

细胞因子与细胞粘附因子的检测

刘霞

江苏大学医学院

免疫学与免疫学检验系

细胞因子(cytokine)

是由活化的免疫细胞及某些基质细胞表达并分泌的活性物质，其主要生物学功能是介导和调节免疫应答及炎症反应，其化学本质是蛋白质或多肽。

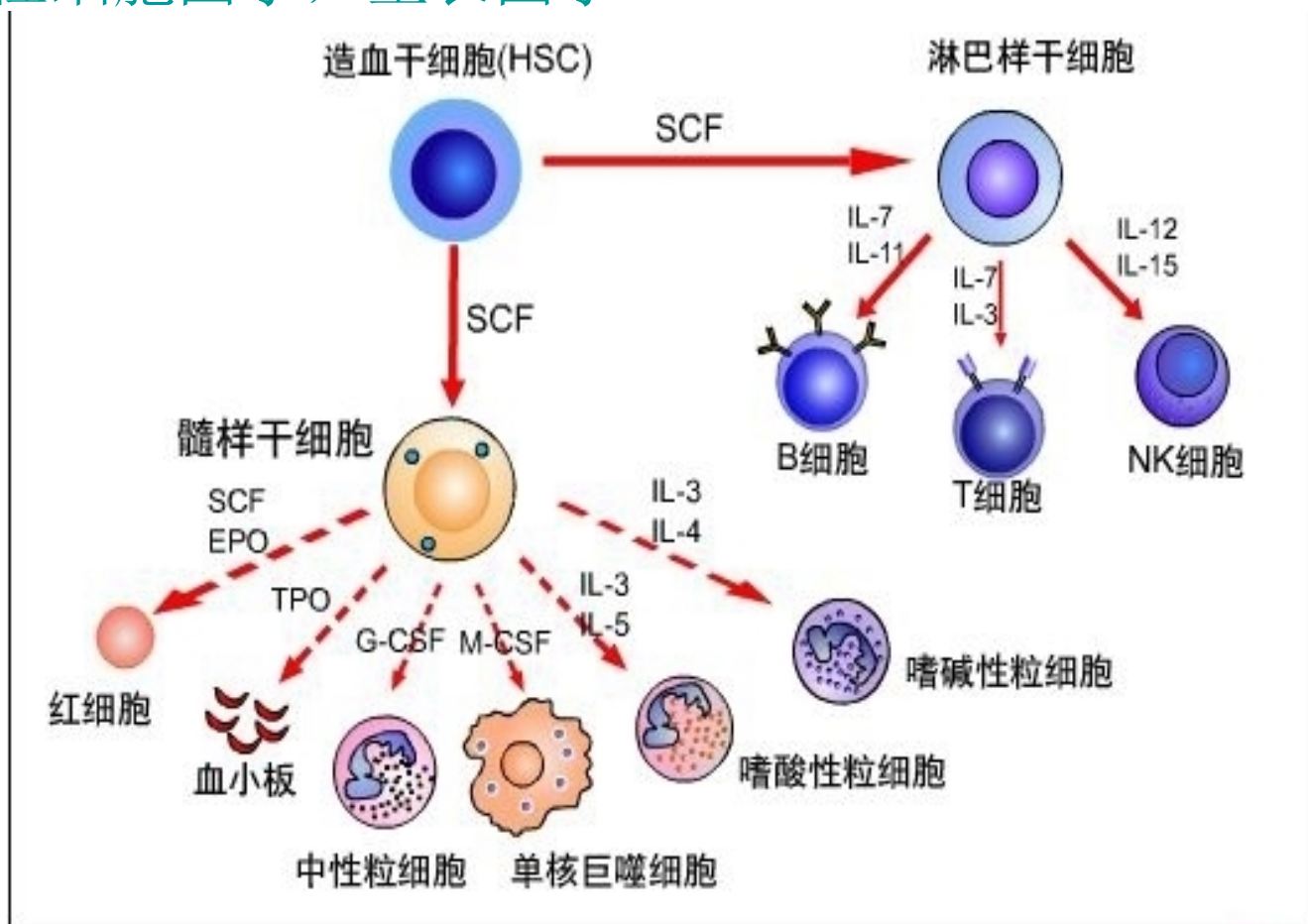
细胞粘附因子(cell-adhesion molecules)

是介导细胞间及细胞与细胞外基质间粘附作用的分子，其化学本质为糖蛋白，可以在细胞膜表面表达和可溶性两种形式存在。

细胞因子简介

种类:

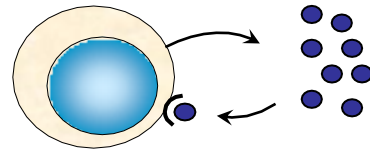
白细胞介素，干扰素，肿瘤坏死因子，集落刺激因子，趋化性细胞因子，生长因子



细胞因子的共同特性

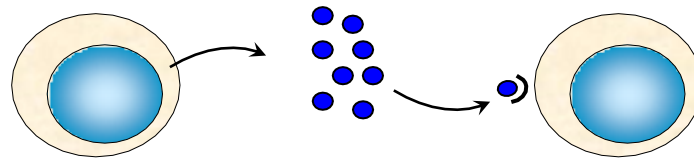
自分泌，旁分泌与内分泌
通过特异性受体发挥作用
高效性，多源性与多效性，
重叠性，拮抗性，协同
性，网络性

细胞因子发挥作用的三种方式



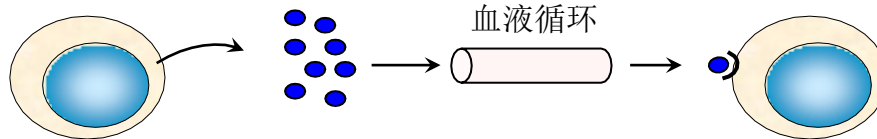
作用于分泌细胞自身

自分泌 autocrine



作用于比邻细胞

旁分泌 paracrine

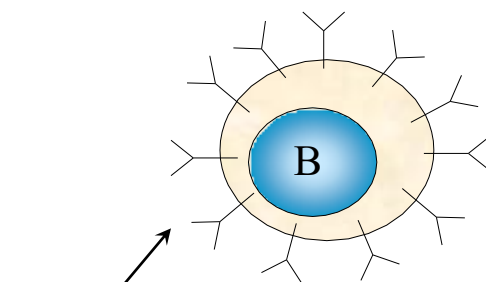


远距离作用

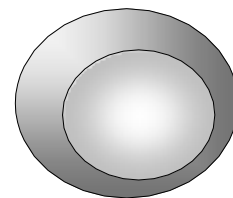
内分泌 endocrine

多效性
pleiotropy

IL-4

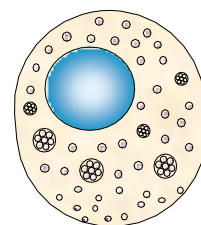


活化、增
殖、分化



增殖

胸腺细胞

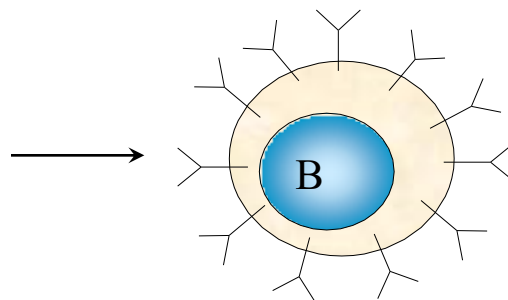


增殖

肥大细胞

重叠性
redundancy

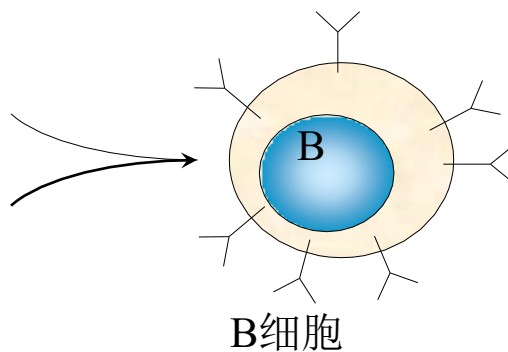
IL-2、IL-4、
IL-5



均有刺激B细胞增殖的功能

协同性
synergy

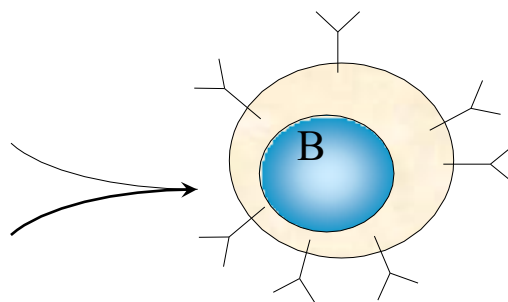
IL-4 +
IL-5



更有效地诱导IgE
类别转换

拮抗性
antagonism

IL-4
IFN- γ



IFN- γ 阻断IL-4诱导的
抗体类别转化的作用

细胞因子的主要生物学作用

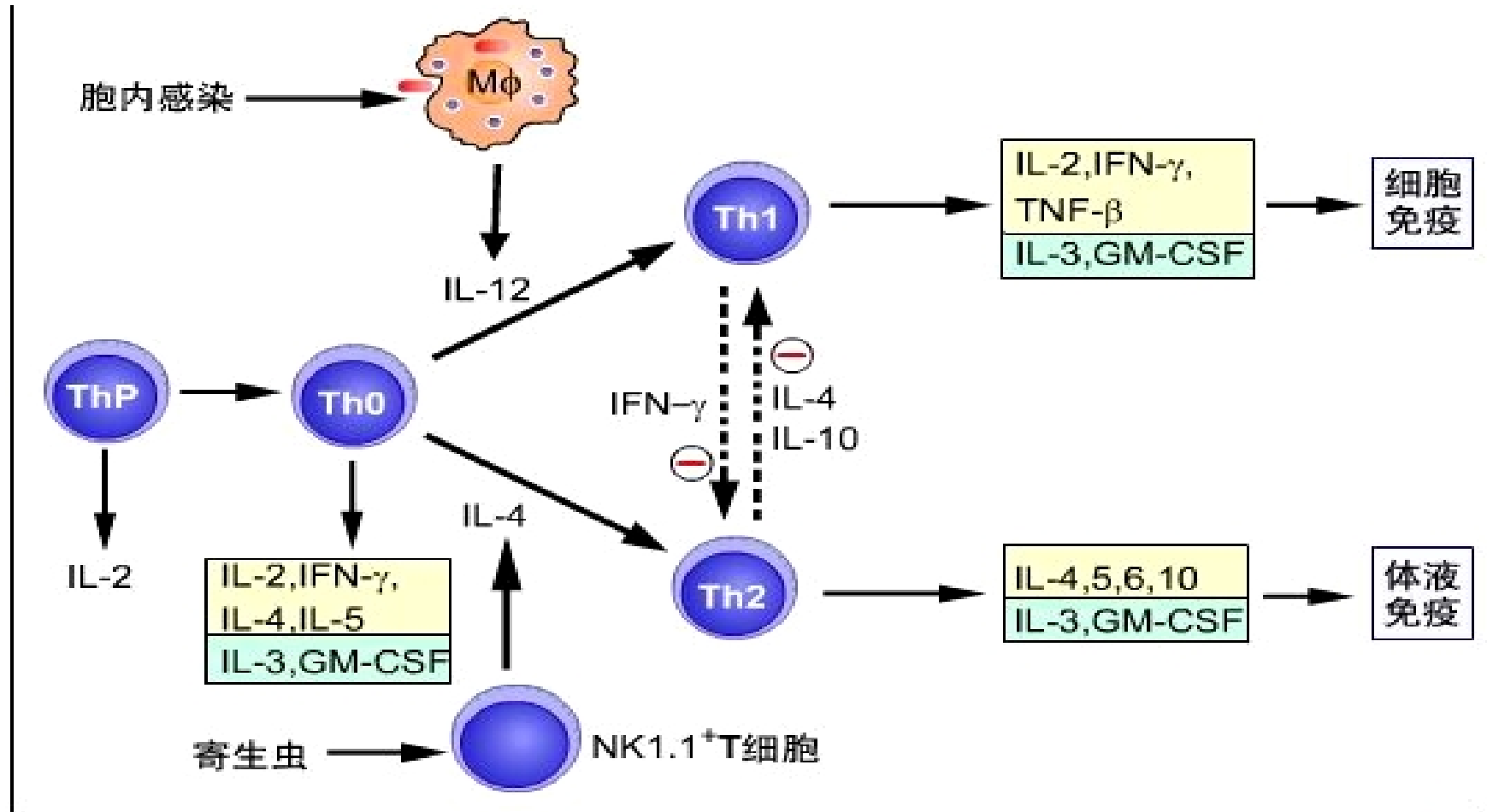
免疫调节作用

免疫效应作用

刺激造血功能

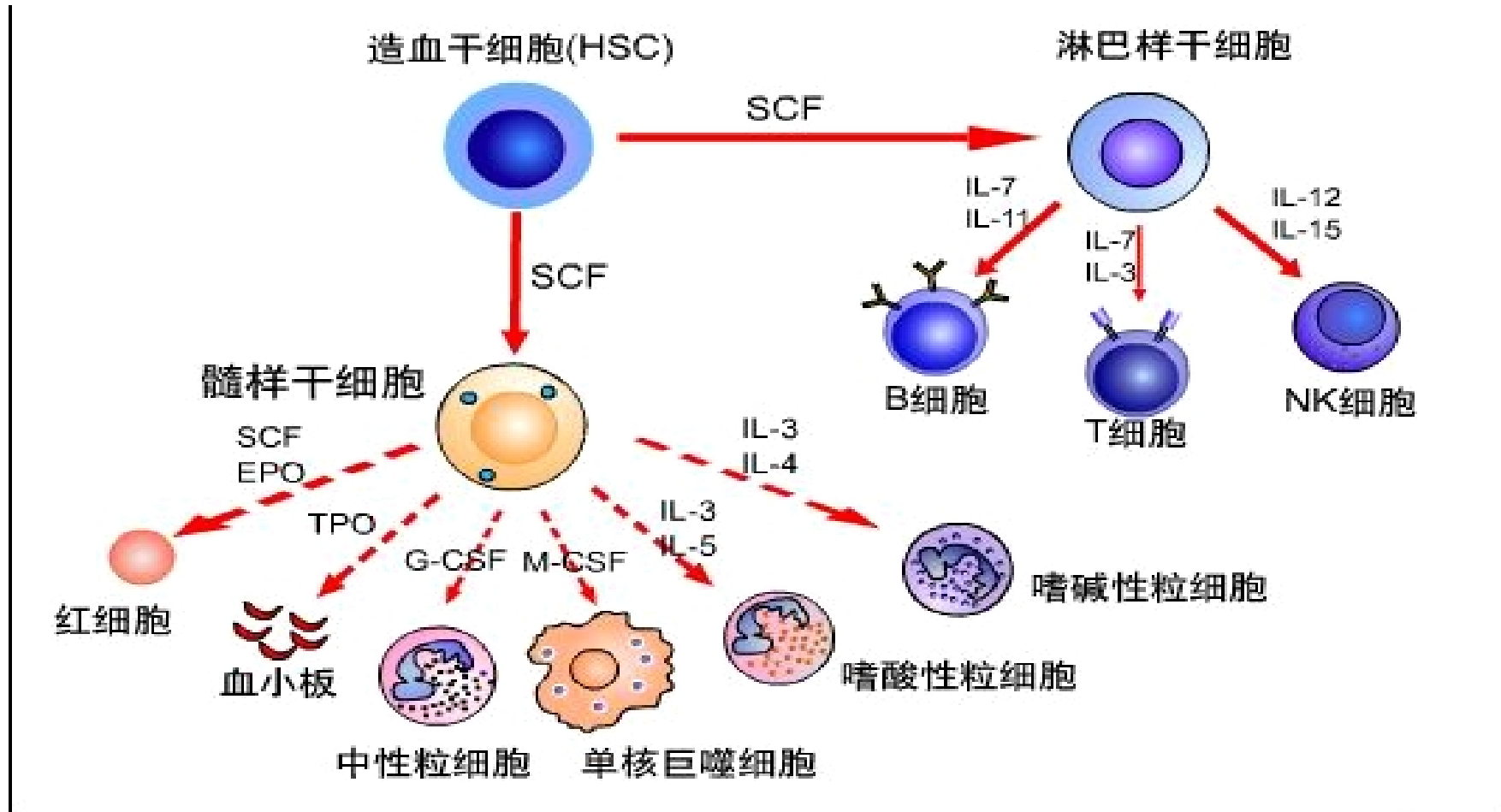
参与炎症反应

免疫调节作用



➤ 细胞因子对Th1和Th2细胞分化的调节作用

刺激造血功能



➤ 各种细胞因子在造血过程中的主要作用

细胞因子与临床

（一）细胞因子与疾病

1. 细胞因子及受体缺陷
2. 细胞因子过高表达
3. 可溶性受体水平升高

（二）细胞因子与治疗

1. 治疗方式

- A. 细胞因子补充疗法
- B. 细胞因子阻断疗法

2. 治疗疾病

- （1）治疗恶性肿瘤
- （2）治疗自身免疫性疾病
- （3）治疗炎症反应
- （4）治疗移植排斥
- （5）治疗造血系统疾病

细胞因子检测方法

生物学测定法

1.基于DNA检测的分子生物学测定法:

DNA扩增法, RNA印迹法, 原位杂交法, 核酸酶保护分析

2.生物活性测定法

促进细胞增殖和增殖抑制测定法

细胞毒活性测定法

抗病毒活性测定法

趋化活性测定法

免疫学测定法

ELISA, 流式细胞仪分析法和酶联免疫斑点试验

生物活性测定法原理

根据细胞因子特定的生物学活性,应用相应的指示系统,同时与标准品对比测定,从而得知样品中细胞因子的活性水平,一般以活性单位(U/ml)表示

一、促进细胞增殖和增殖抑制测定法

以细胞因子依赖性细胞株为靶向，通过观察特定的细胞因子刺激或抑制依赖性细胞株增殖来评估细胞因子的活性水平。

➤ 直接计数法

简便、直观,但费时、主观因素影响大、难以标准化和自动化

➤ 细胞代谢活性测定方法

^3H -TdR、 ^{125}I -UdR掺入法或MTT等比色法

➤ 细胞代谢产物测定法

代谢产物荧光强度测定法和指示细胞表面标记或可溶性分子测定法

(1) 放射性核素掺入法

通过检测细胞DNA合成的增加或减少来判断细胞增殖的方法。在细胞的增殖过程中，DNA合成的增加使得指示细胞对核苷或碱基的需求增多，若将核苷标记上可以示踪的同位素（ $^3\text{H}/^{125}\text{I}$ ），通过检测细胞内的同位素含量，则可反映细胞增殖的程度。

优点：

结果客观易于自动化；适用于大标本量的测定

缺点：

方法的特异性受依赖细胞株影响；放射性污染

(2) MTT 比色法

原理：又称四唑盐比色法，是一种检测细胞存活和生长的方法。其检测原理为活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使外源性MTT还原为水不溶性的蓝紫色结晶甲瓚（Formazan）并沉积在细胞中，而死细胞无此功能。二甲基亚砷（DMSO）能溶解细胞中的甲瓚，用酶联免疫检测仪在540 或720nm波长处测定其光吸收值，可间接反映活细胞数量。在一定细胞数范围内，MTT结晶形成的量与细胞数成正比。

特点：不使用放射性核素，

以细胞代谢变化为增殖指征

指示细胞的增殖情况与线粒体代谢活性相关

二、细胞毒活性测定法

对指示细胞具有破坏作用的细胞因子（TNF），若与细胞共育将会导致细胞死亡。因此，待测细胞因子作一系列稀释后加至指示细胞培养体系，以检测培养细胞的死细胞数作为判断指标，死细胞数量与细胞因子的活性呈正比。试验时，与细胞增殖或抑制方法一样，以已知活性的细胞因子标准品为对照。死、活细胞情况可用同位素 ^{51}Cr 释放法判断，或应用台盼兰染色死细胞后直接计数。也可通过结晶紫、萘酚蓝黑、MTT、NBB等着染活细胞，再用脱色液脱出染料后酶标仪比色测定吸光值。死细胞数、 ^{51}Cr 释放量越高或比色测定的吸光值越低，表明待测细胞因子的细胞毒活性则越高。应用系列稀释的细胞因子标准品，制作其活性与剂量关系的标准曲线，以此作为待测品活性的定量测定的基础。

三、抗病毒活性测定法

常用于检测抗病毒活性的细胞株

Wish、Hep2/c	人干扰素
L929	小鼠干扰素
Ratec	大鼠干扰素
A549	
MDBK	多种族的IFN- α 和IFN- γ

常用于攻击细胞的病毒 VSV、EMCV及Sindbis virus等

检测抗病毒活性的方法

细胞病变效应(CPE)、
抑制病毒蚀斑形成或抑制病毒的产量

本法常用于IFN等的测定，IFN可诱导细胞产生抑制病毒RNA和DNA合成的酶，保护细胞不受病毒感染，产生细胞病变效应（CPE）。

四、趋化活性测定法

多种细胞因子具有趋化活性，分别能诱导中性粒细胞，单核/巨噬细胞和淋巴细胞定向迁移。

趋化因子诱导细胞移动的方式包括：

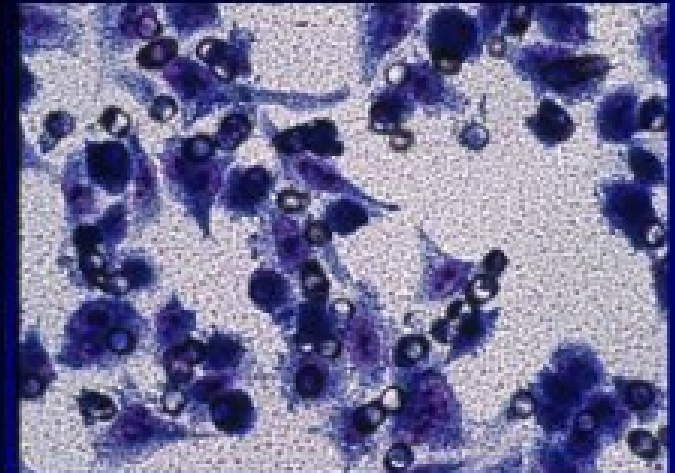
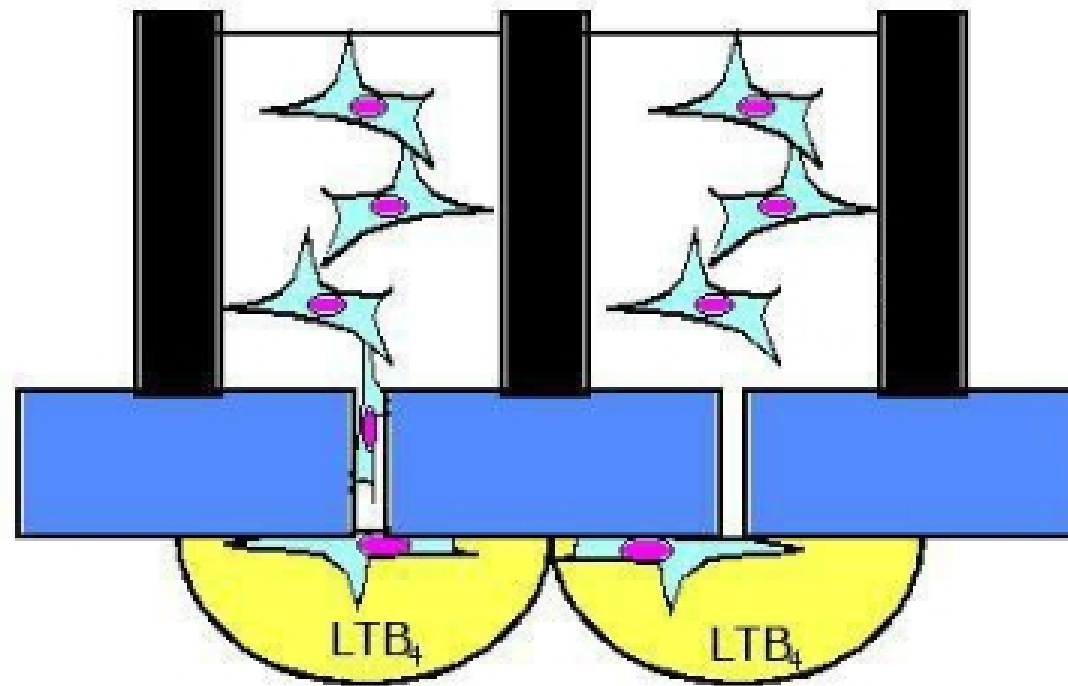
➤ 趋化性(chemotaxis):

诱导细胞向由趋化因子低浓度处向趋化因子高浓度处作定向移动的特性,可采用琼脂糖和微孔小室趋化试验。

➤ 化学增活性(chemokinesis):

细胞因子增强细胞的随机运动能力的特性,可采用琼脂糖小滴化学动力学试验检测。

Boyden chamber assay



Chemotaxis

五、生物学活性测定方法学评价

敏感性较高，特异性不高，
操作繁琐，易受干扰

免疫学测定法

细胞因子(或受体)与相应的特异性抗体(单克隆抗体或多克隆抗体)结合,通过同位素、荧光或酶等标记技术加以放大和显示,从而定性或定量显示细胞因子(或受体)的水平。

一、ELISA方法

ELISA法是应用最为广泛的非均相酶标免疫分析技术，一步或多步的抗原抗体反应和一步酶促反应构成ELISA的基本步骤，可作定性或定量分析。ELISA法不仅可以用于细胞因子检测，也可用于可溶性细胞因子受体或可溶性粘附因子的测定

根据抗体性质和特异性不同，夹心法ELISA可分为：

1. PcAb与McAb夹心法
2. McAb与PcAb夹心法
3. 双McAb夹心法
4. 细胞、McAb夹心法

ELISA

特异、简便

易于推广和标准化等优点

可同时检测大量标本且试验废弃物便于处理

细胞因子测定的**首选方法**

敏感性偏低

不能判断细胞因子的生物学活性。

二、流式细胞分析法

流式细胞分析法，是基于荧光抗体染色技术并借助流式细胞仪敏感的分辨力所建立的方法。该法主要用于细胞内细胞因子和细胞表面粘附分子的检测，通过特异性的荧光抗体染色，能简单、快速地进行单个细胞水平的细胞因子或粘附因子的检测，精确判断不同细胞亚群细胞因子和膜分子的表达情况。

基本步骤



1. 分离和培养待检细胞
2. 细胞破膜与固定
3. 封闭非特异性结合位点
4. 染色与分析

使用流式细胞分析法，可以：

➤ 区分不同分泌特性的细胞亚群：

Th1细胞 IFN- γ

Th2细胞 IL-4

➤ 细胞表面的粘附分子或细胞因子受体：

单克隆抗体技术

直接或间接荧光抗体染色

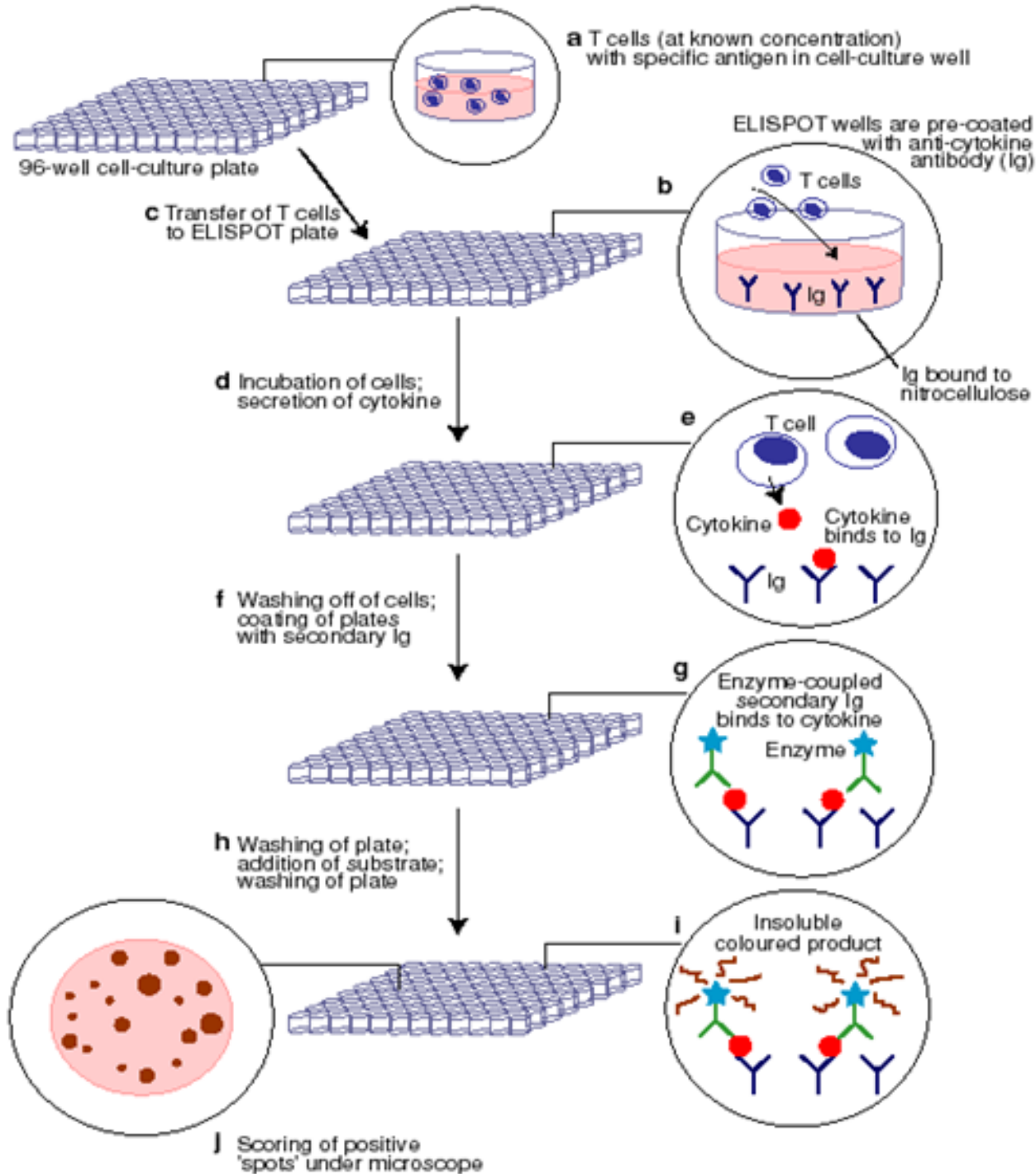
无需作细胞固定和非特异性结合位点的封闭

待测细胞是新鲜分离或培养的活细胞，保持良好状态

三、酶联免疫斑点试验(ELISPOT或ElisaSpot)

原理：在包被有待测细胞因子抗体的微孔板上，加入可分泌相应细胞因子的待测细胞，经在有或无刺激物存在的条件下培养，待测细胞分泌细胞因子于其周围，并被板上的特异性抗体捕获。后续的反应如同ELISA，即在洗去细胞后视用于试验的酶标抗体为一抗或二抗，分别作直接或间接法。

一个斑点代表一个细胞因子分泌细胞，斑点的颜色深浅程度与细胞分泌的细胞因子量相关



四、免疫学测定方法学评价

➤ 优点：

特异性高

操作简便、快速，无需依赖细胞株

影响因素较少且易控制，重复性好，方法容易标准化。

➤ 缺点：

所测定的只是细胞因子的蛋白含量，与其生物活性不一定呈正比

结果与所用的抗体来源及亲和力有很大的关系

敏感性相对较低

标本中细胞因子的可溶性受体，会影响特异性抗体对细胞因子的结合

细胞因子生物学活性与免疫学检测方法的比较

	生物学活性法	免疫学检测法
原 理	细胞因子特定的生物学活性	细胞因子与相应抗体特异性结合反应
结果表示	生物学活性	含 量
敏感性	一般较高	一般较低（加放大系统可明显升高）
特异性	低	高
重复性	较 差	较 好
标准化、大量检测	困 难	容 易
周 期	较 长	短

细胞粘附分子的检测

- 黏附分子以受体-配体结合的形式发挥作用，参与细胞的识别、活化和信号转导、增殖和分化、伸展与移动。
- 粘附分子的分类：钙离子依赖性家族、整合素家族、免疫球蛋白超家族和选择素家族等
- 某些疾病中细胞粘附分子的数量、构象有改变
- 大多限于用免疫学技术检测
- 标本 活检组织 细胞 血液样本

细胞表面粘附分子的检测

放射免疫测定法

免疫荧光测定法 间接免疫荧光法

FACS仪

酶免疫测定法 酶免疫组织化学

双抗体夹心ELISA

可溶性粘附分子的检测

双抗体夹心ELISA

- 细胞粘附分子基因和基因表达的测定
PCR
SSCP（单链构型多态性）
PCR-RFLP
实时荧光定量PCR
** 基因多态性分析 基因表达定量分析
- 临床应用
炎症 肿瘤转移 器官移植排斥

细胞因子与细胞粘附分子测定的临床应用

细胞因子的测定主要应用于：

特定疾病的辅助诊断

机体免疫状态的评估

临床疾病治疗效果的监测和指导用药

疾病预防

一、临床应用原则

细胞因子和粘附分子的异质性、功能交叉性和多样性、来源的复杂性和组织细胞的非特异性，决定了在进行这些分子检测时，必须对方法选择和结果判断作出综合考虑。

（一）方法的联合应用

细胞因子的检测方法多种多样，各有利弊。

高敏感性方法：特异性的降低、废弃物难处理

活性测定方法：定性试验

基因分析法：利于细胞内定位分析、操作烦琐

（二）标本的适当选取

常用临床标本：抗凝全血，并分离获得单个核细胞

炎症局部细胞因子的水平：局部分泌液

细胞因子或粘附分子的细胞内定位检测：免疫组化分析

相应细胞因子的基因和mRNA表达：分子生物学

疗效观察和预后判断：疾病急性期和恢复期双份标本进行动态观测

免疫荧光染色和流式细胞分析：注意待检细胞的活性和状态，以保证结果的特异性

（三）细胞因子的联合检测

意义：

细胞因子具有网络调节的特点

级联效应或相互抑制作用的网络系统。

有助于提供有效的疾病诊断和机体免疫状态信息

举例：

T细胞、巨噬细胞和上皮样细胞分泌相应细胞因子的

功能：IL-1、IL-2、IFN- γ 和GM-CSF

Th1/Th2细胞平衡状态：IL-2、IFN- γ 、IL-10和IL-4

二、特定疾病诊断的辅助指标

（一）细胞因子检测在特定疾病诊断中的意义

粘附分子和细胞因子表达的异常可与某些特定疾病密切关联

哮喘：PBMC分泌IL-5增强，IL-10降低

慢性肝炎：急性期和活动期TNF和IL-6升高，恢复期和稳定期两种CK降低

（二）粘附分子检测在特定疾病诊断中的意义

在炎症、肿瘤转移和器官移植排斥反应中发挥着重要的作用。

CD44过表达与肿瘤的发生和扩散相关，预示肿瘤转移的危险性

E-钙黏素异位表达胃腺癌，作为胃腺癌的早期辅助诊断

三、评估机体的免疫状态、判断治疗效果及预后

机体免疫应答的强弱可通过细胞因子或粘附分子的表达水平来反映，其过高或过低表达均系免疫调节异常的结果

细胞因子和粘附分子的水平，作为观察治疗效果和判断预后的重要指标

接受治疗的患者进行细胞因子水平的监测，对保证治疗效果具有指导意义

Thank you !