用尿素作为解离剂进行传感器再生，尿素可以使结合的抗原抗体复合物解离，使抗体的结合位点重新暴露，恢复抗体的生物活性，用于重复检测，但尿素等变性剂可导致抗体的生物活性降低，再生5次后，传感器的响应能力仅为原来的70%，因此传感器再生次数不超过5次为宜。压电AFP免疫传感器能重复使用，与放免法相比，检测成本降低，其实用性大大增加。

综上所述，压电AFP免疫传感器具有不需标记，操作过程简单，加入标本后不需加入任何试剂；灵敏度高，与放射免疫分析技术的灵敏度相当；检测时间短，仅需40 min左右，比放免法的检测时间大大缩短；更重要的是该方法不需同位素标记，避免了放免法标记同位素的繁琐操作过程和放射性对人体、环境的损害和污染；能重复使用，降低了检测成本等优点。因此，压电AFP免疫传感器是一种灵敏、特异、环保的分析新方法，在临床AFP检测方面具有一定的优势，有望在临床推广应用。

参考文献：

[1] Helmut W, Felix G, Frank B, *et al*. Prospective evaluation of circulating hepatocytes by alpha fetoprotein messenger RNA in patients with hepatocellular carcinoma[J]. Surgery, 2002, 131(1): 34-41.
[2] Gillespie J R, Uversky V N. Structure and function of alpha-fetoprotein: a biophysical overvie[J]. Biochim Biophys Acta, 2000, 1480(1-2): 41-56.
[3] 王力平，庄惠程，黄开盛. EIA法与RIA法检测甲胎蛋白结果比较[J]. 标记免疫分析与临床，1999，6(1)：51-53.
[4] Ilkka H, VeliMatti M. Time-resolution in fluorometry technologies, labels, and applications in bioanalytical assays[J]. Crit Rev Clin Lab Sci, 2001, 38(6): 441-447.
[5] Vaughan R D, O'Sullivan C K, Guilbault G G. Development of a quartz crystal microbalance (QCM) immunosensor for the detection of listeria monocytogenes[J]. Enzyme Microb Technol, 2001, 29(10): 635-638.
[6] Jan H, Maria H, Petr S. Investigation of highly sensitive piezoelectric immunosensors for 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2001, 16(4-5): 253-260.
[7] 张 波，府伟灵，蒋天伦，等. 压电石英晶体微阵列免疫传感器检测hCG的实验研究[J]. 第三军医大学学报，2002，24(1)：35-38.
[8] 姜雄平，许丹科，马立人. 金自组膜固定生物分子技术在核酸及免疫传感器中的应用[J]. 解放军药学学报，2001，17(5)：262-264.
[9] Chaki N K, Vijayamohanan K. Self-assembled monolayers as a tunable platform for biosensor applications[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2002, 17(1-2): 1-12.

（编辑 王 红）

文章编号：1000-5404(2003)13-1177-01

个案与短篇

重组人细胞因子对离体培养的绒毛组织产生β-hCG的影响

Effects of recombinant human cytokine on β-hCG production in cultured villi *in vitro*

章 容，于冬梅，麻 莉 （第三军医大学附属西南医院病理学研究所，重庆 400038）

近年来，有研究显示，妊娠中晚期妇女体内hCG水平异常升高与宫内感染等不良妊娠结局有关[1]。本研究通过观察外源性细胞因子IL-1、IL-6、TNFα对离体培养的晚孕期绒毛组织产生β-hCG的影响，探讨细胞因子与β-hCG水平改变的关系。

1 材料与方法

1.1 绒毛组织培养

选择足月妊娠选择性剖腹产的孕妇胎盘，选取3～5个胎盘小叶，用无菌生理盐水充分漂洗，去除其中的血管和蜕膜，将绒毛组织分割成5～10 mg的小片，在D-Hanks液中冲洗2遍，然后将5片放入24孔板中，每孔加入1 ml RPMI1640培养液，置培养箱中37 ℃，5%CO_2，相对湿度90%条件下孵育24 h。

1.2 外源性细胞因子处理培养的绒毛组织

重组人白细胞介素1（rhIL-1）、重组人白细胞介素6(rhIL-6)、重组人肿瘤坏死因子α(rhTNFα，邦定公司)：分别溶于无血清培养基，稀释成所需不同浓度，－20 ℃备用。绒毛组织培养24 h后，更换培养液，分组培养：每组6孔，对照组(未加处理因素)，rhIL-1处理组(10^5、10^4、10^3、10^2 U/ml，每种浓度各6孔)，rhIL-6处理组(10^5、10^4、10^3、10^2 U/ml，每种浓度各6孔)，rhTNFα处理组(10^5、10^4、10^3、10^2 U/ml，每种浓度各6孔)，继续培养24 h。

1.3 放射免疫法测定培养绒毛组织上清液中β-hCG含量

吸出各孔中的培养液，离心1 500 r/min，取上清液，以放免法用FJ-2008G自动γ免疫计数器（西安262厂）测定其中的β-hCG含量。

（下转1180页）

作者简介：章 容(1974－)，女，重庆市长寿县人，技师，主要从事病理学技术方面的研究。电话：(023)68754000－73107
收稿日期：2003-01-15；修回日期：2003-03-10

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

胞，诱导机体产生特异性免疫应答，打破机体对肿瘤的免疫耐受[2]，从而达到治疗和预防肿瘤的目的。

HER2/neu 基因是特异性较强的肿瘤相关抗原，在乳腺癌的发生、发展、治疗和预后中起重要作用，可作为肿瘤免疫治疗的靶子，诱导机体产生有效的免疫应答。国外采用 HER2 单抗导向治疗乳腺癌已得到 FDA 批准上市。本研究正是基于以上特点，将人类原癌基因 HER2 克隆到真核表达载体 pCMV 上作为肿瘤特异的基因疫苗，利用脂质体法将 pCMV/erbB-2A 转染至 P815 细胞，通过有限稀释法挑选阳性细胞克隆，运用 Westernblot 方法鉴定 erbB-2A 在细胞中的表达，并将转染该质粒的 P815 细胞注入小鼠体内，建立动物肿瘤模型，通过 DNA 疫苗免疫小鼠，探讨主动特异性免疫治疗乳腺癌的可能性。结果小鼠呈现较为明显的特异性 CTL 杀伤效应，而对照组则未呈现特异性 CTL 杀伤效应。由此可见，在小鼠肥大细胞瘤 P815 模型中取得良好的肿瘤免疫治疗效果，抗肿瘤的免疫应答中细胞免疫起着主要作用，特别是 CTL，它是抗肿瘤免疫的主要效应细胞[3]。当质粒 DNA 注射至小鼠肌肉后，宿主肌细胞通过胞饮方式摄取外源性 DNA，质粒编码的抗原基因在肌细胞内首先转录成 mRNA，再翻译成抗原蛋白，经加工处理后抗原分子与肌细胞表达的 MHC-I 类抗原形成复合物，并将抗原递呈给 CD^{8+} 细胞，诱导产生特异性 CTL[4]，杀伤表达此类抗原的肿瘤细胞。而且细菌质粒 DNA 本身含有 CpG 基序，它可以调节 Th0 细胞向 Th1 方向极化，从而更容易产生细胞免疫[5]。因此，HER2/neu 基因免疫小鼠后可以有效的在小鼠体内诱发特异性 CTL 应答。这为基于该肿瘤模型的 HER2/neu 基因疫苗的研制提供了理论依据，也为肿瘤免疫治疗提供了新的途径。

参考文献：

[1] Waalen J. Genetic testing opens brave new world[J]. Ann Intern Med, 1997, 126(12): 139－140.

[2] Encke J, Putlittz J Z, Wands J R. DNA vaccines[J]. Intervirology, 1999, 42(2－3): 117－124.

[3] Kawakami Y, Eliyahu S, Jennings C, *et al*. Recognition of multiple epitopes in the human melanoma antigen gp100 by tumor-in-filtrating T lymphocytes associated with *in vivo* tumor regression[J]. J Immunol, 1995, 154(8): 3961－3968.

[4] Hoffman S L, Chen J, Doolan D L. Toward clinical trials of DNA vaccines against malaria[J]. Immunol Cell Biol, 1997, 75(5): 376.

[5] Chu R S, Targoni O S, Krieg A M, *et al*. CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T Helper 1 (Th1) immunity[J]. J Exp Med, 1997, 186(10): 1623－1631.

（编辑 刘洪娥）

（上接 1177 页）

1.4 免疫组化法检测培养绒毛组织中的 β-hCG 表达

取出培养板各孔中的绒毛组织，迅速置于液氮中冷冻，然后移至恒冷切片机上，连续冰冻切片 20 μm，自然晾干。在 PBS 液中轻轻洗涤后，浸入 4% 多聚甲醛，室温下浸泡 20 min，取出后自然晾干。纯甲醇加 H_2O_2 至 0.5%，室温浸泡切片 30 min 以灭活内源性过氧化物酶，PBS 液洗 3 次。抗原修复液处理 10 min，PBS 液洗 3 次。其余步骤按照 SABC 免疫组化染色试剂盒（博士德公司）说明书进行。

结果判定：光镜下细胞浆内有棕黄色颗粒即为阳性表达，采用 Tiger 920 图像分析仪对阳性表达的标本进行平均光密度（Average optical density, AOD，单位面积的积分吸光度）测定，每个标本测定 5 个视野。以博士德公司提供的阳性片为阳性对照，用 PBS 代替一抗作阴性对照。

1.5 统计学分析

采用 t 检验、直线相关分析。

2 结果

2.1 放免法测定上清液中 β-hCG 含量

加入不同浓度 rhIL-1 继续培养 24 h 后，以放免法检测各组绒毛组织上清液中 β-hCG 含量（ng/ml），rhIL-1、rhIL-6、rhTNFα 在较高浓度时 hCG 的产生量明显加，尤其 rhIL-6、rhTNFα 处理组，与对照相比差异非常显著（$P<0.01$）。

2.2 免疫组化法检测各组绒毛组织中 β-hCG 表达

以免疫组化法检测各组绒毛组织中滋养细胞 β-hCG 的表达，测定 AOD 值作半定量分析，IL-1、IL-6、TNF 处理组滋养细胞 β-hCG 阳性表达的阳性程度均高于对照组（$P<0.05$），浓度越高其作用则越明显。

3 讨论

正常早孕滋养细胞产生 β-hCG 的量受到多种细胞因子的调控[2]，IL-6 受体在滋养细胞中和细胞因子介导的 β-hCG 由滋养细胞产生的调节网络中的存在已被发现，IL-1、TNFα 刺激滋养细胞释放 IL-6 并激活 IL-6 受体传导途径，引起 β-hCG 从滋养层的释放[3]。本结果说明晚期妊娠滋养细胞产生 β-hCG 的过程可能受到了细胞因子的调控，但其之间的相互关系以及可能存在的调控机制与早孕时是否相同，仍需进一步研究。

关键词：β-hCG；细胞因子；绒毛组织
中图法分类号：R714.14+2　　文献标识码：B

参考文献：

[1] Onderoglu L S, Kabukcu A. Elevated second trimester human chorionic gonadotropin level associated with advere pregnancy outcome[J]. Int J Gynecol Obstet, 1997, 56(3): 245－249.

[2] Chandana D V, Senthil K. Network of cytokines, integrins and hormones in human trophoblast cells[J]. J Rep Immun, 2002, 53(2): 257－268.

[3] Baud O, Emilie D, Pelletier E, *et al*. Amniotic fluid concentrations of interleukin-β, interleukin-6 and TNFα in chorioamnionitis before 32 weeks of gestation: histological associations and neonatal outcome[J]. Br J Obstetrics Gynec, 1999, 106(1): 72－77.

（编辑 汪勤俭）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net