

细胞因子 研究方法学

孙卫民 王惠琴 编著

人民卫生出版社

Y26
C11A1

Y4112/24

细胞因子研究方法学

孙卫民 王惠琴 编著

人民卫生出版社

图书在版编目(CIP)数据

细胞因子研究方法学/孙卫民,王惠琴编著.-北京:
人民卫生出版社,1999

ISBN 7-117-03213-8

I.细… II.①孙… ②王… III.细胞-因子-研
究方法-方法论 IV.Q26

中国版本图书馆 CIP 数据核字(1999)第 02548 号

细胞因子研究方法学

孙卫民 王惠琴 编著

人民卫生出版社出版发行
(100078 北京市丰台区方庄芳群园 3 区 3 号楼)

(天津市宏达印刷厂印刷)
新华书店经销

850×1168 32 开本 25.5 印张 669 千字
1999 年 7 月第 1 版 1999 年 7 月第 1 版第 1 次印刷
印数:00 001—3 000

ISBN 7-117-03213-8/R·3214 定价:40.00 元

(凡属质量问题请与本社发行部联系退换)

前 言

细胞因子是体内细胞之间相互作用的主要介质,在机体的免疫应答、炎症反应、造血功能,乃至胚胎发生、生长发育等各个方面都起着关键作用。细胞因子的产生和相互作用对机体抗御疾病和维持生理恒常有重要意义。细胞因子或其受体的异常增多、减少,异常分布或细胞因子网络失衡常常与疾病相关。因此,研究细胞因子的作用机制、细胞因子之间的关系、细胞因子与细胞的相互作用、细胞因子在生理过程中的地位和对疾病发生、发展和转归的影响,以及研究和开发细胞因子在治疗和诊断疾病方面的应用等等,越来越受到基础医学研究者、临床医务工作者、生物学家、药学家的重视。细胞因子的研究和应用已经成为当今科学研究的一个前沿学科。

最近十几年,人们发现了几十种细胞因子并进行了大量研究。一些细胞因子的化学结构已经阐明,对它们的生物学功能和作用机制也有了初步了解,新的细胞因子还不断被发现。一些细胞因子制剂已经用于临床治疗疾病并取得了可喜的成果。但是,细胞因子的研究工作还刚刚开始,尚有许多未知数有待人们去解答,还需要更多的科学工作者参与和共同研究。

迄今为止,人们已经建立了许多研究细胞因子的方法,新的技术还在不断涌现。但是,国内还没有全面系统介绍细胞因子的基础研究方法和临床应用方法的书籍。我们根据自己在国内外多年研究细胞因子的实践,参阅了大量国内外最新的文献资料,选择其中最经典、最常用和最新的方法,加以整理归类,编写了这本《细胞因子研究方法学》,希望能对从事和将要从事细胞因子研究的科研工作者有所帮助。本书共 20 章,前 14 章详细介绍了细胞因子研究中具有共性的方法、注意事项和各种方法的优缺点,包括免疫学

检测法、各种细胞因子生物学活性的研究方法、研究细胞因子与各种细胞间关系的方法、研究细胞因子受体和信号传导的方法、细胞因子抗体的制备和鉴定方法以及分子生物学研究方法等。着重介绍各种方法的操作步骤、注意事项、优缺点和人们对这些方法和结果的评价。后6章介绍了白细胞介素、干扰素、肿瘤坏死因子、集落刺激因子、促生长因子和其它细胞因子的蛋白质及基因结构和特点,产生及其调节,受体结构和信号传导机制,生物学活性,动物实验结果,临床应用方法和研究成果,以及这些细胞因子的纯化方法和一些特殊研究方法。本书可帮助读者了解目前细胞因子研究的理论成果、临床应用情况和应用前景,有助于研究者研究、应用和开发细胞因子。

由于研究细胞因子的方法涉及生物学和医学基础研究的各个方面,内容众多,虽然作者尽量精选,但难免有所遗漏,敬请读者原谅并提出宝贵意见。一些方法可能会有不够详尽之处,好在本书在大多数研究方法中附有原始文献的出处,读者可以进一步查阅。

本书在编写过程中,得到皖南医学院孙瑞元教授和吴敏毓教授、第二军医大学免疫学教研室杨嗣坤教授和徐志工教授的指导和关怀,在此表示衷心的感谢。

孙卫民

1998年11月于上海

内 容 提 要

本书是关于细胞因子研究方法的专著。作者综合国内外最新文献资料并结合自己多年研究实践,系统地介绍了各种细胞因子研究方法的最新成果。本书共 20 章,前 14 章详细介绍了研究细胞因子的具体方法、注意事项和优缺点,包括免疫检测法、各种细胞因子的生物学活性研究方法、研究细胞因子与各种细胞间关系的方法、研究细胞因子受体的方法、细胞因子抗体的制备和鉴定方法以及分子生物学研究方法等。后 6 章分类介绍了各种细胞因子的结构和基因特点,产生及其调节,受体结构和信号传导机制,生物学活性,动物实验结果,临床应用方法和研究成果以及细胞因子的纯化方法和一些特殊研究方法。本书内容详尽,不但是科研工作者和临床医生研究和应用细胞因子的很好参考书,而且可以使读者全面了解这一生物医学领域的最新进展。本书可供从事免疫学、药理学、生物化学、分子生物学、肿瘤学、血液学、病理生理学、药物学以及临床医学各学科的教学、医疗和科研的工作者以及大专院校学生和研究生查阅和参考。

目 录

第一章 概论	(1)
第一节 细胞因子的概念	(5)
一、细胞因子的共同特点	(5)
二、细胞因子的分类	(8)
三、细胞因子的临床应用	(9)
第二节 细胞因子受体	(13)
一、细胞膜受体	(13)
二、可溶性受体	(16)
第三节 细胞因子的研究方法	(18)
第二章 细胞因子的免疫测定法	(20)
第一节 应用免疫检测法的注意事项	(21)
一、免疫检测法与生物学活性检测法的比较	(21)
二、标准品的应用	(21)
三、影响检测结果的因素	(22)
四、固相的包被和洗涤	(23)
五、细胞因子和抗细胞因子抗体的标记	(24)
第二节 放射免疫测定	(25)
一、标记细胞因子的碘原法	(26)
二、放射免疫测定法(竞争抑制实验)	(27)
第三节 免疫放射测定法	(28)
一、抗细胞因子 IgG 的纯化	(29)
二、放射标记 IgG 的氯胺 T 法	(29)
三、免疫放射测定法	(30)
第四节 酶联免疫吸附试验	(31)
一、双抗体夹心法	(32)
二、竞争抑制法	(35)

三、同源 ELISA	(36)
四、标记抗体的方法	(37)
第五节 时间分辨荧光免疫检测法	(40)
第六节 免疫沉淀法和 Western 印迹实验	(42)
一、抗原制备	(43)
二、免疫沉淀	(43)
三、SDS-PAGE 电泳	(44)
四、Western 印迹实验	(48)
第三章 研究细胞因子调节细胞生长活性的方法	(53)
第一节 研究细胞因子调节细胞生长活性方法的要点	(53)
一、用于检测细胞因子的细胞株	(53)
二、测定细胞数的方法	(58)
三、细胞因子的标准品	(59)
四、关于待测样品	(61)
五、待测细胞因子和细胞因子标准品的系列稀释	(62)
六、结果的表达方式	(62)
第二节 细胞因子调节细胞生长活性的检测法	(62)
一、细胞株的培养、冻存和复苏	(63)
二、 $[^3\text{H}]$ 脱氧胸苷摄入法测定细胞数	(64)
三、MTT 检测法	(65)
四、XTT 检测法	(67)
五、MTS 检测法	(68)
六、NAG 检测法	(70)
七、Alamar Blue TM 摄入法	(70)
八、碱性磷酸酶检测法(AKP 法)	(71)
九、三磷酸腺苷检测法(ATP 法)	(72)
十、染料染色法测定细胞数	(73)
十一、直接计数细胞	(75)
第三节 细胞因子活性单位的计算	(76)
一、直接作图法	(77)
二、概率单位分析法	(78)
第四节 研究细胞增殖的其它方法	(79)

一、关于 $[^3\text{H}]$ 脱氧胸苷摄入量	(79)
二、标记细胞核的放射自显影术	(80)
三、用荧光细胞计数器检测细胞数	(81)
四、有丝分裂指数分析	(82)
第五节 集落形成实验	(83)
一、分离骨髓细胞	(84)
二、集落形成试验	(86)
第四章 细胞因子介导细胞毒活性的研究方法	(92)
第一节 细胞因子溶细胞和抑制细胞生长作用的检测法	(92)
第二节 细胞介导的细胞毒作用(CMC)检测法	(93)
一、CMC中效应细胞的制备	(94)
二、靶细胞的制备(分离肿瘤细胞和 TIL)	(98)
三、4 小时 ^{51}Cr 释放法检测 CMC 活性	(99)
四、 $[^3\text{H}]$ 脱氧胸苷释放法	(102)
五、LDH 释放法	(103)
六、时间分辨荧光分析法	(104)
七、用 MTT 检测法测定 CMC	(108)
八、荧光法检测 CMC	(110)
九、单个细胞的 CMC 试验	(110)
第三节 细胞凋亡的研究方法	(111)
一、琼脂糖凝胶电泳检测凋亡细胞	(112)
二、用荧光激活的细胞分类仪检测凋亡细胞	(113)
第五章 细胞因子抗病毒活性的研究方法	(118)
第一节 测定细胞因子抑制细胞病变的活性	(120)
一、微孔板检测法	(120)
二、多孔检测法	(123)
第二节 病毒蚀斑形成实验	(124)
第三节 用抑制病毒产量法测定干扰素	(125)
一、用病毒感染经干扰素处理的细胞	(125)
二、病毒滴度的检测	(126)
三、浓缩病毒保存液的制备	(127)

第六章 细胞因子趋化活性的研究方法	(129)
第一节 琼脂糖小滴化学动力学试验	(129)
一、从外周血中分离多核粒细胞	(129)
二、琼脂糖小滴化学动力学试验	(131)
第二节 琼脂糖中的趋化实验	(132)
一、琼脂平皿的制备	(132)
二、琼脂糖中的趋化实验	(133)
第三节 微孔小室中的趋化实验	(134)
一、分离外周血单个核细胞	(136)
二、趋化试验	(136)
三、用显色反应计数趋化的中性粒细胞	(137)
四、IL-16 诱导 T 淋巴细胞趋化实验	(139)
第四节 用 β 葡萄糖醛酸或过氧化物酶检测趋化因子	(140)
第七章 细胞因子和 T 淋巴细胞	(142)
第一节 T 细胞的分离和纯化	(142)
一、用淋巴细胞分离液分离单个核细胞	(143)
二、从单个核细胞中分离 T 细胞	(145)
三、T 细胞亚群的分离	(149)
第二节 建立抗原特异性 T 细胞株或 T 细胞克隆	(149)
一、建立 T 细胞株	(149)
二、用有限稀释法建立 T 细胞克隆	(151)
第三节 T 细胞产生细胞因子的研究	(153)
一、T 细胞亚群及其产生的细胞因子	(153)
二、研究 T 细胞产生的细胞因子的方法	(156)
第四节 细胞因子对 T 细胞的作用	(158)
一、调节 T 细胞生长	(158)
二、调节 T 细胞分化和活性	(159)
三、T 细胞与免疫耐受	(160)
第八章 细胞因子和 B 淋巴细胞	(162)
第一节 研究 B 细胞反应的常用试剂	(163)
第二节 制备和纯化 B 细胞	(164)
一、制备单个核细胞	(164)

二、用尼龙毛法分离 B 细胞	(166)
三、从单个核细胞中去除 T 细胞	(167)
四、用粘附法分离单核细胞	(168)
五、按细胞比重分离 B 细胞	(169)
六、用单克隆抗体分离 B 细胞亚群	(170)
七、用于检测 BCGF 和 BCDF 的人 B 细胞株	(173)
第三节 B 细胞活化、增殖和分化试验	(174)
一、B 细胞活化试验	(174)
二、细胞因子的 BCGF 活性检测	(176)
三、细胞因子的 BCDF 活性检测	(178)
四、细胞因子的 T 细胞取代因子(TRF)活性检测	(181)
第四节 固相酶免疫测定检测人 B 细胞分泌的免疫球	
蛋白	(182)
一、测定人 B 细胞分泌的免疫球蛋白(Ig)	(182)
二、测定 IgG 的亚类	(183)
三、检测特异性抗体的酶免疫测定法	(183)
第九章 细胞因子和单核巨噬细胞	(185)
第一节 单核巨噬细胞的分离和纯化	(185)
一、巨噬细胞的分离	(186)
二、巨噬细胞的纯化	(189)
第二节 活化巨噬细胞的检测	(192)
一、呼吸爆发活性的检测	(192)
二、检测 MHC- II 类分子表达	(194)
三、检测甘露岩藻糖受体	(196)
四、巨噬细胞吞噬功能的检测	(199)
五、检测巨噬细胞分泌的细胞因子	(201)
六、巨噬细胞杀伤肿瘤细胞活性的研究	(201)
第三节 巨噬细胞移动抑制活性的测定	(203)
一、琼脂糖小滴培养法	(203)
二、琼脂糖平皿打孔法	(205)
第十章 内皮细胞粘附实验和血小板活化因子	(207)
第一节 内皮细胞的研究方法	(208)

一、内皮细胞的分离和培养	(208)
二、内皮细胞趋化实验	(210)
三、血管内皮细胞的前凝血活性	(213)
四、内皮细胞粘附试验	(215)
第二节 PAF 的测定	(220)
一、从 EC 中提取 PAF	(221)
二、鉴定 PAF	(222)
三、定量检测 PAF 的生物活性	(222)
第十一章 细胞内和细胞膜上细胞因子的研究	(225)
第一节 检测单个细胞结合的细胞因子	(225)
一、生物素-抗生物素蛋白技术	(226)
二、碱性磷酸酶-抗碱性磷酸酶技术	(228)
三、间接免疫荧光法	(229)
四、酶联免疫过滤法(EIF)	(233)
第二节 检测单个细胞分泌的细胞因子	(234)
一、反相溶血空斑试验	(234)
二、细胞斑点试验	(238)
三、酶联免疫斑点试验(ELISPOT)	(239)
第三节 检测细胞内的细胞因子	(243)
一、细胞培养和固定	(243)
二、用荧光标记的单克隆抗体染色	(244)
第十二章 抗细胞因子抗体的制备和鉴定	(247)
第一节 选择免疫原	(247)
第二节 多肽和载体蛋白的连接	(249)
一、同源双功能交联剂	(249)
二、异源双功能交联剂	(251)
第三节 选择动物	(252)
第四节 佐剂	(252)
第五节 免疫程序	(253)
一、免疫动物	(253)
二、动物采血	(254)
第六节 单克隆抗体的制备	(255)

一、与细胞融合有关的因素及溶液配制	(256)
二、杂交瘤的制备方法	(259)
第七节 鉴定抗体和测定蛋白含量	(266)
一、抗体的结合能力测定	(266)
二、抗体的蛋白质含量测定	(270)
第八节 抗体的纯化	(273)
一、IgG 的纯化	(273)
二、IgM 的纯化	(276)
第十三章 细胞因子受体及其信号传导的研究	(278)
第一节 IFN- γ 与受体结合的研究	(279)
一、干扰素的磷酸化标记	(279)
二、受体结合实验	(280)
三、将 [^{32}P]Mu-IFN- γ 共价交联到细胞上	(282)
四、克隆化 Mu-IFN- γ 受体	(283)
第二节 GM-CSF 受体的研究	(284)
一、用地高辛标记重组人 GM-CSF	(285)
二、受体结合试验	(285)
三、受体-配体交联物的 SDS-PAGE 分析	(287)
第三节 用 ^{125}I 标记的 IL-2 研究 IL-2 受体	(287)
一、用 ^{125}I 标记的重组 IL-2 分析 IL-2 受体	(287)
二、IL-2 受体分子量的测定	(289)
第四节 可溶性细胞因子受体的测定	(291)
一、可溶性 IL-2 受体的测定	(291)
二、检测可溶性 IL-1 受体	(291)
第五节 细胞中受体信号传导的研究	(292)
一、肌醇磷酸的测定	(294)
二、G 蛋白和信号传导	(296)
三、磷脂的分析	(299)
四、细胞内钙的测定	(300)
五、测定 cAMP	(302)
六、转录调节因子的研究	(304)
第十四章 细胞因子的分子生物学研究	(306)

第一节 细胞因子基因的克隆和表达	(307)
一、建立细胞因子 cDNA 文库	(307)
二、建立细胞因子基因文库的原则	(310)
第二节 细胞因子基因的 DNA 印迹检测	(310)
一、DNA 分离、纯化和限制性酶消化	(311)
二、凝胶电泳和 Southern 转移	(314)
三、标记探针和 Southern 杂交	(318)
四、影响结果的因素	(322)
第三节 细胞因子 mRNA 的 RNA 印迹实验	(325)
一、提取和保存 RNA 时的注意事项	(325)
二、总 RNA 的提取	(325)
三、RNA 的琼脂糖凝胶电泳	(330)
四、Northern 转移	(331)
五、探针的制备和纯化	(332)
六、DNA 探针与膜上的 RNA 杂交(Northern 杂交)	(332)
第四节 原位杂交	(334)
一、组织或细胞样品的处理	(334)
二、探针的选择和标记	(336)
三、杂交和结果观察	(338)
四、原位杂交研究细胞因子 mRNA 的实例	(341)
第五节 研究细胞因子 mRNA 的聚合酶链反应	(346)
一、RNA 纯化(微量法)	(347)
二、逆转录	(349)
三、PCR 和结果分析	(349)
四、定量 PCR	(352)
第六节 细胞因子的基因研究和基因治疗	(360)
一、转基因动物	(360)
二、基因敲除动物	(360)
三、细胞因子的基因治疗	(362)
第十五章 白细胞介素及其研究方法	(367)
第一节 白细胞介素 1	(367)
一、IL-1 的结构特点	(368)

二、IL-1 的产生及其调节	(371)
三、IL-1 的受体	(373)
四、IL-1 的生物学功能	(374)
五、IL-1 的诱导和纯化方法	(377)
六、IL-1 的检测和研究方法	(379)
七、IL-1 的临床应用研究	(386)
第二节 白细胞介素 2	(387)
一、IL-2 的结构和特点	(388)
二、IL-2 的产生和调节	(389)
三、IL-2 的受体	(389)
四、IL-2 的生物学活性	(393)
五、IL-2 的诱导和纯化方法	(395)
六、IL-2 的检测和研究方法	(397)
七、IL-2 的临床应用和研究	(403)
第三节 白细胞介素 3	(406)
一、IL-3 的结构和特点	(406)
二、IL-3 的产生和调节	(408)
三、IL-3 的受体	(409)
四、IL-3 的生物学活性	(411)
五、IL-3 的诱导和纯化方法	(413)
六、IL-3 的检测和研究方法	(415)
七、IL-3 的临床应用和研究	(417)
第四节 白细胞介素 4	(418)
一、IL-4 的结构和特点	(418)
二、IL-4 的产生和调节	(420)
三、IL-4 的受体	(420)
四、IL-4 的生物学活性	(423)
五、IL-4 生物活性的检测	(426)
六、IL-4 的纯化	(430)
七、IL-4 的临床应用研究	(431)
第五节 白细胞介素 5	(432)
一、IL-5 的结构和特点	(432)

二、IL-5 的产生和调节	(434)
三、IL-5 受体	(434)
四、IL-5 的生物学活性和应用研究	(435)
五、IL-5 的研究方法	(436)
第六节 白细胞介素 6	(443)
一、IL-6 的结构和特点	(444)
二、IL-6 的产生和调节	(446)
三、IL-6 的受体	(447)
四、IL-6 的生物学活性和应用研究	(449)
五、IL-6 的研究方法	(453)
第七节 白细胞介素 7	(458)
一、IL-7 的结构和特点	(459)
二、IL-7 的产生和调节	(460)
三、IL-7 受体	(460)
四、IL-7 的生物学活性和应用研究	(462)
五、IL-7 的研究方法	(464)
第八节 白细胞介素 8 和趋化因子家族	(466)
一、白细胞介素 8	(467)
二、C-X-C 趋化因子	(473)
三、C-C 趋化因子	(477)
四、C 趋化因子和 C-X ₃ -C 趋化因子	(479)
五、趋化因子受体	(480)
六、趋化因子的生物学活性	(482)
七、趋化因子的临床研究	(484)
八、IL-8 和趋化因子的研究方法	(485)
第九节 白细胞介素 9	(487)
一、IL-9 的结构和特点	(487)
二、IL-9 的产生和调节	(488)
三、IL-9 受体	(488)
四、IL-9 的生物学活性及其应用	(489)
五、IL-9 的研究方法	(490)
第十节 白细胞介素 10	(492)

一、IL-10 的结构和特点	(493)
二、IL-10 的产生和调节	(494)
三、IL-10 受体	(495)
四、IL-10 的体外生物学功能	(496)
五、IL-10 的研究方法	(497)
六、IL-10 的体内研究和临床研究	(499)
第十一节 白细胞介素 11	(501)
一、IL-11 的结构和功能	(502)
二、IL-11 的产生和调节	(503)
三、IL-11 的受体	(503)
四、IL-11 的生物学活性和应用研究	(504)
五、IL-11 的研究方法	(505)
第十二节 白细胞介素 12	(507)
一、IL-12 的结构和特点	(507)
二、IL-12 的产生和调节	(509)
三、IL-12 的受体	(510)
四、IL-12 的生物学活性和动物体内研究	(511)
五、IL-12 的临床研究	(514)
六、IL-12 的研究方法	(514)
第十三节 其它白细胞介素	(519)
一、白细胞介素 13	(519)
二、白细胞介素 14	(525)
三、白细胞介素 15	(527)
四、白细胞介素 16	(530)
五、白细胞介素 17	(533)
六、白细胞介素 18	(536)
第十六章 干扰素及其研究方法	(540)
第一节 α 干扰素	(541)
一、IFN- α 的结构和特点	(541)
二、IFN- α 的产生和调节	(544)
三、IFN- α 的受体	(545)
四、IFN- α 的生物学活性	(547)