论著

文章编号:1000-5404(2013)19-2084-04

强直性脊柱炎患者外周血单个核细胞中急性时相反应蛋白的差异表达研究

蔡安季,戴 勇,李武县,李紫微,涂植光 (400016 重庆,重庆医科大学检验医学院教育部临床检验诊断学重点实验室)

[摘要] **目的** 检测强直性脊柱炎外周血单个核细胞中急性时相反应蛋白表达水平,探讨其与强直性脊柱炎发病的关系。**方法** 收集10例强直性脊柱炎患者和9例健康对照,提取外周血单个核细胞,采用相对和绝对定量的等量异位标签串联质谱技术检测强直性脊柱炎患者外周血单个核细胞中的急性时相反应蛋白表达水平,并运用Western blot方法进行验证差异表达的触珠蛋白(Hp)和铜蓝蛋白(Cp)。**结果** 基于质谱分析的蛋白组学显示,19种急性时相反应蛋白在强直性脊柱炎外周血单个核细胞中蛋白表达水平明显升高($P<0.05$),主要包括补体C3、纤粘蛋白(FN1)、血浆酶原(PLG)、转铁蛋白(TF)、Hp和Cp;Western blot检测Hp和Cp的表达水平与相对和绝对定量的等量异位标签串联质谱技术检测结果具有相同的变化趋势。**结论** 急性时相反应蛋白差异表达可能参与了强直性脊柱炎的发生、发展,有望作为强直性脊柱炎的临床生物标记物。

[关键词] 强直性脊柱炎;外周血单个核细胞;急性时候反应蛋白;差异表达;相对和绝对定量的等量异位标签技术
[中图法分类号] R446.112;R446.9;R593.23 [文献标志码] A

Expression of acute phase proteins in mononuclear cells from ankylosing spondylitis patients

Cai Anji, Dai Yong, Li Wuxian, Li Ziwei, Tu Zhiguang (Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics of Ministry of Education, College of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the differential expression levels of acute phase proteins (APPs) in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from patients with ankylosing spondylitis (AS), and to investigate their role in the pathogenesis of AS. **Methods** PBMCs were isolated from 9 health controls and 10 AS patients by using Ficoll-Paque plus solution. The proteins of PBMCs were extracted using cell lysate, and iTRAQ coupled with multiple chromatographic fractionation and tandem mass spectrometry were used to screen the APPs in the obtained PBMCs. Mascot software (Matrix Science) was applied to identify and quantify the proteins, and Western blotting were used to further validate the expression levels of haptoglobin (Hp) and ceruloplasmin (Cp). **Results** Initial mass spectrometry-based proteomic analysis revealed that the expression levels of 19 APPs were obviously increased in the PBMCs from AS patients ($P<0.05$), mainly including complement C3, isoform 1 of fibronectin, plasminogen, serotransferrin, Hp and Cp. Moreover, Western blotting indicated that the expression levels of Hp and Cp had a similar trend with iTRAQ results. **Conclusion** The differential expression of APPs might be associated with the pathologenesis and development of AS, and can be used as clinical biomarkers of AS.

[**Key words**] ankylosing spondylitis; peripheral blood mononuclear cells; acute phase proteins; differential expression; isobaric tags for relative and absolute quantitation

Supported by the Project of Science and Technology of Shenzhen City (201105083). Corresponding author: Tu Zhiguang, Tel: 86-23-68485797, E-mail: tuzhiguang@aliyun.com

强直性脊柱炎(ankylosing spondylitis, AS)是一种自身免疫性疾病,其病理特征主要是累及中轴关节和肌腱韧带附着点的炎性改变。Brewerton在1973年研究发现,HLA-B27与AS的发生、发展密切相关,但其发病机制至今尚未完全明确。研究证明,AS的早期诊断在临床上非常重要,但由于缺乏一些实验室早期诊断的金标准,现阶段主要依赖于病变已较严重才出现的临床症状和骶髂关节的影像学改变作出诊断[1]。

[基金项目] 深圳市科技项目(201105083)
[通信作者] 涂植光,电话:(023)68485797, E-mail: tuzhiguang@aliyun.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130516.1138.011.html(2013-05-16)

急性时相反应蛋白(acute phase protein,APPs)在抗菌和调节急性期反应的许多方面发挥作用,与自身免疫性疾病的发病密切相关,主要参与宿主抗感染、组织损伤和修复以及维持内环境稳定[2]。

相对和绝对定量同位素标记(isobaric tags for relative and absolute quantitation,iTRAQ)技术是2004年由美国ABI生物公司开发的一种全新体外同位素标记技术,iTRAQ技术是定量分析蛋白质组学的主要工具之一,其采用串联质谱及多维液相色谱联用,已广泛运用于其他自身免疫性疾病(系统红斑狼疮和类风湿性关节炎)的蛋白组学研究,为诊断疾病提供重要的临床生物标记物[3-5]。本研究运用iTRAQ技术是定量分析APPs在AS患者外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells,PBMCs)中的表达水平,以期进一步明确其与AS发生、发展的相关性。

1 资料与方法

1.1 病例选择

收集2011年6月至2012年1月广东医学院附属深圳南山医院风湿免疫科10例AS患者,年龄(37.0±12.6)岁,男性8例,女性2例;收集体检健康志愿者9例(对照组),年龄(35.0±14.3)岁,男性7例,女性2例。所有患者必须符合1984年纽约修订版AS诊断标准:①下腰背痛的病程至少持续3个月,疼痛随活动改善,但休息不减轻;②胸廓扩展范围小于同年龄和性别的正常值;③腰椎在前后和侧屈方向活动受限;④双侧骶髂关节炎Ⅱ~Ⅳ级,或单侧骶髂关节炎Ⅲ~Ⅳ级。如果患者具备第4条并分别附加1~3条中的任何1条可确诊为AS。

此次采集外周血时,10例AS患者均未接受任何药物治疗。病例收集时排除下列情形:如类风湿性关节炎、系统红斑狼疮等其他自身免疫性疾病,具有生物制剂治疗史。

1.2 标本收集及处理

空腹无菌采集所有研究对象6 mL静脉血于EDTA-2K抗凝管,运用Ficoll分离液提取PBMCs,将抗凝血与生理盐水1∶1混合,轻轻沿着试管壁加入Ficoll分离液中,其中红细胞悬液与Ficoll分离液体积比约为2∶1,2 000 r/min 20 min,吸出中间PBMCs(白色云雾状),加入2 mL生理盐水洗涤,1 000 r/min 5 min,重复3次,收入细胞沉淀;运用细胞裂解液lysis,在200 Watts超声裂解提取蛋白;采用BCA进行蛋白定量。

1.3 蛋白酵解

每个样品精确取出100 μg蛋白,按蛋白∶酶=20∶1的比例加入Trypsin,37 ℃酶解4 h。按上述比例再补加Trypsin 1次,37 ℃继续酶解8 h。

1.4 iTRAQ标记

胰蛋白酶消化后,用真空离心泵抽干肽段,用0.5 mol/L TEAB复溶肽段,严格按照说明书进行iTRAQ标记,每组肽段被不同的iTRAQ标签标记,室温培养2 h,将标记后的各组肽段混合,用SCX柱进行液相分离。

1.5 SCX分离

采用岛津LC-20AB液相系统、分离柱为4.6×250 mm型号的Ultremex SCX柱对样品进行液相分离。①将标记后抽干的混合肽段用4 mL buffer A(25 mmol/L NaH_2PO_4、25% ACN、水,pH 2.7)复溶。②进柱后以1 mL/min的速率进行梯度洗脱:先用buffer A洗脱10 min,接着逐渐混入5%~35% buffer B(25 mmol/L NaH_2PO_4, 1 mol/L KCl溶于25% ACN, pH 2.7)洗脱11 min。最后逐渐混入35%~80% buffer B洗脱1 min。③整个洗脱过程在214 nm光密度下进行监测,经过筛选得到12个组分。每个组分分别用Strata X除盐柱除盐,然后冷冻抽干。

1.6 基于Triple TOF 5600的LC-ESI-MS/MS分离

①与质谱仪相结合的液相系统为nanoACQuity(Waters),包括Symmetry C18柱(规格5 μm, 180 μm×20 mm)和BEH130 C18柱(规格1.7 μm, 100 μm×100 mm)两部分。Symmetry C18柱用于肽段吸附和除盐,BEH130 C18柱用于分离。②流动相A液(水∶乙腈∶甲酸=98∶2∶0.1)和B液(水∶乙腈∶甲酸=2∶98∶0.1)中都加入一定比例的校正液(Thermo Fisher Scientific)。每次上样量为2.25 μg(9 μL),用A液以2 μL/min的流速洗脱15 min,进行肽段吸附和除盐。接下来用含5% B液的流动相以300 μL/min流速洗脱1 min后,开始进行梯度洗脱:40 min内B液梯度线型从5%升至35%,再5 min从35%升至80%,然后80%持续洗脱5 min,最后2 min恢复。③仪器为TripleTOF 5600(AB SCIEX, Concord, ON),离子源为Nanospray Ⅲ source(AB SCIEX, Concord, ON),放射器为石英材料拉制的喷针(New Objectives, Woburn, MA)。数据采集时,机器的参数设置如下:离子源喷雾电压2.5 kV,氮气压力为30 psi(14.5 psi≈1 bar),喷雾气压15 psi,喷雾接口处温度150 ℃;扫描模式为反射模式,分辨率≥30 000;积累250 ms的从2+到5+的离子挑选其中强度每秒积累超过120分的前30个进行扫描,3.3 s为1个循环;第2个四极杆(Q2)的传输窗口设置100为100%;脉冲射频电的频率为11 kHz;检测器的检测频率为40 GHz;每次扫描的粒子信号以4个通道分别记录共4次后合并转化成数据;对于iTRAQ类项目,离子碎裂的能量设置为(35±5)eV;母离子动态排除设置为:在一半的出峰时间内(约18 s),相同母离子的碎裂不超过2次。

1.7 Western blot检测

提取PBMCs,运用细胞裂解液,提取总蛋白,采用考马斯亮蓝方法进行蛋白浓度测定,制备5%浓缩胶和12%分离胶进行SDS-PAGE凝胶电泳,转移至PVDF膜上,用3%(牛血清白蛋白)BSA,4 ℃封闭过夜。取1∶1 000稀释的单克隆抗体Hp或Cp,与膜在塑料袋中反应,再用TBST漂洗3次,每次10 min,将辣根过氧化物酶标记二抗按1∶4 000稀释,HRP直接标记内参β-actin按1∶8 000稀释。然后将膜浸入稀释好的二抗及内参中,用TBST漂洗3次,每次10 min,将化学发光检测试剂A、B液的混合液(1∶1)滴至膜上作用1 min,在X光片夹中曝光1.5 min,显影、定影、洗片。胶片扫描后通过GDS凝胶成像分析系统进行光密度分析,目的蛋白表达的相对表达值=目的条带/内参β-actin的光密度比值。

1.8 统计学分析

运用IPI_human v3.87数据库(91464 sequences),参见ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/IPI/old/HUMAN。采用Mas-

cot 蛋白质鉴定软件进行蛋白检索和鉴定，当蛋白的丰度比即差异倍数达到1.5倍以上，且经统计检验其 P 值小于0.05时，视该蛋白为不同样品间的差异蛋白；采用 SPSS 13.0 统计软件进行2组间 t 检验。

2 结果

2.1 BCA Protein Assay Kit BSA 蛋白浓度标准曲线

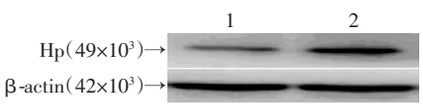
以光密度为横坐标，BSA 浓度（μg/μL）为纵坐标绘制的蛋白浓度测定标准曲线，其 $y=2.358x+0.043$，相关系数（R）为0.992。

2.2 差异表达的急性时相反应蛋白

iTRAQ 技术分析 AS 患者 PBMCs 中参与急性反应期的相关差异蛋白见表1。结果显示，19种急性时相反应蛋白在强直性脊柱炎外周血单个核细胞中蛋白表达水平明显升高（$P<0.05$），主要包括补体 C3、纤粘蛋白（FN1）、血浆酶原（PLG）、转铁蛋白（TF）、触珠蛋白（Hp）和铜蓝蛋白（Cp）。

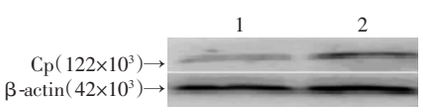
2.3 Western blot 检测结果

与健康对照组（0.54±0.23）比较，Hp 蛋白相对表达水平（2.41±0.65）在 AS 组中明显升高（$P<0.05$），与健康对照组比较（0.33±0.18），Cp 蛋白相对表达水平（0.87±0.15）在 AS 组中同样是增加（$P<0.05$）。见图1、2。



1：对照组；2：AS 组

图1 Western blot 检测2组 PBMCs 中 Hp 蛋白水平



1：对照组；2：AS 组

图2 Western blot 检测2组 PBMCs 中 Cp 蛋白水平

3 讨论

目前，在 AS 发病的早期阶段，缺乏有临床诊断意义的生物标记物，现有的实验室诊断方法包括 HLA-B27、CRP 和 ESR 等检查，无论是特异性还是敏感性都不能有效地满足临床需求，也没有发现能较好地反映 AS 疾病活动情况的标志物来监测 AS 进程。因此，有必要运用新的方法——“定量蛋白质组学”，寻找和发现新的 AS 标志物或能反映 AS 疾病活动情况的蛋白分子。

目前常用的定量蛋白质组学研究技术主要有两类。一类是基于荧光染料进行定量的技术，如荧光双向差异凝胶电泳（2-D DIGE），文献[6-7]报道，该技术目前已广泛应用于 AS 患者血清、PBMCs 和滑膜液中蛋白谱表达的研究，然而，由于该方法存在高背景和低敏感性等问题，研究结果差别较大，存在争议。另一类是基于质谱检测技术为基础的化学标记定量方法，其中以 iTRAQ 结合多维液相色谱和串联质谱分析标记技术最为先进。该技术采用4种或8种同位素编码的标签，通过特异性标记多肽的氨基基团，然后进行串联质谱分析，可同时比较4种或8种不同样品中蛋白质的相对含量或绝对含量。在本研究中，我们以 AS 患者 PBMCs 作为研究对象，采用 iTRAQ 试剂进行体外标记和串联质谱分析，定量鉴定和筛选差异表达的急性时相反应蛋白，为 AS 的诊断提供重要的生物标记物，并进一步明确 AS 的发病机制。

我们分别收集10例 AS 患者和9例健康对照的 PBMCs 并测定其蛋白浓度，测定结果表明，蛋白质的浓

表1 iTRAQ 技术分析 AS 患者 PBMCs 中19种急性反应期相关差异蛋白表达谱

ID	蛋白质编码	名称	相对分子质量	覆盖度	差异倍数
1	IPI00021727	C4BPA C4b-binding protein alpha chain	79 689	6.5	10.534
2	IPI00032179	SERPINC1 Antithrombin-Ⅲ	64 585	8.6	10.464
3	IPI00478809	F5 Coagulation factor V	291 624	4.3	1.725
4	IPI00553177	SERPINA1 Isoform 1 of Alpha-1-antitrypsin	57 525	16.7	19.808
5	IPI00418163	C4B complement C4-B preproprotein	217 898	7.1	4.208
6	IPI00745872	ALB Isoform 1 of Serum albumin	89 874	46.3	18.067
7	IPI00783987	C3 Complement C3 (Fragment)	223 249	23.2	7.967
8	IPI00022418	FN1 Isoform 1 of Fibronectin	290 085	5	3.037
9	IPI00019568	F2 Prothrombin (Fragment)	80 601	7.6	4.605
10	IPI00019580	PLG Plasminogen	108 457	7.9	5.926
11	IPI00218192	ITIH4 Isoform 2 of Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	113 384	1.6	5.486
12	IPI00022463	TF Serotransferrin	97 243	31.2	12.343
13	IPI00478003	A2M Alpha-2-macroglobulin	191 992	14.2	12.948
14	IPI00020091	ORM2 Alpha-1-acid glycoprotein 2	28 132	22.9	17.524
15	IPI00641737	HP;HPR Haptoglobin	56 812	21.9	23.645
16	IPI00021885	FGA Isoform 1 of Fibrinogen alpha chain	109 041	23.3	3.078
17	IPI00296165	C1R Complement C1r subcomponent	92 862	7	3.246
18	IPI00021891	FGG Isoform Gamma-B of Fibrinogen gamma chain	62 753	26	3.151
19	IPI00017601	CP Ceruloplasmin	143 365	10.2	12.085

度符合iTRAQ分析条件,然后将每组的样本混合,以减少样本之间的个体差异。我们采用iTRAQ相关技术对AS患者PBMCs总蛋白进行鉴定和比较蛋白组学相对定量分析,鉴定出19种差异表达的APPs,主要包括触珠蛋白、铜蓝蛋白、补体C3等。研究表明,APPs与AS的发生、发展密切相关,并运用于AS的临床药物治疗的监测[8]。随着APPs检测试剂的标准化和自动化的出现,目前,APPs已广泛运用于AS的基础和临床研究。我们的研究结果也进一步证实了APPs与AS的发病相关,但APPs并非AS特异。已有研究发现,Hp和Cp在AS患者血清中表达水平存在显著改变[6]。因此,本研究选择Hp和Cp蛋白进行Western blot验证。

Hp有3种主要的表型Hp(1-1)、Hp(2-1)和Hp(2-2),表型Hp(2-2)与自身免疫性疾病如AS的发病密切相关[9],此外,表型Hp(2-2)可诱导Th1、Th2细胞转变[10]。在临床诊治重症肌无力过程中,Hp是一个重要的临床生物标记物,可以用来监测疾病严重程度[11]。目前研究表明,Hp不同的表型和基因型在HIV疾病中具有重要的免疫调节作用[12-13]。我们的实验结果发现,Hp在AS患者PBMCs中的表达水平显著升高,同时,我们通过扩大临床标本数量,运用Western blot方法进一步验证了这一结果。早期研究发现,PBMCs表面的Th1和Th2细胞不平衡参与AS的发生、发展,且与疾病的活动性有关[14],基于表型Hp(2-2)可诱导Th1、Th2细胞转变,从而影响AS患者体内Th1和Th2细胞表达水平紊乱,进而造成Th1和Th2细胞不平衡,所以Hp在AS患者PBMCs中的差异表达与Th1和Th2细胞不平衡相关,这有可能是其参与AS发生、发展的关键因素之一;同时鉴于急性反应蛋白Hp在AS中的高表达,可为临床早期诊断和治疗监测提供理想的生物标记物。

早期基础研究发现,Cp具有铜离子运输、血管生成、铁平衡、铁转运等多种生理功能;同时,Cp也是一种急性期的反应蛋白,已广泛应用于临床疾病的诊断监测及预后判断,如甲状腺功能亢进、冠心病等。本研究结果显示,Cp在AS患者PBMCs中的表达水平明显升高,Western blot结果同样证实了Cp在AS患者中的表达是上调的。因此,我们推断,AS是一种炎性的免疫性疾病,炎性因子在AS患者中过表达,同时Cp作为一种急性时相反应蛋白,当机体发生炎性改变时,Cp的表达可能会增加;另外,感染因素一直被认为是AS的发病的主要因素,当机体处于感染状态时,Cp的表达会增加。近来也有研究发现AS患者血清中Cp的表达升高[6],这与本实验结果一致。

综上所述,本研究结果表明,iTRAQ结合多维液相色谱和串联质谱分析标记技术可有效鉴定PBMCs中的APPs差异表达;急性时相反应蛋白可能在AS发病中具有重要的作用,Hp和Cp有望成为临床诊断AS疾病的重要生物标记物,至于如何参与AS发生、发展,尚需进一步探讨。

参考文献:

[1] Malaviya A P, Ostor A J. Early diagnosis crucial in ankylosing spondylitis[J]. Practitioner, 2011, 255(1746): 21-24.

[2] Guerranti R, Bertocci E, Fioravanti A, *et al*. Serum proteome of patients with systemic sclerosis: molecular analysis of expression and prevalence of haptoglobin alpha chain isoforms[J]. Int J Immunopathol Pharmacol, 2010, 23(3): 901-909.

[3] Wang L, Dai Y, Qi S, *et al*. Comparative proteome analysis of peripheral blood mononuclear cells in systemic lupus erythematosus with iTRAQ quantitative proteomics[J]. Rheumatol Int, 2012, 32(3): 585-593.

[4] Song X, Bandow J, Sherman J, *et al*. iTRAQ experimental design for plasma biomarker discovery[J]. J Proteome Res, 2008, 7(7): 2952-2958.

[5] Serada S, Fujimoto M, Ogata A, *et al*. iTRAQ-based proteomic identification of leucine-rich alpha-2 glycoprotein as a novel inflammatory biomarker in autoimmune diseases[J]. Ann Rheum Dis, 2010, 69(4): 770-774.

[6] Li T, Huang Z, Zheng B, *et al*. Serum disease-associated proteins of ankylosing spondylitis: results of a preliminary study by comparative proteomics[J]. Clin Exp Rheumatol, 2010, 28(2): 201-207.

[7] Chang X, Han J, Zhao Y, *et al*. Increased expression of carbonic anhydrase I in the synovium of patients with ankylosing spondylitis[J]. BMC Musculoskelet Disord, 2010, 11: 279.

[8] Ozgocmen S, Godekmerdan A, Ozkurt-Zengin F. Acute-phase response, clinical measures and disease activity in ankylosing spondylitis[J]. Joint Bone Spine, 2007, 74(3): 249-253.

[9] Soliev T S, Arifzhanov K R, Nabieva D A, *et al*. Haptoglobin phenotype in patients with spondyloarthritis and healthy individuals[J]. Klin Lab Diagn, 2002(4): 41-42.

[10] Arredouani M, Matthys P, Kasran A, *et al*. Haptoglobin and the Th1/Th2 balance: hints from *in vitro* and *in vivo* studies[J]. Redox Rep, 2001, 6(6): 369-371.

[11] Oliveira L H, Franca-Jr M C, Nucci A, *et al*. Haptoglobin study in myasthenia gravis[J]. Arq Neuropsiquiatr, 2008, 66(2A): 229-233.

[12] Zaccariotto T R, Rosim E T, Melo D, *et al*. Haptoglobin polymorphism in a HIV-1 seropositive Brazilian population[J]. J Clin Pathol, 2006, 59(5): 550-553.

[13] Friis H, Gomo E, Nyazema N, *et al*. Iron, haptoglobin phenotype, and HIV-1 viral load: a cross-sectional study among pregnant Zimbabwean women[J]. J Acquir Immune Defic Syndr, 2003, 33(1): 74-81.

[14] 苏卓娃, 马文松, 赵丹, 等. 强直性脊柱炎患者外周血T细胞亚群极化状态的研究[J]. 中国免疫学杂志, 2007, 23(10): 947-949.

(**收稿**:2013-03-11;**修回**:2013-04-11)

(编辑　吴培红)