



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106596911 B

(45)授权公告日 2019.07.19

(21)申请号 201611167624.8

(22)申请日 2016.12.16

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 106596911 A

(43)申请公布日 2017.04.26

(73)专利权人 石河子大学

地址 832000 新疆维吾尔自治区石河子市
北四路石河子大学医学院

(72)发明人 马克涛 李新芝 司军强

(74)专利代理机构 北京方圆嘉禾知识产权代理
有限公司 11385

代理人 董芙蓉

(51)Int.Cl.

G01N 33/50(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

(56)对比文件

WO 2008/085564 A2,2008.07.17,全文.

CN 101326439 A,2008.12.17,全文.

CN 101534865 A,2009.09.16,全文.

潘立君等.Cx37和Cx40在自发性高血压大鼠不同动脉间的表达差异.《重庆医学》.2015,第44卷(第1期),第4-6页.

卓泓宇等.Cx43和Cx45在自发性高血压和正常血压大鼠主动脉的表达差异.《中国现代医学杂志》.2014,第24卷(第25期),第1-4页.

王爱等.自发性高血压大鼠外周血CD4+/CD8+ T淋巴细胞比率增加且连接子蛋白40(Cx40)和炎症因子水平升高.《细胞与分子免疫学杂志》.2016,第32卷(第2期),第145-148、152页.

审查员 赵晓明

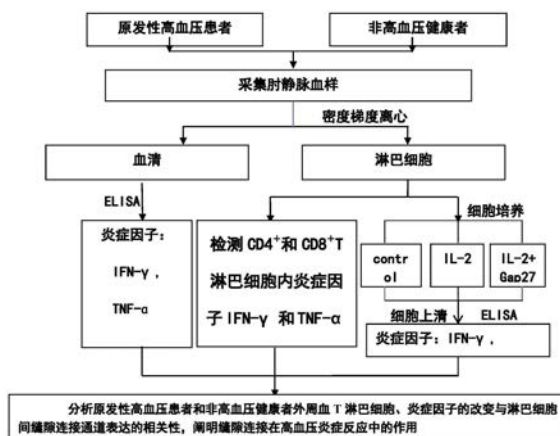
权利要求书2页 说明书7页 附图3页

(54)发明名称

一种证明缝隙连接在高血压炎症反应中的作用的试验方法

(57)摘要

本发明公开了一种证明缝隙连接在高血压炎症反应中的作用的试验方法,该方法包括以下步骤:细胞培养;流式细胞术:检测CD4⁺和CD8⁺T淋巴细胞内炎症因子IFN- γ 和TNF- α 表达;ELISA检测血清及细胞上清中炎症因子IFN- γ 和TNF- α 表达;CCK-8检测外周血淋巴细胞增殖反应;MTT检测外周血淋巴细胞增值活化反应。本发明分析原发性高血压患者和非高血压健康者外周血T淋巴细胞、炎症因子的改变与淋巴细胞间缝隙连接通道表达的相关性,阐明缝隙连接在高血压炎症反应中的作用,试验结果均具有统计学意义。



1. 一种证明缝隙连接在高血压炎症反应中的作用的试验方法,其特征在于,包括以下步骤:

步骤1、细胞培养

1.1 淋巴细胞分离

将抗凝管内的血液离心,离心2000rpm,5min,上层血清-20℃保存,上层血清用于后续ELISA检测;剩余血细胞与生理盐水1:1等体积稀释,吹打混匀;取一无菌15ml离心管,加入淋巴细胞分离液,将细胞悬液缓慢按照1:1比例加到淋巴细胞分离液上层,保证细胞悬液置于分离液上层;根据密度梯度离心法分离淋巴细胞,低速离心机水平离心1500rpm,30min,缓升缓降,离心管内由上到下分为4层:血浆层、单个核细胞层、淋巴细胞分离液层、红细胞层;将分离的白色浑浊淋巴细胞分离液层吸出至一无菌15ml离心管内,加入3倍生理盐水洗涤,离心1800rpm,6min,洗涤2次,弃上清,沉淀即淋巴细胞;加入1ml培养基重悬,吸取50μl到1.5ml离心管,加450μl PBS稀释10倍,显微镜下计数并用台盼蓝染色观察细胞活性,细胞活性为95%以上,调整细胞浓度为 1×10^6 个/ml,将细胞接种在24孔板中;

1.2 细胞培养实验步骤

将分离出的淋巴细胞计数,调整培养基至细胞浓度为 1×10^6 个/ml,将细胞分成不同实验组,给予不同干预措施,阴性空白对照组、Gap27组、ConA刺激活化组、IL-2刺激活化组,以及Gap27+ConA刺激活化组、Gap27+IL-2刺激活化组,加入10wt%自体血清,37℃,5%CO₂培养箱中培养,在不同时间点收集细胞用于后续流式细胞术检测、CCK-8检测、和MTT检测;

步骤2、流式细胞术:检测CD4⁺和CD8⁺T淋巴细胞内炎症因子IFN- γ 和TNF- α 表达分别收集阴性空白对照组细胞、Gap27组细胞、ConA刺激活化组细胞、IL-2刺激活化组细胞、Gap27+ConA刺激活化组细胞、Gap27+IL-2刺激活化组细胞于1.5ml EP管内,每组 5×10^5 个培养的淋巴细胞,离心1800rpm,6min,弃上清,100μl PBS重悬细胞,吹打混匀,加入表面抗原PE anti-human CD4,APC anti-human CD8a,常温避光孵育30min;加入500μl PBS,离心1800rpm,6min,弃上清;加入125μl固定剂,4℃,孵育20min;加入1ml 1×破膜剂洗涤,离心1800rpm,6min,弃上清,加入100μl 1×破膜剂,所述的100μl 1×破膜剂为2μl抗体+98μl破膜剂,37℃孵育20min;加入1μl FITC二抗,37℃孵育20min;加入1ml 1×破膜剂洗涤,离心1800rpm,6min,弃上清;加入250μl PBS稀释细胞悬液,吹打混匀,流式检测;

步骤3、ELISA检测血清及细胞上清中炎症因子IFN- γ 和TNF- α 表达

其中,细胞上清来源于阴性空白对照组、Gap27组、ConA刺激活化组、IL-2刺激活化组,以及Gap27+ConA刺激活化组、Gap27+IL-2刺激活化组;

3.1 ELISA检测炎症因子IFN- γ 和TNF- α 步骤

(1) 检测前将所有的试剂和样本平衡至室温,室温放置30min;取出微孔板,在每个孔内加入300μl Wash buffer静置浸泡30s;弃掉洗液后,在吸水纸上将微孔板拍干;注意:立即使用微孔板,不要让其干燥;

(2) 每孔加50μl 1×Assay buffer;

(3) 将50μl样本以及标准品加入对应的样本孔内,记录所有孔对应的样本;

(4) 每孔加入50μl检测抗体;封板膜封板,室温孵育2h;

(5) 弃掉洗液后,在每个孔内加入300μl洗液,按照不同试剂盒的说明书洗板次数不同,注意在吸水纸上将微孔板拍干;

(6) 在每个孔内加入100 μ l辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素,封板膜封板,室温孵育45min;

(7) 弃掉孔内的洗液,在每个孔内加入300 μ l洗液,按照不同试剂盒的说明书洗板次数不同,注意在吸水纸上将微孔板拍干;

(8) 在每个样本孔内加入100 μ l TMB,室温避光孵育5-30min;

(9) 在每个样本孔内加入100 μ l终止液,颜色由蓝色变为黄色,充分混匀;在30min内,酶标仪在450nm波长处测定OD值,减去630nm的测定值;

(10) 根据软件操作说明,拟合标准曲线,求取实验样本的浓度,数据分析;

步骤4、CCK-8检测外周血淋巴细胞增殖反应

收集培养的淋巴细胞于15ml离心管中,细胞来源于阴性空白对照组、Gap27组、ConA刺激活化组、IL-2刺激活化组,以及Gap27+ConA刺激活化组、Gap27+IL-2刺激活化组,离心1800rpm,6min,收集上清于1.5ml离心管中,置-20 $^{\circ}$ C保存待测;每组细胞去掉剩余上清后,使用1ml培养基重悬,取细胞悬液100 μ l,加入96孔一次性无菌细胞培养板中,加入CCK-8溶液10 μ l,样本均设3个复孔,另设置空白调零孔置37 $^{\circ}$ C,5%CO₂细胞培养箱中孵育3h,450nm处酶标仪测定吸光度值;

步骤5、MTT检测外周血淋巴细胞增殖活化反应

收集培养的淋巴细胞于15ml离心管中,离心1800rpm,6min,细胞来源于阴性空白对照组、Gap27组、ConA刺激活化组、IL-2刺激活化组,以及Gap27+ConA刺激活化组、Gap27+IL-2刺激活化组,收集上清于1.5ml离心管中,计数,调整培养基至细胞浓度为 1×10^6 个/ml,37 $^{\circ}$ C,5%CO₂培养48h,MTT检测淋巴细胞增殖反应;

MTT步骤:

收集细胞,离心1800rpmn,6min,弃上清,制成细胞悬液,细胞计数调整其浓度为 5×10^5 个/ml;将细胞悬液制备好后,轻轻混匀,每孔加入100 μ l,因细胞混匀后会继续沉降,因此接种的过程中要反复多次混匀,确保接种的细胞密度在各孔之间完全相同,设3个复孔,每孔加入10 μ l 5mg/ml MTT,37 $^{\circ}$ C,5%CO₂培养箱内孵育4h;终止培养,溶解结晶;收集每孔细胞于离心管内,离心1800rpm,6min,弃上清,加入150 μ l DMSO溶解结晶,待结晶完全溶解后,酶标仪450nm波长检测OD值。

2. 根据权利要求1所述的证明缝隙连接在高血压炎症反应中的作用的试验方法,其特征在于,步骤1.2中所述10wt%自体血清的处理步骤为:56 $^{\circ}$ C,灭活30min,离心4000rpm,30min,4 $^{\circ}$ C保存备用。

3. 根据权利要求1所述的证明缝隙连接在高血压炎症反应中的作用的试验方法,其特征在于,步骤4中所述空白调零孔只含完全培养基。

一种证明缝隙连接在高血压炎症反应中的作用的试验方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体地说,涉及一种证明缝隙连接在高血压炎症反应中的作用的试验方法。

背景技术

[0002] 缝隙连接,又称通讯连接(communication junction),是除血细胞和骨骼肌细胞间外广泛存在于其他组织细胞间的一种细胞连接形式,呈斑状的分散局部连接。电镜下,连接处相邻细胞膜高度平行,细胞间隙很窄,仅有2~3nm,内有许多间隔大致相等的观察点。冷冻蚀刻术电镜观察,在相邻细胞膜上有许多规律排布的柱状颗粒,称连接小体(connexon)。每个连接小体由6个杆状的连接蛋白(connexin)构成,中央围成直径约2nm的亲水小管,称中央小管(central canaliculum),相邻的细胞膜两侧的连接小体彼此对接,两侧中央小管互相通连而形成细胞间直接交通的孔道。

[0003] 高血压是以血压升高为主要表现的临床综合征。近年来越来越多的研究显示,高血压可能是一种慢性低度炎症状态,炎症在高血压的发生、发展及靶器官损害过程中可能起着关键作用。

[0004] 目前,现有技术中,还没有阐明缝隙连接在高血压炎症反应中的作用中的相关报道。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于克服上述技术存在的缺陷,提供一种证明缝隙连接在高血压炎症反应中的作用的试验方法,该方法分析原发性高血压患者和非高血压健康者外周血T淋巴细胞、炎症因子的改变与淋巴细胞间缝隙连接通道表达的相关性,阐明缝隙连接在高血压炎症反应中的作用。

[0006] 其具体技术方案为:

[0007] 一种证明缝隙连接在高血压炎症反应中的作用的试验方法,包括以下步骤:

[0008] 步骤1、细胞培养

[0009] 1.1淋巴细胞分离

[0010] 将抗凝管内的血液离心,离心2000rpm,5min,上层血清-20℃保存,ELISA检测备用。剩余血细胞与生理盐水1:1等体积稀释,吹打混匀。取一无菌15ml离心管,加入淋巴细胞分离液,将细胞悬液缓慢按照1:1比例加到淋巴细胞分离液上层,保证血液置于分离液上层。根据密度梯度离心法分离淋巴细胞,低速离心机水平离心1500rpm,30min,缓升缓降,离心管内由上到下分为4层:血浆层、单个核细胞层、淋巴细胞分离液层、红细胞层。将分离的白色浑浊淋巴细胞层吸出至一无菌15ml离心管内,加入3倍生理盐水洗涤,离心1800rpm,6min,洗涤2次,弃上清,沉淀即淋巴细胞。加入1ml培养基重悬,吸取50μl到1.5ml离心管,加450μl PBS稀释10倍,显微镜下计数并用台盼蓝染色观察细胞活性,细胞活性为95%以上,调整细胞浓度为 1×10^6 个/ml,将细胞接种在24孔板中。

[0011] 1.2细胞培养实验步骤

[0012] 将分离出的淋巴细胞计数,调整培养基至细胞浓度为 1×10^6 个/ml,将细胞分成不同实验组,给予不同干预措施,阴性空白对照组、Gap27组、刺激活化组ConA、IL-2、Gap27 + 刺激活化组,加入10%自体血清,37℃,5%CO₂培养箱中培养,在不同时间点收集细胞检测。

[0013] 步骤2、流式细胞术:检测CD4⁺和CD8⁺T淋巴细胞内炎症因子IFN- γ 和TNF- α 表达

[0014] 收集 5×10^5 个细胞于1.5ml EP管内,离心1800rpm,6min,弃上清,100 μ l PBS重悬细胞,吹打混匀,加入表面抗原PE anti-human CD4,APC anti-human CD8a,常温避光孵育30min;加入500 μ l PBS,离心1800rpm,6min,弃上清;加入125 μ l固定剂,4℃,孵育20min;加入1ml 1 \times 破膜剂洗涤,离心1800rpm,6min,弃上清,加入100 μ l 1 \times 破膜剂,37℃孵育20min;加入1 μ l FITC二抗,37℃孵育20min;加入1ml 1 \times 破膜剂洗涤,离心1800rpm,6min,弃上清;加入250 μ l PBS稀释细胞悬液,吹打混匀,流式检测。

[0015] 步骤3、ELISA检测血清及细胞上清中炎症因子IFN- γ 和TNF- α 表达

[0016] 3.1ELISA检测炎症因子IFN- γ 和TNF- α 步骤

[0017] (1)检测前将所有的试剂和样本平衡至室温,室温放置30min。取出微孔板,在每个孔内加入300 μ l Wash buffer (1 \times)静置浸泡30s。弃掉洗液后,在吸水纸上将微孔板拍干。注意:立即使用微孔板,不要让其干燥。

[0018] (2)每孔加50 μ l 1 \times Assay buffer。

[0019] (3)将50 μ l样本以及标准品加入对应的样本孔内,记录所有孔对应的样本。

[0020] (4)每孔加入50 μ l检测抗体。封板膜封板,室温孵育2h。

[0021] (5)弃掉洗液后,在每个孔内加入300 μ l洗液,按照不同试剂盒的说明书洗板次数不同,注意在吸水纸上将微孔板拍干。

[0022] (6)在每个孔内加入100 μ l辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素,封板膜封板,室温孵育45 min。

[0023] (7)弃掉孔内的洗液,在每个孔内加入300 μ l洗液,按照不同试剂盒的说明书洗板次数不同,注意在吸水纸上将微孔板拍干。

[0024] (8)在每个样本孔内加入100 μ l TMB,室温避光孵育5-30min。

[0025] (9)在每个样本孔内加入100 μ l终止液,颜色由蓝色变为黄色,充分混匀。在30min内,酶标仪在450nm波长处测定OD值,减去630nm的测定值。

[0026] (10)根据软件操作说明,拟合标准曲线,求取实验样本的浓度,数据分析。

[0027] 步骤4、CCK-8检测外周血淋巴细胞增殖反应

[0028] 收集培养的淋巴细胞于15ml离心管中,离心1800rpm,6min,收集上清于1.5ml离心管中,置-20℃保存待测。每组细胞去掉剩余上清后,使用1ml培养基重悬,取细胞悬液100 μ l,加入96孔一次性无菌细胞培养板中,加入CCK-8溶液10 μ l,样本均设3个复孔,另设置空白调零孔置37℃,5%CO₂细胞培养箱中孵育3h,450nm处酶标仪测定吸光度值。

[0029] 步骤5、MTT检测外周血淋巴细胞增值活化反应

[0030] 收集培养的淋巴细胞于15ml离心管中,离心1800rpm,6min,收集上清于1.5ml离心管中,计数,调整培养基至细胞浓度为 1×10^6 个/ml,37℃,5%CO₂培养48h,MTT检测淋巴细胞增值反应。

[0031] MTT步骤:

[0032] 收集细胞,离心1800rpm,6min,弃上清,制成细胞悬液,细胞计数调整其浓度为 5×10^5 个/ml。将细胞血液制备好后,轻轻混匀,每孔加入100 μ l,因细胞混匀后会继续沉降,因此接种的过程中要反复多次混匀,确保接种的细胞密度在各孔之间完全相同,设3个复孔,每孔加入10 μ l 5mg/ml MTT,37 $^{\circ}$ C,5%CO₂培养箱内孵育4h;终止培养,溶解结晶。收集每孔细胞于离心管内,离心1800rpm,6min,弃上清,加入150 μ l DMSO溶解结晶,待结晶完全溶解后,酶标仪450nm波长检测OD值。

[0033] 进一步,步骤1.2中所述10%自体血清的处理步骤为:56 $^{\circ}$ C,灭活30min,离心4000rpm,30min,4 $^{\circ}$ C保存备用。

[0034] 进一步,步骤1.2中所述的100 μ l1 \times 破膜剂为2 μ l抗体+98 μ l破膜剂。

[0035] 进一步,步骤4中所述空白调零孔只含完全培养基。

[0036] 与现有技术相比,本发明的有益效果:

[0037] 本发明分析原发性高血压患者和非高血压健康者外周血T淋巴细胞、炎症因子的改变与淋巴细胞间缝隙连接通道表达的相关性,阐明缝隙连接在高血压炎症反应中的作用,试验结果均具有统计学意义。

附图说明

[0038] 图1是本发明证明缝隙连接在高血压炎症反应中的作用的试验方法的流程图;

[0039] 图2是原发性高血压患者和非高血压健康者炎症因子表达,其中,图2A:流式检测原发性高血压患者和非高血压健康者淋巴细胞内炎症因子表达;图2B:ELISA检测原发性高血压患者和非高血压健康者血清中炎症因子的表达;

[0040] 图3是Gap27对原发性高血压患者外周血淋巴细胞增殖影响($\times 100$, $\times 200$, $\times 400$);

[0041] 其中,Gap27:缝隙连接阻断剂;箭头所示:随着淋巴细胞培养时间的延长,细胞聚团现象明显,Gap27+ConA组细胞较易吹散成单个细胞;

[0042] 图4是Gap27对原发性高血压患者和非高血压健康者外周血淋巴细胞增殖活化的影响,

[0043] 其中,*与control组相比,** $P < 0.01$;#与IL-2处理组相比,### $P < 0.01$, $n = 5$;

[0044] 图5是Gap27对原发性高血压患者和非高血压健康者外周血T淋巴细胞内IFN- γ 和TNF- α 表达的影响,其中,图5A:流式检测IFN- γ 在淋巴细胞中的表达;图5B:统计分析不同处理组IFN- γ 在CD4⁺T淋巴细胞中的表达;图5C:统计分析不同处理组IFN- γ 在CD8⁺T淋巴细胞中的表达;图5D:流式检测TNF- α 在淋巴细胞中的表达;图5E:统计分析不同处理组TNF- α 在CD4⁺T淋巴细胞中的表达;图5F:统计分析不同处理组TNF- α 在CD8⁺T淋巴细胞中的表达; *与control组相比,** $P < 0.01$;#与IL-2处理组相比,### $P < 0.01$, $n = 30$.NT代表非高血压健康者,EH代表原发性高血压患者。

具体实施方式

[0045] 下面结合附图和具体实施方案对本发明的技术方案作进一步详细地说明。

[0046] 一、试验方法

[0047] 1.1 血压测定

- [0048] 1.2细胞培养
- [0049] 1.2.1细胞培养所需试剂配置
- [0050] (1) 含2%双抗的PBS (30ml) :30ml无菌PBS中加入600 μ l双抗。
- [0051] (2) RPMI1640培养基:RPMI1640培养基粉末溶在1L经0.22 μ m孔径滤膜过滤后的超纯水中,加3.7g NaHCO₃调节PH值。
- [0052] (3) 含10%胎牛血清完全培养基:90ml的培养基中加入10ml的胎牛血清,加入8000活力单位的硫酸庆大霉素注射液。
- [0053] (4) 冻存液:6ml无血清培养基中加入3ml胎牛血清和1ml DMSO (培养基:血清:DMSO=6:3:1)。
- [0054] (5) KBM581细胞培养基:1L培养基中加入1%双抗。
- [0055] (6) ConA:3mg ConA粉末溶于10ml PBS中,经0.22 μ m孔径滤膜过滤后分装至EP 管中备用。
- [0056] (7) IL-2:IL-2配成的终浓度为1 μ l/ml。
- [0057] (8) MTT配制:MTT配成的终浓度为5mg/ml,用PBS作为溶剂。将配好的MTT用铝箔纸包好备用。
- [0058] 1.2.2外周血淋巴细胞分离与培养
- [0059] 1.2.2.1临床实验血样采集
- [0060] 临床血样采集选择原发性高血压患者和非高血压健康者的血样,原发性高血压的纳入标准为:根据WHO对高血压的诊断标准,选择确诊的原发性高血压患者共30例,男15例,女 15例,平均年龄(53 \pm 13)岁。对照组选择非高血压健康者30例,男20例,女10例,平均年龄(48 \pm 11)岁。原发性高血压患者和非高血压健康者两组间年龄和性别差异无统计学意义。排除标准为:有明确的继发性高血压、糖尿病、肝肾功能障碍、感染性疾病、自身免疫系统疾病和心脑血管疾病患者。
- [0061] 1.2.2.2淋巴细胞分离
- [0062] 将抗凝管内的血液离心,离心2000rpm,5min,上层血清-20 $^{\circ}$ C保存,ELISA检测备用。剩余血细胞与生理盐水1:1等体积稀释,吹打混匀。取一无菌15ml离心管,加入淋巴细胞分离液,将细胞悬液缓慢按照1:1比例加到淋巴细胞分离液上层,保证血液置于分离液上层。根据密度梯度离心法分离淋巴细胞,低速离心机水平离心1500rpm,30min(缓升缓降),离心管内由上到下分为4层:血浆层、单个核细胞层、淋巴细胞分离液层、红细胞层。将分离的白色浑浊淋巴细胞层吸出至一无菌15ml离心管内,加入3倍生理盐水洗涤,离心1800rpm,6min,洗涤2次,弃上清,沉淀即淋巴细胞。加入1ml培养基重悬,吸取50 μ l 到1.5ml离心管,稀释10倍(加450 μ l PBS)显微镜下计数并用台盼蓝染色观察细胞活性,细胞活性为95%以上,调整细胞浓度为 1×10^6 个/ml,将细胞接种在24孔板中。
- [0063] 1.2.2.3细胞培养实验步骤
- [0064] 将分离出的淋巴细胞计数,调整培养基至细胞浓度为 1×10^6 个/ml,将细胞分成不同实验组,给予不同干预措施,阴性空白对照组、Gap27组、刺激活化组(ConA、IL-2)、Gap27+刺激活化组,加入10%自体血清(血清处理步骤:56 $^{\circ}$ C,灭活30min,离心4000rpm, 30min,4 $^{\circ}$ C保存备用),37 $^{\circ}$ C,5%CO₂培养箱中培养,在不同时间点收集细胞检测。
- [0065] 表1细胞培养实验分组

[0066] Tab.1 Cell culture experiments grouping

[0067]

分组	0h	24h	48h
空白对照组	---	---	---

[0068]

ConA/IL-2 组	---	---	ConA/IL-2
Gap27+ConA/IL-2 组	Gap27	---	ConA/IL-2

[0069] 1.3流式细胞术

[0070] 1.3.1检测CD4⁺和CD8⁺T淋巴细胞内炎症因子IFN- γ 和TNF- α 表达

[0071] 收集 5×10^5 个细胞于1.5ml EP管内,离心1800rpm,6min,弃上清,100 μ l PBS重悬细胞,吹打混匀,加入表面抗原PE anti-human CD4,APC anti-human CD8a,常温避光孵育30min;加入500 μ l PBS,离心1800rpm,6min,弃上清;加入125 μ l固定剂,4 $^{\circ}$ C,孵育20min;加入1ml 1 \times 破膜剂洗涤,离心1800rpm,6min,弃上清,加入100 μ l 1 \times 破膜剂(2 μ l抗体+98 μ l破膜剂),37 $^{\circ}$ C孵育20min;加入1 μ l FITC二抗,37 $^{\circ}$ C孵育20min;加入1ml 1 \times 破膜剂洗涤,离心1800rpm,6min,弃上清;加入250 μ l PBS稀释细胞悬液,吹打混匀,流式检测。

[0072] 1.4ELISA检测血清及细胞上清中炎症因子IFN- γ 和TNF- α 表达

[0073] 1.4.1ELISA检测炎症因子IFN- γ 和TNF- α 步骤

[0074] (1)检测前将所有的试剂和样本平衡至室温,室温放置30min。取出微孔板,在每个孔内加入300 μ l Wash buffer(1 \times)静置浸泡30s。弃掉洗液后,在吸水纸上将微孔板拍干。注意:立即使用微孔板,不要让其干燥。

[0075] (2)每孔加50 μ l 1 \times Assay buffer。

[0076] (3)将50 μ l样本以及标准品加入对应的样本孔内,记录所有孔对应的样本。

[0077] (4)每孔加入50 μ l检测抗体。封板膜封板,室温孵育2h。

[0078] (5)弃掉洗液后,在每个孔内加入300 μ l洗液,按照不同试剂盒的说明书洗板次数不同,注意在吸水纸上将微孔板拍干。

[0079] (6)在每个孔内加入100 μ l辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素,封板膜封板,室温孵育45 min。

[0080] (7)弃掉孔内的洗液,在每个孔内加入300 μ l洗液,按照不同试剂盒的说明书洗板次数不同,注意在吸水纸上将微孔板拍干。

[0081] (8)在每个样本孔内加入100 μ l TMB,室温避光孵育5-30min。

[0082] (9)在每个样本孔内加入100 μ l终止液,颜色由蓝色变为黄色,充分混匀。在30min内,酶标仪在450nm波长处测定OD值,减去630nm的测定值。

[0083] (10)根据软件操作说明,拟合标准曲线,求取实验样本的浓度,数据分析。

[0084] 1.5CCK-8检测外周血淋巴细胞增殖反应

[0085] 收集培养的淋巴细胞于15ml离心管中,离心1800rpm,6min,收集上清于1.5ml离心管中,置-20 $^{\circ}$ C保存待测。每组细胞去掉剩余上清后,使用1ml培养基重悬,取细胞悬液 100 μ l,加入96孔一次性无菌细胞培养板中,加入CCK-8溶液10 μ l,样本均设3个复孔,另设置空白

调零孔(只含完全培养基)置37℃,5%CO₂细胞培养箱中孵育3h,450nm处酶标仪测定吸光度值。

[0086] 1.6MTT检测外周血淋巴细胞增殖活化反应

[0087] 收集培养的淋巴细胞于15ml离心管中,离心1800rpm,6min,收集上清于1.5ml离心管中,计数,调整培养基至细胞浓度为 1×10^6 个/ml,37℃,5%CO₂培养48h,MTT检测淋巴细胞增殖反应。

[0088] MTT步骤:

[0089] 收集细胞,离心1800rpmn,6min,弃上清,制成细胞悬液,细胞计数调整其浓度为 5×10^5 个/ml。将细胞血液制备好后,轻轻混匀,每孔加入100μl,因细胞混匀后会继续沉降,因此接种的过程中要反复多次混匀,确保接种的细胞密度在各孔之间完全相同,设3个复孔,每孔加入10μl(5mg/ml)MTT,37℃,5%CO₂培养箱内孵育4h;终止培养,溶解结晶。收集每孔细胞于离心管内,离心1800rpm,6min,弃上清,加入150μl DMSO溶解结晶,待结晶完全溶解后,酶标仪450nm波长检测OD值。

[0090] 二、试验结果

[0091] 1.原发性高血压患者和非高血压健康者血清炎症因子比较

[0092] 流式检测胞内炎症因子表达,结果显示:原发性高血压患者外周血CD4⁺T淋巴细胞内IFN-γ表达($3.85 \pm 0.45\%$)显著高于非高血压健康者($2.34 \pm 0.25\%$),差异具有统计学意义($P < 0.05, n = 30$);CD8⁺T淋巴细胞内IFN-γ表达($6.93 \pm 1.61\%$)也显著高于非高血压健康者($3.83 \pm 0.45\%$),差异具有统计学意义($P < 0.05, n = 30$)。原发性高血压患者外周血CD4⁺T淋巴细胞内TNF-α表达($4.25 \pm 0.32\%$)显著高于非高血压健康者($2.77 \pm 0.30\%$)($P < 0.05, n = 30$);CD8⁺T淋巴细胞内TNF-α表达($10.94 \pm 1.07\%$)也显著高于非高血压健康者($4.97 \pm 0.64\%$),差异均具有统计学意义($P < 0.05, n = 30$) (见图2A)。

[0093] ELISA检测血清炎症因子表达,结果显示:原发性高血压患者血清IFN-γ浓度($1013.00 \pm 343.20\text{pg/ml}$)显著高于非高血压健康者($212.00 \pm 41.21\text{pg/ml}$)($P < 0.05, n = 30$),TNF-α浓度($1142.00 \pm 374.90\text{pg/ml}$)也显著高于非高血压健康者($209.20 \pm 74.61\text{pg/ml}$),差异具有统计学意义($P < 0.05, n = 30$) (见图2B)。

[0094] 2.缝隙连接阻断剂Gap27对淋巴细胞间炎症因子IFN-γ和TNF-α的影响

[0095] 2.1外周血淋巴细胞增殖的形态学观察

[0096] 与IL-2处理组相比,Gap27+IL-2组处理组淋巴细胞数量减少,细胞聚团现象少,且较易吹散成单个细胞,而空白对照组与Gap27+IL-2处理组相比,细胞数量和聚团现象明显减少,见图3。

[0097] 2.2Gap27对原发性高血压患者和非高血压健康者外周血淋巴细胞增殖活化影响

[0098] CCK-8检测结果示:在非高血压健康者外周血淋巴细胞中,与IL-2处理组(0.31 ± 0.01)相比,control组(0.19 ± 0.01)淋巴细胞增殖活化OD值显著降低,差异具有统计学意义($P < 0.01, n = 5$),而且Gap27+IL-2组淋巴细胞增殖活化OD值也显著低于IL-2处理组(0.21 ± 0.01),差异具有统计学意义($P < 0.01, n = 5$) (见图4)。

[0099] 在原发性高血压患者外周血淋巴细胞中,与IL-2处理组(0.25 ± 0.04)相比,control组(0.09 ± 0.01)淋巴细胞增殖活化OD值显著降低,差异具有统计学意义($P < 0.01, n = 5$),并且Gap27+IL-2组淋巴细胞增殖活化OD值也显著低于IL-2处理组(0.13 ± 0.01),差

异具有统计学意义 ($P < 0.05, n = 5$) (见图4)。

[0100] 3. Gap27对原发性高血压患者和非高血压健康者炎症因子表达的影响

[0101] 流式检测结果显示:在非高血压健康者外周血淋巴细胞中,IL-2处理组CD4⁺T淋巴细胞内 IFN- γ 和TNF- α 表达 ($11.76 \pm 1.14\%$) ($13.55 \pm 0.69\%$) 均显著高于control组 ($2.70 \pm 0.33\%$) ($2.99 \pm 0.36\%$) ($P < 0.01, n = 30$) 和Gap27+IL-2处理组 ($4.47 \pm 0.47\%$) ($2.89 \pm 0.44\%$) ($P < 0.01, n = 30$), 差异均具有统计学意义。IL-2处理组CD8⁺T淋巴细胞内IFN- γ 表达 ($18.38 \pm 1.04\%$) 也显著高于control组 ($4.97 \pm 0.64\%$) ($P < 0.01, n = 30$) 和Gap27+IL-2处理组 ($5.85 \pm 0.64\%$), 差异均具有统计学意义 ($P < 0.01, n = 30$)。IL-2处理组CD8⁺T淋巴细胞内IFN- γ 和TNF- α 表达 ($18.50 \pm 1.19\%$) ($18.38 \pm 1.04\%$) 均显著高于control组 ($4.17 \pm 0.54\%$) ($4.97 \pm 0.64\%$) ($P < 0.01, n = 30$) 和Gap27+IL-2处理组 ($6.27 \pm 0.56\%$) ($5.85 \pm 0.63\%$) ($P < 0.01, n = 30$), 差异均具有统计学意义 (见图5)。

[0102] 在原发性高血压患者外周血淋巴细胞中,IL-2处理组CD4⁺T淋巴细胞内IFN- γ 和TNF- α 表达 ($13.85 \pm 2.62\%$) ($13.84 \pm 1.68\%$) 均显著高于control组 ($3.84 \pm 0.36\%$) ($2.74 \pm 0.48\%$) ($P < 0.01, n = 30$) 和Gap27+IL-2处理组 ($3.36 \pm 0.68\%$) ($3.72 \pm 0.59\%$) ($P < 0.01, n = 30$), 差异具有统计学意义。IL-2处理组CD8⁺T淋巴细胞内IFN- γ 和TNF- α 表达 ($24.21 \pm 3.33\%$) ($23.84 \pm 2.99\%$) 均显著高于control组 ($6.93 \pm 1.61\%$) ($9.75 \pm 2.91\%$) ($P < 0.01, n = 30$) 和Gap27+IL-2处理组 ($7.84 \pm 1.83\%$) ($6.73 \pm 0.92\%$) ($P < 0.01, n = 30$), 差异均具有统计学意义 (见图5)。

[0103] ELISA检测细胞上清液中炎症因子IFN- γ 和TNF- α 表达,结果发现:在非高血压健康者外周血淋巴细胞中,IL-2处理组IFN- γ 和TNF- α 浓度 ($133.10 \pm 13.52\text{pg/ml}$) ($83.47 \pm 1.13\text{pg/ml}$) 均显著高于control组 ($18.91 \pm 1.20\text{pg/ml}$) ($19.64 \pm 1.00\text{pg/ml}$) ($P < 0.01, n = 30$) 和Gap27 +IL-2处理组 ($78.05 \pm 2.88\text{pg/ml}$) ($39.13 \pm 0.47\text{pg/ml}$) ($P < 0.01, n = 30$), 差异均具有统计学意义。在原发性高血压患者外周血淋巴细胞中,IL-2处理组IFN- γ 和TNF- α 浓度 ($179.80 \pm 12.76\text{pg/ml}$) ($71.16 \pm 10.13\text{pg/ml}$) 均显著高于control组 ($130.20 \pm 7.28\text{pg/ml}$) ($64.36 \pm 1.67\text{pg/ml}$) ($P < 0.05, n = 30$) 和Gap27+IL-2处理组 ($139.70 \pm 7.41\text{pg/ml}$) ($33.11 \pm 7.94\text{pg/ml}$) ($P < 0.05, n = 30$), 差异均具有统计学意义。

[0104] 以上所述,仅为本发明较佳的具体实施方式,本发明的保护范围不限于此,任何熟悉本技术领域的技术人员在本发明披露的技术范围内,可显而易见地得到的技术方案的简单变化或等效替换均落入本发明的保护范围内。

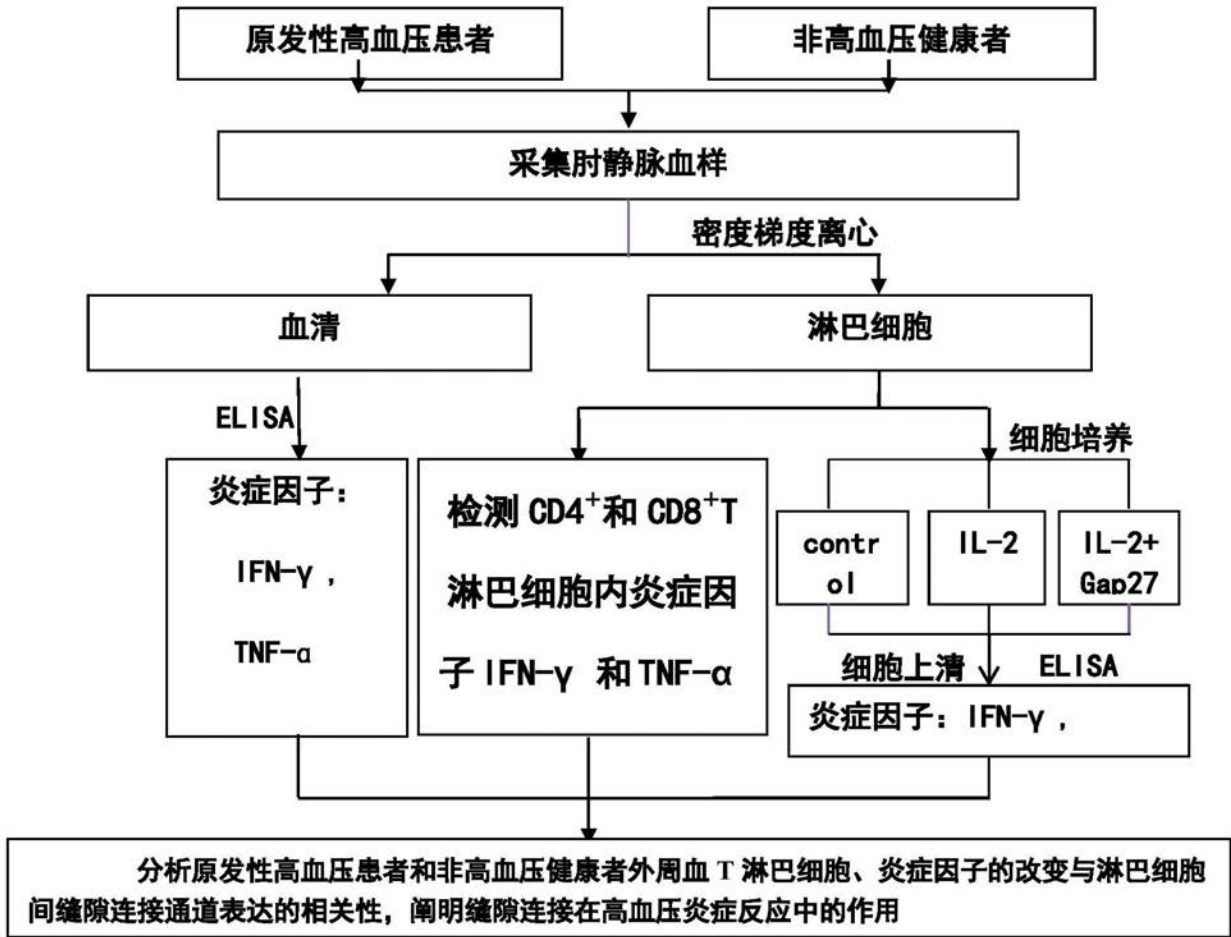


图1

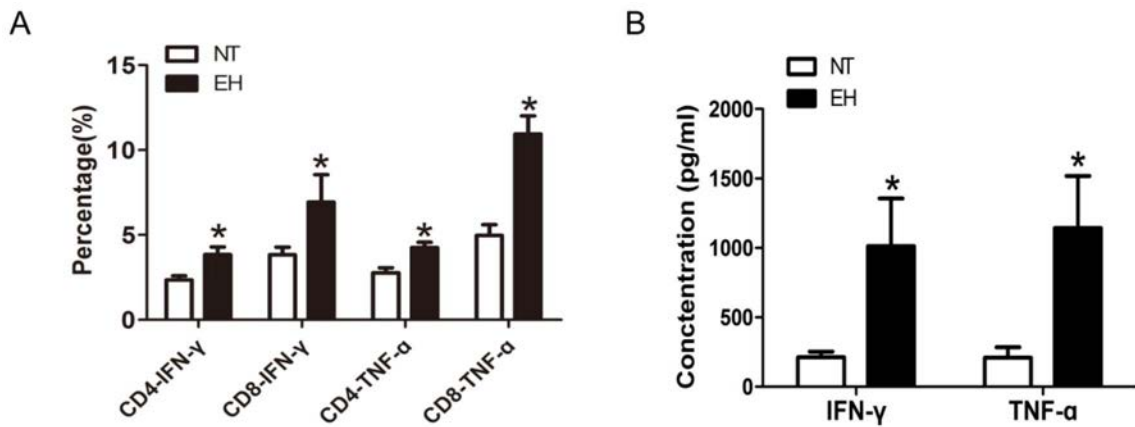


图2

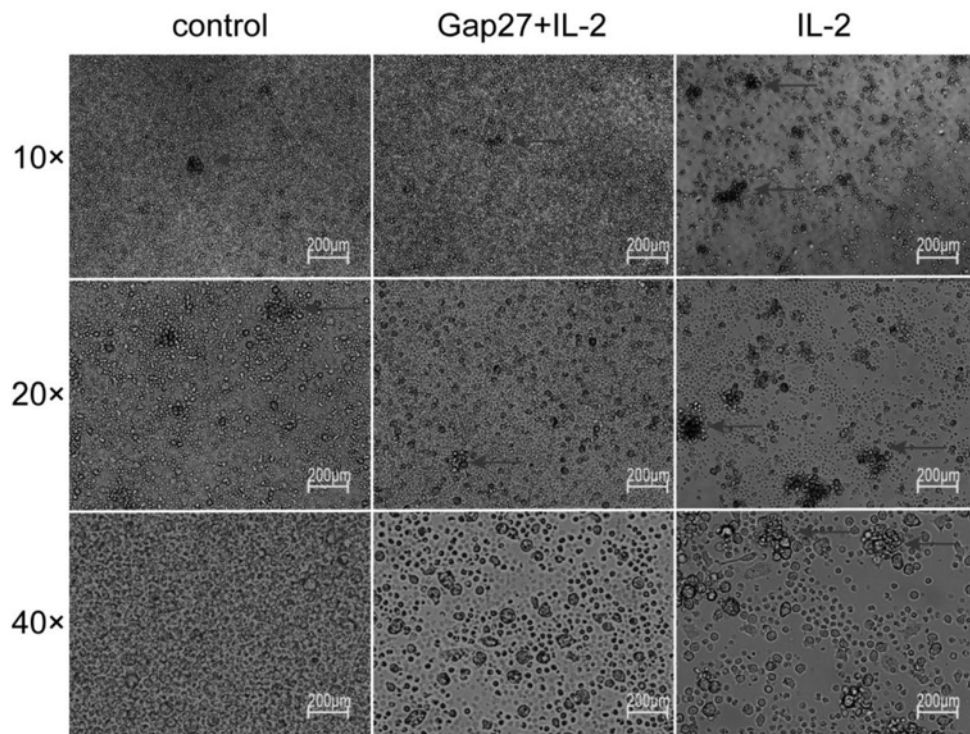


图3

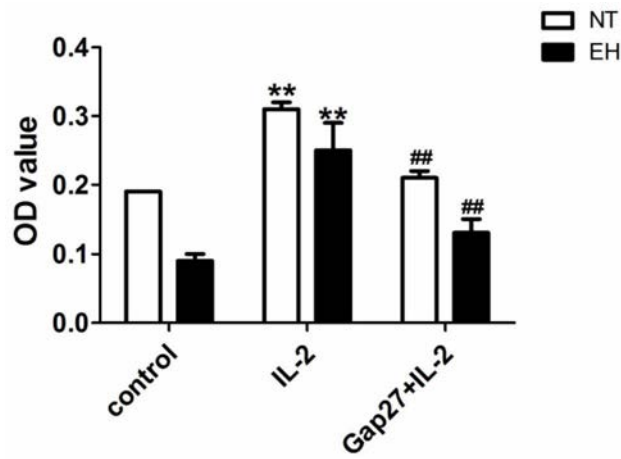


图4

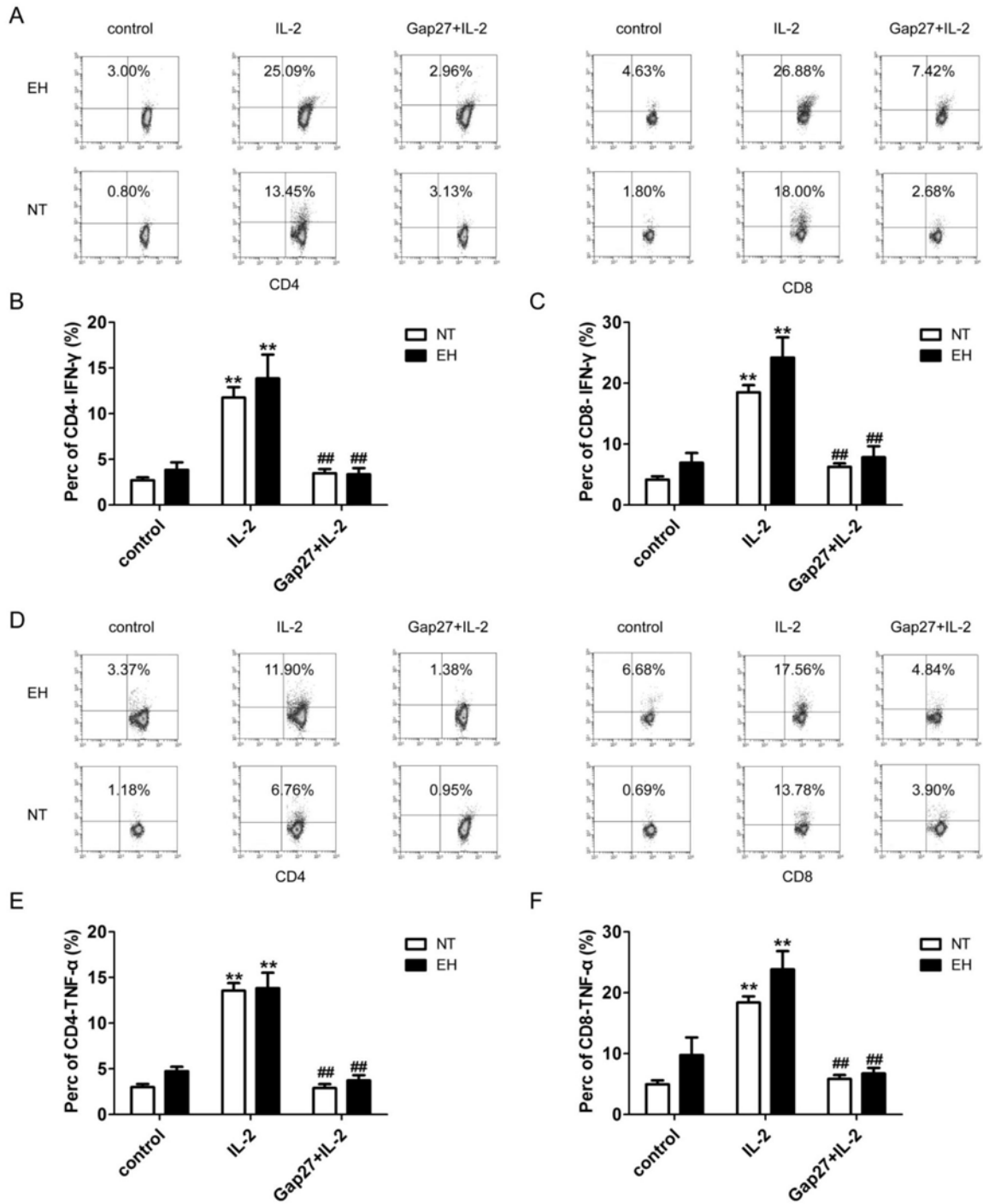


图5

专利名称(译)	一种证明缝隙连接在高血压炎症反应中的作用的试验方法		
公开(公告)号	CN106596911B	公开(公告)日	2019-07-19
申请号	CN201611167624.8	申请日	2016-12-16
[标]申请(专利权)人(译)	石河子大学		
申请(专利权)人(译)	石河子大学		
当前申请(专利权)人(译)	石河子大学		
[标]发明人	马克涛 李新芝 司军强		
发明人	马克涛 李新芝 司军强		
IPC分类号	G01N33/50 G01N33/535 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/5008 G01N33/5044 G01N33/535 G01N33/6863 G01N33/6866 G01N2800/321 G01N2800/7095		
代理人(译)	董芙蓉		
审查员(译)	赵晓明		
其他公开文献	CN106596911A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种证明缝隙连接在高血压炎症反应中的作用的试验方法，该方法包括以下步骤：细胞培养；流式细胞术：检测CD4+和CD8+T淋巴细胞内炎症因子IFN-γ和TNF-α表达；ELISA检测血清及细胞上清中炎症因子IFN-γ和TNF-α表达；CCK-8检测外周血淋巴细胞增殖反应；MTT检测外周血淋巴细胞增值活化反应。本发明分析原发性高血压患者和非高血压健康者外周血T淋巴细胞、炎症因子的改变与淋巴细胞间缝隙连接通道表达的相关性，阐明缝隙连接在高血压炎症反应中的作用，试验结果均具有统计学意义。

