

同位素标记相对和绝对定量技术在 RA 患者血清中的应用研究

余莲^{1*}, 肖垚^{2*}, 马小美¹

(1. 福建医科大学附属龙岩第一医院 血液风湿科, 龙岩 364000; 2. 宜昌市第一人民医院 血液科, 宜昌 443000)

摘要: 采用同位素标记相对和绝对定量(isobaric tags for relative and absolute quantitation, iTRAQ)技术寻找能够用于 RA 诊断、疗效评估或预后判断的新血清标志物, 探索 RA 发病机制。对 10 例活动期 RA 患者、10 例稳定期 RA 患者与 10 例健康对照者血清采用 iTRAQ 技术结合串联质谱技术进行差异蛋白质组学分析, 得到差异蛋白。通过 DAVID 软件鉴定差异蛋白, 分析差异蛋白在 RA 发病过程中所起的生物学作用。结果显示共鉴定出 303 个蛋白质, 其中 RA 活动组与健康对照组差异倍数 ≥ 1.5 的蛋白质 27 个, 表达显著上调和下调的蛋白质分别为 13 和 14 个, 差异蛋白的功能涉及到蛋白质代谢、脂类代谢、补体系统、凝血系统等多个系统。通过 DAVID 软件的在线分析得到了差异蛋白的基因本体论(gene ontology, GO)生物学过程、细胞组分和分子功能的富集分析结果。通过对差异蛋白的研究可以为阐明 RA 的发病机制及发现新的生物标志物提供新的途径。

关键词: 类风湿关节炎; 蛋白质组学; 血清; 同位素标记相对和绝对定量技术

中图分类号: R593.21

文献标志码: A

文章编号: 1001-2478(2019)01-0023-07

RA 是以 T 淋巴细胞, 特别是 Th1 为核心介导的免疫系统功能紊乱性疾病^[1-4]。目前 RA 血清标志物中最为可靠并被广泛应用的只有抗环瓜氨酸肽(anti-cyclic peptide containing citrulline, CCP)和 RF, 这不能满足临床需要。RA 的发病机制仍不十分清楚, 且缺乏早期的检测手段, 因此需要从多角度进行更加深入的研究。蛋白质组学为在全貌性分析蛋白质组表达差异的基础上探索细胞分子机制提供了可能。

同位素标记相对和绝对定量(isobaric tags for relative and absolute quantitation, iTRAQ)技术是一种基于串联质谱方法的蛋白质定量技术, 具有样本兼容性好, 既可相对定量也可绝对定量, 最多可同时对 8 组样本进行定量比较, 标记效率高等优点。目前国内外已经开始广泛应用此项技术进行蛋白质组学研究, 通过对患者血清样本的分析, 获得一些对疾病有价值的候选生物标志物^[5-6]。

本研究拟应用 iTRAQ 技术检测 RA 稳定组、RA 活动组和健康对照组血清中的差异蛋白, 以筛

选血清中潜在的疾病诊断和活性性评判的生物标志物, 并探索 RA 的发病机制和可能的药物作用靶点。

1 材料与方法

1.1 研究对象 RA 患者血清样本均来源于福建医科大学附属龙岩第一医院血液风湿科 2014 年 1 至 10 月住院及门诊患者, 所有患者均被诊断为 RA 且未接受过任何治疗, 诊断标准符合美国风湿病学会 2009 年 ACR/EULAR 关于 RA 的分类标准^[7]。健康对照者来源于同期福建医科大学附属龙岩第一医院体检中心, 身体健康, 心、肺、肝、肾等重要器官功能正常, 无炎症性疾病。全部患者和健康对照者排除哮喘、荨麻疹、湿疹、DM、高血压、肝病、冠心病、器官移植、肿瘤和其他急慢性感染性疾病。根据 DAS28^[8]评分将 RA 患者分为活动组(≥ 2.6)和稳定组(< 2.6), 采用 ELISA 测定患者血清 RF 和抗 CCP 抗体水平。每组患者各 10 例, 同时根据相对应的性别、年龄比例等参数, 设置健康对照者 10 例。

1.2 试剂和仪器 iTRAQ 8-plex 标记试剂盒及缓冲液为美国 AB 公司产品; 强阳离子色谱柱和碳-18 反相色谱柱为美国 Phenomenex 公司产品; 胰蛋白酶为美国 Promega 公司产品; 血清低丰度蛋白提取试剂盒为美国 Bio-Rad 公司产品; 高效液相

收稿日期: 2018-07-17

基金项目: 福建龙岩市科技计划项目(2015LY)

作者简介: 余莲(1962—), 女, 硕士, 主任医师, 主要从事风湿免疫研究; 肖垚(1987—), 男, 硕士, 住院医师, 主要从事血液免疫研究; * 为共同第一作者

通信作者: 余莲(E-mail: yulian-ly@126.com)

色谱仪为美国 Thermo Scientific 公司产品; Ultraflex TOF/TOF、MALDI-TOF-MS 质谱仪及配套软件 Mascot 2.3 为德国 Bruker 公司产品。

1.3 主要实验方法及步骤 血清样本采集于福建医科大学附属龙岩第一医院, 完成样本收集后于北京蛋白质组研究中心完成 RA 血清 iTRAQ 蛋白质组学定量分析。

1.3.1 样本收集与处理 抽取 RA 患者及健康对照者前臂肘窝处外周静脉血 5 mL, 室温静置 2 h 后以 3 000 r/min 离心 10 min, 收集上层血清, 并置于 -80 °C 冰箱保存、待测。

1.3.2 蛋白提取与定量 应用 ProteoMiner™ Protein Enrichment Kit(美国 Bio-Rad 公司)富集样本血清中的低丰度蛋白, 经 SDS-PAGE 测定, 93% 的高丰度蛋白被除去。采用 Bradford 法(BCA)检测蛋白浓度, 绘制标准曲线。

1.3.3 蛋白样本胰蛋白酶消化与 iTRAQ 试剂标记 每组样本取 100 μ g, 用含 0.1% SDS 的 TEAB 补齐样本体积。加 2 μ g 胰蛋白酶, 37 °C 温育 16 h。冻干消化液, 复溶肽段。取 1 μ L 消化后的肽段, 使用 Ultraflex TOF/TOF 检测消化效率。用 iTRAQ 试剂进行标记, 每管标记试剂中加入 60 μ L 异丙醇。将混合好的标记试剂加入到肽段中, 用 115 标记 RA 稳定组、116 标记 RA 活动组、117 标记健康对照组。混匀后, 离心至管底, 室温静置 1 h。

1.3.4 离线二位液相色谱分离与点靶 干燥的标记样本用上样缓冲液 A(10 mmol/L KH_2PO_4 , 25% CAN, pH 值 2.7)复溶并稀释 10 倍, 上样到 SCX 预装柱(粒径为 5 μ m, 规格为 2.1 mm \times 200 mm), 经上样缓冲液 A 洗涤后, 用含有 KCl 浓度分别为 35、50、75、100、125、150、175、200、250 和 300 mmol/L 的缓冲液 B 分步洗脱, 收集不同浓度梯度条件下洗脱的多肽。收集到的各组样本稀释后进行碳-18 反相色谱柱(粒径为 5 μ m, 规格为 77 μ m \times 150 mm)梯度淋洗和点靶。

1.3.5 质谱鉴定及数据库搜索 采用 Q-TOF(飞行时间检测器)串联质谱分析仪进行多肽的串联质谱鉴定和定量分析, 检测模式为正离子模式, 离子喷雾电压为 2.2 kV, 一级质谱扫描范围为 400~1 800 u, 一个谱图选择 5 个最强的母离子进行串联扫描, 二级质谱扫描范围为 100~2 000 u, 最后质谱所得结果数据生成 compound 文件。用 Mas-

cot 2.3 软件检索 Swissprot Human 数据库, 数据库检索条件为胰蛋白酶酶切, 固定修饰为半胱氨酸碘乙酰胺烷基化。允许最大的未被酶切位点数为 1, M 氧化、itraq8plex(K)、itraq8plex(N)、itraq8plex(Y)为可变修饰, MS 与 MS/MS 质量误差为 0.05 Da。使用 Scaffold 软件对数据进行归一化并去冗余, 得到差异表达结果, 差异倍数 ≥ 1.2 , 认为二者之间有差异。得出的差异蛋白用 DAVID 软件分类系统进行蛋白质的生物进程及分子功能分析。

1.4 统计学处理 使用 SPSS 13.0 软件进行统计分析。由于各组患者年龄不符合正态分布, 不符合方差齐性, 故采用非参数检验(Kruskal Wallis Test)进行分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般临床资料 RA 患者 20 例, 根据 DAS28 评分将其分为 RA 活动组(≥ 2.6)10 例和稳定组(< 2.6)10 例。收集健康对照组 10 例。各组研究对象年龄、性别差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 差异蛋白的鉴定 通过质谱鉴定, 用 Mascot 2.3 软件在 Swissprot Human 数据库进行全组分蛋白质搜索。最后共鉴定出 303 个蛋白质, 以表达量差异倍数 ≥ 1.2 、 $P < 0.05$ 、特征肽段 > 2 个为条件进行筛选, 得到 RA 活动组与 RA 稳定组差异倍数 ≥ 1.2 的蛋白质 37 个, 其中表达上调的蛋白质 13 个, 表达下调的蛋白质 24 个。RA 活动组与健康对照组差异倍数 ≥ 1.2 的蛋白质 33 个, 其中表达上调的蛋白质 15 个, 表达下调的蛋白质 18 个。见图 1。

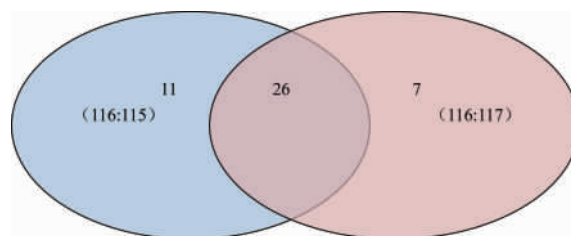


图1 RA 活动组与 RA 稳定组及 RA 活动组与健康对照组差异蛋白的重叠分布

2.3 差异蛋白组的筛选 通过上述 RA 活动组与 RA 稳定组以及 RA 活动组与健康对照组之间差异蛋白的比较, 可以发现它们之间差异蛋白的种类大

致相同，而 RA 活动组与健康对照组差异蛋白的差异倍数比 RA 活动组与 RA 稳定组的更高，这有助于发现潜在的生物标志物。本研究以 RA 稳定组和健康对照组血清中的蛋白质为对照，计算 RA 活动组相应蛋白质与它的比值，当差异倍数 ≥ 1.5 时，认为该蛋白质在相应组中表达差异明显，即为表达

有差异的蛋白质。与健康对照组比较，在 RA 活动组中共筛选出 13 个表达差异显著上调的蛋白质(表 1)和 14 个表达差异显著下调的蛋白质(表 2)。与 RA 稳定组比较，在 RA 活动组中共筛选出 10 个表达差异显著上调的蛋白质(表 3)和 21 个表达差异显著下调的蛋白质(表 4)。

表 1 RA 活动组较健康对照组表达差异显著上调的蛋白质

ID	蛋白质	最大差异倍数
1 tr B4E1Z4 B4E1Z4_HUMAN	补体因子 B	1.63
2 sp P08603 CFAH_HUMAN	补体因子 H	1.72
3 tr H9KV48 H9KV48_HUMAN	血浆蛋白酶 C1 抑制剂	1.75
4 sp P00450 CERU_HUMAN	铜蓝蛋白	1.89
5 sp P02649 APOE_HUMAN	载脂蛋白 E	2.07
6 sp P01871-2 IGHM_HUMAN	Ig μ 链 C 区 2 亚型	2.29
7 sp P01009 A1AT_HUMAN	α 1-抗胰蛋白酶	2.54
8 sp P02763 A1AG1_HUMAN	α 1-酸性糖蛋白 1	2.73
9 sp P02748 CO9_HUMAN	补体 C9	4.09
10 sp P04003 C4BPA_HUMAN	C4b 结合蛋白 α	4.21
11 sp P00738 HPT_HUMAN	结合珠蛋白	4.53
12 tr G3V5I3 G3V5I3_HUMAN	α 1-抗胰凝乳蛋白酶	8.24
13 sp P0DJI8 SAA1_HUMAN	血清淀粉样蛋白 A-1	18.71

表 2 RA 活动组较健康对照组表达差异显著下调的蛋白质

ID	蛋白质	最大差异倍数
1 sp P00747 PLMN_HUMAN	纤溶酶原	1.52
2 sp P01008 ANT3_HUMAN	抗凝血酶 III	1.82
3 sp P19827 ITIH1_HUMAN	间 α 胰蛋白酶抑制剂重链 H1	1.92
4 sp P02787 TRFE_HUMAN	血清铁传递蛋白	2.04
5 sp P03952 KLKB1_HUMAN	血浆激肽释放酶	2.08
6 sp P00734 THRB_HUMAN	凝血酶原	2.13
7 sp P02751- FINC_HUMAN	纤维连接蛋白的亚型 7	2.22
8 sp P01023 A2MG_HUMAN	α 2-巨球蛋白	2.38
9 sp P43652 AFAM_HUMAN	维生素 E 结合糖化蛋白	2.63
10 sp P06396 GELS_HUMAN	凝溶胶蛋白	2.70
11 tr C9JV77 C9JV77_HUMAN	α -2-HS-糖蛋白	2.70
12 sp P19823 ITIH2_HUMAN	间 α 胰蛋白酶抑制剂重链 H2	2.86
13 sp P04114 APOB_HUMAN	载脂蛋白 B-100	3.45
14 sp P02647 APOA1_HUMAN	载脂蛋白 A- I	5.26

表 3 RA 活动组较 RA 稳定组表达差异显著上调的蛋白质

ID	蛋白质	最大差异倍数
1 sp P04003 C4BPA_HUMAN	C4b 结合蛋白 α	1.57
2 sp P00450 CERU_HUMAN	铜蓝蛋白	1.66
3 sp P02671 FIBA_HUMAN	纤维蛋白原 α 链	1.92
4 sp P00738 HPT_HUMAN	结合珠蛋白	2.01
5 tr G3V5I3 G3V5I3_HUMAN	α -1-抗胰凝乳蛋白酶	2.11
6 sp P02748 CO9_HUMAN	补体 C9	2.13
7 sp P01871-2 IGHM_HUMAN	Ig μ 链 C 区 2 亚区	2.31
8 sp P01009 A1AT_HUMAN	α 1-抗胰蛋白酶	2.94
9 sp Q08380 LG3BP_HUMAN	半乳凝素-3 结合蛋白	3.31
10 sp P0DJI8 SAA1_HUMAN	血清淀粉样蛋白 A-1	6.92

表 4 RA 活动组较 RA 稳定组表达差异显著下调的蛋白质

ID	蛋白质	最大差异倍数
1 sp P01023 A2MG_HUMAN	α 2-巨球蛋白	1.54
2 sp P02749 APOH_HUMAN	β -2-糖蛋白 1	1.54
3 sp P01031 CO5_HUMAN	补体 C5	1.56
4 sp P04004 VTNC_HUMAN	玻连蛋白	1.56
5 tr J3QJT6 J3QJT6_HUMAN	纤维鞘相互作用蛋白 2	1.62
6 tr C9JV77 C9JV77_HUMAN	α -2-HS-糖蛋白	1.82
7 sp P19827 ITIH1_HUMAN	间 α 胰蛋白酶抑制剂重链 H1	1.85
8 sp P02787 TRFE_HUMAN	血清转铁蛋白	1.89
9 sp P03952 KLKB1_HUMAN	血浆激肽释放酶	2.00
10 sp P07996 TSP1_HUMAN	血小板反应蛋白-1	2.13
11 sp P06396 GELS_HUMAN	凝溶胶蛋白	2.27
12 sp P01019 ANGT_HUMAN	血管紧张素原	2.27
13 sp P00734 THRB_HUMAN	凝血酶原	2.33
14 sp P04114 APOB_HUMAN	载脂蛋白 B-100	2.38
15 sp P01008 ANT3_HUMAN	抗凝血酶 III	2.38
16 sp P19823 ITIH2_HUMAN	间 α 胰蛋白酶抑制剂重链 H2	2.50
17 sp P43652 AFAM_HUMAN	维生素 E 结合糖化蛋白	2.56
18 sp P06727 APOA4_HUMAN	载脂蛋白 A-IV	3.33
19 sp P35858 ALS_HUMAN	胰岛素样生长因子结合蛋白复合物的酸不稳定亚基	3.57
20 sp P02647 APOA1_HUMAN	载脂蛋白 A-I	4.76
21 sp P69905 HBA_HUMAN	血红蛋白的 α 亚基	5.56

2.4 差异蛋白的功能分析 用 DAVID 软件对 RA 活动组与健康对照组差异蛋白进行了基于基因本体论(gene ontology, GO)的生物学过程、细胞组分和分子功能的富集分析。发现差异蛋白在炎症反应、机械损伤应答、防御反应等生物学过程中出现明显的富集(表 5), 并发现差异蛋白主要在细胞外区

域出现富集(表 6), 这可能与样本取材自血清有一定关系。
在分子功能分类中, 得到的差异蛋白主要是各种肽酶抑制剂, 占差异蛋白的 25.93%, 其次是与结合多糖、结合肝素、结合糖胺聚糖和结合碳水化合物等分子功能相关的蛋白质(表 7)。

表5 RA活动组与健康对照组的差异蛋白生物学过程富集分布

编号	生物学过程	数量	百分率(%)	P 值	GO 编号
1	急性炎症反应	10	37.04	< 0.05	0002526
2	机械损伤应答	14	51.85	< 0.05	0009611
3	炎症反应	11	40.74	< 0.05	0006954
4	防御反应	12	44.44	< 0.05	0006952
5	调节血液凝固	6	22.22	< 0.05	0030193
6	急性时相反应	6	22.22	< 0.05	0006953
7	对外界刺激的调控	8	29.63	< 0.05	0032101
8	蛋白质代谢	6	22.22	< 0.05	0050818
9	伤口愈合	8	29.63	< 0.05	0042060
10	纤溶调节	4	14.82	< 0.05	0051917

表6 RA活动组与健康对照组的差异蛋白细胞组分富集分布

编号	富集分布区域	数量	百分率(%)	P 值	GO 编号
1	胞外区	26	96.30	< 0.05	0005576
2	细胞外间隙	18	66.67	< 0.05	0005615
3	胞外区域组分	18	66.67	< 0.05	0044421
4	囊腔	6	22.22	< 0.05	0031983
5	血小板 α -颗粒腔	5	18.52	< 0.05	0031093
6	分泌颗粒(运输小泡)	7	25.93	< 0.05	0030141
7	胞质膜小泡腔	5	18.52	< 0.05	0060205
8	血小板 α -颗粒	5	18.52	< 0.05	0031091
9	细胞质囊泡	6	22.22	< 0.05	0044433
10	血浆脂蛋白颗粒	4	14.81	< 0.05	0034358

表7 RA活动组与健康对照组的差异蛋白分子功能富集分布

编号	分子功能	数量	百分率(%)	P 值	GO 编号
1	丝氨酸型内肽酶抑制剂活性	7	25.93	< 0.05	0004867
2	内肽酶抑制剂活性	7	25.93	< 0.05	0004866
3	肽酶抑制剂活性	7	25.93	< 0.05	0030414
4	肝素结合	6	22.22	< 0.05	0008201
5	糖胺聚糖结合	6	22.22	< 0.05	0005539
6	酶抑制剂活性	7	25.93	< 0.05	0004857
7	模式连接	6	22.22	< 0.05	0001871
8	多糖结合	6	22.22	< 0.05	0030247
9	碳水化合物代谢过程	6	22.22	< 0.05	0030246
10	胆固醇转运蛋白活性	3	11.11	< 0.05	0017127

2.5 差异蛋白的信号通路分析 根据挑选出的差异蛋白,计算它们与信号通路的超几何分布关系,共发现9种差异蛋白(33.33%) 在补体和凝血通路出现了富集,提示这2条通路可能参与了RA的发病过程,其中差异蛋白在凝血过程的富集也与RA患者更易发生血栓的临床资料^[9]符合。

3 讨论

iTRAQ技术作为一种比较新的蛋白质组学方法已被广泛用于肝癌、乳腺癌、直肠癌等实体瘤组织标志物研究,但在血清中的应用研究目前还少见报道。本研究共鉴定出13个表达差异显著上调的蛋白质和14个下调蛋白质,它们主要涉及蛋白质代谢、脂类代谢、补体系统、免疫进程、凝血、细胞组分的构建、钙离子调控、应激反应等多个领域。它们可能与RA病情的发展过程有密切联系,有望作为RA疾病的活动性指标,帮助疾病诊断及病情评估。

本研究选出了一些具有成为RA血清生物标志物潜能的蛋白质,包括上调的 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶、结合珠蛋白、铜蓝蛋白、血清淀粉样蛋白A-1和下调的 $\alpha 2$ -HS-糖蛋白、载脂蛋白A-I。根据文献,筛选出了几个可能与RA活动性相关的蛋白质,包括血清淀粉样蛋白A-1、 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶和抗凝血酶Ⅲ。

血清淀粉样蛋白A属于急性时相反应蛋白。当发生炎症或急性感染时其在48~72 h内即迅速升高,并在疾病的恢复期迅速下降。有研究发现,在炎性关节炎的患者中,该蛋白与疾病活动性关系密切。Tanimoto等^[9]分析了该蛋白在RA患者血清中的表达情况,发现其在RA患者血清中的水平较对照组明显升高,并随时间的推移不断增加,提示这种炎症相关的标志物在RA中具有潜在的应用价值。安媛等^[10]对RA患者和正常对照者血清的高相对分子质量及低相对分子质量蛋白质进行双向电泳,通过质谱鉴定发现患者中血清淀粉样蛋白A-1、血清淀粉样蛋白A-2水平明显高于正常人。Sinz等^[11]研究发现在RA患者的滑膜液和血浆中均可检测到蛋白质,但在骨关节炎患者中未检测到。本研究发现血清淀粉样蛋白A-1在RA活动组血清中显著升高,相较于RA稳定组升高更加明显,这也与Tanimoto等^[9]的实验结果相符合。血清淀粉样蛋白在继发性淀粉样变性病的致病过程中

发挥关键作用,继发性AA型淀粉样变性是RA的严重并发症,病变可累及肾、消化道及其他重要器官,导致不可逆的器官功能障碍。几乎所有AA型淀粉样变性患者血清淀粉样蛋白A长时间维持在高水平,可为该病的诊断、治疗及预后评估提供良好的参考信息。在临床上,测量淀粉样蛋白A的水平可能成为一个了解RA严重程度或监测治疗效果的工具。

$\alpha 1$ -抗胰蛋白酶是一种糖蛋白,是血清中最主要的蛋白酶抑制剂,对凝血酶、尿激酶等其他酶也有抑制作用。它也是一种急性时相反应蛋白,在有炎症时, $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶可透过毛细血管进入组织液,在炎症局部浓度很高,对急性炎症性疾病有一定限制作用。郭平等^[12]发现RA患者活动期血清 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶水平明显升高,而缓解期无明显变化;RA活动期患者经治疗症状缓解后其升高的 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶又降至正常。这提示 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶水平的变化可以作为判断RA是否活动的一个指标,而症状缓解后蛋白质水平又降至正常,也可以作为观察病情变化及治疗效果的一个辅助指标。本研究发现RA活动组患者血清 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶较RA稳定组及健康对照组均明显上调,提示其可能与RA病情活动度密切相关。

抗凝血酶Ⅲ是体内重要的天然抗凝蛋白,主要作用是中和血液中已形成的凝血酶,并与激活的其他凝血成分结合成复合物,使之失活。研究发现RA活动期患者血清抗凝血酶Ⅲ水平明显降低,其原因可能是活动期RA患者体内的免疫炎症反应激活了体内的凝血系统,促使抗凝血酶Ⅲ消耗增加。抗凝血酶Ⅲ的降低提示RA活动期患者体内存在高凝状态。抗凝血酶Ⅲ也可作为RA诊治过程中一个潜在的监测指标。

通过差异蛋白的信号通路分析发现,9种差异蛋白在补体和凝血途径出现了富集,提示补体和凝血系统参与了RA的发病过程。目前RA和其他自身免疫性疾病被视为血栓前状态、静脉血栓栓塞和心血管疾病的一个危险因素^[13]。研究发现免疫复合物可通过启动补体系统促进RA患者血栓形成,高凝状态一旦发生又可成为关节肿胀、晨僵、疼痛的原因之一,通过对这方面的进一步研究,或许能为RA的诊断和治疗提供新的思路。

综上所述,本研究在小范围内鉴定了RA活动组、RA稳定组以及健康对照组血清中的差异蛋

白, 它们可能在 RA 疾病的发生、发展中起重要作用。然而, 差异蛋白与 RA 的相关性尚需要得到更多分组、更大数量样本的证实并进行生物学验证。此外, 本研究采用的蛋白质组学技术因灵敏度等原因, 仍有一些蛋白质无法被检测, 随着相关技术的新进展相信能有更多新的发现。

参考文献

- [1] Cope AP. T cells in rheumatoid arthritis[J]. *Arthritis Res Ther*, 2008, 10(suppl 1): S1.
- [2] Cope AP, Schulze-Koops H, Aringer M. The central role of T cells in rheumatoid arthritis[J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2007, 25(5, 46): S4-S11.
- [3] Thomas R, Turner M, Cope AP. High avidity autoreactive T cells with a low signalling capacity through the T-cell receptor: Central to rheumatoid arthritis pathogenesis? [J]. *Arthritis Res Ther*, 2008, 10(4): 210.
- [4] Tran CN, Lundy SK, Fox DA. Synovial biology and T cells in rheumatoid arthritis[J]. *Pathophysiology*, 2005, 12(3): 183-189.
- [5] Hergenroeder G, Redell JB, Moore AN, *et al.* Identification of serum biomarkers in brain-injured adults: Potential for predicting elevated intracranial pressure[J]. *J Neurotrauma*, 2008, 25(2): 79-93.
- [6] Culnan DM, Cooney RN, Stanley B, *et al.* Apolipoprotein A-IV, a putative satiety/antiatherogenic factor, rises after gastric bypass[J]. *Obesity*, 2009, 17(1): 46-52.
- [7] 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.
- [8] van der Heijde DM, van't Hof MA, van Riel PL, *et al.* Judging disease activity in clinical practice in rheumatoid arthritis: First step in the development of a disease activity score [J]. *Ann Rheum Dis*, 1990, 49(11): 916-920.
- [9] Tanimoto N, Kumon Y, Suehiro T, *et al.* Serum paraoxonase activity decreases in rheumatoid arthritis[J]. *Life Sci*, 2003, 72(25): 2877-2885.
- [10] 安媛, 蒲海, 何思志, 等. 早期类风湿关节炎患者和正常人血清蛋白质组学分析比较[J]. *中华医学杂志*, 2005, 85(18): 1261-1265.
- [11] Sinz A, Bantscheff M, Mikkat S, *et al.* Mass spectrometric proteome analyses of synovial fluids and plasmas from patients suffering from rheumatoid arthritis and comparison to reactive arthritis or osteoarthritis[J]. *Electrophoresis*, 2002, 23(19): 3445-3456.
- [12] 郭平, 李一文, 许志良. $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶等在类风湿性关节炎诊治中的意义[J]. *浙江实用医学*, 1997, 2(1): 15-16.
- [13] 范平生, 刘安舟, 李萍, 等. 类风湿性关节炎患者高凝状态的初步观察[J]. *临床荟萃*, 1991, 6(7): 305-307.

Application of iTRAQ technology on analysis of serum from the patients with RA

YU Lian^{1*}, XIAO Yao^{2*}, MA Xiao-mei¹. (1. *Department of Hematology and Rheumatology, Longyan First Hospital Affiliated to Fujian Medicine University, Longyan 364000, China*; 2. *Department of Hematology, Yichang First People's Hospital, Yichang 443000, China*)

Abstract: The quantitative proteomics technology based on the isobaric tags for relative and absolute quantitation (iTRAQ) was used to find new serum markers for RA diagnosis, evaluation of treatment effect or prognosis and explore the mechanism of pathogenesis. Twenty patients with RA, 10 in active stage and 10 in stable stage, were enrolled. In addition, 10 healthy individuals were as controls. Sera were collected from each individual and analyzed by the iTRAQ technology and tandem mass spectrometry to get differential proteins. Such differential proteins were identified and their biological roles in the pathogenesis of RA were analyzed by the DAVID software. A total of 303 proteins were identified and analyzed. The difference between the active group and the control group was more than or equal to 1.5 folds in 27 proteins, of which, 13 proteins upregulated and 14 downregulated. The differential proteins were involved in protein metabolism, lipid metabolism, complement system and blood coagulation system. With online analysis of DAVID software, the enrichment analysis results of the biological process of the gene ontology (GO), cellular component and molecular function for the differential protein were obtained. Studying of these differential proteins can provide a new means to understand the pathogenesis of RA and to discover new biomarkers.

Key words: rheumatoid arthritis; proteomic; serum; isobaric tags for relative and absolute quantitation technology