维普资讯 http://www.cqvip.com

ELISA法检测红细胞免疫粘附功能的探讨

第一医院血液组 曹 东 刘国卿* 黄宗干

提 要 红细胞免疫粘附活性(RCIA)是评价红细胞免疫功能的重要指标。作者应用ELISA法首次建立了检测RCIA活性及RBC膜免疫复合物水平的红细胞酶联免疫竞争吸附实验。该方法简便，试剂安全，灵敏度高、重复性好、结果可靠。可望为检测红细胞免疫功能的有效方法之一

关键词：红细胞；红细胞免疫；红细胞膜
中图分类号 R555；R446.63

由于对红细胞功能认识的加深，红细胞免疫功能的检测，被认为是免疫病理与临床免疫学的重要指标之一。目前常以红细胞免疫粘附活性来评价其免疫活性。文献报道的方法较多，但大多只能定性和半定量，灵敏度较低。Miyakawa建立的放射免疫法，具有灵敏度高，特异性强等优点[1]。但该法需标记同位素和配备其测量仪器，不仅价格贵，而且对人体有一定的危害。为此我们依据Miyakawa的实验原理，首次建立了检测人RCIA及红细胞膜免疫复合物水平的红细胞酶联免疫竞争吸附实验，现报道如下：

材料和方法

1. 实验对象

50例年龄为18—40岁的健康自愿者，女21例，男29例。

2. 实验方法

（1） 标准免疫复合物的制备[2]

参照《临床免疫技术》一书方法制得[2]。将人IgG加热63℃15min后即形成热聚集IgG（AHG, heat aggregate human IgG)。WHO提出可将此AHG作为一标准免疫复合物。AHG能激活补体而致敏[3]。所得的AHG用紫外吸收法定量检测蛋白含量为7mg/ml，分装安瓿，于－30℃保存。

（2） 人IgG的制备

参照《临床免疫技术》一书制得。

（3） ELISA所用药品器材

酶标抗体：（辣根过氧化物酶标记羊抗人IgG结合物）卫生部成都生物制品所产．批号：85.2。

基质液：pH5.6，0.05M柠檬酸盐缓冲液100ml加邻苯二胺40mg，临用前加30% H_2O_2 0.15ml。

比色仪：GXM-201型酶标光度计。

固相载体：40孔聚苯己烯塑料微孔板（四川仪分厂制）

（4） 红细胞结合物悬液的制备

采静脉血（肝素抗凝）用Ficoll液分离红细胞，红细胞用pH7.4的GVB缓冲液洗涤三次，末次洗涤后调整红细胞浓度为 10^8/ml。取稀释二倍的新鲜混合AB型血清 0.2ml，AHG（0.32mg/ml）及红细胞悬液0.2ml混合摇匀，置37℃水溶45min，再用GVB液洗涤红细胞三次，末次洗涤后调整红细胞浓度为 10^8/ml。

（5） ELISA步骤

以人IgG（20μg/ml200μl）包被40孔聚苯乙烯酶标板各孔，4℃放置18h，去包被液，用1%NCS

* 检验系临床血液学教研室

维普资讯 http://www.cqvip.com

—PBS—0.05% TW20液（N. C. S. 牛血清白蛋白液）注满各孔，37℃温育30min，清洗板孔后，逐孔加入倍比稀释的已知量的AHG（3200—32ng/100μl）100μl作竞争抑制标准曲线，或加入待测样本的红细胞结合物悬液100μl或未结合AHG的红细胞悬液（10^8/ml）100μl；接着逐孔加入1:100稀释的辣根过氧化物酶羊抗人IgG100μl（每份一式二孔）37℃温育2h，清洗板孔，每孔加入基质液200μl，37℃温育30min后及时用2M H_2SO_4 50μl终止反应。10min后用GXM-201型酶标光度计在波长492nm下进行比色，读取各孔OD值．参照本板竞争抑制标准曲线，求得待测样本的RCIA活性及红细胞膜免疫复合物水平，以相当于AHGng/10^7RBC表示。

3. 统计学处理

ELISA实验原始数据作常用对数转换以几何平均数G及IgG+SIgG表示结果，各组数据经正态分布检验符合正态分布。

方法学鉴定

1. 正常人男女各组RCIA活性及红细胞膜免疫复合物水平见表Ⅰ。

2. 特异性

将同一正常人的红细胞，用灭活与未灭活的补体，加不同浓度的AHG，结果表明：不同浓度的AHG加上56℃灭活30min的人血清组其OD值明显高于补体未灭活组，说明该反应主要依赖补体而存在。见图Ⅰ。

3. 灵敏度

用试剂空白作对照OD值调零，经用ELISA竞争抑制法测得其OD值，绘制成竞争抑制标准曲线，见图Ⅱ．当AHG浓度31.25—16000ng/100μl时呈一段斜率较好的直线，故该法的灵敏度为31.25ng/100μl。

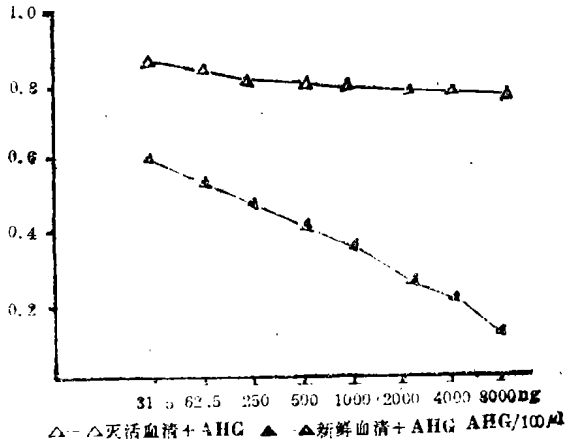
4. 重复性

十次检测的标准曲线，表明有较好的重复性，在本实验相同条件下，各不同稀释度在标准曲线上的同一点，10次测定结果，其变异系数均未超过10%，如表Ⅱ。同一微孔板上平行测定4孔的变异系数亦未超过15%。

5. 实验条件的选择

（1）IgG包被浓度的选择：用不同浓度的AHG、IgG、酶标抗体作棋盘滴定，结果表明IgG为20μg/ml、酶标抗体浓度为1:100时，不同浓度的AHG的OD值，成一较好斜率的曲线。

（2）红细胞浓度的选择：用10^{10}—10^4/ml的红细胞浓度作实验，当RBC为10^8/ml时OD值的变化最为明显



图Ⅰ E-ELISA特异性检查

表1 正常人红细胞免疫指标测定结果

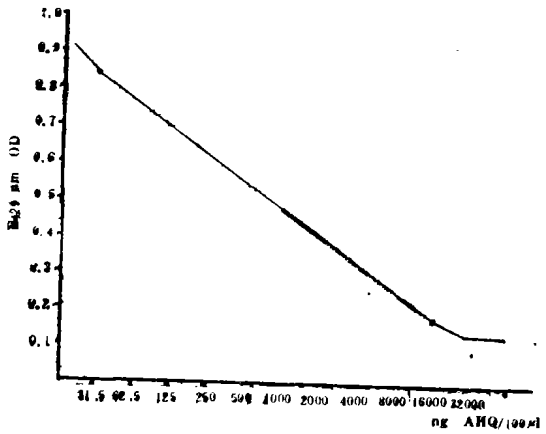
组别	例数	RCIA活性 (ngAHG/10^7RPG)		RBC膜CIC (ngAHG/10^7RBG)	
		G	IgG±SIgG	G	IgG±SIgG
男	29	5454.06	3.74±0.22	188.18	2.28±0.2
女	21	5570.04	3.75±0.19	235.01	2.37±0.25
男、女合并统计	50	5445.02	3.73±0.22	234.72	2.37±0.21

注：男与女各指标比较·结果P均>0.05

维普资讯 http://www.cqvip.com

表Ⅱ 10次E-ELISA竞争曲线测定结果

AHC 浓度 ng/100μl	同一浓度十次测定结果 平均数($\bar{X}$)	标准差(S)	变异系数(CV%)
32	0.815	0.0170	1.9
63	0.780	0.0133	1.7
125	0.719	0.0052	0.7
250	0.612	0.0084	1.3
500	0.542	0.0158	2.9
1000	0.484	0.0070	1.4
2000	0.405	0.0053	1.3
4000	0.308	0.0023	0.7
8000	0.248	0.0062	4.2
16000	0.175	0.0158	9.1
32000	0.136	0.0088	6.4



图Ⅰ E-ELISA法检测RCIA 标准竞争抑制曲线

讨 论

应用ELISA法检测红细胞免疫功能是基于红细胞表面具有大量的免疫粘附受体(C_{3b}/C_{4b}受体)。Fearon发现循环血液中95%的C_{3b}受体是位于红细胞表面[4]。AHG作为一变性的IgG，与IgG有许多相同的免疫活性，但AHG能激活补体被致敏，致敏后的AHG通过C_{3b}与红细胞膜C_{3b}受体结合，测定红细胞结合AHG的多少表示RCIA活性的高低[4]。我们测得50例正常人的RCIA活性如表1，男女间RCIA活性无显著差别（$P>0.05$）。

Cornacoff的实验证明红细胞具有携带及清除血清CIC的作用[5]。郭峰等也发现红细胞表面有CIC存在[6]。我们的实验结果表明红细胞表面粘附有大量的CIC，如表1。

目前国内外检测红细胞免疫粘附功能的方法常有：红细胞-羊红细胞花结（R-R花结）实验[4]；红细胞酵母花环实验[6]；免疫粘附抑制实验[1]及放射免疫测定法[1]等。前三方法简便，但只能半定量，灵敏度较低。我们依据miyakawa的放射免疫定量测定法，首次建立的红细胞酶联免疫竞争吸附实验。用辣根过氧化物酶标记羊抗人IgG，用聚苯乙烯塑料微孔板作固相载体，此法简便易行，竞争抑制法避免了红细胞对OD值的影响，在微孔板上一次可测大批样本，与放射法相比，还省去了同位素标记抗体所需的技术和仪器，没有放射性损伤，且酶标抗体安全，便于保存。本实验特异性强，灵敏度高，重复性好，因此可望本法为研究红细胞免疫功能的有效方法之一。

参 考 文 献

[1] Miyakawa Yuzo. The Lancet 1981; Ⅰ:493

[2] 余贺. 临床免疫学技术 上海科技出版社 1982; P245

[3] 陈敬贤. 国外医学（免疫学分册）1982; 12:1:5

[4] Fearon DT. Pro Natl Acad Sci 1979; 76:59

[5] Cornacoff JB. J Clin Invest 1983; 71:236

[6] 郭峰：第二军医大学学报 1982; 3:188

(收稿日期1990-06-14)

下转第12页

维普资讯 http://www.cqvip.com

MODIFIED HORIZONTAL GLOTTECTOMY FOR TREATING THE CANCER OF BILATERAL VOCAL CORDS

Chen Peijun

(Department of Otolaryngology, The First Hospital)

We have modified the horizontal glottectomy designed by Claearo. 18 patients suffering from the cancer of bilateral vocal cords were treated by our modified surgical procedure in 1983 to 1990. Of 18 patients, 17 had glottic cancer: 10 in $T_{1b}N_0M_0$, 4 in $T_2N_0M_0$ and 3 in $T_3N_0M_0$; 1 patient had $T_3N_0M_0$ of infra-glottic cancer.

The function of phonation, deglutition and respiration of the larynx restored quickly after operation. The voice is satisfactory. The nasogastric tube was left in place for several days after operation. The cannula were removed in all patients.

One patient died of non-specific encephalitis in 4th year postoperatively. Other 17 patients are still alive after operation. 1 patient has been followed up for 7 years, 4 for 5 years, 2 for 4 years, 3 for 3 years, 5 for 2 years, 3 for less than 2 years. They were doing well after operation and now have engaged themselves in physical labour or professional work

KEY WORDS Partial Laryngectomy; Horizontal Glottectomy; Carcinoma, Vocal Cords

(接第15页)

A STUDY ON THE DETECTION OF RED CELL IMMUNE ADHERENCE ACTIVITY WITH ERYTHROCYTES ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY

Cao Dong et al

(Dept. of Internal Medicine, The First Hospital)

We established a new method, the E-ELISA, to detect red-cell immune adherence (RCIA) activity and the value of immune complexes on the surface of red cell. This method has a good specificity, reproducibility and easily perform, with a sensitivity of 31.25ng/100ul. Fifty samples from normal human were determined. The RCIA activity was 5445 (3.73±0.22 LgG)ngAHG/10^7RBC and the value of immune complexes on the surface of red cell was 234.7(2.37+0.21LgG)ngAHG/10^7RBC. We likely suggest that this method is a good tool for study of immune fanction of erythrocytes

KEY WORDS Red Cell; Erythrocyte membrane; Red Cell immune