

• 临床检验研究论著 •

类风湿性关节炎滑膜组织 PADI4 的表达*

孙 涛, 李 燕, 李向东, 孟庆松

(山东省千佛山医院, 济南 250014)

摘要: 目的 研究类风湿关节炎(RA)、骨关节炎(OA)和强直性脊柱炎(AS)滑膜液中肽酰基精氨酸脱亚胺酶 4(PADI4)的表达。方法 收集 RA($n=73$)、OA($n=96$)和 AS($n=32$)滑膜液标本及 RA($n=6$)、OA($n=6$)和 AS($n=32$)关节滑膜标本, 应用酶联免疫吸附法(ELISA)和蛋白印迹分析的方法检测滑膜液中 PADI4 蛋白表达, 应用实时定量 PCR 比较 RA、OA 和 AS 患者滑膜中 PADI4 的 mRNA 表达, 并研究抗环瓜氨酸肽(CCP)抗体和类风湿因子(RF)、C 反应蛋白(CRP)与 PADI4 的相关性。结果

RA 患者滑膜液中 PADI4、抗 CCP 抗体、RF 含量较高, OA、AS 患者滑膜液中 PADI4、抗 CCP 抗体、RF 含量无明显改变, RA 患者与 OA、AS 患者比较差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 以上结果证实 RA 患者滑膜中 PADI4 表达较高, PADI4 在 RA 发病过程中发挥作用, PADI4 的表达水平可能与一些临床表现有关。

关键词: 关节炎, 类风湿; 肽酰基精氨酸脱亚胺酶 4; 滑膜; 类风湿因子; 抗环瓜氨酸肽抗体

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.16.003

文献标识码:A

文章编号: 1673-4130(2012)16-1925-03

Expression of PADI4 in synovial tissue of rheumatoid arthritis*

Sun Tao, Li Yan, Li Xiangdong, Meng Qingsong

(Shandong Provincial Qianfoshan Hospital, Jinan, Shandong 250014, China)

Abstract: Objective To study (peptidylarginine deimine-nase 4, PADI4) expression in synovial fluid of rheumatoid arthritis (RA), osteoarthritis (OA) and ankylosing spondylitis (AS). **Methods** Synovial specimens were collected from RA($n=73$), OA($n=96$) and AS($n=32$) patients. PADI4 levels were detected by using ELISA and western blotting methods. Real time PCR was used to compare synovial fluid PADI4 mRNA expression in RA, OA and AS. Relativity of anti-CCP antibody, RF, CRP and PADI4 was studied. **Results** PADI4, anti-CCP antibody and RF content were higher in synovial fluid of RA patients, which were no obvious change in OA and AS patients. There was a significant difference in RA, OA and AS patients ($P<0.05$). **Conclusion** PADI4 expression was higher in synovial fluid of RA patients. PADI4 plays a role in the pathogenesis of RA and PADI4 expression level may be associated with some clinical manifestations.

Key words: arthritis, rheumatoid; peptidylarginine deimine-nase 4; synovial membrane; rheumatoid factor; anti-citrullinated peptide antibodies

肽酰基精氨酸脱亚胺酶(peptidylarginine deimine-nase, PADI)翻译后转化肽精氨酸为瓜氨酸, 这一过程叫为瓜氨酸化^[1]。最近遗传学研究发现 PADI4, 是 PADI 基因家族的一个成员, 位于染色体 1p36, 在日本、韩国和德国人群中能使易感者患类风湿关节炎(RA)^[1-3]。许多研究表明 PADI 在 RA 发病中起重要的作用, RA 是一种以慢性破坏性关节炎为特征的自身免疫疾病, 是在关节组织的慢性炎症^[2]。Vossenaar 等^[4]在分叶核中性粒细胞浸润到胶原诱导关节炎(CIA)鼠滑膜组织中, 鉴别出 PADI4 mRNA 和蛋白表达。Lundberg 等^[5]在 CIA 鼠炎症关节组织检测到 PADI4 和瓜氨酸蛋白。为了进一步了解 PADI4 和疾病活动的关系, 笔者对滑膜液标本进行了抗环瓜氨酸肽(CCP)抗体和类风湿因子(RF)、C 反应蛋白(CRP)检测; 定量比较了 RA 滑膜和骨关节炎组织 PADI4 mRNA 水平, 并以强直性脊柱炎(AS)为对照, 旨在清楚地了解 PADI4 在 RA 滑膜组织的表达。

1 资料和方法

1.1 一般资料 滑膜液和滑膜组织标本选自山东省千佛山医院 2007 年 6 月至 2010 年 8 月骨关节中心住院的 RA 患者 73 例, 其中男 29 例, 女 44 例, 年龄 22~73 岁, 平均年龄 47 岁, 病程 3~10 年, 收集有严重的关节炎症变化、骨关节炎(OA, $n=96$)和强直性脊柱炎(AS, $n=32$)患者滑膜液标本。标本从关节炎患者炎症关节吸出, 10 000 g 离心 10 min 后, 去除碎片,

收集 RA($n=6$)、OA($n=6$)和 AS($n=32$)关节形成术患者滑膜标本。捐赠滑膜标本的 RA 患者病程 3~10 年, 分类为侵蚀性 RA, CRP 含量较高(30~100 mg/L), 抗 CCP 抗体(300~3 000 U/mL), RF(160~2 560 U/mL)。所有 RA 患者符合美国风湿病协会(ACR)1987 年修订的分类诊断标准^[6], AS 患者均符合 1984 年修订的纽约诊断标准^[7], OA 患者诊断均符合 1987 年美国风湿病学会推荐的膝骨关节炎诊断标准^[8]。另外, 2 例滑膜液及滑膜标本收集于健康车祸截肢患者, 做正常滑膜组织的校准。同时采集上述患者静脉血 3 mL 分离血清。上述标本置于-80 °C 储存待测。

1.2 滑膜标本 PADI4 含量测定 采用 ELISA 方法。1 mL 滑膜液标本稀释 50 倍于 0.05 mol/L 碳酸盐-重碳酸盐缓冲液(pH 9.6)。200 mL 稀释液分加于 96 微孔板上(Costar, 美国), 4 °C 过夜孵育。经过 3 遍 PBS 洗板(每升含 8 g NaCl、0.2 g KCl、1.15 g NaHPO₄ 和 0.2 g KH₂PO₄, pH 7.4~7.6)含 0.1% 吐温 20(PBST), 微孔用 5% 不含脂肪的牛奶室温封闭 1 h。抗体从合成寡肽免疫兔子获得, 这些寡肽(FGD-SCYPSNDSRQMH)只针对 PADI4 氨基酸序列, 并非其他 PADI 成分。PBST 洗板 3 遍后, 微孔用稀释 15 000 倍的抗兔 IgG 碱性磷酸酶结合抗体(货号: A3687, Sigma, 美国)室温孵育 30 min。接着 PBST 洗板 3 遍, 加入碱性磷酸酶黄色底物液体显色(货号: A3469, Sigma, 美国)。用酶标仪 405 nm 波长测定吸

* 基金项目: 山东省自然基金资助项目(Y2007C160)。

光度(Synergy HT, Bio-Tek, 美国)。抗 PADI4 抗体的免疫特性在以前的研究中被鉴定^[9-12]。为了证实 ELISA 中抗 PADI4 抗体的特异性, 抗体用合成寡肽在 37 °C 孵育 2 h, 然后加入微孔来代替抗 PADI4 抗体, 这个过程中没有免疫吸光度。滑膜液标本抗 CCP 抗体用 ELISA 试剂盒操作测定(Euro-Diagnostica AB, 瑞典)。测定前 1 mL 滑膜液标本用稀释液稀释 50 倍。微孔中加入 CCP 和 100 μL 稀释液室温孵育 1 h。然后洗板去除未结合抗体和其他成分, 人 IgG 碱性磷酸酶结合抗体加入微孔中第 2 次室温孵育 30 min。再次洗板, 用底物液室温孵育 30 min。抗体含量和颜色深度有关, 并测定吸光度。

1.3 免疫沉淀反应和蛋白印迹分析 RA(n=6)、OA(n=6) 和 AS(n=32) 患者滑膜标本 200 μg SF 标本在细胞溶解液(Sigma)中均匀溶解, 16 000 g 4 °C 离心 5 min。收集上清液, 蛋白浓度用 BCA 蛋白分析试剂盒(Pierce, 美国)测定。免疫沉淀(IP)反应用蛋白 G IP 试剂盒(Sigma)根据试剂说明操作。每份标本一定量的溶解产物在蛋白酶抑制剂(Sigma)存在的情况下, 和 PADI4 抗体 4 °C 孵育过夜。试剂盒提供的蛋白 G 加入混合物中 4 °C 孵育 2 h。充分洗板后, PADI4 用 1 倍 Laemmli 样本缓冲液洗涤(Sigma)。用 SDS-PAGE 分离 10 μL IP 样本, 然后用 Mini-PROTEAN3 (Biorad, 美国) 转移到 PVDF 膜上。人 PADI4 残留物 2-111 重组片段制成的 PADI4 单克隆抗体用来印迹检测(货号: ab57167, Abcam, 美国), 后用结合碱性磷酸酶羊抗鼠 IgG 杂交(Sigma)。根据试剂说明, 用 BCIP/NBT 蛋白印迹试剂盒(KPL, USA)检测蛋白。

1.4 实时定量 PCR RA(n=6)、OA(n=6) 和 AS(n=32) 患者滑膜标本用 Trizol 试剂(Invitrogen)提取总 RNA。用分光光度计测定总 RNA 浓度。根据试剂说明的要求, 应用 Prime-Script RT-PCR 试剂盒(TaKaRa), 通过随机六聚物的方法, 每一样本取 1 μg 总 RNA 反转录制备 cDNA。PADI4 特异性寡核苷酸上游引物为(5'-GAC TTC AAC GGG CTC ATT C-3'), 下游引物为(5'-GGA CCG ATG ACT CGT TTG A-3'), 这是根据基因库(NM012387)中 mRNA 序列设计的。管家基因 β-actin 上游引物为(5'-TGG CAC CCA GCA CAA TGA A-3'), 下游引物为(5'-CTA AGT CAT AGT CCG CCT AGA AGC A-3')。实时定量 PCR 最终在毛细管中反应体积为 20 μL, 仪器为 LightCycler 2.0(Roche Diagnostic, 德国)。反应混合物包括 2 μL LightCycler FastStart SYBR Green I DNA 反应试剂(Roche Diagnostic), 0.5 mol/L 上下游引物, 4 mmol/L MgCl₂ 和 2 μL 模板 cDNA。PCR 应用下列程序: 开始 95 °C 5 min 激活聚合酶, 后 95 °C 15 s 40 个循环, 最后 60 °C 1 min。阴性对照除模板 DNA 外包括反应混合物中的所有成分。每个样本 PCR 反应做 3 次。证实 PDAI4 和 β-actin cDNA 是以同样的效率扩增后, PADI4 mRNA 相对定量表达按照制造商的描述应用比较 Ct 的方法计算。目的基因的相对定量, 和管家基因规范化并和校准比较, 目的基因表达为 $2^{\Delta\Delta Ct}$, ΔCt =目的基因 Ct-管家基因 Ct。 $\Delta\Delta Ct$ =目的样本基因 Ct-目的基因校准 Ct。

正常滑膜组织 PADI4 的表达作为 RA、OA 和 AS 滑膜组织的校准。引物效率通过稀释一系列标准 PCR 反应产物来测定。PCR 效率根据稀释曲线通过仪器软件自动计算。引物特异性根据凝胶电泳和熔解曲线分析来测定。

1.5 其他实验指标 用散射免疫比浊方法检测 RF 及 CRP, 用 DadeBehring BNP 全自动蛋白分析仪(美国)测定, 试剂为仪器配套进口试剂。

1.6 统计学处理 统计分析应用 SPSS 11.0。滑膜液标本中

PADI4、RF、抗 CCP 抗体表达水平用均数和标准差表示。组间差异统计分析用 Mann-Whitney U 检验。滑膜液标本的 PADI4、RF 和抗 CCP 抗体的相关表达, 还有它们和血液中 ESR、PCT、WBC、CRP 和 RF 关系分析用 Spearman 等级相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 本组检测了滑膜液标本中 PADI4、RF 和抗 CCP 抗体水平。相比较于 OA 和 AS 样本, 在 RA 患者中 PADI4、抗 CCP 抗体和 RF 显著升高($P < 0.01$); OA 和 AS 患者滑膜液标本中 PADI4、RF 和抗 CCP 抗体表达水平没有明显差异($P > 0.05$)。RA 组中, PADI4 与 RF 显著相关($P = 0.015$), 与抗 CCP 抗体相关性无统计学意义。但 RA 组中抗 CRP 抗体水平与血清 CRP 和血清 RF 水平差异有统计学意义($P < 0.05$), 而 PADI4、RF 水平与血液中 WBC、ESR、PCT、CRP、RF 的差异均无统计学意义($P > 0.05$)。OA 和 AS 组中 PADI4、RF、抗 CCP 抗体水平差异无统计学意义($P > 0.05$), 见表 1。

表 1 滑膜液标本中 PADI4、RF 和抗 CCP 抗体水平

病例	PADI4 (OD 值)	RF (U/mL)	抗 CCP 抗体 (U/mL)
RA(n=73)	1.32±0.06*	125.72±29.31*	814.22±65.84*
OA(n=96)	0.53±0.02	15.6±1.85	137.83±22.41
AS(n=32)	0.74±0.06	18.67±8.74	125.67±22.65

*: 相比较于 OA 和 AS, RA 患者中 PADI4、RF 和抗 CCP 抗体显著升高($P < 0.01$)。

2.2 IP 后蛋白印迹, RA、OA、AS 患者滑膜标本中 PADI4 抗体检测到一个 67×10^3 的片段(见图 1)。

RA 患者 SF 中免疫信号的密度比 OA 和 AS 样本中的要强。所有的样本显示同样的表达。虽然同样数量的总蛋白用同样的程序处理, 可能蛋白样本在 IP 中丢失。所以免疫信号密度不能准确代表 SF 样本中 PADI4 水平的表达。但是, 蛋白印迹结果证实了滑膜标本中 PADI4 的表达并支持 ELISA 结果。

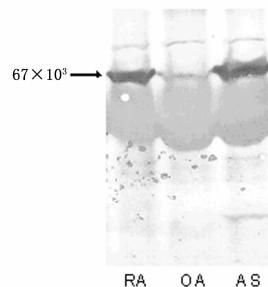


图 1 RA、OA、AS 蛋白印迹片段图

用 β-actin 作为参考, 实时定量 PCR 检测到 RA 患者滑膜标本 PADI4 表达增加, RA 患者标本比 OA 患者标本中的表达高 3 倍($P = 0.002$), 比 AS 患者样本也明显高($P = 0.03$)。这些结果和 ELISA 结果相符合。PCR 效率是 0.99。熔解曲线单个峰出现在 88 °C, 凝胶电泳中可见 1 条片段, 提示 PCR 引物的特异性。

3 讨 论

Chang 等^[9]在 RA 滑膜中检测到 PADI4 和瓜氨酸的表达, 并检测到 PADI4 在 RA 滑膜的高转录, 这些结果表明 PADI4 在 RA 滑膜的表达增加, 这就相应地发现某些人群中 PADI4 和 RA 的特异联系。Cha 等^[10]通过分析了 311 例非侵蚀性和侵蚀性 RA 患者血样证实了抗 CCP 抗体水平与 PADI4 单元型存在关系, 他们发现携带 PADI4 疾病单元型的患者的抗

CCP 抗体表达水平比不携带疾病单元型的患者的明显增高^[11]。他们还发现 PADI4 疾病单元型与 RA 早期抗 CCP 抗体表达量增高有关。这就暗示着 PADI4 的表达影响了 RA 的早期发病过程。

本组发现 RA 血液中 PADI4 与 RF 以及 PADI4 与抗 CCP 抗体有显著的相关性,由此推测在 RA 变得更严重并转化慢性病过程中, PADI4 和它所催化的瓜氨酸化反应与该过程中的自身免疫反应有关。Takizawa 等^[11]利用重组 PADI4 蛋白进行 ELISA 实验,在 50% 的 RA 患者体内存在大量的抗 PADI4 抗体,暗示在一些 RA 患者中 PADI4 是一种自身抗原。

在临床实践中抗 CCP 抗体和 RF 广泛用来诊断 RA,据报道血液中抗 CCP 抗体和 RF 水平与 RA 患者的关节腐烂和畸形有关^[12-13]。增加的 PADI4 水平还与 RF 和 RA 明显相关,说明 PADI4 的表达和 RA 的临床表现相关,当然这还需要更多关于滑膜液 PADI4 水平和关节畸形 X 线资料的研究。Amo 等^[13]报道具有较高抗 CCP 抗体水平的 RA 患者血清中 CRP 升高,并有更严重的放射性损害,患者抗 CCP 抗体水平和血清中 CRP 值有明显的相关性。他们的结果符合本组关于 RA 患者滑膜液抗 CCP 和血清 CRP 明显相关的发现。

Vossenaar 等^[4]表明在关节炎鼠和人的关节炎症过程中,滑膜液抗原的瓜氨酸可能是一个普遍的过程。但是,本组只在 RA 中检测到 PADI4 水平的表达和 RF 有显著关联,而在 AS 和 OA 样本中没有检测到,这意味着 PADI4 参与 RA 的发病是通过不同的机制。

概括来说,本组在 RA 患者中检测到 PADI4 表达增加,在样本中发现 PADI4 水平和 RF 水平明显相关,也检测到 RA 患者滑膜 PADI4 的转录增加。这些结果符合在一些人群中 PADI4 和 RA 特异性相关的发现。

参考文献

- [1] Suzuki A, Yamada R, Chang X, et al. Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis[J]. *Nat Genet*, 2003, 34(4):395-402.
- [2] Kang CP, Lee HS, Ju H, et al. Functional haplotype of the PADI4 gene associated with increased rheumatoid arthritis susceptibility in Koreans[J]. *Arthritis Rheum*, 2006, 54(1):90-96.
- [3] Hoppe B, Haupl T, Gruber R. Detailed analysis of the variability of peptidylarginine deiminase type 4 in German patients with
- [4] Vossenaar ER, Nijenhuis S, Helsen MM, et al. Citrullination of synovial proteins in murine models of rheumatoid arthritis[J]. *Arthritis Rheum*, 2003, 48(9):2489-2500.
- [5] Lundberg K, Nijenhuis S, Vossenaar ER, et al. Citrullinated proteins have increased immunogenicity and arthritogenicity and their presence in arthritic joints correlates with disease severity[J]. *Arthritis Res Ther*, 2005, 20(4):R458-467.
- [6] 叶任高, 陆再英. 内科学[M]. 6 版. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 885-891.
- [7] van der Linden S, Valkenburg HA, Cats A. Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis: a proposal for modification of the New York criteria[J]. *Arthritis Rheum*, 1984, 27:361-368.
- [8] Altman R, Asch E, Bloch D, et al. Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis: classification of osteoarthritis of the knee[J]. *Arthritis Rheum*, 1986, 29(9):1039-1049.
- [9] Chang X, Yamada R, Suzuki A, Sawada T, et al. Localization of peptidylarginine deiminase 4(PADI4) and citrullinated protein in synovial tissue of rheumatoid arthritis[J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2005, 44(1):40-50.
- [10] Seongwon Cha, Chan-Bum Choi, Tae-Un Han, et al. Association of Anti-Cyclic citrullinated peptide antibody levels with PADI4 haplotypes in early rheumatoid arthritis and with shared epitope alleles in very late rheumatoid arthritis[J]. *Arthritis Rheum*, 2007, 56(5):1454-1463.
- [11] Takizawa Y, Sawada T, Suzuki A, Yamada RT, et al. Peptidylarginine deiminase 4(PADI4) identified as a conformation-dependent autoantigen in rheumatoid arthritis[J]. *Scandinavian Journal of Rheumatology*, 2005, 34(3):212-215.
- [12] Agrawal S, Misra R, Aggarwal A. Autoantibodies in rheumatoid arthritis: association with severity of disease in established RA [J]. *Clin Rheumatol*, 2007, 26(2):201-204.
- [13] N. Del Val Del Amo, R. Ibanez Bosch, C. Fito Manteca, R. Gutierrez Polo, E. Loza Cortina, Anti-cyclic citrullinated peptide antibody in rheumatoid arthritis: Relation with disease aggressiveness [J]. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 2006, 24(2):281-283.

(收稿日期: 2011-12-08)

(上接第 1924 页)

- Care Med, 2005, 31(5):649-655.
- [2] Lee K, Ha GY, Shin BM, et al. Metallo-beta-lactamase-producing Gram-negative bacilli in Korean Nationwide Surveillance of anti-microbial resistance group hospitals in 2003: continued prevalence of VIM-producing *Pseudomonas* spp. and increase of IMP-producing *Acinetobacter* spp. *Diagn*[J]. *Microbiol Infect*, 2004, 50(1):51-58.
 - [3] Liu SY, Lin JY, Chu C, et al. Integron-61-associated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* isolated from a regional hospital in Taiwan[J]. *Antimicrob Agents*, 2006, 27(1):81-84.
 - [4] Naas T, Levy M, Hirschauer C, et al. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the carbapenemase OXA-23 in a tertiary care hospital of Papeete, French Polynesia [J]. *Clin Microbiol*, 2005, 43(9):4826-4829.
 - [5] Yu YS, Yang Q, Xu XW, et al. Typing and characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* com-

- plex in a Chinese hospital[J]. *Med. Microbiol*, 2004, 53(Pt 7):653-656.
- [6] 黄源春, 蔡应木, 王佩芬, 等. 某医院鲍曼不动杆菌和铜绿假单胞菌耐药性监测[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(13):1432-1433.
 - [7] 郭宇航, 王勇, 周薇薇, 等. 鲍曼不动杆菌的临床分布及耐药性分析[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(8):889-900.
 - [8] 张小江, 徐英春, 俞云松, 等. 2009 年中国 CHINET 鲍曼不动杆菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2010, 10(6):441-446.
 - [9] 汪复, 朱德妹, 胡付品, 等. 2007 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2008, 8(5):325-332.
 - [10] 汪复. 多重耐药铜绿假单胞菌与鲍曼不动杆菌严重感染的防治策略[J]. 中华感染与化疗杂志, 2007, 7(3):230-232.
 - [11] 同俏静, 苏关美, 袁玉华. 手部卫生与医院感染的研究进展[J]. 中华医院管理杂志, 2004, 20(4):241-244.
 - [12] 邓双艳, 郁素琴. 护士在控制多重耐药菌播散中的作用[J]. 医学信息, 2010, 23(10):331.

(收稿日期: 2011-12-08)