维普资讯 http://www.cqvip.com

算阳性率和表达强度可检测某一细胞IL－3的转录水平。阴性对照组(未加探针进行杂交;用RNase处理载玻片后再杂交)中各组细胞均无阳性颗粒出现。研究结果表明:PCR法制备的hIL－3cDNA探针用于原位杂交具有操作简便,杂交结果直观,评价准确,同时探针能长期保存和避免放射性污染等优点。

研究为探讨IL－3在组织细胞中的表达及调控奠定了实验技术。应用原位杂交技术能从载片上直接观察细胞与组织的IL－3mRNA表达,若与免疫细胞化学技术结合后,同时可检测IL－3的蛋白表达水平,从而能从基因转录和蛋白表达水平研究IL－3的表达与调控。

参 考 文 献

1.Lange B, et al. Blood 1987;70:192
2.Yang YC,et al. Cell 1986;47:3
3.张贺秋,等. 中国应用生理学杂志 1994:10(2):125
4.王 勇,等. 中华血液学杂志 1995;16(12):648
5.王亚平,等. 重庆医科大学学报 996;校庆特刊 7
6.Lopez AF, et al. Proc Natl Acad Sci U S.A 1987:84:2761
7.Stephanie S,et al. Annu Rev cell Dev Biol 1996;12:91
8.Moench TR, et al. J Virol Methods 1985;11:119

(收稿日期 1999－02－01)

Preparation and application of human IL－3cDNA probe

Wang Yaping, et al
Department of histology and embryology, college of basic medical sciences

By using the techniques of polymerase chain reaction(PCR),human IL－3cDNA probe was prepared with pUC 18－ IL－ 3 plasmid, labeled with digoxigenin－11dUTP and identified with dot blot. We detected the expression of IL－3 mRNA in murine bone marrow stromal cells, human fetal thymocytes and splenic cells by nucleic acid in situ hybridization. The results indicated that the prepared IL－3cDNA probe can provide the sensitivity and simplicity of handling needed to replace radioactiassays.

KEY WORDS IL－3; cDNA probe; In situ hybridization; PCR

肝纤维化和慢性肾功能不全患者血清Ⅳ型胶原浓度测定

基础医学院病理生理教研室 沈 宜* 范维珂
第二临床学院消化内科 何 松
临床学院内科 兰 帆

提 要 用双抗体夹心法建立人血清Ⅳ型胶原的ELISA检测法,方法快速、稳定,灵敏度为16ng/ml,批内变异系数为8.52%,批间变异系数为9.23%,回收率为95.28%,与间质胶原无交叉反应。测定110例健康成人血清Ⅳ型胶原浓度均值是34.36±19.41ng/ml。临床应用于96例肝纤维化及30例慢性肾功能不全患者血清Ⅳ型胶原浓度测定,其均值明显高于正常人浓度,有显著差异。

关键词 Ⅳ型胶原; 肝纤维化; 慢性肾功能不全
中图分类号 R575.2; R692.6

* 女,1963－11出生,讲师

维普资讯 http://www.cqvip.com

Ⅳ型胶原是构成基底膜的主要成份,特异地存在于多种上皮及血管内皮下,分子间形成一个有弹性的三维网状骨架结构。在肝纤维化时,Ⅳ型胶原在肝血窦增生,使肝血窦毛细血管化[1]。在慢性肾功能不全病人中,Ⅳ型胶原在肾小球基底膜损伤、修复和促使肾小球硬化中具有双重作用,这些已日益受到人们的关注[2]。我们自行建立一种快速、稳定的血清Ⅳ型胶原ELISA检测方法,探讨肝纤维化病人和慢性肾功能不全病人血清Ⅳ型胶原浓度的变化。

1 材料与方法

1.1 血清标本 健康成人血清来自重庆市血站的健康献血人员。肝纤维化、肾功能不全患者血清来自重庆医科大学附属第一、二医院消化内科、泌尿内科住院确诊病人,共计健康对照110例,肝纤维化96例,肾功能不全30例。分离血清,-20°C冰箱保存。

1.2 材料 人Ⅳ型胶原(Sigma,C7521),人Ⅰ型胶原(Sigma,C3511)。

1.3 鼠抗人Ⅳ型胶原单克隆抗体制备与鉴定,由本室研制,见文献[3]。

1.4 兔抗人Ⅳ型胶原多克隆抗体制备与鉴定,由本室研制,见文献[4]。

1.5 辣根过氧化物酶(HRP)标记兔抗人Ⅳ型胶原多抗的制备与鉴定采用过碘酸氧化结合法标记兔抗人Ⅳ型胶原多抗,用ELISA直接法鉴定其活性和特异性。标记方法如下:6mgHRP溶于0.6ml三蒸水→加0.06M $NaIO_2$ 0.6ml→4°C40'→1%乙二醇1ml→室温1h→ColⅣ多抗2ml→pH9.5CBS透析过夜(4°C)→加5mg/ml硼氢化钠0.3ml→4°C2h→0.05M pH7.4PBS透析(4°C,多次换液)→分装后,-20°C冻存。

1.6 双抗体夹心ELISA检测法

1.6.1 方法 在我室原建立的方法基础上进一步改进而来[4],直接用HRP标记兔抗人Ⅳ型胶原多抗代替兔抗人Ⅳ型胶原多抗和HRP标记的羊抗兔IgG,两步化为一步,使方法更简便,具体操作简述如下:1:1000CⅣMcAb包板4°C过夜,封闭,清洗后,每孔加100ul不同浓度的Ⅳ型胶原标准品或待测血清(均重复双孔),37°C1.5h,清洗,加1:300 HRP标记的兔抗人Ⅳ型胶原多抗,每孔100ul,37°C1.5h,清洗,最后加底物OPD显色,2M H_2SO_4 终止反应,测OD_{492}。画出标准曲线,由光密度值求其血清Ⅳ型胶原浓度。

1.6.2 方法灵敏度、精确度、回收率及特异性测定 将多次测定的标准曲线值绘制在坐标纸上,以OD_{492}与Ⅳ型胶原浓度呈直线关系的浓度范围最低界作为该方法的灵敏度。对血清标本同一次与不同次重复测定其Ⅳ型胶原浓度,求出其批内、批间变异系数,以了解该方法的精确度。用已知浓度的Ⅳ型胶原标准品与已知Ⅳ型胶原浓度的血清标本混合,测其浓度,求其回收率。用Ⅰ型胶原代替Ⅳ型胶原进行测定,了解方法的特异性。

1.7 临床应用 对收集的正常对照、肝纤维化、慢性功能不全病人血清用上述方法测定其492nm光密度(每份血清标本重复双孔),画出标准曲线,由光密度值求得血清Ⅳ型胶原浓度。

1.8 统计学处理 数据用$\bar{x}\pm s$表示,统计学方法用t检验。

2 结果

2.1 HRP标记兔抗人Ⅳ型胶原多抗的活性和特异性鉴定结果

采用ELISA直接法,结果见表1:

表1 HRP标记兔抗人Ⅳ型胶原多抗的活性和特异性鉴定

包被抗原	OD_{492}
包被液	0.002
Ⅰ型胶原(125ng/ml)	0.002
Ⅳ型胶原(16ng/ml)	0.248
(125ng/ml)	0.408
(500ng/ml)	0.635

2.2 双抗体夹心ELISA法最佳条件的选择

用棋盘滴定法得到理想结果:包被用抗Ⅳ型胶原单抗浓度为1:1000稀释,HRP标记的兔抗人Ⅳ型胶原多抗为1:300稀释。能绘制如下标准曲线。

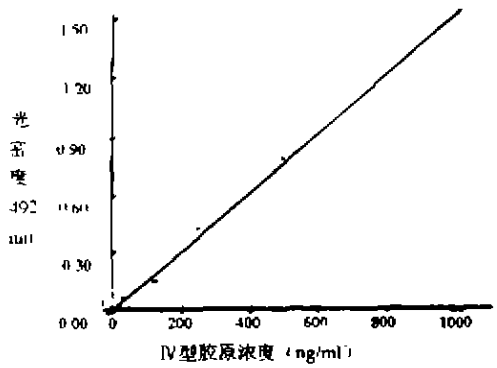


图1 Ⅳ型胶原ELISA检测法的标准曲线

维普资讯 http://www.cqvip.com

2.3 **方法灵敏度、精确度、回收率、特异性** 当Ⅳ型胶原浓度在16～1000ng/ml之间时,工作曲线为线性,灵敏度为16ng/ml。2份血清标本分别同批重复10次测定,平均批内变异系数为8.52%;2份血清5次不同批重复测定,平均批间变异系数为9.23%。将血清中加入已知量的Ⅳ型胶原标准品,测得回收率为95.28%。该方法与Ⅰ型胶原无交叉反应。

2.4 **临床应用** 分别测定110例健康成年人血清及96例肝纤维化、30例慢性肾功能不全病人血清Ⅳ型胶原浓度,结果见表2。其浓度分布情况见图2。

表2 正常与肝纤维化、慢性肾功不全血清Ⅳ型胶原浓度

组别	例数	血清Ⅳ型胶原浓度($\bar{x}\pm s$) ng/ml
正常	110	34.36±19.41
肝纤维化	96	96.40±37.84 *
慢性肾功不全	30	201.30±129 *

* 与正常比较 $P<0.01$

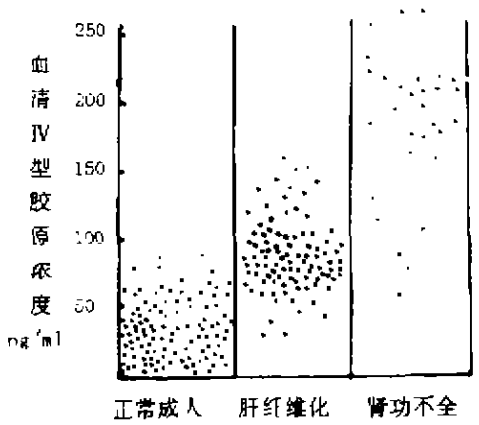


图2 正常人与肝纤维化、慢性肾功不全血清Ⅳ型胶原浓度分布

3 讨论

固相酶联免疫吸附试验因其快速、方便、无放射污染等优点,在临床和实验室工作中越来越受到人们重视。我们在本室已建立的血清Ⅳ型胶原ELISA检测法基础上,将辣根过氧化物酶标记在兔抗Ⅳ型胶原多抗上,得到高特异性、高活性的酶标抗体,提高了原方法的精确度,减少了步骤,缩短了时间,为血清Ⅳ型胶原浓度测定提供一更简便、有效的检测方法。

肝纤维化时,胶原蛋白明显增加,Ⅳ型胶原大量沉积于血窦壁,且血清Ⅳ型胶原浓度与肝纤维化程度密切相关[6]。在我们测定结果显示:肝纤维化血清Ⅳ型胶原浓度与正常对照有显著差异,与文献报导一致,支持Ⅳ型胶原是肝纤维化的血清标志物,为临床快速方便判断肝纤维化程度提供帮助。

近年来,在对慢性肾功能不全发病机制的研究中,发现肾小球硬化是多原因引起肾小球损伤后出现的共同转归,是肾功能衰竭的主要病理基础。肾小球基底膜增厚,肾小球系膜区为主的细胞外基质积聚,导致弥漫性或结节性肾小球硬化[6],而肾基底膜上存在多种胶原和非胶原蛋白成分,在数量上最多的是Ⅳ型胶原[7],Ⅳ型胶原是肾小球疾病中堆积的ECM主要组份之一[8]。肾功能衰竭病理过程中,血清Ⅳ型胶原浓度有何变化?我们的结果显示慢性肾功能不全病人血清Ⅳ型胶原明显高于正常对照,与肾脏病变情况一致,可帮助判断慢性肾功能不全病人肾脏病变情况,对临床诊断有一定的指导意义。

参考文献

1.Hahn E, et al. Gut. 1980; 21:63
2.周庚寅,等. 山东医科大学学报 1997; 35(2):91
3.沈 宜,等. 免疫学杂志 1994; 10:113
4.沈 宜,等. 免疫学杂志 1997; 13(4):226
5.Tsutsumi M, et al. Hepatology. 1993; 17:820
6.张月娥,等.中华病理杂志 1994; 23(1):4
7.Sibiger S, et al. Kidney Int. 1993; 43:853
8.裘莲群. 国外医学泌尿系统分册 1997; 17(1):28

(收稿日期 1999－03－23)

维普资讯 http://www.cqvip.com

Detection of serum concentration of type IV collagen with liver cirrhosis and chronic renal insufficiency

Shen Yi, et al
Department of pathophysiology, college of basic medical sciences

A sandwich type of enzyme-linked immunosorbent assay for serum human type IV collagen was established. The method is fast and stable.The sensitivity of the immunoassay was 16ng/ml. The CV value of intra-assays was 8.52%,and that of inter-assays was 9.23%.The accuracy was 95.28%. No cross reaction was found with type I collagen. The concentrations of serum Type IV collagen from 110 adult healthy persons were 34.36±19.41ng/ml. Serum samples from 96 patients with Liver cirrhosis and 30 patients with chronic renainsufficiency showed increased value of serum Type IV collagen concentration compared with those from the healthy controls in a very significant degree.

KEY WORDS Type IV Collagen, Hepatic Fibrosis; Chronic Renal Insufficiency

甲基斑蝥胺诱导$HepG_2$细胞凋亡的实验研究

基础医学院病理生理教研室 唐 俐* 段积华

提 要 为探讨甲基斑蝥胺对$HepG_2$细胞凋亡的诱导作用,揭示其抗癌机制,用MTT法观察药物对细胞的生长抑制作用,用TUNEL法、流式细胞仪及光镜等技术研究癌细胞凋亡。结果表明药物对癌细胞有明显的抑制生长作用;光镜可见染色质浓缩、核碎裂等改变;流式细胞仪可检测到凋亡峰;6mg/ml药物作用5天,TUNEL法强阳性。提示甲基斑蝥胺可诱导$HepG_2$细胞凋亡。

关键词 甲基斑蝥胺; 细胞凋亡; 肝脏肿瘤细胞株
中图分类号 R735.7

斑蝥素(cantharidin)是我国传统中药斑蝥抗肿瘤作用的有效成分,临床证明对肝癌有肯定疗效,但有毒副作用[1]。甲基斑蝥胺(N-methylcantharidinimidum)系斑蝥素的亚胺类衍生物,临床应用对中、晚期肝癌有一定疗效,且毒性远较斑蝥素低[2]。本文采用$HepG_2$细胞,观察甲基斑蝥胺诱导的细胞凋亡,以探讨其抗癌作用的机理。

1 材料与方法

1.1 **细胞** $HepG_2$细胞系本室保存。用含10%小牛血清的RPMI 1640(Gibco)培养基,在37℃、5%CO_2条件下培养。

1.2 **药物** 甲基斑蝥胺(N-methylcantharidinimidum)由四川省中药研究所提供。使用时用培养液稀释至所需药物浓度。

1.3 **MTT试验**[3] 取对数生长期$HepG_2$细胞(5×10^4/ml),接种于96孔板内,200μl/孔。加入甲基斑蝥胺使终浓度分别为5mg/ml、6mg/ml、7mg/ml、8mg/ml,每种浓度设6个平行孔,另设阴性和试剂对照组。5%CO_2,37℃培养68h加入5mg/ml MTT(Fluka)20μl,继续培养4h后,吸去培养液,加入DMSO 200μl,振荡5min后用酶标仪比色测定OD值。

根据下列公式计算甲基斑蝥胺对$HepG_2$细胞的抑制率。

肿瘤细胞存活率=(实验组OD值/阴性对照组OD值)×100%

抑制率=1-肿瘤细胞存活率

* 女,1970-07出生,助教