

脂多糖诱导人外周血单核细胞产生粒细胞集落刺激因子

秦树林 朱圣庚* 王爱霞 肖志壮* 郭振泉* 黄仪秀*
(北京协和医院 100730) (*北京大学生物系 100871)

人粒细胞集落刺激因子(hG-CSF)是一种能在体内外调节粒细胞系祖细胞的存活、增殖、分化以及增强成熟粒细胞功能的糖蛋白^[1,2]。文献^[3,4]报道膀胱癌细胞株5637和口腔鳞状上皮癌细胞株CHU-2均可自主持续分泌hG-CSF。已有实验室^[5,6]分别从这两种肿瘤细胞株中克隆到hG-CSF的cDNA,并且在大肠杆菌和COS细胞中成功地进行了表达。Ishizaka^[7]等报道人外周血单核细胞在体外经激活可产生有活性的hG-CSF,估计单核细胞在体内也是一种能产生hG-CSF的细胞。我们用大肠杆菌脂多糖(LPS)在体外诱导人外周血单核细胞,使其产生hG-CSF及其mRNA,对诱导条件和动力学进行了研究。本文报道了所取得的一些结果。

材料和方法

材料

1. 试剂 葡聚糖(分子量16.2万)、DMEM细胞培养基、大肠杆菌脂多糖和硫氰酸胍均购自Sigma公司。pGEM-7zf(+)/HaeIII分子量标准、RNasin和TaqDNA聚合酶均购自华美公司。M-MuLV逆转录酶购自Biolabs公司。聚蔗糖-泛影葡胺分离液(20℃比重1.077±0.001)和小牛血清购自天津生化制品厂。

2. hG-CSF引物和探针 均由北京大学生物系DNA合成仪(381A型)合成。

3'端引物: AGGCCTGGGGCTCCGTTCC

5'端引物: ACCCCCCTGGGCCCTGCC

中间探针: GTAGGTGGCACACAGCTTCTCC-TG

3. 正常人新鲜抗凝血 由本院血库提供。

方法

1. 外周血单核细胞的分离^[8] 取正常人新鲜的用肝素抗凝的血放入大试管中,加入1/4体积4.5%

葡聚糖生理盐水溶液,混匀。将试管置37℃保温45分钟,使红细胞下沉。吸出富含白细胞的血浆层铺于比重为1.077的聚蔗糖-泛影葡胺分离液中,20℃,2000rpm离心30分钟。然后吸取界面层的单核细胞,用含1%小牛血清的DMEM培养液洗两次,离心,弃上清。将细胞悬于上述培养液中,并作细胞计数和活力测定。取一滴2%锥虫蓝,加2滴细胞悬液,室温放置3—5分钟,涂片置显微镜下观察,透亮者为活细胞,染蓝色者为死细胞(活细胞数大于98%)。

2. LPS诱导单核细胞 分离到的单核细胞加含10%小牛血清的DMEM细胞培养液,放入几个培养瓶中(细胞密度 1.5×10^6 细胞/厘米³),置CO₂培养箱(含5%CO₂)37℃培养1.5小时,然后加入LPS(终浓度为0.3mg/ml),再培养0—48小时。

3. 细胞总RNA的提取 参照Chomczynski的方法^[9]。

4. 用RT-PCR方法检测hG-CSF的mRNA 参照朱圣庚的方法^[10]。取10μl RT-PCR产物进行3.5%聚丙烯酰胺凝胶电泳。

PCR反应条件为:94℃变性1分钟,57℃退火1分钟,72℃延伸2分钟,共30个循环,最后一个循环延伸10分钟。

5. 用双单克隆抗体ELISA夹心法检测表达产物hG-CSF 参照李太生等人的方法^[11]。

结果

一、LPS诱导人外周血单核细胞产生hG-CSF

培养的人单核细胞中加入LPS后诱导培养0—48小时,以产生hG-CSFmRNA及hG-CSF。分别在0、4、12、24、48小时取细胞和培养上清液,并用双单克隆抗体ELISA夹心法检测上清液的hG-CSF。结果表明:LPS诱导12小时开始检测出hG-CSF,24小时达到高峰,并持续到48小时(见图1)。说明LPS

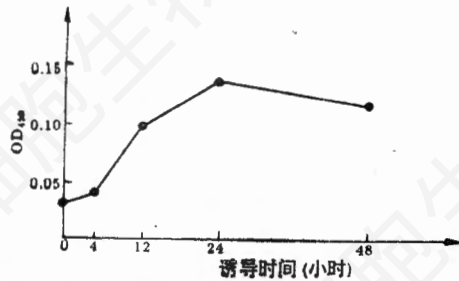


图1 LPS诱导人单核细胞产生和分泌hG-CSF的量与时间关系曲线

注 空白对照 OD₄₅₀: 0.00

阳性对照 OD₄₅₀: 0.68

在体外可诱导人单核细胞产生hG-CSF。

二、LPS诱导人单核细胞产生hG-CSF-mRNA

取经LPS诱导的人单核细胞，提取其总RNA。根据hG-CSF mRNA序列设计两个引物，引物间的扩增片段大小为627 bp。用RT-PCR方法检测hG-CSF mRNA，结果发现在LPS诱导单核细胞第4到12小时存在显著量的hG-CSF mRNA，24小时后测不出mRNA。我们先用3'端引物和M-MuLV逆转录酶合成出hG-CSF cDNA的第一条链，再加入5'端引物，在TaqDNA聚合酶的作用下，经过30次PCR扩增使hG-CSF cDNA的量大大

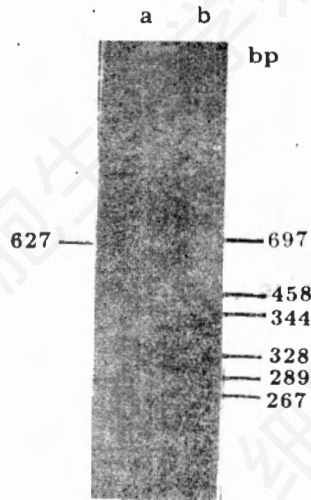


图2 RT-PCR产物hG-CSF cDNA的3.5% PAGE图谱

a. RT-PCR产物hG-CSF cDNA

b. 分子量标准物pGEM-7 zf(+)/Hae III

增加，然后将RT-PCR产物进行3.5%聚丙烯酰胺凝胶电泳，以pGEM-7 zf(+)/Hae III作分子量对照，可以清楚看到627 bp的扩增条带，即hG-CSF的cDNA(见图2)。用光敏生物素标记的特异性探针对扩增条带进行杂交，结果为阳性(结果未列出)。说明LPS在体外可诱导人单核细胞产生hG-CSF mRNA

讨 论

一般情况下未经刺激物诱导的正常人细胞和癌细胞(除个别肿瘤细胞株外)均不产生hG-CSF。只有某些细胞如成纤维细胞、血管内皮细胞、单核细胞在一些外来刺激物如白细胞介素I(IL-1)，肿瘤坏死因子(TNF)，脂多糖(LPS)诱导下才能产生hG-CSF^[12,16]。我们曾用双单克隆抗体ELISA夹心法和RT-PCR方法测定了未经诱导的人成纤维细胞和多种癌细胞(肺癌、膀胱癌、口腔鳞状上皮癌)均无hG-CSF及其mRNA产生。而以LPS体外诱导人的单核细胞4小时即产生显著量的hG-CSF-mRNA，但随着诱导时间的延长，hG-CSF-mRNA的量反而减少，诱导24小时以上则测不到hG-CSF-mRNA，因此，LPS诱导单核细胞产生hG-CSF-mRNA的高峰在诱导的第4小时。hG-CSF的产生和分泌较hG-CSF-mRNA的产生迟10—20小时，它的产生和分泌高峰在诱导的第24小时，并且持续到48小时仍有活性。这说明hG-CSF生物合成的调节主要发生在转录水平上。

LPS刺激单核细胞产生的hG-CSF可诱导造血干细胞终末分化成粒细胞，使粒细胞数量增加。同时，它对于粒细胞也是一个趋化信号。当体内某处细菌感染或增殖时，细胞内毒素(LPS)很快诱导单核细胞hG-CSF基因的表达和hG-CSF的释放。hG-CSF不仅使中性粒细胞在几小时内透过组织集中到细菌感染处，而且增强其杀伤和吞噬细菌的能力，将细菌杀灭。所以我们可以看到在急性细菌感染者的血液中hG-CSF的水平明显增高。

在经 LPS 诱导的单核细胞中 hG-CSFmRNA 的含量并不很多,检测它比较困难。但将 hG-CSFmRNA 经 RT-PCR 方法转变为 hG-CSFcDNA 并扩增后,它的量增加了百万倍,因此可用普通电泳法检测,无需用同位素标记的探针进行杂交。我们用该方法对 LPS 诱导 4 小时和 12 小时的单核细胞内 hG-CSFmRNA 进行逆转录并扩增,均可得到特异性扩增条带,即 hG-CSFcDNA。用光敏生物素标记的特异性探针与这扩增条带杂交呈阳性反应。说明 LPS 体外诱导人单核细胞的确可产生 hG-CSFmRNA,但 hG-CSFmRNA 产生的量与诱导时间有关。

摘 要

用聚蔗糖-泛影葡胺分离液从正常人新鲜抗凝的外周血中分离出单核细胞。在组织培养条件下以大肠杆菌脂多糖(LPS)诱导单核细胞,使其产生人粒细胞集落刺激因子(hG-CSF)mRNA 和 hG-CSF。不同时间取出经诱导的细胞和培养上清液,分别用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)方法和双单克隆抗体 ELISA 夹心法检测细胞的转录产物和表达产物。结果表明:加入 LPS 后的第 4 到第 12 小时单核细胞内有显著量 hG-CSFmRNA,24 小时后测不出

该 mRNA。培养液中从第 12 小时开始出现 hG-CSF,第 24 小时达到高峰,并持续到 48 小时仍有明显活性。这说明 LPS 可在体外诱导人单核细胞产生 hG-CSF 及其 mRNA。

参 考 文 献

- [1] Metcalf, D. 1986, *Blood*, 67: 257.
- [2] Metcalf, D., 1985, *Science*, 229: 16.
- [3] Welte, K. et al., 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 82: 1526.
- [4] Okabe, T. et al., 1982, *J. Cell. Physiol.*, 110: 43.
- [5] Nagata, S. et al., 1986, *EMBO. J.*, 5: 575.
- [6] Souza, L M. et al., 1986, *Science*, 232: 61.
- [7] Ishizaka, Y. et al., 1986, *Exp. Hematol.*, 14: 1.
- [8] Lionel, P. et al., 1983, *Int. Archs. Allergy Appl. Immun.*, 72: 336.
- [9] Chomczynski, P. et al., 1987, *Anal. Biochem.*, 162: 156.
- [10] 朱圣庚, 1992, PCR 基因扩增实验操作手册(朱平主编), p 41, 中国科学技术出版社, 北京.
- [11] 李太生等, 1992, 中华医学杂志, 72: 224.
- [12] Vellenga, E. et al., 1988, *Blood*, 71: 1529.
- [13] Seelentay, W. et al., 1989, *Eur. J. Immunol.* 19: 209.

MNNG 诱导转化的人胎儿皮肤成纤维细胞系的建立

张文庚 徐刚 王艳萍 陈晓未

(华西医科大学肿瘤研究所 成都 610041)

人体细胞体外转化在检测可疑致癌物、研究人类肿瘤的发生与发展机制等方面具有重要意义。然而,由于人体细胞能快速而有效地修复 DNA 损伤,因此其转化较啮齿动物细胞困难^[1,2]。苏兆众等^[3]用紫外线和乙基亚硝基脲先后处理离体培养的正常人胎儿胃成纤维细胞(Fibroblasts, FB),建立了能长久传代的 GST 8502 细胞系。但单独用化学致癌剂处理正常

人 FB, 成功诱导转化并建立细胞系,国内尚未见报道,国外仅见 Namba^[4]和其同事 Bai^[5]的报道。本实验用 N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基脲(MNNG)成功地诱导了人胎儿皮肤 FB 的转化,并建立了可长期传代的细胞系——HFT 89。

材 料 和 方 法

一、细胞培养