



Full-Size Cardiac Troponin I and Its Proteolytic Fragments in Blood of Patients with Acute Myocardial Infarction: Antibody Selection for Assay Development

Ivan A. Katrukha,^{1,2*} Alexander E. Kogan,^{1,3} Alexandra V. Vylegzhanina,¹ Alexey V. Kharitonov,² Natalia N. Tamm,^{1,3} Vladimir L. Filatov,^{1,3} Anastasia V. Bereznikova,^{1,3} Ekaterina V. Koshkina,⁴ and Alexey G. Katrukha^{1,2}

译：王楠 校对：奚苏静

急性心梗患者血液中全长心肌肌钙蛋白I及其水解片段——试剂开发过程的抗体选择

血液中心肌肌钙蛋白I (cTnI) 的免疫检测是诊断急性心肌梗死 (AMI) 的重要手段。然而，目前的检测试剂存在若干问题，从而影响了检测结果。其中，最主要的问题源自于cTnI的降解。通过对心肌坏死组织进行体外研究可以发现若干14-28KDa的cTnI片段（完整的cTnI分子量约为29KDa）。cTnI分子中间区域30-110氨基酸区域被认为是cTnI最稳定的区域，因此目前绝大多数的免疫检测系统均使用了识别该区域的特异性抗体。

最近的研究发现，ST段抬高型心梗患者的血清中存在高达11种cTnI片段。尽管这些片段已经被广泛研究，但是研究仍然不够深入。而这些信息却是试剂开发过程中抗体选择的关键。因此在本研究中，研究者对AMI患者灌注前的血液cTnI片段组分及比例进行了分析；同时，还对支架手术患者术后不同时间点的cTnI稳定区域进行了检测。研究结果对于新一代cTnI试剂的开发具有重要参考价值。

1. 实验材料与与方法：

1.1 试剂：所有cTnI抗体、抗原均由HyTest提供，详细信息见原文。

1.2 样本：所有样本均来自于AMI患者，患者AMI由ECG和TnT (Roche) 检测结果确诊。样本采集于胸痛发作后的1-36小时，并分为5个时间段进行采血（胸痛发作1-4h及支架手术后2-7h，7-12h，12-23h和23-36h）。更多信息请参见原文。

1.3 cTnI免疫提取（亲和层析）：

亲和层析所使用的抗体均由HyTest提供，抗体特异性识别cTnI不同区域，基本上包含cTnI所有的分子区域。更多信息请参见原文。

1.4 WB和增强化学发光检测（ECL）：

具体详细信息，请参见原文。

1.5 ECL图像定量：

具体详细信息，请参见原文。

1.6 FIA平台上的cTnI降解研究：

本研究使用了两种内部FIA检测系统，抗体对分别为19C7（41-49aa）--56O（83-93aa）和MF4（190-196aa）--4C2（23-29aa）。更多信息请参见原文。

1.7 AMI患者血液中由不同抗体检出的cTnI总量定量：

具体信息，将参见原文。

1.8 统计分析：

具体详细信息，请参见原文。

2. 结果分析：

2.1 AMI患者血清cTnI的WB分析及片段分离

对26例AMI患者血清样本进行cTnI免疫亲和纯化，WB结果显示：（a）所有患者均呈现出相似的12条条带，分别对应全长cTnI分子和11个分子片段；（b）片段数量不会随采血时间的改变而发生改变（Fig. 1）。

使用15株不同位点的cTnI单抗对AMI患者血清样本中的cTnI分子片段进行染色，结果显示N端截断和C端截断形式的cTnI分子片段均存在于患者血清中（Fig. 2）。在分子N端区域，主要存在3个蛋白水解位点。第一个蛋白水解位点位于单抗909（识别位点18-22aa）和单抗4C2（识别位点23-29aa）的识别区域之间（见片段2和4），第二个蛋白水解位点位于单抗4C2和单抗M155（识别位点26-35aa）的识别区域之间（见片段3和5），第三个蛋白水解位点位于单抗M155和单抗10F4（识别位点34-37aa）的识别区域之间（见片段5和7）。而在分子C端区域，则可发现多种蛋白水解位点。根据可被单抗84（识别位点

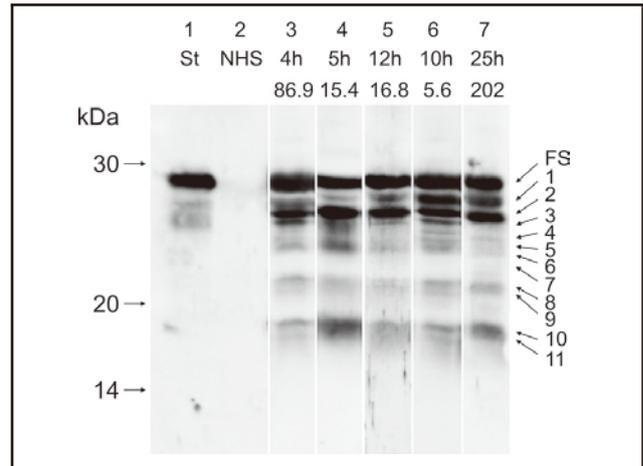


Fig. 1.5 例代表性AMI患者血清cTnI(经免疫亲和纯化的)的WB分析。

1：cTnI标准品（ITC三元复合物）

2：阴性对照（由正常人血清免疫纯化的蛋白）

3-7：从5例代表性AMI血清中免疫亲和纯化的cTnI。胸痛发作后的采血时间和cTnI浓度标示于条带号码下方，全长cTnI及其11个分子片段用箭头标示于图右侧。

为了能清晰的展示结果，研究者使用增强化学发光进行了若干次不同样本量的测试。

免疫染色：标记了HRP的单抗56O。

117-126aa) 染色的条带结果来看，AMI患者血液中cTnI分子的主要稳定区域位于34-126aa区域。

2.2 cTnI片段丰度随时间变化的WB分析

26例AMI患者血清样本中cTnI分子及分子片段丰度的定量结果显示，全长cTnI对应的条带约占全部cTnI的40%（单抗56O染色），而两个最短的片段（片段10和11）则仅占cTnI总量的10%（Fig. 3）。

对AMI患者支架术前和术后1-2小时进行采血，然后分别进行cTnI及其分子片段的WB分析。结果显示，经皮介入治疗并不会对cTnI片段的数目和比率造成显著影响（Fig.3 A和Fig.3 B）。对支架手术患者进行了4次不同时间的采血，分析结果显示AMI发作的前36小时，全长cTnI分子与其片段的比率并不会发生显著改变（Fig.3 C和Fig.3 D）。

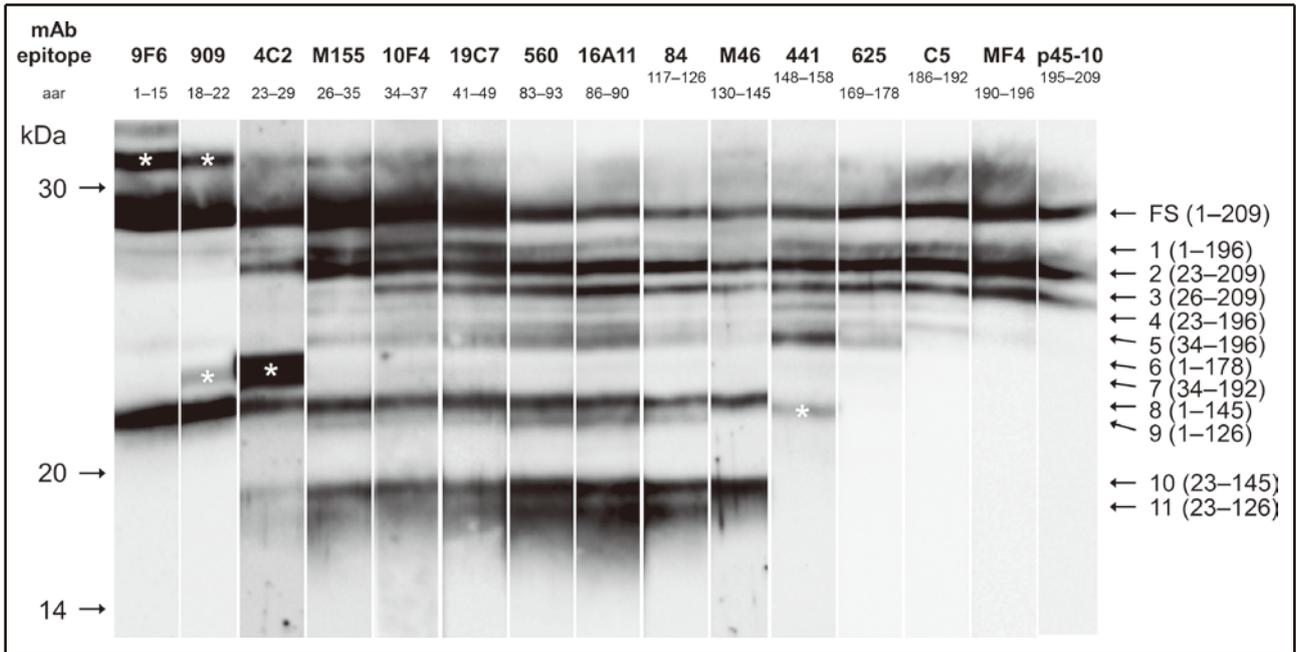


Fig. 2. 一例代表性AMI患者血清cTnI片段定位的免疫分析。

用于染色的单抗名和其识别位点标示于条带上方。不同片段的“预测”氨基酸区域标示于图右侧。非特异性染色用星号标示。

2.3 AMI患者血清中cTnI片段丰度随时间变化的免疫检测分析

为了使用其他方法进一步确认之前的实验结论，研究者使用了两组夹心免疫检测系统对之前研究的系列血清cTnI浓度进行了定量检测（两组单抗配对分别为MF4-4C2和19C7-560），并计算了两组检测系统结果的比率（MF4-4C2/19C7-560）。如果cTnI的末端区域在本研究的时间框架外发生了降解，那么两组检测系统结果比率将发生显著下降；若末端区域未发生显著降解，则比率不会发生显著变化。

最终免疫检测的结果显示，支架手术前后两组检测系统结果的比率并未发生显著变化，与之前WB的结果一致。进一步证实了支架手术并不会改变cTnI分子片段的组成和比率。

此外，研究还发现在AMI发作36小时内，两组检测系统结果的比率仅降低了两倍（Fig. 4），进一步支持了WB的结果，同时提示在AMI发作的前36小时，AMI患者血液cTnI片段并不会发生显著变化。

2.4 不同抗体检出的cTnI的总量的定量化

通过对不同抗体识别出的AMI患者血清cTnI的总量进行定量，结果显示尽管C末端存在若干蛋白水解位点，但是相比于C末端而言N末端更易发生降解（Table. 1）。特异性识别cTnI N末端片段的单抗9F6和909（识别位点分别为11-15aa和18-22aa）仅能识别出55%总量的cTnI，而特异性识别C末端的单抗p45-10（识别位点为195-209）则可检出70%总量的cTnI。

识别N段和中间区域的单抗4C2（识别位点为23-29）可识别不低于90%总量的cTnI。识别C末端的单抗MF4（识别位点为190-196aa）可识别约80%总量的cTnI。因此，对于AMI发作后36小时内的患者，使用识别位点位于23-196aa区域内的单抗可检出总量80%以上的cTnI。

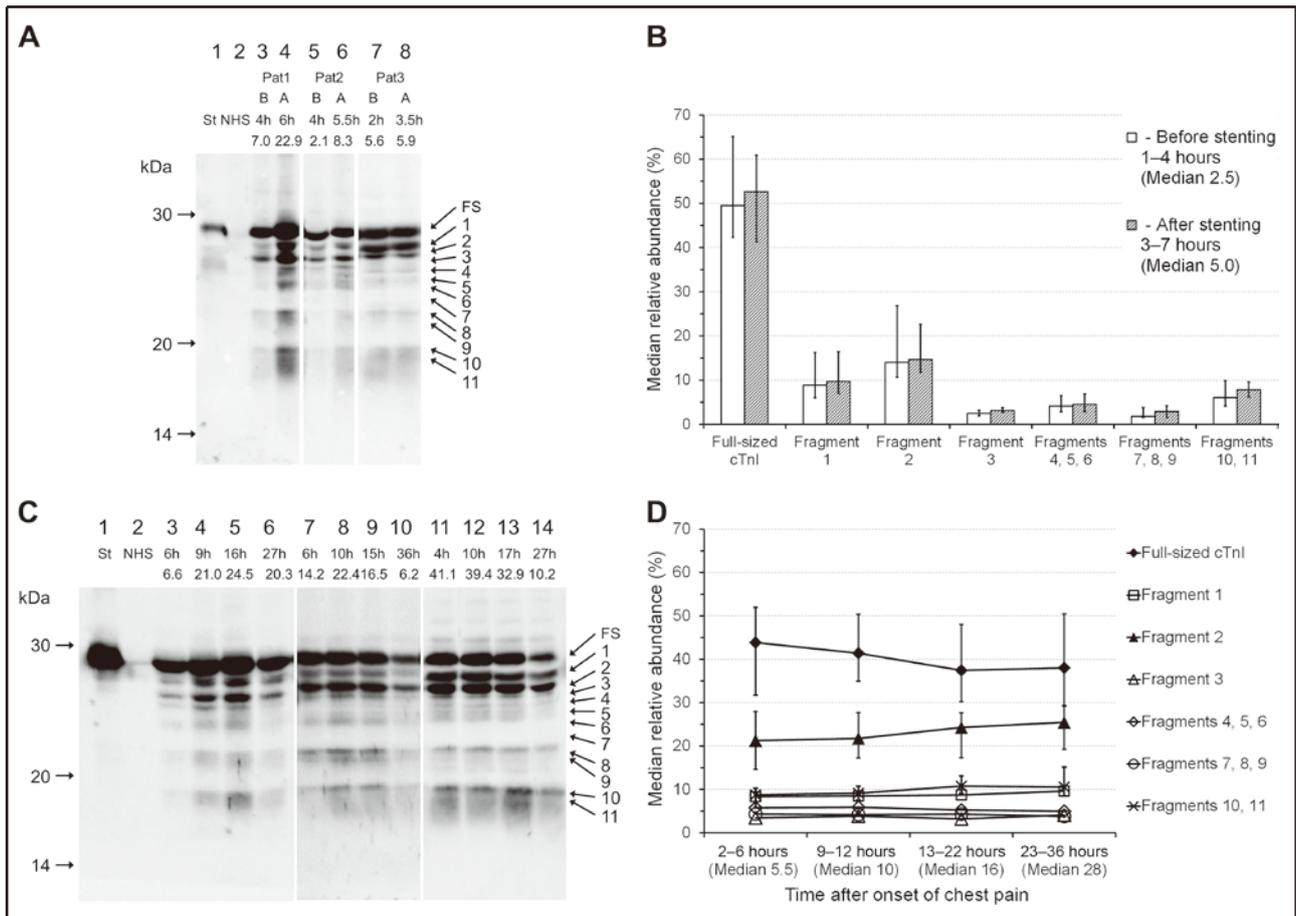


Fig.3. 一定时间内AMI患者血清中cTnI片段比率的变化。

A：AMI患者支架手术前（B）和支架手术后约1小时（A）的全长cTnI和其分子片段丰度的WB分析结果。胸痛发作后的时间及cTnI浓度标示于条带号码下方。使用标记了HRP的单抗56O进行染色。

1：cTnI标准品（ITC三元复合物）；

2：阴性对照（由正常人血清提取的蛋白）；

3-8：3例代表性AMI患者血清的cTnI免疫亲和纯化结果，为了能清晰地展示分析结果，研究了若干不同的样本量和曝光时间。

B：支架术前与术后血清中不同cTnI片段的比率变化（10例患者结果的均值），须状图上下限分别代表25th和75th百分位值。

C：3例AMI患者在支架术后进行4个不同时间的连续采血，之后对全长cTnI及其分子片段的丰度进行WB分析。胸痛发作后的采血时间和cTnI浓度标示于条带号码下方。使用标记了HRP的单抗56O进行染色。

1：cTnI标准品（ITC三元复合物）；

2：阴性对照（由正常人血清提取的蛋白）；

3-14：3例代表性AMI患者系列采血样本的cTnI免疫亲和纯化结果。

为了能清晰地展示分析结果，研究了若干不同的样本量和曝光时间。

D：支架术后4个不同时间节点采血的系列样本的cTnI分子片段比率的变化（26例AMI患者结果的均值）。

须状图展示了3种最高丰度片段的比率变化（分别为全长分子、片段2和片段10及11），须状图上下限分别代表25th和75th百分位值。

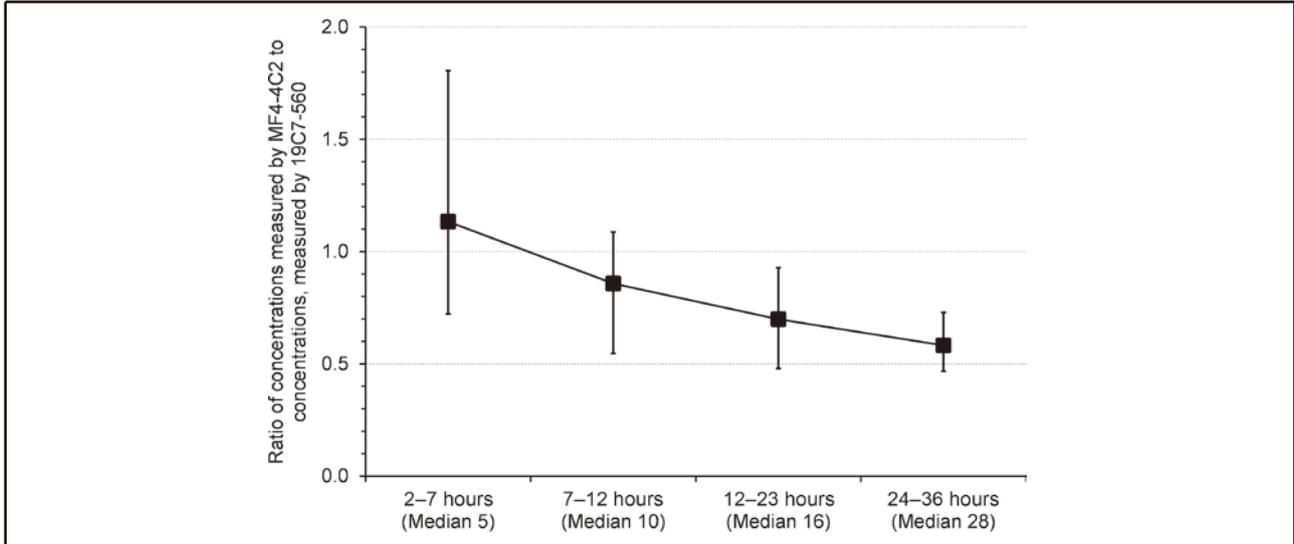


Fig.4. cTnI降解的荧光免疫检测研究

两组检测系统的配对分别为MF4-4C2（特异性识别末端区域）和19C7-560（特异性识别分子中间稳定区域），两组结果的比率变化为64例AMI患者的检测均值计算而来。采血共分为4个时间段，须状图的上下限分别代表25th和75th百分位值。

Table 1. Relative amount of cTnI stained by different mAbs in serial serum samples of AMI patients ($n = 26$).^a

mAb	Epitope (aar)	Fragments that comprise the epitope	Amount of cTnI (%) stained by mAb 560			
			6 h	10 h	15 h	28 h
9F6	1-15	FS, 1, 6, 8, 9	58.9 ± 12.3	56.9 ± 10.8	54.2 ± 10.1	53.4 ± 12.8
909	18-22	FS, 1, 6, 8, 9	58.9 ± 12.3	56.9 ± 10.8	54.2 ± 10.1	53.4 ± 12.8
4C2	23-29	FS, 1, 2, 4, 6, 8-11	94.0 ± 2.2	93.8 ± 2.5	93.9 ± 2.6	93.5 ± 3.1
M155	26-35	FS, 1-4, 6, 8-11	95.5 ± 2.2	95.5 ± 2.0	95.5 ± 1.6	95.7 ± 1.6
10F4, 19C7, 560, 16A11, 84	34-126	All detected fragments	100	100	100	100
M46	130-145	FS, 1-10	95.4 ± 2.5	95.3 ± 1.8	94.2 ± 2.4	93.8 ± 2.5
441	148-158	FS, 1-7	86.0 ± 6.6	85.9 ± 5.0	83.8 ± 5.7	83.0 ± 6.6
625	169-178	FS, 1-7	86.0 ± 6.6	85.9 ± 5.0	83.8 ± 5.7	83.0 ± 6.6
C5	186-192	FS, 1-5, 7	85.5 ± 6.5	85.3 ± 5.1	83.1 ± 5.7	82.5 ± 6.3
MF4	190-196	FS, 1-5	83.9 ± 7.2	83.7 ± 5.7	81.6 ± 6.0	81.0 ± 6.8
P45-10	195-209	FS, 2, 3, 5	71.5 ± 8.8	71.2 ± 8.3	69.3 ± 7.3	68.8 ± 7.9

^a Ratio of cTnI [full-size molecule (FS) and fragments] that could be recognized by the specific antibody to the total cTnI (full-size cTnI and its fragments that are detected by the reference mAb 560, which recognizes all extracted peptides). Mean% ± SD.

3. 启示与讨论：

对于免疫检测试剂而言，如果所使用单抗的识别位点位于分析物的易降解区域，那么将极有可能得到严重低估的检测结果。早期的研究显示，cTnI的N端和C端区域（1-30aa和110-210区域）非常容易降解，这使得识别这些不稳定区域的抗体的应用收到了严重限制。然而，同时还有若干研究显示，大多数识别中间区域的抗体很容易受到患者血液中自身抗体的干扰。因此，cTnI的末端降解问题及中间区域的自身抗体均会对检测试剂的准确性造成影响，这也是近些年来一直困扰着cTnI试剂开发者关于抗体选择的巨大难题。因此本研究旨在通过分析AMI患者血液中cTnI分子片段的分布情况，进一步分析识别cTnI分子30-110aa稳定区域之外的抗体应用于检测试剂的可行性。

本研究的WB结果显示，不同AMI患者在发病的不同时间进行采血，其cTnI的碎片组成及分布均不会出现显著差异。通过使用识别不同位点的单抗，研究者对cTnI的降解片段进行了区域定位。其中可发现的最小的片段的末端分别由单抗4C2（23-26aa）和84（117-126）定位（Fig. 2）。肽段5和7则由识别N末端的单抗10F4（34-37）而得，其氨基酸序列大概为34-126aa的最稳定区域。以上数据与研究者的先前的研究结果一致，特异性识别cTnI 34-126的单抗可以识别出AMI患者血液中所有的cTnI分子片段。

同时，为了能够在WB平台中可靠地检出低丰度的cTnI分子片段，研究者使用了相对较高浓度的cTnI样本（约1-200ng/mL）。研究结果显示，在如此宽范围浓度的样本中，不同样本间的cTnI分子片段的分布情况并未出现显著差异。因此，可以推测即使在浓度小于1ng/mL的样本中，cTnI分子片段的分布情况基本也不会出现显著差异。

本研究者无法检出低于1.4kDa的cTnI分子片段（本研究所使用的凝胶电泳仅能检出1-2kDa的蛋白）。研究者推测，如果cTnI分子片段小于30-130aa，将不会再与cTnC结合（cTnC的存在可保护cTnI免于降解）。因此，若cTnI的分子片段小于30-130aa，由于没有cTnC的保护将迅速发生降解从而在外周循环中被快速清除，最终的低分子量片段将无法被任何单抗所识别。

早期的cTnI在心肌组织中降解的体外研究结果显示，cTnI由全长分子降解为更小分子量的片段的这个过程是时间依赖性，全长分子会随时间推移逐渐降解为30-130aa左右甚至更短分子片段。基于以上发现，可认为在AMI发病早期，患者血液cTnI的主要存在形式为全长分子，然后逐渐降解为大分子量片段进而降解为包含30-110aa的小分子量片段甚至更小分子量的片段。

然而，根据本研究的最新结果来看，患者支架手术前及术后的2-36小时样本的cTnI片段存在情况并未发生显著改变，且在WB和FIA两个方法学上均得到了验证。说明在一定时间内，AMI患者血液中cTnI全长分子和分子片段并不会发生显著变化。

基于以上发现，可以推测cTnI的降解主要发生于坏死的心肌中而非患者AMI血液中。在缺血性心肌中，细胞死亡是连续发生的，一旦心肌细胞及其附属的收缩系统达到了降解的临界水平，肌丝中的cTnI及其分子片段便会被冲刷至血液当中。由于降解和冲刷平衡机制的存在，释放入血液中的全长cTnI和分子片段的比例将会在一定时间内保持不变。早期的支架手术可以使缺血心肌组织的血流恢复，同时也会阻止心肌组织的进一步坏死及cTnI的降解。然而，也仍不能排除若推迟支架手术会造成更多小分子cTnI片段释放进入血液的可能。此外，本研究所针对的患者群里仅限于AMI患者，对于其他心脏疾病的cTnI及其分子片段的分布情况仍然有待验证。

早期Madsen等人的研究认为，在再灌注的前90分钟仅能检出全长cTnI。而cTnI逐步降解为更小的分子片段则发生于支架手术后的90-120分钟。而本研究的结果则直接驳斥了上述结论。这可能是由于当初研究缺乏足够灵敏的检测系统，从而无法检出cTnI降解片段。另外，Madsen等人的后期研究发现患者血液中存在大量全长cTnI及分子片段，即使是在经皮介入治疗的50小时之后，这也间接地证实了本研究的结论。

本研究的结果显示，使用识别位点位于23-196aa区域内的抗体可以检出80%总量的cTnI，而且在AMI发病后36小时内，全长cTnI及其分子片段的比率并不会发生变化，这对于临床实践具有重要意义。尽管之前若干研究均建议cTnI抗体的识别位点应位于30-110aa，而且该区域包含了完整cTnI分子的三分之二的区域，并且是cTnI参与cTnC及cTnT的结合的主要区域。同时，大多数特异识别cTnI 50-80aa和90-130aa的抗体很难识别IC和ITC复合物。因此，识别位点位于30-110aa区域的单抗仅有少数能够用于开发cTnI试剂。而基于本研究的结果，若使用特异识别cTnI 23-40aa和140-196aa的单抗，即使采血时间相对靠后，依然可以检出70%-90%的cTnI及其分子片段。同时，识别这两个区域的单抗对自身抗体不敏感，可以很大程度上避免自身抗体造成的假阴性结果。由此可以看出，使用识别23-40aa和140-196aa的单抗可以很大程度上解决目前cTnI试剂面临的两大挑战，即cTnI蛋白水解和自身抗体造成负面干扰。

综上所述，可以得出结论：1. AMI患者血液中不仅存在cTnI全长分子，还存在11种末端部分水解的片段分子；2. 在AMI发作的36小时内，AMI患者血液中cTnI全长分子与片段分子的比率不会发生改变；3. 患者血液中cTnI最稳定的区域约为34-126aa区域；4. 识别位点位于23-196aa区域的抗体可以检出总量80%以上的cTnI；5. 使用识别23-40aa和140-196aa区域的单抗进行试剂开发，可以解决目前cTnI面临的两个主要难题，即蛋白水解和自身抗体造成的负面干扰。