

类风湿关节炎患者滑膜抗环瓜氨酸肽表位表达与肽酰基精氨酸脱亚氨酶 4 基因的相关性分析*

沈小辉, 喻伟, 杨菲

(湖北医药学院附属东风医院创伤外科, 湖北十堰 442000)

摘要:目的 探讨类风湿关节炎患者滑膜抗环瓜氨酸肽(CCP)表位表达与肽酰基精氨酸脱亚氨酶 4(PADI4)基因的相关性。方法 2013 年 2 月~2015 年选择在湖北医药学院附属东风医院风湿免疫科住院的类风湿关节炎患者 110 例作为观察组,同期选择在该院进行体检的健康者 110 例作为对照组,两组都进行滑膜抗 CCP 表位表达阳性率检测与 PADI4 基因表达检测,同时进行相关性分析。结果 观察组与对照组的滑膜抗 CCP 表位表达阳性率分别为 70.9%和 9.1%,观察组明显高于对照组($\chi^2=23.289, P<0.05$)。观察组 PADI4-104 基因型的表达频率与对照组对比差异有统计学意义($\chi^2=2.984, P<0.05$),多为 G/G 表达,而对照组多为 C/G 表达。Pearson 相关性分析显示在观察组中,滑膜抗 CCP 表位阳性表达情况与 PADI4-104 基因型表达频率之间存在明显相关性($r=0.344, P<0.05$);logistic 逐步回归分析显示 PADI4-104 基因型表达频率是影响滑膜抗 CCP 表位表达的主要因素($P<0.05$)。结论 类风湿关节炎患者的滑膜抗 CCP 表位表达阳性率明显增加,同时也存在 PADI4 基因多态性紊乱情况,两者也存在明显的相关性,从而影响类风湿关节炎的发病状况。

关键词:类风湿关节炎;滑膜抗环瓜氨酸肽;肽酰基精氨酸脱亚氨酶 4;相关性

中图分类号:R593.22;R392.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1671-7414(2016)03-026-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2016.03.008

Relation Analysis of Synovial Anti-Citrullinated Epitope Peptide Expression and Peptidyl Arginine Deiminase 4 Gene in the Rheumatoid Arthritis Patient

SHEN Xiao-hui, YU Wei, YANG Fei (Department of Traumatology, Dongfeng General Hospital Affiliated to Hubei University of Medicine, Hubei Shiyan 442000, China)

Abstract:Objective To investigate the relation of synovial anti-citrullinated epitope peptide(CCP) expression and peptidyl arginine deiminase 4 (PADI4) gene in the rheumatoid arthritis patient. **Methods** From February 2013 to 2015 in Dongfeng General Hospital Affiliated to Hubei University, selected 110 patients with rheumatoid arthritis as the observation group, and selected 110 healthy people at the same period in this hospital for medical examination as the control group, both groups were given the synovial CCP expression positive rate and PADI4 gene expression detecting and correlation analysis. **Results** The synovial anti-CCP expression positive rates in the observation group and the control group were 70.9% and 9.1% respectively, and the observation group were significantly higher than the control group ($P<0.05$). The PADI4-104 genotype expression frequency compared between the observation group and control group, the difference were statistically significant ($P<0.05$). The G/G expression was more in the observation group, while the control group was more with the C/G expression. Pearson correlation analysis showed that in the observation group, synovial CCP positive expression were significant correlated to the expression of genotype PADI4-104 ($r=0.344, P<0.05$). Logistic regression analysis showed PADI4-104 genotype frequency were the main factors for the synovial CCP epitope expression ($P<0.05$). **Conclusion** The rheumatoid arthritis was more with synovial anti-CCP positive expression. There were also PADI4 polymorphism disorder expression, and clear correlation between the two. Thus impact the incidence of rheumatoid arthritis.

Keywords: rheumatoid arthritis; synovial anti-cyclic citrullinated peptide; peptidyl arginine deiminase 4; correlation

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是我国最常见的自身免疫性疾病,多见于中年女性,在我国的患病率为0.33%左右。类风湿关节炎临床主要表现为关节滑膜炎,主要侵犯外周关节,可逐渐

* 基金项目:湖北省自然科学基金项目(编号:2012FFB02002),新型多孔 BG/CS 支架材料复合 TAZ 基因转染 BMSCs 修复骨缺损的实验研究。

作者简介:沈小辉(1983—),男,硕士,主治医师,主要从事骨科相关基础研究以及急症创伤的救治, Tel:15871127475, 0719-8272571, E-mail: shenxiaohui36@163.com。

通讯作者:喻伟(1981—),男,硕士,主治医师,主要从事骨科相关基础研究以及急症创伤的救治, Tel:13085268295, 0719-8272571, E-mail: yuwei658@yeah.net。

发展为破坏关节及关节周围组织,最终导致关节畸形和功能丧失^[1]。类风湿关节炎的发病机制尚不十分清楚,现代研究表明自身抗体和遗传因素在类风湿关节炎发病机制中有重要作用。瓜氨酸为非遗传编码氨基酸,蛋白质瓜氨酸化作用在类风湿关节炎发病机制中具有重要意义^[2,3]。滑膜抗环瓜氨酸肽(CCP)抗体对于类风湿关节炎诊断有高度敏感度和特异度,高滴度抗 CCP 抗体阳性是关节痛患者发展为类风湿关节炎和影响类风湿关节炎预后的独立危险因素^[4,5]。肽酰基精氨酸脱亚氨酶基因是从新生大鼠表皮提取物中分离得到的一种基因,可以在钙离子存在的情况下把精氨酸残基转化成瓜氨酸残基^[6]。相关研究表明肽酰基精氨酸脱亚氨酶 4(PADI4)活性失调与类风湿关节炎疾病的发生发展有密切关系,在细胞分化、细胞凋亡和基因转录等细胞信号传导途径发挥调节作用^[7,8],故深入探讨 PADI4 与抗 CCP 抗体表达的相关性有助于进一步阐明类风湿关节炎的病理及发病机制,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 研究对象 观察组:2013年2月~2015年选择在我院风湿免疫科住院的类风湿关节炎患者110例,临床诊断均符合 ACR1987年修订的 RA 分类标准或 2009年 ACR/EULAR 提出的新的 RA 分类标准^[4],无心、肝功能、肾功能障碍及慢性关节炎病史。其中男性30例,女性80例;年龄42~78岁,平均年龄 56.77 ± 4.12 岁;病程最短3年,最长10年,平均为 5.33 ± 1.24 年;平均体重指数为 $21.42 \pm 2.77 \text{ kg/m}^2$ 。

对照组:同期选择在我院进行体检的健康者110例,其中男性28例,女性82例;年龄39~81岁,平均年龄 56.21 ± 3.89 岁;平均体重指数为 $21.24 \pm 3.10 \text{ kg/m}^2$ 。对照组的年龄、体重指数和性别比例与观察组匹配。两组血标本和活检病理标本的留取均取得入选者的知情同意。

1.2 滑膜环瓜氨酸肽表位表达检测 常规留取两组的滑膜组织,进行脱水、石蜡包埋、3 μm 连续切片,脱蜡、水化后进行抗原修复。兔血清封闭,滴加抗 CCP 单抗 50 μl ,37℃温育 2 h;洗涤 5 min×3 次,滴加 1:500 稀释抗鼠单抗工作液 50 μl ,37℃温育 2 h;洗涤 5 min×3 次;然后滴加 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 单抗工作液 50 μl ,37℃温育 1 h,洗涤 5 min×3 次;滴加 DAB 显色液 10 min,冲洗 10 min;苏木精复染。由两位具有中级职称及其以上的病理学医生进行盲式阅片,高倍镜下随机选择 5 个不重叠视野的滑膜组织,每个视野中着色细胞≥10 个为阳性。

1.3 肽酰基精氨酸脱亚氨酶 4 基因表达检测 两组都采集晨起空腹不抗凝的肘部静脉血 3 ml,于试管架上静置 2 h,然后 3 000 r/min 离心 10 min,取上层血清置于 Eppendorf 管内进行抗凝,-20℃冰箱中保存待检。采用淋巴细胞分离液分离外周血单个核细胞,利用一步法提取外周血单个核细胞的总 RNA。使用天根生物公司的反转录试剂盒按照商品试剂盒说明书进行转录逆转录 cDNA,取总 RNA 1 μg ,反应条件:42℃ 20 min;99℃ 5 min,4℃ 5 min 合成,-80℃保存。在 PADI4 DNA 的检测中,PADI4 引物(上海生工公司合成)为:5'-GGCAAAGAGAAGCCAACCAGA-3'和 5'-GCACGGGATCATCGCATCCATCAGTC-3',反应条件:50℃ 2 min,95℃ 10 min,扩 30 个循环(95℃ 30 s,60℃ 38 s,72℃ 45 s),每个样本均重复 3 次以上。

1.4 统计学分析 选择 SPSS14.00 软件进行分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,对比采用独立样本 *t* 检验;计数资料比较采用百分比表示,对比采用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法,指标间的相关性分析采用 Pearson 检验与 logistic 逐步回归分析方法作相关分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 滑膜抗 CCP 表位的表达情况对比 经过检测,观察组与对照组的滑膜抗 CCP 抗体表位表达阳性率分别为 70.9%(78/110)和 9.1%(10/110),观察组明显高于对照组,差异有统计学意义($\chi^2 = 23.289, P < 0.05$)。

2.2 PADI4 基因多态性表达情况 见表 1。经过检测,观察组 PADI4-104 基因型的表达频率与对照组对比差异有统计学意义($\chi^2 = 2.984, P < 0.05$),多为 G/G 表达,而对照组多为 C/G 表达。

表 1 两组 PADI4 基因多态性表达情况对比 [$n=110, n(\%)$]

组别	C/C	C/G	G/G
观察组	17(15.5)	36(32.7)	57(51.8)
对照组	16(14.5)	52(47.3)	42(38.2)

2.3 相关性分析 见表 2。Pearson 相关性分析显示在观察组中,滑膜抗 CCP 抗体表位阳性表达情况与 PADI4-104 基因型表达频率之间存在明显相关性($r=0.344, P < 0.05$)。同时通过 logistic 逐步回归分析方法,PADI4-104 基因型表达频率是影响滑膜抗 CCP 表位表达的主要因素,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表2 观察组 PADI4-104 基因型表达
频率与滑膜抗 CCP 表位表达的相关性

基因型	β	SE	P	OR	95%CI
C/C	1.382	2.894	<0.05	2.341	1.822~9.412
C/G	0.498	3.567	<0.05	5.398	2.874~14.114
G/G	1.782	4.192	<0.05	3.851	1.094~5.333

3 讨论 类风湿关节炎是非器官特异的自身免疫性疾病,临床主要表现为关节慢性滑膜炎,可导致严重的身体残疾和生活质量的明显恶化^[9]。文献表明类风湿关节炎的发病是抗原刺激、T/B 淋巴细胞介导、细胞因子参与的过程,但是这种关节破坏可以通过早期积极的生物制剂和细胞毒性药物进行预防和干预^[10]。而通过检测血清中类风湿关节炎相关自身抗体,尤其是特异度和敏感度均高的自身抗体,能早期诊断及预测类风湿关节炎。

瓜氨酸化是公认的与炎症密切相关的过程,类风湿关节炎是一炎症性疾病,在类风湿关节炎早期,关节滑膜中有大量的中性粒细胞浸润,这些炎症细胞在某些因素的作用下使得关节内细胞大量死亡,经瓜氨酸化的各种蛋白发生异常免疫反应产生大量抗瓜氨酸蛋白相关抗体^[11]。抗瓜氨酸肽抗体的抗原为波形蛋白经由凋亡的巨噬细胞内的酰胺精氨酸亚氨酶的瓜氨酸化,使瓜氨酸结构发生了变化,增加了潜在的抗原决定簇,其诊断特异度和灵敏度都有很高的效果^[12,13]。本研究显示观察组与对照组的滑膜抗 CCP 表位表达阳性率分别为 70.9% 和 9.1%,观察组明显高于对照组 ($P < 0.05$),这表明滑膜抗 CCP 表位的表达情况能更好地鉴别健康人群和可能罹患结缔组织病尤其是累及关节的结缔组织病人,同时能早期诊断类风湿关节炎。

当前在人体组织中共发现 5 种 PADI 酶,其中 PADI4 与类风湿关节炎关系最为密切,其可以在钙离子存在的情况下把精氨酸残基转化成瓜氨酸残基,为此由于瓜氨酸肽的形成有赖于 PADI 的存在^[13]。相关研究在对编码 PADI 的基因单核苷酸多态性研究中发现 4 个 PADI4 基因的 SNP 外显子 SNP(PADI4-89, PADI4-90, PADI4-92, PADI4-104),单倍体型与类风湿关节炎易感性相关^[14]。本研究显示观察组 PADI4-104 基因型的表达频率与对照组对比差异有统计学意义 ($P < 0.05$),多为 G/G 表达,而对照组多为 C/G 表达。特别是携带 PADI4-104 基因型 G/G 者与常见基因型者相比发生类风湿关节炎风险率高 3.67 倍。已经证明 PADI4 在钙离子存在条件下,能催化肽中精氨酸残基转化成瓜氨酸残基;也可对自身蛋白翻译后修饰,

使得构象表位发生改变^[15]。类风湿关节炎患者可能通过外周淋巴细胞识别修饰过的自身构象表位,并由此介导了类风湿关节炎的自身免疫异常。而近期的研究证明抗 CCP 抗体经由酰胺精氨酸亚氨酶的瓜氨酸化后,蛋白结构发生改变,增加了单甲基精氨酸残基脱亚氨转化为酰胺瓜氨酸,对二甲基精氨酸无作用^[16]。

本研究 Pearson 相关性分析显示在观察组中,滑膜抗 CCP 抗体表位阳性表达情况与 PADI4-104 基因型表达频率之间存在明显相关性 ($r = 0.344$, $P < 0.05$);logistic 逐步回归分析显示 PADI4-104 基因型表达频率是影响滑膜抗 CCP 抗体表位表达的主要因素 ($P < 0.05$)。相关研究也表明 PADI4 基因多态性与抗 CCP 抗体产生相关,不同严重程度的类风湿关节炎患者 PADI4 基因携带率不同,也就是说 PADI4 基因与类风湿关节炎易感性可能受 PADI4 基因型的影响,不过还有待于更大样本和更多环节的研究证实^[17,18]。

总之,类风湿关节炎患者的滑膜抗 CCP 抗体表位表达阳性率明显增加,同时也存在 PADI4 基因多态性紊乱情况,两者也存在明显的相关性,从而影响类风湿关节炎的发病状况。

参考文献:

- [1] 陈琳,李慧颖,姜国平,等. 彩色多普勒超声和抗环瓜氨酸肽抗体在类风湿关节炎病情评估中的应用价值[J]. 中国医药,2015,10(9):1333-1335.
Chen L, Li HY, Jiang GP, et al. Value of ultrasonography and anti-cyclic citrullinated peptide antibody for evaluating activity of rheumatoid arthritis[J]. China Medicine, 2015, 10(9):1333-1335.
- [2] 茅华英,金文君. 抗 CCP 联合 RF, hsCRP, ESR 检测在类风湿关节炎诊断中的意义[J]. 全科医学临床与教育,2015,13(1):56-57.
Mao HY, Jin WJ. Joint anti-CCP RF, hs CRP, ESR detection significance in the diagnosis of rheumatoid arthritis[J]. Clinical Education of General Practice, 2015, 13(1):56-57.
- [3] Olivares-Martínez E, Hernández-Ramírez DF, Núñez-Alvarez CA, et al. The amount of citrullinated proteins in synovial tissue is related to serum anti-cyclic citrullinated peptide (anti-CCP) antibody levels[J]. Clin Rheumatol, 2016, 35(1):55-61.
- [4] 王旭荣,王军,金聂,等. 手腕部 MRI 联合抗环瓜氨酸肽抗体检测在早期 RA 诊断中的应用价值[J]. 中国医师杂志,2015,17(2):232-235.
Wang XR, Wang J, Jin N, et al. Application of wrist MRI combined anti-cyclic citrullinated peptide antibody detection in the diagnosis of early rheumatoid arthritis[J]. Journal of Chinese Physician, 2015, 17

- (2):232-235.
- [5] 李德红,居 军,鲁 彦,等.定量检测抗-CCP 抗体诊断类风湿关节炎关节侵蚀程度的临床意义[J].中华临床实验室管理电子杂志,2014,2(1):51-53.
Li DH,Ju J,Lu Y,et al. Clinical significance of quantitative detection of anti -CCP antibody diagnosis of rheumatoid arthritis joint erosion degree[J]. Chinese Journal of Clinical Laboratory Management (Electronic Edition),2014,2(1):51-53.
- [6] Reyes-Castillo Z, Palafox-Sánchez CA, Parra-Rojas I, et al. Comparative analysis of autoantibodies targeting peptidylarginine deiminase type 4, mutated citrullinated vimentin and cyclic citrullinated peptides in rheumatoid arthritis; associations with cytokine profiles, clinical and genetic features[J]. Clin Exp Immunol, 2015,182(2):119-131.
- [7] 郭 靖,钱 龙,李向培,等.类风湿关节炎患者外周血单个核细胞肽酰基精氨酸脱亚氨酶 4 表达及组蛋白甲基化水平[J].中华内科杂志,2013,52(11):928-931.
Guo J, Qian L, Li XP, et al. Peptidyl arginine deiminase 4 participates in the pathogenesis of rheumatoid arthritis by influencing histone methylation[J]. Chinese Journal of Internal Medicine, 2013, 52(11): 928-931.
- [8] 李鸿斌,铁 宁,贾永峰,等.类风湿关节炎患者滑膜 CCP 表位表达与 HLA-DRB1 等位基因、PADI4 单核苷酸多态性的相关性分析[J].中华医学杂志,2012,92(23):1607-1611.
Li HB, Tie N, Jia YF, et al. Association between the synovial expression of cyclic citrullinated peptide and susceptibility variants of HLA-DRB1 shared epitope alleles and PADI 4 gene single nucleotide polymorphisms in patients with rheumatoid arthritis[J]. National Medical Journal of China, 2012, 92(23): 1607-1611.
- [9] Guzmán-Guzmán IP, Reyes-Castillo Z, Munoz-Barrios S, et al. Polymorphisms and functional haplotype in PADI4; further evidence for contribution on rheumatoid arthritis susceptibility and anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in a western Mexican population [J]. Immunol Lett, 2015, 163(2): 214-220.
- [10] 许 菁,张源潮,孙红胜,等.肽酰基精氨酸脱亚氨酶 4 基因与类风湿关节炎关联研究的 Meta 分析[J].中华风湿病学杂志,2012,16(6):406-410.
Xu J, Zhang YC, Sun HS, et al. Meta-analysis of association between peptidylarginine deiminase IV gene and rheumatoid arthritis [J]. Chinese Journal of Rheumatology, 2012, 16(6): 406-410.
- [11] Snir O, Gomez-Cabrero D, Montes A, et al. Non-HLA genes PTPN22, CDK6 and PADI4 are associated with specific autoantibodies in HLA-defined subgroups of rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Res Ther, 2014, 16(4): 414.
- [12] 刘 冀,杨发满,张培莉,等.高原地区汉、藏、回族群类风湿关节炎与肽酰基精氨酸脱亚氨酶 4 基因多态性的相关性[J].中国老年学杂志,2012,32(18): 3881-3883.
Liu J, Yang FM, Zhang PL, et al. Correlation Plateau Han, Tibetan, Hui people with rheumatoid arthritis and peptidyl arginine deiminase 4 gene polymorphism[J]. Chinese Journal of Gerontology, 2012, 32(18): 3881-3883.
- [13] 秦白茹.类风湿关节炎患者血清与关节滑液抗肽酰基精氨酸脱亚氨酶 4 抗体的变化[J].现代预防医学,2012,39(21):5648-5649,5651.
Qin BR. The changes of the level of peptidylarginine deiminase type 4 (PADI4) in the serum and joint synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis (RA) [J]. Modern Preventive Medicine, 2012, 39(21): 5648-5649, 5651.
- [14] Du Y, Liu X, Guo JP, et al. Association between PADI4 gene polymorphisms and anti-cyclic citrullinated peptide antibody positive rheumatoid arthritis in a large Chinese Han cohort[J]. Clin Exp Rheumatol, 2014, 32(3): 377-382.
- [15] 刘 冀,杨发满,李 蓉,等.青海地区回族类风湿关节炎患者抗环瓜氨酸抗体与血清肽酰基精氨酸脱亚氨酶基因多态性关系的研究[J].中国全科医学,2012,15(32):3734-3736.
Liu J, Yang FM, Li R, et al. Anti-cyclic citrullinated peptide antibody and serum peptidylarginine deiminase polymorphism in rheumatoid arthritis patients in qinghai hui population[J]. Chinese General Practice, 2012, 15(32): 3734-3736.
- [16] 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 H. Clinical significance of anti-CCP antibody and anti-AKA antibody and rheumatoid factor in rRheumatoid arthritis[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2015, 30(5): 159-161.
- [17] Panati K, Pal S, Rao KV, et al. Association of single nucleotide polymorphisms (SNPs) of PADI4 gene with rheumatoid arthritis (RA) in Indian population [J]. Genes Genet Syst, 2012, 87(3): 191-196.
- [18] 钱 龙,史恒星,李向培,等.类风湿关节炎患者血清肽酰基精氨酸脱亚氨酶 4 水平及其意义[J].中华内科杂志,2011,50(2):107-110.
Qian L, Shi HX, Li XP, et al. The significance of serum peptidylarginine deiminase 4 in rheumatoid arthritis [J]. Chinese Journal of Internal Medicine, 2011, 50(2): 107-110.