DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.01.055
第23卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 1
2001年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2001

min,效果良好。电泳进行中应持续监测,吸出或加入电泳液,调节液面高度,保持电压与电流的恒定。

常用染色剂为吖啶橙、EB、碘化丙啶等[2]。EB多见,染色效果良好。

可在染色后4℃避光潮湿条件下保存,数日后观察。但我们通过实践得出为防止荧光衰减,尽快阅片较好。阅片过程中,由于淬灭效应,荧光减弱很快,因此操作必须紧凑。

结果可直接在荧光显微镜下分析,或先摄影,再进行照片分析。但摄影、相片冲洗条件等较难控制统一,因此应尽量直接分析。

分析指标可分为两类:①人工指标,包括彗星发生率、DNA损伤分级计数以及一些距离指标(头长、尾长等),易于测量,无需复杂仪器,但较粗略。②微机图像分析如Komet 3.0软件,可进行精细的荧光强度、尾矩、尾惯量等指标测定。由于无图像采集系统及相应软件,我们采用盲法人工分析,摄影后再对照片进行普通微机图像分析,吻合较好。

总之,SCGE简便易行,易于推广,可用于大规模的筛查工作。但应严格控制各种影响因素,以确保结果的可靠。

关键词:单细胞凝胶电泳;DNA损伤影响因素
中图法分类号:R446.6 文献标识码:B

参考文献:

[1] Singh N P, Mccoy M T, Tice R R, *et al*. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cell[J]. Exp Cell Res, 1988, 175(2): 184—191.
[2] 何 惧,刘玉清.单细胞凝胶电泳技术的研究进展与应用[J].国外医学:卫生学分册,1997,24(2):85—89.
[3] 马爱国,臧金林,刘四朝.单细胞凝胶电泳技术影响因素的分析[J].中华预防医学杂志,1999,33(3):165—165.
[4] 陈 安.单细胞凝胶电泳法检测单细胞DNA损伤[J].国外医学:临床生物化学与检验学分册,1998,19(4):145—146.

(编辑 潘式文)

文章编号:1000-5404(2001)01-0117-02

技术方法

定量细胞ELISA检测培养细胞ICAM-1表达水平

Expression level of ICAM-1 on cultured cells measured quantitatively with cellular ELISA

张绪清,张 瑞,顾长海,王宇明 (第三军医大学附属西南医院感染病科、全军传染病专科中心,重庆 400038)

提 要:目的 探讨检测培养细胞细胞间粘附分子-1(ICAM-1)表达水平的细胞ELISA。方法 用不同浓度TNFα刺激接种于96孔培养板中的$HePG_2$细胞,以抗ICAM-1 McAb为第一抗体,用ELISA检测培养孔中的$HePG_2$细胞ICAM-1表达水平。结果 对相同浓度TNFα诱导的$HePG_2$细胞ICAM-1表达水平的5次测定值进行方差分析显示彼此间相差不显著($P>0.05$),批间变异系数均小于5%,$HePG_2$细胞ICAM-1表达水平与TNFα浓度呈一定剂量依赖关系。结论 所建立的细胞ELISA的稳定性好,可用于对$HePG_2$细胞ICAM-1表达水平进行定量分析。

对细胞表达蛋白进行定量分析,原先多采用Western印迹法和流式细胞术。Western印迹法实验过程复杂,不适用于检测大量标本。流式细胞术检测费用昂贵,且需特殊仪器。近年,国内外许多学者采用定量的细胞ELISA对单层培养细胞表达的细胞和表面膜蛋白进行定量分析。其具有简便、快速、灵敏度高等优点[1,2]。本研究拟在用细胞ELISA对体外单层培养细胞ICAM-1表达水平进行定量分析。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

$HePG_2$细胞,由我校免疫学实验室提供;鼠抗人ICAM-1McAb丹麦DAKO公司产品;Hepes、RPMI 1640培养基为SIGMA公司产品;TNFα北京邦定生物公司产品;羊抗鼠IgG标记HRP和TMB显色剂为北京中山公司产品。

1.2 方法

1.2.1 $HePG_2$细胞培养 将$HePG_2$细胞接种培养瓶中,加入含10%小牛血清的RPMI 1640完全培养基(含谷氨酰胺2 mmol/L,HEPES 10 mmol/L,1%青霉素,1%链霉素),37℃ 5% CO_2培养,待其长满后,用0.25%胰蛋白酶消化、使其退出生长,然后加入含10%小牛血清的RPMI 1640完全培养基,调整细胞数1×10^6/ml。取出96孔板,每孔中加入细胞悬液100 μl(其中2孔不加细胞悬液,作空白孔),37℃ 5% CO_2培养24 h。

1.2.2 细胞因子刺激 分别加入不同浓度的TNFα 100 μl,刺激24 h,每一浓度作5孔;加入500 IU/μl的TNFα 100 μl,分别培养48、24、12、8、4和0 h,每一时相点作5孔。

1.2.3 用细胞ELISA检测培养细胞ICAM-1表达水平 参照Kvale等[1]介绍的方法并稍作改进。①去培养上清,用PBS洗2次。②用0.25%戊二醛/PBS固定10 min,PBS洗3次。③加入3% H_2O_2/PBS 10 min×2次,PBS洗3次。④加入正常羊血清封闭10 min。⑤加入鼠抗人ICAM-1 McAb(1∶300)50 μl,4℃过夜,0.05%吐温-20/PBS洗5 min×3次。⑥加入羊抗鼠IgG标记的HRP,37℃温育1 h,0.05%吐温-20/PBS洗5 min×4次。⑦加入TMB显色剂A、B液各50 μl,室温显色10 min,加入1 mol/L HCl 50

作者简介:张绪清(1965—),男,湖北省鄂州市人,博士,副主任医师,副教授,主要从事病毒性肝炎发病机制与临床方面的研究,发表论文20余篇。电话:(023)68754141
收稿日期:2000-04-07;修回日期:2000-10-20

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

μl 终止反应，用酶标仪在 450 nm 波长下侧 D_{λ} 值，自来水洗板。⑧加入 0.08% 结晶紫 室温 20 min；蒸馏水洗板 5 min×3 次。⑨加入 33% 冰醋酸 100 μl，室温 30 min，用酶标仪在 550 nm 波长下侧 D_{λ} 值。⑩用 $D_{450/550}$ 比值表示细胞 ICAM-1 表达水平。

每次实验每组设 5 个复孔，重复 5 次，阴性对照 5 孔（不加抗 ICAM-1 McAb），正常对照 5 孔（不用细胞因子刺激）。

2 结果

2.1 定量细胞 ELISA 的稳定性

细胞 ELISA 检测 TNFα 诱导的 $HePG_2$ 细胞 ICAM-1 表达水平（$D_{450/550}$），见表 1。对相同浓度 TNFα 诱导 $HePG_2$ 细胞 ICAM-1 表达水平的 5 次测定值进行方差分析显示彼此之间相差不显著（$P>0.05$），批间变异系数均小于 5%。

2.2 TNFα 诱导 $HePG_2$ 细胞 ICAM-1 表达

2.2.1 不同浓度 TNFα 对 $HePG_2$ 细胞 ICAM-1 表达的影响

从表 1 中可以看出，未经刺激的 $HePG_2$ 细胞 ICAM-1 表达水平很低；TNFα 刺激后，$HePG_2$ 细胞 ICAM-1 表达均明显增强，其表达水平（$D_{450/550}$ 比值）与 TNFα 浓度呈显著正相关（$P<0.05$），显示出一定的剂量依赖关系。

表 1 细胞 ELISA 检测 $HePG_2$ 细胞 ICAM-1 表达水平

TNFα（IU/L）	ICAM-1（$D_{450/550}$）*					P 值	变异系数
	1	2	3	4	5		
500	1.341±0.052	1.348±0.046	1.363±0.058	1.298±0.038	1.351±0.041	>0.05	1.86%
250	1.053±0.045	1.079±0.054	1.059±0.043	1.036±0.039	1.048±0.038	>0.05	1.50%
100	0.612±0.036	0.601±0.043	0.608±0.051	0.588±0.041	0.599±0.038	>0.05	1.50%
50	0.469±0.023	0.427±0.031	0.473±0.028	0.447±0.019	0.459±0.026	>0.05	3.22%
0	0.228±0.021	0.239±0.027	0.236±0.029	0.213±0.017	0.219±0.019	>0.05	4.86%

*：所有数值为 5 孔平均数

2.2.2 刺激不同时间对 $HePG_2$ 细胞 ICAM-1 表达的影响

随着 TNFα 刺激时间的延长，$HePG_2$ 细胞 ICAM-1 表达也逐渐增多，见表 2，24 h 达到高峰。

表 2 不同刺激时间后 $HePG_2$ 细胞 ICAM-1 表达水平

	t/h					
	0	4	8	12	24	48
ICAM-1（$D_{450/550}$）	0.220	0.576	0.612	1.009	1.352	1.290

3 讨论

$HePG_2$ 细胞是一种人肝癌细胞株，具有人肝细胞绝大多数的生物学功能和生化功能特征[3,4]。与人肝细胞相比，$HePG_2$ 细胞更容易获得，并能传代培养，因此常用其替代肝细胞作用相关研究。$HePG_2$ 细胞 ICAM-1 基础表达水平很低，与原代培养的人肝细胞相类似，因此我们用其作 ICAM-1 表达的调控研究[4]。

TNFα 在乙型肝炎发病机制中起重要作用。国外研究表明 TNFα 能诱导人肝细胞增强表达 ICAM-1[5]，推测其也能诱导 $HePG_2$ 细胞增强表达 ICAMF-1。目前国内外许多学者采用定量细胞 ELISA 对单层培养细胞表达的细胞和表面膜蛋白进行定量分析。我们也探讨用细胞 ELISA 检测 $HePG_2$ 细胞 ICAM-1 表达，并用 $D_{450/550}$ 比值表示细胞 ICAM-1 表达的相对含量，其中 D_{450} 值代表总的 ICAM-1 量，由于结晶紫使核着色，经 33% 冰醋酸溶解测量得 D_{550} 值表示每孔接种的细胞数，因此 $D_{450/550}$ 比值能较好反映等量细胞 ICAM-1 表达水平。对相同浓度 TNFα 诱导的 $HePG_2$ 细胞 ICAM-1 表达水平的 5 次测定值进行方差分析显示彼此之间相差不显著，批间变异系数均小于 5%，说明我们所建立的细胞 ELISA 的稳定性较好。可用于对 $HePG_2$ 细胞 ICAM-1 表达水平进行定量分析，与国外学者报告相一致[1]。

Mickelson 等[4]用免疫荧光流式细胞术对人肝胚细胞瘤细胞株（C3A）ICAM-1 水平进行定量分析，结果显示 C3A 细胞 ICAM-1 基础水平很低，TNFα 能诱导 C3A 细胞增强表达 ICAM-1，其 ICAM-1 表达水平与 TNFα 浓度呈一定的剂量依赖关系。我们用自己建立的细胞 ELISA 探讨 TNFα 对 $HePG_2$ 细胞 ICAM-1 表达的影响时也发现 $HePG_2$ 细胞 ICAM-1 表达水平与 TNFα 浓度呈一定的剂量依赖关系，并随着 TNFα 刺激时间的延长而逐渐增加，大约在 24 h 达到高峰，提示细胞 ELISA 能测出 $HePG_2$ 细胞 ICAM-1 表达的不同水平，与 Mickelson 等用流式细胞术测出的结果相类似。进一步说明细胞 ELISA 适用于 $HePG_2$ 细胞 ICAM-1 表达的定量分析和调控研究，且具有简便、快速、灵敏度高等优点。

关键词：细胞间粘附分子-1；细胞 ELISA
中图法分类号：R446.6 文献标识码：B

参考文献：

[1] Kvale D, Brandtzaeg P. Immune modulation of adhesion molecules ICAM-1 (CD54) in human hepatocytic cell lines[J]. J Hepatol, 1993, 17(3): 347—352.

[2] 陈 骏，龚肖畸. ELISA 法定量检测中性粒细胞 CD18 表达[J]. 中国免疫学杂志，1994, 10(4): 224—226.

[3] David-Wantine B, Israel A, Kourilsky P. The regulation and expression of MHC class I genes[J]. Immunol Today, 1990, 1(8): 286—292.

[4] Mickelson J K, Kukielka G, Bravenec J S, *et al*. Differential expression and release of CD54 induced by cytokines[J]. Hepatology, 1995, 22(3): 866—875.

[5] Schroder A J, Blaheta R A, Scholz M, *et al*. Effect of proinflammatory cytokines on cultivated primary human hepatocytes[J]. Trransplantation, 1995, 59(7): 1 023—1 028.

（编辑 冯崇英）

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