

- [3] 毛慧娟, 王笑云, 徐昌芬, 等. 人肾近端小管上皮细胞的原代培养、传代及鉴定方法研究[J]. 南京医科大学学报, 2004, 24(6): 561-564.
- [4] 周世文, 刘世杰. 牛磺酸和茵陈素对顺铂引起的原代培养肾小管上皮细胞内游离 Ca^{2+} 浓度变化的影响[J]. 第三军医大学学报, 2002, 24(1): 84-85.
- [5] 沈青, 姚裕家, 熊英, 等. 新生猪肾近曲小管上皮细胞的体外培养与鉴定[J]. 华西医科大学学报, 2002, 33(3): 440-443.
- [6] Sutterlin GG, Laverty G. Characterization of a primary cell culture model of the avian renal proximal tubule[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 1998, 275(1): R220-R226.
- [7] Anbalagan M, Sriraman V, Rao AJ. Isolation and characterization of Leydig cells from adult bonnet monkeys (*Macaca radiata*): evidence for low steroidogenic capacity in monkey Leydig cells in contrast to rat Leydig cells[J]. J Endocrinol, 2003, 179(2): 175-182.
- [8] Martynova MG, Bystrova OA, Moiseeva OM. The presence of ANP in rat peritoneal mast cells[J]. Cell Res, 2005, 15(10): 811-816.

收稿日期: 2006-01-06 修回日期: 2006-02-27

本文编辑: 程春开

IL-6 对照射小鼠脾淋巴细胞亚群活性的影响*

王红兵¹, 王 绪², 刘永彪², 郝兴芝²

(1. 徐州医学院附属医院肿瘤科, 江苏 徐州 221002; 2. 徐州医学院肿瘤研究所, 江苏 徐州 221006)

摘要: 目的 研究白细胞介素 6(IL-6) 对照射小鼠脾淋巴细胞亚群自然杀伤活性的影响。方法 BALB/C 小鼠分为照射组、对照组和照射+IL-6 组, 采用 Panning 法从小鼠脾淋巴细胞中分离 L_3T_4 、 Lyt_2 和 B 细胞, 用 3H -TdR 释放实验检测脾淋巴细胞亚群自然杀伤活性。结果 照射+IL-6 组与对照组比较, 3H -TdR 释放量有显著性差异 ($P < 0.01$)。结论 IL-6 具有促进照射小鼠脾淋巴细胞亚群活性作用。

关键词: 小鼠; 分次照射; 淋巴细胞; 白细胞介素 6; 自然杀伤活性; K562; S180

中图分类号: R818.05 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-2065(2006)02-0103-03

The effects of IL-6 on the natural killing activity of spleen lymphocyte subsets in irradiated mice

WANG Hong-bing, WANG Xu, LIU Yong-biao, et al

(Department of Oncology, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou, Jiangsu 221002, China)

Abstract: **Objective** To study the effects of IL-6 on the natural killing activity of spleen lymphocyte subsets in irradiated mice. **Methods** The spleen lymphocytes in irradiated mice were separated into L_3T_4 , Lyt_2 and B cells by a panning method. The natural killing activity of spleen lymphocytes was determined by means of 3H -TdR release assay. **Results** Significant differences in 3H -TdR release were found between the IL-6 group and the control group ($P < 0.01$). **Conclusion** IL-6 is able to stimulate the killing activity of spleen lymphocyte subsets in irradiated mice.

Key words: mice; fractional irradiation; lymphocyte; IL-6; natural killing activity; K562; S180

白细胞介素 6(IL-6) 是一种生物活性非常广泛的细胞因子^[1], 可作用于淋巴细胞, 诱导其增殖、分化和生长, 还可以通过增强细胞间识别分子的表达, 诱导肿瘤细胞对效应细胞的杀伤敏感性增强。我们已证实 IL-6 对脾淋巴细胞亚群有辐射保护作用^[2], IL-6 是否同时具备促进脾淋巴细胞亚群免疫活性作用? 我们就此进行了如下实验。

1 材料和方法

1.1 实验动物和肿瘤细胞株 6 周左右的纯品系 BALB/C 雄性小鼠, 体重 (20 ± 2)g, 由中科院上海实验动物中心提供。K562 细胞、S180 细胞由中科院上海细胞所提供。

1.2 方法

* 基金项目: 江苏省教育厅自然科学基金资助项目(98KJD320014)

1.2.1 动物分组及处理 实验小鼠随机分为3组 ($n=6$)。①照射组:只照射。②照射+IL-6组:于放射后30 min尾静脉注射小鼠rIL-6(法国产,苏州大学孔向容博士惠赠)400 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。③对照组:于放射后30 min尾静脉注射白蛋白400 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。

照射方法为西门子直线加速器(Simens, USA)对小鼠全身照射,剂量率1 Gy/min。剂量分割8 Gy/1Gy/8d。

1.2.2 脾淋巴细胞亚群的分离和鉴定 动物处理结束后将各组BALB/C小鼠活杀,无菌条件下取脾脏,立即制备脾细胞悬液,采用Wysocki等建立的Panning直接法^[3]分离淋巴细胞亚群。

用RPMI 1640培养液将脾细胞悬液调成 0.5×10^{10} 个/L,加到无菌培养皿(Corning, USA)中,每皿加5 ml,37°C静置90 min,吸取非贴壁细胞,RPMI 1640洗2次,即为去单核的单个核细胞(mononuclear cell, MNC),备用。

收集贴壁细胞并计数,供亚群细胞培养用。分别加100 μl McAbL3T4(Sigma)、100 μl McAbLyt2(Sigma)于培养皿中,立即加3 ml 0.05 mol/L Tris-HCl缓冲液(pH 9.5),摇匀后置于4°C下90 min,吸弃上清,用0.01 mol/L PBS(pH 7.2)洗3次,再用含1%小牛血清的0.01 mol/L PBS洗1次,并静置10 min来封闭皿的剩余结合位点,最后再用0.01 mol/L PBS洗1次,4°C放置备用。

将分离的MNC按每皿 2×10^7 个细胞加入皿中,4°C放置90 min,洗去非贴壁细胞,加入RPMI 1640培养液,收集黏附细胞即分别得到L3T4和Lyt2细胞。采用间接免疫荧光试验加入羊抗鼠Ig-FITC(华美生物工程公司)和台盼蓝拒染法分别对所获细胞作纯度和存活率鉴定。结果表明,L3T4、Lyt2细胞

的纯度、存活率均在90%以上。

用Panning间接法^[3]分离B细胞,将MNC按 0.5×10^{10} 个/L加5 ml于包被羊抗鼠-Ig(华美生物工程公司)的培养皿中,用荧光二抗同样方法鉴别,纯度在90%以上。台盼蓝拒染法鉴定B细胞存活率在90%以上。

1.2.3 靶细胞处理 取对数生长期的K562、S180细胞3 ml,加入 ^3H -TdR 1.2×10^4 Bq(中国原子能科学院),37°C培养6 h,PBS液洗3次,然后用RPMI 1640培养液配成 1×10^9 个/L细胞悬液,备用。

1.2.4 各亚群的肿瘤杀伤活性测定 每个培养瓶内加入靶细胞 1×10^5 个,将获得的L3T4(5×10^5 个/瓶)、Lyt2(5×10^5 个/瓶)、L3T4+B细胞(2种细胞各为 2.5×10^5 个/瓶)、Lyt2+B细胞(2种细胞各为 2.5×10^5 个/瓶)分别加到培养瓶中($n=6$),同时设单纯靶细胞组对照。37°C继续培养16 h,分组收获细胞,Beckman液体闪烁仪(1S-6800, USA)测cpm值。

按下式计算亚群细胞肿瘤杀伤活性:

亚群细胞肿瘤杀伤活性($\text{cpm}/5 \times 10^5$ 细胞) = 单纯靶细胞组cpm - 实验组cpm

上式得到的差值即表示各亚群细胞破坏肿瘤细胞所释放的cpm值。该值越大,说明对肿瘤杀伤活性越强(即被杀死的肿瘤细胞越多),反之则越弱。

1.3 统计学处理 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,t检验进行差异显著性分析, $P < 0.01$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠脾淋巴细胞亚群对K562细胞杀伤活性测定 结果见表1。

2.2 各组小鼠脾淋巴细胞亚群对S180细胞杀伤活性测定 结果见表2。

表1 各组小鼠脾淋巴细胞亚群对K562细胞杀伤活性测定($n=6, \bar{x} \pm s, \text{cpm}$)

组别	L3T4	Lyt2	L3T4+B	Lyt2+B
照射组	4819±302	4034±241	6557±642	5711±466
对照组	4826±291	4117±264	6372±526	5782±509
照射+IL-6组	5751±343*	4937±287*	8872±588*	7226±596*

与对照组、照射组比较: * $P < 0.01$

表2 各组小鼠脾淋巴细胞亚群对S180细胞杀伤活性测定($n=6, \bar{x} \pm s, \text{cpm}$)

组别	L3T4	Lyt2	L3T4+B	Lyt2+B
照射组	4871±327	5638±557	5992±812	5046±656
对照组	4878±316	5721±580	5807±696	5117±699
照射+IL-6组	5916±348*	6652±607*	7241±787*	6876±766*

与对照组、照射组比较: * $P < 0.01$

3 讨论

本实验将 3 组 BALB/C 小鼠活杀, 无菌条件下取脾脏, 立即制备脾细胞悬液后 Panning 直接法、间接法分离脾淋巴细胞亚群(L3T4、Lyt2 和 B 细胞), 通过³H-TdR 释放实验检测了 L3T4、Lyt2 细胞单独培养, L3T4 细胞与 B 细胞、Lyt2 细胞与 B 细胞混合培养时的肿瘤杀伤活性。结果显示, 脾淋巴细胞亚群单独培养、混合培养时, 照射 + IL-6 组与对照组比较, ³H-TdR 释放量均有明显差异 ($P < 0.01$), 表明 IL-6 提高了脾淋巴细胞亚群肿瘤杀伤活性。

业已证实, IL-6 对脾淋巴细胞亚群有辐射保护作用^[2,4], 再结合本实验研究结果, 可以得出这样的结论: IL-6 提高了受分次照射的 BALB/C 小鼠脾淋巴细胞亚群肿瘤杀伤活性, IL-6 具有保护和促进淋巴细胞免疫活性作用。

IL-6 是一种多途径发挥生物活性的细胞因子, 主要作用于淋巴细胞和肿瘤细胞, 又可与其他细胞因子相互调节。IL-6 促进脾淋巴细胞亚群免疫活

性, 提高脾淋巴细胞亚群肿瘤杀伤活性, 可能的机制^[5]是 IL-6 在活体内不直接杀伤肿瘤细胞, 但可以通过增强细胞间识别分子的表达, 激发免疫活性细胞对肿瘤细胞的免疫反应, 而诱发肿瘤细胞对免疫细胞的杀伤敏感性增加。

参考文献:

- [1] Sehgal PB. Interleukin 6 in infection and cancer[J]. Proc Soc Exp Biol Med, 1990, 195(2):183-191.
- [2] 王红兵, 王 绪, 刘永彪, 等. IL-6 对受分次照射的荷瘤小鼠脾淋巴细胞、亚群及其调节的保护效应[J]. 中国肿瘤临床, 2001, 28(12):934-936.
- [3] Jambou RC, Snouwaert JN, Bishop GA, et al. High level expression of a bioengineered, cysteine-free hepatocyte-stimulating factor (interleukin 6)-like protein [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1988, 85(24):9426-9430.
- [4] Kishimoto T. The biology of interleukin-6[J]. Blood, 1989, 74(1):1-5.
- [5] 林飞卿主编. 医学基础免疫学[M]. 上海:上海科技出版社, 1993:30-56.

收稿日期:2006-01-03 修回日期:2006-02-27

本文编辑:孙立杰

盐酸丁咯地尔预处理对大鼠坐骨神经损害后神经元血管内皮生长因子的影响*

苏建华¹, 章莉萍¹, 陈玉芳², 唐金荣³, 肖 杭⁴, 包德诚¹

(1. 金坛市人民医院神经内科, 江苏 金坛 213200; 2. 常州市第四人民医院病理科, 江苏 常州 213001; 3. 南京医科大学第一附属医院神经内科, 江苏 南京 210029; 4. 南京医科大学应用神经毒理研究所, 江苏 南京 210029)

摘要:目的 观察盐酸丁咯地尔对坐骨神经损害后神经元血管内皮生长因子(VEGF)的影响。方法 SD 大鼠随机分为正常组、模型组、预处理组(盐酸丁咯地尔组), 预处理 14 天后制作周围神经损害动物模型, 分别在造模后 6 h、12 h、24 h、48 h、72 h、96 h、7 天各组提取 L₁₋₅背根神经节, 免疫组化观察 VEGF 阳性细胞表达数, 考察盐酸丁咯地尔预处理对坐骨神经损害后神经元 VEGF 的影响。结果 正常组 VEGF 阳性细胞见少量表达; 模型组在造模 48 h 表达达到高峰, 持续至 72 h; 而丁咯地尔造模 24 h 即有明显表达, 48 h~72 h 表达达到高峰, 持续至 7 天时与模型组比较仍有显著性差异 ($P < 0.05$)。结论 盐酸丁咯地尔可通过上调 VEGF 来保护周围神经损害后神经元。

关键词:盐酸丁咯地尔; 预处理; 坐骨神经损害; 神经元; 血管内皮生长因子

中图分类号: R745.4; Q593⁺.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-2065(2006)02-0105-03

周围神经损伤后可引起相应节段神经元的死亡, 严重地影响了周围神经的再生及其功能的恢复。因此, 如何保护神经损伤后神经元、减少其损害或死

亡, 使其能最大限度地恢复功能, 已引起人们的广泛关注。本课题前部分实验已证实了盐酸丁咯地尔对周围神经损害后神经元有确切的保护作用^[1], 本实

* 基金项目:江苏省常州市卫生局资助项目(200417)