

的发展,为进一步深入研究白藜芦醇抗白血病作用的分子机制提供了条件。因此应很好的利用这一条件,进一步加强对白藜芦醇抗肿瘤分子机制的研究,为白藜芦醇的临床应用提供更可靠的依据。

## 参考文献

- [1] Hudson TS, Hartle DK, Hursting SD, et al. Inhibition of prostate cancer growth by muscadine grape skin extract and resveratrol through distinct mechanisms[J]. Cancer Res, 2007, 67: 8396-8405.
- [2] 黎永胜, 文军. 白藜芦醇的药理作用研究进展[J]. 医学综述, 2008, 14(3): 469-471.
- [3] Alkhalaf M, Jaffal S. Potent antiproliferative effect of resveratrol on human osteosarcoma SJSAl cells: Novel cellular mechanisms involving the ERK/P53 cascade[J]. Free Radical Biol Med, 2006, 41: 318-325.
- [4] Hari L, Ratan B. Resveratrol-A prostate cancer chemopreventive agent? [J]. Urologic Oncology, 2002, 7: 223-227.
- [5] Potter GA, Patterson LH, Wanogho E, et al. The cancer preventative agent resveratrol is converted to the anticancer agent pice-atannol by the cytochrome P450 enzyme CYP1B1[J]. Br J Cancer, 2002, 86: 774-778.
- [6] Hung LM, Chen JK, Hung SS, et al. Cardioprotective effect of resveratrol, a natural antioxidant derived from grapes[J]. Cardiovasc Res, 2000, 47: 549-555.
- [7] Athar M, Back JH, Kopelovich L, et al. Multiple molecular targets of resveratrol: anti-carcinogenic mechanisms[J]. Arch Biochem Biophysics, 2009, 486: 95-102.
- [8] Liu BQ, Gao YY, Niu XF, et al. Implication of unfolded protein response in resveratrol-induced inhibition of K562 cell proliferation [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 391: 778-782.
- [9] 吴剑锋, 沈佐君. JAK/STAT 信号通路及其与肿瘤侵袭、转移的关系[J]. Chem Life, 2009, 29(2): 176-179.
- [10] Beneklim JH, Baer MR, Baumann H, et al. Signal trans-

ducer and activator transcription proteins in leukemias [J]. Blood, 2003, 101: 2940-2954.

- [11] Li T, Wang W, Chen H, et al. Evaluation of anti-leukemia effect of resveratrol by modulating SATA3 signaling[J]. Int Immunopharmacol, 2010, 10: 18-25.
- [12] 崔嵩, 刘学峰, 吴斌. NF- $\kappa$ B 在肿瘤中的研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2009, 17(1): 134-137.
- [13] Etrov Z, shishodia S, Federl S, et al. Resveratrol blocks interleukin1 beta-induced activation of the nuclear transcription factor NF-KappaB, inhibits proliferation, causes S-phase arrest, and induces apoptosis of myeloid leukemia cell[J]. Blood, 2003, 102: 987-995.
- [14] 李覃, 范桂香, 王伟, 等. 虎杖提取物白藜芦醇的抗白血病作用及其可能的分子机制[J]. 西安交通大学学报: 医学版, 2008, 29(3): 340-345.
- [15] 冯骥良, 温巧莲. 白藜芦醇以 Caspase 依赖和非依赖两种方式导致 Jurkat 细胞死亡[J]. 细胞生物学杂志, 2007, 29(1): 103-108.
- [16] Hayashibara T, Yamada Y, Nakayama S, et al. Resveratrol induces down regulation in surviving expression and apoptosis in HTLV-1-infected cell lines a prospective agent for adult T cell leukemia chemotherapy [J]. Nutr Cancer, 2002, 44: 193-201.
- [17] Susan JZ, David HS. Resveratrol-induced apoptosis is enhanced in acute lymphoblastic leukemia cells by modulation of the mitochondrial permeability transition pore[J]. Cancer Lett, 2006, 240: 123-134.
- [18] Gao F, Zhang JD, Liu YP, et al. Analysis of methylation status of the promoter of mdrl gene in K562/DNR cells [J]. Chin J Hematol, 2004, 25: 293-295.
- [19] 马泳泳, 黄进. 白藜芦醇诱导 K562/AO2 凋亡与 mdrl 基因表达的关系[J]. 现代中西医结合杂志, 2008, 17(4): 487-489.

(收稿日期: 2010-07-22)

# 酶联免疫斑点检测技术研究进展

聂 华 综述, 郝世勇 审校(湖北省襄樊市中心血站 441000)

【关键词】 酶联免疫吸附测定; 免疫印迹法; 实验室技术和方法

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2011. 01. 043 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2011)01-0082-03

酶联免疫斑点检测技术(ELISPOT)结合了细胞培养技术与酶联免疫吸附试验(ELISA)的长处,能够分析经特异抗原活化后分泌细胞因子[如  $\gamma$  干扰素(IFN- $\gamma$ )、肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )等]的单个效应细胞的频数,具有敏感、特异、易于重复的优点。ELISPOT 是检测抗原反应性效应细胞的最可靠实验方法之一<sup>[1]</sup>,目前已成为抗原特异性 T 细胞免疫学研究的主流技术。本文对 ELISPOT 技术作如下综述。

## 1 ELISPOT 的基本原理

ELISPOT 的培养板以聚偏二氟乙烯(PVDF)膜等为基质,包被上特异性单克隆抗体,在培养板孔内加入细胞培养基、待检测的细胞及抗原刺激物进行培养。在特异性抗原或非特

异性有丝分裂原的刺激下, T 细胞分泌各种细胞因子,细胞因子被膜上的单克隆抗体捕获。被捕获的细胞因子可以与生物素标记的第二抗体结合,然后用酶标亲和素与生物素进行化学酶联显色,在膜的局部形成一个圆形斑点<sup>[2]</sup>。

## 2 ELISPOT 的优点

ELISPOT 得到广泛应用首先是由于其在检测抗原特异性细胞低频数时的高敏感性,比以流式细胞术为基础的技术(四聚体和细胞内细胞因子染色)的敏感性要高出 1~2 个数量级。其次,ELISPOT 可以利用冻存的外周血单(个)核细胞(PBMC)样本来进行免疫监测分析而不丧失细胞的重要活性<sup>[3]</sup>,同时计算机辅助图像分析系统的使用也使大规模研究成为可能。

### 3 各种 ELISPOT 分析方法

由于 IFN- $\gamma$  分泌量较多,且与 T 细胞的细胞毒功能密切相关,一直以来 IFN- $\gamma$  ELISPOT 分析得到了广泛应用。但是单纯检测 IFN- $\gamma$  不足以充分反映 T 细胞的免疫功能,从而检测多种细胞因子成为需求,相应出现了双色 ELISPOT、荧光 ELISPOT、Granzyme B ELISPOT 等分析方法。但这些方法还需进一步完善,虽然早已出现了双色 ELISPOT 应用的报道,但一些原因却限制了其广泛使用。首先,当 ELISPOT 板包被时,两种捕获抗体竞争结合到膜表面,因为抗体的疏水性决定了它们结合到膜上的亲活力,如果一种抗体更加亲水性,它将丧失竞争力;其次,底物产生的两种颜色必须各自独立形成,它们之间不能相互干扰,两种颜色任何一种都不能处于优势地位,这样产生两种细胞因子的细胞才能被检测出来;图像分析系统也必须建立起来并通过验证能准确、客观地测量每个斑点的颜色和形态。此外,细胞因子的产量还受反馈机制调节,因此需要明确哪些细胞因子结合可以在双色 ELISPOT 中进行检测,Quast 等<sup>[4]</sup>发现 IL-2 可导致 IFN- $\gamma$  和 IL-5 斑点的丢失。荧光 ELISPOT 检测时由于荧光素直接耦联在抗体或者亲和素上,缺乏酶催化底物的放大作用,灵敏度无法和化学显色的 ELISPOT 方法比较。此外,硝酸纤维素膜和 PVDF 膜有自发荧光现象,能引起背景升高,信噪比下降<sup>[5]</sup>。

### 4 ELISPOT 标准化与验证

由于超高的灵敏度,ELISPOT 结果易受到诸多因素影响,所以需要进行 ELISPOT 的标准化和验证<sup>[6]</sup>。

#### 4.1 ELISPOT 的标准化

**4.1.1 ELISPOT 板** Shaw 等首先将 PVDF 膜应用到 ELISPOT,后来随着 ELISPOT IP、HP 以及 HTS 板材的应用,质量得到进一步的提高<sup>[7]</sup>。塑料 ELISA 板蛋白结合能力有限,所以不建议使用。建议一项研究中使用同一种板材,最好为同一批次,同时需要检查生产厂家的质量控制程序、批次性能以及是否达到生物分子筛查协会制定的标准。

**4.1.2 包被规程** 使用 PVDF 膜板,建议预湿时每孔加入 15  $\mu$ L 的 70%乙醇来降低膜的疏水性。但乙醇必须被充分洗掉,残留乙醇能干扰斑点形成。抗体对的选择根据实验要求而定,需要考虑抗体敏感性等因素。不同商品试剂盒检测相同细胞因子的敏感性可相差 10 倍,所以需要进行标准化,其中的一个重要参数是包被抗体的总量,一般认为每孔约 0.5~1.0  $\mu$ g 包被抗体可以得到理想的斑点。

**4.1.3 细胞准备** (1)细胞分离:因为红细胞溶血和血小板分泌的抑制因子能影响 T 细胞功能,所以必须进行外周血单个核细胞的分离。(2)冻存、贮藏和运输:冻存在细胞处理过程中最关键。细胞的冻存有几种方法,自动控制降温器可以提供逐步智能降温,这在细胞最佳冻存及其标准化程序中是必需的,经济实用的方法是使用装有异丙醇的冻存盒。血液样本处理、分离及冻存的最佳时间范围应该在 8 h 内或者在采集当天完成,样本放置时间过长或在不合适的温度下过久,会影响 PBMC 的功能,甚至可造成 IFN- $\gamma$  斑点形成细胞减少 5 倍以上。运输 PBMC 的最佳方式是专用的冷冻液氮装置,液氮缓慢挥发使气态氮充满运输容器,从而使样本可在接近-140°的恒定温度下保持 10~18 d。不断变化的温度会对细胞功能造成致命影响,不推荐用干冰运输盒运送标本。(3)细胞复苏:细胞复苏时应用 DNA 酶能提高细胞的产量并降低细胞团块形成<sup>[8]</sup>。ELISPOT 分析前最好将 PBMC 放置过夜,使有凋亡倾向的细胞死亡,这样在分析前就可以估计出活力细胞的确切计数。

**4.1.4 刺激抗原** 重组蛋白可以用来检测 CD4<sup>+</sup> T 细胞介导的反应,对 CD8<sup>+</sup> T 细胞介导的反应有限。对重组蛋白的反应依赖于抗原呈递细胞(APCs),APCs 在冻存后数量减少,同时重组蛋白在不同贮藏温度下会出现溶解性和稳定性的问题。活的重组病毒载体或病毒感染细胞株也有相似的优缺点。重叠多肽池能用来鉴定 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> T 细胞识别的最佳表位。肽段越短,重叠越多,鉴别组织相容性复合物(MHC)-I 表位时越精确,而不需要考虑到可能的 MHC-II 类反应,因为 MHC-II 表位的氨基酸序列长度相对要长。所以检测 MHC-I 表位(CD8<sup>+</sup> T 细胞反应)、MHC-II 表位(CD4<sup>+</sup> T 细胞反应)时在考虑合成肽价格的同时需要找到一个理想的平衡点。另外,使用多肽时需要注意多肽的纯度,以降低非特异细胞因子的产生。

**4.1.5 细胞计数** ELISPOT 在细胞数量上需要很高的准确性,同时,减少死亡细胞的影响也很重要,死亡细胞可影响分析的正确性。常用台盼蓝排斥试验和对丝裂原的反应来判断复苏后 PBMCs 的质量。但 Smith 等<sup>[9]</sup>的实验表明,检测细胞凋亡在判断细胞活力方面更有效,当凋亡小于 18%时可以得到理想结果。目前已有自动化设备用来进行细胞计数和活力检测。

**4.1.6 洗涤及斑点形成** 洗涤程序可以手工也可以使用自动洗板机,大批量洗涤时手工需要很长时间,从而造成孵育时间不一致。另外,手工清洗时如果缓冲液过少或压力过低均不能完全移除细胞和试剂,从而造成膜上的假相斑点增多以及孔的周边染料聚集。因此,建议使用自动洗板机,一般要求至少可以使用两种不同的清洗缓冲液,同时能调整清洗探针的高度和缓冲液的流量。斑点的形成规程与 ELISA 规程相似,正确的抗体及其浓度必须通过实验验证后加以选择,最佳抗体量需要参考生产厂商的要求。对于亲和素酶复合物也必须给予重视,批间的酶变异性要很小,以保证实验的可比性。底物的选择能够影响斑点的检测数量,同一种酶的不同底物以及不同厂商生产的同一底物可能在敏感性上不同,从而造成斑点计数产生相当大的区别<sup>[10]</sup>。

**4.1.7 ELISPOT 板判读** 使用显微镜计数斑点的方法费时、费力,结果依赖个人经验,产生偏差和变异性大的问题不可避免。使用自动读板机可以很明显地降低计数时的变异性。Currier 等使用自动读板机时通过 23 个 8~11 肽组成的肽池(CEF 肽池)来确定斑点的参数设置标准,它们可以被 CD8<sup>+</sup> T 细胞识别并被 I 类人类白细胞抗原(HLA)-A 和 HLA-B 等位基因呈递,形成的斑点代表记忆性 CD8<sup>+</sup> T 细胞反应。Janetzki 等<sup>[11]</sup>的实验表明,使用 CEF 肽池的控制方法时预设读板参数能获得变异性更小的结果。

**4.2 分析的验证** ELISPOT 的验证必须在开始临床试验前进行,验证时应首先确定分析中可能出现问题的变量(如孵育时间、试剂纯度、试剂浓度等),并随后在国际协调会议(ICH)文件 ICH-Q2A 和 ICH-Q2B 的指导下对整个操作规程进行验证。针对一个标准操作规程的验证过程应该包括 7 点:准确性、精确性、特异性、检出限界、定量限界、线性、检测范围。

### 5 ELISPOT 的应用领域

ELISPOT 目前得到了广泛的应用,包括艾滋病<sup>[12]</sup>、癌症、自身免疫性疾病、过敏性疾病以及移植方面的研究,感染性疾病的免疫监测<sup>[13]</sup>,疫苗的研发与检测,免疫显性表位的鉴定等。ELISPOT 在医学研究方面所受的限制不在于技术本身,而在于研究者的想象力与创新思维,客观地说,在一切免疫学研究的前沿领域,ELISPOT 都是最有力的研究工具之一。

## 参考文献

- [1] Zhang W, Caspell R, Karulin AY, et al. ELISPOT assays provide reproducible results among different laboratories for T-cell immune monitoring-even in hands of ELISPOT-inexperienced investigators[J]. J Immunotoxicol, 2009, 6: 227-234.
- [2] Kalyuzhny AE. Chemistry and biology of the ELISPOT assay[J]. Methods Mol Biol, 2005, 302: 15-31.
- [3] Kreher CR, Dittrich MT, Guerkov R, et al. CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells in cryopreserved human PBMC maintain full functionality in cytokine ELISPOT assays[J]. J Immunol Methods, 2003, 278: 79-93.
- [4] Quast S, Zhang W, Shive C, et al. IL-2 absorption affects IFN-gamma and IL-5, but not IL-4 producing memory T cells in double color cytokine ELISPOT assays[J]. Cell Immunol, 2005, 237: 28-36.
- [5] Gazagne A, Malkusch W, Vingert B, et al. Fluorospot assay: methodological analysis[J]. Methods Mol Biol, 2005, 302: 289-296.
- [6] Janetzki S, Cox JH, Oden N, et al. Standardization and validation issues of the ELISPOT assay[J]. Methods Mol Biol, 2005, 302: 51-86.
- [7] Weiss AJ. Membranes and membrane plates used in ELISPOT[J]. Methods Mol Biol, 2005, 302: 33-50.
- [8] Smith JG, Liu X, Kaufhold RM, et al. Development and

validation of a gamma interferon ELISPOT assay for quantitation of cellular immune responses to varicella-zoster virus[J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2001, 8: 871-879.

- [9] Smith JG, Joseph HR, Green T, et al. Establishing acceptance criteria for cell-mediated-immunity assays using frozen peripheral blood mononuclear cells stored under optimal and suboptimal conditions[J]. Clin Vaccine Immunol, 2007, 14: 527-537.
- [10] Kalyuzhny AE. ELISPOT assay on membrane microplates[J]. Methods Mol Biol, 2009, 536: 355-365.
- [11] Janetzki S, Schaed S, Blachere NE, et al. Evaluation of Elispot assays: influence of method and operator on variability of results[J]. J Immunol Methods, 2004, 291: 175-178.
- [12] Shacklett BL, Critchfield JW, Lemongello D. Quantifying HIV-1-specific CD8<sup>+</sup> T-cell responses using ELISPOT and cytokine flow cytometry[J]. Methods Mol Biol, 2009, 485: 359-374.
- [13] Hesselink AC, Gie RP, Mandalakas AM. The predictive value of the ELISPOT-based interferon-gamma-release assay for tuberculosis disease[J]. Ann Intern Med, 2009, 150: 428-429.

(收稿日期: 2010-08-04)

(上接第 75 页)

激光光纤离物镜距离应不小于 1.5 cm, 以免损伤内镜, 具体碎石时, 一定不要连续在结石的某一处碎石, 而应在结石表面多处碎石, 即散在碎石, 以免损伤膀胱壁或对光纤的损害(光纤的折断或塑料保护层损坏); 再次, 冲水速度要慢而平稳, 当然, 电切镜本身具有出水通道, 形成对流<sup>[1]</sup>, 其中就有减压作用, 同时, 钬激光光纤直径比 Olympus 26Fr 操作器中的电切环直径小, 使膀胱减压的作用, 也即使膀胱具有双通道减压作用, 尽量保证结石不移动, 也可在膀胱充盈状态下(至少大于 200 mL 液体), 不冲水碎石, 当碎石粉末使膀胱内液体混浊不清时, 要减压放水冲洗后再进行, 结石一般碎成 0.3~0.4 cm 时, 才易被艾利氏器冲洗出结石。同期处理前列腺增生或(和)膀胱肿瘤时, 需先处理膀胱结石<sup>[1]</sup>。如输尿管镜下处理上尿路结石或输尿管其他病变, 先上尿路、后膀胱结石, 再膀胱肿瘤、前列腺增生, 以便术中定位, 避免损伤输尿管口和膀胱三角, 减少前列腺电切后的创面暴露于冲洗液的时间, 避免经尿道前列腺电切综合征的发生<sup>[2]</sup>, 更重要的是可始终保持手术视野的清晰。

传统膀胱切开取石, 不仅创伤大, 而且患者恢复也较慢<sup>[3]</sup>, 留有瘢痕, 并很费时。

输尿管镜下行膀胱内碎石, 不论是弹道或钬激光, 均会使膀胱内压力增加, 不能连续操作, 视野较小。电切镜外鞘下弹道进行气压弹道治疗膀胱结石的成功率高<sup>[4]</sup>, 但操作较麻烦, 对人体损伤较大<sup>[5]</sup>。其他诸如大力碎石钳相对优势更少。

总之, 前列腺电切设备结合钬激光行膀胱内结石碎石是一

种安全、微创的碎石方法, 因其碎石快, 对膀胱损伤小, 处理结石彻底, 本组 96 例膀胱结石患者无一例发生膀胱穿孔, 随访 3 个月至 3 年未见尿失禁、尿道狭窄等并发症, 仅 1 例高血压患者突发脑卒中死亡, 2 例截瘫患者膀胱结石复发。术后是否行腹部平片或 B 超复查膀胱内有无结石, 有待商榷。

## 参考文献

- [1] 庞桂建, 刘成倍, 徐伟, 等. 经尿道电切下大功率钬激光治疗膀胱结石[J]. 中国内镜杂志, 2008, 14(1): 73-74.
- [2] 庞桂建, 刘成倍, 徐伟, 等. 单纯使用电切镜联合钬激光和汽化电切同期处理前列腺增生症增生并膀胱结石(附 53 例报告)[J]. 现代泌尿外科杂志, 2007, 12(2): 118-119.
- [3] 朱学华, 宋健, 邵强, 等. 经尿道钬激光同期治疗前列腺增生并膀胱结石的疗效[J]. 临床泌尿外科杂志, 2007, 22(9): 689-691.
- [4] 卢剑, 肖春雷, 马潞林, 等. 经尿道电切镜外鞘气压弹道治疗膀胱结石 20 例报告[J]. 中国微创杂志, 2005, 11(7): 753-754.
- [5] 盛旭俊, 朱英坚, 齐隽, 等. 前列腺增生并膀胱结石三种腔内碎石方法比较[J]. 临床泌尿外科杂志, 2007, 22(7): 497-499.

(收稿日期: 2010-08-19)