

on encephalitogenic Th17 cells and the effector phase of experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. J Immunol, 2007, 179(5):3268-3275.

[18] Tao YP, Wang WL, Li SY, et al. Associations between polymorphisms in IL-12A, IL-12B, IL-12R beta 1, IL-27 gene and serum levels of IL-12p40, IL-27p28 with esophageal cancer[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2012, 138(11):1891-1900.

[19] 王雷, 单保恩, 刘亮, 等. 抗原致敏及白细胞介素 27 基因修饰的树突状细胞诱导抗食管癌免疫的体外研究[J]. 肿瘤, 2011, 31(7): 601-607.

[20] Kambayashi Y, Fujimura T, Aiba S. Comparison of immunosuppressive and immunomodulatory cells in keratoacanthoma and cutaneous squamous cell carcinoma[J]. Acta Derm Venereol, 2013, 93(6):663-668.

[21] Natividad KDT, Junankar SR, Redzwan NM, et al. Interleukin-27 signaling promotes immunity against endogenously arising murine tumors[J]. PLoS One, 2013, 8(3):e57469.

[22] Chaturvedi V, Collison LW, Guy CS, et al. Cutting edge: human

regulatory T cells require IL-35 to mediate suppression and infectious tolerance[J]. J Immunol, 2011, 186(12):6661-6666.

[23] Collison LW, Delgoffe GM, Guy CS, et al. The composition and signaling of the IL-35 receptor are unconventional[J]. Nat Immunol, 2012, 13(3):290-315.

[24] Wang ZH, Liu JQ, Liu ZZ, et al. Tumor-derived IL-35 promotes tumor growth by enhancing myeloid cell accumulation and angiogenesis[J]. J Immunol, 2013, 190(5):2415-2423.

[25] Zeng JC, Zhang Z, Li TY, et al. Assessing the role of IL-35 in colorectal cancer progression and prognosis[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2013, 6(9):1806-1816.

[26] Long J, Zhang X, Wen M, et al. IL-35 over-expression increases apoptosis sensitivity and suppresses cell growth in human cancer cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 430(1):364-369.

[27] Jin P, Ren H, Sun W, et al. Circulating IL-35 in pancreatic ductal adenocarcinoma patients[J]. Hum Immunol, 2014, 75(1):29-33.

(收稿日期:2014-01-24)

• 综 述 •

## SARS-CoV 核衣壳蛋白表达方法的研究进展

黄 莉 综述, 车小燕<sup>△</sup> 审校

(南方医科大学珠江医院检验医学部/广东省病原微生物重点实验室, 广东广州 510282)

**关键词:** 严重急性呼吸综合征; SARS 冠状病毒; 核衣壳蛋白; 杆状病毒

**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.11.035

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1673-4130(2014)11-1455-04

2012 年引起中东呼吸综合征的新型冠状病毒 hCoV-EMC, 与 2003 年引起广东暴发性流行的严重急性呼吸综合征的 SARS-CoV 同属于  $\beta$  群冠状病毒, 两种病毒存在许多相似之处<sup>[1-2]</sup>。研究表明 SARS-CoV 核衣壳蛋白(SARS-CoV N 蛋白)可诱导产生强烈的体液和细胞免疫, 是主要的抗原分子<sup>[3]</sup>和临床诊断的最佳靶标<sup>[4]</sup>。获得重组 SARS-CoV N 蛋白, 是进一步研究 SARS-CoV、hCoV-EMC 以及其他可能出现的新型人冠状病毒 N 蛋白之间关系的前提。本文将目前研究 SARS-CoV N 蛋白的重组表达体系、表达蛋白的特性及存在问题等进行了综述。

### 1 SARS-CoV N 蛋白的分子特性

SARS-CoV 包含至少 11 个开放读码框(ORFs), 由 29 727 个核苷酸组成, 其中 5 个主要的 ORFs 主要用于编码复制酶(Rep)、刺突糖蛋白(S)、包膜小蛋白(E)、膜蛋白(M)和核衣壳蛋白(N)<sup>[5-6]</sup>。SARS-CoV N 蛋白是 SARS-CoV 最为丰富的结构蛋白之一, 与病毒 RNA 结合形成核衣壳, 参与 SARS-CoV 的复制, 是主要的抗原分子<sup>[3,7]</sup>; 与其他冠状病毒 N 蛋白的同源性为 20%~30%<sup>[8]</sup>, 由 SARS 冠状病毒第 9 个 ORF 编码的, 由 422 个氨基酸残基组成, 高度磷酸化, 相对分子质量  $48 \times 10^3$ <sup>[8]</sup>。

### 2 SARS-CoV N 蛋白表达方法及研究进展

**2.1 原核系统表达** 自 1977 年, 研究者成功地在大肠杆菌中表达了一种哺乳动物的肽类激素-生长激素抑制素后<sup>[9]</sup>, 首次实现了外源基因在原核细胞中的体外表达。原核表达系统具有培养操作简单、周期短、价格低廉、转化和转导效率高、外源

基因表达产物高等优点, 是迄今研究最为成熟、应用最为广的表达系统<sup>[9]</sup>; 原核系统包括大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和链霉菌等表达系统, 其中以大肠杆菌表达系统最常见。

2003 年 SARS 暴发流行初期, 国内外研究者首选了大肠杆菌表达系统重组 SARS-CoV N 蛋白。据报道, Shi 等<sup>[10]</sup>和 Woo 等<sup>[11-12]</sup>在 pET 载体上成功构建重组质粒, 获得重组蛋白, 并在此基础上建立了高特异性和高灵敏性的 ELISA 方法。Sun 等<sup>[13]</sup>在 pRSET 载体上构建了重组质粒; 而 Guan 等<sup>[14]</sup>则在带 GST 标签的质粒载体上构建, 建立了一种病毒裂解液和重组 N 蛋白结合的免疫印迹方法, 用以检测患者血清抗体。Pei 等<sup>[15]</sup>甚至尝试了在公认为安全的食品级微生物乳酸乳球菌上表达 SARS-CoV N 蛋白, 作为口服活疫苗。

然而原核表达系统本身具有许多固有的缺点, 如高效表达易形成包涵体、不能产生 N-和 O-端糖基化、脂肪酸酰化、磷酸化以及形成二硫键等翻译后修饰, 使其所产生的重组蛋白的生物活性、功能和结构与天然蛋白存在较大差别。因而, 在该类蛋白基础上建立的临床诊断方法与健康人血清中的某些抗体存在一定程度的交叉反应。Leung 等<sup>[16]</sup>和 Shin 等<sup>[17]</sup>均报道了原核表达的 SARS-CoV N 蛋白与健康人血清存在的交叉反应。

**2.2 真核表达系统** 真核表达系统的翻译后修饰功能, 如糖基化、磷酸化等, 使蛋白的生物活性、功能、结构与天然蛋白更接近, 适合于来自高等生物的外源基因的表达。真核系统包括丝状真菌、酵母、昆虫细胞、动物和哺乳类细胞等系统。近年来, 常用的重组 SARS-CoV N 蛋白的表达系统主要包括酵母

作者简介: 黄莉, 女, 在读硕士研究生, 主要从事微生物检验研究。

<sup>△</sup> 通讯作者, E-mail: linche@pub.guangzhou.gd.cn.

表达系统、昆虫细胞(杆状病毒)表达系统以及哺乳动物细胞表达系统;酵母表达系统包括毕赤酵母和酿酒酵母。

**2.3 酵母表达系统** 酵母菌是一类低等真核生物,它既有类似原核生物的特性,又有一般真核生物的分子和细胞生物学特性。酵母表达外源基因具有一定的翻译后加工能力,使重组蛋白具有一定的折叠和糖基化,性质更为稳定,且能分泌表达至胞外,内源性蛋白表达少,有利于纯化。酿酒酵母由于遗传和生理背景清楚、安全,是最早应用于外源基因克隆和蛋白表达的酵母,被称为真核生物中的“大肠杆菌”<sup>[9]</sup>。毕赤酵母则为一种甲醇营养型酵母,依赖甲醇作为唯一碳源生长,是重组蛋白分泌表达的理想宿主<sup>[18]</sup>。

Liu 等<sup>[7]</sup>在胞内表达型载体 pPIC3.5K 上重组质粒,在毕赤酵母 GS115 上成功获得 His<sup>+</sup> Mut<sup>+</sup> 型重组菌,表达了具有生物活性的 SARS-CoV N 蛋白,蛋白产量高出原核系统表达量 2 倍。Cao 等<sup>[5]</sup>使用胞外分泌表达型载体 pPIC9 在 GS115 上得到 His<sup>+</sup> Mut<sup>+</sup> 型重组菌,成功获得了 3 mg/mL 表达量的蛋白。刘如石等<sup>[19]</sup>使用 pPIC3.5K 载体在 GS115 上获得了 His<sup>+</sup> Mut<sup>+</sup> 型重组菌,利用发酵罐大规模表达,获得了 2.5 g/L 的蛋白产量。国内的研究者杨雷等<sup>[20]</sup>使用 pYES6 载体在酿酒酵母 INVScl 载体上也在胞内成功表达了 SARS-CoV N 蛋白。

酵母是与 SARS-CoV 宿主细胞相类似的单细胞真核微生物,其重组 SARS-CoV N 蛋白比原核重组的更为接近天然的结构和生物活性。据刘如石等<sup>[19]</sup>和 Cao 等<sup>[5]</sup>对酵母源性和原核源性的 SARS-CoV N 蛋白生物活性和结构的比对研究,发现酵母源性的 SARS-CoV N 蛋白的生物活性为原核源性的 4 倍以上<sup>[7]</sup>;酵母来源的 SARS-CoV N 重组蛋白的结构比原核源性的更接近天然结构<sup>[5]</sup>。但酵母表达系统的应用是有限的,原因可能是酵母的翻译后修饰主要以甘露糖残基对蛋白简单的糖基化修饰为主,而 SARS-CoV N 蛋白为高磷酸化蛋白<sup>[8,17]</sup>,因此 SARS-CoV N 蛋白仍不适合在酵母这种较低等的真核生物中重组表达。

**2.4 昆虫细胞表达系统** 昆虫细胞表达系统具有更加复杂的翻译后修饰功能,如蛋白质的正确折叠与切割、二硫键形成、糖基化、磷酸化、酰化、酰胺化、羟甲基化等,且与哺乳动物类似,适合于表达高等真核生物蛋白<sup>[21]</sup>。目前常用的昆虫细胞表达系统有昆虫细胞(杆状病毒)系统、稳定表达系统和果蝇表达系统三种,其中昆虫细胞(杆状病毒)表达系统是国内外十分推崇、应用最为广泛的真核表达系统<sup>[21]</sup>。而在杆状病毒表达系统中,苜蓿银纹夜蛾核多角体病毒(AcMNPV)具有外源基因高水平表达能力,可同时表达多个外源基因,能容纳大片段的外源 DNA,对脊椎动物安全,不存在安全隐患等优点,是目前使用最为广泛的杆状病毒表达系统。

He 等<sup>[22]</sup>使用 pBluBacHis2 载体构建质粒,转染 Sf9 细胞,成功表达了 SARS-CoV N 蛋白,并用蔗糖梯度实验发现此重组蛋白具有高分子结构。Ren 等<sup>[23]</sup>使用 pBluescript II SK(+) 载体重组质粒,转染 Tn 5B1-4 细胞,获得了重组蛋白,用共聚焦显微镜证实了其在细胞质和细胞核中的定位。朱函坪等<sup>[24]</sup>使用 pFastBac HTA 载体成功构建重组体,并转染 Sf9 细胞,获得了 SARS-CoV N 蛋白,建立了具有高特异性和敏感性的免疫荧光试验(IFA),用于检测患者血清中的 SARS 抗体。Lai 等<sup>[25]</sup>用 pFastBac HTB 载体同时表达 N 和 E 蛋白,比较了这两种蛋白的特性。Saijo 等<sup>[26]</sup>将 SARS-CoV N 蛋白基因转入已修饰过的 pAcYM1 杆状转移质粒,转染 Tn5 细胞,并用这重

组蛋白作为抗原建立了特异性高达 92% 的 IgG ELISA SARS 血清学诊断方法。

Shin 等<sup>[17]</sup>比较了大肠杆菌来源、杆状病毒来源和哺乳动物来源的三种 N 蛋白的特性。发现来源于杆状病毒表达系统的 N 蛋白相对分子量接近哺乳动物来源的 N 蛋白;其免疫原性比原核来源的高出 2.5 倍以上;高磷酸化的蛋白与阴性血清无交叉反应,说明磷酸化对蛋白的免疫原性存在一定的影响。从这种程度而言,来源于杆状病毒表达系统的 SARS-CoV N 蛋白的生物活性、结构和功能更接近天然蛋白。然而杆状病毒表达系统存在固有缺点。杆状病毒表达蛋白的周期较长、成本较高、操作较繁琐;最为主要的是病毒本身表达的半胱氨酸蛋白酶在一定程度上降解了重组蛋白;随着感染宿主的多角体病毒的死亡,异源蛋白也将停止表达;每一轮新蛋白的合成都需要重新感染宿主细胞;糖基化修饰仍较哺乳动物的简单<sup>[9]</sup>。尽管如此,杆状病毒表达系统仍不失为一个有效的真核表达系统,既具有很好的发展前景,同时也具有很大的挑战。

**2.5 哺乳动物细胞表达系统** 从最开始以裸露 DNA 直接转染哺乳动物至今的 30 余年间,哺乳动物细胞表达系统不仅成为多种基因工程药物的生产平台,在新基因的发现、蛋白质的结构和功能研究中亦起了极为重要的作用。与其他系统相比,哺乳动物细胞表达系统能够指导蛋白的正确折叠,提供复杂的 N 型糖基化和准确的 O 型糖基化等多种翻译后加工功能<sup>[9]</sup>。

Kim 等<sup>[27]</sup>成功地在 pcDNA3.1/myc-His(-) 载体上构建钙网蛋白(CRT)-SARS-CoV N 蛋白重组体,并转染 293 细胞获得 N 重组蛋白和相关的 CRT/N DNA 疫苗,证实了该疫苗能在 C57BL/6 小鼠上产生强烈的 N 蛋白特异性体液和 T 细胞介导的细胞免疫应答。Surjit 等<sup>[28]</sup>采用重组质粒转染 COS-1 细胞,获得 SARS-CoV N 蛋白,并研究了 N 蛋白之间相互作用的结构域。Zakhartchouk 等<sup>[29]</sup>使用人腺病毒载体 pH5L 构建 SARS-CoV N 重组质粒,转染 293 细胞后获得重组 N 蛋白,证实了 N 蛋白是一磷酸化的蛋白,同时发现其能够使小鼠产生特异性体液免疫应答和 T 细胞介导的免疫应答。Surjit 等<sup>[30]</sup>再一次在 pcDNA3.1 Myc 上重组载体,转染 COS-7 和 Huh7 细胞,研究表达的整个过程,发现 N 蛋白的表达能在没有破坏 CDK4-细胞周期蛋白 D 复合物形成的前提下下调了 CDK4 的活性。上述研究表明哺乳动物细胞表达系统产生的 SARS-CoV N 蛋白在其功能研究方面发挥作用。

虽然哺乳动物细胞表达系统所重组的 SARS-CoV N 蛋白能与宿主细胞的天然蛋白结构和生物功能非常接近,但是该系统仍存在着难以克服的缺点,如成本高、技术复杂、宿主范围有限、产量低,存在着潜在的动物病毒污染等,限制了这种表达系统的应用范围。

### 3 转基因植物表达系统

1989 年,在转基因西红柿上成功的重组了一种具有生物活性的抗体<sup>[31]</sup>。1990 年有研究者首次报道植物表达的链球菌属的表面蛋白(SpaA)具有免疫原性以来<sup>[32]</sup>,转基因植物表达系统在生物制药、医疗等行业的应用引起了研究者的广泛兴趣。转基因植物作为一种生物反应器有很多优点,如生产成本较低、基因转化容易、周期短、表达量高、提纯容易、收效快、遗传性状稳定、不受噬菌体污染、动物病原菌污染性小、容易大规模生产、重组蛋白在折叠和组装上与动物细胞来源的相似、产物的生物活性与高等动物细胞表达的产物基本一致等,因此其比细菌、酵母、昆虫和哺乳动物细胞等反应器系统更有开发潜力<sup>[9,31-32]</sup>。

Zheng 等<sup>[33]</sup>使用载体 pBAL 成功构建 SARS-CoV N 蛋白重组质粒,在野生型烟草植物上获得产量为 79  $\mu\text{g/g}$  的蛋白;重组 N 蛋白免疫原性的研究结果发现该蛋白能诱导小鼠产生特异性 B 细胞免疫应答。

转基因植物表达系统需要克服的缺点是其糖基化修饰与人的糖基化修饰模式差别较大;植物所生存的外周环境对其生长、蛋白的表达影响较大;外源蛋白的产量仍相对较低等等。这些在一定程度上限制了植物表达系统的发展,以致其目前仍处于初始发展阶段<sup>[9,31]</sup>。

#### 4 分析与展望

本文就国内外对 SARS-CoV N 蛋白表达方法的研究进展做了概括。原核表达系统技术成熟,是人工生物合成 SARS-CoV N 蛋白的首选;酵母表达系统一定程度上弥补了原核表达系统的固有缺点,但由于 N 蛋白的高磷酸化和无糖基化修饰特性,使重组 N 蛋白与天然结构仍存在差距;昆虫细胞(杆状病毒)表达系统具有磷酸化的翻译后修饰功能,与哺乳动物细胞更接近,很大程度上弥补了前两者的缺陷,是 SARS-CoV N 蛋白研究中使用最为广泛的系统之一;哺乳动物细胞为高级真核表达系统,其固有缺点限制了应用范围;植物细胞的亚细胞结构使其所表达的 N 蛋白在折叠、翻译后修饰等与哺乳动物细胞来源的蛋白相接近,是目前重组蛋白和疫苗开发最具潜力的表达系统。

由此可见,不同的表达系统各有千秋,采用何种重组 SARS-CoV N 蛋白表达系统,除需综合考虑生产成本、生物安全、表达水平之外,还要考虑表达所得的 SARS-CoV N 蛋白的生物学特性。就 SARS-CoV N 蛋白的无糖基化和高磷酸化的特性,以及综合技术的难易程度、生物安全性等因素而言,昆虫细胞(杆状病毒)表达系统较其他系统具有明显优势;植物表达系统在这方面的研究仍然较少,目前还很难判断其是否适合 SARS-CoV N 蛋白的表达。随着生物技术和蛋白研究水平的提高,相信其将是一个最具潜力的表达系统。

#### 参考文献

- [1] Hilgenfeld R, Peiris M. From SARS to MERS: 10 years of research on highly pathogenic human coronaviruses[J]. *Antiviral Res*, 2013, 100(1):286-295.
- [2] Muller MA, Raj VS, Muth D, et al. Human coronavirus EMC does not require the SARS-coronavirus receptor and maintains broad replicative capability in mammalian cell lines[J]. *MBio*, 2012, 3(6):505-512.
- [3] 刘俊丽,曹诚,马清钧. SARS-CoV N 蛋白和 MAP19 的相互作用[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2009, 25(9):777-779.
- [4] Suresh MR, Bhatnagar PK, Das D. Molecular targets for diagnostics and therapeutics of severe acute respiratory syndrome (SARS-CoV)[J]. *J Pharm Pharm Sci*, 2008, 11(2):1-13.
- [5] Cao S, Wang H, Luhur A, et al. Yeast expression and characterization of SARS-CoV N protein[J]. *J Virol Methods*, 2005, 130(1/2):83-88.
- [6] Zhang J, Wang D, Li YE, et al. SARS coronavirus nucleocapsid protein monoclonal antibodies developed using a prokaryotic expressed protein[J]. *Hybridoma (Larchmt)*, 2011, 30(5):481-485.
- [7] Liu RS, Yang KY, Lin J, et al. High-yield expression of recombinant SARS coronavirus nucleocapsid protein in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*[J]. *World J Gastroenterol*, 2004, 10(24):3602-3607.
- [8] Surjit M, Lal SK. The SARS-CoV nucleocapsid protein; a protein with multifarious activities[J]. *Infect Genet Evol*, 2008, 8(4):397-405.
- [9] 范翠英,冯利兴,樊金玲,等. 重组蛋白表达系统的研究进展[J]. *生物技术*, 2012, 22(2):76-80.
- [10] Shi YL, Yi YP, Li P, et al. Diagnosis of severe acute respiratory syndrome (SARS) by detection of SARS coronavirus nucleocapsid antibodies in an antigen-capturing enzyme-linked immunosorbent assay[J]. *J Clin Microbiol*, 2003, 41(12):5781-5782.
- [11] Woo PC, Lau SK, Tsoi HW, et al. Relative rates of non-pneumonic SARS coronavirus infection and SARS coronavirus pneumonia [J]. *Lancet*, 2004, 363(9412):841-845.
- [12] Woo PC, Lau SK, Wong BH, et al. Detection of specific antibodies to severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus nucleocapsid protein for serodiagnosis of SARS coronavirus pneumonia [J]. *J Clin Microbiol*, 2004, 42(5):2306-2309.
- [13] Sun ZF, Meng XJ. Antigenic cross-reactivity between the nucleocapsid protein of severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus and polyclonal antisera of antigenic group I animal coronaviruses; implication for SARS diagnosis [J]. *J Clin Microbiol*, 2004, 42(5):2351-2352.
- [14] Guan M, Chen HY, Tan PH, et al. Use of viral lysate antigen combined with recombinant protein in Western immunoblot assay as confirmatory test for serodiagnosis of severe acute respiratory syndrome[J]. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2004, 11(6):1148-1153.
- [15] Pei H, Liu J, Cheng Y, et al. Expression of SARS-coronavirus nucleocapsid protein in *Escherichia coli* and *Lactococcus lactis* for serodiagnosis and mucosal vaccination [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, 68(2):220-227.
- [16] Leung DTM, van Maren WWC, Chan FKL, et al. Extremely low exposure of a community to severe acute respiratory syndrome coronavirus; false seropositivity due to use of bacterially derived antigens[J]. *J Virol*, 2006, 80(18):8920-8928.
- [17] Shin GC, Chung YS, Kim IS, et al. Antigenic characterization of severe acute respiratory syndrome-coronavirus nucleocapsid protein expressed in insect cells; the effect of phosphorylation on immunoreactivity and specificity[J]. *Virus Res*, 2007, 127(1):71-80.
- [18] 郭雨刚. 毕赤酵母表达系统及其应用[D]. 合肥:中国科学技术大学, 2012.
- [19] 刘如石,邱义兰,杨坤,等. SARS 冠状病毒核衣壳蛋白在酵母中的表达与活性检测[J]. *生物工程学报*, 2005, 21(4):540-546.
- [20] 杨雷,张洪勤,吴淑珍. SARS 冠状病毒核衣壳蛋白在酿酒酵母中的表达和纯化[J]. *实用医学杂志*, 2006, 22(23):2708-2710.
- [21] 高炳森,李宝珠,于津鹏,等. 外源基因在昆虫杆状病毒表达系统中的表达[J]. *中国生物工程杂志*, 2011, 31(11):123-129.
- [22] He R, Dobie F, Ballantine M, et al. Analysis of multimerization of the SARS coronavirus nucleocapsid protein[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 316(2):476-483.
- [23] Ren AX, Xie YH, Kong YY, et al. Expression, purification and sublocalization of SARS-CoV nucleocapsid protein in insect cells [J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2004, 36(11):754-758.
- [24] 朱函坪,朱智勇,董关木,等. SARS 冠状病毒 N 蛋白在免疫荧光诊断技术中的应用[J]. *中华医学杂志*, 2005, 85(9):621-624.
- [25] Lai CW, Chung YC, Lai YK, et al. Expression and purification of N and E proteins from severe acute respiratory syndrome (SARS)-associated coronavirus; a comparative study[J]. *Biotech-*

nol Lett, 2005, 27(13): 883-891.

[26] Saijo M, Ogino T, Taguchi F, et al. Recombinant nucleocapsid protein-based IgG enzyme-linked immunosorbent assay for the serological diagnosis of SARS[J]. J Virol Methods, 2005, 125(2): 181-186.

[27] Kim TW, Lee JH, Hung CF, et al. Generation and characterization of DNA vaccines targeting the nucleocapsid protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus[J]. J Virol, 2004, 78(9): 4638-4645.

[28] Surjit M, Liu BP, Kumar P, et al. The nucleocapsid protein of the SARS coronavirus is capable of self-association through a C-terminal 209 amino acid interaction domain[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 317(4): 1030-1036.

[29] Zakhartchouk AN, Viswanathan S, Mahony JB, et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus nucleocapsid protein expressed by an adenovirus vector is phosphorylated and immunogenic in

mice[J]. J Gen Virol, 2005, 86(Pt 1): 211-215.

[30] Surjit M, Liu B, Chow VTK, et al. The nucleocapsid protein of severe acute respiratory syndrome-coronavirus inhibits the activity of cyclin-cyclin-dependent kinase complex and blocks S phase progression in mammalian cells[J]. J Biol Chem, 2006, 281(16): 10669-10681.

[31] Jamal A, Ko K, Kim HS, et al. Role of genetic factors and environmental conditions in recombinant protein production for molecular farming[J]. Biotechnol Adv, 2009, 27(6): 914-923.

[32] 黄亚红, 陈建秀, 张大兵. 植物表达系统生产疫苗的研究进展[J]. 国外医学: 寄生虫病分册, 2005, 32(3): 129-133.

[33] Zheng N, Xia R, Yang C, et al. Boosted expression of the SARS-CoV nucleocapsid protein in tobacco and its immunogenicity in mice[J]. Vaccine, 2009, 27(36): 5001-5007.

(收稿日期: 2014-01-08)

• 综 述 •

## 脑钠肽在慢性心力衰竭中的应用

李建珍<sup>1</sup>, 刘春江<sup>1△</sup>综述, 府伟灵<sup>2</sup>审校

(1. 武警山西总队医院, 山西太原 030006; 2. 第三军医大学附属西南医院检验科, 重庆 400038)

**关键词:** 脑钠肽; 慢性心力衰竭; 呼吸困难

**DOI:** 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2014. 11. 036

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1673-4130(2014)11-1458-03

随着现代人生活习惯的改变和工作压力的增加,慢性心力衰竭(CHF)的发病率越来越高,尤其是年龄大于75岁的老年人,更为常见。据文献报道,CHF在总人口中的发病率已达0.8%~2.0%,成为导致现代社会人群死亡的重要原因<sup>[1-3]</sup>。脑钠肽(BNP)和氨基末端脑钠肽前体(NT-proBNP)作为新型心脏标志物,具有较高的敏感性和特异性,日益受到人们的青睐。欧洲心脏病协会(ESC)于2008年将BNP和NT-proBNP作为心力衰竭诊断的有益生物标志物<sup>[4]</sup>。本文就BNP和NT-proBNP在慢性心力衰竭中的应用作一综述。

### 1 BNP 和 NT-proBNP 的生物学特性

三十多年前心脏的内分泌功能被发现后,人们对BNP的研究兴趣越来越浓厚<sup>[5]</sup>。BNP基因(NPPB)位于1号染色体短臂远端,内含3个外显子,2个内含子。在心肌中编码产生1个由134个氨基酸组成的前体肽,在去除26个氨基酸信号肽后,产生1个含108氨基酸的激素原——脑钠肽前体(proBNP)。proBNP被酶切后,生成2个产物,1个是由32个氨基酸组成的BNP,1个由76个氨基酸组成的NT-proBNP。前者含有由17个氨基酸组成的二硫化物环,具有生物学活性,半衰期为18~20 min,后者为线性结构,不具有生物学活性,半衰期为90~120 min。前者可以结合具有促尿钠排泄的NRP-A受体,进而激活第二信使cGMP发挥生物学作用:促进尿钠排泄,增强心室舒张功能,抑制成纤维细胞活化,拮抗肾素-血管紧张素-醛固酮系统等。

BNP和NT-proBNP分泌是等摩尔浓度的,但NT-proBNP的半衰期明显长于BNP,因此临床检测中NT-proBNP较BNP更有实用性。两者作为新型标志物,在诊断心力衰竭方面,具有一致性,可以辅助对急性呼吸困难的鉴别诊断,对心力

衰竭患者的危险等级分层等。只是两者测试的线性范围存在一定差异:BNP为5~5 000 pg/mL,NT-proBNP为20~25 000 pg/mL。不仅如此,两者都受多种因素的影响,包括年龄、性别、体质量、心功能不全、肾功能不全、糖尿病以及检测方法、时间等。因此尚缺乏一个精确的诊断标准。国外文献报道对心力衰竭诊断的一个通用标准,可分为3个层次<sup>[6]</sup>:BNP<100 pg/mL或NT-proBNP<300 pg/mL,100 pg/mL<BNP<400 pg/mL或300 pg/mL<NT-proBNP<1 800 pg/mL,500 pg/mL<BNP或1 800 pg/mL<NT-proBNP。

### 2 BNP 和 NT-proBNP 检测在慢性心力衰竭中的应用

BNP和NT-proBNP的测定对CHF患者的危险等级分层十分重要,其水平的高低可以预测患者是否再次入院或发生猝死的可能。尤其是出院前测定BNP和NT-proBNP,对患者6个月内是否发生死亡或再次入院有很强的提示意义<sup>[7]</sup>。而且重复测定较单次测定,对于预后诊断,能够提供更为准确的信息<sup>[8-9]</sup>。对于患有冠心病但心室功能正常的患者,BNP和NT-proBNP测定也能提供预后信息<sup>[10]</sup>。

**2.1 对心源性呼吸困难的鉴别诊断** 呼吸困难多由心肺疾病引起,对于心源性呼吸困难与单纯性肺源性因素所致急性呼吸困难常常难以鉴别。心脏超声检查是诊断心功能不全最可靠的非创伤性方法。然而,据估测在英国每年新增疑似心力衰竭病例12万人,我国则更多。很难对如此大量的患者都进行心脏超声诊断。基于BNP与心功能的密切关系,许多研究人员做了大量的工作以探讨它的临床应用。有研究对321例急性呼吸困难患者进行BNP测定,显示心力衰竭患者的BNP水平明显高于肺部疾病患者,显示了BNP对急性呼吸困难的鉴别诊断价值<sup>[11]</sup>。Steinhart等<sup>[12]</sup>对500例充血性心力衰竭患者