

网络出版时间: 2021-9-7 15:28 网络出版地址: https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20210907.1403.019.html

◇临床医学研究◇

环化 PDC-E2 内硫辛酰区及其在原发性胆汁性胆管炎患者抗线粒体抗体检测中的价值

陈 蕾¹, 李海燕¹, 张亚琴¹, 帅宗文^{1,2}

摘要 目的 探讨丙酮酸脱氢酶复合物 E2 亚基(PDC-E2)内硫辛酰区域(ILD)环化后在原发性胆汁性胆管炎(PBC)患者抗线粒体抗体(AMA)检测中的抗原性变化及临床意义。方法 利用质粒 pTWIN1 提供的内含肽自我剪切技术,构建、表达和纯化环状 ILD(cILD),采用 Western blot 法鉴定线状 ILD 和 cILD 的抗原性;选择 PBC 患者 316 例、类风湿性关节炎(RA)患者 34 例及健康对照 36 例,分别以 PDC-E2、线状 ILD 及 cILD 为包被抗原,ELISA 法比较检测受试者血清中 AMA 的阳性率。结果 Western blot 结果显示,重组获得的线状 ILD 和 cILD 蛋白均具有与 AMA 结合的免疫原性;分别用 PDC-E2、线状 ILD 及 cILD 为包被抗原,ELISA 法检测 AMA 阳性率分别为 93.04% (294/316)、91.46% (289/316) 和 85.76% (271/316),其中,cILD 为包被抗原检测 AMA 阳性率低于 PDC-E2 检测阳性率(85.76% vs 93.04%, $P=0.003$)和线状 ILD 检测阳性率(85.76% vs 91.46%, $P=0.024$);PDC-E2 和线状 ILD 检测 AMA 的阳性率差异无统计学意义(93.04% vs 91.46%, $P=0.744$)。PDC-E2 和线状 ILD 检测 AMA 均呈阴性的 21 例 PBC 患者中,cILD 检测出 38.10% (8/21) 的 AMA 阳性率。结论 cILD 对 AMA 的抗原性虽有所下降,但在传统检测 AMA 呈阴性的 PBC 患者临床诊断中,可能潜在新的临床实用价值。

关键词 原发性胆汁性胆管炎; 丙酮酸脱氢酶 E2 亚单位; 抗线粒体抗体; 蛋白环化; 诊断生物标志物

中图分类号 R 575.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)11-1785-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.11.020

原发性胆汁性胆管炎(primary biliary cholangitis,PBC)是一种典型的进行性自身免疫性疾病,其病理特征是肝内小胆管破坏和门脉炎症,最终导致肝硬化和肝衰竭^[1]。抗线粒体抗体(antimitochondrial antibody,AMA)是 PBC 中的一种常见的特异性

抗体^[2],是早期无症状 PBC 的重要实验室指标。然而,仍有约 10% 左右的 PBC 患者周围血中 AMA 始终呈阴性,给 PBC 临床诊断带来困难。丙酮酸脱氢酶复合物 E2 亚基(pyruvate dehydrogenase complex E2,PDC-E2)是 AMA 识别的主要特异性抗原,该酶的活性中心是硫辛酰区域(inner lipoyl domain,ILD)^[3]。已有研究^[4]证明蛋白质主链的环化不仅保留其原有抗原性,而且可以增加蛋白质的热稳定性和降低熵值等。将线状 ILD 多肽连接成一个环状 ILD(cyclized ILD,cILD),探索其在 PBC 患者 AMA 检测中的抗原性变化,目前尚未见文献报道。该研究通过内含肽介导蛋白连接技术(intein-mediated protein ligation,IPL)获取 cILD,探讨 cILD 在 PBC 临床诊断中的价值。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病例资料 选择 2015 年 11 月至 2020 年 12 月在安徽医科大学第一附属医院就诊的 PBC 患者 316 例,其中男 19 例,女 297 例,均符合 PBC 的临床诊断标准^[5],年龄 37~78(56.835~10.000)岁。另选择 34 例符合类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis,RA)诊断标准的患者为疾病对照组^[6],其中男 5 例,女 29 例,年龄 24~78(56.412~9.671)岁。选择 36 例健康志愿者为健康对照(health control,HC)组,其中男 6 例,女 30 例,年龄 40~78(54.389~12.086)岁,见表 1,三组间差异无统计学意义。

表 1 三组受试者性别构成及平均年龄比较结果

项目	n	性别[n(%)]		年龄 (岁 $\bar{x} \pm s$)
		男	女	
PBC 组	316	19(6.013)	297(93.987)	56.835 ± 10.000
RA 组	34	5(14.706)	29(85.294)	56.412 ± 9.671
HC 组	36	6(16.667)	30(83.333)	54.389 ± 12.086
χ^2/F 值		5.853		0.938
P 值		0.540*		0.392#

* 为 χ^2 检验结果; # 为方差分析结果

2021-07-01 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81871296)

作者单位: ¹ 安徽医科大学第一附属医院风湿免疫科,合肥 230022

² 炎症免疫性疾病安徽省实验室(安徽医科大学),合肥 230032

作者简介: 陈 蕾,女,硕士研究生;

帅宗文,男,主任医师,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: shuaizongwen@ahmu.com

收集所有入选者的临床资料,并抽取静脉血分离血清后 -80°C 冻存。本研究遵循的程序符合安徽医科大学第一附属医院伦理委员会制定的关于人体试验的伦理学标准,所有患者均签署知情同意书。

1.1.2 主要试剂 pTWIN1 质粒、几丁质树脂、MESNA 购自美国 New England Biolabs(NEB)公司; LB 培养基购自美国 OXOID 公司; 异丙 β -D-1-硫代半乳糖苷(IPTG) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; BCA 蛋白定量试剂盒购自美国 Thermo Scientific 公司; 一抗为兔抗 PDC-E2 抗体,二抗分别为辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 和辣根过氧化物酶标记山羊抗人(IgG + IgM + IgA) 购自英国 Abcam 公司; TMB 显影液购自美国 BD 公司; 商业 AMA-M2 检测试剂盒购自德国 HUMAN 公司。

1.2 方法

1.2.1 重组融合蛋白 ILD 的获取 ① 采用成熟的实验室方法获取 cILD^[7],简述如下: PCR 获得 ILD cDNA 插入质粒 pTWIN1 并转化到大肠杆菌中,含有氨苄青霉素的 LB 培养基中 37°C 、200 r/min 震荡培养。当吸光度(OD) 值达到 0.5 ~ 0.6 时,加入工作浓度为 0.3 mmol/L 的 IPTG,并继续培养 5 h。用 5 000 r/min 离心收集细菌,然后将细菌用柱缓冲液(20 mmol/L Na-HEPE, 0.5 mol/L NaCl, pH8.5) 重悬 4°C 下超声碎菌,然后将超声产物在 4°C 以 10 000 r/min 离心 30 min。上清液通过几丁质树脂,室温下用剪切缓冲液 B1(20 mmol/L Tris-HCl, 0.5 mol/L NaCl, pH8.5) 在柱剪切过夜,再用缓冲液 B2(20 mmol/L Tris-HCl, 0.5 mol/L NaCl, 50 mmol/L MESNA, pH6.5) 剪切过夜收集环化蛋白,用 BCA 蛋白定量试剂盒定量后待用。② 线状 ILD 的获取: 含有线状 ILD cDNA 的质粒 pGEX4T 由美国加利福尼亚大学 Gershwin 教授赠送,并采用既往成熟的方法表达、纯化和获取线状 ILD^[8],定量后待用。

1.2.2 Western blot 法鉴定纯化的 ILD 蛋白的抗原性 常规 Western blot 方法鉴定,方法简述如下: 将纯化定量后的待鉴定蛋白多肽分别加入蛋白上样缓冲液后,煮沸 10 min,进行 Western blot 实验。一抗分别为兔抗 PDC-E2 抗体、PBC 患者混合血清、RA 患者血清和 HC 血清,按照 1 : 500 稀释; 二抗分别为辣根过氧化物酶(HRP) 标记的抗兔和山羊抗人(IgM + IgG + IgA) 抗体,按照 1 : 100 000 稀释,加 ECL 超敏显色液后观察显影结果。

1.2.3 ELISA 法检测所有受试者血清 AMA 水平

常规 ELISA 方法检测,步骤为: 使用包被缓冲液在 96 孔板中分别包被 $1\text{ }\mu\text{g}$ 的线状 ILD 及 cILD,在 4°C 下孵育过夜。弃去孔内溶液,含有 0.05% Tween-20 的 PBS(PBS-T) 洗涤 3 次,去残留的液体。每孔加入含 3% 脱脂牛奶的 PBS 150 μl ,室温封闭 1 h,弃液后加入 100 μl 稀释的待测血清,在室温下孵育 1 h,重复 0.05% PBS-T 和 PBS 分别洗涤 3 次。1 : 10 000 稀释的 HRP 标记山羊抗人 Ig(IgG、IgM 和 IgA),每孔 100 μl ,室温孵育 1 h。重复上述洗涤方法,每个孔中加入 100 μl TMB,室温下孵育 10 min 后每孔加入 50 μl 硫酸终止反应,450 nm 处测量 OD 值。同时使用商业 AMA-M2 检测试剂盒(PDC-E2 包被 96 孔板) 检测每例患者的 AMA-M2 水平。

1.3 统计学处理 采用 Graphpad Prism 8.0 软件对所有数据进行分析。ELISA 法检测 AMA 的正常值阈值上限为 HC 组检测获得的均值($\bar{x}$) + 2.5 倍标准差(s)。计量资料为正态分布或者接近正态分布时用 $\bar{x} \pm s$ 表示,非正态资料用 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示。计数资料的比较采用 χ^2 检验,计量资料的比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 纯化蛋白对 AMA 免疫性鉴定结果 Western blot 方法鉴定线状 ILD 和 cILD 分别对兔抗 PDC-E2 抗体和 AMA-M2 抗体阳性 PBC 患者混合血清的反应结果见图 1,提示经原核表达、纯化获得的 cILD 和线状 ILD 均具有与 AMA 特异反应的免疫原性。

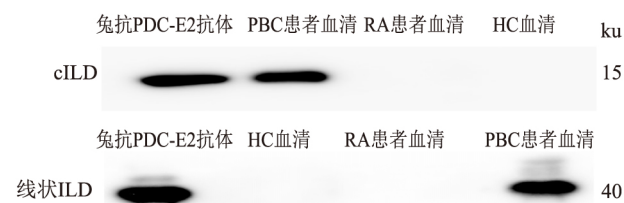


图 1 cILD 和线状 ILD 对 AMA 反应性的 Western blot 鉴定结果

2.2 不同包被抗原检测血清 AMA 结果比较

2.2.1 3 种包被抗原检测 AMA 结果的组间比较

36 名健康对照组周围血用 PDC-E2、线状 ILD 和 cILD 检测的 OD 值($\pm 2.5 s$) 分别为: 0.057、0.049、0.044,以此为界值,高于此界值为抗体阳性,ELISA 法检测 316 例 PBC 患者 AMA 的阳性率分别是 93.04% (294/316)、91.46% (289/316) 和 85.76% (271/316); RA 患者及健康对照对 3 种包被抗原

AMA 检测阳性率均为 0。包被抗原 PDC-E2 和线状 ILD 检测 AMA 的阳性率比较差异无统计学意义 (93.04% vs 91.46% , $P=0.743$) ; 包被抗原 cILD 检测 AMA 阳性率低于 PDC-E2 检测阳性率 (85.76% vs 93.04% , $P=0.003$) , 也低于线状 ILD 检测阳性率 (85.76% vs 91.46% , $P=0.024$) , 见表 2。

表 2 血清样品抗体阳性率的检测结果 [n (%)]

包被抗原	n	阳性例数	阴性例数	χ^2 值	P 值
PDC-E2	316	294 (93.04)	22 (6.96)	0.553*	0.743
线状 ILD	316	289 (91.46)	27 (8.54)	5.079#	0.024
cILD	316	271 (85.76)	45 (14.24)	8.832 Δ	0.003

* : PDC-E2 与 ILD 间 χ^2 检验结果; # : ILD 与 cILD 间 χ^2 检验结果; Δ : PDC-E2 与 cILD 间 χ^2 检验结果

2.2.2 PDC-E2 和线状 ILD 反应均阴性患者的 cILD 检测结果 316 例 PBC 患者中 21 例患者对包被抗原 PDC-E2 与线形 ILD 检测 AMA 结果均呈阴性 , 其中 8 例对 cILD 为包被抗原的检测呈阳性 , 阳性率为 38.10% (8/21) , 13 例阴性 , 阴性率为 61.90% (13/21) 。

3 讨论

流行病学研究表明 PBC 作为最常见的自体免疫性肝病之一 , 其发病率和患病率呈逐渐增加的趋势^[9] , 而 PBC 常隐匿发病 , 给早期诊断、治疗以延缓病情进展带来困难。AMA 是早期 PBC 的常用诊断生物指标^[10] , 根据其识别的抗原 , AMA 被分为 M1 至 M9 共 9 个亚型 , 其中 AMA-M2 识别 PDC-E2 亚基 , 对 PBC 的特异性最高。实际上 , 自身抗体 AMA 不仅是临床诊断的常用指标 , 而且可能参与 PBC 的发病 , 一方面 , AMA 可能与巨噬细胞和胆管上皮的凋亡小体共同作用引发了炎症因子的爆发最终导致了小胆管的损害参与 PBC 发病^[11] , 另一方面 , PDC-E2 中 ILD 不仅是抗原表位的集中部位 , 其也是线粒体能量代谢过程中 PDC-E2 的酶活性中心 , 生理功能的结构变化使其容易被外源性化合修饰而参与 PBC 免疫耐受 , 诱导 PBC 发病^[8]。然而 , 有 5% ~ 20% 的 PBC 患者 AMA 检测呈阴性 , 这部分患者是临床诊断面临的挑战^[12]。在生理状态下 , PDC-E2 蛋白中 ILD 呈线状发夹样结构^[13] , 课题组前期研究^[8]已经证实重组线状 ILD 检测 PBC 患者的 AMA 阳性率为 92% ~ 94%。本研究将重组获得 cILD , 增加其结构稳定性的同时 , 探索其结合 AMA 的抗原性变化。

已有研究^[14]显示环化蛋白质有更高的热稳定性和结构稳定性 , 而且抗水解能力增强 , 在化学溶剂中里也可以保持其原有的活性 , 然而 , 经化学方式环化只适合短的多肽 , 不适合大分子的蛋白质。为了突破环化蛋白受分子量大小的限制 , 已经有研究者运用内含肽剪切技术环化蛋白质 , 主要方式有两种 : 蛋白质反式剪接 (protein trans-splicing , PTS) 和 IPL 技术。有学者用内含肽介导蛋白环化方法成功环化出天冬氨酸蛋白^[15]。本研究采用了 IPL 技术对线状 ILD 进行环化 , 主链大环构象提供了构象约束最严格的结构 , 从而使结构更加稳定。

本研究 Western blot 结果表明 , 通过原核表达、纯化获得的线状 ILD 和 cILD 均具有与 AMA 结合的免疫原性。分别用 PDC-E2、线状 ILD 和 cILD 作为包被抗原 , ELISA 法检测 PBC 患者 AMA-M2 的阳性率结果存在差异 , 其中以 cILD 作为包被抗原检测 AMA 的阳性率分别低于 PDC-E2 和线状 ILD , 而线状 ILD 与 PDC-E2 之间检测的阳性率差异无统计学意义。推测导致这种现象的原因可能是经环化后的 ILD 空间构象发生改变 , 导致部分抗原表位的抗原性丢失 , 以此为包被抗原检测 AMA 的阳性率低于 PDC-E2 和线状 ILD 为包被抗原的阳性率。

然而 , 本研究显示 , 在 PDC-E2 与线状 ILD 为包被抗原检测 AMA 阴性的 PBC 患者中 , 有 38.10% 的患者血清中存在特异识别 cILD 的 AMA , 提示经环化后的 cILD 虽然识别总 AMA 阳性率下降 , 但其可从传统检测 AMA 阴性的 PBC 中识别 38.10% 的 AMA 阳性患者。因此 , 推测经环化的 ILD 构象变化 , 虽然失去部分 AMA 识别的表位 , 但可能出现新的抗原表位识别 AMA , 这些经环化产生的 ILD 新抗原表位 , 可能在生理状态下完整的 PDC-E2 大分子中与 AMA 结合障碍 , 离开完整 PDC-E2 蛋白的重组线状 ILD 空间结构可能发生变化 , 导致这些环化新出现的抗原表位丢失。

参考文献

- [1] Gulamhusein A F , Hirschfield G M. Primary biliary cholangitis: pathogenesis and therapeutic opportunities [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol , 2020 , 17 (2) : 93 - 110.
- [2] Chascsa D M , Lindor K D. Antimitochondrial antibody-negative primary biliary cholangitis: Is it really the same disease? [J]. Clin Liver Dis , 2018 , 22 (3) : 589 - 601.
- [3] Leung P S , Choi J , Yang G , et al. A contemporary perspective on the molecular characteristics of mitochondrial autoantigens and diagnosis in primary biliary cholangitis [J]. Expert Rev Mol Diagn ,

- 2016 , 16(6) : 697 – 705.
- [4] Purkayastha A , Kang T J. Stabilization of proteins by covalent cyclization[J]. *Biotechnol Bioprocess Eng* 2019 , 24(5) : 702 – 12.
- [5] Reshetnyak V I. Primary biliary cirrhosis: Clinical and laboratory criteria for its diagnosis [J]. *World J Gastroenterol* , 2015 , 21 (25) : 7683 – 708.
- [6] Littlejohn E A , Monrad S U. Early diagnosis and treatment of rheumatoid arthritis[J]. *Prim Care* , 2018 , 45(2) : 237 – 55.
- [7] Zhang Y , Zhang K , Wan Y , et al. A pH-induced , intein-mediated expression and purification of recombinant human epidermal growth factor in *Escherichia coli* [J]. *Biotechnol Prog* , 2015 , 31 (3) : 758 – 64.
- [8] Shuai Z , Wang J , Badamagunta M , et al. The fingerprint of anti-mitochondrial antibodies and the etiology of primary biliary cholangitis[J]. *Hepatology* , 2017 , 65(5) : 1670 – 82.
- [9] Sebode M , Kloppenburg A , Aigner A , et al. Population-based study of autoimmune hepatitis and primary biliary cholangitis in Germany: rising prevalences based on ICD codes , yet deficits in medical treatment[J]. *Z Gastroenterol* , 2020 , 58(5) : 431 – 8.
- [10] Younossi Z M , Bernstein D , Shiffman M L , et al. Diagnosis and management of primary biliary cholangitis [J]. *Am J Gastroenterol* , 2019 , 114(1) : 48 – 63.
- [11] Sasaki M , Sato Y , Nakanuma Y. An impaired biliary bicarbonate umbrella may be involved in dysregulated autophagy in primary biliary cholangitis[J]. *Lab Invest* 2018 , 98(6) : 745 – 54.
- [12] de Liso F , Matinato C , Ronchi M , et al. The diagnostic accuracy of biomarkers for diagnosis of primary biliary cholangitis (PBC) in anti-mitochondrial antibody (AMA) -negative PBC patients: a review of literature[J]. *Clin Chem Lab Med* , 2017 , 56(1) : 25 – 31.
- [13] Leung P S , Wang J , Naiyanetr P , et al. Environment and primary biliary cirrhosis: electrophilic drugs and the induction of AMA [J]. *J Autoimmun* , 2013 , 41(SI) : 79 – 86.
- [14] Ye B Y , Shen W L , Shi M L , et al. Intein-mediated backbone cyclization of entolimod confers enhanced radioprotective activity in mouse models[J]. *Peer J* 2018 , 6(6) : e5043.
- [15] Minter C J , Siegert N M , Colelli K M , et al. Intein-promoted cyclization of aspartic acid flanking the intein leads to atypical N-terminal cleavage[J]. *Biochemistry* , 2017 , 56(8) : 1042 – 50.

Cyclization of inner lipoyl domain in PDC-E2 and its clinical significance for anti-mitochondrial antibodies detection in primary biliary cholangitis

Chen Lei , Li Haiyan , Zhang Yaqin , et al

(*Dept of Rheumatology and Immunology , The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University Hefei 230022*)

Abstract Objective To investigate the antigenic change and its clinical significance of the cyclized inner lipoyl domain (ILD) in the E2 subunit of pyruvate dehydrogenase complex (PDC-E2) for detection of anti-mitochondrial antibodies (AMA) in patients with primary biliary cholangitis (PBC) . **Methods** Cyclized ILD (cILD) was obtained through its construction , expression and purification by intein self-cleavage process provided by plasmid pTWIN1. Western blot was employed to identify the antigenicity of the recombinant linear ILD and cILD. A total of 316 patients with PBC , 34 patients with rheumatoid arthritis (RA) and 36 healthy subjects (HC) were involved in this study. The AMA in their serum was comparatively detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) , in which PDC-E2 , linear ILD and cILD were respectively used as coating antigens. **Results** The immunogenicity to AMA of both the recombinant linear ILD and cILD was demonstrated by Western blot. The positive rates of AMA detected by ELISA with PDC-E2 , linear ILD and cILD as coating antigens were 93. 04% (294/316) , 91. 46% (289/316) and 85. 76% (271/316) , respectively. The positive rate of AMA detected by cILD as coating antigen was significantly lower than that detected by PDC-E2 and linear ILD as coating antigens (85. 76% vs 93. 04% , $P = 0. 003$; 85. 76% vs 93. 04% , $P = 0. 024$) . There was no significant difference in AMA positive rate for the PDC-E2 and linear ILD as coating antigens (93. 04% vs 91. 46% , $P = 0. 744$) . In 21 PBC patients with negative AMA to both PEC-E2 and linear ILD , the AMA positive rate was 38. 10% (8/21) when cILD was taken as coating antigen. **Conclusion** Although with some decrease in cILD antigenicity to AMA , cILD may have potential new clinical value in the diagnosis of PBC with negative AMA.

Key words primary biliary cholangitis; pyruvate dehydrogenase E2 subunit; antimitochondrial antibody; protein cyclization; diagnostic biomarker