

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

刘俊秀, 孙巧松, 丰岩清*, 曾 纓, 赖 蓉, 陈 曦, 黄 帆
(中山大学附属第一医院神经科, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】建立一种可临床应用的并能稳定表达水通道蛋白4的胚肾细胞系 HEK293/AQP4, 用于检测视神经脊髓炎患者血清中的 AQP4 抗体。【方法】构建有 AQP4 基因的表达载体, 利用脂质体将载体转入 HEK293 细胞, G418 筛选, RT-PCR、间接免疫荧光检测稳定细胞系中水通道蛋白4的表达及分布。细胞间接免疫荧光检测 20 例 NMO 患者、20 例 MS 患者、30 例健康对照血清中的 AQP4 抗体, 并同鼠脑间接免疫荧光检测法比较。【结果】限制性酶切消化、PCR、测序结果证明载体构建成功。间接免疫荧光证实稳定细胞系中有 AQP4 表达, 且主要分布在细胞膜上。20 例 NMO 患者血清中 11 例 NMO-IgG 阳性, 18 例 AQP4 抗体阳性, 滴度在 1:60 - 1:15 360 之间, 而 MS 患者仅检测到 1 例阳性, 健康对照未检测到阳性。【结论】成功构建稳定表达水通道蛋白4的胚肾细胞系 HEK293/AQP4, 并检测出国人 NMO 患者血清中存在 AQP4 抗体, 且敏感性高于鼠脑法, 可以有效的鉴别视神经脊髓炎和多发性硬化。

关键词: 视神经脊髓炎; NMO-IgG; 水通道蛋白4(AQP4); HEK293

中图分类号: R54 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2010)06-0786-06

Establishment and Evaluation of a Human Embryonic Kidney Epithelial Cell Line HEK293/AQP4 Stably Express Human AQP4

LIU Jun-xiu, SUN Qiao-song, FENG Yan-qing*, ZENG Ying, LAI Rong, CHEN Xi, HUANG Fan
(Department of Neurology, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】 To establish a clinically applicable assay with human embryonic kidney epithelial cell line HEK293 that can stably express human AQP4, and to investigate the performance of this assay to detect anti-AQP4 antibodies in neuromyelitis optica (NMO) patient sera. 【Methods】 The expression vector containing aquaporin-4 (AQP4) gene was constructed and transfected into HEK293 cells mediated by liposomes. After G418 filtration, the expression of AQP4 was detected by RT-PCR and indirect immunofluorescence staining. We tested masked serum samples from 20 NMO patients, 20 patients with multiple sclerosis (MS), and 30 healthy controls. And the seropositivities and titre were compared with the indirect immunofluorescence with a composite substrate of mouse tissues. 【Results】 Recombinant eukaryotic expression vector contained human AQP4 cDNA was constructed successfully, approved by restriction enzyme digestion and DNA sequencing. Indirect immunofluorescence staining showed that the HEK293 cells transfected with pCDNA3.1 (+)-AQP4 could express human AQP4, mainly in the cell membrane. We found antibodies to AQP4 in 18 of 20 patients with neuromyelitis optica using this method, while 11 of 20 patients with NMO using the rat brain assay. The antibody titre ranged from 1:60 to 1:15 360. In contrast, the patient with MS only have one case positive for AQP4 antibody and healthy control showed negative for AQP4 antibody with both assays. 【Conclusion】 We successfully established HEK293/AQP4 cell line which can expressed AQP4, and can be used to detect anti-AQP4 antibody present in the sera of patient with NMO. The newly developed anti-AQP4 antibody assay appears to have a higher sensitivity for NMO than the

收稿日期: 2010-05-24

基金项目: 教育部高等学校博士学科点专项科研基金新教师课题(200805581139); 中山大学医科青年教师科研启动基金(2008011); 广东省医学科研基金(B2009056)

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

indirect immunofluorescent method using mouse brain tissues. It is expected to be a useful tool for the early diagnosis of NMO and distinguish NMO from MS.

Key words: neuromyelitis optica; NMO-IgG; aquaporin-4 (AQP4); HEK293 WANGXIAOYING

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2010, 31(6): 786-791]

视神经脊髓炎(neuromyelitis optica, NMO)又称 Devic 病,是一种以视神经炎和横贯性脊髓炎为特征的严重的神经系统疾病。以往多认为是多发性硬化(multiple sclerosis, MS)的一个亚型^[1],现多数研究^[2-3]发现多发性硬化与 NMO 在发病机制、治疗和预后方面存在不同。早期鉴别 NMO 和 MS,对于选取合理的治疗及改善预后有重要意义,然而临床上两者很难鉴别。2004 年 Lennon^[4]等人发现 NMO 血清中存在一种特异性抗体,命名为 NMO-IgG,认为该抗体可有效的鉴别 NMO 与 MS。后期研究^[5]证实该抗体是针对水通道蛋白 4(aquaporin-4, AQP4)产生的,故又称 AQP4 抗体。2006 年修订的视神经脊髓炎的诊断标准^[6]将 NMO-IgG 阳性作为诊断视神经脊髓炎的重要血清学标记。目前 NMO-IgG/AQP4 抗体的检测有多种方法,且各方法之间特异性及敏感性不同,尚未确定统一的检测手段。在众多检测方法中以水通道蛋白 4 转染的细胞为底物检测血清中 NMO-IgG/AQP4 抗体被认为是特异性、敏感性均较高的一种检测手段^[7-8]。国内对于细胞法检测 NMO-IgG/AQP4 抗体较少报道,本研究目的建立稳定表达水通道蛋白 4 的胚肾细胞系 HEK293/AQP4,并检测血清中的 AQP4 抗体,探讨该方法在检测国人 NMO 患者血清中 AQP4 抗体的灵敏性,为进一步研究该抗体在疾病中的作用及同病情、病程、预后的关系提供更好的检测手段。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 患者来源及取材 患者来自 2009 年 1 月至 2010 年 2 月中山大学附属第一医院神经内科住院及门诊患者。符合标准的有 20 例 NMO 患者,20 例 MS 患者(其中原发进展型 5 例,复发缓解型 9 例,继发进展型 6 例)。纳入标准:①NMO 符合 2006 年新修订的诊断标准^[6];②MS 的临床诊断标准符合 McDonald 标准^[9]。另外 30 例健康对照。已向患者讲明该实验目的,均取得了患者本人的同

意。手术切除的成人脑膜瘤患者的小脑组织,由中山大学附属第一医院神经外科提供。

1.1.2 主要试剂 pcDNA3.1(+)质粒、HEK293 细胞为本实验室保存;总 RNA 提取试剂盒购自 Qiagen 公司;cDNA 合成试剂盒、Pfu DNA 聚合酶购自 Takara 公司;G418、Lipofectamine 2000 试剂盒购自 Invitrogen 公司;DMEM、胎牛血清、2.5 g/L 胰蛋白酶、Opti-MEM 培养液购于 Gibco 公司;FITC 标记的山羊抗兔 IgG、CY3 标记的山羊抗人 IgG 均购自 Sigama 公司。

1.1.3 实验动物 雌性 6-8 周的 C57BL/6 小鼠,体质量 16~20 g,由中山大学动物实验中心提供。

1.2 方 法

1.2.1 AQP4 基因的获取 将人小脑组织匀浆,使用总 RNA 提取试剂盒提取组织总 RNA,行 RT-PCR,以特异性引物扩增 AQP4 基因。AQP4 分为两种亚型:M1 型、M23 型。M1 型扩增的上游引物为:5'-CTAGCTAGCCGATGAGTGACAGACCCACAGC-3',内含 *Nhe* I 酶切位点;下游引物为:5'-CCGGGTACCTCATACTGAAGACAAT-3',内含 *Kpn* I 酶切位点。M23 型扩增的上游引物为 5'-CTAGCTAGCATGGTGGCTTTCAAAGGGGTC-3',内含 *Nhe* I 酶切位点,下游引物同上。

1.2.2 重组质粒的构建和鉴定 以上 AQP4 两种亚型的 PCR 扩增产物和质粒 pcDNA3.1(+)分别以限制性内切酶 *Nhe* I 和 *Kpn* I 37 °C 双酶切过夜,胶回收纯化产物,T4 连接酶连接过夜,连接产物转化感受态细胞大肠杆菌 DH5 α ,硫酸卡那霉素筛选阳性克隆,扩大培养,提抽质粒,进行双酶切和基因测序鉴定。

1.2.3 细胞转染和筛选 接种 HEK293 细胞,24 h 后细胞达 90% 融合,采用 Lipofectamine 2000 根据说明书转染。分别将 pcDNA3.1(+)-AQP4、pcDNA3.1(+)载体转入 HEK293 细胞,48 h 后 600 μ g/mL G418 加压筛选,两周后挑单克隆扩增,200 μ g/mL 加压维持,流式细胞仪检测细胞株中 AQP4 表达率。

1.2.4 RT-PCR、间接免疫荧光检测 AQP4 表达
 分别提取 HEK293/pcDNA3.1 (+)-AQP4 细胞及 HEK293/pcDNA3.1 (+) 细胞总 RNA, 合成 cDNA, 取 2 μ L cDNA 为模板, 进行 RT-PCR 检测。多聚赖氨酸铺板, HEK293/pcDNA3.1 (+)-AQP4 细胞置于其中培养。当细胞生长面积达 80% 时, 40 g/L 多聚甲醛溶液固定, PBS 洗涤; 加一抗兔抗人 AQP4 多克隆抗体 (1 : 200 稀释), 室温 2 h, PBS 洗涤; 加入二抗 FITC 标记的羊抗兔 IgG (1 : 100 稀释), 室温孵育 1 h, PBS 洗涤, 荧光显微镜下观察。以空转质粒的 HEK293 细胞为对照。

1.3 细胞法检测 AQP4 抗体

多聚甲醛溶液固定细胞, 0.3% PBS-Tritonx-100 稀释血清 (2 倍倍比稀释), 加到转染的细胞表面, 4 $^{\circ}$ C 过夜, PBS 洗涤; 加 CY3 标记的山羊抗人 IgG (1 : 100 稀释), 室温孵育 1 h, PBS 洗涤; 加兔抗人 AQP4 多克隆抗体 (1 : 200 稀释), 室温 2 h, PBS 洗涤; 加二抗 FITC 标记羊抗兔 IgG (1 : 100 稀释) 室温 1 h, 洗涤, 荧光显微镜下观察, 分别设立阳性和阴性对照。

1.4 鼠脑法检测 NMO-IgG

采用 Lennon 等^[4]的方法进行 NMO-IgG 的检测。取切好的 C57BL/6 小鼠脑片, PBS 洗涤, 山羊血清室温封闭 30 min; 加入血清过夜, 洗涤后加 CY3 标记的山羊抗人 IgG (1 : 100 稀释), 室温孵育 1 h, PBS 洗涤; 加兔抗人 AQP4 多克隆抗体 (1 : 200 稀释), 室温 2 h, PBS 洗涤; 加二抗 FITC 标记羊抗兔 IgG (1 : 100 稀释), 室温 1 h, 洗涤, 荧光显微镜下观察, 分别设立阳性和阴性对照。为减少非特异染色, 血清需提前用豚鼠肝粉预处理。

1.5 统计分析

采用 SPSS 16.0 统计学软件进行处理, 血清阳性率比较采用 Fisher 精确检验, 抗体低度比较采用 Mann-Whitney 非参数检验。P \leq 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 重组 pcDNA3.1 (+)-AQP4 质粒的构建

经酶切鉴定, M1 亚型在理论预期值 972 bp 处, M23 亚型在理论预期值 906 bp 处各可见一特异性条带 (图 1A), 送 Invitrogen 测序, 与理论序列符合率达到 100%。

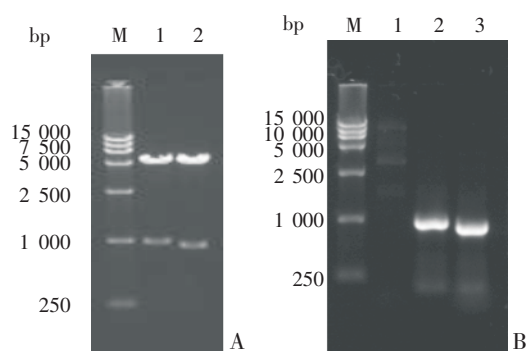


图 1 重组质粒酶切与 HEK293/AQP4 基因 RT-PCR 产物电泳图

Fig.1 Restriction analysis and identification of recombinant plasmid and RT-PCR product of HEK293 stable cell line transfected with AQP4(+) vector

A: Restriction analysis and identification of recombinant plasmid was detected by 1% agarose gel electrophoresis, which showed that M1 isoform was approximately 972 bp and M23 isoform was 906 bp. M: DNA marker (DP15000); Line 1: M1 isoform; Line 2: M23 isoform. B: The RT-PCR products showed that the AQP4 target gene was approximately 972 bp, which was consistent with expectation. M: DNA marker (DP15000); Line 1: negative control; Line 2: M1 isoform; Line 3: M23 isoform.

2.2 细胞转染、筛选

重组质粒转入 HEK293 细胞后, 细胞经加压筛选 2 周后形成单克隆株, 挑单克隆进一步扩增, 4 周后得到稳定的细胞株, 200 μ g/mL G418 加压维持。流式细胞仪检测 AQP4 表达率达 91%。

2.3 RT-PCR、细胞间接免疫荧光检测 AQP4 表达

RT-PCR 扩增产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳, 得到了一条大小为 972 bp, 906 bp 左右的单一条带, 产物大小与预期一致, 阴性对照未见有目标条带 (图 1B)。细胞间接免疫荧光, 显微镜下观察 (图 2), 可见绿色荧光染色主要在细胞膜上, 表明稳定细胞株表达 AQP4, 且主要分布在细胞膜上。

2.4 细胞法检测 AQP4 抗体

20 例 NMO 患者中 18 例阳性 (18/20, 90%), 20 例 MS 患者只有一例阳性 (1/20, 5%; 图 3), NMO 患者阳性率明显高于 MS 患者, 阳性血清滴度分布在 1 : 60 ~ 1 : 15 360 之间 (图 4)。

2.5 鼠脑法检测 NMO-IgG

20 例 NMO 患者中 11 例阳性 (11/20, 55%), 20 例 MS 患者一例阳性 (1/20, 5%; 图 5), 阳性血清滴度在 1 : 60 ~ 1 : 960 之间 (图 6)。

2.6 统计分析

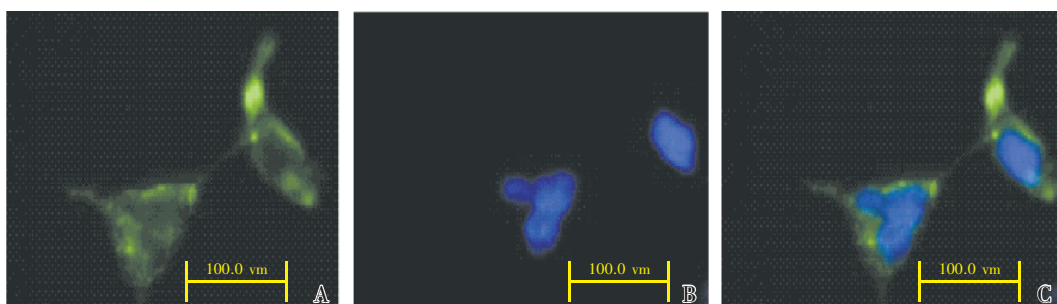


图 2 转染 pcDNA3.1(+)-AQP4 的 HEK293 免疫荧光染色

Fig.2 The HEK293 cells transfected with PCDNA3.1(+)-AQP4 immunofluorescence staining

A: The cells was stained green by FITC Goat-Anti-Rabbit IgG; B: The nucleus of the cells was stained blue by Honchest; C: The picture A and picture B well merged; × 200

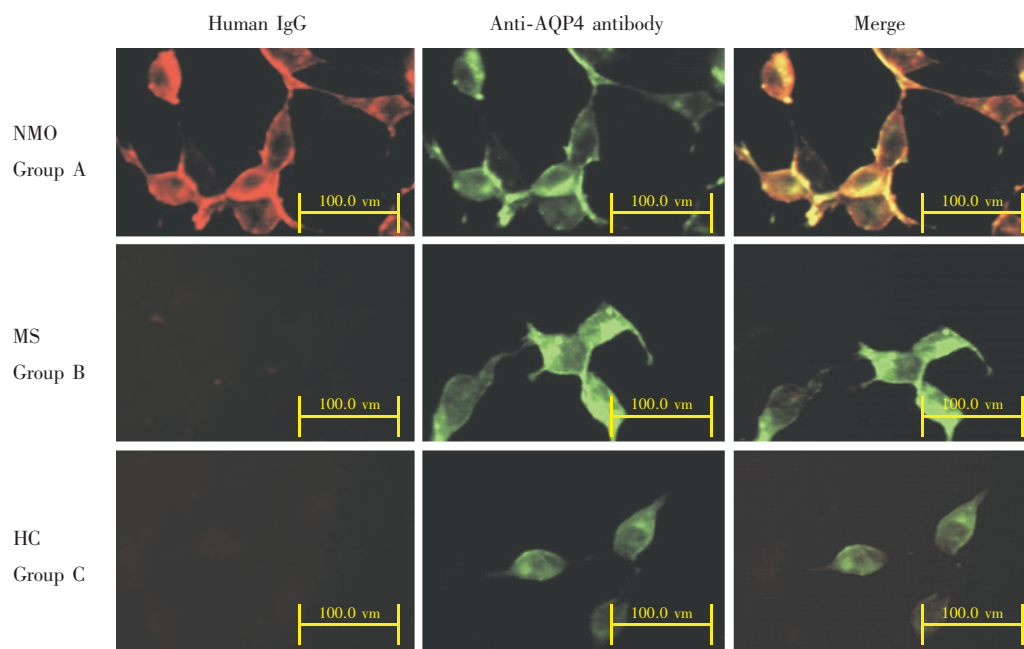


图 3 以细胞为底物检测血清中 AQP4 抗体

Fig.3 Serum-anti-AQP4 antibody measured by the cell-based assay

The figure showed that dual-Immunostaining of AQP4-transfected HEK-293 cells with human serum. Cy3 (red) labelling human serum IgG, FITC(green) labeling anti-AQP4 antibody. Overlap staining is yellow in the merged images. If the red fluorescence and the green fluorescence merged well, we judge it positive. Group A: The positive serum of NMO patients; Group B: The negative serum of MS patients; Group C: Healthy control serum;× 200; NMO: neurom-yelitis optica; MS: multiple sclerosis; HC: healthy control

20例 NMO 患者鼠脑法检测阳性率 55%, 细胞法检测阳性率 90%, 两种方法阳性率, 采用 Fisher 确切概率法比较, $P = 0.031$, 差异有统计学意义。细胞法及组织法阳性血清抗体滴度比较采用 Mann-Whitney 非参数检验, $P = 0.016$, 差异有统计学意义, 由此推断本研究中细胞法检测血清中 NMO-IgG/AQP4 抗体的敏感性高于组织法。

3 讨论

近年 NMO-IgG/AQP4 抗体的发现, 使视神经脊髓炎作为一种独立的疾病同多发性硬化区别开来, 围绕该抗体及靶抗原 AQP4 在视神经脊髓炎发病中的作用的研究^[10-11]也越来越多。AQP4 主要分布在构成中枢神经系统血脑屏障的星形胶

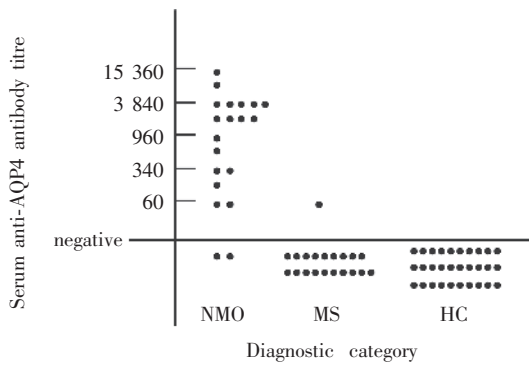


图 4 各组患者血清中 AQP4 抗体滴度分布
Fig.4 The distribution of the serum anti-AQP4 antibody titres in each patient group.
 NMO; neuromyelitis optica; MS; multiple sclerosis;
 HC; healthy control

质细胞足突、微血管等部位^[5], 主要维持中枢神经系统水电解质平衡。进一步的研究发现在 NMO 相关性疾病如视神经脊髓型 MS, 纵形扩展性脊髓炎 (longitudinally extensive transverse myelitis, LETM), 复发性视神经炎中可检测到 NMO-IgG, 因而发展了 NMO 疾病谱的概念^[12]。目前, NMO-IgG/AQP4-Ab 不仅可有效区别 NMO 与 MS, 同时研究还显示该抗体滴度变化对于病情的复发及预后有重要提示意义^[13]。

本研究成功构建了稳定表达 AQP4 的细胞株, 免疫双标显示 AQP4 主要位于细胞膜上, 血清中的 NMO-IgG 染色同水通道蛋白 4 分布重合良好, 验证了 NMO-IgG 实质是 AQP4 抗体。同时研究发现国人 NMO 患者中同样存在 NMO-IgG/AQP4-

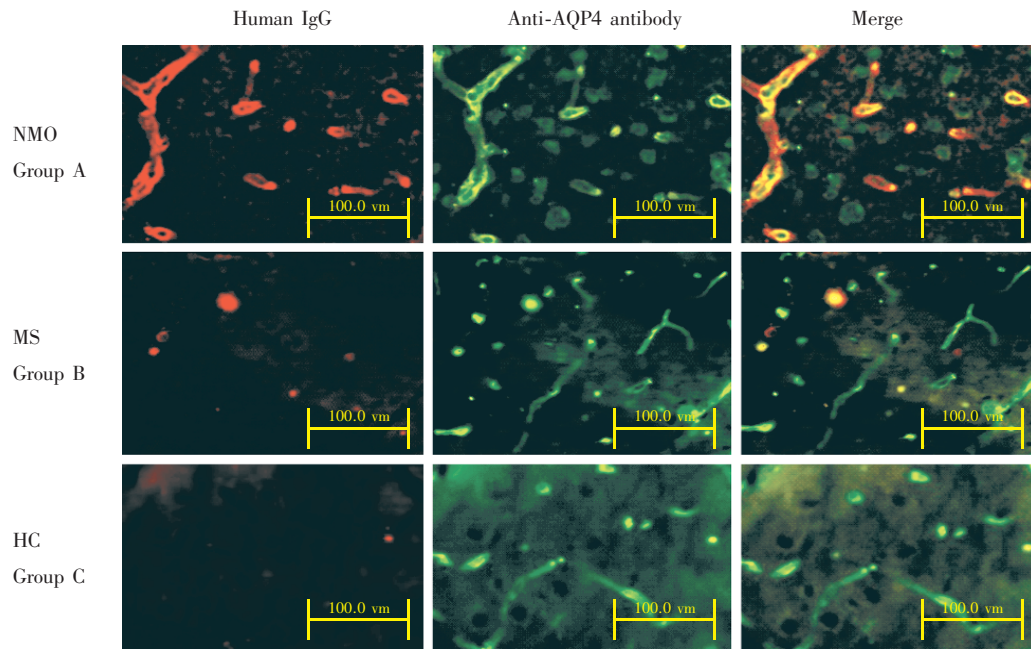


图 5 以鼠脑为底物检测血清中 NMO-IgG

Fig.5 Serum NMO-IgG measured by indirect immunofluorescence based on the mouse brain

The picture showed that the detection of serum NMO-IgG by Dual-immunofluorescence staining. Cy3 (red) labelling human serum IgG, FITC (green) labeling anti-AQP4 antibody. NMO-IgG colocalization with AQP4 in merged images (yellow). Group A: The positive serum of NMO patients; group B: The negative serum of MS patients; Group C: Healthy control serum was negative; × 200; NMO; neuromyelitis optica; MS; multiple sclerosis; HC; healthy control.

Ab, 且细胞法敏感性高于鼠脑法, 同 Takahashi 等^[8]报道基本一致。同鼠脑法比, 细胞法有以下优势: 一方面消除了种属之间的差异, 因鼠 AQP4 虽同人 AQP4 高度一致, 但胞外端仍有几个氨基酸序列不同, 降低了检测的敏感性; 另一方面人血清中存在各种自身抗体如抗核抗体, 抗甲状腺抗体, 抗磷脂抗体等, 可能模拟 NMO-IgG 结构, 造成假阳性, 故

使用鼠脑法检测时血清需使用肝粉预处理。而细胞法中 AQP4 主要在胞膜上表达, 阳性血清染色荧光主要分布在胞膜, 抗核抗体, 抗甲状腺抗体等染色在胞浆, 容易鉴别, 血清不需要预处理, 省时。另外, 有些血管内皮抗体可能模拟 NMO-IgG, 鼠脑法检测时很难鉴别, 而稳定表达 AQP4 的 HEK293 细胞上不存在血管内皮特异性的抗原, 故可以消除未知的

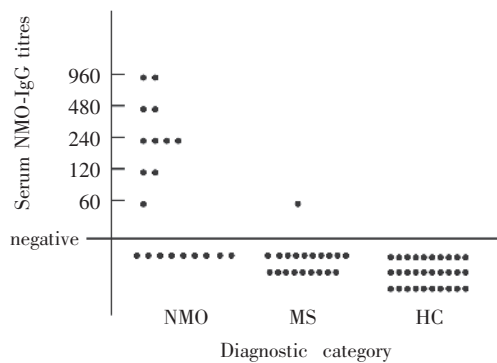


图 6 各组患者血清中 NMO-IgG 滴度分布

Fig.6 The distribution of the serum NMO-IgG titres in each patient group.

NMO: neuromyelitis optica; MS: multiple sclerosis; HC: healthy control

血管内皮抗体可能造成的假阳性^[14]。

虽然在检测方面细胞法较鼠脑法有明显优势,但是细胞法并不能取代鼠脑法。研究报道,20%临床确诊的 NMO 及高达 50% LETM 患者血清中 NMO-IgG/anti-AQP4 抗体阴性^[4,12]。一些自身免疫性疾病^[14](如 SLE,SS 等结缔组织疾病)患者血清中 NMO-IgG 阳性而 anti-AQP4 抗体阴性,且 60% 视神经脊髓炎患者伴有自身免疫的异常。本研究采用两种方法检测 NMO-IgG/anti-AQP4 抗体发现,7 例患者血清中 NMO-IgG 阴性而 anti-AQP4 抗体阳性,两种检测方法之间存在不一致性。故检测 NMO-IgG/anti-AQP4 抗体时应结合两种方法,利用各自的优势,有效鉴别 MS 和 NMO 疾病谱。

本研究成功构建了稳定表达 AQP4 的 HEK293/AQP4 细胞系,检测到国人 NMO 患者中同样存在 AQP4 抗体,且该方法较鼠脑为底物的间接免疫荧光法敏感。临床检测 NMO-IgG/AQP4 抗体可有效的鉴别视神经脊髓炎和多发性硬化,对于早期治疗有重要意义。当然在探索 NMO-IgG 检测方面仍有一些问题尚需解决,如细胞法、组织法仅能半定量检测抗体滴度;不同实验室检测方法尚未形成统一,同一检测方法之间未形成规范流程,造成不同实验室结果之间的差异;国内尚未进行大范围人群中该抗体检测,NMO-IgG/AQP4 抗体特异性仅停留在鉴别 NMO 与 MS 之间。

参考文献:

[1] Lana-Peixoto M. Devic's neuromyelitis optica: a critical review [J]. Arq Neuropsiquiatr, 2008, 66 (1): 120-138.
 [2] Warabi Y, Matsumoto Y, Hayashi H. Interferon beta-

1b exacerbates multiple sclerosis with severe optic nerve and spinal cord demyelination [J]. J Neurol Sci, 2007, 252(1): 57-61.
 [3] Wingerchuk DM, Weinshenker BG. Neuromyelitis optica: clinical predictors of a relapsing course and survival [J]. Neurology, 2003, 60(5): 848-853.
 [4] Lennon VA, Wingerchuk DM, Kryzer TJ, et al. A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis [J]. Lancet, 2004, 364 (9451): 2106-2112.
 [5] Lennon VA, Kryzer TJ, Pittock SJ, et al. IgG marker of optic spinal multiple sclerosis binds to the aquaporin-4 water [J]. J Exp Med, 2005, 202(4): 473-477.
 [6] Wingerchuk DM, Lennon VA, Pittock SJ, et al. Revised diagnostic criteria for neuromyelitis optica [J]. Neurology, 2006, 66(10): 1485-1489.
 [7] 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.
 [8] 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.
 [9] McDonald WI, Compston A, Edan G, et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis [J]. Ann Neurol, 2001, 50(1): 121-127.
 [10] Tani K, Mitsuma T, Hiroaki Y, et al. Mechanism of aquaporin-4's fast and highly selective water conduction and proton exclusion [J]. J Mol Biol, 2009, 389(4): 694-706.
 [11] Saadoun S, Waters P, Bell BA, et al. Intra-cerebral injection of neuromyelitis optica immunoglobulin G and human complement produces neuromyelitis optica lesions in mice [J]. Brain, 2010, 133(2): 349-361.
 [12] Wingerchuk DM, Lennon VA, Lucchinetti CF, et al. The spectrum of neuromyelitis optica [J]. Lancet Neurol, 2007, 6(9): 805-815.
 [13] Paul F, Jarius S, Aktas O, et al. Antibody to aquaporin 4 in the diagnosis of neuromyelitis optica [J]. PLoS Med, 2007, 4 (4): 133.
 [14] Jarius S, Probst C, Borowski K, et al. Standardized method for the detection of antibodies to aquaporin-4 based on a highly sensitive immunofluorescence assay employing recombinant target antigen [J]. J Neurol Sci, 2010, 291(1): 52-56.

(编辑 刘清海)