维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2001)04－0429－03

鸭 γ－干扰素活性体外检测方法的建立

单幼兰,黄爱龙[1],Allison Jilbert[2],Ieva Kotlarski[2]

(1.重庆医科大学病毒性肝炎研究所 重庆 400010;2.澳大利亚阿得雷德大学微生物与免疫学系 南澳州 5005)

【摘 要】目的:建立鸭 γ－干扰素体外活性检测方法。方法:体外刺激巨噬细胞产生一氧化氮(NO)是 γ－干扰素的生物学效应之一。为检测鸭 γ－干扰素活性,采用 Sephadex G－100 诱导产生的腹腔巨噬细胞作为实验体系,观察一氧化氮浓度在 LPS,PHA,L－精氨酸刺激的上述细胞中的变化情况。结果:结果表明上述方法制备的腹腔巨噬细胞经 PHA 或 LPS 活化后,细胞密度较高组一氧化氮产量明显升高,细胞密度较低组则没有显著差异。结论:高浓度的腹腔巨噬细胞对 LPS 等刺激物敏感,可作为检测鸭 γ－干扰素活性的重要手段。

【关键词】鸭子;干扰素;巨噬细胞;一氧化氮

【中国图书分类法分类号】R392－33;R446.62 【文献标识码】A 【收稿日期】2001－02－08

Establishment of a method for detection of duck interferon－gamma bioactivity in vitro

SHAN You－lan, et al

(Institute for Viral Hepatitis, Chongqing Medical University)

【Abstract】 ***Objective***: To establish a method for detection of duck interferon－gamma (DuIFN－γ) bioactivity in vitro. ***Methods***: One of the biological properties of IFN－γ is the ability of activating macrophage in vitro to generate nitric oxide (NO). To detect the duck interferon－gamma (DuIFN－γ) activity, we utilised duck peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and Sephadex G－100 induced peritoneal exudate cells (PECs) as target cells to monitor the change of NO level of the target cells before or after stimulation of LPS, PHA of L－arginine. ***Results***: The results indicated that a limited increase of NO concentration following LPS or L－arginine stimulation was observed in chicken PBMCs, but not in duck PBMCs. The possible reason is assumed to be related to the differential distribution of macrophages in PBMCs from different species. Following stimulation with LPS or PHA, the duck PECs with a high cell density produced a remarkable increase of NO concentration compared to the group with a low cell density. ***Conclusion***: Duck PECs with high cell density are sensitive to the stimulation of LPS or PHA, which can be used as a method to detect the activity of duck IFN－γ.

【Key words】 Duck; Interferon; Macrophage; Nitric oxide

过去认为,乙型肝炎病毒的清除主要是通过病毒特异性 CD8＋细胞毒性 T 细胞攻击病毒感染的肝细胞[1],最近由 Chisari 领导的研究小组在乙型肝炎病毒转基因小鼠中进行的一系列实验结果表明,γ－干扰素、肿瘤坏死因子－α、白细胞介素－2 等细胞因子在清除病毒中的作用可能更为重要[2]。鸭乙型肝炎病毒感染的鸭子模型是国内外公认的研究乙型肝炎发病机理和治疗的动物模型[3~5]。为研究细胞因子在乙型肝炎病毒清除中的作用,我们最近从鸭脾细胞 cDNA 文库中成功克隆了鸭 γ－干扰素 cDNA 序列[6],但对其生物学活性的认识,则缺乏相应的检测手段。

γ－干扰素是免疫系统中起重要调节作用的细胞因子之一,具有广泛的生物学效应。其生物学活性通常以 γ－干扰素刺激体外培养的巨噬细胞产生一氧化氮的能力反映[7]。现已知,巨噬细胞产生一

作者介绍:单幼兰(1963－),女,江西人,检验师。主要研究方向:病毒性肝炎发病机理与治疗

基金项目:本项目由澳大利亚国家医学卫生研究基金(NH&MRC)资助

维普资讯 http://www.cqvip.com

氧化氮能力不仅受 γ－干扰素的正调节，而且受到 LPS、L－精氨酸、PHA 等物质的调控[8]。在目前缺乏相应的鸭体外培养巨噬细胞系条件下，设想以 Sephadx G－100 诱导的腹腔巨噬细胞(peritoneal exudate cells, PECs)作为实验体系，以 LPS、L－精氨酸、PHA 作为刺激物，探讨上述体系作为鸭 γ－干扰素活性检测方法的可能性。现就有关结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 6 周龄未感染成年鸡和鸭，由 IMVS 医学研究所动物实验中心提供和饲养。

1.1.2 培养基 细胞培养基为含 5% 正常鸭血清 RPMI1640，洗涤液为 HBSS，正常鸭血清(Normal duck serum, NDS)由本室自备。56℃热灭活。

1.1.3 试剂 LPS、PHA 购自 Sigma 公司，肝素钠购自澳大利亚 DBL 公司(5000U/ml)，每 100ml 磷酸缓冲液，加入 50U 肝素钠，采用巴比妥纳麻醉动物。

1.2 方法

1.2.1 Sephadex G－100 悬液配制 1.0g Sephadex G－100 (40～120μ, Pharmacia)于 50ml 无菌水中溶胀过夜，洗涤两次后，重悬于 33ml 无菌磷酸缓冲液(3% W/V)。

1.2.2 腹腔巨噬细胞制备 腹腔注射上述 Sephadex G－100 悬液，每 100g 体重 1ml，密切观察进食状况。24h 后，将 30ml 肝素化的磷酸缓冲液注入麻醉的实验鸭腹腔，轻揉腹部数次，抽取腹腔液。

1.2.3 腹腔巨噬细胞分离 腹腔液于 0℃静置 3h 后，吸取含腹腔巨噬细胞上清，Sephadex G－100 沉积物用 HBSS 洗涤数次后，合并上清备用。

1.2.4 腹腔巨噬细胞的体外活化 用细胞培养基调节 PECs 浓度至 2×10^6 细胞/ml(低细胞密度组)和 5×10^6 细胞/ml(高细胞密度组)。于 48 孔板中每孔加入 400μl 2×10^6/ml PECs，24 孔板中，每孔加入 1ml 5×10^6 细胞/ml PECs，37℃孵育 2h，去除悬浮细胞并用 37℃预热的 HBSS 洗涤一次，再加入等体积含不同浓度的刺激物，37℃培养 24h。收集上清，测定一氧化氮含量。

1.2.5 一氧化氮浓度测定 利用对氨基苯磺酸将一氧化氮氧化成亚硝酸盐或硝酸盐，后者能与 N－1－萘基乙二胺形成紫红色水溶液[10]。具体方法如下：于 96 孔板中，分别加入 100μl PECs 培养上清、100μl Griess 试剂(0.1% N－1－萘基乙二胺和 1% 对氨基苯磺酸等体积混合物)，混匀后，室温放置 10min，于 540nm 比色，以亚硝酸钠作为标准品绘制标准曲线。

2 结 果

2.1 标准曲线绘制

亚硝酸钠标准品经 2 倍系列稀释后，每个稀释度取双样平行测定亚硝酸根含量。以稀释后亚硝酸钠含量为横坐标，O.D 540nm 为纵坐标进行线性回归。实验发现，亚硝酸钠浓度在 0.5～256μmol 范围时，标准曲线的线性关系较好，相关系数达 0.999 (如图 1)。

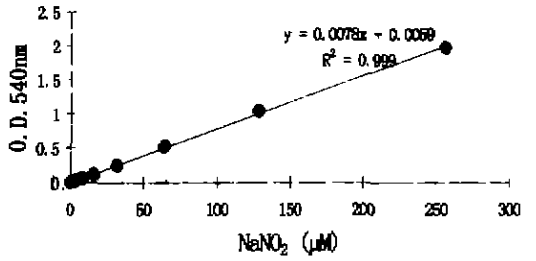


图 1 亚硝酸钠标准曲线

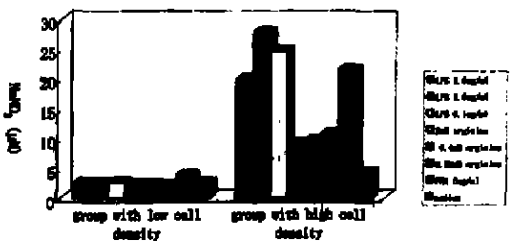


图 2 LPS 等对腹腔巨噬细胞分泌一氧化氮的作用

2.2 LPS 等刺激对腹腔巨噬细胞分泌一氧化氮的作用

图 2 所示为不同浓度鸭腹腔巨噬细胞经不同浓度 LPS 等刺激后，细胞分泌一氧化氮水平的变化。可以看出，低细胞密度组(2×10^6 细胞/ml)仅产生低水平一氧化氮，并且 LPS 等刺激后，一氧化氮产量也未见明显升高。高细胞密度组(5×10^6 细胞/ml)经不同浓度 LPS 等刺激后，细胞产生一氧化氮水平均有不同程度升高，其中 LPS、PHA 刺激最为明显，最高浓度达 27.8μM，因此采用足够数量的腹腔巨噬细胞作为 LPS 等刺激的靶细胞是诱导产生

维普资讯 http://www.cqvip.com

高水平一氧化氮的关键。实验中我们观察到未受刺激的细胞对照分泌的一氧化氮浓度有时可高达10μM,其原因推测可能和腹腔巨噬细胞诱导时产生的内源性 LPS 或分离时污染的外源性 LPS 提前刺激有关。

3 讨 论

γ-干扰素与其它干扰素最重要的区别就在于它能刺激巨噬细胞分泌一氧化氮,因此可通过测定一氧化氮的水平反映 γ-干扰素的活性大小。目前采用的活性测定方法主要以体外传代的巨噬细胞株作为实验体系。基于腹腔巨噬细胞的活性检测方法,仅有少数报道。由于 γ-干扰素具有相对严格的种属特异性,为检测鸭 γ-干扰素活性,在尚无鸭巨噬细胞株的前提下,我们尝试用 Sephadex G-100诱导产生的腹腔巨噬细胞作为实验体系,以 LPS、PHA 代替 γ-干扰素作为一氧化氮诱生剂,探讨体外检测鸭 γ-干扰素的可能性。结果表明,Sephadex G-100 诱导的鸭腹腔巨噬细胞无论在数量上(每只鸭可诱导产生 1×10^8 PECs)、质量上(巨噬细胞占细胞总数 70%),或是刺激前后一氧化氮水平变化的幅度上(由 4.2 到 28μM),都证明是一个较好的检测 γ-干扰素活性的实验体系,目前正进一步利用该体系鉴定真原核表达的鸭 γ-干扰素活性。

参 考 文 献

[1] Chisari, FV. Ferrari, C. Mondelli, et al. Hepatitis B virus structure and biology[J]. Microb. Pathog, 1989;6:311-325.

[2] Guidotti LG, Ishikawa, T. Hobbs MV, et al. Intracellular inactivation of the hepatitis B virus by cytotoxic T lymphocytes [J]. Immunity, 1996;4:25-36.

[3] Mason, WS. Seal, G, et al. Virus of Pekin ducks with structure and biological relatedness to human hepatitis B virus [J]. J. Virol, 1980;36:829-836.

[4] Schodel, F. Weimer, T. Fernholz, et al. "Molecular Biology of the Hepatitis B Virus"(A. McLachan, Ed.)[M]. 1991;53-80.

[5] Tuttleman, JS. Pugh, JC, et al. In vitro experimental infection of primary duck hepatocyte cultures with duck hepatitis B virus[J]. J. Virol, 1986;58:17-25.

[6] Ailong, H. Allison, J. R. Ieva, et al. Structural and functional homologies between duck and chicken interferon-gamma [J]. Develop. And Comp. Immuno. 2001;25(1):55-68.

[7] Fast, DJ. Lynch, RC. Leu, et al. Interferon-γ, but not interferon-αβ, synergizes with tumor necrosis factor-α and lipid A in the induction of nitric oxide production by murine L929 cells[J]. J. Interferon Res, 1993;13:271-277.

[8] Sung, YJ. Hotchkiss, JH. Austic, et al. L-arginine dependent production of reactive nitrogen intermdeiate by macrophages of a uricotelic species[J]. J. Leukoc. Biol, 1991;50:49-56.

[9] Green, LC. Wagner, DA. Glogowski, et al. Analysis of nitrate, nitrite and [^{15}N] nitrite in biological fluids [J]. Anal. Biochem, 1982;126:131-138.