论著

文章编号:1000-5404(2006)07-0726-03

双向电泳-质谱法寻找类风湿关节炎疾病相关蛋白

柏干苹[1,2,3],周丽娜[1,2],贺伟峰[1,2],罗高兴[1,2],陈烯伟[1,2],易绍萱[1,2],方勇飞[3],吴 军[1,2] (第三军医大学西南医院:[1]全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,[2]疾病蛋白质组学重庆市市级重点实验室,[3]风湿科,重庆 400038)

提 要:目的 建立正常人及类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)患者血浆蛋白质的双向凝胶电泳图谱,并分析其差异表达的蛋白质,寻找RA疾病相关蛋白,以阐明RA的发病机制。**方法** 采用固相pH梯度(immobilized pH gradient, IPG)双向凝胶电泳(two-dimensional gel electrophoresis, 2-DE)分离正常人及类风湿关节炎患者血浆总蛋白质,凝胶经银染显色后,PDQuest图像分析软件进行比较分析、识别差异表达的蛋白质,对差异蛋白质点用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱进行鉴定。**结果** 获得正常人及类风湿关节炎患者血浆蛋白双向凝胶电泳图谱,平均蛋白质点数分别为592和563,匹配率分别为89%和87%,通过比较分析,差异表达蛋白质点数为24,选取15个点进行质谱鉴定,成功鉴定7个蛋白质,其中6个蛋白质表达上调。**结论** 两者间存在一些差异表达的蛋白质,为阐明RA的发病机制打下了坚实的基础。

关键词:类风湿关节炎;血浆;蛋白质组;双向电泳

中图法分类号:R341;R446.9;R593.220.4 **文献标识码**:A

Mass spectrometric proteome analyses of plasma obtained from patients suffering from rheumatoid arthritis

BAI Gan-ping[1,2,3], ZHOU Li-na[1,2], HE Wei-feng[1,2], LUO Gao-xing[1,2], CHEN Xi-wei[1,2], YI Shao-xuan[1,2], FANG Yong-fei[3], WU Jun[1,2] ([1]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, [2]Chongqing Key Laboratory for Proteomics of Diseases, [3]Department of Rheumatism, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To find the different plasma-associated proteins of rheumatoid arthritis (RA) by using two-dimensional gel electrophoresis for understanding the pathogenesis of RA. **Methods** The total protein from either RA patients or normal ones was prepared by means of immobilized pH gradient based on two-dimensional gel electrophoresis. After silver staining, gel-image analysis was performed by using PDQuest. The differentially expressed proteins were identified by matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). **Results** 2-DE patterns of plasma from controls and RA patients were presented. The results showed that average number of protein spots was 592 and 563 respectively, and the corresponding average matching rate was 89% and 87% respectively. Gel-image analysis revealed that there were 24 differential protein spots. A total of 15 differential protein spots were successfully identified by MALDI-TOF-MS, of which 6 proteins were up-regulated as compared with control. **Conclusion** The differentially expressed proteins can be observed in plasma from RA and controls, which can be used to elucidate the pathogenesis of RA for further study.

Keywords: rheumatoid arthritis; plasma; proteome; two-dimensional electrophoresis

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种慢性系统性疾病,其病理特征是多关节的慢性滑膜炎,它的病情进展综合体现了炎症、自身免疫和滑膜组织增生这3种病理生理过程。该病发病1年内致残率高达20%,严重影响人类的健康和生活质量。虽现已证实类风湿关节炎是一种受抗原驱动的自身免疫性疾病,但其发病机制仍未完全明了,因而尚无满意的治疗药物和方法,RA一直也是基础和临床研究的热点。迄今为止,有关发病机制的研究中往往强调单个或少数几个分子的作用,缺乏在蛋白水平的系统性、整合性的研究,本研究利用蛋白质组技术,通过对正常人及RA患者血浆的蛋白质组表达差异进行分析,探索类风湿关节炎的发病机制,为早期诊断、寻找治疗的靶标提供新的线索。

基金项目:疾病蛋白质组学重庆市市级重点实验室专项基金资助项目(2004) Supported by the Funds for Chongqing Municipal Key Laboratory of Proteomics of Diseases (2004)

作者简介:柏干苹(1969-),女,四川省广元市人,硕士,主治医师,讲师,主要从事风湿病基础与临床方面的研究。电话:(023)60685643

通讯作者:吴 军,电话:(023)68754006, E-mail:junwupro@126.com;方勇飞,电话:(023)68754135

收稿日期:2006-01-16;**修回日期**:2006-03-07

1　材料与方法

1.1　临床病例

36 例 RA 活动期患者，均为重庆西南医院风湿科住院患者，临床诊断符合美国风湿病学会（ACR）标准[1]，其中男性 10 例，女性 26 例，平均年龄 42 岁。10 例正常人均为西南医院健康献血员。抽取每个患者及正常人静脉血 2 ml 备用。

1.2　方法

1.2.1　血浆蛋白质样品的制备　　参照文献[2]抽取 RA 患者及正常人静脉血 2 ml，700 × *g* 离心 10 min；1 300 × *g* 离心10 min；取上清备用。制备蛋白质样品时，为了减少误差及假阳性，增加二者的可比性，分别将 36 例 RA 患者及 10 例正常人血浆样品混合后用丙酮沉淀法浓缩蛋白质，用 Bradford 法（Bio-Rad 公司试剂盒）测定上清液中蛋白含量，并分装于 -80 ℃冻存备用。

1.2.2　双向电泳　　将蛋白样品 400 μg 加入水化样品缓冲液（8 mol/L 尿素、2% CHAPS、pH 3 ~ 10 的 0.5% IPG 缓冲液、18 mmol/L DTT、0.002% 溴酚蓝）中至总体积为 300 μl，充分混匀后加入 IPG 水化盘中。用镊子去除预制 IPG 胶条（pH 3 ~ 10，NL，17 cm，Bio-Rad 公司）上的保护层，将胶条胶面朝下置于水化盘中样品溶液上，胶条溶胀 >11 h。随后将溶胀好的胶条转移到聚焦盘中，分清胶条的正负极，置 Protein IEF Cell 等电聚集电泳仪（Bio-Rad 公司）电极板上进行等电聚焦。程序设置如下：250 V、线性、30 min，1 000 V、快速、1 h，10 000 V、线性、3 h，10 000 V、快速、40 000 Vh，500 V、快速、任意时间保持。等电聚焦电泳后 IPG 胶条在平衡液（尿素 6M，SDS 2%，Tris-HCl 0.375 mol/L pH 8.8，甘油 20%，DTT 2%）中平衡 15 min。再于 2.5% 碘乙酰胺替换 2% DTT 的同样平衡液中平衡 15 min。随后胶条被转移至 1 mm 厚的 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶（Bio-Rad 公司）上端进行第 2 项 SDS-PAGE 电泳。

1.2.3　银染　　按文献[3]进行，过程如下：凝胶水洗 5 min 后，置于固定液中（每块胶均按 250 ml 计算，100 ml 甲醇，25 ml 乙酸，125 ml Milli Q 水）固定过夜；致敏液（75 ml 甲醇，10 ml 5% 硫代硫酸钠，17 g 乙酸钠，165 ml Milli Q 水）敏化 30 min；水洗胶 5 min × 3 次；银染液（25 ml 2.5% 硝酸银，225 ml Milli Q 水）银染 20 min；水洗胶 1 min × 2 次；显色液（6.25 g 碳酸钠，100 μl 36% 甲醛溶液，250 ml Milli Q 水）显影至背景出现；终止液（1.46% EDTA 溶液）停显 10 min；水洗胶 5 min × 3 遍后扫描。

1.2.4　凝胶图像采集与分析　　凝胶通过 GS800 Calibrated Densitometer 扫描仪（Bio-Rad 公司）以及 Quantity One 4.5.0 扫描软件（Bio-Rad 公司）进行扫描获取图像，数字化图像文件运用 PDQuest 7.3 分析软件（Bio-Rad 公司）对图像进行分析，图像分析过程包括蛋白点的检测、量化、背景消减和点的匹配，进行强度校正、点检测、背景消减、匹配、1D 校正、建立平均凝胶分析等。

1.2.5　质谱鉴定　　切割蛋白质点置于 Eppendorf 管中，进行胶内蛋白质酶解后，将从蛋白质差异点抽提所得的肽段通过 Autoflex 质谱议进行分析，获取蛋白样品的肽质量指纹图（由北京华大蛋白质组研发中心完成），最后应用 Mascot 软件在人类蛋白质公共数据库（NCBI、SWISS-PROT）中搜寻，获得蛋白质的相关信息。

2　结果

2.1　正常人及类风湿关节炎患者血浆的双向凝胶电泳图谱

同一标本的总蛋白，上样量为 400 μg，均在相同条件下制备了 3 张 2-DE 胶。3 次双向电泳图谱非常相似，采用 GS800 Calibrated Densitometer 扫描仪扫描获取图像，通过 PDQuest 7.3 2-DE 分析软件进行点分析，获得正常人及类风湿关节炎患者血浆 3 块凝胶间的平均蛋白质点数分别为 592 和 563。这些蛋白质等电点和分子量大多数集中于 pH 值 4 ~ 8 区域，如图 1、2。经过背景消减后，将其中的 1 块胶定为参考胶进行 3 块凝胶间的蛋白质点的匹配，正常人及类风湿关节炎患者血浆图谱匹配率达 89% 和 87%。同时为了考察两种蛋白质图谱中相互匹配的点是否为同一种蛋白质，选择图 1、2 中相匹配的两点分别进行质谱鉴定，结果均为补体 complement component C4B（gi|55961839），证明胶图具有良好的稳定性，可进行进一步的蛋白质差异表达分析。

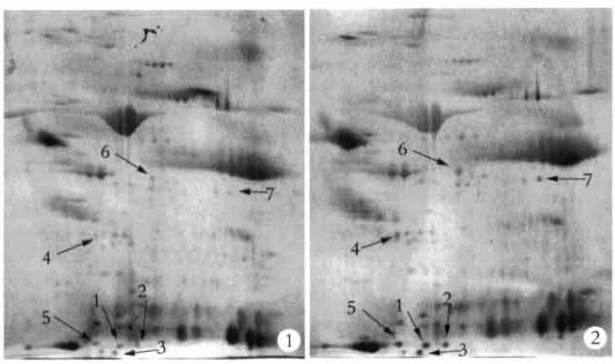


图 1　正常人血浆蛋白质双向电泳图谱

图 2　RA 患者血浆蛋白质双向电泳图谱

2.2　差异蛋白质点的分析

差异表达蛋白质点筛选的标准：凝胶电泳图进行扫描后，用 PDQuest 7.3 分析软件对两组凝胶电泳图谱进行匹配分析，筛选出两者间表达量相差 3 倍以上的差异表达蛋白质点数为 24 个，选取其中最明显的 15 个点进行质谱鉴定，成功鉴定出 7 个蛋白质，其中 6 个蛋白质表达上调，1 个蛋白质表达下调（补体 C3），见表 1。

表 1　正常人及 RA 患者血浆差异蛋白质谱鉴定结果

编号	NCBI 检索 ID	蛋白名称	分值	序列符合率	等电点	分子量
1	gi|296653	hp2-alpha[Homo sapiens]	67	19%	6.25	42 126
2	gi|4505817	phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, type 1, beta isoform 2 [Homo sapiens]	69	21%	6.39	61 226
3	gi|339685	transthyretin[Homo sapiens]	80	52%	5.33	12 835
4	gi|47124562	HP protein[Homo sapiens]	122	37%	8.48	31 647
5	gi|37499465	apolipoprotein A-I[Homo sapiens]	189	58%	5.56	30 759
6	gi|127514	Ig mu chain C region[Homo sapiens]	75	21%	6.35	50 210
7	gi|40786791	complement component 3[Homo sapiens]	110	10%	6.02	188 569

3 讨论

类风湿关节炎的发病呈进展性及破坏性，近10年来，人们越来越认识到RA病情进展很快，在出现症状后2年内，50% ~90%的患者有关节受损的放射学改变，虽尚无根治的方法，早期比晚期治疗更易成功；另外，目前临床使用的1987年美国风湿病学会（ACR）分类标准主要适用于典型病例，对于早期患者敏感性及特异性均较差。因而阐明其发病机制，对早期诊断、防止病情进展、寻找根治的方法均有重要的意义。蛋白质组学研究则为人类疾病的病理机制提供了一个更好的研究方法。目前对疾病相关标志蛋白分子的筛选已在世界范围内形成热潮，对RA蛋白质组学的研究也有零星报道。本研究旨在通过对RA血浆差异蛋白质组学的研究为早期诊断、寻找治疗的靶标提供新的线索。

本研究表明，在正常人及活动期类风湿关节炎患者血浆之间存在差异表达蛋白质，具体表现是RA患者血浆中Ⅰ型磷脂酰肌醇-4-磷酸-5-激酶（PIP5K）、转甲状腺蛋白、结合珠蛋白（HP）、载脂蛋白A Ⅰ（apoA Ⅰ）和Ig mu链含量明显高于正常人。复习文献可知，apoA Ⅰ是高密度脂蛋白（HDL）最主要的蛋白成分，并与HDL颗粒的形成有关，它还是卵磷脂－胆固醇酰基转移酶（lecithin- cholesterol acyltransferase，LCAT）的主要激活剂。LCAT在胆固醇的逆向转运中起关键作用。最近的研究认为[4,5]，apoA Ⅰ具有抑制炎症的作用，可以阻断活化T细胞对于巨噬细胞的激活，抑制巨噬细胞活化和释放炎性因子；当炎症具有慢性化的倾向时，apoA Ⅰ水平下降。RA患者血清中apoA Ⅰ增高，可能是机体对炎症的调节反应，调控炎症程度，抑制炎症的扩大化。当机体这种代偿性反应不足以阻止炎症的进展时，疾病则进展，损害关节滑膜和软骨。

结合珠蛋白（HP）是急性时相反应蛋白之一，其血清含量在肿瘤、炎症、感染、创伤等病理情况下显著升高。研究表明[6-8]，骨关节炎、RA和血清阴性脊柱关节病患者活动期HP均明显增高，但其升高的时相点较C反应蛋白（CRP）晚。CRP也是急性时相反应蛋白之一，在炎症发生的最初2 h内含量就会增加，而HP反应较慢，在炎症发生12 ~24 h后含量才上升，在72 ~96 h达到峰值，其下降的速度也较慢。故本研究提示apoA Ⅰ和HP含量的增加标志着急性炎症的存在，检测血浆中二者的含量可能有助于RA的早期诊断及评价疾病的活动性。

RA患者的补体水平随病情变化而波动，在合并有关节外表现及活动期时可出现总补体、C_3、C_4水平下降，本研究结果与此一致，这可能与抗原抗体反应形成免疫复合物消耗大量补体有关。PIP5K和转甲状腺蛋白与RA的关系少见文献报道，在RA病理过程中的作用有待进一步研究，可能是RA血浆中潜在的标志性蛋白质。

血浆蛋白来源广泛（生理、病理状态下不同组织和器官分泌及损伤细胞泄露、疾病组织释放等），数量最多（机体可以产生多达10 ~100万种具有不同抗体特异性的免疫球蛋白分子），含量差别大（高、低丰度蛋白的存在），成为血浆蛋白质组研究技术上的瓶颈。当利用2-DE分离血浆蛋白质时，大量高丰度蛋白如白蛋白、IgG会掩盖许多重要的低丰度蛋白，降低其分辨率。虽文献报道去除高丰度蛋白的方法较多，但其特异性均较低。尽管如此，应用蛋白质组学的研究方法，全面研究血浆中蛋白质组的改变，仍可为研究疾病的发病机制，寻找特异的生物标志以及药物的开发提供一种全新的方法。同时结合现代物理学、化学、数理科学、生物信息学等学科的发展，开发出高通量、高灵敏度、高稳定性的血浆蛋白质组学技术，可以缩短甚至消除血浆蛋白总数量与可检测蛋白数量间的距离，推动血浆蛋白质组学的应用研究，最终发现更多可用于临床诊断和疗效评价的血浆蛋白。如果克服了技术上的瓶颈，使成百上千、上万、甚至上百万的血浆蛋白得到应用，无疑会在疾病诊断和疗效评价乃至新药开发上掀起一场革命。

参考文献：

[1] 中华医学会风湿病学分会. 类风湿关节炎诊治指南（草案）[J]. 中华风湿病学杂志，2003，7(4)：250－254.

[2] JIANG L，HE L，FOUNTOULAKIS M. Comparison of protein precipitation methods for sample preparation prior to proteomic analysis[J]. J Chromatogr A，2004，1023(2)：317－320.

[3] YAN J X，WAIT R，BERKELMAN T，*et al*. A modified silver staining protocol for visualization of proteins compatible with matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization-mass spectrometry[J]. Electrophoresis，2000，21(17)：3666－3672.

[4] BURGER D，DAYER J M. High-density lipoprotein-associated apolipoprotein A-I：the missing link between infection and chronic inflammation? [J]. Autoimmun Rev，2002，1(1-2)：111－117.

[5] BRESNIHAN B，GOGARTY M，FITZGERALD O，*et al*. Apolipoprotein A-I infiltration in rheumatoid arthritis synovial tissue：a control mechanism of cytokine production[J]. Arthritis Res Ther，2004，6(6)：R563－R566.

[6] 郑 毅，尹国才，任 建. 骨关节炎急性时相反应蛋白的变化[J]. 中华风湿病学杂志，1998，2(4)：215－217

[7] YILDIRIM K，KARATAY S，MELIKOGLU M A，*et al*. Associations between acute phase reactant levels and disease activity score（DAS28）in patients with rheumatoid arthritis[J]. Ann Clin Lab Sci，2004，34(4)：423－426.

[8] 康日辉，叶德富，薛 原，等. 类风湿性关节炎和血清阴性脊柱关节病患者血清急性时相反应蛋白的测定及其临床意义[J]. 中国综合临床，2001，17(3)：193－194.

（编辑 薛国文）