

- [5] Zhou C. ane H. Y. Yang, 1985, *Planta*. 165: 225—231.
 [6] 胡适宜、李乐工、朱 激, 1985, *植物学报*, 27: 337—344.

- [7] 李乐工、胡适宜, 1986, *实验生物学报*, 19: 255—259.
 [8] Mol R, 1986, *Plant Cell Reports*. 3: 202—206.

白细胞介素的检测

劳 红 刘国良

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

白细胞介素(Interleukins, 简称 ILs)是一类在淋巴细胞间传递信息, 刺激淋巴细胞或其它前体细胞增殖分化的介质, 主要来源于白细胞。

到目前为止, 正式命名的白细胞介素有四类, 分别为白细胞介素-1(IL-1)、白细胞介素-2(IL-2)、白细胞介素-3(IL-3)以及由第六届国际免疫学会定名的 T 细胞来源的有关 B 细胞增殖分化的因子——白细胞介素-4(IL-4)^[1]。

随着白细胞介素研究工作的日趋深入, 其相应的检测手段则显得愈为重要, 且在不断地完善和提高。现将其简介如下:

一、白细胞介素-1 的检测

IL-1 的来源较为广泛, 主要由活化巨噬细胞分泌。在体外, 它能直接杀伤某些肿瘤细胞, 同时还能增强单核细胞、NK 细胞、细胞毒性 T 细胞的肿瘤杀伤活性, 诱导 T 细胞分泌 IL-2, 从而引起 T 细胞的增殖, 调节 B 细胞的分化。此外, IL-1 还能作用于其它多种组织细胞, 因而具有广泛的生物学效应^[2]。

IL-1 能单独或与低剂量的致分裂原一起协同刺激胸腺细胞的增殖, 也可刺激某些 T 细胞株释放 IL-2, 从而维持 IL-2 依赖的细胞株的生长。其作用机理是: G_0 期(休止状态) T 细胞在低剂量的致分裂原作用下活化进入 G_1 前期, G_1 前期 T 细胞又在 IL-1 作用下进入 G_1

后期, 同时增加了细胞表面 IL-2 受体的表达以及 IL-2 的分泌, IL-2 再与 T 细胞表面 IL-2 受体相互作用从而使 T 细胞由 G_1 后期进入 S 期, 引起 T 细胞的增殖^[3]。

(一) 胸腺细胞增殖检测^[4]

1. 胸腺细胞悬液的制备

取 6—10 周龄 C_3H/HeJ 小鼠的胸腺, 制备胸腺细胞, 洗涤三次, 用培液将细胞浓度调为 1.5×10^7 细胞/ml, 培液含 5% 小牛血清, 2.5×10^{-5} mol/L-巯基乙醇。

2. Con A 的亚适剂量

在低剂量致分裂原(Con A 等)与 IL-1 协同刺激胸腺细胞增殖检测中, 必须作一 Con A 剂量曲线, 观察其对胸腺细胞增殖影响, 从而选取 Con A 作用的亚适剂量, 即能够激活胸腺细胞但不引起它明显增殖的 Con A 浓度。

取 96 孔微量细胞培养板, 在小孔中加入 100 μ l Con A, 最终浓度分别为 0.5 μ g/ml, 1 μ g/ml, 2 μ g/ml, 5 μ g/ml, 10 μ g/ml, 复孔三个, 并不加 Con A 的培液作对照, 随后于上述各孔内加入 100 μ l 的胸腺细胞(1.5×10^6), 37°C , 5% CO_2 温育 72 小时, 收获前 12 小时每孔加入 50 μ l 0.5 μ Ci 的 $^3\text{H-TdR}$, 到时用半自动微量细胞收集仪收集细胞于玻璃纤维滤纸上, 用液闪计数器测定 $^3\text{H-TdR}$ 掺入量。数据(CPM)以三个复孔的平均值士标准差表示, 据此选择 Con A 作用的亚适剂量, 通常为 0.5 μ g—1.0 μ g/ml。

3. 样品检测

96 孔微量细胞培养板的培养小孔内加入 100 μ l 的胸腺细胞(1.5×10^6), 50 μ l 亚适剂量的 Con A, 50 μ l 各种稀释度的待测样品, 总体积 200 μ l, 同时以单独

加胸腺细胞以及胸腺细胞加亚适剂量的 Con A 作对照, 37°C, 5%CO₂ 中温育 60 小时, 加入 50μl, 0.5 μCi 的 ³H-TdR 继续温育 12 小时, 同上收集细胞和测定掺入量。

应用胸腺细胞来检测 IL-1 时有一点要注意, 即一般小鼠的胸腺细胞对 IL-1 诱导物如 LPS, PMA 等, 以及某些致分裂的胸腺抽提物均有反应, 因而缺乏特异性。为此, 在检测时必须附加这些制品的对照。如有条件最好采用对 LPS, PMA 无反应的 C₃H/HeJ 小鼠的胸腺细胞。

(二) IL-2 依赖的细胞株的增殖检测^[5]

将小鼠 T 淋巴细胞株 LBRM-33 用丝裂霉素-C (50 μg/ml), 37°C 处理 1 小时, 洗涤后取 100 μl (5 × 10⁴ 细胞) 加入到 96 孔细胞培养板小孔内, 同时加入 50 μl 0.1% PHA, 50 μl 各种稀释度的待测样品以及 50 μl CTLL-2 (8 × 10³ 细胞), 总体积 250 μl, 并附加培养液对照, 培养 20 小时, 随后加入 50 μl 0.5 μCi ³H-TdR, 继续培养 4 小时, 同上收集细胞和测定同位素掺入。这个测定的原理是 IL-1 刺激 LBRM-33 分泌 IL-2, IL-2 又诱导 CTLL-2 细胞株增殖, 从而间接检测了样品中 IL-1。

E 类前列腺素在 IL-1 检测中有抑制效应, 因而人们往往经过透析或上亲和层析柱, 也有在诱导 IL-1 的过程中加入前列腺素合成抑制剂来防止前列腺素的产生。

二、白细胞介素-2 的检测

IL-2 来源于活化的 T 细胞, 能维持 T 细胞和 NK 细胞的生长, 增强 NK 细胞和 LAK 细胞的肿瘤杀伤活性, 刺激 T、B 淋巴细胞分泌多种淋巴因子^[6]。

(一) 脾脏细胞增殖检测^[7]

1. 摘取小鼠脾脏, 分离脾脏细胞, 以 0.5-1 × 10⁷ 细胞/ml 浓度悬浮于内含 5% 小牛血清, 5 × 10⁻⁵ mol/L 2-巯基乙醇, 2.5 μg/ml 的 Con A 的培养液中培养 48 小时。

2. 600 g 离心 7 分钟后倾去上清液, 加入 0.05 mol/L α-甲基甘露糖 40°C 温育 15 分钟, 以除去细胞表面残留的 Con A。随后用 Hanks' 液洗涤细胞, Percoll 梯度分离纯化激活的淋巴母细胞。

3. Hanks' 洗涤淋巴母细胞, 校正细胞浓度为 2 × 10⁶ 细胞/ml, 培养液含 10% 小牛血清, 5 × 10⁻⁵ mol/L 2-巯基乙醇, 0.1 mol/L 甲基甘露糖。

4. 取 100 μl (2 × 10⁵ 细胞) 加入到 96 孔微量细胞培养板小孔内, 同时加入 100 μl (i) 各种稀释度的待测样品; (ii) 培养对照; (iii) 各种浓度的标准品对照, 总体积 200 μl, 于 37°C, 5%CO₂ 温育 18 小时后, 加入 50 μl 0.5 μCi ³H-TdR 培养 4-6 小时, 收获细胞, 计数 ³H-TdR 掺入量。

(二) IL-2 依赖的细胞株增殖检测^[8]

1. 检测前将 IL-2 依赖细胞株 CTLL-2 用培养液洗涤多次, 校正细胞浓度为 1 × 10⁵ 细胞/ml, 培养液含 10% 小牛血清, 5 × 10⁻⁵ mol/L 2-巯基乙醇。

2. 各种稀释度的待测样品分别以每孔 100 μl 的量加入到 96 孔培养板小孔内, 附加培养液对照以及各种浓度的标准品对照, 再在上述各孔内加入 100 μl CTLL-2 细胞 (1 × 10⁴), 温育 18 小时后, 加入 50 μl 0.5 μCi ³H-TdR 继续培养 4-6 小时, 收集细胞检测 ³H-TdR 掺入。

三、白细胞介素-3 的检测

IL-3 是多集落刺激因子, 可由凝集素活化的辅助性 T 细胞产生。IL-3 能刺激多种造血干细胞集落的形成, 维持干细胞的生长、分裂、分化, 并诱导 20 α 羟基类固醇脱氢酶的分泌^[9,10]。

(一) 细胞增殖检测

1. 集落形成检测^[11]

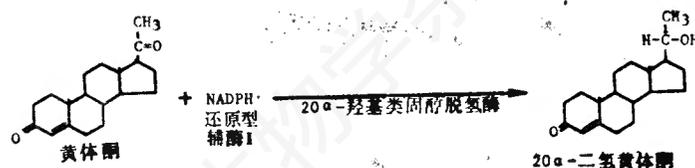
小鼠骨髓细胞与 0.1% 甲基纤维素, 15% 小牛血清, 10% 牛血清白蛋白, 5 × 10⁻⁵ mol/L 2-巯基乙醇, 100 单位青霉素/ml, 100 微克的链霉素/ml 的培养液混合, 各取 1 ml (3.5 × 10⁵ 细胞) 铺展于含 25 μl 待测样品以及培养液对照的细胞培养板上 (35 × 10 mm), 于 37°C, 5%CO₂ 中温育 7 天, 计算细胞集落形成数。其结果以实验组减去对照组后的平均值 ± 标准差表示。

2. IL-3 依赖的细胞株的增殖检测^[12]

检测前 IL-3 依赖的细胞株 (FDC-P₁ 等), 用培养液洗涤多次, 制备成 10⁵-10⁶/ml 的细胞悬液, 以每孔 100 μl 的量加入到 96 孔微量细胞培养板小孔内, 随后分别加入 100 μl 的各种稀释度的待测样品, 设培养液对照以及标准品对照, 总体积为 200 μl, 温育 18-24 小时, 然后加入 50 μl 0.5-1.0 μCi 的 ³H-TdR, 继续培养 3-4 小时, 并计数 ³H-TdR 掺入量。

(二) 20 α 羟基类固醇脱氢酶的诱导检测^[10,13]

1. 20 α 羟基类固醇脱氢酶的作用机理:



2. 取4周龄的裸鼠或BALB/C小鼠脾脏,制成 6×10^6 细胞/ml悬液,培养于含10%小牛血清的培养液中。随后以1:1的比例与待测样品混合,培养24小时,到时离心并取一定量的细胞置于0.01 mol/L PBS (pH 7); 1.0 mmol/L $MgCl_2$ 中,二次超声破碎(15秒一次),随后20000 g离心30分钟,并取上清液中的细胞抽提物100 μ l与100 μ l的 3H -黄体酮(10^{-6} mol/L),200 μ l的NADPH再生系统(0.1 mmol/L NADP, 1 mmol/L 6-磷酸葡萄糖, 0.15单位的6-磷酸葡萄糖脱氢酶)混合温育60分钟。终止反应加入含黄体酮载体的乙醚和20 α -二氢黄体酮,涡漩振荡器上充分混匀后水相用液氮冷冻,醚相轻轻倒入圆锥形玻管,并在微风吹拂下使乙醚挥发,随后加入20 μ l的乙醇重新溶解,在硅胶薄层层析板上进行薄层层析。展层溶剂系统是乙醚:氯仿=3:10。层析完毕后在紫外灯下观察到黄体酮和20 α -二氢黄体酮二个点,随后取出置于闪烁液中检测放射性。据此推算出转化为20 α -二氢黄体酮的Pmole数。实验数据以(实验组-对照组)Pmoles/hr/ 10^8 细胞表示。

通常用裸鼠细胞作为检测细胞较好,因为其细胞20 α -羟基类固醇脱氢酶活性很低,所以本底也较低。

四、白细胞介素-4的检测

IL-4是一类T细胞来源的刺激B细胞生长分化的淋巴因子。以往,人们根据其不同的生物学活性分别命名为B细胞刺激因子-1, B细胞分化因子-r, B细胞生长因子-1以及IgG₁诱导因子^[1]。

(一) B细胞的增殖检测^[14,15]

1. 取8—10周龄的BALB/C小鼠,无菌条件下取出脾脏,制备脾脏细胞,随后过Sephadex G-10柱去除粘附细胞^[16]。

2. 调整细胞浓度至 5×10^7 细胞/ml,加入1/100稀释度的抗Thy-1.2单克隆抗体,4 $^{\circ}C$,温育20分钟(重复处理一次),接着用1/4稀释度的豚鼠血清,于37 $^{\circ}C$ 条件下继续处理30分钟,以除去T细胞。

3. 经上述过程纯化所得的B细胞以每孔 1×10^5 个细胞(100 μ l)的量加入到96孔微量细胞培养板中,

同时加入50 μ l亚适剂量的活化剂(抗IgM抗血清的F(ab')₂片断,50 μ l的待测样品,总体积为200 μ l。同时设培养液对照以及活化剂对照,于37 $^{\circ}C$,5%CO₂中温育72小时。终止温育前16小时,各孔加入1 μ Ci的 3H -TdR(50 μ l),16小时后计数 3H -TdR掺入量。

摘 要

白细胞介素(Interleukins, 简称ILs)是一类在淋巴细胞间传递信息,刺激淋巴细胞或其它前体细胞增殖分化的介质。现已正式命名的有四类,分别为IL-1, IL-2, IL-3以及IL-4。它们在整个免疫系统的分子调节中起着重要的作用,维持了机体的稳定。因而白细胞介素是当代免疫学研究中一个十分活跃的领域,而要广泛而深入地开展这一领域的研究工作,离不开灵敏、可行的检测方法的运用。为此,本文对这四类介素的检测方法作了较为详尽的介绍。

参 考 文 献

- [1] Smith, K. A., 1986, *Immunol. Today.*, 7 (11): 321.
- [2] Oppenheim, J. J., 1986, *Immunol. Today.*, 7: 45-56.
- [3] Oppenheim, J. J., 1982, *Immunol. Today.*, 3: 113-119.
- [4] Mizel, S. B., 1981, *Manual Of Macrophage Methodology.*, pp. 407-416.
- [5] Conlon, P. J., 1983, *J. Immunol.*, 131: 1280-1282.
- [6] Robb, R. J., 1984, *Immunol. Today.*, 5: 203-209.
- [7] Kromer, G., 1984, *J. Immunol. Methods.*, 73: 273-281.
- [8] Kaieda, T., 1982, *J. Immunol.*, 129: 46-51.
- [9] Nicola, N. A., 1984, *Immunol. Today.*, 5: 76-81.
- [10] Ihle, J. N., 1982a, *Immunol. Rev.*, 63: 5-32.

- [11] Klimpel, G. R., 1982, *J. Immunol.*, 129: 76-80.
- [12] Palacios, R., 1984, *Proc. Natl. Acad. USA.*, 81: 1208-1211.
- [13] Pepersack, L., 1980, *J. Immunol.*, 124: 279-285.
- [14] Ohara, J., 1985, *J. Immunol.*, 135: 2518-2523.
- [15] Howard, M., *J. Exp. Med.*, 155: 914-923.
- [16] Benjamin, W. R., 1985, *Investigation Of Cell-mediated Immunity* pp. 165-172.

体外培养心肌细胞的纯化方法及其应用

孙 红

(中国中医研究院西苑医院基础研究室)

心肌组织由多种细胞构成,在体外培养的特殊环境中,这些不同种类的细胞在形态、功能及分裂速度等许多方面都有很大差别。我室自1978年建立体外培养心肌细胞方法并用于中医药研究获得成功^[1],体外培养的心肌细胞已应用于许多研究领域。目前国内大部分的实验报道均用混合培养的心肌细胞,给心肌细胞代谢、心肌细胞药理、病理及细胞生物学等方面的问题的分析和研究带来很大干扰,因此分离去除其它细胞,而保留心肌细胞并维持其正常生长及生理功能,对于深入细致的研究有着重要的意义,是当前国内外该项研究中颇为重视的一个问题。

体外培养的心肌细胞中通常存在两类细胞:心肌细胞(myocardial cells,简称M细胞)和成纤维样细胞(fibroblast-like cells,简称F细胞)。后者主要来自心脏组织中的内皮细胞、心内膜细胞、血管平滑肌细胞等,又称之为间质细胞(mesenchymal cells)^[2,3]。培养的M细胞具有以下生物学特征:(1)原代培养的细胞大多具有收缩功能,在适宜条件下可自发地搏动;(2)含糖原和肌原纤维;(3)有较长的有丝分裂期和传代时间;(4)贴附培养器皿表面较慢,而F细胞的特征相反^[4]。新生动物心肌M细胞和F细胞在培养前其数量的比值约为6:4,由于F细胞增殖迅速,培养3—5天后在

本文得到李连达和李映欧老师指导,谨致谢意。

数目上可大大超过M细胞^[5],占有很大的培养面积,对M细胞的生长及收缩功能有很大影响^[6,7],对于观察M细胞的形态、功能及代谢也带来一定困难,因此介绍国外常用的几种纯化分离M细胞的方法,可供我们参考和借鉴。

一、差速贴壁分离法

差速贴壁分离法(Differential Attachment Technique)的原理即根据心肌M细胞和F细胞在培养器皿表面贴壁生长的速度不同而进行分离的方法。用胰蛋白酶消化心肌组织所得的混合细胞悬液,接种在适当大小的培养瓶中,37℃静置90分钟,轻轻振摇后倾出尚未贴壁的M细胞,重新接种,可得纯度大于95%的M细胞,而原培养瓶中的贴壁细胞几乎全部均为F细胞^[5]。显微镜下观察,刚接种的M细胞呈圆形,而F细胞呈短棒状。也有报道用此法得M细胞95%,而F细胞93%^[7]。所取贴壁的时间各有不同,短至20分钟^[8],长至3小时^[9,10],通常以60—90分钟多用^[6,10],实验操作也略有差异,有直接倾出,也有振摇、旋转、平皿翻转等不同方法,这些对细胞分离纯度都有很大影响。另外,动物的年龄、细胞接种量及操作熟练程度等对控制各类细胞数也有很大关系。差速贴壁分离法具有操作简便、用时短、对细胞影响小、分离纯度高等优点,国外有关实验室大多采用该方法。Wenzel等人发现,纯化后培养的M细胞较混合培养的搏动