

- 10

- 5 杨江苏,秦旭平,张娜,等. 两种真菌多糖对 HL-60 细胞酪氨酸蛋白磷酸化作用的影响. 中国药理学杂志,2000,35(5):303-305
- 6 Hubbard SR,Till JH. Protein tyrosine kinase structure and function. Annu Rev Biochem,2000,69:373-398
- 7 Hubbard SR. Protein tyrosine kinase:asutoregulation and small-molecule inhibition. Curr Opin Struct Biol,2002,12(6):735-741
- 8 杨江苏,张娜,颜卉君. 香菇多糖对 HL-60 细胞酪氨酸蛋白磷酸化作用. 长治医学院学报,2000,2:90-92
- 9 刘北忠,蒋纪恺,何於娟,等. 苦参碱诱导蛋白酪氨酸激酶与磷酸酶活性改变. 中草药,2003,34(1):48-51
- 10 李士坤,陈克河,任庆梅. 槲皮素对人食管癌 Eca-109 细胞的分化诱导作用. 中国实用医药,2007,2(36):14-15
- 11 李荣辉,王玉,郑丽红,等. 树舌多糖抑制胃癌 MGC-803 细胞增殖及对 EGFR 表达的影响. 时珍国医国药,2010,21(3):582-584
- 12 李荣辉,王玉,郑丽红,等. 树舌多糖抑制胃癌 MGC-803 细胞增殖及对 PDGFR β 表达的影响. 医学研究杂志,2009,38(11):52-

54

- 13 李勇,刘冀红,赵群,等. 大蒜素对人胃腺癌 BGC-823 细胞影响的研究. 中国中西医结合外科杂志,2001,7(5):307-310
- 14 李宝元,梁云燕,王代树. 中药白龙片与 HMBA 随人胃癌不同周期细胞癌基因与抑癌基因表达调控的共性研究. 中国中西医结合杂志,2001,21(4):286-290
- 15 Capod T, Shuba Y, Skvrma R, *et al.* Calcium signalling and cancer cell growth. Subcell biochem,2007,45:405-427
- 16 Roderick HL, Cook Sj. Ca^{2+} signalling checkpoints in cancer:remodelling Ca^{2+} for cancer cell proliferation and survival. Nat Rev cancer, 2008,8(5):361-375
- 17 高世勇,季宇彬. 羊栖菜多糖对 SGC-7901 人胃癌细胞内 Ca^{2+} 的影响. 天津中医药,2003,20(4):62-63
- 18 章国来,曾星,梅玉屏,等. 猪苓多糖对膀胱癌细胞钙离子浓度的影响. 中国临床药理学与治疗学,2001,6(3):204-206

(收稿:2010-12-30)

(修回:2011-01-26)

肌钙蛋白自身抗体的检测和临床应用

鲁彦 李晓云 李德红

肌钙蛋白是心肌损伤敏感、特异的生物学指标。肌钙蛋白(cTn)是细肌丝组成成分,CTnC 和钙离子结合,CTnT 与原肌球蛋白结合,cTnI 则抑制肌动蛋白与肌球蛋白结合,在肌肉的兴奋收缩偶联中起关键性作用。肌钙蛋白(cTnI 和 cTnT)主要位于肌肉细胞的肌质网内,小鼠心肌细胞膜上有少部分 cTnI 分布,生理条件下 cTnI 和机体免疫系统不接触。肌钙蛋白进入循环系统,暴露出的隐蔽抗原刺激免疫系统产生自身抗体(cTnI 自身抗体)。肌钙蛋白是心肌细胞重要的功能蛋白,抗肌钙蛋白自身抗体和肌钙蛋白结合对心肌细胞的功能和心脏重构将产生重大影响。由于 cTnI 同时存在于心肌细胞胞质内和细胞膜表面,因此,cTnI 自身抗体和心肌细胞表面的 cTnI 结合后诱发的变态反应能损伤心肌细胞,影响心脏功能。心肌表面没有 cTnT,因此,cTnT 自身抗体对心肌细胞不产生明显的病理学影响^[1]。

一、肌钙蛋白自身抗体的产生和病理生理学作用

正常情况下,cTnI 主要分布于细胞内,小鼠心肌细胞表面有少量 cTnI 分布,在人类心肌细胞表面没

有 cTnI 分布。cTnT 主要分布于心肌细胞内,人类和小鼠心肌细胞表面均无 cTnT。小鼠 cTnI 9 号多肽 105~122 氨基酸残基是产生 cTnI 自身抗体最强的诱导剂;11 号多肽 131~148 氨基酸残基是产生 cTnI 自身抗体次要的诱导剂。和人类的 cTnI 104~121 氨基酸残基对应。105~122 氨基酸残基能够增加炎症因子[单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、单核细胞炎性蛋白-1 α (MIP-1 α)、单核细胞炎性蛋白-1 β (MIP-1 β)、单核细胞炎性蛋白-2(MIP-2)和嗜酸性粒活化因子释放。cTnI 105~122 氨基酸形成的螺旋结构和 cTnT (226~271)形成的螺旋结构平行,二者形成螺旋形盘旋,在心肌细胞的生理学功能中具有重要作用。

cTnI 自身抗体能够降低小鼠心脏功能,增加心肌细胞 L-钙通道电流。在 4 周龄 BALB/c 雌性小鼠腹腔注射 cTnI 单克隆抗体,8 周后(12 周龄),和同龄对照组小鼠比较,实验组小鼠左心室收缩末期压和舒张末期压增加,射血分数降低;右心房压力升高。在离体 pdc1^{-/-}扩张型心肌病小鼠心室肌细胞和心房肌细胞,cTnI 单克隆抗体对心室肌和心房肌细胞膜电容没有显著影响,但能增加心房肌和心室肌细胞最大电压依赖性 L 钙电流。蛋白激酶 A 不能逆转 cTnI 单

作者单位:730030 兰州,解放军第一医院检验科(鲁彦、李晓云);730000 兰州,甘肃省人民医院检验科(李德红)

克隆抗体增加离体 $\text{pdc}1^{-/-}$ 小鼠心室肌和心房肌细胞 L-钙通道电流的作用。降低细胞外钠离子浓度也不影响 cTnI 单克隆抗体对离体 $\text{pdc}1^{-/-}$ 小鼠心室肌和心房肌细胞 L-钙通道电流的增加作用^[2]。cTnI 单克隆抗体增加离体 $\text{pdc}1^{-/-}$ 小鼠心室肌和心房肌细胞 L-钙通道电流的作用可能是 cTnI 自身抗体产生或者加重扩张性心肌病 (DCM) 的病理生理学基础之一。cTnI 自身抗体对 DCM 小鼠心肌细胞 L-钙通道电流的增加作用超过对正常小鼠心肌细胞小鼠心肌细胞 L-钙通道电流 3 倍。从人类血清中分离出来的 cTnI 自身抗体对离体 $\text{pdc}1^{-/-}$ 扩张型心肌病小鼠心室肌细胞和心房肌细胞 L-钙通道电流不产生影响,可能是人类的 cTnI 不能和小鼠 L-型钙通道蛋白质结合的原因。

二、肌钙蛋白自身抗体检测方法

目前主要通过不同的免疫学方法检测 cTnI 自身抗体,最常用的方法是酶联免疫吸附试验 (ELISA) 和化学发光法。Baba 等将日本大阪 Wako Pure Chemical 公司生产的 cTnI (50 μl , 50 mg/L) 溶解到抗原磷酸氢盐缓冲液 (含 0.5% 明胶), 包被到在日本千叶 Iwaki Glass 公司生产的 96 孔板上, 通小牛血清封闭非特异性抗原, 自制出 ELISA 试剂盒, 在舒张性心肌病患者血清中成功检出 cTnI 自身抗体^[3]。Adamczyk M 用化学发光物质吖啶基-9-氨甲酰标记小鼠抗人 IgG, 在 96 空微孔板包被重组的人类 cTnI, 自制的检测 cTnI 自身抗体化学发光仪试剂盒, 适合于大面积、灵敏检测健康人和 DCM 患者血清中 cTnI 自身抗体^[4]。国内赵士禄等利用抗人 cTnI 单克隆抗体制备的 ELISA 试剂盒, 通过酶联免疫分析仪, 能够区分正常健康人 cTnI 自身抗体和 DCM 患者 OD 值^[5]。不同方法之间灵敏性和特异性差距比较大。cTnI 自身抗体的检测缺乏金标准是制约 cTnI 自身抗体研究工作进一步开展的一个重要因素。

三、肌钙蛋白自身抗体在心脏疾病中的临床应用

1. cTnI 自身抗体和扩张型心肌病。DCM 的特点是心室扩张、心肌细胞收缩能力丧失。DCM 是造成非缺血性心肌病最重要的原因之一。动物实验表明, 大约 20% 感染柯萨奇病毒的 BALB/c 小鼠两周后 cTnI 自身抗体升高, 60% ~ 80% 小鼠 4 ~ 8 周后升高, 12 周后几乎 100% 感染柯萨奇病毒的 BALB/c 小鼠 cTnI 自身抗体均升高。但值得注意的是, cTnI 自身抗体是否出现和心肌炎的严重程度没有直接关系。感染性心肌病进展为 DCM 可能与抗肌质网和细胞膜

自身抗体的出现有关^[6]。在发展为 DCM 的细胞凋亡-1 协同受体缺陷 (programmed cell death - 1 co-receptor - deficient, PCD1RD) 小鼠血清中, 可以检测出高效价的 cTnI 自身抗体^[4]。细胞凋亡-1 协同受体属于 Ig 超家族成员, 分布于心肌细胞, 编码跨膜蛋白, 是淋巴细胞活化的负性调节剂。PCD1RD 缺陷小鼠易发展为 DCM 的主要原因可能与 PCD-1 介导的负性免疫调节有关^[4]。给 BALB/c 小鼠转染单克隆 cTnI 自身抗体, 小鼠很容易发展为 DCM, 进一步表明 cTnI 自身抗体可能和 DCM 的发展密切相关。用 cTnI 和 cTnI 免疫同时免疫小鼠, 能在小鼠血清中同时检测到抗 cTnT 和抗 cTnI 的自身抗体。但仅 cTnI 免疫的小鼠进展为 DCM^[4]。在人类, 虽然 DCM 患者体内 cTnI 自身抗体检出水平阳性率不同, 但 15.6% ~ 50% DCM 患者体内能够检测到高效价的 cTnI 自身抗体。有趣的是, 在肌营养不良 (MD) 患者血清中也可检出高水平的 cTnI 自身抗体^[6]。由于部分 MD 患者可以发展为 DCM, 更进一步说明 DCM 的发病和 cTnI 自身抗体可能高度相关。

2. cTnI 自身抗体和缺血性心肌病。缺血性心肌病 (ICM) 是国内外病死率最高的疾病之一。cTnI 自身抗体能够加重缺血性心肌病的严重程度。用小鼠的 cTnI 免疫结扎冠状动脉左前降支急性缺血性心肌病的小鼠, 能够增加心肌缺血的范围。流行病学调查表明, 近 30% ICM 患者血清 cTnI 自身抗体效价超过 1:40, 17.3% 患者 cTnI 自身抗体效价超过 1:80, 近 10% 患者 cTnI 自身抗体超过 1:80^[7,8]。相反, cTnT 自身抗体仅在 3% 左右的 ICM 患者体内升高, 并超过 1:40。cTnI 自身抗体能够预测 ICM 病死率。在不稳定性心绞痛患者体内能够检测到高效价 cTnI 自身抗体, 患者的病死率比较高。可能的原因是 cTnI 反复、持续从心肌细胞释放到血液中, 诱发了充分的免疫学反应, 导致患者病情恶化。

3. 诱导心脏炎症反应和心肌纤维化。动物实验证明 cTnI 自身抗体能够诱导心肌炎症反应和心肌纤维化。通过构建质粒的方法将小鼠 cTnI 导入小鼠体内, 产生的 cTnI 自身抗体能够增加小鼠心脏细胞钙电流, 并诱导炎症反应和心肌纤维化^[1]。cTnI 自身抗体诱导的心肌炎症反应在雌性小鼠比雄性小鼠严重, 表明 cTnI 自身抗体诱导的心肌的炎症反应与性别、基因背景关系密切^[1]。值得注意的是, 将 cTnT 转染到小鼠体内尽管也能引起强烈的体液免疫和细胞免疫, 但不产生心肌炎症反应。主要原因可能是

cTnT 主要定位于细胞质内, cTnI 不仅定位于胞质内, 也定位于细胞膜。cTnI 自身抗体和小鼠特异性 cTnI T 淋巴细胞可以结合到心肌细胞膜表面, 诱发炎症反应, 但 cTnT 自身抗体不具有这个特点。

4. 干扰缺血性心肌病的实验室检测工作: 由于 cTnI 和 cTnT 主要表达于心肌细胞质内(心肌细胞表面表达少量的 cTnI), 因此肌钙蛋白被作为特异性和敏感性比较高的生物学指标用于临床检测心肌损伤。cTnI 自身抗体能够封闭 cTnI 分子 30 ~ 110 氨基酸残基的中心稳定区域, 对 cTnI 检测产生了负性干扰^[7]。吴豫等研究表明, 在检测 13 份 cTnI 自身抗体阳性的患者血清 cTnI 时, 会出现不同程度的假性降低甚至出现假阴性结果, 最终影响 cTnI 检测和缺血性心肌病的临床诊断^[7,8]。

从 2007 年 Shmilovich 首次报道肌钙蛋白自身抗体以来, 由于 cTnI 自身抗体能够加重 DCM 和 ICM 发病, 并影响 cTnI 的检测, cTnI 自身抗体正日益受到国内外学者的重视^[9]。与 cTnI 自身抗体阴性的患者比较, cTnI 自身抗体阳性的患者心肌梗死的面积比较大, 预后比较差, 因此非选择性针对心脏 cTnI 自身抗体的治疗方案已逐步开发出来。目前主要有以下两种方法: ①静脉注射健康人免疫球蛋白减弱体液免疫, 但这种治疗方法产生的效果和安全性有待进一步观察; ②通过免疫吸附方法清除患者血清中 cTnI 自身抗体。通过免疫吸附的方法清除患者血清 cTnI 自身抗体能够改善患者心脏功能, 增加射血分数。尽管

cTnI 自身抗体在 DCM 和 ICM 等心血管患者体内普遍升高, 但 cTnI 自身抗体病理生理学作用仍然不太清楚。有关 cTnI 自身抗体的病理生理学作用、临床检测和临床治疗方面的工作有待进一步研究。

参考文献

- Goser S, Andrassy M, Buss SJ, *et al.* Cardiac troponin i but not cardiac troponin t induces severe autoimmune inflammation in the myocardium. *Circulation*, 2006, 114(16): 1693 - 1702
- Okazaki T, Tanaka Y, Nishio R, *et al.* Autoantibodies against cardiac troponin i are responsible for dilated cardiomyopathy in pd - 1 - deficient mice. *Nat Med*, 2003, 9(12): 1477 - 1483
- Baba A: Autoantigen estimation and simple screening assay against cardiodepressant autoantibodies in patients with dilated cardiomyopathy. *Ther Apher Dial*, 2008, 12(2): 109 - 116
- Adameczyk M, Brashear RJ, Mattingly PG. Prevalence of autoantibodies to cardiac troponin t in healthy blood donors. *Clin Chem*, 2009, 55(8): 1592 - 1593
- 赵士禄. 肥厚型心肌病患者临床资料分析及抗心肌肌钙蛋白 I 自身抗体检测. 南京医科大学, 2008
- Jahns R, Boivin V, Schwarzbach V, *et al.* Pathological autoantibodies in cardiomyopathy. *Autoimmunity*, 2008, 41(6): 454 - 461
- Eriksson S, Halenius H, Pulkki K, *et al.* Negative interference in cardiac troponin i immunoassays by circulating troponin autoantibodies. *Clin Chem*, 2005, 51(5): 839 - 847
- 吴豫. 循环心肌肌钙蛋白 I 自身抗体检测及对常用肌钙蛋白 I 检测系统负性干扰评估. 硕士论文, 第二军医大学, 2008
- Shmilovich H, Danon A, Binah O, *et al.* Autoantibodies to cardiac troponin i in patients with idiopathic dilated and ischemic cardiomyopathy. *Int J Cardiol*, 2007, 117(2): 198 - 203

(收稿: 2010 - 11 - 22)

(上接第 138 页)

的妊娠妇女发展至 GDM 的危险性是低水平 CRP 者的 3.5 倍^[9]。因此认为, 血清 CRP 水平与 GDM 呈正相关, CRP 可作为 GDM 的独立预测因子。本研究也证实, 妊娠期糖尿病患者的炎症标志物 CRP 明显升高, 与既往研究结果一致。

最后, 由于本研究的样本量较少, 人群分布局限, 且作为一个横断面研究, 本身可能存在一定的局限性, 故需要更大样本量的研究以及多中心的前瞻性的临床研究来进一步证实。

参考文献

- Lambrinoudaki I, Vlachou SA, Creatsas G. Genetics in gestational diabetes mellitus: association with incidence, severity, pregnancy outcome and response to treatment. *Curr Diabetes Rev*, 2010, 6(6): 393 - 399
- Leipold H, Worda C, Gruber CJ, *et al.* Gestational diabetes mellitus is associated with increased C - reactive protein concentrations in the third but not second trimester. *Eur J Clin Invest*, 2005, 35(12): 752 - 757
- Solomon TP, Haus JM, Li Y, *et al.* Progressive hyperglycemia across the

glucose tolerance continuum in older obese adults is related to skeletal muscle capillarization and nitric oxide bioavailability. *J Clin Endocrinol Metab*, 2011, 96(5): 1377 - 1384

- American diabetes association. Standards of medical care in diabetes - 2010. *Diabetes Care*, 2010, 33(1): S11 - S61
- Kurtbas H, Keskin HL, Avsar AF. Effectiveness of screening for gestational diabetes during the late gestational period among pregnant Turkish women. *J Obstet Gynaecol Res*, 2011, 37(6): 520 - 526
- Rocha EE, Alves VG, Da Fonseca RB, *et al.* Indirect calorimetry: methodology, instruments and clinical application. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2006, 9(3): 247 - 256
- Jia WP, Yang M, Shao XY, *et al.* Resting energy expenditure and its relationship with patterns of obesity and visceral fat area in Chinese adults. *Biomed Environ Sci*, 2005, 18(2): 103 - 107
- Heldgaard PE, Henriksen JE, Sidelmann JJ, *et al.* Similar cardiovascular risk factor profile in screen - detected and known type 2 diabetic subjects. *Scand J Prim Health Care*, 2011, 29(2): 85 - 91
- Pöyhönen - Alho M, Ebeling P, Saarinen A, *et al.* Decreased variation of inflammatory markers in gestational diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*, 2011, 27(3): 269 - 276

(收稿: 2011 - 04 - 08)

(修回: 2011 - 04 - 12)