



CN9702590

CNIC-01166

SMC-0134

# 中国核科技报告

## CHINA NUCLEAR SCIENCE AND TECHNOLOGY REPORT

rhIL-6 的制备及对辐照小鼠  
造血功能恢复的研究

THE STUDY ON THE PREPARATION OF rhIL-6  
AND ITS EFFECTS ON RECOVERY OF MICE FROM  
RADIATION-INDUCED HEMATOPOIETIC APLASIA

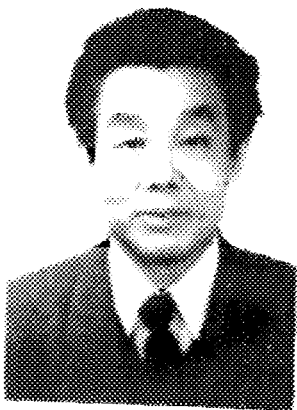
*(In Chinese)*



中国核情报中心  
原子能出版社

China Nuclear Information Centre  
Atomic Energy Press

VOL 28 No 24



杨吉成:副教授,苏州医学院基因工程研究室主任。1967年毕业于南京大学生物系。

YANG Jicheng: Associate professor, director of Gene Engineering Division, Souzhou Medical Collegy. Graduated from Biological Department of Naijing University in 1967.

CNIC-01166

SMC-0134

## rhIL-6 的制备及对辐照小鼠 造血功能恢复的研究

杨吉成 张 云 盛伟华

(苏州医学院, 苏州)

### 摘 要

将构建表达的 rhIL-6 基因工程菌,经发酵、纯化提取后所获得的 rhIL-6 纯品比活性可达  $4.83 \times 10^8$  IU/mg。用该 rhIL-6 制剂对经<sup>60</sup>Co 辐照的 BALB/c 鼠治疗 6 d(2 μg/bid/只),其 rhIL-6 实验组小鼠凝血时间(BT,CT)和凝血酶原时间(PT)比对照组显著缩短( $P < 0.01$ ),血小板(PLT)和白细胞(WBC)比对照组分别提高 130%和 165%,骨髓造血细胞体外培养的 CFU-Mix 和脾脏 CFU-s 显著高于对照组( $P < 0.01$ ),说明 rhIL-6 有利于促进辐射损伤小鼠的早期造血功能的恢复及造血干/祖细胞的增殖、分化,有利于骨髓辐射损伤和造血功能的恢复。

**The Study on the Preparation of rhIL-6  
and its Effects on Recovery of Mice from  
Radiation-Induced Hematopoietic Aplasia**  
(*In Chinese*)

YANG Jicheng ZHANG Yun SHENG Weihua  
(Suzhou Medical College, Suzhou)

**ABSTRACT**

The E coil highly expressing rhIL-6 constructed by our department was fermented and rhIL-6 products were extracted and purified. The specific activity of the purified rhIL-6 products reached  $4.83 \times 10^8$  IU/mg. The rhIL-6 products were used to treat BALB/c mice injured by  $^{60}\text{Co}$  irradiation for six days ( $2 \mu\text{g}/\text{big}/\text{each}$ ). The results showed that the bleeding time, coagulation time and prothrombin time of the rhIL-6 treatment group were significantly shorter than those of the control group ( $P < 0.01$ ), the platelet count and WBC increased by 130% and 165% in the treatment group as compared with the control, the numbers of CFU-Mix cultured in vitro and CFU-s in spleen were significantly higher than those in the control group ( $P < 0.01$ ). These results suggest that rhIL-6 exerts beneficial effects on the recovery of mice from radiation-induced injuries of hematopoietic stem/progenitor cells, and thus helps recovery from radiation injury of bone marrow and hematopoietic function.

## 前 言

IL-6 是由多种细胞分泌的一种多功能细胞因子,参与调节免疫应答、急性期反应以及造血作用,在宿主免疫功能中起着核心调节作用。IL-6 可由 B 细胞、T 细胞、单核细胞、成纤维细胞、内皮细胞、NK 细胞、肾小球膜细胞、心脏粘液瘤细胞、垂体前叶细胞及某些肿瘤细胞等多种不同组织细胞分泌产生。依其生物学活性不同,IL-6 曾被命名为 B 细胞刺激因子  $\alpha$  (BSF- $\alpha$ )、 $\beta_2$ -干扰素 (IFN- $\beta_2$ )、26kd 蛋白、肝细胞刺激因子 (HSF)、杀伤辅助因子 (KHF)、CTL 分化因子、白细胞介素 HP-1 (IL-HP1)、杂交瘤/浆细胞瘤生长因子 (HPGF) 及 2 型巨噬细胞及粒细胞诱导 (MGI-2) 等。自 1985 年 Kishimoto 首先获得 IL-6 cDNA 以来,发现这些分子为同一种物质,因此于 1986 年统一命名为 IL-6。人 IL-6 由 212 个氨基酸残基组成,为 26kd 的糖蛋白,成熟人 IL-6 由 184 个氨基酸组成无需糖基化,分子量为 21kd<sup>[1,2]</sup>。

已知 IL-6 对淋巴细胞、造血干细胞、肝细胞以及神经细胞等具有广泛多样的生物学活性,IL-6 所提供的信号依靶细胞而异,显示促进或抑制生长及诱导分化等作用。IL-6 的生物学活性包括<sup>[1,2]</sup>:(1) 诱导 B 细胞增殖分化,促进抗体分泌。(2) 诱导肝细胞产生多种急性期蛋白,如 SAA, FIB, AAT 及 CRP 等,起 HSF 样活性刺激肝细胞生长。(3) 增强 T 细胞和胸腺细胞 IL-2 和 IL-2 受体的表达,促进生长增殖,还可诱导 CTL 的分化和增生,协同 IL-2 增强 CTL 穿孔素基因的表达,提高机体的抗感染、抗肿瘤免疫力。(4) 抑制 MI 髓样白血病细胞系的生长,诱导其分化为巨噬细胞样细胞。(5) 协同促进 IL-3 诱导的多潜能造血祖细胞的分化,同时还可刺激早期巨核细胞的分化成熟,具有很强的升血小板作用。(6) 刺激星形胶质细胞如 PC12 细胞系分化成典型的神经细胞,具有神经生长因子 (NGF) 样功效,并可调节下丘脑-垂体功能。(7) 促进杂交瘤/浆细胞瘤的生长。(8) 抑制黑色素瘤和乳腺癌细胞生长。另外,有证据表明,IL-6 产生的失调与许多人类疾病,如多克隆 B 细胞的激活异常、淋巴样恶性病、银屑病、红皮病、多发性硬化症、强直性脊椎炎、增生性肾小球肾炎及类风湿性关节炎等自身免疫病和脓毒性休克等细菌感染有关。

IL-6 在骨髓 HSC 的增殖、分化中起重要作用,它导致 HSC G<sub>0</sub> 期缩短,促进其快速增殖、分化。IL-6 是髓系及血小板系单潜能造血细胞的有效刺激物,能刺激粒系与巨噬细胞系造血集落的生长增殖,具有升白细胞作用,它又是重要的巨核细胞集落刺激因子,能促使其成熟,增加血小板数量,从而对骨髓造血细胞起到抗辐射和促进造血功能的重建作用,在核事故发生后立即应用或与其它细胞因子联合应用,可望取代骨髓移植。而且对肿瘤患者放疗/化疗后的升血小板和升白细胞、防止继发感染及出血功效显著,有很高的临床应用价值<sup>[4-11]</sup>。

本研究室在获 IL-6 在大肠杆菌中高效表达的基础上<sup>[12]</sup>,开展 IL-6 基因制药的研究,通过发酵、纯化获取了高纯度的 rhIL-6 细胞因子,并进一步通过动物体内实验研究,探索其药理及药效学机理,对于加快 rhIL-6 应用于临床治疗骨髓抑止、辐射和放/化疗造成的骨髓损伤及某些肿瘤病等具有十分重要的意义<sup>[13,14]</sup>。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

(1) 表达人 IL-6 工程菌 SMD-945 菌株由本院基因研究室构建(如图 1),宿主均为

DH<sub>5α</sub>, rhIL-6 表达率为 38.6%, 质粒为 PBV220(北京病毒所提供)。

(2) 培养基 改良 M9CA 培养基, 其中主要成分酵母提取物为 OXOID 公司产品, 蛋白胨为日本制药株式会社产品。

(3) 实验动物 本实验所用的 BALB/c 小鼠, 由苏州医学院实验动物中心提供, 选择 10~12 周龄, 体重 23±2 g 雌性健康小鼠 60 只, 随机分为 3 组, 每组 20 只。

(4) 细胞因子 rhIL-6 由苏州医学院基因研究室自制备, 纯度大于 95%, 比活性为 4.83×10<sup>8</sup> IU/mg。rhIL-6 参照标准品由苏州医学院免疫学研究室张学光教授惠赠(法国引进)。

(5) <sup>60</sup>Co-γ 射线辐照 全部实验用 BALB/c 鼠一次 8.0 Gy 全身致死性照射, 剂量率为 0.8 Gy/min, 由苏州医学院<sup>60</sup>Co 辐照中心协助进行。

(6) 半固体培养基 1.2% 甲基纤维素(英国产)、20% 胎牛血清(杭州产)、10% 人脐带血清-RPMI 1640(GIBCO 产品)。

2% 甲基纤维素的配制 称取 4 g 甲基纤维素经高压灭菌后, 溶于 100 mL 煮沸的双蒸水中, 置于热磁力搅拌器上, 边震荡边搅拌使之充分混匀, 再煮沸 15 min, 室温冷却, 取双倍浓度的 RPMI 1640 稀释成 2% 浓度, 置 4℃ 磁力搅拌 24 h 后分装置 4℃ 备用。

(7) 其它试剂 淋巴细胞分离液(相对密度 1.077±0.001 g/ml, 上海试剂二厂产品)。

Telleyesmkys 溶液的配制 70% 乙醇 50 ml, 甲醛 2.5 ml, 冰醋酸 2.5 ml。

## 1.2 方法

(1) 工程菌的发酵培养及诱导表达 改良的 M9CA 培养基经高压灭菌, 使用前加入灭菌的 10% 葡萄糖 20 ml/L 和氨苄青霉素 100 mg/L。采用 10 L 发酵罐, 培养体积为 7 L, 搅拌转速 340 r/min, 溶氧量为 45%, 于 30℃ 培养 4 h 后开始升温, 同时补加 1000 ml 新鲜培养基以增加营养成分并调节 pH 值在 7.3 以上。5 h 后温度达到 42℃ 诱导表达, 继续诱导培养 5 h。

rhIL-6 的分离纯化: 应用高速冷冻离心机经 6 000 r/min 离心 20 min, 收集菌体, 并用 1% NaCl 洗菌一次, 加破菌液混匀置 -25℃ 冷冻过夜。次日超声破菌, 12 000 r/min 离心 25 min 回收沉淀。经不同浓度去垢剂和变性剂洗涤后用 7 mol/L 尿素, 以 1:10(W/V) 溶解包涵体, 12 000 r/min 离心收取溶包上清, 用 100 mol/L Tris-HCl, pH 值为 7.4 缓冲液电磁搅拌透析 8~12 h 后于 4℃ 过夜复性, 然后柱层析纯化: 第一步用 Sephadex G50 柱层析。第二步用 DEAE-纤维素阴离子交换柱层析。第三步用 Sephacryl S 200 柱层析。纯化后 rhIL-6 蛋白溶液采用改良 Lowry's 法测定蛋白的含量。

(2) rhIL-6 活性及纯度鉴定 利用小鼠杂交瘤细胞株 B9(珠海中通生物工程公司惠赠)及 MTT 法测定 IL-6 活性及计算比活性。用 15% SDS-PAGE 电泳, 凝胶经考马斯亮蓝或

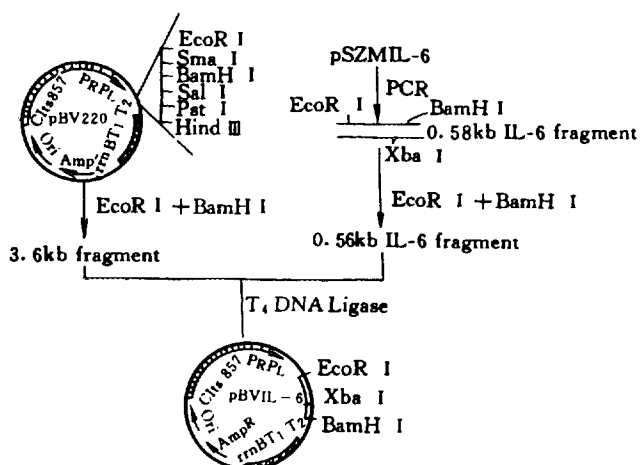


Fig. 1 Scheme construction of recombinant expressing plasmid pBVIL-6

银染色后薄层扫描测定 rhIL-6 占菌体蛋白的百分含量及纯度。

(3) 实验小鼠 rhIL-6 处理 BALB/c 小鼠经照射后,随机分为三组:照射阴性对照组、rhIL-6 参照标准品组(以下称阳性对照组)、自制备 rhIL-6 组(称为实验组),每组 20 只鼠。照射后 1 h 内首次注射:阳性对照组和实验组分别皮内注射 rhIL-6 参考标准品和自制备 rhIL-6 每只每次各  $2\ \mu\text{g}/0.1\ \text{ml}$ (注射用 rhIL-6 于临用前以含 0.1% 同系小鼠血清的 NS 稀释成  $20\ \mu\text{g}/\text{ml}$ ),阴性对照组仅注射同量的稀释液,每日二次,间隔 12 h,连续注射 6 d。

(4) 出血时间(BT)、凝血时间(CT)和血浆凝血酶原时间(PT)检测 小鼠经致死性照射后第 12 天,分别采血检测: I. 小鼠眶下静脉针刺采血, Duke 法测定 BT; II. 玻片法检测 CT; III. Quick 氏一步法测定 PT。

(5) 外周血白细胞(WBC)和血小板(PLT)计数 于眶下静脉采集外周血样进行 WBC 和 PLT 计数。

骨髓造血细胞体外培养 小鼠采血后颈椎脱位处死。无菌取双侧后腿股骨,用含 8~10 u/ml 肝素、5%胎牛血清的无钙镁 PBS 冲洗分离骨髓细胞,制成单细胞悬液,用 Ficoll-Hypaque 淋巴细胞分离液获得骨髓 MNC,用上述 PBS 洗涤三次,再用含 20%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基调整细胞浓度为  $2\times 10^5$ 个/ml。取 1 ml 骨髓 MNC 悬液与含 1.2%甲基纤维素、20%胎牛血清、10%人脐带血清、 $5\times 10^{-5}\ \text{M}/\text{L}$ -2-巯基乙醇及各种不同活性或浓度的细胞因子的培养基(IL-6 100 IU/ml, GM-CSF 100 IU/ml, G-CSF  $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$ , IL-3  $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$ )等量混合,加入 24 孔培养板中,0.5 ml/孔,每组设 4 个复份,置温箱中  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  饱和湿度培养 7 d,倒置显微镜下观察,进行集落计数,以超过 50 个细胞的细胞团为一个混合集落形成单位(CFU-Mix)计数,并求出平均值。

(6) 脾脏 CFU-s 测定 取同一小鼠的脾脏,浸泡于 Telleyesnizkys 溶液中,固定 30 min 后,肉眼观察计数脾脏表面的白色结节数,即每个白色结节为一个脾集落形成单位(CFU-S)计数,并求出平均值。

(7) 统计学处理 实验数据依据设计条件分别进行 *F* 检验(方差分析)、*H* 检验(秩和检验)和 *t* 检验。

## 2 结果

### 2.1 rhIL-6 工程菌发酵培养条件的确定

IL-6 工程菌发酵培养(连续五批次)经升温诱导表达,随着时间的延长,有机酸产物的积聚,培养基 pH 值逐渐下降。经  $42^\circ\text{C}$  诱导 5 h 后菌密度达  $1.1698 \pm 0.1012\ \text{A600}$ ,相当于  $9.37 \pm 0.79\ \text{g}$  [湿菌重]/L(结果见图 2)。但若继续延长培养

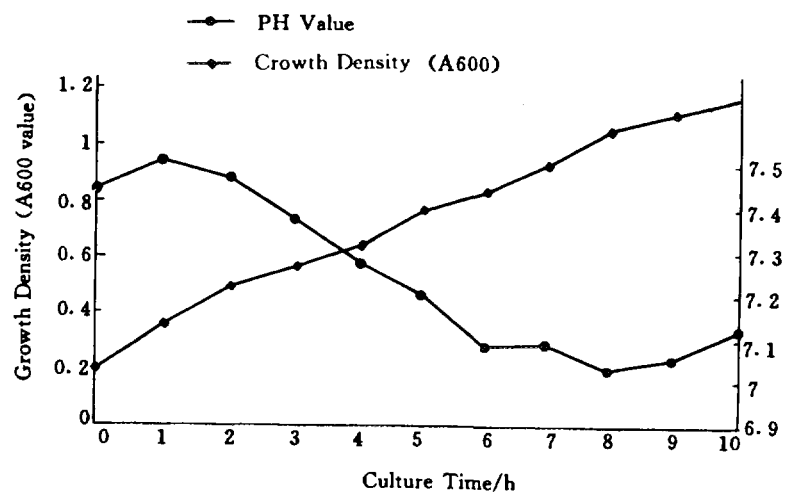


图 2 IL-6 工程菌的发酵培养

时,菌密度非但不再增加反而降低,同时 rhIL-6 的表达水平明显下降。因而,我们将  $42^\circ\text{C}$  诱

导表达时间确定为 5 h, 此时 rhIL-6 的表达占菌体总蛋白的  $35.87\% \pm 2.65\%$  (见图 3)。

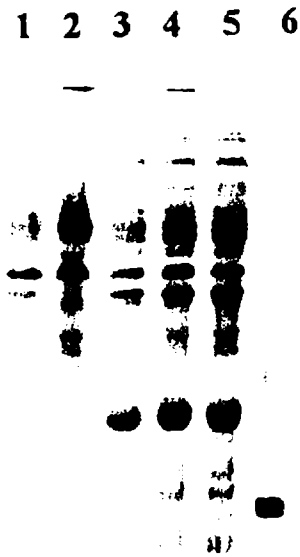


图 3 rhIL-6 包涵体的 SDS-PAGE 分析

1. *E. coli* DH<sub>5</sub>α with pBV IL-6 at 30°C;
2. *E. coli* DH<sub>5</sub>α with pBV IL-6 just at 42°C;
3. *E. coli* DH<sub>5</sub>α with pBV IL-6 at 42°C for 3 h;
4. *E. coli* DH<sub>5</sub>α with pBV IL-6 at 42°C for 4 h;
5. *E. coli* DH<sub>5</sub>α with pBV IL-6 at 42°C for 5 h;
6. Protein molecular marker (14,400; 14,700; 24,000).

## 2.2 rhIL-6 包涵体的提取和纯化

破菌后离心收集的沉淀物, 经用去垢剂和变性剂清洗后, 离心取沉淀。在该工作浓度条件下, rhIL-6 溶解率远低于蛋白涵体中的其它杂蛋白, 上清中损失少量 rhIL-6 (约 10%)。随后以 1% NaCl 洗涤包涵体, 此时其纯度达到  $74.82\% \pm 3.68\%$  (见图 4)。通常沉淀中含有菌体膜蛋白、脂质多糖及核酸物质。4 mol/L 尿素可除去其中的膜蛋白和脂质, 高浓度的 NaCl 可清除核酸物质。因此, 上述步骤提高了包涵体的纯度, 减少了下一步纯化过程中的干扰物质。

## 2.3 重组 IL-6 的纯化和活性鉴定

复性 rhIL-6 上清经凝胶过滤柱层析去除大分子杂蛋白得到纯化产品, 其中经 Sephadex G 50 柱层析, 3 个洗脱峰中, 1 号和 3 号峰为菌体杂蛋白, 2 号主峰为重组 IL-6 蛋白。收集 2 号主峰样品经 SDS-PAGE 分析纯度达到 85%~90%, 柱纯化收率为 49.8%, 比活性为  $3.27 \times 10^6$  IU/mg (表 1)。经阴离子交换柱和 Sephacryl S200 柱进一步纯化后, 纯度在 95% 以上, 回收率为 52.2%, SDS-PAGE 电泳凝胶染色为一条带 (图 4)。采用依赖 IL-6 的小鼠杂交瘤细胞系 B<sub>6</sub> 及 MTT 法测定生物活性达  $4.83 \times 10^6$  IU/mg (表 2)。

表 1 Sephadex G 50 柱过柱后蛋白收率及效价

批次	上样蛋白量 mg	过柱后蛋白量 mg	收率 %	总效价 IU	比活性 IU/mg
1	11.6	5.84	50.34	$4.03 \times 10^6$	$6.90 \times 10^5$
2	11.6	5.84	50.34	$1.43 \times 10^6$	$2.45 \times 10^5$
3	11.6	5.66	48.79	$2.69 \times 10^6$	$0.48 \times 10^6$
均数 $\bar{x}$	11.6	5.77	49.8	$2672 \times 10^6$	$3.27 \times 10^6$

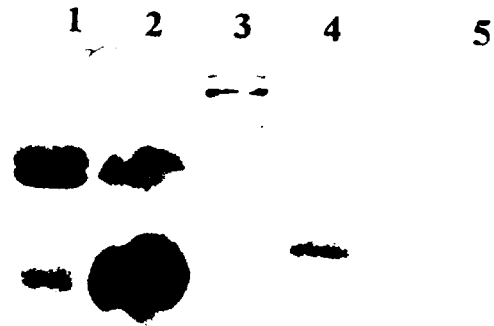


图 4 rhIL-6 纯化的 SDS-PAGE 分析

1. Supernatant after inclusion body washing;
2. Purified inclusion body;
3. Protein molecular marker (14,400; 20,100; 30,000; 43,000; 67,000; 94,000);
4. Purified rhIL-6 after the Sephadex G 50 column;
5. Final purified rhIL-6 after the Sephacryl S 200 column.



表 2 Sephacryl S 200 柱过柱后蛋白收率及效价

批次	上样蛋白量 mg	过柱后蛋白量 mg	收率 %	总效价 IU	比活性 IU/mg
1	4.35	2.44	56.1	$1.97 \times 10^9$	$8.08 \times 10^4$
2	4.35	2.19	50.3	$1.08 \times 10^9$	$4.95 \times 10^4$
3	4.35	2.19	50.3	$3.20 \times 10^9$	$1.46 \times 10^4$
均数 $\bar{x}$	4.35	2.27	52.2	$1.12 \times 10^9$	$4.83 \times 10^4$

#### 2.4 rhIL-6 对受照射小鼠出凝血功能恢复的影响

实验组与阳性对照组于照射后第 12 天,与阴性对照组相比,其 BT,CT 和 PT 均比阴性对照组明显缩短,经 *F* 检验差异显著( $P < 0.01$ ),且 IL-6 阳性对照组与实验组相比,实验组的 BT 和 PT 略优,但无差别( $P > 0.05$ )。见表 3。

表 3 rhIL-6 对受照小鼠 BT,CT 和 PT 恢复的影响/s(秒)  $\bar{x} \pm s$

	实验组	阳性对照组	阴性对照组	<i>F</i>	<i>P</i>
BT	125.83 ± 28.70	147.50 ± 28.60	198.00 ± 20.10	12.08	<0.01
CT	144.20 ± 16.60	140.80 ± 12.80	191.70 ± 26.20	12.94	<0.01
PT	9.83 ± 0.75	10.16 ± 1.47	15.00 ± 1.79	25.34	<0.01

由表可见,本基因室制备的 rhIL-6 在 BT,CT,PT 结果中与法国的 rhIL-6 是有同等功能的。

#### 2.5 rhIL-6 对受照射小鼠外周血 WBC 和 PLT 数量的影响

实验结果经方差分析见表 4。经 IL-6 处理后对小鼠外周血 WBC 计数,阳性对照组和实验组分别为  $(2.82 \pm 0.28) \times 10^9 L^{-1}$  和  $(2.73 \pm 0.34) \times 10^9 L^{-1}$ ,均较阴性对照组  $(1.03 \pm 0.18) \times 10^9 L^{-1}$  有所升高( $P < 0.01$ ),说明经 IL-6 作用后对放射损伤小鼠外周血 PLT 和 WBC 有明显的促进恢复的功效。

表 4 rhIL-6 对受照小鼠外周血 PLT 和 WBC 恢复的影响/ $\times 10^9 \cdot L^{-1}$   $\bar{x} \pm s$

	实验组	阳性对照组	阴性对照组	<i>F</i>	<i>P</i>
PLT	1945 ± 18.36	198.25 ± 19.14	84.25 ± 8.68	129.26	<0.01
WBC	2.73 ± 0.34	2.82 ± 0.28	1.03 ± 0.18	101.38	<0.01

#### 2.6 rhIL-6 对受照射小鼠骨髓 MNC 体外培养 CFU-Mix 的影响

实验结果经秩和检验分析见表 5。受照后第 12 天小鼠骨髓细胞在体外半固体培养体系中经多种造血生长因子(IL-6,GM-CSF,G-CSF 和 IL-3)的共刺激下,rhIL-6 处理组小鼠的 CFU-Mix 计数显著高于对照组( $P < 0.01$ ),而且 IL-6 阳性对照组与实验组之间经 *t* 检验无差异( $P > 0.05$ )。

#### 2.7 rhIL-6 对受照射小鼠脾脏 CFU-s 的影响

受照射小鼠经 rhIL-6 给药后,阳性对照组和实验组脾脏 CFU-s 计数分别为  $10.67 \pm 3.27$  和  $9.67 \pm 2.42$ ,阴性对照组无或偶见 CFU-s(8 只小鼠仅 2 只各有 1 个 CFU-s,其余为 0),经秩和检验(见表 5)结果显示两 rhIL-6 给药组与对照组均有显著差异( $P < 0.01$ )。

#### 2.8 实验小鼠生存期的观察

未用 rhIL-6 处理的受照小鼠第 3 天出现死亡,第 12 天时仅存活 8/20 只(预实验时受

照小鼠于第 18 天全部死亡),rhIL-6 处理组受照小鼠照后第 4 天出现死亡,12 天时存活 12/20 只。

表 5 rhIL-6 对辐射损伤小鼠骨髓造血细胞体外培养 CFU-Mix 及脾脏 CFU-s 的影响

	实验组	阳性对照组	阴性对照组	H	P
CFU-Mix	96.63±9.88	96.13±11.63	54.75±15.43	15.42	<0.01
CFU-S	9.67±2.42	10.67±3.27	0.25±0.46	11.38	<0.01

### 3 讨 论

SMD-945 重组人 IL-6 工程菌经连续五批发酵,结果分析表明稳定性较好。重组 IL-6 表达率为 35.87%,高于已有文献报告的结果<sup>[15~17]</sup>。柱纯化总收率为 23.1%,虽低于文献报道,但由于我们在纯化过程中改进了复性条件,所以 rhIL-6 的比活性高达  $4.83 \times 10^8$  IU/mg。此结果表明 rhIL-6 的制备工艺达到设计要求,且经热原试验、毒性试验、安全试验等各项生物指标检测均达到卫生部人用重组 DNA 制品质量控制要点的标准[卫药政字(90)第 37 号],可望为基础实验及临床研究提供高质量 rhIL-6 制剂。

本研究采用小鼠辐照致骨髓损伤动物模型,通过检测实验小鼠 BT,CT,PT,WBC 和骨髓造血细胞体外培养 CFU-Mix,脾脏 CFU-s 的变化等体内外实验分析 rhIL-6 治疗后对小鼠骨髓型辐射损伤早期造血功能恢复的影响。结果显示,外源性 rhIL-6 对辐射损伤小鼠 BT,CT 和 PT 与阴性对照组小鼠比较,时间明显缩短( $P < 0.01$ ),外周血 PLT 和 WBC 的计数也较对照组有明显的提高。表明适量的 rhIL-6 体内注射,能显著提高骨髓型辐射损伤小鼠外周血 PLT 和 WBC 数量,与国内外文献的报道一致<sup>[3,8,9,11]</sup>,同时提示 rhIL-6 还可改善其凝血功能,其机理除由 PLT 数量增加产生的作用外。IL-6 作为一种髓系造血细胞的有效刺激物,它能诱导巨噬细胞的成熟和增殖,成熟的巨噬细胞可分泌多种补体成分及凝血因子,同时 IL-6 又是一种急性期蛋白的诱导物,可刺激肝细胞产生纤维蛋白原,这些因素均有利于受照小鼠凝血功能的恢复。

骨髓造血细胞体外增殖培养证实,在相同培养体系和条件下,rhIL-6 处理的受照小鼠表现出在多种造血生长因子协同作用下骨髓造血细胞 CFU-Mix 增殖较多,而对照组 CFU-Mix 较少( $P < 0.01$ )。结果表明 IL-6 在骨髓 HSC 的增殖分化中起重要作用。IL-6 作为髓系和血小板系定向造血细胞的刺激物,它可导致干细胞 G<sub>0</sub> 期缩短,促进干细胞加速增殖和分化,经体内应用 rhIL-6 对辐射损伤小鼠的骨髓造血细胞有很强的促进增殖作用<sup>[4,5,10]</sup>。

脾肝作为机体的一个重要储备造血器官,经致死性辐照后骨髓造血功能显著受抑制时,起代偿性髓外造血功能,形成脾脏造血灶,即内源性 CFU-s,起替代和补充照射损伤骨髓造血机能作用。本实验结果显示,rhIL-6 处理后脾脏 CFU-s 计数均显著高于对照组( $P < 0.01$ ),可通过了解脾脏造血机能状况进一步证实 IL-6 对机体造血干/祖细胞的刺激增殖作用。已知 IL-6 可作用于早期原始多功能造血干细胞,促进其向髓系和淋巴干细胞分化。所以,CFU-s 反映的髓外造血功能主要与 HSC 有关<sup>[7]</sup>。

机体受到辐射损伤或放/化疗后骨髓造血功能受抑制,导致造血障碍,外周血 PLT 和 WBC 显著降低,因而出血和继发感染成为其最重要的死亡原因,是放射病与肿瘤患者放/化疗后亟待解决的问题。依据本研究结果所示,进一步证实了 rhIL-6 对骨髓型辐射损伤具有

诱导骨髓造血干细胞增殖和分化,促进凝血功能恢复和外周血 PLT 和 WBC 升高,以及促进辐射损伤骨髓造血功能恢复的功效。近几年研究证实,IL-6 具有重要的抗肿瘤效应<sup>[14]</sup>,可提高机体的特异性和非特异性免疫反应能力,因此,rhIL-6 应用于辐射事故患者的治疗、肿瘤患者放/化疗后 PLT 和 WBC 的恢复、尤其是与其它细胞因子联合应用,其临床前景十分广阔。

此外,本研究结果经统计分析显示,本研究室自制备的 rhIL-6 与国外引进的 IL-6 标准品相比较具有完全相同的功效,这将为今后的基础研究和临床试验提供了物质基础。

## 4 小 结

(1) 重组人 IL-6 工程菌连续五批发酵试验,结果分析表明稳定性较好。rhIL-6 表达率达到 35.87%,包涵体的纯度为 74.8%,经凝胶柱层析和离子交换柱纯化和复性,rhIL-6 纯度大于 95%,纯化收率为 23.1%,比活性高达  $4.83 \times 10^8$  IU/mg。

(2) 重组人 IL-6 处理小鼠 BT,CT,PT 明显较阴性对照组缩短( $P < 0.01$ ),而且 IL-6 能明显提高受辐照小鼠外周血 PLT 和 WBC 数量,分别较阴性对照组提高 130% 和 165% ( $P < 0.01$ )。实验结果表明,IL-6 能改善辐射损伤小鼠造血状态,明显地促进其外周血 PLT 和 WBC 的升高,有利于出、凝血功能的恢复。

(3) 髓型辐射损伤小鼠经 IL-6 给药后,其骨髓造血细胞体外培养 CFU-Mix 和脾脏 CFU-s 计数均显著高于对照组( $P < 0.01$ )。结果显示,rhIL-6 可减轻辐射所致的骨髓损伤和促进造血干/祖细胞增殖的分化。有利于受照小鼠早期造血功能的恢复。

(4) 本研究中所使用的本研究室自制备的 rhIL-6 和法国引进的 rhIL-6 参照标准品,在实验中各项检测数据显示与阴性对照组差异显著( $P < 0.01$ ),但两种 rhIL-6 制品相比较,统计分析显示无差异( $P > 0.05$ ),证明本研究室纯化的 rhIL-6 制品与国外引进的 IL-6 具有完全相同的功效。

## 参 考 文 献

- 1 Kishimoto T. The Biology of Interleukin-6. *Blood*, 1989, 74(1):1
- 2 Hirano T, Akira S, Taga T, et al. Biological and Clinical Aspects of Interleukin 6. *Immunology Today*, 1990, 11(12):443
- 3 Asano S, Okano A, Ozawa K, et al. In Vivo Effects of Recombinant Human Interleukin-6 in Primates, Stimulated Production of Platelets. *Blood*, 1990, 75(8):1602
- 4 MacVittie T J, Farese A M, Patchen M L, et al. Therapeutic Efficacy of Recombinant Interleukin-6(IL-6) Alone and Combined With Recombinant Human IL-3 in a Nonhuman Primate Model of High-Dose, Sublethal Radiation-Induced Marrow Aplasia. *Blood*, 1994, 84(8):2515
- 5 Neta R, Perlstein R, Vogel S N, et al. Role of Interleukin 6(IL-6) in Protection from Lethal Irradiation and in Endocrine Responses to IL-1 and Tumor Necrosis Factor. *J. Exp. Medicine*, 1992, 175:689
- 6 Patchen M L, Fischer R, MacVittie T J. Effects of Combined Administration of Interleukin-6 and Granulocyte Colony-Stimulating Factor on Recovery from Radiation-Induced Hemopoietic Aplasia. *Exp. Hematology*, 1993, 21:338
- 7 Patchen M L, MacVittie T J, Williams J L, et al. Administration of Interleukin-6 Stimulates Multilineage Hematopoiesis and Accelerates Recovery From Radiation-Induced Hematopoietic Depression. *Blood*, 1991, 77(3):472
- 8 Herodin F, Mestries J C, Janodet D, et al. Recombinant Glycosylated Human Interleukin-6 Accelerates Peripheral Blood Platelet Count Recovery in Radiation-Induced Bone Marrow Depression in Baboons. *Blood*, 1992, 80(3):688
- 9 Burstein S A, Downs T, Friese P, et al. Thrombocytopoiesis in Normal and Sublethally Irradiated Dogs, Response to Human

Interleukin-6. *Blood*, 1992, 80(2):420

- 10 Pojda Z, Aoki Y, Sobiczewska E, et al. In Vivo Administration of Interleukin 6 Delays Hematopoietic Regeneration in Sublethally Irradiated Mice. *Exp. Hematol*, 1992, 20: 862
- 11 Quesenberry PJ, McGrath HE, Williams ME, et al. Multifactor Stimulation of Megakaryocytopoiesis; Effects of Interleukin 6. *Exp. Hematol*, 1991, 19: 35
- 12 陈志荣, 杨吉成, 盛伟华等. 重组人 IL-6 在 *E. coli* 中的高效表达. *中华微生物学和免疫学杂志*, 1995, 15(6): 386
- 13 朱康儿, Kerry Atkinson. IL-3 和 IL-6 单独和联合 IL-1, G-CSF, GM-CSF 对小鼠转基因骨髓移植后血小板计数的影响. *中华放射医学与防护杂志*, 1996, 16(1): 13
- 14 王一理, 耿宜萍, 司履生. 白细胞介素 6 抗肿瘤作用的实验研究. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 1995, 2(2): 131
- 15 边疆, 陶好霞, 薛冲等. 重组人白细胞介素 6 的制备. *生物工程进展*, 1995, 15(6): 33
- 16 田季德, 李晨, 陈慰峰等. 人白细胞介素 6 在大肠杆菌中的高效表达. *中国免疫学杂志*, 1991, 7(6): 331
- 17 任启生, 王嘉玺, 邹民吉等. pBV-IL-6 重组质粒的构建及其在 *E. coli* 细胞中的超高表达. *中国免疫学杂志*, 1992, 8(3): 133

### 图书在版编目(CIP)数据

中国核科技报告 CNIC-01166 SMC-0134:rhIL-6 的制备及对辐照小鼠造血功能恢复的研究/杨吉成等著. —北京:原子能出版社,1997. 8

ISBN 7-5022-1683-9

I. 中… I. 杨… III. 核技术-研究报告-中国 IV. TL-2

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (97) 第 09614 号

rhIL-6 的制备及对辐照小鼠造血功能恢复的研究

杨吉成等著

©原子能出版社,1997

原子能出版社出版发行

责任编辑:郭向阳

社址:北京市海淀区阜成路 43 号 邮政编码:100037

中国核科技报告编辑部排版

核科学技术情报研究所印刷

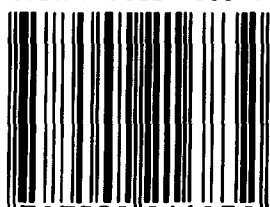
开本 787×1092 1/16·印张 1·字数 15 千字

1997 年 8 月北京第一版·1997 年 8 月北京第一次印刷

# CHINA NUCLEAR SCIENCE & TECHNOLOGY REPORT

This report is subject to copyright. All rights are reserved. Submission of a report for publication implies the transfer of the exclusive publication right from the author(s) to the publisher. No part of this publication, except abstract, may be reproduced, stored in data banks or transmitted in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording or otherwise, without the prior written permission of the publisher, China Nuclear Information Centre, and/or Atomic Energy Press. Violations fall under the prosecution act of the Copyright Law of China. The China Nuclear Information Centre and Atomic Energy Press do not accept any responsibility for loss or damage arising from the use of information contained in any of its reports or in any communication about its test or investigations.

ISBN 7-5022-1683-9



9 787502 216832 >