论著

文章编号:1000-5404(2008)02-0166-04

类风湿关节炎患者滑膜成纤维细胞的差异蛋白质谱分析

柏干苹[1,3],周丽娜[1],贺伟峰[1],罗高兴[1],陈烯伟[1],陈光兴[2],胡晓红[1],石东文[1],方勇飞[3],吴 军[1] (第三军医大学西南医院:[1]全军烧伤研究所,疾病蛋白质组学重庆市重点实验室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,[2]关节外科中心,[3]风湿科,重庆 400038)

摘 要:**目的** 应用双向凝胶电泳-质谱法分析正常人及类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)患者滑膜成纤维细胞蛋白质组表达差异,探讨差异蛋白在类风湿关节炎发病中的作用。**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滑膜成纤维细胞总蛋白质,银染显色,PDQuest软件分析图像,比较两种细胞蛋白质组表达差异,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,并用Western blot验证部分表达差异蛋白质。**结果** ①采用窄范围的pH 4~7 IPG胶条进行2-DE分析,正常人及RA患者滑膜细胞蛋白胶图上分别平均显示852、837个点。有49个蛋白点在正常、RA滑膜细胞间有2倍以上的显著性量变。②分别在胶图上共选取40个表达水平存在明显差异的蛋白质点进行质谱鉴定,鉴定出23个在RA患者滑膜细胞中表达上调蛋白质。Western blot验证Enolase α、Annexin I、Cathepsin D、SOD2、Peroxiredoxin 2在RA滑膜细胞中表达显著升高。**结论** 正常人及类风湿关节炎患者滑膜成纤维细胞表达蛋白质组存在差异。这些差异蛋白可能参与类风湿关节炎的发病。

关键词:滑膜成纤维细胞;蛋白质组;双向电泳;类风湿关节炎

中图法分类号:R341;R394.2;R593.22 **文献标识码**:A

Differential proteome of human synovial fibroblasts from rheumatoid arthritis patients

BO Gan-ping[1,3], ZHOU Li-na[1], HE Wei-feng[1], LUO Gao-xing[1], CHEN Xi-wei[1], CHEN Guang-xing[2], HU Xiao-hong[1], SHI Dong-wen[1], FANG Yong-fei[3], WU Jun[1] ([1]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, [2]Department of Orthopaedics, [3]Department of Rheumatism, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To understand the possible role of some proteins expressed by human synovial fibroblasts (SFs) in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. Methods The expression difference of synovial fibroblast proteins between rheumatoid arthritis (RA) patients and healthy controls was analyzed by 2-DE. The differential expression spots were identified by matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS), followed by bioinformatics analysis, some of which were validated by Western blot. Results Using 12% SDS-PAGE following pH 4 – 7 IPG strips in IEF, averagely 837 and 852 protein spots were detected in RA patients and normal subjects, respectively. Gel image analysis revealed that there were 49 differential protein spots. By peptide mass fingerprinting strategy, we identified 40 protein spots derived from gels of SFs in RA patients among differential spots and 23 valid proteins were obtained. Western blot analysis showed that expressions of Enolase α, Annexin I, Cathepsin D, SOD2, Peroxiredoxin 2 were significantly higher in SFs from RA patients than those from normal subjects, which was consistent with proteome analysis. Conclusion The differential proteins might be involved in inflammation of synovitis in RA.

Key words: synovial fibroblasts; proteome; two-dimensional electrophoresis; rheumatoid arthritis

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是临床常见风湿病,其主要病理特点是滑膜细胞增生,多种炎性细胞浸润,血管翳形成以及软骨和骨组织的破坏,最终导致关节畸形和功能丧失。在RA的发病机制中,滑膜组织的A(类巨噬细胞)、B型细胞(成纤维样滑膜

作者简介:柏干苹,女,四川省广元市人,博士,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, E-mail: zhaobaiganping@163.com

通信作者:吴 军,电话:(023)68754006, E-mail: junwupro1@yahoo.com.cn

收稿日期:2007-09-28;修回日期:2007-11-12

细胞或滑膜成纤维细胞，synovial fibroblasts，SFs）是 RA 关节损伤的最终效应细胞，参与关节炎症和关节破坏。研究滑膜成纤维细胞表型改变的机制正在成为类风湿关节炎的新热点。SFs 在 RA 的发生、发展中发挥着 T 细胞依赖途径所不可解释的重要作用。SFs 在 RA 的发病中主要参与以下环节[1,2]：①表现出转化细胞特征，类肿瘤样异常增殖。②产生炎性介质、促炎症细胞因子及抗炎症细胞因子调节炎症及免疫反应。③分泌基质金属蛋白酶等参与基质降解以及骨破坏。④参与血管生成。但其机制尚未阐明。

本研究利用高分辨双向电泳（two-dimensional gel electrophoresis，2-DE）对正常人及类风湿关节炎患者 SFs 进行蛋白质分离，并对差异蛋白质进行鉴定及功能分析，为探讨 SFs 在类风湿关节炎发病中的作用提供新的线索。

1　材料与方法

1.1　滑膜细胞的培养

人关节滑膜组织取自 5 例在本院及新桥医院关节外科行关节置换术的 RA 患者及 7 例正常人外伤后行滑膜切除术者，RA 患者临床诊断均符合美国风湿病学会标准[3]。参照文献[4]的方法进行滑膜细胞的原代培养：术中取出滑膜组织，立即于无菌条件下剪碎，0.25% 胰蛋白酶 37 ℃消化 2 h 后，离心收集细胞，加入含有 20% 胎牛血清（Gibco 公司）DMEM 培养液，置于 37 ℃、5% CO_2 孵箱中令其贴壁生长，细胞生长至 85% 满时，胰蛋白酶消化进行 1∶2传代。本实验中采用 3～5 代滑膜成纤维细胞。Giemsa 染色鉴定滑膜成纤维细胞形态。

1.2　方法

1.2.1　细胞总蛋白质的制备[5]　　取 3～5 代培养滑膜细胞，PBS 液洗涤细胞 3 次后，加入细胞裂解液（尿素 7 mol/L，硫脲 2 mol/L，CHAPS 4%，DTT 65 mmol/L，Bio-Lyte 0.2%），20 000 r/min，4 ℃离心 1 h，取上清，用 Bradford 方法测定蛋白含量，并分装于 -80 ℃冻存备用。其中尿素、CHAPS、DTT、Bio-Lyte 及蛋白定量试剂盒均为 Bio-Rad 公司产品，硫脲购自 Sigma 公司，所有溶液均用 Milli Q 水配制。

1.2.2　双向电泳　　采用窄范围的 pH 4～7 IPG 胶条（17 cm，Bio-Rad 公司）进行 2-DE 分析。按 Bio-Rad 双向电泳指南进行。400 μg 蛋白样品加入水化样品缓冲液中溶胀后置于 Protein IEF Cell 等电聚集电泳仪（Bio-Rad 公司）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、5 h，10 000 V、快速、60 000 Vh，500 V、快速、任意时间保持。等电聚焦电泳后 IPG 胶条经平衡转移至 1 mm 厚的 12% SDS 聚丙烯酰胺凝胶（Bio-Rad 公司）上端进行第 2 向 SDS-PAGE 电泳。

1.2.3　银染　　按文献[6]进行，过程：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）终止 10 min；水洗胶 5 min ×3 次后进行凝胶扫描。

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，经洗涤、脱色及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[基质辅助激光解析电离飞行时间质谱（matrix-assisted Laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry，MACDI-TOF-MS）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。

1.2.6　Western blot 验证差异蛋白　　采用 Western blot 检测了 Enolaseα、Annexin I、Cathepsin D、SOD2、Peroxiredoxin2 5 个蛋白质在正常人及 RA 患者滑膜成纤维细胞中的表达差异。将 20 μg 滑膜总蛋白加入 2 × SDS 上样缓冲液（0.1 mol/L Tris pH 6.8，0.2 mmol/L DTT，4% SDS，20% 甘油，0.2% 溴酚蓝），100 ℃ 变性 5 min，上样，120 V SDS-PAGE 电泳 2 h，1 mA/cm^2 胶面积电转 30 min。含 5% 脱脂奶粉的 TBST 室温封闭 1 h，分别加入一抗（羊抗 Enolase α，兔抗 Annexin I，Cathepsin D，SOD2，Peroxiredoxin 2 均为 Santa Cruz 产品），4 ℃振荡孵育膜过夜。TBST 洗膜 10 min ×3 次。加入 HRP 标记的二抗，室温 1 h。TBST 洗膜 10 min ×3 次。ChemidocXRS 凝胶成像分析仪（Bio-Rad 公司，美国）化学发光检测，扫描、保存、分析图像。

2　结果

2.1　正常人及 RA 患者滑膜成纤维细胞蛋白质组图谱差异

采用 pH 4～7 NL IPG 胶条进行第一向等电聚焦和第二向 12% 的 SDS-PAGE，在相同条件（即每块胶上样量均为 400 μg、IPG 胶及 SDS-聚丙烯酰胺凝胶所用试剂均为同一批次、使用同一电泳仪在相同参数下电泳、显色条件和程序一致）下，2 种细胞总蛋白各成功制备了聚焦良好、显色清晰的 2-DE 胶 3 块。数字化图像经 PDQuest 7.3 软件分析显示：二者蛋白质点的总体分布模式非常相似，正常人及 RA 患者滑膜细胞蛋白胶图上分别平均显示 852、837 个点。两组胶蛋白点与参考胶的平均匹配百分率分别为 90% 和 88%。两组电泳图谱的相关系数为 0.805。有 49 个蛋白点在正常、RA 滑膜细胞间有 2 倍以上的显著性量变。结合肉眼观察选取了 40 个表达差异点进行质谱鉴定。两种细胞 pH 4～7 范围蛋白质的 2-DE 银染图谱见图 1、2。图 3 是 PDQuest 软件分析的 MASTER 胶，包含了两组细胞 2-DE 银染图谱（pH 4～7）的全部信息，成功鉴定的蛋白质点如图 3 所示。

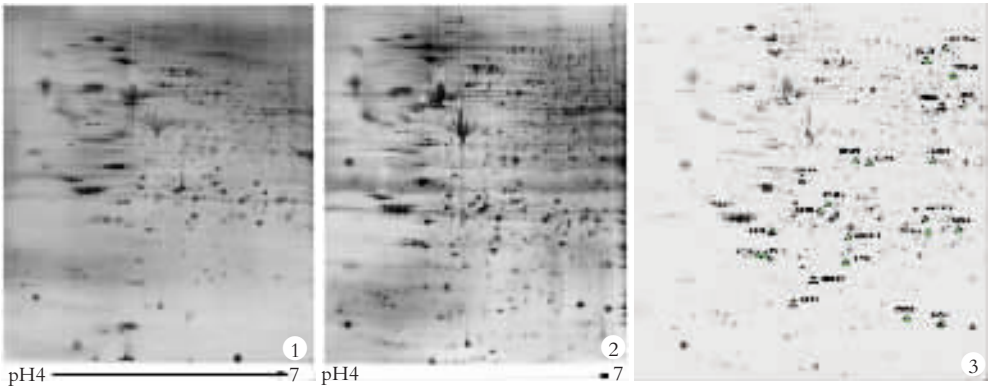


图1 正常滑膜细胞 2-DE 银染图谱(pH 4~7)

图2 RA 滑膜细胞 2-DE 银染图谱(pH 4~7)

图3 滑膜细胞蛋白质双向电泳-Master 胶图谱(pH 4~7)

2.2 差异蛋白质的 MALDI-TOF 质谱鉴定及数据库检索

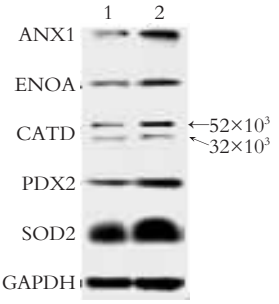
分别选择、切取 2-DE 胶图上与正常人比较在 RA 滑膜成纤维细胞中高表达的 40 个差异蛋白点进行了质谱鉴定,经 NCBI 数据库分析,共成功鉴定 23 个蛋白质,这 23 个蛋白质的名称及相关信息见表 1。

2.3 Western blot 验证差异蛋白

采用 Western blot 检测了 Enolase α、Annexin I、Cathepsin D、SOD2、Peroxiredoxin 2 在正常人及 RA 患者滑膜成纤维细胞中的表达差异(图 4)。用 Quantity one 4.5.0 软件分析,GAPDH 在各组条带的积分光密度(IOD)一致,反映了总蛋白上样量一致。5 个差异蛋白在 RA 滑膜细胞中的表达均显著升高,该结果与蛋白质组的检测结果一致,说明双向电泳检测结果的可靠性。

表1 正常人及 RA 患者滑膜细胞差异表达蛋白质信息

蛋白质简称	蛋白质名称	NCBI 数据库编号	最高分值	序列覆盖率(%)	匹配肽段	等电点	理论分子质量
能量代谢							
ENOA	Enolase a	gi|4503571	66	22	6/16	7.01	47 481
TPIS	Triosephosphate Isomerase	gi|17389815	147	45	10/18	6.45	26 910
LDHB	Chain B, Human Heart L-Lactate Dehydrogenase H Chain	gi|13786848	74	19	6/14	5.72	36 769
蛋白质转录、合成							
CATD	Chain H, Cathepsin D At Ph 7.5	gi|5822091	94	53	10/30	5.31	26 457
PA28B	proteasome activator PA28 beta chain	gi|48734793	129	44	12/30	5.44	27 515
RPLP0	Ribosomal protein P0	gi|12654583	126	47	11/31	5.42	34 424
SSB	Ribonucleoprotein La	gi|337457	106	36	12/35	8.47	40 683
信号转导							
GDIR	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha	gi|76780069	77	29	8/18	5.02	23 250
TCTP	Tumor protein, translationally-controlled 1	gi|15214610	77	36%	6/16	4.84	19 759
TCTP	Tumor protein, translationally-controlled 1	gi|15214610	81	41	8/35	4.84	19 759
细胞结构							
ANX1	Annexin I	gi|4502101	198	45	14/19	6.57	38 918
LEG1	Galectin-1	gi|42542977	96	47	7/25	5.34	14 868
LEG3	laminin-binding protein(Galectin-3)	gi|1125065	65	52	4/11	7.03	14 218
LMNA	Lamin A/C, isoform 1 precursor	gi|54035059	77	27	13/56	6.57	74 380
NMMHC-A	nonmuscle myosin heavy chain-A	gi|189030	77	22	12/28	7.55	82 322
CRABP2	Nmr Solution Structure Of Human Cellular Retinoic Acid Binding Protein-Type Ii, 22 Structures	gi|4389255	74	62	7/19	5.23	15 737
SNAPA	N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein, alpha	gi|47933379	123	43	14/32	5.23	33 667
细胞应激、防御							
PDX2	Peroxiredoxin 2 isoform b	gi|33188452	150	42	9/12	6.12	16 036
SOD2	manganese superoxide dismutase isoform B precursor	gi|67782309	88	40	6/15	8.36	20 882
CCT6A	Acute morphine dependence related protein 2	gi|14517632	82	24	9/21	6.36	58 426
其他							
CGI-114	CGI-114 protein	gi|4929697	68	45	9/30	5.6	23 967
MDGI	mammary-derived growth inhibitor	gi|1869803	77	59	6/24	6.29	14 878
	Hypothetical protein LOC23281, isoform b	gi|21595476	73	17	6/11	5.03	41 120



1：正常对照组；2：RA

图 4　Western blot 验证差异蛋白在正常和 RA 滑膜细胞中的表达

3　讨论

由于 RA 发病的复杂性及异质性，目前尚无根治的方法。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；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。因此 RA 发病机制的研究及寻找早期诊断标志一直是基础及临床研究的热点。

本研究表明，23 个蛋白在 RA 滑膜成纤维细胞中表达明显变化。这些蛋白涵盖结构蛋白、信号转导相关蛋白、信号分子、细胞代谢相关蛋白质等。我们推测部分分子可能与滑膜成纤维细胞在关节炎中的行为特征相关，这些蛋白在滑膜成纤维细胞的增殖，炎症调控等方面可能发挥着重要的作用。

急慢性炎症过程中机体发生氧化应激产生的活性氧与软骨基质的降解有着密切的关系[7]。RA 滑膜成纤维细胞和单核细胞的硫氧还原蛋白的免疫定位也揭示了氧化应激诱导的促炎症途径的存在[8]。已有文献报道 SOD 及 PDX5 在骨关节炎（osteoarthritis，OA）滑膜成纤维细胞中的活性及表达增加，并且在 TNF、IL-1 刺激后其表达上调更明显[9,10]。本研究亦显示，SOD2 和 Peroxiredoxin 2 在 RA 滑膜成纤维细胞中表达增加，提示二者的表达上调可能是机体对滑膜炎症的一种保护反应，旨在清除细胞内多余的活性氧分子，增强细胞抗氧化能力而调控炎症程度。

糖皮质激素用于治疗 RA 已有几十年的历史，其抗炎机制之一是诱导了可抑制磷脂酶 A2 活性的蛋白的表达，Annexin I 是其中之一。许多实验证明了 Annexin I 在关节炎中的抗炎特性[11,12]：① Annexin I 在人外周血白细胞和滑膜组织表达。②RA 滑膜成纤维细胞表面有 Annexin I 的结合位点。③外源性给予 Annexin I 可明显抑制实验动物的关节炎症，而内源性 Annexin I 可下调促炎症细胞因子 IL-1β、IL-6、TNF-α 等的表达而发挥其抗炎作用。因此，Annexin I 在关节炎滑膜成纤维细胞中的高表达可能是机体的一种防御机制，利用 Annexin I 类似物或诱导非激素途径的内源性 Annexin I 的高表达可能成为关节炎症新的治疗靶点。

金属蛋白酶及组织蛋白酶导致细胞外基质的降解在软骨破坏中起着重要的作用。实验已证实[13]，在 RA、OA 滑液中以及滑膜衬里层有组织蛋白酶 D 的存在，在血管翳周围该酶的表达在 RA 中高于 OA，其参与基质降解的作用可能性极大。本实验结果与报道一致。其具体的作用机制有待于进一步研究。

参考文献：

[1] Morand E F, Leech M. Macrophage migration inhibitory factor in rheumatoid arthritis[J]. Front Biosci, 2005, 10: 12 – 22.

[2] DeBusk L M, Chen Y, Nishishita T, *et al*. Tie2 receptor tyrosine kinase, a major mediator of tumor necrosis factor alpha-induced angiogenesis in rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Rheum, 2003, 48(9): 2461 – 2471.

[3] 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.

[4] 孙铁铮, 吕厚山, 药立波, 等. 染料木黄酮对类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞生长的影响[J]. 中华风湿病学杂志, 2000, 4(5): 266 – 269.

[5] 柏干苹, 周丽娜, 贺伟峰, 等. 双向电泳-质谱法寻找类风湿关节炎疾病相关蛋白[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(7): 726 – 728.

[6] 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.

[7] 何颖辉, 肖　诚, 王跃生, 等. 樱桃花青素对佐剂性关节炎大鼠自由基和炎症因子的影响[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(20): 1602 – 1605.

[8] 舒　强, 李兴福, 刘花香, 等. 沙利度对类风湿关节炎滑膜成纤维样细胞影响的体外研究[J]. 实用临床医药杂志, 2007, 11(1): 39 – 44.

[9] Wang M X, Wei A, Yuan J, *et al*. Expression and regulation of peroxiredoxin 5 in human osteoarthritis[J]. FEBS Lett, 2002, 531(2): 359 – 362.

[10] Mazzetti I, Grigolo B, Pulsatelli L, *et al*. Differential roles of nitric oxide and oxygen radicals in chondrocytes affected by osteoarthritis and rheumatoid arthritis[J]. Clin Sci (Lond), 2001, 101(6): 593 – 599.

[11] Yang Y H, Morand E F, Getting S J, *et al*. Modulation of inflammation and response to dexamethasone by Annexin 1 in antigen-induced arthritis[J]. Arthritis Rheum, 2004, 50(3): 976 – 984.

[12] Perretti M, Gavins F N. Annexin 1: an endogenous anti-inflammatory protein[J]. News Physiol Sci, 2003, 18: 60 – 64.

[13] Taubert H, Riemann D, Kehlen A, *et al*. Expression of cathepsin B, D and L protein in juvenile idiopathic arthritis[J]. Autoimmunity, 2002, 35(3): 221 – 224.

（编辑　王小寒）