

至少应包括最低检测限和精密度。

7 其他需要注意的问题

如果申报产品同时适用于几种机型,应提交采用所有适用机型进行的全项目分析性能研究资料。如果申报产品包括多种包装规格,申请人应说明不同包装规格的性能是否存在差异,如存在差异,应提交不同包装规格的全项目分析性能评估资料。

企业参考品在产品的设计开发、性能验证和生产质控等方面具有重要的作用。在产品的设计研发的初期,申请人采用已上市同类产品或其他合理方法制备企业内部参考品,然后采用企业内部参考品选择申报产品适用的主要原材料;在产品成型之后,申请人采用企业参考品对申报产品的分析性能进行验证;在每批产品出厂时,申请人采用企业参考品对生产的每批产品进行质量控制。分析性能评估资料对产品的设计开发的结果进行验证,主要考察申报产品的最低检测限、精密性、特异性等技术指标。鉴于该两部分资料在注册申报中的重要性,希望申请人在法规框架下,依托企业自身的研发平台和研发习惯,科学合理地制备企业参考品、进行产品性能评价。

参考文献

[1] 韦琪平. 耐多药结核病研究进展[J]. 医学信息, 2014, 27(22): 670-671.

[2] 肖和平. 中国耐药结核病的流行现状与治疗对策[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2010, 33(7): 481-482.

[3] 张玲. 肺结核病的诊断和控制耐药结核的新思维[J]. 临床荟萃, 2014, 29(6): 601-604.

[4] 王伟, 刘京铭, 李传友. WHO 2014 年版《耐药结核病规划管理指南伙伴手册》解读之五(耐药结核病实验室检测)[J]. 中国防痨杂志, 2015, 37(6): 655-658.

[5] 聂文娟, 初乃惠. WHO 2014 年版《耐药结核病规划管理指南伙伴手册》系列解读之七(耐多药与广泛耐药结核病的治疗)[J]. 中国防痨杂志, 2015, 37(7): 800-802.

[6] 张琳琳, 杨华, 肖和平. 结核分枝杆菌联合药敏试验的研究进展[J]. 中国防痨杂志, 2015, 37(1): 86-89.

• 综 述 •

NF-κB 在类风湿性关节炎中的作用及调控机制

王 晨 综述, 程艳杰 审校

(大连医科大学附属第一医院检验科 116011)

关键词: NF-κB; 类风湿性关节炎; 促炎作用

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2016.18.037

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2016)18-2600-04

类风湿性关节炎(RA)是1种慢性、系统性自身免疫性疾病,可累及人体许多组织与器官,对关节的破坏尤为严重。主要病理特征为炎性细胞浸润、滑膜组织增生、血管生成、血管翳形成、软骨的破坏及骨的侵蚀。目前认为炎性反应介质的持续作用是RA病变加重的主要原因。NF-κB是1种影响广泛的转录因子,能促进多种基因转录和表达,与炎性反应、免疫应答及细胞增生、分化和凋亡等重要的生理病理过程密切相关。NF-κB在RA的发病中起重要的调节作用,主要通过调控细胞因子(TNF-α、IL-1β)、基质金属蛋白酶 MMPs(MMP-3、MMP-9)、血管生成因子(VEGF)、诱导酶(COX-2、iNOS)等基因表

[7] 田际云, 武洁, 李静, 等. 溶解曲线法在结核分枝杆菌药敏试验质量评估中的应用[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2015, 38(2): 105-109.

[8] 欧喜超, 夏辉, 李强, 等. 结核分枝杆菌及利福平耐药核酸扩增检测成本分析[J]. 中国防痨杂志, 2013, 35(9): 723-728.

[9] 董劲春. 定性检测用体外诊断试剂的企业内部参考品的设置[J]. 放射免疫学杂志, 2011, 24(1): 50-51.

[10] 毛省侠, 郭准. 浅谈体外诊断试剂质量体系中国企业参考品的管理[J]. 中国医疗器械信息, 2011, 17(10): 46-53.

[11] 谷金莲, 祁自柏, 扬振, 等. 第5套丙型肝炎病毒抗体诊断试剂国家参考品的研制[J]. 中国生物制品学杂志, 2006, 19(1): 68-70.

[12] 谭玉华, 于婷, 李奕辉, 等. 时间分辨荧光免疫法风疹病毒 IgG 抗体定量测定试剂盒的研制与性能评价[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(4): 472-474.

[13] 徐伟文. 体外诊断试剂研制常用技术指标之分析性能评估[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2010, 2(2): 140-144.

[14] 单咏梅, 杨凡, 万海英. LIAISON 全自动化学发光仪测定 25-羟基维生素 D 分析性能评估[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(10): 1252-1253.

[15] 黄妍姣, 黄宪章, 庄俊华, 等. CLSI EP12-A2 文件在 HBe-Ab 定性检测性能评价中的应用[J]. 检验医学, 2012, 27(11): 900-903.

[16] Clinical and Laboratory Standards Institute. EP12-A2, User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance; Approved Guideline-Second Edition[S]. USA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.

[17] Clinical and Laboratory Standards Institute. EP15-A2, User Verification of Performance for Precision and Trueness; Approved Guideline-Second Edition[S]. USA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005.

(收稿日期: 2016-04-03 修回日期: 2016-06-11)

达,参与关节炎症反应及损伤反应等病理进程。本文就 NF-κB 在 RA 中的作用及调控机制予以综述。

1 NF-κB 概述

NF-κB 于 1986 年由 Sen 和 Baltimore 发现,得名于它能够与 B 细胞免疫球蛋白 κ 轻链基因的增强子 κB (GG-GACTTTC)特异结合,并能促进 κ 基因表达的核蛋白因子,故称之为核因子 κB,是近年发现的最重要的转录因子之一。NF-κB 存在于多种细胞类型中,调控的靶基因包括免疫相关受体、细胞因子、炎性因子、黏附分子、急性期蛋白等。

1.1 NF-κB 的分子结构 NF-κB 是真核细胞转录因子 Rel 家

族成员之一,广泛存在于哺乳动物细胞中。NF- κ B/Rel 家族成员均具有约 300 个氨基酸组成的相同的高度保守 N 端区域,称为 Rel 同源区(RHD)。该区包括有与 DNA 结合区、二聚体化区、与抑制蛋白 I κ B 相互作用区及核定位信号区域(NLS)。根据 C 末端序列的不同分为两大类:一类包括 P65(RelA)、RelB 和 cRel,它们的 C 末端都包含有 1 个或 1 个以上的跨域激活结构域,内含丰富的丝氨酸、酸性及疏水性氨基酸;另一类包括 P50(NF- κ B1)和 P52(NF- κ B2),它们不含跨域激活结构域,是由共同翻译或更大的前体蛋白(P105 和 P100)裂解而成。NF- κ B/Rel 蛋白以一定的方式结合成同二聚体或异二聚体,目前发现的异二聚体有 P50/P65、P50/c-Rel、P65/c-Rel 和同二聚体 P50/P50、P65/P65 等^[1]。NF- κ B 二聚体的组成决定了其位点识别的特异性,即决定它与不同 DNA 序列结合的能力。二聚体组成的不同还会影响 NF- κ B 与其抑制因子、调节因子之间的结合。尽管 NF- κ B 是指所有的 Rel 蛋白二聚体,但鉴于 P50/P65 是第 1 个鉴定的 NF- κ B,而且在多种细胞中含量丰富,所以习惯上 NF- κ B 仍指 P50/P65。

1.2 NF- κ B 的抑制蛋白 I κ B 核因子 κ B 抑制蛋白(I κ B)是 NF- κ B 的抑制因子。I κ B 蛋白家族与 Rel 蛋白家族一样,也是一大家族,它们都来源于相同祖先 NF- κ B/I κ B 超家族具有 Rel 同源区-锚蛋白重复序列区(RHD-ARD)结构。I κ B 蛋白一方面可以在胞浆中与 NF- κ B 二聚体结合形成复合物,抑制 NF- κ B 进入细胞核发挥转录激活作用;另一方面也可以直接在细胞核内抑制 NF- κ B 与 DNA 的结合。I κ B 蛋白家族主要成员有:I κ B α 、I κ B β 、I κ B ϵ 、Bcl-3、I κ B γ 、I κ B δ 、p100 和 p105 等。p100 和 p105 既含有 RHD 结构,也含有 ARD 结构。

1.3 NF- κ B 抑制蛋白激酶 IKK NF- κ B 抑制蛋白激酶(IKK)蛋白激酶复合体是调控 NF- κ B 信号通路的核心环节,其由 IKK α 、IKK β 、IKK γ 3 个亚基组成。IKK α 和 IKK β 都可以使 I κ B α 肽链 N 端的 Ser32 和 Ser36 磷酸化,但 IKK β 的活性更强,它在前炎症介质诱导 NF- κ B 反应性活化过程中起主要作用,而 IKK α 主要作用于细胞的成熟与分化过程^[2]。

1.4 NF- κ B 的活化 一般情况下,细胞中的二聚体 NF- κ B 与 I κ B 结合成三聚体,处于未活化状态而存在于细胞质中。当细胞受到 TNF- α 、IL-1 β 、脂多糖(LPS)、氧化剂和佛波脂、植物血凝素等细胞外信号刺激时,可激活 IKK,导致 I κ B 发生磷酸化和降解,NF- κ B 与 I κ B 发生解离,然后 NF- κ B 迅速从细胞质移位至细胞核,与靶基因 κ B 位点特异性结合,促进靶基因的转录^[3]。

2 NF- κ B 与 RA

在 RA 患者关节滑膜和关节炎动物模型中,NF- κ B 均处于高度活化状态,活化的 NF- κ B 不仅可以诱导炎症介质的产生,还能够募集它们参与局部炎症反应。而目前认为炎症介质的持续作用是 RA 病变加重的主要原因,因此推断 NF- κ B 可能在 RA 发病中起关键作用。除此之外,NF- κ B 可通过调节促血管生成因子的产生,促进病理性血管生成,维持炎症反应。NF- κ B 还可上调 MMPs,导致软骨的破坏和骨的侵蚀。因此,阐明 NF- κ B 对 RA 的调控作用对找到新靶点治疗 RA 具有重要作用。

2.1 RA 中 NF- κ B 表达量的变化 NF- κ B 在 RA 的滑膜细胞中广泛表达,并与一些炎症细胞因子如 TNF- α 、IL-1 β 的表达具有一致性。随着病情发展,关节滑膜中 NF- κ B 的含量也相应增加,并且与关节粘连及软骨和骨的破坏具有明显相关性^[4]。免疫组化分析显示,RA 患者滑膜组织中 NF- κ B p65 和

p50 的表达比较丰富,尤其是 p65 的表达^[5]。同样,在 II 型胶原诱导关节炎(CIA)大鼠模型的关节滑液中 NF- κ B 表达水平显著增加。蛋白印迹技术显示,在 CIA 大鼠模型中 NF- κ B p65 蛋白的表达水平明显升高并且伴有 p65 磷酸化现象,表明有可能发生 NF- κ B 的高度活化。用芒果苷(NF- κ B 抑制剂)可有效抑制这条信号通路,从而减轻 RA 的病理性改变。相反,缺少 NF- κ B p65 亚基的大鼠模型则不会发生关节破坏^[6-7]。Chen 等^[4]在 CIA 大鼠模型中用凝胶电泳迁移率改变分析法(EMSA)证明,与正常大鼠模型相比,CIA 大鼠模型中 NF- κ B 与 DNA 结合的量更高,并且产生更多的炎症介质。以上研究表明,NF- κ B 可能与介质协同参与 RA 滑膜炎性反应、血管的增生、基质降解、滑膜组织增生等一系列病理改变。

2.2 RA 中 NF- κ B 对炎症细胞因子的调控作用 炎症因子持续作用于病变部位是 RA 病情进展和恶化的关键环节。研究发现 NF- κ B 作为重要的转录因子,它的激活可诱导大量炎症细胞因子产生如 TNF- α 、IL-1 β ,而 TNF- α 、IL-1 β 的上调又可正反馈调节 NF- κ B 的活化,这种恶性循环形成持久、放大的炎症反应,导致机体发生炎症病理损伤。IL-6 是 TNF- α 和 IL-1 β 的某些生物效应的放大因子,可放大 TNF- α 和 IL-1 β 对关节滑膜和软骨的损伤^[8]。Tsubaki 等^[6]在 CIA 大鼠模型中研究发现,大鼠的血清、胸腺和脾脏中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 在 mRNA 和蛋白表达水平均升高,这些炎症细胞因子可能是通过激活 NF- κ B 和 ERK1/2 信号通路介导产生的。使用 NF- κ B 抑制剂芒果苷处理后,NF- κ B 和 ERK1/2 的磷酸化水平明显降低,血清、胸腺和脾脏中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 量也相应减少。进一步研究表明,NF- κ B 和 ERK1/2 信号通路的活化分别是上游 IKK 和 Raf 激酶的磷酸化实现的^[9]。Li 等^[10]研究发现,在 CIA 大鼠模型中,TNF- α 通过诱导 IKK、I κ B α 、I κ B β 发生磷酸化从而激活 NF- κ B(P50/P65),后者活化后经转位进入细胞核促进 IL-1 β 、IL-6、IL-8 等促炎症细胞因子的表达。此外还发现,用 TNF- α 刺激 RA 滑膜成纤维细胞(RASF)时 PI3K/Akt 表达也增高,相反,用 PI3K 抑制剂(LY294002)处理 RASF 后,Akt、IKK、P65 的表达均降低。因此,TNF- α 可能通过调控 PI3K/Akt 通路激活 NF- κ B,而介导大量炎症细胞因子产生并发挥炎症效应,导致 RA 滑膜增生、血管生成、软骨破坏和骨的侵蚀。

2.3 RA 中 NF- κ B 对基质金属蛋白酶(MMP)的调控作用 MMP 是一类锌离子依赖的蛋白水解酶,主要负责组织重塑与细胞外基质(ECM)的降解,在 RA 软骨和骨破坏中起重要作用。基质的降解还为 FLS 的侵袭、病理性血管的生成、炎症反应的扩散等提供条件。其中 MMP-3、MMP-9 在 RA 患者外周血和关节滑液中均有表达,可对关节的结构和功能造成不可逆性损伤,因此备受人们的关注^[11]。FLS 的迁移和侵袭在 RA 发病中起关键作用,MMP-9 能够降解细胞外基质为 FLS 的迁移和侵袭提供足够空间,导致关节炎性反应的扩散并累及其他关节。Li 等^[12]研究发现,用 IL-1 β 、TNF- α 刺激 FLS 后可引起 NF- κ B 抑制蛋白 I κ B 磷酸化后被泛素蛋白酶降解,活化的 NF- κ B 转位进入胞核与 MMP-9 基因启动子序列结合促进其转录,MMP-9 的大量产生可为 FLS 的迁移与侵袭提供了有利条件。进一步研究表明,RA 的 FLS 中 MMP-9 不仅受 NF- κ B 调控,MMP-9 也可反过来激活 NF- κ B,用 MMP-9 的小干扰 RNA 处理 FLS 后,IL-1 β 、IL-6、IL-8 和 TNF- α 的表达均降低,且 NF- κ B 的活化受抑制,同时也抑制了 FLS 介导的关节软骨的损伤^[13]。RA 患者血清中 MMP-3 表达水平也明显升高,是由滑膜细胞产生并释放到关节滑液中,再进入外周血液循环中。近

期研究表明,血清 MMP-3 能够反映 RA 疾病的活动度及炎症反应的进展程度,是 1 种理想的诊断 RA 的非侵入型生物标志物,其活化与 C 反应蛋白、红细胞沉降率等指标具有相关性,并能够促进巨噬细胞和中性粒细胞的激活从而参与组织炎症反应损伤过程。研究发现,MMP-3 基因的表达也可由 NF- κ B 调控,使用 TNF- α 拮抗剂处理后血清中 MMP-3 表达水平明显降低,这一过程可能是由 TNF- α 拮抗剂抑制 I κ B 的降解,进而抑制 NF- κ B 的活化实现的^[14-15]。因此,NF- κ B 可能通过上调 MMP-3、MMP-9 基因的表达,对关节滑膜、软骨和骨造成破坏。

2.4 RA 中 NF- κ B 对血管生成的调控作用 血管生成是 RA 中关节滑膜持续性炎症反应、免疫反应、血管翳形成的必要条件,不但为增生的滑膜组织提供氧气和营养物质,还能够募集炎症细胞,最终造成关节不可逆性破坏。RA 患者的关节滑膜中一些血管生成因子,如 VEGF、IL-8、CXCL12、MCP-1 能够有效诱导血管的生成。Moon 等^[16] 研究发现,用 Toll 样受体 3 (TLR3) 的激动剂聚肌苷酸胞苷酸刺激 FLS,可引起 VEGF 和 IL-8 在基因和蛋白水平上的表达均升高,而用 NF- κ B 抑制剂处理后,即使在 TLR3 激动剂刺激下 VEGF 和 IL-8 的表达量却不增加。因此,NF- κ B 信号通路可能参与 VEGF 和 IL-8 产生过程的调控,促进血管生成。VEGF 是 RA 中重要的促血管生成因子,通过与其受体结合诱导静息状态下的内皮细胞分化,形成新生血管。同样,IL-8 作为 CXC 类趋化因子,通过与内皮细胞表面的 CXCR1 和 CXCR2 受体结合,调节内皮细胞的增殖和迁移,促进血管的生成。近期研究发现,CXCL12 基因的启动子上也存在 NF- κ B 的结合位点。CXCL12 的产生是依赖 NF- κ B 诱导蛋白(NIK)的 NF- κ B 非经典激活途径实现的。CXCL12 通过与 CXCR4+ 造血细胞和 CXCR4+ 内皮细胞相结合,促进造血细胞和内皮细胞的增殖与分化,诱导血管生成^[17]。还有研究表明,在 CIA 大鼠模型中,活化的 NF- κ B 还可上调单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)的表达水平,而使用 NF- κ B 抑制剂 PDTC 处理后,MCP-1 表达水平明显降低^[18]。MCP-1 不仅可以趋化单核细胞和巨噬细胞,而且是 1 种重要的促血管生成因子,MCP-1 主要通过上调缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α) 和 VEGF 的表达间接促进血管的生成^[19]。因此,NF- κ B 可能通过调控血管生成因子的表达促进 RA 中血管生成。

2.5 RA 中 NF- κ B 对诱导酶(COX-2、iNOS)的调控作用 RA 中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等炎症细胞因子可刺激滑膜细胞过度表达环氧合酶-2(COX-2)、诱导型一氧化氮合酶(iNOS),引起 PGE2 和 NO 大量合成和释放。PGE2 作为 PGs 家族中重要成员,在炎症反应、细胞凋亡及血管生成方面均有重要作用。NO 可影响滑膜细胞和软骨细胞的代谢,主要体现在它能促进软骨蛋白多糖降解并增强滑膜中血管的通透性,从而导致滑膜炎性反应和软骨破坏。研究表明,RA 滑膜中 RAW 264.7 细胞受 LPS 的刺激可使 JNK 和 p38 MAPK 磷酸化而激活 NF- κ B,从而上调 COX-2 和 iNOS 基因的表达,可能引起组织炎症细胞浸润、滑膜异常增生、软骨破坏,最终导致关节疼痛、肿胀、变形^[20-22]。COX-2 的代谢产物 PGE2 也受 NF- κ B 调控。RA 中 FLS 在 IL-1 β 刺激下,可激活 IKK,使 I κ B 降解并活化 NF- κ B,活化的 NF- κ B 进入胞核可与 PGE2 基因的启动子位点结合促进其转录^[23]。因此,NF- κ B 可能通过对 COX-2、iNOS 及其产物 PGE2 和 NO 的调控,加重局部炎症反应,并诱导炎症细胞因子的释放,对血管、细胞和组织造成不可逆性破坏。

3 展 望

NF- κ B 能调节多种炎症基因的表达水平,与炎症反应的发生和发展密切相关。环境、遗传、感染等各种因素引起 NF- κ B 信号传导通路的异常激活,进而诱导致炎症因子的大量转录,共同参与了 RA 的发病过程。以 NF- κ B 为中心靶点,对其信号通路的各个环节实施干预,目前已成为了抗炎、抗风湿治疗的热点。但一定的 NF- κ B 是机体生长发育所必须的,因此,找出 NF- κ B 激活途径的抑制物而不影响其生理活性,将是今后 RA 治疗研究中的重要方向。

参考文献

- [1] Chabot-Fletcher M. A role for transcription factor NF- κ B in inflammation[J]. *Inflamm Res*, 1997, 46(1): 1-2.
- [2] Westra J, Limburg PC. P38 mitogen-activated protein kinase(MAPK) in rheumatoid arthritis[J]. *Mini Rev Med Chem*, 2006, 6(8): 867-874.
- [3] Fan H, Sun B, Gu Q, et al. Oxygen radicals trigger activation of NF- κ B and AP-1 and upregulation of ICAM-1 in reperfused canine heart[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2002, 282(5): 1778-1786.
- [4] Chen WP, Yang ZG, Hu PF, et al. Acacetin inhibits expression of matrix metalloproteinases via a MAPK-dependent mechanism in fibroblast-like synoviocytes[J]. *J Cell Mol Med*, 2015, 19(8): 1910-1915.
- [5] Woo YJ, Yoon BY, Jhun JY, et al. Regulation of B cell activating factor(BAFF) receptor expression by NF- κ B signaling in rheumatoid arthritis B cells[J]. *Exp Mol Med*, 2011, 43(6): 350-357.
- [6] Tsubaki M, Takeda T, Kino T, et al. Mangiferin suppresses CIA by suppressing the expression of TNF- α , IL-6, IL-1 β , and RANKL through inhibiting the activation of NF- κ B and ERK1/2[J]. *Am J Transl Res*, 2015, 7(8): 1371-1381.
- [7] Wang HZ, Wang HH, Huang SS, et al. Inhibitory effect of baicalin on collagen-induced arthritis in rats through the nuclear factor- κ B pathway[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2014, 350(2): 435-443.
- [8] Hashizume M, Mihara M. The roles of interleukin-6 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis[J]. *Arthritis*, 2011, 2011: 765624.
- [9] Ahn JK, Hwang JW, Bae EK, et al. The role of Raf kinase inhibitor protein in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes invasiveness and cytokine and matrix metalloproteinase expression[J]. *Inflammation*, 2012, 35(2): 474-483.
- [10] Li J, Li J, Yue Y, et al. Genistein suppresses tumor necrosis factor α -induced inflammation via modulating reactive Oxygen species/Akt/nuclear factor κ B and adenosine monophosphate-activated protein kinase signal pathways in human synovial cell MH7A cells[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2014, 8: 315-323.
- [11] Kim KS, Choi HM, Lee YA, et al. Expression levels and association of gelatinases MMP-2 and MMP-9 and collagenases MMP-1 and MMP-13 with VEGF in synovial flu-

- id of patients with arthritis[J]. Rheumatol Int, 2011, 31(4):543-547.
- [12] Li G, Liu D, Guo S, et al. Anti-invasive effects of Celastrus Orbiculatus extract on interleukin-1 beta and tumour necrosis factor-alpha combination-stimulated fibroblast-like synoviocytes[J]. BMC Complement Altern Med, 2014, 14:62.
- [13] Xue M, Mckelvey K, Shen K, et al. Endogenous MMP-9 and not MMP-2 promotes rheumatoid synovial fibroblast survival, inflammation and cartilage degradation [J]. Rheumatology(Oxford), 2014, 53(12):2270-2279.
- [14] Sun S, Bay-Jensen AC, Karsdal MA, et al. The active form of MMP-3 is a marker of synovial inflammation and cartilage turnover in inflammatory joint diseases [J]. BMC Musculoskelet Disord, 2014, 15:93.
- [15] Mcinnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis[J]. N Engl J Med, 2011, 365(23):2205-2219.
- [16] Moon SJ, Park MK, Oh HJ, et al. Engagement of toll-like receptor 3 induces vascular endothelial growth factor and interleukin-8 in human rheumatoid synovial fibroblasts [J]. Korean J Intern Med, 2010, 25(4):429-435.
- [17] Madge LA, Kluger MS, Orange JS, et al. Lymphotoxin-alpha 1 beta 2 and LIGHT induce classical and noncanonical NF-kappa B-dependent proinflammatory gene expression in vascular endothelial cells[J]. J Immunol, 2008, 180(5):3467-3477.
- [18] Wang F, Yang JL, Yu KK, et al. Activation of the NF-kB pathway as a mechanism of alcohol enhanced progression and metastasis of human hepatocellular carcinoma [J]. Mol Cancer, 2015, 14:10.
- [19] Niu J, Kolattukudy PE. Role of MCP-1 in cardiovascular disease; molecular mechanisms and clinical implications [J]. Clin Sci(Lond), 2009, 117(3):95-109.
- [20] Park JW, Kwon OK, Kim JH, et al. Rhododendron album Blume inhibits iNOS and COX-2 expression in LPS-stimulated RAW264. 7 cells through the downregulation of NF-kB signaling[J]. Int J Mol Med, 2015, 35(4):987-994.
- [21] Chou LW, Wang J, Chang PL, et al. Hyaluronan modulates accumulation of hypoxia-inducible factor-1 alpha, inducible nitric oxide synthase, and matrix metalloproteinase-3 in the synovium of rat adjuvant-induced arthritis model[J]. Arthritis Res Ther, 2011, 13(3):R90.
- [22] Zhou HY, Shin EM, Guo LY, et al. Anti-inflammatory activity of 4-methoxyhonokiol is a function of the inhibition of iNOS and COX-2 expression in RAW 264. 7 macrophages via NF-kappaB, JNK and p38 MAPK inactivation[J]. Eur J Pharmacol, 2008, 586(1/3):340-349.
- [23] Yoon HY, Lee EG, Lee H, et al. Kaempferol inhibits IL-1 β -induced proliferation of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts and the production of COX-2, PGE2 and MMPs[J]. Int J Mol Med, 2013, 32(4):971-977.

(收稿日期:2016-02-26 修回日期:2016-05-09)

• 综 述 •

脊髓灰质炎病毒实时荧光定量 RT-PCR 方法的应用与发展

唐海淑, 杜相品, 甫尔哈提·吾守尔, 范新春, 关 静 综述, 崔 惠 审校
(新疆维吾尔自治区疾病预防控制中心免疫规划科, 乌鲁木齐 830011)

关键词: 脊髓灰质炎病毒; 实时荧光定量 RT-PCR; 应用发展

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2016. 18. 038

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2016)18-2603-03

1996 年美国 Applied Biosystems 公司推出了实时荧光定量 PCR 技术, 该技术是指在 PCR 反应体系中加入荧光基团, 利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程, 最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法^[1-2]。该技术实现了 PCR 从定性到定量的飞跃, 可动态实时检测核酸产物的形成, 无需后处理过程, 避免了扩增产物的污染, 而且具有直观、重复性好、特异性强、敏感性高、定量准确、自动化程度高、速度快、全封闭和易操作等优点, 因而目前已得到广泛应用^[3-4]。

2011 年 8 月新疆维吾尔自治区局部地区发生输入性脊髓灰质炎野病毒(WPV)的疫情后, 为了缩短检测时限, 中国决定从 2013 年起在脊髓灰质炎(下称脊灰)实验室网络启用世界卫生组织推荐的脊灰病毒(PV)分离新的检测流程。新检测流程要求省级脊灰实验室经过培训考核合格后, 使用美国疾病预防控制中心研制的实时荧光定量逆转录-聚合酶链反应(rRT-PCR)试剂和方法, 对分离出的 PV 进行型内鉴定(ITD)。

1 实时荧光定量 RT-PCR 方法

1.1 工作原理 根据原理的不同, 实时荧光定量 RT-PCR 检

测方法主要分为利用与靶序列特异杂交的探针来指示扩增产物增加的探针类和利用荧光染料或者特殊设计的引物来指示扩增的增加非探针类 2 种^[5]。荧光染料技术是在 PCR 反应体系中加入荧光探针, 利用荧光信号累积实时监测整个 PCR 进程, 最后通过标准曲线对未知模板 DNA 进行分析的 1 种方法^[6]。荧光染料法是利用荧光染料染色 DNA 双链结构, 在 DNA 双链结构的小沟中, 当荧光染料处于游离状态时, 检测不到荧光信号, 当它与 dsDNA 结合后荧光强度明显增强, 即被荧光探测系统检测到, 荧光信号强度的增加是与初始模板量相关的, 由此可以进行定量 DNA 分析^[7]。荧光染料目前主要有 Pico Green 和 SYBR Green^[8]。PV 实时荧光定量 RT-PCR 采用的是 TaqMan 荧光探针法。

1.2 定量原理 实时荧光定量 RT-PCR 方法检测到的荧光信号强度与 PCR 反应产物的量呈正相关, 即每扩增 1 条 DNA 链, 就有 1 个荧光分子形成, 实现了荧光信号的累积与 PCR 产物的形成完全同步, 这样就可以通过荧光强度变化监测产物量的变化, 从而得到 1 条荧光扩增曲线图^[9]。一般而言, 荧光扩