

• 论 著 •

iTRAQ 联合 Nano LC-MS/MS 技术在早期类风湿关节炎患者血清中的差异表达蛋白质组学研究^{*}

刘 琴^{1,2}, 严小倩³, 胡红兵^{1△}

(1. 华中科技大学同济医学院附属武汉儿童医院输血科, 湖北武汉 430015; 2. 浙江省立同德医院检验科, 浙江杭州 310012; 3. 浙江省立同德医院肾内科, 浙江杭州 310012)

摘 要:目的 应用同位素标记相对和绝对定量技术(iTRAQ)与纳升液相色谱-串联质谱(Nano LC-MS/MS)技术分析类风湿关节炎(RA)患者血清差异表达蛋白。方法 收集 44 例早期 RA 患者及 50 例健康体检者血清标本,采用 iTRAQ 联合 Nano LC-MS/MS 对差异表达蛋白进行筛选与生物信息学分析。结果 质谱鉴定分析共鉴定差异表达蛋白 113 种,呈上调趋势的 41 种,呈下调趋势的 72 种。KEGG 通路分析,发现差异表达蛋白主要富集于补体和凝血级联反应、金黄色葡萄球菌感染等 12 条 KEGG 通路。通过 STRING 蛋白-蛋白相互作用网络分析发现,AHSG、FN1 等蛋白是蛋白-蛋白相互作用网络的关键节点,是研究 RA 机制的候选蛋白。结论 通过 iTRAQ 和蛋白质组学技术成功得到了早期 RA 血清差异表达蛋白,为早期 RA 的诊断及其发病机制分析提供了理论依据。

关键词:类风湿关节炎; 蛋白质组学; 同位素标记相对和绝对定量技术

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2020.16.002 **中图法分类号:**R446.1

文章编号:1673-4130(2020)16-1926-05 **文献标识码:**A

Differential proteomic study of iTRAQ connected with Nano LC-MS/MS technology in serum of patients with early rheumatoid arthritis^{*}

LIU Qin^{1,2}, YAN Xiaoqian³, HU Hongbing^{1△}

(1. Department of Blood Transfusion, Wuhan Children's Hospital Affiliated to Tongji College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430015, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Tongde Hospital of Zhejiang Province, Hangzhou, Zhejiang 310012, China; 3. Department of Nephrology, Tongde Hospital of Zhejiang Province, Hangzhou, Zhejiang 310012, China)

Abstract: Objective To analyze differentially expressed proteins in the serum of patients with rheumatoid arthritis (RA) by isobaric tags for relative and absolute quantitation technology (iTRAQ) connected with Nano LC-MS/MS technology. **Methods** Serum differential proteins were screened and analyzed in 44 early RA patients and 50 healthy people by iTRAQ combined with Nano LC-MS/MS. **Results** A total of 113 differentially expressed proteins were identified, 41 types were up-regulated and 72 types were down-regulated. KEGG pathway analysis were performed for differentially expressed proteins, the results showed that the differential proteins were mainly concentrated in KEGG pathways including Staphylococcus aureus infection by supplementation and coagulation cascade. STRING analysis showed that AHSG, FN1 and some other proteins were the key nodes of PIP network, and they were candidate proteins for studying RA mechanisms. **Conclusion** The serum differential proteins of RA have been obtained successfully by iTRAQ connected with proteomics technology, which provides a theoretical basis for the diagnosis and pathogenesis of RA.

Key words: rheumatoid arthritis; proteomics; isobaric tags for relative and absolute quantitation technology

类风湿关节炎(RA)是一种慢性全身性自身免疫性疾病,以关节滑膜炎为特征。早诊断、早治疗对有效预防关节破坏的进展,及时控制病情,并改善预后

具有重要意义^[1-3]。本研究利用同位素标记相对和绝对定量技术(iTRAQ)联合纳升液相色谱-串联质谱(Nano LC-MS/MS)技术,对早期 RA 患者血清中的

^{*} 基金项目:浙江省科学技术厅分析测试项目(2018C37008)。

作者简介:刘琴,女,主管技师,主要从事医学免疫学检验和输血研究。△ 通信作者,E-mail:whfesx@163.com。

本文引用格式:刘琴,严小倩,胡红兵. iTRAQ 联合 Nano LC-MS/MS 技术在早期类风湿关节炎患者血清中的差异表达蛋白质组学研究

蛋白质进行鉴定和相对定量分析,并用生物信息学工具对生物学过程、细胞定位、分子功能、参与的信号通路进行富集分析。

1 资料与方法

1.1 一般资料 将浙江省立同德医院 2017 年 8 月至 2018 年 1 月收治的 44 例早期 RA 患者作为病例组,男 17 例,女 27 例;平均(56.97±16.57)岁;所有患者均符合 2010 年欧洲抗风湿病联盟(EULAR)联合美国风湿病学会(ACR)发布的 RA 诊断标准;病程小于 6 个月,且未服用过抗风湿药物。选择同期浙江省立同德医院 50 例体检健康者纳入对照组;男 20 例,女 30 例;平均(51.26±13.06)岁;排除肝功能损伤、肾功能损伤、自身免疫性疾病、肿瘤、感染及传染病者,排除查体或血生化检查有异常者。本研究获得浙江省立同德医院医学伦理管理委员会批准后进行。

1.2 仪器与试剂 液相色谱仪(岛津 LC-20AD)、液相色谱仪(Thermo Dionex Ultimate 3000 RSLC nano,二维)、质谱仪(Thermo Scientific Q Exactive)、冷冻离心机(湘仪, H2050R)、超声仪(新芝生物, LTD JY96-II N)、酶标仪(TECAN SUNRISE)。血清高丰度蛋白去除试剂盒(Sigma,批号:PROTBA-1KT)、丙酮(Thermo Fisher)、BCA 蛋白水平测定试剂盒(碧云天生物,批号:P0010S)、iTRAQ 试剂盒(ABSciex,批号:4381664);10K 超滤管(Pall,批号:OD010C33)、三乙胺-碳酸缓冲液(TEAB, Sigma,批号:T418)、胰酶(Promega,批号:V5280)、甲酸(Fluka,批号:14265)、乙腈(Thermo Fisher,批号:A998-4)、甲酸铵(Sigma,批号:516961)、放射免疫沉淀法(RIPA)强裂解液(碧云天生物,批号:P0013B)、蛋白酶抑制剂(PMSF,凯基生物,批号:KGP610)。

1.3 方法

1.3.1 标本采集 取所有研究对象用于生化检验的血清标本 100 μL, -80℃保存备用。

1.3.2 蛋白提取 按照血清高丰度蛋白去除试剂盒说明书,去除血清中的高丰度蛋白后加入 4 倍体积丙酮, -20℃沉淀过夜。将沉淀得到的蛋白 4℃、12 000 r/min 离心 20 min, 去掉上清, 晾干, -80℃保存备用。BCA 法定量检测蛋白质水平。

1.3.3 蛋白酶解、标记 蛋白定量检测后取 200 μg 蛋白溶液置于离心管中;按 iTRAQ 试剂盒说明书操作,得到 100 μL 酶解后的样品。分别用 iTRAQ 试剂 114、116 进行标记后,混合,真空干燥。

1.3.4 液相分离 将标记后的多肽混匀上样,进行第一维分析,根据峰型和时间共收取 24 个组分,用 50%三氟乙酸(TFA)酸化,真空干燥后,进行第二维液相色谱-串联质谱分析。色谱柱流动相 A: 20 mmol/L 甲酸胺, pH 值为 10。流动相 B: 20 mmol/L 甲酸胺, 80%乙腈, pH 值为 10。流速: 200 μL/min。紫外检测波长: 214 nm/280 nm。

1.3.5 质谱鉴定 肽段用含 2%乙腈、0.1%甲酸样

品溶解液溶解,振荡涡旋, 4℃, 13 500 r/min 离心 20 min, 取上清液转至上样管中, 进行质谱鉴定, 分离后的肽段进行在线分析, 并将质谱原始数据转化成 mfg 文件, 利用 AB Sciex 的检索软件 ProteinPilot™ Software4.5 进行检索, 比对鉴定。

1.3.6 生物信息学分析 将各组差异表达蛋白在 UniProt 数据库中进行比对, 并利用 UniProt 数据库中蛋白序列进行 GO 注释, 对差异表达蛋白进行基于 GO 的细胞定位、分子功能和生物学过程进行富集分析。对差异表达蛋白进行 KEGG (<http://www.Kegg.jp/kegg/pathway.html>)生物学通路富集分析。

1.4 统计学处理 采用 SPSS22.0 统计软件进行数据处理及统计分析, 呈正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组比较采用 *t* 检验, 以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 质谱鉴定分析结果 本研究共鉴定到 343 种蛋白, 以差异倍数大于 1.30 或小于 0.77, *P* < 0.05 为差异表达蛋白。共检测差异表达蛋白 113 种, 包含呈上调趋势的蛋白 41 种和呈下调趋势的蛋白 72 种, 差异倍数较大的 20 种蛋白见表 1。

表 1 差异倍数较大的 20 种呈上调或下调趋势的蛋白

蛋白	蛋白 ID	差异倍数(倍)	<i>P</i>
上调			
CRP	P02741	16.50	0.02
SAA1	P0DJI8	5.02	<0.001
IGHG1	P01857	4.00	0.03
PZP	P20742	3.48	0.01
FGG	P02679	3.39	<0.001
S100A9	P06702	3.18	<0.001
TAGLN2	P37802	3.12	0.01
SAA2	P0DJI9	3.11	<0.001
LRG1	P02750	2.75	0.01
ARHGD1B	P52566	2.71	0.03
下调			
AHSG	P02765	0.29	<0.001
APOC1	P02654	0.32	<0.001
IGHD	P01880	0.43	<0.001
GC	P02774	0.47	0.01
ARAP1	Q96P48	0.48	<0.001
ITIH2	P19823	0.49	<0.001
GSN	P06396	0.49	<0.001
C5	P01031	0.50	0.01
CLU	P10909	0.50	<0.001
FCN3	O75636	0.50	<0.001

2.2 GO 富集分析 通过 GO 富集分析, 筛选出差异表达蛋白主要的细胞定位、分子功能及参与的生物学过程。这些差异表达蛋白主要定位在血液微粒、胞质囊泡腔、囊腔等结构, 见图 1。这些差异表达蛋白的分

子功能主要包括肝素结合、肽酶活性调节、糖胺聚糖结合等,见图 2。这些差异表达蛋白主要参与蛋白质活化级联反应、急性炎症反应、凝血调节等生物学过程,见图 3。

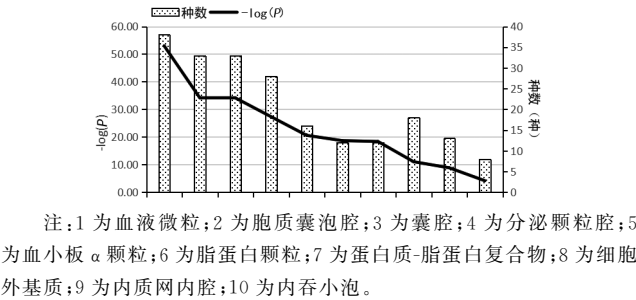


图 1 差异表达蛋白细胞定位分析

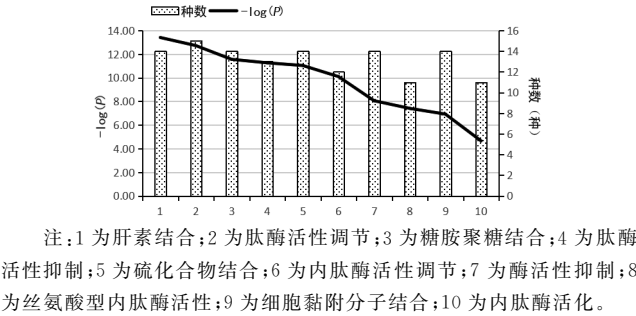


图 2 差异表达蛋白分子功能分析

2.3 KEGG 通路分析 将差异表达蛋白进行 KEGG 通路分析,发现这些蛋白主要富集于补体和凝血级联反应、金黄色葡萄球菌感染等 12 条 KEGG 通路,见表 2。

2.4 STRING 蛋白-蛋白相互作用网络分析 通过 STRING 蛋白-蛋白相互作用网络分析发现,一些差异表达蛋白和其他差异表达蛋白间存在广泛的相互作用,即在蛋白-蛋白相互作用网络中起到关键作用,在差异表达蛋白中具有关键作用的蛋白有 AHSB、FN1、ITIH3、PLG、PROS1、SERPINC1、F2、FGG、CLU、SEPP1 等,在网络中与多个差异表达蛋白发生相互作用,是网络的关键节点,是研究 RA 机制的候选蛋白。

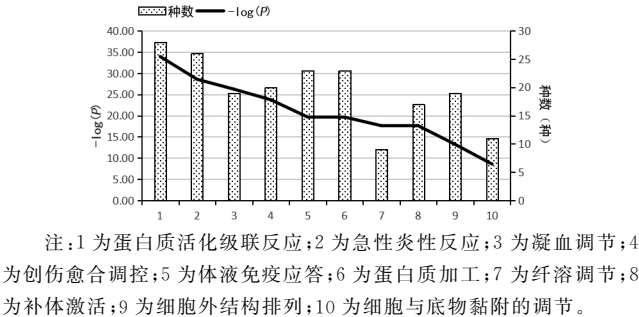


图 3 差异表达蛋白主要参与物生物学过程分析

表 2 差异表达蛋白 KEGG 通路分析

KEGG 通路	P	蛋白数量(种)	差异表达蛋白
补体和凝血级联反应	1.78E-22	15	C1R、C1S、C5、C7、C9、CLU、F2、F11、F12、CFH、PLG、VWF、KNG1、SERPINC1、FGA
金黄色葡萄球菌感染	3.04E-06	5	C1R、C1S、C5、CFH、PLG
疟疾	2.75E-05	5	HBA1、HBA2、HBB、THBS1、VCAM1
百日咳	2.29E-04	4	C1R、C1S、C4BPB、C5
胆固醇代谢	4.81E-04	4	APOC1、APOE、APOH、LCAT
黏着斑	9.07E-04	4	VWF、FN1、FLNA、THBS1
系统性红斑狼疮	2.89E-03	5	C1R、C1S、C5、C7、C9
ECM-受体相互作用	1.06E-02	4	FN1、THBS1、VTN、VWF
癌症与蛋白多糖	1.60E-02	3	FN1、FLNA、THBS1
肌动蛋白细胞骨架的调节	2.05E-02	4	FN1、F2、GSN、PFN1
生物素代谢	2.20E-02	1	BTD
白细胞经内皮细胞迁移	4.97E-02	2	CDH5、VCAM1

3 讨 论

RA 是一种自身免疫性疾病,其发病机制至今尚未明确。目前,临床上诊断 RA 主要依靠免疫学检查及影像学资料,然而疾病的发生往往先是功能和分子标志物的变化,继而是形态学的改变。RA 发病较隐匿,早期的临床表现大多不典型,容易造成误诊、漏诊,RA 患者首次就诊时往往就已存在关节损伤,甚至累及多器官^[1-3]。因此,寻找能反映早期 RA 疾病活动情况的分子标志物,在患者出现关节功能异常之

前,监测 RA 的发展情况具有重要的临床意义。蛋白质组学可以从细胞水平及整体水平来研究蛋白质的组成、定位、表达水平、修饰及其动态变化规律等,揭示蛋白质功能与细胞的活动规律^[4-5]。iTRAQ 联合质谱的定量蛋白质组学技术具有高灵敏度、标记效率高、高分辨率、样品兼容性好、重复性好等独特优势^[6-7],已广泛地应用于肿瘤^[8-9]、阿尔兹海默病^[10]、骨性关节炎^[11-12]等多种疾病中。本研究应用 iTRAQ 联合 Nano LC-MS/MS 技术

筛选出早期 RA 患者与对照者之间具有明显差异的蛋白 113 种,利用 GO 富集分析了这些差异表达蛋白主要的细胞定位、分子功能及参与的生物学过程、主要信号通路,并通过 KEGG 通路注释进一步提取到与差异表达蛋白相关的 12 条 KEGG 通路,这些结果表明凝血纤溶系统、免疫系统、脂质代谢、细胞骨架重建与早期 RA 的发病机制密切相关。凝血纤溶系统异常是 RA 的特异性表现之一,RA 患者体内存在凝血系统及抗凝系统的失衡,并由此引发其他系统相关疾病^[13-14]。GO 富集分析结果发现在凝血调节、纤溶调节生物学过程中有 28 种差异表达蛋白参与。KEGG 通路分析结果发现,补体和凝血级联反应信号通路的差异最大,有 15 种差异表达蛋白参与这一通路,其中补体相关的差异表达蛋白也参与了金黄色葡萄球菌感染、系统性红斑狼疮等通路。由此可见,凝血纤溶系统的异常与免疫系统的异常密切相关。RA 患者多伴有血管炎性反应,这与免疫复合物沉积、纤溶系统亢进、微循环障碍有关^[15-16]。临床工作中在检测炎症因子同时,也可以通过检测患者的凝血纤溶指标来监测疾病的发展情况。KEGG 通路分析结果表明早期 RA 差异表达蛋白 APOC1、APOE、APOH、LCAT 与胆固醇代谢相关,这也证实了 RA 患者疾病的炎症反应与心血管疾病风险相关,RA 疾病活动度升高有可能增加冠状动脉疾病的发生风险^[17-18]。因此,可以通过检测 APOC1、APOE、APOH、LCAT 等与胆固醇代谢相关的指标反映疾病的相关情况,改善患者的胆固醇代谢可以缓解 RA 疾病的发展,预防动脉硬化的发生。

本研究通过 STRING 蛋白-蛋白相互作用网络分析发现,AHSG、FN1 等蛋白是 RA 发病机制的关键节点。AHSG 具有调理作用,可促进细胞内吞,与钙离子和钡离子亲和力高,是具有影响骨矿化作用的蛋白。研究表明 AHSG 可能在骨与软骨的发育中起重要作用^[19-20]。此外,AHSG 与炎症因子的调控有关。BRYLKA 等^[21]研究发现,AHSG 减少可以引起机体炎症反应,导致软骨病变。FN1 在成骨细胞的代谢中发挥着重要的作用,是成骨细胞在成骨过程中不可或缺的蛋白^[12,22]。本研究发现,黏着斑、ECM-受体相互作用、癌症与蛋白多糖、肌动蛋白细胞骨架的调节等多条信号通路与 RA 的发生、发展均存在密切关系。因此,血清中 AHSG 和 FN1 蛋白可作为早期诊断 RA 的候选生物标志物。

iTRAQ 联合 Nano LC-MS/MS 技术通过比较、分析疾病个体的差异表达蛋白,寻找疾病特异性的蛋白质,为疾病的早期诊断与预后提供可能的新型标志物,对疾病的预防、诊断、预后判断和疗效监测具有积极作用,为设计新药物的分子靶点提供实验数据。

4 结 论

本研究从差异表达蛋白质组学的角度出发,通过

iTRAQ 结合 Nano LC-MS/MS 技术成功得到了早期 RA 血清差异表达蛋白,并对差异表达蛋白进行生物信息学分析,为研究 RA 的发病机制提供了实验室数据,也为 RA 的诊断和治疗提供了新思路,为寻找新的监测疾病疗效的实验室指标提供了线索。

参考文献

- [1] RIDGLEY L A, ANDERSON A E, PRATT A G. What are the dominant cytokines in early rheumatoid arthritis? [J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2018, 30(2): 207-214.
- [2] LYKKE L M. Structural joint damage and hand bone loss in patients with rheumatoid arthritis [J]. *Dan Med J*, 2018, 65(3): B5452.
- [3] ZINK A, ALBRECHT K. Rheumatoid arthritis: the benefits of early treatment after decades [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2017, 13(8): 458-459.
- [4] ZHU H, TAMURA T, HAMACHI I. Chemical proteomics for subcellular proteome analysis [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2018, 48(1): 1-7.
- [5] WILSON R S, NAIRN A C. Cell-type-specific proteomics: a neuroscience perspective [J]. *Proteomes*, 2018, 6(4): 51-59.
- [6] SUN G, CAO C, CHEN W, et al. Differential proteomic analysis of respiratory failure in peripheral blood mononuclear cells using iTRAQ technology [J]. *Biomed Rep*, 2016, 4(5): 573-577.
- [7] LATOSINSKA A, VOUGAS K, MAKRIDAKIS M, et al. Comparative analysis of label-free and 8-Plex iTRAQ approach for quantitative tissue proteomic analysis [J]. *PLoS One*, 2015, 10(9): e0137048.
- [8] LI G, LI M, LIANG X, et al. Identifying DCN and HSPD1 as potential biomarkers in colon cancer using 2D-LC-MS/MS combined with iTRAQ technology [J]. *J Cancer*, 2017, 8(3): 479-489.
- [9] SWIATLY A, HORALA A, MATYSIAK J, et al. Understanding ovarian cancer: iTRAQ-based proteomics for biomarker discovery [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(8): 2240-2248.
- [10] SONG F, POLJAK A, KOCHAN N A, et al. Plasma protein profiling of mild cognitive impairment and Alzheimer's disease using iTRAQ quantitative proteomics [J]. *Proteome Sci*, 2014, 12(1): 5-12.
- [11] IKEDA D, AGETA H, TSUCHIDA K, et al. iTRAQ-based proteomics reveals novel biomarkers of osteoarthritis [J]. *Biomarkers*, 2013, 18(7): 565-572.
- [12] CAI T, WU B, TANG X, et al. iTRAQ-Based Proteomic Analysis reveals possible target-related proteins and signal networks in human osteoblasts overexpressing FGFR2 [J]. *Proteome Sci*, 2018, 16(1): 12-19.
- [13] KWASNY-KROCHIN B, GLUSZKO P, UNDAS A. Unfavorably altered fibrin clot properties in patients with active rheumatoid arthritis [J]. *Thromb Res*, 2010, 126(1): e11-e16.

- Comparison of the simplexTM flu a/B & RSV kit (nucleic acid extraction-dependent assay) and the prodesa ProFlu+TM assay for detecting influenza and respiratory syncytial viruses[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2014, 80(1):50-52.
- [13] MAHONY J B. Nucleic acid amplification-based diagnosis of respiratory virus infections[J]. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2010, 8(11):1273-1292.
- [14] KRUNIC N, MERANTE F, YAGHOUBIAN S, et al. Advances in the diagnosis of respiratory tract infections: role of the Luminex xTAG respiratory viral panel[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2011, 1222(1):6-13.
- [15] 陈钰静, 丁细霞, 郭勇晖, 等. 建立检测 18 种(型/亚型)呼吸道病毒的两种循环参数的实时荧光定量 PCR[J]. *临床检验杂志*, 2014, 32(5):340-344.
- [16] VAN HOUTEN C B, NAAKTGEBOREN C, BUITEMAN B J, et al. Antibiotic overuse in children with respiratory syncytial virus lower respiratory tract infection[J]. *Pediatr Infect Dis J*, 2018, 37(11):1077-1081.
- [17] ZHANG Q, ZHANG Q, SUN B Q, et al. GeneXpert MTB/RIF for rapid diagnosis and rifampin resistance detection of endobronchial tuberculosis[J]. *Respirology*, 2018, 23(10):950-955.
- [18] SABI I, MAHIGA H, MGAYA J, et al. Accuracy and operational characteristics of xpert human immunodeficiency virus Point-of-Care testing at birth and until week 6 in human immunodeficiency virus-exposed neonates in Tanzania[J]. *Clin Infect Dis*, 2019, 68(4):615-622.
- [19] YARBROUGH M L, WARREN D K, ALLEN K, et al. Multicenter evaluation of the Xpert MRSA NxG assay for detection of methicillin-resistant staphylococcus aureus in nasal swabs[J]. *J Clin Microbiol*, 2018, 56(1):e01381-17.
- [20] ZOU X, CHANG K, WANG Y, et al. Comparison of the cepheid Xpert Xpress flu/RSV assay and commercial real-time PCR for the detection of influenza a and influenza B in a prospective cohort from China[J]. *Int J Infect Dis*, 2019, 80:92-97.
- [21] BANERJEE D, KANWAR N, HASSAN F, et al. Comparison of six Sample-to-Answer influenza a/B and respiratory syncytial virus nucleic acid amplification assays using respiratory specimens from children[J]. *J Clin Microbiol*, 2018, 56(11):e00930-18.
- [22] HO Y I, WONG A H, LAI R W M. Comparison of the cepheid Xpert Xpress flu/RSV assay to in-house flu/RSV triplex real-time RT-PCR for rapid molecular detection of influenza a, influenza B and respiratory syncytial virus in respiratory specimens[J]. *J Med Microbiol*, 2018, 67(11):1576-1580.
- [23] CHEN J H, LAM H Y, YIP C C, et al. Evaluation of the molecular Xpert Xpress Flu/RSV assay *vs.* Alere i Influenza A&B assay for rapid detection of influenza viruses[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2018, 90(3):177-180.
- [24] 蒋华芳, 李锦亮, 李丽, 等. 潍坊地区儿童急性呼吸道感染病毒病原学分析[J]. *中华试验和临床病毒学杂志*, 2018, 32(3):272-276.
- [25] 张驰, 尚学义, 汤雪萍, 等. 成人呼吸道感染患者病毒病原学分布特征[J]. *军事医学*, 2017, 41(4):325-327.

(收稿日期:2020-04-30 修回日期:2020-05-11)

(上接第 1929 页)

- [14] DIMITROULAS T, DOUGLAS K M, PANOULAS V F, et al. Derangement of hemostasis in rheumatoid arthritis: association with demographic, inflammatory and metabolic factors[J]. *Clin Rheumatol*, 2013, 32(9):1357-1364.
- [15] 杨宇溪, 潘宝龙, 冯磊, 等. 凝血及炎性因子检测在类风湿关节炎并发冠心病患者中的临床意义[J]. *检验医学与临床*, 2018, 15(5):602-604.
- [16] 夏婷, 赵东宝, 罗鹏飞, 等. 类风湿关节炎患者血浆纤维蛋白/纤维蛋白原降解产物和 D-二聚体水平与病情活动性的相关性研究[J]. *中华风湿病学杂志*, 2012, 16(4):247-250.
- [17] BARBER C E, SMITH A, ESDAILE J M, et al. Best practices for cardiovascular disease prevention in rheumatoid arthritis: a systematic review of guideline recommendations and quality indicators[J]. *Arthritis Care Res (Hoboken)*, 2015, 67(2):169-179.
- [18] IKDAHL E, ROLLEFSTAD S, OLSEN I C, et al. EU-LAR task force recommendations on annual cardiovascular risk assessment for patients with rheumatoid arthritis: an audit of the success of implementation in a rheumatology outpatient clinic[J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015:515280.
- [19] JIRAK P, STECHEMESSER L, MORE E, et al. Clinical implications of fetuin-A[J]. *Adv Clin Chem*, 2019, 89:79-130.
- [20] VASHIST S K, SCHNEIDER E M, VENKATESH A G, et al. Emerging human fetuin a assays for biomedical diagnostics[J]. *Trends Biotechnol*, 2017, 35(5):407-421.
- [21] BRYLKA L J, KÖPPERT S, BABLER A, et al. Post-weaning epiphyseolysis causes distal femur dysplasia and foreshortened hindlimbs in fetuin-A-deficient mice[J]. *PLoS One*, 2017, 12(10):e0187030.
- [22] HINDIE M, WU D, ANSELME K, et al. Effects of fibronectin coating on bacterial and osteoblast progenitor cells adherence in a co-culture assay[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 973:17-30.

(收稿日期:2019-10-18 修回日期:2020-02-03)