

人胎脑胶质细胞自发分泌白细胞介素 6*

孙 沛 田志刚 张 捷 崔正言 张建华

(山东省医学科学院基础医学研究所, 山东肿瘤生物治疗研究中心, 济南 250001)

关键词 人胎脑胶质细胞, 白细胞介素 6(IL-6)

自 1986 年获取人白细胞介素 6(IL-6) 分子克隆以来, IL-6 研究已深入生物医学领域的各个分支。已证明 IL-6 在免疫系统、造血系统、肝脏代谢等分化发育及功能表达中担负关键的作用。1987 年发现建株的星形细胞瘤和胶质细胞瘤在 LPS 或 IL-1 刺激后可以表达 IL-6 mRNA。1988 年发现 IL-6 可以促进嗜铬细胞瘤(一种检测神经生长因子的细胞模型)向神经元分化,从而揭开了研究 IL-6 促神经母细胞分化效应的序幕。鉴于上述证据均为间接性证据,尚无法直接证明人中枢神经系统分化中 IL-6 的作用,我们利用人胚胎期中枢神经系统发育分化基为活跃的特点,观察起“支持营养作用”的胶质细胞是否可以自发分泌 IL-6,试图从这一个侧面证实 IL-6 在中枢神经系统中的促分化效应。

按常规制备脑胶质细胞的胰酶(0.2%)-EDTA(0.02%)消化方法获取单个脑胶质细胞悬液,完全培养基为 RPMI1640 加 10% FCS,细胞浓度为 1×10^6 ,种入 24 孔组织培养板(1.5ml/孔),在第 1 到第 3 天(d_1-d_3), d_4-d_7 , d_8-d_{12} , d_1-d_7 分别收获上清,上清中 IL-6 生物活性检测采用国际通用的 IL-6 依赖细胞株——MH60·BSF₂ 细胞(2×10^4 细胞/孔,96 孔板),IL-6 标准品采用 IL-6 分泌细胞株——T24 细胞上清(100U/ml,用基因工程 IL-6 纯品标定)按照生物效价测定方法对待测胎脑胶质细胞上清和 T24 标准品 IL-6 上清作 1:4—1:256 的倍比稀释,培养 24h 后加入 ³H-TdR 观察 MH60·BSF₂ 细胞的增殖状态,并进行概率单位法处理,比较待测样品与标准品之

间的稀释度而求出待测样品的 IL-6 活性单位(U/ml),同时模拟 T24 上清,采用培养瓶观察了待测上清体外长期传代培养 MH60·BSF₂ 的生长状态。

结果表明,四组待测样品(d_1-d_3 , d_1-d_7 , d_4-d_7 , d_8-d_{12})均显示明显的 IL-6 活性,在一定范围内呈剂量依赖关系,经生物效价计算, d_1-d_3 上清含有 46.68U/ml, d_1-d_7 上清含有 30.80 U/ml, d_4-d_7 上清含有 8.85U/ml 和 d_8-d_{12} 上清含 6.70U/ml。提示原代培养的人胎脑胶质细胞在无任何刺激情况下可自发分泌 IL-6,而且脱离机体进入培养液时间越短(d_1-d_3)分泌能力越强。 d_1-d_7 上清低于 d_1-d_3 上清的原因可能与 IL-6 在培养时的生物学消耗(与 IL-6 受体结合)或降解有关。为了进一步观察人胎脑胶质细胞上清 IL-6 活性,我们还进行了该上清支持 IL-6 依赖细胞株——MH60·BSF₂ 生长的体外长期传代试验,在最佳剂量(含 20% 胎脑胶质细胞上清)情况下培养 MH60·BSF₂ 细胞达 120h 并绘出了细胞生长曲线,结果该生长曲线与 IL-6 标准品(T24 上清,为标准品 IL-6 分泌瘤株的上清)支持 MH60·BSF₂ 细胞的生长曲线基本相仿,细胞经过 120h 培养增殖了 9.6 倍(起始浓度为 1×10^5 细胞/ml,120h 浓度为 9.6×10^5 细胞/ml),细胞倍增周期为 35.82 ± 4.18 h。经过 IL-6 检测的短期增殖和长期增殖试验,初步证实了人胎脑胶质细胞可自发分泌高效价的 IL-6,该结果为“IL-6 可作为一种新型神经生长因子而促中枢

* 国家自然科学基金资助项目,1990 年, No38900053.

技术与方法

Eu^{3+} 标记技术的实验研究

陈素娟 李振甲

(解放军总医院, 北京 100853)

提 要

本文探讨了当今较有发展前途的时间分辨荧光免疫分析技术中的关键环节—— Eu^{3+} 标记技术中的 pH 值、螯合剂用量及反应时间等诸因素的影响, 选出了最佳反应条件。

关键词 时间分辨荧光免疫分析, 镧系稀土元素示踪, Eu^{3+} 标记技术

时间分辨荧光免疫分析 (time-resolved fluoimmunoassay 简称 TRFIA) 是国外八十年代初, 继 RIA 后在 FIA 技术基础上发展起来的一种新型非放射配基超微量分析技术^[1,2]。这种分析技术具有灵敏度高, 标记物容易制备, 操作简便, 迅速等许多优点, 虽问世较短, 发展却十分迅速。凡 RIA 和 EIA 测定的物质均可采用 TRFIA 法测量。TRFIA 技术和其它配基分析技术基本相似, 仅示踪物和信号测量不同, 因此制备符合标准的 Eu^{3+} 标记物是其关键问题。有关标记物制备技术的方法研究至今尚未见有报告。本文通过对人白蛋白(hAlb)的标记, 对两步标记法有关问题进行了初步的实验研究, 旨在选用最佳的反应条件, 制备优质的标记物。现将实验方法及结果报告如下。

一、试剂和材料

1. EuCl_3 溶液制备 取高纯 Eu_2O_3 (英国 Johnson Matthey 公司产品) 58.9 mg 于试

管中, 加 1mol/L HCl 约 0.8ml 至完全溶解, 加蒸馏水至 5ml, 此时 pH 为 2, 用 0.25mol/L NaOH 调 pH 至 4, 加蒸馏水至 10ml, 浓度为含 EuCl_3 33 $\mu\text{mol/ml}$, 4 $^\circ\text{C}$ 冰箱保存, 可长期使用。

2. 增强液 取邻苯二甲酸氢钾 1.39g, 三辛基磷化氢的氧化物 (tri-N-octylphosphine oxide) 19.33mg, 2-萘酰三氟丙酮 (2-naphthoyl trifluoroacetone) 6mg, 冰醋酸 6ml, Triton X-100 1g, 加重蒸水 800ml, 微温至溶后加重蒸水至 1000ml。

3. 50mmol/L pH 7.4 磷酸盐缓冲液 0.5 mol/L NaH_2PO_4 16ml, 0.5 mol/L Na_2HPO_4 84ml, NaCl 9g, 明胶 1g, NaN_3 0.5g, 加水至 1000ml。

4. 白蛋白抗体 本室免疫家兔制备, 最终滴度 1:12000—1:18000。

5. ^{125}I -白蛋白标记 本室采用 Iodogen 标记技术, 非特异结合 3.7%, 免疫活性 >92%。

神经系统分化”的假说提供了较为直接的证据, 同时也进一步证实神经系统与免疫系统的内在联系, 丰富了神经内分泌免疫系统。此外也为应用 IL-6 治疗神经损伤病人提供了理论依据。我们目前正在应用现代蛋白质纯化技术和

IL-6 基因杂交技术进一步证明人胎脑胶质细胞分泌 IL-6 的生化属性和基因表达状况。

[本文于 1990 年 8 月 29 日收到]