



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102735841 A

(43) 申请公布日 2012. 10. 17

(21) 申请号 201110091520. 4

G01N 33/531 (2006. 01)

(22) 申请日 2011. 04. 13

C12Q 1/02 (2006. 01)

(71) 申请人 苏州卫生职业技术学院

地址 215000 江苏省苏州市新区技术产业开
发区科华路 28 号

(72) 发明人 孙中文

(74) 专利代理机构 南京经纬专利商标代理有限
公司 32200

代理人 楼高潮

(51) Int. Cl.

G01N 33/577 (2006. 01)

G01N 33/68 (2006. 01)

G01N 33/532 (2006. 01)

权利要求书 3 页 说明书 8 页

(54) 发明名称

一种测定 Graves 病患者血液中可溶性 CD28 含量的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种测定 Graves 病病患者血液中可溶性 CD28 含量的方法,准备好材料、试剂及血液标本后,依次进行单克隆抗体的生物素标记,生物素标记单抗的鉴定, sCD28 标准工作曲线的绘制, Graves 病人血液中 T 细胞的分离和纯化, Graves 病人 T 细胞的表型分析, Graves 病人血液中可溶性 CD28 含量的测定,免疫印迹法分析患者血液中可溶性 CD28,可溶性 CD28 对树突状细胞分泌的细胞因子的影响,可溶性 CD28 对树突状细胞 NF- κ B 核转位的影响等测定步骤并进行统计学分析。本测定 Graves 病病患者血液中可溶性 CD28 含量的方法,对进一步探讨联合其他可溶性共刺激分子建立体外检测的优化方案,和在自身免疫性疾病的临床诊断、治疗及预后评估中的促进意义,为寻找新的免疫干预手段提供实验依据和理论基础。

1. 一种测定 Graves 病患者血液中可溶性 CD28 含量的方法,其特征在于,具体步骤为:

步骤 1) 准备材料、试剂及血液标本:

牛血清;RPMI1640 或 DMEM 基础培养基;CD28 单抗 2D5、2F5、3B6、3F8 和 8G8;亲和层析柱:Protein G 免疫亲和层析柱;rhCD28/Fc 重组蛋白;琥珀酰羟基生物素;二甲基亚砷;4%多聚赖氨酸;streptavidin-HRP;avidin-PE;酶标测定板;酶标测定仪;培养瓶;实验仪器:CO₂ 培养箱、离心机;倒置显微镜及荧光显微镜;流式细胞仪;TMB 底物;人促甲状腺激素试剂盒;淋巴细胞分离液;鼠抗人 PE 直接标记 CD3、CD4、CD8、CD28、NF- κ B 单克隆抗体;

血液标本:选取多例初发 Graves 病患者的血液标本作为实验组,准备健康人血液标本多份作为正常对照组;

步骤 2) 单克隆抗体的生物素标记

用碳酸盐缓冲液将纯化的 2D5 单抗的浓度调整为 200 μ g/ml,取其 1.0ml 在 50ml CBS 中 4 $^{\circ}$ C 透析过夜,移入 Eppendorf 管,加入 1mg/ml 的生物素 40 μ l,避光震荡 4h,0.01mol/L pH7.2PBS 中 4 $^{\circ}$ C 透析 72h,分装后于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用;

步骤 3) 生物素标记单抗的鉴定

将 CD28-T 转基因细胞用 PBS 洗涤后,以 5×10^5 /管的剂量分装于小试管中,以 20 μ l/管的剂量加入生物素标记的单抗 2D5,4 $^{\circ}$ C 反应 45min,充分洗涤后以 10 μ l/管的剂量加入 avidin-PE,再于 4 $^{\circ}$ C 反应 45min,充分洗涤后用流式细胞仪分析,同时设置阴性对照;

步骤 4) sCD28 标准工作曲线的绘制

用 2F5mAb 包被经 0.01%多聚赖氨酸预处理的酶联检测板,4 $^{\circ}$ C 过夜,含 0.01% Tween-20 的 PBS 洗涤后,以 3% BSA 封闭过夜,洗涤后加入 0 ~ 16ng/ml 的标准品 rhCD28/Fc 重组蛋白的梯度稀释液,反应 2h,充分洗涤后,再分别加生物素标记单抗和 HRP 标记链霉亲和素,37 $^{\circ}$ C 反应 1h,洗涤后,加 TMB 底物室温反应 15min,用上述方法测定 A₄₅₀,每个梯度做 3 个复孔,以 sCD28/Fc 的浓度为横坐标, A₄₅₀ 值为纵坐标,绘制 sCD28 的标准工作曲线;

步骤 5) Graves 病人血液中 T 细胞的分离和纯化

抽取肝素抗凝的 Graves 病患者或健康人新鲜外周血 10ml,用 pH7.2 的无 Ca²⁺、Mg²⁺ Hank's 液作 1 : 2 稀释后,轻悬于淋巴细胞分离液上,以 1400rpm 的转速离心 30min,弃上清;吸取界面云雾状层细胞,加 5 倍体积的 Hank's 液,混匀,2000rpm,离心 10min,弃上清;以 1400rpm 的转速转 10min,重复洗涤一次,计数,用含 10% FCS 的 RPMI1640 完全培养基调整细胞浓度为 3×10^6 /ml,置 6 孔塑料培养板于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱孵育 2h 以去除贴壁的单核细胞及 B 细胞等,收集非贴壁细胞悬液,经 E 花环结合法富集 T 细胞,经流式细胞仪分析,CD3⁺T 细胞达到 90%以上,液氮冻存备用;

步骤 6) Graves 病人 T 细胞的表型分析

液氮中复苏冻存的患者和健康对照组的纯化 T 细胞,用 PBS 洗涤 2 遍后,以 5×10^5 /管的剂量分装于小试管中,分别加入 CD3、CD4、CD8、CD28 和 ICOS 分子的 PE 直标抗体 10 μ l 及小鼠 IgG-PE 10 μ l 作为阴性对照,于 4 $^{\circ}$ C 避光反应 45min,经含 5% 小牛血清的 PBS 洗涤后,加入 0.5ml PBS 后,用流式细胞仪分析 T 细胞表型,图象处理运用 EXPO v.2 cytometer software 分析软件。

步骤 7) Graves 病人血液中可溶性 CD28 含量的测定

收集 T 细胞培养上清、Graves' 病人血液中和对照组正常健康人血浆 0.5ml。取包被抗体 2F5 已经预包被的检测板,加入上述收集待测样品 100 μ l, 37 $^{\circ}$ C 水浴反应 2h, 充分洗涤后,加入生物素标记的单抗 2D5,再于 37 $^{\circ}$ C 水浴反应 1h 充分洗涤后,加入 streptavidin-HRP,反应洗涤后,加入临时配制的底物 TMB,室温反应 15min 后,用 2mol/L H_2SO_4 终止酶与底物的反应,于酶标仪测定 A_{450} ,每个样本设置三个复孔,同时用 rhCD28/Fc 重组蛋白标准品制作线性标准曲线,以分析 Graves 病人血浆中可溶性 CD28 含量;

步骤 8) 免疫印迹法分析患者血液中可溶性 CD28

分别收集 T 细胞培养上清、经 PHA 活化的 T 细胞培养上清、健康人血清和 Graves' 病人血清,在上述蛋白质样品中加入 1 \times SDS 凝胶加样缓冲液,于沸水中煮沸 3min 使蛋白质变性,配制 8% 的积层胶和 5% 的分离胶,恒压 100 伏特进行 SDS-PAGE 电泳 3h,电泳结束后,剪取与凝胶块相同大小的 3M 滤纸和硝酸纤维膜,并按照要求正确排列滤纸、硝酸纤维膜和凝胶块,恒流 100mA 电转硝酸纤维膜 2h,用含 5% 脱脂奶粉和 0.3% Tween-20 的 PBS 封闭硝酸纤维膜,摇床过夜,次日 TBS 洗涤后加入稀释的鼠抗人 CD28 抗体 8G8 (10 μ g/ml),封闭 2h, TBS 充分洗涤,加入羊抗鼠 IgG 二抗 (1 : 1000 稀释),室温孵育 2h, TBS 充分洗涤后加入显色液 BCIP 显色,用 ECL 检测系统的化学发光方法观察特异性蛋白条带;

步骤 9) 可溶性 CD28 对树突状细胞分泌的细胞因子的影响

无菌抽取正常人肝素抗凝外周血,常规 Ficoll 分离获得单个核细胞,洗涤 2 遍后,用 RPMI-1640 调整细胞密度至 3×10^6 /ml,加入 6 孔培养板 (2ml/孔) 中,37 $^{\circ}$ C 培养 2h,轻轻吸出悬浮细胞,-80 $^{\circ}$ C 冻存储备用。然后在培养板中加入含 GM-CSF (100ng/ml)、IL-4 (50ng/ml)、100IU/ml 青霉素、100 μ g/ml 链霉素的 RPMI-1640,37 $^{\circ}$ C 培养,每 3d 换液一次。在培养的第 6d,选用脂多糖 (LPS) 诱导其成熟,然后加入 CD28 重组蛋白,两天后,收集细胞培养上清,测定细胞因子 IL-2 和 IL-6 浓度,同时设置阴性对照组;

步骤 10) 可溶性 CD28 对树突状细胞 NF- κ B 核转位的影响

收集成熟的树突状细胞并调整细胞浓度为 1×10^7 /ml,分装 0.5ml 于无菌的 Eppendoff 管中,加入 CD28 融合蛋白分别培养 30min、60min 和 120min,然后用 PBS 洗涤三次,然后用预冷的 4% 多聚甲醛固定细胞 20min, PBS 室温洗涤三次后,0.1% Triton 处理 10min, PBS 室温洗涤三次后,Blocking buffer 室温封闭 1h,以 2 μ g/管的剂量加入 NF- κ B 单抗,室温反应 2h, PBS 室温洗涤三次后,加入 cy5 标记的兔抗鼠二抗室温继续反应 1h, PBS 洗涤后,以 100 μ l/管的剂量加入核染色剂 PI 和以 10 μ l/管的剂量加入 RNase 酶,37 $^{\circ}$ C 培养染色 30min, PBS 室温洗涤三遍后,荧光封片剂封片,然后通过共聚焦显微镜观察结果,对照组为人 IgG 抗体的 Fc 段,另外,收集 LPS 刺激的树突状细胞,通过流式细胞仪检测细胞 CD83、CD86 和 CD80 的阳性百分率,分析树突状细胞的成熟程度;

步骤 11) 统计学分析

所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据采用 Kolmogorov-Smirnov 检验,非参数统计分析视样本类型不同分别采用 Mann-Whitney、Kruskal-Wallis 和 Wilcoxon ranking 检验,相关分析采用 Pearson 相关分析,部分指标采用样本均数比较用 t 检验,采用 SPSS10.0 统计软件进行统计分析。

2. 根据权利要求 1 所述的测定 Graves 病病患者血液中可溶性 CD28 含量的方法,其特征在于,所述步骤 1) 中,在每升 RPMI1640 或 DMEM 基础培养基中,添加胎牛或小牛血清

100ml、L-谷氨酰胺 0.15g、NaHCO₃ 2.0g、丙酮酸钠 0.11g、葡萄糖 3.6g、HEPES 4.766g、浓度为 5×10^{-3} mol/L 的 2-巯基乙醇 10.0ml。

3. 根据权利要求 1 所述的测定 Graves 病患者血液中可溶性 CD28 含量的方法,其特征在于,所述步骤 2) 中的透析的 72h 第一天换液 4 次,以后每 24h 换液 2~3 次。

4. 根据权利要求 1 所述的测定 Graves 病患者血液中可溶性 CD28 含量的方法,其特征在于,所述步骤 6) 的经含 5% 小牛血清的 PBS 的洗涤为以 1400r/min 的转速离心转 5min。

5. 根据权利要求 1 所述的测定 Graves 病患者血液中可溶性 CD28 含量的方法,其特征在于,所述步骤 10) 中 PBS 的洗涤为以 1400r/min 的速度离心转 5min。

一种测定 Graves 病患者血液中可溶性 CD28 含量的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及医学领域,具体涉及一种测定 Graves 病患者血液中可溶性 CD28 含量的方法。

背景技术

[0002] Graves 病又称弥漫性甲状腺肿伴甲状腺功能亢进(甲亢)或毒性弥漫性甲状腺肿,是甲亢中最常见的类型。也是一种伴甲状腺激素分泌增多的器官特异性自身免疫性疾病,其病因和发病机理尚不明确。目前认为其免疫致病机制是由于甲状腺细胞表面促甲状腺激素(TSH)受体作为抗原刺激机体所产生的抗体(TRAb)模拟 TSH 的作用,与 TSH 受体结合,使甲状腺滤泡细胞持续性激发、形成和分泌过量的甲状腺素而引起甲亢。近年来,人们越来越重视免疫致病机制在 Graves 病发病中的作用,希望能寻找免疫干预手段作为治疗 Graves 病的新途径。

[0003] 自身抗体 TRAb 是重要的效应因子,是发病中较靠下游的环节,不是 Graves 病发病的启动因子,为此,近年来研究者们把目光开始投向于开启甲状腺异常免疫应答的上游环节——自身反应性 T 细胞的活化及相关调节分子的研究。大量研究表明,多对共刺激分子的受体-配体分子在免疫病理应答的不同阶段以各自独特的方式参与了类风湿性关节炎、红斑狼疮和实验性自身脑脊髓膜炎等自身免疫性疾病的病理过程。Schmidt 等首次报道了在类风湿性关节炎患者的外周血中存在一群独特的 CD4⁺T 细胞,其表面完全缺乏共刺激分子 CD28 的表达。近年来人们陆续发现,在各种慢性炎症状态下,如多发性硬化症、不稳定性心绞痛、Wegener 肉芽肿病和强直性脊柱炎等患者的外周血中均有异常 CD4⁺CD28⁻T 细胞的高频存在。此外,在年龄大于 65 岁的老年人的外周血中亦发现有该群特殊的 CD4⁺CD28⁻T 细胞存在。业已有研究证实,在类风湿性关节炎病人中,当患者出现类风湿结节和关节外全身症状时,CD4⁺CD28⁻T 细胞数量显著增加;同样,在冠脉综合症中,CD4⁺CD28⁻T 细胞的数量与患者发生急性冠脉事件的危险性呈明显正相关,发生急性冠脉综合症患者体内的炎症性粥样斑块局部可见该群细胞呈克隆性扩增^[12]。进一步研究证实,CD4⁺CD28⁻T 细胞本质上是一群具有独特生物学特性和功能的自身反应性 T 细胞。国内外研究业已证实,共刺激分子,不论受体还是配体,均以膜型和可溶性两种形式存在,分别表达于细胞膜上和分泌于体液中,参与了共刺激信号的介导和调节。有文献报道,可溶性 CD28 分子主要来源于膜型 CD28 分子的脱落和 mRNA 水平剪接、翻译后的直接分泌。但也有文献经 RT-PCR 证实,系统性红斑狼疮病人血液中的可溶性 CD28 分子为全长基因所编码,也就是说,病人血液中的可溶性 CD28 分子为细胞膜 CD28 分子脱落所致。另有体外实验结果表明,可溶性 CD28 分子与多发性硬化症、硬皮病等自身免疫性疾病的严重程度密切相关,并具有抑制 T 细胞增殖的功能。但可溶性 CD28 分子在 Graves 病中的临床诊断价值及其在体内免疫应答和免疫调节中发挥何种作用,在肿瘤、免疫缺陷病、自身免疫性疾病和器官移植等疾病的发生、发展、转归中又有何意义,目前仍不清楚。

[0004] 基于以上原因,发明一种有效的 Graves 病患者血液中可溶性 CD28 含量的测定及

作用机制方法,已成为本技术领域内亟待解决的问题。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供了一种测定 Graves 病患者血液中可溶性 CD28 含量的方法,为探讨 Graves 病的实验室研究和寻找可溶性 CD28 分子参与该病发病机制,提供具有重要基础研究价值和潜在的临床应用价值的生物学参数。

[0006] 本发明的一种测定 Graves 病患者血液中可溶性 CD28 含量的方法,具体步骤如下:

[0007] 步骤 1) 准备材料、试剂及血液标本:

[0008] 牛血清;RPMI 1640 或 DMEM 基础培养基;CD28 单抗 2D5、2F5、3B6、3F8 和 8G8;亲和层析柱:Protein G 免疫亲和层析柱;rhCD28/Fc 重组蛋白;琥珀酰羟基生物素;二甲基亚砜;4%多聚赖氨酸;streptavidin-HRP;avidin-PE;酶标测定板;酶标测定仪;培养瓶;实验仪器:CO₂ 培养箱、离心机;倒置显微镜及荧光显微镜;流式细胞仪;TMB 底物;人促甲状腺激素(hTSH)试剂盒;淋巴细胞分离液;鼠抗人 PE 直接标记 CD3、CD4、CD8、CD28、NF- κ B 单克隆抗体;

[0009] 血液标本:选取多例初发 Graves 病患者的血液标本作为实验组,准备健康人血液标本多份作为正常对照组;

[0010] 步骤 2) 单克隆抗体的生物素标记

[0011] 用碳酸盐缓冲液将纯化的 2D5 单抗的浓度调整为 200 μ g/ml,取其 1.0ml 在 50ml CBS 中 4 $^{\circ}$ C 透析过夜,移入 Eppendorf 管,加入 1mg/ml 的生物素 40 μ l,避光震荡 4h,0.01mol/L pH7.2 PBS 中 4 $^{\circ}$ C 透析 72h,分装后于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用;

[0012] 步骤 3) 生物素标记单抗的鉴定

[0013] 将 CD28-T 转基因细胞用 PBS 洗涤后,以 5×10^5 /管的剂量分装于小试管中,以 20 μ l/管的剂量加入生物素标记的单抗 2D5,4 $^{\circ}$ C 反应 45min,充分洗涤后以 10 μ l/管的剂量加入 avidin-PE,再于 4 $^{\circ}$ C 反应 45min,充分洗涤后用流式细胞仪分析,同时设置阴性对照;

[0014] 步骤 4) sCD28 标准工作曲线的绘制

[0015] 用 2F5mAb 包被经 0.01%多聚赖氨酸预处理的酶联检测板,4 $^{\circ}$ C 过夜,含 0.01% Tween-20 的 PBS 洗涤后,以 3% BSA 封闭过夜,洗涤后加入 0 ~ 16ng/ml 的标准品 rhCD28/Fc 重组蛋白的梯度稀释液,反应 2h,充分洗涤后,再分别加生物素标记单抗和 HRP 标记链霉亲和素,37 $^{\circ}$ C 反应 1h,洗涤后,加 TMB 底物室温反应 15min,用上述方法测定 A₄₅₀,每个梯度做 3 个复孔,以 sCD28/Fc 的浓度为横坐标, A₄₅₀ 值为纵坐标,绘制 sCD28 的标准工作曲线;

[0016] 步骤 5) Graves 病人血液中 T 细胞的分离和纯化

[0017] 抽取肝素抗凝的 Graves 病患者或健康人新鲜外周血 10ml,用 pH7.2 的无 Ca²⁺、Mg²⁺Hank's 液作 1 : 2 稀释后,轻悬于淋巴细胞分离液上,以 1400rpm 的转速离心 30min,弃上清;吸取界面云雾状层细胞,加 5 倍体积的 Hank's 液,混匀,2000rpm,离心 10min,弃上清;以 1400rpm 的转速转 10min,重复洗涤一次,计数,用含 10% FCS 的 RPMI1640 完全培养基调整细胞浓度为 3×10^6 /ml,置 6 孔塑料培养板于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱孵育 2h 以去除贴壁的单核细胞及 B 细胞等,收集非贴壁细胞悬液,经 E 花环结合法富集 T 细胞,经流式细胞

仪分析, CD3⁺T 细胞达到 90% 以上, 液氮冻存备用;

[0018] 步骤 6) Graves 病人 T 细胞的表型分析

[0019] 液氮中复苏冻存的患者和健康对照组的纯化 T 细胞, 用 PBS 洗涤 2 遍后, 以 5×10^5 /管的剂量分装于小试管中, 分别加入 CD3、CD4、CD8、CD28 和 ICOS 分子的 PE 直标抗体 $10 \mu\text{l}$ 及小鼠 IgG-PE $10 \mu\text{l}$ 作为阴性对照, 于 4°C 避光反应 45min, 经含 5% 小牛血清的 PBS 洗涤后, 加入 0.5ml PBS 后, 用流式细胞仪分析 T 细胞表型, 图象处理运用 EXPO v. 2 cytometer software 分析软件。

[0020] 步骤 7) Graves 病人血液中可溶性 CD28 含量的测定

[0021] 收集 T 细胞培养上清、Graves' 病人血液中和对照组正常健康人血浆 0.5ml。取包被抗体 2F5 已经预包被的检测板, 加入上述收集待测样品 $100 \mu\text{l}$, 37°C 水浴反应 2h, 充分洗涤后, 加入生物素标记的单抗 2D5, 再于 37°C 水浴反应 1h 充分洗涤后, 加入 streptavidin-HRP, 反应洗涤后, 加入临时配制的底物 TMB, 室温反应 15min 后, 用 2mol/L H_2SO_4 终止酶与底物的反应, 于酶标仪测定 A_{450} , 每个样本设置三个复孔, 同时用 rhCD28/Fc 重组蛋白标准品制作线性标准曲线, 以分析 Graves 病人血浆中可溶性 CD28 含量;

[0022] 步骤 8) 免疫印迹法分析患者血液中可溶性 CD28

[0023] 分别收集 T 细胞培养上清、经 PHA 活化的 T 细胞培养上清、健康人血清和 Graves' 病人血清, 在上述蛋白质样品中加入 $1 \times \text{SDS}$ 凝胶加样缓冲液, 于沸水中煮沸 3min 使蛋白质变性, 配制 8% 的积层胶和 5% 的分离胶, 恒压 100 伏特进行 SDS-PAGE 电泳 3h, 电泳结束后, 剪取与凝胶块相同大小的 3M 滤纸和硝酸纤维膜, 并按照要求正确排列滤纸、硝酸纤维膜和凝胶块, 恒流 100mA 电转硝酸纤维膜 2h, 用含 5% 脱脂奶粉和 0.3% Tween-20 的 PBS 封闭硝酸纤维膜, 摇床过夜, 次日 TBS 洗涤后加入稀释的鼠抗人 CD28 抗体 8G8 ($10 \mu\text{g/ml}$), 封闭 2h, TBS 充分洗涤, 加入羊抗鼠 IgG 二抗 (1 : 1000 稀释), 室温孵育 2h, TBS 充分洗涤后加入显色液 BCIP 显色, 用 ECL 检测系统的化学发光方法观察特异性蛋白条带;

[0024] 步骤 9) 可溶性 CD28 对树突状细胞分泌的细胞因子的影响

[0025] 无菌抽取正常人肝素抗凝外周血, 常规 Fico11 分离获得单个核细胞, 洗涤 2 遍后, 用 RPMI-1640 调整细胞密度至 $3 \times 10^6/\text{ml}$, 加入 6 孔培养板 (2ml/孔) 中, 37°C 培养 2h, 轻轻吸出悬浮细胞, -80°C 冻存备用。然后在培养板中加入含 GM-CSF (100ng/ml)、IL-4 (50ng/ml)、100IU/ml 青霉素、 $100 \mu\text{g/ml}$ 链霉素的 RPMI-1640, 37°C 培养, 每 3d 换液一次。在培养的第 6d, 选用脂多糖 (LPS) 诱导其成熟, 然后加入 CD28 重组蛋白, 两天后, 收集细胞培养上清, 测定细胞因子 IL-2 和 IL-6 浓度, 同时设置阴性对照组;

[0026] 步骤 10) 可溶性 CD28 对树突状细胞 NF- κ B 核转位的影响

[0027] 收集成熟的树突状细胞并调整细胞浓度为 $1 \times 10^7/\text{ml}$, 分装 0.5ml 于无菌的 Eppendoff 管中, 加入 CD28 融合蛋白分别培养 30min、60min 和 120min, 然后用 PBS 洗涤三次, 然后用预冷的 4% 多聚甲醛固定细胞 20min, PBS 室温洗涤三次后, 0.1% Triton 处理 10min, PBS 室温洗涤三次后, Blocking buffer 室温封闭 1h, 以 $2 \mu\text{g/管}$ 的剂量加入 NF- κ B 单抗, 室温反应 2h, PBS 室温洗涤三次后, 加入 cy5 标记的兔抗鼠二抗室温继续反应 1h, PBS 洗涤后, 以 $100 \mu\text{l/管}$ 的剂量加入核染色剂 PI 和以 $10 \mu\text{l/管}$ 的剂量加入 RNase 酶, 37°C 培养染色 30min, PBS 室温洗涤三遍后, 荧光封片剂封片, 然后通过共聚焦显微镜观察结果, 对照组为人 IgG 抗体的 Fc 段, 另外, 收集 LPS 刺激的树突状细胞, 通过流式细胞仪检测细胞

CD83、CD86 和 CD80 的阳性百分率,分析树突状细胞的成熟程度;

[0028] 步骤 11) 统计学分析

[0029] 所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据采用 Kolmogorov-Smirnov 检验,非参数统计分析视样本类型不同分别采用 Mann-Whitney、Kruskal-Wallis 和 Wilcoxon ranking 检验,相关分析采用 Pearson 相关分析,部分指标采用样本均数比较用 t 检验,采用 SPSS10.0 统计软件进行统计分析。

[0030] 有益效果:经测定 Graves 病患者血液中可溶性 CD28 含量的方法,能得到, Graves 病患者外周血中可溶性 CD28 含量异常增高,并伴有 T 细胞上膜型 CD28 分子的丢失,可溶性 CD28 分子还可以促进抗原递呈细胞树突状细胞的 NF- κ B 分子核转位和细胞因子 IL-6 的分泌等性征,对进一步探讨联合其他可溶性共刺激分子建立体外检测的优化方案,和在自身免疫性疾病的临床诊断、治疗及预后评估中的促进意义,为寻找新的免疫干预手段提供实验依据和理论基础。

具体实施方式

[0031] 实施例 1

[0032] 1. 主要材料和试剂

[0033] 牛血清 (Hyclone, 美国);全培养基:每升 RPMI1640 或 DMEM 基础培养基 (Gibco, 美国) 中,添加胎牛或小牛血清 100ml、L- 谷氨酰胺 0.15g、NaHCO₃ 2.0g、丙酮酸钠 0.11g、葡萄糖 3.6g、HEPES 4.766g、2- 巯基乙醇 10.0ml (5×10^{-3} mol/L);CD28 单抗 2D5、2F5、3B6、3F8 和 8G8 (本科室自行研制);亲和层析柱:Protein G 免疫亲和层析柱 (Pharmacia, 瑞典);rhCD28/Fc 重组蛋白 (R&D, 美国);琥珀酰羟生物素 (Sigma, 美国);二甲基亚砜 (Sigma, 美国);4% 多聚赖氨酸 (Sigma, 美国);streptavidin-HRP (Roche, 瑞士);avidin-PE (Immunotech, 法国);酶标测定板 (8 \times 12 孔, Costar, 美国);酶标测定仪 (Bio-Rad, 美国);培养瓶:50ml、500ml 塑料培养瓶 (Nunc, 丹麦);实验仪器:CO₂ 培养箱、离心机 (Jouan, 法国);倒置显微镜及荧光显微镜 (Olympus, 日本);流式细胞仪 (Beckman-Coulter, 美国);TMB 底物 (KPL 公司, 英国)。人促甲状腺激素 (hTSH) 试剂盒 (Biological 公司, 美国),淋巴细胞分离液 (Ficoll, 上海试剂二厂),鼠抗人 PE 直接标记 CD3、CD4、CD8、CD28、NF- κ B 单克隆抗体 (ebioscience 公司, 美国)

[0034] 标本来源:选取 59 例自 2004 年 5 月至 2006 年 12 月在苏州市第二人民医院住院和门诊确诊的初发 Graves 病患者 (男 17 名,女 42 名,年龄 43.7 ± 15.8 岁) 作为实验组。符合 Graves 病患者诊断标准 (高代谢症候群,触诊和 B 超检查证实有弥漫性甲状腺肿,伴或不伴突眼,高甲状腺素血症,促甲状腺激素受体抗体 (TRAb) 阳性或核素扫描显示甲状腺吸碘率弥漫性增强)。苏州市中心血站提供健康人血液标本 55 份 (男 23 名,女 32 名,年龄 21 ~ 48 岁) 作为正常对照组。所有研究对象均无合并其他自身免疫性疾病、肺部疾患、肿瘤和感染性疾病等,亦无使用影响免疫功能的药物,均常规测定甲状腺功能 (自动化学发光系统检测试剂盒, Bayer 公司, 德国) 和 TRAb 酶联检测试剂盒 (Diagnostika 公司, 美国)。GD 组甲状腺功能:FT3 29.4 ± 15.2 pmol/L (正常值 3.5-5.5 pmol/L)、FT4 77.8 ± 44.9 pmol/L (正常值 11.5-22.7 pmol/L) 和 sTSH 0.13 ± 0.4 μ IU/mL (正常值 0.335-5.5 μ IU/mL)。TRAb 测定值:GD 组为 26.2 ± 1.2 U/L, 正常对照组为 4.6 ± 3.2 U/L ($P < 0.01$)。

[0035] 2. 实验方法

[0036] 步骤 1) 单克隆抗体的生物素 (Biotin) 标记

[0037] 用碳酸盐缓冲液 (0.01M CBS, PH9.3) 将纯化的 2D5 单抗的浓度调整为 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 取其 1.0ml 在 50ml CBS 中 4 $^{\circ}\text{C}$ 透析过夜。移入 Eppendof 管, 加入 1mg/ml 生物素 (Biotin) 40 μl , 避光震荡 4h, 0.01mol/L pH7.2PBS 中 4 $^{\circ}\text{C}$ 透析 72h (第一天换液 4 次, 以后每 24h 换液 2~3 次), 分装后于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

[0038] 步骤 2) 生物素标记单抗的鉴定

[0039] 将 CD28-T 转基因细胞用 PBS 洗涤后, 分装于小试管中 (5×10^5 /管), 加入生物素标记的单抗 2D5 (20 μl /管), 4 $^{\circ}\text{C}$ 反应 45min, 充分洗涤后加入 avidin-PE (10 μl /管), 再于 4 $^{\circ}\text{C}$ 反应 45min, 充分洗涤后用流式细胞仪分析。同时设置阴性对照。

[0040] 步骤 3) sCD28 标准工作曲线的绘制

[0041] 用 2F5mAb 包被 (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、100 μl /孔) 经 0.01% 多聚赖氨酸预处理的酶联检测板, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。PBS (含 0.01% Tween-20) 洗涤后, 3% BSA 封闭过夜。洗涤后加入标准品 rhCD28/Fc 重组蛋白的梯度稀释液 (0~16ng/ml), 反应 2h, 充分洗涤后, 再分别加生物素标记单抗和 HRP 标记链霉亲和素, 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1h, 洗涤后, 加 TMB 底物室温反应 15min, 用上述方法测定 A_{450} 。每个梯度做 3 个复孔。以 sCD28/Fc 的浓度为横坐标, A_{450} 值为纵坐标, 绘制 sCD28 的标准工作曲线。

[0042] 步骤 4) Graves 病人血液中 T 细胞的分离和纯化

[0043] 抽取肝素抗凝的 Graves 病患者或健康人新鲜外周血 10ml, 用 pH7.2 的无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} Hank's 液作 1:2 稀释后, 轻悬于淋巴细胞分离液 (Ficoll) 上, 1400rpm, 离心 30min, 弃上清; 吸取界面云雾状层细胞, 加 5 倍体积的 Hank's 液, 混匀, 2000rpm, 离心 10min, 弃上清; 1400rpm, 10min 重复洗涤一次, 计数, 用含 10% FCS 的 RPMI1640 完全培养基调整细胞浓度为 $3 \times 10^6/\text{ml}$, 置 6 孔塑料培养板于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱孵育 2h 以去除贴壁的单核细胞及 B 细胞等。收集非贴壁细胞悬液, 经 E 花环结合法富集 T 细胞。经流式细胞仪分析, $\text{CD3}^+\text{T}$ 细胞达到 90% 以上, 液氮冻存备用。

[0044] 步骤 5) Graves 病人 T 细胞的表型分析

[0045] 液氮中复苏冻存的患者和健康对照组的纯化 T 细胞, 用 PBS 洗涤 2 遍后, 分装于小试管中 (5×10^5 /管), 分别加入 CD3、CD4、CD8、CD28 和 ICOS 分子的 PE 直标抗体 10 μl 及小鼠 IgG-PE 10 μl 作为阴性对照, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光反应 45min, 经含 5% 小牛血清的 PBS 充分洗涤后 (1400r/min, 5min), 加入 0.5ml PBS 后, 用流式细胞仪分析 T 细胞表型。图象处理运用 EXP0 v.2 cytometer software 分析软件。

[0046] 步骤 6) Graves 病人血液中可溶性 CD28 含量的测定

[0047] 收集 T 细胞培养上清、Graves' 病人血液中和对照组正常健康人血浆 0.5ml。取包被抗体 2F5 已经预包被的检测板, 加入上述收集待测样品 100 μl , 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴反应 2h, 充分洗涤后, 加入生物素标记的单抗 2D5, 再于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴反应 1h 充分洗涤后, 加入 streptavidin-HRP, 反应洗涤后, 加入临时配制的底物 TMB, 室温反应 15min 后, 用 2mol/L H_2SO_4 终止酶与底物的反应, 于酶标仪测定 A_{450} 。每个样本设置三个复孔, 同时用 rhCD28/Fc 重组蛋白标准品制作线性标准曲线, 以分析 Graves 病人血浆中可溶性 CD28 含量。

[0048] 步骤 7) 免疫印迹法分析患者血液中可溶性 CD28

[0049] 分别收集 T 细胞培养上清、经 PHA 活化的 T 细胞培养上清、健康人血清和 Graves' 病人血清,在上述蛋白质样品中加入 1×SDS 凝胶加样缓冲液,于沸水中煮沸 3min 使蛋白质变性,配制 8%的积层胶和 5%的分离胶,恒压 100 伏特进行 SDS-PAGE 电泳 3h。电泳结束后,剪取与凝胶块相同大小的 3M 滤纸和硝酸纤维膜,并按照要求正确排列滤纸、硝酸纤维膜和凝胶块,恒流 100mA 电转硝酸纤维膜 2h。用含 5%脱脂奶粉和 0.3% Tween-20 的 PBS 封闭硝酸纤维膜,摇床过夜,次日 TBS 洗涤后加入稀释的鼠抗人 CD28 抗体 8G8(10 μg/ml),封闭 2h, TBS 充分洗涤,加入羊抗鼠 IgG 二抗(1 : 1000 稀释),室温孵育 2h, TBS 充分洗涤后加入显色液 BCIP 显色,用 ECL 检测系统的化学发光方法观察特异性蛋白条带。

[0050] 步骤 8) 可溶性 CD28 对树突状细胞分泌的细胞因子的影响

[0051] 无菌抽取正常人肝素抗凝外周血,常规 Ficol1 分离获得单个核细胞,洗涤 2 遍后,用 RPMI-1640 调整细胞密度至 3×10^6 /ml,加入 6 孔培养板(2ml/孔)中,37℃培养 2h,轻轻吸出悬浮细胞,-80℃冻存储备用。然后在培养板中加入含 GM-CSF(100ng/ml)、IL-4(50ng/ml)、100IU/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素的 RPMI-1640,37℃培养,每 3d 换液一次。在培养的第 6d,选用脂多糖诱导其成熟,然后加入 CD28 重组蛋白,两天后,收集细胞培养上清,测定细胞因子 IL-2 和 IL-6 浓度。同时设置阴性对照组。

[0052] 步骤 9) 可溶性 CD28 对树突状细胞 NF-κ B 核转位的影响

[0053] 收集成熟的树突状细胞并调整细胞浓度为 1×10^7 /ml,分装 0.5ml 于无菌的 Eppendoff 管中,加入 CD28 融合蛋白(R&D 公司,美国)分别培养 30min、60min 和 120min,然后用 PBS 洗涤三次(1400rpm×5min,下同),然后用预冷的 4%多聚甲醛固定细胞 20min, PBS 室温洗涤三次后,0.1% Triton 处理 10min, PBS 室温洗涤三次后,Blocking buffer 室温封闭 1h,加入 NF-κ B 单抗(2 μg/管)室温反应 2h, PBS 室温洗涤三次后,加入 cy5 标记的兔抗鼠二抗室温继续反应 1h, PBS 洗涤后,加入核染色剂 PI(100 μl/管)和 RNase 酶(10 μl/管)37℃培养染色 30min, PBS 室温洗涤三遍后,荧光封片剂封片,然后通过共聚焦显微镜观察结果。对照组为人 IgG 抗体的 Fc 段。另外,收集 LPS 刺激的树突状细胞,通过流式细胞仪检测细胞 CD83、CD86 和 CD80 的阳性百分率,分析树突状细胞的成熟程度。

[0054] 步骤 10) 统计学分析

[0055] 所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据采用 Kolmogorov-Smirnov 检验,非参数统计分析视样本类型不同分别采用 Mann-Whitney、Kruskal-Wallis 和 Wilcoxon ranking 检验,相关分析采用 Pearson 相关分析,部分指标采用样本均数比较用 t 检验,采用 SPSS10.0 统计软件进行统计分析。

[0056] 3. 测定结果分析

[0057] 1) Graves 病人血液中可溶性 CD28 含量显著升高

[0058] 用上述建立的双单抗夹心可溶性 CD28 检测方法,分析 Graves 病人血液中可溶性 CD28 浓度,测定结果表明,Graves 病人血液中可溶性 CD28 含量(2.16 ± 1.15 ng/ml)明显高于健康对照组(0.83 ± 1.35 ng/ml)($P < 0.01$),并发现具有甲状腺肿大、眼球突出等伴随症状的个别病人体内可溶性 CD28 浓度超过 5ng/ml。结果提示,可溶性 CD28 在 Graves 病人体内明显增高,可能参与了 Graves 病的发生发展等病理过程。

[0059] 2) 可溶性 CD28 表达与 T 细胞活化状态呈正相关

[0060] PHA 活化的 T 细胞培养上清中检测可溶性 CD28 含量明显高于对照组(0.67 ± 0.15

vs $0.34 \pm 0.11 \text{ ng/ml}$, $P < 0.05$), 提示可溶性 CD28 的产生可能与 T 细胞活化状态有关。继而经免疫印迹实验 (Western blotting) 进一步证实, 在活化 T 细胞的浓缩培养上清和 Graves 病人血浆印染的硝酸纤维膜上出现了特异性染色的可溶性 CD28 蛋白分子条带, 而在静止 T 细胞培养上清和健康人对照组血清中并未出现特异性的染色条带。由此可见, 可溶性 CD28 的产生与 T 细胞的活化状态有一定的相关性。

[0061] 3) Graves 病人外周血 T 细胞上 CD28 阳性表达率显著降低

[0062] 采用免疫荧光标记技术和流式细胞仪分析了 Graves 病人及对照组健康人外周血 CD3^+ 、 CD8^+ 、 CD4^+ 、 CD28^+ 、 $\text{CD8}^+\text{CD28}^+$ 、 $\text{CD4}^+\text{CD28}^+$ T 细胞的百分率。结果显示, Graves 病人外周血 T 细胞上共刺激分子 CD28 的阳性表达率显著下降, 不但 CD4^+ T 细胞亚群上 CD28 分子有所丢失, 而且 CD8^+ T 细胞亚群上 CD28 分子的阳性表达率也显著低于健康对照组 (分别为 $9.46 \pm 8.58\%$ 和 $17.55 \pm 5.28\%$, $P < 0.01$)。进一步研究发现, Graves 患者外周血 $\text{CD4}^+\text{CD28}^-$ T 细胞亚群数量显著高于正常对照组 (分别为 $10.2 \pm 8.6\%$ 和 $2.3 \pm 1.9\%$, $P < 0.01$), 而且患者体内 CD3T 细胞的阳性百分率也明显低于健康对照组 ($51.43 \pm 7.54\%$ 和 $69.37 \pm 9.21\%$, $P < 0.05$), 细胞计数也提示, 患者血液中 T 细胞的相对数降低。但是患者外周血 T 细胞却异常上调表达 ICOS 分子 ($11.2 \pm 9.46\%$), 共刺激分子 ICOS 在健康对照组几乎不表达 ($1.32 \pm 0.6\%$)。在给患者药物治疗后, 再次分析患者 T 细胞表型显示, 与治疗前相比较, 药物治疗后的患者体内 CD28 的阳性百分率有明显上调 (分别为 $26.83 \pm 7.35\%$ 和 $49.54 \pm 7.81\%$, $P < 0.01$), 不论是 CD4^+ T 细胞亚群, 还是 CD8^+ T 细胞亚群表面的 CD28 分子都明显呈现恢复性上调, 由此提示患者 T 细胞表面 CD28 分子的表达百分率与病情有密切的关系, CD28 分子可能参与了该病的发生发展等病理过程。

[0063] 4) 可溶性 CD28 含量与 Graves 病临床检测指标相关

[0064] 疾病患者体内可溶性 CD28 浓度与疾病诊断的重要临床实验室指标的相关性分析表明, 患者体内可溶性 CD28 水平与 FT3、FT4 和 TRAb 均呈正相关, 相关系数 γ 分别为 0.663、0.624 和 0.728, 可溶性 CD28 浓度与血清 TSH 呈显著负相关, 相关系数 γ 为 -0.726, 提示可溶性 CD28 的浓度是 Graves 病的重要生物学参数。

[0065] 5) 可溶性 CD28 浓度与临床体征呈正相关

[0066] 为了进一步了解外周血可溶性 CD28 与病情的相关性, 患者按其甲状腺肿大的程度和突眼症存在与否进行分组, 采用非参数 Kruskal-Wallis 检验进行组间比较, 结果提示, 外周血液中可溶性 CD28 与 Graves 病患者的两大主要体征, 甲状腺的肿大程度 ($P < 0.05$) 和突眼症 ($P < 0.01$) 均具有显著的正相关, 提示可溶性 CD28 与疾病的严重程度呈明显正相关。

[0067] 6) 可溶性 CD28 促进树突状细胞分泌 IL-6

[0068] 通过对可溶性 CD28 融合蛋白与树突状细胞相互作用的培养上清中细胞因子的 ELISA 检测证实, 可溶性 CD28 可以明显促进 IL-6 的分泌 ($870.52 \pm 73.61 \text{ pg/ml}$ vs $4.25 \pm 2.83 \text{ pg/ml}$), 而与正常对照组相比, IL-2 的浓度无显著性差异; 但对 Graves 病人血清中 IL-6 含量进行测定后发现, 患者血液中 IL-6 浓度也明显高于正常人群健康对照组 ($73.46 \pm 9.18 \text{ pg/ml}$ vs $8.27 \pm 3.24 \text{ pg/ml}$), 而患者体内 IL-2 含量则显著减少 ($11.54 \pm 1.72 \text{ pg/ml}$ vs $15.36 \pm 1.48 \text{ pg/ml}$), 提示 IL-6 可能参与了 Graves' 病的病理发病过程。

[0069] 7) 可溶性 CD28 促进树突状细胞 NF- κ B 的核转位

[0070] 为了探讨可溶性 CD28 对单核来源的树突状细胞表达目的分子的影响,采用共聚焦显微镜观察到,可溶性 CD28 分子作用于体外诱导的单核来源的树突状细胞 30min 后, NF- κ B 已经开始核转位,60min 后大部分 NF- κ B 分子已经从胞浆转移到细胞核内,120min 后几乎所有的 NF- κ B 转移到了细胞核内部,上述结果表明,可溶性 CD28 分子与树突状细胞表达的目的分子相互作用后,通过逆向信号介导树突状细胞信号分子 NF- κ B 核转位,提示可溶性 CD28 具有调节树突状细胞功能的作用。

[0071] 4 结论

[0072] 本测定方法初步证实,Graves 病患者外周血中可溶性 CD28 含量异常增高,并伴有 T 细胞上膜型 CD28 分子的丢失,体外实验证实,可溶性 CD28 分子还可以促进抗原递呈细胞树突状细胞的 NF- κ B 分子核转位和细胞因子 IL-6 的分泌,进一步探讨联合其他可溶性共刺激分子建立体外检测的优化方案,和在自身免疫性疾病的临床诊断、治疗及预后评估中的意义,将为寻找新的免疫干预手段提供实验依据和理论基础。

[0073] 上述实施例只是为了说明本发明的技术构思及特点,其目的是在于让本领域内的普通技术人员能够了解本发明的内容并据以实施,并不能以此限制本发明的保护范围。凡是根据本发明内容的实质所作出的等效的变化或修饰,都应涵盖在本发明的保护范围内。

专利名称(译)	一种测定Graves病患者血液中可溶性CD28含量的方法		
公开(公告)号	CN102735841A	公开(公告)日	2012-10-17
申请号	CN201110091520.4	申请日	2011-04-13
[标]申请(专利权)人(译)	苏州卫生职业技术学院		
申请(专利权)人(译)	苏州卫生职业技术学院		
当前申请(专利权)人(译)	苏州卫生职业技术学院		
[标]发明人	孙中文		
发明人	孙中文		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/68 G01N33/532 G01N33/531 C12Q1/02		
其他公开文献	CN102735841B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种测定Graves病患者血液中可溶性CD28含量的方法，准备好材料、试剂及血液标本后，依次进行单克隆抗体的生物素标记，生物素标记单抗的鉴定，sCD28标准工作曲线的绘制，Graves病人血液中T细胞的分离和纯化，Graves病人T细胞的表型分析，Graves病人血液中可溶性CD28含量的测定，免疫印迹法分析患者血液中可溶性CD28，可溶性CD28对树突状细胞分泌的细胞因子的影响，可溶性CD28对树突状细胞NF- κ B核转位的影响等测定步骤并进行统计学分析。本测定Graves病患者血液中可溶性CD28含量的方法，对进一步探讨联合其他可溶性共刺激分子建立体外检测的优化方案，和在自身免疫性疾病的临床诊断、治疗及预后评估中的促进意义，为寻找新的免疫干预手段提供实验依据和理论基础。