

类风湿关节炎患者血清 α -微管蛋白的检测及与临床实验室指标的相关性分析

程永静, 张春媚, 陈颖娟, 王芳, 高明, 黄慈波

(北京医院风湿免疫科, 北京 100730)

[摘要] **目的** 利用酶联免疫吸附方法(ELISA)测定类风湿关节炎(RA)患者血清中的 α -微管蛋白(α -tubulin)的水平, 评价与临床实验室指标的关系, 为寻找 RA 新的血清学标记物, 探讨疾病的发病机制提供依据。**方法** 选取 RA 患者 68 例, 骨关节炎(OA)患者 32 例, 健康对照(HC)32 例, 各取血清 10 μ L, 应用 ELISA 方法检测不同患者及健康对照血清 α -tubulin 水平, 应用非配对资料的 t 检验分析不同患者与健康对照者之间 α -tubulin 水平的差异, 相关性检验分析 α -tubulin 水平与 RA 患者年龄、病程、压痛关节数、肿胀关节数、红细胞沉降率(ESR)、C 反应蛋白(CRP)水平、DAS28 评分、类风湿因子(RF)水平、免疫球蛋白(IgG、IgA、IgM)水平的相关性。**结果** RA 患者血清 α -tubulin 的水平明显高于骨关节炎患者及健康对照($P < 0.05$), 进一步分析提示 α -tubulin 水平与 RA 患者病程长短呈正相关($r = 0.307, P = 0.023$), 与血清类风湿因子水平及 IgA 水平呈正相关($r = 0.558, P = 0.0001; r = 0.395, P = 0.004$)。**结论** α -tubulin 是 RA 新的血清学标记物, 在 RA 患者的免疫反应中具有一定的意义, 可能参与了 RA 的发病。

[关键词] 关节炎, 类风湿; 微管蛋白; 自身免疫; 免疫球蛋白类

中图分类号: R593.22 文献标识码: A DOI: 10.3969/J.issn.1672-6790.2016.03.001

The detection and correlation research of α -tubulin and disease activity parameters in rheumatoid arthritis

Cheng Yongjing, Zhang Chunmei, Chen Yingjuan, Wang Fang, Gao Ming, Huang Cibo (Department of Rheumatology and Immunology, Beijing Hospital, Beijing 100730, China)

[Abstract] **Objective** To detect serum α -tubulin in patients with rheumatoid arthritis (RA) and analyze the correlation between serum α -tubulin and clinical, laboratory parameters of RA, provided the theoretical basis to seek the pathogenesis of diseases. **Methods** Blood samples from 68 patients with RA, 32 patients with Osteoarthritis (OA) and 32 healthy controls were collected. Serum α -tubulin were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Difference of α -tubulin between RA patients, OA patients and healthy controls was analyzed by independent sample t test. Correlation analysis was done between α -tubulin level and clinical, laboratory parameters of RA, including age, disease duration, number of tender joints, number of swelling joints, DAS28 score and levels of ESR, C-reactive protein (CRP), Rheumatoid Factor (RF), immunoglobulin G (IgG), immunoglobulin A (IgA) and immunoglobulin M (IgM). **Results** The α -tubulin of RA was obviously higher than that of OA patients and healthy controls ($P < 0.01$). Further analysis demonstrated that α -tubulin level was positively correlated with the disease duration ($r = 0.307, P = 0.023$), levels of RF and IgA ($r = 0.558, P = 0.0001; r = 0.395, P = 0.004$). **Conclusion** α -tubulin may play roles in the development of RA and may be a potential biomarker of RA.

[Key words] Arthritis, rheumatoid; Tubulin; Autoimmunity; Immunoglobulins

类风湿关节炎(RA)是一种慢性全身性自身免疫病, 在我国的患病率约为 0.2% ~ 0.93%^[1], 是一

种严重的致残性疾病, 严重影响着患者的生存质量和身心健康。近年来, 抗环瓜氨酸肽抗体的发现及 TNF- α 拮抗剂的应用提高了 RA 的诊断率, 改善了患者的生存质量及预后^[2-3]。但由于发病机制不明确, 仍有很多早期、不典型病例未能得到及时诊断及治疗。基于现状, 迫切要求找到与疾病相关的、新的生物标记物。目的是更深入的了解 RA 的病理过程, 寻找可能的途径阻断疾病的病理过程, 寻找 RA

基金项目: 国家自然科学基金(31140008); 首都医学发展基金项目(首发-14051); 北京医院院内基金项目(BJ-2014-033)

作者简介: 程永静, 博士, 主任医师, Email: mastercheng99@hotmail.com

诊断及治疗的新的作用靶点。

α 微管蛋白(α -tubulin)是细胞骨架蛋白微管蛋白的亚单位之一,国外学者通过质谱技术研究发现 α -tubulin在RA的血清有升高的趋势,但缺乏进一步与临床资料关系及发病机制的探讨^[4]。本研究拟用酶联免疫吸附方法,测定RA患者血清中 α -tubulin的水平,明确 α -tubulin与RA各临床实验室指标之间的关系;为RA的早期诊断寻找新的生物学靶点,为评估病情、探讨疾病发病机制提供新的实验依据。

1 对象与方法

1.1 研究对象 68例RA患者均为2010—2014年期间在北京医院风湿免疫科住院患者,符合2010年美国风湿病学会(ACR)制定的RA分类标准^[5]。其中,女56例,男12例;年龄18~75岁,平均(56.8 ± 10.7)岁;病程1~10年,平均(1.5 ± 2.3)年。选取年龄、性别相匹配的32例骨关节炎(OA)患者,32例健康志愿者作为健康对照组。

1.2 研究方法

1.2.1 标本采集 每例取血2 mL,3000 r/min,离心15 min,取上清,保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

1.2.2 ELISA方法检测血清中的 α -tubulin水平

α -tubulin的检测采用 α -tubulin ELISA检测试剂盒(Novateinbio公司)。将ELISA检测板常温放置20 min,不同浓度的标准品50 μL 加入标准孔,将5倍稀释的血清样本50 μL 加入样本孔,同时加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗 α -tubulin抗体100 μL , $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h。清洗96孔板,加入50 μL 底物A(0.02% H_2O_2)、底物B(3,3',5,5'-四甲基联苯胺,TMB), $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光孵育15 min。加入1M硫酸终止液50 μL 。在450 nm波长处测定各孔的OD值。绘制标准曲线,按照曲线方程计算样本的浓度。

1.3 统计学处理 应用SPSS16.0统计软件,对RA、OA与健康对照之间血清 α -tubulin水平的差异采用独立样本资料的 t 检验。对 α -tubulin与RA疼痛关节数,肿胀关节数等非连续性变量之间的相关性分析采用Spearman相关性分析,对 α -tubulin与年龄、病程、ESR、CRP、DAS28评分、RF水平、IgG、IgA、IgM等联系性变量之间的相关性分析采用Pearson相关性检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RA患者与健康对照者血清中的 α -tubulin水

平比较 RA患者血清中 α -tubulin水平[(37.90 ± 37.09) $\mu\text{g/L}$]明显高于健康对照[(14.52 ± 10.99) $\mu\text{g/L}$],两者之间差异有统计学意义($t = 4.824$, $P < 0.01$);骨关节炎(OA)患者血清中的 α -tubulin水平[(15.59 ± 15.64) $\mu\text{g/L}$]与健康对照[(14.52 ± 10.99) $\mu\text{g/L}$]差异无统计学意义($t = 0.334$, $P = 0.739$)。

2.2 α -tubulin水平与RA临床及实验室相关性分析 将RA患者血清 α -tubulin水平与患者年龄、病程、压痛关节数、肿胀关节数、红细胞沉降率、C反应蛋白水平、DAS28评分、类风湿因子水平、免疫球蛋白水平等临床及实验室指标做相关性分析,发现 α -tubulin水平与RA患者RF及IgA水平呈正相关($r = 0.558$, $P = 0.0001$; $r = 0.395$, $P = 0.004$,如图1所示),与病程长短呈正相关($r = 0.307$, $P = 0.023$)。

3 讨论

微管蛋白是细胞的一种骨架蛋白,对维持细胞形态、细胞内物质运输和胞器定位等细胞功能起关键作用。 α -tubulin和 β -tubulin两种蛋白亚单位与微管辅助蛋白(MAPs)一同构成微管,两者交替以螺旋状形式形成二聚体,并首尾相连构成原纤维,对细胞有明显的支持作用,被认为是细胞的主要“骨骼”。通常情况下, α -tubulin和 β -tubulin的表达水平不会发生改变,因此常被用于蛋白差异表达研究的内参。

目前对微管蛋白的研究多集中在肿瘤方面。研究发现微管蛋白的表达可能与肿瘤发生和细胞增殖失控,以及肿瘤细胞的恶性生物学行为相关^[6]。当肿瘤细胞增殖活跃时,有丝分裂处于活跃状态,相应的微管蛋白异常表达。因此,研究者将微管蛋白作为肿瘤细胞增殖的血清学标记物之一^[7]。同时,微管稳定剂(MSAs),一种靶点在微管蛋白的抗肿瘤药物,在肿瘤治疗领域显示出了良好的应用前景^[8]。

近年来逐渐发现tubulin在自身免疫病患者有增高的趋势。Zheng等^[4]通过反相高效液相色谱(HPLC)及线性离子阱质谱分析(linear ion trap-FT-MS)方法研究发现RA患者血清中tubulin的水平增高。Kamada通过二维胶和质谱分析技术研究发现RA患者骨髓源性粘连细胞(BMACs)的 α -tubulin的表达水平明显高于OA患者^[9]。目前缺乏进一步与临床资料关系的研究及发病机制的探讨。

本研究发现,RA患者血清中 α -tubulin水平明

显高于健康对照,且 α -tubulin水平与类风湿因子水平、IgA水平呈显著正相关($P < 0.05$),研究结果提示 α -tubulin参与了RA的发病,但并不提示是一种急性相蛋白,更多的与RA患者免疫反应相关。

关于tubulin在自身免疫病发病机制的作用。已知微管蛋白主要参与了血管内皮细胞的生成、迁移^[10],而血管炎是类风湿关节炎等自身免疫性疾病的病理基础之一。研究者推测,血管炎可使血管内皮细胞破坏,微管解聚, α -tubulin释放入血,可能是构成自身免疫病患者血清 α -tubulin水平升高的病理机制之一。

同时,有学者提出 α -tubulin作为一种自身抗原参与了自身免疫病的发病。研究发现,肺移植后出现慢性排斥反应患者K- α 1 tubulin抗体的水平明显高于不出现的患者及健康对照者。且抗K- α 1 tubulin抗体的浓度越高,发生慢性排斥反应的危险性越高。研究者推测抗体与气道表皮细胞K- α 1 tubulin结合激活转录因子TCF5和c-Myc,引起纤维源性生长因子的表达增高,最终激活细胞周期及纤维增殖信号系统,诱发肺移植后的免疫病理反应^[11-12]。本研究中,RA患者血清中 α -tubulin水平与类风湿因子水平、IgA水平呈显著正相关($P < 0.05$),进一步提示了 α -tubulin参与了体内的免疫炎性反应。

(本文图1见封三)

参考文献

- [1] Li R, Sun J, Ren LM, et al. Epidemiology of eight common rheumatic diseases in China: a large-scale cross-sectional survey in Beijing [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2012, 51(4): 721-729.
- [2] Zintzaras E, Papathanasiou A, Zogas D, et al. The reporting quality of studies investigating the diagnostic accuracy of anti-CCP antibody in rheumatoid arthritis and its impact on diagnostic estimates [J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2012, 25, 13(1): 113.
- [3] Zink A, Strangfeld A, Schneider M, et al. Effectiveness of tumor necrosis factor inhibitors in rheumatoid arthritis in an observational cohort study: comparison of patients according to their eligibility for major randomized clinical trials [J]. *Arthritis Rheum*, 2006, 54(11): 3399-3407.
- [4] Zheng X, Wu SL, Hincapie M, et al. Study of the human plasma proteome of rheumatoid arthritis [J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216(16): 3538-3545.
- [5] Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, et al. 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative [J]. *Ann Rheum Dis*, 2010, 69(9): 1580-1588.
- [6] 牛昀, 王颖, 于泳, 等. 中心体 α 、 γ -微管蛋白在乳腺癌前病变及乳腺癌中的表达及其意义初探 [J]. *中华医学杂志*, 2006, 86(1): 56-60.
- [7] Yuan SF, Zhu LJ, Zheng WE, et al. Expression of β -tubulin III and survivin in advance stage breast cancer correlates with chemotherapeutic effects of docetaxel [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012, 13(1): 361-365.
- [8] Prota AE, Bargsten K, Zurwerra D, et al. Molecular mechanism of action of microtubule-stabilizing anticancer agents [J]. *Science*, 2013, 339(6119): 587-590.
- [9] Kamada T, Kurokawa MS, Kato T, et al. Proteomic analysis of bone marrow-adherent cells in rheumatoid arthritis and osteoarthritis [J]. *Int J Rheum Dis*, 2012, 15(2): 169-178.
- [10] Pasquier E, Honoré S, Braguer D, et al. Microtubule-targeting agents in angiogenesis: where do we stand [J]. *Drug Resist Updat*, 2006, 9(1/2): 74-86.
- [11] Goers TA, Ramachandran S, Aloush A, et al. De novo production of K- α 1 tubulin specific antibodies: role in chronic lung allograft rejection [J]. *J Immunol*, 2008, 180(7): 4487-4494.
- [12] Hachema RR, Tiriveedhib V, Patterson G, et al. Antibodies to K- α 1 tubulin and collagen V are associated with chronic rejection after lung transplantation [J]. *Am J Transplant*, 2012, 12(8): 2164-2171.

(收稿日期: 2016-01-04)