

类风湿关节炎患者血清触珠蛋白水平与疾病活动度及 DMARDs 治疗反应相关性分析

王筱曦^{1,2}, 谈文峰³, 张缪佳³, 王芳⁴, 冯小可^{1,2}, 张前德^{1,2*}

(¹南京医科大学中西医结合研究所, 江苏 南京 210029; ²南京医科大学第一附属医院中医科, ³风湿科, ⁴心脏科, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的: 探讨类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 患者血清触珠蛋白含量与疾病活动度及缓解病情抗风湿药 (disease-modifying anti-rheumatic drugs, DMARDs) 治疗的关系。方法: 选取 67 例基线期未接受过 DMARDs 治疗的活动性 RA 患者和 27 例健康志愿者作为正常对照, 于 DMARDs 治疗 12 周前后分别以荧光实时定量 PCR 检测外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMCs) 中触珠蛋白 (haptoglobin, HP) mRNA 表达, 酶联免疫吸附测定血清 HP 含量, 分析其与疾病活动度及治疗反应的相关性。结果: RA 患者外周血 PBMCs 及血清中 HP 含量显著高于正常对照组 ($P < 0.01$), 并与疾病活动度呈正相关。参照 EULAR 治疗反应标准, DMARDs 治疗 12 周后, 根据治疗前后 DAS28 评分下降是否 ≥ 1.2 , 将患者分为治疗有反应和无反应两组, 结果显示 12 周 DMARDs 治疗无反应组 RA 患者基线血清 HP 水平明显高于有反应组 ($P < 0.01$), 且治疗后无明显下降。结论: RA 患者 PBMCs 及血清中 HP 水平显著升高, 与疾病活动度呈正相关。基线血清 HP 含量与 DMARDs 治疗 12 周反应相关。

[关键词] 触珠蛋白; 类风湿关节炎; DMARDs

[中图分类号] R593.22

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)06-844-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20150617

High serum level of haptoglobin is associated with disease activity and the response of DMARDs therapy in rheumatoid arthritis patients

Wang Xiaoxi^{1,2}, Tan Wenfeng³, Zhang Miaojia³, Wang Fang⁴, Feng Xiaoke^{1,2}, Zhang Qiande^{1,2*}

(¹Integrated Traditional and Western Medicine Institution, NJMU, Nanjing 210029; ²Chinese Traditional Medicine Department, ³Rheumatology Department, ⁴Cardiology Department, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate whether serum levels of HP are associated with disease activity and the response of DMARDs therapy in the baseline rheumatoid arthritis (RA) patients. **Methods:** We selected 67 active RA patients who received no DMARDs in the baseline phase and 27 healthy volunteers. Clinical variables, levels of haptoglobin (HP) messenger RNA (mRNA) in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and HP serum levels were measured at week 0 and week 12, and then, we analyzed the relationships between them. **Results:** The serum level of HP of RA patients was significantly higher than that of the healthy controls ($P < 0.0001$), and positively correlated with the disease activity. After 12 weeks of DMARDs treatment, 55.22% of RA patients were categorized as responders according to European League Against Rheumatism (EULAR) response criteria (Disease Activity Score of 28 joints [DAS28] decrease ≥ 1.2) and 29.85% were defined as non-responders. The baseline HP in serum level from non-responders was significantly higher than those in responders ($P < 0.01$) and remained at high level in non-responders after 12 weeks DMARDs treatment. **Conclusion:** The mRNA in PBMCs and HP serum levels were significantly increased in RA patients and positively associated with RA disease activity. The HP serum levels of baseline of RA patients are

[基金项目] 国家自然科学基金(30701129, 30901332, 81172845, 81273294); 国家中医药局青年科学基金(06-07JQ06); 江苏省自然科学基金(BK2011851, BK2012875); 教育部博士点基金(20093237110005); 亚太风湿病联盟青年基金; 国际风湿病联盟基金

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: zhangqiande@njmu.edu.cn

correlated with the 12 weeks DMARDs therapy.

[Key words] haptoglobin; rheumatoid arthritis; DMARDs

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(06): 844-848]

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种病因不明的自身免疫性疾病,主要表现为慢性、侵蚀性多关节炎。由于关节滑膜的慢性炎症,形成血管翳,侵犯关节软骨、软骨下骨、韧带和肌腱等,造成关节软骨、骨和关节囊破坏,最终导致关节畸形和功能丧失。70%的 RA 骨侵蚀发生于起病后两年内,早期诊断和早期干预对于改善预后至关重要^[1]。

触珠蛋白(haptoglobin, HP)又称结合珠蛋白,是血清球蛋白组分中的一种酸性糖蛋白,广泛存在于人类和许多哺乳动物的血清及其他体液中,主要在肝脏中合成和降解。作为急性期蛋白之一的 HP,其血清含量在肿瘤、炎症、创伤、感染、心肌梗死、等病理状态时常显著升高,并与疾病严重程度及预后有关^[2]。国外及本课题组之前报道 HP 水平在 RA 患者中显著升高^[3-4],本研究入组 67 例基线期未接受过缓解病情抗风湿药(disense-modifying anti-rheumatic drugs, DMARDs)治疗的活动性 RA 患者,探讨血清 HP 含量与疾病活动度和 DMARDs 治疗反应的关系。

1 对象和方法

1.1 对象

本研究病例来源于南京医科大学第一附属医

院风湿免疫科门诊及住院的 67 例 RA 患者为 RA 组,男 5 例(7.5%),女 62 例(92.5%),平均年龄为(42.8 ± 10.5)岁,入选标准:①符合 1987 年美国风湿病协会制定的 RA 分类标准;②处于病情活动期的初发 RA 患者(病程<2 年,DAS28 评分>3.2);③未使用过传统 DMARDs 或生物制剂。记录患者相关临床资料,包括血沉(erythrocyte sedimentation rate, ESR)和 C 反应蛋白(C-reaction protein, CRP)。同时选取了 27 例健康志愿者作为对照组(HC 组),平均年龄(43.6 ± 11.6)岁,HC 组未做处理,两组一般资料具有可比性。

人血清 HP 酶联免疫吸附试剂盒(ELISA)(CSB-E08584h, 武汉华美生物工程有限公司),EL-808 酶联免疫检测仪(BIO-TEK Instruments 公司,美国),TRIzol 及逆转录试剂盒(TaKaRa 公司,日本),实时荧光定量聚合酶链式反应(real-time polymerase chain reaction, real-time PCR)SYBR Green Mixture 及 384 孔板(ABI 公司,美国),PCR 反应仪(Prism 7900HT 型,ABI 公司,美国),PCR 扩增用引物见表 1,由上海英骏生物技术有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 ELISA 法检测 RA 组与 HC 组血清中 HP 含量

表 1 PCR 引物碱基序列

Table 1 Nucleobase sequences of PCR primers

基因	上游(5'→3')	下游(5'→3')
β-actin	GTGGGCCGCTCTAGGCACCAA	CTCTTTGATGTCACGCACGATTTC
HP	ACCTTAAACGACGAGAAGCAATGG	AGCCAGACACGTAGCCCaCACC

RA 组与 HC 组均分别采集静脉血 5 mL,分置于干燥管及肝素抗凝管中,3 000 r/min 5 min,分离血清及血浆,采用酶联免疫吸附实验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)测定 HP 含量,参照说明书要求制备标准品,同时将 HC 组及 RA 组的血清按说明书稀释,将样品及 HP 标准品加入包被有 HP 抗体的 96 孔板中,37℃避光孵育 1 h,洗板 3 次后加入酶标记抗体,37℃避光孵育 1 h;洗板 5 次后加入底物液并避光孵育 15 min,加入终止液,并在 450 nm 单波长下检测吸光度值,依据吸光度值计算 RA 组与 HC 组血清中 HP 含量。

1.2.2 荧光实时定量 PCR 技术检测外周血单个核

细胞中 HP mRNA 的含量

于肝素抗凝管中加入 PBS 与人外周血等体积混匀,加至等体积淋巴细胞分离液液面上,1 800 r/min,18~22℃,梯度离心 20 min。取中间白膜层,即为外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMCs)。采用 TRIzol 法提取总 RNA, TaKaRa 逆转录试剂盒反转成 cDNA,通过 real-time PCR 技术检测 PBMCs 中 HP mRNA 的含量。PCR 反应体系如下:2.5 μL Power SYBR Green PCR Master Mix, 吸光值为 1 的上下游引物各 0.125 μL, 1 μL cDNA, 1.25 μL 双蒸水。反应条件为 95℃ 10 min; 95℃, 15 s, 60℃ 1 min,共 40 个循环。每份标本均作复孔,复孔间的

Ct 值差异控制在 0.5 以内,反应结束后作溶解曲线,以目的基因的 Ct 值减去内参的 Ct 值为 ΔCt , $2^{-\Delta Ct}$ 值表示目的基因 mRNA 表达水平的高低。

1.3 统计学方法

采用 GraphPad Prism5 分析数据并作图,实验数据均以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,统计 RA 与 HC 两组 PBMCs 及血清中 HP 含量,组间统计学差异检验用 *t* 检验。统计 RA 患者血清中 HP 含量与疾病活动度的相关性,各指标之间的关系采用 Pearson 检验相关分析。 $P \leq 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料

RA 患者中女性占 92.5%, 平均病程 (23.1 \pm 9.67) 周,68.6% 的患者类风湿因子阳性,47.1% 患者

抗环瓜氨酸肽抗体阳性。所有患者平均 DAS28 评分 (5.1 \pm 0.9) 分,为中重度活动 RA 患者。肿胀关节计数 (12.1 \pm 4.7) 个, VAS 评分 (74.3 \pm 20.5) 分, ESR (41.2 \pm 13.7) mm/h, CRP (28.9 \pm 11.3) mg/L。

2.2 RA 患者 PBMCs 及血清中 HP 含量

基线时 RA 患者 PBMCs 中 HP mRNA 表达显著高于 HC 组 ($P < 0.01$, 图 1A)。与 PBMCs 中相似, RA 患者血清中 HP 含量为 (378.9 \pm 139.7) mg/mL, 显著高于 HC 组 [(250.6 \pm 123.8) mg/mL, $P < 0.01$, 图 1B]。

2.3 RA 患者血清中 HP 含量与疾病活动度相关性

采用 Pearson 检验分析了 RA 患者血清中 HP 含量与疾病活动度的关系,结果显示 RA 组血清 HP 含量与 DAS28、ESR 和 CRP 呈正相关 (P 均 < 0.01 , 图 2), 与病程、关节肿胀度及 VAS 评分等变化无关 ($P > 0.05$)。

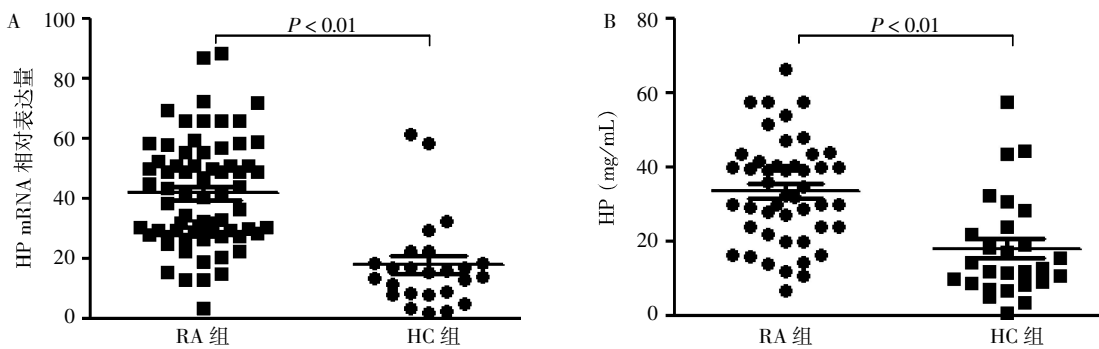


图1 两组外周血 PBMCs(A)及血清中 HP 含量(B)

Figure 1 The levels of HP messenger RNA(mRNA)in PBMCs and HP serum levels in RA and HC

2.4 RA 患者血清中 HP 含量与 DMARDs 12 周治疗反应变化情况

67 例 RA 患者均接受了以甲氨蝶呤(methotrexate, MTX)为基础的 2 种 DMARDs 联合治疗方案,其中 MTX 加来氟米特 44 例,MTX 加羟氯喹 16 例,MTX 加柳氮磺胺吡啶 7 例。治疗 12 周后,参照 EULAR 治疗反应标准,以治疗前后 DAS28 下降是否 ≥ 1.2 分将患者分为治疗有反应和无反应两组。结果显示 37 例 (55.22%) 对 12 周 DMARDs 治疗反

应良好,20 例 (29.85%) 对治疗反应差。治疗有反应组 DAS28 评分平均下降 1.3 分,无反应组下降 0.2 分。两组 ESR 及 CRP 未见明显变化 ($P > 0.05$)。治疗有反应组 HP 水平显著下降 (145.1 \pm 35.4) mg/mL ($P < 0.01$, 表 2)。

3 讨论

目前 RA 病因尚不明确,主要表现为滑膜的慢性炎症和骨侵蚀。尽管生物制剂的应用已经极大改

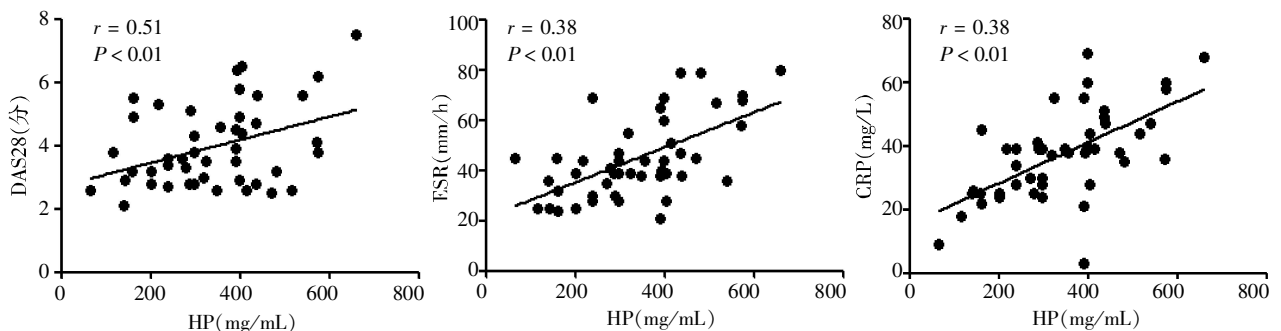


图2 RA 患者中血清 HP 含量与疾病活动度相关性

Figure 2 The correlation of HP serum and disease activity in patients with RA

表 2 DMARDs 治疗 12 周后治疗有反应组和无反应组 DAS28、ESR、CRP 和 HP 含量变化

Table 2 The changes of serum HP, DAS28, ESR and CRP in responders and non-responders after 12-week-DMARDs treatment

组别	ΔDAS28(分)	ΔESR(mm/h)	ΔCRP(mg/L)	ΔHP (mg/mL)
治疗有反应组(n=37)	-1.3 ± 0.4	-25.1 ± 10.9	-20.5 ± 8.8	-145.1 ± 35.4
治疗无反应组(n=20)	-0.2 ± 0.3	-21.7 ± 12.1	-16.8 ± 6.1	-60.1 ± 24.1
P 值	<0.05	>0.05	>0.05	<0.01

变了 RA 预后,但是考虑到安全性及经济因素,以 MTX 为核心的传统 DMARDs 仍然是 RA 一线治疗药物^[5-7],而早期诊断及早期应用 DMARDs 治疗对于减少骨关节破坏及改善预后有着至关重要的作用。由于部分 RA 患者可能对传统 DMARDs 治疗抵抗,因此寻找反映 RA 疾病活动度及预测治疗反应的生物标记有重要临床意义。

本研究中发现血清 HP 水平与 RA 疾病活动度 DAS28 评分、ESR 及 CRP 显著相关。本课题组前期报道了血清 HP 含量与 MTX 单剂治疗反应有关。本研究选择了另外一组患者,进一步验证了血清 HP 含量与 DMARDs 联合使用疗效的关系。结果显示 DMARDs 治疗无反应组患者基线时 HP 水平显著高于有反应组,且 12 周 DMARDs 联合使用不能显著降低血清 HP 水平,提示血清 HP 含量除与疾病活动度相关外,还可能与 DMARDs 治疗反应有关,值得进一步扩大样本量,以验证血清 HP 含量能否作为预测 DMARDs 治疗反应的生物标记。

HP 是一种酸性糖蛋白,主要在肝脏中合成,广泛存在于人类和许多哺乳动物的血清及其他体液中。本研究结果显示 HP 水平在 RA 患者外周血中显著升高,并且与病情活动指标 ESR、CRP、DAS28 评分呈正相关。作为一种急性期反应蛋白,HP 与炎症活动密切相关,在参与宿主抗感染、损伤组织修复以及内环境稳定的过程中起着重要作用,其血清含量在感染、创伤、炎症、肿瘤、心肌梗死等病理状态时显著升高^[8]。HP 一般在炎症发生 12~24 h 后上升,在 72~96 h 达到高峰;慢性炎症是 RA 病理机制中的核心环节,许多炎症因子如 TNF-α、IL-6 均发挥重要作用,是 RA 相关的重要细胞因子^[9-11],导致关节软骨破坏和骨侵蚀,促进关节破坏进行性发展^[12]。在 RA 治疗抵抗组患者中出现显著而又持续增高的 HP,可能代表了持续的炎症反应过程。

近期研究表明,HP 能结合游离血红蛋白,防止活性氧产生的游离血红蛋白带来的损伤。氧化应激是细胞内重要信号分子,可以加重 RA 滑膜炎,减少软骨形成,和 RA 疾病程度呈正相关^[15]。研究表明 RA 患者体内的活性氧簇不仅可引起透明质酸、蛋

白聚糖核心蛋白、透明质酸和硫酸软骨素的片断化,还可引起胶原的降解或多聚化,上调基质金属蛋白酶破坏细胞外基质成分。氧化应激还能导致局部低密度脂蛋白氧化,进而促进炎症反应,慢性炎症反应产生的内源性活性氧簇和活性氮簇能导致 DNA 损伤以及遗传性改变^[16]。血清脂质过氧化反应物水平升高,而超氧化物歧化酶水平降低,且抗氧化酶活性出现异常,机体抗氧化系统受损导致活性氧及其相关代谢产物过量聚集,容易引起组织损伤^[17],因此显著升高的 HP 水平可能与长期的氧化应激存在关系。本研究发现 RA 患者中 DMARDs 治疗有反应组中 HP 水平下降明显,而治疗无反应组 HP 水平无显著下降,这种现象可能与长期的氧化应激引起组织损伤、修复困难存在联系。

综上所述,HP 水平在 RA 患者中显著升高,与病情活动度相关,并且在 DMARDs 治疗有反应的患者中显著降低,这预示着 HP 可能成为新的检测 RA 的生物学标记,并且对于判断 RA 的预后情况有着重要意义。

[参考文献]

- [1] 郑文洁,曾小峰.生物制剂在类风湿关节炎中的应用与进展[J].临床药物治疗杂志,2014,12(4):1-6
- [2] 时岩,史健.血红素结合蛋白研究进展[J].现代检验医学杂志,2013,28(3):120-123
- [3] 尧荣凤,徐龙,许国祥,等.RA 患者血清免疫球蛋白、急性时相蛋白、IL-27 水平变化及意义[J].山东医药,2011,51(3):42-43
- [4] Tan W,Wang F,Zhang M,et al. High serum level of haptoglobin is associated with the response of 12 weeks methotrexate therapy in recent-onset rheumatoid arthritis patients[J]. Int J Rheum D,2014,doi:10.1111/1756-185X.12380[Epub ahead of print]
- [5] 郭惠芳,高丽霞.2013 年风湿免疫病学主要临床进展[J].临床荟萃,2014,29(3):282-286
- [6] 吴华勋,魏伟.改善病情抗风湿药和生物制剂治疗类风湿关节炎的研究进展[J].临床合理用药,2014,7(2):176-177
- [7] 韦超,常晓天.氧化应激在类风湿关节炎中的表现[J].中华风湿病学杂志,2011,15(2):127-130

[8] 谭丽娜. 结合珠蛋白的研究进展[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2006, 26(1): 43-47

[9] 王晓磊, 武 晔, 于笑霞, 等. 类风湿关节炎患者活动期微量元素铜、铁与触珠蛋白的测定[J]. 临床荟萃, 2014, 11(29): 1288-1290

[10] Wruck CJ, Fragoulis A, Gurzynski A, et al. Role of oxidative stress in rheumatoid arthritis: insights from the Nrf2-knockout mice[J]. *Ann Rheum Dis*, 2011, 70(5): 844-850

[11] 张 舸, 赵绵松, 夏蓉晖, 等. 类风湿关节炎患者氧化应激与抑郁情绪的关系[J]. 北京大学学报: 医学版, 2012, 44(2): 199-203

[12] Saeed SA, Ahmad N, Ahmed S. Dual inhibition of cyclooxygenase and lipoxygenase by human haptoglobin: its polymorphism and relation to hemoglobin binding [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 353(4): 915-920

[13] Blits M, Jansen G, Assaraf YG, et al. Methotrexate normalizes up-regulated folate pathway genes in rheumatoid arthritis[J]. *Arthritis Rheum*, 2013, 65(11): 2791-2802

[14] 丁艳杰, 赵 清, 王来芳, 等. 类风湿合并颈动脉硬化患者血清氧化应激状态与 MMPs 相关性分析[J]. 昆明医科大学学报, 2014, 35(5): 61-63

[15] Arora A, Mahajan A, Spurden D, et al. Long-term drug survival of TNF inhibitor therapy in RA, patients: A systematic review of European national drug registers[J]. *Int J Rheumatol*, 2013, 2013: 764518

[16] Yilmaz S, Simsek I. Early intervention in the treatment of rheumatoid arthritis: focus on tocilizumab [J]. *Ther Clin Risk Manag*, 2013, 9: 403-408

[17] Smolen JS, Landewé R, Breedveld FC, et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying anti rheumatic drugs: 2013 update [J]. *Ann Rheum Dis*, 2014, 73(3): 492-509

[收稿日期] 2015-01-16

(上接第 843 页)

[6] Birsoy K, Possemato R, Lorbeer FK, et al. Metabolic determinants of cancer cell sensitivity to glucose limitation and biguanides[J]. *Nature*, 2014, 508(7494): 108-112

[7] Hsieh MC, Lee TC, Cheng SM, et al. The influence of type 2 diabetes and glucose-lowering therapies on cancer risk in the Taiwanese [J]. *Exp Diabetes Res*, 2012, doi: 10.1155/2012/413782

[8] Libby G, Donnelly LA, Donnan PT, et al. New users of metformin are at low risk of incident cancer: a cohort study among people with type 2 diabetes [J]. *Diabetes Care*, 2009, 32(9): 1620-1625

[9] 王爱萍, 刘 超, 蒋克春, 等. 关于 2 型糖尿病患者合并恶性肿瘤临床特点的调查 [J]. 南京医科大学学报: 自然科学版, 2009, 29(1): 102-105

[10] Mazzone PJ, Rai H, Beukemann M, et al. The effect of metformin and thiazolidinedione use on lung cancer in diabetics [J]. *BMC Cancer*, 2012, 14(12): 410

[11] Smiechowski BB, Azoulay L, Yin H, et al. The use of metformin and the incidence of lung cancer in patients with type 2 diabetes [J]. *Diabetes Care*, 2013, 36(1): 124-129

[12] Zhang ZJ, Bi Y, Li S, et al. Reduced risk of lung cancer with metformin therapy in diabetic patients: A systematic review and meta-analysis [J]. *Am J Epidemiol*, 2014, 180(1): 11-14

[收稿日期] 2015-01-19