



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104422761 A

(43) 申请公布日 2015. 03. 18

(21) 申请号 201310405870. 2

(22) 申请日 2013. 09. 09

(71) 申请人 李立

地址 401147 重庆市渝北区加州花园 A2 栋
10-1

(72) 发明人 李立

(74) 专利代理机构 上海卓阳知识产权代理事务
所(普通合伙) 31262

代理人 曹翠娟

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006. 01)

G01N 21/64(2006. 01)

G01N 33/533(2006. 01)

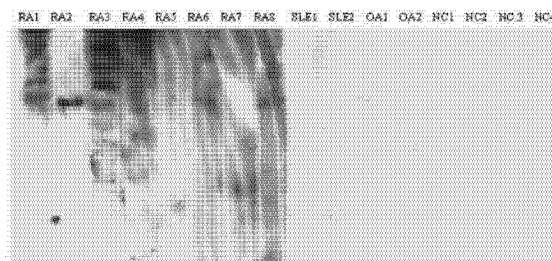
权利要求书1页 说明书11页 附图3页

(54) 发明名称

成纤维样滑膜细胞在制备类风湿关节炎诊断
试剂中的应用

(57) 摘要

本发明提供了成纤维样滑膜细胞在制备类风湿关节炎诊断试剂如试剂盒、细胞芯片中的应用。证实了 RA 患者血清中存在能与成纤维样滑膜细胞结合的特异性抗体。建立了以成纤维样滑膜细胞为底物抗原的间接免疫荧光方法和细胞芯片检测方法,对 RA 的诊断具有较高的敏感性和特异性,为 RA 的诊断提供了新的诊断试剂和方法。



1. 成纤维样滑膜细胞在制备类风湿关节炎诊断试剂中的应用。
2. 根据权利要求 1 所述的应用,其特征在于,所述的成纤维样滑膜细胞是体外培养的人成纤维样滑膜细胞。
3. 成纤维样滑膜细胞在制备类风湿关节炎诊断试剂盒中的应用。
4. 根据权利要求 3 所述的应用,其特征在于,所述的诊断试剂盒中包括体外培养的人成纤维样滑膜细胞及间接免疫荧光检测法所用的其他试剂。
5. 根据权利要求 4 所述的应用,其特征在于,所述的间接免疫荧光检测法的步骤为:
 - (1) 将体外培养的人成纤维样滑膜细胞固定;
 - (2) 用含 BSA 的 PBS 封闭液封闭;
 - (3) 取待测血清孵育固定的成纤维样滑膜细胞;
 - (4) Cy3 标记的羊抗人 IgG 二抗孵育;
 - (5) DAPI 溶液染核;
 - (6) 荧光显微镜观察,类风湿关节炎患者血清孵育的成纤维样滑膜细胞胞浆均匀着色,其他患者及正常人血清孵育的成纤维样滑膜细胞胞浆均不着色。
6. 根据权利要求 5 所述的应用,其特征在于,所述的荧光显微镜观察条件为:使用铬滤光片,激发波长 554nm,发射波长 570nm。
7. 成纤维样滑膜细胞在制备类风湿关节炎诊断细胞芯片中的应用。
8. 根据权利要求 7 所述的应用,其特征在于,所述的细胞芯片中固定有体外培养的人成纤维样滑膜细胞。
9. 根据权利要求 7 或 8 所述的应用,其特征在于,所述的细胞芯片的制备方法为:
 - (1) 应用点样仪软件设计矩阵,确定点间距、点样顺序、点样坐标,每个样本设置 3 个复孔;
 - (2) 选择经预处理的玻片作为基片,将浓度为 $1 \times 10^3/\text{mL}$ 的成纤维样滑膜细胞悬液应用点样仪加到基片中,干燥过夜;
 - (3) 将点样后的基片放置到湿盒中,37℃ 恒温水浴固定 2 小时;
 - (4) 封闭并洗涤基片,置于 4℃ 保存备用。
10. 根据权利要求 7 或 8 所述的应用,其特征在于,所述的细胞芯片的使用方法是:取待测血清加入细胞芯片矩阵反应,经过洗涤,然后与 Cy3 标记的抗人 IgG 二抗反应,再次洗涤后,用激光共聚焦扫描仪进行扫描荧光强度,最后根据标准曲线用 Quant Anlysis 分析待测血清中抗成纤维样滑膜细胞抗体浓度,再与 cutoff 值比较,判断待测血清是否为阳性。

成纤维样滑膜细胞在制备类风湿关节炎诊断试剂中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及类风湿关节炎诊断试剂技术,具体地说,是成纤维样滑膜细胞在制备类风湿关节炎诊断试剂中的应用,属于医学领域。

背景技术

[0002] 类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种系统性自身免疫性疾病,主要累及周围关节,表现为慢性、对称性、进行性关节炎。RA 的病理改变最初表现为关节滑膜增生,并逐渐向软骨、骨及周围肌腱侵犯,最终导致关节破坏、关节畸形及功能丧失。RA 多发于中年女性,患病率在我国为 0.32%~0.36%,在欧美国家则高达 1%。RA 的病因目前尚不清楚,主要与感染因素、遗传因素及激素水平改变有关,其临床表现主要以关节症状为主,表现为晨僵、关节痛、关节肿胀及关节畸形。关节外表现主要包括类风湿结节、类风湿血管炎及肺损坏、肾脏损坏和心脏损坏。RA 的诊断主要依据美国风湿病学会 1987 年 RA 分类标准:(1)晨僵持续 1 小时,病程至少 6 周;(2)有 3 个或 3 个以上的关节肿,至少 6 周;(3)腕、掌指、近端关节肿,至少 6 周;(4)对称性关节肿,至少 6 周;(5)有皮下结节;(6)手 X 线改变;(7)血清类风湿因子(RF)升高;满足 4 条或 4 条以上并排除其他关节炎即可诊断为 RA。2012 年最新的美国风湿病学会 RA 分类标准中添加了抗环瓜氨酸肽抗体(抗 CCP 抗体)作为 RA 诊断的检测指标。从上述 RA 诊断标准看,该疾病的诊断主要依靠临床表现结合放射性检查及实验室检测指标。在已知的 RA 相关的自身抗体当中,类风湿因子敏感性为 60%~70%,特异性为 86%;抗角蛋白抗体(AKA)敏感性为 44%~73%,特异性为 90%;抗核周因子抗体(APF)敏感性为 48%~66%,特异性为 92%;抗聚角蛋白微丝蛋白抗体(AFA)敏感性为 47%~69%,特异性为 93%;抗 CCP 抗体敏感性为 47%~82%,特异性为 96%。虽然这些 RA 实验室检测指标已经达到相当高的敏感性和特异性,但据统计,在 RA 当中仍有 20% 左右患者呈 RF 和 CCP 双阴性,所以,寻求敏感性和特异性更高的 RA 检测指标及方法,仍是该疾病临床研究的重点课题。

[0003] 上述的自身抗体检测都是以特定蛋白或多肽为抗原底物,通过抗原抗体反应的原理设计检测血清中针对该蛋白或多肽的抗体。这些抗原底物的来源主要通过分离提纯、重组表达或体外化学合成(多肽)获得,通过上述方法获得的抗原底物与体内天然存在的抗原在理化性质、生物活性或空间构象上存在一定差异,应用这样得到的抗原底物对其血清抗体进行检测会不可避免的造成误差。为避免上述问题,研究者采用间接免疫荧光的方法对疾病进行定性诊断。该方法是将某种特定细胞为底物抗原固定在固相载体上,如载玻片,将待测血清与其反应,再通过带荧光的抗人 IgG 二抗与血清中能和细胞反应的抗体结合,从而在荧光显微镜下观察荧光强度来判断血清中含抗该细胞抗体多少,与标准阳性血清或阴性血清比较,从而判断待测血清的阴阳性。因为该方法操作简便,判断直观,在临床上得到广泛应用。

[0004] 抗细胞抗体在临床上应用较多的有如下检测:(1)抗内皮细胞抗体检测是以人脐静脉内皮细胞为底物抗原,用于白色病(BD)的辅助诊断;其在 BD 中的敏感性为 54.8%,特异

性为 87.2%；而在系统性红斑狼疮(SLE)、系统性硬化症(SSc)及 RA 中阳性率分别为 8%、9% 及 10%；(2) 抗巨核细胞抗体检测是以人巨核细胞为底物抗原，主要用于 SLE 的辅助诊断；(3) 抗人肾脏集合管细胞抗体检测主要用于肾脏疾病的辅助诊断；(4) 抗壁细胞抗体检测主要用于恶性贫血的辅助诊断。

[0005] 蛋白芯片具有高通量、平行检测、自动化等优点，为简便、快速、同时检测多种自身抗体问题的解决带来了希望，在临床疾病诊断等领域中发挥了重要的作用。既往的蛋白芯片在制备过程中所点的样都是特定的抗原(用其来检测特异性抗体)，其来源大多数为通过基因工程方法重组表达而成。重组表达的蛋白抗原，无论是原核或真核表达，其蛋白产物在理化性质、生物学活性或免疫学性质上与天然存在的蛋白之间多少存在差异，这样会导致用该蛋白检测人体特异性抗体的时候产生误差。直接用原代培养的细胞作为底物，由于细胞中表达的蛋白与体内细胞比较相差最小，在针对检测该细胞蛋白抗体时比重组表达的蛋白更具优势。现有技术中尚无采用一定数量的成纤维样滑膜细胞点样来检测血清中相应抗体含量从而对 RA 进行实验室诊断的报道。

[0006] RA 发病机制至今尚不明确，据研究报道可能参与 RA 疾病发生的细胞多达十余种。其中，目前得到公认的是 CD4⁺T 细胞，尤其是 Th17 细胞被认为在 RA 发病中起主要作用。而其他效应细胞，如成纤维样滑膜细胞、软骨细胞、肥大细胞、巨噬细胞等在 RA 发病机制中也扮演不同角色。然而就 RA 而言，现有技术中未公开哪种细胞蛋白能作为抗原底物通过检测患者血清中抗体达到辅助诊断的目的，且很多细胞参与 RA 疾病发生并非通过抗体发挥作用。已知的人体内细胞的种类不计其数，在 RA 中如何寻找一种细胞，针对其蛋白底物进行自身抗体检测以建立具有高度敏感性和特异性的辅助诊断方法仍是本领域的难点。

[0007] 正常滑膜衬里层细胞包括巨噬细胞样滑膜细胞、成纤维样滑膜细胞(fibroblast-like synovial cells, 简称 FLS) 和树突状滑膜细胞。在 RA 发病机制中，一致认为成纤维样滑膜细胞的过度增生和对软骨的破坏是造成关节病理改变的根本原因，它是参与 RA 滑膜炎反应的效应细胞，但就成纤维样滑膜细胞在制备 RA 诊断试剂中的应用却未见报道，对于本领域技术人员来说，成纤维样滑膜细胞能用于诊断 RA 也是非显而易见的。

发明内容

[0008] 本发明的目的是针对现有技术中的不足，提供成纤维样滑膜细胞在制备类风湿关节炎诊断试剂中的应用。

[0009] 本发明的再一的目的是，提供一种成纤维样滑膜细胞在制备类风湿关节炎诊断试剂盒中的应用。

[0010] 本发明的另外的目的是，提供一种成纤维样滑膜细胞在制备类风湿关节炎诊断细胞芯片中的应用。

[0011] 为实现上述目的，本发明采取的技术方案是：

成纤维样滑膜细胞在制备类风湿关节炎诊断试剂中的应用。

[0012] 所述的成纤维样滑膜细胞是体外培养的人成纤维样滑膜细胞。

[0013] 为实现上述第二个目的，本发明采取的技术方案是：

成纤维样滑膜细胞在制备类风湿关节炎诊断试剂盒中的应用。

[0014] 所述的诊断试剂盒中包括体外培养的人成纤维样滑膜细胞及间接免疫荧光检测法所用的其他试剂。

[0015] 所述的间接免疫荧光检测法的步骤为：

- (1) 将体外培养的人成纤维样滑膜细胞固定；
- (2) 用含 BSA 的 PBS 封闭液封闭；
- (3) 取待测血清孵育固定的成纤维样滑膜细胞；
- (4) Cy3 标记的羊抗人 IgG 二抗孵育；
- (5) DAPI 溶液染核；
- (6) 荧光显微镜观察, 类风湿关节炎患者血清孵育的成纤维样滑膜细胞胞浆均匀着色, 其他患者及正常人血清孵育的成纤维样滑膜细胞胞浆均不着色。

[0016] 所述的荧光显微镜观察条件为: 使用铬滤光片, 激发波长 554nm, 发射波长 570nm。

[0017] 为实现上述第三个目的, 本发明采取的技术方案是：

成纤维样滑膜细胞在制备类风湿关节炎诊断细胞芯片中的应用。

[0018] 所述的细胞芯片中固定有体外培养的人成纤维样滑膜细胞。

[0019] 所述的细胞芯片的制备方法为：

- (1) 应用点样仪软件设计矩阵, 确定点间距、点样顺序、点样坐标, 每个样本设置 3 个复孔；
- (2) 选择经预处理的玻片作为基片, 将浓度为 $1 \times 10^3/\text{mL}$ 的成纤维样滑膜细胞悬液应用点样仪加到基片中, 干燥过夜；
- (3) 将点样后的基片放置到湿盒中, 37°C 恒温水浴固定 2 小时；
- (4) 封闭并洗涤基片, 置于 4°C 保存备用。

[0020] 所述的细胞芯片的使用方法为: 取待测血清加入细胞芯片矩阵反应, 经过洗涤, 然后与 Cy3 标记的抗人 IgG 二抗反应, 再次洗涤后, 用激光共聚焦扫描仪进行扫描荧光强度, 最后根据标准曲线用 Quant Anlysis 分析待测血清中抗成纤维样滑膜细胞抗体浓度, 再与 cutoff 值比较, 判断待测血清是否为阳性。

[0021] 本发明优点在于：

本发明提供了成纤维样滑膜细胞在制备类风湿关节炎诊断试剂如试剂盒、细胞芯片中的应用；证实了 RA 患者血清中存在能特异性与成纤维样滑膜细胞结合的抗体；建立了以成纤维样滑膜细胞为底物抗原的间接免疫荧光方法和细胞芯片检测方法, 具备高通量、自动化操作的特点, 对 RA 的诊断具有较高的敏感性和特异性, 为 RA 的诊断提供了新的诊断试剂和方法。

附图说明

[0022] 附图 1 是用特异性标记 CD55 鉴定原代培养的成纤维样滑膜细胞, 图 A 为 CD55 染色, 表现为细胞浆着色; 图 B 为 DAPI 染色显示细胞核; 图 C 为 A+B 叠加后的图片, 同时显示细胞核和 CD55 显色。

[0023] 附图 2 是不同患者及正常人血清与成纤维样滑膜细胞蛋白 Western-Blot 图, 分别是 RA 患者血清(RA1-RA8)、SLE 患者血清(SLE1-SLE2)、OA 患者血清(OA1-OA2) 及正常人血清(NC1-NC4)。

[0024] 附图 3 是 RA 患者、SLE 患者、OA 患者及正常人血清孵育成纤维样滑膜细胞间接免疫荧光图。

[0025] 附图 4 是人 IgG 标准品浓度与荧光强度之间的线性关系。

[0026] 附图 5 是用特异性标记 CII 鉴定原代培养的软骨细胞,图 A 为 CII 染色,表现为细胞胞浆着色;图 B 为 DAPI 染色显示细胞核;图 C 为 A+B 叠加后的图片,同时显示细胞核和 CII 显色。

[0027] 附图 6 是 RA 患者及正常人血清与软骨细胞蛋白的 Western-Blot 图, A 图表示 RA 患者血清, B 图表示正常人血清。

[0028] 附图 7 是 RA 患者血清和正常人血清孵育的软骨细胞胞浆着色情况, A 图表示 RA 患者血清, B 图表示正常人血清。

[0029] 附图 8 是 RA 患者及正常人血清与 Th17 细胞蛋白的 Western-Blot 图, A 图表示 RA 患者血清, B 图表示正常人血清。

具体实施方式

[0030] 下面结合附图对本发明提供的具体实施方式作详细说明。

[0031] 实施例 1

一、人成纤维样滑膜细胞的分离鉴定及原代培养

1、滑膜来源

滑膜取自膝关节置换或滑膜切除术的 RA 患者,患者诊断符合 1987 年美国风湿病学会分类标准。

[0032] 2、滑膜细胞分离培养

将术中取得的滑膜组织用无菌剪剪碎,用 1.0 mg/mL I 型胶原酶(GIBCO)在 37℃下消化 4h,离心收集细胞,加入含有 20%胎牛血清的 DMEM 培养液(GIBCO),置于 37℃、5%CO₂ 孵箱中贴壁生长。细胞生长到 80% 培养瓶底部时,用 0.25% 胰酶(Sigma)进行消化,小牛血清终止,0.01M PBS 洗涤离心,收集细胞,传代培养。经传代以后滑膜细胞迅速增殖,1 代以后成纤维样滑膜细胞比例逐渐增加,至第 3 代可占视野内细胞 95% 以上(张鹏,石关桐. 膝关节炎滑膜细胞体外培养及生物学特性观察. 中国骨伤,2006,19(11):656-658)。本实验均采用第 3 代成纤维样滑膜细胞。

[0033] 3、成纤维样滑膜细胞的鉴定

培养皿吸去上清,用甲醇在 -20℃ 下固定 10 分钟。用 0.01M PBS 洗涤 3 次,羊血清封闭 30 分钟,0.01M PBS 洗涤 3 次,每次 5 分钟。用成纤维样滑膜细胞特异性标记 CD55 (M D Smith, E Barg, H Weedon. Microarchitecture and protective mechanisms in synovial tissue from clinically and arthroscopically normal knee joints. Ann Rheum Dis 2003, 62: 303-307) 单克隆抗体(Abcam)按照 1:1000 稀释后室温孵育 1 小时,0.01M PBS 洗涤 3 次,每次 5 分钟。用 Cy3 标记的抗小鼠 IgG 二抗按照 1:2000 稀释,室温孵育 30 分钟,0.01M PBS 洗涤 3 次,每次 5 分钟。最后用 1:10000 稀释的 DAPI 染细胞核,洗涤完成后加入防荧光淬灭剂封片,在荧光显微镜下观察。结果见图 1,结果证实从滑膜分离培养后获得的细胞为成纤维样滑膜细胞。

[0034] 二、证实人血清中存在抗成纤维样滑膜细胞抗体

1、成纤维样滑膜细胞蛋白提取

(1) 倒掉培养液,培养瓶倾斜放置 1~2 分钟,残余培养液用移液管吸走。

[0035] (2) 每瓶细胞加 3mL 4℃预冷的 0.01M PBS。平放轻轻摇动 1 分钟以洗涤细胞,然后弃去洗液。共洗细胞三次,将 PBS 弃净后把培养瓶置于冰上。

[0036] (3) 每瓶细胞中加入 200μL Pierce 裂解液(预先加入蛋白酶抑制剂 PMSF),静置 20 分钟;在 10000g、4℃下离心 20 分钟,保留上清。将离心后的上清测定浓度后,分装,放于-80℃保存。

[0037] 2、上样及电泳

(1) 在成纤维样滑膜细胞蛋白样品中加入 2×SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液,混匀后 100℃沸水浴加热 35 分钟,使蛋白充分变性。

[0038] (2) 变性后的蛋白冷却到室温后,把蛋白样品直接上样到 SDS-PAGE 胶加样孔内,使用 Bio-Rad 的电泳装置,恒压设置 100V,溴酚蓝到达胶的底端处附近停止电泳。

[0039] 3、转膜

采用 PVDF 膜,将 PVDF 膜分别浸于甲醇 15 秒、纯水 3 分钟、转移缓冲液 15 分钟预处理;凝胶浸泡于电泳缓冲液 5 分钟;在 Bio-Rad 的标准湿式转膜装置,设定转膜电流为 300mA,转膜时间为 60 分钟。转完膜后,用丽春红染色液对膜进行染色,以观察实际的转膜效果,同时通过其显示条带将每份蛋白样品剪开,以便于孵育不同血清。

[0040] 4、封闭

转膜完毕后,用洗涤液将膜洗 3 次,每次 3 分钟;洗涤完成后将膜加入脱脂奶粉配成的封闭液中,4℃封闭过夜。

[0041] 5、血清孵育

RA 患者、骨关节炎(osteoarthritis,简称 OA)患者、系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus,简称 SLE)患者及正常人(NC)的血清按照 1:200 浓度稀释后加入到湿转后的 PVDF 膜,室温,在水平摇床上轻微震荡孵育 1 小时。孵育结束后,用洗涤液洗涤 6 次,每次 10 分钟,以减轻背景。

[0042] 6、二抗孵育

采用辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗人 IgG 二抗,按照 1:10000 浓度稀释后,室温,在水平摇床上轻微震荡孵育 30 分钟。孵育结束后,用洗涤液洗涤 6 次,每次 10 分钟,以减轻背景。

[0043] 7、化学发光及 X 片显影

在 PVDF 膜上加入化学发光底物(Thermo)后在暗盒中进行曝光,在自行配制的显影液和定影液进行手工洗片。结果见图 2,与 RA 患者血清孵育的 PVDF 膜上能显示多条反应条带,而与 SLE、OA 及正常人(NC)血清孵育的 PVDF 膜上在相同条件下不能显示相应条带,该结果说明 RA 患者血清中存在能特异性与成纤维样滑膜细胞蛋白反应的抗体。

[0044] 三、抗成纤维样滑膜细胞抗体检测方法的建立——间接免疫荧光法

1、成纤维样滑膜细胞的固定

将获得的第 3 代成纤维样滑膜细胞在胰酶消化后,制得单细胞悬液,铺于 96 孔板上,每孔 100μL,37℃培养过夜,吸去培养液,经过 PBS 洗涤 3 次后,每孔加入 95% 乙醇(或甲醇、5%冰醋酸)200μL,4℃固定 20 分钟。固定后的细胞去掉固定液后再经 PBS 洗涤 3 次后,拍干,

置于一 20℃保存备用。

[0045] 2、封闭

每孔用含 3% BSA 的 0.01M PBS 封闭液 100uL 在室温下,封闭 1 小时。完成后,弃去封闭液,洗涤液漂洗 3 次,每次 5 分钟。

[0046] 3、血清孵育

分别取 RA 患者、SLE 患者、OA 患者及正常人血清按照 1:100 倍稀释,在固定了成纤维样滑膜细胞的 96 孔板中,每孔加入上述稀释后血清 100uL,室温孵育 1 小时。孵育完成后,吸去血清,拍干,洗涤液洗涤 6 次,每次 3 分钟。

[0047] 4、Cy3 标记的羊抗人 IgG 二抗孵育

每孔加入 100uL,1:1000 稀释浓度的 Cy3 标记的羊抗人 IgG,室温孵育 30 分钟。完成后,弃去封闭液,洗涤液漂洗 6 次,每次 5 分钟。

[0048] 5、染核

将 1:10000 稀释的 DAPI 溶液 100uL 加入各孔中,常温反应 30 分钟。反应结束后用洗涤液漂洗 3 次,每次 5 分钟。加盖盖玻片封片后荧光显微镜下观察。

[0049] 6、荧光显微镜观察

使用铬滤光片,激发波长 554nm、发射波长 570nm 条件下观察 Cy3 荧光强度。结果见图 3,用 RA 患者血清孵育的成纤维样滑膜细胞胞浆均匀着色(红色),而用 SLE 患者、OA 患者及正常人血清孵育的成纤维样滑膜细胞胞浆均不着色。

[0050] 四、抗成纤维样滑膜细胞抗体细胞芯片检测方法的建立

1、细胞芯片的制备

(1) 矩阵设计:

应用点样仪 ProSys 5510 软件设计矩阵,确定点间距,点样顺序,点样坐标等指标,每个样本设置 3 个复孔。

[0051] (2) 点样:

选择经预处理的玻片作为基片,将浓度为 1×10^3 /mL 的成纤维样滑膜细胞悬液应用点样仪加到基片中,干燥过夜。

[0052] (3) 固定:

将点样后的基片放置到湿盒中,37℃恒温水浴固定 2 小时。

[0053] (4) 封闭:

采用 1%BSA 溶液,每矩阵加入 50uL,放置到湿盒中,37℃恒温水浴封闭半小时;0.1%TBST 洗涤 3 次,每次 15 分钟;封闭洗涤后的基片置于 4℃保存备用。

[0054] 2、标准曲线的建立

(1) 标准品点样:按照 50ng/mL、5ng/mL、2.5ng/mL、1.25ng/mL、0.625ng/mL 五个浓度梯度的纯化人 IgG 加入到矩阵相应位置;37℃反应 30 分钟;

(2) 洗涤:PBST 洗涤 3 次,每次 10 分钟;

(3) 荧光二抗:选择浓度为 0.2ng/mL Cy3 标记的抗人 IgG 二抗,37℃反应 30 分钟;

(4) 洗涤:PBST 洗涤 3 次,每次 10 分钟;

(5) 扫描及绘制标准曲线:应用美国 Innopsys 公司 Innoscan 710 激光共聚焦扫描仪进行扫描,将扫描后得到的结果经 Quant Anlysis 分析各个标准品荧光强度,输入

Excel 软件,进行线性回归分析,得到标准曲线,结果见图 4,线性方程为 $y=1.692x+11.804$, $R^2=0.9925$ 。

[0055] 3、待测血清抗成纤维样滑膜细胞抗体浓度检测

- (1) 待测血清用 1:200 稀释后,每份血清 50 μ L 加入矩阵,37℃反应 30 分钟;
- (2) 洗涤:PBST 洗涤 3 次,每次 10 分钟;
- (3) 荧光二抗:选择浓度为 0.2ng/mL Cy3 标记的抗人 IgG 二抗,37℃反应 30 分钟;
- (4) 洗涤:PBST 洗涤 3 次,每次 10 分钟;

(5) 扫描及根据标准曲线计算待测样本抗体含量:应用美国 Innopsys 公司 Innoscan 710 激光共聚焦扫描仪进行扫描,将扫描后得到的结果经 Quant Anlysis 分析各个待测血清样本荧光强度,根据标准曲线计算待测血清样本中抗体的含量。24 例 RA 患者(RA1-RA24)及 24 例正常人(NC1-NC24)血清荧光强度检测结果见表 1,按照图 4 得到的标准曲线公式进行计算,定量得到待测血清抗成纤维样滑膜细胞抗体浓度,结果见表 2。

[0056] 表 1 RA 患者及正常人血清荧光强度

样本	RA1	RA2	RA3	RA4	RA5	RA6	RA7	RA8	RA9	RA10	RA11	RA12
荧光强度	31.5	64.4	46.1	35.2	51.3	51.3	72.1	56.2	42.0	48.2	55.8	62.9
样本	RA13	RA14	RA15	RA16	RA17	RA18	RA19	RA20	RA21	RA22	RA23	RA24
荧光强度	58.3	91.4	56.3	40.9	53.7	64.2	52.6	55.5	48.8	34.2	60.1	43.0
样本	NC1	NC2	NC3	NC4	NC5	NC6	NC7	NC8	NC9	NC10	NC11	NC12
荧光强度	13.3	14.3	15.6	32.4	30.2	34.5	16.0	26.7	45.9	25.2	29.2	25.3
样本	NC13	NC14	NC15	NC16	NC17	NC18	NC19	NC20	NC21	NC22	NC23	NC24
荧光强度	23.5	33.3	18.4	25.5	14.4	20.4	12.7	35.2	18.4	33.2	19.3	20.4

表 2 血清样本中抗成纤维样滑膜细胞抗体浓度

样本	RA1	RA2	RA3	RA4	RA5	RA6	RA7	RA8	RA9	RA10	RA11	RA12
抗体浓度 (ng/mL)	11.6	31.1	20.3	13.8	23.3	23.3	35.6	26.2	17.8	21.5	26.0	30.2
样本	RA13	RA14	RA15	RA16	RA17	RA18	RA19	RA20	RA21	RA22	RA23	RA24
抗体浓度 (ng/mL)	27.5	47.0	26.3	17.2	24.8	31.0	24.1	25.8	21.9	13.2	28.5	18.4
样本	NC1	NC2	NC3	NC4	NC5	NC6	NC7	NC8	NC9	NC10	NC11	NC12
抗体浓度 (ng/mL)	0.88	1.48	2.24	12.2	10.9	13.4	2.48	8.81	20.2	7.92	10.3	7.98
样本	NC13	NC14	NC15	NC16	NC17	NC18	NC19	NC20	NC21	NC22	NC23	NC24
抗体浓度 (ng/mL)	6.91	12.7	3.90	8.09	1.53	5.08	0.53	13.8	3.90	12.6	4.43	5.08

五、抗成纤维样滑膜细胞抗体检测在 RA 诊断中的价值评价

1、应用间接免疫荧光检测抗成纤维样滑膜细胞抗体对 RA 进行定性诊断

(1) 基本原理:采用阳性血清与阴性血清与待测血清共同孵育的方法,待测血清荧光强度与二者进行比较,大于或等于阳性血清的即为阳性,小于或等于阴性血清的即为阴性。

[0057] (2) 阳性血清及阴性血清的界定:在固定好成纤维样滑膜细胞的 96 孔板中,应用 48 个诊断明确的 RA 患者(RA1-RA48)血清及 48 个正常人(NC1-NC48)血清,按照间接免疫

荧光法,与固定在 96 孔板中的成纤维样滑膜细胞反应,结果在荧光显微镜下观察,每个孔所得到的荧光强度结果如表 3 所示。通过受试者工作曲线(ROC)确定血清荧光强度 cutoff 值,如表 4 所示,在此基础上,选择荧光强度稍高于 cutoff 值血清为阳性血清,即 21 号 RA 血清(荧光强度 4.9),即待测血清荧光强度高于该血清荧光强度则为阳性;选择荧光强度稍低于 cutoff 值血清为阴性血清,即 14 号 NC 血清(荧光强度 4.88),即待测血清荧光强度低于该血清荧光强度则为阴性。

[0058] 表 3 RA 患者及正常人血清荧光强度

样本	RA1	RA2	RA3	RA4	RA5	RA6	RA7	RA8	RA9	RA10	RA11	RA12
荧光强度	9.15	9.44	7.46	3.50	5.03	5.65	7.12	5.37	4.19	4.81	8.33	7.32
样本	RA13	RA14	RA15	RA16	RA17	RA18	RA19	RA20	RA21	RA22	RA23	RA24
荧光强度	8.35	9.14	6.65	5.09	5.29	6.33	7.28	5.44	4.90	3.41	7.15	6.85
样本	RA25	RA26	RA27	RA28	RA29	RA30	RA31	RA32	RA33	RA34	RA35	RA36
荧光强度	8.03	4.33	5.55	3.60	6.22	6.34	6.03	6.74	4.59	5.26	9.24	5.39
样本	RA37	RA38	RA39	RA40	RA41	RA42	RA43	RA44	RA45	RA46	RA47	RA48
荧光强度	9.66	8.58	6.34	4.26	4.59	6.04	5.55	6.29	5.32	4.29	6.88	7.53
样本	NC1	NC2	NC3	NC4	NC5	NC6	NC7	NC8	NC9	NC10	NC11	NC12
荧光强度	4.22	4.50	3.04	2.85	3.02	3.97	4.15	3.54	4.22	3.70	2.29	4.02
样本	NC13	NC14	NC15	NC16	NC17	NC18	NC19	NC20	NC21	NC22	NC23	NC24
荧光强度	4.18	4.88	2.77	2.84	3.22	4.09	4.28	3.58	3.88	3.15	3.32	4.38
样本	NC25	NC26	NC27	NC28	NC29	NC30	NC31	NC32	NC33	NC34	NC35	NC36
荧光强度	4.82	3.17	3.19	4.02	3.72	4.33	3.99	3.15	2.88	2.80	5.01	3.81
样本	NC37	NC38	NC39	NC40	NC41	NC42	NC43	NC44	NC45	NC46	NC47	NC48
荧光强度	4.11	3.66	3.03	3.12	4.17	4.23	2.45	3.11	4.39	4.22	3.85	3.36

表 4 间接免疫荧光检测荧光强度 ROC 曲线分析

Cutoff 值	敏感性 (%)	95%CI	特异性 (%)	95%CI
4.89	79.17	65.01-89.53	97.92	88.93-99.95

(3) 定性方法在 RA 诊断中的敏感性及特异性：

根据表 4 的结果,通过荧光强度的区别,敏感性为 79.17%,特异性为 97.92%,其敏感性和特异性均高于 RF (文献报道 RF 敏感性、特异性分别为 70% 及 86% 左右),而特异性高于 CCP (文献报道 CCP 为 96% 左右),敏感性与 CCP 相当(文献报道 CCP 为 80% 左右)。

[0059] 2、应用细胞芯片检测抗成纤维样滑膜细胞抗体对 RA 进行定量诊断

(1) 基本原理:按照前述细胞芯片检测方法,通过抗人 IgG 标准品得到的标准曲线、待测血清荧光强度,经过计算获得血清中抗体浓度,从而实现待测血清中抗体浓度的定量检测。同时经过 ROC 曲线分析,获得 cutoff 值,从而实现对 RA 的定量诊断,即待测血清抗体浓度高于 cutoff 值视为阳性,低于 cutoff 值视为阴性。

[0060] (2) 阳性判断 Cutoff 值的设定:将表 2 的结果应用 ROC 曲线进行分析,将获得敏

感性 % + 特异性 % 之和最大时的抗体浓度设定为阳性 cutoff 值, 结果见表 5。

[0061] 表 5 细胞芯片检测抗体浓度 ROC 曲线分析

Cutoff 值	敏感性 (%)	95%CI	特异性 (%)	95%CI
15.51	87.5	67.64-97.34	95.83	78.88-99.89

(3) 定量方法在 RA 诊断中的敏感性 & 特异性：

根据表 5 的结果, 抗成纤维样滑膜细胞抗体检测敏感性为 87.5%, 特异性为 95.83%, 其敏感性和特异性均高于 RF 及 CCP (文献报道 RF 敏感性特异性分别为 70% 及 86% 左右, CCP 敏感性、特异性分别为 80% 及 95% 左右)。

[0062] 综上所述, 成纤维样滑膜细胞能作为类风湿关节炎的诊断试剂, 在 RA 的诊断中具有较高的敏感性和特异性。

[0063] 实施例 2 应用软骨细胞作为抗原底物不适合用于 RA 临床辅助诊断

1、RA 软骨细胞的分离培养

(1) 取材: 取行膝关节置换术的 RA 患者关节软骨, 剥离包裹软骨组织的筋膜和软骨膜, 放入盛有 PBS 液的培养皿中;

(2) 将软骨组织剪碎成 0.5 ~ 0.8mm 的细块, 用含有青霉素和链霉素的 PBS 溶液冲洗;

(3) 0.25% 胰蛋白酶在 37℃ 消化 2 小时后终止;

(4) 0.02% II 型胶原酶在 37℃ 消化过夜;

(5) 在倒置显微镜下观察, 当游离出单个细胞后, 加入 DMEM 培养液将 II 型胶原酶稀释终止消化;

(6) 将细胞团吹打成单个细胞后用 200 目滤网过滤, 收集滤液, 1500r/min 离心 5min;

(7) 弃上清, 加入培养液重悬细胞, 0.2% 台盼蓝染色, 活细胞率大于 90%, CO₂ 培养箱孵育。

[0064] 2、软骨细胞鉴定

采用软骨细胞标志物 II 型胶原(CII) 抗体对原代培养的软骨细胞进行染色以确定细胞种类。

[0065] 培养皿吸去上清, 用甲醇在 -20℃ 下固定 10 分钟。用 0.01M PBS 洗涤 3 次, 羊血清封闭 30 分钟, 0.01M PBS 洗涤 3 次, 每次 5 分钟。用软骨细胞特异性标记 CII 单克隆抗体 (Abcam) 按照 1:1000 稀释后室温孵育 1 小时, 0.01M PBS 洗涤 3 次, 每次 5 分钟。用 Cy3 标记的羊抗小鼠 IgG 二抗按照 1:2000 稀释, 室温孵育 30 分钟, 0.01M PBS 洗涤 3 次, 每次 5 分钟。最后用 1:10000 稀释的 DAPI 染细胞核, 洗涤完成后加入防荧光淬灭剂封片, 在荧光显微镜下观察, CII 主要分布在软骨细胞胞浆, 证实原代培养的细胞为软骨细胞, 结果见图 5。

[0066] 3、Western-blot 的方法检测 RA 患者及正常人血清中抗软骨细胞抗体

(1) 软骨细胞蛋白提取:

A、倒掉培养液, 培养瓶倾斜放置 1 ~ 2 分钟, 残余培养液用移液管吸走。

[0067] B、每瓶细胞加 3mL 4℃ 预冷的 0.01M PBS; 平放轻轻摇动 1 分钟以洗涤细胞, 然后弃去洗液; 共洗细胞三次, 将 PBS 洗净后把培养瓶置于冰上。

[0068] C、每瓶细胞中加入 200uL Pierce 裂解液 (预先加入蛋白酶抑制剂 PMSF), 静置 20 分钟; 在 10000g、4℃ 下离心 20 分钟, 保留上清; 将离心后的上清测定浓度后, 分装, 放于 -80℃ 保存。

[0069] (2) 上样及电泳：

A、在软骨细胞蛋白样品中加入 2×SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液，混匀后 100℃沸水浴加热 35 分钟，使蛋白充分变性。

[0070] B、变性后的蛋白冷却到室温后，把蛋白样品直接上样到 SDS-PAGE 胶加样孔内，使用 Bio-Rad 的电泳装置，恒压设置 100V，溴酚蓝到达胶的底端处附近停止电泳。

[0071] (3) 转膜：

采用 PVDF 膜，将 PVDF 膜分别浸于甲醇 15 秒、纯水 3 分钟、转移缓冲液 15 分钟预处理；凝胶浸泡于电泳缓冲液 5 分钟；在 Bio-Rad 的标准湿式转膜装置，设定转膜电流为 300mA，转膜时间为 60 分钟。转完膜后，用丽春红染色液对膜进行染色，以观察实际的转膜效果，同时通过其显示条带将每份蛋白样品剪开，以便于孵育不同血清。

[0072] (4) 封闭：

转膜完毕后，用洗涤液将膜洗 3 次，每次 3 分钟；洗涤完成后将膜加入脱脂奶粉配成的封闭液中，4℃封闭过夜。

[0073] (5) 血清孵育：

RA 患者及正常人血清按照 1:200 浓度稀释后加入到湿转后的 PVDF 膜，室温，在水平摇床上轻微震荡孵育 1 小时。孵育结束后，用洗涤液洗涤 6 次，每次 10 分钟，以减轻背景。

[0074] (6) 二抗孵育：

采用辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的抗人 IgG 二抗，按照 1:10000 浓度稀释后，室温，在水平摇床上轻微震荡孵育 30 分钟；孵育结束后，用洗涤液洗涤 6 次，每次 10 分钟，以减轻背景。

[0075] (7) 化学发光及 X 片显影：

在 PVDF 膜上加入化学发光底物 (Thermo) 后在暗盒中进行曝光，在自行配制的显影液和定影液进行手工洗片。结果见图 6，与 RA 患者及正常人血清孵育的 PVDF 膜上均能显示多条反应条带，该结果说明除 RA 患者血清外，正常人血清中也存在能同软骨细胞蛋白反应的抗体，所以抗软骨细胞抗体不是特异性地存在于 RA 患者血清中。

[0076] 4、间接免疫荧光的方法检测 RA 患者及正常人血清中抗软骨细胞抗体

(1) 软骨细胞的固定：

将获得的软骨细胞在胰酶消化后，制得单细胞悬液，铺于 96 孔板上，每孔 100uL，37℃培养过夜，吸去培养液，经过 PBS 洗涤 3 次后，每孔加入 95% 乙醇 (或甲醇、5% 冰醋酸) 200uL，4℃固定 20 分钟。固定后的细胞去掉固定液后再经 PBS 洗涤 3 次后，拍干，置于一 20℃保存备用。

[0077] (2) 封闭：

每孔用含 3% BSA 的 0.01M PBS 封闭液 100uL 在室温下，封闭 1 小时。完成后，弃去封闭液，洗涤液漂洗 3 次，每次 5 分钟。

[0078] (3) 血清孵育：

分别取 RA 患者及正常人血清按照 1:100 倍稀释，在固定了软骨细胞的 96 孔板中，每孔加入上述稀释后血清 100uL，室温孵育 1 小时。孵育完成后，吸去血清，拍干，洗涤液洗涤 6 次，每次 3 分钟。

[0079] (4) Cy3 标记的羊抗人 IgG 二抗孵育：

每孔加入 100uL, 1:1000 稀释浓度的 Cy3 标记的羊抗人 IgG, 室温孵育 30 分钟。完成后, 弃去封闭液, 洗涤液漂洗 6 次, 每次 5 分钟。

[0080] (5) 染核:

含 1:10000 稀释的 DAPI 溶液 100uL 加入各孔中, 常温反应 30 分钟。反应结束后用洗涤液漂洗 3 次, 每次 5 分钟。加盖盖玻片封片后荧光显微镜下观察。

[0081] (6) 荧光显微镜观察:

使用铬滤光片, 激发波长 554nm, 发射波长 570nm 条件下观察 Cy3 荧光强度, 结果见图 7。实验结果表明, 分别有约 40%、30% 的 RA 患者血清和正常人血清孵育的软骨细胞胞浆均匀着色(绿色), 约 60% 及 70% 的 RA 患者血清及正常人血清不与软骨细胞反应(软骨细胞胞浆不着色)。该结果进一步证实抗软骨细胞抗体不是特异性地存在于 RA 患者血清中, 因而软骨细胞不适合作为细胞底物用于 RA 的辅助诊断。

[0082] 实施例 3 应用 Th17 阳性细胞作为抗原底物不适合用于 RA 临床辅助诊断

1、RA 患者外周血中 Th17 细胞的磁珠分选

(1) 采用梯度离心的方法从 RA 外周血中分离得到单个核细胞(PBMC)。

[0083] (2) 选用德国美天妮的 Th17 细胞阳性分选柱按照说明书对 RA 外周血中的 PBMC 进行分选, 得到 Th17 阳性细胞。

[0084] 2、Th17 细胞蛋白总蛋白提取

加入防蛋白降解的蛋白酶抑制剂, 通过超声裂解的方法破碎细胞, 得到细胞总蛋白。

[0085] 3、Western-blot 的方法检测 RA 患者及正常人血清中抗 Th17 细胞抗体

该部分方法与实施例 2 中用 Western-blot 方法检测血清中抗软骨细胞抗体相同。经过上述实验, 在 RA 患者及正常人血清孵育的 PVDF 膜上均未发现反应条带, 请参见图 8, 该结果说明无论是正常人血清或 RA 患者血清中均不存在抗 Th17 细胞蛋白的抗体, 所以 Th17 细胞不适合用于 RA 的辅助诊断。

[0086] 以上所述仅是本发明的优选实施方式, 应当指出, 对于本技术领域的普通技术人员, 在不脱离本发明方法的前提下, 还可以做出若干改进和补充, 这些改进和补充也应视为本发明的保护范围。

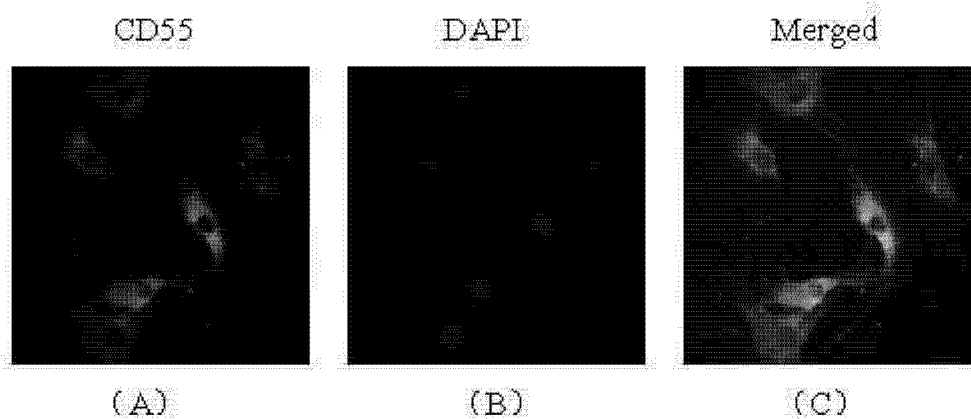


图 1

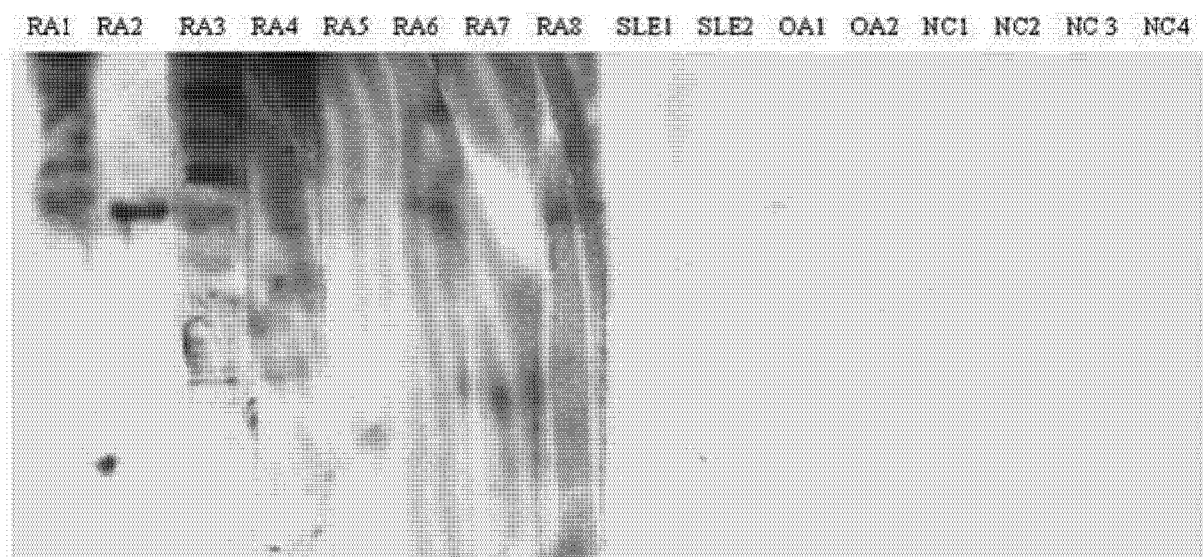


图 2

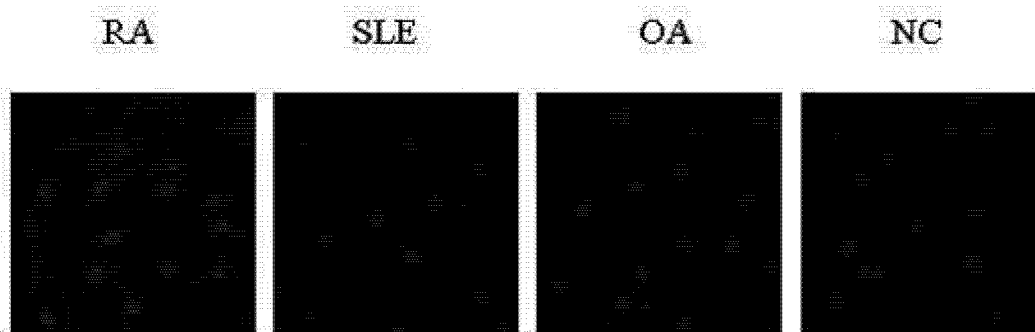


图 3

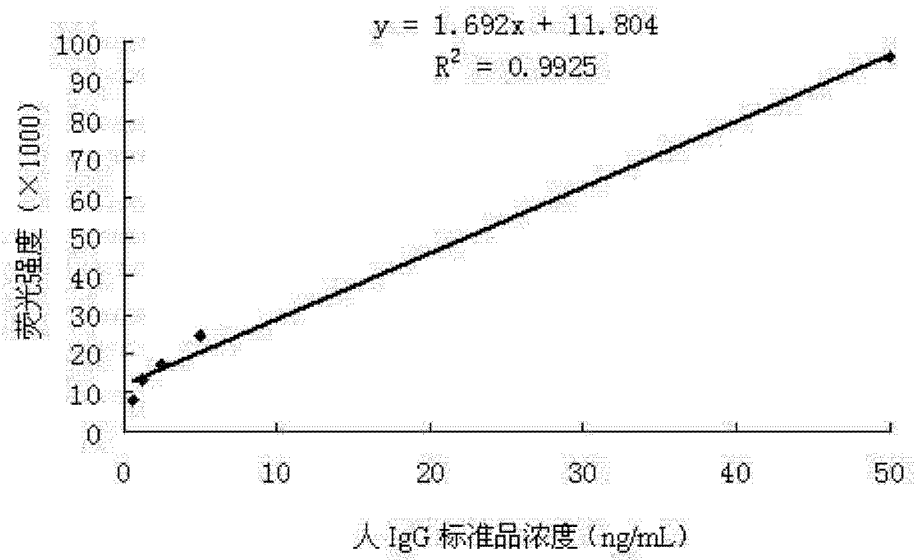


图 4

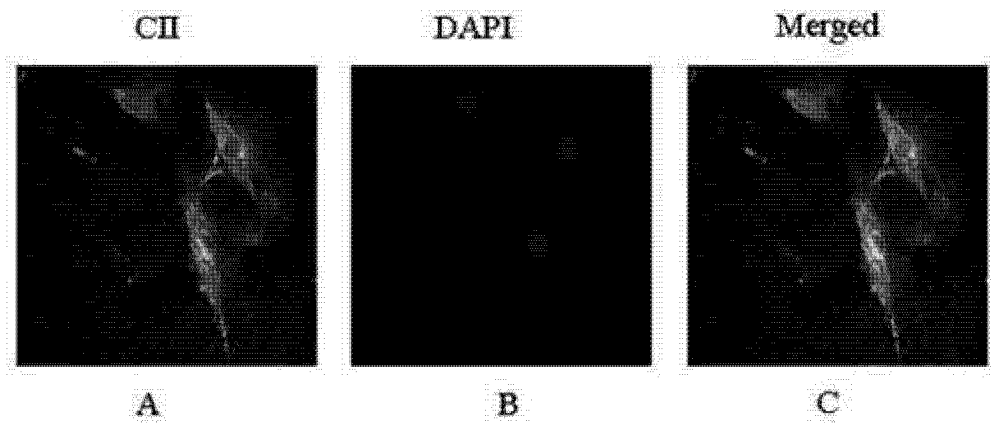


图 5

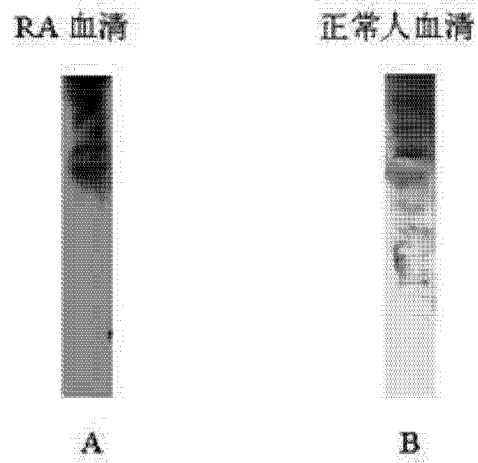


图 6

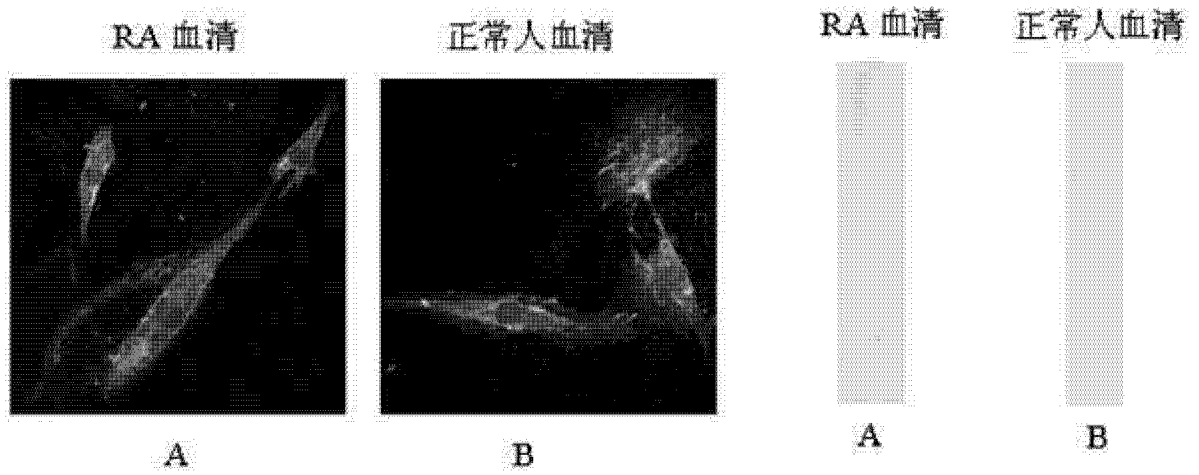


图 7

图 8

专利名称(译)	成纤维样滑膜细胞在制备类风湿关节炎诊断试剂中的应用		
公开(公告)号	CN104422761A	公开(公告)日	2015-03-18
申请号	CN201310405870.2	申请日	2013-09-09
[标]申请(专利权)人(译)	李莉		
申请(专利权)人(译)	李立		
当前申请(专利权)人(译)	李立		
[标]发明人	李立		
发明人	李立		
IPC分类号	G01N33/53 G01N21/64 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/543 G01N2800/102		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了成纤维样滑膜细胞在制备类风湿关节炎诊断试剂如试剂盒、细胞芯片中的应用。证实了RA患者血清中存在能与成纤维样滑膜细胞结合的特异性抗体。建立了以成纤维样滑膜细胞为底物抗原的间接免疫荧光方法和细胞芯片检测方法，对RA的诊断具有较高的敏感性和特异性，为RA的诊断提供了新的诊断试剂和方法。

RA1 RA2 RA3 RA4 RA5 RA6 RA7 RA8 SLE1 SLE2 OA1 OA2 NC1 NC2 NC3 NC4

