



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103116028 B

(45) 授权公告日 2015. 04. 08

(21) 申请号 201110366184. X

(22) 申请日 2011. 11. 17

(73) 专利权人 上海市公共卫生临床中心
地址 201508 上海市金山区漕廊公路 2901
号

(72) 发明人 张丽军 袁正宏 马芳 贾小芳
姚亚敏 刘晓茜

(74) 专利代理机构 上海元一成知识产权代理事
务所(普通合伙) 31268
代理人 吴桂琴

(51) Int. Cl.
G01N 33/68(2006. 01)

审查员 李进进

权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

膜联蛋白 A3 在检测酒精性肝纤维化中的用
途

(57) 摘要

本发明属于生物技术领域,涉及膜联蛋白 A3 在检测酒精性肝纤维化中的用途。本发明通过筛选在酒精性肝纤维化和正常肝脏的肝非实质细胞中存在差异表达的蛋白,获得在酒精性肝纤维化的肝非实质细胞中低表达的蛋白质——膜联蛋白 A3 (ANXA3),经免疫印迹实验进一步证实了所述 ANXA3 在酒精性肝纤维化的肝非实质细胞中有较低的表达水平。实验结果证实,所述的膜联蛋白 A3 可作为分子标志用作检测酒精性肝纤维化;所述的膜联蛋白 A3 的特异性的抗体,包括单克隆抗体和多克隆抗体,可用于制备检测酒精性肝纤维化制剂;所述的抗膜联蛋白 A3 的抗体,包括单克隆抗体和多克隆抗体,可用于制备检测酒精性肝纤维化试剂盒。

1. 膜联蛋白 A3 在制备作为酒精性肝纤维化的分子标志中的用途。
2. 膜联蛋白 A3 的特异性的抗体在制备检测酒精性肝纤维化制剂中的用途。
3. 按权利要求 2 所述的用途,其特征在于,所述的特异性的抗体包括单克隆抗体和多克隆抗体。
4. 抗膜联蛋白 A3 的抗体在制备检测酒精性肝纤维化试剂盒中的用途。
5. 按权利要求 4 所述的用途,其特征在于,所述的抗膜联蛋白 A3 的抗体包括单克隆抗体和多克隆抗体。

膜联蛋白 A3 在检测酒精性肝纤维化中的用途

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,涉及膜联蛋白 A3 在检测酒精性肝纤维化中的用途,具体涉及膜联蛋白 A3 作为检测酒精性肝纤维化分子标志的用途。

背景技术

[0002] 现代医学研究发现,酒精性肝纤维化表现为肝脏内的慢性炎症及进行性肝组织纤维化,随着病程的进展会导致酒精性肝纤维化,是长期酗酒患者死亡的主要原因。有统计显示,酗酒(酒精滥用和酒精依赖)已经成为当今世界一个重要的公共卫生问题;在美国,67%的成年人有饮酒习惯,7.4%的成年人酗酒,每年大约有 10 万人死于酗酒;而在我国,随着人们生活水平的提高和社交的日益频繁,酒精性肝纤维化的发病率逐年增加,严重威胁国人的健康;同时,酒精性肝纤维化患者的预后不容乐观,4~5 年存活率仍然很低。

[0003] 酒精诱导的肝损伤是引起肝纤维化的一个重要原因,虽然肝纤维化的临床表现目前已归类较为清晰明确,但其早期诊断率,特别是酒精性肝纤维化发生早期阶段的诊断仍有待提高。

[0004] 目前,关于酒精因素是如何诱发肝纤维化的过程,最终导致肝纤维化发生,其中的分子机制研究尚很缺乏。现已有研究表明,酒精能导致肝细胞膜、线粒体和细胞核的变化。酒精能引起肝细胞膜通透性的改变,使细胞膜的透性增加,同时导致细胞膜结构上的缺陷(Molleken, Sitek et al. 2009),且酒精还能导致细胞表面的磷脂总量增加,引起细胞表面电荷密度升高和脂质过氧化物酶体的增多(Szachowicz-Petelska, Dobrzynska et al. 2008)。当前还有研究发现,酒精还能通过激活 caspase-9 和 caspase-3 途径来启动细胞的凋亡(Dan, Popov et al. 2005)。因此,酒精影响肝细胞的机制是非常复杂的,需要利用高通量的办法寻找在酒精性肝纤维化发生、发展过程中的标志分子,从而为深入阐述酒精性肝纤维化的发病机制,最终筛选和开发以治疗和诊断为目的的酒精性肝纤维化相关差异表达的基因或/和蛋白质,本领域迫切需要新的在酒精性肝纤维化中差异表达的基因或/和蛋白质。

[0005] 膜联蛋白 A3 SwissProt 的登录号为 ANXA3_RAT,细胞质膜上有分布,其为膜联蛋白家族成员之一(参见 http://myhits.vital-it.ch/cgi-bin/view_seq_entry?name=sw:ANXA3_RAT&view_sw=UniProt);该蛋白家族在细胞生长和信号转导方面发挥调节作用。所述的膜联蛋白 A3 的功能在于抑制磷脂酶 A3 裂解成肌醇 1,2-循环磷酸盐和 1-磷酸肌醇,同时在抗凝血方面也发挥作用。

[0006] 迄今为止,尚未见有关膜联蛋白 A3 与酒精性肝纤维化直接或间接相关的报道。

发明内容

[0007] 本发明的目的是提供膜联蛋白 A3 的新的用途,具体涉及膜联蛋白 A3 用作检测酒精性肝纤维化的分子标志的用途。

[0008] 本发明的另一个目的在于提供膜联蛋白 A3 特异性的抗体,包括单克隆抗体和多

克隆抗体,该特异性的抗体在制备检测酒精性肝纤维化制剂中的用途。

[0009] 本发明的再一个目的在与提供一种抗膜联蛋白 A3 的抗体,包括单克隆抗体和多克隆抗体,在制备检测酒精性肝纤维化试剂盒中的用途。

[0010] 本发明通过筛选在酒精性肝纤维化和正常肝脏的肝非实质细胞中差异表达的蛋白质,获得一种在酒精性肝纤维化和正常肝脏非实质细胞中存在差异表达的蛋白质(酒精性肝纤维化细胞中低表达),经质谱鉴定为膜联蛋白 A3;进一步的免疫印迹实验证实,该蛋白质在酒精性肝纤维化和正常肝脏的肝非实质细胞中存在蛋白质表达水平的差异(酒精性肝纤维化细胞中表达下调);基于膜联蛋白 A3 与酒精性肝纤维化的相关性,以该蛋白的转录本作为一个分子标志对其转录水平进行定量检测可用作检测酒精性肝纤维化。

[0011] 本发明的目的通过下述技术方案实行:

[0012] 本发明以改良的蔗糖密度梯度离心的方法收集离体实验动物正常肝脏和酒精性肝纤维化的肝非实质细胞,裂解获得细胞蛋白质后,以蛋白质二维凝胶电泳的方法分离蛋白质,通过 ImageMaster 软件分析表达差异的蛋白质,并对所获得的差异蛋白质进行质谱鉴定,结果显示,膜联蛋白 A3 在酒精性肝纤维化的肝非实质细胞中低表达;免疫印迹反应实验进一步证实,膜联蛋白 A3 在肝纤维化的肝非实质细胞中的低表达;实验结果表明,膜联蛋白 A3 可作为酒精性肝纤维化的分子标志,对其表达量进行检测可以用来检测酒精性肝纤维化;进一步,可制备检测酒精性肝纤维化制剂。

[0013] 本发明中,采用蔗糖密度梯度离心的方法首先分离肝非实质细胞,再以酶解的方式获得肝非实质细胞的质膜蛋白质;

[0014] 本发明中,通过二维凝胶电泳方法分离裂解得到的蛋白质,通过 ImageMaster 2D Platinum 6.0 软件分析,筛选得到差异表达的蛋白质,用戴安纳升级液相色谱 Ultimate 3000 串联大容量离子阱质谱(LC-MS/MS)进行分离鉴定;

[0015] 实验鉴定获得 14 种非冗余蛋白质在正常肝脏和酒精性肝纤维化肝脏的非实质细胞中差异表达,其中包括在肝纤维化的肝非实质细胞中表达降低的膜联蛋白 A3 表达量;质谱分析获得的膜联蛋白 A3 的鉴定情况结果如表 1 所示。

[0016] 表 1:膜联蛋白 A3 的详细鉴定结果

[0017]

蛋白质 ID	蛋白质描述	搜库得分	等电点	分子量 (kDa)	序列覆盖率
ANXA3_RAT	膜联蛋白 A3	86	5.96	36.6	20%

;

[0018] 本发明还验证了膜联蛋白 A3 差异表达:提取肝纤维化非实质细胞的蛋白质,首先进行 SDS-PAGE,将凝胶中的蛋白质转移到 PVDF 膜上,进行免疫印迹反应,结果与内参 β -Actin 进行对比,确定膜联蛋白 A3 在纤维化组织和正常肝脏组织中的表达,结果表明,膜联蛋白 A3 在酒精性肝纤维化组织中低水平的表达,结果与蛋白质二维凝胶电泳的结果一致;

[0019] 实验结果表明,所述膜联蛋白 A3 在正常肝脏和酒精性肝纤维化的肝非实质细胞中存在差异表达,与酒精性肝纤维化的发生、发展有着密切的相关性;以膜联蛋白 A3 作为

一个分子标志对其表达水平进行检测可用于检测酒精性肝纤维化,其中,膜联蛋白 A3 作为分子标志其在肝非实质细胞中的表达量可用作检测酒精性肝纤维化,其中,尤其检测膜联蛋白 A3 在肝非实质细胞中转录是否存在下调;进一步,相应的特异性检测膜联蛋白 A3 的抗体,包括单克隆抗体和多克隆抗体,由于其能检测膜联蛋白 A3 的表达水平,因而可用于检测酒精性肝纤维化或者用于制备检测酒精性肝纤维化的制剂或试剂盒等。

[0020] 本发明的进一步目的是提供体外检测膜联蛋白 A3 表达的方法,尤其涉及一种体外检测酒精性肝纤维化肝非实质细胞中膜联蛋白 A3 表达是否异常的方法,其包括步骤:

[0021] (1) 用特异性抗体检测待检肝非实质细胞中膜联蛋白 A3 蛋白的数量;

[0022] (2) 将步骤 (1) 得到的检测数量与正常肝脏肝非实质细胞中膜联蛋白 A3 的数量进行比较,测得的结果低于正常值,则表示被检样本中膜联蛋白 A3 的表达异常。

[0023] 本发明实验结果证实了膜联蛋白 A3 与酒精性肝纤维化的相关性,为酒精性肝纤维化的诊断和/或治疗提供了全新的参考途径;所述的膜联蛋白 A3 可用作检测酒精性肝纤维化的分子标志的应用;所述的膜联蛋白 A3 的特异性的抗体,可用于制备检测酒精性肝纤维化制剂,和制备检测酒精性肝纤维化试剂盒。

附图说明

[0024] 图 1 显示了正常肝脏和酒精性肝纤维化肝非实质细胞中膜联蛋白 A3 的表达量,其中,N 代表正常肝脏,A 代表酒精性肝纤维化肝脏,6、9 代表肝纤维化造模后的 6、9 周所取肝脏样品,1、2、3 代表 3 次重复,圆圈及箭头所指处代表膜联蛋白 A3 所在的位置。

[0025] 图 2 显示了正常肝脏和酒精性肝纤维化中膜联蛋白 A3 的免疫印迹结果,其中,N 代表正常肝脏,A 代表酒精性肝纤维化肝脏,6、9 代表肝纤维化造模后的 6、9 周所取肝脏样品, β -Actin 为内参对照。

具体实施方式

[0026] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而不用来限制本发明的范围。

[0027] 下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件参考《分子克隆实验指南》(第三版,冷泉港出版社)中所述的条件或者制造厂商的建议条件。

[0028] 实施例 1 制备酒精性肝纤维化肝非实质细胞蛋白质样品

[0029] 本实施例中所使用的尿素、硫脲、苯甲基磺酰氟 (PMSF)、二硫苏糖醇 (DTT)、3-[(3-胆酰胺丙基)-二乙铵]-1-丙磺酸 (CHAPS) 均购自 Sigma 公司,DNA 酶购自 Takara。

[0030] 本实施例以蔗糖密度梯度离心的方法首先分离肝非实质细胞,再以酶解的方式获得肝非实质细胞的质膜蛋白质,具体步骤如下:

[0031] 取离体的酒精性肝纤维化动物实验模型肝脏组织在冰冷的生理盐水中剪碎,用组织匀浆器匀浆悬浮在冷的缓冲液 A (50mM HEPES, 1mM CaCl₂ and 1mM PMSF, pH7.4) 中的组织碎片,将匀浆好的悬液置于 50ml 离心管中,4℃ 条件下,15000g 离心 15min,取沉淀与 60% 蔗糖混合,至到混合物中的蔗糖浓度为 44%。将 42.3% 的蔗糖溶液小心滴加到 44% 蔗糖混合物上层,4℃ 条件下,100000g 离心 2.5h,取离心管最上层的组织碎片即为分离得到的质膜蛋白质粗提样本,将该沉淀物在缓冲液 B (50mM HEPES, 1mM PMSF, pH 7.4) 中洗涤两

遍。将粗提样本与 60% 的蔗糖混和,直到混合物中的蔗糖浓度为 44%,将 42.3%、41.0%、39.0%、37.0% 依次滴加到 44% 蔗糖混合物上层。100000g 离心 6h,取最上层 37.0% 蔗糖中的组织碎片在缓冲液 B 中洗涤两遍,即为所提取的质膜。

[0032] 将获得的肝非实质质膜加入裂解缓冲液 (8mol/L 尿素、4% CHAPS、65mmol/L DTT、2mol/L 硫尿、1% NP-40、0.5mmol/L PMSF、1% DNA 酶),在冰上作用 30min,再在室温下孵育 30min。裂解得到的蛋白质用 Bradford 法测定蛋白质含量后 -80°C 保存备用。

[0033] 实施例 2 筛选差异表达蛋白质

[0034] 本实施例中所使用的丙烯酰胺、N, N' - 亚甲基双 (丙烯酰胺)、甘氨酸、十二烷基硫酸钠 (SDS)、三羟甲基氨基甲烷 (Tris)、尿素、甘油购自美国 Amresco 公司,过硫酸胺 (AP)、TEMED 购自 Bio-Rad。

[0035] 将裂解得到的蛋白质通过二维凝胶电泳的方法分离,通过 ImageMaster 2D Platinum 6.0 软件分析,找出差异表达的蛋白质,并对所获得的差异蛋白质用戴安纳升级液相色谱 Ultimate 3000 串联大容量离子阱质谱 (LC-MS/MS) 进行分离鉴定,具体步骤如下:

[0036] 双向凝胶电泳的第一向等电聚焦电泳采用 pH 3 ~ 10 非线性胶条,电泳程序设置:水化 30V, 12h;电泳:500V, 1h;1000V, 1h;8000V, 30min, 梯度;8000V, 5h, 线性;总功率达 44 千瓦。第二向十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离,分离胶浓度为 11.5%。电泳完后,剥胶,用考马斯亮蓝染胶,Image scanner 扫描仪成像。所得图像用 ImageMaster 2D Platinum 6.0 软件将电泳图谱分成 2 个类别进行找点、匹配等分析,找出差异蛋白质点。

[0037] 取差异蛋白质点脱色脱水冻干后,每管中加入约 5 μL 胰酶 (0.02 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)。37 $^{\circ}\text{C}$ 酶解过夜 (16 ~ 18h)。酶解后的样品先经过 C18 预柱 (300 μm id x 5mm, 5 μm) 脱盐,流速为 20 $\mu\text{L}/\text{min}$,流动相为 2% ACN, 0.1% FA。然后以 300nL/min 的流速经 C-18 反向柱 (75 μm id x 15cm length, 3 μm , PepMapTM) 进行分离,色谱的梯度为 4-48%,梯度时间为 40min。通过 C18 色谱柱分离的肽段由纳流喷针进入 HCT 质谱进行实时的离子化分析检测。HCT 质谱每秒钟进行一次一级扫描和 5 次二级扫描分析。

[0038] 用 DataAnalysis 3.2 软件整合肽指纹图谱和串联质谱二级图谱,通过 Mascot 软件查询 SwissProt 数据库。MS 误差: $\pm 0.6\text{Da}$, MS/MS 误差: 1.2Da。固定修饰是半胱氨酸被修饰为脲甲基半胱氨酸 (Carbamidomethyl-Cys),可变修饰为甲硫氨酸氧化 (Oxidation(M)),每个肽段允许有 1 个不完全裂解位点,离子选择 (+1, +2, +3),模式为:单同位素,置信区间为 95%, $P < 0.05$,蛋白质得分 36 分以上结果可靠。

[0039] 用上述方法鉴定到 14 种非冗余蛋白质在正常肝脏和酒精性肝纤维化肝脏的非实质细胞中差异表达,其中包括在肝纤维化的肝非实质细胞中表达降低的膜联蛋白 A3 表达量。如图 1 所示,考马斯亮蓝染色的双向凝胶电泳显示膜联蛋白 A3 在纤维化过程中表达下调 (图注:6、9 代表酒精性肝纤维化的不同时间点, N 代表组织来源于正常肝脏, A 代表组织来源于肝纤维化肝脏, 圆圈代表膜联蛋白 A3 所在的位置)。

[0040] 质谱分析获得的膜联蛋白 A3 的详细鉴定情况如表 2 所示。

[0041] 表 2:膜联蛋白 A3 的详细鉴定结果

[0042]

蛋白质 ID	蛋白质描述	搜库得分	等电点	分子量 (kDa)	序列覆盖率
ANXA3_RAT	膜联蛋白 A3	86	5.96	36.6	20%

。

[0043] 实施例 3 验证膜联蛋白 A3 差异表达

[0044] 本实施例中所使用的抗膜联蛋白 A3 的抗体购自 ProteinTech Group Inc. ; β -Actin 的抗体和辣根过氧化物酶标记的二抗均购自 Santa ; PVDF 膜购自 Millipore。

[0045] 提取肝纤维化非实质细胞的蛋白质, 首先进行 SDS-PAGE, 将凝胶中的蛋白质转移到 PVDF 膜上, 进行免疫印迹反应, 结果与内参 β -Actin 进行对比, 以确定膜联蛋白 A3 在纤维化组织和正常肝脏组织中的表达, 包括以下步骤:

[0046] 将 50mg 蛋白质进行电泳, 电泳采用 11.5% 分离胶, 电泳结束后转膜, 将 PVDF 膜过夜封闭, 封闭后的膜在 TBST 中洗膜 3 次, 37°C 孵育抗膜联蛋白 A3 的抗体 2h, 再将 PVDF 膜在 TBST 中洗涤 3 遍, 在辣根过氧化物酶标记的二抗中孵育 2h, 同上述步骤洗膜后在暗室进行曝光显色。

[0047] 膜联蛋白 A3 的表达量通过除以内参 β -Actin 的量得到的比值即为所测膜联蛋白 A3 的蛋白质含量, 结果如图 2 所示, 与正常肝脏中的膜联蛋白 A3 的相对含量相比, 酒精性肝纤维化中的含量明显较低, 结果表明, 膜联蛋白 A3 在酒精性肝纤维化组织中有较低水平的表达, 上述结果与蛋白质二维凝胶电泳的结果一致。

[0048] 实验结果证实, 膜联蛋白 A3 在正常肝脏和酒精性肝纤维化的肝非实质细胞中存在差异表达, 显然与酒精性肝纤维化的发生、发展有着密切的相关性, 因此, 以膜联蛋白 A3 作为一个分子标志对其表达水平进行检测可以用于检测酒精性肝纤维化; 相应的特异性检测膜联蛋白 A3 的抗体, 由于其能检测膜联蛋白 A3 的表达水平, 因而可用于检测酒精性肝纤维化或者用于制备检测酒精性肝纤维化的制剂或试剂盒等, 这对于本领域的技术人员来说是显而易见的。

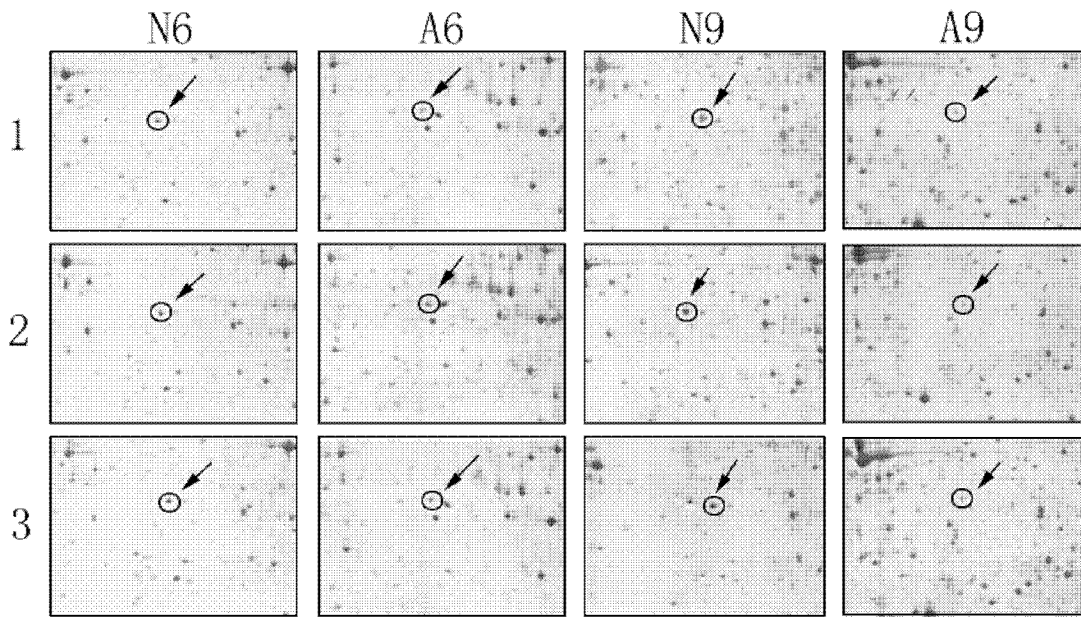


图 1

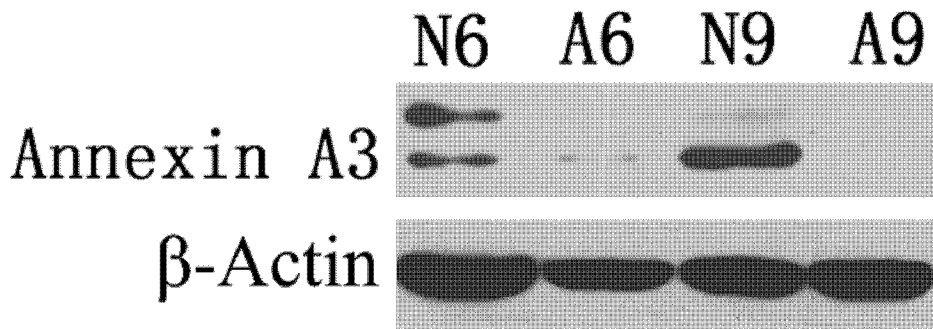


图 2