

· 临床检验研究 ·

类风湿关节炎患者血清转甲状腺素蛋白化学修饰的蛋白质组学分析

黄玉佳

(广东省深圳市宝安区福永人民医院 518103)

摘要:目的 探讨血清转甲状腺素蛋白(TTR)水平的变化规律和不同的修饰类型在类风湿关节炎(RA)早期诊断中的临床价值。方法 采用前瞻性开放研究,采用酶联免疫吸附试验(ELISA)测定 RA 早期、RA 中、晚期和骨性关节炎(OA)患者及健康体检者(对照组)血清中 TTR 的含量;采用基质辅助激光解吸离子化飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)技术测定血清中 TTR 蛋白的化学修饰类型和比例。结果 RA 早期患者血清中的 TTR 含量与对照组比较差异有统计学意义($t=4.57, P<0.05$);TTR 的修饰比例在 RA 早期组和中晚期组中各不相同,与文献报道相符,说明其随着病情的变化而变化。结论 RA 患者早期血清中 TTR 含量的增高,TTR 的修饰比例随着病情的变化而变化,均提示 TTR 可以作为 RA 早期诊断的潜在指标。

关键词:关节炎,类风湿; 前白蛋白; 分析

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.21.013

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)21-2454-02

Proteomic analysis of chemically modified transthyretin in patients with rheumatoid arthritis

Huang Yujia

(Fuyong People's Hospital of Baoan District, Shenzhen, Guangdong 518103, China)

Abstract: Objective To explore the changes of serum transthyretin(TTR) and the clinical value of different chemically modified TTR for the early diagnosis of rheumatoid arthritis(RA). **Methods** Prospective opening research was performed. Serum levels of TTR of patients with early RA, medium and late RA or osteoarthritis(OA), and healthy controls were determined by enzyme linked immunosorbent assay(ELISA). Type and ratio of different chemically modified TTR were detected by matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). **Results** Serum level of TTR in patients with early RA was higher than control group($t=4.57, P<0.05$). Patients with early or medium and late RA were with different ratio of modified TTR. **Conclusion** Serum level of TTR in patients with early RA could increase and ratio of different modified TTR could change with the progress of disease condition, indicating TTR could be used for the early diagnosis of RA.

Key words: arthritis, rheumatoid; prealbumin; analysis

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA),是目前公认的一种自身免疫性疾病,其病因尚未明了,其临床表现主要为慢性全身性炎症性疾病,以慢性、对称性、多滑膜关节炎和关节外病变为主,是临床上的一种常见病、多发病,好发于手、腕、足等小关节;发病性质为反复发作、呈对称性分布、伴随产生类风湿因子。大量流行病学研究表明,本病可能与内分泌、营养、地理、环境的差异、微生物的感染及遗传因等多种因素相关。本病早期无明显的临床症状或体征,因此给早期的诊断和治疗带来了困扰。且研究表明,在早期对本病患者采取有效的治疗措施,能取得更好的效果。因此,研究更多关于本病早期的诊断指标具有重要的意义。最近有报道称血清转甲状腺素蛋白(transthyretin, TTR)在 RA 患者早期血清中含量升高^[1], TTR 是一种主要由肝细胞合成的蛋白质,提示血清 TTR 可作为 RA 早期诊断的潜在指标^[2]。蛋白质组学(proteomics)由 Marc Wilkins 在 1995 年提出的一门新学科,是阐明生物体各种生物基因组在细胞中表达的全部蛋白质的表达模式及功能模式的学科。本研究采用前瞻性开放研究,探讨了血清 TTR 水平变化的规律和不同的修饰类型在 RA 早期诊断中的临床价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2009 年 1 月至 2010 年 12 月在本院共收集 40 例 RA 患者,年龄 30~76 岁,平均(54.3±4.6)岁,其中男

18 例,女 22 例;按病情的轻重分为早期和中晚期,早期 20 例,病程在一年之内,中晚期 20 例,病程大于 2 年。另外收集 35 例骨性关节炎(OA)患者,年龄 58~86 岁,平均(67.2±5.5)岁;以上患者均根据各自的诊断及分类标准确认为 RA 和 OA。与此同时,选择 35 例健康体检者作为对照组。

1.2 入选标准 (1)在本院风湿免疫科就诊的住院患者;(2)以上病例均确认为 RA 和 OA。排除标准:(1)合并心力衰竭、肾功能不全等其他严重的全身性疾病;(2)患有其他严重的急性或慢性疾病;(3)患有精神性疾病等严重影响研究进程的疾病。

1.3 检测方法^[3]

1.3.1 TTR 含量的检测 采用 ELISA 法检测 TTR 的含量。采用 96 孔 ELISA 双抗夹心法检测血清中 TTR 的含量。将血清用样本稀释缓冲液稀释 2 000 倍,每孔加入 50 μL,室温孵育 30 min,然后用 1×磷酸缓冲液(PBS)洗涤 5 次,每次 30 s。加入酶结合物室温孵育 30 min 后,用 PBS 洗涤 5 次,然后在 37℃避光显色 15 min,之后加入 50 μL 终止液终止反应,在 450 nm 波长测定吸光度值。

1.3.2 TTR 化学修饰的测定 采用 MALDI-TOF-MS 测定患者的 TTR 化学修饰,选取 4 组患者血清样本各 6 份,吸取血清 100 μL,加入适量兔抗人前白蛋白混匀后,4℃冰箱静置过夜。生理盐水充分洗涤后加入适量醋酸混合,进行 MALDI-

OF-MS 分析, 获得由不同 m/z 的蛋白峰构成的质谱图。

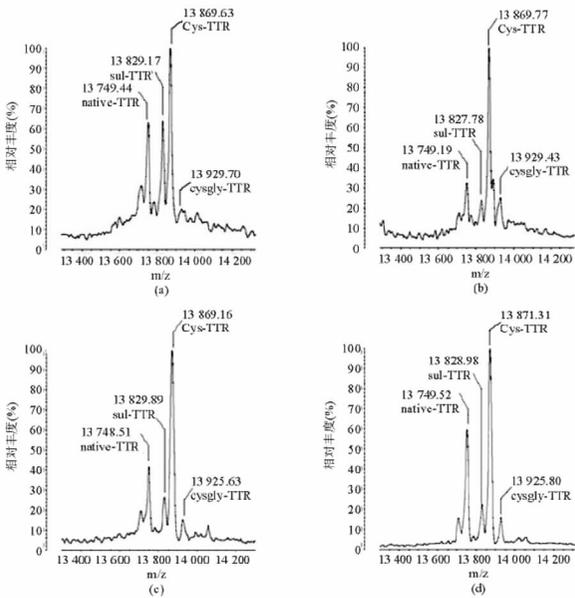
1.4 统计学处理 采用 SPSS18.0 统计软件进行统计学分析, 计量资料两者之间的比较采用 t 检验, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结 果

2.1 血清 TTR 含量的比较 经过 ELISA 法分别测定 RA 早期、RA 中晚期和 OA 组患者及对照组患者血清中 TTR 的含量, 各组患者的含量各不相同, 将 RA 早期、RA 中晚期、OA 组患者血清中的 TTR 含量分别与对照组进行比较, 经 t 检验后, RA 早期患者血清中的 TTR 含量与对照组相比差异有统计学意义 ($t=4.57, P<0.05$); RA 中晚期及 OA 组患者血清中的 TTR 含量与对照组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$), 详见表 1。

表 1 RA 早期、RA 中晚期、OA 组患者血清中 TTR 含量与对照组的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	TTR 含量(mg/L)	t 值	P 值
RA 组	40	458.26±100.58		
早期	20	510.04±104.28	4.57	<0.05
中晚期	20	441.79±92.37	0.89	>0.05
OA 组	35	378.25±102.46	1.16	>0.05
对照组	35	430.58±113.42		



(a): RA 早期; (b): RA 中晚期; (c): OA 组; (d): 对照组。

图 1 4 种类型的 TTR 蛋白峰

2.2 TTR 蛋白的化学修饰 经 MALDI-TOF-MS 质谱图分析结果显示, 各组均发现 4 种类型的 TTR 蛋白峰, 详见图 1。处理后, 分别对应野生型 TTR (native TTR)、磺化 TTR (sul-TTR)、半胱氨酸化 TTR (cys-TTR) 和半胱氨酸甘氨酸化 TTR (cysgly-TTR)。将上述各组 4 种类型 TTR 所占的比例与对照组进行比较, 20 例 RA 早期患者中有 18 例 (90%) cys-TTR 化学修饰比例下降, 10 例 (50%) sul-TTR 修饰比例升高, 结果提示 TTR 修饰比例在 RA 早期组与中晚期组之间发生改变。

3 讨 论

RA 是一种慢性反复发作的全身关节炎症性改变的疾病, 目前公认本病是一种自身免疫性疾病。本病的主要临床症状及体征以慢性、多滑膜关节炎和关节外病变为主, 好发于手、腕、足等小关节, 反复发作, 呈对称性分布。早期无明显的改变, 可出现关节红肿热痛, 中晚期患者病情较严重, 关节可出现不同程度的僵硬畸形, 并伴有骨和骨骼肌的萎缩, 极易致残。目前, 对 RA 病因尚不明确, 多认为是多种因素综合作用的结果, 如环境、病毒、遗传、激素等。本病的诊断主要根据患者的临床症状、体征及实验室检查, 如类风湿因子 (RF)、X 片, 但本病早期 X 线检查无破坏性改变, 不易发现, 属于晚期诊断指标。且 RF 阳性率只占 RA 的 70% 左右, 可出现假阳性或假阴性的现象, 给诊断带来很大的困扰。

TTR 是有肝细胞合成, 在正常人的血清中含量稳定, 一旦发生感染, 其血清含量逐渐降低^[4]。本文通过 ELISA 法检测患者血清中 TTR 的含量, 与此同时, 采用免疫沉淀结合 MALDI-TOF-MS 的方法分析了 4 组患者 TTR 蛋白的化学修饰的结果, 结果显示, RA 早期患者血清中的 TTR 含量与对照组比较差异有统计学意义 ($t=4.57, P<0.05$); TTR 的修饰比例在 RA 早期组和中晚期组各不相同, 与文献报道相符^[5], 说明其随着病情的变化而变化。化学修饰通过添加或去除蛋白质或核酸等分子上的某些功能基团而改变酶、蛋白质或基因活性的过程。

综上所述, RA 患者早期血清中 TTR 含量的增高, TTR 的修饰比例随着病情的变化而变化, 均提示 TTR 可以作为 RA 早期诊断的潜在指标, 其广泛的临床应用, 还需更多研究进行验证说明。

参考文献

- [1] Marchi N, Mazzone P, Fazio V, et al. ProApolipoproteinA1: a serum marker of brain metastases in lung cancer patients[J]. Cancer, 2008, 112(6): 1313-1324.
- [2] Qiu JG, Fan J, Liu YK, et al. Screening and detection of portal vein tumor thrombi-associated serum low molecular weight protein biomarkers in human hepatocellular carcinoma[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2008, 134(3): 299-305.
- [3] 冯强, 孙续国, 张福江, 等. 类风湿关节炎患者血清转甲状腺素蛋白化学修饰的蛋白质组学分析[J]. 检验医学, 2011, 26(3): 185-186.
- [4] Bernstein LH. The systemic inflammatory response syndrome C-reactive protein and transthyretin conundrum[J]. Clin Chem Lab Med, 2007, 45(11): 1566-1567.
- [5] 赵辉, 刘金平, 郑芳, 等. 家族性淀粉样多发性神经性损害转甲状腺素的化学修饰[J]. 第四军医大学学报, 2008, 29(10): 883-885.

(收稿日期: 2011-07-18)