

# ELISA 检测 KRT10\_C 和 COL6A3\_C 短肽抗体的方法建立及作为 RA 诊断的应用价值

周莹<sup>1</sup>, 管晓龙<sup>2</sup>, 李晓军<sup>3</sup>, 虞伟<sup>3</sup>, 管世鹤<sup>1</sup>,

(1. 安徽医科大学第二附属医院检验科, 合肥 230601; 2. 安徽医科大学附属妇幼保健院检验科, 合肥 230001; 3. 东部战区总医院中心实验科, 南京 210002)

**摘要:**目的 建立角蛋白 I 型细胞骨架 10[keratin type I cytoskeletal 10, KRT10]和 VI 型胶原蛋白 A3[collagen alpha-3(VI) chain, COL6A3]短肽抗体的 ELISA 检测方法,并探讨两种瓜氨酸化短肽抗体在类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)实验室诊断中的价值。方法 以合成短肽为包被抗原,抗人 IgA, IgG 及 IgM 为二抗,检测 100 例抗瓜氨酸化蛋白抗体(anti-citrullinated protein antibodies, ACPA)阳性组、100 例健康对照组和 29 例 RA 确诊患者血清中的 KRT10, KRT10\_C, COL6A3 及 COL6A3\_C 短肽抗体水平,比较不同短肽抗体与 RA 的相关性,采用 ROC 曲线分析 KRT10\_C 和 COL6A3\_C 短肽抗体对于 RA 的诊断价值,并对此 ELISA 方法进行精密度评价。结果 与临床诊断相比, KRT10\_C 短肽抗体诊断 RA 的灵敏度为 58.62%, 特异度为 52.17%, 用于诊断抗 CCP 抗体阳性 RA 患者的 ROC 曲线下面积达 0.895; COL6A3\_C 短肽抗体诊断 RA 的灵敏度为 65.52%, 特异度为 78.95%, 用于诊断抗 CCP 抗体阴性的 RA 患者的 ROC 曲线下面积可达 0.956。ELISA 检测值 KRT10\_C(以抗人 IgG 为二抗)的批内变异系数分别为 11.2%(低值)、7.8%(中值)和 6.7%(高值)。ELISA 检测 COL6A3\_C(以抗人 IgM 为二抗)的批内变异系数分别为 12.9%(低值)、8.4%(中值)和 8.9%(高值)。结论 KRT10\_C 和 COL6A3\_C 短肽抗体对 RA 诊断具有重要意义,有望加入并完善实验室诊断体系,提高 RA 的早期诊断率。

**关键词:**类风湿关节炎;角蛋白 I 型细胞骨架 10(KRT10)\_C 短肽抗体;VI 型胶原蛋白 A3(COL6A3)\_C 短肽抗体;酶联免疫吸附试验检测

中图分类号:R446.61;R593.22 文献标识码:A 文章编号:1671-7414(2020)01-001-05

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2020.01.001

## Establishment of ELISA for Detection of KRT10\_C and COL6A3\_C Short Peptide Antibodies and Its Application as A Diagnostic Biomarker for RA

ZHOU Ying<sup>1</sup>, GUAN Xiao-long<sup>2</sup>, LI Xiao-jun<sup>3</sup>, YU Wei<sup>3</sup>, GUAN Shi-he<sup>1</sup> (1. Department of Clinical Laboratory, the Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Maternal and Child Health Care Hospital, Affiliated to Anhui Medical University, Hefei 230001, China; 3. Department of Central Laboratory, Eastern Theater General Hospital, Nanjing 210002, China)

**Abstract: Objective** To establish an ELISA method for the detection of anti-KRT10\_C antibody and anti-COL6A3\_C antibody, and to explore the value of two citrullinated antibodies for the diagnosis of RA. **Methods** Synthetic short peptides were used as coating antigens, anti-human IgA, IgG and IgM were secondary antibodies. KRT10, KRT10\_C, COL6A3 and COL6A3\_C were detected in serum of 100 ACPA positive groups, 100 healthy controls and 29 RA patients. The peptide antibody levels were compared and the correlation between different short peptide antibodies and RA was compared. The diagnostic value of KRT10\_C and COL6A3\_C short peptide antibodies for RA was analyzed by ROC curve, and the precision of this ELISA method was evaluated. **Results** Compared with clinical diagnosis, the sensitivity of KRT10\_C short peptide antibody for diagnosis of RA was 58.62%, the specificity was 52.17%, and the area under the ROC curve for the diagnosis of anti-CCP antibody (+) RA patients was 0.895. COL6A3\_C short peptide antibody diagnosis RA The sensitivity was 65.52% and

**基金项目:**国家自然科学基金(81470071),国家临床重点专科建设项目(2014ZDZK003-1),江苏省临床医学科技专项(BL2014072),军区医药卫生科研重大专项(14ZX17)。

**作者简介:**周莹(1993-),女,硕士研究生,研究方向:临床检验诊断学,E-mail:zhouying161006@126.com。

**通讯作者:**管世鹤,教授,主任技师,博士生导师,E-mail:shiheguan@126.com。

管晓龙,硕士,检验师,E-mail:guanxiaolong523@126.com。

the specificity was 78.95%. The area under the ROC curve for RA patients diagnosed with anti-CCP antibody (-) was up to 0.956. The coefficient of variation of the ELISA test value KRT10\_C (with anti-human IgG) were 11.2% (low), 7.8% (median) and 6.7% (high), respectively. The coefficients of variation of COL6A3\_C (with anti-human IgM) were 12.9% (low), 8.4% (median) and 8.9% (high), respectively. **Conclusion** KRT10\_C and COL6A3\_C short peptide antibodies are of great significance in the diagnosis of RA, and it is expected to add and improve the laboratory diagnosis system to improve the early diagnosis rate of RA.

**Keywords:** rheumatoid arthritis; anti-keratin type I cytoskeletal 10\_C antibody; anti-collagen alpha-3(VI) chain\_C antibody; ELISA assay

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种具有高度异质性的自身免疫性疾病,其特征为组织损伤、慢性炎症和骨质破坏,甚至累及关节外器官(包括心脏、肺等),导致预期寿命缩短<sup>[1]</sup>。抗瓜氨酸化蛋白抗体(anti-citrullinated proteins antibodies, ACPA)是所有能识别瓜氨酸修饰蛋白的抗体统称<sup>[2]</sup>。抗环瓜氨酸化肽(cyclic citrullinated peptide, CCP)抗体在2010年被纳入RA分类标准,广泛应用于临床实验室诊断和病情监测<sup>[3,4]</sup>,但抗CCP抗体对RA的诊断仍有约20%的漏诊率,且尚未有研究鉴定出具体哪些瓜氨酸化自身抗原在RA发生与发展中起重要作用。目前,已有四种瓜氨酸化自身抗原得到验证,包括纤维蛋白原、波形蛋白、II型胶原蛋白和 $\alpha$ -烯醇化酶<sup>[5]</sup>。本课题组的前期实验通过质谱技术、肽芯片技术和生物信息学分析技术,对RA关节滑膜组织及RA血清免疫复合物中的瓜氨酸化蛋白进行鉴定和分析,以期完善RA特异性瓜氨酸化抗原谱。结果发现,角蛋白I型细胞骨架10(keratin type I cytoskeletal 10, KRT10)和VI型胶原蛋白A3[collagen alpha-3(VI) chain, COL6A3]与RA具有较高相关性。因此,本研究筛选了KRT10和COL6A3的原始肽和瓜氨酸修饰肽作为靶抗原,共合成了四种短肽,以临床常规检测的抗CCP抗体阳性和阴性血清进行抗体结合活性验证,初步建立起KRT10\_C和COL6A3\_C短肽抗体检测的ELISA方法,并探讨该两种短肽抗体在作为RA潜在诊断靶标中的应用价值。

## 1 材料与方法

**1.1 研究对象** 收集2018年4~12月在东部战区总医院就诊并进行抗CCP抗体检测的患者血清共229例,当血清抗CCP抗体 $>5\text{U/ml}$ 时,则认为该血清中含有抗瓜氨酸化蛋白抗体(ACPA)。ACPA阳性组100例,男性31例,女性69例,平均年龄 $58 \pm 16.2$ 岁;健康对照组100例,男性43例,女性57例,平均年龄 $39 \pm 28.7$ 岁;另有临床明确诊断为RA的患者29例,其中抗CCP抗体阳性者19例,抗CCP抗体阴性者10例,平均年龄 $51 \pm 13.7$ 岁。血清无脂血、溶血等不合格情况,收集于干燥洁净EP管,  $-80^\circ\text{C}$ 冻存备用。

**1.2 主要试剂与仪器** 短肽粉末(上海强耀生物有限公司),二甲亚砜(DMSO)、双蒸水、PBS缓冲液(博士德生物有限公司),吐温20(北京 Solarbio 科

技有限公司),显色液与终止液(上海科华生物工程有限公司),ELISA酶标板(深圳金灿华实业有限公司),酶标仪(美国Bio-Rad公司)。

## 1.3 方法

**1.3.1 短肽合成:**由上海强耀生物有限公司提供,共合成4条短肽,短肽序列如下:原始短肽KRT10:RLAADDF-R-LKYENEV,修饰短肽KRT10-C:RLAADDF-(Cit)-LKYENEV,原始短肽COL6A3:QD-VVNAV-R-QLTLLGG,修饰短肽COL6A3-C:QD-VVNAV-(Cit)-QLTLLGG。

**1.3.2 实验步骤:**每管短肽粉末(1mg)加入500  $\mu\text{l}$  DMSO及500  $\mu\text{l}$  CBS溶解至清澈无浑浊,得到1mg/ml的短肽溶液,  $4^\circ\text{C}$ 冰箱备用。①包被:将1mg/ml短肽溶液和PBST按1:200比例稀释为5  $\mu\text{g/ml}$ ,每孔100  $\mu\text{l}$ ,  $37^\circ\text{C}$ 水浴箱孵育1h,  $4^\circ\text{C}$ 冰箱过夜,用PBST洗涤,拍干,重复4次;②封闭:牛血清清蛋白(PBST溶解为1 ml/dl)每孔150  $\mu\text{l}$ ,  $37^\circ\text{C}$ 水浴箱孵育1h,  $4^\circ\text{C}$ 冰箱过夜,用PBST洗涤,拍干,重复4次;③加血清样本:1ml/dl牛血清清蛋白与样本血清按1:50比例稀释,每孔100  $\mu\text{l}$ ,  $37^\circ\text{C}$ 水浴箱孵育1h,用PBST洗涤,拍干,重复4次;④加二抗:分别采用HRP标记兔抗人IgA, IgG与IgM按1:3 000稀释,每孔100  $\mu\text{l}$ ,  $37^\circ\text{C}$ 水浴箱孵育1h,用PBST洗涤,拍干,重复5次;⑤显色与终止:加入底物A液2滴和B液2滴,避光显色4 min,加终止液2滴终止反应;⑥读板: $A_{630\text{nm}}/A_{450\text{nm}}$ 双波长读取吸光度A值。

**1.4 统计学分析** 实验数据采用SPSS19.0进行统计学分析,两组样本之间采用配对样本t检验。两种短肽抗体对于RA诊断的应用价值采用ROC曲线进行评估。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 血清ACPA与四种短肽抗原的结合反应** 对100例ACPA阳性组及100例健康对照组进行ELISA检测,结果见表1,表2。以抗人IgA, IgG为二抗时,阳性组的四种短肽抗原检测值均高于相应对照组,差异具有统计学意义(均 $P < 0.05$ )。以抗人IgM为二抗时,阳性组COL6A3和COL6A3\_C检测值与相应对照组差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

**2.2 RA确诊血清与四种短肽的ELISA检测结果** 对确诊RA患者血清[RA抗CCP抗体(+)组19例,

RA 抗 CCP 抗体(-)组 10 例] 进行 ELISA 检测。以抗人 IgG 为二抗时, RA 抗 CCP 抗体(+)组 KRT10\_C 检测值( $0.82 \pm 0.058$ )明显高于其他组检测值, 差异有统计学意义

( $P < 0.05$ ); 以抗人 IgM 为二抗时, RA 抗 CCP 抗体(-)组 COL6A3\_C 检测值( $0.41 \pm 0.043$ )明显高于其他组检测值, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

表 1 KRT10 和 KRT10\_C 吸光度 A 值( $\bar{x} \pm s$ )

类别	KRT10		<i>t</i>	<i>P</i>	KRT10_C		<i>t</i>	<i>P</i>
	ACPA 阳性组	对照组			ACPA 阳性组	对照组		
抗人 IgA	$0.674 \pm 0.031$	$0.272 \pm 0.014$	11.79	$< 0.001$	$0.781 \pm 0.031$	$0.319 \pm 0.020$	12.74	$< 0.001$
抗人 IgG	$0.980 \pm 0.039$	$0.492 \pm 0.015$	11.63	$< 0.001$	$1.063 \pm 0.039$	$0.485 \pm 0.017$	13.72	$< 0.001$
抗人 IgM	$0.189 \pm 0.006$	$0.246 \pm 0.009$	4.997	$< 0.001$	$0.197 \pm 0.005$	$0.237 \pm 0.009$	3.475	$< 0.001$

表 2 COL6A3 和 COL6A3\_C 吸光度 A 值( $\bar{x} \pm s$ )

类别	COL6A3		<i>t</i>	<i>P</i>	COL6A3_C		<i>t</i>	<i>P</i>
	ACPA 阳性组	对照组			ACPA 阳性组	对照组		
抗人 IgA	$0.349 \pm 0.020$	$0.214 \pm 0.012$	5.785	$< 0.001$	$0.407 \pm 0.026$	$0.178 \pm 0.011$	8.082	$< 0.001$
抗人 IgG	$0.753 \pm 0.034$	$0.333 \pm 0.013$	11.52	$< 0.001$	$0.550 \pm 0.024$	$0.321 \pm 0.014$	8.196	$< 0.001$
抗人 IgM	$0.195 \pm 0.009$	$0.218 \pm 0.010$	1.681	0.094	$0.221 \pm 0.010$	$0.199 \pm 0.011$	1.485	0.139

2.3 两种瓜氨酸化短肽抗体用于 RA 诊断的效果评价 KRT10\_C 在 RA 抗 CCP 抗体(+)组检测值较高, COL6A3\_C 在 RA 抗 CCP 抗体(-)组检测值较高。因此, 筛选 KRT10\_C(以抗人 IgG 为二抗)和 COL6A3\_C(以抗人 IgM 为二抗)用于 RA 诊断并进行价值评价。依据 100 例健康对照组血清检测 KRT10\_C 短肽抗体(以抗人 IgG 为二抗)与 COL6A3\_C 短肽抗体(以抗人 IgM 为二抗)的吸光度 A 值, 取  $+2s$  确定 KRT10\_C 短肽抗体(以抗人 IgG 为二抗)的 cut-off 值为 0.5, COL6A3\_C 短肽抗体(以抗人 IgM 为二抗)的 cut-off 值为 0.2。

KRT10\_C 短肽抗体的 ELISA 检测(以抗人 IgG 为二抗)用于 RA 患者诊断的灵敏度为 58.62%, 特异度为 52.17%, 阳性预测值 60.71%, 阴性预测值 52.17%, ROC 曲线下面积为 0.686, 见图 1A。该类抗体仅用于诊断抗 CCP 抗体(+)RA 患者时诊断的 ROC 曲线下面积可达 0.895, 见图 1B。

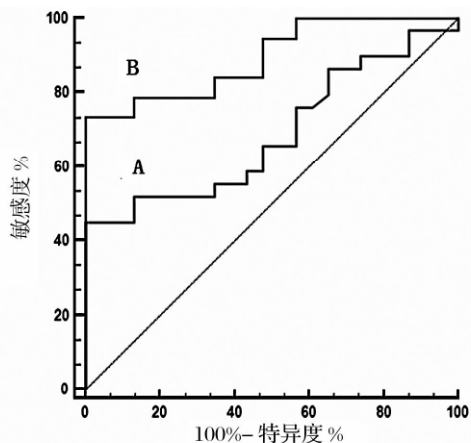


图 1 KRT10\_C 短肽抗体用于诊断 RA 的 ROC 曲线

与临床诊断相比, COL6A3\_C 短肽抗体的 ELISA 检测值用于 RA 患者诊断的灵敏度为 65.52%, 特异度为 78.95%, 阳性预测值 82.61%, 阴性预测值 60%, ROC 曲线下面积为 0.724, 见图 2C。有趣的是, 该短肽抗体仅用于诊断抗 CCP 抗体(-)的 RA 患者准确性有很大提高, ROC 曲线下面积可达 0.956, 见图 2D。

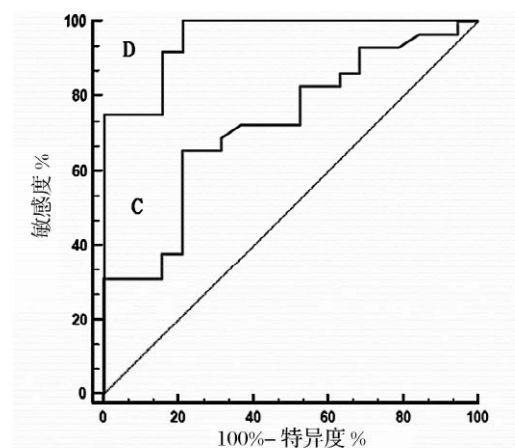


图 2 COL6A3\_C 短肽抗体用于诊断 RA 的 ROC 曲线

2.4 精密性评价 取 ACPA 低浓度( $< 0.05$  U/ml)、中浓度(97.2 U/ml)和高浓度( $> 200$  U/ml)患者血清各一份, 以上述 ELISA 方法重复检测 20 次, 包被 KRT10\_C 的 ELISA 检测值(以抗人 IgG 为二抗)的批内变异系数分别为 11.2%, 7.8% 和 6.7%。COL6A3\_C 对 RA(-)组检测意义较大, RA(-)组无 ACPA 参照, 因此取 RA(-)组 COL6A3\_C 低浓度(A 值 $< 0.2$ )、中浓度(A 值 $= 0.456$ )和高浓度(A 值 $> 0.6$ )患者血清各一份, 以上述 ELISA 方法重复检测 20 次, 包被 COL6A3\_C 的 ELISA 检测(以抗人 IgM 为二抗)的批内变异系数分别为 12.9%,

8.4%和8.9%。

### 3 讨论

本研究筛选了两种短肽及其瓜氨酸修饰肽段作为ELISA检测的靶抗原,实验结果提示四种短肽与ACPA阳性组的结合活性高于健康对照组(以抗人IgA,IgG为二抗),说明四种短肽与RA具有较高相关性。通过比较ELISA检测结果和临床实验报告发现,KRT10\_C短肽抗体的检测值(以抗人IgG为二抗)较高的血清样本的抗CCP抗体浓度水平也较高(多数浓度值>200U/ml),提示该短肽抗体可能与抗CCP抗体浓度值存在正相关性。

角蛋白属于中间丝蛋白的超家族,主要分为两组:28种I型酸性蛋白质和26种II型碱性蛋白质。I型和II型角蛋白形成异二聚体,用于组装10nm细丝,为维持细胞完整性提供结构支持<sup>[6]</sup>。角蛋白作为一种多方面的细胞骨架蛋白,主要在上皮细胞的基底细胞中表达,可调节多种的生物过程,包括维持细胞完整性、调节细胞生长和迁移、以及减缓细胞凋亡。促炎细胞因子包括IL-17,IL-22,IFN-3,TGF- $\beta$ ,Nr2和p53可通过转录和翻译调控角蛋白表达。此外,磷酸化和泛素化等蛋白翻译后修饰参与调节角蛋白功能和稳定性<sup>[7-8]</sup>。在角蛋白与RA相关性的前期研究中,NIENHUIS等<sup>[9-10]</sup>发现抗核周因子对颊黏膜细胞核周围的角质透明颗粒具有反应性,抗核周因子在RA中具有特异性表达,但由于复杂的免疫荧光技术、选择标本的繁琐和实验室间难以标准化,因而没有被广泛使用。此后,其他研究者发现抗核周因子与颊黏膜细胞中的丝聚蛋白特异性单克隆抗体共定位,并通过抗核周因子作为抗原和相关抗角蛋白抗体的生化特性得到证实和扩展,因此抗角蛋白抗体应该更准确地称为“抗丝聚蛋白抗体”,被用于RA实验室诊断与研究<sup>[11]</sup>。在本次以抗人IgG为二抗的ELISA实验中,KRT10\_C较KRT10与ACPA结合活性升高。与其他组相比,抗KRT10\_C短肽抗体在RA抗CCP抗体(+)组检测值较高,差异具有统计学意义。同时,KRT10\_C短肽抗体仅用于诊断RA抗CCP抗体(+)的ROC曲线下面积为0.895,可见KRT10\_C短肽抗体对RA抗CCP抗体(+)患者的诊断价值较高。

VI型胶原蛋白珠状微纤维存在于几乎所有组织的细胞外基质中,与皮肤、肾脏、神经、血管和肌肉中的基底膜密切相关<sup>[12]</sup>,被认为是基底膜与周围的细胞外基质锚定的主要作用物。在肌腱和角膜中,VI型胶原蛋白微纤维分布在肌腱纤维周围;在软骨中,细胞周围基质富含VI型胶原蛋白微纤维,可保护软骨细胞,减轻关节压力。VI型胶原蛋白通过与各种细胞外基质蛋白的相互作用来促进这些桥接和锚定作用,包括其他胶原蛋白、蛋白多糖、纤连蛋白和微纤维相关糖蛋白1(MAGPI)<sup>[13]</sup>。同时,LAMANDÉ等<sup>[14]</sup>也发现VI型胶原蛋白缺乏会改变细胞外基质

结构和生物力学特性,导致细胞凋亡和氧化应激增加,肌肉再生受损,RA中VI型胶原蛋白被瓜氨酸化修饰,极有可能因此影响了蛋白结构和功能,产生了与VI型胶原蛋白缺乏类似的生物学效应。

以抗人IgG为二抗的实验中,COL6A3瓜氨酸修饰之后,与ACPA结合活性降低,提示并非所有瓜氨酸修饰后肽段与ACPA的结合活性都是升高的,有些蛋白的瓜氨酸修饰形式与ACPA的结合活性反而降低。但是,在确诊RA但抗CCP抗体阴性的血清实验(以抗人IgM为二抗)中,COL6A3\_C短肽抗体的检测值较其他组高。由此我们不禁猜想:当COL6A3为靶抗原时,极有可能产生IgM类抗体,而大多临床实验室检测ACPA的二抗为抗IgG抗体,因而检测不出IgM类COL6A3的抗体值,这可能是临床实验室诊断中RA患者出现抗体漏检的重要原因。初步研究表明,COL6A3\_C短肽抗体的ELISA检测用于诊断抗CCP抗体阴性RA患者的ROC曲线下面积可达0.956,具有较高诊断价值,将有可能作为抗CCP抗体的有效补充。

综上,KRT10\_C和COL6A3\_C短肽抗体的ELISA检测,可完善RA实验室诊断体系,提高RA早期诊断率,对降低RA疾病晚期致残致畸率具有重要意义。同时,后续研究仍需进一步扩大样本量,优化实验条件,以期获得更可靠的应用数据。

### 参考文献:

- [1] DAS S, PADHAN P. An overview of the extraarticular involvement in rheumatoid arthritis and its management [J]. *Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics*, 2017, 8(3): 81-86.
- [2] TRIER N H, HOLM B E, HANSEN P R, et al. Specificity of anti-citrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis [J]. *Antibodies*, 2019, 8(2): 37.
- [3] 冯婧,喻晓雯,吴斌,等.血清多项自身抗体检测对类风湿关节炎的诊断价值[J]. *现代检验医学杂志*, 2019, 34(5): 9-11, 15.  
FENG Jing, YU Xiaowen, WU Bin, et al. Diagnostic value of serum multiple autoantibodies in rheumatoid arthritis [J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2019, 34(5): 9-11, 15.
- [4] 赵辉.抗CCP抗体,AKA与RF联合检测在类风湿关节炎诊断中的临床意义[J]. *现代检验医学杂志*, 2015, 30(5): 159-161.  
ZHAO Hui. Clinical significance of anti-CCP antibody and anti-AKA antibody and rheumatoid factor in rheumatoid arthritis [J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2015, 30(5): 159-161.
- [5] WEGNER N, LUNDBERG K, KINLOCH A, et al. Autoimmunity to specific citrullinated proteins gives the first clues to the etiology of rheumatoid arthritis [J]. *Immunological Reviews*, 2010, 233(1): 34-54.

(下转12页)