CD4 cell surface antigen and demonstrates anti-viral properties against human immunodeficiency virus.

In : Lectins. Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry 8.1993 : 334 - 340.

5. Lien Do Ngoc, Brillard M and Hoebeke J.

The α - and β - subunits of jacalin are cleavage products from a 17k Da precursor.

Biochim. Biophys. Acta, 1156 : (1993) 219 - 222.

6. Saxon. A. Tsui. F and Martinez - Maza

Jacalin : an IgA - binding lectin inhibits differentiation of human B Cell by both a direct effect and by activating T - suppressor cells.

Cell. Immunol. 104 (1987) 134 - 141.

7. Young N.M. Johnston R.A.Z and Watson D.C

The amino acid sequences of jacalin and the *Maclura pomifera* agglutinin. FEB. letter:

282 : (1991) 382 384.

8. Đỗ Ngọc Liên F. Duarte và P. Aucouturier

Một số đặc tính miễn dịch của các lectin giống *Artocarpus* của Việt Nam - Tạp chí Dạy học và ứng dụng 2/1992 (1992) 20 - 23.

VNU. Journal of science. Nat. sci. t. XI, n^o3-1995

MITOGENIC PROPERTIES FOR HUMAN T LYMPHOCYTES OF
THE LECTINS FROM TWO WILD JACK FRUITS SPECIES
(*ARTOCARPUS ASPERULUS*, *ARTOCARPUS MASTICATA*)

Do Ngoc Lien

College of Natural Sciences, VNU

The lectins or jacalins of seeds from two wild jack - fruits species (*Artocarpus asperulus* *Artocarpus masticata*) were purified by mucin CNBr sepharose 4B column. The purity of these lectins were checked by SDS - PAGE and by immunologic technique "Western Blot". These lectins stimulated the proliferation of mononuclear cell populations from normal human peripheral blood, especially CD4 T - lymphocytes which increase from 13,1% (for *A. masticata*) to 19,5% (for *A. asperulus*) in comparison with medium alone.