·技术与方法· doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.33.025

总免疫球蛋白 E 时间分辨荧光免疫分析法的建立与评价*

谭玉华,孙宝清△

(广州医科大学附属第一医院广州呼吸疾病研究所/呼吸疾病国家重点实验室,广州 510120)

摘 要:目的 应用时间分辨荧光免疫分析法(TRFIA)建立总免疫球蛋白 E(TIgE)的定量测定方法。**方法** 采用双抗体夹心法建立 TIgE TRFIA,并对其进行方法学评价。**结果** 建立的 TIgE TRFIA 批内、批间变异系数(*CV*)分别为 1.59%～1.68%和 5.23%～7.33%;检测低限为 0.25 IU/mL;线性范围为 1.47～1 510.00 IU/mL;其准确性在允许偏差±10%内;回收率为 97.00%～106.75%;交叉反应试验和干扰试验均能满足检测要求;检测 TIgE 达 15 000 IU/mL 时仍未见 HOOK 效应;与欧蒙公司的 ELISA 法检测 40 份临床样本结果相关性良好(r=0.999 2,P<0.01),2 种方法间预期偏差在允许范围(±12.5%)内;检测健康成人样本 TIgE 的参考值为 100 IU/mL。**结论** 建立的 TIgE TRFIA 具有精密度好,灵敏度高,线性范围宽,准确度高,特异性强等优点,能满足临床需要。

关键词:免疫球蛋白 E;过敏反应;销标记;时间分辨荧光免疫分析法;方法学评价

中图分类号:R392-33;R392.8 **文献标识码:**A **文章编号:**1671-8348(2014)33-4490-04

Establishment and evaluation of time resolved fluoroimmuno assay for quantification of total immuno globulin E*

Tan Yuhua, *Sun Baoqing*△

(*Guangzhou Institute of Respiratory Diseases/State Key Laboratory of Respiratory Diseases, the First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong* 510120, *China*)

Abstract: Objective To establish a method for quantitative detection of total immunoglobulin E(TIgE) by Time resolved Fluoroimmunoassay(TRFIA). **Methods** The method for quantitative detection of TIgE by TRFIA was established on the basis of solidphase double sandwich enzyme linked immunosorbent assay(ELISA). The methodology was evaluated. **Results** The TIgE TRFIA intra assay and inter assay coefficients of variation (*CV*) were 1.59%－1.68% and 5.23%－7.33%, respectively. The lower limit of detection was 0.25 IU/mL. The linear range was 1.47－1 510.00 IU/mL. The accuracy was within the allowable deviation (±10%). The recovery rate was 97.00%－106.75%. The cross reaction test and interference experiment could meet the testing requirements. The TIgE TRFIA showed no HOOK effect at least up to 15 000 IU/mL TIgE, compared with EUROIMMUN ELISA, the correlation coefficient(r) was 0.999 2(P<0.01)for 40 blood specimens in the range of 14.43－518.81 IU/mL, and the expected bias was in the range of acceptable bias (±12.50%). The reference value 100 IU/mL could be used for a normal, allergy free adult sample TIgE level detected by TRFIA. **Conclusion** The established TRFIA for TIgE detection meets the demand of clinical application with good precision, high sensitivity, wide linear range, high accuracy, specificity and other advantages.

Key words: immunoglobulin E; anaphylaxis; europium marker; time resolved fluoroimmunoassay; methodology evaluation

免疫球蛋白 E(immunoglobulin E,IgE)在血清中含量极微,仅占血清免疫球蛋白总量的 0.002%,但它却是引起过敏反应的主要抗体。自 1966 年日本学者 Ishizaka 发现 IgE 以来,开启了过敏性疾病研究的新时代。总 IgE(total IgE,TIgE)的测定已在临床广泛应用,它已成为过敏性疾病诊断与鉴别诊断、寄生虫感染性疾病、免疫功能障碍相关性疾病的实验室评估指标。随着环境的改变,在生活中接触到的食物、药物、化学物质等越来越多,过敏原也就越来越复杂多样,可达数千种,而且很隐蔽。虽然目前已有多种国际先进的过敏原检测系统,但仍难将所有过敏原全部涵盖。TIgE 检测对这类无法确定具体过敏原的过敏症患者仍具有极大的帮助。TIgE 的体外定量检测可为判定机体对过敏原的易感性提供了有价值的信息[1],TIgE 是特应性体质的客观指标。据文献报道,血清 TIgE 水平的高低还与疾病严重程度有关,测定 TIgE 含量有助于对病情严重程度的判定从而对急性发作期临床治疗疗程、缓解期预防性用药疗程进行指导[2]。IgE 在过敏性疾病诊断中的作用已获得公认,但血清中 IgE 的含量较低,特别是新生儿脐带血中 IgE 含量极低,必须用灵敏的方法才能正确检测。建立一个高度敏感同时又非常特异的检测系统是开展人 IgE 抗体免疫调节机理研究的基本前提和难点之一。目前,时间分辨荧光免疫分析(time-resolved fluoroisnmunoassay,TRFIA)已成为生物医学研究和临床超微量生化检验中一项最有发展前景的分析手段。因此,笔者基于双抗体夹心法建立了 TIgE TRFIA 法,并对其性能进行了评价,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 按照《全国临床检验操作规程》(第 3 版)采集静脉血,样本如其干扰限超过试剂盒说明书给定范围或样本污染等均应予以剔除。收集用于方法学比对试验预期偏倚评估的随机样本共 40 例,其待测物浓度应覆盖方法学的检测范围,且尽可能均匀分布;健康成人样本来自健康体检正常者的血清样本共 20 例,用于参考值的转移接收的验证试验;确诊为过敏性疾病患者的样本 80 例,用于评价 TIgE 在过敏患者样本中的检

* **基金项目:**广东省自然科学基金资助项目(S2013010014728);广州医科大学科学科研项目(2013A06);珠海市科技工贸和信息化局(2011B040102031)。 **作者简介:**谭玉华(1980－),检验技师,硕士,主要从事体外诊断试剂的研发、应用,现工作单位在广州市丰华生物工程有限公司。 △ **通讯作者**,Tel:(020):83062865;E-mail:sunbaoqing@vip.163.com。

出率及方法学检测结果间的一致性。

1.2　仪器与试剂　TAKEEN-Ⅰ型 TRFIA 仪、FWZ-Ⅰ型微量振荡器、DEM-Ⅲ型全自动洗板机(广州市丰华生物工程有限公司);酶标仪(深圳雷杜生命科学股份有限公司);Victor$_{TM}^{2}$ D1420 型 TRFIA 仪(芬兰 Wallac Oy 公司)。羊抗人 IgE 多克隆抗体(深圳菲鹏生物股份有限公司);鼠抗人 IgE 单克隆抗体(美国 Advance 公司);人 IgE 纯品(英国 Abcam 公司);牛血清清蛋白(BSA)和 Tween20(美国 Sigma 公司);Sepharose CL-6B 凝胶(瑞典 Pharmacia 公司);96 孔微孔板(深圳金灿华实业有限公司);铕(Eu^{3+})标记试剂盒(芬兰 Wallac Oy 公司);带有滤膜的离心管(美国 Millipore 公司);其余试剂为国产分析纯试剂;自制以 β-萘甲酰三氟丙酮为主要成分的增强液;自制含 0.4%(V/V)的 Tween20 为主要成分的 pH 7.8 200 mmol/L Tris-HCl 溶液为浓缩洗涤液;自制含 10%(V/V)的小牛血清和 0.01 g/L 乙二胺四乙酸二钠为主要成分的 pH 7.8 50 mmol/L 的 Tris-HCl 溶液为实验缓冲液;自制含 50 g/L BSA 的 50 mmol/L、pH 7.8 的 Tris-HCl 缓冲液为校准品稀释液或样本稀释液。300 mg/mL 的 IgA、IgG、IgM,160 g/L 的清蛋白,1 000 IU/mL 的甲胎蛋白,800 IU/mL 的类风湿因子,低、中、高 3 个浓度的质量控制品(广州市丰华生物工程有限公司);IgE 国际标准品(WHO 2nd IRP75/502;5 000IU/安培)(英国 NIBSC);TIgE 检测 ELISA 试剂盒(德国欧蒙医学实验诊断股份公司)。

1.3　方法

1.3.1　校准品的制备　以 WHO 2nd IRP 75/502 为对照,人 IgE 纯品用含 50 g/L BSA 的 50 mmol/L、pH 7.8 的 Tris-HCl 缓冲液定量稀释成 0.0、2.4、12.0、60.0、300.0、1 500.0 IU/mL(分别用 A～F 表示)。

1.3.2　固相反应板的制备和最适包被浓度的选择　将羊抗人 IgE 多克隆抗体用 50 mmol/L、pH 9.6 的碳酸盐缓冲液稀释成包被液(2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 μg/mL),在固相微孔板加入 100 μL 抗体包被液,以上浓度各包被 1 块,4 ℃冰箱孵育过夜,洗涤 1 次,再每孔中加入含 10 g/L BSA 的 50 mmol/L、pH 7.2 的磷酸盐缓冲液(PBS)250 μL,37 ℃恒温箱孵育 2 h 封闭,甩干后晾干,真空封膜,4 ℃冰箱保存备用。采用方阵(棋盘)滴定法,在 2.0～6.0 μg/mL 预包被的反应板上,检测校准品 A、校准品 F 2 个浓度点的荧光值强度(CPs)。选取校准品 A 本底荧光值(N)较低,且校准品 F 的检测荧光值(P)与 N 的比值(P/N)最大的包被浓度为最适包被浓度。确定最适包被浓度后按以上方法制备固相反应板。

1.3.3　铕标记物的制备和最佳稀释度的选择　将 1 mg 的鼠抗人 IgE 单克隆抗体加入 Millipore 公司的带有滤膜的离心管中,10 000 r/min 离心 9～10 min。再用标记缓冲液(50 mmol/L、pH 9.3 的碳酸盐缓冲液)重复洗涤 3～5 次。将收集到的 200 μL 鼠抗人 IgE 单克隆抗体和 1 mg 的铕标记试剂充分混匀,4 ℃振荡反应(24±2)h。反应液经 50 mmol/L、pH 7.80 Tris-HCl 缓冲液平衡的 Sepharose CL-6B 柱(1 cm×30 cm)层析,每管 2.0 mL,A280 监测收集第一洗脱峰。合并峰管,根据 Eu^{3+} 标记试剂盒说明书所提供的公式计算标记率和回收率。蛋白相对分子质量为 160 000 的单克隆抗体的理想标记 Eu^{3+} 个数为 6～10 个/蛋白分子。将铕标记物用实验缓冲液按体积比 1∶500、1∶1 000、1∶1 500、1∶2 000 稀释,检测校准品 A、校准品 F 2 个浓度点的 CPs。选取 N 较低,且 P/N 最大的稀释度为铕标记物最佳稀释度。

1.3.4　TIgE TRFIA 方法学的建立　为了尽量避免 HOOK 效应,选用双抗体夹心二步法。检测方法应适用于普通实验室条件下,反应宜选择室温 20～25 ℃条件。第 1 步:在固相微孔反应板中依次加入 10 μL 的校准品或样本或质量控制品,再每孔中加入 100 μL 样本稀释液,在室温条件下振荡孵育(30、45、60、75 min),洗板 5 次拍干。第 2 步:在每孔中加入 100 μL 铕标记物工作液,在室温条件下振荡孵育(30、45、60、75 min),洗板 5 次拍干。然后在每孔中加入 100 μL 增强液,在室温条件下振荡(1、2、3、4、5、10、30、40 min),将反应板放入 TRFIA 仪内进行荧光计数。选择检测校准品 A～F 荧光值接近平衡的反应时间作为最适反应时间。

1.3.5　性能评价　参考文献[3-4]对剂量-反应曲线拟合模型进行优选。参考 NCCLS 的指南及有关文献[5-14]对精密度、检测低限、线性、准确度(校准品核对试验、回收试验)、特异性(交叉反应试验、干扰试验)、参考值确认、方法学比对等进行评价。

1.4　统计学处理　TRFIA 测量所得荧光计数采用 TRFIA 仪上随机配备的分析软件进行数据分析。其他统计数据采用 SPSS13.0 和 Microsoft Excel 软件进行分析。

2　结　　果

2.1　铕标记鼠抗人 IgE 抗体的鉴定　铕标记鼠抗人 IgE 抗体 A280 监测收集,收集铕标记物峰(5～8 管)。铕标记鼠抗人 IgE 抗体的回收率为 92.51%,表明分离纯化后的抗体损失较少。以芬兰 Wallac Oy 公司标准 Eu^{3+} 为参考,铕标记物峰的铕标记鼠抗人 IgE 抗体中的 Eu^{3+} 含量为 6.06 μmol/L,蛋白含量为 0.72 μmol/L,计算可得平均每个鼠抗人 IgE 抗体上连接了 8.40 个 Eu^{3+},达到了理想的标记率。

2.2　方法学的建立

2.2.1　最适包被浓度和铕标记物最佳稀释度　经方阵(棋盘)滴定法,当以 4.0 μg/mL 包被反应板和铕标记物按 1∶1 500 稀释时,本底良好(<2 000)且校准品 F 检测荧光值的 S/N 值趋于最大,因此最适包被浓度为 4.0 μg/mL,铕标记物最佳稀释度为 1∶1 500。

2.2.2　反应动力学　当第 1、2 步的反应时间分别为 60 min 和 45 min,检测校准品 A～F 的荧光值趋于"饱和",曲线斜率趋于最大,表明反应趋于完全。解离增强振荡 5 min 时,校准品 A～F 的荧光值已趋于平衡,表明 Eu^{3+} 已从铕标记物螯合物上充分解离下来,与增强液成分形成了稳定的复合物。

2.2.3　建立剂量-反应曲线　按优化的反应条件进行试验[3-4],剂量-反应曲线拟合优选 Log_LogB 双对数数学模式及三样条平滑(SPLINE)拟合时曲线平滑,拟合程度高,拟合后的曲线的 $r>0.990\ 0$,典型的剂量-反应曲线,见图 1。

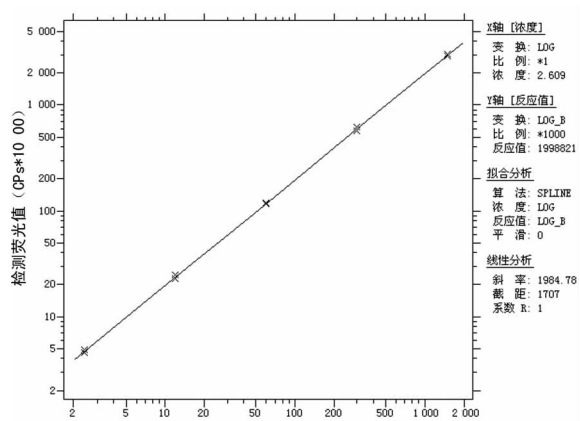

图 1　TIgE TRFIA 的剂量-反应曲线

2.3 分析性能评价

2.3.1 精密度 参考 NCCLS EP5-A 文件[5]评价，低、中、高 3 个浓度的质量控制品批内和批间检测的实测值分别为(4.03±0.07)IU/mL 和(4.03±0.30)IU/mL，(90.57±1.44)IU/mL 和(90.57±5.05)IU/mL，(319.55±5.33)IU/mL 和(319.55±16.70)IU/mL，批内和批间的变异系数(*CV*)分别为 1.68%和 7.33%，1.59%和 5.57%，1.67%和 5.23%。

2.3.2 检测低限 参考文献[6]评价，平行检测校准品 A 20 次的荧光值($\bar{x}\pm s$)为 1 309+156；95%*CI*($\bar{x}\pm 2s$)为 1 620，在剂量-反应曲线上拟合得到的浓度值为 0.25 IU/mL，优于欧蒙 TIgE ELISA 法试剂的检测低限 1 IU/mL。

2.3.3 线性 参考 EP6-A 文件[7]评价，该方法在 1.47～1 510.00 IU/mL 范围内，其线性回归方程为 $Y=0.988\ 2X-0.068\ 8$，$r=0.999\ 3$($t_r=83.15$，$v=9$，$P<0.01$)，见图 2。本方法的线性上限高于欧蒙 TIgE ELISA 法试剂的线性上限 500 IU/mL。

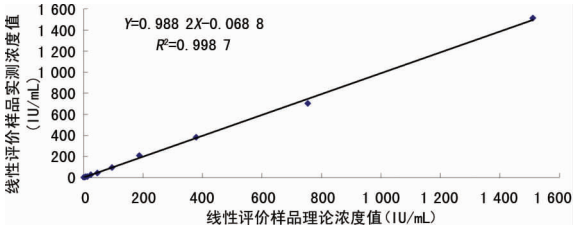

图 2 TIgE TRFIA 的线性

2.3.4 校准品核对试验 参考文献[8-9]评价，以国际标准品的稀释溶液(2.4～1 500.0 IU/mL)为对照，测定 TIgE TRFIA 各校准品，以相对偏倚±10.00%为可接受范围；TIgE TRFIA 校准品 A～F 的实测值与标示值的相对偏倚在－5.57%～7.92%内。

2.3.5 回收试验 将 1 份 22 IU/mL 的常规检测样本分成 3 等份(各 1 mL)，在其中 2 份中分别加入 44 IU/mL 和 110 IU/mL 的血清样本 0.1 mL，制成加入浓度分别为 4.0 IU/mL 和 10.0 IU/mL 的 2 份待回收分析样本，第 3 份中加入校准品稀释液 0.1 mL 制成基础样本血清，回收率在 90.00%～110.00%范围内为可接受。检测基础样本和 2 份待回收分析样本的实测浓度分别为 19.41、24.21 IU/mL 和 29.64 IU/mL，2 份待回收分析样本的回收率分别为 97.00%和 106.75%，平均回收率为 101.88%，比例系统误差为 1.88%。

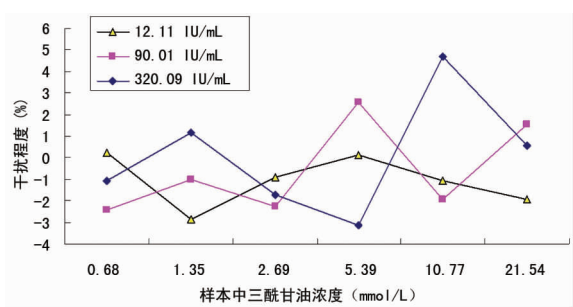

图 3 血红蛋白对样本检测结果的干扰程度

2.3.6 交叉反应 参考文献[9-10]评价，检测 300 mg/mL 的 IgA、IgG、IgM，160 g/L 的清蛋白，800 IU/mL 的类风湿因子，1 000 IU/mL 的甲胎蛋白，其实测浓度值分别为 0.075、0.120、0.120、0.105、0.125 IU/mL 和 0.040 IU/mL，均未高于检测低限 0.25 IU/mL，表明对 TIgE TRFIA 检测结果无明显交叉反应。

2.3.7 干扰试验 参考 NCCLS EP7-A2 文件[11]评价，分别选用低、中、高浓度的血清加入以下干扰物，干扰物质溶液与血清分别按体积比 1∶9 混合，组成系列干扰物浓度，对照血清加入干扰物相同体积的纯化水，采用干扰率为±10.00%作为系统干扰物最高限。样本中含血红蛋白(≤18.00 g/L)，胆红素(≤818.0 mol/L)，三酰甘油(≤21.54 mmol/L)，乙二胺四乙酸钾(≤2.20 mg/mL)，草酸钾(≤2.00 mg/mL)，肝素(≤15.00 U/mL)，枸橼酸钠(≤21.80 mmol/L)，氟化钠(≤1.00 mg/mL)对检测结果干扰率均在±10.00%以内，见图 3～10。

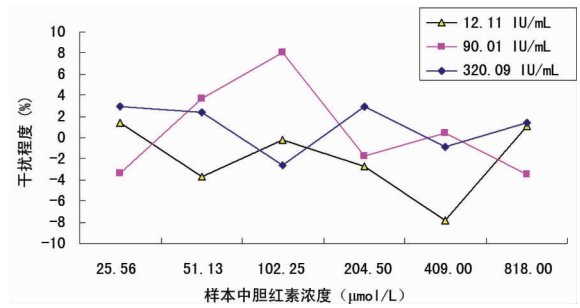

图 4 胆红素对样本检测结果的干扰程度

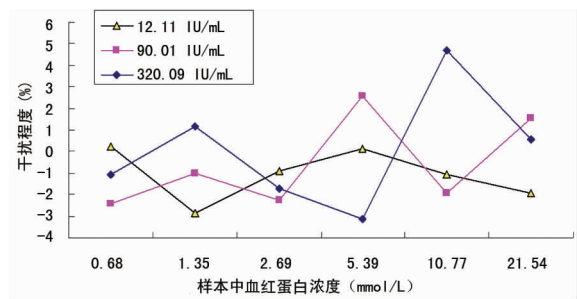

图 5 三酰甘油对样本检测结果的干扰程度

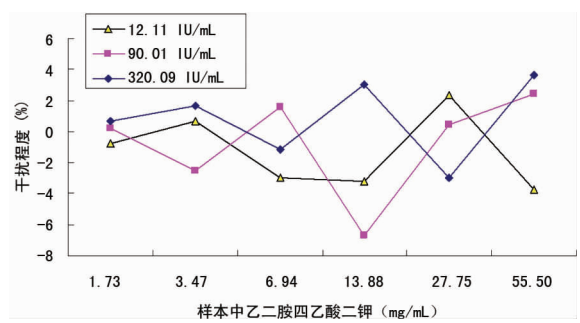

图 6 乙二胺四乙酸二钾对样本检测结果的干扰程度

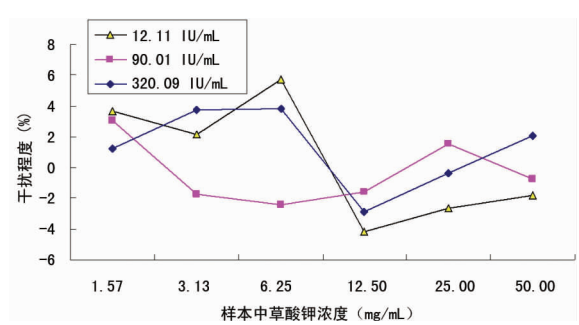

图 7 草酸钾对样本检测结果的干扰程度

2.3.8 HOOK 效应 将已知浓度的 IgE 纯品稀释成 3.6～15 000.0 IU/mL 的系列浓度样品，每稀释浓度重复测定 2 次后取平均值。该方法检测 TIgE 达 15 000.0 IU/mL 时仍未见 HOOK 效应。

2.3.9 参考值验证 欧蒙 ELISA 法试剂的参考值为 100 IU/

mL(年龄大于 16 岁)。参考 NCCLS C28-A2 文件[12]及 WS/T 402-2012[13],对参考值进行转移接收验证,检测 20 例健康成人样本,仅有 1 例结果(114.96 IU/mL)高于 100 IU/mL,其他 19 例样本在 29.81～92.91 IU/mL 间,检测值在引用参考区间的参考个体数与总的参考个体数的比率为 95%,可以直接引用 100 IU/mL 作为 TRFIA 检测成人样本 TIgE 的参考值,但是健康人群 TIgE 水平易受环境、种族、遗传、年龄、检测方法及取样标准等因素的影响,各实验室应建立自己的参考值或参考值验证。

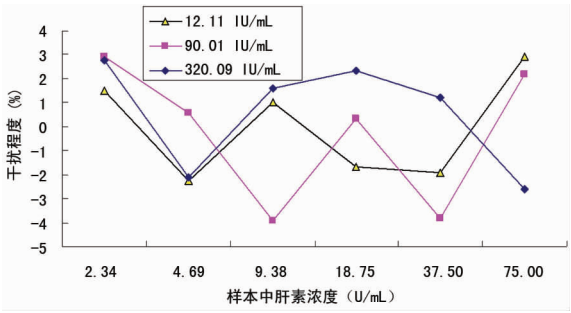

图 8　肝素对样本检测结果的干扰程度

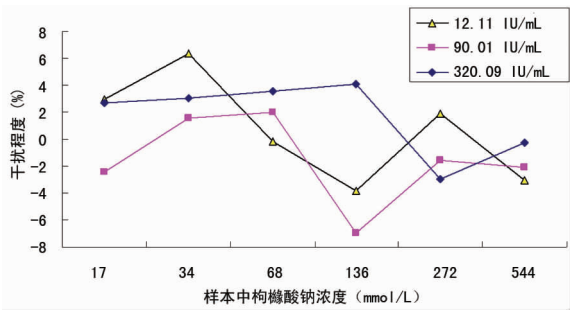

图 9　枸橼酸钠对样本检测结果的干扰程度

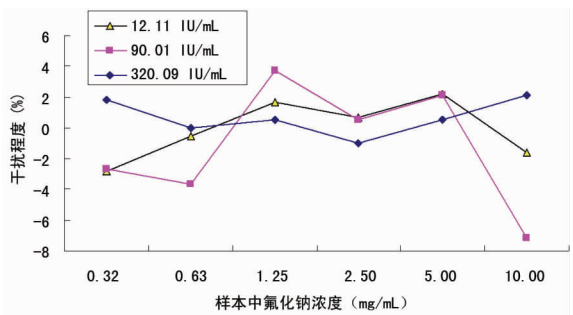

图 10　氟化钠对样本检测结果的干扰程度

2.3.10　方法学比对　参考 NCCLS EP9-A2 文件[14]进行预期偏倚评估试验。参考美国 CLIA′88 规定的类似项目(IgG)的允许误差(±25%)的 1/2(即±12.50%),作为方法学可比性的临床接受判断标准。TIgE TRFIA 与欧蒙 ELISA 平行检测 40 份样本(14.43～518.81 IU/mL)结果的线性回归方程为 $Y=1.005\ 6X-0.153\ 4$,$r=0.999\ 2$($t_r=153.99$,$\upsilon=38$,$P<0.01$)。选用欧蒙 TIgE ELISA 说明书上的各年龄阶段的参考值作为给定值,TRFIA 与欧蒙 ELISA 的测定结果的相对偏倚在−12.22%～0.48%内,均在可接受范围(±12.50%)之内。2 种方法在 80 例过敏性疾病患者样本中均检出 61 例(76.25%)TIgE 高于临界值 100 IU/mL,2 种方法检测结果的一致性符合率为 100%。

3　讨　论

目前应用于 TIgE 检测的方法有免疫比浊法(ITM)、放射免疫法(RIA)、ELISA 法、化学发光法(CLIA)、电化学发光法(ECLIA)、荧光免疫分析法(FIA)等。ITM 是一类均相免疫测定法,但单纯就灵敏度而言,RIA、ELISA 及 FIA 法等均优于 ITM 法。因 RIA 具有放射性污染的固有缺陷,其市场占有率逐年下降,Gosling[15]在《Clinical Chemistry》发表的文章统计,国际上在免疫分析中采用同位素标记所占的比例由 1980 年的 60%下降为 1989 年的 25%,非同位素标记由 1980 年的不足 40%上升为 1989 年的 75%,近年来这个比例仍在变化。目前,临床检测 TIgE 常用的仍是 ELISA 法,但其灵敏度较低,线性范围较窄,结果易受操作人员、实验条件等因素的影响。由于一般 FIA 法中的本底较高等问题,传统的 FIA 用于定量测定有一定困难。CLIA 和 ECLIA 是目前的新型超微量免疫分析技术,但是 CLIA 发光过程短、样品不能重复检测、本底高及易受环境物质干扰。ECLIA 尽管有一定优势,但目前仪器和试剂均依赖进口,且非开放系统,造成试剂价格昂贵,仪器成本及维护费用高。近年来引进的荧光酶免疫法 Pharmacia CAP 变应原体外检测系统,试剂价格昂贵,限制了其大量使用。

RIA、ELISA、传统的 FIA 均没有实现人们所期待的高灵敏度分析,因此科学家们努力寻求一种更可靠的标记物,自 1979 年 Soini 等[16]合成了一种可用于标记抗体的“Eu^{3+}、β-二酮体和 EDTA 衍生物”的三元混合物作为荧光探针并提出 TRFIA 理论,他们预言 TRFIA 将发展为新一代以镧系元素为示踪物和时间分辨荧光测量相结合的非放射性微量免疫分析技术。TRFIA 因镧系元素的荧光寿命可达 60～900 s,甚至更长,比普通荧光高数个数量级,在每个激发光脉冲过后,通过延时,门宽选择,并通过滤光,以达到消除来自样品、试剂及其他的非特异荧光,从而提高灵敏度,又因镧系元素的激发光和发射光之间有一个较大的 stokes 位移,这有利于排除其他非特异荧光的干扰,方法的特异性较高。TRFIA 将抗原抗体反应与荧光物质发光和时间分辨技术三者相结合,其灵敏度可达 10^{-18} mol/L。与现在广泛使用的 RIA、ELISA、FIA、CLIA 和 ECLIA 相比,TRFIA 克服了 RIA 放射性污染的不足、酶标记物的不稳定性和定量范围窄的缺陷、化学发光仅能一次发光、一般荧光标记受环境干扰的难点和电化学发光的非直接标记等缺点。

本研究应用 Eu^{3+} 标记建立的 TIgE 双抗体夹心 TRFIA,经方法学评价具有以下优点:(1)重复性好;(2)灵敏度高;(3)线性范围宽;(4)准确度高;(5)特异性强;(6)与欧蒙 ELISA 比对检测试剂线性范围内的临床样本具有良好的相关性,2 种方法检测结果的一致性符合率为 100.00%;在过敏性疾病患者中的 TIgE 的阳性检出率达 76.25%。表明 TIgE 的检测在过敏性疾病筛选试验中是一个重要参考指标,本研究建立的 TIgE TRFIA 能满足临床的需要。

参考文献:

[1]　李丰,曾华松. IgE 介导的儿童过敏性疾病的诊断及治疗[J]. 临床儿科杂志,2013,31(1):97-98.

[2]　Lee JH, Haselkorn T, Chipps BE, et al. Gender differences in IgE-mediated allergic asthma in the epidemiology and natural history of asthma: Outcomes and Treatment Regimens (TENOR) study[J]. J Asthma, 2006, 43(3): 179-184.

[3]　乐爱平,胡国信,李太原,等. 血清乙型肝炎病毒大蛋白浓度标准曲线的拟合与优选[J]. 检验医学,2009,24(6):463-465.

(下转第 4697 页)

称作十八(碳)烯酸。研究表明,肝细胞可摄取在链长为 C12～C18 的长链脂肪酸,将其酯化成中性脂滴后,储存于肝细胞内。依据此原理 Yasuyuki 等[7]首次应用 OA 诱导 HepG2 细胞 24 h 后,成功造成人源性肝细胞株的脂肪变性模型。杨林辉等[8]应用低浓度 OA 诱导 L02 细胞 72 h,建立肝细胞脂肪变性模型。

本实验选用不同浓度 OA 诱导 Changliver 细胞,在不同的时间点通过 MTT 检测和油红 O 染色明确建模所需的最佳诱导浓度和时间,依据 MTT 检测、油红 O 染色和 TG 检测验证,0.2 mmol/L 浓度 OA 作用细胞 24 h,细胞脂变明显。随着诱导时间的延长,超过 48 h 后,脂滴不再增加反而减少。当 OA≥0.2 mmol/L 时,脂变虽然有所增加,但细胞受损程度也逐渐增加,与杨林辉等[8]在制备 HepG2 脂肪肝细胞造模中的现象相似。提示 OA 对细胞有一定的毒性,有研究认为当肝细胞内不饱和脂肪酸蓄积,可通过细胞色素 P4502E1 酶途径引起脂质过氧化,进一步促进细胞凋亡从而产生细胞毒性[9]。Cui 等[10]发现经 OA 诱导后的肝细胞中超氧化物酶-1(SOD-1)含量明显减少,这种自由基清除酶可以在脂质过氧化过程中保护细胞膜免受自由基的攻击。因此 OA 的细胞毒性与脂质过氧化及细胞的抗氧化能力降低有关。

综上所述,本实验造模方法所需时间较短,且细胞来源方便,性质稳定,是一种研究 NAFLD 的理想方法。

参考文献:

[1] Kobashi-margain RA, Gutierrez-grobe Y, Ponciano-rodriguez G, et al. Prevalence of type 2 diabetes mellitus and chronic liver disease a retrospective study of the association of two increasingly common diseases in Mexico [J]. Ann Hepatol, 2010, 9(3): 282-288.

[2] Feldstein AE, Werneburg NW. Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF alpha expression via alysosomal pathway [J]. Hepatology, 2004, 40(1): 185-194.

[3] 吕业春,刘翼翔,吴薇,等. 蓝莓多酚对油酸诱导 HepG2 细胞脂肪累积的干预作用[J]. 食品科学,2011,32(17):308-312.

[4] Day CP, James OF. Steatohepatitis: atale of two "hits" [J]. Gastroenterology, 1998, 114(4): 842-845.

[5] Gómez-Lechón MJ, Donato MT, Martínez-Romero A, et al. A human hepatocellular in vitro model to investigate steatosis[J]. Chem Biol Interact, 2007, 165: 106-116.

[6] Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, et al. Nonalcoholic steatoheptitis clinical research network. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease[J]. Hepatology, 2005, 41(6): 1313-1321.

[7] Okamoto Y, Tanaka S, Haga Y. Enhanced GLUT2 gene expression in all oleic acid-induced in vitro fatty liver model [J]. Hepatol Res, 2002, 23(2): 138-144.

[8] 杨林辉,陈东风. 油酸诱导培养肝细胞脂肪变性模型的建立[J]. 重庆医学,2007,36(8):698-700.

[9] Sung M, Kim I, Park M, et al. Differential effects of dietary fatty acids on the regulation of CYP2E1 and protein kinase C in human hepatoma HepG2 cells [J]. J Med Food, 2004, 7(2): 197-203.

[10] Cui W, Chen SL, Hu KQ. Quantification and mechanisms of oleic acid-induced steatosis in HepG2 cells [J]. Am J Transl Res, 2010, 2(1): 95-104.

(收稿日期:2014-05-20 修回日期:2014-07-25)

(上接第 4693 页)

[4] 胡镇球,夏宗勤. 免疫放射分析剂量效应曲线的质量作用模型及其拟合[J]. 中华核医学杂志,1992,12(4):226-228.

[5] National Committee for Clinical Laboratory Standards. EP5-A Evaluation of precision performance of clinical chemistry devices, approved guideline[S]. Wayne, PA: NCCLS, 1999.

[6] 冯仁丰. 分析灵敏度(检测限)[J]. 上海医学检验杂志,2002,17(3):133-136.

[7] National Committee for Clinical Laboratory Standards. EP6-A Evaluation of the Linearity of Quantitative measurement Procedures: A Statistical Approach, Proposed Guideline [S]. Wayne, PA: NCCLS, 2003.

[8] 国家食品药品监督管理局. YY/T 1175-2010 中华人民共和国医药行业标准——肿瘤标志物定量测定试剂(盒)(化学发光免疫分析法)[S]. 北京:中国标准出版社,2012.

[9] 徐伟文. 体外诊断试剂研制常用技术指标之分析性能评估[J]. 分子诊断与治疗杂志,2010,2(2):140-144.

[10] 董劲春. 过敏原特异性 IgE 抗体检测试剂盒的临床研究指南[J]. 标记免疫分析与临床,2011,18(3):213-216.

[11] National Committee for Clinical Laboratory Standards. EP7-A2 Interference testing in clinical chemisty, approved guideline-second edition[S]. 2nd. Wayne, PA: NCCLS, 2005.

[12] National Committee for Clinical Laboratory Standards. C28-A How to Define and Determine Reference Intervals in The Clinical Laboratory, Approved Guideline [S]. Wayne, PA: NCCLS, 2000.

[13] 中华人民共和国卫生部. WS/T 402-2012 中华人民共和国卫生行业标准——临床实验室检验项目参考区间的制定[S]. 北京:中国标准出版社,2013.

[14] National Committee for Clinical Laboratory Standards. EP9-A2 Method comparison and bias estimation using patient samples, approved guideline[S]. 2nd. Wayne, PA: NCCLS, 2002.

[15] Gosling JP. A decade of development in immunoassay methodology[J]. Clin Chem, 1990, 36(8): 1408-1427.

[16] Soini E, Hemmilä I. Fluoroimmunoassay: present status and key problems[J]. Clin Chem, 1979, 25(3): 353-361.

(收稿日期:2014-06-25 修回日期:2014-08-10)