

人 FcεRI 膜外区 α 蛋白的表达及其自身抗体的检测

Detecting Anti-FcεRI Autoantibodies and its Significance

孙仁山/SUN Ren-shan,冉新泽/RAN Xin-ze,程天民/CHENG Tian-min,刘荣卿/LIU Rong-qing

解放军第三军医大学预防医学院全军复合伤研究所创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038

State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Combined Injury, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

[摘要] 利用昆虫细胞杆状病毒表达系统,成功表达了人 FcεRI 膜外区 α 蛋白;用该蛋白检测抗 FcεRI 自身抗体,结果显示慢性荨麻疹病例组与健康对照组差异不显著。

[关键词] 皮肤病学;抗 FcεRI 自身抗体;慢性荨麻疹;杆状病毒表达系统

[中图分类号] R758.24, Q78

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-7857(2006)05-0059-03

Abstract: The alpha subunit ectodomain of FcεRI (α) was successfully produced by baculovirus expression system. This recombinant protein had been utilized to detect the anti-FcεRI autoantibodies. The results showed no significant difference of the autoantibodies positive rate between the chronic urticaria group and the health control groups.

Key Words: dermatology; anti-FcεRI autoantibody; chronic urticaria; baculovirus expression system

CLC Numbers: R758.24, Q78

Document Code: A

Article ID: 1000-7857(2006)05-0059-03

1 引言

高亲和力 IgE 受体(FcεRI)主要表达于肥大细胞和嗜碱粒细胞表面,经与过敏原 IgE 特异性交联后,与 FcεRI 结合,导致效应细胞活化,引起脱颗粒,释放组胺、白三烯等炎性介质,引起病理生理反应。据报道,部分慢性荨麻疹病人外周血中存在抗 FcεRI 自身抗体,该抗体可以直接结合 FcεRI 活化肥大细胞和嗜碱粒细胞,引起病理生理反应;亦有报道,抗 FcεRI 属于天然自身抗体库的成员,它参与 IgE 和 FcεRI 的反应调控,维持内环境的稳定性。制备完全糖基化的膜外 FcεRIα 蛋白,对深入研究 IgE 受体的功能有着重要意义。我们以昆虫杆状病毒系统制备了可溶性高亲和力 IgE 受体膜外蛋白,并利用该蛋白对其体内的自身抗体进行了检测。

2 材料与方法

2.1 研究对象

162 例慢性荨麻疹患者,应符合如下条件:① 非食物药物过敏因素;② 非物理性荨麻疹;③ 3 周末使用抗组胺药物、皮质类固醇和免疫抑制剂。29 例正常健康自愿者为对照组,本人及家属均无过敏史及寄生虫感染史。

2.2 实验器材和试剂

含人高亲和力 IgE 受体膜外区 α 链 DNA (α) 的重组质粒 pUC19/α 由本实验室分离克隆^[1]。大肠杆菌 JM109 为第三军医大学防原教研室保存菌种。杆状病毒表达系统试剂盒购自 CLON-TECH 公司。生化试剂、限制性内切酶和连接酶购自 Sigma 华美生物工程公司和宝灵曼公司。人 IgE、过氧化物酶标记的羊抗人

IgE 和过氧化物酶标记的羊抗人 IgG,为晶美生物工程公司产品。PCR 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成,上游引物:5'-CT GAA TTC ATG GTC CCT CAT AAA CCT AAG G-3' (含 EcoRI 酶切位点);下游引物:5'-TC CTC CAG TCA TTA TAG CCA GTA C-3' (含 XhoI 酶切位点)。

2.3 实验方法

2.3.1 重组转移质粒 pBacPAK/α 的构建

以质粒 PUC/α 为模板,PCR 扩增出含有 EcoRI 和 XhoI 酶切位点的 α cDNA,用 EcoRI 和 XhoI 酶双切 PCR 产物及 pBacPAK9 质粒,然后用 PCR 回收试剂盒分别回收,将回收的 α 片段与 pBacPAK9 载体片段,进行连接转化后,经 EcoRI 和 XhoI 双酶切鉴定阳性克隆。

表 1 实验染液的配制
Tbl. 1 The confect of the infect solution

	实验组	阳性对照	阴性对照
消毒蒸馏水	86 μl	91 μl	91 μl
pBacPAK/α (100 ng/μl)	5 μl	5 μl	-
BacPAK6 virus DNA	5 μl	-	5 μl
Bacfectin	4 μl	4 μl	4 μl
合计	100 μl	100 μl	100 μl

2.3.2 重组病毒的构建

取生长良好的对数生长期 Sf21,用 BacPAK 完全培养基调整细胞浓度为 7×10^5 ml,27℃ 在 35 mm 培养皿温育 2 h 后,换为 2 ml

收稿日期:2005-09-23

基金项目:重庆市科学技术委员会院士基金项目(995691)

作者简介:孙仁山,男,重庆市高滩岩解放军第三军医大学预防医学院,博士,主要从事创伤、烧伤与复合伤研究;

E-mail:sunyueyue@yahoo.com

Grace 培养液,温育 0.5 h。按表 1 配制染液。

轻轻转动以上各管,室温静置 15 min 后,分别加入到对应的培养皿中,轻轻旋动,使之混匀,放入湿盒,温育 5 h 后,分别各加入 1.5 ml BacPAK 完全培养基至各培养皿。约 72 h 后,收集各培养皿中的培养液,用终点滴定法测定重组杆状病毒的滴度。

2.3.3 重组病毒的鉴定

分别从感染上清中提取重组杆状病毒 Bac/αtv DNA,并以其为模板,用前述引物进行 PCR 扩增及序到测定。用 Bac/αtv 感染 Sf21 细胞后,用免疫细胞化学方法进行鉴定,其一抗为人 IgE,二抗为酶标抗 IgE 抗体。

2.3.4 免疫印迹

以 10 mol 重组杆状病毒 Bac/αtv 感染 Sf21 细胞,27℃培养 72 h 后,收集感染细胞,PBS 清洗 3 次并重悬细胞,加入 B-PER 哺乳细胞蛋白提取液(Pierce 公司产品),Vortex10 min 4℃离心 13 000 /rpm 10 min。收集上清进行 12%聚丙烯酰胺凝胶电泳及 West-blot 分析。蛋白样品通过 SDS-PAGE 分离蛋白组分并通过转膜仪转到硝酸纤维素滤膜(Immuno-P, Millipore)上。蛋白杂交膜用含有 3%牛血清白蛋白(BSA)的 TBS 溶液在 4℃封闭过夜。封闭后的硝酸纤维素滤膜与人 IgE 抗体在室温下作用 1 h,其使用浓度为 1:200,杂交溶液为含有 0.3%BSA 的 TBS 溶液。用 TBS-TC(含有 0.1%的 TWEEN20)清洗 3 次,每次 15 min。用过氧化物酶标记的羊抗人 IgE 二抗与硝酸纤维素滤膜在室温下作用 1 h,抗体浓度为 1:1000。再用 TBS-T 溶液清洗 3 次,每次 15 min。而后用 DAB-过氧化氢系统检测杂交信号。

2.3.5 抗 FcεRI 自身抗体的检测

方法同上,其一抗为 1:200 的慢性荨麻疹病人或健康者的血清,辣根过氧化物酶标记的羊抗人 IgG 抗体为二抗进行免疫反应。

2.4 统计学处理

将慢性荨麻疹组与健康对照组自身抗体检测阳性率结果进行卡方检验。 $P<0.05$ 为相差显著。

3 结果

3.1 高亲和力 IgE 受体膜外区 α 链 cDNA 的获取及序列测定

从 pUC19/αt 中,通过 PCR 获得含有 *Eco*RI 和 *Xho*I 酶切位点的 αt cDNA。扩增产物经 2%琼脂糖凝胶电泳鉴定,长度约 540 bp。将 PCR 产物克隆入 pBacPAK9 多酶切位点。重组 pBacPAK/αt 质粒经 *Eco*RI 及 *Xho*I 双酶切后,用 1.2%琼脂糖凝胶电泳鉴定阳性克隆(见图 1)。DNA 测序表明,扩增的 cDNA 为人 αt cDNA,编码 179 个氨基酸。

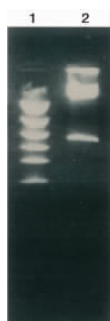


图 1 pBacPAK9/αt 酶切鉴定
1. Marker 2. *Eco*RI 和 *Xho*I 双酶切
Fig. 1 Digestion identification of pBacPAK9/αt

3.2 重组病毒的获取与鉴定

将转染混合液转染 Sf21,在感染后第 4 天,我们观察到,两个阴性对照的共转染上清处理的细胞生长良好。图 2 显示了阴性对

照共转染上清处理的 Sf21 的生长未见有异常影响,说明线性的 BacPAK6 DNA 因缺乏病毒复制前的必需基因,而不能进行正常感染程序。实验管共转染上清感染的 Sf21 可见细胞体积增大,有颗粒形成(见图 3)。做为阳性对照,野生型病毒 AcMNPVC6 感染的 Sf21 细胞数目明显减少,细胞有双核及停止在分裂期的细胞,细胞体积增大,有颗粒,可见包涵体形成(见图 4)。

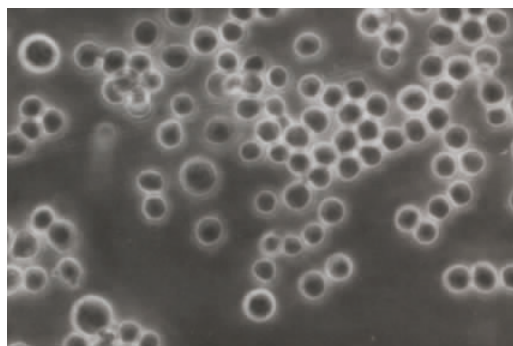


图 2 Sf21 经阴性对照共转染上清处理 (×500)
Fig. 2 Sf21 treated by supernants of negative control co-transfects (×500)

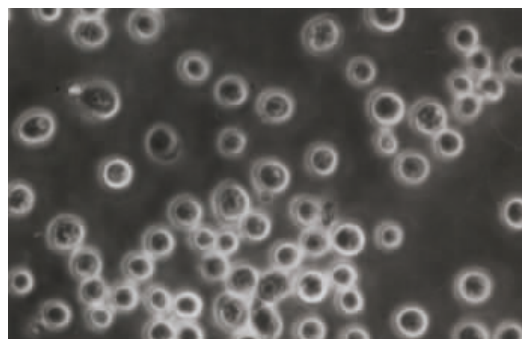


图 3 Sf21 经实验管共转染上清处理 (×500)
Fig. 3 Sf21 treated by supernants of test co-transfects (×500)



图 4 Sf21 经 AcMNPVC6 处理(×500)
Fig. 4 Sf21 treated by AcMNPVC6 (×500)

用空斑法挑取实验管单个病毒 αtn,感染 Sf21 5 d 后,收集含病毒上清,提取 DNA,用 PCR 鉴定,结果出现 540 bp 条带(见图 5),证实含 αt cDNA。用被 αtv 感染的 Sf21 进行免疫细胞化学试验,结果见图 6。

3.3 目的蛋白的表达结果

用重组 αtv 病毒感染 Sf21 细胞,72~96 h 后,进行 12% SDS-PAGE 分析,蛋白质电泳结果表明,对比未感染的 Sf21 细胞,感染



图 5 空斑病毒的 PCR 鉴定
1. Marker; 2~4 PCR 鉴定的部分阳性结果
Fig. 5 PCR identification of the plaque viruses

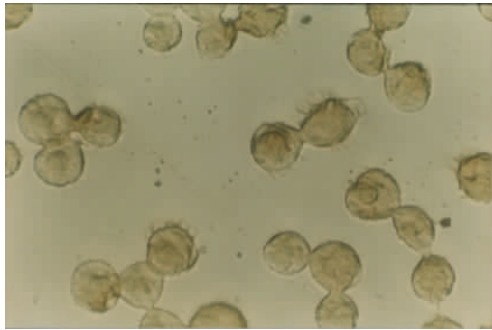


图 6 αtv 感染 Sf21 细胞 4 d 后免疫细胞化学显色结果
Fig. 6 Sf21 studied with immunohistochemistry at day 4 after infected by αtv

细胞新增了 1 条 60 kD 的蛋白条带,免疫印迹证实该条带可与人 IgE 进行特异结合,证实该条带即为目的蛋白——可溶性高亲和力 IgE 受体膜外区蛋白(见图 7)。

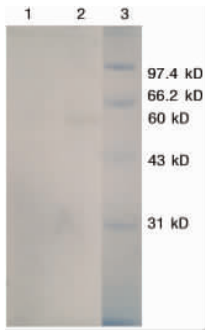


图 7 免疫印迹
1. 正常 Sf21 蛋白样品 2. αtv 感染的 Sf21 蛋白样品 3. 对照
Fig. 7 Western blotting

3.4 抗人 FcεRI 自身抗体的检测结果

抗人 FcεRI 自身抗体的检测结果见表 2。

表 2 抗人 FcεRI 自身抗体的检测结果 Tbl. 2 Detecting results of the anti-FcεRI antoantibodies			
	总例数	阳性例数	阳性率
荨麻疹组	162	50	31%
对照组	29	8	28%

经卡方检验,荨麻疹组与正常组间无显著差异($P>0.05$, $\chi^2=0.0180$)

4 讨论

高亲和力 IgE 受体膜外 α 链,含 7 个糖基化位点^[2],糖基对 α 链膜外区蛋白的抗原性和免疫原性有着重要的影响,制备完全糖基化的膜外 FcεRIα 蛋白,对 IgE 受体功能的深入研究有着重要意义。由于利用原核表达系统制备的高亲和力 IgE 受体膜外区蛋白是没有糖基化的,本研究利用杆状病毒表达系统对其进行表达,制备了分子量约 60 kD 的可溶性高亲和力 IgE 受体膜外蛋白,实验证明该蛋白可结合人 IgE,本研究利用该蛋白对其体内的自身抗体进行了检测。

发现抗 FcεRI 自身抗体最重要的意义在于,可对大约 1/3 到 2/3 的不明原因慢性荨麻疹患者^[3]的发生机制进行更深一步的阐明,为临床医生对该类患者的检查诊断措施和治疗决策提供新的依据和参考方向。抗 FcεRI 自身抗体主要有 4 种检查方法,自身血清皮肤试验、组胺释放试验、免疫印迹方法和基于重组蛋白 sFcεRIα 的 ELISA 试验^[4]。我们应用前三者的实验过程中,认为免疫印迹方法稳定性好,实验结果可靠^[5-7]。但该方法检测出的抗 FcεRI 不一定具有活化肥大细胞和嗜碱粒细胞的效能。

起初人们单纯认为抗 FcεRI 属病理性自身抗体,但近年报道从正常人外周血、基于胎儿脐血细胞的噬菌体抗体库和基于荨麻疹患者及对照血细胞的噬菌体抗体库中分离到了相同的抗 FcεRI 自身抗体^[8,9]。序列分析这些抗体的重链可变区和轻链可变区,结果提示抗 FcεRI 自身抗体属于天然自身抗体库的成分。Horn MP 等提出假设:FcεRI、抗 FcεRI 自身抗体、游离 IgE、膜结合 IgE 和可溶性 FcεRI 共同构成网络,在生理情况下处于平衡状态,抗 FcεRI 天然存在,具有维持内环境稳定性的作用。当 FcεRI 的膜外区 α 肽处于裸露状态未被 IgE 占领时,抗 FcεRI 即可与 FcεRI 结合,导致效应细胞脱颗粒,引起病理反应,即所谓的条件自身免疫(conditional autoimmune)^[10]。我们从 162 例慢性荨麻疹患者血清中检测出 50 例携带抗 FcεRI,阳性率 31%,与对照组 28%无显著差异。阳性率的高低与检测方法的敏感性有关,我们的结果支持抗 FcεRI 属于天然自身抗体成份这一观点。荨麻疹及过敏性鼻炎和过敏性哮喘同属于 I 型超敏反应,抗 FcεRI 在过敏性鼻炎和过敏性哮喘发病机制中的作用尚待进一步的研究。

参考文献(References)

[1] 孙仁山,胡川闽,刘荣卿,等.高亲和力 IgE 受体 α 链 cDNA 的克隆及序列测定[J].第三军医大学学报,2000,22(2): 123-125.
[2] 孙仁山,刁庆春.高亲和力 IgE 受体 α 亚单位[J].中国实用免疫和哮喘杂志,2002,6(2): 16-117.
[3] 孙仁山,刘荣卿.自身免疫与慢性荨麻疹[J].国外医学皮肤性病学分册,2000,26(3):135-138.
[4] 孙仁山,刘荣卿.自身免疫性慢性荨麻疹的检测方法及治疗进展[J].临床皮肤科杂志,2000,29(3):187-188.
[5] 孙仁山,刘荣卿,叶庆俊,等.慢性特发性荨麻疹患者血清组胺释放活性的检测[J].第三军医大学学报,2000,22(4): 349-350.
[6] 孙仁山,刘荣卿,胡川闽,等.高亲和力 IgE 受体 α 链蛋白及其自身抗体在慢性荨麻疹患者中的表达[J].中华皮肤科杂志,2001,34(6):444-445.
[7] 刘荣卿,孙仁山.嗜碱粒细胞组胺释放实验检测抗高亲和力 IgE 受体及其抗体的自身抗体[J].重庆医学,2001,30(1):27-29.
[8] MIESCHER S M, HORN M P, PACHLOPNIK J M, et al. Natural anti-FcεRIα autoantibodies isolated from healthy donors and chronic idiopathic urticaria patients reveal a restricted repertoire and autoreactivity on human basophils [J]. Hum Antibodies, 2001,10(3-4):119-126.
[9] HORN M P, PACHLOPNIK J M, VOGEL M, et al. Conditional autoimmunity mediated by human natural anti-Fc(ε)RIα autoantibodies? [J]. FASEB J, 2001,15(12): 2 268-2 274.
[10] PACHLOPNIK J M, HORN M P, FUX M, et al. Natural anti-FcεRIα autoantibodies may interfere with diagnostic tests for autoimmune urticaria [J]. J Autoimmun, 2004,22(1):43-51.

(责任编辑 王 芷)