

人白细胞介素-6mRNA 的富集及其特性研究

田志刚¹ 杨贵贞² 孙 沛¹ 李登华¹
张 捷¹ 路力生¹ 张建华¹ 崔正言¹

(山东省医科院免疫室, 济南)¹

(白求恩医科大学免疫室, 长春)²

白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)是当代细胞因子研究中倍受分子生物学家和免疫学家关注的生物活性肽。已经证明 IL-6 不仅对免疫效应细胞(B细胞、T细胞、巨噬细胞、天然杀伤细胞和淋巴因子激活杀伤细胞)有极强的促进作用,而且与促进造血系统的发育和神经系统的分化密切相关,在肝细胞应急期反应中亦占重要地位。IL-6 不仅可由免疫效应细胞产生,亦可由表皮细胞、血管内皮细胞,神经胶质细胞和纤维母细胞产生。IL-6 产生细胞和生物效应的多样性充分显示出该细胞因子在机体整个生理反应中的重要意义^[1,2]。

人IL-6分子克隆成功于1986年并且在1988年获正式命名^[3],成熟的人IL-6由184个氨基酸组成,分子量为20781.5。国内尚无IL-6 cDNA分子克隆的报道,研究多停留于细胞水平的生物学效应。本文报道了人IL-6 mRNA的大量制备和分子特性,为构建人IL-6 cDNA文库和进行IL-6基因表达调控研究奠定了基础。

材料和方 法

(一)人脾脏细胞的激活和胞浆 RNA 的制备

无菌取健康死亡的成人脾脏,先剪成 0.5×0.5 cm碎片,然后用100目不锈钢网研磨出单细胞悬液,用Tris-HCl去除红细胞,最后用RPMI 1640(Gibco公司)调细胞浓度为 2×10^6 个/ml,培养液含10%新生牛血清。加入PHA(植物血凝素,上海医学化验所产,按使用说明每支配2ml,用量2%,v/v),或PHA+TPA(乙酸豆蔻佛波醇, Sigma, 终浓度10ng/ml), 5%CO₂。37℃

培养不同时间收获细胞上清和细胞沉淀。细胞沉淀立即进行冷NP40处理,破膜后离心去除细胞核,胞浆液立即用冷酚法抽提RNA^[4]。

(二)用麦胚无细胞液进行mRNA的体外转译

用Oligo(dT)-纤维素素和层析从胞浆RNA中获取mRNA(polyA⁺-RNA)。胞浆RNA和mRNA均可直接用麦胚无细胞液进行体外转译详见文献^[4]。

(三)IL-6生物活性检测

人脾脏细胞培养上清可直接用于检测IL-6活性。麦胚体外mRNA转译产物需先用RPMI1640液4℃透析平衡并除菌后方可测定。采用IL-6依赖细胞株(MH60·BSF-2, 大阪大学细胞工学中心赠送)检测IL-6的杂交瘤/骨髓瘤增殖因子(HPGF)活性,用³H-TdR(氚标脱氧胸腺嘧啶核苷)掺入反映该细胞对倍比稀释的IL-6的增殖反应^[5]。用SKW₆-CL₄细胞检测IL-6的B细胞分化因子(BCDF)活性,用ELISA法测定该细胞受IL-6诱导后培养上清中的IgM含量^[5]。可以用金黄色葡萄球菌Cowan I株(SAC菌)活化的B淋巴细胞代替SKW₆-CL₄细胞^[6]。

结果与讨论

(一)人IL-6 mRNA的诱生动力学

如图1所示,PHA活化脾细胞IL-6 mRNA在24h达高峰,比上清中IL-6活性高峰提前约24h。此外还观察到冷酚法制备胞浆RNA的量在时相上与体外转译所证实的IL-6 mRNA的量相

本文于1990年1月18日收到。

国家自然科学基金资助项目。

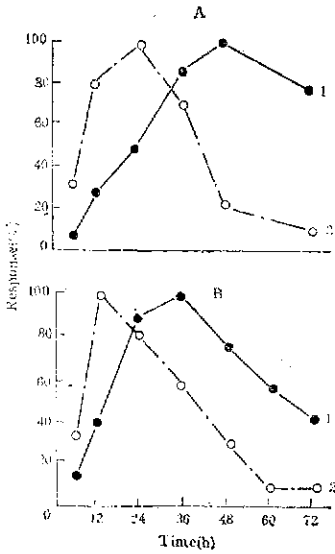


图 1 人IL-6和IL-6 mRNA 的诱导动力学
 A. PHA刺激组。高峰时相上清IL-6(1)含量为52.5u/ml, 细胞RNA体外转译 IL-6(2)为73.1u/100μg RNA
 B. PHA + TPA刺激组。高峰时相上清IL-6(1)含量为220.5u/ml, 细胞RNA体外转译 IL-6(2)为118.4u/100μg RNA

平行。PHA + TPA活化脾细胞中IL-6 mRNA时相高峰比PHA活化组提前12h, 上清中IL-6活性高峰亦提前12h。PHA + TPA组最大IL-6和IL-6 mRNA的峰值分别比PHA组高4.2倍和1.62倍。此外还观察到扁桃体和淋巴结亦基本遵循上述规律。

(二)富含IL-6 mRNA的胞浆 RNA的制备

用考马斯亮蓝法检测所制备的胞浆 RNA 标本中的蛋白质含量,用二苯胺法检测其中的DNA含量,用苔黑蓝法检测其中的RNA含量,证明本室建立的RNA制备方法较为稳定,可以去除制备物中蛋白质和DNA的污染。同时还证明苔黑酚法检测RNA含量与RNA的紫外分光光度法检测有良好的相关性。数次制备的RNA标本的A₂₆₀/A₂₈₀比值均在1.8以上。

人脾脏细胞经PHA + TPA活化12h后提取胞浆RNA,产量为800μg/3 × 10⁸细胞,每个脾脏可获1—2 × 10¹⁰细胞,可制备的总胞浆RNA量为26.67—53.33mg。另外我们还观察到扁桃体胞浆RNA产量为1100μg/3 × 10⁸细胞;淋巴结为1000μg/3 × 10⁸细胞;外周血为800μg/3 × 10⁸

细胞。

将提取的胞浆RNA作7mol/L尿素-SDS-PAGE凝胶,终浓度为8%,经紫外透射仪检测出现三条区带。其中近阴极的区带显色最浓,代表占RNA含量最多的28S的rRNA;然后出现一个区带较宽显色较浅的区带,代表含量较少但分子大小差异较大的异质性mRNA群体,近阳极的带则可能代表小分子的tRNA。RNA标本经RNase处理后无显色带出现,证明标本确为RNA。

对RNA标本进行紫外分光光度扫描(220—320nm),扫描结果为一单峰曲线,峰值处在256nm, A₂₆₀/A₂₈₀ = 2.0—2.17,提示为一典型的核酸图谱。采用三种不同浓度的LiCl(0.5、0.1、0 mol/L)分段洗脱胞浆RNA的Oligo(dT)纤维素亲和层析柱,获得了含3个洗脱峰的典型的层析图谱,这三个峰分别代表rRNA, tRNA和mRNA,各自在总RNA中的含量亦与文献符合。

对上述所获胞浆RNA和mRNA进行转译活性鉴定,二者在一定剂量范围内对麦胚无细胞转译体系的转译IL-6(tIL-6)量有剂量相关性,最佳胞浆RNA用量为100μg RNA/200μl转译体系;最佳mRNA用量为5μg mRNA/200μl转译体系。二者的转译量分别为73.1u tIL-6/100μg RNA, 89.4u tIL-6/5μg mRNA。

(三)人IL-6 mRNA的鉴定——体外转译及S值测定

如图2所示,利用7mol/L尿素-SDS-PAGE连续电泳技术将RNA分离,借紫外灯检测仪描绘或拍摄RNA标准物(16S、23S)的迁移率,然后回收各电泳凝胶柱内的待检RNA并经体外转译体系鉴定其中IL-6 mRNA转译活性,找到IL-6 mRNA高峰在凝胶电泳中位置。结果表明人脾IL-6 mRNA约为18S。

(四)体外转译的IL-6(tIL-6)的特性

1. 分子量测定: 将tIL-6与初步纯化的nIL-6和标准品rIL-6分别进行Sephadex G100层析的标准蛋白的洗脱液体积进行比较,结果表明这3种IL-6(tIL-6, nIL-6, rIL-6)的分子量基本相同,均约为20kd(图3)。

2. IL-6 mRNA 体外转译反应的酶敏感性测试: 转译反应的模板RNA受RNase处理后失

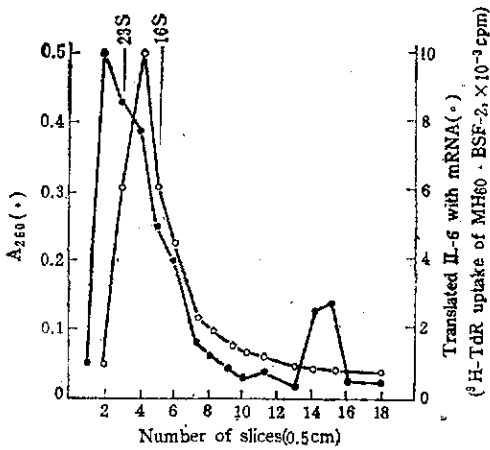


图2 人IL-6 mRNA S值的测定
RNA的7mol/L尿素-SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳、回收各割胶片的RNA并进行体外转译,检测IL-6活性。

去转译效应但对蛋白酶不敏感;转译产物tIL-6受蛋白酶处理后失去活性但对RNase不敏感。上述结果证实确为IL-6 mRNA的体外转译反应。

3. tIL-6的生物学效应(图略): (1) 杂交瘤/骨髓瘤细胞增殖活性(HPGF): IL-6可以促进杂交瘤细胞或骨髓瘤细胞的体外增殖,由此建株的MH60·BSF-2细胞具备对IL-6的绝对增殖依赖性。将nIL-6, rIL-6和tIL-6进行比较,结果表明在0.1—5u/ml范围内MH60·BSF-2的48h增殖呈剂量依赖性;取1—5 u/ml IL-6含量观察MH60·BSF-2细胞体外长期传代培养状态(起始浓度 10^4 /ml),发现亦呈剂量依赖关系,证明tIL-6具备HPGF活性。(2) B细胞分化因子活性(BCDF): IL-6可以促进活化B细胞分化为免疫球蛋白分泌细胞,SKW6-CL₄为EB病毒转化的B细胞,具备在体外增殖活性,在IL-6存在下可以分化成熟而分泌IgM。我们比较了nIL-6, rIL-6和tIL-6对SKW6-CL₄细胞的促分化效应,培

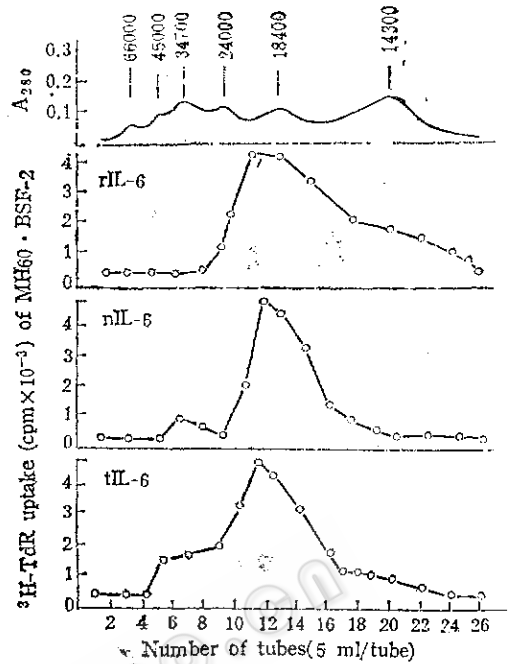


图3 凝胶过滤法(Sephadex G-100)测定体外转译IL-6的分子量
rIL-6: 基因工程IL-6; nIL-6: 天然IL-6部分纯化品; tIL-6: 体外转译IL-6

养上清中IgM分泌量与IL-6加入量呈剂量依赖性。同时还观察了新鲜制备的SAC活化的人外周血B淋巴母细胞对IL-6的促分化反应(检测IgM分泌量),获得了与SKW6-CL₄同样结果。(3) IL-6受体(IL-6R)吸收试验, IL-6和IL-6R具备很高的亲和力,因此用IL-6R阳性细胞对IL-6上清进行吸收试验,可从另一侧面证实IL-6的存在。将MH60·BSF-2细胞, SKW6-CL₄和SAC活化外周血B淋巴细胞以不同细胞浓度分别吸引nIL-6, rIL-6和tIL-6,结果残留上清中的IL-6含量随IL-6R阳性细胞数量增加而减少,三种IL-6(nIL-6, tIL-6, rIL-6)表现相同的反应。

参 考 文 献

- [1] 李康生, 田志刚: 国外医学分子生物学分册, 11:128, 1989.
- [2] 田志刚, 李康生: 上海免疫学杂志, 10:189, 1990.
- [3] Kishimoto, T. and Hirano, T.: *Ann. Rev. Immunol.*, 6:485, 1988.
- [4] 田志刚, 杨贵贞: 中国免疫学杂志, 5:4, 1989.
- [5] Muraguchi, A. et al.: *J. Exp Med.*, 167:332, 1988.
- [6] 田志刚, 杨贵贞: 中国药理学通报, 8:37, 1990.

Large Scale Preparation and Characterization of Human Interleukin-6 mRNA

Tian Zhigang¹ Yang Guizhen² Sun Rui¹ Li Denghua¹
Zhang Jie¹ Lu Lisheng¹ Zhang Jianhua¹ Cui Zhengyan^{*}

(Immunology Department, Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan)¹

(Immunology Department, Norman Bethun University of Medical Sciences, Changchun)²

Large scale preparation of IL-6 mRNA was obtained from human spleen cells stimulated with PHA + TPA at the peak of IL-6 mRNA transcription. Full length of IL-6 mRNA was translated in wheat germ extract to produce bioactive IL-6 (tIL-6), the IL-6 mRNA was about 18 S depending on the 7 mol/L urea-SDS-PAGE, recovery of the RNA from the gel and translation *in vitro*. The elute curve of tIL-6 was the same as recombinant IL-6 (rIL-6) and natural IL-6 (nIL-6), the molecular weight of IL-6 was about 20000 Dalton. The translational process of IL-6 mRNA *in vitro* was inhibited when RNA was cultured with RNase or translated product was cultured with proteinase, proving a standard *in vitro* translation. The tIL-6 acts on MH60 · BSF-2 cell line to support the IL-6-dependent cell proliferating, on SKW6-CL₄ cell line or SAC-activated B lymphoblast cell for secreting IgM, and binds with IL-6 receptor of IL-6 response cell in IL-6 receptor absorption assay.

Key words

Large-scale preparation; characterization; *in vitro* translation; human interleukin-6 mRNA