

人羧基肽酶 H 不同区段抗原的克隆表达及其初步应用*

胡纪文¹, 杨锡琴², 宗克亮³, 郭兰芹⁴, 宋晓国², 王国华², 刘喜明⁵, 朱翠侠², 赵琰枫²,

冯晓燕², 张贺秋² (1. 深圳市罗湖区中医院, 广东深圳 518001;

2. 军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850; 3. 风帆集团职工医院, 河北保定 071000;

4. 华北石油总医院, 河北任丘 062552; 5. 中国中医科学院广安门医院, 北京 100053)

摘要:目的 构建人羧基肽酶 H 不同区段抗原的原核表达载体, 诱导表达获得重组蛋白, 初步验证人羧基肽酶 H 不同抗原区段在羧基肽酶 H 自身抗体检测中的应用价值。方法 应用 RT-PCR 方法调取目的基因, 构建相应的原核表达质粒, 转化大肠埃希氏菌诱导表达重组蛋白, 用重组蛋白作为包被抗原建立人羧基肽酶 H 自身抗体的间接 ELISA 方法, 评价羧基肽酶 H 抗原在检测新诊断 2 型糖尿病患者抗羧基肽酶 H 自身抗体中的应用价值。结果 获得了羧基肽酶 H 三种不同区段抗原, 其中 42~476 氨基酸区段为较理想的抗原。以该全长抗原作为包被抗原检测 95 例新诊断 2 型糖尿病患者, 羧基肽酶 H 自身抗体阳性率为 8.42%。结论 原核克隆表达的人羧基肽酶 H 42~476 氨基酸区段抗原具有良好的抗原性, 可作为成人隐匿性自身免疫性糖尿病鉴别诊断的候选抗原。

关键词:人羧基肽酶 H; 自身抗体; 新诊断 2 型糖尿病; 成人隐匿性自身免疫性糖尿病

中图分类号: R587.1; Q786 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2015)04-010-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2015.04.003

Cloning, Expression and Diagnostic Application of Different Fragments of Human Carboxypeptidase

HU Ji-wen¹, YANG Xi-qin², ZONG Ke-liang³, GUO Lan-qin⁴, SONG Xiao-guo²,
WANG Guo-hua², LIU Xi-ming⁵, ZHU Cui-xia², ZHAO Yan-feng², FENG Xiao-yan², ZHANG He-qiu²

(1. Chinese Medicine Hospital of Luohu District, Guangdong Shenzhen 518001, China;

2. Beijing Institute of Basic Medical Sciences, Beijing 100850, China;

3. the Worker's Hospital of Sail Group, Hebei Baoding 071000, China;

4. the General Hospital of Huabei Petroleum, Hebei Renqiu 062552, China;

5. Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China)

Abstract: **Objective** To obtain different fragments of human carboxypeptidase H, and evaluate the diagnostic application of the recombination carboxypeptidase H in detecting autoantibody. **Methods** The coding gene of carboxypeptidase H was obtained by RT-PCR. The corresponding prokaryotic expression vectors were constructed and transformed into *E. coli* to induce the expression of the recombination different fragments of carboxypeptidase H. Using these antigen fragments as the coating antigens, the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was established for the detection of carboxypeptidase H autoantibody in 95 newly diagnosed type 2 diabetes patients. **Results** Three fragments of human carboxypeptidase H were obtained, in which the 42~476aa fragment antigen was ideal one. Using the full-length carboxypeptidase H as coating antigen, the positive rate of carboxypeptidase H autoantibody was 8.42%. **Conclusion** Because of the favorable antigenicity, the 42~476aa fragment antigen of carboxypeptidase H could be the candidate antigen for discrimination and diagnosis of latent autoimmune diabetes in adults.

Keyword: human carboxypeptidase H; autoantibody; newly diagnosed type 2 diabetes; latent autoimmune diabetes in adults

糖尿病是一种因胰岛素分泌绝对或相对不足而引起的代谢性疾病, 可引起严重的并发症和高死亡率, 目前已经成为继心脑血管、癌症以外危害人类健康的第三大疾病。成人隐匿性免疫性糖尿病 (latent autoimmune diabetes in adult, LADA) 是

成人发病的缓慢进展的自身免疫性糖尿病, 起病特点与 2 型糖尿病 (T2DM) 相似, 患病率约占初诊 2 型糖尿病患者的 5.9%~9.2%, 但是其胰岛 β 细胞功能衰退速度却是 2 型糖尿病患者的 3 倍^[1], 因此一旦确诊为 LADA, 则应该立刻用胰岛素治疗,

* 基金项目: 十二五国家高技术研究发展计划 (863 计划) 课题, 编号 2011AA02A113; 深圳市伯劳特生物制品有限公司委托课题。

作者简介: 胡纪文 (1967—), 男, 医学学士, 副主任技师, 从事免疫学检验及检验方法学研究, Tel: 13620208790, E-mail: shenzhenaw@163.com;

共同第一作者简介: 杨锡琴 (1985—), 女, 硕士, 助理研究员, 从事诊断试剂研制, Tel: 15210343247, E-mail: yangxiqin001@163.com。

共同第一作者简介: 宗克亮 (1974—), 男, 硕士, 副主任医师, 从事内分泌系统疾病研究, Tel: 13930242582, E-mail: zklbd@163.com。

通讯作者: 冯晓燕 (1973—), 女, 博士, 副研究员, 主要研究方向为疾病诊断标志物筛选与诊断试剂研制, Tel: 13011821686, E-mail: xyfeng2002@126.com。

目的在于阻止自身免疫胰岛 β 细胞的损伤,促进自身胰岛素修复和分泌。如果未能及时确诊,继续服用促进胰岛素分泌的药物,则会使剩余的胰岛 β 细胞遭到彻底破坏,造成更严重的并发症。因此,对初诊高血糖患者及早进行自身抗体筛查具有非常重要的意义^[2]。

羧基肽酶 H (carboxypeptidase-H, CPH) 是 1991 年由 Castano 等^[3]利用 T1DM 前期患者血清筛选胰岛细胞 cDNA 文库时发现的,但是后期的多数研究结果表明 CPH 自身抗体并不能增加对 T1DM 诊断的敏感度^[4,5],在抗谷氨酸脱羧酶自身抗体(GADA)阴性患者中无一例 CPH 自身抗体阳性。直到 2000 年,周智广等^[5]发现其在 LADA 患者中的检出率明显高于正常对照和 T2DM 患者,且 CPH 自身抗体与 GADA 自身抗体存在互补性,有助于提高 LADA 患者的检出率。

在本研究中,我们通过原核表达重组 CPH 不同表位区段抗原,建立了抗 CPH 自身抗体的间接 ELISA 检测方法,并用该方法对新诊断的 2 型糖尿病患者抗 CPH 自身抗体进行筛查,以期对 LADA 患者的早期鉴别判断提供一些参考。

1 材料与方法

1.1 研究对象 12 例 1 型糖尿病患者和 95 例新诊断 2 型糖尿病患者血清样本来自深圳市罗湖区中医院和中国中医科学院广安门医院于 2014 年 5 月~10 月临床确诊的患者,研究对象均知情同意。

1.2 试剂和仪器 原核融合表达质粒 pBAD/TOP/TA 表达载体试剂盒购自 Invitrogen 公司;DNA 限制内切酶购自原平皓公司;T4 DNA 连接酶和 PrimeSTAR HS DNA 聚合酶由 TaKaRa 公司生产;Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis 和 FastStart High Fidelity PCR System 购自 Roche 公司;辣根过氧化物酶标记的抗人 IgG 购自 Sigma 公司。全自动酶标洗板机(ZM988B)和自动化酶免分析仪(SM-3)购自北京天石医疗用品制作所。

1.3 方法

1.3.1 抗原区段的选择:利用生物信息学软件 BIOSUN 分析 CPH 膜外区(1~476aa)B 细胞表位分布情况。

1.3.2 引物设计:根据 GenBank 公布的 CPH 序列,设计了各抗原区段基因的上下游引物,以便从 RNA 反转录产物中扩增获得相应目的基因。引物合成及序列测定由中美泰和生物技术有限公司完成。

42-F:5'-CTCGAGCGGCTGCAGCAAGAGGACGGCA-3'

287-R:5'-TCTAGATTAAGAAGAGTATGCCCGGGC-3'

250-F:5'-GGCGACCTTGTGGCCAATTAT-3'

476-R:5'-AAAATTCAGAGTTTCAGA-3'

1.3.3 目的基因的获取:利用 Trizol 法分别从人胰岛细胞系中提取总 RNA,采用 Roche 公司的 Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis,按照说明书进行反转录,获得 cDNA。然后,利用 Roche 公司的 FastStart High Fidelity PCR System 和相应引物扩增获得不同区段的编码基因。

1.3.4 原核表达载体的构建及诱导表达:将纯化后的 PCR 产物连接入 pBAD/TOP/TA 表达载体进行测序,将含有测序正确目的基因的大肠埃希氏菌株用 L-阿拉伯糖诱导表达,获得 CPH 不同表位区段抗原。

1.3.5 抗原纯化:用超声波破碎法从表达菌中提取包涵体,并用溶解液(25 mmol/L TE, 1 ml/dl β -巯基乙醇, 8 mmol/L 脲, pH8.5)将其溶解,收集样品进行 Ni 柱纯化,用洗涤缓冲液(25 mmol/L TE, 1 ml/dl β -巯基乙醇, 6 mol/L 脲, pH8.5)洗涤柱体,用含 25 mmol/L 咪唑的洗涤缓冲液洗脱杂蛋白,最后用含 250 mmol/L 咪唑洗涤缓冲液洗脱并收集目的蛋白,SDS-PAGE 电泳鉴定。

1.3.6 抗原活性鉴定:用碳酸盐缓冲液(pH9.6)溶解抗原为 2.5 μ g/ml,包被酶联板,4 $^{\circ}$ C 过夜,次日用 1 ml/dl BSA 封闭,干燥备用。将待测血清 20 倍稀释后,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min 后洗板,加入辣根过氧化物酶标记的抗人 IgG,37 $^{\circ}$ C 孵育 20 min 后洗板,显色剂显色 10 min,读取 $A_{450\text{ nm}}$ 值,测定值 > Cutoff 值判定为阳性,测定值 < Cutoff 值判定为阴性。

2 结果

2.1 抗原表位分析 利用生物信息学软件 BIOSUN,首先输入 CPH 膜外区 1~476 氨基酸序列,分析 B 细胞表位分布情况,根据分析结果,分别选取 CPH 抗原中的 42~476aa, 42~287aa 和 250~476aa 三个抗原表位区段进行克隆表达,见图 1。

2.2 目的基因的获取 用 Trizol 法分别从人胰岛细胞系中提取总 RNA,将经逆转录后 cDNA 作为模板,分别用不同区段的引物进行 PCR 扩增,琼脂糖电泳鉴定,结果显示分别获得了相应大小的目的基因条带,分子量分别约为 1 302 bp (42~476aa), 735 bp (42~287aa) 和 678 bp (250~476aa),见图 2。

2.3 抗原表达与纯化 将经 PCR 扩增获得的产物连接至 pBAD/TOPO/TA 载体,获得表达质粒 pBAD/CPH(42~287), pBAD/CPH(250~476) 和 pBAD/CPH(42~476)。将测序正确的重组表达质粒转化于大肠埃希氏菌中,进行诱导表达,收集

菌体,并进行 SDS-PAGE 电泳鉴定,各抗原均获得了高效表达。各抗原均以包涵体方式表达,所以首先从菌体中提取包涵体,溶解后经 Ni 柱纯化获得

纯化后抗原,经 SDS-PAGE 鉴定,其纯度约为 95%左右,见图 3。

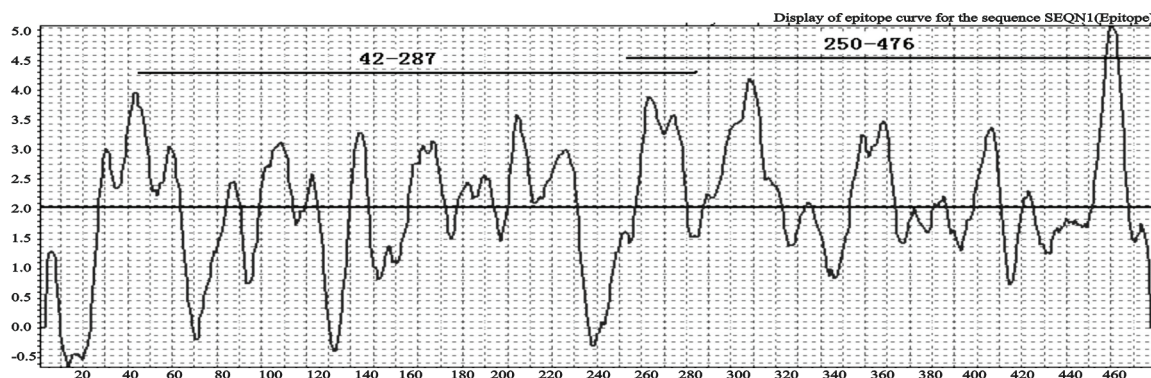


图1 CPH 膜外区 B 细胞表位分布情况

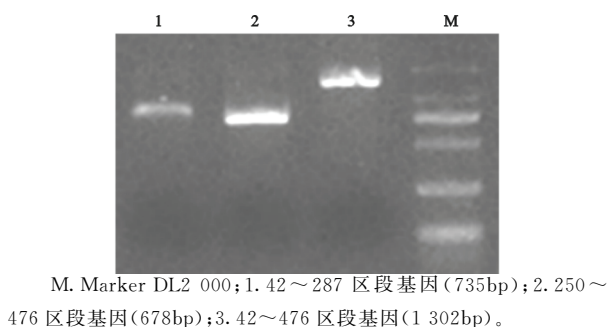


图2 PCR 扩增产物电泳鉴定

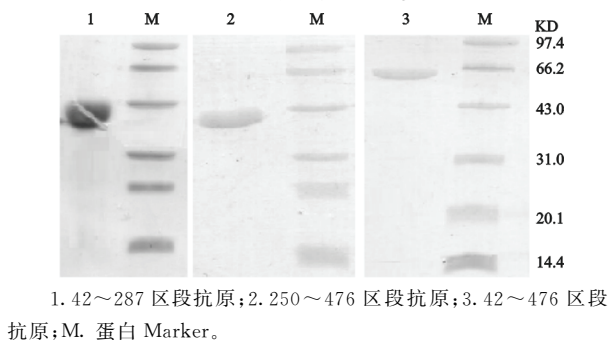


图3 原核表达重组人 CPH 不同区段纯化后电泳鉴定

2.4 抗原活性测定 用所获得的重组人 CPH 抗原不同区段包被酶联板,采用间接 ELISA 方法比较 CPH(42~287),CPH(250~476)和 CPH(42~476)不同抗原区段的血清反应性,筛选检测灵敏度与特异度较好的抗原区段。结果显示,对于 12 份临床确诊 1 型糖尿病患者血清其阳性率分别为 16.7%,25.0%和 33.3%(以标本 $A \geq 0.3$ 为阳性,标本 A 值分别介于 0.447~0.553,0.302~1.012,0.489~1.239),CPH(42~476)表位区段抗原的检出率高于其它两种抗原区段,且阳性标本检测数值明显较高。在特异度方面,三种抗原基本一致均为 90.9%。接下来,我们选定 CPH(42~476)表位区段抗原,评价了抗 CPH 自身抗体在新诊断 2 型

糖尿病患者中的阳性率,结果显示在 95 份新诊断 2 型糖尿病患者血清样本中检出抗 CPH 自身抗体阳性样本 8 例,阳性率为 8.42%(以标本 $A \geq 0.3$ 为阳性),8 份标本 A 值介于 0.31~1.641 之间。

3 讨论 糖尿病作为一种非传染性流行病和慢性病,正肆虐全球。2010 年最新的统计数据表明:我国 18 岁以上成人中,根据国际最新临床诊断标准进行诊断的糖尿病估测患病率为 11.6%,约 1.139 亿人,进一步说明糖尿病已成为我国重大的公共卫生问题^[6]。成人隐匿性自身免疫糖尿病(latent autoimmune diabetes in adults, LADA)是从疑似 T2DM 的患者中通过胰岛自身抗体检测筛查出来的一种特殊类型的糖尿病^[7],属于免疫介导性 1 型糖尿病的亚型。虽然 LADA 早期临床表现貌似 2 型糖尿病,但以胰岛 β 细胞缓慢自身免疫损害为特征。早期诊断和干预治疗对于保留 LADA 患者残存的胰岛 β 细胞功能,延缓急性和慢性并发症发生具有现实意义。因此,在新诊断 2 型糖尿病患者中进行自身抗体筛查,及早确诊 LADA,并及早制定正确的治疗方案具有非常重要的意义。

目前 LADA 临床诊断主要基于三条标准:①糖尿病诊断年龄 ≥ 35 岁;②抗谷氨酸脱羧酶自身抗体(GADA)阳性。③诊断半年内不依赖胰岛素治疗^[8]。但是实际临床应用中,LADA 患者中 GADA 阳性率大约为 50%,相当一部分呈现阴性,而 T1DM 诊断常用的其它自身抗体(ICA,IAA 和 IA-2A)对于 LADA 的诊断价值不高,即便联合检测但仍不能满足临床需求。因此,仅依据 GADA 自身抗体从新诊断 2 型糖尿病中识别 LADA 的效率偏低,积极探索其它胰岛自身抗体的诊断价值,有利于制定更加合理的诊断策略。

2000 年,周智广等^[5]发现抗 CPH 自身抗体在

LADA 患者中的检出率明显高于正常对照和 T2DM 患者,且 CPH 自身抗体与 GADA 自身抗体存在互补性,有助于提高 LADA 患者的检出率,但是后续少有相关报道。本研究首先利用生物信息学软件分析了 CPH 抗原的 B 细胞表位分布情况,依据分析结果克隆表达了全长 CPH 抗原和两个不同区段抗原。利用临床确诊 1 型糖尿病患者血清样本对三个抗原进行初筛,确定全长 CPH 抗原活性优于其它两个区段抗原。随后,我们利用全长 CPH 抗原作为包被抗原,建立了间接酶联免疫测定法,并对 95 份新诊断 2 型糖尿病患者血清样本进行检测,抗 CPH 自身抗体阳性率为 8.42%,与新诊断 2 型糖尿病中 5.9%~9.2% 的 LADA 患病率相吻合^[1,9]。本课题组在先前研究中对 101 例新诊断 2 型糖尿病患者血清样本的 GADA 和锌转运体自身抗体 (ZnT8A) 水平进行了联合检测,结果显示 8.91% 的患者呈现两种自身抗体同时阳性^[10],与本研究的结果以及 LADA 患病率相一致。但是,关于新诊断 2 型糖尿病患者中 LADA 患者的筛选确定以及临床对 LADA 患者的确诊仍然缺乏特异性标志物^[8],多种自身抗体在 LADA 患者筛查中价值还有待进行细致的研究,因此,本研究下一步将在所建立的自身抗体检测方法的基础上,详细探讨多个自身抗体标志物联合检测在新诊断 2 型糖尿病患者中筛查 LADA 患者的应用价值。

参考文献:

- [1] Naik RG, Brooks-Worrell BM, Palmer JP. Latent autoimmune diabetes in adults [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2009, 94(12): 4635-4644.
- [2] Liao Y, Xiang Y, Zhou Z. Diagnostic criteria of latent autoimmune diabetes in adults (LADA): a review and reflection[J]. Front Med, 2012, 6(3): 243-247.
- [3] Castano L, Russo E, Zhou L, et al. Identification and cloning of a granule autoantigen (carboxypeptidase-H) associated with type I diabetes[J]. J Clin Endocrinol Metab, 1991, 73(6): 1197-1201.
- [4] Bonifacio E, Genovese S, Braghi S, et al. Islet autoantibody markers in IDDM: risk assessment strategies yielding high sensitivity[J]. Diabetologia, 1995, 38(7): 816-822.
- [5] Zhou ZG, Lagasse J, Valle T, et al. Carboxypeptidase-H autoantibodies lack sensitivity and specificity for diagnosis of type 1 diabetes but may be an additional immune marker in LADA [J]. Diabetes, 2000, 49: A411.
- [6] Xu Y, Wang L, He J, et al. Prevalence and control of diabetes in Chinese adults [J]. the Journal of the American Medical Association, 2013, 310(9): 948-959.
- [7] Fourlanos S, Dotta F, Greenbaum CJ, et al. Latent autoimmune diabetes in adults (LADA) should be less latent [J]. Diabetologia, 2005, 48(11): 2206-2212.
- [8] Pipi E, Marketou M, Tsirogianni A. Distinct clinical and laboratory characteristics of latent autoimmune diabetes in adults in relation to type 1 and type 2 diabetes mellitus [J]. World J Diabetes, 2014, 5(4): 505-510.
- [9] Zhou ZG, Xiang YF, Ji L, et al. Frequency, immunogenetics, and clinical characteristics of latent autoimmune diabetes in China (LADA China study): a nationwide, multicenter, clinic-based cross-sectional study [J]. Diabetes, 2013, 62(2): 543-550.
- [10] 赵长胜,董倩,张海涛,等.新诊断 2 型糖尿病患者 GADA 和 ZnT8A 自身抗体检测意义研究 [J]. 现代检验医学杂志, 2015, 30(3): 50-52.

Zhao CS, Dong Q, Zhang HT, et al. Role of detecting GADA and ZnT8A in newly diagnosed type 2 diabetes patients [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2015, 30(3): 50-52.