

• 论 著 • DOI:10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2018. 13. 014

慢性自发性荨麻疹抗 IgE 高亲和力受体自身抗体检测方法研究

徐 婷, 易中梅, 罗军梅, 张 强, 孟 强, 喻荷莲, 王世春, 蒋天伦[△]
(陆军军医大学第一附属医院输血科, 重庆 400038)

摘 要:目的 通过噬菌体展示技术制备人 FcεRIα 的 scFv 片段并建立抗人 FcεRIα 自身抗体的检测方法, 为慢性自发性荨麻疹的临床治疗提供有效的诊断依据。**方法** 通过噬菌体抗体库筛选技术, 筛选得到携带目标 scFv 片段的噬菌体并进行富集; 通过测序分析确定阳性克隆, 并将其进行大量表达和纯化; 利用 scFv 片段构建抗人 FcεRIα 自身抗体的检测方法。**结果** 通过噬菌体展示技术筛选富集得到 12 个与抗人 FcεRIα 抗体结合的噬菌体阳性克隆; 经测序分析及酶联免疫吸附试验(ELISA)鉴定后选择 A20 转化到表达菌株中大量表达; 利用表达获得的 scFv 片段构建抗人 FcεRIα 自身抗体的检测方法并采用受试者工作特征(ROC)曲线分析, 确定该方法的临界(cut off)值为 0. 635, 其灵敏度及特异度分别为 96. 7% 和 100. 0%。**结论** 成功构建人血清中抗人 FcεRIα 自身抗体的检测方法, 为后续临床研究提供了有利的理论基础。

关键词:慢性自发性荨麻疹; 抗 FcεRIα 自身抗体; 酶联免疫吸附试验
中图法分类号:R392. 8 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2018)13-1913-04

Study on detection of autoantibodies against IgE high affinity receptor in chronic spontaneous urticaria
XU Ting, YI Zhongmei, LUO Junmei, ZHANG Qiang, MENG Qiang,
YU Helian, WANG Shichun, JIANG Tianlun[△]
(Department of Blood Transfusion, Southwest Hospital, Army Military
Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To establish the detection method of anti-human FcεRIα autoantibody, we obtained the scFv fragment of FcεRIα by phage display. It provided an effective diagnostic method for chronic spontaneous urticaria in clinical. **Methods** The target scFv fragments was selected and enriched by phage antibody library. The positive clones were determined by sequencing analysis and expressed in ER2766. scFv fragment was used to construct the detection of anti-human FcεRIα autoantibodies. **Results** A total of 12 phage positive clones were obtained and enriched by the phage display. The A20 was converted to ER2766 and the expression product was used to construct the detection of anti-human FcεRIα antibody. The ROC analysis was indicated that the cut off value was 0. 635, and its sensitivity and specificity were 96. 7% and 100. 0%, respectively. **Conclusion** It provided a power tool for screening the anti-human FcεRIα autoantibodies in clinical research.

Key words: chronic spontaneous urticaria; anti-FcεRIα autoantibody; ELISA

慢性自发性荨麻疹(CSU)是一种常见易复发的皮肤疾病,在任何年龄段均可发生,其临床症状表现为反复发作的水肿性红斑、风团,常伴剧烈瘙痒,给患者的日常生活造成了严重影响^[1-3]。然而,这类荨麻疹的发生却难以找到确切的病因或诱发因素,这为 CSU 的临床治疗带来了不便和困难^[4-6]。现有的研究表明,CSU 的发生与抗人 IgE 高亲和力受体(FcεRIα)自身抗体存在密切的关系,但在临床上却未开展对该自身抗体的检测^[7-9]。因此,本研究通过噬菌体展示技术制备人 FcεRIα 的单链抗体(scFv)并建立抗人 FcεRIα 自身抗体的快速检测方法,为慢性自发性荨麻疹的临床治疗提供有效的诊断依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器 噬菌体随机线性 12 肽库(Ph. D. TM-12 Phage Display Peptide Library),其滴度为 1.0×10¹³ 噬菌斑形成单位(pfu)/mL;大肠杆菌 E. coli ER2738、ER2766;测序引物(-96 g III sequencing primer)序列为 5'-CCC TCA TAG TTA GCG TAA CG-3',均购自美国 New England Biolabs 公司;抗人 FcεRIα 抗体、HRP 标记的山羊抗人 IgG 均购自英国 Abcam 公司;噬菌体单链 DNA 提取试剂盒购自美国 Axygen 公司;Superdex 75 层析柱购自美国 GE Healthcare 公司;3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)显色试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。

台式高速离心机购自德国 Sorval 公司;Biologic LP 层析系统购自美国 Bio-Rad 公司;Hofer MV-25 紫外透射仪购自美国 Amersham Pharmacia 公司;Multiskan MK3 酶标仪购自美国 Thermo 公司;VT-1300L 超净工作台购自成都苏净科学器材有限公司;恒温培养箱购自上海博泰科学器材有限公司。

1.2 方法

1.2.1 标本收集 本研究经本院伦理学委员会批准,患者知情同意,从本院收集健康者和 CSU 患者标本各 30 例。CSU 患者入组前需接受自体血清(50 μ L)注射测试,以 0.1 mg/mL 的组胺和 0.9% 的生理盐水分别为阳性和阴性对照。注射 30 min 内,若风团直径>1.5 mm 者为阳性反应,方可入组。若风团直径 $\leq$ 1.5 mm 者为阴性反应,不可入组。

1.2.2 scFv 的生物淘选 在 96 孔板中加入 50 μ g/mL 抗人 Fc ϵ RI 抗体溶液于 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜 $\rightarrow$ 加入封闭液于 4 $^{\circ}$ C 孵育 2 h $\rightarrow$ TBST 洗涤 $\rightarrow$ 加入 2×10^{11} pfu 噬菌体溶液于室温孵育 1 h $\rightarrow$ TBST 洗涤 $\rightarrow$ 加入洗脱液(0.2 mol/L, pH2.2, Glycine-HCl)及中和液(1 mol/L, pH9.1, Tris-HCl) $\rightarrow$ 取 1 μ L 测滴度并将剩余液体扩增 $\rightarrow$ 扩增液于 4 $^{\circ}$ C 12 000 $\times$ g 离心 10 min $\rightarrow$ 取 80% 上清液至新管中,加入 1/6 体积的 2.5 mol/L、NaCl/20% PEG-8000(w/v)于 4 $^{\circ}$ C 静置过夜 $\rightarrow$ 次日于 4 $^{\circ}$ C 12 000 $\times$ g 离心 15 min,去上清液 $\rightarrow$ 1 mL TBS 重悬沉淀,重复离心 1 次 $\rightarrow$ 取上清液至新管中并加入 1/6 体积的 PEG/NaCl 冰浴 1 h $\rightarrow$ 4 $^{\circ}$ C 12 000 $\times$ g 离心 10 min,去上清液 $\rightarrow$ 用含 0.01% NaN₃ 的 TBS 重悬沉淀 $\rightarrow$ 取 1 μ L 测滴度,剩余液体用于下轮筛选。三轮筛选后,在菌斑数<100 的平板上随机挑取 48 个分隔良好的噬菌斑按 1.2.3 的方法进行扩增。

1.2.3 噬菌体的扩增 将 ER2738 的过夜培养物用 LB 培养基进行 1:100 稀释,按每管 1 mL 分装于 50 mL 的培养管中。用无菌牙签蘸取 48 个分隔良好的蓝色噬菌斑分别放入上述培养管中,37 $^{\circ}$ C 剧烈振荡培养 4.5 h。将扩增好的噬菌体液体倒入离心管中,12 000 $\times$ g 离心 1 min,重复 1 次。取 80% 的上清液于新离心管中,即为扩增的噬菌体液体。

1.2.4 噬菌体阳性克隆的选择 将噬菌体抗体加入 96 孔板中,加入 2 倍体积的封闭液(5 mg/L BSA)混匀,于室温静置 30 min。取 100 μ L 加入已包被抗人 Fc ϵ RI α 抗体的板条中,加底物 TMB 溶液显色 15 min,以 2 mol/L H₂SO₄ 终止反应,于波长 450 nm 下测定吸光值(A 值)。设立 1% BSA 的包被孔为阴性对照,以 A₄₅₀ 值高于阴性对照 2 倍以上为阳性克隆。

1.2.5 scFv 序列测定 将阳性克隆扩增培养后,按照噬菌体单链 DNA 提取试剂盒的操作说明进行操

作,提取阳性克隆的 DNA,采用 1.1 中的测序引物送上海生工公司测序。

1.2.6 scFv 的制备和纯化 将阳性克隆转化到表达菌株 ER2766 中大量表达,通过 Biologic LP 层析系统对 scFv 进行纯化并进行酶联免疫吸附试验(ELISA)鉴定。

1.2.7 抗人 Fc ϵ RI α 自身抗体的检测 将 scFv 50 ng/mL 100 μ L 包被于 ELISA 板上,4 $^{\circ}$ C 过夜并封闭,于板孔中加入 1:100 稀释的健康者和患者血清标本,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min;加入 HRP 标记的山羊抗人 IgG(1:1 000),37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min;洗板后,每孔加入 TMB 显色液 100 μ L,于 37 $^{\circ}$ C 避光显色 20 min,加入 50 μ L H₂SO₄(2 mol/L),于 20 min 内测定 A 值。

1.2.8 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件进行统计学分析,通过受试者工作特征(ROC)曲线确定检测的临界(cut off)值、特异度及灵敏度。

2 结果

2.1 噬菌体 12 肽库的生物淘选结果 通过噬菌体抗体库筛选技术,不但可以将目标分子从库中准确筛选得到,而且通过 3 轮扩增可以将目标分子进行富集。从表 1 可以看到,随着淘选轮数的增加,噬菌体产量也在增加,这说明与抗人 Fc ϵ RI α 抗体结合的噬菌体得到了富集。

表 1 噬菌体 12 肽库的生物淘选结果(pfu)		
淘选次数	加入噬菌体量	洗脱噬菌体量
第 1 轮	2.00×10^{11}	4.80×10^6
第 2 轮	2.00×10^{11}	6.11×10^7
第 3 轮	2.00×10^{11}	5.65×10^8

2.2 噬菌体阳性克隆的检测 随机挑取 48 个分隔良好的蓝色噬菌斑,并依次编号进行扩增纯化后,通过 ELISA 检测筛选得到 12 个阳性克隆,具体结果见图 1。

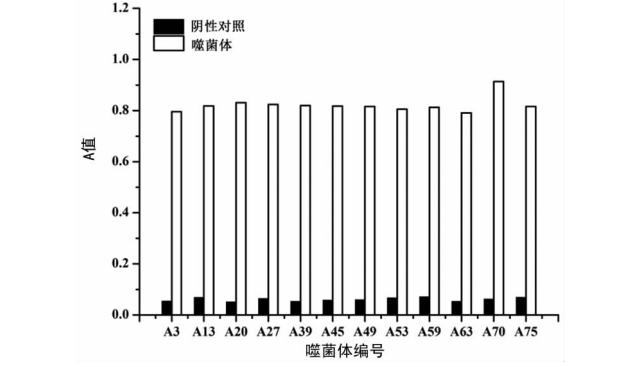


图 1 噬菌体阳性克隆 ELISA 结果

2.3 筛选肽的序列分析 按试剂盒说明书提取上述 12 个阳性噬菌体的 ssDNA,用-96 g III 测序引物进行测序,其中 7 个克隆的序列与抗人 Fc ϵ RI α 自身抗体的结合表位一致。

2.4 表达克隆的选择 将上述克隆分别转入表达菌株中进行表达,并将纯化后的 scFv 片段加入已包被抗人 FcεRIα 抗体的板条中进行 ELISA 检测。从图 2 中可知,A20 的 A 值最高,说明它与抗人 FcεRIα 抗体的结合力最强,故选定 A20 为表达克隆。

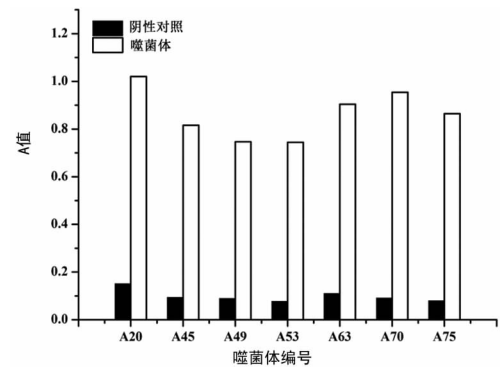


图2 噬菌体阳性克隆 ELISA 结果

2.5 抗人 FcεRIα 自身抗体的检测 将 A20 转化到表达菌株中大量表达纯化后,将 scFv 片段包被于 ELISA 板上测定健康者和 CSU 患者血清中的抗人 FcεRIα 自身抗体,结果见图 3。

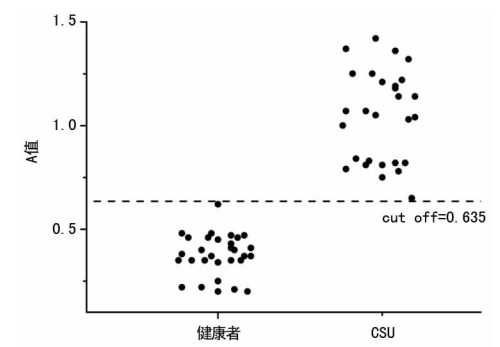


图3 检测抗人 FcεRIα 自身抗体结果

2.6 ROC 曲线分析 将 CSU 患者的 ELISA 检测值作 ROC 曲线分析发现,当 A 值为 0.635 时,该检测方法的灵敏度为 96.7%,特异度为 100.0%,见图 4。

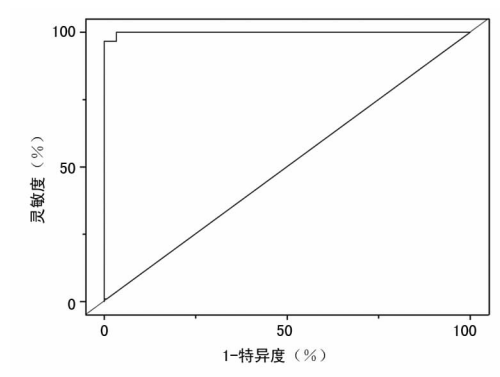


图4 ROC 曲线分析结果

3 讨 论

CSU 给患者的日常生活质量造成了严重的影响,但至今对其发病机制仍不清楚,并且难以找到确切的病因或诱发因素,从而加大了临床治疗的难度^[10-11]。

传统的研究认为荨麻疹的发生是属于 I 型变态反应,与 IgE 介导的肥大细胞及嗜碱性粒细胞活化,进而释放组胺、白三烯等活性物质有关。肥大细胞是 IgE 介导的超敏反应的主要效应细胞。在荨麻疹疾病中,活化的肥大细胞主要通过释放组胺及多种细胞因子和趋化因子来发挥作用^[12]。然而,这种发病机制多见于急性荨麻疹,少见慢性荨麻疹。

在部分慢性荨麻疹患者皮内注射自体血清后,注射部位周围可出现红斑和风团。由此表明,其血清中可能存在某些自身抗体能活化肥大细胞,从而释放活性物质,导致 CSU 的发生。这一研究发现提示具有功能性的自身抗体与 CSU 的发病存在着密切的关系^[13-14]。随着研究的不断深入,在 CSU 患者血清中纯化的 IgG 片段可以在体外诱导组胺的释放,并且这类 IgG 抗体主要是针对 IgE 高亲和力受体 α 链 (FcεRIα) 的自身抗体,从而证实当 IgG-抗 FcεRI 和 IgG-抗 IgE 结合 FcεRI 或 IgE 后通过激活补体 C5a 促使肥大细胞脱颗粒并释放组胺,导致荨麻疹的发生^[15]。因此,抗 FcεRIα 自身抗体的诊断对 CSU 在临床治疗过程中具有重要的指导意义。

目前,国内在临床上尚未出现抗 FcεRIα 自身抗体的商品化诊断试剂盒,严重影响了由抗人 FcεRIα 自身抗体所引起的此类疾病的诊断^[16]。而现有的研究多数是先通过原核表达的方法获取 FcεRIα 蛋白,然后构建 ELISA 检测的方法,但是由于原核表达技术多表达的是全长蛋白,在 ELISA 检测过程中存在一定的交叉反应,从而使该检测方法的特异性达不到预期^[17]。本研究采用噬菌体抗体库技术通过 3 轮“吸附-洗脱-扩增”来大量富集特异性克隆从而获得人 FcεRIα 的单链抗体。该单链抗体属于全人源性抗体,通过对其序列分析及氨基酸残基的优化能明显提高抗体的亲和力,而且获取过程简便、高效。另外,从本研究结果中可以看出,利用 scFv 来构建的抗 FcεRIα 自身抗体 ELISA 检测的方法,其特异度及灵敏度均较高,为抗 FcεRIα 自身抗体在临床上的诊断提供了可靠的理论依据。

参考文献

[1] SAINI S S. Chronic spontaneous urticaria etiology and pathogenesis[J]. Immunol Allergy Clin North Am, 2014, 34(1):33-52.

[2] ABAJIAN M, SCHOEPKE N, ALTRICHTER S, et al. Physical urticarias and cholinergic urticaria[J]. Immunol Allergy Clin North Am, 2014, 34(1):73-88.

[3] WANG D Y, GHOSH A G, BIN ABDUL MUTTA-LIF A R, et al. Quality of life and economic burden of respiratory disease in Asia-Pacific-Asia-Pacific burden of respiratory diseases study[J]. Value Health Reg Issues,

- 2016,9:72-77.
- [4] ZUBERBIER T. A summary of the new international EAA-CI/GA2LEN/EDF/WAO guidelines in urticaria[J]. World Allergy Organ J, 2012, 5(Suppl 1): S1-S5.
 - [5] MAURER M, MAGERL M, METZ M, et al. Revisions to the international guidelines on the diagnosis and therapy of chronic urticaria[J]. J Dtsch Dermatol Ges, 2013, 11(10): 971-978.
 - [6] SORIA A, FRANCÈS C. Urticaria: diagnosis and treatment[J]. La Revue de Medecine Interne, 2014, 35(9): 586-594.
 - [7] LIU F, XU L B, CHEN N Z, et al. Neuronal Fc-epsilon receptor 1 contributes to antigen-evoked pruritus in a murine model of ocular allergy[J]. Brain Behav Immun, 2017, 61(16): 165-175.
 - [8] CRUSE G, YIN Y Z, FUKUYAMA T, et al. Exon skipping of FcεRIβ eliminates expression of the high-affinity IgE receptor in mast cells with therapeutic potential for allergy[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016, 113(49): 14115-14120.
 - [9] HONG J Y, BAE J H, LEE K E, et al. Antibody to FcεRIα suppresses immunoglobulin E binding to high-affinity receptor 1 in allergic inflammation[J]. Yonsei Med J, 2016, 57(6): 1412-1419.
 - [10] FRASER K, ROBERTSON L. Chronic urticaria and autoimmunity[J]. Skin Therapy Lett, 2013, 18(7): 5-9.
 - [11] KOLKHIR P, CHURCH M K, WELLER K, et al. Auto-immune chronic spontaneous urticaria: what we know and what we do not know[J]. J Allergy Clin Immunol, 2017, 139(6): 1772-1781.
 - [12] DARLENSKI R, KAZANDJIEVA J, ZUBERBIER T, et al. Chronic urticaria as a systemic disease[J]. Clin Dermatol, 2014, 32(3): 420-423.
 - [13] YADAV S, KANWAR A, PARSAD D, et al. Chronic idiopathic urticaria and thyroid autoimmunity: perplexing association[J]. Indian J Dermatol, 2013, 58(4): 325.
 - [14] CHO C B, STUTES S A, ALTRICH M L, et al. Autoantibodies in chronic idiopathic urticaria and nonurticarial systemic autoimmune disorders[J]. Ann Allergy Asthma Immunol, 2013, 110(1): 29-33.
 - [15] SHIN Y S, SUH D H, YANG E M, et al. Serum specific IgE to thyroid peroxidase activates basophils in aspirin intolerant urticaria[J]. J Korean Med Sci, 2015, 30(6): 705-709.
 - [16] KONSTANTINOU G N, ASERO R, FERRER M, et al. EAACI taskforce position paper: evidence for autoimmune urticaria and proposal for defining diagnostic criteria[J]. Allergy, 2013, 68(1): 27-36.
 - [17] LEE M F, LIN T M, LIU S W, et al. A rapid method of detecting autoantibody against FcεRIα for chronic spontaneous urticaria[J]. PLoS One, 2014, 9(10): e109565.

(收稿日期: 2018-01-10 修回日期: 2018-05-02)

(上接第 1912 页)

- [J]. Chin J Chancer Prev Freat, 2014, 21(19): 1548-1552.
- [3] 谢勇, 王君辅, 李红浪. 腹腔镜结肠癌手术中行完整结肠系膜切除研究进展[J]. 中国实用外科杂志, 2014, 34(3): 276-278.
- [4] 何毅, 张鸿, 何东生. 腹腔镜根治术与传统开腹手术治疗结肠癌的临床效果对比分析[J]. 科技通报, 2017, 33(3): 81-84.
- [5] 王文韬, 冯勇. 腹腔镜与开腹结肠癌完整结肠系膜切除术比较 Meta 分析[J]. 中国实用外科杂志, 2015, 35(1): 79-85.
- [6] 雷海锋, 刘安选. 完整结肠系膜切除在结肠癌手术治疗中的应用研究[J]. 临床急诊杂志, 2015, 16(4): 272-274.
- [7] 杨卫华, 高慷, 张松柏. 全结肠系膜切除术在腹腔镜辅助右半结肠癌根治术中的应用[J]. 中国微创外科杂志, 2015, 15(4): 318-320.
- [8] 莫波, 马娟, 郝志楠, 等. 结肠癌应用腹腔镜以及开腹手术治疗对机体免疫功能的影响比较[J]. 中国内镜杂志, 2016, 22(6): 24-26.
- [9] HAN L, LIU L, WANG H. Comparison of different operation routes of laparoscopic right hemicolectomy[J]. Aeta Med Univ Sci Techonl Huazhong, 2015, 44(4): 464-467.
- [10] 计小静, 郝济伟, 张庆红, 等. 胰高血糖素样肽-1 的神经内分泌效应研究进展[J]. 生理科学进展, 2016, 47(6): 467-472.
- [11] 王勇, 傅赞, 封益飞, 等. 腹腔镜完整结肠系膜切除(CME)治疗局部晚期右半结肠癌的临床疗效[J]. 中国地方病防治杂志, 2016, 31(11): 1302-1303.
- [12] ZENG H H, FU W. Laparoscopic surgery for rectal cancer: overseas current status and future perspective[J]. Chin J Min Inv Surg, 2016, 16(7): 650-655.
- [13] 孔磊, 孙景武, 张彩虹. 腹腔镜与开腹结肠癌根治术对患者术后近期生命质量的影响[J]. 中国内镜杂志, 2014, 20(5): 536-539.
- [14] 孙学军, 郑见宝. 腹腔镜结直肠癌手术治疗研究进展[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2016, 37(5): 613-621.
- [15] 薛刚, 周均, 曹永宽, 等. 血清结肠癌特异性抗原-2 检测在结直肠癌随访和预后判断中的应用[J]. 重庆医科大学学报, 2014, 39(3): 354-357.
- [16] 孙常铭, 王丽萍, 刘敏, 等. 血清中期因子联合癌胚抗原检测对非小细胞肺癌的诊断价值[J]. 广东医学, 2015, 36(5): 768-769.
- [17] 杨静红, 倪东京. 结肠癌浸润 T 淋巴细胞亚群的临床意义[J]. 免疫学杂志, 2014, 30(3): 270-273.
- [18] 鲍文华, 梁建合, 李树民, 等. Th17 细胞和 IL-23/IL-17 轴在肺纤维化大鼠肺组织动态表达的意义[J]. 医学研究生学报, 2014, 27(3): 240-244.

(收稿日期: 2018-02-26 修回日期: 2018-05-07)