

- [13] Chang YM, Kung HJ, Evans CP. Nonreceptor tyrosine kinases in prostate cancer[J]. *Neoplasia*, 2007, 9(2): 90-100.
- [14] Warmuth M, Damoiseaux R, Liu Y, et al. SRC family kinases: potential targets for the treatment of human cancer and leukemia[J]. *Curr Pharm Des*, 2003, 9(25): 2043-2059.
- [15] Lu R, Alioua A, Kumar Y, et al. c-Src tyrosine kinase, a critical component for 5-HT_{2A} receptor-mediated contraction in rat aorta[J]. *J Physiol*, 2008, 586(16): 3855-3869.
- [16] Li Z, Xie Z. The Na/K-ATPase/Src complex and cardiotonic steroid-activated protein kinase cascades[J]. *Pflugers Arch*, 2009, 457(3): 635-644.
- [17] Summy JM, Gallick GE. Src family kinases in tumor progression and metastasis[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2003, 22(4): 337-358.
- [18] 毛成毅, 郑继军, 杜鹃, 等. Src 蛋白在肝癌 HepG2 细胞增殖凋亡中作用的初步研究[J]. *重庆医学*, 2010, 39(1): 19-23.
- [19] 杜军, 戈应滨, 顾洛. Src 激酶抑制剂 PP2 对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞黏附、迁移能力的影响[J]. *南京医科大学学报*, 2008, 28(7): 850-854.
- [20] 于虹, 怀娜, 马季梅. Src 激酶抑制剂 PP2 对人胃癌细胞生物学行为的影响[J]. *肿瘤*, 2010, 30(10): 822-826.
- [21] Marin TM, Clemente CF, Santos AM, et al. Shp2 negatively regulates growth in cardiomyocytes by controlling focal adhesion kinase/Src and mTOR pathways[J]. *Circ Res*, 2008, 103(8): 813-824.
- [22] Morisco C, Marrone C, Galeotti J, et al. Endocytosis machinery is required for beta1-adrenergic receptor-induced hypertrophy in neonatal rat cardiac myocytes[J]. *Cardiovasc Res*, 2008, 78(1): 36-44.
- [23] 李卓, 刘杰文, 齐淑玲, 等. 长期培养的急性粒细胞白血病患者骨髓贴壁细胞中 src 原癌基因的高水平表达[J]. *中国实验血液学杂志*, 1999, 7(3): 205-207.
- [24] Vultur A, Buettner R, Kowolik C, et al. SKI-606 (bosutinib), a novel Src kinase inhibitor, suppresses migration and invasion of human breast cancer cells[J]. *Mol Cancer Ther*, 2008, 7(5): 1185-1194.
- [25] 杜芸, 左连富, 王小玲, 等. 食管癌中 Src 蛋白与相关因子的表达及其预后意义[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2006, 22(3): 319-324.

(收稿日期: 2011-05-15)

· 综 述 ·

肽酰基精氨酸脱亚胺酶 4 与类风湿关节炎相关性的研究进展

蔡小慧 综述, 卿之驹 审校

(中南大学湘雅二医院检验科, 长沙 410011)

关键词: 关节炎, 类风湿; 多态现象, 遗传; 瓜氨酸; 肽酰基精氨酸脱亚胺酶

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.16.031

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)16-1852-03

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种常见的具有较高致残性的系统性自身免疫性疾病, 主要表现为对称性、慢性、进行性多关节炎。关节滑膜的病理改变为慢性炎症、增生形成血管翳、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。RA 在自身免疫性结缔组织病中患病率居首位, 全世界患病率大约为 1%^[1], 且较多发于中年女性, 中国人的患病率约为 0.32%~0.36%^[2]。

RA 确切的发病机制尚未明确, 多项研究表明是由遗传因素和环境因素共同作用导致的, 约 50%~60% 的表现型取决于遗传因素^[3-5]。抗原性蛋白或多肽的瓜氨酸化可能是 RA 的发病机制之一。瓜氨酸化是蛋白质翻译后修饰的一种形式, 肽酰基精氨酸脱亚胺酶 (peptidylarginine deiminase, PADI) 是催化精氨酸转化为瓜氨酸的关键酶。人类 PADI 有 5 种亚型, 分别为 PADI1、PADI2、PADI3、PADI4 和 PADI6, 其中与 RA 密切相关的为 PADI4。

1 PADI4 基因多态性与 RA 易感性

人类 PADI4 基因定位于染色体 1p36 上的 NT-034367.1 区域, 共有 2 238 个碱基对, 相对分子质量为 74 000, 包含 16 个外显子和 15 个内含子。从 PADI4 基因的 5' 非翻译区的启动子序列到 3' 非翻译区目前已发现 17 个单核苷酸多态性变异 (SNP) 位点, 其中外显子区域 padi4_89 (rs11203366)、padi4_90 (rs11203367)、padi4_92 (rs874881)、padi4_104 (rs1748033) 的 SNP 是目前的研究热点。

PADI4 基因单核苷酸和单倍体型多态性与 RA 的易感性

相关是 2003 年由日本学者 Suzuki 等^[6]首先发现的。他们发现 PADI4 在 RA 患者滑膜液中显著高表达, 进一步通过对日本人群 830 例 RA 和 736 例健康对照中 PADI4 基因进行 SNP 分析, 发现 PADI4 基因多态性与 RA 的易感性显著相关, 并用位于 PADI4 基因外显子区域的 4 个 SNP, 即 padi4_89、padi4_90、padi4_92、padi4_104 定义了 ACCC 和 GTGT 两种最常见的单倍型, GTGT 是 RA 易感性单倍型, ACCC 是 RA 非易感性单倍型。随后, 多国学者进行了类似研究。韩国学者 Kang 等^[7]分析了韩国人群的 padi4_89、padi4_90 和 padi4_92 3 个 SNP 位点, 证明了 PADI4 基因 SNP 和单倍体型在韩国人群中与 RA 易感性密切相关。Hoppe 等^[8]对德国人群 PADI4 进行研究后发现, PADI4 主要的单倍体型分布与日本人群相似, 并证明了 PADI4 在德国人群中与 RA 的相关性。2005 年 Plenge 等^[9]对北美和瑞典人群研究发现 padi4_94 与 RA 亦有很强的相关性。然而, Hamey 等^[10]对英国人群的 PADI4 基因进行研究, 发现 PADI4 基因多态性在英国与 RA 的易感性并无明显相关性, Caponi 等^[11]对法国白人的研究也得到了类似结论。2007 年 Lee 等^[12]通过对全世界相关研究的 Meta 分析显示 PADI4 基因多态性在亚洲人种和欧洲人种中均与 RA 易感性相关, 且在亚洲人种中相关性更为显著。然而 2010 年 Burr 等^[13]通过对大量英国高加索人群的 Meta 分析显示欧洲人种的 PADI4 基因多态性与 RA 没有相关性。可见, 全世界 PADI4 与 RA 关系的研究结果仍存在分歧, 二者的相关性可能存在一定的种族差异性。Freudenberg 等^[14]通过最新研究, 比较亚洲和欧洲人种后认为: RA 的遗传易感性包括两个方

面——种族特异性和多个共有的易感基因位点。

国内关于 *PADI4* 多态性与 RA 相关性的研究尚少。冯忠军等^[15]通过对河北汉族人群(106 例健康体检者及 115 例 RA 患者)的 *padi4*₉₄、*padi4*₁₀₄ 两个 SNP 位点测序发现 *PADI4* 多态性与 RA 易感性可能不存在相关性,但随后该实验室对 *padi4*₉₂ 位点的 SNP 分析又肯定了二者之间存在相关性。钟兵等^[16]比较了 3 个不同种族的研究发现,*padi4*₈₉、*padi4*₉₀ 和 *padi4*₉₂ 3 个位点几乎呈现完全性的连锁,故他们只检测 *padi4*₉₂ 1 个位点,通过条件 Logistic 回归分析显示该等位基因与 RA 易感性无相关性。因此,汉族人群中 *PADI4* 多态性与 RA 的关系亦存在分歧,仍需增大标本量,进行进一步研究。

2 *PADI4* 表达与 RA 的实验室诊断

PADI4 催化瓜氨酸化反应后产生大量瓜氨酸化蛋白或多肽。RA 血清中存在多种针对这类蛋白或多肽的特异性抗体,称瓜氨酸化蛋白抗体(ACPA)。包括抗核周因子抗体(APF)、抗角蛋白抗体(AKA)和抗环瓜氨酸化蛋白抗体(抗 CCP 抗体)等,其中抗 CCP 抗体由于具有较高的敏感性和特异性已逐渐被广泛应用于 RA 的实验室诊断。美国风湿联盟(ACR)与欧洲抗风湿病联盟(EULAR)于 2009 年 11 月联合推出新的 RA 分类标准,该分类标准采用评分系统,并在 1987 年 RA 分类标准的基础上新增了一个血清学指标——ACPA,对于 RA 的早期诊断、早期治疗有重要意义。

PADI4 及其抗体也可能成为新的 RA 实验室诊断指标。Takizawa 等^[17]利用重组的人 *PADI4* 蛋白为抗原,用 ELSIA 法分别检测 RA 患者、系统性红斑狼疮(SLE)患者、其他风湿病患者和健康体检者血清中抗 *PADI4* 抗体水平,发现 RA 患者血清抗 *PADI4* 抗体阳性率明显高于其他 3 组,说明抗 *PADI4* 抗体可能作为一种新的特异性诊断指标应用于 RA 的实验室诊断。Suzuki 等^[6]研究发现 *PADI4* 基因多态性与 ACPA 的阳性率有关,但也有证据显示 ACPA 的产生与 *PADI4* 基因无关,而是与 SE 阳性的 HLA-DRB1 基因相关^[18]。Cha 等^[5]研究显示,RA 早期(病程小于或等于 34 个月)的抗 CCP 抗体水平与 *PADI4* 基因相关,晚期则与 SE 阳性的 HLA-DRB1 相关。国内学者常丽丽等^[19]对 RA 组、骨关节炎(OA)组及健康对照组外周血单个核细胞中 *PADI4* mRNA 表达进行检测,并分析其与抗 CCP 抗体、DAS 28 评分、患者病程的关系,发现 RA 组 *PADI4* mRNA 表达明显高于 OA 组和健康对照组,且 RA 组中 *PADI4* mRNA 表达与抗 CCP 抗体和 DAS 28 评分水平呈明显正相关,与病程呈负相关。赵金霞等^[20]还发现,抗 *PADI4* 抗体阳性组出现皮下结节及关节 X 线Ⅲ期以上改变明显多于阴性组,这表明抗 *PADI4* 抗体可能与 RA 疾病活动及病情严重程度相关。而史恒星等^[21]研究否认抗 *PADI4* 抗体与 DAS 28、RF 及抗 CCP 抗体水平的相关性,这些不同结果的产生可能与病例选择偏倚、不同地域及不同遗传背景有关,有待深入研究。

3 *PADI4* 与 RA 发病机制

瓜氨酸化是 RA 可能的发病机制之一,细胞凋亡是瓜氨酸化一个可能的前提。早在 1995 年,有学者发现在 RA 患者的滑膜组织中存在大量的细胞凋亡,凋亡细胞主要存在于滑膜表层,以巨噬细胞为主,包括一些成纤维样滑膜细胞。*PADI4* 的活化依赖于钙离子浓度和 pH 值,Chang 等^[22]认为 RA 患者滑膜细胞内的 *PADI4* 酶在通常情况下处于无活性或低活性状态,因为细胞内钙离子浓度低,不足以激活 *PADI4* 酶;在病变情况下,细胞内钙离子浓度升高,*PADI4* 酶激活,瓜氨酸化增

强,促进细胞凋亡,*PADI4* 从破坏的细胞中溢出,将大量纤维蛋白沉淀瓜氨酸化,促进病情发展。Lundberg 等^[23]通过动物体内试验发现 *PADI4* 和瓜氨酸化蛋白在正常的关节中检测不到,而在 RA 时大量存在于滑膜中,证实了 *PADI4* 及其产物在 RA 发病中的重要作用。

那么,*PADI4* 是如何打破机体的免疫耐受而产生抗 *PADI4* 抗体的,一种可能是抗 *PADI4* 抗体继发于抗 CCP 抗体的产生,因为抗 CCP 抗体对应的靶抗原是由 *PADI* 催化产生的瓜氨酸化蛋白,这种酶与底物的关系可能会通过分子间表位扩展的方式引起抗体的产生,也就是说机体在对瓜氨酸化蛋白产生免疫反应之后通过表位扩展进而产生了抗 *PADI4* 抗体。另一种可能是抗 *PADI4* 抗体独立于抗 CCP 抗体而产生,因为在抗 CCP 抗体阴性的患者中也可以检测到抗 *PADI4* 抗体。

机体对 *PADI4* 的免疫耐受被打破后,产生抗 *PADI4* 抗体,同时 *PADI4* 催化体内蛋白瓜氨酸化并产生抗 ACPA。抗 *PADI4* 抗体和 ACPA 可能通过形成免疫复合物,进而激活炎症细胞,产生炎症因子,并进一步促进炎症细胞浸润,参与 RA 的发展过程。

另外,HLA-DRB1 共同表位参与 RA 的发生已达成共识,*PADI4* 基因可能通过基因间相互作用与 HLA-DRB1 共同表位一起在 RA 的发病中发挥更显著的作用^[24]。吸烟也是 RA 可能的危险因素,Kochi 等^[25]最新研究表明,吸烟与 RA 易感基因共同作用更易导致 RA 的发生,亚洲、欧洲 RA 易感基因的异质性可部分地由男性吸烟率不同来解释。

4 小 结

PADI4 及瓜氨酸化可能是 RA 的发病机制之一,成为近年来 RA 的研究新热点。*PADI4* 基因多态性在某些人种中可能与 RA 易感性相关,但可能存在较大的种族差异性。多种 ACPA 的检测,特别是抗 CCP 抗体已广泛应用于 RA 的实验室诊断,并大大提高了 RA 早期诊断的敏感性。抗 *PADI4* 抗体对 RA 的诊断有较高敏感性和特异性,可能成为 RA 早期诊断的新思路,但有关 *PADI4* 基因多态性及抗 *PADI4* 抗体应用价值方面仍有待进一步研究。

参考文献

- [1] Gabriel SE. The epidemiology of rheumatoid arthritis[J]. *Rheum Dis Clin North Am*, 2001, 27(2): 269-281.
- [2] 吴意,张艳如. 抗 CCP 抗体和 RF 对类风湿性关节炎诊断价值的比较[J]. *中国现代医学杂志*, 2010, 20(17): 2680-2687.
- [3] Macgregor AJ, Sniedre H, Rigby AS, et al. Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins[J]. *Arthritis Rheum*, 2000, 43(1): 30-37.
- [4] du Montcel ST, Michou L, Petit-Teixeira E, et al. New classification of HLA-DRB1 alleles supports the shared epitope hypothesis of rheumatoid arthritis susceptibility[J]. *Arthritis Rheum*, 2005, 52(4): 1063-1068.
- [5] Cha S, Choi CB, Han TU, et al. Association of anti-cyclic citrullinated peptide antibody levels with *PADI4* haplotypes in early rheumatoid arthritis and with shared epitope alleles in very late rheumatoid arthritis[J]. *Arthritis Rheum*, 2007, 56(5): 1464-1463.
- [6] Suzuki A, Yamada R, Chang X, et al. Functional haplotypes of *PADI4*, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis[J]. *Nat Genet*, 2003, 34(4): 395-402.

- [7] Kang CP, Lee HS, Ju H, et al. A functional haplotype of the *PADI4* gene associated with increased rheumatoid arthritis susceptibility in Koreans[J]. *Arthritis Rheum*, 2006, 54(1): 90-96.
- [8] Hoppe B, Häupl T, Gruber R, et al. Detailed analysis of the variability of peptidylarginine deiminase type 4 in German patients with rheumatoid arthritis: a case-control study[J]. *Arthritis Res Ther*, 2006, 8(2): R34.
- [9] Plenge RM, Padyukov L, Remmers EF, et al. Replications of putative candidate-gene association with rheumatoid arthritis in > 4 000 samples from North America and Sweden: association of susceptibility with *PTPN22*, *CTLA4*, and *PADI4* [J]. *Am J Hum Genet*, 2005, 77(6): 1044-1060.
- [10] Harney SM, Meisel C, Sims AM, et al. Genetic and genomic studies of *PADI4* in rheumatoid arthritis [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2005, 44(7): 869-872.
- [11] Caponi L, Ptit-Teixeira E, Sebbag M, et al. A family based study shows no association between rheumatoid arthritis and the *PADI4* gene in a white French population[J]. *Ann Rheum Dis*, 2005, 64(4): 587-593.
- [12] Lee YH, Rho YH, Choi SJ, et al. *PADI4* polymorphisms and rheumatoid arthritis susceptibility: a meta-analysis[J]. *Rheumatol Int*, 2007, 27(4): 827-833.
- [13] Burr ML, Naseem H, Hinks A, et al. *PADI4* genotype is not associated with rheumatoid arthritis in a large UK Caucasian population[J]. *Ann Rheum Dis*, 2010, 69(4): 666-670.
- [14] Freudenberg J, Lee HS, Han BG, et al. Genome-wide association study of rheumatoid arthritis in Korea: population-specific loci as well as overlap with European susceptibility loci [J]. *Arthritis Rheum*, 2011, 63(4): 884-893.
- [15] 冯忠军, 梁芸, 闻海丰, 等. 中国河北地区汉族健康人与 RA 患者 *PADI4*₉₄ 单核苷酸多态性的研究[J]. *临床检验杂志*, 2009, 27(2): 97-99.
- [16] 钟兵, 方勇飞, 李华, 等. *PADI4* 基因多态性与类风湿关节炎的相关性研究[J]. *第三军医大学学报*, 2010, 32(11): 1155-1157.
- [17] Takizawa Y, Sawada T, Suzuki A, et al. Peptidylarginine deiminase 4 (*PADI4*) identified as a conformation-dependent autoantigen in rheumatoid arthritis[J]. *Scand J Rheumatol*, 2005, 34(3): 212-215.
- [18] Kapitany A, Szabo Z, Lakos G, et al. Associations between serum anti-CCP antibody, rheumatoid factor levels and HLA-DR4 expression in Hungarian patients with rheumatoid arthritis[J]. *Isr Med Assoc J*, 2008, 10(1): 32-36.
- [19] 常丽丽, 刘雁鹰, 粟占国. RA 患者易感基因肽酰基精氨酸脱亚氨酶 4 mRNA 的表达及其意义[J]. *中华风湿病学杂志*, 2007, 11(11): 641-644.
- [20] 赵金霞, 何菁, 贾汝琳, 等. 抗 *PADI4* 抗体检测方法的建立及其在类风湿性关节炎中的临床意义[J]. *中华风湿病学杂志*, 2008, 12(1): 4-8.
- [21] 史恒星, 钱龙, 李向培, 等. 血清抗肽酰基精氨酸脱亚氨酶 4 抗体检测在类风湿性关节炎诊断中的意义[J]. *免疫学杂志*, 2010, 2(4): 329-332.
- [22] Chang X, Yamada R, Sawada T, et al. The inhibition of antithrombin by peptidylarginine deiminase 4 may contribute to pathogenesis of rheumatoid arthritis[J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2005, 44(3): 293-298.
- [23] Lundberg K, Nijenhuis S, Vossenaar ER, et al. Citrullinated proteins have increased immunogenicity and arthritogenicity and their presence in arthritic joints correlates with disease severity[J]. *Arthritis Res Ther*, 2005, 7(3): R458-467.
- [24] Bang SY, Han TU, Choi CB, et al. Peptidylarginine deiminase type IV (*PADI4*) haplotypes interact with shared epitope regardless of anti-cyclic citrullinated peptide antibody or erosive joint status in rheumatoid arthritis: a case control study[J]. *Arthritis Res Ther*, 2010, 12(3): R115.
- [25] Kochi Y, Thabet MM, Suzuki A, et al. *PADI4* polymorphism predisposes male smokers to rheumatoid arthritis[J]. *Ann Rheum Dis*, 2011, 70(3): 512-515.

(收稿日期: 2011-05-15)

流式细胞免疫分型在临床的应用研究

周萍 综述, 唐吉斌 审校

(安徽省铜陵市人民医院临床检验中心 244009)

关键词: 研究; 细胞分化抗原群; 流式细胞术; 免疫分型**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.16.032**文献标识码:** A**文章编号:** 1673-4130(2011)16-1854-03

流式细胞仪的应用对白血病、淋巴瘤等血液系统疾病的分型、诊断、治疗及预后判断均有重要作用, 本文就流式细胞免疫分型在临床中的应用进行简要综述。

1 免疫分型的应用基础

血细胞在分化的不同阶段及细胞活化的过程中出现或消失的细胞表面抗原分子统称细胞分化群(cluster of differentiation, CD)。在白细胞系、红细胞系、巨核细胞系、血小板及非造血细胞均有不同的分化抗原簇表达, 分布在细胞膜、细胞质中。血液肿瘤细胞的特征是丧失了正常细胞的系列专一性和分化阶段的规律性, 因此, 运用流式细胞术(flow cytometry, FCM)将具有系列特异性并涵盖不同分化阶段的单克隆抗体作为分

子探针来检测血液肿瘤细胞的内外抗原可以反映其本质上与正常造血细胞的差异^[1], 对确定其来源和分化阶段、判断微量残留病变的存在及推测预后均有价值。FCM是以流式细胞仪和荧光素标记的单克隆抗体作为工具来分析异常细胞群体, 针对不同疾病采用不同设门策略^[2], 如在急性白血病中采用CD45/SSC设门法可以将分化程度低的白血病细胞(CD45低表达)与正常细胞(CD45高表达)区分开; 在B细胞淋巴瘤中用一个全B细胞的抗体来分析抗 κ 链和抗 λ 链; T细胞淋巴瘤时用一个全T细胞抗体设门来精确分型肿瘤细胞。相对于传统的免疫组化染色技术, FCM能对血液肿瘤细胞同时进行多重抗体标记, 因此具有快速、简便、客观、多参数定量分析等优