论著

文章编号:1000-5404(2012)15-1564-04

# 类风湿关节炎早期诊断指标的筛选及鉴定

万 萍,钟 兵,邹庆华,方勇飞 (400038 重庆,第三军医大学西南医院中西医结合科)

[摘要] **目的** 寻找类风湿关节炎的早期诊断指标。**方法** 采用双向电泳、MALDI-TOF/TOF 质谱分析等方法从类风湿关节炎滑膜组织中筛选并鉴定特异性自身抗原,进一步建立该抗体的 ELISA 检测方法,测定 30 例早期类风湿关节炎患者及 30 例健康对照者血清中的抗体水平,并分析抗体水平与疾病活动度的相关性。**结果** 早期类风湿关节炎血清中筛选并鉴定出特异性的锰超氧化物歧化酶抗体。ELISA 法检测早期 RA 血清中锰超氧化物歧化酶抗体 $D(450)$ 值均值($1.72 \pm 0.35$)明显高于正常人血清($0.95 \pm 0.34$)($P<0.000\ 1$)。在早期 RA 患者血清中锰超氧化物歧化酶抗体阳性率为 63.3%,且该抗体水平与 RF、CCP、CRP 呈明显正相关。**结论** 锰超氧化物歧化酶抗体可能作为类风湿关节炎早期诊断与疾病活动性预测的指标之一。

[关键词] 类风湿关节炎;自身抗体;锰超氧化物歧化酶;早期诊断

[中图法分类号] R446; R593.22 [文献标志码] A

# Manganese superoxide dismutase: an early diagnostic marker for rheumatoid arthritis

Wan Ping, Zhong Bing, Zou Qinhua, Fang Yongfei (Department of Chinese and Western Integrated Medicine, Southwest Hospital, Third Military Medical University. Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate an early diagnostic marker for rheumatoid arthritis. **Methods** Two-dimensional electrophoresis and MALDI-TOF/TOF mass spectrometry were employed to screen and identify the specific autoantigen in the fresh synovial tissues from 2 patients with identified rheumatoid arthritis. ELISA was used to measure the antibodies in the 30 serum samples from patients with early rheumatoid arthritis and the 30 serum samples from healthy donors. The correlation between antibody levels and disease activity was analyzed. **Results** Manganese superoxide dismutase antibody was specific presence in the serum of early rheumatoid arthritis. The mean $D(450)$ value of manganese superoxide dismutase antibody was $1.72 \pm 0.35$ in early RA serum, significantly higher than normal serum ($0.95 \pm 0.34$, $P<0.000\ 1$). The levels of manganese superoxide dismutase antibody was positively correlated with levels of RF, CCP and CRP in patients with early RA. The positive rate for these serum samples was 63.3% to manganese superoxide dismutase antibody RA. **Conclusion** Manganese superoxide dismutase antibodies might be used as a biomarker for early diagnosis of rheumatoid arthritis and for prediction of disease activity .

[**Key words**] rheumatoid arthritis; autoantibody; manganese superoxide dismutase; early diagnosis

Corresponding author: Fang Yongfei, E-mail: fangyongfei@qq.com

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis,RA)是一种以骨关节病变为主的自身免疫性疾病[1]。在我国发病率在0.1%左右,患病人数约500万。类风湿关节炎病情呈进行性发展,最终导致关节畸形。类风湿关节炎具有非常严重的致残性,根据全国第2次残疾人口调查结果显示,因类风湿关节炎导致的残疾在男性和女性残疾人当中分别占第2位和第1位,仅次于心血管疾病导致的残疾[2]。类风湿关节炎发病初期的1~2个月为"窗口期",若得到有效治疗,病情将得到明显控制,在疾病早期未得到有效治疗,病情将迁延不愈,直至慢性化发展。所以,寻找类风湿关节炎早期诊断指标,是实现其早期治疗的前提[3]。我们应用免疫蛋白组学方法,在类风湿关节炎早期患者血清中筛选出锰超氧化物歧化酶(manganese superoxide dismutase, MnSOD)自身抗体,在验证该筛选结果的基础上,通过间接法ELISA调查该抗体在早期RA中的分布特点及其与RA疾病活动度的相关性,为RA的早期诊断及

[通信作者] 方勇飞,E-mail:fangyongfei@qq.com

病情评价提供新的血清学指标。

## 1 资料与方法

### 1.1 临床资料

2 例类风湿关节炎患者滑膜组织取自我院关节外科中心；从 2009－2011 年我科收集的 RA 血清中筛选自出现关节炎症状 2 个月内确诊的早期类风湿关节炎患者血清 30 例，其中男性 11 例，女性 19 例，平均年龄 65.2 岁。RA 诊断标准参照 ACR/EULAR2010 分类标准。正常人血清 30 例取自我院健康查体中心，其中男性 10 例，女性 20 例，平均年龄 58.5 岁。所取标本均得到患者知情同意，本研究受我院伦理委员会批准。

### 1.2 试剂

尿素、硫脲、二硫苏糖醇（dithiothreitol，DTT）、十二烷基硫酸钠（sodium dodecyl sulphate，SDS）、甘油、碘乙酰胺、丙烯酰胺、矿物油、2D Quant Kit™、固相胶条（pH 3～11，NL 13 cm）购自美国 GE 公司；过硫酸铵购自美国 Amersham Bioscience 公司。Complete Mini 蛋白酶抑制剂购自德国 Roch 公司，PVDF 膜购自美国 Millipore 公司，SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate 发光试剂（美国 Thermo scientific 公司）。

### 1.3 仪器

IPGphor IEF unit 等点聚焦仪（瑞典 amersham pharmacia biotech 公司）、Hoefer Electrophoresis unit 垂直电泳系统（瑞典 amersham pharmacia biotech 公司）、GS-800 Calibrated Densitometer 凝胶扫描仪（美国 Bio-RAD 公司）、TE-77 PWR SEMI-DRY TRANSFER UN 半干转印仪（美国 Amersham Bioscience）。

### 1.4 样品制备

称取滑膜组织 100 mg，加入 1 ml 组织裂解液（40 mmol/L Tris，7 mol/L Urea，2 mol/L thiourea，4% CHAPS），并加入蛋白酶抑制剂。在冰上剪碎研磨并超声裂解。4 ℃ 12 000 r/min 离心 1h，取上清，测浓度后，分装－80℃冻存。

### 1.5 双向凝胶电泳

1.5.1 等电聚焦 取滑膜组织蛋白 500 μg，上样体积 250 μl。用 IPGphor IEF unit 完成水化和等电聚焦，电压时间积为 30 000 Vh。

1.5.2 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳 IGP 胶条经 10 g/L DTT 和 25 g/L 碘乙酰胺平衡后，Hoefer Electrophoresis unit 垂直电泳，50 mA，4 h。

### 1.6 Western blot 检测结果

电泳后根据凝胶面积计算电转条件（0.8 × $cm^2$ 面积）（mA），半干转印仪转膜 1 h。5% 封闭液 4 ℃封闭过夜。1∶200 稀释的混合早期类风湿关节炎患者及正常人血清室温孵育 1 h，1% Tween-20 TBS 洗涤 6 × 5 min；1∶10 000 HRP 标记的羊抗人 IgG 为二抗孵育室温 30 min，1% Tween-20 TBS 洗涤 6 × 5 min。加入发光试剂，暗室压片 5 min 后显影定影。

### 1.7 质谱鉴定及验证

将胶上只和早期类风湿关节炎患者血清反应的蛋白点切取后，送中国科学院上海生命科学研究院蛋白质组研究分析中心，经胶内酶解（Trypsin，20 h）、抽提酶解肽段、ZipTip 脱盐、MALDI-TOF/MALDI-TOF/TOF 质谱、软件分析数据等步骤鉴定蛋白质。

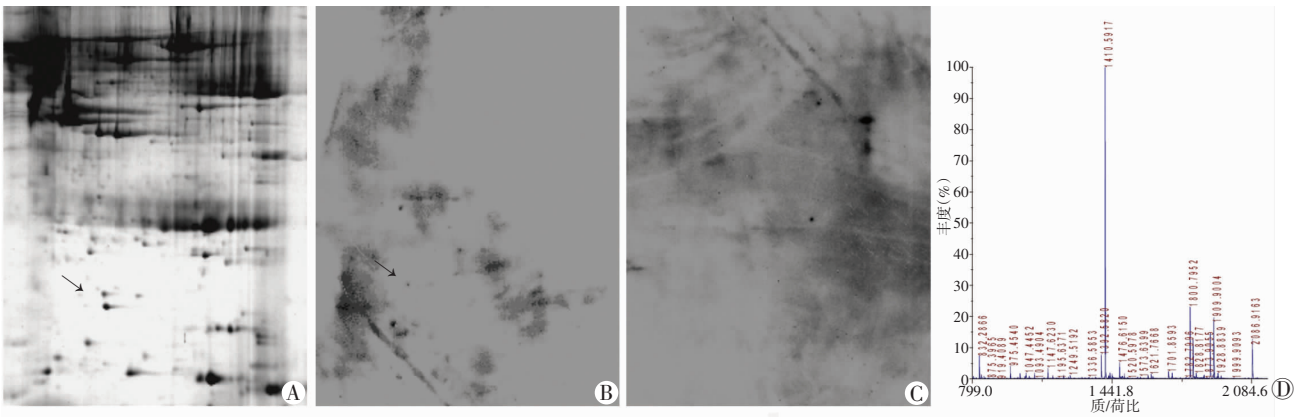
### 1.8 间接法 ELISA 检测血清中抗体

自 eBioscience 购得带 His 标签的重组蛋白，按照 10 μg/ml 包板，4 ℃过夜。1% BSA 室温封闭 1 h。1∶200 稀释待测血清，100 μl 37 ℃孵育 1 h，1% Tween-20 PBS 洗涤 6 × 5 min；加入 1∶4 000 羊抗人 HRP 标记的 IgG（H＋L）37 ℃孵育 30 min。1% Tween-20 PBS 洗涤 6 × 5 min；TMB 显色 10 min，2 mol/L 硫酸终止，450 nm 波长测定光密度值［$D$(450)］。

## 2 结果

### 2.1 类风湿关节炎滑膜组织备选抗原筛选及鉴定

我们按照上述方法，将 RA 滑膜组织蛋白经二维凝胶电泳分离，经考马斯亮蓝染色，显示出约 350 个独立的蛋白点（图 1A），说明我们在滑膜组织蛋白提取制备、等点聚焦及 SDS-Page 等阶段操作处理正确，所分离出的蛋白点能用于下一步备选抗原筛选。将上述分离得到的蛋白点用半干转印的方法电转到 PVDF 膜，用 RA 患者及正常血清作为一抗与之反应，用 HRP 标记的抗人 IgG 作为二抗，并显影（图 1B、C），这样筛选出只和 RA 血清反应的蛋白点视为备选抗原（图 1B 箭头所示），切取该蛋白点经质谱鉴定，质谱测序结果显示，在 RA 滑膜组织箭头所示蛋白点为锰超氧化物歧化酶，其 MALDI-TOF/TOF 质谱鉴定见图 1D，说明在 RA 血清中可能特异性存在抗锰超氧化物歧化酶抗体。




A：类风湿关节炎滑膜组织 2-DE 考马斯蓝染色图谱；B：类风湿关节炎血清 2-DE Western blot 图谱；C：正常人血清 2-DE Western blot 图谱；D：锰超氧化物歧化酶 MALDI-TOF/TOF 质谱图谱

**图 1 类风湿关节炎滑膜组织备选抗原筛选及鉴定**

将重组表达的锰超氧化物歧化酶包被在聚氯乙烯板上,通过BSA封闭,用稀释后的早期RA和正常人血清与之反应,洗板,去掉非特异性结合,再用HRP酶标记的抗人IgG孵育,TMB显色,通过测定标本$D(450)$值反映血清中抗锰超氧化物歧化酶水平。检测结果显示,在早期RA中锰超氧化物歧化酶抗体$D(450)$值均值为(1.72±0.35),正常人血清中为(0.95±0.34),早期RA血清中锰超氧化物歧化酶抗体水平明显高于正常人,二者血清抗体水平之间存在显著差异($P<0.000\ 1$)。

### 2.2 RA血清中锰超氧化物歧化酶抗体水平

我们应用间接法ELISA检测早期RA及正常血清水平。早期RA血清中锰超氧化物歧化酶抗体$D(450)$值均值为(1.72±0.35),明显高于正常人血清(0.95±0.34)($P<0.000\ 1$)(图2)。以正常人血清抗体$D(450)$值均值+2×标准差作为Cutoff值(1.63),在早期RA患者血清中锰超氧化物歧化酶抗体阳性率为63.3%。

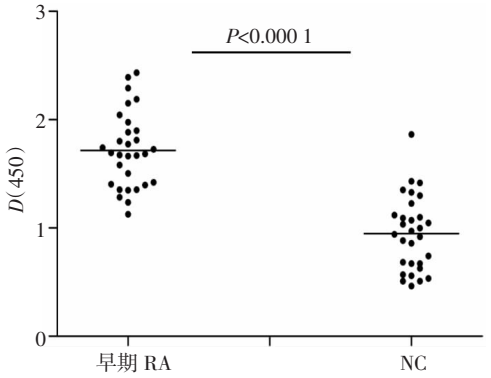



**图2 间接ELISA检测早期RA及正常人血清中锰过氧化物酶抗体**

### 2.3 疾病相关性分析

根据患者临床资料中类风湿因子(rheumatoid factor,RF)、抗环瓜氨酸肽抗体(anti-CCP antibody,ACPA)、C反应蛋白(C reactive protein,CRP)及红细胞沉降率(erythrocyte sedimentation rate,ESR)检测结果与抗体水平进行Pearson积矩线性相关分析,结果提示在早期RA血清中锰过氧化物酶抗体水平与RF、CCP、CRP呈高度正相关($P=0.003$、$0.000$、$0.003$,$r=0.521$、$0.436$、$0.488$),与ESR无相关性($P=0.107$,$r=0.233$),说明锰超氧化物歧化酶抗体水平可作为检测指标,反应类风湿关节炎疾病活动度,同时提示锰过氧化物酶及其抗体可能参与RA疾病发生及进展。

## 3 讨论

类风湿关节炎是种常见的类风湿疾病,发病原因尚不清楚,但具有相当高的致残率[4]。尽管类风湿关节炎分类标准经过多年研究和发展,但对类风湿关节炎的诊断,特别是在疾病早期阶段,依然没有明确的诊断指标。由于RA的早期治疗对预后有着重要作用,对关节炎症早期进行明确的诊断意义重大[5]。目前,绝大多数临床医师依赖积累的经验,结合实验室和放射检查对RA进行诊断。

血清学指标是类风湿病实验室检查的主要内容。其中,类风湿因子已经应用半个世纪之久。虽然其缺乏敏感性(54~88)%和特异性(48~92)%[6],仍然作为RA实验室检查的首选指标。对其他自身抗原的抗体,包括抗角蛋白抗体[7],Sa[8],抗核因子[9],BiP[10],RA33[11]等与RF比较,这些抗体诊断RA敏感性较差,但其中的很大多数都具有很高的特异性。新近发现的抗环瓜氨酸肽抗体具有70%左右的敏感性和90%以上的特异性,在RA的血清学诊断中得到广泛应用,但抗环瓜氨酸肽抗体在早期RA中的诊断价值仍不理想,据报道,其在早期RA中的阳性率不到60%[12-13]。虽然转录后瓜氨酸化修饰的fillagrin可能作为环瓜氨酸肽抗体所针对的靶抗原,但目前RA主要的参与其疾病发生的关键抗原仍不明确。发现RA疾病相关的关键抗原分子,对于阐述其发病机制及寻找新的特异性的诊断指标具有非常重要的意义。

从自身免疫性疾病发病机制来看,自身抗原应该来源于发病部位。我们从RA病变滑膜中提取蛋白,通过血清蛋白组学的方法筛选备选抗原。通过2-D分离蛋白点后,大约有10多个蛋白点能与RA血清特异性反应,提示这些蛋白点可能是RA的备选抗原,如图1B所示。在这些蛋白点中,质谱鉴定出锰超氧化物歧化酶。锰超氧化物歧化酶作为抗氧化酶,通过不断清除活性氧,在对抗氧化应激中发挥重要作用[14]。我们推测,关节炎症过程中,关节滑膜等病变部位锰超氧化物歧化酶可能表达增强或功能活化。但关于锰超氧化物歧化酶在RA中的具体作用少见报道。

我们建立了间接法ELISA,检测早期RA血清中锰超氧化物歧化酶抗体水平,发现与正常人比较,明显高于正常人血清,以正常人血清抗体$D(450)$值均值+2×标准差作为cutoff值(1.63),在早期RA患者血清中锰过氧化物酶抗体阳性率为63.3%,高于CCP及RF在早期RA中的阳性率(在60%以下)。所以针对锰过氧化物酶抗体检测可作为RA早期诊断的指标应用。

同时,我们通过相关性分析,发现锰过氧化物酶抗体水平与RA患者RF及CCP水平之间存在明显相关性($P<0.01$)。与反应炎症程度的CRP密切相关($P<0.01$),说明针对锰过氧化物酶的抗体反应可能参与RA炎症发生、维持或进展。同时说明,锰过氧化物酶的抗体水平可作为评价RA疾病活动程度的指标。

综合上述,我们在RA滑膜组织中发现的新的备选抗原锰过氧化物酶,早期RA血清中针对其的抗体反应可能是RA发病的机制之一,同时由于其抗体在早期RA中的较高阳性率及与RF、CCP和CRP之间的

相关性,锰过氧化物酶可作为 RA 早期诊断和病情活动评价的指标加以应用。

## 参考文献:

[1] Firestein G S. Evolving concepts of rheumatoid arthritis[J]. Nature, 2003, 423(6937): 356 – 361.
[2] 第二次全国残疾人抽样调查办公室、北京大学人口研究所. 第二次全国残疾人抽样调查数据分析报告[M]. 北京: 华夏出版社, 2008.
[3] van-Venrooij W J, van-Beers J J, Pruijn G J. Anti-CCP Antibody, a Marker for the Early Detection of Rheumatoid Arthritis[J]. Ann N Y Acad Sci, 2008, 1143: 268 – 285.
[4] O'Dell J R. Treating rheumatoid arthritis early: a window of opportunity? [J]. Arthritis Rheum, 2002, 46(2): 283 – 285.
[5] Mottonen T, Hannonen P, Korpela M, *et al*. Delay to institution of therapy and induction of remission using single-drug or combination-disease-modifying antirheumatic drug therapy in early rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Rheum, 2002, 46(4): 894 – 898.
[6] Bas S, Perneger TV, Kunzle E, *et al*. Comparative study of different enzyme immunoassays for measurement of IgM and IgA rheumatoid factors[J]. Ann Rheum Dis, 2002, 61(6): 505 – 510.
[7] Young B J, Mallya R K, Leslie R D, *et al*. Anti-keratin antibodies in rheumatoid arthritis[J]. Br Med J, 1979, 2(6182): 97 – 99.
[8] Despres N, Boire G, Lopez-Longo F J, *et al*. The Sa system: a novel antigen-antibody system specific for rheumatoid arthritis[J]. J Rheumatol 1994, 21(6): 1027 – 1033.
[9] Blass S, Specker C, Lakomek H J, *et al*. Novel 68 kDa autoantigen detected by rheumatoid arthritis specific antibodies[J]. Ann Rheum Dis, 1995, 54(5): 355 – 360.
[10] Corrigall V M, Bodman-Smith M D, Fife M S, *et al*. The human endoplasmic reticulum molecular chaperone BiP is an autoantigen for rheumatoid arthritis and prevents the induction of experimental arthritis[J]. J Immunol, 2001, 166(3): 1492 – 1498.
[11] Hassfeld W, Steiner G, Hartmuth K, *et al*. Demonstration of a new antinuclear antibody (anti-RA33) that is highly specific for rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Rheum, 1989, 32(12): 1515 – 1520.
[12] van-Gaalen F A, Visser H, Huizinga T W. A comparison of the diagnostic accuracy and prognostic value of the first and second anti-cyclic citrullinated peptides (CCP1 and CCP2) autoantibody tests for rheumatoid arthritis[J]. Ann Rheum Dis, 2005, 64(10): 1510 – 1512.
[13] Nielen M M, van-der-Hors A R, van-Schaardenburg D, *et al*. Antibodies to citrullinated human fibrinogen (ACF) have diagnostic and prognostic value in early arthritis[J]. Ann Rheum Dis, 2005, 64(8): 1199 – 1204.
[14] Winterbourn C C. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species[J]. Nat Chem Biol, 2008, 4(5): 278 – 286.

(**收稿**:2012-01-30;**修回**:2012-04-01)
(编辑 王 红)

(上接 1563 页)

### 2.2 手术结果

术中所见除 1 例小卵圆孔未闭 CTA 未发现外,其余先天性心脏病表现均与 CTA 一致,其中,例 1 及例 3 异位心脏行还纳入胸腔,例 2 因憩室疝出较重,给予切除。

## 3 讨论

Cantrell 综合征病因尚不明确,可能是妊娠后 2 ~ 3 周中胚叶的一个片段发育异常而致[2-3]。Cantrell 综合征手术治疗分 2 部分[4]:第 1 部分为心包、膈肌、胸腹壁缺损及胸骨下端裂的修复,在修复过程中,因心脏异位,需同时进行矫治,如果心脏异位形成左室憩室较小,可以直接还纳入胸腔,如果憩室疝出复位困难,可予以切除;第 2 部分先天性心脏病的矫治,Cantrell 综合征先天性心脏病复杂多样,各种畸形发生率[5]列举如下:室间隔缺损 100%,房间隔缺损 34% ~ 53%,左心室憩室 20% ~50%,肺动脉瓣狭窄 31.5%,法乐氏四联症 10% ~20%,永存动脉干、主动脉缩窄等偶有报道,Cantrell 综合征先天性心脏病的矫治是该疾病手术及预后的关键。

CT 检查对 Cantrell 综合征的诊断具有重要意义。多排螺旋 CT(MSCT)具有扫描速度快、受心率影响因素少、图像质量高等特点,并通过强大的后处理功能,能很好地显示 Cantrell 综合征的各种征象,如:通过冠状位胸骨容积重建可清晰显示胸骨发育情况,例 1 患儿胸骨下端 2 个小骨骺并排显示(图 1A),为胸骨发育异常;通过多平面重建可清晰显示脐疝及疝内容物,同时鉴别疝内容物是肠管还是腹腔脏器;通过心脏及大血管 CTA 可显示心内及心脏大血管的畸形,尤其是一些数据的测量,为术前精确的解剖定位提供良好的参考,例 2 患儿可见左心室心尖部突出一管状结构与脐部相连(图 1C),其长度为 4.6 cm,该患儿适用手术给予憩室切除,是手术成功的重要前提。

总之,CT 能很好显示 Cantrell 综合征的各种征象,对其诊断,尤其对术前手术方案的制定具有不可缺少的作用。因此,CT 检查应为 Cantrell 综合征的首选检查方法。

## 参考文献:

[1] Cantrell J R, Haller J A, Ravitch M M. A syndrome of congenital defects involving the abdominal wall, sternum, diaphragm, pericardium, and heart[J]. Surg Gynecol Obstet, 1958, 107(5): 602 – 614.
[2] Vazquez-Jimenez J F, Muehler E G, Daebritz S, *et al*. Cantrell' syndrome: a challenge to the surgeon[J]. Ann Thorao Surg, 1998, 65(4): 1178 – 1185.
[3] 孙明利, 吕滨, 荆志成, 等. Cantrell 综合征的诊断与治疗[J]. 中华心血管病杂志, 2011, 39(9): 836 – 839.
[4] 肖明第, 冯晓东, 张建卿, 等. Cantrell 五联症 5 例手术经验总结[J]. 中华外科杂志, 2009, 47(24): 1912 – 1913.
[5] van-Hoorn J H, Moonen R M, Huysentruyt C J, *et al*. Pentalogy of Cantrell: two patients and a review to determine prognostic factors for optimal approach[J]. Eur J Pediatr, 2008, 167(1): 29 – 35.

(**收稿**:2012-05-15;**修回**:2012-06-20)
(编辑 汪勤俭)