



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108546750 A

(43)申请公布日 2018. 09. 18

(21)申请号 201810324827.6

(22)申请日 2018.04.12

(71)申请人 邦世(苏州)生物医药科技有限公司

地址 215000 江苏省苏州市苏州工业园区

星湖街218号生物纳米园B5楼401P

(72)发明人 吴曼 朱晓雷

(51)Int. Cl.

C12Q 1/6883(2018.01)

C12Q 1/02(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

权利要求书3页 说明书8页 附图2页

(54)发明名称

一种将TLR9应用于治疗冠状动脉粥样硬化的研究方法

(57)摘要

一种将TLR9应用于治疗冠状动脉粥样硬化的研究方法,本发明涉及医疗技术领域;研究对象及分组;血标本采集;指标检测:心脏超声;冠心病患者术前、术后、无冠心病者一次心肌酶、CRP、BNP检测;冠心病患者术前术后、无冠心病者一次TLR9检测;统计学分析。通过用RT-PCR检测冠心病患者和健康者外周血单核细胞中TLR9 mRNA的表达水平,明确TLR9与冠心病及其预后有无关系并进一步分析是怎样的关系,经皮冠脉介入治疗对TLR9表达的影响,为冠心病治疗确立新的靶点。



1. 一种将TLR9应用于治疗冠状动脉粥样硬化的研究方法,其特征在于:它从人体实验方面进行研究分析,所述的人体实验的研究步骤如下:

(1)、研究对象及分组:

2017年4月-2019年6月医院心内科住院病人,共入选150例经临床和造影诊断为冠状动脉粥样硬化性心脏病的患者,其诊断根据典型的临床表现、心肌酶学、心电图、冠脉造影等指标,符合世界卫生组织关于冠心病的诊断标准;其中急性心肌梗死组50例;稳定性心绞痛组50例;不稳定性心绞痛组50例;正常对照组:共入选50例无冠心病者,无既往冠心病史,血常规、血脂、肝肾功能指标均正常,无其他自身免疫性疾病及感染性疾病表现;

(2)、血标本采集:

冠心病入选者在PCI术前和术后,无冠心病者任何时间点空腹采集静脉血3ml,1:9的枸橼酸钠抗凝;

(3)、指标检测:

(3.1)、心脏超声:冠心病组每个病人术前术后各做一次心脏超声,无冠心病者也进行一次心脏超声检查;

(3.2)、冠心病患者术前、术后、无冠心病者一次心肌酶、CRP、BNP检测;

(3.3)、冠心病患者术前术后、无冠心病者一次TLR9检测;

(3.3.1)、分离PBMCs和制备细胞总RNA所有人选者空腹采集静脉血3ml,以1:9的枸橼酸钠抗凝,加入等体积生理盐水稀释后,以2ml的淋巴细胞分离液按密度梯度离心法分离单个核细胞;收集细胞沉淀,提取细胞总RNA,操作严格按照试剂公司的细胞总RNA抽提试剂盒的说明书进行;分别通过1%琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度仪,检测所得总RNA的质量和浓度;

(3.3.2)、cDNA的合成RNA+DEPC水:11 μ l,RNA量1-5 μ g;Oligle dT:1 μ l;70 $^{\circ}$ C放置5min,冰上放置5min;5 $\times$ RTase Buffer:4 μ l;Rnase Inhibitor:1 μ l,dNTP:2 μ l,37 $^{\circ}$ C放置5min;RTase:1 μ l,42 $^{\circ}$ C放置70min,70 $^{\circ}$ C放置10min;所得cDNA-20 $^{\circ}$ C冻存备用;

(3.3.3)、qRT-PCR取0.2ml薄壁PCR管,分别编号;向各管中加入2 $\times$ qPCR TaqMix 12.5 μ l,10uM各基因正反向引物混合物0.5 μ l,对应的cDNA各1 μ l;一管中不加模板用作阴性对照;各管补加水至25 μ l;PCR反应混匀,置于Roche 480荧光定量PCR仪中;95 $^{\circ}$ C 5min预变性后,95 $^{\circ}$ C 15s,65 $^{\circ}$ C 35s,40循环;

(4)、统计学分析:

各数据以均数 $\pm$ 标准差表示,组间比较首先行方差齐性检验,方差不齐,使用非参数检验,方差齐采用方差分析,采用SPSS23统计软件对实验数据进行统计学处理; $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2. 一种将TLR9应用于治疗冠状动脉粥样硬化的研究方法,其特征在于:它从细胞实验方面进行研究分析,所述的细胞实验的研究步骤如下:

(1)、细胞培养和传代:

复苏冻存的HUVEC,加入含10%胎牛血清、 1×10^8 U $\cdot$ L $^{-1}$ 青霉素、 1×10^8 U $\cdot$ L $^{-1}$ 硫酸链霉素、 5×10^7 U $\cdot$ L $^{-1}$ 庆大霉素的DMEM培养基,于37 $^{\circ}$ C、5%CO $_2$ 培养箱中静置培养,将生长良好的HUVEC用0.5%的胰蛋白酶消化2-3min后,轻轻吹打制成细胞悬液,每周传代培养2~3次;

(2)、细胞分组及给药:

采用ox-LDL造成HUVEC损伤模型,药物干预组分别用TLR9的拮抗剂和激动剂预处理4h,再继续用含ox-LDL及相应药物的培养基进行培养;

(3)、MTS比色法检测内皮细胞生存活性:

将HUVEC单细胞悬液接种于96孔板,每组设4个复孔,将各组HUVEC细胞进行相应处理后,小心吸掉原培养基,每孔加入MTS检测液100 μ l,并设空白对照,继续培养30-60min;用多功能酶标仪测定各孔在490nm处的OD值,并通过下列公式计算细胞生存活性:细胞生存活性(%) = (样品孔OD490值-空白孔OD490值) / (对照孔OD490值-空白孔OD490值) $\times$ 100%;

(4)、活细胞成像系统检测内皮细胞线粒体膜电位变化:

将HUVEC接种于玻底96孔板,各组细胞进行相应处理并同时加入JC-1线粒体膜电位检测试剂,在CO₂培养箱中37 $^{\circ}$ C孵育15min;波长以FITC和TRITC通道于活细胞成像系统中进行动态观察;JC-1染料表现出电势依赖性的积聚在线粒体内,正常线粒体内,JC-1以聚合物的形式聚集在线粒体基质中,发出强烈的红色荧光;损伤的线粒体由于膜电位的下降或丧失,JC-1只能以单体的形式存在于胞浆中,产生绿色荧光;根据颜色的变化直接反映线粒体膜电位的变化,线粒体的去极化程度也可以通过红/绿荧光强度的比例来衡量;

(5)、活细胞成像系统检测内皮细胞钙离子变化:

将HUVEC接种于玻底96孔板,各组细胞进行相应处理,加入Fluo-3AM钙离子荧光探针,在37 $^{\circ}$ C避光孵育30min进行荧光探针装载,随后用D-Hank's液洗两遍,加入无血清DMEM培养基继续孵育20min以确保Fluo-3AM在细胞内酯酶的作用下完全转变成Fluo-3,从而被滞留在细胞内和钙离子结合产生较强的荧光;激发波长488nm,发射波长为525-530nm,以FITC通道于活细胞成像系统中进行动态观察;

(6)、Western blot检测LOX-1、p38MAPK、pI κ B α 、NF- κ Bp65、pNF- κ Bp65蛋白的表达:

将各组HUVEC细胞进行相应处理后,弃去培养基PBS清洗2次,吸干PBS,各皿加入等量细胞裂解液充分裂解后将细胞裂解物移至EP管中,以上操作均在冰上进行,4 $^{\circ}$ C、12000g离心20min,收集上清至新的EP管中;应用BCA试剂盒测定上清中蛋白浓度,余加入5x上样缓冲液,100 $^{\circ}$ C金属浴加热5min使蛋白变性,冷却备用;配制SDS聚丙烯酰胺凝胶,各组取等量蛋白样品进行凝胶电泳,90V稳压电泳约30min,待溴酚蓝进入分离胶后,换用120V稳压电泳,至溴酚蓝前缘移动到凝胶底部,取出凝胶;采用半干式转膜,将凝胶内蛋白转入硝酸纤维素膜;转膜完毕后取出NC膜,应用封闭液室温封闭3h,将封闭后的NC膜置入使用按说明书稀释后的相应一抗溶液中,4 $^{\circ}$ C缓慢摇动孵育过夜,TBST水平摇床振荡洗膜3次后,将NC膜置入适量稀释的辣根过氧化物酶标记的二抗溶液中,室温孵育2h;TBST室温洗膜3次;用Odyssey 9120双色红外激光成像系统扫描检测,以相对密度灰度值作为蛋白表达量;

(7)、细胞免疫荧光法检测目的蛋白的表达:

将各组HUVEC细胞进行相应处理后,用预冷的PBS洗涤3次,每孔加固定液,甲醇:冰乙酸=3:1,200 μ l,在4 $^{\circ}$ C条件下固定15min,再用预冷的PBS洗涤3次,加穿透液,0.25%聚乙二醇辛基苯基醚与5%二甲基亚砷的混合液,1ml,37 $^{\circ}$ C放置5min,再用预冷的PBS洗涤3次,加入FITC标记的二抗50 μ l,37 $^{\circ}$ C孵育1h,荧光显微镜下拍照观察;

(8)、ELISA法检测内皮细胞培养上清MCP-1、sICAM-1、sVCAM-1水平:

将各组HUVEC细胞进行相应处理后,取各组细胞培养上清,1000rpm离心2min去除细胞

碎片,取上清进行指标检测;

(9)、统计学分析:

各数据以均数±标准差表示,组间比较首先行方差齐性检验,方差不齐,使用非参数检验,方差齐采用方差分析,采用SPSS23统计软件对实验数据进行统计学处理; $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

一种将TLR9应用于治疗冠状动脉粥样硬化的研究方法

技术领域

[0001] 本发明涉及医疗技术领域,具体涉及一种将TLR9应用于治疗冠状动脉粥样硬化的研究方法。

背景技术

[0002] 动脉粥样硬化(Atherosclerosis,AS)是冠心病最基本的病理改变,以管壁内脂质积累、免疫细胞(巨噬细胞、T细胞和肥大细胞等)浸润为特征,早期病变主要表现为内皮下的脂质和巨噬细胞形成的泡沫细胞组成的脂纹的形成,随着时间的进展逐渐形成一个由纤维帽覆盖的坏死中心(由凋亡细胞、坏死细胞、细胞碎片以及胆固醇结晶等组成),且斑块逐渐增大导致管腔狭窄可引起心肌缺血甚至心肌梗死。巨噬细胞作为AS斑块中最为典型的炎症细胞,在AS的发生发展过程中具有重要的作用。在不同局部微环境的影响下,巨噬细胞可活化为不同的亚型,主要表现为两种:具有促炎作用的经典激活型(M1型)和具有抗炎作用的替代激活型(M2型),这是巨噬细胞一系列功能亚型中的两个极端表现。巨噬细胞的极化状态(M1/M2)则是决定巨噬细胞功能的主要标志,有研究发现冠状动脉粥样硬化与心外膜脂肪组织中的巨噬细胞极化状态密切相关。在机体不断变化的微环境中巨噬细胞可通过上调其Toll样受体(toll like receptors,TLRs)的表达而影响其活化表型,有研究表明TLR4可以诱导miR-155的表达,而miR-155可引起M1型巨噬细胞的表达上调及抑制M2型相关因子Arg1的表达。

[0003] 巨噬细胞(M1/M2)的极化状态与其在AS斑块发生发展中的作用密切相关,其中M1型巨噬细胞主要存在于ApoE^{-/-}小鼠的早期斑块中,且多见于易损性斑块;而M2型巨噬细胞主要存在于晚期斑块中,多与动脉斑块稳定性增强有关。有研究显示TLR9的激动剂CpG-ODN可直接或间接激活免疫效应细胞(巨噬细胞和树突状细胞等)促进IL-12和TNF- α 等Th1类细胞因子的分泌而诱导机体建立Th1型免疫反应,而巨噬细胞被Th1型相关细胞因子或脂多糖激活时可极化为M1型。此时,白介素-1 β (IL-1 β)、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)和Ciita表达相对增加;巨噬细胞被Th2型相关细胞因子如IL-4和IL-13等激活时可极化为M2型,进而引起FIZZ1,Arginase-1和Ym1等相关因子的表达上调。目前关于TLR9是否可以影响巨噬细胞的活化表型尚不完全清楚。

[0004] 近年来多数研究表明免疫反应及伴随其发生的慢性炎症反应在AS的发病机制中起到了重要作用。TLRs作为一类经典的模式识别受体,可通过识别病原微生物的相应组分启动机体的固有免疫反应,并在获得性免疫反应中也具有重要的作用。TLR9是一种细胞内的重要模式识别受体,主要分布于巨噬细胞、B细胞和树突状细胞等免疫细胞,其配体主要是病原体和自身DNA。免疫刺激序列(ISS)是一类人工合成的TLR9特异性激活剂,主要包括三种类型:CpG-ODN-A、B和C型,ODN1826属于B型CpG-ODN,可有效激活小鼠单核细胞的TLR9。IRS是一类具有免疫调节作用的DNA序列,可有效抑制TLR9的激活。有研究表明ISS可通过激活TLR9而引起Th1/Th2类细胞因子的平衡偏离,而Th1/Th2类细胞因子与巨噬细胞的活化表型密切相关,所以TLR9表达水平的改变可能与巨噬细胞的极化状态存在相关性。

[0005] 很多研究都表明TLR4在AS发病机制中具有重要作用,但关于TLR9在AS发病机制中的作用还尚不十分清楚。有研究发现TLR7/9的双拮抗剂可抑制ApoE^{-/-}小鼠动脉内膜增厚和泡沫细胞形成而减弱动脉血管的介入后重构;氯喹可以改变细胞内的PH值而改变TLR9所必须的酸性环境,发挥抑制TLR9的作用,Razani等发现氯喹可以通过p53而发挥抗AS的作用;TLR9激动剂ODN1826刺激小鼠巨噬细胞后可以显著增强周脂蛋白3表达和巨噬细胞中脂质积累,尤其是甘油三酯;另有研究发现TLR9活化后可能通过其下游的NF- κ B和IRF7途径促进泡沫细胞的形成,但关于TLR9在AS发病机制中的具体作用亦不清楚。

[0006] 体外数据显示,由CpG DNA介导刺激单核细胞分化为巨噬细胞,使进入血管内皮下的低密度脂蛋白发生氧化,导致其修饰成为氧化型低密度脂蛋白胆固醇,而后其被巨噬细胞清道夫受体大量摄取,造成胞内脂质堆积,形成巨噬细胞源性泡沫细胞。泡沫细胞是AS早期的一个重要标志,暗示了TLR9可能促进了动脉粥样硬化的发展。Sorrentino R等人发现,在体外,包含CpG的寡脱氧核苷酸片段通过TLR9的介导激活巨噬细胞,导致脂质堆积物增加,泡沫细胞的扩增。此外,在人类动脉粥样硬化的纤维脂肪病变处,浆细胞样树突状细胞(plasmacytoid dendritic cell,pDC)也表达了TLR9。在体内,通过CpG DNA片段激活TLR9,刺激CD4⁺T细胞向平滑肌移动,促进干扰素(IFN- α)的分泌。最近有研究发现,TLR9除了有加速AS斑块的形成,还有保护机体缓解AS的作用。有证据表明,在体内TLR9的活化刺激cDC产生白介素(IL)-10,其可以反过来抑制pDC表达IFN- α 。然而有体内实验证明,在ApoE^{-/-}小鼠模型中TLR9在动脉粥样硬化中起保护作用。Christine Koulis等人发现,给TLR9、ApoE双基因敲除的C57BL/6小鼠喂食高脂肪食物,与ApoE的小鼠进行比较,观察对二者动脉粥样硬化病变程度的影响。结果显示,TLR9在AS中起到保护的作用,这一结果支持了在Apo^{-/-}小鼠中寡聚脱氧核苷酸刺激TLR9减少病变损害的程度。TLR3和TLR7也有类似的差异,即在体外实验中有促炎效应,在体内有抗动脉粥样硬化的作用。体内表达TLR受体的细胞类型很多,各种细胞TLR配体的特异性差异以及由此在体内环境中各种细胞类型相互作用,效果相互抵消中和,可能造成了这种体内体外的差异。此外,不同疾病可能在其复合反应中的信号通路不同。例如,据Salagiannim等人报道,干预血管重建降低了TLR7和TLR9的阻滞,然而TLR7、TLR9的基因缺乏,导致了动脉粥样硬化的加速。当然,在TLR9信号途径中,有很多步骤的细节都有争议,TLR9与CpG DNA如何作用,TLR9在细胞中的运输,还有其下游的信号转导机制也不是完全清楚,这些都有待进一步研究阐明。

[0007] 近年来研究提示:TLR家族在冠心病的炎症免疫反应中发挥重要作用,是细菌感染与冠心病炎症形成的一个桥梁,其在冠心病中的作用已成为新的研究热点。蓝景生等发现外周血中单个核细胞TLR2~5表达的阳性率均与冠心病危险因素积分呈正相关。Shirak已证实TLR1、TLR4、TLR6动脉粥样斑块中的表达比正常人增多。Erridge等在动物实验中发现TLRs家族内部成员有协同作用。

发明内容

[0008] 本发明的目的在于针对现有技术的缺陷和不足,提供一种结构简单,设计合理、使用方便的将TLR9应用于治疗冠状动脉粥样硬化的研究方法;通过用RT-PCR检测冠心病患者和健康者外周血单核细胞中TLR9mRNA的表达水平,明确TLR9与冠心病及其预后有无关系并进一步分析是怎样的关系,经皮冠脉介入治疗对TLR9表达的影响,为冠心病治疗确立新的

靶点;并用TLR9拮抗剂和激动剂对ox-LDL造成人脐静脉内皮细胞HUVEC损伤模型进行干预,进一步探讨TLR9在ox-LDL损伤内皮细胞致动脉粥样硬化中的作用及对其干预效果,为寻找AS新的干预药物作一个尝试。

[0009] 为实现上述目的,本发明采用的技术方案是:它分别从人体实验和细胞实验两方面进行研究分析;

[0010] 所述的人体实验的研究步骤如下:

[0011] 1、研究对象及分组:

[0012] 2017年4月-2019年6月医院心内科住院病人,共入选150例经临床和造影诊断为冠状动脉粥样硬化性心脏病(CAD)的患者,其诊断根据典型的临床表现、心肌酶学、心电图、冠脉造影等指标,符合世界卫生组织(WHO)关于冠心病的诊断标准;其中急性心肌梗死(AMI)组50例;稳定性心绞痛(SA)组50例;不稳定性心绞痛(UA)组50例;正常对照组:共入选50例无冠心病者,无既往冠心病史,血常规、血脂、肝肾功能指标均正常,无其他自身免疫性疾病及感染性疾病表现;

[0013] 2、血标本采集:

[0014] 冠心病入选者在PCI术前和术后(72h),无冠心病者任何时间点空腹采集静脉血3ml,1:9的枸橼酸钠抗凝;

[0015] 3、指标检测:

[0016] 3.1、心脏超声:冠心病组每个病人术前术后各做一次心脏超声(急性ST段抬高型心肌梗死术前心脏超声可以不做),无冠心病者也行一次心脏超声检查;

[0017] 3.2、冠心病患者术前、术后、无冠心病者一次心肌酶、CRP、BNP检测;

[0018] 3.3、冠心病患者术前术后、无冠心病者一次TLR9检测;

[0019] 3.3.1、分离PBMCs和制备细胞总RNA所有人选者空腹采集静脉血3ml,以1:9的枸橼酸钠抗凝,加入等体积生理盐水稀释后,以2ml的淋巴细胞分离液按密度梯度离心法分离单个核细胞;收集细胞沉淀,提取细胞总RNA,操作严格按照试剂公司的细胞总RNA抽提试剂盒的说明书进行;分别通过1%琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度仪,检测所得总RNA的质量和浓度;

[0020] 3.3.2、cDNA的合成RNA+DEPC水:11 μ l,RNA量1-5 μ g;Oligle dT:1 μ l;70 $^{\circ}$ C放置5min,冰上放置5min;5 $\times$ RTase Buffer:4 μ l(10 $\times$ RTase Buffer 2 μ l+2 μ l DEPC水);Rnase Inhibitor:1 μ l,dNTP:2 μ l,37 $^{\circ}$ C放置5min;RTase:1 μ l,42 $^{\circ}$ C放置70min,70 $^{\circ}$ C放置10min;所得cDNA-20 $^{\circ}$ C冻存备用;

[0021] 3.3.3、qRT-PCR取0.2ml薄壁PCR管,分别编号;向各管中加入2 $\times$ qPCR TaqMix 12.5 μ l,10uM各基因正反向引物混合物0.5 μ l,对应的cDNA各1 μ l(GAPDH为内参);一管中不加模板用作阴性对照;各管补加水至25 μ l;PCR反应混匀,置于Roche 480荧光定量PCR仪中;95 $^{\circ}$ C 5min预变性后,95 $^{\circ}$ C 15s,65 $^{\circ}$ C 35s(荧光检测),40循环;

[0022] 4、统计学分析:

[0023] 各数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较首先行方差齐性检验,方差不齐,使用非参数检验(Kruskal Wallis test),方差齐采用方差分析,采用SPSS23统计软件对实验数据进行统计学处理; $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

[0024] 所述的细胞实验的研究步骤如下:

[0025] 1、细胞培养和传代:

[0026] 常规方法复苏冻存的HUVEC,加入含10%胎牛血清、 $1 \times 10^8 \text{U} \cdot \text{L}^{-1}$ 青霉素、 $1 \times 10^8 \text{U} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫酸链霉素、 $5 \times 10^7 \text{U} \cdot \text{L}^{-1}$ 庆大霉素的DMEM培养基,于37℃、5%CO₂培养箱中静置培养,将生长良好的HUVEC用0.5%的胰蛋白酶消化2-3min后,轻轻吹打制成细胞悬液,每周传代培养2~3次;

[0027] 2、细胞分组及给药:

[0028] 采用ox-LDL(终浓度为 $30 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)造成HUVEC损伤模型,药物干预组分别用TLR9的拮抗剂(IRS869)(终浓度为 $1 \mu\text{M}$)和激动剂(ODN1826)(终浓度为 $1 \mu\text{M}$)预处理4h,再继续用含ox-LDL及相应药物的培养基进行培养;

[0029] 3、MTS比色法检测内皮细胞生存活性:

[0030] MTS比色法是常用的检测细胞生存活性、筛选处理因素浓度的方法,活细胞能将MTS还原为一种蓝紫色的甲臍化合物,而死细胞则不能,该甲臍化合物在490nm处有较强的吸收峰,且此吸收峰值与活细胞数成较好的线性关系;具体方法如下:将HUVEC单细胞悬液接种于96孔板,每组设4个复孔,将各组HUVEC细胞进行相应处理后,小心吸掉原培养基,每孔加入MTS检测液(MTS:无血清培养基=1:5)100 μl ,并设空白对照,继续培养30-60min;用多功能酶标仪测定各孔在490nm处的OD值,并通过下列公式计算细胞生存活性:细胞生存活性(%)=(样品孔OD₄₉₀值-空白孔OD₄₉₀值)/(对照孔OD₄₉₀值-空白孔OD₄₉₀值) $\times 100\%$;

[0031] 4、活细胞成像系统检测内皮细胞线粒体膜电位变化:

[0032] 将HUVEC接种于玻底96孔板,各组细胞进行相应处理并同时加入JC-1线粒体膜电位检测试剂(每100 μl 培养基加入10 μl JC-1检测试剂),在CO₂培养箱中37℃孵育15min;根据说明书推荐的波长以FITC和TRITC通道于活细胞成像系统中进行动态观察;JC-1染料表现出电势依赖性的积聚在线粒体内,正常线粒体内,JC-1以聚合物的形式聚集在线粒体基质中,发出强烈的红色荧光($\text{Ex}=585 \text{nm}$, $\text{Em}=590 \text{nm}$);损伤的线粒体由于膜电位的下降或丧失,JC-1只能以单体的形式存在于胞浆中,产生绿色荧光($\text{Ex}=514 \text{nm}$, $\text{Em}=529 \text{nm}$);根据颜色的变化直接反映线粒体膜电位的变化,线粒体的去极化程度也可以通过红/绿荧光强度的比例来衡量;

[0033] 5、活细胞成像系统检测内皮细胞钙离子变化:

[0034] 将HUVEC接种于玻底96孔板,各组细胞进行相应处理,加入Fluo-3AM钙离子荧光探针(终浓度为 $1 \mu\text{M}$),在37℃避光孵育30min进行荧光探针装载,随后用D-Hank's液洗两遍,加入无血清DMEM培养基继续孵育20min以确保Fluo-3AM在细胞内酯酶的作用下完全转变成Fluo-3,从而被滞留在细胞内和钙离子结合产生较强的荧光;根据说明书推荐使用的激发波长488nm,发射波长为525-530nm,以FITC通道于活细胞成像系统中进行动态观察;

[0035] 6、Western blot检测LOX-1、p38MAPK、pI κ B α 、NF- κ Bp65、pNF- κ Bp65蛋白的表达:

[0036] 将各组HUVEC细胞进行相应处理后,弃去培养基PBS清洗2次,吸干PBS,各皿加入等量细胞裂解液充分裂解后将细胞裂解物移至EP管中,以上操作均在冰上进行。4℃、12000g离心20min,收集上清至新的EP管中;应用BCA试剂盒测定上清中蛋白浓度,余加入5x上样缓冲液,100℃金属浴加热5min使蛋白变性,冷却备用。配制SDS聚丙烯酰胺凝胶,各组取等量蛋白样品进行凝胶电泳,90V稳压电泳约30min,待溴酚蓝进入分离胶后,换用120V稳压电泳,至溴酚蓝前缘移动到凝胶底部,取出凝胶;采用半干式转膜,将凝胶内蛋白转入硝酸纤

纤维素膜(NC膜);转膜完毕后取出NC膜,应用封闭液室温封闭3h,将封闭后的NC膜置入使用按说明书稀释后的相应一抗溶液中,4℃缓慢摇动孵育过夜,TBST水平摇床振荡洗膜3次后,将NC膜置入适量稀释的辣根过氧化物酶标记的二抗溶液中,室温孵育2h.TBST室温洗膜3次;用Odyssey 9120双色红外激光成像系统扫描检测,以相对密度灰度值作为蛋白表达量;

[0037] 7、细胞免疫荧光法检测目的蛋白的表达:

[0038] 将各组HUVEC细胞进行相应处理后,用预冷的PBS洗涤3次,每孔加固定液(甲醇:冰乙酸=3:1)200 μ l,在4℃条件下固定15min,再用预冷的PBS洗涤3次,加穿透液(0.25%聚乙二醇辛基苯基醚与5%二甲基亚砷的混合液)1ml,37℃放置5min,再用预冷的PBS洗涤3次,加入FITC标记的二抗50 μ l,37℃孵育1h,荧光显微镜下拍照观察;

[0039] 8、ELISA法检测内皮细胞培养上清MCP-1、sICAM-1、sVCAM-1水平:

[0040] 将各组HUVEC细胞进行相应处理后,取各组细胞培养上清,1000rpm离心2min去除细胞碎片,取上清进行指标检测,操作步骤严格按照说明书进行;

[0041] 9、统计学分析:

[0042] 各数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较首先行方差齐性检验,方差不齐,使用非参数检验(Kruskal Wallis test),方差齐采用方差分析,采用SPSS23统计软件对实验数据进行统计学处理; $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

[0043] 本发明有益效果为:本发明所述的将TLR9应用于治疗冠状动脉粥样硬化的研究方法;通过用RT-PCR检测冠心病患者和健康者外周血单核细胞中TLR9mRNA的表达水平,明确TLR9与冠心病及其预后有无关系并进一步分析是怎样的关系,经皮冠脉介入治疗对TLR9表达的影响,为冠心病治疗确立新的靶点;并用TLR9拮抗剂和激动剂对ox-LDL造成人脐静脉内皮细胞HUVEC损伤模型进行干预,进一步探讨TLR9在ox-LDL损伤内皮细胞致动脉粥样硬化中的作用及对其干预效果,为寻找AS新的干预药物作一个尝试。

附图说明

[0044] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案,下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅仅是本发明的一些实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动性的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0045] 图1是本发明中人体实验的流程图。

[0046] 图2是本发明中细胞实验的流程图。

具体实施方式

[0047] 下面结合附图对本发明作进一步的说明。

[0048] 具体实施方式一:

[0049] 参看如图1所示,本具体实施方式采用的技术方案是:它从人体实验方面进行分析,所述的人体实验的研究步骤如下:

[0050] 1、研究对象及分组:

[0051] 2017年4月-2019年6月医院心内科住院病人,共人选150例经临床和造影诊断为冠状动脉粥样硬化性心脏病(CAD)的患者,其诊断根据典型的临床表现、心肌酶学、心电图、冠

脉造影等指标,符合世界卫生组织(WHO)关于冠心病的诊断标准;其中急性心肌梗死(AMI)组50例;稳定性心绞痛(SA)组50例;不稳定性心绞痛(UA)组50例;正常对照组:共入选50例无冠心病者,无既往冠心病史,血常规、血脂、肝肾功能指标均正常,无其他自身免疫性疾病及感染性疾病表现;

[0052] 2、血标本采集:

[0053] 冠心病入选者在PCI术前和术后(72h),无冠心病者任何时间点空腹采集静脉血3ml,1:9的枸橼酸钠抗凝;

[0054] 3、指标检测:

[0055] 3.1、心脏超声:冠心病组每个病人术前术后各做一次心脏超声(急性ST段抬高型心肌梗死术前心脏超声可以不做),无冠心病者也行一次心脏超声检查;

[0056] 3.2、冠心病患者术前、术后、无冠心病者一次心肌酶、CRP、BNP检测;

[0057] 3.3、冠心病患者术前术后、无冠心病者一次TLR9检测;

[0058] 3.3.1、分离PBMCs和制备细胞总RNA所有人选者空腹采集静脉血3ml,以1:9的枸橼酸钠抗凝,加入等体积生理盐水稀释后,以2ml的淋巴细胞分离液按密度梯度离心法分离单个核细胞;收集细胞沉淀,提取细胞总RNA,操作严格按照试剂公司的细胞总RNA抽提试剂盒的说明书进行;分别通过1%琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度仪,检测所得总RNA的质量和浓度;

[0059] 3.3.2、cDNA的合成RNA+DEPC水:11 μ l,RNA量1-5 μ g;Oligle dT:1 μ l;70 $^{\circ}$ C放置5min,冰上放置5min;5 $\times$ RTase Buffer:4 μ l(10 $\times$ RTase Buffer 2 μ l+2 μ l DEPC水);Rnase Inhibitor:1 μ l,dNTP:2 μ l,37 $^{\circ}$ C放置5min;RTase:1 μ l,42 $^{\circ}$ C放置70min,70 $^{\circ}$ C放置10min;所得cDNA-20 $^{\circ}$ C冻存备用;

[0060] 3.3.3、qRT-PCR取0.2ml薄壁PCR管,分别编号;向各管中加入2 $\times$ qPCR TaqMix 12.5 μ l,10uM各基因正反向引物混合物0.5 μ l,对应的cDNA各1 μ l(GAPDH为内参);一管中不加模板用作阴性对照;各管补加水至25 μ l;PCR反应混匀,置于Roche 480荧光定量PCR仪中;95 $^{\circ}$ C5min预变性后,95 $^{\circ}$ C15s,65 $^{\circ}$ C35s(荧光检测),40循环;

[0061] 4、统计学分析:

[0062] 各数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较首先行方差齐性检验,方差不齐,使用非参数检验(Kruskal Wallis test),方差齐采用方差分析,采用SPSS23统计软件对实验数据进行统计学处理; $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

[0063] 本具体实施方式有益效果为:本具体实施方式所述的将TLR9应用于治疗冠状动脉粥样硬化的研究方法;通过用RT-PCR检测冠心病患者和健康者外周血单核细胞中TLR9mRNA的表达水平,明确TLR9与冠心病及其预后有无关系并进一步分析是怎样的关系,经皮冠脉介入治疗对TLR9表达的影响,为冠心病治疗确立新的靶点;并用TLR9拮抗剂和激动剂对ox-LDL造成人脐静脉内皮细胞HUVEC损伤模型进行干预,进一步探讨TLR9在ox-LDL损伤内皮细胞致动脉粥样硬化中的作用及对其干预效果,为寻找AS新的干预药物作一个尝试。

[0064] 具体实施方式二:

[0065] 参看图2,本具体实施方式从细胞实验方面进行研究分析,所述的细胞实验研究步骤如下:

[0066] 1、细胞培养和传代:

[0067] 常规方法复苏冻存的HUVEC,加入含10%胎牛血清、 $1 \times 108 \text{U} \cdot \text{L}^{-1}$ 青霉素、 $1 \times 108 \text{U} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫酸链霉素、 $5 \times 107 \text{U} \cdot \text{L}^{-1}$ 庆大霉素的DMEM培养基,于 37°C 、5% CO_2 培养箱中静置培养,将生长良好的HUVEC用0.5%的胰蛋白酶消化2-3min后,轻轻吹打制成细胞悬液,每周传代培养2~3次;

[0068] 2、细胞分组及给药:

[0069] 采用ox-LDL(终浓度为 $30 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)造成HUVEC损伤模型,药物干预组分别用TLR9的拮抗剂(IRS869)(终浓度为 $1 \mu\text{M}$)和激动剂(ODN1826)(终浓度为 $1 \mu\text{M}$)预处理4h,再继续用含ox-LDL及相应药物的培养基进行培养;

[0070] 3、MTS比色法检测内皮细胞生存活性:

[0071] MTS比色法是常用的检测细胞生存活性、筛选处理因素浓度的方法,活细胞能将MTS还原为一种蓝紫色的甲臢化合物,而死细胞则不能,该甲臢化合物在490nm处有较强的吸收峰,且此吸收峰值与活细胞数成较好的线性关系;具体方法如下:将HUVEC单细胞悬液接种于96孔板,每组设4个复孔,将各组HUVEC细胞进行相应处理后,小心吸掉原培养基,每孔加入MTS检测液(MTS:无血清培养基=1:5)100 μl ,并设空白对照,继续培养30-60min;用多功能酶标仪测定各孔在490nm处的OD值,并通过下列公式计算细胞生存活性:细胞生存活性(%)=(样品孔OD490值-空白孔OD490值)/(对照孔OD490值-空白孔OD490值) $\times 100\%$;

[0072] 4、活细胞成像系统检测内皮细胞线粒体膜电位变化:

[0073] 将HUVEC接种于玻底96孔板,各组细胞进行相应处理并同时加入JC-1线粒体膜电位检测试剂(每100 μl 培养基加入10 μl JC-1检测试剂),在 CO_2 培养箱中 37°C 孵育15min;根据说明书推荐的波长以FITC和TRITC通道于活细胞成像系统中进行动态观察;JC-1染料表现出电势依赖性的积聚在线粒体内,正常线粒体内,JC-1以聚合物的形式聚集在线粒体基质中,发出强烈的红色荧光($\text{Ex}=585 \text{nm}$, $\text{Em}=590 \text{nm}$);损伤的线粒体由于膜电位的下降或丧失,JC-1只能以单体的形式存在于胞浆中,产生绿色荧光($\text{Ex}=514 \text{nm}$, $\text{Em}=529 \text{nm}$);根据颜色的变化直接反映线粒体膜电位的变化,线粒体的去极化程度也可以通过红/绿荧光强度的比例来衡量;

[0074] 5、活细胞成像系统检测内皮细胞钙离子变化:

[0075] 将HUVEC接种于玻底96孔板,各组细胞进行相应处理,加入Fluo-3AM钙离子荧光探针(终浓度为 $1 \mu\text{M}$),在 37°C 避光孵育30min进行荧光探针装载,随后用D-Hank's液洗两遍,加入无血清DMEM培养基继续孵育20min以确保Fluo-3AM在细胞内酯酶的作用下完全转变成Fluo-3,从而被滞留在细胞内和钙离子结合产生较强的荧光;根据说明书推荐使用的激发波长488nm,发射波长为525-530nm,以FITC通道于活细胞成像系统中进行动态观察;

[0076] 6、Western blot检测LOX-1、p38MAPK、pI κ B α 、NF- κ Bp65、pNF- κ Bp65蛋白的表达:

[0077] 将各组HUVEC细胞进行相应处理后,弃去培养基PBS清洗2次,吸干PBS,各皿加入等量细胞裂解液充分裂解后将细胞裂解物移至EP管中,以上操作均在冰上进行。 4°C 、12000g离心20min,收集上清至新的EP管中;应用BCA试剂盒测定上清中蛋白浓度,余加入5x上样缓冲液,100 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴加热5min使蛋白变性,冷却备用。配制SDS聚丙烯酰胺凝胶,各组取等量蛋白样品进行凝胶电泳,90V稳压电泳约30min,待溴酚蓝进入分离胶后,换用120V稳压电泳,至溴酚蓝前缘移动到凝胶底部,取出凝胶;采用半干式转膜,将凝胶内蛋白转入硝酸纤维素膜(NC膜);转膜完毕后取出NC膜,应用封闭液室温封闭3h,将封闭后的NC膜置入使用按

说明书稀释后的相应一抗溶液中,4℃缓慢摇动孵育过夜,TBST水平摇床振荡洗膜3次后,将NC膜置入适量稀释的辣根过氧化物酶标记的二抗溶液中,室温孵育2h。TBST室温洗膜3次;用Odyssey 9120双色红外激光成像系统扫描检测,以相对密度灰度值作为蛋白表达量;

[0078] 7、细胞免疫荧光法检测目的蛋白的表达:

[0079] 将各组HUVEC细胞进行相应处理后,用预冷的PBS洗涤3次,每孔加固定液(甲醇:冰乙酸=3:1)200 μ l,在4℃条件下固定15min,再用预冷的PBS洗涤3次,加穿透液(0.25%聚乙二醇辛基苯基醚+5%二甲基亚砷混合液)1ml,37℃放置5min,再用预冷的PBS洗涤3次,加入FITC标记的二抗50 μ l,37℃孵育1h,荧光显微镜下拍照观察;

[0080] 8、ELISA法检测内皮细胞培养上清MCP-1、sICAM-1、sVCAM-1水平:

[0081] 将各组HUVEC细胞进行相应处理后,取各组细胞培养上清,1000rpm离心2min去除细胞碎片,取上清进行指标检测,操作步骤严格按照说明书进行;

[0082] 9、统计学分析:

[0083] 各数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较首先行方差齐性检验,方差不齐,使用非参数检验(Kruskal Wallis test),方差齐采用方差分析,采用SPSS23统计软件对实验数据进行统计学处理; $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

[0084] 以上所述,仅用以说明本发明的技术方案而非限制,本领域普通技术人员对本发明的技术方案所做的其它修改或者等同替换,只要不脱离本发明技术方案的精神和范围,均应涵盖在本发明的权利要求范围当中。

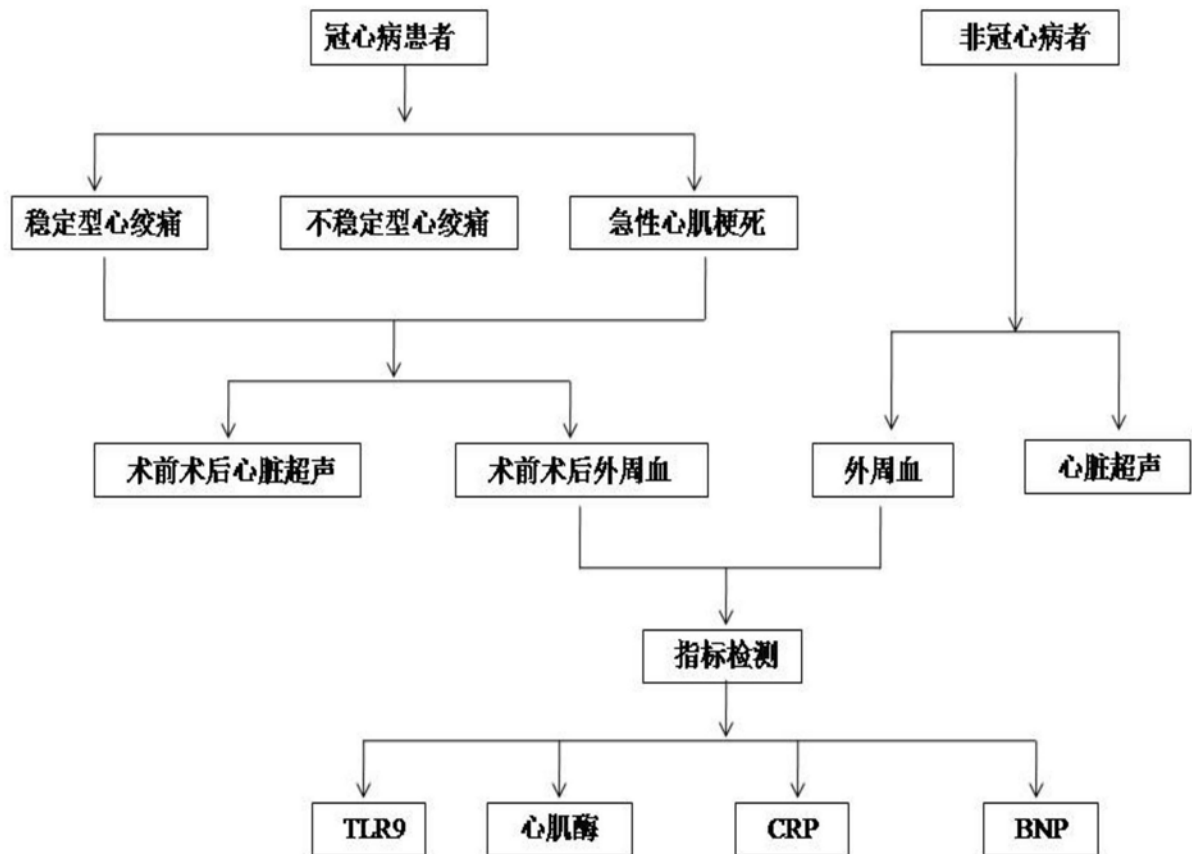


图1

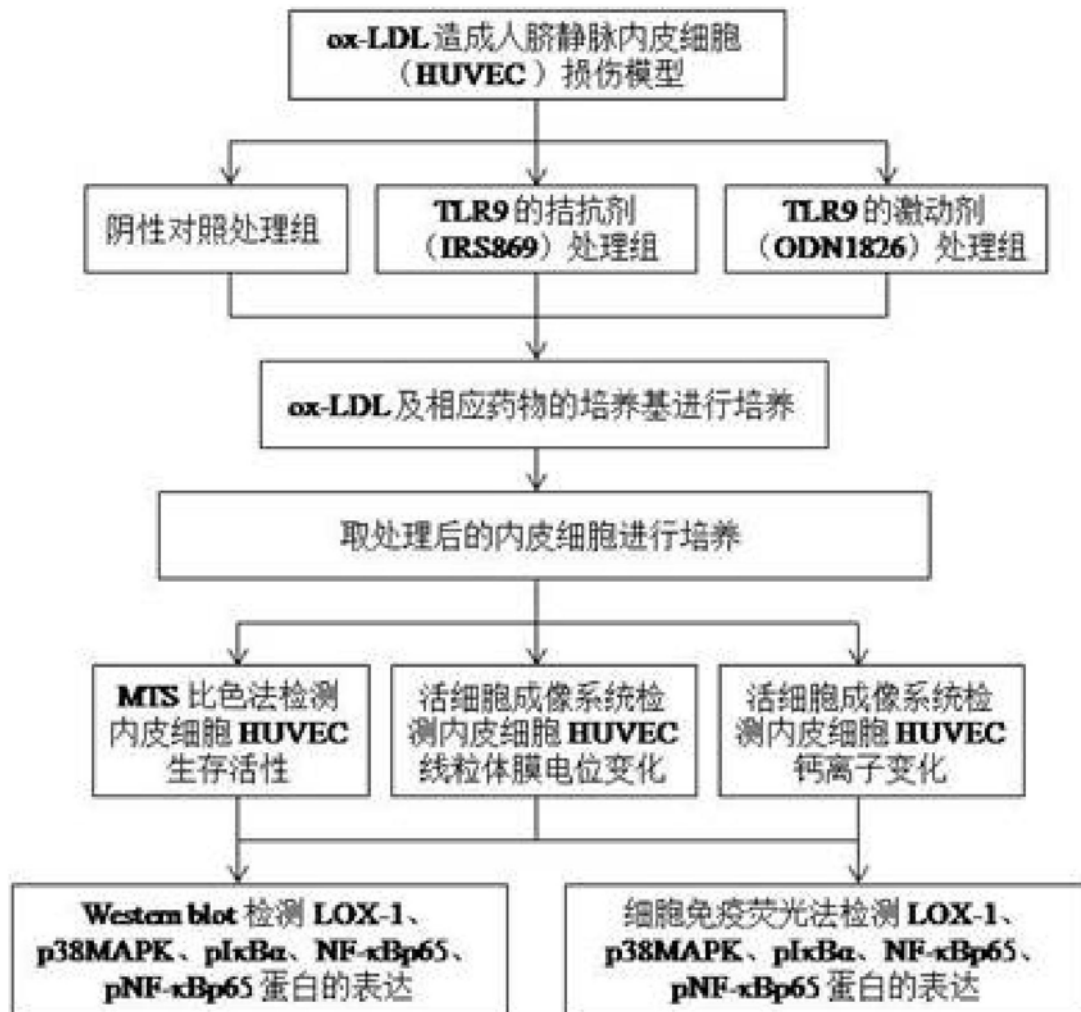


图2

专利名称(译)	一种将TLR9应用于治疗冠状动脉粥样硬化的研究方法		
公开(公告)号	CN108546750A	公开(公告)日	2018-09-18
申请号	CN201810324827.6	申请日	2018-04-12
[标]发明人	吴曼 朱晓雷		
发明人	吴曼 朱晓雷		
IPC分类号	C12Q1/6883 C12Q1/02 G01N33/533 G01N33/68		
CPC分类号	C12Q1/6883 C12Q2600/118 C12Q2600/158 G01N33/5005 G01N33/533 G01N33/6893 G01N2800/323		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种将TLR9应用于治疗冠状动脉粥样硬化的研究方法，本发明涉及医疗技术领域；研究对象及分组；血标本采集；指标检测：心脏超声；冠心病患者术前、术后、无冠心病者一次心肌酶、CRP、BNP检测；冠心病患者术前术后、无冠心病者一次TLR9检测；统计学分析。通过用RT-PCR检测冠心病患者和健康者外周血单核细胞中TLR9 mRNA的表达水平，明确TLR9与冠心病及其预后有无关系并进一步分析是怎样的关系，经皮冠脉介入治疗对TLR9表达的影响，为冠心病治疗确立新的靶点。

