



Full-Size and Partially Truncated Cardiac Troponin Complexes in the Blood of Patients with Acute Myocardial Infarction

Alexandra V. Vylegzhanina,^{1*} Alexander E. Kogan,^{1,3} Ivan A. Katrukha,^{1,2} Ekaterina V. Koshkina,⁴ Anastasia V. Bereznikova,^{1,3} Vladimir L. Filatov,^{1,3} Marina N. Bloshchitsyna,^{1,3} Agnessa P. Bogomolova,² and Alexey G. Katrukha^{1,2}

译：王楠 校对：奚苏静

急性心肌梗死患者血液中全长及部分截断的肌钙蛋白复合物

肌钙蛋白复合物是参与条纹肌和心肌收缩的重要蛋白。在心脏中，心肌肌钙蛋白复合物由心肌特异性的cTnI、cTnT和心肌/慢型骨骼肌TnC组成。当心梗发作后，坏死的心肌组织会释放肌钙蛋白复合物进入血液，cTnI和cTnT的检测目前已经被广泛使用。然而，目前血液中肌钙蛋白的存在形式仍然没有研究透彻。

Katrukha等人的研究结果显示，AMI患者血液中cTnI的主要存在形式为I-C复合物。Giuliani等人的研究也得到了类似的结果。而Wu等人的研究结果则发现，ITC三元复合物、IC二元复合物及游离cTnT均存在与外周循环中，游离cTnI则不存在。这一结论也与Bates等人的研究结果类似。

据信当AMI发作后，IC复合物和游离cTnT是血液中存在的主要形式。而HyTest的科学家在近期的研究中发现，IC复合物与ITC复合物均存在于AMI患者血液中，甚至在AMI早期ITC的比例会更高。

就游离的cTnT而言，血清不存在全长分子，这可能是由于R68-S69位点被凝血酶作用导致血清样本中仅含有29KDa的cTnT片段。而在肝素血浆中，37KDa的全长分子则是主要的cTnT形式。

理解外周循环中肌钙蛋白复合物的存在形式有助于开发鉴别诊断多种心脏疾病的检测试剂。因此，本篇研究旨在

检测AMI患者血液中肌钙蛋白复合物的存在形式。

1. 实验材料与方法：

研究中所有抗体及抗原均由HyTest提供

1.1 样本

AMI患者均由Roche cTnT检测确诊。对38例患者在胸痛发作后2-33小时内进行连续采血，共计148例样本。更多信息参见原文。

1.2 cTnI与cTnT的定量检测。

肝素锂血浆样本中的cTnI和cTnT均由HyTest内部免疫荧光检测系统测定，抗体配对分别为TnI19C7-TnI560和TnT329-TnT406。更多信息参见原文。

1.3 夹心荧光免疫检测系统。

配对为TnI19C7-TnI560（捕获41-49aa/检测83-93aa）的检测系统识别IC与ITC复合物中的cTnI；TnT329-TnT406（捕获119-138aa/检测132-152aa）检测系统识别游离cTnT与ITC复合物中的cTnT；TnI84-TnI560（捕获117-126aa/检测83-93aa）仅识别IC复合物中的cTnI；Tcom8-TnC7B9（捕获IC构象表位/检测TnC）检测系统识别IC和ITC复合物；Tcom8-TnT7E7（223-242aa）检测系统仅识别ITC复合物；此外，

Tcom8与其他TnT单抗（7G7，2A7，109，2F3和1C11）进行配对的检测系统均用于检测ITC复合物。更多信息参见原文。

1.4 凝胶过滤：具体信息请参见原文。

1.5 cTnI与cTnT的免疫亲和层析：具体信息请参见原文。

1.6 SDS-PAGE、WB与增强化学发光检测：具体信息请参见原文。

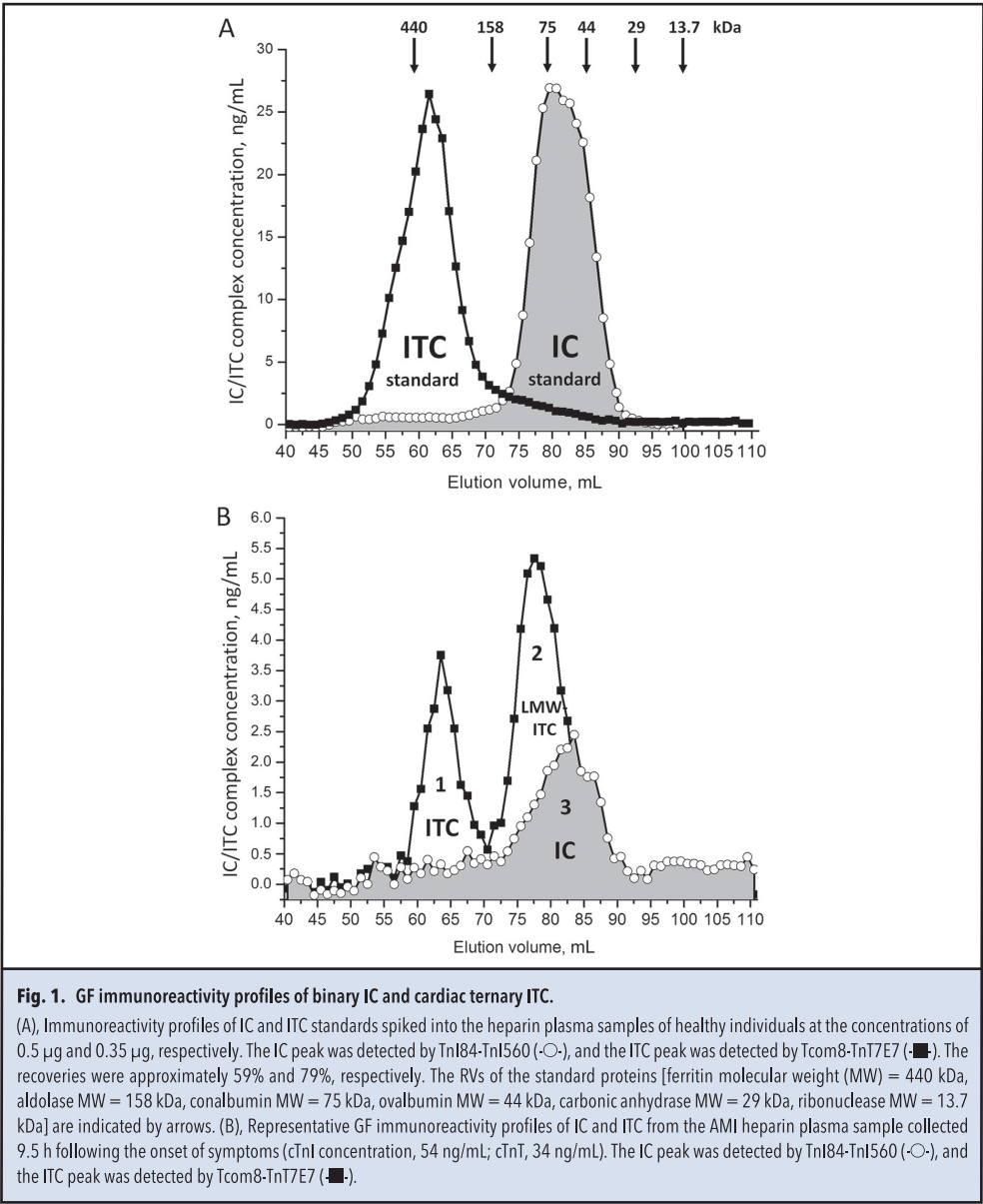
1.7 统计学分析：具体信息请参见原文。

2. 结果分析：

2.1 AMI患者血浆中肌钙蛋白复合物的凝胶过滤分析

10例肝素锂血浆样本采集自患者AMI发生后的3-30小时。之后使用凝胶过滤分析对其IC和ITC复合物进行了测定。该实验使用了两组抗体配对，分别为TnI84-TnI560（仅识别IC复合物中的cTnI）和Tcom8-TnT7E7（仅识别ITC复合物）。实验所用的对照质控为分别添加了ITC和IC复合物的健康人血浆（Fig. 1A）。

在AMI患者血浆中可以发现ITC复合物（峰1）和IC复合物（峰3），且洗脱体积与质控一致。此外，使用配对Tcom8-TnT7E7进行分析发现，所有AMI样本中均出现了另一个ITC复合物的峰（峰2）。由于该复合物的分子量比正常纯化的ITC复合物要低，因此可将该复合物定义为低分子量ITC（LMW-ITC）。



2.2 AMI患者凝胶过滤层析的ITC和IC免疫信号峰的WB分析

为了分析凝胶过滤层析的免疫信号峰值中的心肌肌钙蛋白及其片段，研究者对其进行了WB分析（Fig. 2）。

使用单抗TnT7E7（识别位点为cTnT的C末端区域）对cTnT进行染色，结果显示在最初的血浆样本中出现了三条条带，对应的分子量分别为37KDa（全长分子）、29KDa和14KDa。泳道2的检测物为第一个信号峰，即纯化的ITC复合物，WB结果显示该复合物中cTnT存在全长37KDa和片段化29KDa两种形式；泳道3的检测物为第二个信号峰，其cTnT主要为14KDa的片段及29DKa片段；泳道4的检测物为第三个信号峰，其中cTnT的拖带与第二个信号峰一样。由上述数据可以推断，第一个信号峰中的cTnT为全长分子及部分截断的片段分子，而第二个信号峰（低分子量ITC复合物）中的cTnT主要为14KDa的分子片段。

使用单抗1N1560（识别位点为cTnI的中间区域）对cTnI进行染色，结果与之前的报道基本一致。在第一个免疫信号峰中（纯化的ITC复合物），cTnI主要以29KDa（1-209aa）全长分子及27KDa（1-196aa）和26KDa（23-209aa）片段分子的形式存在；在第二个免疫信号峰中，也发现了同样的三个片段，但是27KDa和21-25KDa（34-192aa、1-178aa、34-196aa、23-196aa和26-209aa）的片段的丰度更高；在第三个免疫信号峰中（纯化的IC复合物），更小的19KDa和14KDa（23-145aa和23-126aa）的片段丰度更高。由上述结果可知，在ITC复合物和低分子量ITC复合物中，cTnI主要以全长分子和轻度降解的分子形式存在；而在IC复合物中，cTnI则主要以截断形式存在。

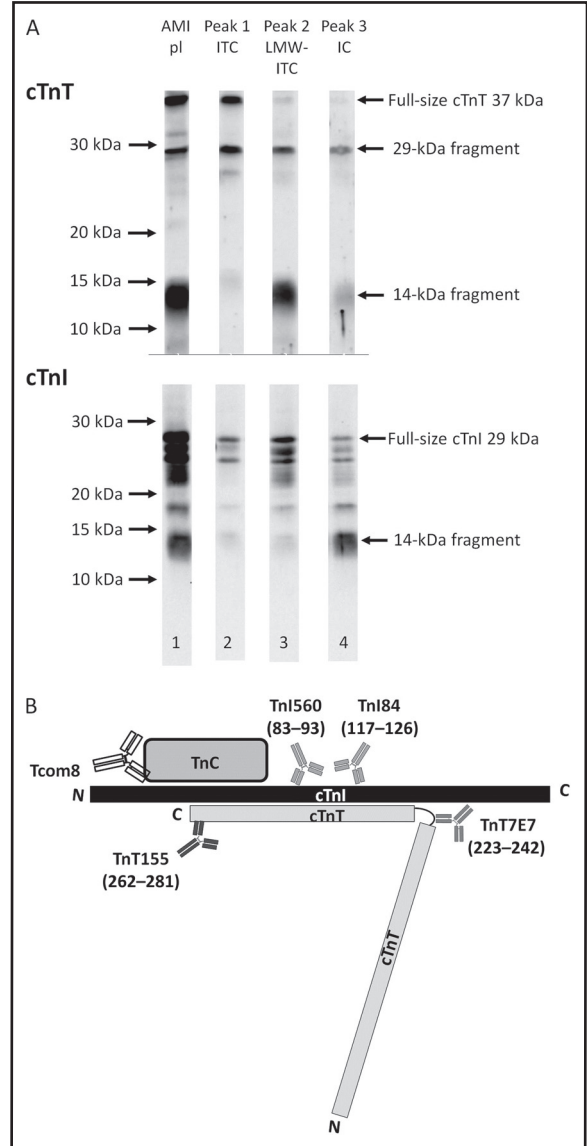


Fig. 2. WB analysis of cardiac troponins in GF immunoreactivity peaks of the AMI patient heparin plasma sample.

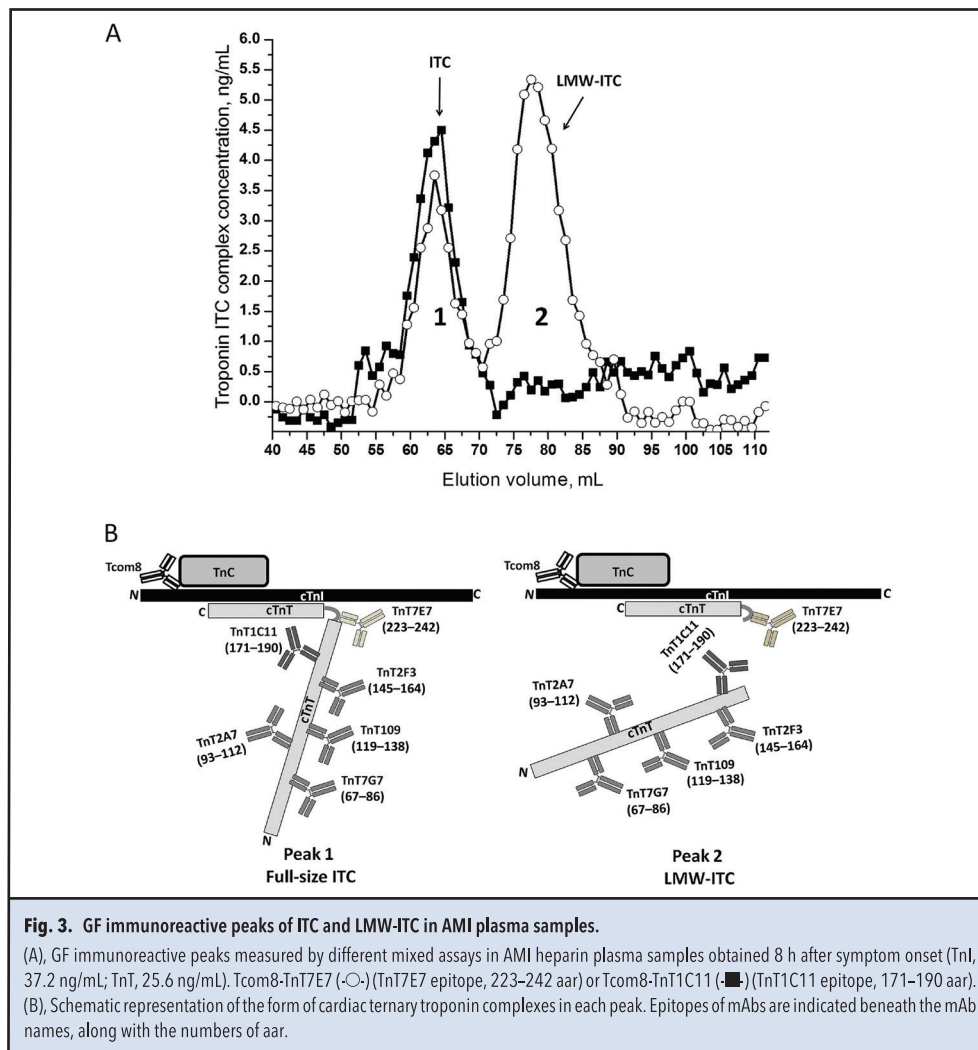
(A), WB of a heparin plasma sample obtained 9.5 h after symptom onset (cTnI concentration, 54 ng/mL; cTnT, 34 ng/mL). Proteins were immunoextracted from the original plasma sample and from pooled peaks on the mixture of anti-cTnI and anti-cTnT Sepharoses. Track 1, AMI plasma; track 2, GF fractions 59 to 65 mL of peak 1 (Fig. 1B); track 3, GF fractions 74 to 80 mL of peak 2; track 4, GF fractions 83 to 87 mL of peak 3. cTnT was stained by TnT7E7 that was specific to the C terminus of cTnT. cTnI was stained by TnI560 that was specific to a midfragment epitope. To obtain a clearer picture, different times of ECL exposure were used. (B), A schematic representation of the interaction of the used mAbs with cardiac troponin complex. The epitopes of mAbs are indicated beneath the mAb names, along with the numbers of aar.

2.3 LWM-ITC中的cTnT

为了鉴别LWM-ITC复合物中cTnT片段,该实验使用了以Tcom8为捕获抗体,TnT7G7、TnT2A7、TnT109、TnT2F3和1C11为检测抗体的混合检测系统(检测抗体的识别区域为67-190aa)对AMI患者血浆的免疫信号峰进行了分析。上述所有检测系统仅能识别全长ITC复合物,而与LWM-ITC无反应(Fig. 3);另外,仅有Tcom8-TnT7E7

可识别两种复合物。由此可知,LWM-ITC中的cTnT被酶切截断并失去了大部分的N末端多肽(截断发生区域为191-223aa)。

为了鉴别14KDa cTnT片段的C末端,研究者使用单抗TnT155(262-281aa)在WB中对其进行染色,结果为阳性。因此可以推断,LWM-ITC含有C末端的cTnT片段,且片段的序列为190-281aa。



2.4 AMI患者血浆中游离的cTnT片段

上述结果已经表明,AMI患者血浆中的LWM-ITC复合物中含有C末端的cTnT片段。因此,为了更精确的研究游离的cTnT,研究者使用了cTnI亲和层析以去除结合在复合物上的cTnT。使用凝胶过滤分别对处理前后的患者血浆进行蛋白分离,之后使用TnT329-TnT406(识别cTnT的中间区域,不识别LWM-ITC中的cTnT)对洗脱物进行分析。

在亲和层析处理前,AMI患者血浆呈现出三个免疫活

性峰(Fig. 4A),A峰与纯化的全长ITC峰一致,在对样本进行亲和层析后,该峰消失;而B峰和C峰在亲和层析后依然存在,说明这些蛋白为游离的cTnT中间区域的分子片段。此外,没有峰值与全长cTnT相匹配。

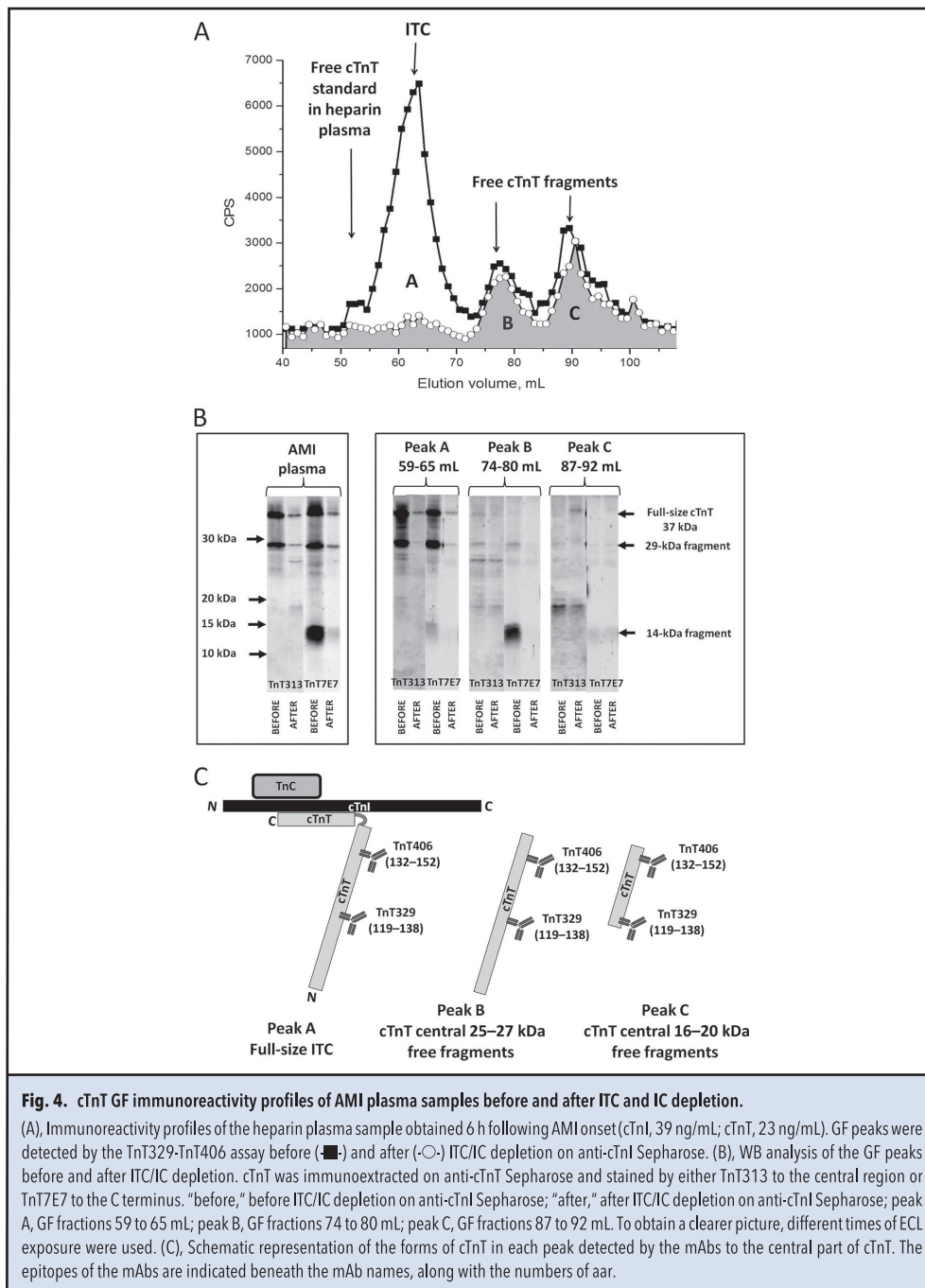
为了进一步鉴别不同免疫活性峰中的cTnT,研究者使用WB进行了进一步分析。结果显示,A峰中的cTnT为全长cTnT和29KDa的片段,因为其可以被TnT313(识别中间区域)或TnT7E7(识别C末端区域)(Fig. 4B和4C)识别。在对样本进行抗cTnI亲和层析后,全长cTnT和29KDa

片段几乎被完全清除,说明ITC复合物中的cTnT基本为全长分子和29KDa片段,而且在AMI患者血浆中基本没有游离的全长cTnT和29KDa片段。此外,在抗cTnI亲和层析后的WB结果中仍可发现残余的37KDa cTnT和29KDa片段的模糊条带,这可能是由亲和层析的效率为97%导致了少量结合了cTnI的cTnT分子残余。

使用TnT313对B峰进行染色时可发现16-25KDa的条带,且25KDa的条带最为丰富。在抗cTnI亲和层析处理后,这些条带仍然存在,说明这些条带可能是游离的

cTnT。当使用TnT7E7对B峰进行染色时,在抗cTnI亲和层析处理后,14KDa的条带消失,说明该片段可能是ITC复合物中cTnT的C末端。因此,B峰中可能存在两种cTnT,即中间区域片段和LWM-ITC中的cTnT的C末端。

C峰中的条带分子量为16-20KDa,在抗cTnI亲和层析后条带依然存在。这些蛋白可能是B峰中游离cTnT片段的进一步降解产物。因为这些降解产物仍可被TnT329-TnT406识别,因此可确定这些片段仍然保留着cTnT的中间区域。



2.5 AMI患者血浆中肌钙蛋白存在形式的时间依赖性改变

为了确认在AMI发病过程中肌钙蛋白分子形式的改变及其存在比例,研究者使用凝胶过滤的方法对5位AMI患者的早期(3-10小时)和晚期(13-30小时)血浆中的肌钙蛋白进行了分析。其中一例典型样本的结果如图5所示。

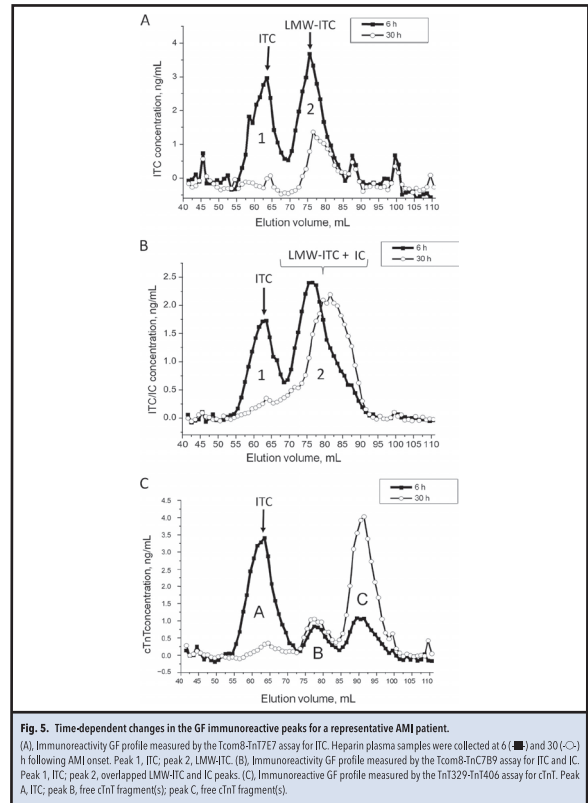
为了便于统计分析,肌钙蛋白浓度以占总量的百分比表示;早期AMI的6例样本与晚期AMI的4例样本采用了Mann-Whitney U-test进行了比较。

当使用Tcom8-TnT7E7进行分析时,结果显示,在AMI发作早期(3-10小时),全长ITC占比38.4%(17.0%-61.3%),LMW-ITC占比61.6%(38.7%-69.9%)。而在AMI发作后的晚期阶段(13-30小时),全长ITC和LMW-ITC的占比分别变为8.9%(0.1%-26.8%)和83.3%(73.2%-99.9%)。由此可见,随着AMI发作时间的推移,全长ITC的占比下降,而LMW-ITC的占比上升。

使用TnT329-TnT406对凝胶过滤的活性峰进行分析时发现,在AMI发作早期,52.3%(43.6%-

66.7%)的cTnT以全长ITC的形式存在;而在AMI发作晚期,全长形式占比仅为20.8%(5.3%-33.9%)。在B峰中,cTnT中间区域的游离片段在AMI发作早期的占比为25.6%(12.9%-35.6%),在AMI发作晚期的占比为26.3%(18.4%-28.7%)。在C峰中,cTnT中间区域的游离片段在AMI发作早期的占比为20.8%(11.7%-33.0%),在AMI发作晚期的占比为39.8%(33.3%-76.4%)。随着AMI发作时间的推移,ITC复合物的占比下降,游离cTnT中间区域的最小分子片段的占比上升。

Tcom8-TnC7B9可检测所有肌钙蛋白复合物,包括ITC、LMW-ITC及IC复合物。第二个峰呈现出的结果可能是LMW-ITC和IC的叠加。在AMI发作早期LMW-ITC占比为主,而在晚期则是IC占比为主。因此可以推断,在一些AMI晚期样本中,随着AMI发病的进行LMW-ITC会向IC进行转换。



3. 讨论

之前的研究认为AMI患者血液中心肌肌钙蛋白的存在形式以IC和游离cTnT为主。也有一些文章的研究结果显示ITC复合物也存在于患者血液中。然而,本研究发现,在外周循环中存在两种不同形式的三元复合物,分别为全长ITC复合物(全长或轻度降解的cTnI和全长cTnT及其29KDa片段)和LMW-ITC复合物(轻度降解的cTnI和起始于191到223aa的cTnT C末端片段)。此外,血液中也存在IC复合物,其中的cTnI主要为14KDa的片段。

使用识别不同肌钙蛋白亚基的抗体组成的双抗体夹心检测系统使得检测肌钙蛋白复合物成为了可能。之前的研究都是采用cTnI和cTnT单独检测,当不同亚基可在同一免疫峰中被检出时则可推断是复合物,但是这种检测方法得到的结果可能是多种蛋白的重叠。

合适的抗体选择对于肌钙蛋白复合物的检测至关重要。研究者之前使用了N末端cTnT抗体,而cTnT的N末端在血清制备过程中会被凝血酶清除。因此,使用这类抗体将不能检出血清中的ITC复合物,使得研究者推断AMI患者血液中主要的肌钙蛋白复合物仅为IC复合物。另外,Giuliani等人使用了同样的抗体也得出了类似的结论。同样的,对于LMW-ITC复合物而言,由于之前的研究者没有使用过C末端抗体进行检测,因此没有人发现LMW-ITC中的cTnT仅

为C末端片段。在本研究中，使用的样本为肝素抗凝血浆，避免了血清制备过程中凝血酶介导的cTnT降解。此外，接受了肝素治疗的患者，其血液中的cTnT也可能会受到保护免受凝血酶的降解。

本篇研究的数据显示，AMI患者血液中存在一系列的cTnT的中间区域游离片段，分子量约为16-27KDa，这些片段随着AMI病程进展出现的截断也在其他研究中有过报道。本篇研究的结果还显示，AMI患者血液不存在游离的全长cTnT和29KDa片段，这两者均以复合物的形式存在（全长ITC和LMW-ITC）。在AMI早期，ITC的浓度更高，而在AMI晚期，LMW-ITC占据主导，同时IC复合物的浓度也会升高。这也进一步证实了研究者之前的结果，即在AMI早期，肌钙蛋白主要以ITC和IC的混合形式存在，随着AMI的病程进展，两者比例逐步发生了转变。

本篇研究中没有考虑TnC，因为普遍认为TnC在复合物中是不会发生截断的。同时也没有考虑游离的全长cTnI，因为很多研究已证实AMI患者血液不存在全长cTnI。此外，所使用的样本均不含肌钙蛋白自身抗体，因为自身抗体可能会影响检测结果。

基于本篇研究所得的结果，研究者对AMI病程中ITC复合物的转换做了推断，如图6所示。首先，全长ITC会通过cTnT大部分N末端被移除的方式向LMW-ITC转变，然后LMW-ITC的cTnT C末端逐步从复合物上解离，使得LMW-ITC向IC进行转变，同时cTnI的两个末端也逐步发生截断。此外，游离的cTnT中间区域的片段也会逐步发生进一步的降解。至于上述过程是仅发生于坏死的心肌中还是也可发生于血液中，仍有待进一步证实。

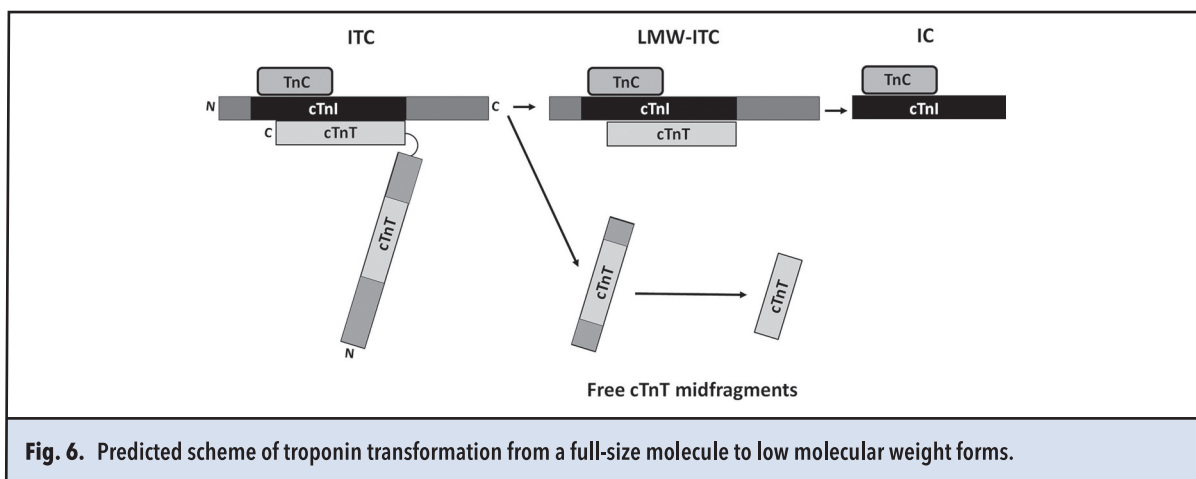


Fig. 6. Predicted scheme of troponin transformation from a full-size molecule to low molecular weight forms.

考虑到不同患者在AMI发作后入院时间的不同，诊断试剂对于不同肌钙蛋白复合物的等效识别至关重要。因此，为了能够检出所有的肌钙蛋白复合物，cTnI抗体建议选择选择在23-126aa区域内。此外，使用识别cTnI和TnC的抗体的混合检测系统也是检测复合物非常好的选择。另外，若使用cTnT进行AMI诊断，则建议选取中间区域（119-152aa），因为该区域存在于ITC复合物中，且当ITC向LMW-ITC转化时，血液中的游离片段也包含该区域。