

## • 论 著 •

## 卵泡抑素样蛋白 1 在类风湿关节炎中的作用

张 红<sup>1</sup>, 张 平<sup>2△</sup>, 周洪兴<sup>2</sup>, 王禹基<sup>3</sup>, 李小红<sup>1</sup>

(1. 南京中医药大学附属常州中医医院检验科, 江苏常州 213003; 2. 南京医科大学附属常州第二人民医院检验科, 江苏常州 213003; 3. 南京医科大学附属常州第二人民医院骨科, 江苏常州 213003)

**摘要:** 目的 研究卵泡抑素样蛋白 1(FSTL1)与类风湿关节炎(RA)活动度的相关性。方法 20 例 RA 患者纳入观察组, 20 例非 RA 患者纳入对照组。用酶联免疫吸附试验(ELISA)法测定 20 例 RA 患者治疗前后的血清 FSTL1 水平; 魏氏法测定患者治疗前红细胞沉降率(ESR), 免疫透射比浊测定 C 反应蛋白(CRP)、类风湿因子(RF)水平, 抗环瓜氨酸肽(CCP)抗体酶联免疫试剂盒检测抗 CCP 抗体, 并进行疾病活动指数 28(DAS28)评分。用免疫印迹法测定两组被试成纤维样滑膜细胞(FLSs)中 FSTL1 的水平。结果 观察组患者血清 FSTL1 水平与 ESR、CRP、RF、抗 CCP 抗体及 DAS28 呈较好的相关性( $P < 0.05$ ); 观察组关节组织 FSTL1 蛋白相对表达量明显高于对照组( $P < 0.05$ ); 观察组治疗后, 血清 FSTL1 水平明显低于治疗前( $P < 0.05$ )。结论 FSTL1 可作为 RA 患者疾病活动度的新炎性标志物。

**关键词:** 类风湿关节炎; 卵泡抑素样蛋白 1; 成纤维样滑膜细胞**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2015.02.021**文献标识码:**A**文章编号:** 1673-4130(2015)02-0193-03**The function of follistatin-like protein 1 in patients with rheumatoid arthritis**Zhang Hong<sup>1</sup>, Zhang Ping<sup>2△</sup>, Zhou Hongxing<sup>2</sup>, Wang Yuji<sup>3</sup>, Li Xiaohong<sup>1</sup>

(1. Department of Clinical Laboratory, Changzhou TCM Hospital Affiliated to Nanjing TCM University, Changzhou, Jiangsu 213003, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Changzhou Second People's Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Changzhou, Jiangsu 213003, China; 3. Department of Orthopedics, Changzhou Second People's Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Changzhou, Jiangsu 213003, China)

**Abstract: Objective** To explore the correlation between the level of follistatin-like protein 1(FSTL1) and the disease activity in patients with rheumatoid arthritis (RA). **Methods** Twenty patients with RA in observation group, twenty patients without RA in contrast group. Serum FSTL1 levels were detected before and after treatment by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), erythrocyte sedimentation rate(ESR) were detected by Westergren, the levels of C-reactive protein (CRP) and rheumatoid factor (RF) were detected by Immune Transmission Turbidimetric, cyclic citrullinated peptide CCP antibody was detected by CCP antibody ELISA kit, Disease Activity Score in 28 Joints(DAS28) were used to evaluate the disease activity. The level of FSTL1 in fibroblast-like synoviocytes was detected by Western Blotting. **Results** Serum FSTL1 level in the observation group was correlated with ESR, CRP, RF, CCP antibody and DAS28 score( $P < 0.05$ ). FSTL1 level in the observation group was significant higher than that of the control group( $P < 0.05$ ), and the FSTL1 level was significantly diminished in the observation group after receiving clinical treatment( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Serum FSTL1 level might serve as a serological inflammatory marker of disease activity in RA patients.

**Key words:** rheumatoid arthritis; follistatin-like protein 1; fibroblast-like synoviocytes

卵泡抑素样蛋白 1(FSTL1)是一种细胞外基质糖蛋白, 广泛表达于所有的器官, 参与细胞多种生物学过程, 在缺血再灌注损伤、压力负荷过重以及心肌梗死的心脏中表达上调, 在缺血应激情况下可能通过内皮细胞 Akt-NOS 信号转导通路促进内皮细胞和血管再生<sup>[1]</sup>。类风湿关节炎(RA)是周围关节的慢性炎症病变, Tanaka 等<sup>[2]</sup>报道 FSTL1 与 RA 的发病机制有关。相关研究认为 FSTL1 是一种新型的炎症因子, 能诱导自发生性炎症<sup>[3]</sup>。FSTL1 在关节中过度表达会导致成纤维样滑膜细胞(FLSs)分泌白介素(IL)-6, 并且 FSTL1 可能刺激巨噬细胞分泌促炎细胞因子。本研究通过测定 RA 患者 FSTL1 水平, 旨在研究血清 FSTL1 水平与 RA 疾病发展的关系, 现将研究结果报道如下。

**1 资料与方法****1.1 一般资料** 南京中医药大学附属常州中医医院确诊的 RA

患者 20 例纳入观察组, 其中男 13 例, 女 7 例; 年龄 49~78 岁, 平均(62.2±7.9)岁; 纳入排除标准依据 RA 的诊断标准<sup>[4]</sup>, 且未接受过抗风湿药物、生物药物和糖皮质激素单独或联合治疗。南京中医药大学附属常州中医医院接受全膝关节置换或关节镜滑膜切除术患者 20 例纳入对照组, 其中男 11 例, 女 9 例; 年龄 48~77 岁, 平均(61.2±7.6)岁; 纳入标准为非 RA 患者, 且无影响关节滑膜组织 FSTL1 水平的疾病史, 手术前 3 月未服用过影响关节滑膜组织 FSTL1 水平的药物。

**1.2 方法**

**1.2.1 治疗方法** 观察组 RA 患者连续治疗 6 月, 其中 2 例采用英夫利昔单抗单独治疗, 4 例采用英夫利昔单抗和免疫抑制剂来氟米特联合治疗, 2 例采用英夫利昔单抗、来氟米特、甲氨蝶呤联合治疗, 6 例单独采用来氟米特治疗。治疗后, 按照美国风湿病协会(ACR)推荐的改善标准将治疗后的患者分成

ACR20 改善组和无明显改善组<sup>[4]</sup>: ACR 推荐的标准为患者压痛及肿胀关节数及下列 5 项中至少 3 项改善了 20%、50% 或 70%, 则表明患者达到 ACR20、ACR50、ACR70 改善标准。包括休息痛、日常生活能力、医生评价、患者评价、ESR 或 CRP。

**1.2.2 标本采集** (1) 血液标本采集: 20 例 RA 患者于治疗开始前及治疗 6 月后, 清晨、空腹抽取静脉血 3 mL, 相对离心力 1 000 r/min 离心 15 min, 取上层血清置于试管中, -20 ℃ 保存, 所有标本在 1 h 内完成 FSTL1、红细胞沉降率(ESR)、血清 C 反应蛋白(CRP)、类风湿因子(RF)及抗环瓜氨酸肽(CCP)抗体检测。(2) 关节组织标本采集: 通过全膝关节置换或关节镜滑膜切除术, 取得观察组 20 例 RA 患者及对照组 20 例非 RA 患者的关节滑膜组织, 经检查, 20 例 RA 患者的组织标本均为发炎组织标本。

**1.2.3 血清 FSTL1 水平测定** 血清 FSTL1 水平使用美国加利福尼亚 Groundwork 生物技术诊断公司生产的试剂盒, 试剂盒灵敏度为 100 pg/mL, 采用酶联免疫吸附试验(ELISA)进行测定。血清样本在磷酸盐缓冲液中以 1:5 进行稀释, 浓度以  $\mu\text{g}/\text{L}$  报告。采用美国 BIO-RAD 公司生产的酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度。

**1.2.4 FLSs 中 FSTL1 蛋白测定** (1) 分离与培养: 将取得的关节组织切碎, 在含 1 mg/mL I 型胶原的无血清 Dulbecco 改良 Eagle 培养基(DMEM)(美国纽约 Gibco BRL 公司)中 37 ℃ 孵化 4 h 后用尼龙网过滤洗净。然后, 在含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基中, 加 100 U 青霉素、100 mg/mL 链霉素, 提供 5%  $\text{CO}_2$  环境, 经过隔夜培养, 去除非黏附细胞, 取分裂的贴壁细胞, 将分离得到的 FLSs 在 100 mm 的细胞培养皿中培养 36 h 后收集蛋白, 以 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  聚肌胞甘酸, 100 ng/mL 大肠杆菌脂多糖, 300 ng/mL 细菌脂蛋白, 10 ng/mL IL-1 $\beta$ , 10 ng/mL 肿瘤坏死因子  $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) 和 10 ng/mL 转化因子  $\beta$ (TGF- $\beta$ ) 等介质作为诱导剂。(2) 免疫印迹法(Western blot)测定: 将培养的 FLSs 溶解, 在十二烷基硫酸钠(SDS)缓冲液中煮沸。用 10% 聚丙烯酰胺凝胶进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后转移至硝酸纤维素膜。分别用羊抗人 FSTL1 多克隆抗体和 actin AC-40 来检测 FSTL1 和  $\beta$ -actin 的表达。用 Gel Doc 全自动凝胶成像系统(美国 BioRad 公司)进行光密度扫描。

**1.2.5 其他指标测定** ESR 水平用魏氏法测定; CRP 和 RF 水平使用免疫透射比浊进行测定, 所用仪器为 AU5431 大型全自动生化分析仪(日本 Olympus); 抗 CCP 抗体使用抗 CCP 抗体酶联免疫检测试剂盒(上海富莼科芯生物技术股份有限公司)测定。此外, 对 20 例 RA 患者进行疾病活动指数 28(DAS28)评分, 即采用 ESR、压痛关节数、肿胀关节数和患者对自身健康状况的总体评估进行计算。

**1.3 统计学处理** 采用 InStat 公司 GraphPad 软件进行数据处理及统计学分析。相关分析采用 Spearman 等级相关, 组间差异比较采用 Wilcoxon 秩和检验, 同组被试处理前后差异比较采用配对秩和检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 观察组 FSTL1 水平与其他指标的相关分析** FSTL1 水平 25.5~684.9  $\mu\text{g}/\text{L}$ , 平均值为 192.6  $\mu\text{g}/\text{L}$ , Spearman 等级相关分析显示血清 FSTL1 水平与其他 RA 相关指标均呈正相关( $P < 0.05$ )。见表 1。

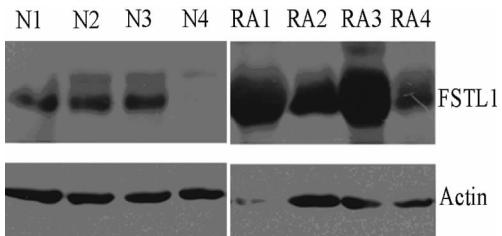
**2.2 两组被试关节滑膜组织 FSTL1 水平比较** 以 FSTL1/ $\beta$ -

actin 进行统计分析, 观察组关节组织 FSTL1 相对表达量明显高于对照组, 比较差异有统计学意义( $T = 193.6, P < 0.05$ )。Western blot 所检测到的 RA 患者及对照人群关节滑膜组织成纤维样细胞所表达的 FSTL1 水平图谱, 见图 1; 凝胶成像仪扫描后两组人群 FSTL1 相对水平, 见表 2。

表 1 观察组血清 FSTL1 水平与其他指标间关系

检测指标	检测结果[M( $P_{25}, P_{75}$ )]	与 FSTL1 相关系数( $r^2$ )
ESR(mm/h)	33.0(17.6, 61)	0.615 3*
CRP(g/L)	8.1(2.5, 33.6)	0.697 8*
RF(IU/mL)	63.6(15.0, 185.0)	0.572 0*
抗 CCP(RU/mL)	251.9(42.7, 650.7)	0.537 4*
DAS28(分)	0.515 3*	0.515 3*

\*:  $P < 0.05$ , 与 FSTL1 水平相关显著。



N1-N4: 对照组; RA1-RA4: 观察组。

图 1 两组被试关节组织 FSTL1 水平图谱

表 2 两组被试关节组织 FSTL1 相对水平

组别	n	FSTL1/ $\beta$ -actin[M( $P_{25}, P_{75}$ )]
观察组	20	4.8(1.2, 6.6)*
对照组	20	0.5(0.1, 0.7)

\*:  $P < 0.05$ , 与对照组相比。

**2.3 观察组患者治疗前后 FSTL1 水平比较** 观察组 20 例患者治疗前后均行 FSTL1 测定。ACR20 改善组治疗后 FSTL1 水平  $M(P_{25}, P_{75})$  为 202.6(61.4, 398.6)  $\mu\text{g}/\text{L}$  明显低于治疗前的 252.4(69.4, 418.3)  $\mu\text{g}/\text{L}$ , 比较差异有统计学意义( $T = 104.6, P < 0.05$ ); 无明显改善组 FSTL1 水平治疗前后  $FSTL1$  水平  $M(P_{25}, P_{75})$  分别为 98.4(19.7, 589.3)、87.8(15.1, 342.7)  $\mu\text{g}/\text{L}$ , 治疗前后比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

## 3 讨 论

本研究发现, RA 患者血清 FSTL1 水平与其他血清学指标如 ESR、CRP、RF、抗 CCP 抗体及 DAS28 相关。另外, RA 患者经过临床治疗, 血清 FSTL1 水平明显降低。可见, FSTL1 可作为 RA 患者一个可靠的疾病活动度观察指标。FSTL1 广泛表达于所有器官, 尤其是肺和心脏, 但在关节组织中的报道较少。而本研究发现, FSTL1 不仅在血清中表达, 在关节组织中也有表达。证实在炎性细胞因子诱导的 RA 患者 FLSs 中, FSTL1 也有表达。因此, 作者认为 FLSs 也是 FSTL1 来源之一。

目前, 少有升高的 FSTL1 在促炎作用机制的相关报道, 但有报道称 FSTL1 是一种新的促炎因子, 高水平的 FSTL1 可能导致炎性因子的过度表达, 从而导致 RA 患者的关节炎恶化<sup>[3]</sup>。有研究给小鼠爪中注射 FSTL1 导致严重的爪水肿, 结果显示这种炎症的产生与 IFN- $\gamma$  转录水平上(下转第 197 页)

和 ApoA-1 作为糖尿病患者常规检查项目。

Sierra-Johnson 等<sup>[8]</sup>对美国成年人的 ApoB/ApoA-1 比值和代谢指标进行了分析,结果提示 ApoB/ApoA-1 比值与 IR 密切相关,优于传统风险因子、代谢综合征组分及炎症风险因子,ApoB/ApoA-1 比值是 IR 的独立预测因子。本研究以 T2DM 患者为研究对象,发现 ApoB/ApoA-1 比值与 Homa-IR 呈正相关( $P < 0.05$ ),进一步按 ApoB/ApoA-1 值的四分位值将患者分为 4 组,发现随 ApoB/ApoA-1 比值增高,Homa-IR 值也逐渐增高。鲁炳怀等<sup>[9]</sup>对北京 T2DM 及糖耐量受损人群的研究发现 Homa-IR 与 ApoA-1 呈负相关,与 ApoB 呈正相关;且随 IR 趋于严重,ApobA-1 显著降低,ApoB 及 ApoB/ApoA-1 则显著增高。多元线性回归显示,ApoA-1、ApoB 对于 Homa-IR 水平的影响大于 HDL-C、LDL-C,ApoB/ApoA-1 对于 Homa-IR 的贡献大于 HDL-C/TC。本研究各项目与 Homa-IR 的相关性分析中,常规脂类项目和 ApoA-1 与 Homa-IR 的相关性不强,但 Homa-IR 与 ApoB、ApoB/ApoA-1 均有明显的正相关,尤其与 ApoB/ApoA-1 紧密相关( $P < 0.05$ )。据此可认为 ApoB/ApoA-1 是脂代谢指标中反映 IR 的灵敏指标。

T2DM 患者的 HbA1c 值小于 7% 时,血糖得到良好的控制,ApoB/ApoA-1 比值相对处于较低水平,说明血糖控制良好对动脉粥样硬化发生的风险减少有很好的正面作用。血糖控制不好的糖尿病患者血脂异常率高,这是由于 T2DM 患者长期处于高血糖状态,各类血浆脂蛋白可发生不同程度的糖化,糖化又加速脂蛋白氧化,影响脂蛋白在体内的代谢。LDL-C 和 HDL-C 的糖化及氧化,可促进动脉粥样硬化的发生。以 ApoB/ApoA-1 比值参考上限值 0.9 分组进行比较可知,Homa-IR 的变化对预测血管硬化的风险具有重要意义。

综上所述,ApoB/ApoA-1 比值与 IR 密切相关,是 IR 发生的重要标志,对 T2DM 患者动脉粥样硬化的发生起着很好的

(上接第 194 页)

调及其诱导的 CXC 趋化因子配体 10(CXCL10)有关,并且其促炎效应需要 T 细胞激活<sup>[1]</sup>。然而,也有观点认为 FSTL1 可能在免疫和炎性反应中扮演免疫抑制剂的角色而降低炎性反应,FSTL1 在心脏移植中发挥了免疫调节作用<sup>[5]</sup>,也可改善小鼠模型的关节炎症<sup>[6-7]</sup>。因此,FSTL1 在炎性反应中的作用机制还不是很明确。

与传统的一些 RA 指标相比,FSTL1 不仅在血清中有表达,而且在关节液、关节组织都有表达,所以在反映炎症部位、损伤程度上更精确。此外,有些患者尽管有广泛关节炎,但 ESR 或 CRP 水平却正常或偏低,因而这些患者的血清 FSTL1 水平可能是一个有用的炎性反应标志物。

RA 患者中血清 FSTL1 水平与其他血清学指标及 DAS28 存在正相关关系,临床治疗对 FSTL1 水平的影响表明,FSTL1 可作为 RA 病情活动的新观察指标,FSTL1 水平可能成为 RA 的潜在治疗靶点。

## 参考文献

- 陈斌,孙黎明,徐海涛. 卵泡抑素样蛋白 1 的研究进展[J]. 中国基层医药,2010,17(10):1329-1332.
- Tanaka M, Ozaki S, Osakada F, et al. Cloning of follistatin-related

监测作用,也将为 IR 诊断、防治及相关并发症的评估提供新的线索与思路。

## 参考文献

- 季菊珍. 2 型糖尿病大血管病变与血脂及胰岛素抵抗的关系[J]. 浙江中西医结合杂志,2001,11(2):74-75.
- 叶桂云,胡望平,池细悌,等. 载脂蛋白 B 与 A1 比值对预测血管疾病风险的价值[J]. 诊断与治疗杂志,2012,32(4):336-341.
- 蒋袁娟,李启富. ApoB/ApoA-1 比值与胰岛素抵抗的相关性研究[J]. 重庆医科大学学报,2010,35(4):575-578.
- Walldius G, Jungner J. Is there a better marker of cardiovascular risk than LDL cholesterol? Apolipoproteins B and A-I-New risk factors and targets for therapy[J]. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2007,17(8):565-571.
- 王佳,邹大进. 2 型糖尿病治疗新动向——高质量控制血糖的六大道点[J]. 中国实用内科杂志,2009,5(29):413-416.
- 饶荣,刘志军. 80 例冠心病患者血清中脂蛋白 a 及载脂蛋白 A1 和 B 的检测分析[J]. 国际检验医学杂志,2011,32(3):392-393.
- Bruno G, Merletti F, Biggeri A, et al. Effect of age on the association of non-high-density lipoprotein cholesterol and apolipoprotein B with cardiovascular mortality in a Mediterranean population with type 2 diabetes: the casale monferrato study[J]. Diabetologia, 2006,49(5):937-944.
- Sierra-Johnson J, Romero-Corral A, Somers VK, et al. ApoB/ApoA-I ratio: an independent predictor of insulin resistance in US non-diabetic subjects[J]. Eur Heart J, 2007,28(21):2637-2643.
- 鲁炳怀,朱凤霞. 2 型糖尿病与糖耐量受损人群 Lp(a)、ApoB/A1 与胰岛素抵抗相关性分析[J]. 北京医学杂志,2008,30(8):544-547.

(收稿日期:2014-11-08)

- protein as a novel autoantigen in systemic rheumatic diseases[J]. Int Immunol, 1998,10(9):1305-1314.
- Miyamae T, Marinov AD, Sowders D, et al. Follistatin-like protein-1 is a novel proinflammatory molecule[J]. J Immunol, 2006, 177(7):4758-4762.
- 吕芳,李兴福. 2010 年美国风湿病学会联合欧洲抗风湿病联盟的类风湿关节炎分析标准研究[J]. 诊断学理论与实践,2010,9(4):307-310.
- Luduec JB, Condamine T, Louvet C, et al. An immunomodulatory role for follistatin-like 1 in heart allograft transplantation[J]. Am J Transplant, 2008,8(11):2297-2306.
- Kawabata D, Tanaka M, Fujii T, et al. Ameliorative effects of follistatin-related protein/TSC-36/FSTL1 on joint inflammation in a mouse model of arthritis[J]. Arthritis Rheum, 2004,50(2):660-668.
- Tanaka M, Ozaki S, Kawabata D, et al. Potential preventive effects of follistatin-related protein/TSC-36 on joint destruction and antagonistic modulation of its autoantibodies in rheumatoid arthritis [J]. Int Immunol, 2003,15(1):71-77.

(收稿日期:2014-12-08)