

因素[J]. 中国公共卫生, 2012, 28(8): 1009-1013.

[8] 李妍, 马儒林, 郭恒, 等. 新疆北疆地区 18 岁及以上汉族人群血脂异常的调查分析[J]. 石河子大学学报: 自然科学版, 2011, 29(3): 318-321.

[9] 袁振才, 张雪峰. 移居高原人群返平原后血脂水平的调查[J]. 环境与 健康杂志, 2011, 28(7): 619-621.

[10] 李星辉, 乔燕, 李宝鹃, 等. 甘肃省甘南州藏族人群高脂血症流行病学调查[J]. 第四军医大学学报, 2009, 30(21): 2472-2473.

[11] 庞金荣, 颜中. 西藏高原地区藏族人群血脂水平分析[J]. 中华检验医学杂志, 2010, 33(9): 856-861.

[12] 兰咏梅, 谢小冬, 贾云, 等. 甘肃省肃南裕固族自治县居民血脂水平调查[J]. 中国公共卫生, 2010, 26(7): 887-889.

[13] 兰咏梅, 韩涛, 金龙, 等. 甘肃省裕固族地区中老年居民血脂水平的流行病学调查[J]. 中国老年学杂志, 2011, 31(3): 371-373.

[14] 李金, 梁得宁, 马翠, 等. 宁夏回族自治区灵武市回族人群血脂水平调查[J]. 中华心血管病杂志, 2006, 34(10): 939-940.

[15] 樊学敏, 赵赓, 许红霞, 等. 宁夏农村居民胰岛素抵抗与血脂异常的观察[J]. 中国糖尿病杂志, 2012, 20(7): 486-488.

[16] 金晶, 刘秀英, 许红霞, 等. 宁夏农村居民血脂水平调查[J]. 卫生研究, 2010, 39(6): 731-734.

[17] 张坚, 满青青, 王春荣, 等. 中国 18 岁及以上人群血脂水平及分布特征[J]. 中华预防医学杂志, 2005, 39(5): 302-305.

[18] 刘秀英, 刘兰, 赵鼓, 等. 银川市成年居民血脂异常患病率及其危险因素调查[J]. 宁夏医科大学学报, 2011, 33(1): 27-30.

[19] 高彬, 陈非, 张雅萍, 等. 陕西秦岭以北地区成人血脂水平的横断面调查[J]. 中国动脉硬化杂志, 2010, 18(10): 824-827.

[20] Campbell S, Genest J. HDL-C: clinical equipoise and vascular endothelial function[J]. Expert Rev Cardiovasc Ther, 2013, 11(3): 343-353.

[21] 樊霞, 高峰, 朱艳, 等. 延安市在岗人群血脂分布特征及其与高血糖高血压的关系[J]. 现代预防医学, 2012, 39(23): 6197-6200.

[22] 李黎. 某市部分职业人群血脂水平调查分析[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(15): 1730-1731.

[23] 李红霞, 满永国, 汉邦, 等. 北京市部分人群血压、血糖、血脂异常的知晓率、治疗率和达标率的调查[J]. 北京医学, 2007, 29(1): 57.

[24] Kotseva K, Wood D, De Backer G, et al. EUROASPIRE III. Management of cardiovascular risk factors in asymptomatic high-risk patients in general practice: cross-sectional survey in 12 European countries[J]. Eur J Cardiovasc Prev Rehabil, 2010, 17(5): 530-540.

(收稿日期: 2013-04-07)

• 综 述 •

免疫层析纳米金试纸研究方法进展

华 川¹综述, 府伟灵²审校

(1. 中国人民解放军第 252 医院, 河北保定 071000; 2. 第三军医大学西南医院检验科, 重庆 400038)

关键词: 免疫层析; 纳米金试纸; 研究方法; 进展

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2013. 17. 036

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)17-2286-04

纳米金(也称为胶体金)是指分散粒子直径在 1~150 nm 之间的金溶胶, 属于多相不均匀体系, 颜色呈橘红色到紫红色。1971 年研究者将纳米金引入免疫化学, 开始作为一种免疫标记技术而被使用。此后免疫纳米金技术作为一种新的免疫学方法, 在生物医学各领域得到了日益广泛的应用。目前在医学检验中的应用主要是免疫层析法(IC)和快速免疫金渗滤法(DIGFA)。纳米金免疫层析技术是目前国内外常用的一种快速筛查方法, 用于一些传染病的快速诊断和生物反恐的快速检测, 使疑似感染者在疾病的早期有机会得到及时治疗。同时, 使用纳米金免疫层析技术对可疑样品进行快速筛查, 对于传染病的防控具有重要意义^[1]。由于其快速便捷、不需特殊设备、结果判断直观, 极适合临床医生、临床实验室、家庭的自我检测及现场快速诊断。近年来该技术越来越受到人们的重视, 在临床检验如过敏症标志物、心脏病标志物、药物滥用、激素检测、传染性疾病、免疫性疾病、肿瘤标志物、毒素检测、血液生化指标的检测(血红蛋白、血脂等), 在其他领域如农业生产、食品卫生和环境保护等领域都有广泛应用^[2-3]。免疫层析纳米金试纸研制过程包括金颗粒制备、纳米金颗粒标记、膜和垫的处理等过程, 本文对纳米金免疫层析试纸研究方法进展进行综述, 以为纳米金免疫层析试纸的研究及生产提供一定指导。

1 纳米金颗粒制备

1.1 金颗粒的制备原理 免疫纳米金技术是以纳米金作为示踪标志物应用于抗原抗体的一种免疫标记技术。纳米金是由氯金酸(HAuCl₄)在还原剂如白磷、抗坏血酸、枸橼酸钠、鞣酸

等作用下, 聚合成为特定大小的金颗粒, 并由于静电作用成为一种稳定的胶体状态, 称为纳米金。纳米金在弱碱环境下带负电荷, 可与蛋白质分子的正电荷基团形成牢固的结合, 由于这种结合是静电结合, 所以不影响蛋白质的生物特性。纳米金除了与蛋白质结合以外, 还可以与许多其他生物大分子结合, 如 SPA、PHA、ConA 等。

1.2 金颗粒制备方法 金颗粒制备方法有枸橼酸三钠还原法、鞣酸-枸橼酸钠还原法、白磷还原法。随着金属浓度的增加, 金属原子聚集形成一个核, 核继续增大, 通常胶体能合成核大小 1~250 nm 的单层纳米颗粒。不同的还原剂可以制备大小不同的纳米金, 纳米颗粒的尺寸和其随后的特性可以通过不同还原剂和还原反应速度来控制。随着纳米金颗粒尺寸的增加, 其对盐和其他环境的敏感性增加, 变得更易絮凝和聚集。另一方面, 在中性或生理 pH 条件下, 生物结合纳米金粒子是由纳米金的阴离子对蛋白质的阳离子有亲和力而合成的。一些蛋白质, 尤其是抗体能强烈吸附纳米金形成稳定复合物, 而蛋白质保留其生物学特性。

1.3 鉴定纳米金制备质量的方法 (1)目测直观法: 纳米金溶液不浑浊, 无漂浮物, 无颗粒沉淀物, 在日光灯下观察溶液中无微小颗粒, 或用光电笔透过金溶液成一条直线, 无散光现象, 表明制备纳米金颗粒质量好。(2)紫外-可见吸收光谱法: 纳米金微粒粒径、均匀程度与紫外-可见吸收光谱相关。波峰越尖, 峰宽越窄, 说明颗粒更均一、分散性越好^[4]。(3)透射电镜法: 将制备的纳米金颗粒经预处理后在透射电镜下观察, 直接反映

金颗粒溶液有无凝聚,均不均匀,分散性如何,颗粒直径大小^[5]。(4)表面增强拉曼光谱法(SERS);SERS强度与纳米微粒粒径相关,故SERS散射可用来表征纳米金粒子。另有研究者采用修正的长波长近似法计算得出了纳米金粒子SERS增强因子与粒径关系,当微粒粒径小于60 nm,球形粒子的增强因子随粒径增大而增大,后随粒径的增大而降低^[6]。(5)共振散射光谱法:蒋治良等^[7]研究了纳米金粒子共振散射光谱。结果表明:纳米金粒子在粒径10~95 nm范围内呈红色,最强共振散射峰位于580 nm处,散射强度随着纳米金粒子粒径的增大而增大,且此波长的共振散射光强度与粒径(d)呈正比。

2 金颗粒的标记

蛋白质对金颗粒的吸附是基于三个独立但相关现象的非共价过程:(1)纳米颗粒的阴离子和蛋白质阳离子的离子相互作用;(2)蛋白质和金属表面的疏水性吸引力;(3)金属和蛋白质的导电电子氮和硫原子的格结合。与其生物结合物相比,未结合的金属胶体溶液是不稳定的。这是由于电解质如NaCl的存在,胶体表面的阴离子被掩盖,导致吸引力和排斥力的不平衡。当金颗粒相互吸附形成聚集时胶体崩溃。纳米颗粒聚集现象可通过胶体颜色变化肉眼观察。蛋白质对金颗粒的吸附过程就是纳米金的标记过程,标记过程的一些关键参数直接影响后续制备纳米金免疫层析试纸的稳定性、灵敏度等特性。

2.1 纳米金标记关键参数研究方法 为了制备质量好、稳定的蛋白-纳米金颗粒复合物,几个关键参数需要考虑:蛋白质等电点,反应pH,标记在金上蛋白质浓度,胶体稳定性。

2.1.1 最适蛋白标记量 在纳米金最低蛋白标记量基础上再加上10%~20%^[8]或30%^[9],即为稳定所需蛋白质的最适标记量(也为实际用量)。待标记蛋白质最低稳定量的测定:(1)光电比色法-拐点法:制备一系列不同浓度的等体积蛋白质溶液(1 mL),分别加入5 mL纳米金中,迅速混匀,然后,各加入1 mL 10% NaCl溶液,摇匀,静置5 min后测各管光密度(OD)值。根据纳米金颗粒的大小,OD在520~580 nm之间测定,以OD值为纵坐标,蛋白质用量为横坐标作一曲线,取曲线最先与横轴相接近的那一点(即拐点)处的蛋白质用量为最低稳定量^[10];光电比色法-差值法:处理同前,只在加入NaCl摇匀,静置5 min后测各管OD₅₂₀和OD₅₈₀,以蛋白质用量为横坐标,以(OD₅₂₀-OD₅₈₀)为纵坐标绘制曲线,曲线拐点处蛋白质用量为最低稳定量^[11]。(2)共振散射光谱法:纳米金微粒的最强共振散射峰位于580 nm处。50 μL不同浓度蛋白质加入1 mL纳米金溶液中混匀,5 min后加入0.1 mL 10% KCl溶液,混匀后静置2 h,稀释至3.0 mL,用荧光分光光度计测定580 nm处共振散射强度。以蛋白质用量为横坐标,I₅₈₀为纵坐标绘制曲线,曲线拐点处蛋白量为最低稳定量^[12]。(3)目测法:将标记的蛋白质逐级稀释后(另设对照管),各取等体积顺序加入一系列装有1 mL纳米金的试管中,5 min后,在上述各管内分别加入0.1 mL 10% NaCl溶液,混匀静置2 h以上观察结果。没有加入蛋白质的管为对照管。小于5 nm颗粒的纳米金溶液,每个管内应加入5 μL 30%的双氧水,否则有不变蓝色及聚沉现象。未加蛋白质及加入蛋白质量不足以稳定纳米金的试管,即呈现由红变蓝的聚沉现象,而加入蛋白质量达到或超过最低稳定量的试管则纳米金的红颜色不变。其中含蛋白质量最低的试管即含稳定1 mL纳米金的必须蛋白质量。

2.1.2 最适标记pH 纳米金与蛋白质的结合成功与否,取决于pH值,一般只有在蛋白质等电点(PI)略偏碱的条件下二者才能牢固地结合,因此,标记之前须将纳米金溶液的pH值调至待标记蛋白质的等电点略偏碱。需提高纳米金的pH值时可用0.1 mol/L/0.2 mol/L K₂CO₃,需降低纳米金的pH值

时可用0.1N HCl。测定金溶液的pH,可能损害pH测定计的探头,因此,一般用精密的pH试纸测定其pH即可。

(1)目测法:在一定体积不同pH的纳米金溶液中加入适量的蛋白质溶液混匀,加入10% NaCl溶液适量,混匀后放置2 h,肉眼观察溶液颜色变化,保持纳米金溶液颜色不变的pH为最适pH。(2)光电比色法-拐点法:制备一系列不同pH的等体积纳米金溶液,分别加入等量的适量蛋白质,迅速混匀,然后,各加入一定体积10% NaCl溶液,摇匀,静置5 min后测各管OD值。根据纳米金颗粒的大小,OD在520~580 nm之间测定,以OD值为纵坐标,pH值为横坐标作一曲线,取曲线最先与横轴相接近的那一点处pH为最适标记pH^[13];光电比色法-差值法:处理同前,只在加入NaCl溶液混匀静置5 min后,测各管OD₅₂₀和OD₅₈₀,以pH值为横坐标,以(OD₅₂₀-OD₅₈₀)为纵坐标绘制曲线,曲线拐点处为最适标记pH^[11]。(3)共振散射光谱法:1 mL不同pH的纳米金溶液中,分别加入50 μL一定浓度的蛋白质溶液混匀,放置5 min后,加入0.1 mL 10% KCl,混匀,放置2 h,稀释至3.0 mL,测定I₅₈₀,以不同pH值为横坐标,I₅₈₀为纵坐标绘制曲线,曲线拐点处即为最适标记pH^[12,14]。

2.1.3 标记方法 当蛋白质的最适稳定量及标记的最佳pH值被确定以后便可进行标记。具体步骤如下:(1)根据用以标记的纳米金的总量计算出所需要的待标记蛋白质的总量;(2)将纳米金溶液的pH调节到需要的pH(可以直接用0.1 mol/L/0.2 mol/L K₂CO₃溶液或0.1N HCl溶液调节,也可以采用高速离心后将纳米金沉淀重悬于适当pH的缓冲溶液中);(3)一般按照纳米金与蛋白质体积比(10:1)的比例加入所需量的蛋白质溶液,混匀,室温静置一定时间;(4)加入封闭液封闭纳米金上多余位点来稳定免疫纳米金复合物,一般加入5%的牛血清白蛋白(BSA)使其终浓度为1%,或加入3%聚乙二醇(PEG MW20000)使其终浓度为0.05%;(5)纯化纳米金免疫复合物,复合物室温放置30 min或4℃放置过夜后进行离心纯化。一般在10 nm以上所标记的纳米金均可在调整离心机上离心,小于10 nm的纳米金用超速离心机离心,在4℃离心1 h左右,弃上清,将沉淀重悬于适量缓冲溶液中。也可用凝胶过滤法纯化免疫金复合物。纯化后的免疫金复合物溶液存放于4℃备用^[15-16]。

2.1.4 免疫纳米金复合物特性表征方法 (1)透射电镜分析:将纳米金和离心重悬后的免疫纳米金复合物做透射电镜分析,与空白纳米金颗粒相比,金颗粒周围有一明显的空晕,表示颗粒表面吸附有蛋白质分子。(2)紫外-可见光谱法:由于蛋白质与纳米金颗粒的相互作用,表面等离子体波段扩大,峰高增加,发生红移;免疫纳米金与羊抗鼠IgG结合后,减少纳米颗粒表面,表面等离子体波段减少。所得纳米金及免疫纳米金用双光束分光光度计于200~700 nm UV-vis间隔1 nm扫描,根据峰形变化进行判断^[17]。(3)荧光光谱分析:荧光光谱是研究蛋白质三维结构的有力工具,蛋白质色氨酸残基在280 nm被激发,监测300~500 nm发射谱带,比较纳米金-蛋白质复合物和游离蛋白质的发射谱带形状和最大波长。(4)间接竞争ELISA法:检测免疫纳米金的滴度和交叉反应。(5)直接竞争ELISA法:检测免疫纳米金的敏感性和相对稳定性^[9,17]。

3 膜和垫的处理

影响免疫层析试纸特异性和敏感性的3个主要因素:第一,检测线和纳米金上标记的抗体必须对N抗原决定簇有高度亲和力;第二,合适的硝酸纤维素膜也很重要;第三,样品垫和结合垫应该适当预处理^[18]。

3.1 膜的处理 硝酸纤维素膜(NC膜)是纳米金免疫层析反

应的载体,其孔径大小、质量好坏,层析膜的化学处理都直接影响检测结果。使用进口 NC 膜,不需要进行化学处理,利用其物理吸附能力,即可具备良好吸附蛋白质的能力,使受体固定时间长且性状稳定;但如果使用国产的 NC 膜则最好使用苯醌法、溴化氰等方法对其作化学处理,使其具有与受体蛋白共价连接的特性^[19]。NC 膜上点加或喷涂抗原或抗体后,一般需封闭和洗涤后进行干燥。室温干燥 NC 膜的目的是将抗体和抗原固定在 NC 膜上。抗原和抗体对硝酸纤维素膜的结合通过静电机制,非常强大的硝酸酯的偶极与强大的抗体和抗原肽键的偶极相互作用^[17]。

3.2 垫的处理 一般用玻璃纤维素膜作为样品垫和结合垫,结合垫和样品垫预处理后于 60 ℃干燥 2 h。喷涂了免疫纳米金复合物的结合垫于 37 ℃干燥 30 min 至 2 h。垫预处理液的缓冲液有 PBS^[16,20-21]、Tris 缓冲溶液^[22]、硼砂缓冲液^[23]。不同文献对垫的预处理液成分不一,干燥时间也有差异,实验过程中应根据具体免疫层析系统使用的缓冲体系进行改进。吸收垫一般用吸水性能良好的滤纸,无需预处理。

4 纳米金免疫层析试纸检测结果的确认方法

纳米金免疫层析试纸检测结果的确认方法(结果一致性实验方法)有:高效液相色谱串联质谱法(HPLC-MS/MS)^[18]、ELISA 方法^[16]、HPLC 法^[24]、竞争酶联免疫分析法(cdELISA)^[25]、放射免疫分析法(RIA)^[17]、RT-PCR 法^[19]、血凝抑制实验(HI)^[21,26]、液相色谱-质谱-质谱联用(LC-MS/MS)法^[27]。

5 纳米金免疫层析试纸重复性、稳定性实验方法

稳定性实验:试纸封闭于塑料袋中 4 ℃存放,第 1 个月每星期,第 2 至第 6 个月期间每个月检测试纸的稳定性,用 PB 缓冲液分析。也可将试纸放 45 ℃ 2 个月和室温下储存 1 年^[15,28],或试纸分别放于 4 ℃和室温 3 个月,试纸再于 37 ℃放 15 d,检测样品和空白对照品进行稳定性实验^[29]。重复性试验用同一批次试纸检测不同浓度的抗原或抗体。

6 前景展望与存在问题

免疫纳米金快速诊断技术的无污染、便捷、灵敏、安全,不仅更适合于未来环保型社会,而且利于家居、野外检测或作为军事用途,尤其对生物武器的检测有着相当大的应用前景。而且,利用纳米金微粒的光谱特征和导电性能的建立配套仪器分析方法灵敏度高,选择性好,为实现纳米金标记技术的定量分析应用提供了新的研究思路。故基于纳米金技术的多项目同时快速测定以及定量分析方法将会得到更广泛的研究开发和应用^[23,30]。采用免疫层析纳米金试纸配合特征光谱吸收法进行定量检测可能是将来纳米金免疫层析发展的方向之一^[31]。但纳米金粒子作为标记物亦存在一些问题,制备条件对颗粒粒径影响明显,稳定的,粒径均匀的金颗粒制备条件较难控制,检测试纸的灵敏度还需进一步探索提高,生物可相容性等都有待进一步研究探索。

参考文献

[1] 王中民,李君文. 免疫层析技术研究进展[J]. 国外医学临床生物化学与检验学分册,2001,22(2):96-97.
[2] 李永勤,杨瑞馥. 以膜为固相载体的免疫胶体金快速试验[J]. 微生物学免疫学进展,2003,31(1):74-78.
[3] Shyu RH,Shyu HF,Liu HW,et al. Colloidal gold based immunochromatographic assay for detection of ricin[J]. Toxicon,2002,40(3):255-258.
[4] 彭剑淳,刘晓达,丁晓萍,等. 可见光光谱法评价胶体金粒径及分布[J]. 军事医学科学院院刊,2000,24(3):211-212.
[5] 朱立平,陈学清. 免疫学实验方法[M]. 北京:人民军医出版社,

2000:426-429.
[6] Zeman EJ,Schatz GC. An accurate electronmagnetic theory study of surface enhancement factors for Ag,Au,Cu,Li,Na,In,Zn and Cd[J]. J Phvs Chem,1987,91(1):634-643.
[7] 蒋治良,冯忠伟,李廷盛,等. 金纳米粒子的共振散射光谱[J]. 中国科学:B辑,2001,31(2):183-188.
[8] 郝建秀,张春明,王沂,等. 人心肌肌钙蛋白 I 胶体金免疫层析试纸条的研制[J]. 生物医学工程与临床,2010,14(6):546-549.
[9] Xiulan S,Xiaolian Z,Jian T,et al. Preparation of gold-labeled antibody probe and its use in immunochromatography assay for detection of aflatoxin B1[J]. J Food Microbiol,2005,99(2):185-194.
[10] 王静,陈维娜,胡孔新,等. 大肠杆菌 O157 胶体金免疫层析快速筛查方法的建立[J]. 卫生研究,2006,35(4):439-441.
[11] Thobhani S,Attree S,Boyd R,et al. Bioconjugation and characterisation of gold colloid-labelled proteins[J]. J Immunol Methods,2010,356(1/2):60-69.
[12] 蒋治良,王娜,梁爱惠. 免疫纳米金共振散射光谱探针检测痕量免疫球蛋白 A[J]. 化学学报,2008,66(9):1047-1052.
[13] Wu L,Jiang T,Lu ZJ,et al. Development and validation of a prokaryotically expressed foot-and-mouth disease virus non-structural protein 2C'3AB-based immunochromatographic strip to differentiate between infected and vaccinated animals[J]. Virol J,2011,8(1):186.
[14] 邹明静,王娜. 液相免疫体系胶体金粒径的选择及其应用[J]. 菏泽医学专科学校学报,2010,22(2):4-7.
[15] Lu SY,Lin C,Li YS,et al. A screening lateral flow immunochromatographic assay for on-site detection of okadaic acid in shellfish products[J]. Anal Biochem,2012,422(2):59-65.
[16] Chen X,Xu H,Lai W,et al. A sensitive chromatographic strip test for the rapid detection of enrofloxacin in chicken muscle[J]. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess,2012,29(3):383-391.
[17] Omidfar K,Kia S,Kashanian S,et al. Colloidal nanogold-based immunochromatographic strip test for the detection of digoxin toxicity[J]. Appl Biochem Biotechnol,2010,160(3):843-855.
[18] Li XS,Fu F,Lang YK,et al. Development and preliminary application of an immunochromatographic stripfor rapid detection of infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus in swine[J]. J Virol Methods,2011,176(1/2):46-52.
[19] 蒋韬,梁仲,陈涓,等. 检测 Asi a I 型口蹄疫病毒的胶体金免疫层析法的建立及应用[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2007,23(11):1021-1024.
[20] Yang W,Li XB,Liu GW,et al. A colloidal gold probe-based silver enhancement immunochromatographic assay for the rapid detection of abrin-a[J]. Biosens Bioelectron,2011,26(8):3710-3713.
[21] Chen K,He W,Lu H,et al. Development of an immunochromatographic strip for serological diagnosis of Porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus[J]. J Vet Diagn Invest,2011,23(2):288-296.
[22] Nurulfiza I,Hair-Bejo M,Omar AR,et al. Immunochromatographic gold-based test strip for rapid detection of Infectious bursal disease virus antibodies[J]. J Vet Diagn Invest,2011,23(2):320-324.
[23] Zhang MZ,Wang MZ,Chen ZL,et al. Development of a colloidal gold-based lateral-flow immunoassay for the rapid simultaneous detection of clenbuterol and ractopamine in swine urine[J]. Anal Bioanal Chem,2009,395(8):2591-2599.
[24] Shi C,Zhao S,Zhang K,et al. Preparation of colloidal gold immunochromatography strip for detection of methamidophos residue[J]. J Environ Sci,2008,20(11):1392-1397.
[25] Tsao ZJ,Liao YC,Liu BH,et al. Development of a monoclonal antibody against domoic acid and its application in enzyme-linked

- immunosorbent assay and colloidal gold immunostrip[J]. J Agric Food Chem, 2007, 55(13):4921-4927.
- [26] Cui S, Chen C, Tong G. A simple and rapid immunochromatographic strip test for monitoring antibodies to H5 subtype Avian Influenza Virus[J]. J Virol Methods, 2008, 152(1/2):102-105.
- [27] Kolosova AY, Sibanda L, Dumoulin F, et al. Lateral-flow colloidal gold-based immunoassay for the rapid detection of deoxynivalenol with two indicator ranges[J]. Anal Chim Acta, 2008, 616(2):235-244.
- [28] Omidfar K, Kia S, Larijani B. Development of a colloidal gold-based immunochromatographic test strip for screening of microalbuminuria[J]. Hybridoma(Larchmt), 2011, 30(2):117-124.
- [29] Ju Y, Hao HJ, Xiong GH, et al. Development of colloidal gold-based immunochromatographic assay for rapid detection of *Streptococcus suis* serotype 2[J]. Vet Immunol Immunopathol, 2010, 133(2/4):207-211.
- [30] Shim WB, Yang ZY, Kim JY, et al. Immunochromatography using colloidal gold-antibody probe for the detection of atrazine in water samples[J]. J Agric Food Chem, 2006, 54(26):9728-9734.
- [31] 朱健铭, 陈真诚. 特征光谱吸收法测量人血清前列腺特异性抗原浓度的研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2012, 32(1):196-199.
- (收稿日期:2013-04-08)

• 综 述 •

STAT3 在缺血心脏中的作用

邓文文 综述, 石 蓓[△] 审核

(遵义医学院附属医院心内科, 贵州遵义 563099)

关键词: STAT3; 心脏; 心肌缺血

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.17.037

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)17-2289-03

信号转导和转录活化因子 3(STAT3)参与调节多种心脏病理生理过程,如缺血预适应、缺血再灌注、缺血后适应和心脏肥厚等。在心脏中,作为信号分子和转录分子的 STAT3 同时也是一种参与调节能量生成的线粒体蛋白。本文探讨了 STAT3 信号在缺血心脏中的作用及其潜在机制,试图以 STAT3 信号为治疗靶点,为缺血性心脏病的治疗策略提供新的理论依据。

1 STAT3 的基本结构

哺乳动物中已发现的信号转导和转录活化因子(STATs)家族成员有 STAT1、STAT2、STAT3、STAT4、STAT5a、STAT5b 和 STAT6。STAT 蛋白家族的 7 个家族成员均在心脏细胞系中表达。大量关于 STAT 蛋白在心脏中的作用的研究着重把目光集中在 STAT3 蛋白,认为 STAT3 在心脏缺血再灌注损伤、凋亡、肥大和心力衰竭中发挥重要作用。STAT3 不仅仅存在于心脏细胞的细胞质和细胞核。最近有研究表明,STAT3 蛋白还参与了心肌细胞线粒体的能量代谢^[1]。

STAT3 最初作为白细胞介素-6(IL-6)信号传递中的急性期反应因子被发现,编码 STAT3 的基因在鼠类定位于第 11 号染色体,在人则定位于第 12 号染色体。目前发现 STAT3 存在由同一基因编码的三种天然异构体:STAT3 α 、STAT3 β 和 STAT3 γ 。STAT3 基因包括 6 个功能区:氨基端氨基酸保守序列、螺旋域、DNA 结合域、连接域、SH2 结构域及羧基端转录活化域。SH2 结构域被认为是 STAT3 结构中最保守和功能最重要的功能区,主要参与 STAT3 蛋白的酪氨酸磷酸化;目前认为此结构域附近的酪氨酸 705 位点发生磷酸化的 STAT3 即为活化形式的 STAT3(p-STAT3)。此外,STAT 蛋白的 C 端还有一丝氨酸磷酸化位点(Ser 727),是多种丝氨酸激酶的底物,其磷酸化水平也可调节 STAT3 的转录活性^[2-3]。

2 STAT3 信号通道

STAT3 在细胞静息状态时主要位于细胞浆。研究表明,STAT3 的完全活化 Tyr705 和 Ser727 位点发生磷酸化。STAT3 Ser727 位点的磷酸化在小鼠心肌 IR 和心肌梗死中发挥心脏保护作用^[4]。IL-6 家族成员(包含 IL-5、IL-6、IL-11、白

血病抑制因子、制瘤素 M 和心肌素 1)通过其共同受体 gp130 激活 STAT3。Gp130 激活 STAT3 时,JAK 和酪氨酸激酶(Tyr)-2 聚集至 gp130 胞质内结构域并发生催化反应,促使 gp130 胞质内结构域的羧基末端酪氨酸残基发生磷酸化并与 STAT3 结合并使 STAT3 酪氨酸残基 705 位点(Tyr705)发生磷酸化。Tyr705 位点的磷酸化促使 STAT3 蛋白同或异二聚体化,随后所形成的的二聚体进入核内并通过与下游靶基因启动子域内的特异性 DNA 元件结合激活下游相关靶基因的转录,这些靶基因调控细胞的分化、增殖、凋亡、血管发生、代谢和免疫反应^[5]。除 Tyr705 位点发生磷酸化外, gp130 或大量其他激酶(如 ERK1/2、p38 和 JNK)也可激活 STAT3 中的 Ser727 位点发生磷酸化^[5-6]。Ser727 位点的磷酸对于 STAT3 的二聚体化及核转位来说并不是必不可少的,但对于 STAT3 的完全性转录活性及线粒体定位是至关重要的^[6]。

除了 IL-6-gp130 系统外,其他大量配体-受体系统也可激活 STAT3 信号。研究显示,Epo、瘦素和血管紧张素 II(Ang II)通过其相应的受体 EpoR、瘦素受体和 1 型血管紧张素受体(AT1R)激活 MI 小鼠心肌 STAT3 信号^[7]。

3 STAT3 与心脏缺血

Negoro 等^[8]首次证实了心肌梗死可激活 JAK-STAT3 信号通道,注射 JAK 抑制剂 AG490 可抑制 STAT3 磷酸化并增加 caspase-3 和促凋亡蛋白 Bax 的表达及 TUNEL 阳性凋亡细胞数量。心脏缺血可诱导 STAT3 发生磷酸化并激活 STAT3 信号,而再灌注可进一步提高 STAT3 的磷酸化水平。研究显示,心脏缺血 25 min 后 STAT3 酪氨酸磷酸化水平升高;随后进行的 30 min 再灌注能进一步提高 STAT3 酪氨酸磷酸化水平;STAT3 酪氨酸磷酸化的高表达水平至少持续 6 h^[9]。同时,持续性过表达 STAT3 可减少心脏缺血再灌注小鼠的心梗面积^[10];敲除 STAT3 则增加小鼠心脏缺血再灌注后的心梗面积。STAT3 敲除小鼠心肌梗死后的长期生存率也较野生型小鼠明显降低;在心肌梗死晚期,STAT3 敲除小鼠的死亡率明显上升^[11]。这表明活化的 STAT3 在心脏缺血再灌注中发挥保护作用。