

Moesin 抗体与动脉粥样硬化相关疾病的关系

毛华, 杜峰, 胥勇, 朱晋坤, 文美, 刘廷筑

(贵阳市第一人民医院心内科, 贵州省贵阳市 550002)

[关键词] 膜突蛋白; 重组表达载体; 抗膜突蛋白抗体; 动脉粥样硬化

[摘要] **目的** 通过重组表达的方法获得纯化的膜突蛋白(moesin), 利用纯化的重组 moesin 作为抗原建立间接酶联免疫吸附实验(ELISA), 检测并探讨抗膜突蛋白抗体与动脉粥样硬化相关疾病的关系。**方法** 设计针对 moesin 的引物, 通过 PCR 扩增, 得到 moesin 的编码 DNA, 构建出能够表达 moesin 的重组质粒, 用异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)在适当温度和条件下诱导表达, 通过 SDS-PAGE 电泳鉴定所表达的蛋白, 并对重组蛋白进行纯化。利用纯化的重组 moesin 作建立间接 ELISA, 采用酶联免疫吸附试验检测 120 例动脉粥样硬化相关疾病(20 例急性冠状动脉综合征、30 例原发性高血压、20 例颈动脉硬化、20 例糖尿病及 30 例血脂异常症)患者血清抗膜突蛋白抗体, 观察抗膜突蛋白抗体的阳性率。**结果** 表达产物经 SDS-PAGE 电泳分析, 确定所得表达产物为 moesin; 抗原的最佳包被浓度为 4 mg/L, 抗体的最佳稀释倍数为 1:100, 酶标二抗的最佳稀释倍数是 1:20 000。在 120 例动脉粥样硬化相关疾病中, 抗膜突蛋白抗体的阳性检出率较高, 达 25%~70%, 显著高于正常对照组的 5% ($P<0.01$); 急性冠状动脉综合征组阳性检出率高达 70%, 高于其它疾病组 ($P<0.05$), 其它各亚型疾病组之间差异无显著性。**结论** 成功地表达了重组人 moesin; 建立了最佳的重组 moesin 作为抗原检测抗膜突蛋白抗体的间接 ELISA 反应条件; 抗膜突蛋白抗体在动脉粥样硬化相关疾病患者中有较高的检出率。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Discussion on the Relationship Between Moesin Antibody and Atherosclerosis-related Diseases

MAO Hua, DU Feng, XU Yong, ZHU Jin-Kun, WEN Mei, and LIU Ting-Zhu

(Department of Cardiology, The First People's Hospital of Guiyang, Guiyang, Guizhou 550002, China)

[KEY WORDS] Moesin; Expression Vector; Moesin Antibody; Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** Obtain purified moesin protein by recombinant, purified recombinant moesin protein was plated as coating antigen of indirect ELISA. And discussion on the relationship between moesin antibody and atherosclerosis-related diseases. **Methods** A pair of primers were designed according to the sequence of the moesin. The moesin gene was amplified by PCR. PCR products were then inserted into a prokaryotic expression plasmid, Using isopropyl thio-galactoside (IPTG) induced expression in the appropriate temperature and conditions. Recombinant moesin protein was analyzed by SDS-PAGE. Recombinant moesin protein will be purified. Purified recombinant moesin protein was applied to establish the indirect ELISA. Adsorption assay in 120 patients (20 patients with acute coronary syndrome, 30 patients with primary hypertension, 20 patients with carotid atherosclerosis, 20 patients with diabetes and 30 patients with hyperlipidemia) with diseases related to atherosclerosis anti-moesin antibody by ELISA, compared the positive rate of anti-moesin antibody of blood. **Results** The expression product was recombinant moesin by SDS-PAGE; 2) The optimal antigen concentration was 4 mg/L, the optimal antibody dilution was 1:100, the optimal HRP-IgG dilution was 1:20 000. In 120 cases of diseases related to atherosclerosis, positive rate is higher protein antibody against membrane process, up to 25%~70%, significantly higher than that of normal control group 5% ($P<0.01$); acute coronary syndrome group, the positive rate of 70%, higher than the other groups ($P<0.05$), the difference between other subtypes of disease no significant ($P>0.05$).

[收稿日期] 2013-02-27

[作者简介] 毛华, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向为缺血性心肌病分子生物学, E-mail 为 maobaosisiley@yahoo.com.cn。杜峰, 硕士, 主治医师, 研究方向为冠心病, E-mail 为 hunterdufeng168@yahoo.com.cn。胥勇, 硕士, 主治医师, 研究方向为冠心病, E-mail 为 xuxiongyx@126.com。

Conclusion Successfully expressed the recombinant human moesin protein; Establish the best indirect ELISA of Purified recombinant moesin protein was plated as coating antigen detect moesin antibody ; Moesin antibodies in patients with atherosclerotic disease associated with high detection rate.

Moesin(分子量大约为 75 KDa)为细胞膜、细胞骨架连接蛋白,存在于包括血管内皮细胞在内的多种细胞中,同肌动蛋白相连;通过磷酸化其特定位点改变其构象而使其激活,进而在细胞的表面结构形成、细胞连接、生长、有丝分裂、膜运输、细胞的黏附等发挥重要作用^[1,2]。但是,对于 moesin 是否参与介导血管内皮细胞损伤致动脉粥样硬化的具体机制目前还不明确。为了弄清其途径和机理,首先必须具有较高纯度及良好抗原性的 moesin;但国内外目前尚缺满足此要求的 moesin,虽然国外已有一些相关的报道,但其表达的融合蛋白为包涵体,不利于纯化且对抗原性也有影响^[3]。有鉴于此,本研究的首要任务就是通过基因工程技术制备重组 moesin,来推进后续的研究工作;其次,我们利用获得的重组 moesin 建立间接 ELISA 反应条件以检测动脉粥样硬化相关疾病外周血中抗膜突蛋白抗体的表达情况,对进一步研究如何改善动脉粥样硬化性疾病的预后有积极的意义。

1 对象与方法

1.1 对象

选择贵阳市第一人民医院 2010 年 6 月至 2010 年 12 月收治的与动脉硬化相关疾病 120 例(均经冠

状动脉造影、冠状动脉 CT 或颈部血管超声证实有不同程度的动脉硬化影像学表现),其中急性冠状动脉综合征(ACS)20 例(均符合 2007 年 ACC/AHA ACS 防治指南制定的 ACS 诊断标准);高血压 30 例(为原发性高血压未分级,均符合 2005 年中国高血压防治指南制定的诊断标准);血脂异常症 30 例(以高胆固醇血症为主,均符合 2007 年中国成人血脂异常防治指南制定的诊断标准);颈动脉硬化 20 例(经颈动脉超声明确);糖尿病 20 例(为 2 型糖尿病符合 2009 年 ADA 糖尿病防治指南制定的诊断标准)。入选病例均排除心功能不全、慢性阻塞性肺病、急、慢性感染、肝、肾功能不全、甲状腺疾病、结缔组织病、血液系统疾病及恶性肿瘤者。其中,ACS 患者血清标本于入院时即刻抽血保留,其它疾病组血清标本于入院次日清晨空腹抽血保留。选择同期在本院健康体检者 120 例作为对照组,与动脉硬化相关疾病组相比在性别、年龄构成上差异无统计学意义,具有可比性(表 1)。血脂异常症组 TC 明显高于其它组($P < 0.05$);高血压组血压明显高于其它组($P < 0.05$);糖尿病组 FPG 明显高于其它组($P < 0.05$)。

1.2 主要药品与试剂

常规试剂和化学药品、酶标板、缓冲液均由上海科新生物技术股份有限公司免疫诊断研究中心提供。

表 1. 各组基本资料比较

Table 1. The comparison of basic data between each group

指 标	ACS (n = 20)	高血压 (n = 30)	颈动脉硬化 (n = 20)	血脂异常症 (n = 30)	糖尿病 (n = 20)	对照组 (n = 120)
男/女(例)	11/9	16/14	12/8	15/15	12/8	68/52
年龄(岁)	61 ± 11	63 ± 12	62 ± 11	60 ± 13	59 ± 10	58 ± 11
TC (mmol/L)	6.78 ± 0.16	3.95 ± 0.08	4.14 ± 0.09	7.82 ± 0.14 ^a	3.88 ± 0.10	3.87 ± 0.11
收缩压(mmHg)	146 ± 11	162 ± 13 ^b	138 ± 10	131 ± 9	132 ± 9	130 ± 8
舒张压(mmHg)	93 ± 7	100 ± 8 ^b	85 ± 7	83 ± 6	84 ± 7	80 ± 5
FPG(mmol/L)	7.38 ± 0.26	4.79 ± 0.22	4.76 ± 0.23	4.78 ± 0.20	9.68 ± 0.31 ^c	4.38 ± 0.20

a 为 $P < 0.05$,与其它各组比较;b 为 $P < 0.05$,与其它各组比较;c 为 $P < 0.05$,与其它各组比较。

1.3 Moesin DNA 的提取

将胃组织碾磨至粉末状,经裂解液及 RNaseA/蛋白酶 K 贮液充分反应。加入 Buffer 并反复离心 3 次,加入 DNA 结合溶液并转移到离心吸附柱,取出吸附柱并加入洗脱液充分洗脱,离心后获得基因组 DNA。

1.4 PCR 扩增

引物设计:Moesin-top (EcoR I) 5'-CCG GAA TTC ATG CCC AAA ACG ATC AGT-3'; Moesin-bottom (Hind III) [5'-CCC AAG CTT TTA CAT AGA CTC AAA TTC GTC-3'],将上下游引物加入体系进

行 PCR 扩增(94℃预变性 5 min 后,95℃变性 30 s,47℃退火 1 min,72℃延伸 1.5 min,循环 35 次后,72℃延伸 10 min)。反应结束后,取 5 μ L 产物用于 1% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.5 pET-32/pET-28-moesin 构建

pET-32a/pET-28a 用 EcoR I、Hind III 进行双酶切,回收产物用 T4 DNA 连接酶 10 ~ 16℃ 过夜连接。从大肠杆菌 DH5 α 中取一环接种到 LB 液体培养基中过夜。取 2 mL 菌液转接到一个含有 LB 液体培养基的锥形瓶中培养 2 h。将细胞转移至 EP 管中,冰上放置 10 min,离心后加入预冷的 500 μ L CaCl₂ 重悬细胞冰上放置 30 min,再次离心后用 200 μ L 预冷 CaCl₂ 重悬细胞,置于冰上 30 min,感受态大肠杆菌 DH5 α 。

1.6 转化

取 2 μ L 连接产物加入大肠杆菌感受态细胞中,冰上放置 30 min。42℃ 循环水浴作用 90 s,冰浴 2 min。再加入 800 μ L LB 培养基 37℃ 振荡培养 55 min。取 100 μ L 培养物涂布 Amp LB 平板,倒置平板 37℃ 培养 12 ~ 16 h。

1.7 质粒提取及鉴定

挑取转化后的单个菌落接种于 LB 液体培养基中,37℃ 振荡培养 16 ~ 18 h。利用质粒提取试剂盒提取质粒。将提取的质粒分别进行 PCR 和酶切反应鉴定。用琼脂糖电泳检查 PCR 产物和酶切产物。鉴定为含有 pET32a-moesin/pET-28a 阳性的细菌,并与 genbank 上的 moesin 序列进行同源性比对。

1.8 重组 moesin 的纯化

取诱导表达菌液,离心收集菌体,PBS 漂洗 3 次,再加入溶菌酶冰上放置 30 min 后再加入 Triton X-100。采用超声波破碎仪破碎菌体,离心收集上清和沉淀分别进行 SDS-PAGE。若沉淀有较多目的蛋白则进行包涵体处理。收集处理好的细菌上清,利用 Ni-Sepharose FF 亲和层析柱进行分离纯化,经洗脱,收集得到纯化的融合蛋白,4℃ 保存备用。取培养后的细菌和纯化的融合蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,观察蛋白的表达情况

1.9 moesin 抗体间接 ELISA 的建立

采用 Brad 蛋白测定试剂盒确定 moesin 抗原浓度,通过间接酶联免疫法评估两种重组人膜突蛋白的抗原性。确定含 1% ~ 3% BSA 封闭液有较好的封闭效果,运用棋盘试验法,选择酶标羊抗人 IgG 的最佳稀释度,根据阴、阳性样本检测值的差异大小及控制本底的角度选择待测血清稀释度。检测 400 份

正常人血清,以 OD 值平均值 + 3 倍标准差作为临界值(cutoff 值),此 cutoff 值代表 99% 的可信度。

1.10 临床标本检测

按照本试验摸索出的最优间接 ELISA 条件,以表达得到的重组 moesin 作为抗原检测 120 例动脉粥样硬化相关疾病和 120 例健康体检者外周血中抗膜突蛋白抗体。测定主波长为 450 nm 光吸收值(OD),结果判定以阳性判断值(S/CO) \geq 1.0 为阳性。

1.11 统计学处理及方法

应用 SPSS 11.5 软件包进行数据处理。计数资料采用 χ^2 检验,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料检验其正态分布后,采用方差分析并行方差齐性检验; $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 PCR 扩增及酶切鉴定结果

经 EcoR I 和 Hind III 双酶切,获得两条条带:一个为 6 000 bp 左右的的载体片段,一个为 1 800 bp 的含 moesin 蛋白序列的片段(图 1)。

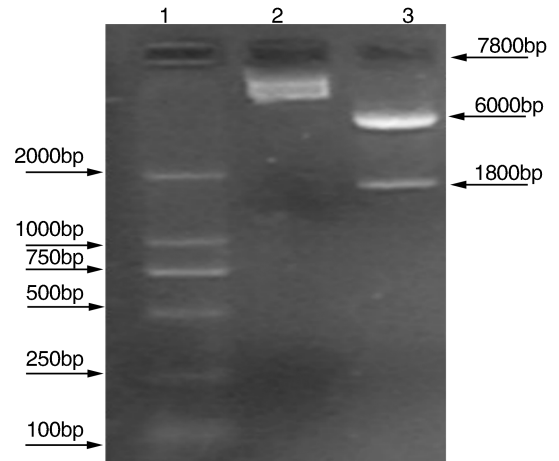


图 1. 重组质粒 pET32a-moesin 的酶切鉴定电泳图 1 为 DL2000 marker, 2 为 pET32a-moesin 质粒, 3 为 pET32a-moesin 质粒 EcoR I/Hind III 双酶切。

Figure 1. The recombinant plasmid pET32a-moesin restriction endonuclease map

2.2 测序结果

pET32a-moesin 及 pET28a-mosein 的测序由上海英俊公司(分别为标注 A11. CS080806065 _ 0493. M-3. S. TAG 和 A10. CS080806065 _ 0494. M-3. T7TER)完成,测序结果经过与 genbank 上的 moesin 序列进行同源性比对,成功获得了 moesin 全长,序列完全正确,同源性 100%,符合预期。

2.3 moesin 融合蛋白表达及纯化

取适量经 IPTG 诱导表达的菌体进行超声破碎,上清经镍柱纯化、洗脱、离心后,SDS-PAGE 电泳显示 moesin 在两种表达载体中均获得了可溶性表达。通过 Brad 蛋白检测试剂盒的测定,其 pET-32a 载体的融合蛋白抗原浓度为 1.45 g/L,pET-28a 载体的融合蛋白抗原浓度为 1.52 g/L。

2.4 pET32a-moesin 融合蛋白的表达及纯化

3 g 菌体用 30 mL 的 20 mmol/L 的 PB 缓冲液 (pH = 8.0) 冰浴搅拌混匀,然后进行超声破碎,4 度,12 kr/min,40 min,离心取上清,用 0.45 μm 的滤膜过滤。用平衡液 (20 mmol/L PB, 0.15 mol/L NaCl, 20 mmol/L 的咪唑) 平衡镍柱,然后样品进行上样,1 mL/min。上样完毕后用平衡液冲柱后用洗脱液 1 (50 mmol/L 咪唑, 20 mmol/L PB, 0.15 mol/L NaCl) 和洗脱液 2 (100 mmol/L 咪唑, 20 mmol/L PB, 0.15 mol/L NaCl) 洗脱,收集相应洗脱峰 (图 2)。

2.5 pET28a-mosein 融合蛋白的表达及纯化

将洗脱所得的样品,用 20 mmol/L 的 Tris-HCL 缓冲液 (pH = 8.0) 稀释至咪唑浓度为 5 mmol/L 二次上柱,平衡后,再用洗脱液 1 (20 mmol/L Tris-HCL, 0.15 mol/L NaCl, 50 mmol/L 咪唑, pH = 8.0) 和洗脱液 2 (20 mmol/L Tris-HCL, 0.15 mol/L NaCl, 100 mmol/L 咪唑, pH = 8.0) 洗脱,收集洗脱峰 (图 3)。

2.6 膜突蛋白抗体的间接 ELISA 反应条件的建立

在 4 mg/L 的抗原包被的浓度时,pET-28a 载体表达的融合蛋白能明显区分三份不同血清样本,且差异显著,因此将 pET-28a 载体的融合蛋白作为检测用抗原蛋白,4 mg/L 作为抗原蛋白最适包被浓度。根据阴阳性样本检测值的差异大小及控制本底的角度,选择 1:100 作为血清稀释度,1:20000 作为酶标羊抗人 IgG 稀释度。

2.7 抗膜突蛋白抗体的检出率

检测 400 份正常人血清,根据 400 份血清的检测 OD 值计算检测平均值和标准差 SD。以 +3SD 作为 cutoff 值 (S/CO) ≥ 1.0 定为阳性。动脉粥样硬化相关疾病抗膜突蛋白抗体的检出率,动脉粥样硬

化相关疾病组抗膜突蛋白抗体的阳性检出率显著高于正常对照组 ($P < 0.01$),ACS 组阳性检出率高于其它疾病组 ($P < 0.05$; 表 2)。

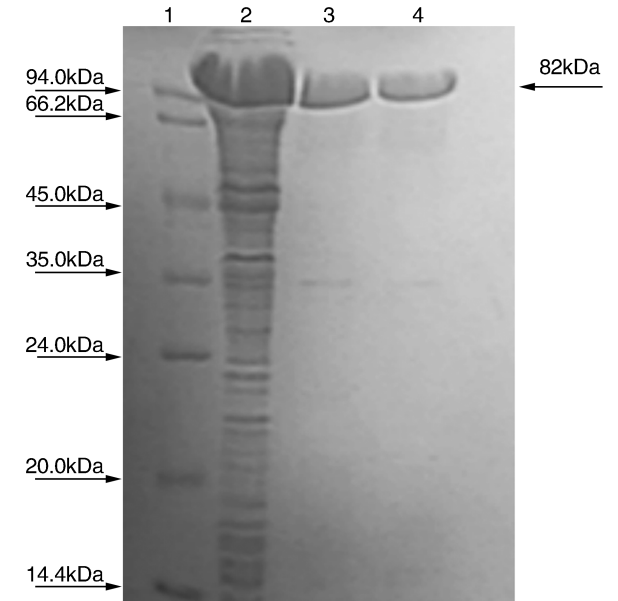


图 2. pET32a-moesin 蛋白的表达及纯化 SDS-PAGE 图
1 为 protein marker ,2 为 moesin 超声后的上清,3 为洗脱液 1 洗脱产物,4 为洗脱液 2 洗脱产物。

Figure 2. PET32a-moesin protein expression and purification of SDS-PAGE map

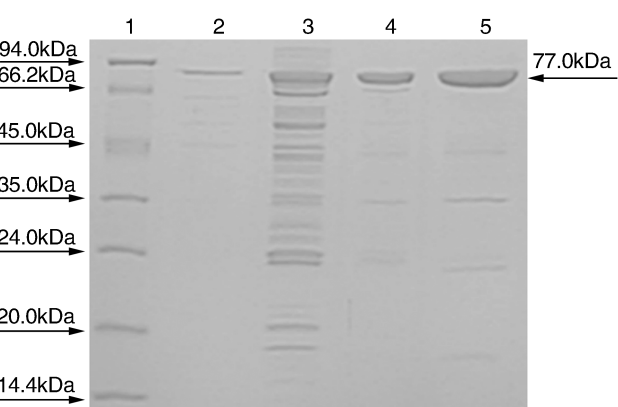


图 3. pET28a-moesin 蛋白的二次纯化 SDS-PAGE 图
1 为样品,2 为穿液,3 为洗脱液 1,4 为洗脱液 2,5 为洗脱液 3。

Figure 3. Two purification of SDS-PAGE pET28a-moesin protein

表 2. 抗膜突蛋白抗体阳性检出率结果

Table 2. Positive rate of anti-moesin antibody

指 标	ACS (n = 20)	高血压 (n = 30)	颈动脉硬化 (n = 20)	血脂异常症 (n = 30)	糖尿病 (n = 20)	对照组 (n = 120)
阳性	14	11	8	8	5	6
阴性	6	19	12	22	15	114
阳性率	70.0% ^a	36.7% ^{ab}	40.0% ^{ab}	26.7% ^{ab}	25.0% ^{ab}	5.0%
Ln(OD)	-1.531 ± 0.381 ^a	-1.598 ± 0.376 ^a	-1.576 ± 0.362 ^a	-1.636 ± 0.343 ^a	-1.633 ± 0.336 ^a	-1.869 ± 0.331

a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 ACS 组比较。

3 讨论

Moesin 代表以膜组织外延的突出蛋白,是一种胞内蛋白,主要表达在细胞质及细胞表面结构的肌动蛋白上。Moesin 作为胞质膜和肌动细胞骨架间的结构交联剂,通过许多信号传导包括 Rho 传导,PI3-激酶/Akt 传导通路调节细胞间的粘附、细胞形状的维持、改变细胞骨架、增加细胞通透性等方面而参与血管内皮细胞损伤^[4-6]。足量的具有较高纯度及良好抗原性的 moesin 是进一步研究 moesin 生物学功能以及其参与介导血管内皮细胞损伤机制的先决条件。

因此,本研究通过基因工程技术扩增了 moesin 全长基因,将其克隆到表达载体 pET-32a 和 pET-28a 中,构建了表达 moesin 全长的重组质粒,并实现了 moesin 融合蛋白在大肠杆菌 BL21 中的高效表达,表达量约占细胞总蛋白的 35%,最高时可达 38%。这是目前关于重组 moesin 在大肠中表达量最高的报道^[3,7]。

通过 BLAST 我们发现,所表达的 moesin 融合蛋白的同源性上传的 moesin 全长核酸同源性高,免疫原性相似,而且此蛋白为可溶性表达,性质稳定,可以直接用镍柱亲和层析柱快速纯化,方法简便,快捷。动脉粥样硬化(As)是一种多因性疾病,其发生发展是由于动脉管壁局部炎症平衡失调导致的,表现为各种炎症因子的过度表达及炎症细胞的活化。由于众多危险因子损伤内皮而发生的一系列炎症反应,在其危险因子如血脂异常、高血压、糖尿病及感染等的作用下引起血管内皮细胞(VEC)合成和分泌的多种生长调节因子、细胞因子和血管活性物质表达及激活紊乱而导致血管内皮细胞损伤^[5-10]。有报道表明,抗膜突蛋白抗体作为自身抗体参与了自身免疫性疾病的免疫炎症损伤,并且对抗膜突蛋白单克隆抗体(MmAb)的研究发现,其可使体外培养的肺微血管内皮细胞出现细胞骨架结构紊乱、肌动蛋白(F-actin)断裂、细胞间隙增大、并且出现对数生长期的细胞凋亡^[11]。

本实验发现,抗膜突蛋白抗体在上述患者中阳性检出率较高,达 25%~70%,显著高于正常对照组的 5%;而 ACS 组达 70%,明显高于其它疾病组。上述结果表明抗膜突蛋白抗体在动脉粥样硬化相关疾病中有较高的阳性检出率,ACS 患者尤为显著。其可能原因为 ACS 是在高血压、糖尿病、血脂异常等多重危险因子的协同作用下,引起血管内皮损伤导致粥样斑块形成并进一步发生斑块的不稳定及斑块破裂,与同样伴有粥样斑块的颈动脉硬化组患者比较,ACS 组抗膜突蛋白抗体的阳性检出率

亦明显增高。因此抗膜突蛋白抗体能否作为易损斑块及斑块破裂的一个有说服力的危险标志,值得进一步深入研究验证。

综上,本研究成功地表达了具有较高纯度及良好抗原性的重组人 moesin;建立了最佳的重组 moesin 作为抗原检测抗膜突蛋白抗体的间接 ELISA 反应条件;初步探讨了抗膜突蛋白抗体与动脉粥样硬化相关疾病的关系。提示抗膜突蛋白抗体作为一种加重炎症损伤的自身抗体参与了血管内皮损伤及动脉粥样硬化的进程,其在动脉粥样硬化相关疾病中的高表达有着很重要的临床价值。

[参考文献]

- [1] CAnes DB, Pollak KS, Buck CA, et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders [J]. Blood, 1998, 91 (10): 3 527-561.
- [2] Polesello C, Payre F. Small is beautiful; what flies tell US about ERM protein function in development [J]. Trends Cell Biol, 2004, 14(6): 294-302.
- [3] Takamatsu H, Feng X, Chuhjo T. et al. Specific antibodies to moesin, a membrane-cytoskeleton linker protein, are frequently detected in patients with acquired aplastic anemia [J]. Blood, 2007, 109(6): 2 514-520.
- [4] Dard N, Louvet-Vallée S, Santa-Maria A, et al. Phosphorylation of ezrin on threonine T567 plays a crucial role during compaction in the mouse early embryo [J]. Biol, 2004, 271(1): 87-97.
- [5] 程春华, 杨继红. 普洱茶对 apoE 基因敲除小鼠动脉粥样硬化的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2012, 32(15): 3 241-243.
- [6] 韩一, 张静, 苏明, 等. 基质金属蛋白酶-9 基因单核苷酸多态性与冠状动脉血管狭窄的相关性 [J]. 中国老年学杂志, 2012, 32(1): 5-6.
- [7] 仲英洁, 张子为, 徐郁, 等. 阿托伐他汀对 ApoE^{-/-}小鼠主动脉粥样硬化和钙化的影响 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2013, 21(4): 305-310.
- [8] 任涛, 李枚娟, 李岩, 等. 动脉粥样硬化与炎症反应关系的研究进展 [J]. 中国老年学杂志, 2010, 5(30): 1 464-467.
- [9] 苏琦, 李昱瑛. PTEN 与动脉粥样硬化 [J]. 中国老年学杂志, 2013, 90(suppl1): 40-48.
- [10] 涂晶, 洪涛, 文格波. 高胰岛素血症与动脉粥样硬化研究现状与进展 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2013, 21(1): 79-83.
- [11] 李梦涛, 尹雷, 王迁, 等. 膜突蛋白及其抗体对人肺微血管内皮细胞损伤机制的研究 [J]. 中华风湿病学杂志, 2010, 14(4): 232-235.

(此文编辑 李小玲)