

PREPARATION AND PRELIMINARY APPLICATION OF MONOCLONAL ANTIBODY AGAINST HUMAN LEPTIN

DONG Xiu Hua ZHAO Yue Ran ZHANG Jian Hua WANG Jun Fu

ZHANG Jie LIU Wei ZHANG Cai TIAN Zhi Gang

(Center for Tumor Biotherapy of Shandong, Institute of Basic Medicine, Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250062)

ABSTRACT

Recombinant human leptin(rh-Lep) was conjugated to naked bacteria of salmonella typhimurium as immunogen to immunize BALB/c mice. Rh-Lep was administered by three routes of intrasplenic inoculation, intraperitoneal and intravenous injection. The spleen cells were fused with SP2/0 cells using polyethylene glycol and hybridoma cells were selected by HAT medium and screened with enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA). After rounds of cloning with limited dilution method, three of hybridoma cell lines were obtained which stably secret monoclonal antibodies of IgG3 against human leptin with high specificity and affinity. MCAs were tested for their potential uses and the results showed that these McAbs can be used in Western blotting, Immunohistochemical and Immunofluorescent techniques.

Key words: Leptin Hybridoma Monoclonal antibody(McAb)

单核细胞促进人外周血淋巴细胞离体增殖的自由基机理

白海涛 张永芳 潘金燕 江家贵*

(苏州大学核医学院 苏州 215007)

许多研究表明多种细胞,例如人成纤维细胞、内皮细胞和胰岛细胞,在体外培养条件下可向培养基中释放低浓度的超氧阴离子自由基 $O_2^{\cdot-}$ ^[1], $O_2^{\cdot-}$ 充当了第二信使的作用,可激活细胞增殖信号传导链上的多种靶分子,从而导致细胞增殖^[2]。人们早就发现,在淋巴细胞培养过程中加入少量的单核细胞可促进 PHA 刺激的淋巴细胞的体外增殖。然而其确切机制尚不清楚,为此我们设想淋巴细胞和单核细胞共同培养条件下的介质中的 $O_2^{\cdot-}$ 是否参与了淋巴细胞的增殖调控作用? 因此我们设计了下列实验。

材料和方法

一、主要仪器和试剂

低本底液闪仪 LS-6800 USA; 3H -TdR 上海原子能研究所; 超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase SOD)按丙酮沉淀法^[3]从猪红细胞提取(比活力 $5000\mu/mg$ 蛋白); 淋巴细胞分离液, 上海试剂二厂; 细胞色素 C, 二亚苯基碘(Diphenyleneiodonium, DPI), PHA 均购自 Sigma 公司。

二、细胞的分离

吴县市中心血站提供健康人外周血, 肝素抗凝后以淋巴

细胞分离液分离出单个核细胞, PBS 洗三次, 用含 PHA 的无酚红 RPMI-1640(PHA 浓度为 $60\mu g/ml$)液配制成 $0.5 - 1 \times 10^7/ml$ 的细胞悬液, 加入无菌培养皿中, $37^\circ C$ 静置 90 分钟。吸取非贴壁细胞, PBS 洗两次, 即为淋巴细胞。PBS 冲洗培养皿三次, 小心刮取贴壁细胞, 瑞氏染色后镜下观察, 单核细胞比例为 $84\% - 90\%$ 。

三、细胞培养

(1) 取 24 孔培养板, 每孔加入淋巴细胞 1×10^6 , 实验分单纯淋巴细胞组, 淋巴细胞 + 1×10^5 单核细胞组, 淋巴细胞 + 2×10^5 单核细胞组, 每组设九个复孔, $37^\circ C$ 无血清培养 48 小时后, 每组前三孔加入 3H -TdR $20\mu l$ ($2.22 \times 10^5 Bq/ml$), 继续培养 16 小时, 吸取非贴壁的淋巴细胞, 滤膜法制样, 液闪测定各样品的 DPM 值(每分钟衰变数)^[4]。后六孔作如下处理, 其中三孔加入细胞色素 C $160\mu mol/L$, 另三孔加入等量细胞色素 C 的同时加入 SOD 1200μ (测定非 $O_2^{\cdot-}$ 因素对结果的影响)^[5], $37^\circ C$ 培养 1 小时后, 将样品 1000 转离心 10 分钟, $550nm$ 波长处测定上层相吸光度值(OD 值), 计算出两者 OD 差值, 再换算成 $O_2^{\cdot-}$ 浓度($nmol/h/10^6$ 细胞)^[5]。

(2) 取另一块培养板, 各处理组加入 DPI $20\mu mol/L$, 分组和处理同上。

本文 2001 年 7 月 2 日收到, 11 月 5 日接受。

* 导师、通讯联系人。

结 果

由表 1 可见,向淋巴细胞培养体系中分别加入 1×10^5 单核细胞和 2×10^5 单核细胞,培养介质中 O_2^- 浓度分别增加了 86% 和 168%,而淋巴细胞的 DPM 值也相应增加了 27% 和 56%。

由表 2 可见,DPI 加入后对单纯淋巴细胞培养组 O_2^- 浓度及 DPM 值影响均不大,但可显著下调淋巴细胞和单核细胞混合培养组介质中 O_2^- 浓度及淋巴细胞的 DPM 值。

表 1 加入不同数量单核细胞对培养介质中 O_2^- 浓度及淋巴细胞增殖的影响

实验组别	O_2^- (nmol/h/ 10^6 细胞) (均数±标准差)	DPM(每分钟衰变数) (均数±标准差)
淋巴细胞	2.2±0.3	9544±402
淋巴细胞+ 1×10^5 单核细胞	4.1±0.2*	12081±371*
淋巴细胞+ 2×10^5 单核细胞	5.9±0.2*	14892±565*

* $P < 0.01$ 与淋巴细胞组比较。

表 2 加入 DPI 对介质中 O_2^- 浓度及淋巴细胞增殖能力的影响

实验组别	O_2^- (nmol/h/ 10^6 细胞) (均数±标准差)	DPM(每分钟衰变数) (均数±标准差)
淋巴细胞	2.0±0.3	9544±402
淋巴细胞+DPI	1.9±0.2	9289±674
淋巴细胞+ 1×10^5 单核细胞	3.9±0.3*	12408±702*
淋巴细胞+ 1×10^5 单核细胞+DPI	2.2±0.4	10176±485
淋巴细胞+ 2×10^5 单核细胞	5.7±0.3*	15129±477*
淋巴细胞+ 2×10^5 单核细胞+DPI	1.9±0.2	9655±712

* $P < 0.01$ 与淋巴细胞组比较。

讨 论

从表 1 可以看出,随着加入的单核细胞数的增多,介质中 O_2^- 浓度升高,而反应淋巴细胞增殖能力的 DPM 值也相应升高。为此我们可以作出如下假设:单核细胞向培养介质中释放的低浓度 O_2^- 参与了淋巴细胞的离体增殖效应。为证实上述假设,我们向上述培养体系中加入 NADPH 氧化酶抑制剂 DPI,抑制 NADPH 氧化酶催化氧分子形成 O_2^- 的单电子还原反应,从而降低单核细胞向介质中释放的 O_2^- ,可观察到淋巴细胞 DPM 值的变化。

NADPH 氧化酶是一种定位于细胞膜的 GTP 酶,属 rac 蛋白家族^[6],可催化氧分子发生单电子还

原而形成 O_2^- ^[7],当我们在培养体系中加入 DPI 后,从表 2 可见 O_2^- 浓度明显下降,且细胞增殖能力也下降至对照组水平,这有力地证实了上述假设,说明生理状态下由 NADPH 氧化酶途径生成的低浓度 O_2^- 是单核细胞促进淋巴细胞体外增殖的重要因素之一。关于 O_2^- 促进细胞增殖的机制已有大量报道,主要有以下几条途径:(1)激活 PTK、PKC、MAPK 等蛋白激酶,引起增殖反应;(2)激活 NF- κ β 或 AP-1 等转录因子,引起早期生长基因的表达;(3)促使 Ca^{2+} 内流,活化 Ca^{2+} 依赖性信号传导途径^[7]。就本实验而言, O_2^- 直接作用的下游靶分子是什么?其作用的确切位点在哪儿?这些都是值得深入探讨的问题。

摘 要

在人外周血淋巴细胞培养体系中加入不同数量的单核细胞共同培养,以³H-TdR 掺入法和细胞色素 C 还原法分别测定淋巴细胞增殖能力和培养介质中 O_2^- 浓度;加入 NADPH 氧化酶抑制剂 DPI 实验性地下调 O_2^- 浓度,观察淋巴细胞增殖能力的变化。结果显示加入单核细胞可增加培养介质中 O_2^- 浓度,进而促进淋巴细胞增殖,提示 O_2^- 浓度的升高是淋巴细胞和单核细胞共培养体系中淋巴细胞增殖的重要因素。

关键词:超氧自由基 淋巴细胞 单核细胞 增殖
NADPH 氧化酶

参 考 文 献

- [1] Burdon R, 1995, *Free Radical Biology*, 18: 775-794.
- [2] Primiano T, et al., 1997, *Comp Biochem Physiol Biochem Mol Biol.*, 118(3): 487-497.
- [3] 陈同来、徐得昌, 1997, 生化工艺学, 北京大学出版社, 北京, pp. 92-97.
- [4] 孔向蓉等, 1997, 辐射研究与辐射工艺学报, 15(2): 114-118.
- [5] 庞战军等, 2000, 自由基医学研究方法, 人民卫生出版社, 北京, pp. 27-28.
- [6] Finkel T, 2000, *Feb letters*, 476: 52-54.
- [7] Pick E, et al., 1981, *J Immunol Methods*, 46(2): 211-226.
- [8] 邱嵘、郑荣梁, 2001, 生物化学与生物物理进展, 28(3): 287-288.

FREE RADICAL MECHANISM OF PROLIFERATION OF PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES CULTURED WITH MONOCYTES

BAI Hai Tao ZHANG Yong Fang PAN Jin Yan JIANG Jia Gui
(School of Nuclear Medicine, Soochow University, Su zhou 215007)

ABSTRACT

When lymphocytes of human peripheral blood were cultured with different amounts of monocytes, the ability of lymphocyte proliferation was determined by ^3H -TdR incorporation method and the concentration of O_2^- was measured by cytochrome C reduction method, respectively. We added DPI into culture medium to depress the activity of NADPH oxidase, which produces superoxide anions, to observe the change of cell proliferation. Results showed that the concentration of superoxide anions, which can cause lymphocytes proliferation was increased with the amounts of cultured monocytes. These findings suggest superoxide anions play an important part in the proliferation of peripheral blood lymphocytes cultured with monocytes.

Key words: Superoxide anions Lymphocytes Monocytes Proliferation NADPH oxidase

TSA 杀伤培养的人大肠癌细胞 DLD1 及机理的研究

庞希宁 宋今丹 柴原茂树*

(中国医科大学细胞生物学卫生部重点实验室发育生物学研究室 沈阳 110001)

大肠癌(colon cancer)是消化系统最常见的恶性肿瘤之一,寻找杀伤大肠癌的新药及探讨其作用机理是目前研究的热点之一。曲古抑菌素 A(trichostatin A, TSA)是链霉素代谢产物,其以纳摩尔的浓度特异抑制哺乳动物组蛋白脱酰基酶,使高度酰基化的组蛋白积累,激活基因表达、抑制细胞增殖、引起细胞分化或凋亡,是目前国际上公认的研究酰基化对细胞影响的可靠模式^[1,2]。TSA 可通过抑制组蛋白脱酰基酶使肿瘤细胞酰基化蛋白质增加,产生细胞生长抑制和凋亡,可选择性激活培养肿瘤细胞的许多基因,改变其 2% 基因的表达。除组蛋白外其他的蛋白质也可作为组蛋白脱酰基酶的作用底物,但目前对它们还了解甚少。小眼相关转录因子(microphthalmia transcription factor, MITF)与胚胎发育、细胞色素生成和分化有关,并可引起细胞凋亡,对肿瘤细胞生长有抑制作用^[3]。但是在非黑色素细胞的表达和作用机理还不清楚^[4]。也未见有关人大肠癌细胞 DLD1 表达 MITF 及其酰基化与 DLD1 生长抑制和凋亡关系的报道。为进一步探讨 TSA 对肿瘤细胞的杀伤作用及其机理,我们用 TSA 作用于人大肠癌细胞 DLD1,研究 TSA 与 MITF 表

达的关系,在电子显微镜下观察细胞的微细结构改变,现将结果报告如下。

材料与方法

1. 细胞培养与给药处理

人大肠癌细胞 DLD1^[5]由日本东北大学医学部惠赠。将细胞培养在含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 (GIBCO/BRL) 培养液中, 5% CO_2 、100% 相对湿度、37℃ 条件下于塑料培养皿(Falcon)培养。以初始浓度为 10^5 /ml 接种细胞,实验时取对数生长期细胞。

实验分三组:空白对照组;加 TSA $3.0\mu\text{mol/L}$ (biomol) 组;加细胞因子组:人干扰素 γ 100U/ml (Osaka)、人肿瘤坏死因子 α 10ng/ml (Boston, MA) 和人白细胞介素-2 10ng/ml (Tokushima),孵育 24 小时后取细胞进行实验^[6]。

2. Northern 杂交实验

用 Trizo 试剂盒(GIBCO/BRL)提取人大肠癌细胞 DLD1 总 RNA,经甲醛琼脂糖凝胶电泳和硝酸纤维素膜(Roche)转印后,以 MITF 探针用 Dig Northern Kit(Roche)作杂交实验。

3. 透射电镜标本制备和观察

PBS 缓冲液冲洗实验及对照组细胞两次, 2.5% 戊二醛迅速固定 2 小时,二钾磷酸钠缓冲液冲洗,锇酸后固定,乙

* 日本东北大学医学部分子生物学分野。

本文 2002 年 3 月 25 日收到,5 月 10 日接收。