维普资讯 http://www.cqvip.com

重庆医科大学学报 1991年第16卷第3期

(23) 255-258 肿瘤坏死因子，检测

肿瘤坏死因子的检测及意义

病毒性肝炎研究所 任 红 综述 张定凤 审校 R730.43

中图分类号 R512.6

1975年，美国学者Caswell[1]等利用卡介苗和内毒素感染小鼠，在其血清中发现了一种细胞毒性因子（CTX），它能够选择性地诱导肿瘤细胞出血坏死，故称之为肿瘤坏死因子（tumor necrosis factor，TNF）。随后证明，激活的单核巨噬细胞为TNF的主要产生细胞。另一类由活化的T淋巴细胞产生的细胞毒性因子—淋巴毒素（Lymphotoxin LT）[2]与细胞毒性的TNF具有相似的生物学活性。二者可能来源于同一前体基因产物，能够竞争靶细胞上的同一受体。所以，目前称激活的巨噬细胞产生的肿瘤坏死因子为TNF_α而淋巴细胞产生的LT为TNF_β[3]。最近，有人将NK细胞产生的TNF命名为TNF_γ。TNF不仅对多种人类和动物的肿瘤细胞有毒性作用，而且是一种重要的免疫调节因子。随着TNF在体内浓度增高，它可参予机体的多种病理改变，甚至造成多器官系统的损害，与多种疾病发病有关[4]。目前，国外已开始TNF抗肿瘤的Ⅰ、Ⅱ期临床试验[5]。所以，TNF用于临床检测将有重要意义。

一、TNF的产生

TNF在体外可有多种不同来源，以不同形式存在于体液中的TNF可能影响其生物活性的测定。

1. 天然状态TNF的诱生

临床检测TNF活性水平多属这一类型。内毒素或LPS在体内外诱生单核巨噬细胞产生TNF_α是其主要途径。CD_4阳性辅助性T细胞和CD_8阳性的细胞毒性T细胞在抗原或有丝分裂原刺激下产生TNF_β；佛波酯（PMA），白细胞介素2（IL-2）、r-干扰素（IFN-r）等，则可影响TNF的诱生[6]。

2. 细胞系产生TNF

许多实验室建立并发现某些细胞株可分泌TNF。如T细胞克隆[7]，T细胞杂交瘤[8]，B细胞系-RPMI-1788[9]，单核细胞系HL-60等。

3. 重组TNF

人、鼠TNF_α和TNF_β的DNA现均已克隆成功；并在大肠杆菌中高表达，这为TNF的临床应用提供了可能性[10]。尽管不同实验室所产生的TNF（r TNF）在氨基酸序列及组成上存在着细微差别但其生物活性则大多一致。重组的人和鼠TNF大约有80%氨基酸同源，现均已用于临床试验和实验研究。

4. TNF的临床来源

一般认为，正常人体的各种体液中不含有可检测量的TNF。而往往在多种慢性侵袭性疾病如恶性肿瘤，慢性肝损伤和急性感染疾患，如流脑败血症、脑型疟疾等患者的体液中，可检测出TNF活性。患者的三种体液即血浆，脑脊液（CSF）及关节滑液常作为TNF的临床检测样本。

维普资讯 http://www.cqvip.com

二、TNF生物活性检测

目前已知，TNF 具有多种生物活性。作为一种多肽类激素，它可促进急性期反应物质如C反应蛋白的形成，降低细胞色素p-450介导的肝细胞药物代谢功能，改变金属锌、铁离子的代谢[11]；作为一种生长因子，它能够促进纤维母细胞的增殖，加强骨细胞的反应性[12]；作为一种免疫调节因子，可促进单核巨噬细胞分泌IL-1，IL-6，促进内皮细胞合成释放IL-1、GM-CSF等[13]。而TNF最基本的生物活性是选择性地使某些细胞系（肿瘤细胞系）出血、坏死。利用这些细胞系对于TNF 所具有高度敏感性，进行细胞毒性试验，即可检测各种样品中TNF的生物学活性。

TNF的生物学活性是经过特异性受体所介导的。这类受体可存在于多种正常细胞或肿瘤细胞表面。TNF_α和 TNF_β共同竞争同一细胞受体。受体是进行生物学活性检测的基础。受体的存在是必需的，但有受体存在的细胞不一定对TNF必然敏感。如二倍体成纤维母细胞具有TNF 受体，但却能抵抗TNF的细胞毒性作用。

1．细胞毒性试验

至70年代中期发现TNF以来，人们均应用体外细胞毒性试验对其进行生物活性测定或定量测定。简单地讲，选择敏感细胞系与含有一系列稀释度TNF制备液或临床待测标本共同培养一定的时间，然后通过细胞毒性作用即以细胞生长抑制或细胞溶解为指标估计TNF的生物学活性。鼠的成纤维母细胞系-L929细胞系首先被用于细胞毒性试验[14]。随着L929 细胞系在全世界的广泛应用，已产生了许多细胞亚类。同时也带来了细胞在一系列传代过程中对 TNF 敏感性改变的问题。所以，大量冻存在细胞传代过程中已证明对TNF具有高度敏感的细胞株是非常重要的。除L929 细胞系外，其它的鼠细胞系如L-M细胞系，EMT-6细胞系，WEHI164，克隆B细胞株也常用来作TNF的细胞毒性试验。并认为具有较好敏感性[15、16、17]。至今还没有人的敏感细胞系的建立。但人TNF可作用于鼠的特异性细胞。最近有报道[18]：同种TNF作用于同种细胞比异种细胞显示出更强的细胞毒性。

2．细胞毒性试验方法

将TNF敏感的细胞系传代培养并种植成单层细胞。在含TNF的样本作用下，经过一定时间，使细胞毒性达最大。

细胞毒性实验条件：一定的细胞密度，一定的培养时间及温度，代谢抑制物加入及其浓度是影响试验的主要条件因素。一般选用对数生长期的相对较低密度的敏感细胞株，可提高方法的敏感性，获得较为理想的实验结果[19]。绝大多数细胞毒性试验的培养温度选择在37℃，并培养48至72h。有报道认为将培养温度提高至39℃或40℃，可增高实验的灵敏度[20]。加入代谢抑制物质如放线菌素 D(AMD)，在实验中常用浓度为1—5μg/ml，它可使L929或L-M 细胞毒性试验方法的敏感度提高10倍，并将TNF作用时间缩短至18—24h[19]。

细胞毒性试验检测方法：检测方法有多种。常用的有：相差显微镜观察；台酚兰染色计数死活细胞；各种染料染色吸收后进行分光光度比色法，如中性红染色法，结晶紫染色法；^{14}C—标记氨基酸吸收试验，^{3}H—TdR 吸收或释放试验[19]。方法选择主要取决于试验选用的靶细胞系（株）类型。例如，染色法多使用牢固贴壁细胞；贴壁细胞也可选择同位素释放试验。而不牢固贴壁细胞则可选用同位素掺入法。各种方法各有其优缺点，但目前最常用的方法为染色法。

TNF活性单位计算：通过一系列不同稀释度的标准TNF和待测样本TNF 测定，可以得到一条TNF剂量反应曲线。即以光密度

维普资讯 http://www.cqvip.com

OD值或细胞生存或死亡百分率对TNF浓度（稀释度)作图而得。在OD值中点或50%细胞生存或死亡率时TNF的稀释度的倒数为实验单位（LU/ml）的滴度[21]。

细胞毒性试验的干挠因素：存在于样本中的一些内源性物质，如IL-1、IL-2、$_r$-IFN等均可影响TNF测定。r-IFN与TNF有着许多协同作用，它可加强TNF的细胞毒性作用[22]。从而影响TNF生物活性测定。一般认为，IFN的作用具有较高的种族特异性，使用小鼠细胞系测定TNF的生物学活性，人r-IFN干挠影响甚微。IL-1、IL-2、及IL-6均可影响TNF的活性，IL-2可促进TNF的产生，IL-6可协同TNF的细胞调节作用，而IL-1则可作用于某些肿瘤细胞使之出血坏死。同时，IL-1还可降低某些细胞的TNF受体的表达，从而影响TNF活性的测定。

三、TNF的免疫学测定

由于生物学测定方法的明显不足，如易受多种内源性物质及外源性因素的干挠；不能准确进行定量测定等。所以，发展免疫学方法进行定量测定是必要的。随着TNF基因克隆的成功，可以获得高度纯化的产物，从而为免疫学方法测定TNF提供了可能。目前国外已成功地制备了多克隆的抗TNF_α和抗TNF_β的抗血清[23]，单克隆抗TNF抗体已获得[24]。从而为建立具有高度特异性、敏感性的免疫学方法提供了基础。

现行的免疫学检测方法一般有两种，放射免疫法（RIA）和酶联免疫吸附法（ELISA)。放射免疫法多采用放射性竞争抑制法来检测TNF_α和TNF_β[23]利用非标记的多克隆或单克隆抗TNF抗体与^{125}I标记的抗体共同竞争抗原TNF，通过计数同位素值，从而对TNF进行定量测定。ELISA法多采用双抗体夹心法，即利用标记的抗TNF抗体和酶联接抗体夹心检测标本中TNF含量[24]。一般认为，ELISA法没有同位素半衰期限制，使用较为方便，但重复性相对较差，其特异性及敏感性也不及RIA法。二种方法的灵敏度均可达到pg/ml检出水平。

四、TNF检测的临床意义

由于TNF的活性水平与多种疾病有关，TNF的临床检测，对于探索这些疾病的发病原理并最终应用于临床治疗将有积极意义。

TNF在感染性休克的发病原理中起着重要作用[25]。同时，TNF也能引起肿瘤恶病质的发生[12]。正因如此，人们正努力证明机体遭受严重感染和肿瘤疾患时，其体液内可能存在一种可诱导相应一系列病理生理变化的激素或介质，而TNF则可能为其中重要的一种，称之为恶液素。

在细菌性脑膜炎败血症患者血清及脑脊液中，TNF活性水平明显增高，其水平与患者病情转归密切相关[26]。在AIDS病患者，TNF活性水平增高，并与相应病理生理变化有关，决定疾病发展的各段进程[27]。在人类多种寄生虫病患者血清中可测定到TNF活性增高，而TNF可能为脑型疟疾的一种重要介质，其水平高低直接关系到发病与否[28]。在儿童的Kawasaki病中，患儿TNF活性增高并直接造成疾病中血管内皮的损害[29]。在酒精性肝病患者，其单核巨噬细胞可自发或在内毒素酯多糖（LPS）诱导下产生高水平TNF，介导肝细胞损害[31]。又可引起肝细胞代谢障碍。在病毒性肝炎患者，重症肝炎及慢性活动性肝炎患者TNF活性水平增高，它与患者疾病严重程度相关并与肝细胞损害相关[30、32]。至于TNF在癌症患者中情况，既有升高，也可降低，其病理生理作用则需进一步研究。

参考文献

[1] Caswell E A. Proc Natl Acad Sci USA 1975; 72:3666

[2] Granger G A. Nature 1986; 218:1253

维普资讯 http://www.cqvip.com

[3] Shalaby M R.J Immunol 1988; 135: 2069
[4] Anthony C.Immunology Today 1988; 9(1)28
[5] Aggrwal B.Critical Reviews in Immunology 1989; 9(1)28
[6] Nedwin G E. J Immunol 1985; 135: 2492
[7] Conta et al. J Immunol 1986; 134: 2185
[8] Kobayashi M. J Immunol 1986; 137: 1885
[9] Aggarwal B. J Biol Chem 1985; 260: 2334
[10] Shirai T,et al. Nature 1985; 313:803
[11] Remick D G. 1987 Lab Invest 1987; 56:234
[12] Bertollini D R. Nature 1986; 319:516
[13] Nina L, et al. Ann Rev Immunol 1988; 6:407
[14] Rull M R, et al. J Immunol 1980; 125:1671
[15] Kramer S M. J Immunol Methods 1986; 93:201
[16] Espevik T. J Immunol Methods 1986; 95:99
[17] Klostergard. Lymphokine Res 1986; 4: 309
[18] Kramer S M,et al.Cancer Res 1988; 48:920
[19] Flick D A,et al.J Immunol Methods 1984; 68:167
[20] Niitsu T,et al. Cancer Rev 1988; 48: 654
[21] Anthony M,et al J Immunol Methods 1989; 116:1
[22] Williamson,et al.Proc Natl Acad Sci USA 1983; 89:5397
[23] Meager A, et al. J Immunol Methods 1987; 104:31
[24] Hirai M, et al. J Immunol Methods 1987; 96:57
[25] Beutler B, et al. Science 1985; 229: 869
[26] Waage A, et al. Lancet 1987; 8529: 355
[27] Pascale P L, et al. Clin Immunol and Immunopath 1989; 50:374
[28] Grau G E, et al. Science 1987; 237: 1201
[29] Susumn F, et al.Clin Immunol and Immunopath 1988; 48:247
[30] Muto, et al.Lancent 1988; 9:73
[31] Craig J, et al. Hepatology 1989; 9(3) :349
[32] 张定凤, 任红.中华医学杂志 1990; 70(8): 238

(收稿日期 1990—10—26)