

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910075223.3

[51] Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 1/28 (2006.01)

C12Q 1/18 (2006.01)

C12N 5/08 (2006.01)

[43] 公开日 2010年1月20日

[11] 公开号 CN 101629951A

[22] 申请日 2009.8.20

[21] 申请号 200910075223.3

[71] 申请人 吴广印

地址 056000 河北省邯郸市高新技术开发区
科技路1号

[72] 发明人 吴广印

[74] 专利代理机构 邯郸市久天专利事务所

代理人 薛建铎

权利要求书1页 说明书3页

[54] 发明名称

一种人胎盘组织液抗炎作用检测方法

[57] 摘要

本发明公开一种人胎盘组织液抗炎作用检测方法，其工艺步骤为：①人胎盘组织试验液的配制，②hPBMC 制备，③组织培养液与 hPBMC 共培养，④ELISA 检测 TNF - α 及 IFN - γ ，⑤MTT 检测 hPBMC 增殖，⑥结果分析。它是一种开创性的人胎盘组织液抗炎作用检测方法，它对人胎盘组织液抗炎药的研发与生产奠定了科学基础。

1、一种人胎盘组织液抗炎作用检测方法，其特征在于：其工艺步骤为：①人胎盘组织试验液的配制，②hPBMC制备，③组织培养液与hPBMC共培养，④ELISA检测TNF- α 及IFN- γ ，⑤MTT检测hPBMC增殖，⑥结果分析。

2、根据权利要求1所述的一种人胎盘组织液抗炎作用检测方法，其特征在于：所述的人胎盘组织试验液的配制步骤为人胎盘组织原液及用RPMI1640完全培养液2倍、4倍、6倍的进行稀释，即得人胎盘组织试验液。

3、根据权利要求1所述的一种人胎盘组织液抗炎作用检测方法，其特征在于：所述的hPBMC制备步骤，即在无菌条件下，预置10mlFicoll分离液于50ml离心管中。取正常成人供者血液20ml，以1:2的比例用平衡至室温的PBS将外周血稀释，将60ml稀释的外周血沿45度倾斜的管壁缓慢加至盛有30mlFicoll分离液的离心管中，在关闭Heraeus离心机机械制动功能前提下，2000rpm离心20min，小心收集界面单个核细胞层至50ml离心管中，加入PBS至20ml，1500rpm离心10min，洗涤2次，并作细胞计数，以完全培养基（RPMI1640+10%FBS+1%双抗）重悬细胞至 2×10^6 /ml。

4、根据权利要求1所述的一种人胎盘组织液抗炎作用检测方法，其特征在于：所述的组织培养液与hPBMC共培养步骤，即 $50 \mu\text{l}$ hPBMC(2×10^6 /ml)和 $50 \mu\text{l}$ PHA混合接种于96孔平底板，然后向其中加入 $100 \mu\text{l}$ 不同浓度的人胎盘组织试验液，每组设5个复孔；同时将空白对照组、阴性对照组和阳性对照组接种于96孔平底板，每组设5个复孔，将96孔培养板置于 37°C ，5% CO_2 ，饱和湿度的细胞培养箱中孵育72h。所述的空白对照组为 $50 \mu\text{l}$ PHA与 $150 \mu\text{l}$ RPMI1640完全培养液的混合物，所述的阴性对照组为 $50 \mu\text{l}$ hPBMC(2×10^6 /ml)与 $150 \mu\text{l}$ RPMI1640完全培养液的混合物，所述的阳性对照组为 $50 \mu\text{l}$ hPBMC(2×10^6 /ml)、 $50 \mu\text{l}$ PHA和 $100 \mu\text{l}$ RPMI1640完全培养液的混合物。

5、根据权利要求1所述的一种人胎盘组织液抗炎作用检测方法，其特征在于：所述的ELISA检测TNF- α 及IFN- γ 步骤，即将经72h培养后的96孔板取出，1500rpm离心10min，吸取hPBMC细胞培养液上清置于0.5mlEP管中，稀释，分别用人IFN- γ ELISA试剂盒、人TNF- α ELISA试剂盒检测IFN- γ 及TNF- α 含量。

6、根据权利要求1所述的一种人胎盘组织液抗炎作用检测方法，其特征在于：所述的MTT检测hPBMC增殖步骤，即从培养的hPBMC细胞每孔吸出 $20 \mu\text{l}$ 上清，加入 $20 \mu\text{l}$ MTT，在细胞培养箱中继续培养4h，1500rpm离心10min，吸弃培养液上清后每孔加入 $150 \mu\text{l}$ DMSO，微量振荡器振荡10min后用酶标仪于599nm检测。

7、根据权利要求1所述的一种人胎盘组织液抗炎作用检测方法，其特征在于：所述的结果分析步骤，即采用SPSS13.0软件、GraphPadPrism5Demo软件进行统计学分析。

一种人胎盘组织液抗炎作用检测方法

技术领域

本发明涉及一种检测方法，尤其是一种人胎盘组织液抗炎作用检测方法。

背景技术

人们都知道人胎盘组织液具有抗炎作用，但是，具体多大浓度的人胎盘组织液才具有治疗效果，人们并不清楚，同时，目前人们还没有掌握人胎盘组织液抗炎作用的检测方法，这样，就影响了这种生物药品的研发和生产。因此，研究一种人胎盘组织液抗炎作用检测方法，是目前需要解决的技术问题。

发明内容

本发明所要解决的技术问题是提供一种人胎盘组织液抗炎作用检测方法。

本发明解决其技术问题的技术方案是：

一种人胎盘组织液抗炎作用检测方法，其工艺步骤为：①人胎盘组织试验液的配制，②hPBMC 制备，③组织培养液与 hPBMC 共培养，④ELISA 检测 TNF- α 及 IFN- γ ，⑤MTT 检测 hPBMC 增殖，⑥结果分析。

2、根据权利要求 1 所述的一种人胎盘组织液抗炎作用检测方法，其特征在于：所述的人胎盘组织试验液的配制步骤为人胎盘组织原液及用 RPMI1640 完全培养液 2 倍、4 倍、6 倍的进行稀释，即得人胎盘组织试验液。

所述的 hPBMC 制备步骤，即在无菌条件下，预置 10ml Ficol1 分离液于 50ml 离心管中。取正常成人供者血液 20ml，以 1:2 的比例用平衡至室温的 PBS 将外周血稀释，将 60ml 稀释的外周血沿 45 度倾斜的管壁缓慢加至盛有 30ml Ficol1 分离液的离心管中，在关闭 Heraeus 离心机机械制动功能前提下，2000rpm 离心 20min，小心收集界面单个核细胞层至 50ml 离心管中，加入 PBS 至 20ml，1500rpm 离心 10min，洗涤 2 次，并作细胞计数，以完全培养基（RPMI1640+10%FBS+1%双抗）重悬细胞至 2×10^6 /ml。

所述的组织培养液与 hPBMC 共培养步骤，即 50 μ l hPBMC (2×10^6 /ml) 和 50 μ l PHA 混合接种于 96 孔平底板，然后向其中加入 100 μ l 不同浓度的人胎盘组织试验液，每组设 5 个复孔；同时将空白对照组、阴性对照组和阳性对照组接种于 96 孔平底板，每组设 5 个复孔，将 96 孔培养板置于 37 $^{\circ}$ C，5%CO₂，饱和湿度的细胞培养箱中孵育 72h。所述的空白对照组为 50 μ l PHA 与 150 μ l RPMI1640 完全培养液的混合物，所述的阴性对照组为 50 μ l hPBMC (2×10^6 /ml) 与 150 μ l RPMI1640 完全培养液的混合物，所述的阳性对照组为 50 μ l hPBMC (2×10^6 /ml)、50 μ l PHA 和 100 μ l RPMI1640 完全培养液的混合物。

所述的 ELISA 检测 TNF- α 及 IFN- γ 步骤，即将经 72h 培养后的 96 孔板取出，

1500rpm 离心 10min, 吸取 hPBMC 细胞培养液上清置于 0.5mlEP 管中, 稀释, 分别用人 IFN- γ ELISA 试剂盒、人 TNF- α ELISA 试剂盒检测 IFN- γ 及 TNF- α 含量。

所述的 MTT 检测 hPBMC 增殖步骤, 即从培养的 hPBMC 细胞每孔吸出 20 μ l 上清, 加入 20 μ lMTT, 在细胞培养箱中继续培养 4h, 1500rpm 离心 10min, 吸弃培养液上清后每孔加入 150 μ lDMSO, 微量振荡器振荡 10min 后用酶标仪于 599nm 检测。

所述的结果分析步骤, 即采用 SPSS13.0 软件、GraphPadPrism5Demo 软件进行统计学分析。

本发明的有益效果是:

本发明开创了一种人胎盘组织液抗炎作用检测方法, 它对人胎盘组织液抗炎药的研发与生产奠定了科学基础。

本发明的目的: 实验研究使用不同浓度的胎盘组织液, 在体外对丝裂原激活人外周血单核细胞 (hPBMC) 增殖以及分泌炎症因子的抑制作用。

本发明的理论依据: 使用不同浓度的人胎盘组织液, 与丝裂原激活的 hPBMC 共培养, 经 37 $^{\circ}$ C 培养箱培养 72h 后, 用 ELISA 试剂盒检测各组 IFN- γ 、TNF- α 的水平, 用 MTT 法检测 hPBLC 增殖情况。

本发明试验的结果: 在 PHA 的刺激作用下, hPBMC 表达释放大量 IFN- γ 、TNF- α 。然而, 在不同浓度的人胎盘组织液中进行培养时, 炎性因子的分泌均受到不同程度的抑制, 并且在本试验范围内, 人胎盘组织液对上述炎性因子分泌的抑制作用呈现良好的剂量相关性, 其中, 当人胎盘组织液浓度较高时, 对 IFN- γ 、TNF- α 炎性因子分泌的抑制率高达 90% 以上。MTT 试验还发现, 不同浓度的组织液也都具有抑制 hPBMC 增殖的作用 ($P < 0.01$)。

本发明实验的结论: 人胎盘组织液可明显抑制丝裂原刺激的 hPBMC 增殖以及分泌 IFN- γ 及 TNF- α 的作用, 并且抑制作用与人胎盘组织液呈现良好的剂量相关性。

具体实施方式

一种人胎盘组织液抗炎作用检测方法, 其工艺步骤为: ①人胎盘组织试验液的配制, ②hPBMC 制备, ③组织培养液与 hPBMC 共培养, ④ELISA 检测 TNF- α 及 IFN- γ , ⑤MTT 检测 hPBMC 增殖, ⑥结果分析。

所述的人胎盘组织试验液的配制步骤为人胎盘组织原液及用 RPMI1640 完全培养液 2 倍、4 倍、6 倍的进行稀释, 即得人胎盘组织试验液。

所述的 hPBMC 制备步骤, 即在无菌条件下, 预置 10mlFicoll 分离液于 50ml 离心管中。取正常成人供者血液 20ml, 以 1:2 的比例用平衡至室温的 PBS 将外周血稀释, 将 60ml 稀释的外周血沿 45 度倾斜的管壁缓慢加至盛有 30mlFicoll 分

离液的离心管中，在关闭 Heraeus 离心机机械制动功能前提下，2000rpm 离心 20min，小心收集界面单个核细胞层至 50ml 离心管中，加入 PBS 至 20ml，1500rpm 离心 10min，洗涤 2 次，并作细胞计数，以完全培养基（RPMI1640+10%FBS+1%双抗）重悬细胞至 2×10^6 /ml。

所述的组织培养液与 hPBMC 共培养步骤，即 $50 \mu\text{l}$ hPBMC (2×10^6 /ml) 和 $50 \mu\text{l}$ PHA 混合接种于 96 孔平底板，然后向其中加入 $100 \mu\text{l}$ 不同浓度的人胎盘组织试验液，每组设 5 个复孔；同时将空白对照组、阴性对照组和阳性对照组接种于 96 孔平底板，每组设 5 个复孔，将 96 孔培养板置于 37°C ，5% CO_2 ，饱和湿度的细胞培养箱中孵育 72h，所述的空白对照组为 $50 \mu\text{l}$ PHA 与 $150 \mu\text{l}$ RPMI1640 完全培养液的混合物，所述的阴性对照组为 $50 \mu\text{l}$ hPBMC (2×10^6 /ml) 与 $150 \mu\text{l}$ RPMI1640 完全培养液的混合物，所述的阳性对照组为 $50 \mu\text{l}$ hPBMC (2×10^6 /ml)、 $50 \mu\text{l}$ PHA 和 $100 \mu\text{l}$ RPMI1640 完全培养液的混合物。

所述的 ELISA 检测 TNF- α 及 IFN- γ 步骤，即将经 72h 培养后的 96 孔板取出，1500rpm 离心 10min，吸取 hPBMC 细胞培养液上清置于 0.5ml EP 管中，稀释，分别用人 IFN- γ ELISA 试剂盒、人 TNF- α ELISA 试剂盒检测 IFN- γ 及 TNF- α 含量。

所述的 MTT 检测 hPBMC 增殖步骤，即从培养的 hPBMC 细胞每孔吸出 $20 \mu\text{l}$ 上清，加入 $20 \mu\text{l}$ MTT，在细胞培养箱中继续培养 4h，1500rpm 离心 10min，吸弃培养液上清后每孔加入 $150 \mu\text{l}$ DMSO，微量振荡器振荡 10min 后用酶标仪于 599nm 检测。

所述的结果分析步骤，即采用 SPSS13.0 软件、GraphPad Prism 5 Demo 软件进行统计学分析。

专利名称(译)	一种人胎盘组织液抗炎作用检测方法		
公开(公告)号	CN101629951A	公开(公告)日	2010-01-20
申请号	CN200910075223.3	申请日	2009-08-20
[标]申请(专利权)人(译)	吴广印		
申请(专利权)人(译)	吴广印		
当前申请(专利权)人(译)	吴广印		
[标]发明人	吴广印		
发明人	吴广印		
IPC分类号	G01N33/53 G01N1/28 C12Q1/18 C12N5/08		
其他公开文献	CN101629951B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开一种人胎盘组织液抗炎作用检测方法，其工艺步骤为：①人胎盘组织试验液的配制，②hPBMC制备，③组织培养液与hPBMC共培养，④ELISA检测TNF - α 及IFN - γ ，⑤MTT检测hPBMC增殖，⑥结果分析。它是一种开创性的人胎盘组织液抗炎作用检测方法，它对人胎盘组织液抗炎药的研发与生产奠定了科学基础。