(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106950367 A
(43)申请公布日 2017.07.14

(21)申请号 201710126637.9

(22)申请日 2017.03.03

(71)申请人 中山大学孙逸仙纪念医院
地址 510120 广东省广州市沿江西路107号

(72)发明人 戴洌 马剑达 莫颖倩 荆俊

(74)专利代理机构 广州三环专利商标代理有限公司 44202
代理人 宋静娜 郝传鑫

(51)Int.Cl.
G01N 33/564(2006.01)

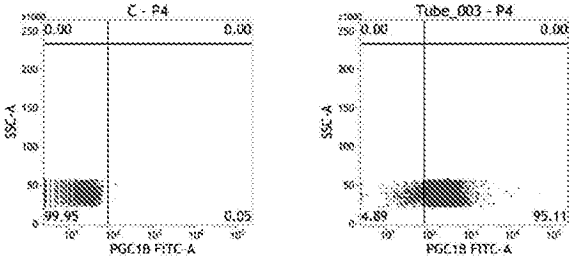
权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54)发明名称

用于类风湿关节炎诊断的试剂盒

(57)摘要

本发明公开了一种类风湿关节炎诊断试剂盒，试剂盒包含用于检测血液中CD14阳性的单核细胞中PGC1β阳性细胞的试剂。采用本发明的试剂盒和方法，无需进行细胞分离，无需进行细胞培养、染色鉴定以及功能实验，操作相对简单，检测周期短，数小时即可完成，且结果客观可靠，具有可比性，有利于推广应用。



CN 106950367 A

1.一种类风湿关节炎诊断试剂盒，其特征在于，所述试剂盒包含用于检测血液中CD14阳性的单核细胞中PGC1β阳性细胞的试剂。

2.根据权利要求1所述的试剂盒，其特征在于，所述试剂包含CD14抗体、同型对照抗体、PGC1β抗体和荧光二抗。

3.根据权利要求1或2所述的试剂盒，其特征在于，所述血液是外周血。

4.根据权利要求2所述的试剂盒，其特征在于，所述CD14抗体为小鼠抗人CD14抗体，所述同型对照抗体是小鼠抗人同型对照抗体。

5.根据权利要求2所述的试剂盒，其特征在于，所述荧光二抗为山羊抗兔FITC荧光二抗。

6.根据权利要求2所述的试剂盒，其特征在于，所述试剂盒还包括肝素抗凝管和PBS溶液。

7.CD14和PGC1β的联合使用在制备用于诊断类风湿关节炎的试剂盒中的用途。

8.外周血中CD14阳性的单核细胞中PGC1β阳性细胞在制备用于诊断类风湿关节炎的试剂盒中的用途。

用于类风湿关节炎诊断的试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及医药领域，特别是风湿免疫病学和骨科学领域，尤其是一种用于类风湿关节炎诊断的试剂盒。

背景技术

[0002] 骨是一种特化的结缔组织，作为肌肉的附着点可以支持运动、保护内脏器官和骨髓，还具有代谢功能如储存和供应体内的钙。骨组织处于形成-吸收的动态过程中，其中，骨吸收主要由破骨细胞介导。破骨细胞是一种由单核/巨噬前体细胞融合而成的具有骨吸收能力的终末期细胞，是唯一能够吸收骨质的细胞；破骨细胞的前体细胞是血液系统中的单核细胞，在特定的信号作用下，经历一系列分化过程最终分化形成成熟的破骨细胞，释放骨基质降解酶，包括抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)、组织蛋白酶K以及基质金属蛋白酶9等骨基质降解蛋白。当人体破骨细胞分化及成熟异常活跃时，会打破骨形成-吸收平衡，出现全身性或局部性骨侵蚀破坏。全身性骨侵蚀主要表现为骨质疏松症，可出现疼痛、脊柱变形以及骨折等表现。局部的骨侵蚀破坏主要导致关节畸形，严重影响关节功能，最终出现残疾，如类风湿关节炎。类风湿关节炎是一种常见的以进行性关节破坏为特征的慢性炎症性致残性疾病，是导致我国女性肢体残疾的首要病因。目前对于类风湿关节炎关节破坏的评估主要通过影像学检查，或者血清学检查骨破坏相关代谢产物，只能发现已经存在的关节破坏，无法预测类风湿关节炎关节破坏的进展。类风湿关节炎关节破坏的严重程度取决于破骨细胞的数量及功能。研究发现人外周血单核细胞在细胞因子RANKL和M-CSF的诱导下可分化为破骨细胞，而在相同的外界环境中类风湿关节炎患者外周血单核细胞较正常人更容易被诱导成破骨细胞，而不同类风湿关节炎患者之间外周血单核细胞分化成破骨细胞的能力也存在差异。如果能找到可以评估人破骨细胞前体细胞(外周血单核细胞)分化成破骨细胞能力的方法，可以为临床判断患者是否存在骨吸收-形成失平衡提供指导，以及有助于预测类风湿关节炎患者关节破坏进展，为临床诊疗提供指导。

[0003] 现有的评估人破骨细胞前体细胞(外周血单核细胞)分化成破骨细胞能力的方法为：抽取人外周血并稀释，以淋巴细胞分离液密度梯度离心分离外周血单个核细胞，贴壁纯化后流式细胞术CD14、CD3双色荧光标记抗体检测单核细胞纯度，在单核细胞培养体系中加入破骨细胞诱导因子M-CSF和RANKL，第0、7、14、21天行TRAP染色，光镜下观察TRAP染色阳性且细胞核≥3个的细胞为成熟破骨细胞。将培养体系中人外周血单核细胞在预置了骨片的96孔板中共培养，第21天取出骨片，梯度酒精脱水及1％甲苯胺蓝染色，相差显微镜观察骨吸收陷窝情况。通过比较成熟破骨细胞数量及骨陷窝面积评估破骨细胞前体细胞分化成破骨细胞的活性。

[0004] 上述方法的缺点包括操作复杂，所需时间较长，需要特殊的场地和设备进行细胞培养，容易出现细胞污染导致检测失败，结果评估时存在一定的主观因素。上述缺点主要是因为要进行细胞分离培养，模拟体内的环境加入相关的诱导因子把破骨细胞前体诱导成破骨细胞，并且还要进行染色鉴定和功能实验。由于诱导培养的时间周期比较长，对操作人员

的技术要求高，需要超净台、细胞培养箱等专业的设备，因此难以推广应用。

发明内容

[0005] 基于此，本发明的目的在于克服上述现有技术的不足之处而提供一种操作方便、能快速准确诊断受试者类风湿关节炎的试剂盒。

[0006] 为实现上述目的，本发明采取的技术方案为：

[0007] 一种类风湿关节炎诊断试剂盒，所述试剂盒包含用于检测血液中CD14阳性的单核细胞中PGC1β阳性细胞的试剂。

[0008] 优选地，所述试剂包含CD14抗体、同型对照抗体、PGC1β抗体和荧光二抗。所述抗体优选是被标记的抗体，例如生物素化的抗体。如本文所用的术语“抗体”是指特异性结合至特定抗原或与特定抗原免疫应答的免疫球蛋白分子，并且包括抗体的多克隆、单克隆、遗传工程化和以其它方式修饰的形式，包括但不限于嵌合抗体、人源化抗体、异缀合抗体(例如，二-、三-和四-特异性抗体、diabody、triabody和tetrabody)以及抗体的抗原结合片段包括例如Fab'、F(ab')$_2$、FAB、FV、rIgG和scFv片段；抗体可以包括嵌合的、灵长类化的、人源化的或人抗体；可与本发明相关使用的抗体可使用本领域已知的各种各样的技术，包括使用动物免疫、杂交瘤、重组和噬菌体展示技术或其组合来制备；可与本发明相关使用的抗体还可从供应商购买获得。

[0009] 本发明所用的抗体可以是被标记的抗体。如本文所用的术语“被标记”是指将抗体偶联于可检测物质来促进检测。可检测物质的实例包括各种酶、辅基、荧光材料、发光材料、生物发光材料、放射性材料、使用各种正电子发射型断层摄影术的正电子发射金属、以及非放射性顺磁性金属离子。可检测物质可直接地或通过中间体(例如本领域中已知的接头)使用本领域中已知的技术间接地偶联或缀合于抗体(或其片段)。酶标记的实例包括萤光素酶(例如，萤火虫萤光素酶和细菌萤光素酶；美国专利No.4,737,456)、萤光素、2,3-二氢酞嗪二酮、苹果酸脱氢酶、脲酶、过氧化物酶例如辣根过氧化物酶(HRPO)、碱性磷酸酶、β-半乳糖苷酶、乙酰胆碱酯酶、葡萄糖淀粉酶、溶菌酶、糖氧化酶(例如，葡萄糖氧化酶、半乳糖氧化酶和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶)、杂环氧化酶(例如尿酸酶和黄嘌呤氧化酶)、乳过氧化物酶、微过氧化物酶和类似物。合适的辅基复合物的实例包括抗生蛋白链菌素/生物素和亲和素/生物素；合适的荧光材料的实例包括伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、若丹明、二氯三嗪基胺荧光素、丹磺酰氯或藻红蛋白；发光材料的实例包括鲁米诺；生物发光材料的实例包括萤光素酶、萤光素和水母荧光素；以及合适的放射性材料的实例包括^{125}I、^{131}I、^{111}In或^{99}Tc。优选地，本发明所用的抗体是生物素化的抗体。

[0010] 优选地，所述血液是外周血。

[0011] 优选地，所述CD14抗体为小鼠抗人CD14抗体，所述同型对照抗体是小鼠抗人同型对照抗体。应当说明的是，所述小鼠抗人同型对照抗体是针对CD14IgG的同型对照抗体。

[0012] 优选地，所述荧光二抗为山羊抗兔FITC荧光二抗。

[0013] 优选地，所述试剂盒还包括肝素抗凝管和PBS溶液。

[0014] 作为本发明的另一个方面，本发明还提供了CD14和PGC1β的联合使用在制备用于诊断类风湿关节炎的试剂盒中的用途。由此，可以通过判断CD14阳性的单核细胞中核转录因子PGC1β阳性细胞的比例判断受试者是否患有类风湿关节炎。在本文中，正常水平是指健

康受试者中生物标志物的水平；健康受试者是指经体检，依据类风湿关节炎诊断标准排除患有类风湿关节炎的受试者；本申请的发明人经多次试验令人惊讶地发现，类风湿关节炎患者外周血中含有PGC1β的CD14阳性的单核细胞比例高于正常人外周血中含有PGC1β的单核细胞比例，当受试者外周血中含有PGC1β的CD14阳性的单核细胞比例为90％以上时，可以极高的准确率确诊受试者为类风湿关节炎患者；根据该诊断结果，本领域技术人员能够通过与医学影像学、患者临床特征表现等其它方法联合检查，从而进一步确诊类风湿关节炎。

[0015] 作为本发明的又一个方面，本发明还提供了外周血中CD14阳性的单核细胞中PGC1β阳性细胞在制备用于诊断类风湿关节炎的试剂盒中的用途。

[0016] 相对于现有技术，本发明的有益效果为：

[0017] 采用本发明的试剂盒和方法，无需进行细胞分离，无需进行细胞培养、染色鉴定以及功能实验，只需要全血细胞标记相关CD14和PGC1β的抗体后通过流式细胞仪检测，计算CD14阳性的单核细胞中PGC1β阳性细胞比例即可，操作相对简单，检测周期短，数小时即可完成，且结果客观可靠，具有可比性，有利于推广应用。

附图说明

[0018] 图1是本发明实施例中经流式细胞仪后圈出的单核细胞群；

[0019] 图2是本发明实施例中经流式细胞仪后圈出的CD14阳性细胞；

[0020] 图3是本发明实施例中经流式细胞仪后对照显示的PGC1β阳性细胞群；

[0021] 图4是本发明中将单核细胞体外培养，下调PGC1β之后获得的图片与统计结果；

[0022] 图5A为采用流式细胞仪检测类风湿关节炎患者及正常人的外周血中单核细胞PGC1β+阳性率；

[0023] 图5B为PGC1β表达升高促进人单核细胞分化及成熟能力所得图及统计结果。

具体实施方式

[0024] 为更好地说明本发明的目的、技术方案和优点，下面将结合具体实施例对本发明作进一步说明。本文中的试剂或细胞如无特别说明，则属于市场上可购买的常规试剂或细胞。

[0025] 一、试剂及耗材

[0026]

试剂与耗材	浓度或规格	公司	属国
Human CD14-APC	100Tests,1:5～20	Becton Deckinson	美国
平衡盐溶液(PBS)	100ml,280～315mOsm/kg	Invitrogen Gibco	美国
Fixation and Permeabilization	5ml	Becton Deckinson	美国
Gout-Ribbit IgG-FITC	100μl,1:25～100	康为世纪	中国
流式管	12×75mm,5ml	Becton Deckinson	美国
Anti-PGC1beta antibody	0.093mg/ml	Abcam	英国

[0027] 二、试剂盒组成及使用方法

[0028] (1)《类风湿关节炎诊断试剂盒》的组成：

[0029] 该试剂盒主要有肝素抗凝管4ml×2支、小鼠抗人CD14抗体2ml，小鼠抗人同型对照

抗体2ml，兔抗人PGC1β抗体100μL，山羊抗兔FITC荧光二抗100μL，以及PBS 100ml、试管4支组成。

[0030] (2)《类风湿关节炎诊断试剂盒》的使用方法：

[0031] 获取类风湿关节炎患者外周血4ml于肝素抗凝管中，取1ml置于2个试管中，分别加入小鼠抗人CD14抗体+兔抗人PGC1β抗体和小鼠抗人CD14抗体+小鼠抗人同型对照抗体，孵育20min后，再加入山羊抗兔FITC荧光二抗，流式细胞仪检测患者外周血单核细胞含有PGC1β抗体的比例。

[0032] 三、具体实验步骤

[0033] (1)采集患者外周静脉血2ml，各取100μL血样分别加入3支空白流式管中，分别标记空白对照管、阴性对照管、实验管；

[0034] (2)分别各取5μL Human CD14-APC抗体加入空白对照管、阴性对照管和实验管中，混匀，室温孵育20min；

[0035] (3)每管加入PBS 2ml，1000rpm×5min离心洗涤1次，弃上清液；

[0036] (4)分别各取100μL Fixation液加入空白对照管、阴性对照管和实验管中于实验管中，混匀，室温孵育20min；

[0037] (5)每管加入PBS 2ml，1000rpm×5min离心洗涤1次，弃上清液；

[0038] (6)分别各取100μL Permeabilization液加入空白对照管、阴性对照管和实验管中于实验管中，于阴性对照管、实验管加入1μL Anti-PGC1beta抗体，混匀，室温孵育20min；

[0039] (7)每管加入PBS 2ml，1000rpm×5min离心洗涤1次，弃上清液；

[0040] (8)于实验管加入2μL Goat-Ribbit IgG-FITC抗体，混匀，空白对照管、阴性对照管中不加抗体作为对照，室温孵育20min；

[0041] (9)加入PBS 2ml，1000rpm×5min离心洗涤1次，弃上清液；

[0042] (10)每管加入200μL PBS重悬，上流式细胞仪(美国Becton Deckinson FACSVerse)分析，流式细胞仪检测外周血CD14阳性细胞PGC1β表达与否，并计算其阳性率；

[0043] (11)先将空白对照管上流式细胞仪，根据细胞大小形态划定单核细胞群(如图1)；

[0044] (12)将阴性对照管上流式细胞仪，根据空白对照管设门，将CD14阳性细胞圈出(如图2)；

[0045] (13)将目标实验管上流式细胞仪，根据阴性对照管设门，将CD14阳性细胞中PGC1β阳性细胞圈出，并统计其阳性率(如图3)。

[0046] 四、结果与分析

[0047] 实验结果如图1、图2和图3所示，图1所示为将空白对照上样管通过流式细胞仪检测分析所得到的图像，图像显示裂红后的细胞大致分为3群，即淋巴细胞群、粒细胞群和单核细胞群，根据细胞通过流式细胞仪时的FSC和SSC形态将单核细胞群圈出以进行下一步分析；

[0048] 图2所示为将阴性对照上样管通过流式细胞仪检测分析所得到的图像，图像显示根据空白对照管设门，将单核细胞群中标记CD14-APC荧光的阳性细胞在横坐标(代表APC荧光值)突前部分的细胞群圈出，即得到CD14阳性细胞以进行下一步分析；

[0049] 图3所示为将目标检测上样管通过流式细胞仪检测分析所得到的图像，图像显示根据阴性对照管设门，将CD14阳性细胞中标记PGC1β-FITC荧光的阳性细胞圈出，CD14阳性

细胞群中标记PGC1β-FITC荧光的阳性细胞在横坐标(代表FITC荧光值)突前部分的细胞群圈出并统计其阳性率为95.11%。

[0050] 本发明研制的《类风湿关节炎诊断试剂盒》是由收集人外周血的抗凝管、单核细胞的标记物CD14以及反映单核细胞分化成破骨细胞能力的标记物PGC1β组成。该试剂盒具有快速、准确评估破骨细胞分化及成熟的能力。下表对比示出了传统的诱导培养鉴定法和本发明的试剂盒用于诊断类风湿关节炎时的优缺点：

[0051]

评估方法	实验周期	准确率	细胞污染标准
类风湿关节炎诊断试剂盒	2 小时	流式细胞仪检测灵敏度、准确率高	对细胞污染与否无严格要求
传统诱导培养鉴定法	14~21 天	化学染色光镜下判读灵敏度、准确率低	诱导培养过程要求细胞全程无污染

[0052] PGC1β是一种核转录因子，我们研究发现类风湿关节炎患者PGC1β的表达升高，体外实验中，我们运用单核细胞(RAW264.7)进行体外培养，并运用慢病毒敲减PGC1β表达后，通过RANKL+M-CSF诱导培养12天后，进行抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色检测破骨细胞生成和甲苯胺蓝染色检测破骨吸收陷凹形成，证实下调PGC1β之后，单核细胞分化为破骨细胞及骨破坏能力均受到抑制，结果如图4所示。

[0053] 结果判断：我们运用分离出的单核细胞进行体外培养，通过RANKL+M-CSF诱导培养21天后，进行抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色检测破骨细胞生成，发现外周血中PGC1β+单核细胞比例高于60%，提示人破骨细胞分化及成熟能力异常，结果如图5B所示；另外，将类风湿关节炎患者及正常人的外周血中PGC1β+单核细胞进行流式细胞学检测，研究发现正常人外周血中PGC1β+单核细胞比例均低于60%，类风湿关节炎患者外周血中PGC1β+单核细胞比例约为90%～100%，结果如图5A所示。

[0054] 最后所应当说明的是，以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非对本发明保护范围的限制，尽管参照较佳实施例对本发明作了详细说明，本领域的普通技术人员应当理解，可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换，而不脱离本发明技术方案的实质和范围。

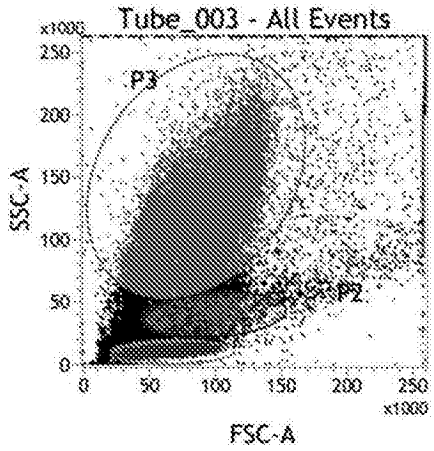

Tube_003 - All Events
P3
P2
SSC-A
FSC-A
x1000

图1

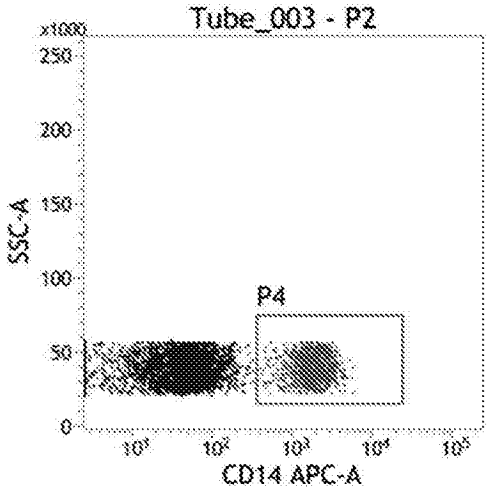

Tube_003 - P2
P4
SSC-A
CD14 APC-A
x1000

图2

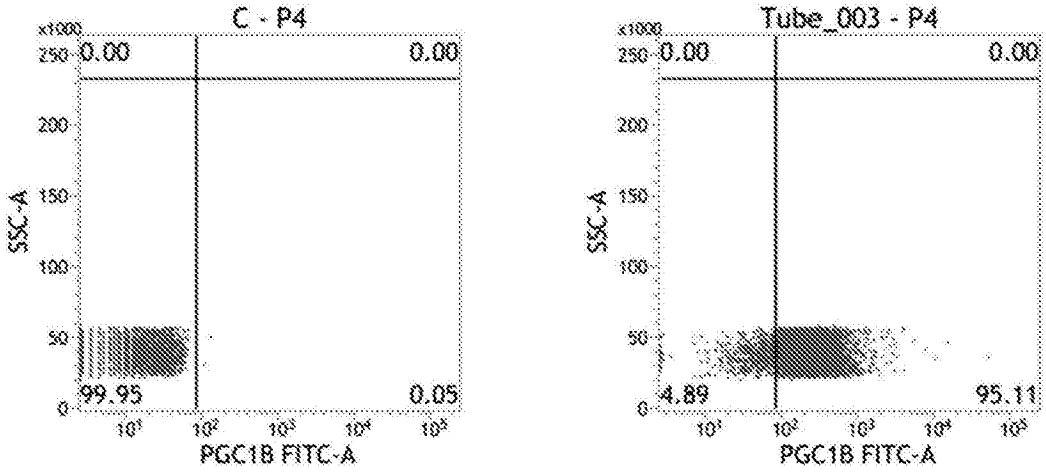

C - P4
0.00
0.00
99.95
0.05
SSC-A
PGC1B FITC-A
Tube_003 - P4
0.00
0.00
4.89
95.11
SSC-A
PGC1B FITC-A

图3

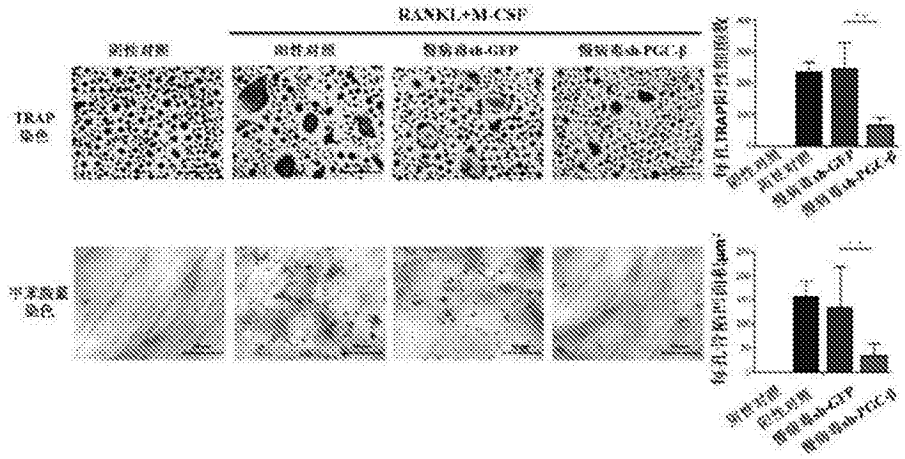

RANKL+M-CSF
正常对照
模型对照
慢病毒sh-GFP
慢病毒sh-PGC-β
TRAP染色
平滑肌肌动蛋白染色

图4

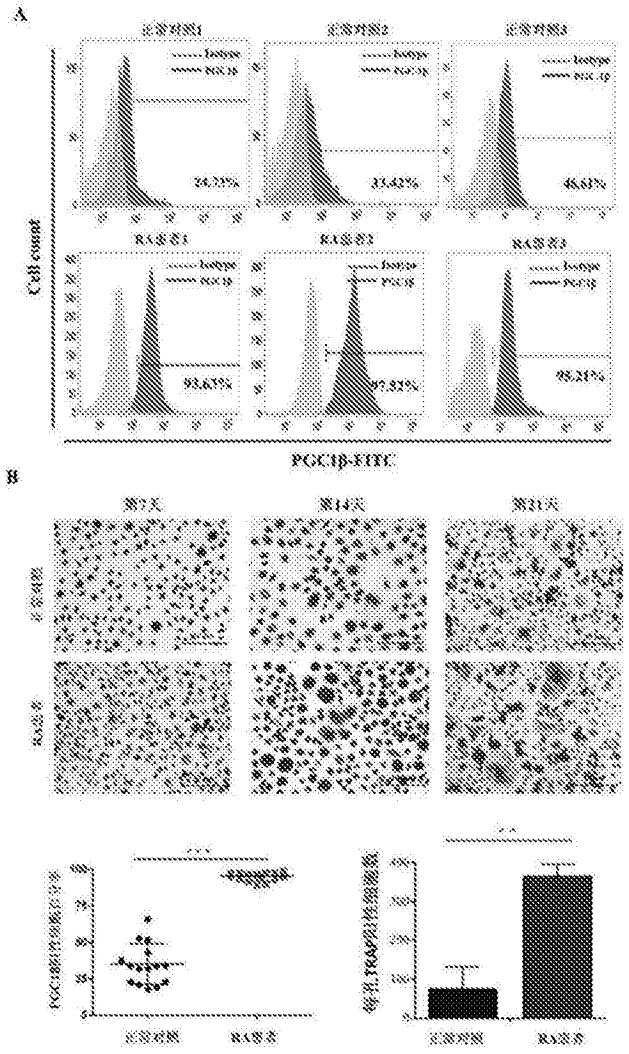

A
正常对照1
正常对照2
正常对照3
RA患者1
RA患者2
RA患者3
Isotype
PGC1β
24.73%
33.62%
46.61%
93.63%
97.52%
98.21%
Cell count
PGC1β-FITC
B
第7天
第14天
第21天
正常对照
RA患者

图5