

技术与方法

高灵敏白介素 6 放射免疫分析的建立及初步应用*

颜光涛 郝秀华 王录焕

(解放军总医院基础医学研究所生物化学研究室, 北京 100853)

摘要 用人工重组的白介素 6 (IL-6) 多次免疫兔和豚鼠, 获取高效价的 IL-6 抗体. 用氯胺 T 法制备¹²⁵I 标记 IL-6, 经 Sephadex G-25 纯化, 抗原抗体反应采用平衡一步法, 4℃温育 24 h 后经 PR 试剂分离结合和游离的标记抗原. 该法测定范围 0.1~3.2 μg/L 最低检出量为 0.1 μg/L, 批内和批间误差分别小于 6.4% 和 10%. 健康男性 115 例血清 IL-6 含量为 (0.27±0.13) μg/L. 女性 101 例血清 IL-6 为 (0.26±0.10) μg/L. 男女无差异. 此外, 用该法检测兔失血性休克再灌注损伤后 24 h 血清 IL-6 水平明显升高. 失血性休克大鼠淋巴液中 IL-6 水平明显上升, 经山莨菪碱 (1 mg/kg) 治疗休克后 IL-6 又明显下降. 内毒素同人牙周纤维细胞共同培养不同时间也促进 IL-6 释放并明显高于对照水平.

关键词 白介素 6, 放射免疫分析, 内毒素, 失血性休克

学科分类号 R392-33

白介素 6 (interleukin-6, IL-6) 是一种主要来源于单核-巨噬细胞的多功能细胞因子, 是由 212 个氨基酸构成的糖蛋白. 现已阐明 IL-6 在机体的应激状态、炎症反应和抗感染防御机制中有重要作用^[1,2]. 还同心肌粘液瘤、多发性骨髓瘤以及很多自身免疫性疾病的发生和转归相关^[3,4]. 我们率先于国内开始了 IL-6 放射免疫分析技术, 并应用于人和某些动物的研究, 取得良好的结果.

1 材料和方法

1.1 材料

免疫用大耳白兔 (1.4 kg) 和豚鼠各 3 只 (0.5 kg), 实验用大耳白兔 52 只 (2.5 kg), 均为中国科学院动物研究所提供. SD 大鼠 60 只, 为本院动物中心提供. 人重组 IL-6 为北京医科大学分子免疫室提供. 福氏完全佐剂和不完全佐剂为 GIBCORL 产品. 脂多糖 (LPS)、IL-1、IL-8、肿瘤坏死因子 α (TNFα)、IL-2、促红细胞生成素 (EPO)、粒细胞巨噬细胞-克隆刺激因子 (GM-CSF) 均为 Sigma 产品. ¹²⁵I 标记物由中国原子能研究院提供. 其他试剂均为国产分析纯.

1.2 抗血清制备

将纯化的 IL-6 420 μg 同 3 ml 福氏完全佐剂充分混匀后, 免疫 3 只大耳白兔. 另取 60 μg IL-6 和

2.1 ml 福氏完全佐剂充分混匀后, 免疫 3 只豚鼠. 每月一次, 兔和豚鼠分别免疫 4 次, 加强免疫后第 7 天, 放血分离血清保存于 -20℃^[5,6].

1.3 抗原的标记

将 2.5 μg IL-6 溶于 0.2 mol/L pH 7.5 磷酸缓冲液 30 μl 中, 加入 Na¹²⁵I 3.7×10⁷ Bq, 立即加入氯胺-T 10 μg (10 μl), 混匀反应 30 s 后加入偏重亚硫酸钠 20 μg (20 μl) 终止反应; 将所有反应体积加至用上述缓冲液平衡的 Sephadex G-25 凝胶柱, 用 0.1 mol/L pH 7.4 磷酸缓冲液淋洗, 1 ml 收集 1 管, 同抗体反应后, 取结合率高而非特异结合低的管作为标记 IL-6, 经 3% BSA 倍比稀释后分装保存于 -20℃^[5,6].

1.4 放射免疫分析

将标准 IL-6 (0.1、0.2、0.4、0.8、1.6 和 3.2 μg/L) 或待测样品 100 μl, 同兔抗血清或豚鼠抗血清 100 μl, 以及标记 IL-6 100 μl (cpm 值为 20 000), 混匀后, 于 4℃放置 24 h, 加 PR 试剂 (第二抗体和聚乙二醇的混合剂) 500 μl, 混匀后置 4℃15 min, 经 3 500 r/min, 离心 15 min, 弃上清, 测定沉淀的放射性, 经放免分析专用软件处理

* 国家自然科学基金资助项目 (39770716).

Tel: (010) 68131451, 66935272, E-mail: yangtpla@public.bta.net.cn

收稿日期: 1999-08-13, 修回日期: 1999-12-27

和计算各点结合率 ($B/B_0 \times 100\%$), 绘制标准曲线并给出样品的浓度^[5,6].

1.5 正常人血清的分离

空腹取正常人体检者男 115 例、女 101 例的静脉血, 并分离血清, -20℃ 贮存待测.

1.6 兔失血性休克再灌注复苏后血清样品的制备

经无菌分离动脉放血造成失血休克 60 min, 再灌注所放出的抗凝血液和平衡液, 造成失血性休克再灌注损伤. 分别取损伤后 30 min、2 h、6 h 和 24 h 各时间点动物血清和伤前自身血清. 贮存待测^[7].

1.7 大鼠失血性休克后淋巴液的制备

SD 大鼠无菌分离颈动脉并插管放血至血压为 5332.88 Pa. 经乳糜池插管引流收集淋巴液, 离心取上清-20℃ 贮存待测^[8].

1.8 牙周纤维细胞培养上清样品制备

无菌分离牙周纤维组织, 经传代培养后, 取细胞 10^6 /ml 加入 10 μg LPS, 经 37℃ 培养 8 h 及 24 h 分别收集贮存待检.

2 结 果

2.1 标准曲线和抗体滴度

在免疫的 6 只动物中, 有 1 只兔 IL-6 抗血清工作稀释度为 1:14 000, 而有 1 只豚鼠抗血清为 1:40 000, 反应液最终滴度则分别达到 1:42 000 和 1:210 000, 表明我们所获抗体具有很强的 IL-6 亲和力. 在 IL-6 为 0.1~3.2 μg/L 之间, 两种不同的抗血清均能获得良好的结合曲线, 如图 1 所示.

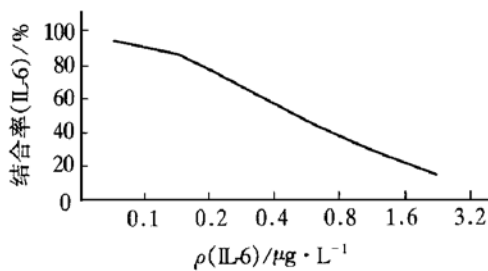


图 1 IL-6 放免分析竞争抑制曲线

2.2 灵敏度和精密度

按 $B_0 \pm 2S$ 计算, 最小可测值为 0.1 μg/L. 血清样品批内 CV 为 6.4% ($n=5$), 批间 CV 为小于 10% ($n=5$).

2.3 特异性和准确性

两种抗血清与 IL-2、TNFα、GM-CSF 和 IL-8 在 25~200 μg/L 范围内均无交叉反应. 在每毫升

血清中加入高中低三种浓度的 IL-6 标准后, 回收率为 95%~106%. 取 IL-6 含量较高的血清, 作 1/2~1/32 倍比稀释, 测定结果和倍数之间有良好的线性关系.

2.4 正常人血清中 IL-6 水平

健康人男性 115 例, 女性 101 例, 血清 IL-6 水平为 (0.27 ± 0.13) μg/L 和 (0.26 ± 0.10) μg/L, 男女无差异. 10% EDTA 抗凝血浆 41 例正常人 IL-6 为 (0.29 ± 0.03) μg/L, 与血清值比较无差异.

2.5 兔失血性休克再灌注后血清中 IL-6 水平

同伤前自身对照血清比较, 兔失血性休克再灌注复苏后 30 min 和 2 h 血清 IL-6 明显降低, 而 24 h IL-6 显著升高, 如表 1 所示.

表 1 兔失血性休克再灌注复苏后 24 h 内血清 IL-6 的变化

	例数	$\rho(\text{血清 IL-6}) / \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	T 值
损伤前	52	0.297 ± 0.132	
再灌注后 30 min	52	0.252 ± 0.018	-2.11, $P < 0.05$
再灌注后 2 h	51	0.232 ± 0.092	-2.894, $P < 0.01$
再灌注后 6 h	46	0.357 ± 0.509	0.820, $P > 0.05$
再灌注后 24 h	41	0.685 ± 0.854	3.232, $P < 0.01$

同损伤前自身对照比较.

2.6 大鼠失血性休克后淋巴液中 IL-6 测定

大鼠失血性休克后 1、2、3 h, 淋巴液中 IL-6 水平较对照明显上升, 以 1 mg/kg 体重的用量给与山莨菪碱治疗后 IL-6 水平恢复至对照水平. 如表 2 所示.

表 2 大鼠失血性休克后淋巴液中 IL-6 水平的变化

	例数	$\rho(\text{淋巴液 IL-6}) / \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	T 值
正常对照	11	0.60 ± 0.40	
休克后 1 h	13	1.08 ± 0.21	3.766, $P < 0.01$
休克后 2 h	10	1.10 ± 0.11	3.816, $P < 0.01$
休克后 3 h	10	0.96 ± 0.24	2.468, $P < 0.05$
山莨菪碱治疗	10	0.52 ± 0.25	

2.7 牙周纤维细胞培养上清中 IL-6 的测定

人牙周纤维细胞经传代培养后在体外同 LPS 共同培养 8 h 和 24 h, 上清液中 IL-6 水平明显上升. 如图 2 所示.

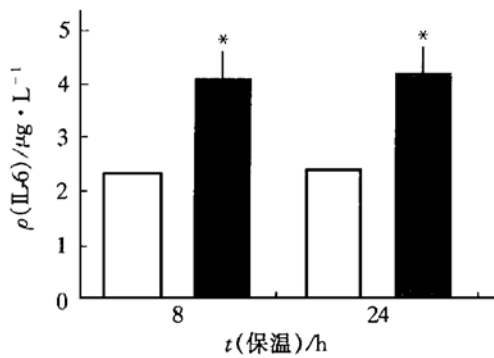


图2 牙周纤维细胞同 LPS (1 mg/L) 共同培养不同时间后 IL-6 水平
同对照比较 $P^* < 0.01$.

3 讨 论

白介素 6 是一种来源广泛的多功能细胞因子, 正常情况下在血液和组织内含量很低. 生物、理化因素诱导活化的单核细胞、巨噬细胞、内皮细胞、表皮细胞、星形胶质细胞、成纤维细胞以及受 IL-1、IL-2 激活的 T、B 淋巴细胞均能释放多量 IL-6^[1,3]. 研究证实, 损伤引起的内毒素血症导致血液中 IL-6 明显上升, 但体外给予适量的 IL-6 抗体并不能产生有效的保护作用^[9]. 反而, 在动物实验中给予 IL-6 对 LPS 造成的脓毒性休克有保护作用, 显示 IL-6 在急性损伤中是一种保护因子^[10]. 由于急性感染时 IL-6 在血清中先于 C 反应蛋白出现, 发达国家正逐步采用检测血中 IL-6 来观察病人尤其是新生儿感染^[3].

为满足日益增多的研究和临床需要, 我们用氯胺 T 法标记 IL-6, 建立了 IL-6 的放射免疫分析方法. 经过摸索, 以平衡法、4℃温育 24 h, 可获得良好的实验结果. 碘标记抗原在冷冻干燥后于室温能保持 2 个月. 标准物和抗体冻干后在室温下可放置半年, 于 -20℃下放置二年能保持良好的曲线形态. 另外, 测定兔血清 IL-6 时, 用兔 IL-6 抗血清作一抗, 用羊抗兔 IgG 作二抗, 会造成二抗同兔血清中 IgG 的结合而影响曲线形态, 导致测定值过低. 采用 25% PEG 做分离剂, 非特异结合高达 20% 以上, 不适宜进行 IL-6 分析. 因此, 在兔失血性休克再灌注损伤模型中, 我们采用豚鼠抗 IL-6 抗体作一抗, 而用羊抗豚鼠的 IgG 抗体作二抗, 加入 15% 的 PEG 混匀作为分离剂, 获良好结果.

为验证该方法的可靠性, 我们分别在人血清、兔血清、大鼠淋巴液和纤维细胞培养上清中进行了 IL-6 的测定. 结果发现男女正常人血清中 IL-6 的

含量同国外比较很相近^[5]. 男女之间无差异, 而且无需进行 EDTA 抗凝, 直接测定血清即可. 兔血清样品则采用豚鼠抗 IL-6 抗体, 同自身对照比较, 兔失血性休克再灌注后 30 min 和 2 h 血清 IL-6 明显降低, 24 h 后血清中 IL-6 又明显高于伤前, 而在大鼠失血性休克后淋巴液中 IL-6 的变化最典型, 1、2、3 h 均高于对照组. 用山莨菪碱抗休克后 IL-6 恢复于正常水平. 人牙外周纤维细胞体外培养加入 LPS 不同时间也显示上清液中 IL-6 有显著的增高. 以上结果表明该法能用于不同种属的血清、淋巴液和细胞培养上清中 IL-6 的测定, 为临床和科研开展 IL-6 的研究工作提供了一种可靠的手段.

参 考 文 献

- Hirano T, Akira S, Taga T, *et al.* Biological and clinical aspects of interleukin 6. *Immunol Today*, 1990, **11** (12): 443~449
- Kozak W, Kluger M J, Soszynski D, *et al.* IL-6 and IL-1 in fever: studies using cytokine deficient (knockout) mice. *Ann NY Acad Sci*, 1998, **856**: 33~47
- Tadamitsu K, Shizuo A, Tetsuya T, *et al.* Interleukin 6 and its preceptor: A paradigm for cytokines. *Science in Japan*, 1992, **258**: 593~597
- Samoilova E B, Horton J L, Hilliard B, *et al.* IL-6 deficient mice are resistant to experimental autoimmune encephalomyelitis: roles of IL-6 in the activation and differentiation of autoreactive T cells. *J Immunol*, 1998, **161** (12): 6480~6486
- Jane V P, John J R, Julie A K, *et al.* A simple and rapid radioimmunoassay for human interleukin 6. *J Immunol Methods*, 1992, **148** (1~2): 23~28
- 郝秀华, 颜光涛, 奚永志, 等. 红细胞生成素放射免疫分析方法的建立及初临床应用. *中华血液学杂志*, 1998, **19** (6): 326~327
- Hao X H, Yan G T, Xie Y Z, *et al.* *Chin J Hematology*, 1998, **19** (6): 326~327
- 颜光涛, 郝秀华, 王录焕, 等. 失血性休克再灌注复苏后血浆降钙素基因相关肽的变化. *中国危重病急救医学*, 1996, **8** (10): 582~584
- Yan G T, Hao X H, Wang L H, *et al.* *Chinese Critical Care Medicine*, 1996, **8** (10): 582~584
- 李玉珍, 刘育英, 赵秀梅, 等. 失血性休克大鼠淋巴液中 TNF 和 IL-6 水平的变化及山莨菪碱的作用. *军医进修学院学报*, 1999, **20** (1): 19~20
- Li Y Z, Liu Y Y, Zhao X M, *et al.* *Acad J PLA Postgrad Med Sch*, 1999, **20** (1): 19~20
- Chee W X, Edward A H, Francis G, *et al.* Interleukin-6 production in a murine model of pneumocystis carinii pneumonia: relation to resistance and inflammatory response. *Infection and Immunity*, 1993, **61** (1): 97~102
- Barton B E, Jackson J V. Protective role of interleukin 6 in the lipopolysaccharide galactosamine septic shock model. *Infection and Immunity*, 1993, **61** (4): 1496~1499

The Establishment and Primary Application of High Sensitive Interleukin-6 Radioimmunoassay. YAN Guang-Tao, HAO Xiur-Hua, WANG Lu-Huan (Research Laboratory of Biochemistry, Basic Medical Institute, General Hospital of PLA, Beijing 100853, China).

Abstract The high effective antibody of interleukin-6 was obtained by immunizing rabbits and guinea pigs with recombinant IL-6 many times. The IL-6 was labeled by ^{125}I with chloramines-T methods and purified by the Sephadex-G25 chromatograph column. The reaction between antigen and antibody was carried out by one step balance method and incubated in $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 24 hours, then separated bond and free antigen by PR reagent. The detection range of this method was about $0.1\sim 3.2\ \mu\text{g/L}$, the lowest detection level was $0.1\ \mu\text{g/L}$, error within batches

and between batches was less than 6.4% and 10% respectively. The serum IL-6 concentration in normal male was $(0.270\pm 0.13)\ \mu\text{g/L}$ ($n=115$), and in female was $(0.260\pm 0.10)\ \mu\text{g/L}$ ($n=101$), there was no difference in male and female group. Otherwise, the level of IL-6 in serum of rabbits was significantly higher than that of self-control at 24 hours after hemorrhagic shock and reperfusion. IL-6 in lymph fluid of rat after hemorrhagic shock was significantly elevated, then it was descended by the treatment of anisodamime ($1\ \text{mg/kg}$). The liberation of IL-6 also was promoted and obviously higher than that of the control when fibre cells around tooth were cultured with endotoxin ($10\ \text{mg/L}$) at different time *in vitro*.

Key words interleukin-6, radioimmunoassay, endotoxin, hemorrhagic shock

亲和层析法分离纯化猪肺血管紧张素转换酶*

刘宏 陈兰英¹⁾

(中国医学科学院心血管病研究所, 北京 100037)
(中国协和医科大学阜外心血管病医院)

摘要 亲和层析法实验以双环氧化物 1, 4-丁二醇-2-缩水甘油醚 (1, 4-butanediol diglycidyl ether) 为活化体及连接臂, 在硼氢化钠 (NaBH) 存在的碱性条件下, 将载体 Sepharose CL4B 与雷诺普利 (lisinopril) 共价连接在一起, 成功合成亲和层析胶, 并利用亲和层析胶对猪肺血管紧张素转换酶 (angiotensin converting enzyme, ACE) 进行分离提纯. 猪肺组织匀浆经 $1.6\sim 2.6\ \text{mol/L}$ 硫酸铵分级沉淀、透析平衡、亲和柱分离等步骤, 从 $200\ \text{g}$ 猪肺中提纯得到 $0.79\ \text{mg}$ ACE 蛋白, 酶活力回收 11.9%, 比活力 $38.8\ \text{U/mg}$. 与层析前的酶液比较, 亲和层析一步提纯可达 264 倍; 与肺匀浆液比较提纯达 808 倍. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳可见, 提纯的猪肺 ACE 为一条带, 分子质量约为 $180\ \text{ku}$.

关键词 亲和层析胶制备, 分离纯化, 血管紧张素转换酶

学科分类号 Q503

血管紧张素转换酶 (angiotensin converting enzyme, ACE) 是与细胞膜结合的含锌蛋白酶, 可水解血管紧张素 I (angiotensin I, Ang I) 羧基端二肽, 得到八肽的升压活性物质——血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II), 还可以作用有降压活性的物质——缓激肽 (bradykinin, BK), 切去其羧基端二肽使之失活, ACE 的这些性质使其参与了体内血压调节^[1]. 目前各种 ACE 抑制剂 (ACE inhibitor, ACEI) 类药物在临床治疗中所取得的成

功进一步说明 ACE 在血压调节和高血压发生中起重要作用^[2], 对 ACE 的生化性质、生理功能及其 ACEI 的研究一直是心血管疾病研究中的一个重要方向, 而制备高纯度的 ACE 是开展研究工作的第一步. 本实验室早期采用传统分离提纯方法在国内

* 国家新药研究基金资助项目 (96-901-05-85).

¹⁾ 通讯联系人.

Tel: (010) 68314466-8068, E-mail: lychen@mail.sparkice.com.cn

收稿日期: 1999-09-05, 修回日期: 2000-03-01