

表达 AQP4 不同亚型的细胞系检测 AQP4 抗体敏感性的研究

刘俊秀, 赖 蓉, 钟德霞, 黄 帆, 丰岩清*, 梁秀龄
(中山大学附属第一医院神经内科, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】研究表达不同亚型的 AQP4 细胞系检测中国人群视神经脊髓炎患者血清中 AQP4 抗体的敏感性。【方法】根据纳入标准共获取血清 205 例, 其中包括视神经脊髓炎 40 例, 长节段性脊髓炎 39 例, 复发性视神经炎 39 例, 多发性硬化 47 例, 另设 40 例健康对照。使用稳定表达水通道蛋白 4 的四种细胞系 HEK293/pcDNA3.1(+)-M23-AQP4、HEK293/pcDNA3.1(+)-M1-AQP4、HEK293/pEGFP-N3-M23-AQP4、HEK293/pEGFP-N3-M1-AQP4 通过细胞间接免疫荧光法分别检测以上血清中的 AQP4 抗体。【结果】NMO-IgG 普遍存在于视神经脊髓炎疾病谱中。AQP4 抗体同 AQP4 两种亚型结合敏感性比较发现, M23-AQP4 的敏感性高于 M1-AQP4。同时绿色荧光蛋白作为标签蛋白, 可能干扰抗体同 AQP4 的结合。【结论】M23-AQP4 作为靶抗原检测血清中 AQP4 抗体优于 M1-AQP4, 临床中采用细胞间接免疫荧光法对抗体进行检测时应首选表达 M23-AQP4 亚型的细胞系进行检测。

关键词: 视神经脊髓炎; AQP4; NMO-IgG; 亚型; 抗体敏感性

中图分类号: R74 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2012)05-0587-05

Sensitivity of Aquaporin-4 Isoforms Binding to Antibody in Neuromyelitis Optica

LIU Jun-xiu, LAI Rong, ZHONG De-xia, HUANG Fan, FENG Yan-qing*, LIANG Xiu-ling
(Department of Neurology, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】To investigate the performance of AQP4 isoform to detect AQP4 antibodies in neuromyelitis optica(NMO) patient's sera. 【Methods】We tested 205 masked serum samples from 40 NMO patients, 39 longitudinally extensive transverse myelitis (LETM) patients, 39 patients with recurrent optic neuritis (rON), 47 patients with multiple sclerosis (MS) and 40 healthy controls with the indirect immunofluorescence with a composite substrate of HEK293/pcDNA3.1 (+)-M23-AQP4, HEK293/pcDNA3.1 (+)-M1-AQP4, HEK293/pEGFP-N3-M23-AQP4, HEK293/pEGFP-N3-M1-AQP4. 【Results】We found antibody to AQP4 was present in NMO spectrums. M23-AQP4 was more sensitivity than the M1-AQP4 and while the enhanced green fluorescent protein (EGFP) which was a tag protein may be interfere with the combination between the AQP4 antibody and AQP4. 【Conclusion】M23-AQP4 appears to have a higher sensitivity than the M1-AQP4. It is expected to be a first consideration for the detection AQP4 antibody with the cell based assay.

Key words: neuromyelitis optica; aquaporin-4; NMO-IgG; isoform; sensitivity of antibody

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2012, 33(5):587-591]

视神经脊髓炎(neuromyelitis optica, NMO)是一种以视神经和脊髓受累为主的中枢神经系统脱髓鞘疾病^[1]。该病以女性受累为主,预后较差,患者晚期多因呼吸衰竭而死亡^[1-2]。过去 NMO 被认为是多发性硬化(multiple sclerosis, MS)的一种亚型^[1-3],而 NMO-IgG 的发现^[4]使其作为一种通道免

疫性疾病同 MS 有效地鉴别开来。NMO-IgG 是针对水通道蛋白(aquaporin-4, AQP4)产生的一种自身免疫性抗体^[5],又称为 AQP4 抗体。在中枢神经系统中 AQP4 主要有两种亚型:M1-AQP4, M23-AQP4。由于二者 N 端的 23 个氨基酸形成蛋白不同,两种亚型在胞外端形成结构也不同^[6]; M23-

收稿日期:2012-03-04

基金项目:广东省自然科学基金(31694;2004B33801006)

作者简介:刘俊秀,硕士,研究方向:神经免疫学, E-mail:ljx586000@163.com; * 通信作者, 丰岩清, 副教授, 硕士生导师, E-mail:fyqgz@sohu.com

AQP4 在胞外端可形成直角正方形结构 (orthogonally arranged particles, OAP), 而 M1-AQP4 则为线性端不能形成 OAP [7]。2006 年, NMO-IgG 作为一项支持标准纳入 NMO 的诊断中, NMO-IgG 的早期检测 [8] 对于该类疾病的预后具有重要指导意义。尽管目前多项研究已经证实以转染 AQP4 的细胞系为底物的细胞间接免疫荧光法是检测 NMO-IgG 最敏感的方法 [9], 然而有研究报道 [10] 不同表达载体、不同亚型的 AQP4 在检测抗体敏感性方面仍存在差异。目前国内尚未有对 AQP4 的两种亚型同血清中 AQP4 抗体结合敏感性进行过研究。因此本研究的主要目的是采用表达 AQP4 两种亚型的细胞系检测视神经脊髓炎疾病谱患者中的 NMO-IgG, 并比较两种亚型对抗体免疫反应的敏感性。

1 材料与方法

1.1 研究对象

1.1.1 患者来源 患者来自 2009 年 1 月至 2011 年 11 月中山大学附属第一医院神经内科住院及门诊患者。血清共 205 例, 其中包括 NMO 40 例, 纵形扩展性脊髓炎 (longitudinally extensive transverse myelitis, LETM) 39 例, 复发性视神经炎 (recurrent optic neuritis, rON) 39 例, MS 47 例, 健康对照 40 例。所有入组者均被告知该实验的目的, 取得了其同意后采取静脉血, 采血前患者未经激素及免疫抑制剂等治疗。血清样本保存在 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱。

1.1.2 诊断标准 纳入标准: ① NMO 符合 2006 年新修订的诊断标准 [8] (除外血清 NMO-IgG 阳性); ② MS 患者符合 McDonald 标准 [11]; ③ LETM: 脊髓磁共振显示脊髓超过连续 3 个以上节段信号异常, 不符合 NMO 的诊断标准。

1.2 HEK293 细胞系免疫荧光法检测血清中的 AQP4 抗体

我们前期工作已经利用 EGFP-N3 载体成功构建了稳定表达 M1、M23 亚型的 HEK293/pEGFP-N3-M23-AQP4、HEK293/pEGFP-N3-M1-AQP4 HEK293 细胞系 [12], 本实验中采用此细胞系检测血清中的抗体。大致步骤如下: 将盖玻片放入 24 孔板中, 接种细胞, 待细胞生长达 80% 时, 取出盖玻片, PBS 洗 3 次, 40 g/L 多聚甲醛溶液固定 10

min, 山羊血清封闭 30 min, 加入血清 (1:60), 室温 2 h, PBS 洗 3 次, 加入 CY3 标记的山羊抗人 IgG (1:100), 室温孵育 1 h, PBS 洗涤, 荧光显微镜下观察。

1.3 HEK293 细胞系免疫双标法检测血清中的 AQP4 抗体

早期以 pcDNA3.1 (+) 载体成功构建了稳定表达 M1、M23 亚型的 HEK293/pcDNA3.1 (+)-M23-AQP4、HEK293/pcDNA3.1 (+)-M1-AQP4 细胞系 [13]。免疫双标大致步骤同 1.2。

1.4 结果评价

染色结果经两个观察者在不知临床资料的情况下进行评价, 细胞膜表面被红色荧光染色定义为血清中抗体阳性。

1.5 统计分析

采用 SPSS16.0 软件进行统计分析, 率的比较采用 Fisher 精确检验, $P \leq 0.05$ 定义为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 载体 pEGFP-N3 转染的 HEK293 细胞系检测 AQP4 抗体

HEK293/pEGFP-N3-M23-AQP4 检测血清中 AQP4 抗体发现, 40 例 NMO 患者中 36 例阳性, 39 例 LETM 中 23 例阳性, 39 例 rON 中 13 例阳性, 而 47 例 MS 患者中仅有 3 例阳性, 健康对照未检测出阳性。而 HEK293/pEGFP-N3-M1-AQP4 同 HEK293/pEGFP-N3-M23-AQP4 相比各组疾病的血清阳性数明显减少 (表 1), 采用 Fisher 精确检验比较两种亚型的检测 NMO 中抗体的敏感性, $P=0.024$, 差异有统计学意义, 可知 M23-AQP4 亚型检测抗体的敏感性高于 M1-AQP4 亚型。阳性血清同细胞膜表面结合, 比较抗体同两种亚型的结合方式, 未发现明显差异 (图 1)。

2.2 载体 pcDNA 3.1 (+) 转染的 HEK293 细胞系检测血清中 AQP4 抗体

HEK293/pcDNA3.1 (+)-M23-AQP4 检测血清中 AQP4 抗体发现 40 例 NMO 患者中 38 例阳性, 39 例 LETM 中 25 例阳性, 39 例 rON 中 15 例阳性, 而 MS 中仅 3 例阳性, 健康对照未检测出阳性。而 HEK293/pcDNA3.1 (+)-M1-AQP4 检测共发现 63 例阳性血清, 其中包括 NMO 32 例, LETM

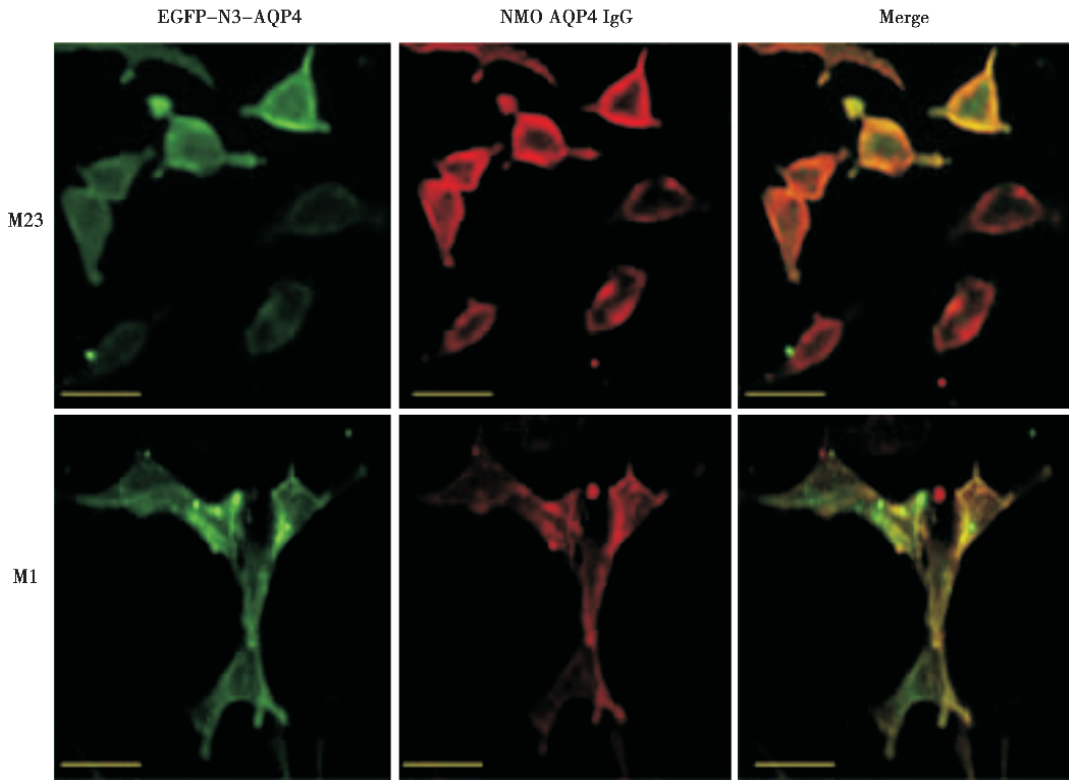


图 1 HEK293/pEGFP-N3-M23-AQP4、HEK293/pEGFP-N3-M1-AQP4 细胞为底物检测血清中 AQP4 抗体
Fig.1 Serum anti-AQP4 antibody measured by the cell line with pEGFP-N3-M23-AQP4 and pEGFP-N3-M1-AQP4

The figure showed the transfected cells with EGFP-N3-M23-AQP4, EGFP-N3-M1-AQP4 is green. NMO patient's serum with AQP4 IgG was labeled by Cy3 (red). The bar is 100 μ m.

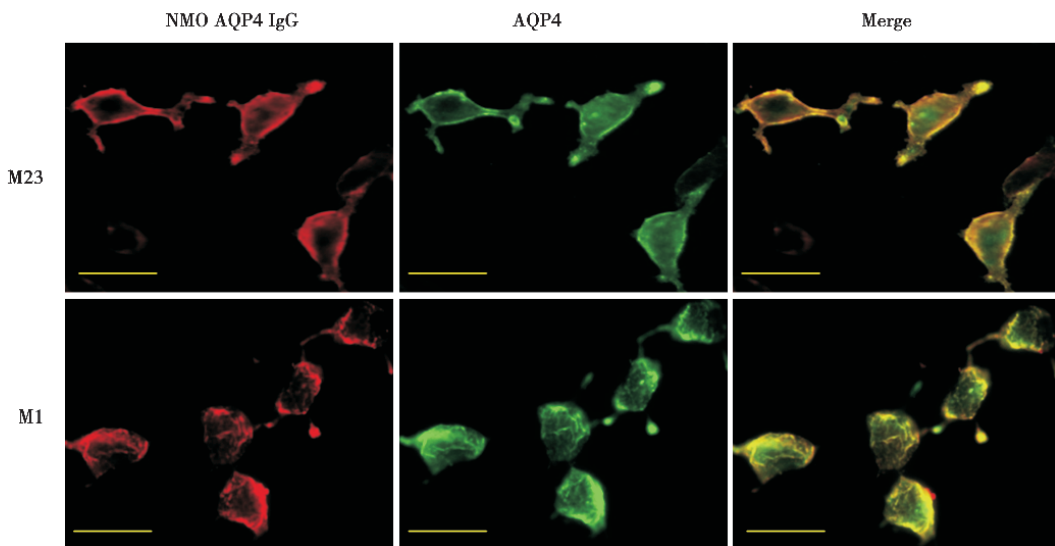


图 2 HEK293/ pcDNA3.1(+)-M1-AQP4、HEK293/ pcDNA3.1(+)-M23-AQP4 细胞检测血清中 AQP4 抗体
Fig.2 Serum anti-AQP4 antibody measured by the pcDNA3.1(+)-M1-AQP4 and pcDNA3.1(+)-M23-AQP4 transfected cells

The figure showed NMO patient's AQP4 antibody combined with the M1 and M23 isoforms. Cy3 (red) labeling NMO serum AQP4 antibody, FITC (green) labeling rabbit aquaporin 4 antibody. The bar is 50 μ m.

中 18 例阳性, rON 10 例, 而 MS 3 例, 健康对照未检测出阳性(表 1), 两种亚型检测 NMO 血清中抗体阳性率采用 Fisher 精确检验, $P = 0.044$, 可知 M23-AQP4 亚型检测抗体的敏感性高于 M1-AQP4 亚型。阳性血清同细胞膜表面结合, 比较抗体同两种亚型细胞的结合方式, 未发现明显差异(图 2)。

2.3 不同表达载体对抗体检测敏感性的影响

HEK293/M23-pcDNA3.1 (+)-AQP4 检测 40 例 NMO 发现 38 例血清阳性, 而 HEK293/pEGFP-N3-M23-AQP4 检测出 36 例阳性血清(表 1), 比较两种利用不同载体表达 AQP4 检测抗体的差异, $P = 0.338$, 差异并无统计学意义。但是我们发现部分 HEK293/M23-pcDNA3.1 (+)-AQP4 检测阳性的血清而使用 HEK293/pEGFP-N3-M23-AQP4 检测则为阴性, EGFP 的存在可能干扰了 AQP4 抗体同 AQP4 的结合。

表 1 不同亚型细胞系检测血清中 AQP4 抗体阳性率
Table 1 Serum antibody binding M1-AQP4 and M23-AQP4 isoforms in NMO spectrums

	NMO	LETM	rON	MS	<i>P</i> value
Age(average)	32.3	34.8	34.5	42.7	
Sex(Female/Male)	32/7	16/23	19/20	26/21	
pEGFP-N3-M1-AQP4	70%	41%	23.1%	6.4%	
pEGFP-N3-M23-AQP4	90%	59%	33.3%	6.4%	0.024
pcDNA3.1(+)-M1-AQP4	80%	46.2%	25.6%	6.4%	
pcDNA3.1(+)-M23-AQP4	95%	64.1%	38.5%	6.4%	0.044

NMO: neuromyelitis optica; LETM: longitudinally extensive transverse myelitis; rON: recurrent optic neuritis; MS: multiple sclerosis.

3 讨 论

目前 NMO-IgG 抗体的检测方法已达十余种, 国内外尚未形成统一的检测手段^[14]。Takahashi 等^[15]首次采用载体 pTarget™ 将 AQP4 转入 HEK293 细胞系检测日本 NMO 患者血清中 AQP4 抗体, 阳性率为 80%, 但未说明使用的哪种亚型的 AQP4。之后 Waters 等^[10]使用 EGFP-C3 载体建立了表达 M1 及 M23 亚型的 AQP4, 并对 25 例 NMO 患者血清进行检测, 他们发现 M23 亚型检测抗体的敏感性高于 M1 亚型。Mader 等^[16]通过使用载体 pcDNA3.1 建立了表达 M1-AQP4、M23-AQP4

的 HEK293 细胞系, 并检测澳大利亚人群 NMO 患者血清中 AQP4 抗体, 同样发现 M23 亚型检测抗体的敏感性高于 M1 亚型。在本研究中, 我们采用不同亚型不同载体的细胞系对中国南方人群视神经脊髓炎疾病谱患者血清中的 NMO-IgG 检测发现 AQP4 抗体普遍存在于视神经脊髓炎疾病谱中, 而多发性硬化患者中较少存在, 健康患者中不存在, 且 M23-AQP4 检测血清抗体的敏感性高于 M1-AQP4 亚型, 同时我们也发现荧光蛋白的存在可能干扰血清中的 AQP4 抗体同 AQP4 结合, 而导致漏诊。

已有的研究^[17-19]证实 NMO-IgG 同 AQP4 的细胞外端特异性结合, 但具体的结合位点仍不清楚。近年通过对 AQP4 两种亚型结构的研究, 有学者^[7]指出 M23-AQP4 在胞膜外端形成的 OAP, 是 AQP4 抗体特异性结合的靶点。本研究发现 M1 亚型转染的细胞系检测 AQP4 抗体阳性率仍较高, 说明 AQP4 抗体可以和 M1 亚型结合, 因此我们认为 AQP4 抗体识别的 AQP4 的靶点并不是唯一的。Marnetto 等^[18]采用 Western blot 检测血清中 AQP4 抗体, 发现 AQP4 抗体可以有效地识别 AQP4-M1 亚型(81%), 指出 AQP4 抗体既可以和 M23 胞外段形成的空间构象结合也可以同 M1 胞外的线性结构结合。本研究中我们可以看到 40 例视神经脊髓炎中 M23 亚型可以检测出 38 例阳性血清, 而 M1 亚型则检测出 32 例阳性血清, M23 亚型检测抗体的敏感性高于 M1 亚型, 且 M1 亚型检测抗体阳性的血清, M23 亚型均可以检测出来。因此在临床检测中使用 M23 亚型转染的细胞系可能更有利于早期诊断 NMO。

Mader 等^[16]通过使用转染 M1-AQP4、M23-AQP4 的 HEK293 细胞检测 NMO 血清中的 AQP4-IgG, 发现 M23 AQP4-IgG 主要呈层状染色结合在细胞膜上, 这可能和 OAP 结构的形成有关, 而 M1 AQP4-IgG 主要以点状染色形式同转染 M1 亚型的细胞膜结合。在本研究中我们看到两种亚型的细胞系同阳性血清结合, 表现为胞膜表面红色荧光均染色, 并未发现差异。比较两种研究, 我们发现 Mader 等^[16]的研究在进行细胞间接免疫荧光法时使用细胞后固定的方法, 是否由于固定方式的不同造成两种研究结果的差异, 仍需要进一步探讨。

增强型绿色荧光蛋白 (enhanced green fluorescent protein, EGFP) 是一种常用的基因标签蛋白, 广泛用于标记目的蛋白的表达及定位。在已

有的研究中,EGFP 作为标签融合蛋白与目的基因融合后,一般不会影响目的基因的表达。早期我们利用 EGFP 构建了表达 AQP4 的细胞系用于检测血清中的 NMO-IgG^[12],在本研究中我们发现 EGFP 可能影响 AQP4 与抗体的结合。国外部分研究^[10,19]也显示 EGFP 作为融合蛋白干扰抗体同 AQP4 的结合。我们通过对表达相同目的蛋白携带不同载体的细胞系检测血清中抗体的阳性率发现,EGFP 同 pcDNA3.1 相比,虽然阳性率无统计学差异,但部分 HEK293/pcDNA3.1(+)-M23-AQP4 检测阳性的血清而使用 HEK293/pEGFP-N3-M23-AQP4 检测则为阴性,EGFP 的存在可能干扰了 AQP4 抗体同 AQP4 的结合,因此在临床检测中选择合适的表达载体,对于采用细胞法检测 NMO 中的 AQP4 抗体仍有重要意义。

本研究证实 NMO-IgG 可以有效地鉴别 NMO 和多发性硬化,在细胞法的检测中 M23 亚型检测抗体的敏感性高于 M1 亚型,且非荧光蛋白的表达载体优于荧光蛋白的表达载体,在临床中使用表达 M23-AQP4 细胞系检测血清中 AQP4 抗体更有利于疾病的早期诊断。

参考文献:

- [1] Wingerchuk DM, Hogancamp WF, O'Brien PC, et al. The clinical course of neuromyelitis optica (Devic's syndrome)[J]. *Neurology*, 1999, 53(9): 1107-1114.
- [2] Wingerchuk DM, Weinshenker BG. Neuromyelitis optica: clinical predictors of a relapsing course and survival[J]. *Neurology*, 2003, 60(5): 848-853.
- [3] Wingerchuk DM, Lennon VA, Lucchinetti CF, et al. The spectrum of neuromyelitis optica[J]. *Lancet Neurol*, 2007, 6(1): 805-815.
- [4] Lennon VA, Wingerchuk DM, Kryzer TJ, et al. A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis[J]. *Lancet*, 2004, 364(9376): 2106-2112.
- [5] Lennon VA, Kryzer TJ, Pittock SJ, et al. IgG marker of optic-spinal multiple sclerosis binds to the aquaporin 4 water channel[J]. *J Exp Med*, 2005, 202(9): 473-477.
- [6] Neely JD, Christensen BM, Nielsen S, et al. Heterotetrameric composition of aquaporin-4 water channels[J]. *Biochemistry*, 1999, 38(34): 11156-11163.
- [7] Hiroaki Y, Tani K, Kamegawa A, et al. Implications of the aquaporin-4 structure on array formation and cell adhesion[J]. *J Mol Biol*, 2006, 355(9): 628-639.
- [8] Wingerchuk DM, Lennon VA, Pittock SJ, et al. Revised diagnostic criteria for neuromyelitis optica[J]. *Neurology*, 2006, 66(9): 1485-1489.
- [9] Fazio R, Malosio ML, Lampasona V, et al. Anti-aquaporin 4 antibodies detection by different techniques in neuromyelitis optica patients[J]. *Mult Scler*, 2009, 15(10): 1153-1163.
- [10] Waters P, Leite MI, Gray B, et al. Aquaporin-4 M23 isoform provides a more sensitive assay for aquaporin-4 antibodies[J]. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2010, 81(9): 11-16.
- [11] McDonald WI, Compston A, Edan G, et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis[J]. *Ann Neurol*, 2001, 50(1): 121-127.
- [12] 孙巧松,刘俊秀,丰岩清,等.中国人视神经脊髓炎疾病谱 NMO-IgG/anti-AQP4 抗体检测方法学的比较研究[J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2010, 31(6): 872-877.
- [13] 刘俊秀,孙巧松,丰岩清,等.稳定表达人水通道蛋白 4 的胚肾细胞系 HEK293/AQP4 的建立及应用[J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2010, 31(6): 786-791.
- [14] Waters P, Vincent A. Detection of antiaquaporin-4 antibodies in neuromyelitis optica: current status of the assays[J]. *Int MS J*, 2008, 15(9): 99-105.
- [15] Takahashi T, Fujihara K, Nakashima I, et al. Establishment of a new sensitive assay for anti-human aquaporin-4 antibody in neuromyelitis optica[J]. *Tohoku J Exp Med*, 2006, 210(4): 307-313.
- [16] Mader S, Lutterotti A, Di Pauli F, et al. Patterns of antibody binding to aquaporin-4 isoforms in neuromyelitis optica[J]. *PLoS One*, 2010, 5(5): e10455.
- [17] Hinson SR, Pittock SJ, Lucchinetti CF, et al. Pathogenic potential of IgG binding to water channel extracellular domain in neuromyelitis optica[J]. *Neurology*, 2007, 69(9): 2221-2231.
- [18] Marnetto F, Hellias B, Granieri L, et al. Western blot analysis for the detection of serum antibodies recognizing linear Aquaporin-4 epitopes in patients with Neuromyelitis Optica[J]. *J Neuroimmunol*, 2009, 217(1-2): 74-79.
- [19] Apiwattanakul M, McKeon A, Fryer JP, et al. AQP4-IgG Immunoprecipitation Assay Optimization[J]. *Clin Chem*, 2009, 55(3): 592-594.