

- [8] Jo JTH, Brinkman FSL, Hancock REW. Aminoglycoside efflux in *pseudomonas aeruginosa*: involvement of novel outer membrane proteins[J]. Antimicrob Chemother, 2003, 47(3): 1101-1111.
- [9] 刘永芳, 吕晓菊. 铜绿假单胞菌对碳青霉烯类抗生素的耐药表型与外排泵表达水平的关系[J]. 中华检验医学杂志, 2008, 31(9): 982-983.
- [10] Lopez-Dupla M, Martinez JA, Vidal F, et al. Previous ciprofloxacin exposure is associated with resistance to beta-lactam antibiotics in subsequent *pseudomonas aeruginosa* bacteremic isolates[J]. Am J Infect Control, 2009, 37(9): 753-758.
- [11] Zhao Q, Li XZ, Mistry A, et al. Influence of the TonB energy-coupling protein on efflux-mediated multidrug resistance in *pseudomonas aeruginosa*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1998, 42(9): 2225-2231.
- [12] Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2010, 54(3): 969-976.
- [13] 赵书平. 多药耐药铜绿假单胞菌β-内酰胺类耐药相关基因及I型整合酶基因研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2008, 18(12): 1663-1666.
- [14] Sacha P, Zorawski M, Hauschild T, et al. The presence of blaIMP genes on plasmids DNA isolated from multidrug-resistant *pseudomonas aeruginosa* strains at university hospital in Bialystok (Poland)-first report[J]. Folia Histochem Cytobiol, 2007, 45(4): 405-408.
- [15] Suk SE, Yoo JS, Lee JK, et al. Investigation of beta-lactamase-producing multidrug-resistant *pseudomonas aeruginosa* isolated from non-tertiary care hospitals in Korea[J]. J Microbiol Biotechnol, 2007, 17(10): 1733-1737.
- [16] Saeja P, Wieczorek P, Hauschild T, et al. Metallo-beta-lactamases of *pseudomonas aeruginosa*-a novel mechanism resistance to beta-lactam antibiotics[J]. Folia Histochem Cytobiol, 2008, 46(2): 137-142.
- [17] Llano-Sotelo B, Azucena EF, Kotra LP, et al. Aminoglycosides modified by resistance enzymes display diminished binding to the bacterial ribosomal aminoacyl-tRNA site[J]. Chem Biol, 2002, 9(4): 455-463.
- [18] Song J, Ruan Q, Qi J, et al. The mechanism of resistance of *pseudomonas aeruginosa* to beta-lactam antibiotics and clinical significance[J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2002, 22(4): 339-342.
- [19] Farra A, Islam S, Stralfors A, et al. Role of outer membrane protein OprD and penicillin-binding proteins in resistance of *pseudomonas aeruginosa* to imipenem and meropenem[J]. Int J Antimicrob Agents, 2008, 31(5): 427-433.
- [20] Nagino K, Kobayashi H. Influence of macrolides on mucoid alginate biosynthetic enzyme from *pseudomonas aeruginosa*[J]. Clin Microbiol Infect, 1997, 3(4): 432-439.
- [21] Bayer AS, Speart DP, Park S, et al. Functional role of mucoid extracellular polysaccharide(alginate) in antibiotic-induced and polymorphonuclear leukocyte-mediated killing of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Infect Immun, 1991, 59(1): 302-308.

(收稿日期: 2010-12-09)

## · 综述 ·

## 钙卫蛋白的临床研究进展

王凤霞 综述, 胡志东 审校

(天津医科大学总医院微生物与检验科 300052)

关键词: 白细胞 L1 抗原复合物; 酶联免疫吸附测定; 中性粒细胞; 炎症性肠病

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.09.023

文献标识码:A

文章编号: 1673-4130(2011)09-0971-03

钙卫蛋白(calprotectin, CP)是一种主要来源于中性粒细胞和单核细胞的钙-锌结合蛋白质, 其表达具有组织或细胞特异性, 具有抗微生物、抗增殖、调节免疫、诱导细胞凋亡、促进肿瘤细胞生长等多种生物学功能。国外多项研究发现 CP 与多种临床疾病具有较好的相关性, 对疾病的诊断、治疗、预示复发等具有十分重要的作用。其检测具有灵敏度高、快速、简便、节约等特点, 因而具有较好的临床应用前景。

### 1 CP 的生物学特性

CP 最早于 1980 年由研究者自嗜中性粒细胞分离而来, 并命名为 L1 蛋白质。后因发现其结构中含钙离子并有抗微生物特性而命名。其组成成分是 5% 的蛋白质和 60% 的人类嗜中性粒细胞溶质蛋白质, 是嗜中性粒细胞的主要炎性反应蛋白(60%)。研究发现, CP 属于 S100 家族, 是一个相对分子质量为  $36 \times 10^3$  的钙-锌结合蛋白, 由  $14 \times 10^3$  的重链(S100A9)和  $8 \times 10^3$  的轻链(S100A8)以其价键连接的异二聚体。其具有耐热性和水解性强的特点, 广泛分布于人体细胞、组织及体液中, 可在血清、粪便等标本中被检测到, 且不同部位 CP 的含量各不相同, 其中, 粪便 CP 含量较高, 约为血浆中 CP 含量的 6 倍, 且无性别差异。结果显示, CP 具有多种生物学功能:(1)诱导

自体吞噬和细胞凋亡;(2)抑制体外中性粒细胞的氧化代谢;(3)在感染和炎性反应过程中保护细胞内外环境的稳定;(4)促进肿瘤细胞的生长;并通过刺激细胞伪足的形成而使肿瘤细胞获得游走活性, 从而增强了肿瘤细胞的侵袭力;(5)诱导相当数量白细胞基因的表达, 且低浓度( $1 \text{ ng/mL}$ )可促进正常人类角质细胞的生长;(6)在炎性反应中起调节作用。

### 2 检测方法

目前多采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测 CP 含量, 常规 ELISA 操作程序(双抗体夹心法), 按需要设置酶标仪的波长进行不同标本吸光度值的测定。正确使用此方法可以减少一定数目不必要的侵入性检查, 易被患者所接受。

### 3 CP 与疾病的相关性

#### 3.1 胃肠疾病

其中研究最多是粪便 CP(faecal CP, FCP)与炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)的相关性。

IBD 是一组原因未明的慢性肠道炎性疾病, 主要包括溃疡性结肠炎和克罗恩病, 其病理基础为肠道的炎性反应。目前, 多采用内镜和活组织检查等侵入性方法来确定炎症部位及严重程度, 但这些检查方法通常价格高、有侵入性或暴露于射线, 因此不易被患者所接受。Patrick F 等<sup>[1]</sup>对疑似 IBD 的患

者进行了13项研究,其中6项针对成人( $n=670$ )的研究和7项针对儿童和青少年( $n=371$ )的研究。成人组经内镜检查IBD确诊率为32%,少儿组为61%。成人组FCP检测的敏感性和特异性分别为0.93(95%CI:0.85~0.97)、0.96(95%CI:0.79~0.99),青少儿组分别为0.92(95%CI:0.84~0.96)、0.76(95%CI:0.62~0.86),两组特异性比较差异有统计学意义( $P=0.048$ ),且与内镜检查具有较好的相关性。因此,FCP作为一项十分重要的IBD辅助检查项目,可以减少不必要的侵入性检查。与国外其他研究一致<sup>[2~3]</sup>,可用于指导临床治疗、预示疾病复发、检测疾病的活动性、鉴别诊断等。

慢性胃炎是一种常见的由各种病因引起的胃黏膜的慢性炎症,并有恶变的可能性,因此,选择正确的检测指标显得尤为重要。Montalto等<sup>[4]</sup>对61名组织学诊断为慢性胃炎的患者和74名健康志愿者进行了研究,结果发现,即使有大量嗜中性粒细胞浸润,与对照组比较,试验组FCP浓度亦无显著变化。而Bealer和Colgin<sup>[5]</sup>的一项报道首先研究了外周血CP水平与急性阑尾炎的相关性,并建立了这一生物标志物作为急性阑尾炎诊断的相关理论依据。

**3.2 婴幼儿胃肠疾病** 婴幼儿由于其生理状态特殊而临床表现亦与成人不同。Savino和Castagno<sup>[6]</sup>通过对专用母乳(breast fed,BF)和配方奶(formula fed,FF)喂养的婴儿(年龄:13~90 d)FCP的检测发现,BF组FCP中位数水平(555.00  $\mu\text{g}/\text{g}$ )明显高于FF组(206.60  $\mu\text{g}/\text{g}$ )。表明喂养方式影响FCP的浓度,但是这种影响机制有待更深入的研究。而一项对刚出生至出生1个月新生儿FCP的动态检测发现,无论是否患有过敏性疾病,受试者出生时和出生一个月时FCP并无显著变化,但其水平高于健康成人。FCP作为新生儿胃肠疾病诊断标志物的临床意义并不显著<sup>[7]</sup>。但是对于早产儿而言,高水平表达的FCP与肠道细菌的形成有关<sup>[8]</sup>。

国外亦有研究显示,正确的FCP试验与儿童IBD有密切的相关性。Sipponen和Kocho<sup>[9]</sup>对儿童临床静止期IBD患者的调查显示,FCP与患者的临床症状与临床评估的相关性较差,但是在IBD患者维持治疗期间,如果FCP表达低水平,则在随后的一年患者处于临床缓解期的可能性很大,而功能性胃肠病患者FCP水平在正常范围之内<sup>[10]</sup>。

**3.3 心肌梗死** 心肌梗死是心肌的缺血性坏死。在中国,近年来发病率呈上升趋势。Katashima等<sup>[11]</sup>对55例急性心肌梗死(acute myocardial infarction,AMI)患者和16例不稳定型心绞痛(unstable angina pectoris,UAP)患者血清CP水平进行研究发现,AMI患者血清CP在急性发作期第1天高于[(1118±115) $\text{ng}/\text{mL}$ ]UAP患者[(787±147) $\text{ng}/\text{mL}$ ],且在第3~5天达到峰值,显著高于UAP组。AMI组CP峰值水平与血细胞和中性粒细胞数、肌酸激酶同工酶(CK-MB)及C反应蛋白(CRP)峰值水平成正相关。且免疫双染色显示,中性粒细胞和巨噬细胞特异性表达CP是AMI发生的病理生理学基础,可以作为AMI局部炎性反应随访的生物学指标。

另一项关于血浆CP与经皮冠状动脉介入治疗(primary percutaneous coronary intervention,pPCI)ST段抬高性心肌梗死(ST segment elevation myocardial infarction,STEMI)患者死亡率相关性的研究显示<sup>[12]</sup>,STEMI患者血浆CP显著高于42名健康者( $P<0.01$ ),而且13名STEMI死者(中位随访时间为12个月)血浆CP高于STEMI幸存者。调整年龄、性别、复杂损伤和CK-MB峰值之后的多元比例风险回归分析显示,CP每升高10  $\mu\text{g}/\text{L}$ ,死亡的相对危险是1.26(95%CI:1.1~

1.4),此外,血浆CP>177  $\mu\text{g}/\text{L}$ 的患者死亡相对危险是11.11(95%CI:2.2~56.0, $P=0.004$ )。研究结果表明,入院时已确诊为STEMI并经pPCI成功治疗的患者血浆CP水平可以预示12个月的死亡率,能够作为一个新的重要的预测急性缺血性心脏病的生物学指标。

**3.4 类风湿性疾病和结缔组织病** 类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis,RA)是一个累及周围关节为主的多系统性炎症性的自身免疫病,是导致人群丧失劳动力和致残的主要因素之一。Hammer等<sup>[13]</sup>对124名RA患者的研究发现,血浆CP水平正常者其关节损伤也较轻,其水平变化与RA关节损伤级别、血清学指标(抗环瓜氨酸肽抗体、类风湿因子-免疫球蛋白A型、类风湿因子免疫球蛋白-M型)、炎症性指标(CRP,血细胞沉降率)具有较好的相关性。这与Hammer等<sup>[14]</sup>的另一项纵向研究结果相吻合。因而,CP可以作为一项独立的指标预示10年后射线照相联合损伤程度,且CP是RA患者糜烂性疾病的生物学指标。

而另一种常见的慢性多系统损害性自身免疫病——系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus,SLE),多发生于育龄期妇女,严重影响患者的劳动能力和生命质量。因此,其早期诊断和鉴别诊断显得尤为重要。Soyfoo等<sup>[15]</sup>对噬菌体特异性CP水平在SLE患者恶化和感染时的变化进行研究,结果显示,SLE组CP水平[(1412±664) $\text{ng}/\text{mL}$ ]显著高于健康对照组[(339±35) $\text{ng}/\text{mL}$ ]和原发性干燥综合征组[(400±85) $\text{ng}/\text{mL}$ ],且其感染或恶化时CP水平较无感染/恶化时明显升高。因此,血浆CP水平变化能够作为SLE疾病活动性指标,且与SLE患者感染密切相关,可用于指导临床的诊断和治疗。

#### 4 展望

CP是一种重要的炎性反应蛋白,主要来自于嗜中性粒细胞、巨噬细胞和上皮细胞,具有多种生物学功能,可作为炎性疾病标志物,对临床多种疾病的诊断和鉴别诊断、预测复发、监测疗效、跟踪随访等方面具有重要作用。但由于CP水平受多种因素的影响,如药物、年龄等,使其在临床中的应用受到了限制,有待去除影响因子后的进一步研究。CP还可与其他标志物(CRP、血细胞沉降率、类风湿因子等)联合应用,但其联合应用的价值有待更深入的研究。

#### 参考文献

- [1] Patrick F Van Rheenen, Els Van de Vijver, Vaclav Fidler, et al. Faecal calprotectin for screening of patients with suspected inflammatory bowel disease: diagnostic meta-analysis[J]. BMJ, 2010, 341:c3369.
- [2] Meucci G, Dlncă R, Maierov R, et al. Diagnostic value of faecal calprotectin in unselected outpatients referred for colonoscopy: a multicenter prospective study[J]. Dig Liver Dis, 2010, 42(3):191~195.
- [3] Caccio R, Dlncă R, Sturniolo GC. Clinical utility of calprotectin and lactoferrin as markers of inflammation in patients with inflammatory bowel disease[J]. Expert Rev Immunol, 2010, 6(4):551~558.
- [4] Montaldo M, Gallo A, Laniro G, et al. Can chronic gastritis cause an increase in fecal calprotectin concentrations? [J]. World J Gastroenterol, 2010, 16(27):3406~3410.
- [5] Bealer JF, Colgin M. S100A8/A9: a potential new diagnostic aid for acute appendicitis[J]. Acad Emerg Med, 2010, 17(3):333~336.
- [6] Savino F, Castagno E. High faecal calprotectin levels in healthy,

- exclusively breast-fed infants[J]. Neonatol, 2010, 97(4):299-304.
- [7] Maria E, Baldassarre, Fanelli M, et al. Fecal calprotectin (FC) in newborns; is it a predictive marker of gastrointestinal and/or allergic disease? [J]. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2010, 33(1):220-223.
- [8] Roug'e C, Butel MJ, Piloquet H, et al. Fecal Calprotectin Excretion in Preterm Infants during the Neonatal Period [J]. PLoS ONE, 2010, 5(6):e11083.
- [9] Sipponen T, Kolho KL. Faecal calprotectin in children with clinically quiescent inflammatory bowel disease[J]. Scand J Gastroenterol, 2010, 45(7/8):872-877.
- [10] Flagstad G, Helgeland H, Markestad T. Faecal calprotectin concentrations in children with functional gastrointestinal disorders diagnosed according to the pediatric Rome III criteria[J]. Acta Paediatrica, 2010, 99(5):734-737.
- [11] Katashima T, Naruko T, Fujita M, et al. Enhanced expression of the S100A8/A9 complex in acute myocardial infarction patients [J]. Circ J, 2010, 74(4):741-748.
- [12] Jensen LJ, Pedersen S. Plasma calprotectin predicts mortality in

patients with ST segment elevation myocardial infarction treated with primary percutaneous coronary intervention[J]. J Interventional Cardiol, 2010, 23(2):123-129.

- [13] Hammer HB, Qdegard S, Syversen SW. Calprotectin (a major S100 leucocyte protein) predicts 10-year radiographic progression in patients with rheumatoid arthritis[J]. Ann Rheum Dis, 2010, 69(1):150-154.
- [14] Hammer HB, Haavardsholm EA, Kvien TK. Calprotectin(a major leucocyte protein) is associated with the levels of anti-CCP and rheumatoid factor in a longitudinal study of patients with very early rheumatoid arthritis[J]. Scand J Rheumatol, 2008, 37(3): 179-182.
- [15] Soyfoo MS, Roth J, Vog T, et al. Phagocyte-specific S100 A8/A9 protein levels during disease exacerbations and infections in systemic lupus erythematosus[J]. J Rheumatol, 2009, 36(10):2190-2194.

(收稿日期:2011-02-17)

## · 综述 ·

# 类风湿关节炎自身抗体类风湿因子与抗瓜氨酸化蛋白抗体关系的研究进展

刘彦虹, 卢秀敏 综述, 高飞 审校

(哈尔滨医科大学附属第二医院检验科 150086)

**关键词:** 关节炎, 类风湿; 自身抗体; 抗瓜氨酸化蛋白抗体

**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.09.024

**文献标识码:**A

**文章编号:** 1673-4130(2011)09-0973-03

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种常见的高发病及高致残性的炎症性自身免疫病,病理表现为慢性滑膜炎,侵及下层的软骨和骨,造成关节破坏。早期诊断、早期治疗是阻止病情发展和减少致残率的关键。因此,临幊上迫切需要有助于RA早期诊断,而且能够预示病情进展、观察疗效的无创性实验室指标。20世纪40年代,有学者先后在RA患者血清中发现了类风湿因子(rheumatoid factor, RF),找到了诊断RA的“金标准”<sup>[1]</sup>。近些年来,抗瓜氨酸化蛋白抗体(anticitrullinated protein antibodies, ACPAs)系列的发现是RA诊断领域新的里程碑。

## 1 RF

RF是针对IgG Fc段抗原表位的一类自身抗体,在RA中的阳性率高达75%,但其特异性差,在其他自身免疫性疾病,如系统性红斑狼疮、干燥综合征、多种感染性疾病甚至正常人血清中也都检测到(健康人群阳性率3%~5%,老年人10%~30%)<sup>[2]</sup>。检测RF阴性不能排除RA,阳性则要结合临床症状进行诊断。

RF有IgG、IgA、IgM等亚型,IgA RF、IgG RF在RA患者血清中出现有一定规律,IgA RF、IgG RF很少单独出现,而总是伴有IgM RF含量的升高<sup>[3]</sup>。3种RF同时升高较单独一型升高的患者病情严重,在RA多关节受累的患者IgM RF、IgA RF显著增高,RA患者关节受累个数与IgM RF、IgA RF水平的高低正相关,另外当患者血清中同时有高含量的IgM RF、IgA RF时,其病情进展快,易发生骨侵蚀和骨破坏,而血清中IgM RF、IgG RF含量持续增高则是预后不良的表现<sup>[4]</sup>。

Bobbio-Pallavicini等<sup>[5]</sup>研究发现RA患者在使用英夫利昔单抗和抗风湿药联合治疗时,IgM RF、IgA RF滴度显著地下降,但IgG RF没有变化。Bos等<sup>[6]</sup>选取188名RA患者使用阿达木单抗进行治疗,结果显示,IgM RF滴度下降并伴随血细胞沉降率和C-反应蛋白水平下降,因此,IgM RF可作为炎症活动的标志物。

## 2 ACPAs

自从1964年证实抗核周因子(APF)是RA的特异性抗体并可在疾病早期出现后,又陆续发现抗角蛋白抗体(AKA)、抗聚角蛋白微丝蛋白抗体(AFA)以及抗Sa抗体都对RA诊断具有较高特异性,上述抗体在化学结构上具有相关性,他们的表位都含有瓜氨酸,故称之为抗瓜氨酸化蛋白抗体,在RA的发病及发展中起作用。新近发现的ACPAs包括抗环瓜氨酸肽抗体(抗CCP抗体)、抗瓜氨酸化纤维蛋白原抗体(ACF)、抗突变型瓜氨酸化波形蛋白抗体(抗MCV抗体)等。

2000年国外首次报道根据聚丝蛋白(filaggrin)的cDNA序列合成一条含瓜氨酸的环肽(cyclic citrullinated peptide, CCP)并用于ELISA检测,发现其对RA诊断特异性为98%,敏感性是68%,可视为RA新的血清标志物。抗CCP抗体阳性是侵蚀性关节损害的一个重要标志及危险因素,联合检测IgM RF和抗CCP抗体能够提高RA的诊断水平<sup>[7]</sup>。研究证实抗CCP抗体对RA诊断有极高的特异性,尤其在疾病早期或RF阴性的RA患者中。抗CCP抗体除早期诊断外,对疾病的预后评估也有重要意义<sup>[8]</sup>。Nishimura等<sup>[9]</sup>在其发表的一项Meta分析中指出,抗CCP抗体与IgM RF相比对RA诊断