



急性冠脉综合征（ACS）患者血液循环中的糖基和非糖基化的N末端-IGFBP-4

IGFBP-4属于胰岛素样生长因子(IGF)蛋白家族,在外周循环中参与血液游离IGFs浓度的调控。IGFBP-4与IGF的复合物可以被一种锌-金属蛋白酶PAPP-A裂解。PAPP-A对于IGFBP-4的裂解是高度位点性特异的,裂解位点为met135-lys36。IGFBP-4经PAPP-A酶切后会形成N末端(14.6KDa)和C末端(11.3KDa)两个片段,并且从IGF上释放出来。

近期的一些研究显示,外周循环中IGFBP-4片段水平的升高与心肌缺血、I型糖尿病和ST段抬高心肌梗死患者的主要不良心脏事件及致死率高度相关。

IGFBP-4的104号天冬酰胺(Asn104)是一个潜在的糖基化位点,位于全长分子的N末端。有报道显示,在外周循环中存在糖基化的全长IGFBP-4。此外,在外周循环中糖基化的N末端IGFBP-4 (NT-IGFBP-4)也可能存在。

特异性检测NT-IGFBP-4的免疫学试剂使用的单抗IBP180的识别位点为108-122aa,与104号天冬酰胺的糖基化位点非常接近,检测结果可能会受到糖基化影响。因此本研究旨在评估糖基化对NT-IGFBP-4检测的影响,以及糖基化对PAPP-A介导的IGFBP-4水解效率的影响。

1. 材料和方法

1.1 重组蛋白和单克隆抗体

重组蛋白N末端-IGFBP-4、C末端-IGFBP-4和全片段IGFBP-4均由Expi293F细胞株表达,本研究所使用的校准品均由上述蛋白配制。重组的同型二聚体PAPP-A由CHO-DG44细胞株表达。单克隆抗体和单克隆抗体与辣根过氧化物酶或钼标记的交联物均由HyTest提供。单抗的表位信息如图1所示

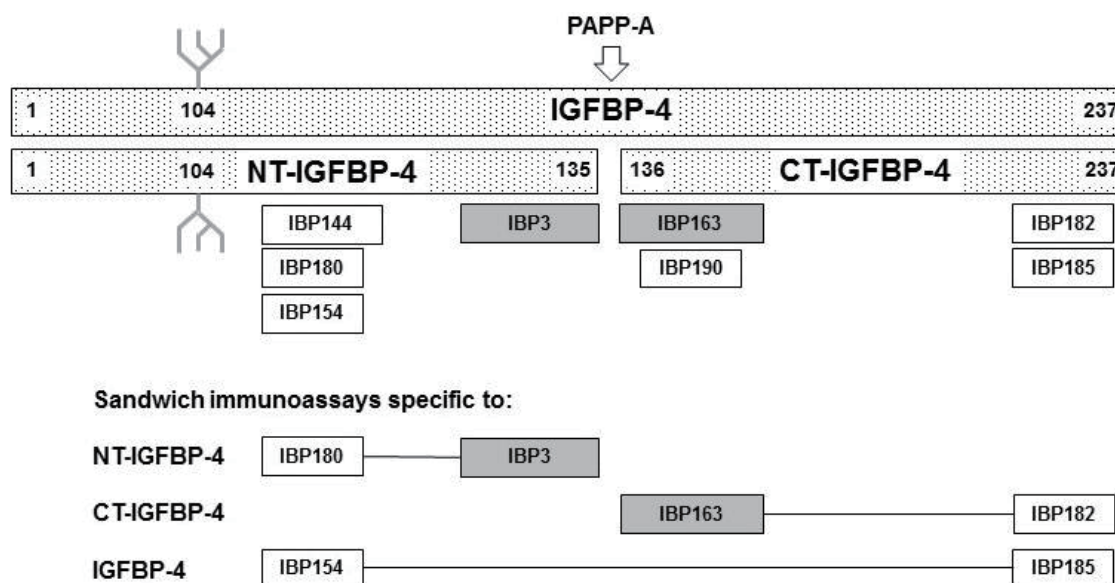


Fig. 1. 抗体表位信息和免疫夹心法所用抗体对信息

蛋白水解产生的新位点用灰色表示:单抗IBP3识别位点为121-135aa,单抗IBP163识别位点为136-150aa。位点远离蛋白水解位置用白色表示:单抗IBP144 (108-127aa), IBP154 (108-122aa), 单抗IBP180 (108-122aa), 单抗IBP190 (137-142aa), 单抗IBP182 (222-236aa), 单抗IBP185 (222-236aa), 单抗IBP190 (137-142aa), 单抗IBP182 (222-236aa) 和单抗IBP185 (222-236aa)。IGFBP-4和N端-IGFBP-4可被糖基化的位点——104号天冬酰胺(Asn104)已被标出。

1.2 EDTA人血浆样本

详见原文。

1.3 患者血浆样本中IGFBP-4及其裂解片段的提取

IGFBP-4及其裂解片段经免疫亲和层析法由EDTA血浆中提取,使用的单抗为IBP144、IBP180、IBP182、IBP185和IBP190。

IGFBP-4与NT-IGFBP-4混合物经上述同样方法由混合EDTA血浆中提取,随后使用单抗IBP185对IGFBP-4与NT-IGFBP-4进行分离。

其他信息请见原文。

1.4 N末端-IGFBP-4的去糖基化方法

详见原文

1.5 质谱法研究

详见原文

1.6 在体外通过PAPP-A水解IGFBP-4

详见原文

1.7 WB法和免疫夹心法分析

详见原文

1.8 统计分析

详见原文

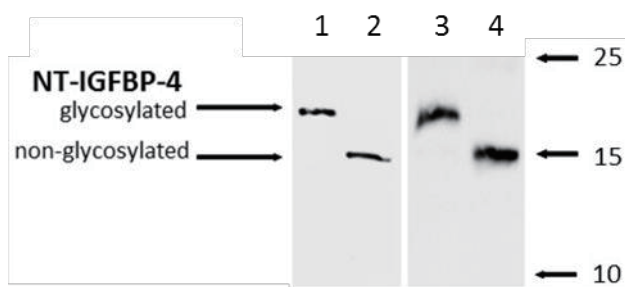
2. 结果分析

2.1 ACS患者血浆内源性N末端-IGFBP-4的分析

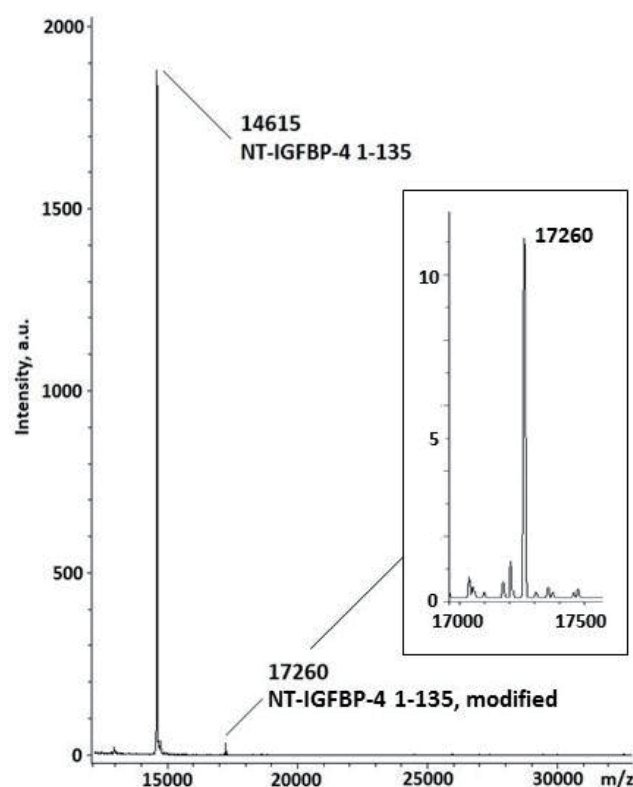
对ACS患者血浆中得到的N末端-IGFBP-4(免疫亲和层析法纯化)进行WB分析。含糖基的N末端-IGFBP-4片段分子量为17kDa (Fig.2, A, 泳道1)。不含糖基的N末端-IGFBP-4片段分子量为15kDa (Fig.2, A, 泳道2)。

未经糖苷酶处理的N末端-IGFBP-4,分子量为17kDa,属于N-糖基化蛋白。经糖苷酶处理的去糖基化N末端-IGFBP-4片段分子量为15kDa。(Fig.2, A, 泳道3和泳道4)

ACS患者混合血浆经过基质辅助激光解吸附质谱技术(MALDI MS)分析显示了两两种不同形式的蛋白。(Fig.2, B) 14615 m/z峰表示的是非糖基化的N末端-IGFBP-4,而17260 m/z峰表示的是糖基化的N末端-IGFBP-4。



A



B

Fig. 2. ACS患者血浆中提取的内源性N末端-IGFBP-4的分析

对从40份ACS患者混合的EDTA血浆样本中提取的糖基化和非糖基化N末端-IGFBP-4进行分析。

A.用单抗IBP180进行染色的N末端-IGFBP-4的WB分析:泳道1为糖基化的N末端-IGFBP-4;泳道2为非糖基化的N末端-IGFBP-4;泳道3为没有经过糖苷酶处理的内源性N末端-IGFBP-4;泳道4为经过糖苷酶处理的内源性N末端-IGFBP-4。

B.内源性N末端-IGFBP-4的质谱分析:糖基化的N末端-IGFBP-4峰(m/z 17260)和非糖基化的N末端-IGFBP-4峰(m/z 14615)

2.2 糖基化对单抗IBP180与IGFBP-4和N末端-IGFBP-4 反应的影响

近期的一些研究所使用的N末端-IGFBP-4和IGFBP-4免疫检测系统均使用了单抗IBP180, 该单抗的位点是108-122aa。因为这些免疫法检测可能会被糖基化位点104号天冬酰胺(Asn104)影响, 所以我们对单抗IBP180对于糖基化的IGFBP-4和N末端-IGFBP-4的反应性进行了研究。该研究通过WB与HRP标记的免疫夹心检测系统进行了比较。

糖基化的IGFBP-4蛋白(30-kDa)通过亲和色谱法纯化, 非糖基化的IGFBP-4蛋白(25-kDa)从ACS患者的混合血浆中通过免疫亲和纯化, 并通过WB进行分析, 染色抗体为IBP180 (Fig. 3, A)。结果显示, 糖基化

和非糖基化的IGFBP-4对于单抗IBP180免疫反应性相同。

使用配对为IBP180-IBP3HRP的免疫夹心检测系统对糖基化和非糖基化的N末端-IGFBP-4的免疫反应性进行分析比较。结果如图3, B所示, 糖基化和非糖基化的N末端-IGFBP-4拥有相似的免疫反应性, 它们之间的差异在10%以内。

本研究对IBP180-IBP3HRP检测系统进行了进一步分析, 对40份ACS患者的EDTA血浆中的N末端-IGFBP-4进行了检测。结果显示, IBP180-IBP3HRP免疫检测系统与IBP3-IBP180EU时间分辨免疫分析检测系统之间有很高的相关性($r=0.95$, $p<0.001$)。

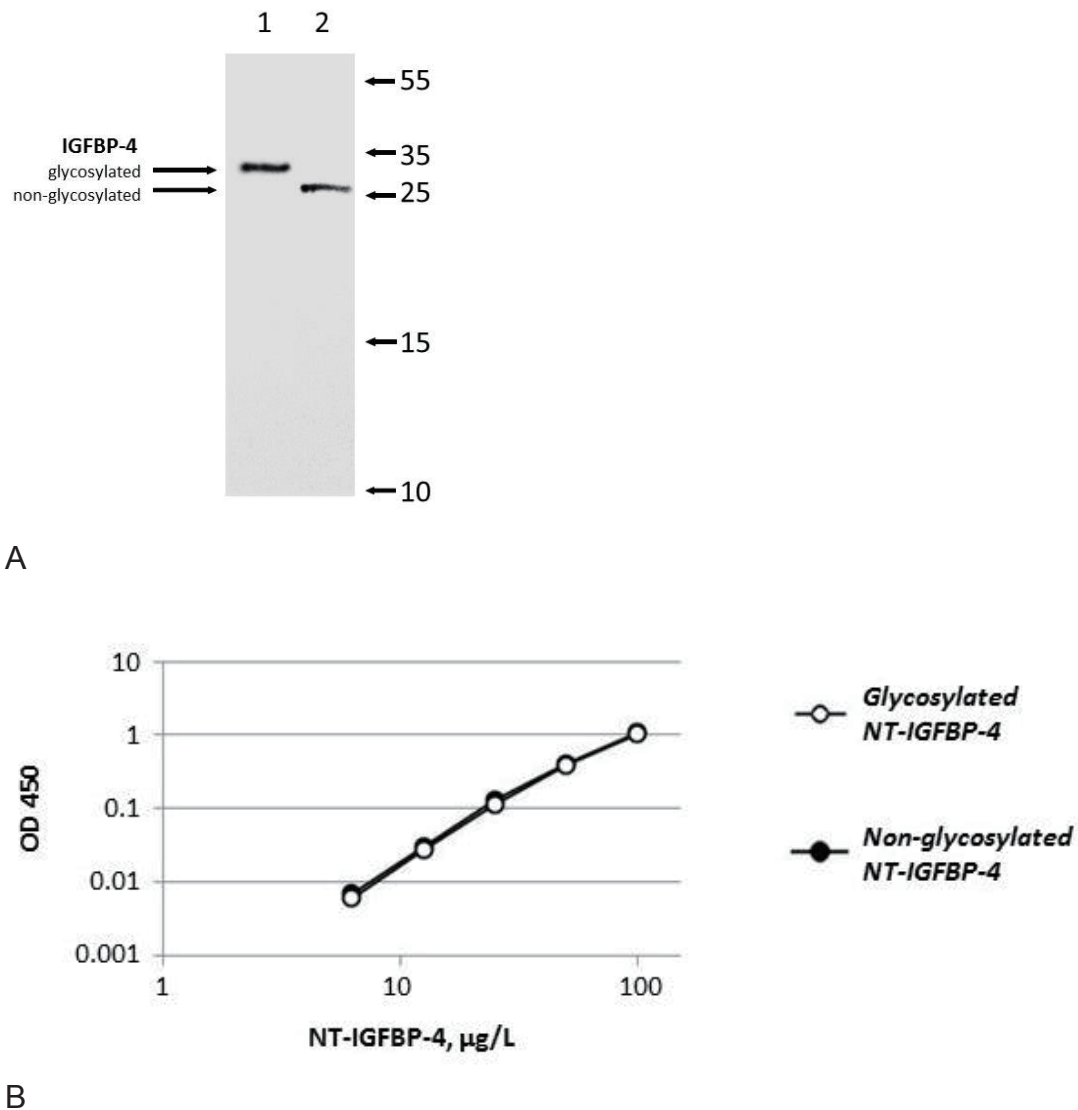


Fig. 3 IGFBP-4和N末端-IGFBP-4的糖基化对于单抗IBP180反应性的影响

A: WB分析, 单抗IBP180的识别位点为108-122aa。泳道1为糖基化的IGFBP-4蛋白; 泳道2为非糖基化的IGFBP-4蛋白。

B: IBP180-IBP3(HRP标记)免疫检测系统中糖基化和非糖基化的N末端-IGFBP-4的免疫反应性。

2.3 ACS患者个体血浆样本中的IGFBP-4和N末端-IGFBP-4的研究:糖基化和非糖基化蛋白的比例

为了研究ACS患者个体血浆样本中IGFBP-4和N末端-IGFBP-4的糖基化水平,本研究提取了12份ACS患者EDTA血浆中的IGFBP-4和N末端-IGFBP-4。样本中IGFBP-4和N末端-IGFBP-4蛋白平均浓度分别为706.53148.4 μ g/L和338.3396.1 μ g/L。通过分离纯化后,IGFBP-4和N末端-IGFBP-4蛋白平均浓度分别为3.832.4 μ g/L和2.531.9 μ g/L,说明分离纯化效率大于99%。之后,研究者对纯化后的蛋白进行了WB分析,糖基化和非糖基化的N末端-IGFBP-4和IGFBP-4的WB结果如图4,A所示。

所有样本均可检出30kDa的糖基化IGFBP-4蛋白和25kDa的非糖基化的IGFBP-4蛋白 (Fig.4,A)。此外,不同的血浆样本中糖基化IGFBP-4在总IGFBP-4蛋白中的含量为47.2%-61.7%。(均值54.8%) (Fig.4,B)。

所有样本均可检出15kDa的非糖基化N末端-IGFBP-4和17kDa的糖基化的N末端-IGFBP-4蛋白 (Fig.4,A)。此外,不同的血浆样本中糖基化的N末端-IGFBP-4占总N末端-IGFBP-4蛋白中的含量为9.8%-23.5%(均值15.6%)。(Fig.4,B) 两种不同碎片的糖基化蛋白含量存在显著差异 ($p<0.001$)。

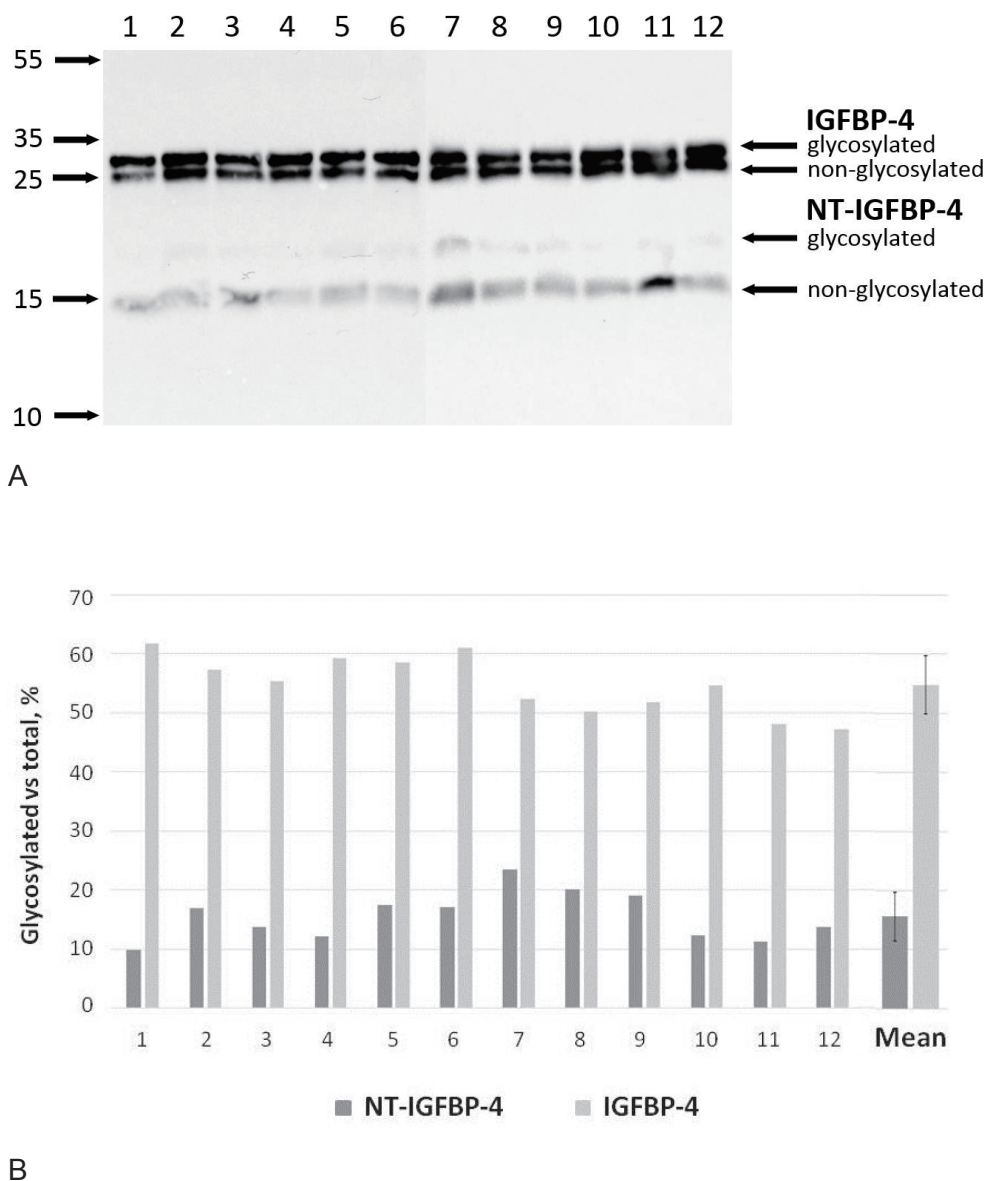


Fig. 4. ACS患者个体血浆样本中提取的内源性IGFBP-4和N末端-IGFBP-4的WB分析

图A: IGFBP-4和N末端-IGFBP-4的WB分析, 染色抗体为IBP180。泳道:1-12表示不同ACS患者血浆样本中提取的总IGFBP-4和N末端-IGFBP-4蛋白。

图B: 分别表示糖基化IGFBP-4和糖基化N末端-IGFBP-4在总IGFBP-4和N末端-IGFBP-4蛋白中的百分比。泳道:1-12 表示不同ACS患者血浆样本中提取的糖基化蛋白的含量。

2.4 糖基化对于PAPP-A介导的IGFBP-4蛋白水解的影响

通过比较ACS患者血浆中提取的糖基化和非糖基化的IGFBP-4的水解比率,分析糖基化对于PAPP-A介导的IGFBP-4蛋白水解反应的影响。结果显示,糖基化和非糖基化的IGFBP-4与PAPP-A的反应速率存在差异。非糖基化的IGFBP-4的蛋白水解速率是糖基化的IGFBP-4的3-4倍($p<0.001$, Fig. 5, A)。因此,非糖基化的IGFBP-4的蛋白水解产

物的形成比糖基化的IGFBP-4的蛋白水解产物的形成快3-4倍($p<0.001$, Fig. 5, B, C)。

另外我们还对IGF对PAPP-A介导的IGFBP-4蛋白水解反应的影响进行了研究。结果表明,在水解过程中加入10倍过量的IGF-II并不会对糖基化的IGFBP-4造成干扰,具体信息可见原文。

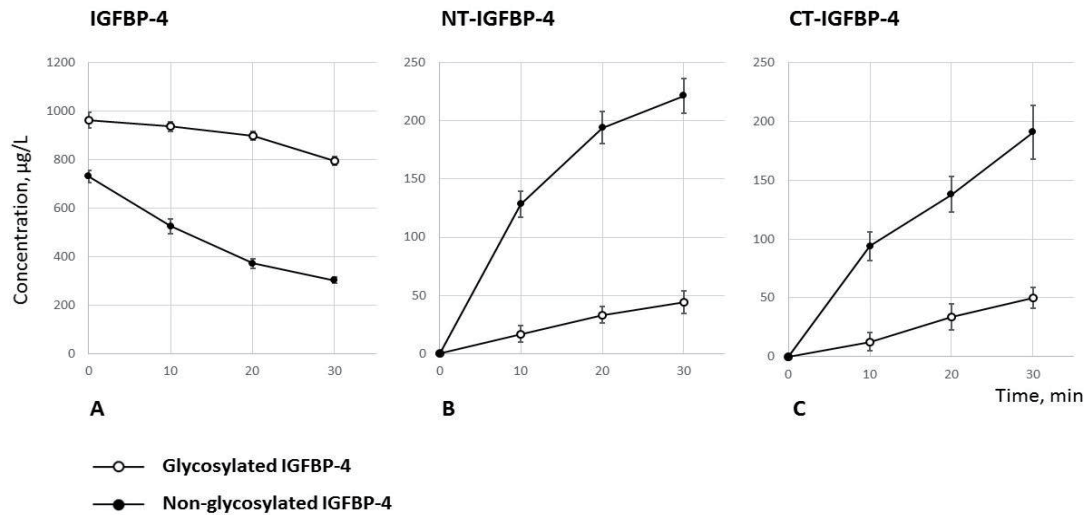


Fig. 5. 糖基化对于PAPP-A介导的IGFBP-4蛋白水解反应的影响: (A) IGFBP-4浓度下降趋势; (B) N末端-IGFBP-4浓度上升趋势; (C) C末端-IGFBP-4浓度上升趋势

样本中的IGFBP-4、N末端-IGFBP-4和C末端-IGFBP-4蛋白浓度通过时间分辨免疫夹心法检测,检测抗体分别为为HyTest公司的IBP185-IBP154EU, IBP180-IBP3EU和IBP182-IBP163EU。

结果讨论

N末端-IGFBP-4和C末端-IGFBP-4是主要不良心血管事件和患者死亡率相关的标志物, 这些疾病包括心肌缺血, 1型糖尿病和ST段抬高型心肌梗死。N末端和C末端-IGFBP-4都是PAPP-A介导的IGFBP-4水解产物。

通过免疫色谱层析法制备N末端-IGFBP-4, 进行ConA色谱分析。本研究结果显示, 分子量为17kDa的蛋白结合于ConA凝胶上 (Fig.2,A,泳道1), 并能被N末端-IGFBP-4单克隆抗体识别, 证明该蛋白是糖基化N末端-IGFBP-4。分子量为15kDa的N末端-IGFBP-4 (Fig.2,A,泳道2) 对应的是非糖基化的N末端-IGFBP-4。质谱分析上述两种蛋白分子 (Fig.2,B), 峰值分别为14,615Da和17,260Da。14,615Da的峰接近非糖基化的N末端-IGFBP-4蛋白分子 (理论分子量是14,626Da), 17,260Da的峰对应就是糖基化的N末端-IGFBP-4 (加上2,619Da的N-多糖)。2,619Da的多糖分子有两种可能结构: 14个单糖基团组成的N-多糖唾液酸残基 (分子量: 2,619.4Da) 或是15个单糖基团组成的N-多糖复合物 (分子量: 2,621.4Da)。

经糖苷酶处理后, ConA凝胶纯化提取的分子量为15kDa的去糖基化N末端-IGFBP-4 (Fig.2,A,泳道3和泳道4), 结果表明IGFBP-4及水解产物N末端-IGFBP-4都存在N-糖基化基团。本研究首次证明了人血浆中同时存在糖基化和非糖基化的N末端-IGFBP-4。

糖基化可能会影响免疫学检测系统的结果。本研究分析了IGFBP-4和N末端-IGFBP-4的糖基化对于免疫检测系统的影响。通过WB分析 (Fig.3,A), 从结果可见单抗IBP180识

别糖基化和非糖基化的IGFBP-4的效率是一样的。用IBP180-IBP3HRP免疫检测系统对ACS患者混合血浆中提取的N末端-IGFBP-4进行检测, 其检测系统并未受到N末端-IGFBP-4糖基化的影响 (Fig.3,B)。本研究所用的IBP180-IBP3HRP免疫检测系统与IBP3-IBP180EU时间分辨免疫检测系统有良好的相关性, 该时间分辨免疫检测系统有很多临床研究正在使用。总的来说, IBP180-IBP3HRP免疫检测系统用于检测血浆中的N末端-IGFBP-4有较高的可靠性。

对ASC患者个体血浆的分析表明, N末端-IGFBP-4主要以非糖基化 (平均: 84.4%) 的形式存在。同时, 我们还发现样本个体中存在糖基化的N末端-IGFBP-4 (平均: 15.6%; Fig.4,B)。低浓度水平的糖基化N末端-IGFBP-4可能是由不同敏感性的糖基化和非糖基化的IGFBP-4, 通过PAPP-A酶解得到的。为验证这个假设, 我们对内源性的糖基化和非糖基化IGFBP-4蛋白对于PAPP-A介导的水解的敏感性进行研究。结果发现糖基化的IGFBP-4的水解速率比非糖基化的慢3-4倍 (Fig.5)。

因为检测N末端-IGFBP-4蛋白的浓度水平可用于评估患者心血管疾病的风险, 所以了解潜在的影响检测的干扰因素是十分重要的。本研究首次确定ACS患者血液中存在糖基化的N末端-IGFBP-4。基于HyTest公司的IBP180-IBP3HRP免疫法用于检测N末端-IGFBP-4蛋白, 能够同时识别血液中的糖基化和非糖基化的N末端-IGFBP-4蛋白, 并且拥有相同的检测效率。