

Differenzierung von Makrophagen-Vorläufern des Knochenmarks

bei der Maus unter dem Einfluss von Interleukin-2:

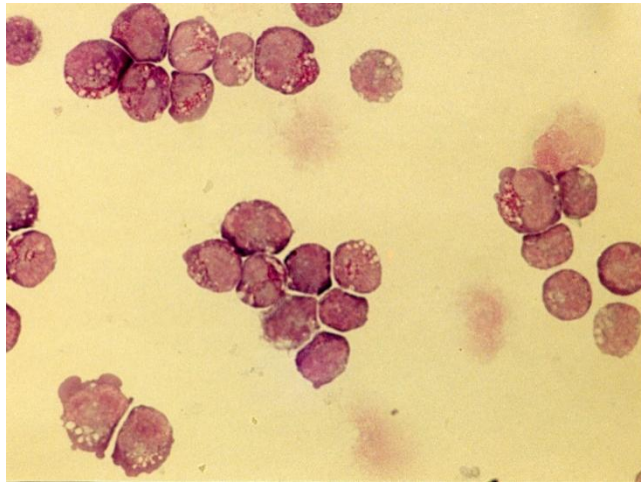
Sind Interleukin-2 aktivierte Makrophagen-Vorläufer

natürliche Killer (NK-) Zellen ? ^①

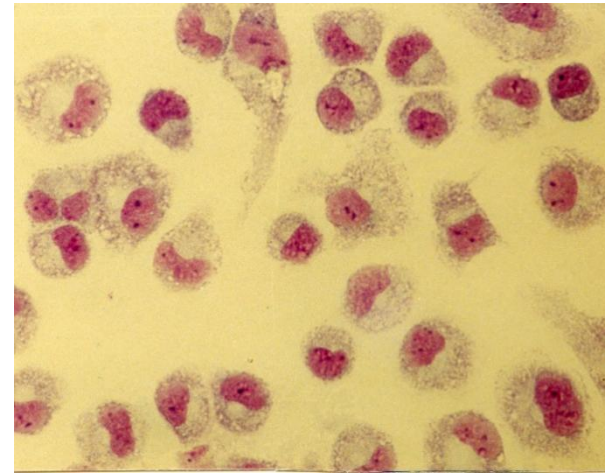
小鼠骨髓巨噬前体细胞在白细胞介素-2 影响下的分化:

被白细胞介素-2 活化的巨噬前体细胞是自然杀伤 (NK-) 细胞 ?

Hao Li 李皓^②



Makrophagen-Vorläufer 巨噬细胞前体



Makrophagen 巨噬细胞

^① <https://www.tib.eu/en/search/id/TIBKAT:168421054>

^② Email: lihao20c@163.com

**Differenzierung von Makrophagen-Vorläufern des Knochenmarks
bei der Maus unter dem Einfluss von Interleukin-2**

Sind Interleukin-2 aktivierte Makrophagen-Vorläufer
natürliche Killer (NK-) Zellen?

vom Fachbereich Biologie
der Universität Hannover

Zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.
genehmigte Dissertation

von

Hao Li

geboren am 13.09.57. in Sichuan, China

Hannover, 1994.

小鼠骨髓巨噬前体细胞在白细胞介素-2 影响下的分化:

白细胞介素-2 活化的巨噬前体细胞是
自然杀伤 (NK-) 细胞吗 ?

来自生物系

汉诺威大学

为获得学位

自然科学博士

Dr.rer.nat.

已通过的论文

提交者

李皓

生于 1957 年 9 月 13 日, 中国四川省

1994 年于汉诺威

Referent: Prof. Dr. M.-L. Lohmann-Matthes

Korreferent: Prof. Dr. H. Kirchhoff

Tag der Promotion: 27. Juni 1994

指导教师: M.-L. Lohmann-Matthes 教授、博士

合作教授: H. Kirchhoff 教授、博士

答辩时间: 1994 年 6 月 27 日

DANKSAGEN

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. M. L. Lohmann-Matthes, die es mir überhaupt erst ermöglicht hat, in Hannover beim Fraunhofer-Institut die Doktorarbeit anzufertigen. Ich danke ihr für die freundliche Überlassung des Themas, für die Betreuung und die wertvollen Hinweise. Ihre ständig wohlwollende Unterstützung und hilfreiche Beratung haben dieser Arbeit sehr zum Gelingen beigetragen.

Frau Prof. Dr. H. Kirchhoff danke ich herzlich für das freundlicherweise übernommene Korreferat.

Frau Dr. E. Kniep danke ich sehr für das Gegenlesen des Manuskriptes und die hilfreiche Kritik.

Bei Dipl. Biol. U. Pohler und Dipl. Biol. J. Lehmann sowie Dr. I. Strehlow möchte ich mich für die Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit sowie die Bereitschaft bei der Lösung von Problemen mitzuhelfen bedanken.

Drs. T. Decker und M. Baccarini danke ich für das stete Interesse und hilfreiche Beratung.

Frau G. Aichert-Brinkmann bin ich für die Anfertigung der Photographien sehr dankbar.

Allen Mitarbeitern der Abt. Immunbiologie des Fraunhofer Institutes in Hannover danke ich herzlich für ein hervorragendes Arbeitsklima, das durch Hilfsbereitschaft besonders geprägt wurde.

Zu guter Letzt danke ich aus ganzem Herz meiner Familie (meinen Eltern, meinem Mann und meiner Schwester), die zwar weit entfernt von mir sind, aber stete Liebe, Ermunterung und Unterstützung an mich geschickt haben.

致谢

我特别感谢教授、博士罗曼-马特斯 (M. L. Lohmann-Matthes) 夫人, 是她给了我这一难得的机会, 在汉诺威弗朗霍夫研究所完成博士论文的研究。我感谢她亲切地将选题交给我, 感谢她的关照与宝贵的指导。她始终仁爱的支持与极富帮助的建议对这项工作的完成助力很大。

我衷心感谢 H. Kirchhoff 教授友善地担任合作考官。

我非常感谢 E. Kniep 博士对论文的审阅与十分有益的指正。

我感谢 U. Pohler 与 J. Lehmann 两位生物学硕士, 还有 I. Strehlow 博士在此项工作的进程中给予的支持以及在解决问题时他们随时提供的帮助。

我感谢 T. Decker 和 M. Baccarini 两位博士始终的关注与很有帮助的指导。

我很感谢 G. Aichert-Brinkmann 女士为冲印论文图片所做的工作。

对于所有在汉诺威弗朗霍夫研究所免疫生物学部工作的同事, 我衷心感谢他们所营造出的卓越的工作氛围, 这个氛围的突出特点是乐于助人。

最后且同样重要的是, 我衷心感谢我的家人 (我的父母, 我的丈夫, 我的妹妹), 他们虽与我相距甚远, 但始终给我送来亲情、鼓励与支持。

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Li, H., U. Pohler, I. Strehlow, S. Hertig, M. Baccharini, A. Emmendorffer, J. Tschopp, and M.-L. Lohmann-Matthes: Macrophage precursor cells produce perforin and perform Yac-1 lytic activity in response to stimulation with interleukin-2. *Journal of Leukocyte Biology*, 56, 117-123, 1994.

Li, H., E. Kniep, A. Emmendorffer and M.-L. Lohmann-Matthes: Differentiation of macrophage precursors to cells with LAK activity under the influence of CSF-1 and high dose IL-2. *Scand. J. Immunol.*, 33, 511-520, 1991.

Li, H., R. Schwinzer, M. Baccharini, and M.-L. Lohmann-Matthes: Cooperative effects of colony-stimulating factor 1 and recombinant interleukin 2 on proliferation and induction of cytotoxicity of macrophage precursors generated from mouse bone marrow cell cultures. *J. Exp. Med.*, 169, 973-986, 1989.

本工作部分内容已发表的文章:

李皓, 罗曼-马特斯等. 巨噬细胞前体产生穿孔素并且实施对 Yac-1 的裂解活性以应答白细胞介素-2 的刺激. *白细胞生物学期刊 (美国)* 1994, 56: 117-123.

李皓, 罗曼-马特斯等. 在 CSF-1 与高剂量 IL-2 的影响下, 巨噬细胞前体分化成为具有 LAK 活性的细胞. *斯堪的纳维亚免疫学期刊 (瑞典)* 1991, 33: 511-520.

李皓, 罗曼-马特斯等. 集落刺激因子-1 与重组白细胞介素-2 对来自小鼠骨髓细胞培养的巨噬细胞前体的增殖与诱导杀伤活性的协同效应. *实验医学期刊 (美国)* 1989, 169: 973-986.

ABSTRAKT

Es ist seit langem bekannt, dass NK-Zellen (natürliche Killer-Zellen) bei der natürlichen Abwehr des Immunsystems gegen neoplastische oder Virusinfizierte Zellen und manche Mikroorganismen eine wichtige Rolle spielen. Dennoch ist die Zellzugehörigkeit der NK-Zellen immer noch nicht geklärt. In der vorliegenden Arbeit wurden mittels der Knochenmark-Kultur die Knochenmark-Vorläuferzellen untersucht, die sich durch Interleukin-2-Aktivierung (NK-Zytotoxizität Stimulation) zu NK-Zellen differenzierten. Es stellte sich heraus, dass diese NK-Zell-Vorläufer aus dem Knochenmark zur Proliferation von myeloischen Wachstumsfaktoren: GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierende Faktor) oder CSF-1 (colony-stimulating factor 1 bzw. Makrophagen-Kolonie-stimulierende Faktor), abhängig waren. Wurden diese NK-Zell-Vorläufer allein mit CSF-1 oder PMA (Phorbol 12-Myristate 13-Acetate), welches die Differenzierung stimuliert, inkubiert, entwickelten sie sich in kurzer Zeit (24-72 Stunden) zu typischen reifen Makrophagen. Deshalb wurden diese Knochenmark-Vorläuferzellen, die fähig waren, zu NK-Zellen zu differenzieren, als Makrophagen-Vorläufer identifiziert.

Interleukin-2 ist der entscheidende Faktor, der die Differenzierung der Makrophagen-Vorläufer des Knochenmarks in die Richtung zu NK-Zellen beeinflusst. Bei der Inkubation mit Interleukin-2 konnten sich diese Makrophagen-Vorläuferzellen innerhalb von 3-6 Tagen zunächst zu typischen NK-Zellen, danach zu deren weiter aktivierten Form LAK-Zellen (Lymphokin-aktivierte-Killer-Zellen) entwickeln. Die Zelltypen wurden durch morphologische, phänotypische, und funktionelle Untersuchungen bestimmt.

Die Ergebnisse aus dieser Arbeit deuten an, dass NK-/LAK-Zellen wahrscheinlich aus dem Makrophagen-system abstammen.

摘要

人们早已知道, 在免疫系统对抗肿瘤或者病毒感染的细胞以及某些微生物的天然防御中, 自然杀伤细胞 (Natural Killer Cells, NK 细胞) 发挥着重要的作用。然而, NK 细胞的细胞谱系一直未被阐明。本工作借助于骨髓细胞培养, 研究了骨髓中的前体细胞, 它们通过白细胞介素-2 (Interleukin-2, IL-2) 的活化 (刺激产生 NK 杀伤活性) 能够分化成为 NK 细胞。原来, 这些来自骨髓的 NK 前体细胞的增殖依赖于髓细胞的生长因子: 粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF) 或者集落刺激因子-1 (colony-stimulating factor-1, CSF-1, 也就是巨噬细胞集落刺激因子)。将这些 NK 前体细胞单独地与 CSF-1 或者 PMA (Phorbol 12-Myristate 13-Acetate, 佛波酯) 进行培养, 在较短时间内 (24-72 小时) 这些前体细胞发育成为典型的成熟巨噬细胞。因此, 这些骨髓中的前体细胞——其有能力分化成为 NK 细胞——被鉴定为巨噬细胞前体 (Macrophage Precursors)。

白细胞介素-2 是影响骨髓巨噬细胞前体朝着 NK 细胞方向分化的决定性因子。在与白细胞介素-2 培养时, 这些巨噬细胞前体能够在 3-6 天内首先发育成为典型的 NK 细胞, 然后成为它们进一步的活化形式 LAK 细胞 (lymphokine-activated killer cells, 淋巴因子活化后的杀伤细胞)。细胞的类型通过形态、表型与功能的研究得以确认。

来自本工作的实验结果表明: NK/LAK 细胞可能来自巨噬细胞系。

INHALTSVERZEICHNIS

Abbildungsverzeichnis / VI

Tabellenverzeichnis / VIII

Abkürzungsverzeichnis / X

1. Einleitung / 1

1.1. NK-Zellen und Makrophagen-Vorläufer / 1

1.2. IL-2 und IL-2 Rezeptor / 3

1.3. LAK-Zellen und ihre Beziehung zu NK-Zellen / 5

1.4. Mechanismus der NK/LAK-Zytotoxizität und das Membranloch-bildende Perforin / 7

1.5. Regulatorische Funktion der NK-Zellen / 8

1.6. Ziel der Arbeit / 11

2. Material und Methoden / 12**Material**

2.1. Tiere / 12

2.2. Chemikalien / 12

2.3. Zytokine / 15

2.4. Antikörper / 16

2.5. Enzyme / 19

2.6. Isotope / 19

2.7. Medien

2.7.1. RPMI 1640 Medium / 20

2.7.2. Vollmedium / 20

2.7.3. L-Zell "konditioniertes" Medium / 20

2.7.4. Iscove's Medium / 20

2.8. Puffer und Lösungen**2.8.1. für die zellbiologische Arbeit**2.8.1.1. PBS⁺-MC (Phosphat gepufferte Kochsalzlösung) / 21

2.8.1.2. Actinomycin D Lösung / 21

2.8.1.3. Glycerin-Gelatine-Lösung / 21

2.8.1.4. Gepufferte Formalin-Aceton-Lösung / 22

2.8.1.5. 2-ME/Hepes Stammlösung / 22

内容目录

图片目录 / VI

表格目录 / VIII

缩写目录 / X

1. 绪论 / 1

1.1 NK 细胞与巨噬细胞前体 / 1

1.2 白细胞介素-2 与白细胞介素-2 受体 / 3

1.3 LAK 细胞及它们与 NK 细胞的关系 / 5

1.4 NK/LAK 杀伤活性的机理与建造膜孔的穿孔素 / 7

1.5 NK 细胞的调节功能 / 8

1.6 本工作的目标 / 11

2. 材料与方法 / 12**材料**

2.1 动物 / 12

2.2 化学药品 / 12

2.3 细胞因子 / 15

2.4 抗体 / 16

2.5 酶 / 19

2.6 同位素 / 19

2.7 培养液

2.7.1 RPMI 1640 培养液 / 20

2.7.2 全培养液 / 20

2.7.3 L-细胞条件培养液 / 20

2.7.4 Iscove's 培养液 / 20

2.8 缓冲液与溶液**2.8.1 用于细胞生物学工作**2.8.1.1 PBS⁺-MC (磷酸盐缓冲生理盐水) / 21

2.8.1.2 放线菌素 D 溶液 / 21

2.8.1.3 甘油明胶液 / 21

2.8.1.4 缓冲型福尔马林-丙酮液 / 22

2.8.1.5 2-巯基乙醇/Hepes 母液 / 22

- 2.8.1.6. MTT-Lösung / 23
- 2.8.1.7. MTT-Abstopplösung / 23
- 2.8.1.8. Percoll Stammlösung / 23
- 2.8.1.9. Puffer für die Esterase-Doppelfärbung / 23
- 2.8.1.10. Trypsin/EDTA-Lösung / 24

2.8.2. für ELISA, FACS und histochemische Färbung

- 2.8.2.1. TBS-Puffer / 25
- 2.8.2.2. DAB-H₂O₂-Lösung / 25
- 2.8.2.3. ELISA-Waschpuffer / 25
- 2.8.2.4. FACS-Waschpuffer / 25
- 2.8.2.5. Fast-Red-Lösung / 26
- 2.8.2.6. TMS-Puffer (Alkalische Phosphatase Puffer) / 26

2.8.3. für die molekularbiologische Arbeit

- 2.8.3.1. 20×SSC Lösung / 26
- 2.8.3.2. 50×Denhardt's Lösung / 27
- 2.8.3.3. DEPC-H₂O / 27
- 2.8.3.4. DMSO-Mix / 27
- 2.8.3.5. Hybridisierungspuffer für den Northern-Blot / 27
- 2.8.3.6. Hybridisierungspuffer für die *in situ* Hybridisierung / 27
- 2.8.3.7. 5×RNA-Probenpuffer / 28
- 2.8.3.8. Lösung D / 28
- 2.8.3.9. 10×TE-Puffer / 29

2.9. Zelllinien

- 2.9.1. D10.G4.1 / 29
- 2.9.2. FDCP-1 / 29
- 2.9.3. L929 / 29
- 2.9.4. P815 / 30
- 2.9.5. 7TD1 / 30
- 2.9.6. Yac-1 / 30

Methoden

2.10. Zellisolierung, -kultur, -reinigung und -aktivierung

- 2.10.1. Isolierung der Knochenmarkzellen / 31

- 2.8.1.6 MTT-溶液 / 23
- 2.8.1.7 MTT-终止液 / 23
- 2.8.1.8 Percoll 母液 / 23
- 2.8.1.9 用于酯酶双染色的缓冲液 / 23
- 2.8.1.10 胰蛋白酶/EDTA 溶液 / 24

2.8.2 用于 ELISA、FACS 与组织化学染色

- 2.8.2.1 TBS 缓冲液 / 25
- 2.8.2.2 DAB-H₂O₂ 溶液 / 25
- 2.8.2.3 ELISA 洗涤缓冲液 / 25
- 2.8.2.4 FACS 洗涤缓冲液 / 25
- 2.8.2.5 固红溶液 / 26
- 2.8.2.6 TMS 缓冲液 (碱性磷酸酶缓冲液) / 26

2.8.3 用于分子生物学工作

- 2.8.3.1 20×SSC 溶液 / 26
- 2.8.3.2 50×Denhardt's 溶液 / 27
- 2.8.3.3 DEPC 水 / 27
- 2.8.3.4 DMSO 混合液 / 27
- 2.8.3.5 用于 Northern 印迹杂交的杂交缓冲液 / 27
- 2.8.3.6 用于原位杂交的杂交缓冲液 / 27
- 2.8.3.7 5×RNA-样品缓冲液 / 28
- 2.8.3.8 溶液 D / 28
- 2.8.3.9 10×TE 缓冲液 / 29

2.9 细胞株

- 2.9.1 D10.G4.1 / 29
- 2.9.2 FDCP-1 / 29
- 2.9.3 L929 / 29
- 2.9.4 P815 / 30
- 2.9.5 7TD1 / 30
- 2.9.6 Yac-1 / 30

方法

2.10 细胞的分离、培养、纯化与活化

- 2.10.1 骨髓细胞的分离 / 31

- 2.10.2. Percoll-Gradient Fraktionierung / 31
- 2.10.3. Knochenmark (KM)-Vorkultur / 32
- 2.10.4. Isolierung der Makrophagen-Vorläufer aus KM-Vorkultur / 33
- 2.10.5. Depletion der phagozytischen Zellen / 33
- 2.10.6. Depletion der Lymphozyten mit magnetischen Beads / 33
- 2.10.7. Hauptkultur und LAK-Kultur / 34
- 2.10.8. Aktivierung der KM-Makrophagen-Vorläufer zur Zytokin-Produktion / 34

2.11. Zellfärbungen

- 2.11.1. Zytopräparate / 34
- 2.11.2. Zellkultur in Chamber Slides / 35
- 2.11.3. Esterase-Doppelfärbung / 35
- 2.11.4. Fluoreszenzfärbung der Zelloberflächenmarker / 36
- 2.11.5. Immunhistochemische Färbung mit AP-konjugiertem Antikörper / 36
- 2.11.6. Pappenheimfärbung (May-Grünwald/Giemsa-Färbung) / 37

2.12. Tests

- 2.12.1. [³H] Thymidin Einbau zum Test der Zellproliferation / 37
- 2.12.2. [⁵¹Cr] Freisetzung aus Zielzellen zum Test der Zytotoxizität / 38
- 2.12.3. Test der Kalzium-Abhängigkeit der Zytotoxizität / 39
- 2.12.4. MTT-Test (kolorimetrischer Bioassay) / 39
- 2.12.5. Enzymgebundener Immunoassay (ELISA) / 40
- 2.12.6. Soft-Agar Assay / 40

2.13. Nachweis der Zytokine

- 2.13.1. IL-1 / 41
- 2.13.2. IL-6 / 41
- 2.13.3. IL-10 / 42
- 2.13.4. M-CSF / 42
- 2.13.5. GM-CSF und IL-3 / 42
- 2.13.6. IFN- γ / 43
- 2.13.7. TNF- α / 43

2.14. Nachweis der mRNA von speziellen Proteinen

2.14.1. Northern-Blot

- 2.14.1.1. Markierung einer cDNA-Probe mit [³²P] / 43

- 2.10.2. Percoll 密度梯度离心分离法 / 31
- 2.10.3. 骨髓细胞前培养 / 32
- 2.10.4. 分离来自骨髓细胞前培养的巨噬细胞前体 / 33
- 2.10.5. 去除吞噬细胞 / 33
- 2.10.6. 用磁珠去除淋巴细胞 / 33
- 2.10.7. 主培养与 LAK 培养 / 34
- 2.10.8. 活化骨髓巨噬细胞前体促其产生细胞因子 / 34

2.11 细胞的染色

- 2.11.1. 制备细胞涂片 / 34
- 2.11.2. 腔室载玻片中的细胞培养 / 35
- 2.11.3. 酯酶双染色 / 35
- 2.11.4. 细胞表面标志物的荧光染色 / 36
- 2.11.5. 使用碱性磷酸酶偶联抗体的免疫组化染色 / 36
- 2.11.6. 帕彭海姆染色法 (May-Grunwald-Giemsa 染色法) / 37

2.12 检测

- 2.12.1. ³H-胸腺嘧啶核苷掺入法测定细胞的增殖 / 37
- 2.12.2. 从靶细胞释放出的 ⁵¹Cr 来测定细胞杀伤活性 / 38
- 2.12.3. 检测细胞杀伤活性的钙依赖性 / 39
- 2.12.4. MTT 实验 (比色法生物检测) / 39
- 2.12.5. 酶联免疫吸附测定 (ELISA) / 40
- 2.12.6. 软琼脂检测法 / 40

2.13 细胞因子的检出

- 2.13.1. 白细胞介素-1 / 41
- 2.13.2. 白细胞介素-6 / 41
- 2.13.3. 白细胞介素-10 / 42
- 2.13.4. 巨噬细胞集落刺激因子 / 42
- 2.13.5. 粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子与白细胞介素-3 / 42
- 2.13.6. γ -干扰素 (IFN- γ) / 43
- 2.13.7. 肿瘤坏死因子- α (TNF- α) / 43

2.14 特定蛋白信使 RNA 的检出

2.14.1 Northern 印迹杂交

- 2.14.1.1. 用 [³²P] 标记互补 DNA (cDNA) 探针 / 43

- 2.14.1.2. RNA-Präparation / 44
- 2.14.1.3. RNA-Trennung und Blot / 45
- 2.14.1.4. Hybridisierung und Nachweis der RNA / 46

2.14.2. *in situ* Hybridisierung

- 2.14.2.1. cDNA-Markierung mit Digoxigenin (DIG) / 46
- 2.14.2.2. Zellfixierung und Permeabilisierung / 47
- 2.14.2.3. Hybridisierung / 47
- 2.14.2.4. Immunologischer Nachweis mit anti-DIG Antikörper / 48

2.15. Statistische Analyse / 49

3. Ergebnisse / 50

3.1. Anreicherung und Kultur für NK-aktive Zellen aus Knochenmark

- 3.1.1. Anreicherung der NK-Vorläufer aus den gesamten Knochenmarkszellen / 50
- 3.1.2. Mikroskopische Untersuchung der Knochenmarkszellen in verschiedenen Percoll-Fraktionen / 51
- 3.1.3. Proliferation der NK-Vorläufer haltigen Zellpopulation / 52
- 3.1.4. Effektive Knochenmark-Kultur für proliferierende und NK-aktive Zellen / 54
- 3.1.5. Reinigung der NK-aktiven Zellen nach KM-Kultur in CSF + IL-2 / 56

3.2. Eigenschaften der durch IL-2 induzierten, NK-aktiven Makrophagen-Vorläuferzellen

- 3.2.1. Morphologie und Phänotyp der NK-aktiven Makrophagen-Vorläuferzellen / 59
- 3.2.2. Faktor-Abhängigkeit der Zellproliferation / 61
- 3.2.3. Faktor-Abhängigkeit der Zytotoxizität / 62
- 3.2.4. Zielzellen-Selektivität der Effektorzellen / 64
- 3.2.5. Morphologische Entwicklung der Zellen beim Entzug von IL-2 / 65

3.3. Induktion von LAK-Aktivität in NK-ähnlichen Makrophagen-Vorläuferzellen

- 3.3.1. Aktivierung zur LAK-Aktivität durch Stimulierung mit hohen Dosen IL-2 / 67
- 3.3.2. Kinetik der LAK-Induktion / 68
- 3.3.3. Morphologie der aus NK-ähnlichen Makrophagen-Vorläufer entwickelten LAK-Zellen / 69
- 3.3.4. Phänotyp der aus NK-ähnlichen Makrophagen-Vorläufer entwickelten LAK-Zellen / 71

- 2.14.1.2 RNA 的制备 / 44
- 2.14.1.3 RNA 的分离与印迹法 / 45
- 2.14.1.4 RNA 的杂交与检出 / 46

2.14.2 原位杂交

- 2.14.2.1 使用地高辛 (DIG) 的 cDNA 标记法 / 46
- 2.14.2.2 细胞的固定与通透处理 / 47
- 2.14.2.3 杂交 / 47
- 2.14.2.4 使用抗地高辛抗体的免疫检出法 / 48

2.15 统计学分析 / 49

3. 结果 / 50

3.1 从骨髓细胞中富集与培养有 NK 活性的细胞

- 3.1.1 从全骨髓细胞中富集 NK 前体细胞 / 50
- 3.1.2 显微镜观察在不同的 Percoll 分离层中的骨髓细胞 / 51
- 3.1.3 含有 NK 前体的细胞群的增殖 / 52
- 3.1.4 为获得增殖且有 NK 活性细胞的有效骨髓培养 / 54
- 3.1.5 在 CSF+IL-2 骨髓培养后, 纯化有 NK 活性的细胞 / 56

3.2 被 IL-2 诱导的、有 NK 活性的巨噬细胞前体的特性

- 3.2.1 有 NK 活性的巨噬细胞前体的形态与表型 / 59
- 3.2.2 细胞增殖的因子依赖性 / 61
- 3.2.3 细胞杀伤活性的因子依赖性 / 62
- 3.2.4 效应细胞对靶细胞的选择性 / 64
- 3.2.5 移除 IL-2 后, 细胞的形态发育 / 65

3.3 在近似 NK 的巨噬细胞前体中诱导 LAK 活性

- 3.3.1 通过高剂量 IL-2 的刺激来活化产生 LAK 活性 / 67
- 3.3.2 诱导 LAK 的动力学 / 68
- 3.3.3 近似 NK 的巨噬细胞前体发展而成的 LAK 细胞的形态 / 69
- 3.3.4 近似 NK 的巨噬细胞前体发展而成的 LAK 细胞的表型 / 71

3.4. Perforin Produktion von Makrophagen-Vorläuferzellen

- 3.4.1. Kalzium-Abhängigkeit der Zytotoxizität / 72
- 3.4.2. Nachweis der Perforin mRNA durch Northern-Blot / 73
- 3.4.3. Nachweis der Perforin mRNA durch *in situ* Hybridisierung / 75
- 3.4.4. Nachweis des Perforin Proteins durch immunhistochemische Färbung / 77

3.5. Zytokine-Freisetzung von NK-aktiven Makrophagen-Vorläuferzellen

- 3.5.1. Freisetzung von regulatorischen Faktoren nach Stimulierung mit Zielzellen und Zytokinen / 78
 - 3.5.1.1. TNF- α / 78
 - 3.5.1.2. IL-1 / 80
 - 3.5.1.3. IL-6 / 81
 - 3.5.1.4. IL-10 / 82
 - 3.5.1.5. IFN- γ / 83
- 3.5.2. Freisetzung von regulatorischen Faktoren nach Stimulierung mit Phorbolster/Ca²⁺-Ionophor / 85
- 3.5.3. Produktion von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren / 86
 - 3.5.3.1. GM-CSF und IL-3 / 86
 - 3.5.3.2. M-CSF / 86

4. Diskussion / 91

- 4.1. Sind NK-Zellen IL-2 aktivierte Makrophagen-Vorläufer? / 91
- 4.2. Differenzierung der Makrophagen-Vorläufer des Knochenmarks unter dem Einfluss von CSF-1 und IL-2 / 96
- 4.3. *in vivo* Anwendung der kultivierten LAK-Zellen und Analyse der Ursache für die Nebenwirkungen der Immuntherapie mit LAK-Zellen plus hoch Dosen IL-2 / 101
- 4.4. Vergleich der Eigenschaften von den unstimulierten Makrophagen-Vorläufern, den durch IL-2 stimulierten Makrophagen-Vorläufern, und den in der Literatur beschriebenen NK/LAK-Zellen / 102

5. Zusammenfassung / 105**6. Literatur / 107****3.4 巨噬细胞前体产生穿孔素**

- 3.4.1 细胞杀伤活性的钙依赖性 / 72
- 3.4.2 通过 Northern 印迹杂交法检定穿孔素 mRNA / 73
- 3.4.3 通过原位杂交法检定穿孔素 mRNA / 75
- 3.4.4 通过免疫组化染色法检定穿孔素蛋白 / 77

3.5 有 NK 活性的巨噬细胞前体对细胞因子的释放

- 3.5.1 被靶细胞与细胞因子刺激后对调节因子的释放 / 78
 - 3.5.1.1 肿瘤坏死因子- α / 78
 - 3.5.1.2 白细胞介素-1 / 80
 - 3.5.1.3 白细胞介素-6 / 81
 - 3.5.1.4 白细胞介素-10 / 82
 - 3.5.1.5 γ -干扰素 / 83
- 3.5.2 被佛波酯 (PMA) 或钙离子载体刺激后对调节因子的释放 / 85
- 3.5.3 产生造血生长因子 / 86
 - 3.5.3.1 粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子与白细胞介素-3 / 86
 - 3.5.3.2 巨噬细胞集落刺激因子 / 88

4. 讨论 / 91

- 4.1 NK 细胞是 IL-2 活化的巨噬细胞前体吗? / 91
- 4.2 骨髓巨噬细胞前体在 CSF-1 与 IL-2 影响下的分化 / 96
- 4.3 体内应用培养的 LAK 细胞与 LAK 细胞加高剂量 IL-2 免疫治疗副作用的原因分析 / 101
- 4.4 未受刺激的巨噬细胞前体、受到 IL-2 刺激的巨噬细胞前体与文献描述的 NK/LAK 细胞的特性比较 / 102

5. 总结 / 105**6. 参考文献 / 107**

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

图片目录

- Abb.1 Frisch isolierte gesamte Knochenmarkszellen / 50
- Abb.2 Proliferation der KM-Zellen von Percoll-Fraktion 32%/52% / 53
- Abb.3 Zellproliferation in Gegenwart von rekombinanten CSFs / 54
- Abb.4 Einfluss des Zeitpunktes der Zugabe von IL-2 auf die Induktion der NK-Aktivität / 55
- Abb.5 Morphologie der gereinigten Makrophagen-Vorläufer (MV-Zellen) / 58
- Abb.6 Die aus der gereinigten MV-Zellen ausgereiften Makrophagen / 58
- Abb.7 Die aus der KM-Vorkultur mit CSF + IL-2 gewonnene, zytoplasmatische Granula-haltige, NK-aktive MV-Zelle / 59
- Abb.8 Die aus der KM-Vorkultur allein mit CSF gewonnene, agranuläre, NK-inaktive MV-Zelle / 59
- Abb.9 Oberflächenantigen-Profile der NK-aktiven MV-Zellpopulation / 60
- Abb.10 Faktor-Abhängigkeit der Proliferation von NK-ähnlichen MV-Zellen / 61
- Abb.11 Kinetik der NK-Aktivität in Gegenwart von CSF-1 + IL-2 / 62
- Abb.12 Verlust der Zytotoxizität nach Entzug von IL-2 / 63
- Abb.13 Target-Selektivität von NK-aktiven MV-Zellen / 64
- Abb. 14 Die von NK-ähnlichen Makrophagen-Vorläufern nach 3-tägiger Kultur mit CSF-1 ausgereiften Makrophagen / 65

- 图 1 新鲜分离的全骨髓细胞 / 50
- 图 2 Percoll 32%/52% 分离层中骨髓细胞的增殖 / 53
- 图 3 在重组 CSFs 存在下的细胞增殖 / 54
- 图 4 添加 IL-2 的时间点对诱导 NK 活性的影响 / 55
- 图 5 纯化的巨噬细胞前体的形态 / 58
- 图 6 由纯化的巨噬细胞前体快速成熟的巨噬细胞 / 58
- 图 7 来自 CSF+IL-2 骨髓细胞前培养、含有细胞质颗粒、有 NK 活性的巨噬细胞前体 / 59
- 图 8 来自单用 CSF 骨髓细胞前培养、无细胞质颗粒、无 NK 活性的巨噬细胞前体 / 59
- 图 9 有 NK 活性的巨噬细胞前体群的表面抗原状态 / 60
- 图 10 近似 NK 的巨噬细胞前体增值的因子依赖性 / 61
- 图 11 在 CSF-1+IL-2 存在下的 NK 活性动力学 / 62
- 图 12 移除 IL-2 后, 杀伤活性的丧失 / 63
- 图 13 有 NK 活性的巨噬细胞前体对靶细胞的选择性 / 64
- 图 14 近似 NK 的巨噬细胞前体在与 CSF-1 培养 3 天后发育为成熟的巨噬细胞 / 65

- Abb. 15 Phänotyp (Oberflächenantigen-Profile) der von NK-ähnlichen Makrophagen-Vorläufern gewonnenen reifen Makrophagen / 66
- Abb.16 Morphologie der von NK-ähnlichen Makrophagen-Vorläufern nach 3-tägiger Kultur mit CSF-1 + IL-2 entwickelten Zellen / 66
- Abb.17 Kinetik der LAK-Induktion in IL-2 stimulierten MV-Zellen / 69
- Abb.18 Morphologie der LAK-Effektorzellen, isoliert am Tag 4 der LAK-Kultur / 70
- Abb.19 Fragmentierung der LAK-Zellen, beobachtet am Tag 9 der LAK-Kultur / 70
- Abb.20 Phänotyp (Oberflächenantigen-Profile) der LAK-Effektorzellen, isoliert am Tag 4 der LAK-Kultur / 71
- Abb.21 Kalzium-Abhängigkeit der Zytotoxizität von NK/LAK-ähnlichen MV-Zellen / 73
- Abb.22 Northern-Blot Analyse für die Exprimierung der Perforin-Messenger-RNA durch MV-Zellen / 74
- Abb.23 Ergebnis von *in situ* Hybridisierung mit cDNA gegen Perforin / 76
- Abb.24 Immunhistochemische Färbung mit mAk gegen murines Perforin / 77
- Abb.25 Eine Hypothese über die Differenzierungsmöglichkeiten der Makrophagen-Vorläufer des Knochenmarks / 96
- 图 15 从近似 NK 的巨噬细胞前体获得的成熟巨噬细胞的表型 (表面抗原状态) / 66
- 图 16 近似 NK 的巨噬细胞前体在 CSF-1+IL-2 中培养 3 天后发育而成的细胞形态 / 66
- 图 17 在 IL-2 刺激后的巨噬细胞前体中诱导 LAK 的动力学 / 69
- 图 18 LAK 效应细胞的形态, 细胞来自 LAK 培养的第 4 天 / 70
- 图 19 LAK 细胞的碎裂, 在 LAK 培养第 9 天观察到 / 70
- 图 20 LAK 效应细胞的表型 (表面抗原状态), 细胞来自 LAK 培养第 4 天 / 71
- 图 21 近似 NK/LAK 的巨噬细胞前体杀伤活性的钙依赖性 / 73
- 图 22 Northern 印迹杂交分析巨噬细胞前体对穿孔素信使 RNA 的表达 / 74
- 图 23 使用对应穿孔素 mRNA 的互补 DNA 原位杂交的结果 / 76
- 图 24 使用抗小鼠穿孔素的单克隆抗体免疫组化染色的结果 / 77
- 图 25 一个关于骨髓巨噬细胞前体分化可能性的推测示意图 / 96

TABELLENVERZEICHNIS

表格目录

Tab. A	Zytokin-Produktion von NK-Zellen (Daten aus der Literatur) / 10
Tab. 1	Zytotoxizität verschiedener Percoll-Fraktionen aus murinem Knochenmark gegen Yac-1 Tumorzellen nach IL-2 Stimulation / 51
Tab. 2	Zelltypen in den verschiedenen Fraktionen von Percoll-Gradient I / 52
Tab. 3	Zellzusammensetzung in den Fraktionen von Percoll-Gradient II / 56
Tab. 4	NK-Aktivität und Zellzahl in jeder Fraktion von Percoll-Gradient II / 57
Tab. 5	Wirkung von IL-2-Dosen auf NK-ähnliche MV-Zellen / 68
Tab. 6	Zytotoxizität gegen Yac-1 von verschiedenen MV-Zellproben / 75
Tab. 7	Freisetzung von TNF aus MV-Zellen nach Stimulierung durch Tumorzellen / 79
Tab. 8	Freisetzung von IL-1 aus MV-Zellen nach Stimulierung durch Tumorzellen / 80
Tab. 9	Freisetzung von IL-6 aus MV-Zellen bei Aktivierung mit IL-2 und Yac-1 / 81
Tab. 10	Freisetzung von IL-10 aus MV-Zellen / 83
Tab. 11	Freisetzung von IFN- γ aus MV-Zellen / 84
Tab. 12	Zytokin-Freisetzung aus MV-Zellen nach Aktivierung durch PMA und Ionomycin / 85
Tab. 13	Freisetzung von GM-CSF oder IL-3 aus den stimulierten MV-Zellen / 87

表 A	NK 细胞产生的细胞因子 (数据来自文献) / 10
表 1	IL-2 刺激后, 不同的 Percoll 分离层中的小鼠骨髓细胞对 YAC-1 肿瘤细胞的杀伤活性 / 51
表 2	Percoll 密度梯度液 I 的不同分离层中的细胞类型 / 52
表 3	Percoll 密度梯度液 II 的各分离层中的细胞组成 / 56
表 4	Percoll 密度梯度液 II 的每个分离层中的 NK 活性与细胞数量 / 57
表 5	IL-2 的剂量对近似 NK 的巨噬细胞前体的作用 / 68
表 6	不同的巨噬细胞前体样品对 YAC-1 的杀伤活性 / 75
表 7	使用肿瘤细胞刺激后, 巨噬细胞前体对 TNF 的释放 / 79
表 8	使用肿瘤细胞刺激后, 巨噬细胞前体对 IL-1 的释放 / 80
表 9	使用 IL-2 与 Yac-1 活化时, 巨噬细胞前体对 IL-6 的释放 / 81
表 10	巨噬细胞前体对 IL-10 的释放 / 83
表 11	巨噬细胞前体对 IFN- γ 的释放 / 84
表 12	经 PMA、离子霉素活化后, 巨噬细胞前体对细胞因子的释放 / 85
表 13	被刺激的巨噬细胞前体对 GM-CSF 或 IL-3 的释放 / 87

Tab. 14 Produktion von M-CSF durch MV-Zellen / 88

表 14 由巨噬细胞前体产生的 M-CSF / 88

Tab. 15a Kurzfassung der Zytokin-Freisetzung aus NK-aktiven MV-Zellen / 90

表 15a 汇总有 NK 活性的巨噬细胞前体对细胞因子的释放 / 90

Tab. 15b Kurzfassung der Zytokin-Freisetzung aus NK-inaktiven MV-Zellen / 90

表 15b 汇总无 NK 活性的巨噬细胞前体对细胞因子的释放 / 90

Tab. 16 Vergleich der Eigenschaften von MV-Zellen mit denen von NK/LAK Zellen / 103

表 16 比较巨噬细胞前体与 NK/LAK 细胞的特性 / 103

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Ak	Antikörper
AP	alkalische Phosphatase
BSA	Bovines Serum-Albumin
°C	Grad Celsius
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CFU	Koloniebildende-Einheiten, engl. colony forming units
Ci	Curie
Con A	Concanavalin A
cpm	Zerfälle pro Minute, engl. counts per minute
⁵¹ Cr	Chrom-51 (Natriumchromat)
CSF	Kolonie-stimulierende-Faktor
DAB	3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destilliert
DIG	Digoxigenin
DMF	N, N-Dimethylformamid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzymgebundener Immunoassay, engl. Enzyme-linked immunosorbent assay
FACS	Durchflusszytometer, engl. Fluorescence activated cell sorter
FITC	Fluorescein-isothiocyanate
FKS	Fötales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung, engl. Gravity

缩略语目录

Ak	抗体
AP	碱性磷酸酶
BSA	牛血清白蛋白
°C	摄氏度
cDNA	互补脱氧核糖核酸 (能与 mRNA 互补的 DNA 链)
CFU	集落形成单位, 英文: colony forming units
Ci	居里 (放射性活度单位)
Con A	刀豆蛋白 A (一种植物凝集素, 能促进有丝分裂)
cpm	每分钟计数, 英文: counts per minute
⁵¹ Cr	铬-51 (铬酸钠, 常用于测定 NK 细胞的杀伤活性)
CSF	集落刺激因子, 英文: colony-stimulating factor
DAB	3,3'-二氨基联苯胺四盐酸 (过氧化物酶的底物)
DEPC	焦碳酸二乙酯 (一种非特异性 RNA 酶的化学抑制剂)
dest.	蒸馏过的
DIG	地高辛 (具抗原性的小分子, 常用于核酸探针的标记)
DMF	N,N-二甲基甲酰胺 (能与水及多数有机溶剂混溶)
EDTA	乙二胺四乙酸 (能与二价金属离子结合的螯合剂)
ELISA	酶联免疫吸附测定, 英文: Enzyme-linked Immunosorbent assay
FACS	流式细胞仪, 英文: fluorescence activated cell sorter
FITC	异硫氰酸荧光素 (用于抗体的荧光标记)
FKS	胎牛血清
g	重力, 英文: gravity

GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen CSF	GM-CSF	粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子
h	Stunde, engl. hour	h	小时, 英文: hour
Hepes	N-[2-Hydroxyethyl] piperazin-N'-[2-Ethansulfonsäure]	Hepes	N-[2-羟乙基] 哌嗪-N'-[2-乙磺酸] (一种生物缓冲剂)
hr	human rekombinant	hr	人重组的
IFN	Interferon	IFN	干扰素
Ig	Immunglobulin	Ig	免疫球蛋白
IL	Interleukin	IL	白细胞介素
IL-2 R	Interleukin-2 Rezeptor	IL-2 R	白细胞介素-2 受体
Ion.	Ionomycin	Ion.	离子霉素
KM	Knochenmark	KM	骨髓
LAK	Lymphokin-aktivierte Killer	LAK	淋巴因子活化后的杀伤细胞
LGL	große granuläre Lymphozyten, engl. Large granular lymphocytes	LGL	大颗粒淋巴细胞, 英文: large granular lymphocytes
LU	lytische Einheiten	LU	裂解单位 (lytic unit)
L-Zellen	L929-Fibroblastenzellen	L-Zellen	L929 小鼠成纤维细胞株
M	Molar	M	摩尔 (体积克分子浓度: mol/L)
mAk	monoklonaler Antikörper	mAk	单克隆抗体
M-CSF	Makrophagen CSF	M-CSF	巨噬细胞集落刺激因子 (又名: CSF-1)
2-ME	2-Mercaptoethanol	2-ME	2-巯基乙醇 (对细胞培养起抗氧化作用)
mg	Milligramm	mg	毫克
Min	Minute	Min	分钟
ml	Milliliter	ml	毫升 (中文教材规范后写法为: mL)
mM	Millimolar	mM	毫摩尔 (mmol/L)
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure	mRNA	信使核糖核酸 (messenger ribonucleic acid)
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyl-tetrazolium Bromide	MTT	3-[4,5-二甲基噻唑-2]-2,5-二苯基-四氮唑溴盐 (简称噻唑兰, 在活细胞中从黄色变为紫色)

MV	Makrophagen-Vorläufer	MV	巨噬前体细胞
Mφ	Makrophagen	Mφ	巨噬细胞
NBT	Nitroblau tetrazolium Salz	NBT	氮蓝四唑盐 (用于碱性磷酸酶参与的免疫组化染色)
NK	natürliche "Killer"	NK	自然杀伤细胞 (natural killer)
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung, engl. phosphate buffered saline	PBS	磷酸盐缓冲盐水溶液 英文: phosphate buffered saline
PMA	Phorbol 12-Myristate 13-Acetate	PMA	佛波醇 12-肉豆蔻酸 13-乙酸酯 (简称: 佛波酯)
PMN	polymorphkernige neutrophile Leukozyten	PMN	多形核中性粒细胞 (polymorphonuclear neutrophils)
POD	Peroxidase	POD	过氧化物酶
RT	Raumtemperatur	RT	室温
SDS	Natriumdodecylsulfat, engl. sodium dodecyl sulfate	SDS	十二烷基硫酸钠, 英文: sodium dodecyl sulfate
Sek.	Sekunde	Sek.	秒
spez.	spezifisch	spez.	特异的
SR	spontane Freisetzung, engl. spontaneous release	SR	自发释放, 英文: spontaneous release
Stdn.	Stunden	Stdn.	小时
TBS	Tris-Puffer-Salzlösung	TBS	三羟甲基氨基甲烷缓冲盐水溶液 (tris buffered saline)
TCR	T-Zell-Rezeptor	TCR	T 细胞受体 (T cell receptor)
TE	Tris-EDTA	TE	Tris-EDTA (三羟甲基氨基甲烷 + EDTA 的缓冲液)
TMS	Tris-Magnesium-Salzlösung	TMS	Tris-镁-盐水溶液 (tris magnesium saline)
TNF	Tumornekrosefaktor	TNF	肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor)
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan	Tris	三羟甲基氨基甲烷 (一种可控制 pH 值的胺类化合物)
U	Einheit, engl. unit	U	单位, 英文: unit
Upm	Umdrehungen pro Minute	Upm	转/分钟
VM	Vollmedium	VM	全培养液

1.EINLEITUNG

1.1. NK-Zellen und Makrophagen-Vorläufer

Vor 20 Jahren entdeckten mehrere Gruppen von Wissenschaftlern während ihren Studien der Zell-vermittelten-Zytotoxizität zufällig die natürlichen Killerzellen [Rosenberg et al. 1972; Takasugi et al. 1973]. Die Forscher wünschten, eine spezifische zytotoxische Aktivität von Zellen aus Tumor-tragenden Patienten gegen autologe Tumorzellen oder gegen allogene Tumoren des ähnlichen oder gleichen histologischen Typs zu finden, und fanden eine Zytotoxizität von "Lymphozyten" aus normalen Individuen. Diese Art zytotoxischer Aktivität unterscheidet sich von der Aktivität zytotoxischer T-Lymphozyten durch folgende Eigenschaften: (i) Sie zeigt keine MHC-Restriktion [Kiessling et al. 1975]; (ii) Sie scheint nicht von der Antigenen Sensibilisierung abhängig zu sein und zeigt keine spezifische "secondary memory" Antwort [Herberman et al. 1975]. Diese zytotoxischen Zellen können spontan die für diese Form der Zytotoxizität empfindlichen, sogenannten NK-Zielzellen, wie z.B. syngene, allogene, und xenogene Tumorzellen (Leukemiezellen, Karzinomzellen und andere Typen [Herberman & Holden 1978]), Virus-infizierte Zellen (z.B. Herpes und Influenza Virus [Biron & Welsh 1982]), und sogar manche Mikroorganismen [Nencioni et al. 1983; Morgan et al. 1984] zerstören. Deshalb wurde diese spontane zytotoxische Aktivität "Natural Killing"-Aktivität genannt und die dafür verantwortlichen Effektor-Zellen als NK-Zellen bezeichnet. Gleich nach ihrer Entdeckung zeigten funktionelle Experimente im *in vivo* Modell, dass NK-Zellen bei der natürlichen Resistenz gegen Tumoren und Infektions-krankheiten eine wichtige Rolle spielen [Baldwin et al. 1976; Herberman & Holden 1978; und Hanna et al. 1980, 1981].

Zahlreiche Forschungen über NK-Zellen, hauptsächlich über ihre Identität, Ursprung und Zugehörigkeit, wurden in erstem Jahrzehnt nach ihrer Entdeckung gemacht. Obwohl man damals nicht in der Lage war, reine NK-Zellen zu isolieren, sind folgende Eigenschaften von den Zellen, die NK-Aktivität ausübten, übereinstimmend festgestellt worden: (i) NK-

1. 绪论

1.1 NK 细胞与巨噬细胞前体

20 年前, 多个科学工作者团队在他们研究细胞介导的杀伤活性时偶然发现了自然杀伤细胞【Rosenberg 等, 1972 年; Takasugi 等, 1973 年】。这些研究者原本期待在肿瘤患者身上发现一种来自细胞的特异性杀伤活性, 以对抗自体的肿瘤细胞或者对抗同种异体的肿瘤 (有着相近或相同的组织学类型), 而他们发现了一种来自正常个体的“淋巴细胞”的杀伤活性。这种形式的细胞杀伤活性与杀伤性 T 淋巴细胞的活性在以下特征上有所不同: ① 它显示出无 MHC (主要组织相容性复合体) 的限制性【Kiessling 等, 1975 年】; ② 它似乎不依赖于抗原的敏感性, 并显示出无特异性“第二记忆”的应答【Herberman 等, 1975 年】。这种有杀伤活性的细胞能够自发地摧毁对此种杀伤活性敏感的、通常所谓的 NK 靶细胞, 比如: 同基因的、同种异基因的、还有异种的肿瘤细胞 (白血病细胞、癌细胞和其他类型【Herberman 与 Holden, 1978 年】), 病毒感染的细胞 (如疱疹与流感病毒【Biron 与 Welsh, 1982 年】), 甚至某些微生物【Nencioni 等, 1983 年; Morgan 等, 1984 年】。因此, 这种自发的细胞杀伤活性被命名为“自然杀伤” (Natural Killing) 活性, 而对此负责的效应细胞简称为 NK 细胞。在它们被发现后不久, 体内模型的功能性实验表明: 在天然对抗肿瘤和感染性疾病中, NK 细胞发挥着重要的作用【Baldwin 等, 1976 年; Herberman 与 Holden, 1978 年; 及 Hanna 等, 1980 年, 1981 年】。

大量有关 NK 细胞的研究 (主要是关于它们的身份、来源与属性) 在它们被发现的头 10 年中得以开展。虽然人们在那时还没有条件分离出纯的 NK 细胞, 但那些执行 NK 活性的细胞的以下特征已经得到了一致地确

Aktivität wird von Zellen mit LGL ("large granular lymphocytes") Morphologie vermittelt; (ii) NK-Effektorzellen sind nicht adhärenz und nicht phagozytierende Zellen, die im peripheren Blut und in der Milz am häufigsten zu finden sind; (iii) Den NK-Effektorzellen fehlen typische Eigenschaften und Oberflächenmarker von klassischen Makrophagen, Granulozyten, B-Zellen oder T-Zellen [Übersicht von Ortaldo & Herberman 1984; Tutt et al. 1986]. Dank der Herstellung von spezifischen monoklonalen Antikörpern gegen NK-Zellen und der Anwendung von rekombinanten Faktoren in der Zellkultur, wurden ab 1986 die Methoden für Isolierung, Kultur und Analyse der NK-Zellen wesentlich verbessert und die Gewinnung von NK-Zellen mit hohem Reinheitsgrad ermöglicht [Hackett et al. 1986]. 1988 wurde von Fitzgerald-Bocarsly et al. die erste genauere Definition der NK-Zellen publiziert [Fitzgerald-Bocarsly et al. 1988]. Es wurde beschrieben, dass NK-Zellen $CD3^-$, TCR^- große granuläre Lymphozyten sind und dass sie bestimmte Marker (beim Menschen $CD16$ sowie $NKH-1$ und bei der Maus $NK-1.1$ oder $NK-2.1$) auf der Oberfläche exprimieren. NK-Zellen brauchen für ihre zytolytischen Reaktionen nicht die Expressierung von MHC Klasse I oder II Molekülen. Dies ist ein deutlicher Unterschied zwischen NK-Zellen und T-Zellen, dennoch hat es die Zugehörigkeit der NK-Zellen nicht ausreichend geklärt.

Durch ein Transplantationsexperiment von Haller et al. 1977 ist festgestellt worden, dass die Vorläufer der NK-Zellen aus dem Knochenmark kommen [Haller et al. 1977]. 10 Jahre später konnte durch *in vitro* Untersuchungen gezeigt werden, dass $IL-2$ der essentielle Faktor ist, der die Entwicklung dieser Knochenmark-Vorläufer von NK-inaktiver Form zu NK-aktiven Effektor-Zellen stimuliert [Koo et al. 1986; Pollack et al. 1987; und Lotzova et al. 1987]. Im Maussystem fanden Hackett et al., dass die Knochenmark-Vorläufer für NK-Zellen $NK-1.1$ Marker exprimieren [Hackett et al. 1986]. Ob diese Vorläufer einen unabhängigen Zelltyp repräsentieren oder ob sie zu einem bereits bekannten Zelltyp gehören, ist bis heute unklar.

1979 erschien die erste Veröffentlichung, die über die Gemeinsamkeiten zwischen NK-Zellen und Promonozyten, auch Makrophagen-Vorläufer genannt, berichtet [Lohmann-

认:① NK 活性是由有着大颗粒淋巴细胞(large granular lymphocytes, LGL)形态的细胞介导的;② NK 效应细胞是非粘附且无吞噬能力的细胞,它们在外周血与脾脏中最常被发现;③ NK 效应细胞缺乏典型的常规巨噬细胞、粒细胞、B 细胞或者 T 细胞所具有的特征与表面标志物【Ortaldo 与 Herberman 的综述, 1984 年; Tutt 等, 1986 年】。归功于抗 NK 细胞的特异性单克隆抗体的生产与重组因子在细胞培养中的应用,自 1986 年起,分离、培养和分析 NK 细胞的方法有了根本性改善,使得获取有较高纯度的 NK 细胞成为可能【Hackett 等, 1986】。1988 年, Fitzgerald-Bocarsly 等发表了首个对 NK 细胞较为准确的定义【Fitzgerald-Bocarsly 等, 1988 年】。他们描述道: NK 细胞是 $CD3^-$ 、 TCR^- 的大颗粒淋巴细胞,它们在细胞表面表达确定的标志物(在人的 NK 细胞上为 $CD16$ 及 $NKH-1$,而在小鼠的 NK 细胞上为 $NK-1.1$ 或者 $NK-2.1$)。NK 细胞在它们裂解细胞的反应中不需要 MHC (主要组织相容性复合体) I 类或 II 类分子的表达。这是 NK 细胞与 T 细胞之间的一个清晰的差异,但此描述对 NK 细胞的属性没有作充分的阐释。

通过 Haller 等在 1977 年做的移植实验确定: NK 细胞的前体来自骨髓【Haller 等, 1977 年】。10 年之后,通过体外实验的研究能够显示:白细胞介素-2 (Interleukin-2, $IL-2$) 是关键的因素,它刺激这些骨髓前体细胞从无 NK 活性的形式发育成为有 NK 活性的效应细胞【Koo 等, 1986 年; Pollack 等, 1987 年; 及 Lotzova 等, 1987 年】。在小鼠系统中, Hackett 等发现: NK 细胞的骨髓前体细胞表达 $NK-1.1$ 标志物【Hackett 等, 1986 年】。是否这些前体细胞代表一种独立的细胞类型,或者是否它们属于一种已知的细胞类型,直到今天仍不清楚。

1979 年出现了首篇发表的文章,此文报道了关于在 NK 细胞与前单核细胞 (promonocytes, 也称为巨噬细胞前体) 之间的共同点【Lohmann-

Matthes et al. 1979]. Diese Promonozyten wurden aus einer 5-tägigen Maus-Knochenmark-Kultur in L-Zell konditioniertem Medium isoliert und waren nicht adhärenz und nicht phagozytierende Zellen. Sie waren zytolytisch für die NK-Zielzellen Yac-1 und sahen wie mittelgroße Lymphozyten aus. Sie wurden als Promonozyten identifiziert, weil sie in CSF-1 haltigem L-Zell konditioniertem Medium zu Makrophagen ausdifferenzieren konnten. Die Autoren vermuteten, dass diese Makrophagen-Vorläuferzellen mit den beschriebenen NK-Zellen verwandt sind oder dass es sich in beiden Fällen um die gleichen Zellen handeln könnte. Diese neuartige Ansicht wurde später durch Experimente mit den aus Milz und Leber isolierten Makrophagen-Vorläufern unterstützt [Baccarini et al. 1985, 1986a, 1986b; Decker et al. 1986]. Jedoch wurde die Hypothese, dass NK-Zellen wahrscheinlich aus dem Makrophagen-system kommen, für lange Zeit ignoriert, weil andere Autoren zeigten, dass in der Knochenmark-Kultur nur mit gereinigtem Makrophagen-Wachstumsfaktor CSF-1 keine NK-Aktivität gefunden wurde [Koo & Manyak 1986].

Von 1988 bis 1993 ist die Zahl der Publikationen aus der Forschung über die Zugehörigkeit der NK-Zellen gering. Suchen nach NK-Vorläufern im Knochenmark wurde meistens mittels "LTBMC" ("long-term bone marrow culture") Kultur durchgeführt [Van-den-Brink et al. 1990; Sitnicka & Hansson 1992; Vecchini et al. 1993]. Bei diesen langfristigen Knochenmark-Kulturen werden die gesamten Knochenmark-Zellen zuerst ohne exogen zugefügte Faktoren für 4 Wochen inkubiert, danach mit IL-2 für weitere 3-6 Tage kultiviert. Die NK-Aktivität taucht in der Kultur ungefähr nach 3-tägiger Inkubation mit IL-2 auf. Über die Vorläufer-Zellen, die für die Erzeugung der NK-Aktivität verantwortlich sind, weiß man nur, dass sie sich von den T-Zell-Vorläufern unterscheiden [Lotzova et al. 1993].

1.2. IL-2 und IL-2 Rezeptor

Wie oben erwähnt, ist IL-2 der essentielle Faktor, der in Knochenmarkzellen die NK-Aktivität stimuliert. Diese Funktion von IL-2 wurde durch Forschungen mit Knochen-

Matthes 等, 1979 年】。这些前单核细胞分离自在 L-细胞条件培养液中进行 5 天的小鼠骨髓细胞培养, 它们是非粘附且无吞噬能力的细胞。它们对 NK 的靶细胞 Yac-1 有细胞裂解性, 而且看上去与中等大小的淋巴细胞相似。它们被鉴定为前单核细胞, 是因为它们能够在含有 CSF-1 (巨噬细胞集落刺激因子) 的 L-细胞条件培养液中发育成为巨噬细胞。文章作者推测: 这些巨噬细胞前体与文献报道的 NK 细胞同源, 或者说, 与这两种情况相关联的可能是同一种细胞。这一新颖的观点后来通过使用分离自小鼠脾脏与肝脏的巨噬细胞前体的实验而得到了支持【Baccarini 等, 1985 年, 1986 年 a, 1986 年 b; Decker 等, 1986 年】。然而, 这一假设——NK 细胞可能来自巨噬细胞系——在很长时间被忽视了, 因为其他的研究者指出: 在只使用纯化的巨噬细胞生长因子 CSF-1 的骨髓细胞培养中, 未发现 NK 活性【Koo 与 Manyak, 1986 年】。

从 1988 年至 1993 年, 来自研究关于 NK 细胞属性的发表文章数量很少。在骨髓中寻找 NK 前体细胞大多借助于“长期骨髓细胞培养”(long-term bone marrow culture, LTBMC) 来进行【Van-den-Brink 等, 1990 年; Sitnicka 与 Hansson, 1992 年; Vecchini 等, 1993 年】。在这个长期骨髓细胞培养期间, 全骨髓细胞首先要在无外来添加因子的情况下培养 4 周, 然后与 IL-2 进行 3-6 天的培养。大约在与 IL-2 培养 3 天后, NK 活性在培养中显现。关于那些前体细胞, 它们负责产生了 NK 活性, 人们只知道: 它们与 T 细胞的前体细胞是不相同的【Lotzova 等, 1993 年】。

1.2 白细胞介素-2 与白细胞介素-2 受体

如上所述, 白细胞介素-2 (IL-2) 是最为关键的因子, 它能够在骨髓细胞中刺激出 NK 活性。IL-2 的这一功能是通过使用来自小鼠、人体和大鼠的骨

mark Zellen aus Maus, Mensch, und Ratte [Koo et al. 1986; Lotzova & Savary 1987; und Van-den-Brink 1990] gefunden. Man betrachtet dies als eine der wichtigsten Wirkungen von IL-2 auf das Immunsystem.

Ursprünglich wurde IL-2 im Überstand von humanen peripheren Blut-Lymphozyten, die mit T-Zell-spezifischen Mitogenen inkubiert worden waren, entdeckt [Morgan & Ruscetti 1976]. Funktionelle und phänotypische Daten deuteten an, dass der Faktor das Wachstum von T-Lymphozyten fördert [Ruscetti et al. 1977], Es stellte sich später heraus, dass die Aktivitäten von folgenden Faktoren alle auf dasselbe Molekül zurückzuführen sind: (i) T-Zellwachstumsfaktor (TCGF); (ii) Thymozyten stimulierender Faktor (TSF); (iii) Thymozyten-Mitogenese Faktor (TMF); (iv) T-Zellen ersetzender Faktor (TRF); und (v) Killer-Helfer Faktor (KHF). Dieses Molekül wurde nach dem zweiten internationalen "Lymphokine Workshop" 1979 Interleukin-2 (IL-2) genannt [Aarden et al. 1979].

IL-2 ist ein aus 133 Aminosäuren bestehendes Protein (Molmasse 15,420) und zeigt keinerlei Sequenzverwandtschaft zu anderen Faktoren [Taniguchi et al. 1983; Kashima et al. 1985]. Es übt seine Wirkungen durch spezifische, sättigbare Rezeptoren aus, die an der Oberfläche von T-Zellen, B-Zellen, [Übersicht von Smith 1989], NK-/LAK-Zellen [Siegel et al. 1987], Monozyten [Wahl et al. 1987; Holter et al. 1987; Espinoza-Delgado et al. 1990] und Neutrophilen [Djeu et al. 1993] zu finden sind. Man unterscheidet drei verschiedene Typen von Rezeptoren, die unabhängig voneinander exprimiert werden können. Der hochaffine IL-2-Rezeptor ($K_D \approx 10^{-11}$ M) ist ein Komplex aus den zwei Proteinketten von IL-2R α (p55, im Humansystem Tac-Antigen genannt) und IL-2R β (als p75 oder p70 bezeichnet) [Sharon et al. 1986; Teshigawara et al. 1987]. Der IL-2-Rezeptor mittlere Affinität ($K_D \approx 10^{-9}$ M) besteht nur aus der β -Kette, während die α -Kette einen Rezeptor niedriger Affinität ($K_D \approx 10^{-8}$ M) darstellt [Tsudo et al. 1986; Teshigawara et al. 1987; und Robb et al. 1987]. Bei aktivierten T-Zellen erfolgt die Stimulierung durch IL-2 nach Bindung an den hochaffinen Rezeptor [Tsudo et al. 1987].

髓细胞进行研究而发现的【Koo 等, 1986 年; Lotzova 与 Savary, 1987 年; Van-den-Brink 等, 1990 年】。人们将此视为 IL-2 对免疫系统最重要的功能之一。

起初, IL-2 是在来自人体外周血淋巴细胞的上清液中被发现的, 这些细胞与对 T 细胞专一的有丝分裂素做过培养【Morgan 与 Ruscetti, 1976 年】。功能与表型的实验数据显示: 这个因子为 T 淋巴细胞的生长所需要【Ruscetti 等, 1977 年】。后来证明, 以下因子的活性都归因于同一种分子, 它们是: ① T 细胞生长因子 (TCGF); ② 胸腺细胞刺激因子 (TSF); ③ 胸腺细胞有丝分裂因子 (TMF); ④ T 细胞替换因子 (TRF); 还有⑤ 杀伤细胞辅助因子 (KHF)。这个分子在 1979 年召开的第二届国际“淋巴因子研讨会” (Lymphokine Workshop) 之后, 以 Interleukin-2 (IL-2, 白细胞介素-2) 命名【Aarden 等, 1979 年】。

IL-2 是一种由 133 个氨基酸组成的蛋白质 (分子量为 15,420), 它显示出与其他的因子毫无序列上的关系【Taniguchi 等, 1983 年; Kashima 等, 1985 年】。它通过特异的、能饱和的受体发挥其功能, 这些受体被发现存在于 T 细胞、B 细胞【Smith 的综述, 1989 年】、NK/LAK 细胞【Siegel 等, 1987 年】、单核细胞【Wahl 等, 1987 年; Holter 等, 1987 年; Espinoza-Delgado 等, 1990 年】以及中性粒细胞【Djeu 等, 1993 年】的表面。人们区分出了三种不同类型的受体, 它们能够相互独立地表达。高亲和力的 IL-2 受体 ($K_D \approx 10^{-11}$ M) 是一个复合体, 由 IL-2 受体 α (p55, 在人体系统中称为 Tac 抗原) 和 IL-2 受体 β (以 p75 或者 p70 表示) 两条蛋白质链组成【Sharon 等, 1986 年; Teshigawara 等, 1987 年】。中亲和力的 IL-2 受体 ($K_D \approx 10^{-9}$ M) 只由 β 链构成, 而只有 α 链的 IL-2 受体显示的亲和力 ($K_D \approx 10^{-8}$ M) 更低【Tsudo 等, 1986 年; Teshigawara 等, 1987 年; 及 Robb 等, 1987 年】。活化 T 细胞时, IL-2 的刺激发生在与高亲和力的受体结合

Bei NK-Zellen hingegen wurde eine Signaltransduktion durch Bindung allein an die β -Untereinheit beobachtet, wobei NK-Zellen in Abwesenheit von Tac-Antigen (α -Untereinheit) auf IL-2 reagierten und zytolytisch wurden [Siegel et al. 1987; Tsudo et al. 1987]. Der Mechanismus, wie die Signaltransduktion bei der Aktivierung durch IL-2 erfolgt, ist unklar. Es wird allgemein angenommen, dass der Phosphorylierungszustand des Rezeptors eine wesentliche Rolle spielt [Sharon et al. 1989].

Baccarini et al. berichteten 1989, dass der p75 IL-2 Rezeptor ebenfalls auf murinen Makrophagen-Vorläufer aus dem Knochenmark vorliegt [Baccarini et al. 1989]. Ähnlich wie bei NK-Zellen und bei den nicht aktivierten Monozyten und Neutrophilen ist nur die IL-2R β -Untereinheit (p75) an der Oberfläche dieser murinen Promonozyten zu finden.

Seit einiger Zeit ist es bekannt, dass IL-2 außer seiner lange bekannter Wirkung auf das Wachstum der T-Zellen noch mehrere andere Effekte auf verschiedene Zellen des Immunsystems hat, wie z.B. (i) Es aktiviert die Tumor-abtötende Zytotoxizität und das Wachstum der NK/LAK-Zellen [Herbermann et al. 1987]; (ii) Es erhöht die Proliferation der B-Zellen und ihre Produktion von Immunglobulin [Ceuppens et al. 1985]; (iii) Es stimuliert Monozyten (im Mensch) zur Steigerung ihrer Zytotoxizität [Malkovsky et al. 1987] und zur Freisetzung von IL-6 [Musso et al. 1992]; (iv) Es moduliert die Freisetzung von Histamin aus aktivierten Basophilen [White et al. 1992]. Deshalb gilt IL-2 nicht mehr als ein spezifischer Faktor, der nur auf Lymphozyten wirkt.

1.3. LAK-Zellen und ihre Beziehung zu NK-Zellen

1982 beobachteten Grimm et al. bei *in vitro* Kultur von humanen peripheren Blut-Lymphozyten mit IL-2-haltigen Überständen eine früher nicht beschriebene zytotoxische Aktivität, nämlich LAK (Lymphokin-aktivierte Killer) -Aktivität. LAK-Aktivität unterscheidet sich von NK-Aktivität dadurch, dass sie sowohl NK-empfindliche als auch NK-resistente Tumor-Zellen lysiert [Grimm et al. 1982]. Dieser Befund hat sofort große

之后【Tsudo 等, 1987 年】。在 NK 细胞方面则相反, 一种通过单独结合 β 亚单位的信号传导被观察到, 在此过程中, NK 细胞在无 Tac 抗原 (α 亚单位) 存在的情况下对 IL-2 起反应而变得有了裂解性【Siegel 等, 1987 年; Tsudo 等, 1987 年】。关于信号传导如何通过 IL-2 的活化来完成的机理尚不清楚。普遍接受的想法是: 受体磷酸化的状态起到了关键性的作用【Sharon 等, 1989 年】。

Baccarini 等在 1989 年报道: p75 IL-2 受体也存在于小鼠骨髓巨噬细胞前体的表面【Baccarini 等, 1989 年】。与 NK 细胞、非活化的单核细胞和中性粒细胞相似, 只有 IL-2 受体的 β 亚单位 (p75) 在这些小鼠的前单核细胞的表面被发现。

一段时间以来, 人们已经知晓: 除了早已被认知的对 T 细胞生长的作用之外, IL-2 还有多种作用于免疫系统中不同细胞上的其他效应, 例如: ① 它活化杀死肿瘤的杀伤活性以及 NK/LAK 细胞的生长【Herbermann 等, 1987 年】; ② 它提高 B 细胞的增殖及其它们对免疫球蛋白的制造【Ceuppens 等, 1985 年】; ③ 它刺激单核细胞 (人体中) 提升杀伤活性【Malkovsky 等, 1987 年】, 并且释放出 IL-6【Musso 等, 1992 年】; ④ 它调节活化的嗜碱性粒细胞释放出组织胺【White 等, 1992 年】。因此, IL-2 不再被看作是一种只作用于淋巴细胞的特异性因子。

1.3 LAK 细胞及它们与 NK 细胞的关系

1982 年, Grimm 等在将人体外周血淋巴细胞与含有 IL-2 的上清液进行体外培养时, 观察到一种不曾被描述过的杀伤活性, 也就是 LAK (Lymphokine Activated Killer, 淋巴因子活化后的杀伤细胞) 活性。LAK 活性与 NK 活性的区别在于: 它们不仅对 NK 敏感的, 而且对 NK 不敏感的

Aufmerksamkeit erregt, weil er Hoffnungen auf eine neue Tumor-Therapie geweckt hat. Einige Forschungsgruppen begannen sofort, mit den *in vitro* kultivierten LAK-Zellen im Tierversuchsmodell zu experimentieren [Rosenstein et al. 1984; Mule et al. 1984; und Lafreniere & Rosenberg 1985]. IL-2 ist wiederum als der entscheidende Faktor bestätigt worden, der die LAK-Aktivität induziert [Rosenberg et al. 1984]. Von Yang et al. wurde später genauer beschrieben, dass eine effektive *in vitro* Kultur für die Generation der LAK-Aktivität hohe IL-2-Konzentrationen (1000 U/ml) benötigt und die Kultur normalerweise von 72 bis 96 Stunden dauert [Yang et al. 1986].

In den ersten Jahren nach der Entdeckung des LAK-Phänomens waren die Meinungen über die Vorläufer-Zellen für LAK-Aktivität unvereinbar [Grimm et al. 1982, 1983; Karre et al. 1983; und Rosenstein et al. 1984], Der Grund dafür ist, dass die damaligen Kulturen nie einen hohen Reinheitsgrad erreichten. Erst nach der Anwendung der positiven Sortierungstechnik stimmten die Untersuchungsergebnisse aus Maus [Salup et al. 1987], Mensch [Morris et al. 1989], und Ratte [Maghazachi et al. 1988; Vujanovic et al. 1989] darin überein, dass die Zellen, die unter dem Einfluss von IL-2 LAK-Aktivität entwickeln, NK-Zellen sind. Mit anderen Worten: Die meisten LAK-Effektoren sind die von IL-2 aktivierten NK-Zellen. Die Hauptmerkmale dieser LAK-Effektoren sind: (i) Sie exprimieren keine T-Zell-Marker, wie CD3 und CD8; (ii) Sie vermitteln eine MHC-unabhängige Zytotoxizität gegen sowohl NK-empfindliche als auch NK-resistente Tumor-Zellen [Fitzgerald-Bocarsly et al. 1988].

Bei den Untersuchungen mit Knochenmark-Kulturen beweisen übereinstimmende Ergebnisse, dass NK-Aktivität und LAK-Aktivität von denselben, nicht zytotoxischen Knochenmark-Vorläuferzellen durch IL-2 Stimulation generiert werden, obwohl die beiden Aktivitäten nach unterschiedlichen Zeiten nachgewiesen wurden. LAK-Aktivität taucht in der Kultur etwas später (~3 Tage) auf als NK-Aktivität [Sarneva et al. 1989; Keever et al. 1990; Sitnicka & Hansson 1992]. Diese Ergebnisse haben auf der Knochenmark-Vorläufer Ebene die Beziehung zwischen NK-Zellen und LAK-Zellen als zwei Differenzierungs-zustände bestätigt.

Tumorzellen werden durch LAK-Zellen abgetötet [Grimm et al., 1982]. Dieses Ergebnis hat eine große Aufmerksamkeit erregt, weil es Hoffnungen auf eine neue Tumor-Therapie geweckt hat. Einige Forschungsgruppen begannen sofort, mit den *in vitro* kultivierten LAK-Zellen im Tierversuchsmodell zu experimentieren [Rosenstein et al. 1984; Mule et al. 1984; und Lafreniere & Rosenberg 1985]. IL-2 ist wiederum als der entscheidende Faktor bestätigt worden, der die LAK-Aktivität induziert [Rosenberg et al. 1984]. Von Yang et al. wurde später genauer beschrieben, dass eine effektive *in vitro* Kultur für die Generation der LAK-Aktivität hohe IL-2-Konzentrationen (1000 U/ml) benötigt und die Kultur normalerweise von 72 bis 96 Stunden dauert [Yang et al. 1986].

In den ersten Jahren nach der Entdeckung des LAK-Phänomens waren die Meinungen über die Vorläufer-Zellen für LAK-Aktivität unvereinbar [Grimm et al. 1982, 1983; Karre et al. 1983; und Rosenstein et al. 1984], Der Grund dafür ist, dass die damaligen Kulturen nie einen hohen Reinheitsgrad erreichten. Erst nach der Anwendung der positiven Sortierungstechnik stimmten die Untersuchungsergebnisse aus Maus [Salup et al. 1987], Mensch [Morris et al. 1989], und Ratte [Maghazachi et al. 1988; Vujanovic et al. 1989] darin überein, dass die Zellen, die unter dem Einfluss von IL-2 LAK-Aktivität entwickeln, NK-Zellen sind. Mit anderen Worten: Die meisten LAK-Effektoren sind die von IL-2 aktivierten NK-Zellen. Die Hauptmerkmale dieser LAK-Effektoren sind: (i) Sie exprimieren keine T-Zell-Marker, wie CD3 und CD8; (ii) Sie vermitteln eine MHC-unabhängige Zytotoxizität gegen sowohl NK-empfindliche als auch NK-resistente Tumor-Zellen [Fitzgerald-Bocarsly et al. 1988].

Bei den Untersuchungen mit Knochenmark-Kulturen beweisen übereinstimmende Ergebnisse, dass NK-Aktivität und LAK-Aktivität von denselben, nicht zytotoxischen Knochenmark-Vorläuferzellen durch IL-2 Stimulation generiert werden, obwohl die beiden Aktivitäten nach unterschiedlichen Zeiten nachgewiesen wurden. LAK-Aktivität taucht in der Kultur etwas später (~3 Tage) auf als NK-Aktivität [Sarneva et al. 1989; Keever et al. 1990; Sitnicka & Hansson 1992]. Diese Ergebnisse haben auf der Knochenmark-Vorläufer Ebene die Beziehung zwischen NK-Zellen und LAK-Zellen als zwei Differenzierungs-zustände bestätigt.

1.4. Mechanismus der NK/LAK Zytotoxizität und das Membranloch-bildende Perforin

Obwohl NK/LAK-Zellen sich deutlich von den zytotoxischen T-Zellen unterscheiden, weil sie keine typischen Oberflächenmarker für die zytotoxischen T-Zellen, wie z.B. CD3 und CD8, tragen und sie unabhängig von der Expressierung des MHC Moleküls zytolytische Aktivität haben, haben sie auf der anderen Seite mit zytotoxischen T-Zellen etwas gemeinsam, nämlich in den Zytoplasmen beider Typen von Zellen ist das lytische Protein, das sogenannte Perforin, zu finden, welches normalerweise nicht bei anderen Zellen, wie z.B. Monozyten-Makrophagen, Granulozyten, B-Zellen und T-Helfer-Zellen zu beobachten ist [Masson & Tschopp 1985; Podack et al. 1985 a und b; Young et al. 1986; Liu et al. 1986; und Lowrey et al. 1988].

Die ersten Berichte über Perforin erschienen 1984, als einige Forschungsgruppen sich für die zytoplasmatischen Granula aus zytotoxischen T-Zellen und LGL-Zellen interessierten [Millard et al. 1984; Henkart et al, 1984; Podack et al. 1984; und Blumenthal et al. 1984]. Die Forscher fanden, dass diese aus zytotoxischen Zellen isolierten Granula allein Membranen durchlässig machen können. Daher haben die Forscher die lytische Komponente in den Granula nach der Funktion unterschiedlich als "cytolin", "pore forming protein", oder "C9-related protein" genannt. Ein Jahr später einigte man sich auf den Namen "Perforin" [Podack et al. 1985a]. Bei zahlreichen biochemischen Arbeiten ist gefunden worden, dass Perforin ein Protein ist, das aus 534 Aminosäuren besteht und nur in zytotoxischen Granula existiert. Zusammen mit anderen Enzymen in Granula spielt Perforin bei dem Abtöten der Zielzellen durch zytotoxische Effektor-Zellen eine wesentliche Rolle [Tschopp & Nabholz 1990; Young et al. 1990].

Anders als Lymphotoxin und TNF, deren zytotoxische Funktion nur eine von ihren pleiotropischen Aktivitäten repräsentiert, ist Perforin ein Protein mit einer einzigen Funktion: die Membran der Zielzellen zu lysieren und zum Zelltod zu führen [Podack et al. 1991]. Die Lyse, die mit Perforin assoziiert ist, bedingt die Anwesenheit von Kalzium.

1.4 NK/LAK 杀伤活性的机理与建造膜孔的穿孔素

虽然 NK/LAK 细胞明显地不同于杀伤性 T 细胞,因为它们不携带典型的杀伤性 T 细胞的表面标志物,如 CD3 和 CD8,并且,它们不依赖于 MHC 分子的表达就具有裂解细胞的活性,但在另一方面,它们与杀伤性 T 细胞有着一些共同点,那就是:在这两类细胞的细胞质中,都能发现被称为穿孔素(Perforin)的裂解性蛋白。这种蛋白在通常情况下不会在其他的细胞,比如单核/巨噬细胞、粒细胞、B 细胞与辅助性 T 细胞,中被观察到【Masson 与 Tschopp, 1985 年; Podack 等, 1985 年 a 与 b; Young 等, 1986 年; Liu 等, 1986 年; 以及 Lowrey 等, 1988 年】。

第一篇关于穿孔素的报道出现在1984年,当时几个科研团队对来自杀伤性T细胞和LGL(大颗粒淋巴细胞)的细胞质颗粒物感兴趣【Millard等, 1984年; Henkart等, 1984年; Podack等, 1984年, 及Blumenthal等, 1984年】。研究者们发现:这些从杀伤性细胞中分离出来的颗粒物能够独立地造成膜的穿孔。由此,研究者们依据其功能将颗粒物中的裂解性成分不同地命名为“裂解素(cytolin)”、“成孔蛋白(pore forming protein)”、或者“补体9关联蛋白(C9-related protein)”。一年后,人们对“穿孔素(Perforin)”的命名达成了一致的意见【Podack等, 1985年a】。在大量的生物化学工作中,人们发现:穿孔素是一种蛋白质,它由534个氨基酸组成,只存在于杀伤性颗粒物中。与颗粒物中的其他酶一起,穿孔素在通过杀伤性效应细胞对靶细胞的致死中起着主要的作用【Tschopp与Nabholz, 1990年; Young等, 1990年】。

不同于淋巴毒素(lymphotoxin)与TNF(肿瘤坏死因子),它们的杀伤功能只代表其多效的活性之一,穿孔素是一种只有单一功能的蛋白质——裂解靶细胞的膜并导致细胞死亡【Podack等, 1991年】。这种与穿孔素

In Gegenwart von Kalzium (~1mM) kann Perforin an der Membran der Zielzellen erfolgreich polymerisieren, und dann die Zielzellen lysieren. Jedes fertige Perforin-Polymer, auch als Polyperforin bezeichnet, besteht aus 12-18 Monomeren und befindet sich in der Ziel-Membran als ein geschlossener Zylinder von 16nm Länge und einem Durchmesser von 5-20nm [Tschopp & Nabholz 1990].

Alle CD8 positiven CTL-Zelllinien und alle NK-Zellpopulationen (einschließlich LAK-Zellen) enthalten Perforin [Podack et al. 1991]. In den wenig Perforin exprimierenden, frisch isolierten CD8⁺ T-Zellen aus human peripherem Blut wurde die Menge von Perforin-mRNA nach IL-2 Aktivierung rasch erhöht [Lichtenheld et al. 1988; Smyth et al. 1990a]. IL-2 allein reicht aus, hohes Niveau von Perforin-mRNA zu induzieren. Die Aktivierung erfolgt über den p75 IL-2R. Dieser Vorgang ist unabhängig von dem Vorhandensein des T-Zell-Rezeptors [Liu et al. 1989; Smyth et al. 1990a]. Interessant aber noch unverständlich ist, dass die IL-2-induzierte Perforin Erhöhung durch IL-6 verstärkt werden kann, obwohl IL-6 allein völlig ineffektiv ist [Smyth et al. 1990b]. Perforin scheint nicht in B-Zellen und Monozyten induzierbar zu sein [Podack et al. 1991].

1.5. Regulatorische Funktion der NK-Zellen

NK-Zellen sind wichtige immunregulatorische Zellen, weil sie fähig sind, eine Menge von Zytokinen freizusetzen. Obwohl die Forscher bereits in früheren Studien über NK-Zellen (1981-1983) beobachteten, dass mehrere Typen von Lymphokinen, wie z.B. alpha und gamma IFN, IL-1, IL-2, Lymphotoxin (LT), Kolonie-stimulierende Faktoren, und B-Zell Wachstums-Faktor, in Überständen der NK-Zellkultur zu finden waren [Übersicht von Ortaldo & Herberman 1984], konnten sie nicht ausschließen, dass die die NK-Zellkultur kontaminierenden Zellen, z.B. T-Lymphozyten, für die Freisetzung der Zytokine verantwortlich waren. Ab 1986, als die Gewinnung von hoch gereinigten NK-Zellpopulationen und eine spezifische Stimulierung der NK-Zellen (z.B. mit spezifischem

korrelatives裂解以钙的存在为条件。在有钙(~1 mmol/L)存在的条件下,穿孔素能够在靶细胞的膜上成功地聚合,然后裂解靶细胞。每个完成的穿孔素聚合物(也简称为多聚穿孔素)由12-18个单体构成,并以一个封闭的筒状物存在于靶膜中,其长度为16纳米,直径为5-20纳米【Tschopp与Nabholz, 1990年】。

所有CD8阳性的CTL细胞株与所有NK细胞群(包括LAK细胞)都含有穿孔素【Podack等, 1991年】。在穿孔素表达弱、从人体外周血新鲜分离而得的CD8⁺T细胞中,穿孔素mRNA的量在IL-2的活化之后快速地升高【Lichtenheld等, 1988年; Smyth等, 1990年a】。单独使用IL-2足以诱导穿孔素mRNA达到高水平。这一活化通过p75IL-2受体来完成。这个过程不依赖于T细胞受体的存在【Liu等, 1989年; Smyth等, 1990年a】。有趣但尚未被理解的是:IL-2诱导的穿孔素增多能够通过IL-6而增强,虽然IL-6单独作用时完全无效【Smyth等, 1990年b】。在B细胞与单核细胞中,似乎不能诱导产生穿孔素【Podack等, 1991年】。

1.5 NK细胞的调节功能

NK细胞是重要的免疫调节细胞,因为它们能够释放出多种细胞因子。虽然研究者们已在早期关于NK细胞的研究(1981-1983年)中观察到:多种类型的淋巴因子,如 α -与 γ -干扰素(IFN)、白细胞介素-1(IL-1)、IL-2、淋巴毒素(Lymphotoxin, LT)、集落刺激因子(CSF)以及B细胞生长因子,都能够在NK细胞培养的上清液中被发现【Ortaldo与Herberman的综述, 1984年】,他们不能排除:这些是在NK细胞培养中污染的细胞,如T淋巴细胞,对细胞因子的释放起了主要的作用。自1986年起,随着获得高纯度的NK细胞群与对NK细胞的特异性刺激(比如使用特异性配

Ligand) möglich waren, ist die Fähigkeit von NK-Zellen, Zytokine zu produzieren, in verschiedenen Laboren bestätigt worden [Übersicht von Trinchieri 1989].

Sowohl frisch isolierte als auch kultivierte NK-Zellen können entweder spontan oder nach Stimulation eine Reihe von Zytokinen synthetisieren, die in der Tabelle "Zytokin-Produktion von NK-Zellen" (siehe Tab. A auf Seite 10) mit Daten aus verschiedenen Laboren zusammengestellt wurden. Die Untersuchungen zur Fähigkeit der NK-Zellen Zytokine zu produzieren wurden entweder mittels Northern-Blot Analyse oder Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) auf Messenger-RNA Ebene oder mittels Aktivitätstest oder Immuno-präzipitation auf Protein Ebene durchgeführt. Zur Aktivierung der NK-Zellen wurden häufig folgende Stimulatoren benutzt: NK-Targetzellen, CD16 FcR Ligand (z.B. Sepharose verbundene anti-CD16 Antikörper oder Immun-komplexe, wie die mit IgG Antikörper bedeckten Erythrozyten oder Zielzellen), IL-2, IFN- γ , und Phorbolster/Kalzium Ionophor. Eine Kombination aus zwei Stimulatoren wurde häufig verwendet, weil sie deutlich effektiver wirkt als ein einziger Faktor. Im Humansystem zeigte sich z.B. die Kombination von CD16 Ligand mit IL-2 sehr wirksam, denn unter dieser Stimulationsbedingung konnte innerhalb von 2 Stunden aktive Synthese von Messenger-RNA für TNF, IFN- γ , GM-CSF und CSF-1 in NK-Zellen nachgewiesen werden. Dagegen hatte der CD16 Ligand allein fast gar keine Wirkung, und IL-2 allein bewirkt nur eine schwache Induktion von GM-CSF mRNA [Cuturi et al. 1989]. In den Experimenten mit NK-Targetzellen allein oder plus IFN- γ als Aktivator wurde deutlich höhere TNF-Freisetzung bei der Kombination beobachtet [Peter et al. 1986]. Der Mechanismus der synergistischen Wirkung von zwei Stimulatoren ist noch nicht geklärt.

体) 成为了可能, NK细胞产生细胞因子的能力在不同的实验室中得到了证实【Trinchieri的综述, 1989年】。

无论是新鲜分离的还是培养的 NK 细胞, 都能够或是自发地、或是在被刺激之后合成一系列细胞因子, 这在“NK 细胞产生的细胞因子”表中(见第 10 页的表 A) 使用来自不同实验室的数据作了汇总。研究 NK 细胞产生细胞因子的能力要么借助于 Northern 印迹杂交分析法或是聚合酶链式反应法 (PCR) 在 mRNA 层面, 要么借助于活性检测法或是免疫沉淀法在蛋白质层面来开展工作。为了激活 NK 细胞, 常用的刺激物如下: NK 靶细胞、CD16 Fc 受体的配体 (例如与琼脂糖结合的抗 CD16 的抗体, 或者免疫复合物——使用 IgG 抗体包被的红细胞或者靶细胞)、IL-2、IFN- γ 、还有佛波酯 (Phorbolster) 或者钙离子载体。两种刺激物的组合经常被应用, 因为它们明显地比单个因子更有效。比如, 在人体系统中显示: CD16 配体与 IL-2 的组合非常有效, 因为在这种刺激条件下, 2 小时内就能在 NK 细胞中检测到活跃的 TNF、IFN- γ 、GM-CSF 与 CSF-1 信使 RNA 的合成。与之相反, 单一的 CD16 的配体几乎毫无作用, 而单用 IL-2 只引发一种很弱的对 GM-CSF 信使 RNA 的诱导【Cuturi 等, 1989 年】。在单独使用 NK 靶细胞或者加上 IFN- γ 作为活化物的实验中, 明显更高的 TNF 的释放在组合的情况下被观察到【Peter 等, 1986 年】。两种刺激物协同效应的机理尚未得到解释。

Tab. A Zytokin-Produktion von NK-Zellen

(Daten aus der Literatur)

Stimulator	synthetisiertes Zytokin	mRNA ⁺	Protein ⁺
Keine	IL-1- β	1	
	IL-6	1	
NK-Targetzellen	IL-1		2
	TNF (niedrig)		3
NK-Targetzellen + IFN- γ	TNF (hoch)		3
IL-2	GM-CSF (niedrig)	5	5
	IL-6	1	
IL-2+CD16 Fc R Ligand	CSF-1	4,5,6	6
	G-CSF	6	6
	GM-CSF	4,5,6	5,6
	IFN- γ	4,5,6	5,6
	TNF	4,5,6	5,6
IL-2+Immunkomplex	IFN- γ		5
	TNF		5
Phorbol Dibutyrate und / oder Kalzium Ionophore A23187	GM-CSF	4,5	5
	IL-3	4,5	
	TNF	4,5	

1. Vitolo et al. 1993
2. Herman et al. 1986
3. Peters et al. 1986
4. Anegon et al. 1988
5. Cuturi et al. 1989
6. Saito et al. 1993

表 A NK 细胞产生的细胞因子

(数据来自文献)

刺激物	合成的细胞因子	mRNA ⁺	蛋白质 ⁺
无	IL-1- β	1	
	IL-6	1	
NK-靶细胞	IL-1		2
	TNF (低)		3
NK-靶细胞+IFN- γ	TNF (高)		3
IL-2	GM-CSF (低)	5	5
	IL-6	1	
IL-2+CD16 Fc 受体的配体	CSF-1	4,5,6	6
	G-CSF	6	6
	GM-CSF	4,5,6	5,6
	IFN- γ	4,5,6	5,6
	TNF	4,5,6	5,6
IL-2+免疫复合物	IFN- γ		5
	TNF		5
佛波醇二丁酸酯与/或钙离子载体 A23187	GM-CSF	4,5	5
	IL-3	4,5	
	TNF	4,5	

1. Vitolo 等, 1993 年
2. Herman 等, 1986 年
3. Peters 等, 1986 年
4. Anegon 等, 1988 年
5. Cuturi 等, 1989 年
6. Saito 等, 1993 年

1.6. Ziel der Arbeit

1. Es sollte versucht werden, Bedingungen für primäre Knochenmark-Kulturen zu etablieren, unter denen die im Knochenmark vorliegenden Vorläufer für NK-Zellen sowohl proliferieren als auch sich zu NK-aktiven Effektoren entwickeln können. Dabei sollte der Wachstumsfaktor für diese Vorläufer-Zellen definiert werden.
2. Eine Isolierungsmethode sollte etabliert werden, mit der die aus dem Knochenmark kultivierten NK-aktiven Zellen zu einem hohen Grad gereinigt werden können. Die isolierten NK-Zellen sollten auf morphologischer, phänotypischer, funktioneller, und differenzierender Ebene untersucht und charakterisiert werden.
3. Sollten die aus Knochenmark-Kultur gewonnenen NK-aktiven Zellen mit den Makrophagen-Vorläufern identisch sein, sollte weiterhin geklärt werden, ob diese Zellen zu LAK-Effektoren differenzierbar sind und ob in ihren Zytoplasmen Perforin zu finden ist wie bei den beschriebenen NK/LAK-Zellen.
4. Da IL-2 als ein sehr wichtiger stimulierender Faktor für die NK/LAK-Aktivität anerkannt wurde und der IL-2R auf murine Makrophagen-Vorläufern aus dem Knochenmark vorliegt, sollte in diesem Studium die Zytotoxizität-stimulierende Wirkung von IL-2 auf Makrophagen-Vorläufer auf funktioneller Ebene und Gen Ebene untersucht werden.
5. Die Frage, was für Ähnlichkeiten und Unterschiede es zwischen Makrophagen-Vorläufern und NK-Zellen gibt, sollte in dieser Arbeit in den Bereichen von Morphologie, Phänotyp (Oberflächenantigen-Profile), zytotoxischer Funktion, zytotoxischem Mechanismus, und Zytokin-Produktions-Spektrum beantwortet werden.

1.6 本工作的目标

1. 本工作将设法建立初始的骨髓细胞培养条件, 在这样的培养条件下, 存在于骨髓中的 NK 前体细胞不仅能够增殖, 而且能够发育成为有 NK 活性的效应细胞。与此同时, 这些前体细胞的生长因子将被阐明。
2. 本工作将建立一种分离方法, 使用这样的方法能够将来自骨髓细胞培养的、有 NK 活性的细胞纯化至一个高的级别。分离出的 NK 细胞将在形态、表型、功能、以及分化的层面上得到研究与特性描述。
3. 如果从骨髓细胞培养获得的有 NK 活性的细胞与巨噬细胞前体是同一类细胞, 本工作将进一步探究: 是否这些细胞能够朝向 LAK 效应细胞进行分化, 并且, 是否在这些细胞的细胞质中能够发现穿孔素, 如同文献所描述的 NK/LAK 细胞那样。
4. 由于 IL-2 是公认的对 NK/LAK 活性极为重要的刺激因子, 而且 IL-2 的受体存在于小鼠骨髓巨噬细胞前体的表面, 在本工作中, IL-2 影响巨噬细胞前体产生杀伤活性的刺激作用将在功能层面和基因层面进行研究。
5. 对于“在巨噬细胞前体与 NK 细胞之间存在什么相似性与差异性”的问题, 本工作将在细胞的形态、表型 (表面抗原状态)、杀伤功能、杀伤机理、以及细胞因子产生谱的范围内进行回答。

2. MATERIAL UND METHODEN**Material****2.1. Tiere**

C57BL/6 Mause wurden im Alter von 6-8 Wochen aus der Zucht von Charles River, Sulzfeld, oder von der Zentralen Versuchstieranstalt, Hannover bezogen.

2.2. Chemikalien**für Zellisolierung und Zellkultur**

Agar (Bakteriologischer Grad)	Fa. OXOID, Basingstoke	L11
Concanavalin A	Fa. Pharmacia, Freiburg	17-0450-01
Ficoll-Paque (steril)	Fa. Pharmacia	17-0840-02
FKS (Fötale Kälberserum)	Fa. Sigma, Deisenhofen	F-7524
α -D-Glucose	Fa. Serva, Heidelberg	22720
Hepes (N-2-Hydroxyethyl- Piperazine-N'-2-ethane sulfonic Acid. pKa. 20°C=7,55)	Fa. Biomol, Hamburg	05288
Iscove's Medium	Fa. Gibco-BRL, Karlsruhe	074-02200A
2-ME (2-Mercaptoethanol)	Fa. Sigma	M-7154
Natrium Pyruvat	Fa. Biochrom	L0473
Percoll (steril)	Fa. Pharmacia	17-0891-01
RPMI 1640 01800N	Fa. Gibco-BRL	074-

für Zellfixierung, Färbung und Einbetten

Aquatex	Fa. Merck, Darmstadt	Art.No.8562
Bovin Serum Albumin	Fa. Sigma	A-3350

2. 材料与amp;方法**材料****2.1 动物**

C57BL/6 小鼠在 6-8 周大时从 Sulzfeld 的 Charles River 饲养所, 或从汉诺威中心实验动物所定期购得。

2.2 化学试剂**用于细胞分离与细胞培养**

琼脂 (细菌学级别)	公司 OXOID, Basingstoke	L11
刀豆蛋白 A	公司 Pharmacia, Freiburg	17-0450-01
Ficoll-Paque (无菌)	公司 Pharmacia	17-0840-02
FKS (胎牛血清)	公司 Sigma, Deisenhofen	F-7524
α -D-葡萄糖	公司 Serva, Heidelberg	22720
Hepes (N-2-羟乙基- 哌嗪-N'-2-乙磺酸, 20°C的酸度系数=7.55)	公司 Biomol, Hamburg	05288
Iscove's 培养液	公司 Gibco-BRL, Karlsruhe	074-02200A
2-ME (2-巯基乙醇)	公司 Sigma	M-7154
丙酮酸钠	公司 Biochrom	L0473
Percoll (无菌)	公司 Pharmacia	17-0891-01
RPMI 1640 (培养基)	公司 Gibco-BRL	074-01800N

用于细胞固定、染色与amp;封固

Aquatex (水性封片剂)	公司 Merck, Darmstadt	货号 8562
牛血清白蛋白	公司 Sigma	A-3350

DMF (N, N-Dimethylformamid)	Fa. Sigma	D-4254	DMF (N,N-二甲基甲酰胺)	公司 Sigma	D-4254
Ethylenglycolmonomethylether	Fa. Merck	Art.No.859	乙二醇单甲基醚	公司 Merck	货号 859
Fast Garnet GBC	Fa. Sigma	F-6504	固深红 GBC	公司 Sigma	F-6504
Fast Blue BB Salz	Fa. Sigma	F-3378	固蓝 BB 盐	公司 Sigma	F-3378
Fast Red TR	Fa. Sigma	F-2768	固红 TR 碱基	公司 Sigma	F-2768
Gelatine (für Mikrobiologie)	Fa. Merck	Art.No.4070	明胶 (用于微生物)	公司 Merck	货号 4070
Giemsa-Lösung	Fa. Sigma	GS-500	吉姆萨染液	公司 Sigma	GS-500
Glycerin	Fa. Serva	23175	甘油	公司 Serva	23175
H ₂ O ₂	Fa. Merck-Schuchardt	822287	H ₂ O ₂ (过氧化氢)	公司 Merck-Schuchardt	822287
Hämatoxylin	Fa. Sigma	H-3136	苏木精	公司 Sigma	H-3136
Human Ig	Fa. Sigma	I-4506	人免疫球蛋白	公司 Sigma	I-4506
Isopropanol	Fa. Roth, Karlsruhe	Art.6752	异丙醇	公司 Roth, Karlsruhe	Art.6752
Levamisole	Fa. Sigma	L-9756	左旋咪唑	公司 Sigma	L-9756
Mayers Hemalaun-Lösung	Fa. Merck	Art.No.9249	Mayer 苏木素染色试剂	公司 Merck	货号 9249
May-Grünwald-Lösung	Fa. Sigma	MG-500	迈格林华染色液	公司 Sigma	MG-500
NaN ₃	Fa. Riedel-deHaen	1687	叠氮化钠	公司 Riedel-deHaen	1687
Naphthol As-D Chloracetate	Fa. Sigma	N-0758	萘酚 AS-D 氯乙酸	公司 Sigma	N-0758
Naphthol As-MX Phosphate	Fa. Sigma	N-4875	萘酚 AS-MX 磷酸盐	公司 Sigma	N-4875
α -Naphthylbutyrat	Fa. Merck	Art.No.502	α -丁酸萘酯	公司 Merck	货号 502

Für verschiedene Tests

Actinomycin D	Fa. Sigma	A-4262
Avidin-POD-Konjugat	Fa. DAKO, Hamburg	P 347
DAB (3,3'-Diamino-Benzidin-Tetrahydrochlorid)	Fa. Sigma	D-5637
Ionomycin	Fa. Sigma	I-0634
MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5,-diphenyltetrazolium Bromide)	Fa. Sigma	M-2128

用于不同的检测

放线菌素 D	公司 Sigma	A-4262
耦合了 POD 的抗生物素蛋白	公司 DAKO, Hamburg	P 347
DAB (3,3'-二氨基-联苯胺四盐酸)	公司 Sigma	D-5637
离子霉素	公司 Sigma	I-0634
MTT (3-[4,5-二甲基-2-噻唑基]-2,5,-二苯基溴化四唑)	公司 Sigma	M-2128

PMA (Phorbol 12-Myristate 13-Acetate)	Fa. Sigma	P-8139	PMA (佛波醇 12-肉豆蔻酸 13-乙酸酯)	公司 Sigma	P-8139
Rotiszint 2200 (Szintillationsflüssigkeit)	Fa. Roth	Art. 9389	Rotiszint 2200 (闪烁液)	公司 Roth	货号 9389
Tween 20 (Polyoxyethylene-Sorbitan-Monolaurate)	Fa. Merck	822184	Tween 20 (聚氧化乙烯-山梨聚糖-单月桂酸酯)	公司 Merck	822184
<u>Für molekular biologische Arbeit</u>			<u>用于分子生物学工作</u>		
Agarose (Elektrophorese Grad)	Fa. Gibco-BRL	55100B	琼脂 (电泳级)	公司 Gibco-BRL	55100B
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Fa. Sigma	D-5758	DEPC (焦碳酸二乙酯)	公司 Sigma	D-5758
Dextran Sulfate	Fa. Pharmacia	17-0340-01	硫酸葡聚糖	公司 Pharmacia	17-0340-01
DIG-DNA Markierungs Kits	Fa. Boehringer-Mannheim	1175033	地高辛 DNA 标记试剂盒	公司 Boehringer-Mannheim	1175033
DIG-Nucleic Acid Detection Kits	Fa. Boehringer-Mannheim	1175041	地高辛核酸检测试剂盒	公司 Boehringer-Mannheim	1175041
EDTA	Fa. Sigma	E-4378	EDTA	公司 Sigma	E-4378
Ethidiumbromid	Fa. Serva	21238	溴化乙锭	公司 Serva	21238
Formamide	Fa. Sigma	F-7503	甲酰胺	公司 Sigma	F-7503
Guanidiniumisothiocyanat	Fa. Stratagene, Heidelberg	300116	异硫氰酸胍	公司 Stratagene, Heidelberg	300116
Megaprime DNA Labeling Kit	Fa. Amersham	RPN.1607	大引物 DNA 标记试剂盒	公司 Amersham	RPN.1607
Polyvinylpyrrolidon	Fa. Sigma	P-5288	聚乙烯吡咯烷酮	公司 Sigma	P-5288
Lachs Sperma DNA	Fa. Stratagene	201190	鲑鱼精 DNA	公司 Stratagene	201190
Sarcosyl	Fa. Sigma	L-5125	十二烷基肌氨酸钠	公司 Sigma	L-5125
Tris (research grade)	Fa. Serva	37190	Tris (研究级)	公司 Serva	37190
Triton-X-100	Fa. Serva	37240	Triton X-100	公司 Serva	37240
Hefe tRNA	Fa. Sigma	R-8759	酵母 tRNA	公司 Sigma	R-8759

2.3. Zytokine

- IL-1: Rekombinantes murines Interleukin-1 α aus *E.coli* von Oncogene Science (spezifische Aktivität von 1×10^7 U/mg Protein) wurde durch Firma Dianova bezogen und beim IL-1 Bioassay als Standard gebraucht.
- IL-2: Rekombinantes humanes Interleukin-2 aus *E.coli* (spezifische Aktivität von 2×10^7 U/mg Protein), kreuzreaktiv mit Mauszellen, wurde freundlicherweise von Dr. Conradt, GBF, Braunschweig zur Verfügung gestellt. Bei der Zellkultur und Zellaktivierung wurde IL-2 als stimulierender Faktor benutzt.
- IL-3: Rekombinantes murines Interleukin-3 aus *E.coli* von Behring (spezifische Aktivität von 5×10^7 CFU/mg Protein) wurde beim IL-3 Bioassay als Standard gebraucht.
- IL-6: Rekombinantes humanes Interleukin-6, kreuzreaktiv mit Mauszellen, aus Hefe von Genzyme (spezifische Aktivität von 1×10^7 U/mg Protein) wurde beim IL-6 Bioassay als Standard benutzt.
- IL-10: Rekombinantes murines Interleukin-10 aus COS7 von Phar Mingen (spezifische Aktivität von 470 U/mg) wurde beim ELISA für IL-10 als Standard verwendet.
- GM-CSF: Rekombinanter muriner Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor aus Hefe (biologische Aktivität von 5×10^7 CFU/mg Protein) wurde freundlicherweise von der Firma Behring zur Verfügung gestellt. Dieser Faktor wurde bei der Zellkultur als Wachstums-Faktor und beim GM-CSF Bioassay als Standard gebraucht.

2.3 细胞因子

- IL-1: Oncogene Science 公司产自大肠杆菌的重组小鼠白细胞介素-1 α (比活性为 1×10^7 U/mg 蛋白) 通过 Dianova 公司购得, 在 IL-1 的生物检测中作为标准使用。
- IL-2: 产自大肠杆菌的重组人体白细胞介素-2(比活性为 2×10^7 U/mg 蛋白, 能与小鼠细胞交叉反应)来自德国生物技术研究中心(GBF, 位于 Braunschweig) 的 Conradt 博士的友好提供。在细胞培养与细胞活化的实验中, IL-2 作为刺激因子使用。
- IL-3: Behring 公司产自大肠杆菌的重组小鼠白细胞介素-3 (比活性为 5×10^7 CFU/mg 蛋白) 在 IL-3 的生物检测中作为标准使用。
- IL-6: Genzyme 公司的产自酵母的重组人体白细胞介素-6(能与小鼠细胞交叉反应, 比活性为 1×10^7 U/mg 蛋白) 在 IL-6 生物检测中作为标准使用。
- IL-10: Phar Mingen 公司的产自 COS7 细胞的重组小鼠白细胞介素-10 (比活性为 470 U/mg) 在 ELISA 中作为标准应用。
- GM-CSF: 产自酵母的重组小鼠粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(生物学活性为 5×10^7 CFU/mg 蛋白) 由 Behring 公司友好提供。此因子在细胞培养中作为生长因子使用, 并在 GM-CSF 的生物检测中作为标准使用。

- CSF-1: Rekombinanter humaner Makrophagen-Koloniestimulierender Faktor aus *E.coli* (biologische Aktivität von 1×10^7 CFU/mg Protein), kreuzreaktiv mit Mauszellen, auch als Geschenk von Behring bezogen, wurde als spezifischer Wachstumsfaktor für die Zellen des Makrophagen-systems [Stanley et al. 1983] benutzt.
- TNF- α : Rekombinanter muriner Tumor Nekrose Faktor- α aus *E.coli* (spezifische Aktivität von 4×10^5 bis 4×10^9 U/mg Protein) von Genzyme wurde beim TNF- α Bioassay als Standard verwendet.
- IFN- γ : Rekombinantes murines Gamma-Interferon aus *E.coli* (spezifische Aktivität von 1×10^7 U/mg Protein) wurde von Bender Wien (durch Boehringer Ingelheim) erworben und wurde zur Zellaktivierung und beim ELISA für IFN- γ als Standard gebraucht.

2.4 Antikörper

gegen Zelloberflächenmarker

- B220: 1) Ratte anti-Maus-B220 (CD45R, B-Zell-Marker) von Phar Mingen (Cat.No: 01121D) wurde bei der Depletion der B-Lymphozyten gebraucht. Die Einsetzungsverdünnung war 1:40.
- 2) FITC markiertes Ratten IgG2a anti-Maus-Ly5 (B220) von Klon RA3-6B2 (Medac, Hamburg, Cat.No: RM2601) wurde bei der Fluoreszenzfärbung zum Nachweis der B-Lymphozyten benutzt.
- CD3: 1) Ratten IgG2a anti-Maus CD3 (spezifischer T-Zell-Marker) von Klon KT3 (SeroTec, England Code: MCA500) wurde bei der Depletion der T-Lymphozyten benutzt. Die Einsetzungsverdünnung war 1:40.
- 2) FITC markiertes Hamster IgG anti-Maus CD3 (Medac, Cat.No: HM3401) wurde zur Untersuchung der Zellphänotypen gebraucht.

- CSF-1: 产自大肠杆菌的重组人巨噬细胞集落刺激因子 (生物学活性 1×10^7 CFU/mg 蛋白, 能与小鼠细胞交叉反应) 也来自 Behring 公司的赠予。此因子作为对巨噬细胞系的细胞专一的生长因子【Stanley 等, 1983 年】而使用。
- TNF- α : Genzyme 公司的产自大肠杆菌的重组小鼠肿瘤坏死因子- α (比活性为 4×10^5 至 4×10^9 U/mg 蛋白) 在 TNF- α 的生物检测中作为标准使用。
- IFN- γ : 大肠杆菌产的重组小鼠 γ -干扰素 (比活性为 1×10^7 U/mg 蛋白) 来自 Bender Wien 公司 (经由 Boehringer Ingelheim 购得), 作为标准用于细胞活化与对 IFN- γ 的 ELISA 检测。

2.4 抗体

抗细胞表面标志物

- B220: 1) 大鼠抗小鼠的 B220 (CD45R, B 细胞标志物) 购自 Phar Minge 公司 (编号: 01121D), 用于去除 B 淋巴细胞。使用稀释度为 1:40。
- 2) FITC 标记的大鼠 IgG2a 抗小鼠的 Ly5 (B220) 产自克隆 RA3-6B (Medac 公司, Hamburg, 编号: RM2601), 用于检测 B 淋巴细胞的荧光染色。
- CD3: 1) 大鼠 IgG2a 抗小鼠的 CD3 (特异性 T 细胞标志物) 产自克隆 KT3 (SeroTec 公司, England, 编号: MCA500), 用于去除 T 淋巴细胞。使用稀释度为 1:40。
- 2) FITC 标记的豚鼠 IgG 抗小鼠的 CD3 (Medac 公司, 编号: HM3401) 用于分析细胞的表型。

- CD4: FITC-markiertes Ratten anti-Maus-L3T4 (CD4, T-Helferzell-Marker) von Klon YTS 191.1 (Medac, Cat.No: RM2401) wurde zur Untersuchung auf Anwesenheit von T-Helferzellen gebraucht.
- CD4: FITC 标记的大鼠抗小鼠的 L3T4 (CD4, 辅助性 T 细胞标志物) 来自克隆 YTS191.1 (Medac 公司, 编号: RM2401), 用于分析辅助性 T 细胞的存在。
- CD8: FITC-markiertes Ratten anti-Maus Lyt-2 (CD8, zytotoxische T-Zell-Marker) von Becton Dickinson (Order No: 1353) wurde zur Untersuchung auf Anwesenheit von zytotoxischen T-Zellen gebraucht.
- CD8: FITC 标记的抗小鼠的 Lyt-2 (CD8, 杀伤性 T 细胞标志物) 购自 Becton Dickinson (货号 1353), 用于分析杀伤性 T 细胞的存在。
- F4/80: Ratten IgG2b anti-Maus Makrophagen [Anstyn & Gordon 1981], ein freundliches Geschenk von Dr. Siamon Gordon (University of Oxford, UK), wurde als dialysierte Ammonium Sulfat Fällung aus Gewebekulturüberstand zur Verfügung gestellt und bei der indirekten Fluoreszenzfärbung für Makrophagen als erster Antikörper benutzt. Die Einsetzungsverdünnung war 1:20.
- F4/80: 大鼠 IgG2b 抗小鼠的巨噬细胞【Anstyn 与 Gordon, 1981 年】来自英国牛津大学 Simon Gordon 博士的友好赠送。样品为透析后的组织培养上清液硫酸铵沉淀物, 在对巨噬细胞的间接荧光染色时用作第一抗体。使用稀释度为 1 : 20。
- Mac-1: FITC markiertes Ratten IgG2b anti-Maus Makrophagen (Mac-1, Marker der myeloischen Zellen) von Klon M1/70.15 (Medac Cat.No: RM2801) wurde zur Untersuchung der Zelloberflächenmarker gebraucht.
- Mac-1: FITC 标记的大鼠 IgG 2b 抗小鼠的巨噬细胞 (Mac-1, 髓系细胞的标志物) 来自克隆 M1/70.15 (Medac 公司, 编号: RM2801), 用于分析细胞的表面标志物。
- NK-1.1: Maus IgG2b anti-Maus NK-1.1 (Marker der Maus NK Vorläufer und reifen NK-Zellen [Hackett, et al. 1986]) von Klon PK136 aus American Type Culture Collection wurde an Protein A-Sepharose und anschließend durch Filtration über Sphergel gereinigt und wurde bei der Untersuchung auf Zelloberflächenmarker gebraucht.
- NK-1.1: 小鼠 IgG2b 抗小鼠的 NK-1.1 (小鼠 NK 前体细胞与成熟 NK 细胞的标志物【Hackett 等, 1986 年】) 产自克隆 PK136 (American Type Culture Collection 生产), 经蛋白 A 琼脂糖凝胶并接着通过球状凝胶过滤纯化后, 用于分析细胞的表面标志物。
- Leu-M3: Maus IgG2b anti-Human Monozyten und Makrophagen wurde als Isotyp Kontrolle bei der Antikörper-Färbung verwendet.
- Leu-M3: 小鼠 IgG2b 抗人的单核细胞与巨噬细胞, 在抗体染色中用作同型的对照。

gegen Immunglobuline

FITC-Ziege (Fab') ₂ anti-Maus IgG	Fa. Dianova	Code No. 115-016-062
FITC-Ziege (Fab') ₂ anti-Ratte IgG	Fa. Dianova	Code No. 112-016-062
AP-Ziege (Fab') ₂ anti-Ratte IgG	Fa. Dianova	Code No. 112-056-062

gegen spezielle Proteine und Substanzen

ananti-IL-3: Ratten IgG1 anti-murines IL-3 (zur Neutralization)	Fa. Oncogene Science	Code No. GF17
anti-IL-10: Ratten IgG1 anti-murines IL-10, gereinigt	Fa. Phar Mingen	Cat.No.18141D
biotinyliert	Fa. Phar Mingen	Cat.No.18152D
anti-IFN- γ : Ratten IgG1 anti-murines IFN- γ , gereinigt	Fa. Phar Mingen	Cat.No. 18181D
biotinyliert	Fa. Phar Mingen	Cat.No. 18112D
anti-TNF- α : Kaninchen IgG+IgM anti- murines TNF- α (zur Neutralization)	Fa. Genzym	Code. IP-400
anti-Perforin: mAb CB.5.4 Ratte anti-murines Perforin, ein großzügiges Geschenk von Prof. Tschopp, Institut für Biochemie, Universität de Lausanne, Schweiz.		

抗免疫球蛋白

FITC-山羊 (Fab') ₂ 抗小鼠 IgG	公司 Dianova	代号 115-016-062
FITC-山羊 (Fab') ₂ 抗大鼠 IgG	公司 Dianova	代号 112-016-062
AP-山羊 (Fab') ₂ 抗大鼠 IgG	公司 Dianova	代号 112-056-062

抗特定的蛋白质与物质

抗 IL-3: 大鼠 IgG1 抗小鼠的 IL-3 (用于中和)	公司 Oncogene Science	代号 GF17
抗 IL-10: 大鼠 IgG1 抗小鼠的 IL-10, 纯化	公司 Phar Mingen	编号 18141D
生物素化	公司 Phar Mingen	编号 18152D
抗 IFN- γ : 大鼠 IgG1 抗小鼠的 IFN- γ , 纯化	公司 Phar Mingen	编号 18181D
生物素化	公司 Phar Mingen	编号 18112D
抗 TNF- α : 家兔 IgG+IgM 抗 小鼠的 TNF- α (用于中和)	公司 Genzym	代号 IP-400
抗穿孔素: 单克隆抗体 CB.5.4, 大鼠抗小鼠的穿孔素, 来自瑞士洛桑大学 生物化学研究所 Tschopp 教授的慷慨赠予。		

2.5 Enzyme

Trypsin: Trypsin (aus Rinderpankreas) wurde als 2,5%ige Lösung (für die Zellkultur) von Firma Boehringer Mannheim (Bestell Nr:210234) gekauft.

Klenow Enzym: Zur cDNA-Markierung wurde Klenow Enzym (labeling grade, 2U/μl) von Boehringer Mannheim (Bestell Nr: 1008404) erworben.

2.6 Isotop

[³H] Thymidin: spez. Aktivität von 25 Ci/mmol, wurde von IRE (Düsseldorf) bezogen und beim [³H] Thymidin-Einbaus Assay zur Untersuchung der Zellproliferation gebraucht.

Na₂[⁵¹CrO₄]: spez. Aktivität von 423 mCi/mg, wurde von NEN (Dreieich) erworben und beim ⁵¹Cr-Freisetzungsassay zum Test der Zytotoxizität verwendet.

[α-³²P] -dCTP: spez. Aktivität von 3000 Ci/mmol, wurde von Amersham-Buchler (Braunschweig) gekauft und bei der Markierung der cDNA-Sonde für den Northern-Blot benutzt.

2.5 酶

胰蛋白酶: 胰蛋白酶 (来自牛胰腺) 以 2.5% 的溶液试剂 (用于细胞培养) 购自 Boehringer Mannheim 公司 (订货号: 210234)。

Klenow 酶: 为标记 cDNA (互补 DNA), Klenow 酶 (标记级, 2U/μL) 采购自 Boehringer Mannheim 公司 (订货号: 1008404)。

2.6 同位素

[³H]-Thymidine: 比活度为 25Ci (居里) /mmol, 购自 IRE (Düsseldorf) 公司, 在 [³H]-Thymidine (胸腺嘧啶脱氧核苷, 简称“胸苷”) 掺入法中用于检测细胞的增殖。

Na₂[⁵¹CrO₄]: 比活度为 423mCi/mg, 购自 NEN (Dreieich) 公司, 用于 ⁵¹Cr-释放检测来试验细胞的杀伤活性。

[α-³²P] dCTP: 比活度为 3000Ci/mmol, 购自 Braunschweig 的 Amersham-Buchler 公司, 在 Northern 印迹杂交中用于标记 cDNA 探针。

2.7. Medien

2.7.1. RPMI 1640 Medium

Zu 1 Liter in dest. H₂O aufgelösten RPMI 1640 Medium wurden 10⁵ Einheiten Penicillin, 0,1g Streptomycin, 15 mg Phenolrot als pH-Indikator sowie 2 g NaHCO₃ als Puffersubstanz gegeben, der pH-Wert mit CO₂ auf 6,9 eingestellt. Die Lösung wurde steril filtriert, und bei 4°C aufbewahrt.

2.7.2. Vollmedium

Das Vollmedium besteht aus 90% RPMI 1640 Medium und 10% fötalem, bei 56°C für 30 min hitzeinaktiviertem Kälberserum (FKS). Das Vollmedium enthält alle für die Zellen nötigen Wachstumsfaktoren, ist deswegen das am häufigsten benutzte Medium für die Zellkultur.

2.7.3. L-Zell "konditioniertes" Medium

L929 Fibroblasten-Zellen sezernieren spontan Kolonie-stimulierende-Faktoren (CSF), die zum Proliferieren und Heranreifen der Makrophagen notwendig sind [Stanley & Heard, 1977], Zum Gewinnen des L-Zell konditionierten Mediums wurden 10 ml Vollmedium auf 3×10⁶ L929 Fibroblasten-Zellen, die zuvor in einer 9-cm Gewebeskulturschale (Falcon 3003) ausgesät worden waren, gegeben. Es folgte eine 4-tägige Inkubation bei 37°C, 5% CO₂. Anschließend wurde der zellfreie Überstand von L929-Zellen gesammelt und als CSF-haltiges Medium verwendet. Das Medium wurde bei -20°C aufbewahrt.

2.7.4. Iscove's Medium (Minimum Essential Medium Iscove's Modification)

Zu 1 Liter in dest. H₂O aufgelösten Iscove's Medium wurden 2 g NaHCO₃, 10⁵ Einheiten Penicillin und 0,1 g Streptomycin gegeben. 15 mg/l Phenolrot wurde als pH Indikator zugesetzt und der pH-Wert des Mediums wurde mit CO₂ auf 6,9 eingestellt. Nach Sterilfiltration wurde das fertige Iscove's Medium bei 4°C aufbewahrt. Iscove's Medium wurde für den Soft Agar Assay und den IL-1 Bioassay als Medium verwendet.

2.7 培养液

2.7.1 RPMI 1640 培养液

在 1 升溶解于蒸馏水的 RPMI 1640 培养基中, 加入 10⁵ 单位的青霉素 (Penicillin)、0.1 克链霉素 (Streptomycin)、15 毫克酚红 (Phenol red) 作为 pH 指示剂及 2 克碳酸氢钠 (NaHCO₃) 作为缓冲物, 用二氧化碳 (CO₂) 气体将培养液的 pH 值调至 6.9。将此溶液无菌过滤, 然后置于 4°C 保存。

2.7.2 全培养液

全培养液由 90% 的 RPMI 1640 培养液与 10% 在 56°C 经 30 分钟加热灭活后的胎牛血清 (FCS) 组成。全培养液含有所有细胞必需的生长因子, 因而是细胞培养最常用的培养液。

2.7.3 L-细胞条件培养液

L929 小鼠成纤维细胞自发地分泌集落刺激因子 (CSF), 该因子为巨噬细胞增殖与成熟所必需【Stanley 与 Heard, 1977 年】。为了获取 L-细胞条件培养液, 将 10 毫升全培养液加到 3×10⁶ 个 L929 小鼠成纤维细胞上, 这些细胞事先已接种在直径为 9 厘米的组织培养皿 (Falcon 3003) 中。接着在 37°C、5% CO₂ 中培养 4 天。最后收集无细胞的 L929 培养上清液, 并将此液作为含有 CSF 的培养液使用。此培养液在 -20°C 保存。

2.7.4 Iscove's 培养液 (最小基础培养液 Iscove's 改良型)

在 1 升溶解于蒸馏水的 Iscove's 培养基中, 加入 2 克碳酸氢钠、10⁵ 单位青霉素与 0.1 克链霉素。以 15 微克/升将酚红加入其中作为 pH 指示剂, 用 CO₂ 气体将培养液的 pH 值调至 6.9。无菌过滤后, 制作完成的 Iscove's 培养液保存于 4°C。Iscove's 培养液在软琼脂检测与 IL-1 的生物检测中用作培养液。

2.8. Puffer und Lösungen**2.8.1. für die zellbiologische Arbeit****2.8.1.1. PBS⁺-MC (Phosphat gepufferte Kochsalzlösung):**

Na ₂ HPO ₄	8,1 mM
KH ₂ PO ₄	1,5 mM
NaCl	140 mM
KCl	2,5 mM
Penicillin	10 ⁵ Einheiten/l
Streptomycin	0.1 g/l
pH 7,4	

Der pH-Wert wurde mit HCl eingestellt. Die Lösung wurde steril filtriert und danach bei 4°C aufbewahrt. Für den als PBS-MC bezeichneten Puffer wurden Penicillin und Streptomycin nicht hinzugefügt.

2.8.1.2. Actinomycin D Lösung:

Actinomycin D	5 mg
70% Ethanol	0,5 ml
PBS ⁺ -MC	4,5 ml

Actinomycin D wurde zunächst in 70% Ethanol gelöst, dann mit PBS aufgefüllt und bei 4°C aufbewahrt. Diese Lösung wurde für den TNF-Aktivitätstest zur Hemmung der Zellteilung von L929 gebraucht.

2.8.1.3. Glyzerin-Gelatine-Lösung:

Gelatine	10 g
PBS-MC	70 ml
Glyzerin	30 ml

2.8 缓冲液与溶液**2.8.1 用于细胞生物学工作****2.8.1.1 PBS⁺-MC (磷酸盐缓冲生理盐水) :**

磷酸氢二钠	8.1 mmol/L
磷酸二氢钾	1.5 mmol/L
氯化钠	140 mmol/L
氯化钾	2.5 mmol/L
青霉素	10 ⁵ 单位/L
链霉素	0.1 g/L
pH 7.4	

用盐酸 (HCl) 调 pH 值。将溶液无菌过滤后在 4°C 保存。对于标识为 PBS-MC 的缓冲液，青霉素与链霉素未加入其中。

2.8.1.2 放线菌素 D 溶液:

放线菌素 D (Actinomycin D)	5 mg
70% 乙醇 (Ethanol)	0.5 mL
PBS ⁺ -MC	4.5 mL

先将放线菌素 D 溶于 70% 的乙醇中，然后加入 PBS，置于 4°C 保存。在 TNF 的活性试验中，此溶液用于抑制 L929 的细胞分裂。

2.8.1.3 甘油明胶液:

明胶 (Gelatine)	10 g
PBS-MC	70 mL
甘油 (Glycerin)	30 mL

Bei ca. 60°C wurde Gelatine in PBS-MC gelöst, die Lösung handwarm abgekühlt und Glycerin hinzugegeben. Bei 4°C ist diese Gallerte unbegrenzt haltbar. Vor dem Gebrauch wurde sie auf 60°C erwärmt und die luftgetrockneten Präparate mit der auf 40°C abgekühlten Glycerin-Gelatine-Lösung eingedeckt.

在约 60°C 将明胶溶于 PBS-MC 中, 待溶液冷却至手温后, 将甘油加入其中。在 4°C, 此胶体可无限期保存。使用前, 将胶体在 60°C 加热, 空气干燥后的细胞制片用冷却至 40°C 的甘油明胶液封固。

2.8.1.4. Gepufferte Formalin-Aceton-Lösung:

Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	40 mg
KH ₂ PO ₄	200 mg
dest. H ₂ O	100 ml
Aceton	90 ml
Formalin	50 ml

Die Substanzen wurden in der angegebenen Reihenfolge gemischt. Die hergestellte Lösung zeigte einen pH-Wert von ca. 6,6 und wurde bei der doppelten Esterase-Färbung zur Zellfixierung benutzt.

2.8.1.4 缓冲型福尔马林-丙酮液:

磷酸氢二钠 2 水合物	40 mg
磷酸二氢钾	200 mg
蒸馏水	100 mL
丙酮	90 mL
福尔马林	50 mL

将上述物质按照所列顺序进行混合。配制完成的溶液显示的 pH 值约为 6.6, 在酯酶双染色中用于细胞的固定。

2.8.1.5. 2-ME/Hepes Stammlösung:

2-Mercaptoethanol	10 µl
H ₂ O	10 ml
1 M Hepes Lösung	12,5 ml
Vollmedium	27,5 ml

2-Mercaptoethanol wurde zuerst mit H₂O gemischt, steril filtriert, dann mit der sterilen Hepes Lösung und Vollmedium versetzt. Die dadurch entstandene Stammlösung enthielt zirka 3mM 2-Mercaptoethanol und 0,25 M Hepes, und wurde in Aliquots bei -20°C gelagert.

2.8.1.5 2-巯基乙醇/Hepes 母液:

2-巯基乙醇	10 µL
水	10 mL
1 mol/L Hepes 溶液	12.5 mL
全培养液	27.5 mL

先将 2-巯基乙醇与水混合, 无菌过滤后, 与无菌的 Hepes 溶液和全培养液混匀。由此配成的母液含有约 3mmol/L 的 2-巯基乙醇和 0.25 mol/L 的 Hepes, 将溶液等分为多个小份, 存放于 -20°C。

2.8.1.6. MTT-Lösung:

MTT	50 mg
PBS ⁺ -MC	10 ml

MTT wurde in PBS⁺-MC gelöst, steril filtriert und bei 4°C aufbewahrt. Die MTT-Lösung wurde bei dem kolorimetrischen Bioassay (MTT-Test) verwendet.

2.8.1.7. MTT-Abstopplösung:

N, N-Dimethylformamid	200 ml
dest. H ₂ O	200 ml
SDS	40 g

In einer 500 ml Glasflasche wurde zuerst DMF (N, N-Dimethylformamid) mit H₂O versetzt. Danach wurde SDS in die Flasche gegeben. Die Flasche wurde bei 37°C über Nacht stehen gelassen, um das SDS aufzulösen. Diese Lösung wurde bei 37°C aufbewahrt.

2.8.1.8. Percoll Stammlösung (60,6%):

Percoll	60 ml
3×RPML 1640	30 ml
FKS	9.8 ml

Diese Lösung diente als Stammlösung zum Aufbauen des Percollgradientes und konnte bei 4°C für mehrere Monate aufbewahrt werden. Die Osmolarität der Lösung steht bei 285 m OSM/kg H₂O.

2.8.1.9. Puffer für die Esterase-Doppelfärbung:

Stammlösung A:	10 ml 1M KH ₂ PO ₄ + 140 ml H ₂ O
Stammlösung B:	10 ml 1M Na ₂ HPO ₄ + 140 ml H ₂ O

2.8.1.6 MTT-溶液:

MTT	50 mg
PBS ⁺ -MC	10 mL

将 MTT 溶于 PBS⁺-MC 中, 无菌过滤后, 存放于 4°C。此 MTT 溶液用于比色法生物检测 (MTT 法)。

2.8.1.7 MTT-终止液:

N,N-二甲基甲酰胺	200 mL
蒸馏水	200 mL
SDS	40 g

在一个 500 毫升的玻璃瓶中, 先将 DMF (N,N-二甲基甲酰胺) 与水混匀。随后将 SDS 加入瓶中。此瓶在 37°C 静置过夜, 以便让 SDS 充分地溶解。此液在 37°C 存放。

2.8.1.8 Percoll 母液 (60.6%) :

Percoll	60 mL
3×RPMI 1640	30 mL
胎牛血清	9.8 mL

此液是用于配制 Percoll 密度梯度离心液的母液, 能在 4°C 存放数月。此液的渗透压为 285 毫渗透摩尔/升水 (m OSM/kg H₂O)。

2.8.1.9 用于酯酶双染色的缓冲液:

母液 A:	10 mL 1 mol/L 磷酸二氢钾 + 140 mL 水
母液 B:	10 mL 1 mol/L 磷酸氢二钠 + 140 mL 水

Sørensen-Puffer:

pH 6,3	77,35 ml Stammlösung A + 22,65 ml Stammlösung B
pH 7.4	19,60 ml Stammlösung A + 80,40 ml Stammlösung B

1) für die Chloroacetatesterase-Färbung:

Sørensen-Puffer pH 7,4	190 ml
Fast Blue BB Salz	200 mg
Naphthol AS-D Chloroacetat	20 mg
DMF	10 ml

Naphthol AS-D Chloracetat wurde in einem Reagenzröhrchen aus Glas in DMF (N, N-Dimethylformamid) gelöst und zu der Puffer/Farbstoff-Mischung gegeben. Das Gemisch wurde immer frisch angesetzt, vor Licht geschützt und unmittelbar vor der Färbung durch Whatman-Filterpapier (Nr.54) filtriert.

2) für die 2-Naphtylbutyratesterase Färbung:

Sørensen-Puffer pH 6,3	190 ml
Fast Garnet GBC	200 mg
α -Naphtylbutyrat	200 μ g
Ethylenglycolmonomethylether	8 ml

α -Naphtylbutyrat wurde mit Ethylenglycolmonomethylether gemischt und zu der Puffer/Farbstoff-Mischung gegeben. Vor jedem Gebrauch wurde es frisch angesetzt und vor Licht geschützt.

2.8.1.10. Trypsin/EDTA Lösung:

NaCl	8 g
KCl	0,4 g
α -D-Glucose	1,0 g
NaHCO ₃	0,35g
EDTA	0,2 g

索伦森氏 (Sørensen) 缓冲液:

pH 6.3	77.35 mL 母液 A + 22.65 mL 母液 B
pH 7.4	19.60 mL 母液 A + 80.40 mL 母液 B

1) 用于氯乙酸酯酶的染色:

索伦森氏缓冲液 pH 7.4	190 mL
固蓝 BB 盐	200 mg
萘酚 AS-D 氯乙酸酯	20 mg
DMF	10 mL

将萘酚 AS-D 氯乙酸酯在一支玻璃的反应试管中溶于 DMF (N,N-二甲基甲酰胺), 然后加入到缓冲液与染料 (固蓝 BB 盐) 的混合物中。这一混合物总是新鲜配制, 避光操作, 染色前直接使用 Whatman 滤纸 (54 号) 进行过滤。

2) 用于 α -丁酸萘酚酯酶的染色:

索伦森氏缓冲液 pH 6.3	190 mL
固深红 GBC	200 mg
α -丁酸萘酚酯	200 μ g
乙二醇单甲基醚	8 mL

将 α -丁酸萘酚酯与乙二醇单甲基醚混合后, 加到缓冲液与染料 (固深红 GBC) 的混合液中。每次使用前新鲜配制, 避光操作。

2.8.1.10 胰蛋白酶/EDTA 溶液:

氯化钠 (NaCl)	8 g
氯化钾 (KCl)	0.4 g
α -D-葡萄糖 (α -D-Glucose)	1.0 g
碳酸氢钠 (NaHCO ₃)	0.35 g
EDTA	0.2 g

Die Substanzen wurden hintereinander im 1 Liter dest. H₂O gelöst und mit 20 ml 2,5% Trypsin-Lösung versetzt, damit eine Endkonzentration von 0,05% (w/v) Trypsin in der Lösung entstand. Nach Steril-filtration wurde die Lösung in Aliquots bei -20°C zum Aufbewahren eingefroren.

2.8.2. für ELISA, FACS und histochemische Färbungen

2.8.2.1. TBS-Puffer:

Tris-HCl	100 mM
NaCl	150 mM
pH 7,5	

2.8.2.2. DAB-H₂O₂-Lösung:

DAB	7 mg
TBS	10 ml
H ₂ O ₂	4 µl

DAB (3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid, Substrat für Peroxidase) wurde in TBS aufgelöst. Kurz vor dem Gebrauch wurde H₂O₂ hinzugegeben. Zum Aufbewahren konnte die DAB/TBS-Lösung bei -20°C eingefroren werden, dann vor der Anwendung aufgetaut und mit H₂O₂ ergänzt.

2.8.2.3. ELISA-Waschpuffer:

NaCl	0,3 M
Tween 20	0,1%
in PBS-MC gelöst und bei 4°C aufbewahrt.	

2.8.2.4. FACS-Waschpuffer:

FKS	2%
NaN ₃	0,01% (w/v)
in PBS ⁺ -MC versetzt, bei 4°C aufbewahrt.	

将上述物质逐一溶入 1 升蒸馏水中，然后与 20 毫升 2.5% 的胰蛋白酶 (Trypsin) 溶液混匀，生成终浓度为 0.05% (重量/体积) 的胰蛋白酶溶液。无菌过滤后，将溶液分为小份，存于 -20°C。

2.8.2 用于 ELISA、FACS 与组织化学染色

2.8.2.1 TBS-缓冲液:

Tris-盐酸盐	100 mmol/L
氯化钠	150 mmol/L
pH 7.5	

2.8.2.2 DAB-H₂O₂ 溶液:

DAB	7 mg
TBS (Tris-buffer-salt-solution)	10 mL
过氧化氢	4 µL

将 DAB (3,3'-二氨基联苯胺四盐酸，过氧化物酶的底物) 溶解在 TBS 中。即将使用前，将过氧化氢加入其中。为了保存，可将 DAB+TBS 的溶液冻存于 -20°C，使用前解冻，然后加入过氧化氢。

2.8.2.3 ELISA-洗涤缓冲液:

氯化钠	0.3 mol/L
Tween 20	0.1%
溶于 PBS-MC 中，置于 4°C 保存。	

2.8.2.4 FACS-洗涤缓冲液:

胎牛血清	2%
叠氮化钠	0.01% (重量/体积)
在 PBS ⁺ -MC 中混匀，保存于 4°C。	

2.8.2.5. Fast-Red-Lösung:

Naphthol AS-MX Phosphat	2 mg
N, N-Dimethylformamid	0,2 ml
0, 1 M Trispuffer pH 8,2	9,8 ml
1 M Levamisole	0,01 ml
Fast Red TR	10 mg

Zuerst wurde Naphthol AS-MX Phosphat in N, N-Dimethylformamid (im Glas-Reagenz Röhrchen) gelöst, dann wurden Trispuffer und Levamisole zugegeben. Diese Lösung ist bei 4°C einige Wochen, bei -20°C langer haltbar. Kurz vor der Färbung wurde Fast Red TR (Substrat für Alkalische Phosphatase [Dejong et al. 1985]) darin gelöst und durch einen Filter (0,22 µm, Millipore, Nr: SLGS 025BS) auf die Objektträger gegeben.

2.8.2.6. TMS-Puffer (Alkalische Phosphatase Puffer):

Tris-HCl	100 mM
NaCl	100 mM
MgCl ₂	50 mM
pH 9,5	

2.8.3. für die Molekularbiologische Arbeit**2.8.3.1. 20×SSC-Lösung:**

NaCl	3 M
Na-Citrate	0,3 M
pH 7,0 (20°C)	

mit dest.H₂O angesetzt, autoklaviert und dann bei RT aufbewahrt.

2.8.2.5 固红溶液:

萘酚 AS-MX 磷酸盐	2 mg
N,N-二甲基甲酰胺	0.2 mL
0.1 mol/L Tris-缓冲液 (pH 8.2)	9.8 mL
1 mol/L 左旋咪唑	0.01 mL
固红 TR	10 mg

先将萘酚 AS-MX 磷酸盐溶解于 N,N-二甲基甲酰胺 (在玻璃试管中进行), 然后加入 Tris-缓冲液与左旋咪唑。此溶液可在 4°C 放置几周, 在 -20°C 保存时间更长。即将染色前, 将固红 TR (碱性磷酸酶的底物【Dejong 等, 1985 年】) 溶于其中, 通过一个过滤器 (0.22 微米, Millipore 公司, 型号: SLGS025BS) 加到载玻片上。

2.8.2.6 TMS-缓冲液 (碱性磷酸酶缓冲液) :

Tris-盐酸盐	100 mmol/L
氯化钠	100 mmol/L
氯化镁	50 mmol/L
pH 9.5	

2.8.3 用于分子生物学工作**2.8.3.1 20×SSC 溶液:**

氯化钠	3 mol/L
柠檬酸钠	0.3 mol/L
pH 7.0 (20°C)	

使用蒸馏水配制, 蒸汽灭菌, 置于室温保存。

2.8.3.2. 50×Denhardt's Lösung:

Ficoll	1 %
Polyvinylpyrrolidon	1%
BSA	1%
in H ₂ O bidest.	
sterilfiltriert und in Aliquots bei -20°C aufbewahrt.	

2.8.3.3. DEPC-H₂O:

H₂O bidest. + 0,1% DEPC
über Nacht stehen lassen, dann autoklavieren.

2.8.3.4. DMSO-Mix:

H ₂ O	150 µl
Dimethylsulfoxid	1750 µl
0,5 M Na-Phosphatpuffer (pH 7)	70 µl
20 % SDS	35 µl

Der Mix wurde in 150 µl Aliquots bei -20°C aufbewahrt.

2.8.3.5. Hybridisierungspuffer für den Northern-Blot:

SSC	5×
Denhardt's Lösung	5×
SDS	0,5%
EDTA	10 mM
bei RT aufbewahrt.	

2.8.3.2 50×Denhardt's 溶液:

Ficoll	1%
聚乙烯吡咯烷酮	1%
牛血清白蛋白	1%

溶于双蒸水, 无菌过滤, 分为小份, 存放于-20°C。

2.8.3.3 DEPC 水:

双蒸水+0.1% 焦碳酸二乙酯
静置过夜, 然后蒸汽灭菌。

2.8.3.4 DMSO 混合液:

水	150 µL
二甲基亚砷	1750 µL
0.5 mol/L 钠-磷酸盐缓冲液 (pH7)	70 µL
20% SDS	35 µL

将此混合液以每份 150 微升进行等分, 保存于-20°C。

2.8.3.5 用于 Northern 印迹杂交的杂交缓冲液:

SSC	5×
Denhardt's 溶液	5×
SDS	0.5%
EDTA	10 mmol/L
置于室温保存。	

2.8.3.6. Hybridisierungspuffer für die *in situ* Hybridisierung:

SSC	4×
Formamid	50%
Denhart's Lösung	1×
Dextran Sulfat	5%
Lachs Sperma DNA	0,5 mg/ml
Hefe tRNA	0,25 mg/ml

Vor der Hybridisierung wurde der Puffer aus den Stammlösungen (2×SSC, 50×Denhart's, 28% Dextran Sulfat, 10 mg/ml Lachs Sperma DNA und 5 mg/ml Hefe tRNA) frisch angesetzt.

2.8.3.7. 5×RNA-Probenpuffer:

Na-Phosphatpuffer (pH 7)	10 mM
Ficoll	10%
Bromphenolblau	0,4%

Der Puffer wurde mit Wasser angesetzt, autoklaviert und bei -20°C aufbewahrt.

2.8.3.8. Lösung D:

Guanidiniumisothiocyanat	4 M
Natriumcitrat	25 mM (pH 7)
Sarcosyl	0,5%
2-Mercaptoethanol	0,1 M

Um den Umgang mit Guanidiniumisothiocyanat (GTC) zu minimieren, wurde 250 g GTC in der Originalverpackung mit 293 ml Wasser, 17,6 ml 1 M Natriumcitrat pH 7 und 26,4 ml 10% Sarcosyl bei 65°C gelöst. Diese Stammlösung konnte mindestens 3 Monate bei RT aufbewahrt werden. Lösung D wurde dann durch Zugabe von 72 µl 2-Mercaptoethanol/10 ml Stammlösung hergestellt. Diese Lösung wurde bei 4°C aufbewahrt und für die RNA-Isolation benutzt [Chomczynski & Sacchi 1987].

2.8.3.6 用于原位杂交的杂交缓冲液:

SSC	4×
甲酰胺	50%
Denhart's 溶液	1×
硫酸葡聚糖	5%
鲑鱼精 DNA	0.5 mg/mL
酵母 tRNA	0.25 mg/mL

原位杂交前, 此缓冲液需用多个母液 (20×SSC, 50×Denhart's, 28% 硫酸葡聚糖, 10mg/mL 鲑鱼精 DNA, 以及 5mg/mL 酵母 tRNA) 来新鲜配制。

2.8.3.7 5×RNA-样品缓冲液:

钠-磷酸盐缓冲液 (pH 7)	10 mmol/L
Ficoll	10%
溴酚蓝	0.4%

此缓冲液使用水配制, 蒸汽灭菌后存于-20°C。

2.8.3.8 溶液 D:

异硫氰酸胍	4 mol/L
柠檬酸钠	25 mmol/L (pH 7)
十二烷基肌氨酸钠	0.5%
2-巯基乙醇	0.1 mol/L

为使接触异硫氰酸胍 (GTC) 降至最低, 在原包装中, 将 250 克异硫氰酸胍溶于 293 毫升水、17.6 毫升 1 摩尔柠檬酸钠 (pH7) 及 26.4 毫升 10% 的十二烷基肌氨酸钠, 溶解温度为 65°C。此母液能够在室温下至少存放 3 个月。向每 10 毫升母液加入 72 微升 2-巯基乙醇, 即可完成溶液 D 的配制。此液保存在 4°C, 用于分离 RNA 【Chomczynski 与 Sacchi, 1987 年】。

2.8.3.9. 10×TE-Puffer:

Tris-HCl	100 mM
EDTA	10 mM
pH 8,0	

mit H₂O bidest. angesetzt, autoklaviert und bei RT aufbewahrt.

2.9. Zelllinien**2.9.1. D10.G4.1**

D10.G4.1 ist eine klonierte Maus T-Helfer-Zelllinie (Herkunft: AKR/J(H-2k) Mäuse). In Abwesenheit von IL-1 wächst diese Zelllinie nur minimal nach Con A Stimulation. Deswegen wird sie als vertraubare und empfindliche Zelllinie zum Bioassay auf IL-1 verwendet [Kaye et al. 1983]. Die D10 Zellen werden kultiviert in Iscove's Medium mit 5% FKS, 1 mM Natrium Pyruvat, 1% 2-ME/Hepes Stammlösung, und ca. 7% Überstand aus Con A-stimulierten Ratten Milzzellen in 6-well Mikrotiterplatten (Nunc, Denmark).

2.9.2. FDCP-1

FDCP-1 ist eine murine Faktor-abhängige hämatopoetische Vorläufer Zelllinie [Naparstek et al., 1986] und proliferiert nur in Antwort auf GM-CSF oder IL-3 [Magee & Wing, 1989]. In der vorliegenden Arbeit wurden FDCP-1 Zellen in Vollmedium plus ca. 10% IL-3-haltiges Medium (Wehi-3D Zellüberstand) in Gewebekulturschalen (Falcon 3003) kultiviert. Sie wurden zur Bestimmung der GM-CSF- oder IL-3-Aktivität in Überständen verwendet.

2.9.3. L929

Die adhärenente L929-Fibroblastenlinie (Herkunft: C3H Mäuse) wurde in Vollmedium in Gewebekulturschalen (Falcon 3003) kultiviert. Zum Ablösen der Zellen wurde das Medium entfernt, 3 ml Trypsin/EDTA-Lösung (2.8.1.10) auf den L929 Zellrasen gegeben und 4-5 min bei RT inkubiert. Die Trypsin-EDTA-Lösung wurde anschließend vorsich-

2.8.3.9 10×TE 缓冲液:

Tris-盐酸盐	100 mmol/L
EDTA	10 mmol/L
pH 8.0	

使用双蒸水配制，蒸汽灭菌，室温存放。

2.9 细胞株**2.9.1 D10.G4.1**

D10.G4.1 是克隆的小鼠辅助性 T 细胞株 [产自 AKR/J (H-2K)小鼠]。无 IL-1 时，此细胞株只在 Con A 的刺激后有最小量生长，因此它被作为可信赖与敏感的细胞株用于 IL-1 的生物检测【Kaye 等，1983 年】。D10.G4.1 细胞培养在 Iscove's 培养液中，其中含有胎牛血清（5%）、丙酮酸钠（1 mmol/L）、2-巯基乙醇/Hepes 母液（1%）、还有来自 Con A 刺激后的大鼠脾细胞上清液（约 7%），培养容器为 6 孔培养板（Nunc, Denmark）。

2.9.2 FDCP-1

FDCP-1 是一个小鼠的因子依赖型造血前体细胞株【Naparstek 等，1986 年】，其只对 GM-CSF 或者 IL-3 产生应答而增殖（Magee 与 Wing，1989 年）。在本工作中，FDCP-1 细胞培养在全培养液里，其中添加了约 10% 含有 IL-3 的培养液（Wehi-3D 细胞的上清液），培养容器为组织培养皿（Falcon 3003）。此细胞株用于测定上清液中的 GM-CSF 或者 IL-3 的活性。

2.9.3 L929

将粘附的 L929 成纤维细胞（产自 C3H 小鼠）在组织培养皿（Falcon 3003）中培养在全培养液里。为了剥离细胞，将培养液移出，在细胞坪上添加 3 毫升的胰蛋白酶/EDTA 溶液（2.8.1.10），室温放置 4-5 分钟。接下

tig entfernt, die Zellen mit Vollmedium abgespült und zweimal gewaschen. Die gewaschenen L929 wurden in Voll-medium aufgenommen, verdünnt und in Kulturschalen wieder eingesät. L929 Zellen wurden in der Arbeit als TNF-empfindliche Tumorzellen für den TNF-Aktivitätstest gebraucht.

2.9.4. P815

P815-Mastozytomzellen (Herkunft: DBA/2J Mäuse, Methylcholanthren-induziert) wurden in Vollmedium als Suspensionskultur in Greiner Petrischalen gehalten. Diese Tumorzelllinie zeigt sich NK-resistent, lässt sich aber von LAK-Zellen und aktivierten Makrophagen lysieren. Zur Bestimmung der NK- oder LAK-Aktivität wurden P815 jeweils als Kontrolle oder Zielzellen bei dem Zytotoxizität-Test verwendet.

2.9.5. 7TD1

Die Hybridoma Zelllinie 7TD1 (Fusion der Maus Myeloma Zelllinie SP2/0-AG14 mit Milzzellen aus einer mit 50 µg *E.coli* LPS immunisierten C57BL/6 Maus) wächst nur in Gegenwart von IL-6 und wird deswegen zum Bioassay auf IL-6 angewendet [Van-Snick et al. 1986]. Zur Kultur werden die Zellen im Vollmedium, ergänzt mit 2% 2-ME/Hepes Stammlösung (2.8.1.5) und 5-10% IL-6 haltigem Medium (3T3-Zellüberstand), in 50 ml Gewebekultur-flaschen (Nunc, Denmark 1 63371) gehalten.

2.9.6. Yac-1

Yac-1 ist eine durch Inokulation mit Moloney Leukemia Virus (MLV) in einer neugeborenen A/Sn Maus induzierte Lymphoma Zelllinie. Diese Zelllinie ist sehr empfindlich gegen die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen aus der Maus [Kiessling et al. 1975 a und b]. Yac-1 wurde zum NK-Aktivität-Test als Zielzellen benutzt und *in vitro* mit Vollmedium in 9-cm Gewebekulturschalen (Falcon 3003) gehalten.

来, 小心地移去胰蛋白酶/EDTA 溶液, 用全培养液将细胞洗下, 洗涤两次。洗后的 L929 细胞在全培养液中悬浮、稀释, 再次接种入培养皿。L929 细胞在本工作中作为对 TNF 敏感的肿瘤细胞用于 TNF 活性的检测。

2.9.4 P815

P815 肥大细胞瘤细胞 [产自 DBA/2J 小鼠, 由甲基胆蒽 (Methylcholanthrene) 诱导生成] 在全培养液中, 以悬浮培养的方式在 Greiner 培养皿中进行。此肿瘤细胞株表现出对 NK 细胞有抵抗力, 但能被 LAK 细胞与活化的巨噬细胞所裂解。为了确定是 NK 还是 LAK 活性, P815 总是作为对照细胞或者靶细胞被用于杀伤活性的试验中。

2.9.5 7TD1

杂交瘤细胞株 7TD1 [来自小鼠骨髓瘤细胞株 SP2/0-AG14 与使用 50 微克大肠杆菌的脂多糖 (LPS) 免疫过的 C57BL/6 小鼠脾细胞的融合] 只生长在有 IL-6 的环境中, 故而应用于 IL-6 的生物检测 [Van-Snick 等, 1986 年]。为了培养, 将这种细胞用全培养液 [其中已添加 2% 的 2-巯基乙醇/Hepes 母液 (2.8.1.5) 与 5-10% 含有 IL-6 的培养液 (3T3 细胞上清液)] 培养在 50 毫升组织培养瓶 (Nunc, Denmark 1 63371) 中。

2.9.6 Yac-1

Yac-1 是一种通过将莫洛尼白血病病毒 (MLV) 接种于一只新生的 A/Sn 小鼠而诱导生成的淋巴瘤细胞株。此细胞株对小鼠 NK 细胞的杀伤活性极为敏感 [Kiessling 等, 1975 年 a 与 b]。Yac-1 作为靶细胞用于 NK 活性的检测, 体外使用全培养液培养在直径为 9 厘米的组织培养皿 (Falcon 3003) 中。

Methoden

2.10. Zellisolierung, -kultur, -reinigung und -aktivierung

2.10.2. Isolierung der Knochenmarkzellen

Maus-Femuren wurden aseptisch entnommen, gesäubert und an den Enden aufgeschnitten. Das Knochenmark wurde mit Hilfe einer Spritze und einer 27G (0,4-mm in Durchmesser) Kanüle herausgespült, dann in RPMI 1640 Medium suspendiert. Nach einmaligem Waschen wurden die Knochenmarkzellen mit Vollmedium auf eine Zellkonzentration von 3×10^7 /ml eingestellt. Die Zellsuspension wurde sorgfältig auf einen 4-stufigen Percoll-Gradienten (Gradient I: 32,0%, 52,0%, 55,0%, 60,6%) geschichtet und bei 1500 Upm ($425 \times g$) für 30 min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde die Zellfraktion zwischen Percoll-Stufe 1 (32,0%) und -Stufe 2 (52,0%) gesammelt, dreimal gewaschen und zur Knochenmark-Vorkultur (siehe 2.10.3) eingesät.

2.10.2. Percoll-Gradient Fraktionierung

Kurz vor dem Aufbauen eines Gradienten wurde die Percoll Stammlösung (60,6%, siehe 2.8. 1.8) mit Vollmedium auf die gewünschten Konzentrationen, wie unten dargestellt, verdünnt. Je 2 ml von den fertig eingestellten Percoll-Lösungen wurde sorgfältig stufenweise in die konischen Zentrifuge-röhrchen (Falcon 2099) gefüllt. $3-6 \times 10^7$ Zellen in 2 ml Vollmedium wurden mit Hilfe einer 2 ml Pipette auf die Oberfläche des Gradienten geschichtet. Die Gradienten wurden 30 min zentrifugiert (Gradient I bei $425 \times g$ und Gradient II bei $550 \times g$). Die dadurch getrennten Zellfraktionen wurden mit Hilfe einer Spritze und einer 20G (0,9×70 mm) Kanüle abgenommen und dreimal mit RPMI 1640 gewaschen.

方法

2.10 细胞的分离、培养、纯化与活化

2.10.1 骨髓细胞的分离

将小鼠的股骨无菌取出、洗净，在股骨两端剪开。借助于一个注射器和一支 27 G (直径为 0.4 毫米) 的针头将骨髓冲洗出来，然后在 RPMI 1640 培养液中分散悬浮。经过一次洗涤后，将骨髓细胞用全培养液调至细胞浓度为 3×10^7 个/毫升的悬液。将此细胞悬液小心地铺在一个 4 级的 Percoll 密度梯度液 (梯度液 I: 32.0%、52.0%、55.0%、60.6%) 上，在 1500 转/分钟 ($425 \times g$) 离心 30 分钟。离心后，收集 Percoll 梯级 1 (32.0%) 与梯级 2 (52.0%) 之间的细胞层，洗涤三遍，用于骨髓细胞前培养的接种 (见 2.10.3)。

2.10.2 Percoll 密度梯度离心分离法

在即将组建一个密度梯度液之前，将 Percoll 母液 (60.6%，见 2.8.1.8) 用全培养液稀释至所期待的浓度 (见下页)。将每 2 毫升配制完成的 Percoll 溶液小心地逐级加入锥型底离心管 (Falcon 2099) 中。 $3-6 \times 10^7$ 个细胞在 2 毫升全培养液中通过一个 2 毫升的移液管铺在密度梯度液的上部。将此密度梯度液离心 30 分钟 (密度梯度液 I: $425 \times g$ ，密度梯度液 II: $550 \times g$)。由此分开的细胞层借助于一个注射器和一支 20G (0.9×70 毫米) 的针头来抽取，使用 RPMI 1640 洗涤三遍。

Herstellung der Percoll-Stufen für Gradient I:

Stufe	Volumen	Percoll Stammlösung	Vollmedium
1 (32,0%)	4,5 ml	2,376 ml	2,124 ml
2 (52,0%)	4,5 ml	3,821 ml	0,579 ml
3 (55,0%)	4,5 ml	4,125 ml	0,375 ml
4 (60,0%)	4,5 ml	4,500 ml	0,000 ml

Herstellung der Percoll-Stufen für Gradient II:

Stufe	Volumen	Percoll Stammlösung	Vollmedium
1 (32,0%)	4,5 ml	2,376 ml	2,124 ml
2 (40,8%)	4,5 ml	3,063 ml	1,437 ml
3 (45,3%)	4,5 ml	3,398 ml	1,103 ml
4 (50,0%)	4,5 ml	3,750 ml	0,750 ml
5 (55,0%)	4,5 ml	4,125 ml	0,375 ml
6 (60,6%)	4,5 ml	4,500 ml	0,000 ml

2.10.3. KM-Vorkultur

10×10⁶ Zellen (2.10.1) wurden in 15 ml Vollmedium in 9-cm Gewebekulturschale (Greiner) ausgesät. Zur Expandierung der Makrophagen-Vorläufer wurde die Kultur mit CSF-haltigem L-Zell "konditioniertem" Medium (2.7.3) auf 10-15% supplementiert. Für manche Untersuchungen (wie z.B. Northern-Blot Analyse, Zytokin-Produktion) wurde anstatt des L-kond. Mediums rekombinanter GM-CSF (200 U/ml) eingesetzt, um zu vermeiden, die möglich im L-kond. Medium existierenden unbekannt Faktoren auf die Zellen einzuwirken. Bei niedriger Konzentration (< 200 U/ml) wirkt GM-CSF hauptsächlich auf die Vermehrung der Zellen des Makrophagen-systems [Metcalf, 1987]. Zur Erzeugung der NK-Aktivität wurde die KM-Vorkultur mit IL-2 (100 U/ml) ergänzt. Dazu wurde das Vollmedium mit 5 µM 2-ME [Kuppen et al. 1991] benutzt. Diese KM-Vorkultur lief immer nur 3 Tage.

制作 Percoll 密度梯度液 I:

梯级	体积	Percoll 母液	全培养液
1 (32.0%)	4.5 mL	2.376 mL	2.124 mL
2 (52.0%)	4.5 mL	3.821 mL	0.579 mL
3 (55.0%)	4.5 mL	4.125 mL	0.375 mL
4 (60.65)	4.5 mL	4.500 mL	0.000 mL

制作 Percoll 密度梯度液 II:

梯级	体积	Percoll 母液	全培养液
1 (32.0%)	4.5 mL	2.376 mL	2.124 mL
2 (40.8%)	4.5 mL	3.063 mL	1.437 mL
3 (45.5%)	4.5 mL	3.398 mL	1.103 mL
4 (50.5%)	4.5 mL	3.750 mL	0.750 mL
5 (55.0%)	4.5 mL	4.125 mL	0.375 mL
6 (60.6%)	4.5 mL	4.500 mL	0.000 mL

2.10.3 骨髓细胞前培养

将 10×10⁶ 个细胞 (2.10.1) 接种入装有 15 毫升全培养液的 9 厘米组织培养皿 (Greiner) 中。为了扩增巨噬细胞前体, 培养液中添加了 10-15% 含有 CSF 的 L-细胞条件培养液 (2.7.3)。对于有些实验 (比如 Northern 印迹杂交分析、产生细胞因子), 将使用重组的 GM-CSF (200 U/mL) 来取代 L-细胞条件培养液, 以避免可能存在于 L-细胞条件培养液中的未知因子对细胞的影响。在较低的浓度 (< 200 U/mL) 下, GM-CSF 主要作用于巨噬细胞系的细胞扩增【Metcalf, 1987 年】。为了产生 NK 活性, 需在骨髓细胞前培养中加入 IL-2 (100 U/mL)。此外, 需使用含有 5µmol/L 2-巯基乙醇【Kuppen 等, 1991 年】的全培养液。这个骨髓细胞前培养总是只进行 3 天。

2.10.4. Isolierung der Makrophagen Vorläufer aus KM-Vorkultur

Nach einer 3-tägigen KM-Vorkultur wurden die nicht adhärenen Zellen gesammelt, gewaschen, und über einen 6-stufigen Percoll Gradienten II (32,0%, 40,8%, 45,3%, 50,0%, 55,0% und 60,6%) fraktioniert. Die Zellfraktion zwischen Percoll-Stufe 2 (40,8%) und 3 (45,3%) wurde gesammelt und dreimal mit RPMI 1640 gewaschen. Diese Zellfraktion enthielt ungefähr 85% Makrophagen Vorläufer (einschließlich ein paar leicht adhärenen Makrophagen), ca. 10% polymorphkernige Zellen, und 2-5% Lymphozyten.

2.10.5. Depletion der Phagozytischen Zellen

Die Zellen wurden in Vollmedium auf 1×10^6 Zellen/ml suspendiert und mit Eisenpartikeln (Technicon Instruments Corp. Tarrytown, NY. Product No: T01-0507) in einer Plastikschaale (Falcon 3003) 30 min bei 37°C inkubiert. Während der Inkubation fraßen die phagozytischen Zellen Eisenpartikel. Nach der Inkubation wurden die nicht adhärenen Zellen gesammelt und in ein 10 cm langes Röhrchen (Falcon 2057) überführt. Das Röhrchen wurde in einen Dynal Magneten (Dynal MPC-1, "magnetic particle concentrator", Dynal, Oslo, Prod.No. 12001) eingelegt, um die nicht adhärenen aber Eisenpartikeln-enthaltenden (also phagozytischen) Zellen zu entfernen. Nachdem die phagozytischen Zellen fest an der Wand des Röhrchens hingen, wurde die Zellsuspension im Röhrchen mit Hilfe einer Spritze und einer 20G (0,9×70mm) Kanüle aus dem Röhrchen abgesaugt. Die dadurch gewonnene Zellpopulation war frei von phagozytischen und adhärenen Granulozyten und semi-reifen Makrophagen.

2.10.6. Depletion der Lymphozyten mit magnetischen Beads

Zuerst wurden die Zellen mit Antikörper gegen spezifische Oberflächenmarker von unerwünschten Lymphozyten (Ratte anti-Maus CD3 für T Lymphozyten und Ratte anti-Maus B220 für B Lymphozyten) bei 4°C für 45 Minuten inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, mit PBS + 2% FKS auf 2×10^6 Zellen/ml eingestellt und in 10 ml Falcon Reagenzröhrchen überführt. Magnetische Beads der Firma

2.10.4 分离来自骨髓细胞前培养的巨噬细胞前体

经过 3 天的骨髓细胞前培养之后, 收集非粘附的细胞, 洗涤, 然后在一个 6 级的 Percoll 密度梯度液 II (32.0%、40.8%、45.3%、50.0%、55.0% 与 60.6%) 上进行离心分离。收集位于 Percoll 梯级 2 (40.8%) 与梯级 3 (45.3%) 之间的细胞层, 用 RPMI 1640 洗三遍。这个细胞层中含有约 85% 的巨噬细胞前体 (其中包括少量轻度粘附的巨噬细胞)、约 10% 的多型核白细胞、还有 2-5% 的淋巴细胞。

2.10.5 去除吞噬细胞

将细胞在全培养液中以 1×10^6 个细胞/毫升进行悬浮, 与铁颗粒 (购自 Technicon Instruments Corp. Tarrytown, NY. 产品号: T01-0507) 在一个塑料培养皿 (Falcon 3003) 中进行 30 分钟置于 37°C 的孵育。在孵育期间, 吞噬细胞会吞噬铁颗粒。孵育结束之后, 收集非粘附的细胞, 并将其转入一支 10 厘米长的试管 (Falcon 2057) 内。将试管置于一个磁力架 (购自 Dynal MPC-1, "magnetic particle concentrator", Dynal, Oslo, 产品号: 12001) 中, 以去除含有铁颗粒 (即有吞噬功能) 的非粘附细胞。在吞噬细胞紧贴于管壁之后, 使用一个注射器和一支 20G (0.9×70 毫米) 的针头将细胞悬液从试管内抽取出来。由此获得的细胞群不含具有吞噬功能和粘附性的粒细胞与半成熟巨噬细胞。

2.10.6 用磁珠去除淋巴细胞

首先将细胞与相关的抗体——特异性对抗需去除的淋巴细胞的表面标志物 (大鼠抗小鼠的 CD3 以去除 T 淋巴细胞; 大鼠抗小鼠的 B220 以去除 B 淋巴细胞) ——在 4°C 孵育 45 分钟。孵育完成之后, 将细胞用 PBS 洗三遍, 在 PBS + 2% 的胎牛血清中调为 2×10^6 个细胞/毫升, 移入 10 毫升

Dynal, gekoppelt mit Schaf anti-Ratte IgG, wurden in einem Verhältnis von 4:1 (Beads zu Zellen) in die Zellsuspension gegeben. Das Röhrchen wurde bei 4°C für 30 min auf einem Drehrad inkubiert. Anschließend wurden die magnetischen Beads und die über die Antikörper daran gebundenen Zellen von Dynal Magnet MPC-1 entfernt. Die übrige Zellsuspension wurde abzentrifugiert und zweimal gewaschen. Die dadurch gereinigte Zellpopulation enthielt weniger als 0.5% Lymphozyten.

2.10.7. Hauptkultur und LAK-Kultur

Die aus 3-tägiger KM-Vorkultur (2.10.3) isolierten Makrophagen-Vorläuferzellen wurden als Ausgangspopulation in Vollmedium mit 2-ME (5 µM) weiter kultiviert. Je nach dem Zweck der Untersuchung wurden entsprechende Faktoren (CSF-1 oder IL-2, oder CSF-1+IL-2) in verschiedenen Konzentrationen in die Kultur eingefügt. Diese Kultur wurde als Hauptkultur bezeichnet. Für LAK-Kultur wurde der Hauptkultur hohe Konzentration von IL-2 (1000 U/ml) gegeben.

2.10.8. Aktivierung der KM-Makrophagen Vorläufer zur Zytokin-Produktion

Um die Zytokin-Produktionsfähigkeit von Knochenmark Makrophagen-Vorläuferzellen zu untersuchen, wurden die gewaschenen Zellen im Vollmedium (0,5×10⁶ Zellen/ml) mit entsprechenden stimulierenden Faktoren bei 37°C über Nacht inkubiert. Überstände wurden am nächsten Tag (ca. 20 Stdn. nach der Zugabe der Faktoren) gesammelt und in Polypropylene Röhrchen (Falcon 2063) bei 4°C aufbewahrt. Zytokine wurden entweder im Bioassay (2.12.4) oder im ELISA (2.12.5) nachgewiesen.

2.11. Zellfärbung

2.11.1. Zytopräparate

Je 1×10⁵ Zellen pro Objektträger wurden in einer Zytozentrifuge (Cytospin, Shandon

的 Falcon 反应试管里。将耦合了绵羊抗大鼠 IgG 的磁珠(Dynal 公司产品)按照 4:1 (磁珠:细胞)的比例添加到细胞悬液里。将此试管放在一个旋转器上,在 4°C 孵育 30 分钟。接着使用 Dynal MPC-1 磁力架来移除磁珠和通过抗体结合到磁珠上的细胞。将余下的细胞悬液进行离心分离,洗涤两遍。由此纯化的细胞群所含的淋巴细胞低于 0.5%。

2.10.7 主培养与 LAK 培养

从骨髓细胞前培养 (2.10.3) 分离出的巨噬细胞前体作为起始细胞群,在含有 2-巯基乙醇 (5µmol/L) 的全培养液里继续培养。根据研究的目的,相关的因子 (CSF-1 或者 IL-2, 或者 CSF-1+IL-2) 以不同的浓度添加到培养液中。这种培养简称为“主培养”。对于 LAK 培养 (诱导产生 LAK 活性的培养), 在主培养中将添加高浓度的 IL-2 (1000 U/ml)。

2.10.8 活化骨髓巨噬细胞前体促其产生细胞因子

为了研究骨髓巨噬细胞前体产生细胞因子的能力, 将洗后的细胞在全培养液中 (0.5×10⁶ 个细胞/毫升) 与相关的刺激因子在 37°C 培养过夜。次日 (约在添加因子 20 小时之后) 收集上清液, 置于聚丙烯小管 (Falcon 2063) 里, 在 4°C 保存。细胞因子将使用生物检测法 (2.12.4) 或者使用 ELISA 法 (2.12.5) 来测定。

2.11 细胞的染色

2.11.1 制备细胞涂片

以每个载玻片 1×10⁵ 个细胞的量在细胞涂片机 (Cytospin, Shandon

Southern, Astmoor, GB) 5 min bei 500 Upm auf Objektträger gebracht und danach luftgetrocknet. Die davon angefertigten Zytopräparate können durch verschiedene Färbungsverfahren zur Untersuchung von Zellmorphologie, Zelloberflächenmarkern und zytoplasmatischen Komponenten verwendet werden. Zum Aufbewahren können die getrocknete Zytopräparate in Alufolie getrennt voneinander eingepackt und bei -20°C eingefroren werden.

2.11.2. Zell-kultur in Chamber Slides

Zellen wurden im Vollmedium mit 0,2% 2-ME/Hepes Stammlösung (2.8.1.5) auf eine Zellkonzentration von $2.5-5 \times 10^5$ Zellen/ml suspendiert und je 300 μ l pro Loch in die 8-well Chamber Slides (Nunc, IL. Order No.: 177402) eingesät. Die entsprechenden Zusätze wie PMA, M-CSF, und IL-2 wurden je nach dem Ziel der Untersuchung zu den Kulturen hinzugegeben. Die Slides wurden bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert.

2.11.3. Esterase-Doppelfärbung

Die Präparate wurden zuerst in der gepufferten Formalin-Aceton-Lösung (siehe 2.8.1.4) für 30 Sek. bei 4-10°C fixiert, dann 3 min mit PBS gespült, und danach an der Luft getrocknet. Die fixierten Präparate wurden für 15 min im Dunkeln mit der unter 2.8.1.9 beschriebenen Färbelösung für Chloroacetatesterase (spezifisch für Granulozyten) bei RT inkubiert, und danach 3 min mit dest. H₂O gespült. Nachdem die Präparate luftgetrocknet waren, wurden sie für weitere 25-30 min in der filtrierten Färbelösung für α -Naphthylbutyrat Esterase (siehe 2.8.1.9) im Dunkeln gefärbt, um Monozyten und Makrophagen (positiv für α -Naphthylbutyrat Esterase) nachzuweisen. Anschließend wurden die Präparate 3 min mit H₂O gespült und danach luftgetrocknet. Mit Mayers Hemalaun-Lösung (für Kernfärbung) wurden sie ca. 4 min gegengefärbt. Nach gründlichem Spülen mit Wasser und anschließendem Lufttrocknen, wurden die Präparate mit der Glycerin-Gelatine-Lösung (2.8.1.3) eingedeckt.

Southern, Astmoor, GB 产品) 中以 500 转/分钟离心 5 分钟, 使细胞涂于载玻片上, 然后空气干燥。由此制成的细胞涂片能够通过不同的染色方法用于对细胞的形态、细胞的表面标志物和细胞质中组分的研究。为了保存, 可以将干燥的细胞涂片在铝箔中相互隔开地包好, 冻存于 -20°C。

2.11.2 腔室载玻片中的细胞培养

在含有 0.2% 的 2-巯基乙醇/Hepes 母液 (2.8.1.5) 的全培养液中, 将细胞以浓度为 $2.5-5 \times 10^5$ 个细胞/毫升进行悬浮, 以每孔 300 微升接种入 8 孔的腔室载玻片 (Nunc, IL., 订货号: 177402) 里。相关的添加物, 如 PMA、M-CSF、IL-2, 根据研究的目的添加入培养液。腔室载玻片在 37°C、5% CO₂ 中进行培养。

2.11.3 酯酶双染色

首先将细胞涂片在缓冲型福尔马林-丙酮溶液 (见 2.8.1.4) 中于 4-10°C 固定 30 秒, 然后用 PBS 洗 3 分钟, 之后空气晾干。固定后的细胞涂片在黑暗中与氯乙酸酯酶 (对粒细胞专一) 的染色液 (见 2.8.1.9) 于室温下孵育 15 分钟, 然后用蒸馏水冲洗 3 分钟。待细胞涂片空气干燥后, 将其继续在黑暗中使用过滤后的 α -丁酸萘酚酯酶的染色液 (见 2.8.1.9) 进行 25-30 分钟的染色, 以检出单核细胞与巨噬细胞 (α -丁酸萘酚酯酶阳性)。接下来, 将细胞涂片用水冲洗 3 分钟, 然后空气干燥。用 Mayer 苏木素染色试剂 (染色细胞核) 对细胞涂片进行大约 4 分钟的对比染色。用水充分冲洗, 接着空气干燥之后, 将细胞涂片用甘油明胶液 (2.8.1.3) 封片。

2.11.4. Fluoreszenzfärbung der Zelloberflächenmarker

1-5×10⁵ Zellen in 40 µl FACS-Waschpuffer (2.8.2.4) wurden in 0,6 ml Röhrchen (Greiner 101101) suspendiert. Die Zellen wurden zunächst mit 40 µl Human Ig Lösung (10 µg/ml) versetzt und für 15 min auf Eis inkubiert, um die unspezifische Bindung an FcR an der Zelloberfläche zu blockieren. Nach einmaligem Waschen wurden die Zellen entweder mit 40µl FACS-Waschpuffer oder mit 40µl Antikörper Lösung (Antikörper verdünnt in FACS-Waschpuffer) für 45 min auf dem Eis inkubiert. Es folgte dreimaliges Waschen mit dem Waschpuffer. Anschließend wurde der FITC-konjugierte zweite Antikörper zugesetzt und weiter auf dem Eis inkubiert. Nach 30 min Inkubation wurden die Zellen wiederum dreimal gewaschen und schließlich mittels des Durchflusszytometers (FACSscan Becton, Dickinson GmbH, Heidelberg) analysiert. Für die direkte Fluoreszenzfärbung wurden die Zellen gleich nach dem Blockierungsschritt mit FITC-Antikörper für 30 min auf dem Eis inkubiert.

2.11.5. Immunhistochemische Färbung mit AP-konjugiertem-Antikörper

Frische oder eingefrorene Zytopräparate wurden bei RT für 10 min in 100%igem Isopropanol fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit TBS + 0,1% Tween 20 wurden sie mit Ziegen Serum (1:10 verdünnt in TBS) für 40 min vorinkubiert. Nachdem das Ziegen Serum entfernt worden war, wurden die Zytopräparate für 45 min bei RT mit Antikörper-Lösung (Ratte anti-murines Perforin 1:400 in TBS verdünnt) in einer feuchten Kammer inkubiert. Es folgte zweimaliges Waschen mit TBS + Tween 20. Als nächster Schritt wurde 1:20 verdünnter Ziege anti-Ratte IgG (konjugiert mit alkalischer-Phosphatase) auf die Zytopräparate gegeben und bei RT für 45 min in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Präparate zunächst dreimal mit TBS + Tween 20 gespült, dann wurde Fast-Red-Substrat-Lösung (2.8.2.5) durch einen Filter (0,22 µm, Millipore SLGS025BS) darauf gegeben und 10-30 min reagieren gelassen. Durch Spülen mit TBS wurde die Farbentwicklung abgestoppt. Die anschließende Gegenfärbung (Kernfärbung) erfolgte durch kurzes Einlegen der Präparate im Hämatoxylin (nur für 5-10 Sek.), danach wurde sofort mit Wasser gespült. Die fertig gefärbten Zytopräparate wurden mit Aquatex eingedeckt.

2.11.4 细胞表面标志物的荧光染色

在 0.6 毫升指型管 (Greiner 101101) 里将 1-5×10⁵ 个细胞悬浮于 40 微升 FACS 洗涤缓冲液 (2.8.2.4) 中。先将细胞与 40 微升人免疫球蛋白溶液 (10µg/mL) 混匀, 在冰上孵育 15 分钟, 以阻断细胞表面 Fc 受体的非特异性结合。洗涤 1 次后, 将细胞要么与 40 微升 FACS 洗涤缓冲液, 要么与 40 微升抗体溶液 (在 FACS 洗涤缓冲液中稀释后的抗体) 在冰上孵育 45 分钟。接下来用洗涤缓冲液洗 3 次, 随后加入 FITC 偶联的第二抗体, 继续在冰上孵育。经过 30 分钟孵育后, 再次将细胞洗 3 遍, 接着借助于流式细胞仪 (FACSscan Becton, Dickinson GmbH, Heidelberg 产品) 进行分析。对于直接的荧光染色, 将细胞在阻断步骤后立即与 FITC-抗体 (已与荧光素异硫氰酸结合的抗体) 在冰上孵育 30 分钟。

2.11.5 使用碱性磷酸酶偶联抗体的免疫组化染色

将新鲜制备或者冰冻保存的细胞涂片在室温下浸入 100% 异丙醇中固定 10 分钟。在两次使用 TBS+0.1% Tween 20 洗涤之后, 将细胞涂片与山羊血清 (1:10 稀释于 TBS 中) 进行 40 分钟的预孵育。除去山羊血清后, 将细胞涂片在室温下与抗体溶液 (大鼠抗小鼠的穿孔素抗体 1:400 稀释于 TBS 中) 在一个湿盒内孵育 45 分钟。接着用 TBS + Tween 20 洗涤两遍。下一步是将 1:20 稀释后的山羊抗大鼠免疫球蛋白 (IgG, 已偶联碱性磷酸酶) 加到细胞涂片上, 室温下在一个湿盒内孵育 45 分钟。完成孵育后, 先用 TBS + Tween 20 将细胞涂片洗三遍, 然后, 将固红溶液 (2.8.2.5) 通过一只微孔过滤器 (0.22 微米, Millipore SLGS025BS) 给到细胞涂片上, 让其反应 10-30 分钟。通过用 TBS 冲洗使显色反应终止。接下来进行的对比染色 (核染色) 是将细胞涂片短暂地置于苏木精染色液中 (只需 5-10 秒), 然后立即用水冲洗。染色完成的细胞涂片使用 Aquatex 封片。

2.11.6. Pappenheimfärbung (May-Grünwald/Giemsa-Färbung)

Zytopräparate wurden 3 min mit May-Grünwald-Färbelösung überschichtet und dadurch fixiert und gefärbt (die sauren Bestandteile der Zellen lassen sich bei dieser Behandlung bläulich anfärben). Nach kurzem Waschen in dest. Wasser wurden sie mit der 1:10 in dest. Wasser verdünnten Giemsa-Lösung für 10 min gegengefärbt. Bei diesem Schritt wurden basische azidophile Proteine mit dem sauren Farbstoff rot angefärbt. Nachdem die Zytopräparate mit dest. Wasser gründlich gespült und danach luftgetrocknet wurden, waren sie bereit für die lichtmikroskopische Untersuchung.

May-Grünwald-Lösung: 0,25% (w/v) May-Grünwald in Methanol

Giemsa-Lösung: 0,4% (w/v) modifiziertes Giemsa in gepuffertem Methanol (pH 6.8) gelöst.

2.12. Tests

2.12.1. ³H-Thymidin Einbau zum Test der Zellproliferation

Die zu testenden Zellen wurden in 96-well Mikrotiterplatten (Falcon 3072) auf 5×10^3 in 200 μ l Vollmedium pro Loch ausgesät und mit oder ohne Wachstumsfaktor bei 37°C, 5% CO₂ für verschiedene Zeiten inkubiert. Danach wurde 1 μ Ci von ³H-Thymidin pro Loch in die Platten gegeben und für weitere 18 Stdn. inkubiert. Die Zellen in den Platten wurden schließlich mit einem Zellerntegerat (Skatron, Norway) auf Glasfaserfilter (Schleicher & Schüll, Dassel) geerntet. Die getrockneten Filterplättchen wurden in Plastikröhrchen (Scintillation Vials & Caps, Skatron, Cat.No. 15765) gelegt und mit 3 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt. Die von den Zellen aufgenommene Radioaktivität wurde in einem Flüssigkeitsszintillationszähler (Beckman LS1801) gemessen. Die Radioaktivität ist in Counts pro Minute (cpm) angegeben.

2.11.6 帕彭海姆染色法 (May-Grunwald -Giemsa 染色法)

将细胞涂片用迈格林华染色液 (May-Grunwald Stain) 覆盖 3 分钟, 使其固定并染色 (细胞的酸性组分在此处理中被染成淡蓝色)。用蒸馏水短暂洗涤后, 用 1 : 10 稀释在蒸馏水中的吉姆萨 (Giemsa) 染液对细胞涂片进行 10 分钟对比染色。在此步骤中, 碱性的嗜酸蛋白被酸性染料染成红色。用蒸馏水将细胞涂片充分地冲洗, 随后将它们空气晾干, 它们即可用于光学显微镜的分析了。

迈格林华染色液: 0.25% (重量/体积) May-Grunwald 溶于甲醇中

吉姆萨染液: 0.4% (重量/体积) 改良后的吉姆萨溶于缓冲后的甲醇中 (pH 6.8)。

2.12 检测

2.12.1 ³H-胸腺嘧啶核苷掺入法测定细胞的增殖

将所需检测的细胞以每孔 5×10^3 个细胞在 200 微升全培养液中接种入 96 孔细胞培养板 (Falcon 3072), 在添加或者不添加生长因子的情况下, 在 37°C、5% CO₂ 中进行不同时长的培养。随后将 ³H-胸腺嘧啶核苷以每孔 1 微居里 (μ Ci) 加入培养板中, 继续培养 18 小时。培养板中的细胞最终被一个细胞收集器 (Skatron 公司, Norway) 收集到玻璃纤维滤纸 (Schleicher und Schüll 公司, Dassel) 上。干燥后的滤纸条被置于塑料小管 (带盖闪烁管, Skatron 公司, 目录号 15765) 里并与 3 毫升闪烁液混匀。被细胞吸收的放射活性将在一台液体闪烁计数器 (Beckman 公司 LS1801) 中进行测定。其放射活性以每分钟计数 (cpm) 来显示。

2.12.2. ^{51}Cr Freisetzung aus Zielzellen zum Test der Zytotoxizität

Zuerst wurden die Zielzellen mit $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (200 $\mu\text{Ci}/5 \times 10^6$ Zellen) in 0,5 ml Vollmedium für 1,5 Stdn. bei 37°C , 5% CO_2 markiert. Nach der Markierung wurden die Zielzellen dreimal mit RPMI 1640 gewaschen, um extrazelluläres ^{51}Cr zu entfernen, und anschließend mit Vollmedium auf 1×10^5 Zellen/ml eingestellt. Zum Test der Zytotoxizität wurden je 100 μl Effektorzellensuspension mit verschiedener Zellzahl (4×10^5 , 2×10^5 , 1×10^5 , 5×10^4 , 2×10^4 und 1×10^4 Zellen) pro Loch in 96-well Mikrotiterplatten mit rundem Boden (Nunc, Roskilde, Danmark) ausplattiert. Dazu wurden die radioaktiv markierten Zielzellen ($1 \times 10^4/\text{Loch}$) pipettiert. Die dadurch gebildeten Verhältnisse von Effektor- und Zielzellen waren: 40:1, 20:1, 10:1, 5:1, 2:1 und 1:1. Die Mikrotiterplatten wurden kurz bei 600 Upm zentrifugiert und bei 37°C , 5% CO_2 inkubiert. Nach 4 Stdn. (zur Untersuchung der NK-Aktivität) oder 16 Stdn. (zum Test der LAK-Aktivität) Lysezeit wurden die Mikrotiterplatten für 10 min bei 1200 Upm zentrifugiert, 100 μl Aliquots von den Überständen abgenommen und die darin enthaltene Radioaktivität ("Experimental Release": ExpR) in einem Messgerät für gamma-Strahlen (Kontron MR 480, Basel, Schweiz) gemessen. Zur Kontrolle wurden von den Zielzellen die spontane ^{51}Cr -Freisetzung (ohne Anwesenheit von Effektorzellen, als SR bezeichnet) sowie die maximale ^{51}Cr -Freisetzung (100%ige Abtötung der Zielzellen durch Inkubation mit 1N HCl: MaxR) bestimmt. Die Zytotoxizität der Effektorzellen wurde entweder als % spezifische Lyse von Zielzellen, berechnet nach der unten dargestellten Formel, oder Lytische Einheiten (LU) angegeben:

$$\% \text{ spezifische Lyse} = \frac{\text{ExpR} - \text{SR}}{\text{MaxR} - \text{SR}} \times 100$$

Wenn die Ergebnisse als LU präsentiert werden, entspricht Eine Lytische Einheit (1 LU) die Zahl der Effektorzellen, die eine 20%ige spezifische Lyse von 1×10^4 Zielzellen bewirkten. LU wurden aus verschiedenen Verhältnissen von Effektor- und Zielzellen kalkuliert. $\text{LU}/10^7$ ergibt die lytischen Einheiten von 1×10^7 Effektorzellen.

2.12.2 从靶细胞释放出的 ^{51}Cr 来测定细胞杀伤活性

首先将靶细胞用铬酸钠 $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (200 微居里/ 5×10^6 个细胞) 在 0.5 毫升全培养液中进行 1.5 小时在 37°C 、5% CO_2 中的标记。标记完成后, 将靶细胞用 RPMI 1640 洗三遍, 以去除细胞外的 ^{51}Cr , 随后使用全培养液来配制 1×10^5 个细胞/毫升的悬液。为了检测细胞的杀伤活性, 在 96 孔圆底细胞培养板 (Nunc, Roskilde 公司, Danmark) 中, 每孔加入 100 微升有着不同细胞数量 (4×10^5 、 2×10^5 、 1×10^5 、 5×10^4 、 2×10^4 以及 1×10^4) 的效应细胞悬液。将放射标记的靶细胞 (1×10^4 个/孔) 加入其中。由此形成的效应细胞与靶细胞的比例是 40:1; 20:1; 10:1; 5:1; 2:1 和 1:1。将细胞培养板短暂地在 600 转/分钟离心, 然后置于 37°C 、0.5% CO_2 中培养。经过 4 小时 (检测 NK 活性) 或者 16 小时 (检测 LAK 活性) 的裂解时间后, 将细胞培养板以 1200 转/分钟离心 10 分钟, 从每孔中取出 100 微升上清液, 其中所含的放射活性 ("实验释放": ExpR) 在一个伽马射线检测仪 (Kontron MR 480, Basel, Schweiz 公司) 中进行测定。作为对照, 测定靶细胞对 ^{51}Cr 的自然释放 (不加入效应细胞的释放, 以 SR 表示) 以及对 ^{51}Cr 的最大释放 (通过与 1 当量盐酸培养来 100% 杀死靶细胞的释放: MaxR)。效应细胞的杀伤活性或以靶细胞的特异性裂解% (按下述公式计算), 或以裂解单位 (LU) 来表述结果:

$$\text{特异性裂解 \%} = \frac{\text{实验释放 (ExpR)} - \text{自然释放 (SR)}}{\text{最大释放 (MaxR)} - \text{自然释放 (SR)}} \times 100$$

当实验结果以裂解单位来陈述时, 一个裂解单位 (1 LU) 相当于导致 1×10^4 个靶细胞发生 20% 特异性裂解的效应细胞数。LU 需从效应细胞与靶细胞的不同比例计算而得, $\text{LU}/10^7$ 给出的是来自 1×10^7 个效应细胞的裂解单位。

2.12.3. Test der Kalzium-Abhängigkeit der Zytotoxizität

Um festzustellen, ob die Zytotoxizität der Zellen von der Anwesenheit von Kalzium abhängig war, wurden drei Testmedien: A) Vollmedium, B) Vollmedium + 10mM EDTA und C) Vollmedium + 10mM EDTA + 15mM CaCl₂ verwendet. EDTA kann mit den im Vollmedium enthaltenen Kalzium-Ionen Komplexe bilden. Dadurch wurde Ca²⁺ im Medium B depletiert. Im Medium C wurde CaCl₂ im Überschuss zugegeben, damit es wieder Ca²⁺ enthielt. Die zu testenden Effektorzellen wurden in drei Portionen unterteilt, in den entsprechenden Testmedien suspendiert, und in 96-well Mikrotiterplatten ausplattiert. Zytotoxizitätstests wurden wie unter 2.12.2. beschrieben durchgeführt.

2.12.4. MTT-Test (kolorimetrischer Bioassay)

Da nur lebende Zellen fähig sind, MTT umzusetzen (Bildung von blauen Formazan Kristallen), wird MTT-Test häufig zur Bestimmung des Zellwachstums angewendet. Dieser Test wird auch kolorimetrischer Bioassay genannt [Mosmann 1983; Tada et al. 1986]. In der vorliegenden Arbeit wurde der MTT-Test zu Untersuchungen der Zytokin-Aktivitäten in Zellüberständen durchgeführt. Die Zytokin-abhängigen Zelllinien wurden in 96-well Mikrotiterplatten mit den zu testenden Überständen sowie entsprechenden Zytokin-Standards kultiviert. Für die Kontrolle wurden die Zellen mit Medium ohne Faktor inkubiert. Nachdem die Zellen im Kontrollwellen verstorben waren (ca. 2-4 Tage), wurde je 10 µl MTT-Lösung (2.8.1.6) pro Loch in die Platten pipettiert. Nach ca. 4-stündiger Inkubation bei 37°C wurden 100 µl MTT-Abstopplösung (2.8.1.7) pro Loch gegeben. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C stehen gelassen, um ein vollständiges Lösen der gebildeten blauen Kristalle zu erreichen. Es erfolgte eine photometrische Absorptionsmessung mit einem Microplate Reader (MR 700 Dynatech) bei 570 nm.

2.12.3 检测细胞杀伤活性的钙依赖性

为了确认细胞的杀伤活性是否对钙存在依赖性, 需使用三种试验培养液: A) 全培养液; B) 全培养液+10 mmol/L EDTA; C) 全培养液+10 mmol/L EDTA+15 mmol/L 氯化钙 (CaCl₂)。EDTA 能与全培养液所含的钙离子形成复合物, 使得培养液 B 中的钙离子 (Ca²⁺) 被耗尽。在培养液 C 中, 过量的 CaCl₂ 被加入其中, 因而培养液又含有钙离子。用于试验的效应细胞被分为三份, 悬浮于相应的试验培养液中, 铺入 96 孔细胞培养板里。细胞的杀伤活性试验按照 2.12.2 中的描述进行操作。

2.12.4 MTT 实验 (比色法生物检测)

因为只有活细胞才能转化 MTT (产生蓝色的甲臞结晶), MTT 实验常用于细胞生长的测定。这个实验也称为比色法生物检测【Mosmann, 1983 年; Tada 等, 1986 年】。在本工作中, MTT 实验用于检测细胞上清液中的细胞因子活性。将依赖细胞因子的细胞株在 96 孔细胞培养板中与待测上清液以及相应的标准细胞因子进行培养。作为对照, 将细胞培养在无细胞因子的培养液中。待对照组孔中的细胞死亡之后 (约 2-4 天), 将 MTT-溶液 (2.8.1.6) 以每孔 10 微升加入到细胞培养板里。在 37°C 培养大约 4 个小时后, 向每孔加入 100 微升 MTT-终止液 (2.8.1.7)。将细胞培养板在 37°C 静置过夜, 以达到生成的蓝色结晶完全溶解。使用 Microplate Reader (微孔板读取器, 也称为酶标仪, 购自 MR 700 Dynatech 公司) 在 570nm 做光吸收测定, 检测完成。

2.12.5. Enzymgebundener Immunoassay (ELISA)

In dieser Arbeit wurde der ELISA hauptsächlich zur Untersuchung des Zytokin-Gehaltes in Überständen angewendet. Zuerst wurden die Platten (Nunc Immunoplate I, Code Nr.439454) mit entsprechendem anti-Zytokin "Fang-Antikörper" je 50 µl pro Loch (2,5µg/ml) beschichtet und dann über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit ELISA-Waschenpuffer (2.8.2.3) wurde pro Loch 100µl PBS + 0,5% BSA zum Blockieren der Plastikoberfläche zugegeben und die Platten für eine Stunde bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert. Es folgte zweimaliges Waschen und dann wurden die zu testenden Überständen sowie Zytokin-Standard Lösungen einpipettiert (50 µl/Loch). Die Platten wurden in einer feuchten Kammer 2 h bei RT inkubiert, danach fünfmal gewaschen. Als nächste Schritt erfolgte eine Inkubation der Platten mit 1:100 verdünntem biotinyliertem Antikörper gegen dasselbe Zytokin (50 µl/Loch) in einer feuchten Kammer bei RT für 1 Stunde. Danach wurden die Platten sechsmal gewaschen, und mit 1:500 verdünntem Avidin-POD-Konjugat (50 µl/Loch) in einer feuchten Kammer bei RT für 30-45 min inkubiert. Am Ende wurde wiederum sechsmal gewaschen. Danach wurde die DAB-H₂O₂-Lösung (siehe 2.8.2.2) je 50 µl pro Loch in die Platten gefüllt und die Platten anschließend bei RT im Dunkeln 10-20 min stehen gelassen. Durch Zugabe von 100 µl 1N HCl/Loch wurde die Farbreaktion abgestoppt. Mit dem Microplate Reader wurden die Ergebnisse ausgewertet.

2.12.6. Soft-Agar Assay

30-60×10⁶ frische Knochenmarkzellen aus C57BL/6 Mäusen im Alter von 4 Wochen wurden in 3 ml PBS suspendiert, dann sorgfältig auf 5 ml Ficoll geschichtet und bei 2500Upm zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde die Zellfraktion zwischen PBS und Ficoll gesammelt und dreimal gewaschen. Die Zellen wurden dann in dem mit 15% FKS versetztem Iscove's Medium auf 1×10⁵ Zellen/ml eingestellt. Je 0,1 ml zu testenden Überständen oder CSF-haltige Lösungen wurde in 3,5 cm Gewebe-kulturschalen (35×10 w/Grid, Nunc, Inc., IL. Order No.:174926) gefüllt. Danach wurde die KM-Zellsuspension

2.12.5 酶联免疫吸附测定 (ELISA)

在本工作中, ELISA 主要用于检测上清液中的细胞因子含量。首先将 96 孔的酶标板 (Nunc Immunoplate I, 货号: 439454) 用相应的抗细胞因子的包被抗体以每孔 50 微升 (2.5µg/mL) 进行包被, 然后置于 4°C 孵育过夜。经过两次使用 ELISA 洗涤缓冲液 (2.8.2.3) 洗涤后, 向每孔加入 100 微升 PBS + 0.5% 牛血清白蛋白以封闭其塑料表面, 酶标板在一个湿盒中室温下孵育 1 小时。接着洗涤两遍, 然后将待测上清液、细胞因子标准液加入酶标板 (50 微升/孔) 中。酶标板在湿盒中室温下孵育 2 小时, 随后洗涤五遍。接下来要做的是: 用 1:100 稀释后的抗同种细胞因子的生物素化抗体 (50 微升/孔) 与酶标板在湿盒中室温下孵育 1 小时。酶标板被洗六遍后, 与 1:500 稀释后的抗生物素蛋白-过氧化物酶共轭物 (Avidin-POD-conjugate, 50 微升/孔) 在湿盒中室温下孵育 30-45 分钟。最后又洗涤六遍, 然后将 DAB-H₂O₂ 溶液 (见 2.8.2.2) 以每孔 50 微升加到酶标板中, 接着, 酶标板在室温下、黑暗中静置 10-20 分钟。通过向每孔加入 100 微升 1 当量 (1N) 的盐酸使染色反应终止。用酶标仪 (Microplate Reader) 读取实验结果。

2.12.6 软琼脂检测法

将 30-60×10⁶ 个新鲜的骨髓细胞 (取自 4 周大的 C57BL/6 小鼠) 悬浮于 3 毫升 PBS 中, 然后小心地铺在 5 毫升的菲科帕克 (Ficoll-Paque) 淋巴细胞分离液上, 以 2500 转/分钟离心。完成离心后, 收集在 PBS 与 Ficoll 之间的细胞层, 洗涤 3 遍。然后将细胞在加入了 15% 胎牛血清 (FCS) 的 Iscove's 培养液中调为 1×10⁵ 个细胞/毫升的悬液。每 0.1 毫升待测上清液或者含有 CSF 的溶液分别注入直径为 3.5 厘米的组织培养皿 (35×10 带栅格, Nunc, Inc., IL. 型号: 174926) 中。然后将骨髓细胞悬液按照 8:1 的比

im Verhältnis von 8:1 mit 3,5% Agar im 42°C Wasserbad gemischt und dann in die Schalen (0,9 ml/Schale) gegossen. Es folgte eine schnelle Mischung, um die zu testenden Überstände oder CSF-Lösungen mit den Zellen sowie dem Agar in der Kulturschale gleichmäßig zu verteilen. Die Schalen wurden in feuchter Atmosphäre bei 37°C, 5% CO₂ für 7 Tage inkubiert. Danach wurden die auf dem Agar ausgewachsenen Kolonien unter dem Lichtmikroskop gezählt.

Zur Bestimmung der Zelltypen in den Kolonien wurden die Scheiben von "Soft-Agar" im PBS-MC Bad auf Objektträger gebracht und danach luftgetrocknet. Anschließend wurden die Präparate nach Esterase-Doppelfärbung (2.11.3) angefärbt und mikroskopisch untersucht.

2.13. Nachweis der Zytokine

2.13.1. IL-1

Die zu testende Überstände sowie Standard IL-1 (0,1-125 Einheiten/ml) wurden zunächst in die Löcher der 96-well Mikrotiterplatten (Falcon 3072) gefüllt. Die gewaschenen D10.G4.1 Zellen (2.9.1) wurden in IL-1-Testmedium (Iscove's Medium + 1mM Natrium Pyruvat + 1% 2-ME/Hepes Stammlösung + 5 µg/ml Con A + 5% FKS) auf 2×10^5 Zellen/ml eingestellt, je 100µl pro Loch in die Mikrotiterplatten pipettiert, dann bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Für die Kontrolle wurden D10 Zellen mit IL-1-Testmedium allein inkubiert. Nach angemessener Inkubationszeit wurde der MTT-Test durchgeführt (2.12.4) und das Wachstum der D10 Zellen bestimmt. Mit Hilfe der IL-1 Standardlösungen wurde eine Eichkurve erstellt. Die IL-1 Aktivität der Proben werden an den Eichkurven abgelesen.

2.13.2. IL-6

7TD1 Zellen (2.9.5) wurden in Vollmedium + 2% 2-ME/Hepes Stammlösung (somit die Endkonzentration von 2-ME im Medium auf ca. 50µM liegt) in die 96-well-Mikrotiterplatten ($2,5 \times 10^3$ Zellen pro Loch) pipettiert, die zuvor mit verdünnten, zu

Beispiel mit 3,5%琼脂在42°C的水浴中相混合,随后倒入培养皿中(0.9毫升/皿),接着快速混合,以使待测上清液或者CSF溶液与细胞及琼脂在培养皿中均匀地分布。将培养皿置于潮湿的空气环境中,在37°C、5% CO₂中培养7天。然后在光学显微镜下对在琼脂上生长起来的细胞集落进行计数。

为了确定细胞集落中的细胞类型,将浸泡在PBS-MC中的“软琼脂”片涂于载玻片上,随后空气晾干。接下来,将细胞制片按照酯酶双染色法(2.11.3)进行染色,显微观察。

2.13 细胞因子的检出

2.13.1 白细胞介素-1

首先将待测上清液以及标准 IL-1 (0.1-125 U/mL) 加进 96 孔细胞培养板 (Falcon 3072) 的孔中。洗后的 D10.G4.1 细胞 (2.9.1) 在 IL-1 检测培养液 (Iscove's 培养液+1 mmol/L 丙酮酸钠+1% 2-巯基乙醇/Hepes 母液+5µg/mL 刀豆蛋白 A+5% 胎牛血清) 中调为 2×10^5 个细胞/毫升,以每孔 100 微升接种入细胞培养板,然后在 37°C、5% CO₂ 中培养。作为对照,将 D10.G4.1 细胞与 IL-1 检测培养液单独培养。在适当的培养时间之后,通过 MTT 实验 (2.12.4) 来测定 D10.G4.1 细胞的生长。借助于 IL-1 标准液来建立一条标准曲线。待测样品中的 IL-1 活性在标准曲线上读取。

2.13.2 白细胞介素-6

将 7TD1 细胞 (2.9.5) 在全培养液+2% 2-巯基乙醇/Hepes 母液 (由此使得 2-巯基乙醇在培养液中的最终浓度约处于 50 µmol/L) 中接种入 96 孔细胞培养板 (每孔 $2,5 \times 10^3$ 个细胞), 这些培养板事先已经铺上了稀释后

testenden Überständen und Standard IL-6 beschichtet worden waren und bei 37°C, 5% CO₂ für 3-4 Tage inkubiert. Anschließend wurde der MTT-Test durchgeführt. Zum Aufstellen der Eichkurve wurde Standard IL-6 in den Testlöchern schrittweise von 125 U/ml bis zu 0,5 U/ml verdünnt.

2.13.3. IL-10

Der IL-10-Gehalt in den Zellüberständen wurde mittels ELISA (2.12.5) nachgewiesen. Die zwei dazu gebrauchten spezifischen anti-Maus IL-10 Antikörper (gereinigt und biotinyliert, siehe Seite 18) wurden in einer Verdünnung von 1:500 verwendet.

2.13.4. M-CSF

Zum Bestimmen der M-CSF-Aktivität in Zellüberständen wurde der Soft-Agar Assay (2.12.6) und anschließend eine doppelte Esterase-Färbung (2.11.3) gemacht.

2.13.5. GM-CSF/IL-3

FDCP-1 Zellen brauchen entweder GM-CSF oder IL-3 im Kulturmedium, um zu überleben und zu proliferieren (2.9.2). Um GM-CSF- oder IL-3-Aktivität der Zellüberständen zu untersuchen, wurde spezifischer, monoklonaler anti-Maus IL-3 Antikörper (Seite 18) bei dem Bioassay mit FDCP-1 Zellen verwendet, indem zwei Ansätze, mit und ohne anti-IL-3, parallel getestet wurden. Bei der Untersuchung wurden FDCP-1 Zellen zunächst in Vollmedium (4×10^5 Zellen/ml) suspendiert und dann je 2×10^4 Zellen pro Loch in 96-well Mikrotiterplatten, die seriell verdünnten Standard GM-CSF (0,25-125 U/ml) oder IL-3 (0,01-10 U/ml) oder die zu testenden Überstände enthielten, ausgesät. Anschließend wurde je 10 µl anti-IL-3 Antikörper in die entsprechenden Testlöcher pipettiert. Die Ergebnisse des Bioassays wurden ebenfalls wie oben beschrieben mit dem MTT-Test ausgewertet. Die Einheiten der GM-CSF- oder IL-3-Aktivität wurden jeweils mit der Eichkurve von Standard GM-CSF oder IL-3 berechnet.

的待测上清液与标准 IL-6, 在 37°C、5% CO₂ 中培养 3-4 天。接下来进行 MTT 实验。为了建立标准曲线, 将 IL-6 的标准样品在检测孔中逐步地从 125 U/mL 稀释至 0.5 U/mL。

2.13.3 白细胞介素-10

细胞上清液中的 IL-10 含量借助于 ELISA 法 (2.12.5) 检出。两种为此所需的特异性抗小鼠 IL-10 的抗体 (纯化的与生物素化的, 见第 18 页) 在 1 : 500 稀释后使用。

2.13.4 巨噬细胞集落刺激因子

测定细胞上清液中的 M-CSF 活性通过软琼脂检测法 (2.12.6) 与紧接着的酯酶双染色法 (2.11.3) 来完成。

2.13.5 粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子与白细胞介素-3

FDCP-1 细胞需要 GM-CSF 或者 IL-3 存在于培养液中才能存活与增殖 (2.9.2)。为了检测细胞上清液中 GM-CSF 或 IL-3 的活性, 特异性的单克隆抗小鼠 IL-3 的抗体 (见第 18 页) 在使用 FDCP-1 细胞的生物检测中得以应用, 在此, 两种配方 (有与无抗 IL-3 的抗体) 进行平行实验。在检测过程中, 先将 FDCP-1 细胞悬浮于全培养液 (4×10^5 个细胞/毫升) 中, 然后以每孔 2×10^4 个细胞接种到 96 孔细胞培养板里, 这些培养板的孔中已含有系列稀释后的标准 GM-CSF (0.25-125 U/mL) 或者 IL-3 (0.01-10 U/mL) 或者待测上清液。随后, 抗 IL-3 的抗体以每孔 10 微升加入到相应的检测孔中。此项生物检测的结果也如同以上描述的那样用 MTT 试验来评定。GM-CSF 或者 IL-3 活性的单位分别用 GM-CSF 或者 IL-3 标准样品的标准曲线来计算。

2.13.6. IFN- γ

Mit zwei spezifischen anti-Maus IFN- γ Antikörper (gereinigt und biotinyliert, siehe Seite 18) wurde ein ELISA (2.12.5) zum Nachweis des Gamma-IFNs in Zellüberständen durchgeführt. Die Antikörper waren 1:500 verdünnt.

2.13.7. TNF- α

Die TNF-Aktivität in Zellüberständen wurde mittels L929-Zellen bestimmt. In Gegenwart von Actinomycin D sind L929-Zellen sehr sensitiv für TNF-vermittelte Zytotoxizität und lassen sich innerhalb von 24 h lysieren [Ruff & Gifford 1980]. Zum Test wurden L929-Zellen (1.5×10^4 Zellen pro Loch) in Vollmedium in die 96-well Mikrotiterplatten ausgesät und über Nacht bei 37°C inkubiert, so dass sich ein geschlossener Zellrasen bildete. Auf diesen Zellen wurden serielle Verdünnungen (1:2, 1:4, 1:8 etc.) der zu testenden Zellüberstände sowie des Standard TNFs (0,10-200 U/ml) hergestellt. Je 100 μ l 1:500 im PRMI 1640 verdünnte Actinomycin D Lösung (2.8.1.2) wurde zugefügt. Nach ca. 20 h Inkubation bei 37°C, 5% CO₂, wurden aus jedem Loch 100 μ l Medium entnommen und 10 μ l MIT Lösung hinzu pipettiert, um den Abtötungsgrad der L929 Zellen zu bestimmen. Da Actinomycin-behandelte Zellen MTT langsamer umsetzen als normale Zellen, wurde die Inkubationszeit von ca. 4 h auf 6 h verlängert. Die Ergebnisse wurden ausgewertet wie bei dem MTT-Test (2.12.4) beschrieben. Um den TNF-Typ (TNF- α oder TNF- β) zu bestimmen, wurde spezifischer anti-TNF- α Antikörper (siehe Seite 18) in einer Verdünnung von 1:100 dem Test zugefügt.

2.14. Nachweis der mRNA von speziellen Proteinen

2.14.1. Northern-Blot

2.14.1.1. Markierung einer cDNA-Probe mit [³²P]

Zur Markierung wurde der "Megaprime"-Kit der Firma Amersham verwendet. Die Markierung wurde nach der "Random Prime" Methode [Feinberg & Vogelstein

2.13.6 γ -干扰素

使用两种特异性抗小鼠 IFN- γ 的抗体 (纯化的与生物素化的, 见第 18 页), 通过 ELISA 法 (2.12.5) 来检测细胞上清液中的 IFN- γ 。抗体的稀释度为 1 : 500。

2.13.7 肿瘤坏死因子- α

细胞上清液中的 TNF 活性借助于 L929 细胞来检测。在放线菌素 D 存在的情况下, L929 细胞对 TNF 介导的杀伤活性极为敏感并在 24 小时内裂解【Ruff 与 Gifford, 1980 年】。为做试验, 将 L929 细胞 (每孔 1.5×10^4 个细胞) 在全培养液中接种入 96 孔细胞培养板里, 在 37°C、5% CO₂ 中培养过夜, 由此, 一个封闭的细胞坪自行长成。在这些细胞上进行连续稀释待测上清液 (1 : 2; 1 : 4; 1 : 8 等) 以及标准的 TNF (0.10-200 U/mL), 再向每孔加入 100 微升 1 : 500 稀释于 PRMI 1640 中的放线菌素 D 溶液 (2.8.1.2)。在大约 20 小时培养于 37°C、5% CO₂ 中之后, 从每孔取出 100 微升培养液, 并将 10 微升 MTT 溶液加入孔中, 以测定 L929 细胞的死亡程度。由于放线菌素 D 处理过的细胞对 MTT 的转化比正常细胞慢, 将孵育时间从约 4 小时延长至 6 小时。实验结果的评定如 MTT 实验 (2.12.4) 中所述。为了确定 TNF 的类型 (TNF- α 或是 TNF- β), 将特异性抗 TNF- α 的抗体 (见第 18 页) 在 1 : 100 稀释后添加到试验中。

2.14 特定蛋白质信使 RNA (mRNA) 的检出

2.14.1 Northern 印记杂交

2.14.1.1 用 [³²P]标记互补 DNA (cDNA) 探针

为了标记, 实验使用了 Amersham 公司的大引物 DNA 标记试剂盒。此标记依照随机引物法【Feinberg 与 Vogelstein, 1983 年】按照下列步骤进

1983] folgenderweise durchgeführt: 20 ng doppelsträngige cDNA wurde mit 5 µl Primerlösung (Nonadeoxynukleotide in wässriger Lösung) versetzt und der Ansatz wurde mit H₂O bidest. auf 50 µl aufgefüllt. Die DNA wurde 5 min bei 95°C denaturiert und zur Primer-anlagerung auf RT abgekühlt. Die Markierung erfolgte nach Zugabe von 10 µl 5×Markierungs-puffer (dATP, dGTP, dTTP in Tris-HCl pH 7.8), 34 µl H₂O, 5 µl [α -³²P] dCTP (spez. Aktivität: 3000Ci/mM) und 2 µl Klenow-Enzym (1 Unit/µl) für 30 min bei 37°C. Anschließend wurde die DNA durch Ethanol Fällung von den freien Nukleotiden abgetrennt und in TE-Puffer (2.8.3.9) aufgenommen. Es wurde eine spezifische Aktivität von > 10⁹ cpm/µg DNA erreicht.

2.14.1.2. RNA-Präparation

3-10×10⁶ Zellen aus Gewebekultur wurden abzentrifugiert und zweimal mit 5 ml eiskaltem PBS gewaschen. Nachdem das PBS entfernt wurde, wurde das Zellpellet mit 900 Lösung D (2.8.3.8) versetzt, so dass die Zellen sofort lysiert wurden [Chomczynski & Sacchi 1987]. Das Zell-Lysat wurde in ein 2 ml Eppendorf-hütchen überführt und 90 µl 2M NaAc (pH 4,0), 900 µl Phenol (vorher mit Wasser gesättigt), und 180 µl Chloroform/Isoamylalkohol (49:1) wurden hinzugegeben (nach Zugabe jeder einzelnen Komponente wurde vorsichtig gemischt). Die Suspension wurde anschließend 10 Sekunden kräftig auf dem Vortex geschüttelt. Nach 15 min Abkühlen auf Eis wurde die Probe 20 Minuten bei 10000×g in einer Eppendorf-zentrifuge bei 4°C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation befand sich die RNA in der wässrigen Phase, DNA und Protein dagegen in der Interphase und der Phenolphase. Die wässrige Phase wurde in ein neues 2 ml Eppendorf-hütchen transferiert, mit 900 µl Isopropanol gemischt und dann mindestens 1 Stunde bei -20°C stehen gelassen, um die RNA zu präzipitieren, die schließlich durch Zentrifugation (10 min bei 10000×g) gewonnen werden konnte. Die RNA wurde in 75%igem vorgekühltem Ethanol resuspendiert und 5 min bei 10000×g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer gebogenen Pasteurpipette sorgfältig abgenommen und der Niederschlag wurde 10-15 min bei RT luftgetrocknet, bis keine

行: 将 20 纳克双链 cDNA 与 5 微升引物溶液 (九脱氧核苷酸的水溶液) 混匀, 用双蒸水将混合物补足至 50 微升。在 95°C 对 DNA 进行 5 分钟变性, 并为了引物的附着而冷却至室温。在加入 10 微升 5×标记缓冲液 (dATP、dGTP、dTTP 溶于 Tris-盐酸盐溶液, pH 7.8)、34 微升水、5 微升 [α -³²P]-dCTP (比活度为 3000 居里/mM) 以及 2 微升 Klenow 酶 (1 U/µL) 之后, 在 37°C 进行 30 分钟标记。随后使 DNA 通过乙醇沉淀与游离的核苷酸分开, 并溶于 TE 缓冲液 (2.8.3.9) 中。此标记能达到的比活性 > 10⁹ 每分钟计数/微克 DNA。

2.14.1.2 RNA 的制备

离心收集来自组织培养的 3-10×10⁶ 个细胞, 用 5 毫升冰冷的 PBS 洗两遍。去除 PBS 后, 将细胞沉淀与 900 微升溶液 D (2.8.3.8) 混匀, 使细胞被立即裂解【Chomczynski 与 Sacchi, 1987 年】。将细胞裂解物移入一只 2 毫升的小型离心管 (Eppendorf 管, 又称为 EP 管) 内, 向其中加入 90 微升的 2mol/L 乙酸钠 (NaAc, pH 4.0)、900 微升的酚 (之前已用水饱和)、还有 180 微升的氯仿/异戊醇 (49:1), 每加入一种成分后都要小心地混匀。接着, 将此悬液置于旋涡混合器 (Vortex) 上强力震动 10 秒钟。在冰上冷却 15 分钟后, 将样品置于小型离心机 (Eppendorf Centrifuge) 里, 在 4°C 以 10000×g 离心 20 分钟。离心后, RNA 在水相里, 与之相反, DNA 和蛋白质在中间层与酚相中。将水相转入一支新的 2 毫升 EP 小型离心管里, 与 900 微升异丙醇相混合, 然后在 -20°C 至少静置 1 小时, 使 RNA 得以沉淀, 随后, 通过离心 (10000×g, 10 分钟) 获取沉淀的 RNA。将 RNA 重新悬浮在 75% 预冷过的乙醇中, 并在 10000×g 离心 5 分钟。使用一支弯曲的巴斯德移液管小心地取出上清液, 让沉淀物在室温下空气干燥 10-15

Spuren von Ethanol mehr sichtbar waren. Die RNA wurde in 50 µl 0,5% SDS aufgenommen und 15 min auf 65°C erhitzt, um sie zu lösen. Um die Nukleinsäuregehalte der Proben zu bestimmen, wurde die Extinktion der Proben bei 260nm gemessen. Die RNA-Lösung wurde entweder direkt im Northern-Blot analysiert oder bei -70°C aufbewahrt.

2.14.1.3. RNA-Trennung und Blot

Je 10 µl RNA-Lösung (ca. 20 µg RNA) wurde mit 8 µl DMSO-Mix (2.8.3.4) und 1,2 µl Glyoxal (20% in H₂O pH ca.6) gemischt und 30 min bei 50°C inkubiert. Die Proben wurden schnell auf 4°C abgekühlt, mit 4 µl 5×RNA-Probenpuffer (2.8.3.7) gemischt, auf ein Gel (1% Agarose in 10mM Na-Phosphatpuffer pH 7) aufgetragen und bei 70 V in demselben Puffer aufgetrennt. Das Gel wurde dann mit 1 µg/ml Ethidiumbromid in 10mM Na-Phosphatpuffer 10 min angefärbt, um die RNA sichtbar zu machen. Am Ende wurde eine Membran (Hybond N⁺ Nylonmembran, Amersham) auf das Gel gelegt und ein Kapillar-Blot aufgebaut, wie in der Abbildung unten dargestellt. Das Transferieren der RNA von dem Gel auf die Membran erfolgte über Nacht, wobei 2×SSC als transferierender Puffer benutzt wurde.

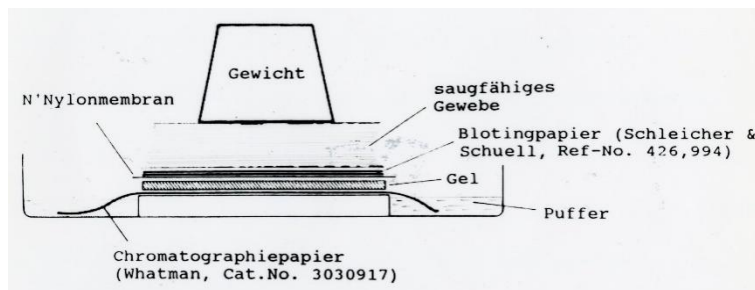


Abb. Gerät für einen Northern-Blot

分钟, 直至不再有残留的乙醇能被看见。将 RNA 溶于 50 微升 0.5% SDS 中, 在 65°C 加热 15 分钟使其溶解。为了确定样品的核酸含量, 检测样品在 260 nm 的光吸收。此 RNA 溶液或直接用于 Northern 印迹杂交分析, 或者在 -70°C 下保存。

2.14.1.3 RNA 的分离与印迹法

每 10 微升 RNA 溶液 (约 20 微克 RNA) 与 8 微升 DMSO 混合液 (2.8.3.4) 和 1.2 微升乙二醛 (20% 水溶液, pH 约为 6) 相混合, 在 50°C 保温 30 分钟。将样品迅速冷却至 4°C, 与 4 微升 5×RNA 样品缓冲液 (2.8.3.7) 混合, 上样入电泳凝胶 (1% 琼脂糖溶于 10 mmol/L 钠-磷酸盐缓冲液, pH7) 中, 于 70 伏下在同一缓冲液中进行电泳分离。然后用 1 µg/mL 溴化乙锭 (溶于 10 mmol/L 钠-磷酸盐缓冲液中) 对凝胶染色 10 分钟, 使 RNA 变为可见。最后, 按照标准技术【Maniatis 等, 1982 年】来做 Northern 印迹, 即: 将一张膜 (Hybond-N⁺ 尼龙膜, Amersham 产品) 置于凝胶之上, 建造毛细管印迹, 如下图所示。RNA 从凝胶到尼龙膜上的转移过夜即可完成, 在此过程中, 2×SSC 溶液用作转移缓冲液。

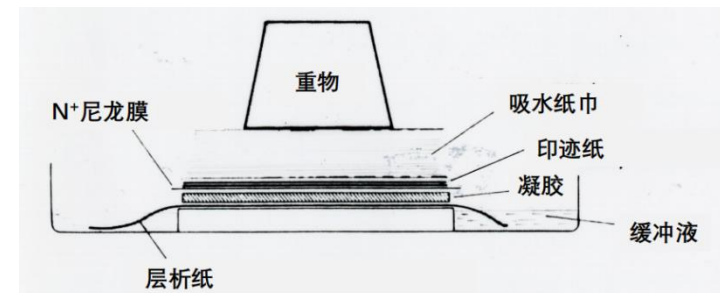


图: Northern 印迹操作图示

2.14.1.4. Hybridisierung und Nachweis der RNA

Die Nylonmembran wurde zur Fixierung der RNA für 30-60 min bei 80°C gebacken. Anschließend wurde die Membran in 2×SSC angefeuchtet und mit denaturierter Lachs-Sperma DNA (100 µg/ml in Hybridisierungspuffer) 1-3 Stunden bei 42°C prähybridisiert. Die durch Erhitzen und Abkühlen denaturierte radioaktiv markierte cDNA wurde in den Prähybridisierungsansatz gegeben und mit der RNA für 12-15 h bei 65°C hybridisiert. Danach wurde die Membran in SSC/SDS nachfolgendem Schema gewaschen, um unspezifisch gebundene DNA zu entfernen: 1. 2×SSC/0,1% SDS 10 min bei 20°C, 2. 2×SSC/0,1% SDS 30 min bei 65°C, 3. 1×SSC/0,1% SDS 30 min bei 65°C, und 4. 0,2×SSC/0,1% SDS 20 min bei 65°C. Um die hybridisierte radioaktive DNA sichtbar zu machen, wurde die Membran in eine Haushaltsfolie eingepackt und dann mit einem Kodak Xomat AR Film und zwei Verstärkerfolien für 1-5 Tage bei -70°C autoradiographiert.

2.14.2. *in situ* Hybridisierung

2.14.2.1. cDNA-Markierung mit Digoxigenin (DIG)

Zur DIG-Markierung der cDNA wurde wiederum die "Random Prime" DNA-Markierungsmethode angewendet. Die Reagenzien wurden von Boehringer Mannheim erworben. Zunächst wurden ca. 30ng DNA, die vorher gereinigt und linearisiert worden war, in einem Eppendorf Gefäß mit bidest. Wasser auf 15 µl aufgefüllt, dann durch Erhitzen für 10-15 min im kochenden Wasserbad und darauffolgend schnelles Abkühlen auf Eis/NaCl denaturiert. Es folgte die Zugabe von 2 µl Hexanucleotid-Gemisch, 2 µl dNTP-Markierungsgemisch (dATP, dCTP, dGTP je 1mM und dTTP 0,65mM sowie DIG-dUTP 0,35mM), und anschließend 1 µl Klenow Enzym (2 Einheiten/µl). Die Mischung wurde kurz zentrifugiert und für 20 h bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden 2 µl 0,2M EDTA-Lösung (pH 8,0) zugegeben, um die Synthese abzustoppen. Die Lösung wurde mit 2,5 µl 4M LiCl und 75 µl vorgekühltem (-20°C) absolutem Ethanol gemischt und 1 Stunde bei -70°C oder über Nacht bei -20°C stehen gelassen, um DNA zu präzipitieren. Es folgte eine 10 min Zentrifugation bei 12000×g. Der Niederschlag wurde

2.14.1.4 RNA 的杂交与检出

为了固定 RNA, 将尼龙膜在 80°C 烘烤 30-60 分钟。接着将膜在 2×SSC 溶液中浸湿, 与已变性的鲑鱼精 DNA (100µg/mL 溶于杂交缓冲液中) 在 42°C 预杂交 1-3 小时。通过加热与冷却而变性的、已放射标记的 cDNA 被加进预杂交体中, 与 RNA 在 65°C 杂交 12-15 小时。随后将膜在 SSC/SDS 溶液中按照下述流程洗涤, 以去除非特异性结合的 DNA: 1. 在 20°C, 用 2×SSC / 0.1% SDS 洗 10 分钟; 2. 在 65°C, 用 2×SSC / 0.1% SDS 洗 30 分钟; 3. 在 65°C, 用 1×SSC / 0.1% SDS 洗 30 分钟; 4. 在 65°C, 用 0.2×SSC / 0.1% SDS 洗 20 分钟。为使杂交后的放射性 DNA 可见, 将膜包裹在一张家用保鲜薄膜里, 然后用一张柯达 Xomat AR 胶片和两张加厚的薄膜在 -70°C 放射自显影 1-5 天。

2.14.2 原位杂交

2.14.2.1 使用地高辛 (DIG) 的 cDNA 标记法

为做 cDNA 的地高辛标记, “随机引物” DNA 标记法再次得以应用。与之相关的试剂购自 Boehringer Mannheim 公司。首先将约 30 纳克 DNA (其事先已纯化并线性化) 在一只小型的 EP 离心管中用双蒸水调至 15 微升, 然后通过沸水浴中加热 10-15 分钟, 接着迅速置于冰/氯化钠上冷却使其变性。随后加入 2 微升六核苷酸混合物、2 微升 dNTP 标记混合物 (dATP、dCTP、dGTP 每种 1 mmol/L 与 dTTP 0.65 mmol/L 及 DIG-dUTP 0.35 mmol/L), 最后加入 1 微升 Klenow 酶 (2 U/µL)。将此混合物短暂离心, 置于 37°C 孵育 20 小时。结束孵育后, 将 2 微升 0.2mol/L EDTA 溶液 (pH 8.0) 加入其中以终止合成。将此液与 2.5 微升 4mol/L 氯化锂 (LiCl) 和 75 微升预冷却 (-20°C) 的无水乙醇相混合, 在 -70°C 进行 1 小时或者在 -20°C 过夜静置, 使 DNA 沉淀。随后在 12000×g 离心 10 分钟。将沉淀物用 50

einmal mit 50 µl kaltem Ethanol (70%) gewaschen, im Vakuum getrocknet und schließlich in 50 µl TE-Puffer gelöst. Die Menge DIG-markierter DNA wurde in verschiedenen Verdünnungen (10×, 100×, 1000×, 2000×, 4000×, 8000×, 16000× und 32000×) im Vergleich zu Standard DIG-DNA im Dot-Blot bestimmt.

Hexanucleotid-Gemisch:	Tris-HCl	0,5 M
	MgCl ₂	0,1 M
	Dithioerythritol	1 mM
	BSA	2 mg/ml
	Hexanucleotide	62,5 A ₂₆₀ U/ml
	pH 7,2 (20°C)	

2.14.2.2. Zellfixierung und Permeabilisierung

Die eingefrorenen Zytopräparate wurden sofort für 10-15 min in 100% Isopropanol fixiert. Die fixierten Präparate wurden bei Raumtemperatur zunächst einmal für 15 min mit PBS + 0.02% Triton X-100 (DEPC behandelt) und dann zweimal für 10 min mit 2×SSC (DEPC behandelt) gespült.

2.14.2.3. Hybridisierung

Die Zytopräparate wurden bei RT mit 25-35 µl Hybridisierungspuffer (2.8.3.6) pro Präparat für eine Stunde prähybridisiert. Es folgte eine 16-20-stündige Hybridisierung bei 37°C mit der zuvor bei 100°C für 10 min denaturierten und dann schnell abgekühlten DIG-markierten cDNA-Sonde (5ng/Präparat). Am Ende der Hybridisierung wurden die Präparate folgendermaßen gewaschen: zuerst für 5 min in PBS + 0,02% Triton X-100 bei RT, dann 10 min in 2×SSC bei RT, anschließend zweimal für 10 min in 1×SSC + 0,01% SDS bei 50°C, schließlich für 10 min in 0,5×SSC + 0,01% SDS bei RT.

微升冷乙醇 (70%) 洗一次, 真空干燥, 最后溶于 50 微升 TE 缓冲液中。地高辛标记的 DNA 量以不同的稀释度 (10×、100×、1000×、2000×、4000×、8000×、16000× 和 32000×) 与标准的地高辛 DNA 相比较, 用点印迹 (Dot-Blot) 法来确定。

六核苷酸混合物:	Tris-盐酸盐	0.5 mol/L
	氯化镁	0.1 mol/L
	二硫赤藓糖醇	1 mmol/L
	牛血清白蛋白	2 mg/mL
	六核苷酸	62.5 A ₂₆₀ U/mL
	pH 7.2 (20°C)	

2.14.2.2 细胞的固定与通透处理

将冻存的细胞涂片立即在 100% 异丙醇中固定 10-15 分钟。固定后的细胞涂片在室温下先用 PBS + 0.02% Triton X-100 (DEPC 处理过) 一次洗 15 分钟, 再用 2×SSC (DEPC 处理过) 两次洗 10 分钟。

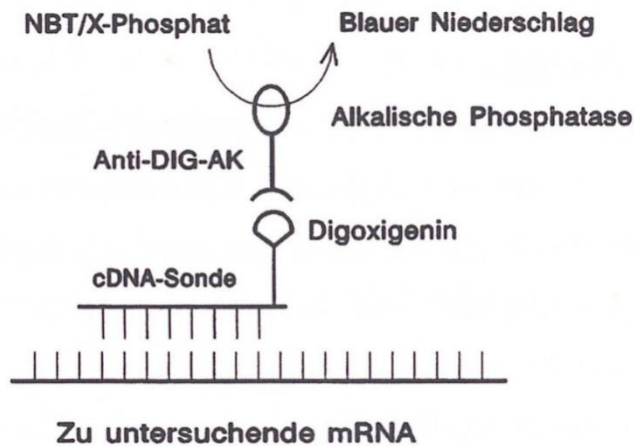
2.14.2.3 杂交

在室温下将细胞涂片与杂交缓冲液 (2.8.3.6) 以每片 25-30 微升进行 1 小时的预杂交。接着与事先在 100°C 变性 10 分钟并随后快速冷却的地高辛标记的 cDNA 探针 (5 纳克/细胞涂片) 在 37°C 进行 16-20 小时杂交。杂交结束后, 将细胞涂片按照以下步骤洗涤: 首先在 PBS + 0.02% Triton X-100 中室温下洗 5 分钟, 然后在 2×SSC 中室温下洗 10 分钟, 接着两次在 1×SSC + 0.01% SDS 中 50°C 下洗 10 分钟, 最后在 0.5×SSC + 0.01% SDS 中室温下洗 10 分钟。

2.14.2.4. Immunologischer Nachweis mit anti-DIG Antikörper

Gleich nach dem Waschen wurden die Zytopräparate zunächst mit der Blocking-Lösung (0,2% BSA + 0,3% Triton X-100 in TBS, pH 7,6) 30 min bei RT und anschließend mit anti-DIG Antikörper (1:1000 verdünnt in Blocking-Lösung) eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Präparate 15 min in TBS + 0,1% Triton X-100 und danach 15 min in TBS allein gewaschen, dann in TMS (pH 9,5, siehe 2.8.2.6) für 5 min äquilibriert. Anschließend wurden sie mit NBT + X-Phosphat Lösung (4,5 µl Nitroblau-Tetrazolium Salz, 75 mg/ml in 70% DMF + 3,5µl 5-Brom-4-chlor-3-indoly Phosphat p-Toluidin-Salz, 50 mg/ml in 100% DMF + 1 ml TMS-Puffer) bedeckt. Die Farbreaktion verlief für 4-20 h bei 37°C im Dunkeln. Anschließend wurden die Präparate mit TE-Puffer (2.8.3.9) gespült, um die Reaktion abzustoppen, in Isopropanol dehydriert, und 40 Sek. mit Xylol gereinigt. Die Präparate konnten für die mikroskopische Untersuchung mit Glycerin-Gelatine-Lösung eingedeckt werden.

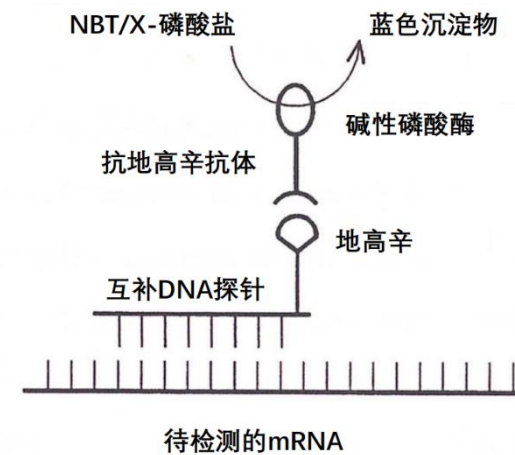
Prinzip der Detektion mit einer DIG-Sonde



2.14.2.4 使用抗地高辛抗体的免疫检出法

将完成洗涤的细胞涂片立刻与阻断液 (0.2% 牛血清白蛋白 + 0.3% Triton X-100 溶于 TBS, pH 7.6) 在室温下孵育 30 分钟, 接着与抗地高辛抗体 (已耦合碱性磷酸酶, 1:1000 稀释于阻断液中) 在 37°C 孵育 1 小时。完成孵育后, 将细胞涂片在 TBS + 0.1% Triton X-100 中洗 15 分钟, 随后在 TBS 单液中洗 15 分钟, 接着在 TMS (pH 9.5, 见 2.8.2.6) 中进行 5 分钟平衡。下一步是在细胞涂片上覆盖 NBT + X-磷酸盐溶液 [4.5 微升氮蓝四唑盐 (NBT, 75mg/mL 溶于 70% DMF) + 3.5 微升对 5-溴-4-氯-3-吡啶磷酸酯-对甲苯胺盐 (BCIP, 50mg/mL 溶于 100% DMF) + 1 毫升 TMS 缓冲液]。染色反应在 37°C、黑暗中进行 4-20 小时。最后将细胞涂片用 TE 缓冲液 (2.8.3.9) 冲洗, 使反应终止, 在异丙醇中脱水, 用二甲苯清洁 40 秒。细胞涂片即可为显微观察而用甘油明胶液封固了。

使用地高辛标记的探针的检出原理



2.15. Statistische Analyse

Alle Experimente wurden in Triplikaten gemacht und mindestens dreimal wiederholt. Die nachgewiesenen Unterschiede zwischen den Proben wurden mittels "Student's *t*-test" analysiert. $P < 0,05$ galt als signifikant.

2.15 统计学分析

所有实验以一式三份完成并至少重复了三次。对样品之间检出的差异使用“学生 *t* 检验”法进行了分析。 $P < 0.05$ 被视为显著。

3. ERGEBNISSE

3.1. Anreicherung und Kultur für NK-aktive Zellen aus Knochenmark

3.1.1. Anreicherung der NK-Vorläufer aus den gesamten Knochenmarkzellen

Wie schon in der Einleitung 1.1 erwähnt, befinden sich die Vorläufer der NK-Zellen im Knochenmark. *In vitro* Stimulation der frisch isolierten Knochenmarkzellen mit IL-2 führt zu einer Entwicklung von NK-inaktiven Vorläufern zu aktiven NK-Zellen. Um die NK-Aktivität in der Maus nachzuweisen, wird die Zytotoxizität gegen NK-empfindliche Yac-1 Tumorzellen (siehe 2.9.6) in einem 4-stündigen Test gemessen [Koo et al, 1986; Pollack & Rosse, 1987]. In der vorliegenden Arbeit wurden die NK-Vorläufer, deren Zelldichte relativ niedrig ist [Silvennoinen et al., 1986], durch Zentrifugation im Dichtegradienten angereichert. Die frisch isolierten gesamten Knochenmarkzellen wurden über einen 4-stufigen Percoll-Gradienten (Gradient I, siehe 2.10.2) in 4 Fraktionen getrennt. Danach wurden alle Fraktionen mit IL-2 kultiviert. Nach 48- sowie 72-stündiger Inkubation wurde die Zytotoxizität der Zellen gegen Yac-1 getestet. Bisher wurde die höchste anti-Yac-1 Aktivität bei den Zellen in der leichten Percoll-Fraktion (Fr.32%/52%) nachgewiesen (Tab. 1). Die zytotoxische Aktivität hing mit der Anwesenheit von IL-2 zusammen und trat bei den Kulturen ohne IL-2 nicht auf.

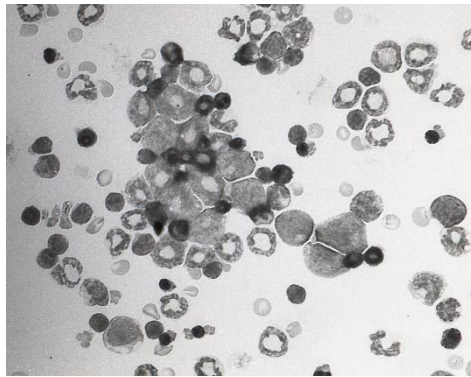


Abb.1 Frisch isolierte gesamte Knochenmarkzellen. Das Zytopräparat zeigt eine heterogene Population, die aus verschiedenen Zelltypen (myeloischen Monoblasten und polymorphkernigen Zellen, Erythrozyten, kleinen Lymphozyten, und noch unidentifizierbaren Vorläufer-zellen) besteht.

3. 结果

3.1 从骨髓细胞中富集与培养有 NK 活性的细胞

3.1.1 从全骨髓细胞中富集 NK 前体细胞

正如已在绪论 1.1 中所述, NK 细胞的前体存在于骨髓中。使用 IL-2 在体外刺激新鲜分离的骨髓细胞, 引发了无 NK 活性的前体细胞向有活性的 NK 细胞的发育。为了检出小鼠体内的 NK 活性, 针对 NK 敏感的 Yac-1 肿瘤细胞 (见 2.9.6) 的杀伤活性在一个 4 小时的试验中进行测定【Koo 等, 1986 年; Pollack 与 Rosse, 1987 年】。在本工作中, NK 前体细胞, 其细胞密度较低【Silvennoinen 等, 1986 年】, 通过密度梯度离心法得以富集。新鲜分离的全骨髓细胞在一个 4 级的 Percoll 密度梯度离心液 (梯度液 I, 见 2.10.2) 上被分离为 4 个细胞层。随后, 所有的细胞层都分别与 IL-2 进行培养。经过 48 与 72 小时培养后, 测定这些细胞对 YAC-1 的杀伤活性。迄今为止, 最高的杀伤 Yac-1 的活性在轻的 Percoll 细胞层 (32%/52%) 中被检出 (表 1)。细胞的杀伤活性依赖于 IL-2 的存在, 未出现在无 IL-2 的培养中。

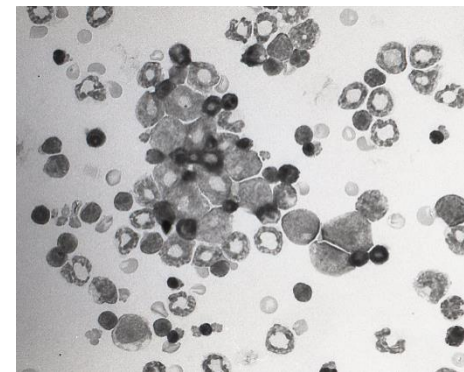


图 1 新鲜分离的全骨髓细胞。此细胞涂片显示出多样化的细胞群, 它由不同的细胞类型 (髓样原单核细胞与多形核细胞, 红细胞、小淋巴细胞、还有尚不能确定身份的前体细胞) 组成。

Tab.1. Zytotoxizität verschiedener Percoll-Fractionen aus murinem Knochenmark gegen Yac-1 Tumorzellen nach IL-2 Stimulation

Zellen	in Vollmedium		in 100 U/ml IL-2	
	48 h	72h	48 h	72 h
gesamte KM Zellen	0%	0%	2±2%	15±3%
Fr.1 32%/52%	0%	0%	15±2% ^a	35±5% ^b
Fr. 2 52%/55%	0%	0%	2.5±2%	5±3%
Fr. 3 55%/60.6%	0%	0%	0%	0%
Fr. 4 60.6%/Boden	0%	0%	0%	0%

Die Zellen wurden in 96-well Mikrotiterplatten ($2,5 \times 10^5$ Zellen/Loch) ausgesät und entweder nur mit Vollmedium oder mit Vollmedium + 100 U/ml IL-2 inkubiert. Nach entsprechender Inkubationszeit wurden die Zellen dreimal gewaschen und weiter mit ^{51}Cr -markierten Yac-1 (5×10^3 Zellen/Loch) 4 Stunden inkubiert. Die Ergebnisse werden als % spezifische Lyse von Yac-1 Zielzellen (siehe 2. 12.2) angegeben.

^a $p < 0,01$, Fr. 32%/52% vs. Fr. 52%/55%

^b $p < 0,01$, Fr. 32%/52% vs. Fr. 52%/55%

3.1.2. Mikroskopische Untersuchung der Knochenmarkzellen in verschiedenen Percoll-Fractionen

Die frisch isolierte gesamte KM-Zellpopulation bestand aus heterogenen Zelltypen (siehe Abb. 1). Sie wurde durch Zentrifugation über einen Percoll-Gradienten in vier Fraktionen, die jeweils Zellen ähnlicher Dichte enthielten, aufgetrennt. Es wurden Zytopräparate

表 1 IL-2 刺激后, 不同的 Percoll 分离层中的小鼠骨髓细胞对 YAC-1 肿瘤细胞的杀伤活性

细胞	在全培养液中		在 100 U/ml IL-2 中	
	48 h	72 h	48 h	72 h
全骨髓细胞	0%	0%	2±2%	15±3%
层 1: 32%/52%	0%	0%	15±2% ^a	35±5% ^b
层 2: 52%/55%	0%	0%	2.5±2%	5±3%
层 3: 55%/60.6%	0%	0%	0%	0%
层 4: 60.6%/底部	0%	0%	0%	0%

细胞被接种入 96 孔细胞培养板 ($2,5 \times 10^5$ 个细胞/孔) 中, 或与全培养液、或与全培养液+100 U/mL IL-2 进行培养。在相应的培养时间后, 将细胞洗三遍, 接着与 ^{51}Cr 标记的 Yac-1 (5×10^3 个细胞/孔) 培养 4 小时。实验结果以 Yac-1 靶细胞的特异性裂解% (见 2.12.2) 来呈现。

^a $p < 0.01$ 分离层 32%/52% 对比 分离层 52%/55%

^b $p < 0.01$ 分离层 32%/52% 对比 分离层 52%/55%

3.1.2 显微镜观察在不同的 Percoll 分离层中的骨髓细胞

新鲜分离的全骨髓细胞群由多样的细胞类型组成 (见图 1)。它们通过在 Percoll 密度梯度液 I 上的离心被分为 4 个细胞分离层, 每个分离层含有密度相近的细胞。对所有的 Percoll 分离层制作细胞涂片 (2.11.1),

(2.11.1) aller Percoll-Fractionen gemacht, nach Pappenheim (2.11.6) gefärbt und schließlich die Zellzusammensetzung von jeder Fraktion mikroskopisch untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 dargestellt. Ein großer Teil der Zellen in der leichten Fraktion (32%/52%) ließen sich wegen ihrer unreifen Morphologie nicht identifizieren. Solche unidentifizierbaren Vorläufer waren in den schweren Percoll-Fractionen (52%/55%, 55%/60% und 60%/Boden) kaum zu finden.

Tab.2. Zelltypen in den verschiedenen Fraktionen von Percoll-Gradient I

Percoll Fr.	Unidentifizierbare Vorläufer	Monoblast-ähnliche Zellen	Polymorph-kernige Zellen	Kleine Lymphozyten	Erythrozyten
32%/52%	60±10% *	15±5%	10±5%	5±3%	2±1%
52%/55%	10±5%	9±5%	39±12%	25±10%	8±5%
55%/60.6%	-	1±1%	60±10%	10±5%	30±10%
60.6%/Bod.	-	-	-	15±3%	85±5%

"-" bedeutet, der entsprechende Zelltyp wurde in der Fraktion nicht beobachtet.

* $p < 0,02$ Fr. 32%/52% vs. Fr. 52%/55%

3.1.3. Proliferation der NK-Vorläufer haltigen Zellpopulation

Eine Kultivierung der Knochenmarkzellen von der leichten Percoll-Fraktion (32%/52%), die die meisten NK-Vorläufer enthielt, mit lymphoidem Wachstumsfaktor IL-2 führte zu keiner signifikanten Proliferation. Im Gegensatz dazu resultierte die Kultivierung dieser

依照帕彭海姆法 (2.11.6) 进行染色, 最后对每个分离层的细胞组成做显微镜观察。观察结果显示在表 2 中。在轻的分离层 (32%/52%) 中, 有大量细胞因其不成熟的形态而无法被识别。这些不可识别的前体细胞在较重的 Percoll 分离层 (52%/55%、55%/60%、及 60%/底部) 中难以找到。

表 2 Percoll 密度梯度液 I 的不同分离层中的细胞类型

Percoll 分离层	难识别前体细胞	似原单核细胞	多形核细胞	小淋巴细胞	红细胞
32%/52%	60±10% *	15±5%	10±5%	5±3%	2±1%
52%/55%	10±5%	9±5%	39±12%	25±10%	8±5%
55%/60.6%	-	1±1%	60±10%	10±5%	30±10%
60.6%底部	-	-	-	15±3%	85±5%

"-" 表示: 相关细胞类型未在此分离层中被观察到。

* $p < 0.02$ 分离层 32%/52% 对比 分离层 52%/55%

3.1.3 含有 NK 前体的细胞群的增殖

将轻的 Percoll 分离层 (32%/52%) 中的骨髓细胞 (其中含有大部分 NK 前体细胞) 与淋巴细胞生长因子 IL-2 进行培养, 未引发明显的细胞增殖。与之相反, 将这个分离层培养在含有 CSF 的培养液 (L-细胞条件培养液)

Fraktion mit CSF-haltigem Medium (L-Zell "konditioniertes" Medium) in einer starken Proliferationsantwort (Abb. 2). Da das L-Zell "konditionierte Medium" außer CSF (CSF-1 und GM-CSF) auch andere Faktoren enthalten konnte, wurden die rekombinanten Koloniestimulierenden Faktoren, nämlich hr CSF-1 und mr GM-CSF, für den weiteren Proliferationstest eingesetzt. In Abbildung 3 ist zu sehen, dass sowohl hr CSF-1 als auch mr GM-CSF eine starke Zellproliferation anregen. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Zellen in der leichten Percoll-Fraktion von myeloidem Wachstumsfaktor abhängig wachsen.

Proliferation der KM-Zellen von Percoll-Fraktion 32%/52%

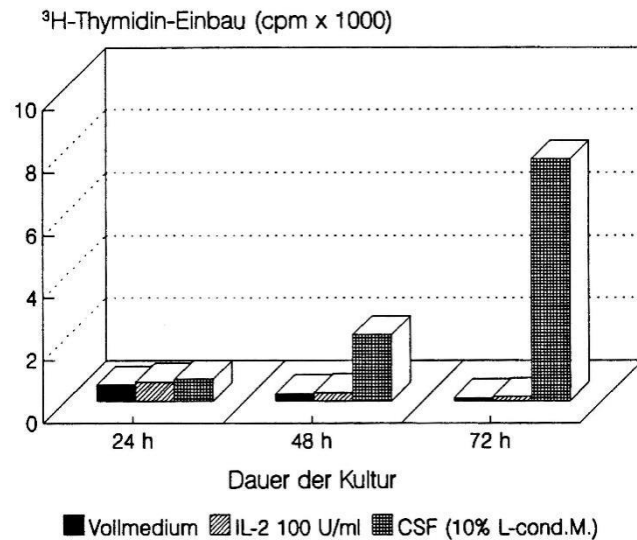


Abb.2. Die Zellen wurden in 96-well Mikrotiterplatten auf 5×10^3 Zellen/Loch ausplattiert und inkubiert mit 1) Vollmedium allein; 2) IL-2; oder 3) CSF-haltigem L-Zell "konditionierten" Medium. Der $[^3\text{H}]$ Thymidin-Einbaus Assay (2.12.1) wurde nach den angegebenen Inkubationszeiten durchgeführt.

中, 则产生了强烈的增殖反应 (图 2)。由于 L-细胞条件培养液除了 CSF (CSF-1 与 GM-CSF) 还可能含有其他因子, 重组的集落刺激性因子, 即 hr CSF-1 与 mr GM-CSF, 被用于后续的增殖实验中。在图 3 中可见: 不仅 hr CSF-1 而且 mr GM-CSF 都激发了强烈的细胞增殖。这些实验结果表明: 在轻的 Percoll 分离层中的细胞依赖于髓细胞生长因子而生长。

Percoll 32%/52% 分离层中骨髓细胞的增殖

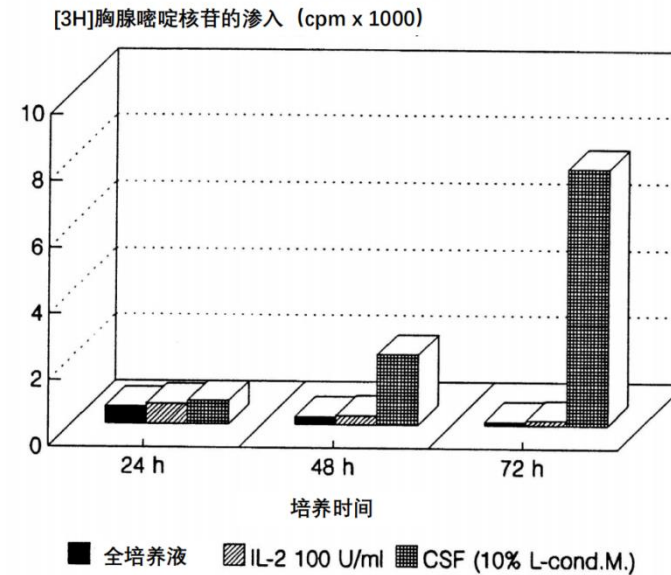


图 2 细胞以 5×10^3 个细胞/孔被接种入 96 孔细胞培养板里, 培养条件如下: 1) 只有全培养液; 2) IL-2; 或 3) 含有 CSF 的 L-细胞条件培养液。 ^3H -胸腺嘧啶核苷的掺入 (2.12.1) 在指定的培养时间后测定。

Zellproliferation in Gegenwart von rekombinanten CSFs

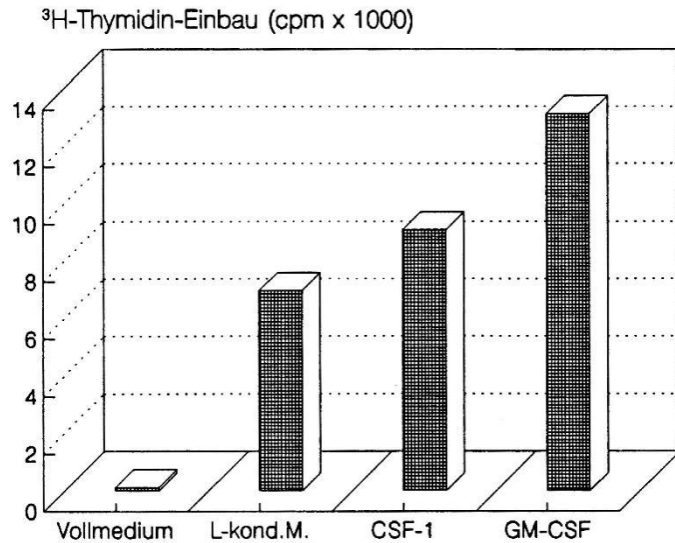


Abb.3. Die Zellen von Fr.32%/52% wurden in 96-well Mikrotiterplatten (5×10^3 Zellen/Loch) mit Reihenfolge wie in der Abbildung beschrieben 1) Vollmedium; 2) 10% L-Zell "konditioniertes" Medium; 3) 1000 U/ml hrCSF-1; und 4) 1000 U/ml mrGM-CSF inkubiert. Vollmedium und L-Zell "konditioniertes" Medium dienten als Kontrolle. Nach 2 Tagen wurde [^3H]-Thymidin in die Kultur gegeben und 20 h später die Einbausrate gemessen.

3.1.4. Effektive Knochenmark-Kultur für proliferierende und NK-aktive Zellen

Unter der Kulturbedingung nur mit CSF wurde keine zytotoxische Aktivität der Zellen (Fr.32%/52%) beobachtet. Nach einer 3-tägigen Kultur wurden die Zellen durch den Percoll-Gradienten II (2.10.2) in fünf Fraktionen getrennt und die lytische Aktivität jeder Fraktion getestet. Es konnte keine Yac-1 Lyse nachgewiesen wurde. Da die Zellen nach Kultur in Gegenwart von IL-2 gute NK-Aktivität zeigten wie unter 3.1.1. beschrieben,

在重组 CSFs 存在下的细胞增殖

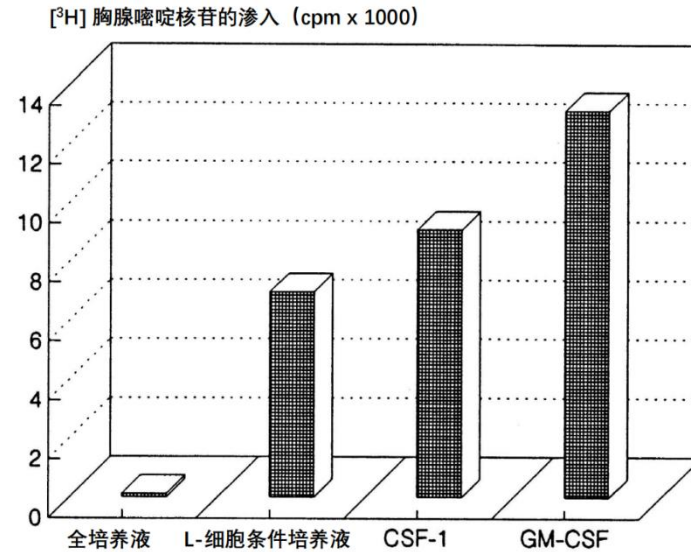


图 3 来自 32%/52% 分离层中的细胞在 96 孔培养板中 (5×10^3 个细胞/孔) 以图中所示的顺序与 1) 全培养液; 2) 10% L-细胞条件培养液; 3) 1000 U/mL hr CSF-1; 4) 1000 U/mL mr GM-CSF 进行培养。全培养液与 L-细胞条件培养液用于对照。2 天后将 ^3H -胸腺嘧啶核苷加入培养中, 20 小时后测定其掺入。

3.1.4 为获得增殖且有 NK 活性细胞的有效骨髓培养

在只有 CSF 的培养条件下, 未观察到 (来自 32%/52% 分离层) 细胞的杀伤活性。经过 3 天的培养之后, 通过 Percoll 密度梯度液 II (2.10.2) 的离心, 将细胞分离为 5 个细胞层, 测定每个细胞层的裂解活性, 仍未能检出对 Yac-1 有裂解。由于这些细胞在培养液中存在 IL-2 时显示出了好的

wurde versucht, eine Kombination von CSF (als Zellwachstumsfaktor) mit IL-2 (als NK-Aktivität stimulierender Faktor) in die Kultur einzusetzen. Diese Kulturbedingung mit beiden Faktoren führte sowohl zu einer aktiven Zellproliferation als auch zu NK-Aktivität. In Abbildung 4 wird demonstriert, dass die Wirksamkeit von IL-2 stark von der Zugabezeit beeinflusst wurde. Je früher IL-2 zur Kultur hinzugefügt wurde, desto effektivere Induktion von NK-Aktivität wurde beobachtet. Wenn IL-2 erst zwei Tage nach dem Beginn der Kultur eingesetzt wurde, konnte keine NK-Aktivität mehr in den Zellen induziert werden.

*Einfluss des Zeitpunktes der Zugabe von IL-2 auf
die Induktion der NK-Aktivität*

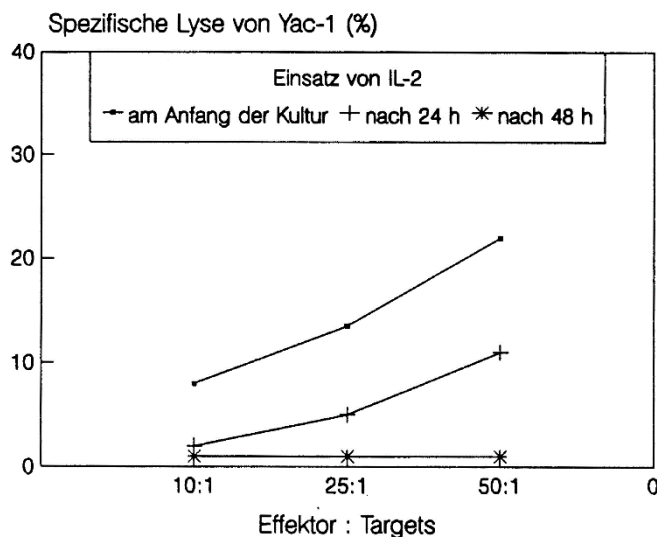


Abb.4. Die Zellen von Fr.32%/52% wurden in drei separaten Kulturen mit CSF (10% L-Zell kond. Medium) kultiviert. IL-2 (100 U/ml) wurde jeweils bei drei verschiedenen Zeitpunkten in die entsprechenden Kulturen gegeben: 1) gleich am Anfang der Kultur; 2) 24 Stunden später; und 3) 48 Stunden später. Jede Kultur wurde für 72 Stunden mit IL-2 inkubiert. Danach wurde ein 4-stündiger Zytotoxizitätstest (siehe 2.12.2) durchgeführt.

NK Aktivität (如 3.1.1 中所述), 以下尝试得以开展: 将 CSF (作为细胞的生长因子) 与 IL-2 (作为 NK 活性的刺激因子) 以联合方式添加到细胞培养中。这个含有两种因子的培养条件引发了活跃的细胞增殖与 NK 活性。如图 4 所示: IL-2 的效力强烈地受到了添加时间的影响。越早将 IL-2 添加到培养中, 观察到的对 NK 活性的诱导越有效的。如果 IL-2 在培养开始 2 天之后才被添加, 就无法在细胞中诱导出任何 NK 活性了。

添加 IL-2 的时间点对诱导 NK 活性的影响

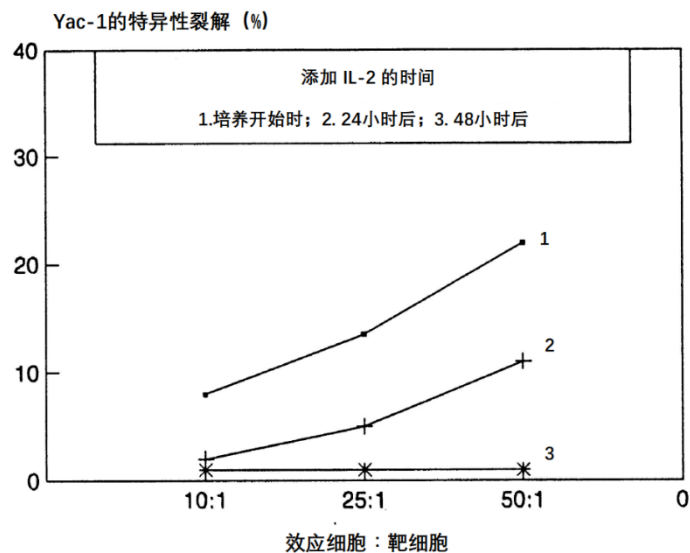


图 4 来自 32%/52%分离层的细胞在三个分开的培养中与 CSF (10% L-细胞条件培养液) 进行培养。IL-2 (100 U/ml) 分别在三个不同的时间点添加到相应的培养中: 1) 培养开始时立即添加; 2) 24 小时后添加; 3) 48 小时后添加。每种培养都与 IL-2 保温 72 小时, 然后进行 4 小时的杀伤活性实验 (见 2.12.2)。

3.1.5. Reinigung der NK-aktiven Zellen nach Kultur in CSF + IL-2

Nach einer 3-tägigen KM-Vorkultur in dem "Cocktail" von CSF mit IL-2 (siehe 2.10.3) wurden die Zellen aus der Kultur geerntet und über einen 6-stufigen Percoll-Gradienten II (2.10.2) fraktioniert. Die dadurch entstandenen fünf Zellfraktionen wurden für die morphologische Identifizierung und den Zytotoxizitätstest eingesetzt. Es wurde nachgewiesen, dass die NK-aktiven Zellen wiederum in den leichten Fraktionen (Fr. 1-3) angereichert wurden (Tab.4). Dabei wies die Fraktion 2 (40,8/45,3%), die eindeutig den höchsten Prozentsatz an Makrophagen Vorläufern enthielt (Tab.3), die beste NK-Aktivität auf (Tab.4). In dieser Fraktion wurden ca. 60% der aus der CSF+IL-2 Vorkultur geernteten Zellen wiedergewonnen (Tab.4).

Tab.3. Zellzusammensetzung in den Fraktionen von Percoll-Gradient II

Percoll-Fr.	Makrophagen-Vorläufer*	Leicht ad-härente Mφ	PMN	Lymphozyten + andere
1. 32.0/40.8%	20±7%	67±9%	5±2%	3±3%
2. 40.8/45.3%	80±5% ^{a b}	8±4%	7±3%	5±3%
3. 45.3/50.5%	42±5%	3±1%	40±6%	10±2%
4. 50.5/55.0%			80±4%	20±8%
5. 55.0/60.6%			48±7%	44±11%

* Die morphologischen Charakteristika von Makrophagen-Vorläufern wurde in früherer Arbeit beschrieben [Lohmann-Matthes 1979; Baccarini et al. 1985].

^a p < 0,01 Fr.2 vs. Fr. 1

^b p < 0,01 Fr.2 vs. Fr.3

3.1.5 在 CSF+IL-2 的骨髓培养后，纯化有 NK 活性的细胞

经过 3 天在 CSF 与 IL-2 双因子存在下的骨髓细胞前培养 (见 2.10.3) 之后, 收集培养的细胞, 在 6 级的 Percoll 密度梯度离心液二 (2.10.2) 上进行分离。由此产生的 5 个细胞分离层被用于细胞形态的鉴定与杀伤活性实验。结果证实: 有 NK 活性的细胞再次被富集到轻的分离层 (层 1~3) 中 (表 4)。并且分离层 2 (40.8%/45.3%) ——其明显含有最高百分比的巨噬细胞前体 (见表 3) ——显示出了最好的 NK 活性 (表 4)。在此分离层中, 大约能获得 60% 从 CSF+IL-2 前培养产生的细胞 (表 4)。

表 3 Percoll 密度梯度液 II 的各分离层中的细胞组成

Percoll 分离层	巨噬细胞前体*	轻度粘性巨噬细胞	多形核白细胞	淋巴细胞 + 其他细胞
1. 32.0/40.8%	20±7%	67±9%	5±2%	3±3%
2. 40.8/45.3%	80±5% ^{a b}	8±4%	7±3%	5±3%
3. 45.3/50.5%	42±5%	3±1%	40±6%	10±2%
4. 50.5/55.0%			80±4%	20±8%
5. 55.0/60.6%			48±7%	44±11%

* 巨噬细胞前体的形态特征见早期工作的描述【Lohmann-Matthes 1979 年; Baccarini 等, 1985 年】

^a p < 0.01 分离层 2 对比 分离层 1

^b p < 0.01 分离层 2 对比 分离层 3

Tab.4. NK-Aktivität und Zellzahl in jeder Fraktion von Percoll-Gradient II

	Fr. 1	Fr. 2	Fr. 3	Fr. 4+Fr. 5
NK-Aktivität (LU/10 ⁷) *	15±4	33±4 ^{a,b}	20±3	0
Zellzahl/gesamte	3±1%	60±7%	27±2%	7±3%

* Die lytischen Einheiten in den Zellpopulationen (LU/10⁷) wurden wie unter 2.12.2. beschrieben berechnet.

^a p < 0,05 Fr. 2 vs. Fr. 1

^b p < 0,05 Fr. 2 vs. Fr. 3

Da die Fraktion 2 sowohl die beste NK-Aktivität als auch den höchsten Reinheitsgrad (Tab.3) hatte, wurde sie zu weiteren Untersuchungen eingesetzt. Zum Erhöhen des Reinheitsgrads dieser Fraktion, nämlich zum Entfernen der PMN, leicht adhärenen Makrophagen und kleinen Lymphozyten, wurde die Zellpopulation zuerst in einer Plastik Kulturschale für 30 min bei 37°C mit Eisenpartikeln inkubiert (2.10.5), um die adhärenen und phagozytischen Zellen (PMN und Makrophagen) von der Population zu trennen. Danach wurde, wie unter 2.10.6 beschrieben, ein Antikörper "Cocktail" von Ratte anti-Maus B220 und Ratte anti-Maus CD3 mit den Zellen für 45 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen, die B220 oder CD3 Antikörper gebunden hatten (typische B- und T-Lymphozyten), mit Dynal Beads, gekoppelt mit Schaf anti-Ratte IgG, von der Population beseitigt. Die so behandelten Zellen ließen sich bei mikroskopischer Untersuchung als homogene Makrophagen-Vorläufer erkennen (Abb.5). Es wurde nach der Reinigung kein Verlust an NK-Aktivität beobachtet. Die gereinigten MV-Zellen differenzierten nach einer 24-stündigen Inkubation bei 37°C mit 0,2 µg/ml PMA, welches schnell eine Enddifferenzierung von Makrophagen-linien bewirken kann [Nguyen et al. 1993], zu reifen Makrophagen aus (Abb.6).

表 4 Percoll 密度梯度液 II 的每个分离层中的 NK 活性与细胞数量

	分离层1	分离层2	分离层3	分离层4+5
NK活性 (LU/10 ⁷) *	15±4	33±4 ^{a,b}	20±3	0
细胞数量/全细胞量	3±1%	60±7%	27±2%	7±3%

* 细胞群的裂解单位 (LU/10⁷) 按照 2.12.2 中所述进行计算。

^a p < 0.05 分离层 2 对比 分离层 1

^b p < 0.05 分离层 2 对比 分离层 3

由于分离层 2 既有最好的 NK 活性, 又有最高的细胞纯度 (表 3), 此分离层被用于下一步的研究。为了提高这个分离层的细胞纯度, 也就是说, 为了去除多形核白细胞 (PMN)、轻度粘附的巨噬细胞以及小淋巴细胞, 先将这个细胞群在一个塑料培养皿中与铁粒子在 37°C 孵育 30 分钟 (2.10.5), 以便将有粘附性与有吞噬能力的细胞 (多形核白细胞与巨噬细胞) 从细胞群中分离出去。然后按照 2.10.6 所述, 使用两种抗体同时加入的鸡尾酒法, 将大鼠抗小鼠 B220 与大鼠抗小鼠 CD3 的抗体与细胞在冰上孵育 45 分钟。孵育完成后, 用 Dynal 磁珠 (其上结合有绵羊抗大鼠 IgG) 将已与 B220 或者 CD3 抗体结合的细胞 (典型的 B 细胞与 T 细胞) 从细胞群中移除。如此处理过的细胞在显微镜观察下显示为同类的巨噬细胞前体 (图 5)。细胞纯化后, 未观察到 NK 活性的损失。这些纯化的巨噬细胞前体在 37°C 与 0.2µg/mL 的 PMA (佛波酯, 其能快速促成巨噬细胞的终极分化 [Nguyen 等, 1993 年]) 培养 24 小时后, 成熟为巨噬细胞 (图 6)。

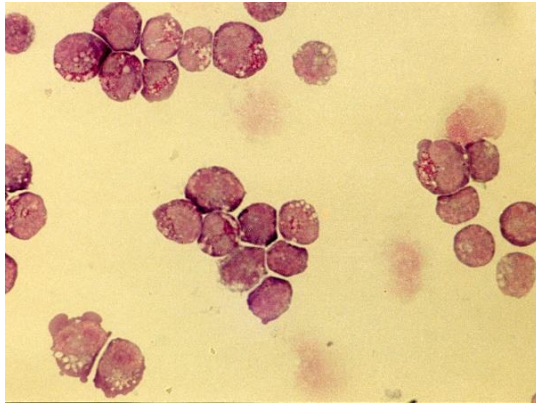


Abb.5. Morphologie der gereinigten Makrophagen-Vorläufer (MV-Zellen). Die Zellen wurden aus einer 3-tägigen KM-Vorkultur mit CSF+IL-2 isoliert und gereinigt wie unter 2.10.4-6 beschrieben.

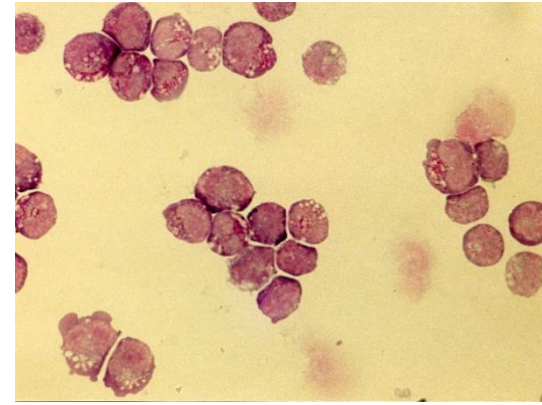


图 5 纯化的巨噬细胞前体的形态。这些细胞分离自用 CSF+IL-2 进行了 3 天的骨髓细胞前培养，并且按照 2.10.4-6 中所述进行了纯化。

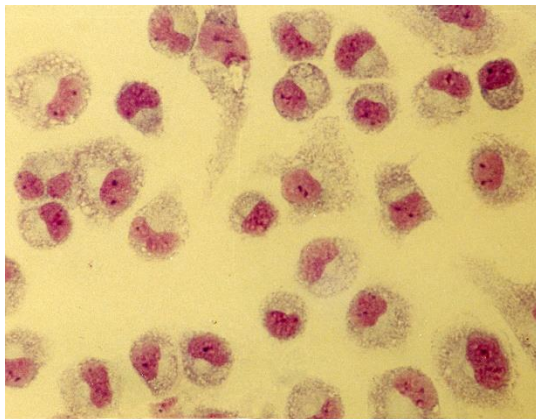


Abb.6. Die aus den gereinigten MV-Zellen ausgereiften Makrophagen. Die MV-Zellen, isoliert und gereinigt aus der 3-tägigen KM-Vorkultur mit CSF+IL-2, wurden in einer 8-well Chamberslide (siehe 2.11.2) mit PMA (0,2 µg/ml) für 24 h bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert.

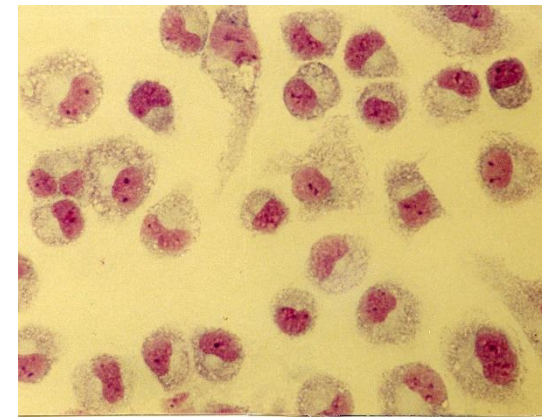


图 6 由纯化的巨噬细胞前体快速成熟的巨噬细胞。巨噬细胞前体分离并纯化自与 CSF+IL-2 培养了 3 天的骨髓细胞前培养，在 8 孔的腔室载玻片 (2.11.2) 中与 PMA (0.2µg/mL) 在 37°C、5% CO₂ 中培养了 24 小时。

2.4. Eigenschaften der durch IL-2 induzierten, NK-aktiven-Makrophagen-Vorläuferzellen

NK-aktive MV-Zellen, isoliert aus 3-tägiger KM-Vorkultur mit CSF+IL-2, wurden weiter charakterisiert. In folgenden werden die Kulturen, die mit den aus 3-tägiger KM-Vorkultur isolierten MV-Zellen als Ausgangspopulation begannen, "Hauptkultur" genannt.

3.2.1. Morphologie und Phänotyp der NK-aktiven Makrophagen-Vorläuferzellen

Beim Betrachten der Zellen im Lichtmikroskop mit hoher Vergrößerung (> 600×) stellte sich heraus, dass NK-aktive MV-Zellen zytoplasmatische Granula enthalten (Abb.7), die nicht bei NK-inaktiven Makrophagen Vorläufern, isoliert aus KM-Vorkultur nur mit CSF, zu finden sind (Abb. 8). Um den Phänotyp (Oberflächenantigen-Profile) der gereinigten



Abb.7. Die aus der KM-Vorkultur mit CSF+IL-2 gewonnene, zytoplasmatische Granula-haltige, NK-aktive MV-Zelle.

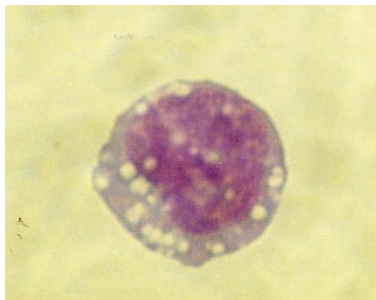


Abb.8. Die aus der KM-Vorkultur allein mit CSF gewonnene, agranuläre, NK-inaktive MV-Zelle.

3.2 被 IL-2 诱导的、有 NK 活性的巨噬细胞前体的特性

有 NK 活性的巨噬细胞前体（从与 CSF+IL-2 培养了 3 天的骨髓细胞前培养中分离而来）被用于进一步的定性研究。在下文中，将把那些使用从 3 天骨髓细胞前培养分离而来的巨噬细胞前体作为起始细胞群的培养称为“主培养”。

3.2.1 有 NK 活性的巨噬细胞前体的形态与表型

在光学显微镜中用较高的放大倍数 (>×600) 观察细胞证实：有 NK 活性的细胞含有细胞质颗粒（图 7），这在无 NK 活性的巨噬细胞前体（从单独使用 CSF 的骨髓细胞前培养分离而来）中没有被发现（图 8）。为了研究纯化后有 NK 活性的巨噬细胞前体群的表型（表面抗原状态），同时

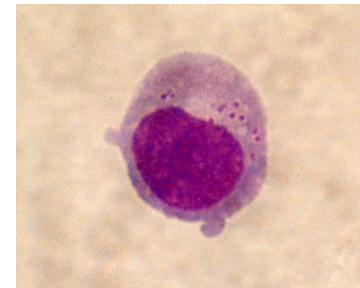


图 7 来自 CSF+IL-2 骨髓细胞前培养、含有细胞质颗粒、有 NK 活性的巨噬细胞前体。

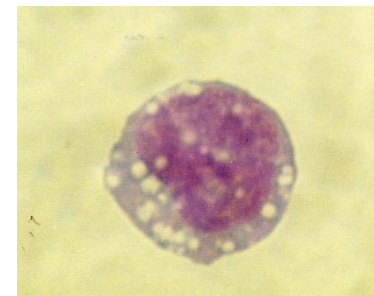


图 8 来自单用 CSF 骨髓细胞前培养、无细胞质颗粒、无 NK 活性的巨噬细胞前体。

NK-aktiven MV-Zellpopulation zu untersuchen und gleichzeitig ihren Reinheitsgrad zu überprüfen, wurden die Zellen in direktem oder indirektem Fluoreszenzfärbungsverfahren (2.11.4) mit verschiedenen spezifischen monoklonalen Antikörpern gefärbt. Die ausgewählten Antikörper waren folgende: 1) NK-1.1, gegen Maus NK-Zellen; 2) F4/80, gegen Maus Makrophagen; 3) anti-Maus Mac-1, gegen myeloide Zellen; 4) FITC-anti-Maus Lyt-1, gegen alle T-Zellen; 5) FITC-anti-Maus Lyt-2, gegen zytotoxische T-Zellen; 6) FITC-anti-Maus L3T4, gegen T-Helferzellen; 7) anti-Maus B220, gegen B-Zellen; und 8) Maus IgG2b anti-human Monozyten Leu-M3, als Isotyp Kontrolle. Die Ergebnisse der Fluoreszenzfärbung wurden mit Hilfe des FACSs analysiert und ausgewertet. In Abbildung 9 ist dargestellt, dass die gereinigte NK-aktive MV-Zellpopulation völlig negativ für Lyt-1, Lyt-2, L3T4, und B220 war. Die Zellen hatten NK-1.1 und Mac-1 Marker an der Oberfläche, zeigten aber nur eine schwache Expressierung von F4/80. F4/80 ist ein Makrophage-differenzierungs-marker und nur auf reifen Makrophagen eindeutig zu finden [Crocker & Gordon 1985; Hoefsmit et al., 1986].

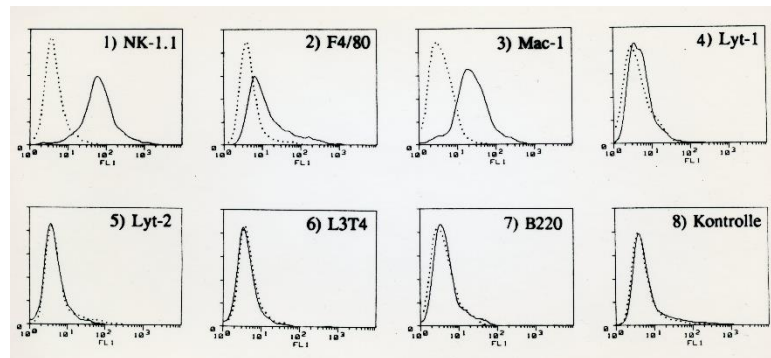


Abb.9. Oberflächenantigen-Profile der NK-aktiven MV-Zellpopulation. Die gereinigten NK-aktiven MV-Zellen aus KM-Vorkultur mit CSF+IL-2 wurden mittels der Immunofluoreszenzfärbung untersucht. Ein Maus IgG2b diente als Isotyp Kontrolle. Alle Zellen in der Population wurden analysiert.

检查细胞群的纯度, 将细胞在直接或间接荧光染色法 (2.11.4) 中用不同的特异性单克隆抗体进行染色。所选择的抗体如下: 1) NK-1.1, 抗小鼠 NK 细胞; 2) F4/80, 抗小鼠巨噬细胞; 3) 抗小鼠 Mac-1, 抗髓系细胞; 4) FITC 标记的抗小鼠 Lyt-1, 抗所有的 T 细胞; 5) FITC 标记的抗小鼠 Lyt-2, 抗杀伤性 T 细胞; 6) FITC 标记的抗小鼠 L3T4, 抗辅助性 T 细胞; 7) 抗小鼠 B220, 抗 B 细胞; 以及 8) 小鼠 IgG2b 抗人单核细胞 Leu-M3, 用作同型对照。荧光染色的结果借助于 FACS 进行分析与评定。在图 9 中显示: 纯化的有 NK 活性的巨噬细胞前体群对 Lyt-1、Lyt-2、L3T4、以及 B220 为全阴性。这些细胞的表面有 NK-1.1 与 Mac-1 标志物, 但只显示出一种对 F4/80 的弱表达。F4/80 是一个巨噬细胞分化的标志物, 只在成熟的巨噬细胞上才能清晰地被发现【Crocker 与 Gordon, 1985 年; Hoefsmit 等, 1986 年】。

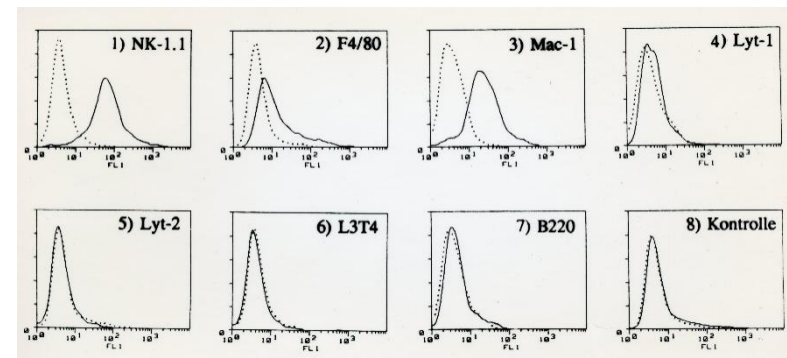


图 9 有 NK 活性的巨噬细胞前体群的表面抗原状态。来自 CSF+IL-2 骨髓细胞前培养、纯化的有 NK 活性的巨噬细胞前体借助于免疫荧光染色法得以检测。一种小鼠 IgG2b 被用作同型对照。细胞群中的所有细胞都纳入了分析。

3.2.2. Faktor-Abhängigkeit der Zellproliferation

Da die NK-aktiven MV-Zellen Ähnlichkeiten (LGL-Morphologie und NK-1.1⁺) mit den NK-Zellen aufwiesen, wurde ein Proliferationstest durchgeführt, um zu bestimmen, welcher Zellstamm-spezifische Wachstumsfaktor (CSF-1 oder IL-2) für die weitere Proliferation der Zellen gebraucht wird. In diesem Test wurden MV-Zellen aus 3-tägiger KM-Vorkultur (mit CSF+IL-2) in 96-well Mikrotiterplatten ausgesät, dann entweder mit 1000 U/ml IL-2 oder mit 1000 U/ml CSF-1 oder mit IL-2+CSF-1 (je 1000 U/ml) inkubiert. 1000 U/ml IL-2 wurde deswegen in diesem Experiment verwendet, weil beschrieben wurde, dass NK-Zellen zur Proliferation hohe Konzentrationen von IL-2 benötigen [Talmadge et al. 1986]. Am Tag 1, 2, 3, 4 der Kultur wurde der [³H] Thymidin-Einbaus Assay durchgeführt. Abbildung 10 zeigt, dass die NK-aktiven MV-Zellen für ihre Proliferation immer noch auf CSF-1 angewiesen sind. IL-2 hatte im getesteten Zeitraum (von Tag 1 bis 4) weder stimulierende noch hemmende Wirkung auf die Zellproliferation.

Faktor-Abhängigkeit der Proliferation von NK-ähnlichen MV-Zellen

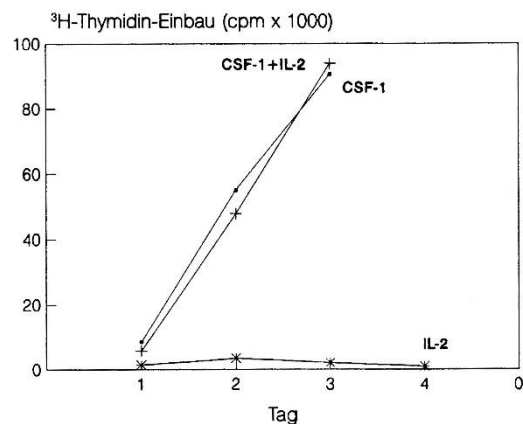


Abb.10. 5×10^3 Zellen in 200 μ l Vollmedium pro Loch wurde in 96-well Mikrotiterplatten eingesät und inkubiert mit: 1) IL-2 (1000 U/ml); 2) CSF-1 (1000 U/ml); und 3) IL-2+CSF-1 (je 1000 U/ml). Der [³H] Thymidin-Einbau wurde an verschiedenen Tagen getestet.

3.2.2 细胞增殖的因子依赖性

由于有 NK 活性的巨噬细胞前体显示出与 NK 细胞的相似性 (LGL 形态与 NK-1.1⁺)，本工作做了一个细胞增殖试验，为的是确认：哪种细胞系特异的生长因子 (CSF-1 还是 IL-2) 为这些细胞的进一步增殖所需。在这一试验中，来自 3 天骨髓细胞前培养 (使用 CSF+IL-2) 的巨噬细胞前体被接种在 96 孔细胞培养板中，然后与 1000 U/mL IL-2 或者 1000 U/mL CSF-1，再或者与 CSF-1+IL-2 (各 1000 U/mL) 进行培养。1000 U/mL IL-2 被用于这个试验的原因是：根据报道，NK 细胞的增殖需要高浓度的 IL-2 【Talmadge 等，1986 年】。在培养的第 1、2、3、4 天进行 ³H-胸腺嘧啶核苷渗入检测。图 10 显示：有 NK 活性的巨噬细胞前体为其增殖仍然始终依赖于 CSF-1。在所试验的时间段中 (从第 1 天至第 4 天)，IL-2 对于细胞的增殖既无刺激的也无抑制的作用。

近似 NK 的巨噬细胞前体增殖的因子依赖性

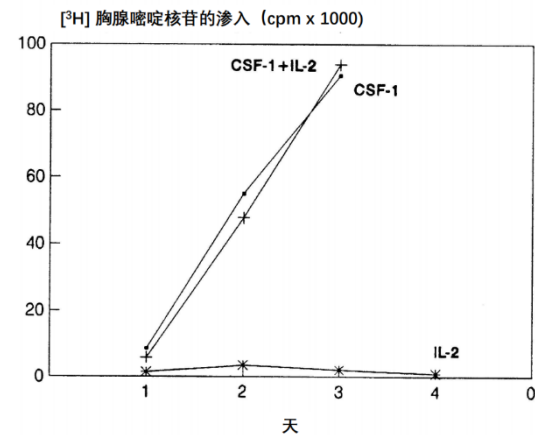


图 10 以每孔 5×10^3 个细胞悬于 200 微升全培养液中接种入 96 孔培养板，与之培养的有：1) IL-2 (1000 U/mL)；2) CSF-1 (1000 U/mL)；3) IL-2+CSF-1 (各 1000 U/mL)。 ³H-胸腺嘧啶核苷的渗入在不同的天数测定。

3.2.3. Faktor-Abhängigkeit der Zytotoxizität

Um zu studieren, unter welcher Kulturbedingung die NK-aktiven MV-Zellen ihre Zytotoxizität beibehalten und wie sie sich möglicherweise verändern, wurden folgende Untersuchungen durchgeführt.

In der ersten Untersuchung wurden die NK-aktiven MV-Zellen in Mikrotiterplatten (1×10^5 Zellen/Loch) eingesät und in Gegenwart von entweder 100 U/ml IL-2 oder 100 U/ml CSF-1, oder IL-2+CSF-1 (je 100 U/ml) kultiviert. Diese Mikroulturen wurden alle zwei Tage mit frischem Vollmedium und den entsprechenden Faktoren gefüttert. Die Zytotoxizität der Zellen gegen Yac-1 wurde am Tag 2, 4, und 6 der Kultur getestet. Abbildung 11 demonstriert, dass die NK-aktiven MV-Zellen in der Kultur mit CSF-1 allein ihre Zytotoxizität schnell verloren. In der Kultur mit IL-2 allein ist NK-Aktivität gut geblieben. Die Kombination von CSF-1+IL-2 rief eine erhöhte Zytotoxizität hervor. Da CSF-1 keine stimulierende Wirkung auf die NK-Aktivität hatte, ist die Steigerung der Zytotoxizität in der Kultur mit CSF-1+IL-2 vermutlich durch die Zunahme der Effektorzellzahl verursacht.

Kinetik der NK-Aktivität in Gegenwart von CSF-1 + IL-2

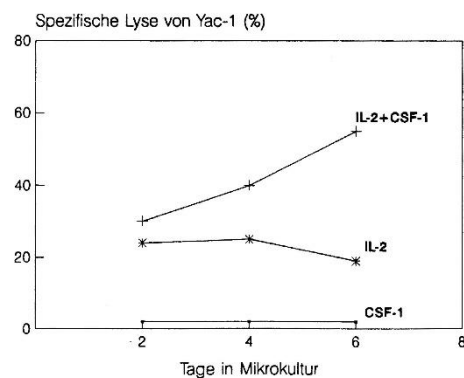


Abb.11. In 96-well Mikrotiterplatten wurden NK-aktive MV-Zellen jeweils mit 100 U/ml IL-2, 100 U/ml CSF-1, und IL-2+CSF-1 (je 100 U/ml) kultiviert. Die NK-Aktivität gegen Yac-1 wurde an verschiedenen Tagen untersucht.

3.2.3 细胞杀伤活性的因子依赖性

为了研究在哪种培养条件下, 有 NK 活性的巨噬细胞前体保持它们的杀伤活性, 并且它们可能怎样发生改变, 下述检测得以开展。

在首个检测中, 有 NK 活性的巨噬细胞前体被接种到 96 孔细胞培养板 (1×10^5 个细胞/孔) 中, 在存在或者是 100 U/mL IL-2, 或者是 100 U/mL CSF-1, 再或者是 IL-2+CSF-1 (各 100 U/mL) 的情况下进行培养。对这些微培养每隔 2 天饲喂新鲜的全培养液与相关的因子。细胞对 Yac-1 的杀伤活性试验 (2.12.2) 在培养开始后的第 2、4、6 天进行。图 11 表明: 有 NK 活性的巨噬细胞前体在只有 CSF-1 的培养中快速失去了杀伤活性。在只有 IL-2 的培养中, NK 活性保存尚可。CSF-1+IL-2 的组合引发了上升的杀伤活性。因 CSF-1 不具有对 NK 活性的刺激作用, 在 CSF+IL-2 的培养中, 杀伤活性的升高被推测为由效应细胞数量的增加而引起。

在 CSF-1+IL-2 存在下的 NK 活性动力学

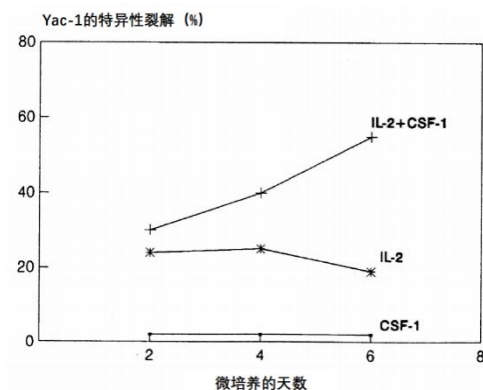


图 11 在 96 孔培养板中, 有 NK 活性的巨噬细胞前体分别与 100 U/mL IL-2、100 U/mL CSF-1、以及 IL-2+CSF-1 (各 100 U/mL) 进行培养。裂解 Yac-1 的 NK 活性在不同的培养天数后进行检测。

Eine hohe NK-Aktivität konnte nach 5-tägiger Hauptkultur mit CSF-1+IL-2 (je 100 U/ml) erreicht werden. Zu dieser Zeit sind die lytischen Einheiten in der Zellpopulation mehrfach erhöht im Vergleich zu der NK-aktiven MV-Ausgangspopulation, die frisch aus der KM-Vorkultur isoliert wurde. Für die zweite Untersuchung auf die Faktor-Abhängigkeit der Zytotoxizität wurden diese stark lytischen Effektorzellen in Mikrokulturen überführt und mit oder ohne IL-2 in CSF-1 oder Vollmedium über Nacht inkubiert. Danach wurde die Zytotoxizität gegen Yac-1 getestet. Wie in Abbildung 12 gezeigt, wurde die Zytotoxizität nur in den Kulturen, zu denen IL-2 gegeben worden war, wiedergefunden. Die hoch NK-aktiven Zellen verlieren bei einer Inkubation über Nacht ohne IL-2 ihre Zytotoxizität. Es ist ausgeschlossen, dass die Effektorzellen bei dem Entzug von IL-2 abgestorben waren, denn bei lichtmikroskopischer Untersuchung wurde kein Zelltot beobachtet. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Zellen nur in Gegenwart von IL-2 ihre NK-Aktivität aufrechterhalten können.

Verlust der Zytotoxizität nach Entzug von IL-2

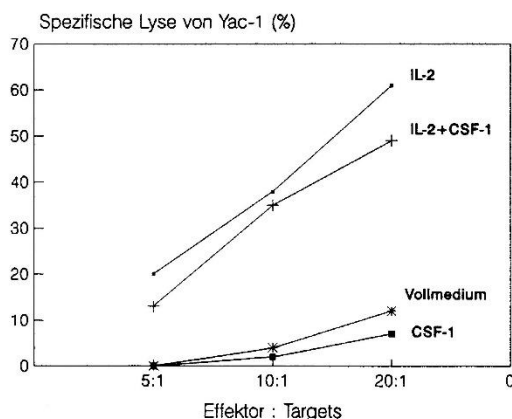


Abb.12. Hoch NK-aktive Zellen aus 5-tägiger Hauptkultur mit CSF-1+IL-2 wurden in 96-well Mikrotiterplatten überführt und über Nacht inkubiert mit: 1) CSF-1 (100 U/ml); 2) Vollmedium; 3) IL-2 (100 U/ml); und 4) IL-2+CSF-1 (je 100 U/ml). Der Zytotoxizitätstest gegen Yac-1 wurde am nächsten Tag durchgeführt.

在使用 CSF-1+IL-2 (各 100 U/mL) 进行 5 天主培养之后, NK 活性达到很高。与有 NK 活性的巨噬细胞前体起始群 (刚从骨髓细胞前培养分离而来) 相比较, 此时细胞群的裂解单位升高了数倍。在第二个对杀伤活性的因子依赖性的检测中, 将这些有强裂解能力的效应细胞转入微培养中, 在有或无 IL-2 的情况下与 CSF-1 或者全培养液进行过夜培养, 随后测定其裂解 Yac-1 的杀伤活性。如图 12 中所示: 杀伤活性只在给与了 IL-2 的培养中再次被发现。那些高 NK 活性的细胞在无 IL-2 的过夜培养中丧失了它们的杀伤活性。可以排除的可能性是效应细胞在移除 IL-2 后发生了死亡, 因为光学显微镜检查并未观察到细胞的死亡。这一结果显示出: 这些细胞只有在有 IL-2 存在的情况下才能保持住它们的 NK 活性。

移除 IL-2 之后, 杀伤活性的丧失

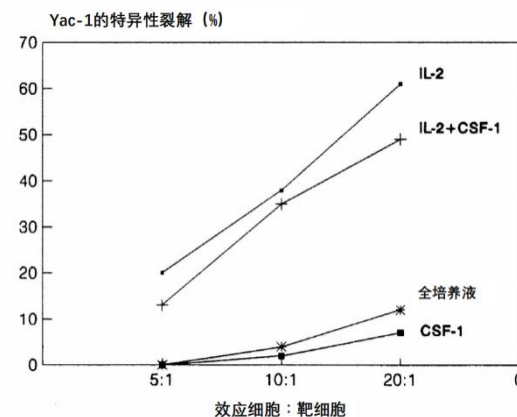


图 12 高 NK 活性的细胞 (来自 5 天在 CSF-1+IL-2 中的主培养) 被转入 96 孔培养板中, 与之过夜培养的有: 1) CSF-1 (100 U/mL); 2) 全培养液; 3) IL-2 (100 U/mL); 4) IL-2+CSF-1 (各 100 U/mL)。次日进行对 Yac-1 的杀伤活性试验。

3.2.4. Zielzell-Selektivität der Effektorzellen

Um zu untersuchen, ob die NK-ähnlichen MV-Zellen nur selektiv auf NK-empfindlichen Zielzellen (vertreten von Yac-1) ihre lytische Aktivität ausüben, wurden sie als Effektoren in einem Zytotoxizitätstest gegen P815 Mastocytoma (NK-resistente Tumorzelle) eingesetzt. Die Inkubationszeit der Effektorzellen mit den Tumorzellen wurde von 4 Stdn. auf 16 Stdn. verlängert, da dies die optimale Lyse-Zeit für P815 Zellen ist. Yac-1 Zellen dienten dabei als positive Kontrolle. Wie in der Abbildung 13 gezeigt, waren die Effektorzellen, zwar hoch lytisch gegen Yac-1 Zielzellen, aber nicht in der Lage, P815 Tumorzellen abzutöten.

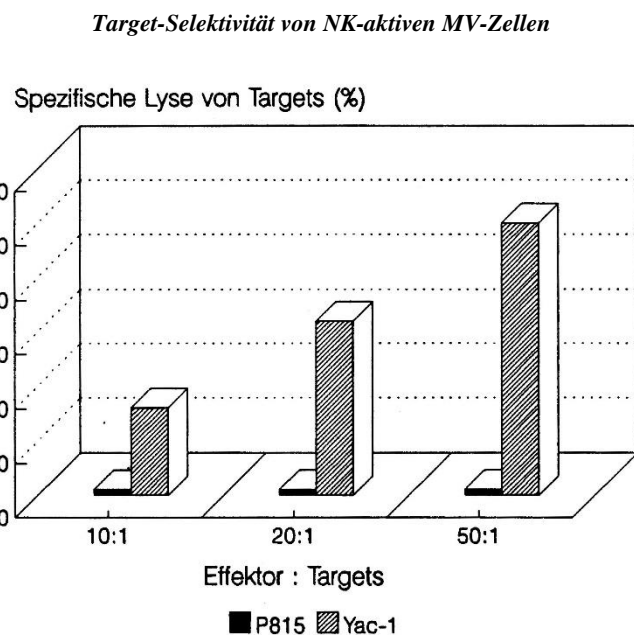


Abb.13. Die Effektorzellen wurden für den Test in 96-well Mikrotiterplatten jeweils mit ^{51}Cr -markierten P815 und Yac-1 Tumorzellen bei 37°C , $5\% \text{CO}_2$ für 16 h inkubiert.

3.2.4 效应细胞对靶细胞的选择性

为了研究是否近似 NK 的巨噬细胞前体只选择性地对 NK 敏感的靶细胞 (以 Yac-1 为代表) 施展它们的裂解活性, 将它们作为效应细胞用于一个对 P815 肥大细胞瘤 (对 NK 不敏感的肿瘤细胞株) 的杀伤活性试验。效应细胞与肿瘤细胞的培养时间从 4 小时延长至 16 小时, 因为这是对 P815 细胞最佳的裂解时长。在此试验中, Yac-1 细胞用作正对照。如图 13 所示: 这些效应细胞虽然对 Yac-1 有很高的裂解性, 但却没有能力杀死 P815 肿瘤细胞。

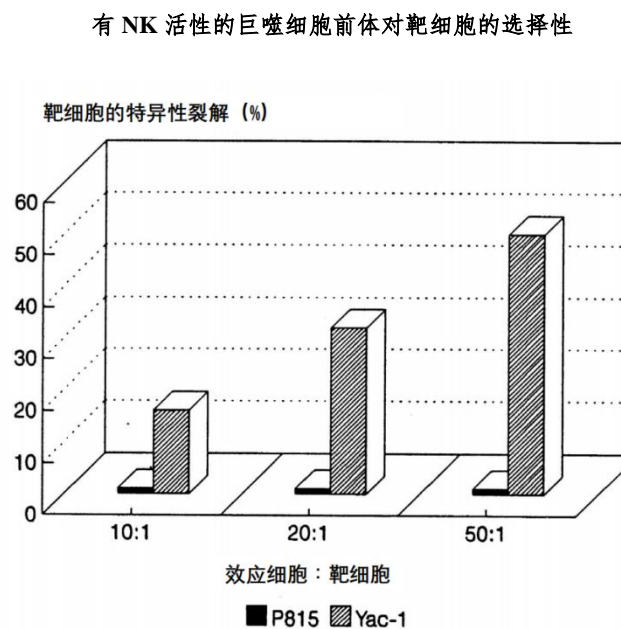


图 13 用于试验的效应细胞在 96 孔细胞培养板中分别与 ^{51}Cr 标记的 P815 和 Yac-1 肿瘤细胞在 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 中培养 16 小时。

3.2.5. Morphologische Entwicklung der Zellen beim Entzug von IL-2

In dem Kapitel über die Faktor-Abhängigkeit der Zytotoxizität (3.2.3) wurde gezeigt, dass in den Kulturen mit verschiedenen Lymphokinzusätzen aus derselben MV-Ausgangspopulation funktionell sich unterschiedlich verhaltende Zellen entwickelten (siehe Abb. 11 und 12). Um zu sehen, ob sich die Zellen aus Kulturen mit CSF-1 allein oder mit CSF-1+IL-2 morphologisch unterscheiden, wurden die MV-Zellen aus 3-tägiger CSF+IL-2 KM-Vorkultur in "Chamber-Slides" (siehe 2.11.2) eingesät und entweder mit CSF-1+IL-2 oder mit CSF-1 allein weiter kultiviert. Die Kulturen wurden zwei Tage später gefüttert und am Tag 4 beendet. Nach einer kurzen Zentrifugation bei 1000 Upm, wurde der Überstand im "Chamber" sorgfältig entfernt und die Slides an der Luft getrocknet. Schließlich wurden sie nach Pappenheim (2.11.6) gefärbt und lichtmikroskopisch untersucht. Abbildungen 14 und 16 zeigen, dass die Zellen aus beiden Kulturen ganz unterschiedlich aussahen. In der Kultur nur mit CSF-1, differenzierten sich die NK-ähnlichen MV-Zellen zu Zellen aus, welche typische Morphologie (Abb. 14) und Phänotyp (Abb. 15) von Makrophagen aufwiesen. Dagegen haben sich die gleiche Vorläuferzellen in der Kultur mit CSF-1+IL-2 zu Zellen mit zahlreichen zytoplasmatischen Granula entwickelt (Abb. 16).

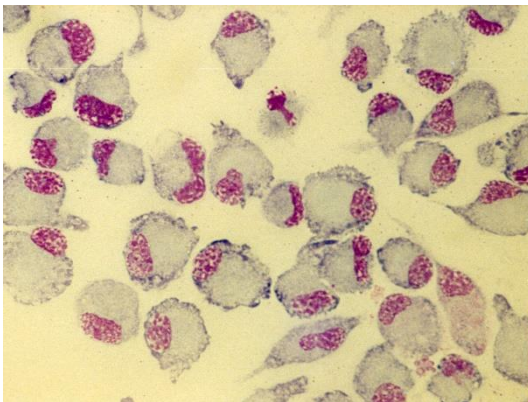


Abb.14. Die von NK-ähnlichen Makrophagen-Vorläufern nach 3-tägiger Kultur mit CSF-1 ausgereiften Makrophagen.

3.2.5 在移除 IL-2 后, 细胞的形态发育

在有关细胞杀伤活性的因子依赖性章节中 (3.2.3) 显示: 在使用不同的淋巴因子添加物的培养中, 同一巨噬细胞前体起始群在功能上发育成为了行为不同的细胞 (见图 11 与 12)。为了看到是否这些细胞在单独与 CSF-1 培养或者与 CSF-1+IL-2 培养时在形态上有差异, 来自 3 天 CSF+IL-2 骨髓细胞前体培养的巨噬细胞前体被接种到腔室载玻片 (见 2.11.2) 中, 要么与 CSF-1+IL-2 培养, 或者单独与 CSF-1 培养。2 天后对培养饲养 1 次, 在第 4 天终止培养。经过在 1000 转/分钟的短暂离心之后, 将腔室中的培养液小心地移出, 并让载玻片空气干燥。最后, 将载玻片按照帕彭海姆法 (2.11.6) 染色并在光学显微镜下观察。图 14 与 16 显示: 来自两种培养的细胞看上去完全不同。在只有 CSF-1 的培养中, 近似 NK 的巨噬细胞前体分化形成的细胞显示出典型的巨噬细胞的形态 (图 14) 与表型 (图 15)。与之相反, 同样的前体细胞在与 CSF-1+IL-2 培养中发展成为含有许多细胞质颗粒的细胞 (图 16)。

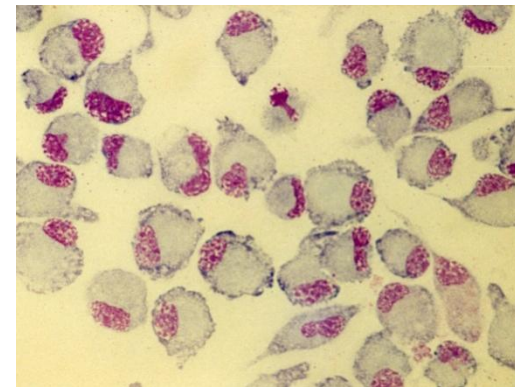


图 14 近似 NK 的巨噬细胞前体在与 CSF-1 培养 3 天后发育为成熟巨噬细胞。

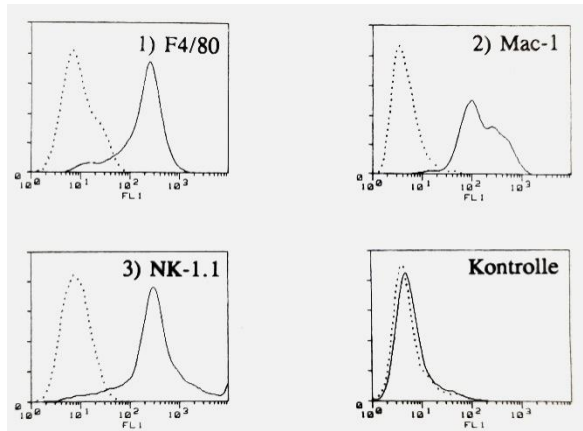


Abb.15. Phänotyp (Oberflächenantigen-Profile) der von NK-ähnlichen Makrophagen-Vorläufern gewonnenen reifen Makrophagen.

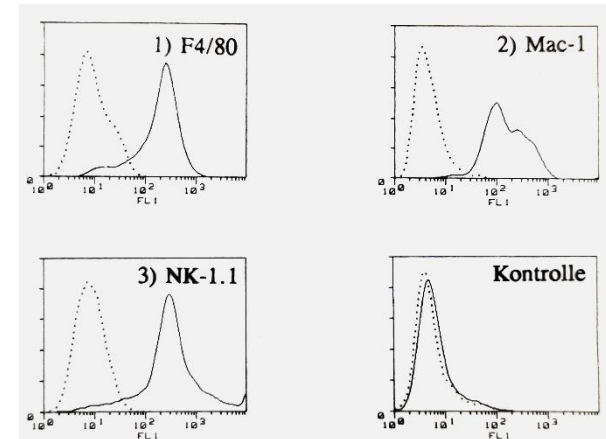


图 15 从近似 NK 的巨噬细胞前体得到的成熟巨噬细胞的表型（表面抗原状态）。

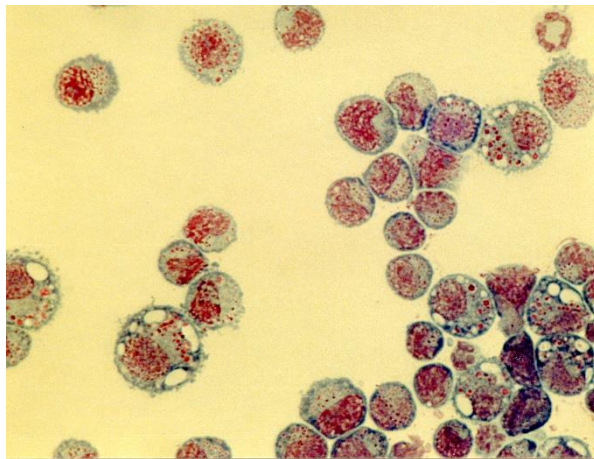


Abb.16. Morphologie der von NK-ähnlichen Makrophagen-Vorläufern nach 3-tägiger Kultur mit CSF-1+IL-2 entwickelten Zellen.

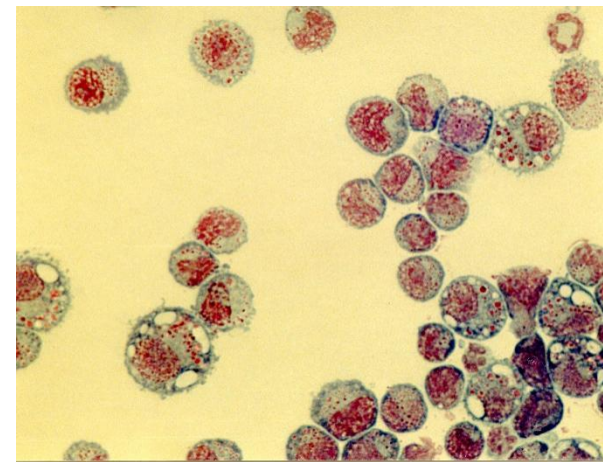


图 16 近似 NK 的巨噬细胞前体在与 CSF-1+IL-2 中培养 3 天后发育而成的细胞形态。

3.3. Induktion von LAK-Aktivität in NK-ähnlichen Makrophagen-Vorläuferzellen

Die im vorigen Kapitel (3.2.1-5) präsentierten Ergebnisse haben dargelegt, dass die von IL-2 induzierten NK-aktiven MV-Zellen funktionell, morphologisch und phänotypisch den NK-Zellen ähnelten. In den folgenden Experimenten wurde untersucht, wie sie sich weiter unter den Bedingungen für die Induktion von LAK-Zellen (siehe 1.3) entwickeln.

3.3.1. Aktivierung zur LAK-Aktivität durch Stimulierung mit hohen Dosen IL-2

NK-ähnliche MV-Zellen aus KM-Vorkultur mit CSF+IL-2 wurden in 9-cm Kulturschalen (Greiner) in CSF-haltigen Medium (100 U/ml CSF-1) bei hoher IL-2-Konzentration (1000 U/ml) kultiviert. Nach 3-tägiger LAK-Kultur (siehe 2.10.7) wurden die Zellen gesammelt, gewaschen und zum Test der LAK-Aktivität in 96-well Mikrotiterplatten mit verschiedenen Zellzahlen von 1×10^5 , 5×10^4 , 2×10^4 , und 1×10^4 pro Loch ausgesät. Sowohl NK-sensitive Yac-1 als auch NK-resistente P815 Tumorzellen wurden als ^{51}Cr -markierte Zielzellen in einer Konzentration von $1 \times 10^5/\text{ml}$ in Vollmedium suspendiert und dann in die Mikrotiterplatten je 100 μl pro Loch hinzu-pipettiert. Dadurch entstand eine Reihe von E:T Verhältnissen von 10:1, 5:1, 2:1 und 1:1. Die Platten wurden kurz bei 600 Upm zentrifugiert und schließlich, auf Grund der optimalen Lyse-Zeit für P815, bei 37°C, 5% CO_2 für 16 Stunden inkubiert. Zum Vergleich wurde die gleiche NK-ähnliche MV-Ausgangspopulation in Medium mit niedriger IL-2-Konzentration (100 U/ml) parallel kultiviert und mitgetestet. Tabelle 5 demonstriert, dass die mit 1000 U/ml IL-2 für 3 Tage inkubierten Zellen aktiviert wurden, NK-sensitive und NK-resistente Tumorzellen zu lysieren. Bei der Kultur mit 100 U/ml IL-2 dagegen wurden nur die NK-sensitiven Zellen lysiert. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass durch die Stimulierung in hohen IL-2-Dosen die NK-ähnlichen MV-Zellen sich zu Effektorzellen mit LAK-Aktivität entwickelten.

3.3 在近似 NK 的巨噬细胞前体中诱导 LAK 活性

前面章节 (3.2.1-5) 呈现的结果显示: 由 IL-2 诱导的有 NK 活性的巨噬细胞前体在功能、形态和表型方面与 NK 细胞很相似。以下的实验将研究: 在诱导 LAK 细胞 (见 1.3) 的条件下, 这些细胞是如何进一步发育的。

3.3.1 通过高剂量 IL-2 的刺激来活化产生 LAK 活性

将来自 CSF+IL-2 骨髓细胞前培养的近似 NK 的巨噬细胞前体在 9 厘米培养皿 (Greiner) 中培养在 (15 毫升) 含有 CSF 的培养液 (100 U/ml CSF-1) 里, 添加高浓度的 IL-2 (1000 U/mL)。经过 3 天的 LAK 培养 (见 2.10.7) 之后, 细胞被收集、洗涤并为试验 LAK 活性而以不同的细胞数量 (1×10^5 、 5×10^4 、 2×10^4 和 1×10^4 个细胞/孔) 接种入 96 孔培养板。不仅 NK 敏感的 Yac-1, 还有 NK 不敏感的 P815 肿瘤细胞, 都作为 ^{51}Cr 标记的靶细胞以浓度为 1×10^5 个细胞/毫升悬浮于全培养液中, 然后以每孔 100 微升加入培养板里。由此形成一系列效应细胞对靶细胞 (E:T) 的比例是 10:1; 5:1; 2:1 与 1:1。将培养板在 600 转/分钟短暂离心, 接着 (基于对 P815 的最佳裂解时长) 在 37°C、5% CO_2 中培养 16 小时。作为对照, 将同一近似 NK 的巨噬细胞前体起始群在培养液中与低浓度的 IL-2 (100 U/mL) 进行平行培养并一同试验。表 5 展示出: 与 1000 U/mL IL-2 培养了 3 天的细胞已被活化, 能够裂解 NK 敏感的和 NK 不敏感的肿瘤细胞。相反, 用 100 U/mL IL-2 培养的效应细胞只裂解了 NK 敏感的靶细胞。此结果表明: 通过高剂量 IL-2 的刺激, 近似 NK 的巨噬细胞前体已经发展成为具有 LAK 活性的效应细胞。

Tab.5. Wirkung von IL-2-Dosen auf NK-ähnliche MV-Zellen

Kulturbedingung	Zytotoxizität (LU/10 ⁷ Zellen)	
	Yac-1	P815
100 U/ml CSF-1+100 U/ml IL-2	325	0
100 U/ml CSF-1+1000 U/ml IL-2	824	455

NK-ähnliche MV-Zellen wurden unter den dargestellten Kulturbedingungen für 3 Tage kultiviert und dann durch einen 16-stündigen Zytotoxizitätstest auf die lytische Aktivität gegen Yac-1 und P815 getestet. Die lytischen Einheiten wurden berechnet wie unter 2.12.2 beschrieben.

3.3.2. Kinetik der LAK-Induktion

NK-ähnliche MV-Zellen wurden in 96-well Mikrotiterplatten (2×10⁵ Zellen in 200 µl Medium pro Loch) mit 1000 U/ml IL-2 kultiviert. Diese Mikrokulturen wurden alle zwei Tage mit frischem Medium und IL-2 gefüttert und ihre LAK-Aktivität wurde am Tag 0, 3, 6, 9 und 12 der LAK-Kultur untersucht, um die Kinetik der LAK-Induktion in den Zellen zu verfolgen. Abbildung 17 zeigt, dass die LAK-Aktivität in der Kultur in den ersten 3-6 Tagen zunimmt und danach abfällt, trotz ständiger Ergänzung mit frischem Medium und dem stimulierenden Faktor IL-2. Dieses Ergebnis stimmt mit dem von Grimm et al. beschriebenen Befunden überein, dass die *in vitro* von IL-2 induzierte LAK-Aktivität erst nach 3-tägiger Kultur nachweisbar ist und nur ungefähr eine Woche lang in der Kultur zu finden ist [Grimm et al., 1982].

表 5 IL-2 的剂量对近似 NK 的巨噬细胞前体的作用

培养条件	杀伤活性 (裂解单位/10 ⁷ 细胞)	
	Yac-1	P815
100 U/ml CSF-1+100 U/ml IL-2	325	0
100 U/ml CSF-1+1000 U/ml IL-2	824	455

近似 NK 的巨噬细胞前体在表中所示的培养条件下培养了 3 天, 然后通过一个 16 小时的杀伤活性试验来对其裂解 Yac-1 与 P815 的活性进行检测。裂解单位 (LU) 依照在 2.12.2 中的表述进行计算。

3.3.2 诱导 LAK 的动力学

近似 NK 的巨噬细胞前体在 96 孔细胞培养板中 (每孔 2×10⁵ 个细胞, 200 微升培养液) 与 1000 U/mL IL-2 进行培养。对这些微培养每两天饲喂新鲜的培养液与 IL-2, 并在培养的第 0、3、6、9、12 天检测 LAK 活性, 以跟踪在细胞中诱导 LAK 活性的动力学。图 17 显示: 培养物中的 LAK 活性在开始的 3-6 天增加, 然后下降, 尽管新鲜的培养液与刺激因子 IL-2 持续地补充着。这一实验结果与来自 Grimm 等描述的发现完全一致: 在体外培养中, IL-2 诱导的 LAK 活性最初在 3 天的培养后能够被检出, 并只有约一周的时长可在培养中发现【Grimm 等, 1982 年】。

Kinetik der LAK-Induktion in IL-2 stimulierten MV-Zellen

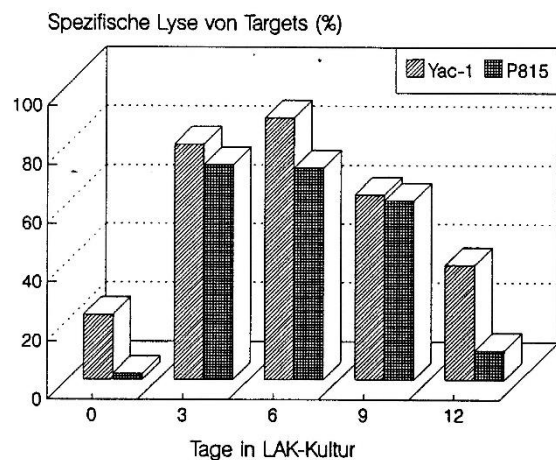


Abb.17. 2×10^5 NK-ähnliche MV-Zellen pro Loch wurden in 96-well Mikrotiterplatten mit 1000 U/ml IL-2 (LAK-Kultur) inkubiert. An verschiedenen Tagen wurden ^{51}Cr -markierte Zielzellen (1×10^4 /Loch) hinzugegeben und die LAK-Aktivität der Kulturen durch einen 16-stündigen Zytotoxizitätstest untersucht.

3.3.3. Morphologie der aus NK-ähnlichen Makrophagen-Vorläufern entwickelten LAK-Zellen

Zu den Zeitpunkten für den LAK-Aktivität-Test (Tag 3, 6, 9 und 12) wurden Zellproben aus der LAK-Kultur abgenommen, mit Hilfe der "Cytospin" Zentrifuge auf Objektträger gebracht, luftgetrocknet und nach Pappenheim gefärbt. Die mikroskopische Untersuchung zeigte eine auffällige morphologische Veränderung der Zellen: in diesen Zellen war eine starke Vermehrung der zytoplasmatischen Granula zu beobachten (Abb. 18). Je länger die LAK-Kultur dauerte, desto dichter und größer wurden die Granula. Schließlich (ungefähr an Tag 8-10 der Kultur) begannen die LAK-Effektoren, die reichlich Granula enthielten, zu fragmentieren (Abb. 19). Die Abnahme der LAK-

在 IL-2 刺激的巨噬细胞前体中诱导 LAK 活性的动力学

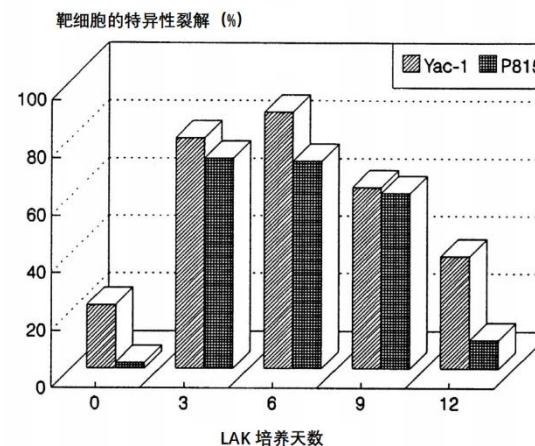


图 17 每孔 2×10^5 个近似 NK 的巨噬细胞前体在 96 孔细胞培养板中与 1000 U/mL IL-2 (LAK 培养) 进行培养。在不同的天数, 将 ^{51}Cr 标记的靶细胞 (1×10^4 个细胞/孔) 加入其中, 通过一个 16 小时的杀伤活性试验来检测 LAK 活性。

3.3.3 近似 NK 的巨噬细胞前体发展而成的 LAK 细胞的形态

对应检测 LAK 活性的时间点 (第 3、6、9、12 天), 将细胞样品从 LAK 培养中取出, 借助于细胞涂片离心机涂于载玻片上, 空气干燥后, 按照帕彭海姆染色法 (May-Grunwald Giemsa 染色法, 见 2.11.6) 进行染色。显微镜观察显示出了明显的细胞形态的变化: 在这些细胞中, 可观察到细胞质颗粒的强烈扩增 (见图 18)。LAK 培养时间持续越长, 颗粒变得越密, 而且更大。最终 (大约在 LAK 培养的第 8~10 天), 含有大量颗粒的 LAK 效应细胞开始碎裂 (图 19)。在 LAK 培养 9 天之后所观察到的 LAK 活性

Aktivität, beobachtet nach 9 Tagen LAK-Kultur (siehe Abb. 17), ist auf das massenhafte Zellsterben in der Kultur zurückzuführen.

的下降（见图17）应当归因于在培养中有大量的细胞死亡。

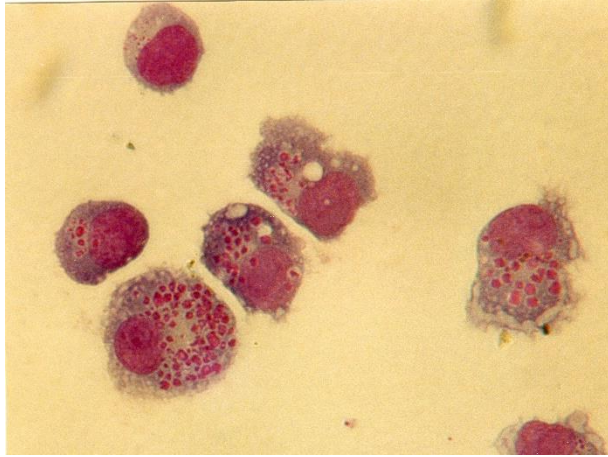


Abb. 18. Morphologie der LAK-Effektorzellen, isoliert am Tag 4 der LAK-Kultur.

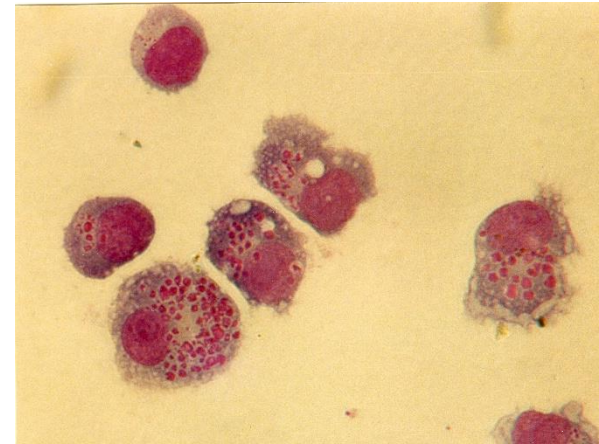


图 18 LAK 效应细胞的形态，细胞来自 LAK 培养第 4 天。

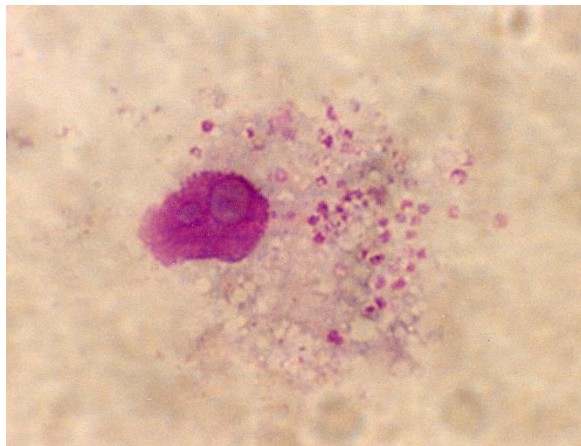


Abb.19. Fragmentierung der LAK-Zellen, beobachtet am Tag 9 der LAK-Kultur.

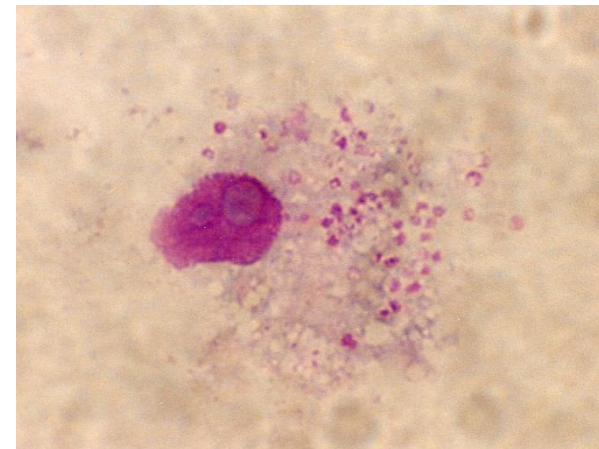


图 19 LAK 细胞的碎裂，在 LAK 培养第 9 天观察到。

3.3.4. Phänotyp der aus NK-ähnlichen Makrophagen-Vorläufer entwickelten LAK-Zellen

Die zu untersuchenden LAK-Zellen wurden am Tag 4 der LAK-Kultur, die mit den gereinigten NK-ähnlichen MV-Zellen angefangen hatte, geerntet. Zu dieser Zeit übten die Zellen hohe LAK-Aktivität aus und sie waren noch in gutem Zustand. Nach dreimaligem Waschen wurden je $1-5 \times 10^5$ Zellen in kleine Polyethylen Röhrchen (0,6 ml Greiner) überführt, und es wurde eine direkte oder indirekte Fluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen Oberflächenmarker durch-geführt. NK-1.1, F4/80, Mac-1, anti-CD3 und anti-CD8 wurden jeweils für die Färbung verwendet, um den Phänotyp der LAK-Effektoren zu untersuchen. Dabei konnte auch die Möglichkeit, dass Lymphozyten in der LAK-Kultur herangewachsen waren, geprüft werden.

In Abbildung 20 wird deutlich, dass die LAK-Effektoren, im Vergleich zu der NK-ähnlichen MV-Ausgangspopulation (siehe Abb. 9), die Mac-1 und F4/80 Marker völlig verloren hatten. Diese Zellen waren positiv für NK-1.1 aber negativ für die T-Zell Marker CD3 und CD8, also ein typischer Phänotyp der beschriebenen, aus NK-Zellen induzierten LAK-Zellen [Hercend & Schmidt, 1988].

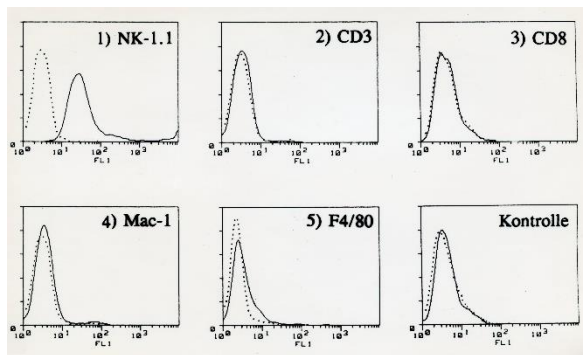


Abb. 20. Phänotyp (Oberflächenantigen-Profile) der LAK-Effektorzellen, isoliert am Tag 4 der LAK-Kultur.

3.3.4 近似 NK 的巨噬细胞前体发展而成的 LAK 细胞的表型

用于检测的 LAK 细胞收获自 LAK 培养的第 4 天（培养使用纯化的近似 NK 的巨噬细胞前体起始）。在此时，这些细胞表现出很高的 LAK 活性，并且它们还处于良好的状态。经过三次洗涤之后，以每份 $1-5 \times 10^5$ 个细胞转入聚乙烯小管（0.6 mL Greiner）中，使用抗细胞表面标志物的抗体进行直接或者间接的荧光染色。NK-1.1、F4/80、Mac-1、抗 CD3 与抗 CD8 分别用于此项染色中，以检测 LAK 细胞的表型。这样做也能对淋巴细胞在 LAK 培养中生长起来的可能性进行监测。

图 20 清晰地显示：与近似 NK 的巨噬细胞前体起始群（见图 9）相比较，LAK 效应细胞完全失去了 Mac-1 和 F4/80 标志物。这些细胞是 NK-1.1 阳性，但对 T 细胞的标志物 CD3 和 CD8 为阴性，而这是一种被报道过的、从 NK 细胞诱导出的 LAK 细胞的典型表型【Hercend 与 Schmidt, 1988 年】。

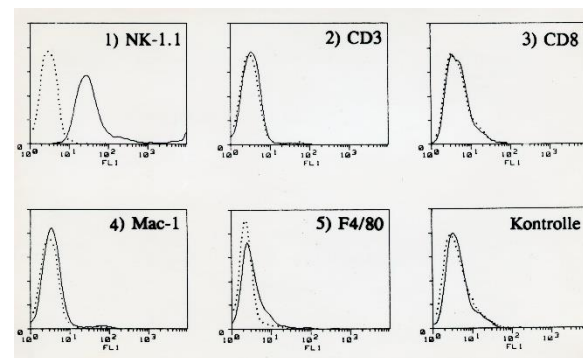


图 20 LAK 效应细胞的表型（表面抗原状态）。细胞来自 LAK 培养的第 4 天。

3.4. Perforin Produktion von Makrophagen-Vorläuferzellen

In den vorhergehenden Versuchen konnte gezeigt werden, dass das Auftreten von zytoplasmatischen Granula eng mit der zytotoxischen Funktion der Zellen zusammenhing. Nun sollte geprüft werden, ob diese Granula das lytische Protein Perforin enthalten. Zu diesem Zweck wurden folgende Untersuchungen durchgeführt.

3.4.1. Kalzium-Abhängigkeit der Zytotoxizität

Ein Hauptmerkmal der Perforin-vermittelten Zytotoxizität ist ihre Kalzium-Abhängigkeit: in Abwesenheit von Kalzium tritt die Zytotoxizität nicht mehr auf. Es ist beschrieben worden, dass Perforin strukturell und funktionell der Komplement Komponente C9 ähnelt [Tschopp & Nabholz 1990]. In Anwesenheit von Kalzium bewirken die Perforine Löcher in der Zellmembran von Zielzellen und die Zielzellen lysieren. Deshalb gilt eine Kalzium-Abhängigkeit der Zytotoxizität als Hinweis auf die Wirkung von Perforin.

Wie in Material und Methoden (2.12.3) beschrieben wurden drei Testmedien hergestellt: depletiertes Medium ohne freie Ca^{2+} Ionen durch Zugabe von 10mM EDTA, rekonstituiertes Medium durch Zugabe von CaCl_2 (15mM Endkonzentration) zum depletierten Medium, und Vollmedium. In diesen drei Medien wurde mit Effektorzellen aus 4-tägiger Hauptkultur mit CSF-1+IL-2 (je 500 U/ml) jeweils der Zytotoxizitätstest mit Yac-1 Zellen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 21 dargestellt. Es ist deutlich, dass die Anwesenheit von Kalzium essentiell für die Lyse der Zielzellen ist.

3.4 巨噬细胞前体产生穿孔素

前述的实验能够显示：细胞质颗粒的出现与细胞的杀伤活性功能密切相关。现在应当验证：是否这些颗粒物含有裂解性蛋白穿孔素 (Perforin)。为了这个目的，以下实验得以开展。

3.4.1 细胞杀伤活性的钙依赖性

穿孔素介导的杀伤活性的一个主要标志是它的钙依赖性：在没有钙存在的环境中，杀伤活性不再出现。有文献报道，穿孔素在结构和功能上都与补体组分 C9 相似【Tschopp 与 Nabholz, 1990 年】。在有钙存在的情况下，穿孔素在靶细胞的细胞膜上造成孔洞并裂解靶细胞。因此，细胞杀伤活性的钙依赖性被看作是在提示穿孔素的作用。

如同在材料与方法 (2.12.3) 中所述，三种试验培养液的制备如下：通过加入 10 mmol/L EDTA 而不再有游离钙离子 (Ca^{2+}) 的“贫竭型”培养液；通过向“贫竭型”培养液中加入氯化钙 (CaCl_2 , 终浓度为 15 mmol/L) 的“重建型”培养液；以及全培养液。在这三种培养液中，使用来自 4 天在 CSF+IL-2 (各 500U/mL) 主培养的效应细胞，分别进行对 Yac-1 细胞的杀伤活性检测。结果展示在图 21 中。很明显，钙的存在对靶细胞的裂解是必需的。

Kalzium-Abhängigkeit der Zytotoxizität von NK/LAK-ähnlichen MV-Zellen

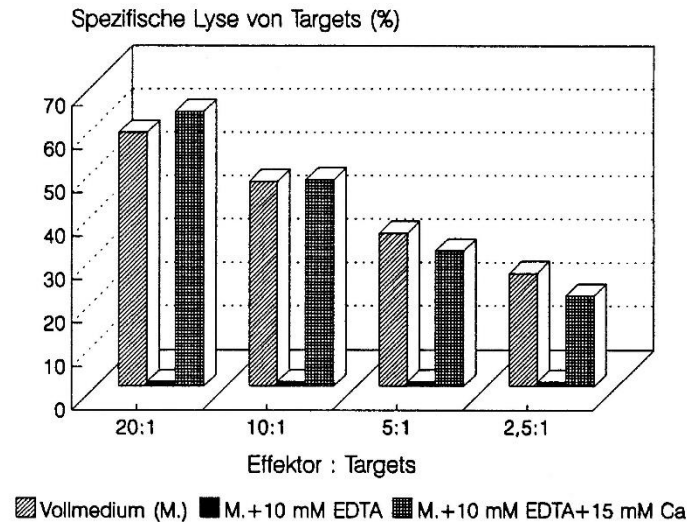


Abb.21. Die Effektorzellen wurden aus einer 4-tägigen Hauptkultur mit CSF-1+IL-2 (je 500 U/ml) geerntet, gewaschen, und dann in verschiedenen Testmedien mit Yac-1 als Targets zur Untersuchung der Zytotoxizität für 4 Stunden inkubiert.

3.4.2. Nachweis der Perforin mRNA durch Northern-Blot

Mittels Northern-Blot Analyse wurde untersucht, ob die aus MV-Zellen isolierten RNA-Präparate Messenger-RNA enthielten. Dazu wurde, wie unter 2.14.1 beschrieben, die gesamte RNA aus verschiedenen MV-Zellproben extrahiert, im Gel aufgetrennt, auf eine N⁺-Nylonmembran übertragen und mit ³²P-markierten cDNA-Sonden hybridisiert. Drei cDNA-Sonden, spezifisch komplementär zu a) mRNA für murines Perforin [Lowrey et al. 1989]; b) mRNA für CSF-1 Rezeptor [Rothwell & Rohrschneider 1987]; und c) mRNA für Aktin [Cleveland et al, 1980], wurden Hintereinander mit der gleichen

近似 NK/LAK 的巨噬细胞前体杀伤活性的钙依赖性

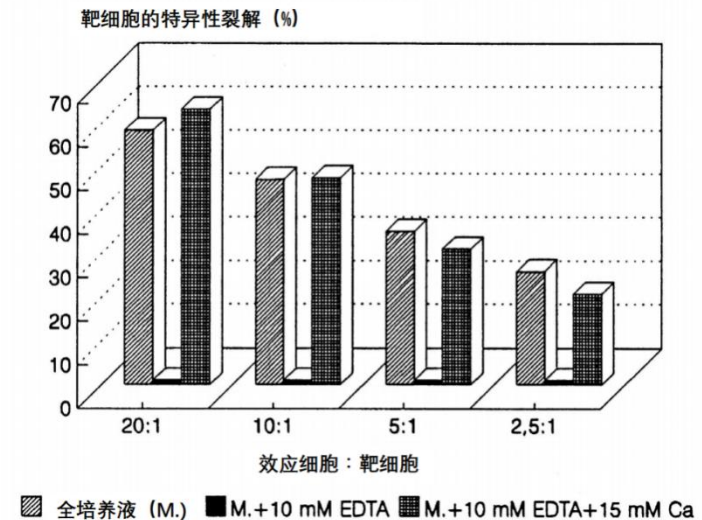


图 21 效应细胞从一个使用 CSF+IL-2 (各 500 U/mL) 进行了 4 天的主培养中获得、洗涤, 然后在不同的试验培养液中与 Yac-1 靶细胞培养 4 小时, 检测其杀伤活性。

3.4.2 通过 Northern 印迹杂交法检定穿孔素 mRNA

借助于 Northern 印迹杂交分析法将研究: 是否从巨噬细胞前体分离出的 RNA 提取物含有信使 RNA (mRNA)。为此, 如 2.14.1 所述, 从不同的巨噬细胞前体样品中提取全 RNA, 在凝胶中电泳分离, 转移到一张 N⁺-尼龙膜上并与 ³²P 标记的 cDNA 探针进行杂交。三种 cDNA 探针, 特异性互补 a) 小鼠穿孔素 mRNA [Lowrey 等, 1989 年]; b) CSF-1 受体 mRNA [Rothwell 与 Rohrschneider, 1987 年]; c) 肌动蛋白 mRNA [Cleveland

Membran hybridisiert. Die untersuchten MV-Zellproben waren folgende:

1. NK-inaktive MV-Zellen isoliert aus KM-Vorkultur mit GM-CSF (2.10.3);
2. NK-ähnliche MV-Zellen isoliert aus KM-Vorkultur mit GM-CSF+IL-2;
3. NK-ähnliche MV-Zellen in Hauptkultur mit CSF-1+IL-2 für 3 Tage;
4. NK-ähnliche MV-Zellen in Hauptkultur mit IL-2 für 3 Tage;
5. NK-ähnliche MV-Zellen in Hauptkultur mit CSF-1 für 3 Tage;
6. NK-inaktive MV-Zellen in Hauptkultur mit IL-2 für 3 Tage.

In Abbildung 22 wird gezeigt, dass die mRNA für Perforin eindeutig in den NK-ähnlichen MV-Zellen beziehungsweise in diesen Zellen nach weiterer Kultur mit CSF-1+IL-2 oder IL-2 allein zu finden war. Dieser Befund weist auf eine Beziehung zwischen der Exprimierung von Perforin mRNA und der zytotoxischen Funktion der Zellen hin, weil nur die im Zytotoxizitätstest (siehe Tab.6) als lytisch bestätigten Zellen positiv für die Perforin mRNA waren. Alle Zellproben zeigten sich positiv für c-fms, ein wichtiger Hinweis für die Zugehörigkeit der Zellen zur Makrophagen-reihe [Baccarini & Stanley 1990]. Die Aktin-Banden dienten als Kontrollen und deuten darauf hin, dass von jeder Zellprobe gleiche Menge an RNA eingesetzt wurde.

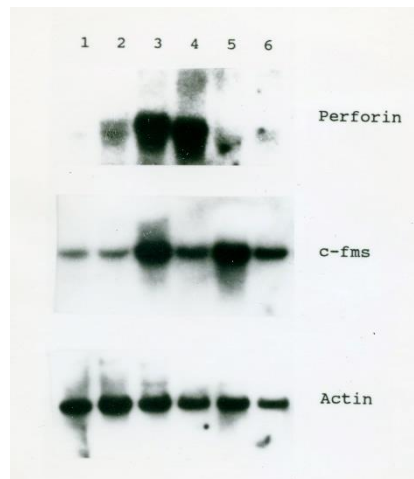


Abb.22. Northern-Blot Analyse für die Exprimierung der Perforin-Messenger-RNA durch MV-Zellen. Die Nummern 1-6 der RNA-Proben entsprechen den oben dargestellten Zell-proben 1-6. Der Film wurde für ca. 48 Std. exponiert.

等, 1980 年】，一个接一个在同一张膜上杂交。被检测的巨噬前体如下：

1. 无 NK 活性的巨噬前体，来自 GM-CSF 骨髓细胞前培养 (2.10.3)；
2. 近似 NK 的巨噬前体，来自 GM-CSF+IL-2 骨髓细胞前培养；
3. 近似 NK 的巨噬前体在 CSF-1+IL-2 中进行了 3 天的主培养；
4. 近似 NK 的巨噬前体在 IL-2 中进行了 3 天的主培养；
5. 近似 NK 的巨噬前体在 CSF-1 中进行了 3 天的主培养；
6. 无 NK 活性的巨噬前体在 IL-2 中进行了 3 天的主培养。

图 22 显示：穿孔素 (Perforin) 的 mRNA 清晰地近似 NK 的巨噬细胞前体，更确切地说，在这些细胞进一步与 CSF-1+IL-2 或者与 IL-2 的培养之后被发现。这一发现提示着一种在穿孔素 mRNA 表达与杀伤活性功能之间的关系，因为只有杀伤活性试验 (见表 6) 中其裂解活性被确认的细胞才对穿孔素 mRNA 为阳性。所有细胞样品都显示出对 CSF-1 受体 c-fms (一个对细胞属于巨噬细胞系的重要指征 [Baccarini 与 Stanley, 1990 年]) 为阳性。作为对照的肌动蛋白 (Actin) mRNA 的显示带表明：从每个细胞样品中获取了等量的 RNA 用于杂交。

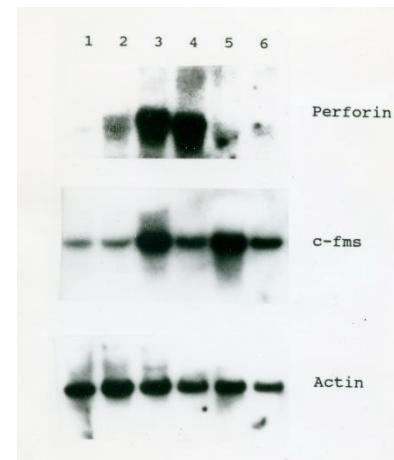


图 22 Northern 印迹杂交分析巨噬细胞前体对穿孔素 (Perforin) 信使 RNA 的表达。编号为 1-6 的 RNA 样品对应着上方列出的细胞样品 1 - 6。胶片进行了约 48 小时的曝光。

Tab.6. Zytotoxizität gegen Yac-1 von verschiedenen MV-Zellproben ^a

Nr. ^b	Zellproben	Zytotoxizität (LU/10 ⁷)
<u>MV-Zellen aus KM-Vorkultur mit:</u>		
1.	GM-CSF 200 U/ml	0
2.	GM-CSF 200 U/ml+IL-2 100 U/ml	35
<u>NK-ähnliche MV-Zellen in Hauptkultur mit:</u>		
3.	CSF-1 500 U/ml+IL-2 500 U/ml	375
4.	IL-2 500 U/ml	380
5.	CSF-1 500 U/ml	0
<u>NK-inaktive MV-Zellen in Hauptkultur mit:</u>		
6.	IL-2 500 U/ml	0

^a Die zu testenden Zellen wurden in den entsprechenden Kulturen für 3 Tage kultiviert. Am Tag 4, als sie für Northern-Blot Analyse zur Untersuchung der Perforin Messenger-RNA geerntet wurden, wurde jeweils ein Teil jeder Zellprobe für den Zytotoxizitätstest eingesetzt. Der Zytotoxizitätstest wurde bei 37°C für 4 Stunden durchgeführt. Die lytischen Einheiten (LU/10⁷) wurden berechnet wie unter 2.12.2 beschrieben.

^b Die Nummern 1-6 der Zellproben entsprechen den in dem Northern-Blot (Abb. 22) dargestellten Lane 1-6.

3.4.3. Nachweis der Perforin mRNA durch *in situ* Hybridisierung

Es wurde nun weiter versucht, mit den auf Objektträger fixierten Zellen eine *in situ* Hybridisierung mit cDNA gegen Perforin mRNA durchzuführen, um Perforin mRNA in

表 6 不同的巨噬细胞前体样品 ^a 对 Yac-1 的杀伤活性

编号 ^b	细胞样品	杀伤活性 (裂解单位 / 10 ⁷)
<u>来自以下骨髓前培养的巨噬前体细胞:</u>		
1.	GM-CSF 200 U/ml	0
2.	GM-CSF 200 U/ml+IL-2 100 U/ml	35
<u>近似 NK 的巨噬前体细胞在以下主培养中:</u>		
3.	CSF-1 500 U/ml+IL-2 500 U/ml	375
4.	IL-2 500 U/ml	380
5.	CSF-1 500 U/ml	0
<u>无 NK 活性的巨噬前体细胞在以下主培养中:</u>		
6.	IL-2 500 U/ml	0

^a 用于试验的细胞在相应的培养条件下培养 3 天。在第 4 天, 当它们被收获用于 Northern 印迹杂交分析来检测穿孔素 mRNA 时, 每份细胞样品中的一部分各用于杀伤活性的试验。杀伤活性试验在 37°C 进行 4 小时。裂解单位 (LU/10⁷) 的计算如 2.12.2 所述。

^b 细胞样品的编号 1-6 与在 Northern 印迹杂交 (图 22) 中所示的 1-6 列的号相对应。

3.4.3 通过原位杂交法检定穿孔素 mRNA

现在进一步实验, 使用固定在载玻片上的细胞与对应穿孔素 mRNA 的 cDNA (互补 DNA) 进行原位杂交, 以直接证实细胞中的穿孔素 mRNA。

den Zellen direkt nachzuweisen. Wie unter 2.14.2. beschrieben, wurden die zu untersuchenden Zellen, isoliert aus 4-tägiger Hauptkultur in CSF-1+IL-2 (je 500 U/ml), auf Objektträger gebracht. Nachdem sie luftgetrocknet worden waren, wurden sie fixiert, permeabilisiert, und schließlich mit DIG-markierter cDNA gegen Perforin mRNA für 16-20 Std. hybridisiert. Ein Zytopräparat mit normalen Makrophagen diente als Kontrolle. Nach der Hybridisierung wurden die Zytopräparate in mehreren Schritten (siehe 2.14.2.4) gewaschen und dann mit dem an alkalische Phosphatase gekoppelten anti-DIG Antikörper inkubiert. Am Ende wurde die Hybridisierung durch Zugabe von NBT + X-Phosphat, deren Farbe sich bei Katalyse durch alkalische Phosphatase von gelb in blau umwandelt, sichtbar gemacht. Die dunkelblau angefärbten Zellen waren positiv für Perforin mRNA. Abbildung 23 ist die lichtmikroskopische Aufnahme der Zellen nach der Hybridisierung mit DIG-markierter anti-Perforin cDNA.

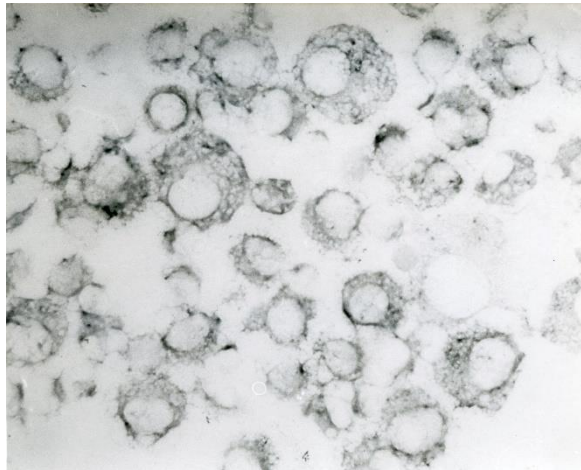


Abb.23. Ergebnis von *in situ* Hybridisierung mit cDNA gegen Perforin mRNA. Die NK/LAK-ähnlichen MV-Zellen wurden aus einer 4-tägigen Hauptkultur mit CSF-1+IL-2 (je 500 U/ml) isoliert und dann mit DIG-markierter Perforin cDNA *in situ* hybridisiert (siehe 2.14.2).

如在 2.14.2 中所述, 将被检测细胞——来自在 CSF-1+IL-2 (各 500 U/mL) 中进行了 4 天的主培养——涂于载玻片上。待细胞涂片空气干燥后, 将其进行固定、通透处理, 并最终与地高辛 (DIG) 标记的对应穿孔素 mRNA 的 cDNA 进行 16~20 小时杂交。用普通巨噬细胞制作的细胞涂片作对照。杂交后, 将细胞涂片在多个步骤中 (见 2.14.2.4) 洗涤, 然后与耦合了碱性磷酸酶的抗 DIG 抗体进行孵育。最后通过加入氮蓝四唑盐 (NBT) + X-磷酸盐溶液 (其颜色经碱性磷酸酶的催化由黄色变为蓝色) 使得杂交可看见。着色深蓝的细胞为穿孔素 mRNA 阳性。图 23 是细胞在与 DIG 标记的穿孔素 cDNA 进行杂交之后, 在光学显微镜下的照片。

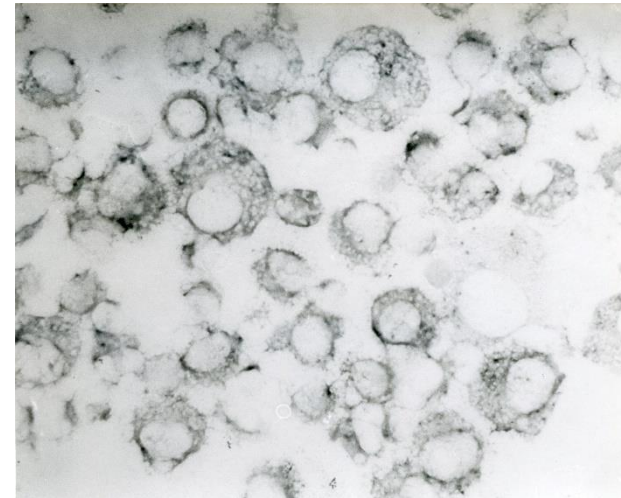


图 23 使用对应穿孔素 mRNA 的互补 DNA 原位杂交的结果。近似 NK/LAK 的巨噬细胞前体来自 4 天使用 CSF+IL-2 (各 500 U/mL) 的主培养, 然后与 DIG 标记的穿孔素 cDNA 进行了原位杂交 (见 2.14.2)。

3.4.4. Nachweis des Perforin Proteins durch immunhistochemische Färbung

Monoklonaler Antikörper spezifisch gegen Maus-Perforin wurde für die immunhistochemische Färbung angewendet, um festzustellen, ob Perforin Proteine in den Zellen vorhanden sind und wo sie lokalisiert sind. Hierzu wurden die Zytopräparate von hoch lytischen Effektorzellen aus 4-tägiger Hauptkultur in CSF-1+IL-2 (je 500 U/ml), wie unter 2.11.5 beschrieben, vorbereitet, fixiert, mit mAk Ratte gegen murines Perforin und anschließend mit polyklonalem Antikörper gegen Ratten IgG aus Ziege, gekoppelt an alkalische Phosphatase, inkubiert. Fast-Red-TR, ein Substrat für alkalischer Phosphatase [Dejong et al. 1985], wurde für die Farbreaktion benutzt. In Abbildung 24 ist zu sehen, dass fast alle zytoplasmatischen Granula angefärbt sind. Im Gegensatz dazu waren die Zellen, die agranulär und NK-inaktiv waren, völlig negativ für diese Färbung.

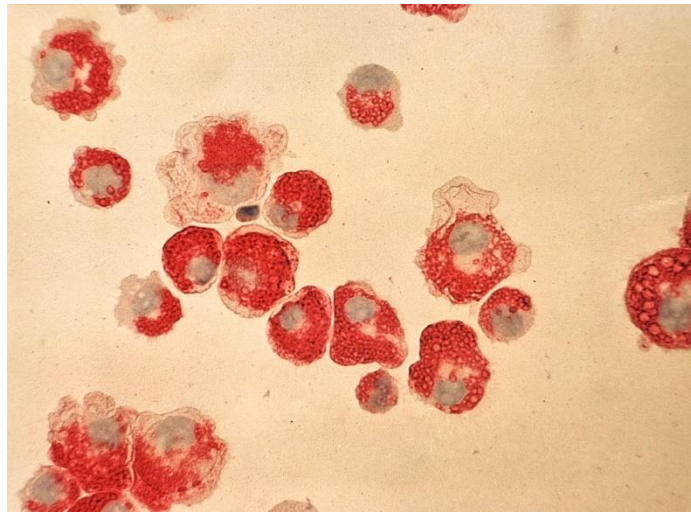


Abb.24. Immunhistochemische Färbung mit mAk gegen murines Perforin. Die NK-ähnlichen MV-Zellen isoliert aus der KM-Vorkultur wurden in Hauptkultur mit CSF-1+IL-2 (je 500 U/ml) für 4 Tage inkubiert und danach mit anti-murines Perforin Antikörper immunhistochemisch (2.11.5) auf Perforin Protein untersucht.

3.4.4 通过免疫组化染色法检定穿孔素蛋白

特异性抗小鼠穿孔素的单克隆抗体被用于此项免疫组化的染色，目的是确认：是否穿孔素蛋白存在于细胞中且它们定位在哪里。为此，来自 4 天在 CSF-1+IL-2 (各 500 U/mL) 主培养的、具有高裂解活性的效应细胞，按照 2.11.5 所述，用于制备细胞涂片、固定，与大鼠抗小鼠穿孔素的单克隆抗体并接着与耦合了碱性磷酸酶的山羊抗大鼠 IgG 多克隆抗体进行孵育。固红-TR (一种碱性磷酸酶的底物【Dejong 等, 1985 年】) 用于此项染色反应中。在图 24 中可见：几乎所有细胞质的颗粒都被着色了。与之相反，无细胞质颗粒且无 NK 活性的细胞对此染色反应全部为阴性。

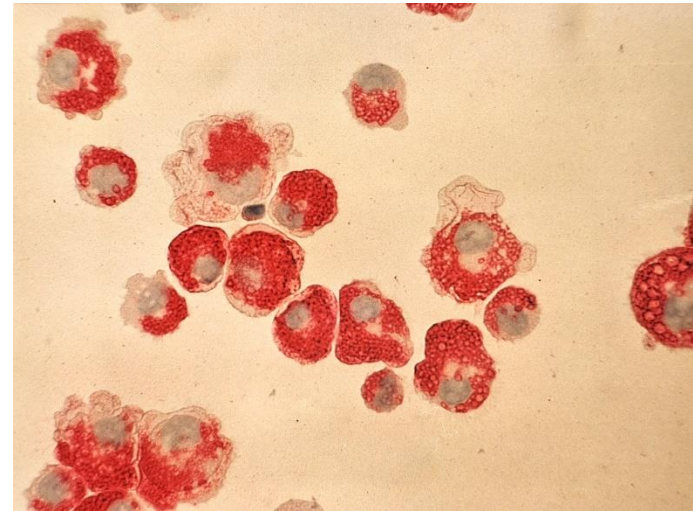


图 24 使用抗小鼠穿孔素的单克隆抗体免疫组化染色的结果。从骨髓细胞前培养分离出的近似 NK 的巨噬细胞前体在 CSF-1+IL-2 (各 500 U/mL) 的主培养中培养了 4 天，然后用抗小鼠穿孔素抗体对穿孔素蛋白进行免疫组化染色 (2.11.5) 检测。

3.5. Zytokin-Freisetzung von NK-aktiven Makrophagen-Vorläuferzellen

Außer der Zytotoxizität üben NK-Zellen eine andere wichtige Funktion aus: Sie setzen Zytokine frei. Dies geschieht bei Stimulierung der NK-Zellen durch ihre Zielzellen, durch Faktoren, oder durch eine Kombination von beiden. Die am häufigsten studierten Bedingungen für eine spezifische Aktivierung der NK-Zellen sind folgende: 1) Inkubation mit Zielzellen; 2) Inkubation mit Zielzellen + IFN- γ ; und 3) Inkubation mit IL-2+Liganden für den CD16FcR [Herman et al., 1986; Peters et al., 1986; Cuturi et al., 1989]. Außerdem benutzt man unspezifische Stimulatoren, um NK-Zellen zu stimulieren, wie den Protein Kinase C Aktivator Phorbol ester PMA und Ca²⁺-Ionophor [Paya et al., 1988; Anegon et al., 1988; Cuturi et al., 1989]. In den folgenden Experimenten wurden die NK-aktiven MV-Zellen unter ähnlichen Stimulationsbedingungen behandelt. Es wurden Yac-1, Yac-1+IFN- γ , Yac-1+IL-2, PMA (Phorbol ester), sowie Ionomycin (Ca²⁺-Ionophor) als Stimulatoren mit NK-ähnlichen MV-Zellen inkubiert. Vollmedium, P815, IFN- γ oder IL-2 allein dienten dabei als Kontrolle. Nach der Inkubation wurden die Überstände von den Kulturen abgenommen und anschließend auf Zytokine untersucht. Zum Vergleich wurden die NK-inaktiven MV-Zellen unter gleichen Bedingungen behandelt und auch getestet.

3.5.1. Freisetzung von regulatorischen Faktoren nach Stimulierung mit Zielzellen und Zytokinen

3.5.1.1. TNF- α

NK-Zellen können beim Kontakt mit den Zielzellen oder Zielzellen + IFN- γ TNF freisetzen [Peters et al. 1986]. Vermutlich ist TNF durch Auslösung der Apoptose-Wirkung bzw. DNA-Fragmentierung an dem Abtöten der Zielzellen durch NK-Zellen beteiligt [Young et al. 1990]. In diesem Experiment wurde ermittelt, ob auch NK-ähnliche MV-Zellen durch Zugabe von NK-Zielzellen aktiviert werden konnten, TNF zu sezernieren. Hierzu wurden die Effektorzellen (MV-Zellen) in 96-well Mikrotiterplatten

3.5 有 NK 活性的巨噬细胞前体对细胞因子的释放

除了杀伤活性, NK 细胞发挥着另一种重要的功能: 它们释放细胞因子。这发生在 NK 细胞受到刺激时, 刺激来自它们的靶细胞, 来自多种因子, 或者来自靶细胞与因子两者的联合作用。为了特异性地激活 NK 细胞, 最常使用的研究条件如下: 1) 与靶细胞培养; 2) 与靶细胞 + IFN- γ 培养; 3) 与 IL-2 + CD16 Fc 受体的配体培养【Herman 等, 1986 年; Peters 等, 1986 年; Cuturi 等, 1989 年】。此外, 人们还使用非特异性的刺激物来刺激 NK 细胞, 比如蛋白激酶 C 的活化物 PMA 和钙离子载体【Paya 等, 1988 年; Anegon 等, 1988 年; Cuturi 等, 1989 年】。在下列实验中, 将有 NK 活性的巨噬细胞前体置于相似的刺激条件下。Yac-1、Yac-1+IFN- γ 、Yac-1+IL-2、PMA (phorbol ester, 佛波酯) 以及离子霉素 (Ca²⁺ 离子载体) 作为刺激物与近似 NK 的巨噬细胞前体进行培养。全培养液、P815、IFN- γ 或者 IL-2 单用作为实验的对照。培养结束之后, 取出培养物的上清液, 随后检测细胞因子。为了比较, 将无 NK 活性的巨噬细胞前体置于相同的刺激条件下, 也一并检测。

3.5.1 被靶细胞与细胞因子刺激后对调节因子的释放

3.5.1.1 肿瘤坏死因子- α (TNF- α)

NK 细胞能够在接触靶细胞或者靶细胞+IFN- γ 时释放出 TNF【Peters 等, 1986 年】。据推测, TNF 通过启动细胞凋亡作用或者 DNA 的碎片化而参与到 NK 细胞对靶细胞的杀灭中【Young 等, 1990 年】。在此项实验中, 将查验: 是否近似 NK 的巨噬细胞前体也能够通过给与 NK 靶细胞而被激活, 释放出 TNF。为此, 将效应细胞 (巨噬细胞前体) 以 1×10^5 个细

mit 1×10^5 Zellen/Loch ausplattiert und jeweils mit Yac-1 (als Zielzellen) beziehungsweise P815 (als Kontrolle) allein oder in Kombination mit IFN- γ inkubiert. Das Verhältnis von MV-Zellen zu Tumorzellen war 4:1. Nach ca. 20 Stunden wurden die Überstände von den Kulturen abgenommen und zur Bestimmung der TNF-Aktivität auf die TNF-sensitiven L929-Zellen seriell titriert (siehe 2.13.7). In Tabelle 7 ist zu sehen, dass NK-ähnliche MV-Zellen nach Inkubation mit Yac-1 aktiv TNF produzierten. Zugabe von IFN- γ führte zu einer deutlichen Erhöhung der TNF-Produktion. NK-resistente P815-Zellen zeigten nur eine ganz geringe Wirkung auf die TNF-Freisetzung durch MV-Zellen. Mit IFN- γ konnte die Wirkung etwas verbessert werden. In dem Experiment, in dem die NK-inaktiven MV-Zellen eingesetzt wurden, führten weder Yac-1 oder P815 allein noch die Kombination von Tumorzellen mit IFN- γ zu nennenswerter TNF-Produktion.

Tab.7. Freisetzung von TNF aus MV-Zellen nach Stimulierung durch Tumorzellen

20 h Inkubation mit	NK-aktive MV		NK-inaktive
	TNF (U/ml)		MV
	ohne anti-TNF α	mit anti-TNF α	TNF (U/ml)
Vollmedium	0		0
IFN- γ	0		0
Yac-1	32 \pm 1 ^a	0	1
Yac-1+IFN- γ	58 \pm 2 ^b	0	2
P815	4 \pm 1	0	1
P815+IFN- γ	8 \pm 1	0	2

MV-Zellen : Tumorzellen = 4:1 IFN- γ : 500 U/ml

^a p < 0,001 Yac-1 vs. P815 ^b p < 0,001 Yac-1+IFN- γ vs. P815+IFN- γ

胞/孔接种入 96 孔细胞培养板, 分别与 Yac-1 (作为靶细胞) 以及 P815 (作为对照) 单独地或与 IFN- γ 一起培养。巨噬细胞前体对靶细胞的比例为 4 : 1。经过大约 20 小时后, 取出培养物的上清液。为了测定 TNF 活性, 将上清液在对 TNF 敏感的 L929 细胞上进行连续地稀释 (见 2.13.7)。在表 7 中可见: 近似 NK 的巨噬细胞前体在与 Yac-1 培养之后, 活跃地产出了 TNF。添加 IFN- γ 引发了一种明显的 TNF 产出的升高。对 NK 不敏感的 P815 细胞只显示出一种很低的对巨噬细胞前体产生 TNF 的作用。加入 IFN- γ 能够稍微改善其作用。而在使用无 NK 活性的巨噬细胞前体的实验中, 无论是 Yac-1 或者 P815 单用, 还是肿瘤细胞加 IFN- γ 联合使用, 都未引发值得一提的 TNF 的产生。

表 7 使用肿瘤细胞刺激后, 巨噬细胞前体对 TNF 的释放

20小时培养物	有NK活性的巨噬前体		无NK活性的
	TNF (U/ml)		巨噬前体
	无TNF α 抗体	有TNF α 抗体	TNF (U/ml)
全培养液	0		0
IFN- γ	0		0
Yac-1	32 \pm 1 ^a	0	1
Yac-1+ IFN- γ	58 \pm 2 ^b	0	2
P815	4 \pm 1	0	1
P815+IFN- γ	8 \pm 1	0	2

巨噬细胞前体 : 肿瘤细胞=4 : 1 IFN- γ : 500 U/mL

^a p < 0.001 Yac-1 对比 P815 ^b p < 0.001 Yac-1+IFN γ 对比 P815+IFN γ

Um den Typ des von NK-ähnlichen MV-Zellen freigesetzten TNFs zu definieren, wurde ein Hemmungstest mit spezifischem monoklonalem anti-murinen TNF- α Antikörper (siehe 2.13.7.) gemacht, indem L929-Zellen in Gegenwart von anti-TNF- α mit TNF-haltigen Überständen inkubiert wurden. In Tabelle 7 ist gezeigt, dass die TNF-Aktivität von anti-TNF- α vollständig inhibiert wurde. Dies weist daraufhin, dass NK-ähnlichen MV-Zellen TNF- α freisetzen.

3.5.1.2. IL-1

Da beschrieben wurde, dass NK-sensitive (jedoch nicht NK-resistente) Tumorzellen NK-Zellen zur Produktion von IL-1 stimulieren konnten [Herman & Rabson 1986], wurden NK-ähnliche sowie NK-inaktive MV-Zellen jeweils mit Yac-1 und P815 (beide Tumorzellen produzieren selbst kein IL-1) für 20 Stunden inkubiert und danach die Überstände auf IL-1-Aktivität untersucht. Der Nachweis der IL-1-Aktivität erfolgte durch einen kolorimetrischen Bioassay mit Hilfe der IL-1-abhängigen Zelllinie D10.G4.1 (siehe 2.13.1). In Tabelle 8 ist gezeigt, dass die höchste IL-1-Produktion von den NK-

为了对近似 NK 的巨噬细胞前体释放出的 TNFs 的类型进行确认, 使用特异性单克隆抗小鼠 TNF α 抗体 (见 2.13.7) 的抑制实验同时进行。此实验中, L929 细胞在抗 TNF α 抗体的存在下与含有 TNF 的上清液进行培养。在表 7 中可见: TNF 的活性被抗 TNF α 的抗体完全抑制了。这说明: 近似 NK 的巨噬细胞前体释放的是 TNF- α 。

3.5.1.2 白细胞介素-1

因有文献报道: NK 敏感的 (但不是 NK 不敏感的) 肿瘤细胞能够刺激 NK 细胞产生 IL-1【Herman 与 Rabson, 1986 年】, 本工作将近似 NK 的巨噬细胞前体和无 NK 活性的巨噬细胞前体分别与 Yac-1 和 P815 (两种肿瘤细胞自身不产生 IL-1) 培养了 20 小时, 然后测定它们上清液中的 IL-1 活性。检测 IL-1 的活性通过比色生物检测法借助于依赖 IL-1 的细胞株 D10.G4.1 (见 2.13.1) 来完成。在表 8 中可见, 由近似 NK 的巨噬细胞

Tab.8. Freisetzung von IL-1 aus MV-Zellen nach Stimulierung durch Tumorzellen

20 h inkubation mit	NK-aktive MV		NK-inaktive MV	
	O.D. _{570 nm}	IL-1 (U/ml)	O.D. _{570 nm}	IL-1 (U/ml)
Vollmedium	0,244±0,008 ^b	2	0,090±0,002	0
Yac-1	0,882±0,026 ^a	8	0,282±0,40 ^c	2
P815	0,242±0,022	2	0,066±0,015	0

MV-Zellen : Tumorzellen = 4 : 1

^b p < 0,001 NK-aktive vs. NK-inaktive

^a p < 0,001 Yac-1 vs. P815

^c p < 0,001 Yac-1 vs. Vollmedium

表 8 使用肿瘤细胞刺激后, 巨噬细胞前体对 IL-1 的释放

20小时 培养物	有NK活性的巨噬前体		无NK活性的巨噬前体	
	O.D. _{570nm}	IL-1(U/ml)	O.D. _{570nm}	IL-1(U/ml)
全培养液	0.244±0.008 ^b	2	0.090±0.002	0
Yac-1	0.882±0.026 ^a	8	0.282±0.40 ^c	2
P815	0.242±0.022	2	0.066±0.015	0

巨噬细胞前体: 肿瘤细胞=4:1

^b p < 0.001 有NK活性对比无NK活性

^a p < 0.001 Yac-1 对比 P815

^c p < 0.001 Yac-1 对比全培养液

aktiven MV-Zellen bei der Inkubation mit den Yac-1 beobachtet wurde. Im Gegensatz zu den NK-inaktiven MV-Zellen waren die NK-aktiven spontan in der Lage, geringe Menge von IL-1 zu sezernieren. P815 Tumorzellen wiesen dagegen keine IL-1-induzierende Wirkung auf. Bei der Inkubation von NK-inaktiven MV-Zellen mit Yac-1 wurde eine geringe IL-1 Produktion gefunden.

3.5.1.3. IL-6

Zu den inflammatorischen Faktoren, die von NK-Zellen freigesetzt werden können, gehört auch IL-6. Es wurde beschrieben, dass die Aktivierung von NK-Zellen durch IL-2 zu starker IL-6 Gen-Exprimierung führt [Vitolo et al., 1993]. Im Folgenden wurden die MV-Zellen jeweils mit IL-2, Yac-1, oder einer Kombination von beiden für 20 Std. aktiviert, und die Überstände mittels der IL-6-abhängigen Zelllinie 7TD1 auf ihren IL-6-Gehalt untersucht (2.13.2). P815 Tumorzellen wurden bei diesem Test nicht verwendet, weil sie selbst IL-6-Produzenten sind. In Tabelle 9 ist gezeigt, dass sowohl NK-aktive

Tab.9. Freisetzung von IL-6 aus MV-Zellen bei Aktivierung mit IL-2 und Yac-1

20 h Inkubation mit	NK-active MV IL-6 (U/ml)	NK-inactive MV IL-6 (U/ml)
Vollmedium	20±0,4	0
IL-2	26±0,5	0
Yac-1	4000±80 ^a	258±25
Yac-1+IL-2	7200±24 ^b	557±35

MV-Zellen : Yac-1 = 4 : 1

IL-2: 500 U/ml

^{a,b} p < 0,001 NK-aktive vs. NK-inaktive

前体产生 IL-1 的最高量在与 YAC-1 的培养中被观察到。与无 NK 活性的到。与无 NK 活性的巨噬细胞前体相反, 有 NK 活性的巨噬细胞前体处于自发分泌少量 IL-1 的状态。P815 肿瘤细胞未显示出诱导 IL-1 的作用。在无 NK 活性的巨噬细胞前体与 Yac-1 培养的情况下, 发现了少量 IL-1 的产生。

3.5.1.3 白细胞介素-6

IL-6 也属于能够被 NK 细胞释放的炎症因子。有文献报道: 通过 IL-2 对 NK 细胞的活化导致了 IL-6 基因的强烈表达【Vitolo 等, 1993 年】。以下实验将巨噬细胞前体分别使用 IL-2、Yac-1、或者两者并用来进行 20 小时的活化, 借助于依赖 IL-6 的细胞株 7TD1 来检测其上清液中 IL-6 的含量 (2.13.2)。该实验未使用 P815 肿瘤细胞, 因为它们自身是 IL-6 的产生者。表 9 中显示: 不仅有 NK 活性的, 而且无 NK 活性的巨噬细胞前体在受到

表 9 使用 IL-2 与 Yac-1 活化时, 巨噬细胞前体对 IL-6 的释放

20 小时培养物	有NK活性巨噬前体 IL-6 (U/ml)	无NK活性巨噬前体 IL-6 (U/ml)
全培养液	20±0.4	0
IL-2	26±0.5	0
Yac-1	4000±80 ^a	258±25
Yac-1+IL-2	7200±24 ^b	557±35

巨噬细胞前体 : Yac-1=4 : 1

IL-2: 500 U/mL

^{a,b} p < 0.001 有 NK 活性 对比 无 NK 活性

MV-Zellen bei der Stimulierung durch Yac-1 allein oder Yac-1+IL-2 aktiviert wurden, IL-6 freizusetzen. Die NK-aktiven MV-Zellen sezernierten jedoch ca. 10-fach höhere als auch NK-inaktive Mengen von IL-6 als die NK-inaktiven. Geringe spontane IL-6-Freisetzung wurde bei den NK-aktiven MV-Zellen beobachtet, aber nicht bei den NK-inaktiven Zellen. Die Aktivierung mit IL-2 allein zeigte in diesem Experiment keinen signifikanten Einfluss auf die IL-6-Freisetzung von den Zellen.

3.5.1.4. IL-10

Es ist noch unklar, ob NK-Zellen IL-10 (auch "Cytokine-Synthese-Inhibitory-Factor, CSIF" genannt) produzieren können. Bekannt ist, dass dieser relativ neu entdeckte Faktor nicht nur von Th2(T-Helfer2)-Zellen, B-Zellen, sondern auch von Monozyten/Makrophagen [De-Waal-Malefyt et al., 1991; Fiorentino et al., 1991b] freigesetzt werden kann. In den folgenden Versuchen wurden die NK-aktiven sowie die NK-inaktiven MV-Zellen mit einer Reihe von Stimulatoren, wie in Tabelle 10 angegeben, inkubiert und danach mit einem ELISA IL-10 in den Überständen bestimmt (2.12.5 und 2.13.3). Es wurde festgestellt, dass MV-Zellen nach Inkubation mit Yac-1 IL-10 sezernierten (siehe Tab. 10). Yac-1+IFN- γ regte sowohl NK-aktive als auch NK-inaktive MV-Zellen an, IL-10 zu produzieren, die NK-aktiven Zellen waren jedoch schon nach dem Kontakt mit Yac-1 ohne IFN- γ in der Lage, große Menge von IL-10 zu sezernieren. Dies vermochten die NK-inaktiven Zellen nicht. Die Zugabe von IL-2 führte zu keiner signifikanten Erhöhung der IL-10-Sekretion aus MV-Zellen. Eine Freisetzung des IL-10 aus Yac-1 Zellen ist ausgeschlossen, weil alle Überstände aus Yac-1 Zellen allein oder mit Faktoren (IL-2, IFN- γ) negativ für die IL-10 waren. Die P815 Tumorzellen stimulierten keine Sekretion von IL-10 in MV-Zellen.

Yac-1 单独或者 Yac-1+IL-2 的刺激时都能够被活化, 释放出 IL-6。不过与无 NK 活性的细胞相比较, 有 NK 活性的巨噬细胞前体分泌出高约 10 倍的 IL-6 量。少量自发的对 IL-6 的释放在有 NK 活性的巨噬细胞前体中被观察到, 但无 NK 活性的细胞没有。单独使用 IL-2 的活化在此实验中对细胞释放 IL-6 无显著的影响。

3.5.1.4 白细胞介素-10

目前尚不清楚, 是否 NK 细胞能够产生 IL-10 (也称为“cytokine-synthesis-inhibitory-factor”, CSIF, 细胞因子合成抑制因子)。众所周知: 这个较晚被发现的因子不仅能被 Th2(辅助性 T2) 细胞、B 细胞, 也能被单核/巨噬细胞【De-Waal-Malefyt 等, 1991 年; Fiorentino 等, 1991 年 b】所释放。在下面的实验中, 将有 NK 活性的以及无 NK 活性的巨噬细胞前体与一系列刺激物 (如表 10 中所列) 进行培养, 然后使用 ELISA 法来测定上清液中的 IL-10 (2.12.5 与 2.13.3)。实验发现: 在与 Yac-1 培养之后, 巨噬细胞前体分泌了 IL-10 (见表 10)。Yac-1+IFN- γ 促进了不仅有 NK 活性的, 而且无 NK 活性的巨噬细胞前体产生 IL-10, 但有 NK 活性的细胞在与 Yac-1 接触之后 (无 IFN- γ 时) 就处于了大量分泌 IL-10 的状态。这是无 NK 活性的细胞所不能的。添加 IL-2 未能导致巨噬细胞前体对 IL-10 分泌的显著上升。来自 Yac-1 细胞对 IL-10 的释放已被排除, 因为在所有来自 Yac-1 单独或者有因子 (IL-2、IFN- γ) 的上清液中, 都未能检出 IL-10。P815 肿瘤细胞不刺激巨噬细胞前体分泌 IL-10。

Tab. 10 Freisetzung von IL-10 aus MV-Zellen

20 h Inkubation mit	NK-aktive MV IL-10 (U/ml)	NK-inaktive MV IL-10 (U/ml)
Vollmedium	0	0
IFN- γ	0	0
IL-2	0	0
Yac-1	22,0 \pm 2 ^a	2,5 \pm 0,4
Yac-1+IFN- γ	37,3 \pm 2 ^b	19,4 \pm 1
Yac-1+IL-2	25,9 \pm 2 ^c	2,6 \pm 0,5
P815	0	0
P815+IFN- γ	0	0
P815+IL-2	0	0

MV-Zellen : Tumorzellen = 4 : 1 IFN- γ : 500 U/ml IL-2: 500 U/ml

a, b, c p < 0,001 NK-aktive vs. NK-inaktive

3.5.1.5. IFN- γ

IFN- γ -Produktion ist eine der wichtigsten funktionellen Eigenschaften der NK-Zellen, denn IFN- γ zeigt eine starke antivirale Aktivität und wirkt antimitotisch auf transformierte Zellen. IFN- γ -Synthese durch NK-Zellen findet hauptsächlich nach der Aktivierung durch Antigen plus IL-2 statt [Cuturi et al., 1989]. In den folgenden Experimenten wurden NK-aktive und NK-inaktive MV-Zellen mit Tumorzellen allein oder mit Tumorzellen +

表 10 巨噬细胞前体对 IL-10 的释放

20小时 培养物	有 NK 活性巨噬前体 IL-10 (U/ml)	无 NK 活性巨噬前体 IL-10 (U/ml)
全培养液	0	0
IFN- γ	0	0
IL-2	0	0
Yac-1	22.0 \pm 2 ^a	2.5 \pm 0.4
Yac-1+IFN- γ	37.3 \pm 2 ^b	19.4 \pm 1
Yac-1+IL-2	25.9 \pm 2 ^c	2.6 \pm 0.5
P815	0	0
P815+IFN- γ	0	0
P815+IL-2	0	0

巨噬细胞前体：肿瘤细胞 = 4 : 1 IFN- γ : 500 U/mL IL-2: 500 U/mL

a, b, c p < 0.001 有 NK 活性 对比 无 NK 活性

3.5.1.5 γ -干扰素 (IFN- γ)

产生 IFN- γ 是 NK 细胞的重要功能性特征之一，因为 IFN- γ 显示出一种很强的抗病毒活性而且对转化细胞起着抗有丝分裂的作用。NK 细胞合成 IFN- γ 主要发生在使用抗原加 IL-2 的活化之后【Cuturi 等，1989 年】。在以下的实验中，有 NK 活性的和无 NK 活

IL-2 oder mit Tumorzellen+IL-2 inkubiert. Danach wurde der IFN- γ -Gehalt in den Überständen mittels ELISA bestimmt (siehe 2.12.5 und 2.13.6). Es wurde beobachtet, dass die NK-aktiven MV-Zellen sich von den NK-inaktiven funktionell deutlich unterschieden. Im Gegensatz zu den NK-inaktiven MV-Zellen, die unter getesteten Bedingungen niemals IFN- γ freisetzen, sezernierten die NK-aktiven MV-Zellen nach Aktivierung durch eine Kombination von Tumorzellen mit IL-2 IFN- γ (Tab.11). Hierbei zeigten Yac-1 Zellen und P815 Zellen eine ähnlich starke Wirkung auf die NK-aktiven Zellen. Die IFN- γ -Freisetzung aus NK-aktiven MV-Zellen kann somit von anderen Zellen als NK-Zielzellen angeregt werden.

Tab. 11. Freisetzung von IFN- γ aus MV-Zellen

20 h Inkubation mit	NK-aktive MV IFN- γ (ng/ml)	NK-inaktive MV IFN- γ (ng/ml)
Vollmedium	0	0
IL-2	0	0
Yac-1	0	0
Yac-1+IL-2	6,3 \pm 0,1	0
P815	0	0
P815+IL-2	6,4 \pm 0,2	0

MV-Zellen : Tumorzellen = 4 : 1

IL-2: 500 U/ml

性的巨噬细胞前体与肿瘤细胞单独地、或者与肿瘤细胞+IL-2 进行培养。然后借助于 ELISA 来测定上清液中 IFN- γ 的含量 (见 2.12.5 与 2.13.6)。实验观察到: 有 NK 活性的巨噬细胞前体与无 NK 活性的细胞在功能上明显地不同。与无 NK 活性的巨噬细胞前体(其在被试验条件下从未释放出 IFN- γ) 相反, 有 NK 活性的巨噬细胞前体在被一种由肿瘤细胞加 IL-2 的组合活化之后, 释放出了 IFN- γ (表 11)。在此, Yac-1 细胞和 P815 细胞对有 NK 活性的巨噬细胞前体显示出强度相近的效应。看来, 有 NK 活性的巨噬细胞前体对 IFN- γ 的释放除 NK 靶细胞外也能被其他细胞激活。

表 11 巨噬细胞前体对 IFN- γ 的释放

20 小时培养物	有NK活性巨噬前体 IFN- γ (ng/ml)	无NK活性巨噬前体 IFN- γ (ng/ml)
全培养液	0	0
IL-2	0	0
Yac-1	0	0
Yac-1+IL-2	6.3 \pm 0.1	0
P815	0	0
P815+IL-2	6.4 \pm 0.2	0

巨噬细胞前体 : 肿瘤细胞=4 : 1

IL-2: 500 U/mL

3.5.2. Freisetzung von regulatorischen Faktoren nach Stimulierung mit Phorbol ester / Ca²⁺-Ionophor

In folgenden Tests wurden die MV-Zellen in 24-well Mikrotiterplatten (1×10⁶ Zellen in 2 ml Medium/Loch) jeweils mit PMA (0,2 µg/ml) und Ionomycin (1,2 µg/ml) für 20 Stdn. aktiviert. Die nach der Aktivierung von den Zellen freigesetzten Zytokine wie TNF, IL-1, IL-6, IL-10 und IFN-γ wurden entweder mit dem kolorimetrischen Bioassay oder durch ELISA bestimmt. Wie in Tabelle 12 dargestellt, rief die Aktivierung der MV-Zellen durch den Protein Kinase C Aktivator PMA keine Freisetzung von IL-10 oder IFN-γ hervor, ebenso wenig die Aktivierung durch Ca²⁺-Ionophor Ionomycin. Der TNF-Test wurde nur mit den von Ionomycin aktivierten Proben gemacht (weil PMA eine toxische Wirkung auf die L929-Zellen hat). Es wurde jedoch keine TNF-Aktivität in den getesteten Überständen beobachtet. Im Gegensatz dazu konnten die Freisetzungen von IL-1 und IL-6 aus MV-Zellen durch PMA oder Ionomycin aktiviert werden. NK-aktive und NK-inaktive Zellen verhielten sich bei dieser Untersuchung ähnlich, allerdings produzierten die NK-aktiven MV-Zellen mehr IL-6 als die NK-inaktiven, besonders nach Aktivierung mit Ionomycin.

Tab. 12. Zytokin-Freisetzung aus MV-Zellen nach Aktivierung durch PMA und Ionomycin

Zytokin	NK-aktive MV		NK-inaktive MV	
	PMA	Ionomycin	PMA	Ionomycin
TNF U/ml		0		0
IL-1 U/ml	6	13	2	6
IL-6 U/ml	620	2500	267	257
IL-10 U/ml	0	0	0	0
IFN-γ ng/ml	0	0	0	0

Dauer der Aktivierung: 20 h PMA: 0,2 µg/ml Ionomycin: 1,2 µg/ml

3.5.2 被佛波酯 (PMA) 或钙离子载体刺激后对调节因子的释放

在以下试验中, 将巨噬细胞前体在 24 孔培养板 (1×10⁶ 个细胞在 2 毫升培养液中/孔) 里分别用 PMA (0.2µg/mL) 和 (钙离子载体) 离子霉素 (1.2µg/mL) 活化 20 小时。细胞活化后释放的细胞因子如 TNF、IL-1、IL-6、IL-10、以及 IFN-γ 或使用比色法生物检测法, 或通过 ELISA 法来测定。如在表 12 中所示: 用蛋白激酶活化物 PMA 对巨噬细胞前体的活化未引发 IL-10 或者 IFN-γ 的释放, 使用 Ca²⁺离子载体的离子霉素活化也相同。TNF 试验只做了使用离子霉素活化的样品 (因为 PMA 对 L929 细胞有毒性作用)。但在被检测的上清液中未观察到 TNF 的活性。与之相反, 巨噬细胞前体对 IL-1 与 IL-6 的释放能够通过 PMA 或者离子霉素而被激活。在此项实验中, 有 NK 活性的与无 NK 活性的细胞表现相似, 不过, 有 NK 活性的巨噬细胞前体产生的 IL-6 比无 NK 活性的更多, 尤其是使用离子霉素活化之后。

表 12 经 PMA、离子霉素活化后, 巨噬细胞前体对细胞因子的释放

细胞因子	有 NK 活性巨噬前体		无 NK 活性巨噬前体	
	PMA	离子霉素	PMA	离子霉素
TNF U/ml		0		0
IL-1 U/ml	6	13	2	6
IL-6 U/ml	620	2500	267	257
IL-10 U/ml	0	0	0	0
IFN-γ ng/ml	0	0	0	0

活化时长: 20 小时 PMA: 0.2µg/mL 离子霉素: 1.2µg/mL

3.5.3. Produktion von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren

Berichte über Produktion von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren durch NK-Zellen haben gezeigt, dass nach Aktivierung, hauptsächlich durch IL-2, oder IL-2+NK-Liganden, oder Phorbolster/Ca²⁺-Ionophor, m-RNA von GM-CSF, IL-3, sowie M-CSF in NK-Zellen exprimiert wurde [Cuturi et al., 1989; Murphy et al., 1992]. Dabei wurde erwähnt, dass der Nachweis solcher Wachstumsfaktoren durch Bioassays schwierig sei, weil die zu testenden Überstände auch Proliferation-hemmende Faktoren wie TNF, IFN- γ enthalten konnten. In den folgenden Experimenten wurden die Untersuchungen auf CSFs nur mit denjenigen Überständen gemacht, die frei von TNF, IFN- γ , und IL-10 waren. Nur die Überstände, die nach der Inkubation der MV-Zellen mit PMA, Ionomycin, oder IL-2 erhalten wurden, entsprachen dieser Anforderung (siehe Tab.10, 11, 12). Da die aus NK-ähnlichen MV-Zellen entwickelten LAK-Effektorzellen (siehe unter 3.3.) sich den von anderen Forschern beschriebenen in IL-2-kultivierten NK-Zellen ähnelten, wurden sie auch in entsprechenden Versuchen mitgetestet.

3.5.3.1. GM-CSF/IL-3

Der kolorimetrischer Bioassay mit der GM-CSF/IL-3 abhängigen Zelllinie FDCP1 (2.9.2) wurde wie unter 2.13.5. beschrieben durchgeführt. Die zu testenden Überstände, gesammelt von den Kulturen mit NK-aktiven oder NK-inaktiven MV-Zellen oder LAK-Effektorzellen, wurden in Mikrotiterplatten mit FDCP1 Zellen inkubiert. Vollmedium diente als Kontrolle. Um die IL-3-Aktivität von der GM-CSF-Aktivität zu unterscheiden, wurde spezifischer anti-IL-3 Antikörper in die entsprechenden Test-Löcher hinzu pipettiert und der Hemmungsgrad getestet. Wie in Tabelle 13 dargestellt, wurde GM-CSF/IL-3 Aktivität nur in den Überständen aus NK- und LAK-aktiven Zellen gefunden. Ionomycin stimulierte nur die IL-3-Produktion von NK- und LAK-aktiven Zellen, denn das Zellwachstum von FDCP-1 wurde vollständig durch anti-IL-3 Ak. gehemmt. IL-2-Aktivierung dagegen stimulierte offenbar nur die LAK-Zellen, GM-CSF zu sezernieren.

3.5.3 产生造血生长因子

有关 NK 细胞产生造血生长因子的报道指出：在活化之后，主要是通过 IL-2、或者 IL-2+NK 配体、或是佛波酯/钙离子载体的活化，NK 细胞中表达 GM-CSF、IL-3、以及 M-CSF 的 mRNA 【Cuturi 等，1989 年；Murphy 等，1992 年】。同时文献提到：用生物检测法来测定这些生长因子有难度，因为被检测的上清液中也可能含有增殖的抑制因子如 TNF、IFN- γ 。在以下实验中，对 CSFs 的检测只使用那些不含有 TNF、IFN- γ 、IL-10 的上清液来做。只有巨噬细胞前体与 PMA、离子霉素、或者 IL-2 培养之后产生的上清液满足此要求（见表 10、11、12）。由于从近似 NK 的巨噬细胞前体发育而成的 LAK 效应细胞（见 3.3 中所述）与其他研究者描述的在 IL-2 中活化的 NK 细胞很相似，它们也在相关的实验中被一同检测。

3.5.3.1 粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子与白细胞介素-3

使用对 GM-CSF/IL-3 依赖的细胞株 FDCP1 (2.9.2) 的比色生物检测法依照在 2.13.5 中所述进行。将待测上清液（收集自使用有 NK 活性或无 NK 活性的巨噬细胞前体、或是 LAK 效应细胞的培养）在 96 孔培养板中与 FDCP1 细胞进行培养。全培养液用于对照。为了将 IL-3 的活性与 GM-CSF 的活性相区别，特异性抗 IL-3 的抗体被添加到相应的试验孔中，检测其抑制程度。如在表 13 中所示：GM-CSF/IL-3 的活性只有在有 NK 与 LAK 活性的细胞上清液中被发现。离子霉素只刺激有 NK 与 LAK 活性的细胞产生 IL-3，因为 FDCP-1 的细胞生长通过抗 IL-3 的抗体被完全抑制了。相反，IL-2 的活化显而易见地只刺激了有 LAK 活性的细胞分泌 GM-CSF。

Tab. 13. Freisetzung von GM-CSF oder IL-3 aus den stimulierten MV-Zellen

Zellen und Stimulatoren	O.D.570nm		GM-CSF (U/ml)	IL-3 (U/ml)
	ohne anti-IL-3	mit anti-IL-3		
1) NK-inaktive MV:				
Vollmedium	0,010±0,003		0	0
PMA	0,066±0,001		0	0
Ionomycin	0,096±0,004		0	0
IL-2	0,034±0,006		0	0
2) NK-aktive MV:				
Vollmedium	0,072±0,002		0	0
PMA	0,098±0,000		0	0
Ionomycin	0,426±0,013 ^a	0,068±0,001	0	1,5
IL-2	0,082±0,007		0	0
3) LAK-aktive MV:				
Vollmedium	0,036±0,000		0	0
PMA	0,097±0,004		0	0
Ionomycin	0,486±0,070 ^b	0,070±0,002	0	1.75
IL-2	0,488±0,004 ^c	0,430±0,032	16	0

Dauer der Inkubationszeit mit den Stimulatoren: 20 h

PMA: 0,2µg/ml Ionomycin: 1,2µg/ml IL-2: 500 U/ml

^a p < 0,001 Ion. vs. VM. ^b p < 0,001 Ion. vs. VM.

^c p < 0,001 Ion. vs VM

表 13 被刺激的巨噬细胞前体对 GM-CSF 或 IL-3 的释放

细胞与刺激物	OD.570nm		GM-CSF (U/ml)	IL-3 (U/ml)
	无IL-3抗体	有IL-3抗体		
1) 无 NK 活性的巨噬前体:				
全培养液	0.010±0.003		0	0
PMA	0.066±0.001		0	0
离子霉素	0.096±0.004		0	0
IL-2	0.034±0.006		0	0
2) 有 NK 活性的巨噬前体:				
全培养液	0.072±0.002		0	0
PMA	0.098±0.000		0	0
离子霉素	0.426±0.013 ^a	0.068±0.001	0	1.5
IL-2	0.082±0.007		0	0
3) 有 LAK 活性的巨噬前体:				
全培养液	0.036±0.000		0	0
PMA	0.097±0.004		0	0
离子霉素	0.486±0.070 ^b	0.070±0.002	0	1.75
IL-2	0.488±0.004 ^c	0.430±0.032	16	0

与刺激物培养的时长: 20 小时

PMA: 0.2µg/mL 离子霉素: 1.2µg/mL IL-2: 500 U/mL

^a p < 0.001 离子霉素对比全培养液 ^b p < 0.001 离子霉素对比全培养液

^c p < 0.001 IL-2 对比全培养液

3.5.3.2. M-CSF

Zur Untersuchung der M-CSF-Aktivität wurde der Soft-Agar Assay angewendet (siehe 2.12.6). Überstände von MV-Zellen, die durch PMA, Ionomycin, oder IL-2 aktiviert worden waren, wurden in 3,5-cm Kulturschalen im Verhältnis 1:1:8 mit 0,35% igem Agar und frischer KM-Zellsuspension (1×10^5 Zellen/ml) versetzt. Dadurch wurden die Überstände 1:10 verdünnt. Nach einer 7-tägigen Inkubation wurden die Kolonien auf dem Agar unter dem Lichtmikroskop gezählt. Um die Zelltypen in den Kolonien zu bestimmen, wurden die Soft-Agar-Scheibe mit Kolonien auf Objektträger gebracht, luftgetrocknet, fixiert, und schließlich mit der Esterase-Doppelfärbung (2.11.3) gefärbt. Die braun angefärbten Zellen waren Monozyten/Makrophagen [Li et al., 1973]. Es wurde beobachtet, dass die NK-aktiven MV-Zellen nach Aktivierung durch PMA der Koloniebildenden-Faktor (CSF) freisetzen. Weil nach der doppelten Esterase-Färbung alle Zellen in den gebildeten Kolonien braun angefärbt wurden, müsste M-CSF in den Überständen vorhanden sein. Die induzierende Wirkung von PMA auf CSF-Freisetzung wurde bei NK-inaktiven MV-Zellen nicht gefunden.

Tab. 14. Produktion von M-CSF durch MV-Zellen

20 h Inkubation mit	NK-aktive MV		NK-inaktive MV
	Kolonie-Zahl	CUF/ml	Kolonie-Zahl
Vollmedium	0	0	0
PMA	28,5±11,2	285	0
Ionomycin	0	0	0
IL-2	0	0	0

PMA: 0,2 µg/ml

Ionomycin: 1,2 µg/ml

IL-2: 500 U/ml

3.5.3.2 巨噬细胞集落刺激因子

为了检测 M-CSF 的活性, 软琼脂检测法得以应用 (见 2.12.6)。已被 PMA、离子霉素、或者 IL-2 活化的巨噬细胞前体的上清液在直径为 3.5 厘米的培养皿中以 1:1:8 的比例与 0.35% 的琼脂和新鲜骨髓细胞悬液 (1×10^5 个细胞/毫升) 相混合。由此使上清液得到 1:10 的稀释。经过 7 天的培养之后, 对琼脂上的集落在光学显微镜下计数。为了确认集落中的细胞类型, 将带有集落的琼脂片涂于载玻片上, 空气干燥, 固定, 并最终使用酯酶双染色法 (2.11.3) 进行染色。被染为棕色的细胞是单核/巨噬细胞【Li 等, 1973 年】。实验观察到: 有 NK 活性的巨噬细胞前体在 PMA 活化后释放了集落刺激因子 (CSF)。由于在酯酶双染色后, 在形成的集落中的所有细胞都被染成了棕色, 上清液中存在的必定是 M-CSF。PMA 对释放 CSF 的诱导作用在无 NK 活性的巨噬细胞前体中没有被发现。

表 14 由巨噬细胞前体产生的 M-CSF

20小时 培养物	有NK活性巨噬前体		无NK活性巨噬前体
	集落数	CFU/ml	集落数
全培养液	0	0	0
PMA	28.5±11.2	285	0
离子霉素	0	0	0
IL-2	0	0	0

PMA: 0.2 µg/mL

离子霉素: 1.2 µg/mL

IL-2: 500 U/mL

Um einen Überblick über Zytokin-Freisetzungsfähigkeit von MV-Zellen zu geben, ist Tabelle 15 hergestellt worden. Daten von NK-aktiven und NK-inaktiven Zellen werden getrennt in Tab.15.a und 15.b präsentiert (siehe Seite 90).

为了给出一个有关巨噬细胞前体释放细胞因子的全貌，表 15 得以制作。有 NK 活性与无 NK 活性细胞的数据分别呈现在表 15.a 与表 15.b 中（见第 90 页）。

Tab. 15.a Kurzfassung der Zytokin-Freisetzung aus NK-aktiven MV-Zellen

Stimulator	IL-1 (U/ml)	IL-3 (U/ml)	IL-6 (U/ml)	IL-10 (U/ml)	TNF- α (U/ml)	IFN- γ (ng/ml)	GM-CSF (U/ml)	M-CSF (U/ml)
<u>unspezifisch:</u>								
PMA	6	0	620	0		0	0	285
Ionomycin	13	1,5	2500	0	0	0	0	0
<u>spezifische:</u>								
Yac-1	8		4000	22	32	0		
Yac-1+IFN- γ				37	58			
Yac-1+IL-2			7200	24		6,3		
<u>Kontrolle:</u>								
Vollmedium	2	0	20	0	0	0	0	0
IFN- γ				0	0			
IL-2		0	26	0		0	0	0
P815	2			0	4	0		
P815+ IFN- γ				0	8			
P815+IL-2				0		6,4		

表 15.a 汇总有 NK 活性的巨噬细胞前体对细胞因子的释放

刺激物	IL-1 (U/ml)	IL-3 (U/ml)	IL-6 (U/ml)	IL-10 (U/ml)	TNF- α (U/ml)	IFN- γ (ng/ml)	GM-CSF (U/ml)	M-CSF (U/ml)
<u>非特异性:</u>								
PMA	6	0	620	0		0	0	285
离子霉素	13	1.5	2500	0	0	0	0	0
<u>特异性:</u>								
Yac-1	8		4000	22	32	0		
Yac-1+IFN- γ				37	58			
Yac-1+IL-2			7200	24		6.3		
<u>对照:</u>								
全培养液	2	0	20	0	0	0	0	0
IFN- γ				0	0			
IL-2		0	26	0		0	0	0
P815	2			0	4	0		
P815+ IFN- γ				0	8			
P815+IL-2				0		6.4		

Tab.15.b Kurzfassung der Zytokin-Freisetzung aus NK-inaktiven MV-Zellen

Stimulator	IL-1 (U/ml)	IL-3 (U/ml)	IL-6 (U/ml)	IL-10 (U/ml)	TNF- α (U/ml)	IFN- γ (ng/ml)	GM-CSF (U/ml)	M-CSF (U/ml)
<u>unspezifisch:</u>								
PMA	2	0	267	0		0	0	0
Ionomycin	6	0	257	0	0	0	0	0
<u>spezifische:</u>								
Yac-1	2		268	3	1	0		
Yac-1+IFN- γ				19	2			
Yac-1+IL-2			557	3		0		
<u>Kontrolle:</u>								
Vollmedium	0	0	0	0	0	0	0	0
IFN- γ				0	0			
IL-2		0	0	0		0	0	0
P815	0			0	1	0		
P815+ IFN- γ				0	2			
P815+IL-2				0		0		

表 15.b 汇总无 NK 活性的巨噬细胞前体对细胞因子的释放

刺激物	IL-1 (U/ml)	IL-3 (U/ml)	IL-6 (U/ml)	IL-10 (U/ml)	TNF- α (U/ml)	IFN- γ (ng/ml)	GM-CSF (U/ml)	M-CSF (U/ml)
<u>非特异性:</u>								
PMA	2	0	267	0		0	0	0
离子霉素	6	0	257	0	0	0	0	0
<u>特异性:</u>								
Yac-1	2		268	3	1	0		
Yac-1+IFN- γ				19	2			
Yac-1+IL-2			557	3		0		
<u>对照:</u>								
全培养液	0	0	0	0	0	0	0	0
IFN- γ				0	0			
IL-2		0	0	0		0	0	0
P815	0			0	1	0		
P815+ IFN- γ				0	2			
P815+IL-2				0		0		

4. DISKUSSION

4.1. Sind NK-Zellen IL-2 aktivierte Makrophagen-Vorläufer?

In den letzten 20 Jahren haben Wissenschaftler mit starkem Interesse nach dem Ursprung der NK-Zellen, nach ihrer Abstammung, und nach ihrer Entwicklung von Vorläufern zu reifen Effektor-Zellen geforscht, um diese aktiv an der Abwehr des Körpers gegen Tumoren, Virus- und Mikroben-Infektionen beteiligten Zellen näher kennenzulernen und zu identifizieren. 1977 wurde von Haller et al. durch *in vivo* Experimente in der Maus gezeigt, dass das Knochenmark der Ursprungsort von NK-Zellen ist [Haller et al. 1977]. Dieses Ergebnis wurde später von Hackett et al. mit den Daten aus *in vitro* Untersuchungen ergänzt. Sie zeigten, dass das Knochenmark-Milieu für die Differenzierung der NK-Zellen essentiell ist [Hackett et al. 1986]. Studien in Ratten- und Human-System haben später bestätigt, dass die NK/LAK-Zellen von Knochenmark-Vorläufern abstammen [Sarneva et al. 1989; Keever et al. 1990]. Alle diese Daten führten zu der Schlussfolgerung, dass die NK/LAK-Effektorzellen sich aus Knochenmark-Vorläufern entwickeln.

Eine offene Frage in der NK/LAK-Forschung ist noch, zu welcher Zellreihe die NK/LAK-Zellen gehören und was der Wachstums-Faktor für diese Zellen ist. Obwohl IL-2 der wichtigste Faktor für die NK/LAK-Kulturen zu sein scheint, ist die Wirkung von IL-2 auf die Zellen eher stimulierend für die Zytotoxizität als für die Proliferation. Olabuenaga et al. berichteten beispielsweise bereits 1983, dass IL-2 allein für das Wachstum einer klonierten NK-Zell-Linie nicht ausreicht [Olabuenaga et al. 1983]. Ein paar Jahre später bestätigten mehrere Forschungsgruppen, die mit den NK/LAK-Zellen aus Milz oder aus Knochenmark-Kultur arbeiteten, dass für die Proliferation der NK/LAK-Zellen außer IL-2 noch ein anderer Faktor benötigt wird [Gunji et al. 1989; Van-Den-Brink et al. 1990; Ayroldi et al. 1992]. Dieser andere Faktor ist bis heute nicht identifiziert worden.

4. 讨论

4.1 NK 细胞是 IL-2 活化的巨噬细胞前体吗?

在过去 20 年里, 科学家们带着强烈的兴趣对 NK 细胞的起源、对它们的谱系、以及对它们从前体细胞发育到成熟的效应细胞进行了研究, 为的是更近地认识与定性这些活跃地参与到机体抵抗肿瘤、病毒与微生物感染的细胞。1977 年, Haller 等通过小鼠的体内实验指出: 骨髓是 NK 细胞的起源处【Haller 等, 1977 年】。这一结果在其后由 Hackett 等使用来自体外研究的数据得到了补充。他们指出: 骨髓环境对 NK 细胞的分化是必要的【Hackett 等, 1986 年】。后来, 在大鼠与人体系统中的研究证实: NK/LAK 细胞起源于来自骨髓的前体细胞【Sarneva 等, 1989 年; Keever 等, 1990 年】。所有这些数据引向的结论是: NK/LAK 效应细胞是从骨髓中的前体细胞发育而来的。

在 NK/LAK 研究中的一个公开的问题仍然是: NK/LAK 细胞属于哪个细胞系并且什么是这种细胞的生长因子。虽然 IL-2 看上去是对 NK/LAK 培养最为重要的因子, 但 IL-2 在细胞上的作用更像是对杀伤活性有刺激性而不是对其增殖。比如在 1983 年, Olabuenaga 等已经报告: 单独使用 IL-2 对于一种克隆化的 NK 细胞株的生长是不足的【Olabuenaga 等, 1983 年】。几年之后, 更多的研究团队 (他们使用来自脾脏或者来自骨髓细胞培养的 NK/LAK 细胞开展工作) 证实: 为了 NK/LAK 细胞的增殖, 除了 IL-2 还必需有一种另外的因子【Gunji 等, 1989 年; Van-Den-Brink 等, 1990 年; Ayroldi 等, 1992 年】。这个另外的因子直到今天没有被确定。

Da der Wachstumsfaktor für NK-Zellen unbekannt ist, ist es in der Tat schwer, mittels der *in vitro* Kultur, insbesondere mittels der Knochenmark-Kultur die Entwicklung der NK-Zellen von den Vorläufern bis zu den Effektorzellen zu erforschen. In den letzten fünf Jahren wurden fast alle Studien über die Knochenmark-Vorläufer der NK/LAK-Effektoren in Ratte, Mensch und Maus nur mittels "LTBMC" (long-term bone marrow culture) gemacht [Van-Den-Brink et al. 1990; Pollack et al. 1992; Sitnicka & Hansson 1992; und Vecchini et al. 1993]. Unter "LTBMC"-Bedingungen wurden die gesamten Knochenmarkzellen bei einer Dichte von ca. 2×10^6 Zellen/ml in Medium (RPMI 1640 + 5% FKS + 50 μ M 2-Mercaptoethanol) ohne exogene Faktoren vorkultiviert, um eine adhärenzte Stroma-Zellschicht zu erhalten. Nach einer 4-wochigen Vorkultur hatten weniger als 3,5% der Zellen von der Ausgangspopulation überlebt [Vecchini et al. 1993]. Unter den überlebenden Zellen waren zum großen Teil adhärenzte Stroma-Zellen und wenige nicht adhärenzte Zellen, die locker an der Stroma-Zellschicht hafteten. Dann wurde IL-2 in die Kultur gegeben. Die nicht adhärenzten Zellen entwickelten sich während einer 3-6-tägigen Inkubation mit IL-2 zunächst zu NK- und weiter zu LAK-Effektor-Zellen, deswegen wurden sie als NK-Vorläufer angesehen [Sitnicka & Hansson 1992]. In allen diesen Studien zeigten die Autoren übereinstimmend, dass das Stroma für die Generation der NK-Zellen in der Knochenmark-Kultur nötig ist, und dass unter "LTBMC"-Bedingungen die Entwicklung von Vorläufern zu NK-Zellen eine Zusammenwirkung von IL-2 und einem Wachstumsfaktor, der von dem Stroma gebildet wird, benötigt [Ayroldi et al. 1992; Vecchini et al. 1993]. Eine konkrete Beschreibung dieses Wachstumsfaktors aus Stroma ist in der Literatur nicht zu finden.

"LTBMC"-Bedingungen haben offensichtlich folgende Nachteile: (i) Die Kultur dauert sehr lange, daher ist sie gefährdet, kontaminiert zu werden; (ii) Das Stroma dient als Quelle für viele Zytokine, so dass es schwierig ist, einen Wachstumsfaktor für NK-Vorläufer zu definieren; und (iii) Die Kultur enthält in den ersten 4 Wochen keine exogen zugesetzten Faktoren, dies kann in einem massenhaften Tod der Stammzellen resultieren, dadurch kann die Ausbeute der NK-Vorläufer-Zellen stark herabgesetzt sein. Wegen

由于NK细胞的生长因子是未知的,这在实际上很难借助于体外培养,尤其是借助于骨髓细胞培养来研究NK细胞从前体到效应细胞的发育。在过去5年间,几乎所有关于NK/LAK效应细胞的骨髓前体细胞的研究在大鼠、人体和小鼠中都只借助于“长期骨髓细胞培养”(long-term bone marrow culture, LTBMC)来做【Van-Den-Brink等, 1990年; Pollack等, 1992年; Sitnicka与Hansson, 1992年; 及Vecchini等, 1993年】。在“长期骨髓细胞培养”的条件下,全骨髓细胞以约为 2×10^6 个细胞/毫升的密度在无外来因子的培养液(RPMI 1640 + 5%胎牛血清 + 50 μ mol/L 2-巯基乙醇)中进行前培养,以获得一个贴壁的基质细胞层。经过4周的前培养之后,少于3.5%起始群的细胞存活了下来【Vecchini等, 1993年】。在存活下来的细胞中,大部分是有粘附性的基质细胞,而少数是非粘附的细胞,后者松散地附着在基质细胞层上。此时将IL-2加入到培养中。在3-6天与IL-2的培养期间,非粘附细胞首先发育成为NK并进一步成为LAK效应细胞,因而它们被看作是NK前体细胞【Sitnicka与Hansson, 1992年】。在所有这些研究中,作者们一致指出:在骨髓细胞培养中,基质细胞层对于产生NK细胞是必需的,并且,在“长期骨髓细胞培养”的条件下,从前体细胞到NK细胞的发育需要由IL-2和一种生长因子的共同作用,这个生长因子由基质细胞层产生【Ayroldi等, 1992年; Vecchini等, 1993年】。对这个来自基质细胞层的生长因子的具体描述在文献中无法找到。

“长期骨髓细胞培养”的条件有着显而易见的下述弊端: (1) 其培养时间太长,故而有被污染的危险; (2) 其基质细胞层起着多种细胞因子释放源的作用,因而很难对NK前体细胞的生长因子进行确定; (3) 这种培养在前4周不添加任何外来因子,这会导致干细胞的大量死亡,从而会大幅降低NK细胞的收获量。由于这些问题,“长期骨髓细胞培养”对于研究NK

dieser Probleme gilt die "LTBMC"-Kultur weder als praktische noch als ideale Knochenmark-Kulturbedingung für die Erforschung der NK-Vorläufer.

Die vorliegende Arbeit basierte auf dem Gedanken, dass die NK-Effektorzellen mit Promonozyten verwandt sein könnten [Lohmann-Matthes et al. 1979]. Statt nach anderen Wachstumsfaktoren zu suchen, wurden die myeloischen Wachstumsfaktoren, GM-CSF und CSF-1, angewendet, um die Proliferation der Knochenmark-Vorläufer für die NK-Effektorzellen zu stimulieren. Dies hatte sofort Erfolg. Sowohl die aus frischem Knochenmark angereicherte NK-Vorläufer-Population als auch die aus einer 3-tägigen KM-Vorkultur isolierte und gereinigte NK-aktive Zellpopulation sind im [³H] Thymidin-Einbau-Test als CSF-abhängige Zellen zu erkennen (Abb.2 und Abb. 10). Im Vergleich zu der "LTBMC"-Kultur hat unsere Knochenmark-Kultur folgende Vorteile: (i) Einschließlich der KM-Vorkultur und der Haupt-Kultur braucht sie nur 3-7 Tage, um die NK- und LAK-Aktivität hervorzubringen. Sie ist also viel kürzer als die 4-wöchige "LTBMC"-Kultur; (ii) Unsere Knochenmark-Kultur wird mit bekannten exogenen Faktoren gestartet. Daher ist der Verlauf der Kultur leicht abzuschätzen und zu steuern; (iii) Von unserer Kultur wird eine hohe Zellausbeute erhalten. Von einer Maus werden bereits nach einer 3-tägigen Vorkultur $3-5 \times 10^6$ Vorläufer-Zellen, die alle zu NK/LAK-Effektorzellen ausdifferenzieren können, gewonnen. Diese Zellzahl ist 10-fach höher als die aus "LTBMC" gewonnene [Vecchini et al. 1993]; und (iv) In unserer Knochenmark-Kultur mit CSF plus IL-2 sind die Stroma-Zellen für die Erzeugung der NK/LAK-Aktivität nicht nötig. Die Kultur kann mit einer reinen Zellpopulation laufen. Dies schafft die Voraussetzung, die Entwicklung der Zellen zu verfolgen.

Bei der Oberflächenmarker-Analyse der Zellen aus der "LTBMC"-Kultur wurde häufig gefunden, dass die als NK-Vorläufer geltenden, nicht adhärenen Zellen verschiedene Phänotypen haben. Sitnicka et al. berichteten beispielsweise, dass in der "LTBMC"-Kultur

前体细胞来说, 被认为是既不实用、也不理想的骨髓细胞培养条件。

本工作基于的思路是: NK 效应细胞与前单核细胞可能是同类【Lohmann-Matthes 等, 1979 年】。未去寻找其它的生长因子, 髓系细胞的生长因子 (GM-CSF 与 CSF-1) 被用于刺激 NK 效应细胞的骨髓前体细胞的增殖。此举即刻见效。无论是新鲜从骨髓富集的 NK 前体细胞群, 还是来自 3 天骨髓细胞前培养之后分离并纯化后的有 NK 活性的细胞群, 它们都在 ³H 胸腺嘧啶核苷掺入实验中显示是依赖于 CSF 的细胞 (图 2 与图 10)。与“长期骨髓细胞培养”相比较, 我们的骨髓细胞培养具有以下优势: (1) 包括骨髓细胞前培养和主培养在内, 它只需要 3-7 天就能产生出 NK 及 LAK 活性。故而它比 4 周的“长期骨髓细胞培养”要短得多; (2) 我们的骨髓细胞培养从使用已知的外来因子开始, 所以培养的进程易于评估与控制; (3) 我们的培养可以获得较高的细胞产量。从一只小鼠就能在 3 天的前培养后获得 $3-5 \times 10^6$ 个前体细胞, 它们都能发育成为 NK/LAK 效应细胞。这个细胞数量为 10 倍高于“长期骨髓细胞培养”所获得的细胞数量【Vecchini 等, 1993 年】; (4) 在我们使用 CSF 加 IL-2 的骨髓细胞培养中, 对于 NK/LAK 活性的产生并不需要基质细胞。这种培养能够使用纯的细胞群进行。这解决了跟踪细胞发育的先决条件。

在对来自“长期骨髓细胞培养”的细胞作表面标志物的分析时常常发现: 那些被认为是 NK 前体细胞的、非粘附的细胞有着不同的细胞表型。例如 Sitnicka 等报道: 在“长期骨髓细胞培养”中, 非粘附细胞有部分对 T 细胞标

die nicht adhären Zellen zum Teil positiv für den T-Zellmarker CD3 waren [Sitnicka & Hansson 1992]. Nach der Definition für NK-Zellen sollte CD3 nicht von NK-Zellen exprimiert werden [Fitzgerald-Bocarsly et al. 1988]. Daher kann der Befund der CD3⁺ Zellen nur bedeuten, dass die nicht adhären Population in der "LTBMC"-Kultur aus heterogenen Zellen besteht. Aus diesem Grund ist es nicht korrekt, die nicht adhären Zellen in der "LTBMC"-Kultur eine NK-Vorläufer Population zu nennen. Bisher ist nur ein Oberflächenmarker auf den Knochenmark-Vorläuferzellen für die NK/LAK-Effektoren bestimmt worden, nämlich der spezifische Marker für NK-Zellen, also in der Maus NK-1.1 [Hackett et al. 1986; Vecchini et al. 1993]. So betrachtet, ist die aus unserer Kultur isolierte Vorläufer-Population, im Vergleich zu der aus "LTBMC", eindeutig in besserem Zustand hinsichtlich ihrer Expressierung von NK-1.1 (mehr als 95% Zellen positiv, siehe Abb.9) und ihres Reinheitsgrads (komplett negativ für T-, B-Zellmarker, siehe Abb.9).

Die NK-1.1 positiven Knochenmark-Vorläufer aus unserer Kultur erwiesen sich als bipotente Zellen, die durch IL-2 Aktivierung schnell zu aktiven NK/LAK-Effektoren differenzierten, aber auf der anderen Seite, in Abwesenheit von IL-2, unter dem Einfluss von CSF-1, zu Makrophagen (F4/80⁺) herausreifen konnten (Abb. 14 und 15). Diese zweite Eigenschaft haben sie mit den in der Literatur definierten Knochenmark-Vorläufern für Makrophagen [Crocker & Gordon 1985] gemeinsam. Das Vorhandensein von NK-1.1 Markern auf reifen Makrophagen (siehe Abb. 15) weist auf einen gemeinsamen Ursprung der beiden Zellarten hin. Vor kurzem berichteten Koo et al ebenfalls, dass die F4/80 positiven Makrophagen aus Maus den NK-1.1 Marker tragen [Koo et al. 1991].

Seit 15 Jahren wird die Beziehung zwischen den Zellen aus dem Makrophagen-system und den NK-Effektor-Zellen diskutiert [Lohmann-Matthes et al. 1979; Decker et al. 1986; und Baccarini et al. 1985, 1986, 1988, 1989]. Obwohl schon lange bekannt ist, dass die NK-Zellen einen typische myeloischen Marker, Mac-1, tragen [Zarling & Kung 1980;

志物 CD3 为阳性【Sitnicka 与 Hansson, 1992 年】。根据对 NK 细胞的定义, CD3 不应当被 NK 细胞所表达【Fitzgerald-Bocarsly 等, 1988 年】。因此,发现 CD3⁺细胞只能表明:在“长期骨髓细胞培养”中的非粘附细胞群由多种细胞组成。基于这一原因,将“长期骨髓细胞培养”中的非粘附细胞称为一个 NK 前体细胞群是不精准的。至今,只有一个在 NK/LAK 效应细胞的骨髓前体细胞上的表面标志物被确认,那就是 NK 细胞的特异性标志物,即在小鼠中为 NK-1.1【Hackett 等, 1986 年; Vecchini 等, 1993 年】。从这一角度观察,与来自“长期骨髓细胞培养”的前体细胞群相比较,从我们的培养分离出的前体细胞群明显地处于更好的状况,这从它们对 NK-1.1 的表达(大于 95%的细胞为阳性,见图 9)和它们的纯度级别(对 T、B 细胞标志物全为阴性,见图 9)就能看到。

我们的培养产出的 NK-1.1 阳性的骨髓前体细胞表明自身是双潜能的细胞,它们通过 IL-2 的活化快速地朝向有活性的 NK/LAK 效应细胞分化,但在另一方面,在无 IL-2 的情况下,受 CSF-1 的影响,它们能够成熟为 F4/80⁺ 的巨噬细胞(图 14 与图 15)。这第二个特性使得它们与在文献中定义的巨噬细胞的骨髓前体细胞(Crocker 与 Gordon, 1985 年)具有共同性。NK-1.1 标志物存在于成熟的巨噬细胞上(见图 15)暗示着两种细胞类型有一个共同的起源。不久前, Koo 等也报道:来自小鼠的 F4/80 阳性的巨噬细胞携带 NK-1.1 标志物【Koo 等, 1991 年】。

15 年来,来自巨噬细胞系的细胞与 NK 效应细胞之间的关系一直被讨论着【Lohmann-Matthes 等, 1979 年; Decker 等, 1986 年; 及 Baccarini 等, 1985 年、1986 年、1988 年、1989 年】。虽然人们早已知道: NK 细胞携带着一个典型的髓系细胞标志物 Mac-1【Zarling 与

Tai & Werner 1980; Ortaldo et al. 1981], nehmen viele Autoren an, dass die NK-Zellen zu den Lymphozyten gehören. Das Hauptargument dafür ist, dass die Entstehung der NK-Aktivität von IL-2 abhängig ist und IL-2 ein bekannter Wachstumsfaktor spezifisch für Lymphozyten ist [Herberman et al. 1987]. Wie oben erwähnt, ist IL-2 bei den NK-Zellen nicht für die Zell-proliferation sondern für die zytotoxische Funktion verantwortlich [Gunji et al. 1989; Van-den-Brink et al. 1990; Ayroldi et al. 1992]. Außerdem ist die Expression des IL-2-Rezeptors auf Monozyten und Granulozyten (siehe Einleitung 1.2) ein Hinweis, dass die Wirkung von IL-2 nicht spezifisch auf Lymphozyten beschränkt ist. Der IL-2 Bedarf der NK/LAK-Effektorzellen ist kein Beweis dafür, dass die NK/LAK-Zellen Lymphozyten sind.

In dieser Arbeit wurde ein noch nicht beschriebenes jedoch wichtiges Phänomen bei der Entwicklung der Makrophagen-Vorläufer aus dem Knochenmark beobachtet, nämlich: wenn diese Makrophagen-Vorläufer des Knochenmarks in frühem Stadium dem IL-2 Stimulationssignal begegnen, werden sie potent sein, zu NK/LAK-Effektoren zu differenzieren. Da diese Effektorzellen morphologisch, phänotypisch, funktionell sowie zytochemisch alle typischen Charaktermerkmale der NK-Zellen aufweisen, sind wir der Ansicht, dass diese von IL-2 aktivierten Makrophagen-Vorläuferzellen die NK-Zellen sind. Unsere KM-Kultur beginnt allerdings nicht mit den gesamten Knochenmarkzellen, sondern nur mit der leichten Percoll-Fraktion, aber es wurde durch den IL-2 Stimulationstest überprüft, dass die Zellen in den schweren Percoll-Fractionen kaum NK-Vorläuferzellen enthielten (siehe Tab. 1). Silvennoinen et al. zeigten ebenfalls, dass die Knochenmark-Vorläufer der NK-Zellen nur in den leichten Percoll-Fractionen zu finden sind [Silvennoinen et al. 1986].

Aus den obengenannten Gründen kann vermutet werden, dass die von anderen Autoren beschriebenen NK/LAK-Effektor-Zellen aus den Knochenmark-Vorläufern stammen, die entweder durch IL-2-Aktivierung zu NK/LAK-Zellen oder durch CSF-1-Stimulierung zu Makrophagen differenzieren können. Unsere Ergebnisse sind teilweise mit denen von Sitnicka et al. vereinbar. Diese Autoren zeigten mit den Experimenten aus der "LTBMC"-

Kung, 1980 年; Tai 与 Werner, 1980 年; Ortaldo 等, 1981 年】, 许多作者相信: NK 细胞属于淋巴细胞。其主要的论据是: NK 活性的出现依赖于 IL-2, 而 IL-2 是已知的对淋巴细胞专一的生长因子【Herberman 等, 1987 年】。如上文已提到: 对于 NK 细胞来说, IL-2 不是对细胞的增殖而是对杀伤活性的功能起了作用【Gunji 等, 1989 年; Van-den-Brink 等, 1990 年; Ayroldi 等, 1992 年】。此外, IL-2 受体在单核细胞与粒细胞上的表达 (见绪论 1.2) 提示着: IL-2 的作用并非特异地限制在淋巴细胞上。NK/LAK 效应细胞对 IL-2 的需求不是 NK/LAK 细胞属于淋巴细胞的证据。

在本工作中, 一个尚未被报道但重要的现象在来自骨髓的巨噬细胞前体的发育中被观察到, 那就是: 当这些骨髓巨噬细胞前体在早期遇上 IL-2 的刺激信号时, 它们有能力分化成为 NK/LAK 效应细胞。因为这些效应细胞在形态、表型、功能以及细胞化学方面都显示出了 NK 细胞典型的性质特征, 我们认为: 这些由 IL-2 活化的巨噬细胞前体是 NK 细胞。虽然我们的骨髓细胞培养的起始并未使用全骨髓细胞, 而只使用了轻的 Percoll 分离细胞层, 但通过 IL-2 的刺激实验证实: 在重的 Percoll 分离细胞层中, 几乎不含 NK 前体细胞 (见表 1)。Silvennoinen 等也指出: NK 细胞的骨髓前体细胞只在轻的 Percoll 分离细胞层中被发现【Silvennoinen 等, 1986 年】。

依据上述的理由可以推测: 被其他作者所报道的 NK/LAK 效应细胞起源于骨髓前体细胞, 这些前体细胞能够要么通过 IL-2 的活化朝向 NK/LAK 细胞, 要么通过 CSF-1 的刺激朝向巨噬细胞分化。我们的结果部分地与来自 Sitnicka 等的结果相一致。这些作者根据来自“长期骨髓细胞培养”的实

Kultur, dass die KM-Vorläufer für NK/LAK-Zellen unter dem Einfluss von GM-CSF allein zu Granulozyten-Makrophagen ausdifferenzierten [Sitnicka & Hansson 1992]. Wir stimmen darin überein, dass es im Knochenmark einen gemeinsamen Vorläufer für die NK-Zellen und die myeloischen Zellen gibt. Das Stadium der Vorläufer wird jedoch von uns unterschiedlich definiert. Sitnicka und Hasson sind der Meinung, dass diese Vorläufer noch die pluripotenten Stammzellen sind, die entweder zu lymphoiden oder zu myeloiden Zellen differenzieren können. Unsere Daten zeigen aber, dass diese Vorläufer-Zellen schon in die myeloische Linie eingetreten sind, weil der Lymphozyten-Wachstumsfaktor IL-2 die Zellen weder zum Proliferieren (siehe Abb.2 und 10) noch zum Differenzieren zu T-Zellen (CD3⁺) stimulieren konnte (siehe Abb. 20).

4.2. Differenzierung der Makrophagen-Vorläufer des Knochenmarks unter dem Einfluss von CSF-1 und IL-2

Beruhend auf den Daten dieser Arbeit wird eine Hypothese über die Differenzierungsmöglichkeiten der Makrophagen-Vorläufer des Knochenmarks, wie in Abb.25 dargestellt, vorgeschlagen:

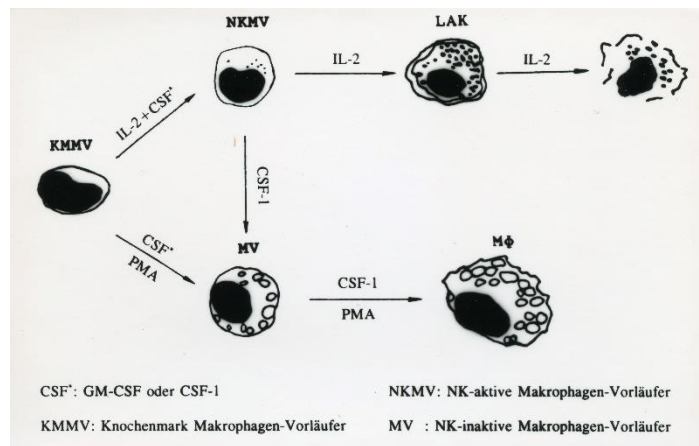
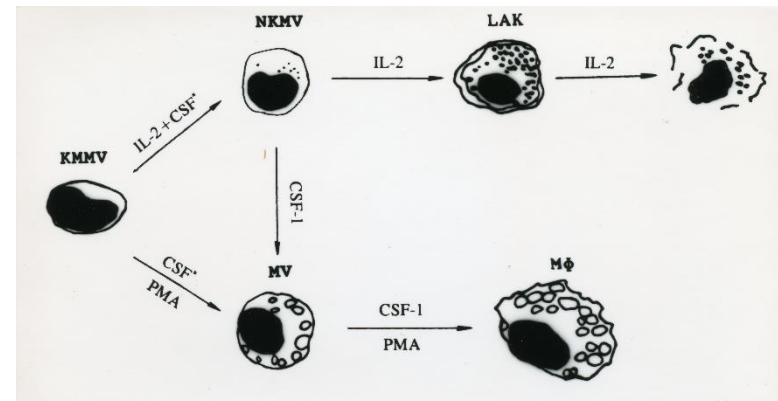


Abb.25. Eine Hypothese über die Differenzierungsmöglichkeiten der Makrophagen-Vorläufer des Knochenmarks

验指出: NK/LAK 细胞的骨髓前体细胞在 GM-CSF 单独的影响下分化成为粒细胞-巨噬细胞【Sitnicka 与 Hansson, 1992 年】。我们赞同这样的观点: 骨髓中存在一种对 NK 细胞和髓系细胞共同的前体细胞。但我们对前体细胞阶段的定义却不一样。Sitnicka 与 Hasson 认为: 这些前体细胞还处于多能干细胞的阶段, 它们能够要么朝着淋巴细胞, 要么朝着髓系细胞进行分化。我们的数据却显示出: 这些前体细胞已经进入到了髓系细胞的体系, 因为淋巴细胞的生长因子 IL-2 对于这些细胞的刺激既不能促其增殖(见图 2 与 10) 也不能使其分化成为 CD3⁺ 的 T 细胞(见图 20)。

4.2 骨髓巨噬细胞前体在 CSF-1 与 IL-2 影响下的分化

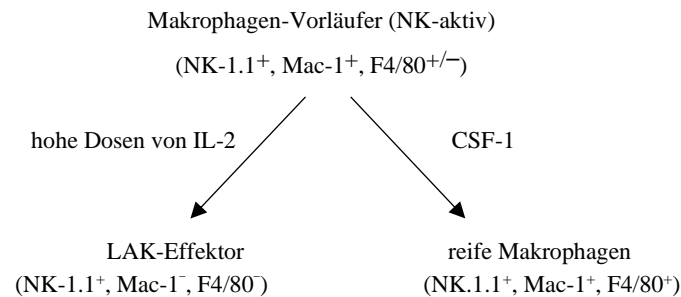
基于本工作的数据, 笔者提出一个关于骨髓巨噬细胞前体分化可能性的推测, 如图 25 所示:



KMMV: 骨髓巨噬前体; CSF*: GM-CSF 或 CSF-1; PMA: 佛波酯; MV: 普通巨噬前体; MΦ: 巨噬细胞; NKMV: 有 NK 活性的巨噬前体; LAK: LAK 细胞

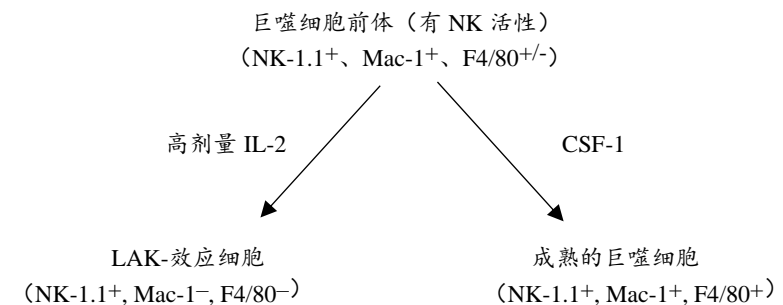
图25 一个关于骨髓巨噬细胞前体分化可能性的推测图示。

Während der Differenzierungsvorgänge verändert sich der Phänotyp der MV-Zellen je nach den Kulturbedingungen. Unter den getesteten monoklonalen anti-Oberflächenmarker Antikörper war NK-1.1 der einzige gemeinsame Oberflächenmarker für alle Differenzierungsstadien der MV-Zellen. F4/80, ein typischer Marker für die reifen Makrophagen [Anstyn & Gordon 1981], konnte nur schwach auf den NK-aktiven Zellen aber nicht auf den LAK-aktiven Zellen nachgewiesen werden (siehe Abb.9 und 20). Ebenso wurde eine noch deutlichere Abnahme der Expression von Mac-1 bei der Entwicklung von NK-aktiven zu LAK-aktiven Zellen beobachtet (Abb.9 und 20). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der Phänotyp von KM-Makrophagen-Vorläufern sich unter den Einfluss von IL-2 oder CSF-1 folgendermaßen entwickelt:



Unsere Beobachtung, dass bei der LAK-Induktion mit hohen Dosen IL-2 die MV-Zellen ihre Oberflächenmarker Mac-1 und F4/80 verlieren, stimmt mit den Ergebnissen von anderen Forschern überein. Grimm et al. fanden bei der LAK-Kultur, dass die LAK-Effektorzellen negativ für Mac-1 Marker sind [Grimm et al. 1982]. Parr et al. beschrieben, dass die viel Perforin enthaltenden NK/LAK-ähnlichen Zellen keinen F4/80 Marker exprimieren [Parr et al. 1990]. Wie solche Zellmarker durch IL-2 Stimulation herunterreguliert werden, bleibt noch zu untersuchen.

在分化的过程期间, 巨噬细胞前体的表型 (表面标志物) 根据培养条件而自行变化。在所测试过的单克隆抗表面标志物的抗体中, NK-1.1 是唯一共有表面标志物, 表达在巨噬细胞前体所有的分化阶段。F4/80 (一个成熟巨噬细胞的典型标志物【Anstyn 与 Gordon, 1981 年】) 只能较弱地在有 NK 活性的细胞上但不在有 LAK 活性的细胞上被检测到 (见图 9 与图 20)。同样地, 一个更为清晰的 Mac-1 表达的减少在从有 NK 活性到有 LAK 活性的细胞发展中被观察到 (图 9 和 20)。总结起来可以说: 骨髓巨噬细胞前体的表型在 IL-2 或者 CSF-1 的影响下会以下述方式发展:



我们的观察是: 在使用高剂量 IL-2 诱导 LAK 活性时, 巨噬细胞前体失去了它们的表面标志物 Mac-1 和 F4/80。这一观察与来自其他研究者的结果相一致。Grimm 等在 LAK 培养中发现: LAK 效应细胞的 Mac-1 标志物为阴性【Grimm 等, 1982 年】。Parr 等写道: 含有大量穿孔素的与 NK/LAK 相似的细胞不表达 F4/80 标志物【Parr 等, 1990 年】。这些细胞标志物是怎样通过 IL-2 的刺激被下调的, 尚待继续研究。

Diese Arbeit zeigt, dass die Wirkung von IL-2 auf die Makrophagen-Vorläufer auf der Gen-Ebene abläuft. In den MV-Zellen, die durch IL-2 aktiviert worden waren, wurde Perforin Messenger-RNA gefunden (Abb.22 Lane 2,3,4), die von den normalen MV-Zellen (nur mit CSF kultiviert) konstitutiv nicht exprimiert wurde (Abb.22 Lane 1). Das Anschalten des Gens zum Synthetisieren der Perforin Messenger-RNA erscheint durch eine frühzeitige IL-2-Stimulation bedingt zu sein, weil die MV-Zellen, die in CSF allein nur für 3 Tage vorkultiviert waren, nicht mehr fähig waren, unter der Stimulation mit IL-2 die Perforin-mRNA zu synthetisieren (siehe Abb.22 Lane 6). Auch die Daten aus dem NK-Aktivitätstest bestätigen, dass eine frühzeitige Zugabe von IL-2 wesentlich für die NK-Induktion ist (siehe Abb.4). Wenn IL-2 erst 24 h später in eine Vorkultur mit CSF allein hinzugefügt wurde, wurde die Induktion der NK-Aktivität dramatisch reduziert; wurde IL-2 erst 48 später hinzugegeben, dann war keine Induktion mehr zu beobachten. Dies kann dadurch erklärt werden, dass der Reifungsprozess zur Makrophagen-Entwicklung die Perforin-Produktionsfähigkeit der MV-Zellen vermindert. Vor kurzem haben Ayroldi et al. berichtet, dass die von IL-2 induzierte NK-Entwicklung in Knochenmark-Kulturen durch PMA inhibiert wurde [Ayroldi et al. 1993]. In der vorliegenden Arbeit wurde beobachtet, dass PMA den Reifungsprozess von Vorläuferzellen zu Makrophagen beschleunigt (siehe Abb.6). Es kann daher vermutet werden, dass PMA die Induktion der NK-Aktivität dadurch verhindert, dass PMA die jungen Knochenmark-Vorläufer, die mit IL-2 reagieren können, rasch in ein reiferes Stadium treibt. Somit sind die Zellen trotz der Anwesenheit von IL-2 nicht mehr in der Lage, Perforin zu synthetisieren, dessen Vorhandensein für die NK-Aktivität wesentlich ist. Es sind weitere Untersuchungen notwendig, um festzustellen, ab welchem Stadium ein Vorläufer nicht mehr zur Perforin-Produktion stimulierbar ist.

Wurde der Kultur IL-2 entzogen, verschwanden sowohl Perforin-mRNA in den Zellen (siehe Abb.22 Lane 5) als auch die NK-Aktivität (Tab.6. Nr. 5). Die Zytotoxizität der MV-Zellen gegen NK-Zielzellen (Yac-1) ist also streng IL-2-abhängig. Der Befund

本工作展示出: IL-2 对巨噬细胞前体的作用在基因水平上进行。在被 IL-2 活化后的巨噬细胞前体中, 穿孔素的信使 RNA 被发现 (图 22 第 2、3、4 列), 它们没有被普通的巨噬细胞前体 (只与 CSF 培养而成) 作为结构基因来表达 (图 22 第 1 列)。此基因开放合成穿孔素信使 RNA, 看上去是通过一种早期的 IL-2 的刺激为条件, 因为那些在 CSF 单因子中仅进行了 3 天前培养的巨噬细胞前体不再具有这样的能力——在 IL-2 的刺激下合成穿孔素信使 RNA (见图 22 第 6 列)。还有, 来自 NK 活性测定的数据证实: 早期添加 IL-2 对 NK 的诱导至关重要 (见图 4)。当 IL-2 在 24 小时之后才添加到只有 CSF 的前培养中时, NK 活性的诱导将大幅度降低; 若 IL-2 在 48 小时之后才加入, 那就不再具有诱导可观察到了。此现象可以这样解释: 巨噬细胞发育的成熟过程减少了巨噬细胞前体对穿孔素的制造能力。不久前, Ayroldi 等报道: 在骨髓细胞培养中, 由 IL-2 诱导的 NK 发育被 PMA 抑制了【Ayroldi 等, 1993 年】。本工作观察到: PMA 加速了前体细胞向巨噬细胞的成熟过程 (见图 6)。由此可推测: PMA 抑制 NK 活性的诱导是通过将年幼的骨髓前体细胞 (其能够与 IL-2 起反应) 迅速地推入了一个更成熟的阶段。因此, 虽然细胞在有 IL-2 的环境中, 却不再处于能够合成穿孔素的状态, 而穿孔素的存在对于 NK 活性来说是不可缺少的。有必要做进一步的研究以确定: 从哪个阶段开始, 前体细胞不再是可刺激产生穿孔素的了。

如若在培养中移出 IL-2, 不仅细胞中的穿孔素 mRNA 消失了 (见图 22 第 5 列), 而且 NK 活性也消失了 (表 6 中编号 5)。可见, 巨噬细胞前体对 NK 靶细胞 (Yac-1) 的杀伤活性强烈地依赖于 IL-2。本工作的发现带

der vorliegenden Arbeit bringt einen neuen Aspekt zu der langjährig umstrittenen Frage, ob die NK/LAK-Zellen zu Lymphozyten oder zum Makrophagen-system gehören. Viele Autoren präsentierten Daten über die IL-2-Abhängigkeit der NK/LAK-Aktivität, um zu beweisen, dass die NK/LAK-Effektorzellen zu Lymphozyten gehören. Zusätzlich wurde gezeigt, dass in der Kultur nur mit CSF-1 keine NK-Zytotoxizität zu finden ist [Ortaldo et al. 1984; Koo & Manyak 1986]. Deshalb wurde angenommen, dass die Zellen des Makrophagen-systems keine NK-Aktivität haben können. Unsere Daten stimmen zwar mit diesen Ergebnissen überein, jedoch kommen wir zu anderen Schlussfolgerungen. Da die Makrophagen-Vorläufer IL-2 zum Synthetisieren des Perforins benötigen, ist die NK-Aktivität, die auf das Vorhandensein des Perforin angewiesen ist, von IL-2 abhängig. Hingegen übt CSF-1 nur eine stimulierende Wirkung auf das Zellwachstum aus, daher ist zu erwarten, dass die Zellkultur mit CSF-1 allein nicht zu NK-Aktivität führt. In früheren Studien über die Ähnlichkeiten zwischen Promonozyten und NK-Zellen wurde die wichtige Rolle des IL-2s für die Induktion der NK-Aktivität in Makrophagen-Vorläufern nicht erkannt. Die damaligen Knochenmark-Kulturen wurden mit gesamten Knochenmarkzellen in L-Zell konditioniertem Medium durchgeführt [Lohmann-Matthes et al. 1979; Baccarini et al. 1985, 1988]. Der einzige bekannte Faktor in der Kultur war CSF-1. Seit rekombinantes CSF-1 in den KM-Kulturen angewendet wird und die Kulturen mit den fraktionierten KM-Zellen beginnen, ist NK-Aktivität in den Kulturen ohne Zugabe von IL-2 nicht zu beobachten. Dies weist darauf hin, dass die KM-Kulturen in früheren Studien wahrscheinlich die NK-Aktivität-stimulierende Faktoren, wie IL-2, selbst produzierten. Die in der vorliegenden Arbeit gefundene Wirkung von IL-2 auf Makrophagen-Vorläufer konnte eine wichtige Ergänzung für die Differenzierungstheorie der Makrophagen-Vorläufer beitragen.

IL-2 kann auch die Zytokin-Produktionsfähigkeit der MV-Zellen stark beeinflussen. In dieser Arbeit wurde beispielsweise beobachtet, dass die durch IL-2 aktivierten, NK-aktiven MV-Zellen IFN- γ sezernierten, während die normalen, NK-inaktiven MV-Zellen kein IFN- γ produzierten (Tab. 11). Der Einfluss von IL-2 auf die Zellen scheint im frühen

kam einen neuen Blickwinkel auf das langjährige Streitthema: Sind NK/LAK-Zellen Lymphozyten oder gehören sie zum Makrophagen-System? Viele Autoren zeigten Daten zur IL-2-Abhängigkeit der NK/LAK-Aktivität, um zu beweisen, dass diese Zellen Lymphozyten sind. Außerdem wurde festgestellt, dass in Kulturen ohne CSF-1 keine NK-Zytotoxizität nachweisbar ist [Ortaldo et al. 1984; Koo & Manyak 1986]. Daher wurde angenommen, dass Makrophagen-Systeme keine NK-Aktivität aufweisen können. Unsere Ergebnisse stimmen mit diesen überein, führen jedoch zu anderen Schlussfolgerungen. Da Makrophagen-Vorläufer IL-2 zur Synthese von Perforin benötigen, ist die NK-Aktivität, die von Perforin abhängt, von IL-2 abhängig. CSF-1 wirkt hingegen nur stimulierend auf das Zellwachstum, weshalb man erwarten kann, dass eine Kultur mit CSF-1 allein keine NK-Aktivität induziert. Frühere Studien über die Ähnlichkeit von Promonozyten und NK-Zellen haben die Rolle von IL-2 bei der Induktion der NK-Aktivität bei Makrophagen-Vorläufern übersehen. Die damaligen Knochenmarkkulturen wurden mit Gesamtknochenmarkzellen in L-Zell-konditioniertem Medium durchgeführt [Lohmann-Matthes et al. 1979; Baccarini et al. 1985, 1988]. Der einzige bekannte Faktor war CSF-1. Seit rekombinantes CSF-1 in den Knochenmarkkulturen eingesetzt wird und man mit fraktionierten Knochenmarkzellen beginnt, ist in diesen Kulturen ohne IL-2 keine NK-Aktivität zu sehen. Dies deutet darauf hin, dass die Knochenmarkkulturen in früheren Studien wahrscheinlich die stimulierenden Faktoren für die NK-Aktivität, wie IL-2, selbst produzierten. Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Wirkung von IL-2 auf Makrophagen-Vorläufer könnte eine wichtige Ergänzung zur Differenzierungstheorie der Makrophagen-Vorläufer sein.

IL-2 kann auch die Zytokin-Produktionsfähigkeit der MV-Zellen stark beeinflussen. In dieser Arbeit wurde beispielsweise beobachtet, dass durch IL-2 aktivierte, NK-aktive MV-Zellen IFN- γ sezernieren, während normale, NK-inaktive MV-Zellen kein IFN- γ produzieren (Tab. 11). Der Einfluss von IL-2 auf die Zellen scheint im frühen

Stadium sehr wichtig, denn bei dem Zytokin-Induktionsexperiment konnte derselbe Stimulator (Tumorzellen+IL-2) die NK-aktiven MV-Zellen zu IFN- γ -Freisetzung stimulieren, aber die normalen MV-Zellen nicht. Es ist bekannt, dass IFN- γ von aktivierten T-Zellen [Trinchieri et al. 1985] und NK-Zellen [Michael et al. 1989] produziert wird, aber nicht von Monozyten/Makrophagen. Da unsere NK-aktive MV-Zellpopulation frei von T-Zellen war (siehe Abb.9), ist es ausgeschlossen, dass das in dieser Arbeit gefundene IFN- γ von kontaminierenden T-Zellen freigesetzt wurde. Außerdem haben wir beobachtet, dass die von IL-2 aktivierten, NK-aktiven MV-Zellen bei der Produktion von TNF (Tab.7), IL-6 (Tab.9), IL-10 (Tab.10), sowie Kolonie-stimulierenden Faktoren (Tab.13, 14) viel aktiver sind als die normalen, NK-inaktiven MV-Zellen.

Die aktive Zytokin-Produktion, insbesondere CSF-Freisetzung von NK/LAK-Zellen spricht dafür, dass die langjährige Kontroverse über die Proliferationswirkung von IL-2 auf NK/LAK-Zellen wahrscheinlich auf einen oder mehrere von IL-2 induzierten Faktor/en zurückzuführen ist. 1989 beobachteten Gunji et al. bei einer *in vitro* Kultur mit den NK/LAK-Zellen aus Milz, dass außer IL-2 noch ein "konditioniertes Medium", das aus einer 3-tägigen Vorkultur derselben Zellen mit IL-2 (1000 U/ml) stammte, in die Kultur eingesetzt werden musste, um die Proliferation der NK/LAK-Zellen zu bewirken. Aufgrund unserer Daten (siehe Tab.13 LAK-aktive) und denen aus anderen Labors [Cuturi et al. 1989], die zeigen, dass IL-2 die NK/LAK-Effektoren zur CSF-Synthese stimuliert, kann vermutet werden, dass dieses "konditionierte Medium" wahrscheinlich die Kolonie-stimulierenden Faktoren, wie z.B. GM-CSF, CSF-1, oder IL-3, enthält, die für die Vermehrung der NK/LAK-Zellen verantwortlich sind.

Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Daten über die Fähigkeit der NK-aktiven MV-Zellen Zytokine zu produzieren stimmen mit denen aus der NK-Zellen Forschung (siehe Einleitung 1.5) annähernd überein. Die von IL-2 aktivierten MV-Zellen reagierten auf die Stimulierung durch NK-Zielzellen (Yac-1) deutlich empfindlicher als die normalen, NK-inaktiven MV-Zellen hinsichtlich ihrer TNF-, IL-1-, und IL-10-Produktion (siehe

的影响显示出在早期阶段很重要,因为在细胞因子诱导实验中,同样的刺激物(肿瘤细胞+IL-2)能够对有NK活性的巨噬细胞前体产生释放IFN- γ 的刺激,但对普通的巨噬细胞前体却不能。众所周知:IFN- γ 由被活化的T细胞【Trinchieri等,1985年】与NK细胞【Michael等,1989年】产生,却不能被单核/巨噬细胞产生。由于我们培养的有NK活性的巨噬细胞前体群不含T细胞(见图9),可以排除在本工作中发现的IFN- γ 由污染的T细胞所释放。我们还观察到:被IL-2活化的、有NK活性的巨噬细胞前体在产生TNF(表7)、IL-6(表9)、IL-10(表10)、以及集落刺激因子(表13、14)方面比普通的巨噬细胞前体要活跃得多。

活跃的细胞因子产生,尤其是NK/LAK细胞对CSF的释放说明:关于IL-2对NK/LAK细胞的增殖作用的长年争论可能归因于一个或多个由IL-2诱导出的因子。1989年, Gunji等观察到:在一个使用来自脾脏的NK/LAK细胞的体外培养中,除了IL-2,还必须加入一种“条件培养液”(使用1000 U/mL IL-2对同样的细胞进行3天的前培养而获得),为的是促成NK/LAK细胞的增殖。基于我们的数据(见表13中有LAK活性)和来自其他实验室显示IL-2刺激NK/LAK效应细胞合成CSF的数据【Cuturi等,1989年】,可以推测:这个“条件培养液”很可能含有集落刺激因子,比如GM-CSF、CSF-1、或者IL-3,这些因子对于NK/LAK细胞的扩增起了主要的作用。

本工作展示的关于有NK活性的巨噬细胞前体产生细胞因子能力的的数据,与来自NK细胞的研究数据(见绪论1.5)大致相同。被IL-2活化的巨噬细胞前体对来自NK靶细胞(Yac-1)刺激的反应明显地比普通的、无NK活性的巨噬细胞前体更为敏感,这表现在它们对TNF、IL-1、及

Tab. 7, 8, 10). Die Ergebnisse aus der IL-10-Untersuchung weisen darauf hin, dass ganz unabhängig von der IL-2 Stimulierung die MV-Zellen die Yac-1-Zellen erkennen können, weil beide NK-aktive und NK-inaktive MV-Zellen bei den Stimulationen mit Yac-1 und P815 nur spezifisch auf Yac-1-Zellen mit IL-10-Freisetzung reagierten (siehe Tab.10). IL-10 ist ein relativ neu entdeckter Faktor, der sowohl hemmende Wirkungen auf Th1 (T-Helfer 1) Zellen und Monozyten/ Makrophagen [Fiorentino et al. 1991a und b; De-Waal-Malefyt et al. 1991, 1993] als auch stimulierende Wirkungen auf B-Zellen [Go et al. 1990; Defrance et al. 1992], zytotoxische T-Zellen [Chen & Zlotnik 1991], sowie Mastzellen [Thompson-Snipes et al. 1991] ausübt. Welche Bedeutung diese IL-10 Freisetzung aus MV-Zellen hat, ist noch unklar.

4.3. *in vivo* Anwendung der kultivierten LAK-Zellen und Analyse der Ursache für die Nebenwirkungen der Immuntherapie mit LAK-Zellen plus hohe Dosen IL-2

Vor ein paar Jahren wurde berichtet, dass Immuntherapie mit *in vitro* kultivierten NK/LAK-Zellen zu einer Regression von Tumoren führte [Lafreniere & Rosenberg 1985]. Bedauerlicherweise steht bis heute keine effektive Kulturbedingung für eine schnelle *in vitro* Expansion der NK/LAK-Zellen zu Verfügung. Aus der vorliegenden Arbeit kann vielleicht eine neue *in vitro* Kulturbedingung, die aus CSF als Wachstumsfaktor und IL-2 als Zytotoxizität-stimulierendem Faktor besteht, für die Kultivierung der NK/LAK-Effektoren hervorgehen. Bei der Immuntherapie wurden häufig die *in vitro* kultivierten LAK-Zellen mit hohen Dosen IL-2 (als LAK-Aktivität stimulierender Faktor) eingesetzt. Dabei beobachtet man sowohl Regression von Tumoren als auch stark toxische Nebenwirkungen, wie z.B. "vascular leak syndrome" [Rosenberg et al. 1985; Lotze et al. 1986; Rosenstein et al. 1986; und Peace et al. 1989]. Der Grund dafür ist noch nicht geklärt.

In der vorliegenden Arbeit wurde beobachtet, dass hohe Dosen IL-2 eine erhebliche

IL-10 der Produktion (siehe Tab. 7, 8, 10). Aus den IL-10 Messungen ergibt sich: In der Abwesenheit von IL-2, können Vorläuferzellen von Makrophagen Yac-1-Zellen erkennen, weil sowohl NK-aktive als auch NK-inaktive Vorläuferzellen bei den Stimulationen mit Yac-1 und P815 nur spezifisch auf Yac-1-Zellen mit IL-10-Freisetzung reagierten (siehe Tab.10). IL-10 ist ein relativ neu entdeckter Faktor, der sowohl hemmende Wirkungen auf Th1 (T-Helfer 1) Zellen und Monozyten/ Makrophagen [Fiorentino et al. 1991a und b; De-Waal-Malefyt et al. 1991, 1993] als auch stimulierende Wirkungen auf B-Zellen [Go et al. 1990; Defrance et al. 1992], zytotoxische T-Zellen [Chen & Zlotnik 1991], sowie Mastzellen [Thompson-Snipes et al. 1991] ausübt. Welche Bedeutung diese IL-10 Freisetzung aus MV-Zellen hat, ist noch unklar.

4.3 体内应用培养的 LAK 细胞与 LAK 细胞加高剂量 IL-2 免疫治疗副作用的原因分析

几年前有报道称:使用体外培养的 NK/LAK 细胞的免疫治疗带来了肿瘤的缩小 [Lafreniere 与 Rosenberg, 1985 年]。遗憾的是,至今还无有效的培养条件可用于快速在体外扩增 NK/LAK 细胞。从本工作中,也许能产生一种新的体外培养条件,它以 CSF 作为生长因子、以 IL-2 作为杀伤活性刺激因子而组成,用以培养 NK/LAK 效应细胞。免疫治疗时,体外培养的 LAK 细胞与高剂量 IL-2 (作为 LAK 活性刺激因子)经常共用。与此同时,人们观察到既有肿瘤的缩小,也有强烈的毒性副作用,例如“血管渗漏综合症 (vascular leak syndrome)” [Rosenberg 等, 1985 年; Lotze 等, 1986 年; 以及 Peace 等, 1989 年]。产生此问题的原因尚未得到解释。

本工作观察到:高剂量的 IL-2 在 NK/LAK 效应细胞中引发了细胞裂

Vermehrung des zytolytischen Perforins in NK/LAK-Effektorzellen hervorruft (Abb. 18 und 24), und dass die mit vielen Perforin-Granula gefüllten LAK-Zellen schließlich fragmentieren und somit eine Freisetzung von Perforin aus den LAK-Zellen stattfindet (Abb.19). Dies könnte eine Ursache für die toxischen Nebenwirkungen sein. Andererseits zeigen unsere Ergebnisse, dass IL-2 zu einer Erhöhung der IL-6-Freisetzung führt (Tab.9). Wie in der Einleitung 1.4 erwähnt, hat IL-6 eine synergistische Wirkung auf die von IL-2 induzierte Perforin-Synthese, deshalb ist es vorstellbar, dass die Perforin-Vermehrung in den LAK-Zellen wegen des Vorhandenseins des IL-6s noch effektiver und schneller abläuft. Als Folge kommt es früher zur Zersetzung der LAK-Zellen im Körper. Daher scheint es nicht empfehlenswert zu sein, hohe Dosen IL-2 zusammen mit LAK-Zellen *in vivo* einzusetzen. Die anderen Nebenwirkungen könnten von den aus NK/LAK-Zellen ausgeschütteten Zytokine verursacht werden. Daher konnten die Zytokin-Produktionsdaten dieser Arbeit für die *in vivo* Anwendung der NK/LAK-aktiven Zellen nützlich sein, um manche Nebenwirkungen zu vermindern.

4.4. Vergleich der Eigenschaften von den unstimulierten Makrophagen-Vorläufern, den durch IL-2 stimulierten Makrophagen-Vorläufern, und den in der Literatur beschriebenen NK/LAK-Zellen.

Basierend auf die Ergebnisse vorliegender Arbeit werden die wichtigsten Charaktermerkmale der beiden Typen von MV-Zellen, nämlich der normalen (NK-inaktiven) und der NK-aktiven Makrophagen-Vorläufer, in Tabelle 16 (siehe nächste Seite) zusammengefasst präsentiert und mit den in der Literatur beschriebenen NK/LAK-Zellen vergleichend dargestellt.

解性穿孔素的显著扩增 (图 18 与 24), 而被大量穿孔素颗粒充满的 LAK 细胞最终会碎裂, 由此发生穿孔素被释放到 LAK 细胞外 (图 19)。这可能是其毒性副作用的原因之一。另一方面, 我们的结果显示: IL-2 导致了 IL-6 释放的升高 (表 9)。如在绪论 1.4 所述, IL-6 有着一种对 IL-2 诱导的穿孔素合成的协同作用, 因此可以想象: 在 LAK 细胞中, 穿孔素的扩增可能由于 IL-6 的存在而更加有效并快速地进行。作为后果, LAK 细胞在体内的碎裂会发生得更早。由此看来, 将高剂量 IL-2 与 LAK 细胞一起用于体内的做法是不值得推荐的。其他的副作用可能是由于 NK/LAK 细胞释放出的细胞因子所引发的。故而为了避免某些副作用, 本工作的细胞因子释放数据对于体内应用有 NK/LAK 活性的细胞可能是有用的。

4.4 未受刺激的巨噬细胞前体、受到 IL-2 刺激的巨噬细胞前体与文献报道的 NK/LAK 细胞的特性比较

基于本工作的实验结果, 两种类型的巨噬细胞前体 (即普通、无 NK 活性的巨噬细胞前体与有 NK 活性的巨噬细胞前体) 的最重要的性质特征在表 16 (见下页) 中被概括地呈现出来, 并与文献中描述的 NK/LAK 细胞以比较的方式作了展示。

Tab. 16 Vergleich der Eigenschaften von MV-Zellen mit denen von NK/LAK-Zellen

Eigenschaften	MV-Zellen			in der Literatur beschriebene NK/LAK-Zellen
	normal	NK-aktive	LAK-aktive	
1) Allgemein:				
Größe	16-20 µm	16-20 µm	20-25 µm	16-20/20-25µm
K/Z* Verhältnis	hoch	hoch	mittel	hoch/mittel
Adhärenz	-	-	+	-/+
Perforin Granula	-	+	++	+ / ++
2) Oberflächenmarker:				
Mac-1	+	+	-	+/-
NK-1.1	+	+	+	+ / +
F4/80	schwach	schwach	-	?/-
3) Zytotoxizität:				
gegen Yac-1	-	+	++	+ / ++
gegen P815	-	-	++	- / ++
4) Zytokin-Freisetzung:				
IL-1	+	+		+
IL-3	-	+	+	+
IL-6	+	++		++
IL-10	+	++		
TNF-α	+	++		++
IFN-γ	-	+		+
GM-CSF	-	-	+	+
M-CSF	-	+		+

* K/Z: Kern / Zytoplasma

表 16 比较巨噬细胞前体与 NK/LAK 细胞的特性

特点	巨噬前体细胞			文献中描述的 NK/LAK 细胞
	普通	有NK活性	有LAK活性	
1) 通性:				
个头	16-20 µm	16-20 µm	20-25 µm	16-20/20-25µm
核/质*比	高	高	中等	高/中等
粘性	-	-	+	-/+
穿孔素颗粒	-	+	++	+ / ++
2) 表面标志物:				
Mac-1	+	+	-	+/-
NK-1.1	+	+	+	+ / +
F4/80	弱	弱	-	?/-
3) 杀伤活性:				
对 Yac-1	-	+	++	+ / ++
对 P815	-	-	++	- / ++
4) 释放细胞因子:				
IL-1	+	+		+
IL-3	-	+	+	+
IL-6	+	++		++
IL-10	+	++		
TNF-α	+	++		++
IFN-γ	-	+		+
GM-CSF	-	-	+	+
M-CSF	-	+		+

* 核/质: 细胞核/细胞质

Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen dafür, dass die Knochenmark-Vorläuferzellen des Makrophagen-systems zu zytolytischen NK/LAK-Effektorzellen differenzieren können.

本工作的结果表明：巨噬细胞系的骨髓前体细胞能够分化成为具有细胞裂解活性的NK/LAK效应细胞。

5. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde eine günstige Knochenmarkkultur-bedingung zum Expandieren der NK/LAK-Effektorzellen etabliert. Diese Knochenmark-Kultur enthält CSF (CSF-1 oder GM-CSF) als Wachstumsfaktor und IL-2 als NK/LAK-Aktivität stimulierenden Faktor und kann innerhalb von 3-6 Tagen zirka 10-fach mehr NK/LAK-Effektorzellen produzieren als die heutzutage allgemein benutzte LTBMK ("long-term bone marrow culture"), die normalerweise 4 Wochen dauert und als die einzige geeignete Knochenmark-Kulturbedingung für NK/LAK-Zellen beschrieben wurde [Vecchini et al. 1993].

Die aus der Knochenmark-Kultur mit CSF+IL-2 isolierten NK-aktiven Zellen zeigten eine "large-granular lymphocyte" (LGL)-ähnliche Morphologie und konnten bis auf > 90% gereinigt werden. Der Phänotyp (Oberflächenantigen-Profil) der gereinigten Zellen war positiv für Mac-1 und NK-1.1 und negativ für alle typischen T- und B-Zell-Marker, wie Lyl-1, Lyl-2 (CD8), L3T4 (CD4) und B220. Diese NK-1.1 positiven, NK-aktiven Zellen proliferierten in Gegenwart von CSF (CSF-1 oder GM-CSF), aber nicht von IL-2, und differenzieren unter dem Einfluss von PMA (Phobol-12-Myristate-13-Acetate), welches die Differenzierung stimuliert, innerhalb von 24 Stunden zu reifen Makrophagen aus. Deshalb wurden sie als Makrophagen-Vorläufer identifiziert.

Die NK-aktiven Makrophagen-Vorläufer konnten ihre Zytotoxizität in Gegenwart von IL-2 aufrechterhalten. Wurde IL-2 der Kultur entzogen, war die Zytotoxizität am nächsten Tag nicht mehr nachweisbar. Auf der anderen Seite erwarben diese NK-aktiven Makrophagen-Vorläufer LAK-Aktivität (lytisch gegen sowohl NK-empfindliche als auch NK-resistente Zielzellen), wenn sie mit hohen Dosen IL-2 kultiviert wurden. Der Phänotyp der LAK-aktiven Zellen (NK-1.1⁺, CD3⁻, Mac-1⁻ und F4/80⁻) entsprach dem der in der Literatur beschriebenen LAK-Zellen. Die zytolytische Aktivität der durch IL-2

5. 总结

本工作建立了一个易于操作的骨髓细胞培养条件,用以扩增NK/LAK效应细胞。这种骨髓细胞培养含有CSF(CSF-1或者GM-CSF)作为生长因子和IL-2作为NK/LAK活性的刺激因子,并能在3~6天内产出比当下普遍采用的长期骨髓培养(long-term bone marrow culture, LTBMK)多出约10倍的NK/LAK效应细胞。长期骨髓培养一般延续4周,且被描述为唯一适于培养NK/LAK细胞的骨髓细胞培养条件【Vecchini等,1993年】。

从CSF+IL-2骨髓细胞培养分离出的有NK活性的细胞显现出一种与大颗粒淋巴细胞(large-granular lymphocyte, LGL)相似的形态,而且能够被纯化至>90%。纯化后的细胞表型(表面抗原状态)对Mac-1与NK-1.1为阳性,对所有典型的T和B细胞标志物为阴性,如Lyl-1、Lyl-2(CD8)、L3T4(CD4)与B220。这些NK-1.1阳性、有NK活性的细胞在存在CSF(CSF-1或者GM-CSF)而不是IL-2的环境中增殖,并且在刺激细胞分化的PMA(Phobol-12-Myristate-13-Acetate,佛波酯)的影响下不到24小时成熟为巨噬细胞。因此,它们被确认为巨噬细胞前体。

有NK活性的巨噬细胞前体能够在IL-2存在的环境中保持它们的杀伤活性。将IL-2从培养中移出,其杀伤活性在第二天就不再能够被检测到了。另一方面,当这些有NK活性的巨噬细胞前体与高剂量的IL-2培养时,它们会发展出LAK活性(不仅对NK敏感的,也对NK不敏感的靶细胞都有裂解性)。有LAK活性的细胞表型(NK-1.1⁺、CD3⁻、Mac-1⁻、以及F4/80⁻)与文献描述的LAK细胞相一致。这些由IL-2刺激巨噬细胞前体产生的细

stimulierten Makrophagen-Vorläufer basiert auf einem von Perforin vermittelten Mechanismus.

Die Untersuchungen auf Zytokin-Freisetzung zeigten, dass die durch IL-2 stimulierten, NK-aktiven Makrophagen-Vorläuferzellen auch aktive Zytokin-Produzenten waren. Sie setzten deutlich höhere Mengen von IL-1, IL-6, IL-10 und TNF- α frei als die nicht stimulierten, NK-inaktiven (normalen) Makrophagen-Vorläufer. Außerdem wurden IFN- γ , Kolonie-stimulierende Faktoren wie GM-CSF, M-CSF und IL-3 von IL-2 stimulierten Makrophagen-Vorläufer-Zellen sezerniert, was bei normalen Makrophagen-Vorläuferzellen nicht zu beobachten war. Dieses Spektrum freigesetzter Zytokine entspricht dem Zytokin-Muster, welches von den in der Literatur beschriebenen NK/LAK-Zellen sezerniert wird.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse aus dieser Arbeit, dass durch IL-2-Aktivierung die Makrophagen-Vorläufer des Knochenmarks sich zu Zellen mit typischen Merkmalen der NK/LAK-Zellen entwickeln können.

胞裂解活性基于一种由穿孔素介导的机理。

对细胞因子释放的研究显示：受到 IL-2 刺激的、有 NK 活性的巨噬细胞前体也是活跃的细胞因子产生者。与未受刺激的、无 NK 活性的（普通的）巨噬细胞前体相比较，它们分泌出明显更高量的 IL-1、IL-6、IL-10 与 TNF- α 。此外，IFN- γ 、集落刺激因子如 GM-CSF、M-CSF 与 IL-3 能够被 IL-2 刺激后的巨噬细胞前体所分泌，而这在普通的巨噬细胞前体是观察不到的。这个释放细胞因子的谱系符合文献报道的由 NK/LAK 细胞分泌的细胞因子模式。

本工作的结果归纳起来表明：通过 IL-2 活化的骨髓巨噬细胞前体能够发育成为带有 NK/LAK 细胞典型特征的细胞。

6. LITERATUR / 6. 参考文献

- Aarden, L. A.**, et al. (1979) Letter to the Editor, Revised nomenclature for antigen-nonspecific T cell proliferation and helper factors. *J. Immunol.* 123: 2928.
- Anegon I.**, Cuturi, M. C., Trinchieri, G., and Perussia, B. (1988) Interaction of Fc receptor (CD 16) ligands induces transcription of interleukin 2 receptor (CD25) and lymphokine genes and expression of their products in human natural killer cells. *J. Exp. Med.* 167: 452.
- Anstyn, J.M. & Gordon, S.** (1981) F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. *Eur. J. Immunol.* 11: 805.
- Ayroldi, E.**, Cannarile, L., D'Adamio, F., Delfino, D., Migliorati, G., and Riccardi, C. (1992) Long-term cultures of mouse bone marrow cells: a model for studying the generation of natural killer cells. *Nat. Immun.* 11(6): 317.
- Ayroldi, E.**, Cannarile, L., Migliorati, G., Riccardi, C. (1993) PMA inhibits NK cell generation, cytotoxic activity and NK-1.1 expression. *Int. J. Immunopharmacol.* 15 (1): 11.
- Baccarini, M.**, Bistoni, F., and Lohmann-Matthes, M. L. (1985) In vitro natural cell-mediated cytotoxicity against *Candida albicans*: macrophage precursors as effector cells. *J. Immunol.* 134: 2658.
- Baccarini, M.**, Bistoni, F., and Lohmann-Matthes, M. L. (1986a) Organ-associated macrophage precursor activity. Isolation of candidacidal and tumoricidal effectors from the spleen of cyclophosphamide-treated mice. *J. Immunol.* 136: 837.
- Baccarini, M.**, Kiderlen, A. F., Decker, T., and Lohmann-Matthes, M. L. (1986b) Functional heterogeneity of murine macrophage precursors from spleen and bone marrow. *Cell. Immunol.* 101: 339.
- Baccarini, M.**, Hockertz, S., Kiderlen, A. F., and Lohmann-Matthes, M.-L. (1988) Extracellular killing of *Leishmania* promastigotes and amastigotes by macrophage precursors derived from bone marrow cultures. *J. Exp. Med.* 167: 1487.
- Baccarini, M.**, Schwinger, R. and Lohmann-Matthes, M.-L. (1989) Effect of human recombinant IL-2 on murine macrophage precursors. Involvement of a receptor distinct from the Tac protein. *J. Immunol.* 142: 118.
- Baccarini, M. and Stanley, E. R.** (1990) Colony stimulating Factor-1. Growth factors, Differentiation Factors and Cytokines. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*:189.
- Baldwin, R. W.** (1976) Role of immunosurveillance against chemically induced rat tumors. *Transplant Rev.* 28: 62.
- Biron, C. A. & Welsh, R. M.** (1982) Activation and role of natural killer cells in virus infections. *Med. Microbiol. Immunol.* 170: 155.
- Blumenthal, R. P.**, Millard, P. J., Henkart, M. P., Reynold, C. W., and Henkart, P. A. (1984) Liposome as targets for granule cytolysis from cytotoxic large granular lymphocyte tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: 81: 5551.
- Ceuppens, J. L.**, Bloemmen, F. J., and Van-Wauwe, J. P. (1985) T cell unresponsiveness to the mitogenic activity of OKT3 antibody results from a deficiency of monocyte Fc gamma receptors for murine IgG2a and inability to cross-link the T3-Ti complex. *J. Immunol.* 135: 3882.
- Chen, W.-F. & Zlotnik, A.** (1991) IL-10: a novel cytotoxic T cell differentiation factor. *J. Immunol.* 147: 528.

Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Single Step Method of RNA isolation by Acid-Guanidine-thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Anal. biochem.* 162: 156.

Cleveland, B.W., Lopate, M.A., MacDonald, R. J. and Kirschner M. W. (1980) Number and evolutionary conservation of alpha- and beta-tubulin and cytoplasmic beta- and gamma-actin genes using specific cloned cDNA probes. *Cell* 20: 95.

Crocker P. R. and Gordon S. (1985) Isolation and characterization of resident stromal macrophages and hematopoietic cell clusters from mouse bone marrow. *J. Exp. Med.* 162: 993.

Cuturi, M. C., Anegon, I., Sherman, F., London, R., Clark, S. C., Perussia, B., and Trinchieri, G. (1989) Production of hematopoietic colony-stimulating factors by human natural killer cells. *J. Exp. Med.* 169: 569.

Decker, T., Baccharini, M. and Lohmann-Matthes, M. L. (1986) Liver-associated macrophage precursors as natural cytotoxic effectors against *Candida albicans* and Yac-1 cells. *Eur. J. Immunol.* 16: 693.

Defrance, T., Vanbervliet, B., Briere, F., Durand, I., Rousset, F., and Banchereau, J. (1992) Interleukin 10 and transforming growth factor beta cooperate to induce anti-CD40-activated naive human B cells to secrete immunoglobulin A. *J. Exp. Med.* 175: 671.

Dejong A.S.H., Van Kessel-Van Vark, M., and Raap, A. K. (1985) Sensitivity of various visualization methods for peroxidase and alkaline phosphatase activity in immunoenzyme histochemistry. *Histochemical Journal* 17: 1119.

De-Waal-Malefyt, R., Abrams, J., Bennett, B., Figdor, C. G., and De-Vries, J. E. (1991) Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J. Exp. Med.* 174: 1209.

De-Waal-Malefyt, R., Yssel, H., and De-Vries, J. E. (1993) Direct effects of IL-10 on subsets of human CD4⁺ T cell clones and resting T cells. Specific inhibition of IL-2 production and proliferation. *J. Immunol.* 150: 4754.

Djeu J. Y., Liu, J. H., Wei, S., Rui, H., Pearson, C. A., Leonad, W. J. and Blanchard, D. K. (1993) Function associated with IL-2 receptor-beta on human Neutrophils. *J. Immunol.* 150: 960.

Espinoza-Delgado, I., Ortaldo, J. R., Winkler-Pickett, R., Sugamara, K., Varesio, L., and Longo, D. C. (1990) Expression and role of p75 interleukin-2 receptor on human monocytes. *J. Exp. Med.* 171: 1821

Feinberg, A.P. and Vogelstein, B. (1983) A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Bioch.* 132: 6.

Fiorentino, D. F., Zlotnik, A., Mosmann, T. R., Howard, M., Moore, K. W., and O'Garra, A. (1991a) IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J. Immunol.* 146: 3444.

Fiorentino, D. F., Zlotnik, A., Mosmann, T.R., Howard, M., and O'Garra, A. (1991b) IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J. Immunol.* 147: 3815.

Fitzgerald-Bocarsly, P., Herberman, R., Hercend, T., Hiserodt, J., Kumar, V., Lanier, L., Ortaldo, J., Pross, H., Reynolds, C., Welsh, R. and Wigzell, H. (1988) Box I. A definition of natural killer cells. *Immunology Today* 9(10): 292.

Go, N., Castle, B. E., Barrett, R., Rastlein, R., Dang, W., Mosmann, T. R., Moore, K. W., and Howard, M. (1990) Interleukin 10, a novel B cell stimulatory factor: unresponsiveness of X chromosome-linked immunodeficiency B cells. *J. Exp. Med.* 172: 1625.

Grimm, E. A., Mazumder, A., Zhang, H. & Rosenberg, S. (1982) Lymphokine-activated killer cell phenomenon. I. Lysis of natural killer resistant fresh solid tumor cells by interleukin-2 activated autologous human peripheral blood lymphocytes. *J. Exp. Med.* 155:1823.

Grimm, E. A., Robb, R. J., Roth, J. A., Neckers, L. A., Lachman, L. B., Wilson, D. J. & Rosenberg, S. A. (1983) Lymphokine-activated killer cell phenomenon. III. Evidence that IL-2 is sufficient for direct activation of peripheral blood lymphocytes into lymphokine-activated killer cells. *J. Exp. Med.* 158: 1356.

Gunji, Y., Vujanovic, N., Hiserodt, J. C., Herberman, R. B. & Gorelik, E. (1989) Generation and characterization of purified adherent lymphokine-activated killer cells in mice. *J. Immunol.* 142: 1748.

Hackett, J. Jr., Tutt, M., Lipscomb, M., Bennet, M., Koo, K., and Kumar, V. (1986) Origin and differentiation of natural killer cells II. Functional and morphologic studies of purified NK-1.1⁺ cells. *J. Immunol.* 136: 3124.

Haller, O., Kiessling, R., Öre, A. & Wigzell, H. (1977) Generation of natural killer cells: an autonomous function of the bone marrow. *J. Exp. Med.* 145: 1411.

Hanna, N., Fidler, I. J. (1980) The role of natural killer cells in the destruction of circulating tumor emboli. *J. Natl. Cancer Inst.* 65: 801.

Hanna, N., Burton, R. (1981) Definitive evidence that natural killer (NK) cells inhibit experimental tumor metastasis *in vivo*. *J. Immunol.* 127: 1754.

Henkart P. A., Miiard P. J., Reynolds C. W., and Henkart M. P. (1984) Cytolytic activity of purified cytoplasmic granules from cytotoxic rat large granular lymphocyte tumors. *J. Exp. Med.* 160: 75.

Herberman, R. B., Nunn, M. E., Lavrin, D. H. (1975) Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity. *Int. J. Cancer.* 16: 216.

Herberman, R. B. und Holden, H. T. (1978) Natural cell-mediated immunity. *Adv. Cancer Res.* 27: 305.

Herbermann, R. B., Balch, C., Bolhius, R., Golub, S., Hiserodt, J., Lanier, L., Lotzova, E., Philips, J., Riccardi, C., Ritz, J., Santoni, A., Schmidt, R., Uchide, A. & Vujanovic, N. (1987) Most lymphokine activated killer (LAK) activity mediated by blood and splenic lymphocytes is attributable to stimulation of natural killer (NK) cells by interleukin-2 (IL-2). *Immunology Today* 8: 178.

Hercend, T. and Schmidt, R. E. (1988) Characteristics and uses of natural killer cells. *Immunology Today* 9(10): 291-293.

Herman, J. and A. R. Rabson. (1986) Tumor cells stimulate interleukin 1 (IL-1) production from enriched large granular lymphocytes. *Clinical Imm. and Immunopatho.* 38: 282-294.

Hoefsmit, C. M., Schadee-Eestermans, I. L., and Beelen, R. H. J. (1986) The development of the resident pattern of endogenous peroxidatic activity in mouse peritoneal macrophages coincides with the expression of the differentiation antigen F4/80. A combined method for immunoperoxidase labeling and endogenous peroxidase cytochemistry. *J. Histochem. Cytochem.* 34(5): 633.

Holter, W., Goldman, C., Casabo, L., Nelson, D., Greene, W., and Waldmann, T. (1987) Expression of functional IL-2 receptors by lipopolysaccharide and interferon-gamma-stimulated human monocytes. *J. Immunol.* 138: 2917.

Kashima, N., Nishi-Takaoka, C., Fijita, T., Taki, S., Yamada, G., Hamuro, J., and Taniguchi, T. (1985) Unique structure of murine interleukin-2 as deduced from cloned cDNAs. *Nature* 313: 402.

- Karre, K.**, Seeley, J. K., Eriksson, E., Barton, R. C., and Kiessling, R. (1983) "Anomalous" Thy-1⁺ killer cells in allogeneic and F1-anti-parental mixed leukocyte culture. Relation to natural killer cells and allospecific cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 157:385.
- Kaye, J.**, Porcelli, S., Tite, J., Joues, B., and Janeway, JR. C. A. (1983) Both of monoclonal antibody and antisera specific for determinants unique to individual cloned Helper T cell lines can substitute for antigen and antigen-presenting cells in the activation of T cells. *J. Exp. Med.* 158: 836.
- Keever, C. A.**, Pekle, K., Gazzola, M. V., Collins, N. H. and Gillio, A. (1990) NK and LAK activities from human marrow progenitors. *Cell. Immunol.* 126: 211.
- Kiessling, R.**, Klein, E., Wigzell, H. (1975a) "Natural" Killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur. J. Immunol.* 5: 112.
- Kiessling, R.**, Petranyi, G., Klein, G., Wigzell, H. (1975b) Genetic variation of *in vivo* rejection potential of nonimmunized semi-syngeneic mice against a mouse lymphoma line. *Int. J. Cancer.* 15: 933
- Koo, G. C. and Manyak, C. L.** (1986) Generation of cytotoxic cells from murine bone-marrow by human recombinant IL-2. *J. Immunol.* 137: 1751-56.
- Koo, G. C.**, Manyak, C. L., Dasch, J., Ellingsworth, L., and Schultz, L. D. (1991) Suppressive effects of monocytic cells and transforming growth factor-beta on natural killer cell differentiation in autoimmune viable motheaten mutant mice. *J. Immunol.* 147: 1194.
- Kuppen, P. J.**, Eggermont, A. M., Marinelli, A., De-Heer, E., Van-de-Valde, C. J., and Fleuren, G. J. (1991) Induction of lymphokine-activated killer activity in rat splenocyte cultures: the importance of 2-mercaptoethanol and indomethacin. *Cancer. Immunol. Immunother.* 33: 28.
- Lafreniere, R., and Rosenberg. S. A.** (1985) Successful immunotherapy of murine experimental hepatic metastases with lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin 2. *Cancer Res.* 45: 3735.
- Li, C. Y.**, Lam, K. W., and Yan, L. T. (1973) Esterases in human leukocytes. *J. Histochem. Cytochem.* 21: 1.
- Lichtenheld, M. G.**, Olsen, K. J., Lu, P., Lowrey, D. M., Hameed, A., Hengartner, H., Podack, E. R. (1988) Structure and function of human perforin. *Nature* 335: 448.
- Liu, C.-C.**, Perussia, B., Cohn, Z.A. and Young J.D.-E. (1986) Identification and characterization of a pore-forming protein of human peripheral blood natural killer cells. *J. Exp. Med.* 164: 2061-76.
- Liu, C.-C.**, Rafii, S., Granelli-Piperno, A., Trapani, J. A., Young, J. D.-E. (1989) Perforin and serine esterase gene expression in stimulated human T cells. *J. Exp. Med.* 170: 2105.
- Lohmann-Mattes, M. L.**, Domzig, W., und Roder J. (1979) Promonocytes have the functional characteristics of natural killer cells. *J. Immunol.* 123: 1883.
- Lotze, M. T.**, Matory, Y. L., Rayner, A. A., Ettinghausen, S. E., Vetto, J. T., Seipp, C. A., and Rosenberg, S. A. (1986) Clinical effects and toxicity of interleukin-2 in patients with cancer. *Cancer* 58: 2764.
- Lotzova, E. and Savary, C. A.** (1987) Generation of NK cell activity from human bone marrow. *J. Immunol.* 139: 279.
- Lotzova, E.**, Savary, C. A., and Champlin, R. E. (1993) Genesis of human oncolytic natural killer cells from primitive CD34⁺ CD33⁻ bone marrow progenitors. *J. Immunol.* 150: 5263.

- Lowrey, D. M.**, Hameed, A., Lichtenheld, M., and Podack, E. R. (1988) Isolation and characterization of cytotoxic granules from human lymphokine (interleukin 2) activated killer cells. *Cancer Research* 48 : 4681.
- Lowrey, D.V.**, Aebischer, T., Olsen, K., Lichtenheld, M., Rupp, F., Hengartner, H., Podack, E.R. (1989) Cloning, analysis and expression of murine perforin 1 cDNA, a component of cytolytic T-cell granules with homology to complement component C9. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 247.
- Magee D. M. and Wing E. J.** (1989) Secretion of colony-stimulating factors by T cell clones. *J. Immunol.* 143: 2336.
- Maghazachi, A.**, Vujanovic, N. L., Herberman, R. B. & Hiserodt, J. C. (1988) Lymphokine-activated killer cells in rats. IV. Development relationship among large agranular lymphocytes, large granular lymphocytes, and lymphokine-activated killer cells. *J. Immunol.* 140: 2846.
- Malkovsky, M.**, Lovenland, B., North, M., Asherson, G. L., Gao, L., Ward, P. and Fiers, W. (1987) Recombinant interleukin-2 directly augments the cytotoxicity of human monocytes. *Nature* 325: 262.
- Maniatis, T.**, Frisch, E. F. and Sambrook, J. (1982) Molecular cloning: A laboratory manual (Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, N.Y.).
- Masson, D. and Tschopp, J.** (1985) Isolation of a lytic pore forming protein (perforin) from cytolytic T-lymphocytes. *J. Biol. Chem* 260: 9069.
- Metcalf, D.** (1987) The molecular control of normal and leukaemic granulocytes and macrophages. *Proc. R. Soc. Lond.* B230: 389.
- Michael, A.**, Hachett, J. J., Bennett, M., Kumar, V., and Yuan, D. (1989) Regulation of B lymphocytes by natural killer cells, Role of IFN- γ . *J. Immunol.* 142: 1095.
- Millard, P. J.**, Henkart, M. P., Reynolds, C. W., Henkart, P. A. (1984) Purification and properties of cytoplasmic granules from cytotoxic rat LGL tumor. *J. Immunol.* 132: 3197.
- Migliotati, G.**, Canarile, L., Herbermann, R., Bartocci, A., Stanley, E.R. and Riccardi, C. (1987) Role of IL-2 and H-1 in the generation of mouse NK cells from primitive bone marrow precursor. *J. Immunol.* 138: 3618.
- Morgan, D. A. and Ruscetti, F. W.** (1976) Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science* 193: 1007.
- Morgan, D. R.**, Dupont, H. L., Gonik, B., and Konl, S. (1984) Cytotoxicity of human peripheral blood and colostral leukocytes against *Shigella* species. *Infect. Immun.* 46: 25.
- Morris, D. G. and Pross, H. F.** (1989) Studies of lymphokine-activated killer (LAK) cells. *J. Exp. Med.* 169: 717.
- Mosmann, T.R.** (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. *J. Immunol. Methods.* 65: 55.
- Mule, J. J.**, Shu, S., Schwarz, S. L., and Rosenberg, S. A. (1984) Adoptive immunotherapy of established pulmonary metastases with LAK cells and recombinant interleukin 2. *Science* 225: 1487.
- Murphy, W. J.**, Keller, J. R., Harrison, C. L., Young, H. A., and Longo, D. L. (1992) Interleukin-2-activated natural killer cells can support hematopoiesis in vitro and promote marrow engraftment in vivo. *Blood.* 80(3): 670.
- Musso, T.**, Espinoza-Delgado, L., Pulkki, K., Gusella, G. L., Longo, D. L., and Varesio, L. (1992) IL-2 induces IL-6 production in human monocytes. *J. Immunol.* 148: 795.

- Naparstek, E.**, Pierce, J., Metcalf, D., Shaddock, R. K., Ihle, J., Leder, A., Sakakeeny, M. A., Wagner, K., Falco, J., FitzGerald, T. J., and Greenberger, J. S. (1986) Induction of growth alterations in factor-dependent hematopoietic progenitor cell lines by cocultivation with irradiated bone marrow stromal cell lines. *Blood*. 67: 1395.
- Nencioni, L.**, Villa, L., Borasschi, D., Berti, B., and Tagliabue, A. (1983) Natural and antibody-dependent cells-mediated activity against *Salmonella typhimurium* by peripheral and intestinal lymphoid cells in mice. *J. Immunol.* 130: 903.
- Nguyen H. Q.**, Hoffmann-Liebermann B., and Liebermann D. A. (1993) The zinc finger transcription factor Egr-1 is essential for and restricts differentiation along the macrophage lineage. *Cell* 72: 197-209.
- Olabuena, S. E.**, Brooks, C. G., Gillis, S., and Henney, C. S. (1983) Interleukin 2 is not sufficient for the continuous growth of cloned NK-like cytotoxic cell lines. *J. Immunol.* 131: 2386.
- Ortaldo, J. R.**, Sharrow, S. O., Timonen, T., Herberman, R. B. (1981) Analysis of surface antigens on highly purified human NK cells by flow cytometry with monoclonal antibodies. *J. Immunol.* 127: 2401.
- Ortaldo, J. R.**, Mason, A., and Allavena, P. (1984) Studies of progenitors of human natural killer (NK) cells in blood and bone marrow. In *Thymic Factor Therapy*, ed. Byrom, N. A. and Hobbs, J. R. London: Academic.
- Ortaldo, J. R. and Herbermann R. B.** (1984) Heterogeneity of natural killer cells. *Ann. Rev. Immunol.* 2: 359-394.
- Parr, E. L.**, Young, L. H. Y., Parr, M. B., and Young, J. D.-E. (1990) Granulated metrial gland cells of pregnant mouse uterus are natural killer-like cells that contain perforin and serine esterases. *J. Immunol.* 145: 2365.
- Paya, C. V.**, Kenmotsu, N., Schoon, R. A. and Leibson, P. J. (1988) Tumor necrosis factor and lymphotoxin secretion by human natural killer cells leads to antiviral cytotoxicity. *J. Immunol.* 141: 1989.
- Peace, D. J. and Cheever, M. A.** (1989) Toxicity and therapeutic efficacy of high-dose interleukin 2. *J. Exp. Med.* 169: 161.
- Peters, P. M.**, Ortaldo, J. R., Shalaby, M. R., Svedersky, L. P., Ned win, G. E., Bringman, T. S., Hass, P. E., Aggarwal, B. B., Herbermann, R. B., Goeddel, D. V., and Palladino, M. A. (1986) Natural killer-sensitive targets stimulate production of TNF- α but not TNF- β (lymphotoxin) by highly purified human peripheral blood large granular lymphocytes. *J. Immunol.* 137: 2592.
- Podack, E. R. and Konigsberg, P. J.** (1984) Cytolytic T cell granules. Isolation, structural, biochemical, and functional characterization. *J. Exp. Med.* 160: 695.
- Podack, E. R.**, Young, J. D.-E., and Cohn, Z. A. (1985a) Isolation and biochemical and functional characterization of perforin 1 from cytolytic T-cell granules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 8629.
- Podack, E. R.** (1985b) The molecular mechanism of lymphocyte-mediated tumor cell lysis. *Immunology Today* 6: 21.
- Podack, E. R.**, Hengartner, H., and Lichtheld, M. G. (1991) A central role of perforin in cytolysis? *Anna. Rev. Immunol.* 9: 129.
- Pollack, S.B. and Rosse, C.** (1987) The primary role of murine bone-marrow in the production of natural killer cells. *J. Immunol.* 139: 2149.
- Pollack, S. B.**, Tsuji, J., and Rosse, C. (1992) Production and differentiation of NK lineage cells in long-term bone marrow cultures in the absence of exogenous growth factors. *Cellular Immunology* 139: 352.

Robb, R. J., Rusk, C. M., Yodoi, J., and Greene, W. C. (1987) Interleukin 2 binding molecule distinct from the Tac protein: Analysis of its role in formation of high-affinity receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84: 2002.

Rosenberg, E. B., Herberman, R. B., Levine, P. H., Halterman, R. H., McCoy, J. L., Wunderlich, J. R. (1972) Lymphocyte cytotoxicity reactions to leukemia-associated antigens in identical twins. *Int. J. Cancer.* 9: 648.

Rosenberg, S. A., Grimm E. A., McGrogan, M., et al. (1984) Biological activity of recombinant interleukin 2 produced in *Escherichia coli*. *Science* 223: 1412.

Rosenberg, S. A., Lotze, M. T., Muul, L. M., Leitman, S., Chang, A., Ettinghausen, S. E., Matory, Y. L., Skibber, J. M., Shiloni, E., Vetto, J. T., Seipp, C. A., Simpson, C., and Reichert, C. M. (1985) Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *N. Engl. J. Med.* 313: 1485

Rosenstein, M., Yron, I., Kaufmann, Y., and Rosenberg, S. A. (1984) Lymphokine-activated killer cells: lysis of fresh syngeneic natural killer-resistant murine tumor cells by lymphocytes cultured in interleukin 2. *Cancer Res.* 44: 1946.

Rosenstein, M., Ettinghausen, S. E., and Rosenberg, S. A. (1986) Extravasation of intravascular fluid mediated by systemic administration of recombinant interleukin-2. *J. Immunol.* 137: 1735.

Rothwell, V.M. and Rohrschneider, L. R. (1987) Murine c-fms cDNA: Cloning, sequence, analysis and retroviral expression. *Oncogene Research* 1: 311.

Ruff, M.R. and G.E. Gifford (1980) Purification and physicochemical characterization of rabbit tumor necrosis factor. *J. Immunol.* 125: 1671.

Ruscetti, F. W., Morgen, D. A. and Gano, R. C. (1977) Functional and morphologic characterization of human T cells continuously grown in vitro. *J. Immunol.* 119: 131.

Saito, S., Nishikawa, K., Morii, T., Enomoto, M., Narita, N., Motoyoshi, K., Ichijo, M. (1993) Cytokine production by CD16-CD56 bright natural killer cells in the human early pregnancy decidua. *Int. Immunol.* 5(5): 559.

Salup, R. R., Mathieson, B. J. & Wiltrout, R. H. (1987) Precursor phenotype of lymphokine-activated killer cells in the mouse. *J. Immunol.* 138: 3635.

Sarneva, M., Vujanovic, N. L., Van-Den-Brink, M. R. M., Herberman R. B., and Hiserodt, J. C. (1989) Lymphokine-activated killer cells in rats: generation of natural killer cells and lymphokine-activated killer cells from bone marrow progenitor cells. *Cell. Immunol.* 118: 448.

Sharon, M., Klausner, D. R., Cullen, R. B., Chizzonite, R., and Leonard, J. W. (1986) Novel Interleukin-2 receptor subunit detected by cross-linking under high-affinity conditions *Science* 234: 859.

Sharon, M., Gnarra, R. J., and Leonard, J. W. (1989) The β -chain of the IL-2 receptor (p70) is tyrosine phosphorylated on YT and HUT-102 B2 cells. *J. Immunol.* 143: 2530.

Siegel, P. J., Sharon, M., Smith, L. P., and Leonard, J. W. (1987) The IL-2 receptor β chain (p70): role in mediating signals for LAK, NK, and proliferative activities. *Science* 238: 75.

Silvennoinen, D., Renkonen, R., and Hurme, K. (1986) Characterization of natural killer cells and their precursors in the murine bone marrow. *Cell. Immunol.* 101: 1.

Sitnicka, E. and Hansson, M. (1992) Natural killer (NK) cell activity in human long-term bone marrow cultures (LTBMC): effects of interleukin-2 (IL-2) and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) on the progenitor cells. *Immunology* 76: 292.

Smith, K. A. (1989) The interleukin 2 receptor. *Annu. Rev. Cell Biol.* 5: 397.

Smyth, M.J., Ortaldo, J. R., Shinkai, Y.I., Yagita, H., Nagata, M., Okumura, K., and Young, H.A. (1990a) Interleukin 2 induction of pore-forming protein gene expression in human peripheral blood CD8⁺ T cells. *J. Exp. Med.* 171: 1269.

Smyth, M. J., Ortaldo, J. R., Bene. W., Yagita, H., Okumura, K., and Young, H. A. (1990b) IL-2 and IL-6 synergize to augment the pore-forming protein gene expression and cytotoxic potential of human peripheral blood T cells. *J. Immunol.* 145: 1159

Stanley, E. R., Guilbert, L. J., Tushinski, R. J. and Bartelmez, S. H. (1983) CSF-1, a mononuclear phagocyte lineage-specific hemopoietic growth factor. *J. Cell biochem.* 21: 151.

Stanley, E. R. & Heard, P. M. (1977) Factors regulating macrophage production and growth. Purification and some properties of the colony stimulating factor from medium conditioned by mouse L cells. *J. bio. Chem.* 252: 4305.

Tada H, Shisho, O., Kuroshima, K., Koyama, M. and Tsukamoto, K. (1986). An improved colorimetric assay for interleukin 2. *J. Immunol. Methods.* 93: 157.

Tai, A. and Werner, N. L. (1980) Biophysical and serological characterization of murine NK cells. *Natural Cell-Mediated Immunity Against Tumors* Herberman R. B. ed. NY: Academic: 241.

Takasugi, M., Mickey, M. R., and Terasaki, P. I. (1973) Reactivity of lymphocytes from normal persons on cultured tumor cells. *Cancer Res.* 33: 2898.

Talmadge, J. E., Wiltrot, R. H., Counts, D. F., Herberman, R. B., Mcdonald, T., and Ortaldo, J. R. (1986) Proliferation of human peripheral blood lymphocytes induced by recombinant human interleukin 2: Contribution of large granular lymphocytes and T lymphocytes. *Cellular Immunology* 102: 261.

Taniguchi, T., Matsui, H., Fiyita, T., Takaoka, C., Kashima, N., and Yoshimoto, R. (1983) Structure and expression of a cloned cDNA for human interleukin-2. *Nature* 302: 305.

Teshigawara, K., Wang, H-M., Kato, K., and Smith, K. A. (1987) Interleukin 2 high-affinity receptor expression requires two distinct binding proteins. *J. Exp. Med.* 165: 223.

Thompson-Snipes, L.-A., Dhar, V., Bond, M. W., Mosmann, T. R., Moore, K. M., and Rennick, D. M. (1991) Interleukin 10: a novel stimulatory factor for mast cells and their progenitors. *J. Exp. Med.* 173: 507.

Trinchieri. G. and Perussia, B. (1985) Immune interferon: a pleiotropic lymphokine with multiple effects. *Immunology Today* 6: 131.

Trinchieri. G. (1989) Biology of natural killer cells. *Advances in Immunology* 47: 187.

Tschopp, J. and Nabholz, M. (1990) Perforin-mediated target cell lysis by cytolytic T-lymphocytes. *Ann Rev. Immunol.* 8: 279.

Tsудо, M., Kozak, W. R., Goldman, K. C., and Waldmann, A. T. (1986) Demonstration of a non-Tac peptide that binds interleukin 2: a potential participant in a multichain interleukin-2 receptor complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83: 9694.

Tsудо, M., Goldmann, C. K., Bongiovanni, K. F., Chan, W. C., Winton, E. F., Yagita, M., Grimm, E. A., and Waldmann, T. A. (1987) The p75 peptide is the receptor for interleukin 2 expressed on large granular lymphocytes and is responsible for the interleukin 2 activation of these cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 5394.

Tutt, M. M., Kuziel, S. A., Hackett, J., Bennett, M., Tucker, P. W. and Kumar, V. (1986) Murine natural killer cells do not express functional transcripts of the α - β - γ -chain genes of the T-cell receptor. *J. Immunol.* 137: 2998.

Van-den-Brink, M.R., Boggs, S. S., Herberman, R. B. & Hiserodt, J. C. (1990) The generation of natural killer (NK) cells from NK precursor cells in rat long-term bone marrow culture. *J. Exp. Med.* 172: 303.

Van-Snick, J., Cayphas, S., Vink, A., Uyttenhove, C., Coulle, P. G., Rubira, M. R., and Simpson, R. J. (1986) Purification and NH₂-terminal amino acid sequence of a T-cell-derived lymphokine with growth factor activity for B-cell hybridomas. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83: 9679.

Vecchini, F., Delfino, D., Patrene, K. D., Deleo, A., Lu L., Herberman, R. B., Boggs S. S. (1993) Generation of natural killer cells from long-term cultures of mouse bone marrow. *Nat. Immun.* 12(1): 1.

Vitolo, D., Vujanovic, N. L., Rabinowich, H., Schlesinger, M., Herbermann, R. B., und Whiteside T. L. (1993) Rapid IL-2-induced adherence of human natural killer cells, expression of mRNA for cytokines and IL-2 receptors in adherent NK cells. *J. Immunol.* 151: 1926.

Vujanovic, N. L., Herberman, R. B., Olszowy, M. W., Cramer, D. V., Salup, R. R., Reynold, C. W. and Hiserodt, J. C. (1989) Lymphokine-activated killer cells in rats: analysis of progenitor and effector cell phenotype and relationship to natural killer cells. *Cancer Research* 48: 884.

Wahl, S. M., McCartney-Francis, N., Hunt, D. A., Smith, P. D., Wahl, L. M., and Katona, I. M. (1987) Monocyte interleukin 2 receptor gene expression and interleukin 2 augmentation of microbicidal activity. *J. Immunol.* 139: 1342.

White, M. V., Igarashi, Y., Emery, B. E., Lotze, M. T., and Kaliner, M. A. (1992) Effects of in vivo administration of interleukin-2 (IL-2) and IL-4, alone and in combination, on ex vivo human basophil histamine release. *Blood* 79: 1491.

Yang, J., Mule, J. & Rosenberg, S. (1986) Murine lymphokine activated killer (LAK) cells: phenotypic characterization of the precursor and effector cells. *J. Immunol.* 137: 715.

Young, J. D. E., Hengartner, H., Podack, E. R., Cohn, Z. A. (1986) Purification and characterization of a cytolytic pore-forming protein from granules of cloned lymphocytes with natural killer activity. *Cell* 44: 849.

Young, L. H. Y., Liu, C.-C., Joag, S., Rafii, S., and Young, J. D.-E. (1990) How lymphocytes kill. *Annu. Rev. Med.* 41: 45.

Zarling, J. M. & Kung, P. C. (1980) Monoclonal antibodies which distinguish between human NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *Nature* 288: 394.

Lebenslauf

13.09.1957 geboren in Chongqing, Sichuan, China

9.1964-7.1969 Besuch der Grundschule in Chongqing

9.1969-2.1975 Besuch der Mittelschule in Chongqing

8.1975-1.1978 Landarbeitsdienst in Baxian, Chongqing

3.1978-1.1982 Studium der Biologie an der Sichuan Universität

2.1982-7.1983 Assistentin an der biochemischen Fakultät der Südwest-China Landwirtschaftlichen Universität

8.1983-10.1986 wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Abteilung Biochemie des Chengdu-Biologischen-Institutes der Academia Sinica

11.1986-11.1987 Stipendium für die Arbeit in der Abteilung Immunbiologie (Leitung Professor M. -L. Lohmann-Matthes) des Fraunhofer-Institutes für Toxikologie in Hannover

12.1987-1994 wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Abteilung Immunbiologie (Leitung Professor M. -L. Lohmann-Matthes) des Fraunhofer-Institutes für Toxikologie

个人简历

1957/9 出生于中国重庆市

1964/9-1969/7 在重庆上小学

1969/9-1975/7 在重庆上中学

1975/8-1978/2 在重庆巴县当知青

1978/3-1982/1 在四川大学生物系读本科

1982/2-1983/7 在西南农业大学植物生化室任助教

1983/8-1986/10 在中国科学院成都生物研究所生化室任助研

1986/11-1987/11 在德国汉诺威弗朗霍夫毒理研究所免疫生物学部进修 (主管教授: M.-L. Lohmann-Matthes)

1987/12-1994/12 在德国汉诺威弗朗霍夫毒理研究所免疫生物学部工作 (主管教授: M.-L. Lohmann-Matthes)
