技术方法

文章编号:1000-5404(2010)07-0728-03

人外周血中 NF-κB p65 定量检测方法的建立及临床应用

林 青[1],郑 健[2],陈宇新[1],艾 斯[2],王 芳[1],林礼兴[1] (350004 福州,福建中医学院附属人民医院:检验科[1],儿科[2])

[摘要] **目的** 建立一种能定量测定人外周血中核转录因子-κB(nuclear transcription factor-kappa B,NF-κB) p65 活化量的检测方法。**方法** 采用密度梯度离心法分离人外周血单个核细胞,从细胞核成分中提取核蛋白,应用 Bradford 法进行核蛋白定量,以识别 NF-κB p65 不同抗原表位的 2 种抗 NF-κB 单克隆抗体为基础,建立可定量检测人外周血 NF-κB p65 活化量水平的双抗体夹心酶联免疫吸附实验法。应用已建立的 NF-κB p65 定量检测方法测定了 68 例微小病变型肾病综合征患者和 20 名健康人外周血中 NF-κB p65 活化量。**结果** 本方法批内、批间变异系数分别为(9.78±3.99)%、(12.51±4.53)%,灵敏度为 0.030 mg/L,平均回收率为 95.8 %。与 NF-κB 突变型寡核苷酸不发生交叉反应。微小病变型肾病综合征患者治疗前外周血中 NF-κB p65 活化量较健康人显著增高($P<0.01$),治疗后与治疗前 NF-κB p65 活化量差异有统计学意义($P<0.01$),但与健康人 NF-κB p65 活化量差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 本研究建立的人外周血中 NF-κB p65 活化量定量检测方法快速、特异且可靠,为临床监测 NF-κB p65 活化情况提供了条件。

[关键词] NF-κB ,p65 亚基;单个核细胞;酶联免疫吸附测定;微小病变型肾病综合征

[中图法分类号] R446.11;R446.6 **[文献标志码]** B

核转录因子-κB(Nuclear transcription factor-kappa B,NF-κB)是具有多向性调节作用的蛋白质分子,能与多种细胞基因的启动子和增强子中的 κB 序列位点特异结合,参与基因表达的调控,在炎症、应激反应及免疫调控中起重要作用[1,2]。目前 NF-κB 的检测方法主要是电泳迁移率变动分析实验,通常采用放射性同位素进行标记,由于标记物的稳定性差、存在放射性污染,并且操作费时、无法进行高效筛选,因此不适用于临床[3,4]。酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay,ELISA)法由于测定灵敏、特异、操作简便、易于自动化,且无放射性污染等诸多优点成为目前临床应用最广的一种免疫测定技术。本研究通过提取外周血中单个核细胞的核蛋白,定量检测外周血中 NF-κB p65 活化情况,建立适用于临床的快速、敏感、特异的定量分析方法,并初步探讨其在微小病变型肾病综合征(Minimal-changed nephrotic syndrome,MCNS)治疗监测中的应用价值。

1 资料与方法

1.1 研究对象

筛选 2006 年 2 月至 2008 年 4 月福建中医学院附属人民医院儿科门诊及住院患者 68 例,其中男性 38 例,女性 30 例,年龄(6.28±3.71)岁。68 例入选患者临床诊断均为 MCNS,所有病例的诊断均符合 2001 年中华医学会儿科学分会肾脏病学组诊断标准[5]。健康对照组 20 例,选自本院健康体检中心的健康体检儿童,其中男性 7 例,女性 13 例,年龄(5.75±4.19)岁,均排除肾、心、脑、肝及急、慢性感染等疾病。

[基金项目] 福建省自然科学基金(C0740002,C0440015);福建中医学院课题(XB2006011)

[通信作者] 林 青,E-mail: fjlinqing@126.com

1.2 主要试剂

淋巴细胞分离液(天津川页有限公司);二硫苏糖醇、磷酸酶抑制剂、蛋白酶抑制剂、重组 NF-κB p65 蛋白、NF-κB p65 抗体、NF-κB 野生型寡核苷酸、NF-κB 突变型寡核苷酸、Jurkat 核提取物、鲱鱼精 DNA、NF-κB 抗体包被的 96 孔板、溶解缓冲液、低渗缓冲液、结合缓冲液(美国 Active Motif 公司);蛋白定量试剂、BSA(北京赛百盛公司)。

1.3 方法

1.3.1 样本采集 MCNS 患者分别于治疗前和治疗后 3 个月、健康对照组于体检时抽取肘静脉血 6 ml,加入肝素抗凝试管内充分混匀。

1.3.2 单个核细胞的收集 采用密度梯度离心法分离人外周血单个核细胞,加入相当于单个核细胞悬液 5 倍体积的预冷的 PBS(每毫升 PBS 中加入磷酸酶抑制剂 0.05 ml,以限制进一步的蛋白质修饰)洗涤 2 次,176×g 离心 9 min 后弃去上清液,加入预冷的 PBS 将单个核细胞悬液的体积还原至 1 ml,用血细胞计数板计数单个核细胞数量,取大约 8.8×10^6 个单个核细胞进行核蛋白提取。

1.3.3 核蛋白提取 将含有约 8.8×10^6 个单个核细胞的混悬液 12×g 离心 5 min,弃去上清液,在沉淀中加入低渗缓冲液 500 μl,上下吸打数次使细胞重悬,置入冰盒中孵育 15 min 使细胞膜肿胀易碎;加入去垢剂 25 μl,高速混匀 10 s 后于 4 ℃ 14 000×g 离心 30 s,使细胞质中的蛋白质类渗漏至上清液中;移去上清液,在沉淀中加入溶解缓冲液(每毫升溶解缓冲液中加入 0.01 ml 蛋白酶抑制剂,防止蛋白分解)50 μl,上下吸打使沉淀分散。将混悬液置于冰盒中,在自动旋转振荡仪上 150 r/min 摇动 30 min,使核蛋白质类完全溶解;高速涡漩混匀 30 s,然后于 4 ℃ 14 000×g 离心 10 min,将上清液(核蛋白)分装入预冷的微量离心管中,置于 -80 ℃冰箱储存。

1.3.4 核蛋白定量 应用根据 Bradford 法建立起来的蛋白定量方法进行核蛋白定量,采用 BSA 作为标准蛋白,严格按照试剂说明书进行操作。

1.3.5 定量检测 NF-κB p65 的活化量 首先用溶解缓冲液将重组 NF-κB p65 蛋白稀释至浓度为 2.0 mg/L,再依次进行倍比稀释,使最终获得的标准蛋白溶液的浓度分别为:2.0、1.0、0.5、0.25、0.125、0.0625、0.0312、0.0156 mg/L。

在已包被有寡核苷酸(含 NF-κB 共有序列 5′-GGGACTTTCC-3′)的每个反应孔中加入 30 μl 结合缓冲液,然后在空白孔中加入 20 μl 溶解缓冲液,阳性对照孔中加入 1 μl Jurkat 核提取物和 19 μl 溶解缓冲液,标准孔每孔加入 20 μl 上述已稀释的标准蛋白溶液,样品孔中加入上述已提取的核蛋白(使每孔的蛋白含量为 20 μg)。

将反应板置于旋转振荡仪上以 100 r/min 的速度轻轻摇动,室温下反应 1 h 后用缓冲液洗涤 3 次。每孔中分别加入 100 μl NF-κB p65 抗体(用抗体结合缓冲液 1∶1 000 稀释,用以识别已活化并与靶 DNA 结合的 NF-κB p65 抗原表位),室温反应 1 h 后洗涤 3 次。每孔中再加入 100 μl 辣根过氧化物酶标记的人抗兔 IgG(用抗体结合缓冲液 1∶1 000 稀释),室温反应 1 h 后洗涤 4 次。每孔中分别加入 100 μl 底物,避光反应 8 min 后终止反应,用空白孔调零,以主波长 450 nm,次波长 655 nm 在酶标仪上读取光密度值(D)。

根据标准蛋白浓度及反应吸光度建立标准曲线,根据标准曲线及样品反应吸光度值计算 NF-κB p65 的含量。

1.3.6 灵敏度实验 将 2.0 mg/L 的重组 NF-κB p65 蛋白进行 128 倍稀释,以此含量为最低检出值,重复测定 5 次,根据标准曲线计算实际最低检出值的平均值。

1.3.7 回收率实验 提取 3 份不同浓度的核蛋白样品(A、B、C)作为基线样品。用溶解缓冲液将重组 NF-κB p65 蛋白分别稀释至浓度为 5.0 mg/L 和 10.0 mg/L 作为标准物。向 19 μl 的核蛋白样品中分别加入 1 μl 溶解缓冲液、1 μl 浓度为 5.0 mg/L 的标准物、1 μl 浓度为 10.0 mg/L 的标准物,使每一份样品的最终体积为 20 μl。测定核蛋白样品的 NF-κB p65 含量,计算回收率。

1.3.8 特异性实验 设竞争结合实验孔 16 孔,在 1~8 孔中分别加入 30 μl 含 20 pmol NF-κB 野生型寡核苷酸的结合缓冲液,在 9~16 孔中分别加入 30 μl 含 20 pmol NF-κB 突变型寡核苷酸的结合缓冲液。在已提取的核蛋白中随机抽取 8 份样品,检测已包被的寡核苷酸及 NF-κB p65 抗体的结合特异性。

1.3.9 重复性实验 6 份全血样品(其中肾病综合征 3 份、健康人 3 份),用同一批次试剂检测,每份测 3 次,计算批内 NF-κB p65 水平差异;用 2 批检测试剂分别检测 NF-κB p65 水平,每份测 3 次,计算批间 NF-κB p65 水平差异。

1.4 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 Excel 软件和 SPSS 13.0 统计软件,组间数据比较采用成组 t 检验,治疗前后比较采用配对样本 t 检验。

2 结果

2.1 NF-κB p65 标准曲线

将重组 NF-κB p65 蛋白配制成浓度为 0.015 6、0.031 2、0.062 5、0.125、0.25、0.5、1.0、2.0 mg/L 系列标准溶液,并进行测定。结果见图 1。

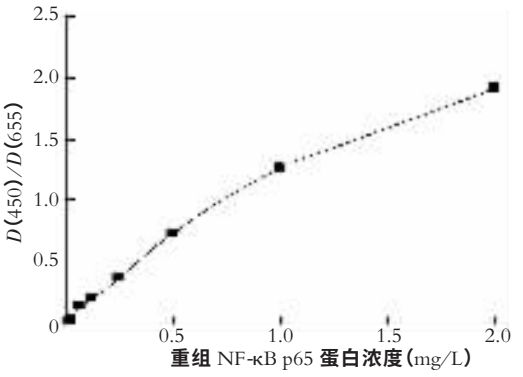


图 1 NF-κB p65 标准曲线

2.2 灵敏度

将 2.0 mg/L 的重组 NF-κB p65 蛋白进行 128 倍稀释,以此含量为最低检出值,重复测定 5 次的平均值为 0.030 mg/L。所测 68 例临床标本和 20 例健康对照结果均在 0.030 mg/L 以上。

2.3 特异性

加入 30 μl 含 20 pmol NF-κB 野生型寡核苷酸的结合缓冲液后,8 份核蛋白的 D 值为(0.012 ± 0.008);加入 30 μl 含 20 pmol NF-κB 突变型寡核苷酸的结合缓冲液后,8 份核蛋白的 D 值为(0.452 ± 0.157),二者差异显著($t = 7.78$, $P < 0.01$)。说明预包被的寡核苷酸(含 NF-κB 共有序列 5′-GGGACTTTCC-3′)不与 NF-κB 突变型寡核苷酸结合,而 NF-κB p65 抗体只识别已活化并与靶 DNA 结合的 NF-κB p65 抗原表位。

2.4 精密度

同一批次检测试剂检测 6 份全血样品 NF-κB p65 活化量水平的批内变异系数(CV)为(9.78 ± 3.99)%(4.65%~14.57%);2 批检测试剂检测 6 份全血样品 NF-κB p65 活化量水平的批间 CV 为(12.51 ± 4.53)%(6.32%~18.26%)。

2.5 准确度

3 份不同浓度的核蛋白样品回收率为 87.0%~106.0%(表 1),平均回收率为 95.8%。

表 1 核蛋白样品中加入不同浓度重组 NF-κB p65 蛋白回收率计算

样品号	加入浓度(mg/L)	测定浓度(mg/L)	回收浓度(mg/L)	回收率(%)
A	0	0.567	–	–
A	0.25	0.820	0.253	101.2
A	0.50	1.097	0.530	106.0
B	0	0.263	–	–
B	0.25	0.495	0.232	92.8
B	0.50	0.750	0.487	97.4
C	0	0.749	–	–
C	0.25	0.975	0.226	90.4
C	0.50	1.184	0.435	87.0

2.6 临床样本检测结果

68 例 MCNS 患者治疗前外周血中 NF-κB p65 活化量为 0.282~1.155(0.703 ± 0.200) mg/L,与健康对照组外周血中 NF-κB p65 活化量 0.087~0.572(0.264 ± 0.133) mg/L 相比具有显著性差异($t = 11.409$, $P < 0.01$)。治疗 3 个月后 MCNS 患者外周血中 NF-κB p65 活化量为 0.040~1.005(0.277 ± 0.208) mg/L 较治疗前显著降低($t = 13.049$, $P < 0.01$),与健康对照组相比无显著性差异($t = 0.255$, $P > 0.05$)。

3 讨论

核转录因子-κB(nuclear transcription factor -kappa B,NF-κB)广泛存在于真核细胞内,研究发现其活性只存在于细胞核的抽提物中。在静息细胞中,NF-κB 的 Rel 同源区与其抑制因子(IκB)的锚蛋白重复序列结合形成三聚体复合物(NF-κB-IκB),阻止了 NF-κB 的核移位,使之以非活化形式锚定在细胞质中[6,7]。当外界刺激因素作用于细胞后,复合物 NF-κB-IκB 解体,NF-κB 被活化并很快易位到胞核,与核内靶基因启动子/增强子区域的 κB 基序特异性结合,启动和调控一系列包含有 κB-反应元件的基因转录[1,8,9]。

NF-κB 目前的检测方法主要是电泳迁移率变动分析实验,通常采用放射性同位素(如^{32}P、^{3}H)标记的寡核苷酸探针,由于同位素的半衰期短、且易于污染环境、危害身体,其应用的广泛性受到了极大的限制。本研究从人外周血中分离单个核细胞,提取核蛋白,利用抗原抗体反应的特异性,只有当细胞核提取物中含有激活型的 NF-κB 时才会与预包被的寡核苷酸(含 NF-κB 共有序列 5′-GGGACTTTCC-3′)结合,而用于识别 NF-κB p65 特异抗原表位的抗体只识别已被激活并且和其靶 DNA 结合的 NF-κB,因此可以真实地反映体内蛋白因子与基因组 DNA 结合的状况。实验结果表明,该方法具有较好的精密度,批内和批间 *CV* 分别为 4.65% ~14.57%(9.78 ±3.99)%、6.32% ~18.26%(12.51 ±4.53)%,灵敏度为 0.030 mg/L,平均回收率为 95.8 %。在临床应用中仅需抽取少量外周血,取材容易,易被患者所接受。实验操作简单易行,可同时对大批量临床标本进行检测,适合在临床推广使用。

本研究中发现健康对照组外周血单个核细胞核提取液中也存在较低的 NF-κB 活化量,说明 NF-κB 参与机体正常的新陈代谢,NF-κB 的适度活化是调节正常生理功能所必需的。然而 NF-κB 的过度活化会激活、增强机体的非特异及特异性免疫反应,造成组织损伤和器官功能紊乱。Cao 等[10]报道 MCNS 患者单个核细胞中 NF-κB 与 DNA 的结合能力显著提高,并且与尿蛋白之间具有良好的相关性,提示 NF-κB 的异常激活参与了 MCNS 的发病。Sahali 等[11]也证实处在发病期的 MCNS 患者外周血单个核细胞中 NF-κB 活性被强烈持久的激活,而在缓解期 NF-κB 活性则下调至基础水平。本研究初步临床应用结果显示,MCNS 患者在发病期外周血单个核细胞核提取液中 NF-κB p65 活化量较健康对照组显著增高($P<0.01$),提示单个核细胞胞质中 NF-κB 被激活,转移入胞核内与 DNA 结合增多,活化的 NF-κB 上调多种炎症介质和细胞因子基因的转录,使得肿瘤坏死因子-α 以及一氧化氮等出现不同程度过度表达,这些过度表达的免疫因子通过单一或协同效应,间接或直接地激活、增强机体的非特异及特异免疫反应,导致肾脏损害[12,13]。治疗 3 个月后外周血单个核细胞核提取液中 NF-κB p65 活化量比治疗前显著降低($P<0.01$),此时大多数患者临床症状缓解,说明监测 MCNS 患者外周血单个核细胞 NF-κB p65 活化量能为临床进行预后判断提供参考依据。本研究建立的人外周血单个核细胞 NF-κB 活化量检测方法快速、可靠,适合于向临床推广应用。

参考文献:

[1] Delhalle S, Blasius R, Dicato M, *et al*. A beginner's guide to NF-kappaB signaling pathways[J]. Ann N Y Acad Sci, 2004, 1030: 1 - 13.

[2] Selkirk G A, McLeuan T M, Wright H E, *et al*. Mild endotoxemia, NF-κB translocation, and cytokine increase during exertional heat stress in trained and untrained individuals[J]. Am J Physiol, 2008, 295(2): 611 - 623.

[3] Graham T R, Odero-Marah V A, Chung L W, *et al*. PI3K/Akt-dependent transcriptional regulation and activation of BMP-2-Smad signaling by NF-kappaB in metastatic prostate cancer cells[J]. Prostate, 2009, 69(2): 168 - 180.

[4] Edderkaoui M, Odinokova I, Ohno I, *et al*. Ellagic acid induces apoptosis through inhibition of nuclear factor kappa B in pancreatic cancer cells[J]. World J Gastroenterol, 2008, 14(23): 3672 - 3680 .

[5] 中华医学会儿科学分会肾脏病学组. 小儿肾小球疾病的临床分类、诊断及治疗[J]. 中华儿科杂志, 2001, 39(12): 746 - 749.

[6] Wang F, Jing L. Latest recognition of NF-kappaB's essential roles in immune, inflammation and apoptosis[J]. Journal of Nanjing Medical University, 2006, 20(2): 65 - 69.

[7] Camus-Bouclainville C, Fiette L, Bouchiha S, *et al*. A virulence factor of myxoma virus colocalizes with NF-kappa B in the nucleus and interferes with inflammation[J]. J Virol, 2004, 78(5): 2510 - 2516.

[8] Spann K M, Tran K C, Collins P L. Effects of nonstructural proteins NS1 and NS2 of human respiratory Syncytial Virus on interferon regulatory factor 3, NF-kappaB, and proinflammatory cytokines[J]. J Virol, 2005, 79(9): 5353 - 5362.

[9] Salminen A, Huuskonen J, Ojala J, *et al*. Activation of innate immunity system during aging: NF-κB signaling is the molecular culprit of inflamm-aging[J]. Aging Res Rev, 2008, 7(2): 83 - 105.

[10] Cao C, Lu S, Dong C, *et al*. Abnormal DNA-binding of transcription factors in minimal change nephrotic syndrome[J]. Pediatr Nephrol, 2001, 16(10): 790 - 795.

[11] Sahali D, Pawlak A, Le-Gouvello S, *et al*. Transcriptional and post-transcriptional alterations of IkappaB alpha in active minimal-change nephrotic syndrome[J]. J Am Soc Nephrol, 2001, 12(8): 1648 - 1658.

[12] 林青, 郑健, 陈永海, 等. NF-κB、TNF-α 及 NO 在微小病变型肾病综合征发病机制中的作用[J]. 徐州医学院学报, 2009, 29(3): 149 - 153.

[13] 林青,郑健,艾斯,等. 肾康灵汤剂联合强的松治疗阿霉素肾病大鼠的作用机制[J]. 中西医结合学报, 2009, 7(7): 661 - 666.

(**收稿**:2009-09-23;**修回**:2009-11-30)

(编辑 栾 嘉)