

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.26.010

文章编号: 1005-8982(2017)26-0052-04

钙网织蛋白在类风湿关节炎早期诊断及活动度评估中的作用*

丁红梅¹, 刘建华¹, 郑芳², 贾曙光¹, 魏蔚³, 孙晓东¹, 赵雁艳¹, 孟海妹²

(1. 河北省唐山市第二医院, 河北 唐山 063000; 2. 天津医科大学 医学检验学院, 天津 300203; 3. 天津医科大学总医院 风湿免疫科, 天津 300050)

摘要:目的 探讨钙网织蛋白(CRT)在类风湿关节炎(RA)早期诊断和疾病活动度评估中的作用及临床意义。**方法** 收集 45 例早期活动性 RA 患者、35 例骨性关节炎(OA)患者,以及 30 例正常对照者(HC)的血清标本。采用酶联免疫吸附法检测 3 组患者血清 CRT 水平,魏氏法检测红细胞沉降率(ESR),免疫散射比浊法检测 C 反应蛋白(CRP)的水平。采用 Spearman 对血清 CRT 水平与疾病活动度评分(DAS28)、ESR、CRP 进行相关性分析。**结果** RA 组血清 CRT 水平 $[(6.7 \pm 2.5) \mu\text{g/L}]$ 高于 OA 组 $[(3.9 \pm 0.9) \mu\text{g/L}]$ 和 HC 组 $[(3.8 \pm 0.7) \mu\text{g/L}]$ ($P < 0.05$),OA 组与 HC 组的血清 CRT 水平比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);与 OA 组和 HC 组比较,RA 组 ESR、CRP 水平升高($P < 0.05$);RA 组血清 CRT 水平与 DAS28 评分、ESR 及 CRP 呈正相关($r_s = 0.391, 0.459$ 和 $0.454, P = 0.008, 0.002$ 和 0.002)。**结论** 早期活动性 RA 患者血清 CRT 水平增高,CRT 与 DAS28 评分、ESR 及 CRP 呈正相关,提示 CRT 可能成为早期诊断 RA,以及辅助 ESR、CRP 评估 RA 疾病活动度的潜在血清学指标。

关键词: 类风湿关节炎;钙网织蛋白;疾病活动度;DAS28 评分

中图分类号: R446.1

文献标识码: A

Role of calreticulin in early diagnosis and activity assessment of rheumatoid arthritis*

Hong-mei Ding¹, Jian-hua Liu¹, Fang Zheng², Shu-guang Jia¹, Wei Wei³,
Xiao-dong Sun¹, Yan-yan Zhao¹, Hai-mei Meng²

(1. The Second Hospital of Tangshan, Tangshan, Hebei 063000, China; 2. School of Laboratory Medicine, Tianjin Medical University, Tianjin 300203, China; 3. Department of Rheumatology and Immunology, General Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300050, China)

Abstract: Objective To investigate the role of calreticulin (CRT) in the diagnosis and assessment of disease activity in the patients with early rheumatoid arthritis (RA). **Methods** Serum CRT level was measured by ELISA in 45 patients with early RA, 35 cases with osteoarthritis (OA) and 30 healthy controls (HC). ESR was measured by the Westergren method. Serum CRP level was measured by immunonephelometry. The correlations of CRT with Disease Activity Score for 28 joints (DAS28 score), ESR and CRP were assessed by Spearman's rank correlation coefficient. **Results** The serum concentration of CRT of the early RA patients $[(6.7 \pm 2.5) \mu\text{g/L}]$ was higher than that of the OA patients and HC $[(3.9 \pm 0.9)$ and $(3.8 \pm 0.7) \mu\text{g/L}, P < 0.05]$, while there was no significant difference between the OA and HC groups ($P > 0.05$). Compared with the OA and HC groups, the ESR and CRP levels were elevated in the early RA group ($P < 0.05$). Serum CRT concentration in the early RA patients was positively correlated with DAS28 score, ESR and CRP ($r_s = 0.391,$

收稿日期:2016-05-10

* 基金项目:河北省科技计划项目(No:152777157)

0.459 and 0.454; $P=0.008, 0.002$ and 0.002). **Conclusions** Together with ESR and CRP, CRT may be used as a potential biomarker for early diagnosis of RA and for assessment of disease activity.

Keywords: rheumatoid arthritis; calreticulin; disease activity; DAS28 score

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种以外周关节慢性、侵袭性关节炎为主要临床表现的免疫介导的疾病,其致残率在关节病中居首位。RA的患病率占世界总人口的0.5%~1.0%,我国患病率为0.3%~0.4%,且呈上升趋势^[1-2]。早期诊断和治疗、控制疾病活动是改善RA患者预后及降低其致残率的关键。RA的诊断主要依据患者的临床表现、影像学检查及血清学检查等方法。早期RA患者临床表现多不典型,当出现明显的临床症状和影像学改变时,患者已经出现骨质破坏。因此,寻找更特异、灵敏的血清学指标,指导RA的早期诊断和治疗、预后评估和疗效监测是目前RA临床研究的热点^[3-4]。本研究通过分析钙网织蛋白(Calreticulin, CRT)在RA患者体内的表达特点及其与28个关节病情活动度评分(disease activity score for 28 joints, DAS28)、红细胞沉降率(erythrocyte sedimentation rate, ESR)和C反应蛋白(C-reactive protein, CRP)等活动度指标的相关性,进一步探讨CRT在RA早期诊断及病情评估中的潜在价值。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取2014年10月-2015年10月在天津医科大学总医院感染免疫科和唐山市第二医院关节外科住院治疗患者,其中早期活动性RA患者45例,骨关节炎(Osteoarthritis, OA)患者35例。早期活动性RA患者的纳入标准为病程<12个月,且未接受缓解病情抗风湿药物(disease-modifying anti-rheumatic drugs, DMARDs)治疗^[5]。选取同期收集的30例性别、年龄匹配的健康体检者作为健康对照组(healthy control, HC)。RA和OA患者的诊断标准参考1987年美国风湿病学会(American College of Rheumatology, ACR)修订的RA诊断标准^[6]和1995年ACR修订的OA诊断标准^[7]。本研究通过河北省唐山市第二医院伦理会的审查,并取得受试者的知情同意。

1.2 主要试剂与仪器

人CRT检测试剂盒购自上海鑫乐生物科技有限公司,采用BioTek Synergy 2酶标仪(美国Biotek公司)进行检测。人全血CRP采用Nephstar Plus蛋

白分析仪(深圳市国赛生物技术有限公司)及其配套试剂盒进行检测,严格按照说明书进行操作。

1.3 方法

1.3.1 酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 采集所有受试对象的清晨空腹静脉血2 ml, 3 000 r/min离心10 min,分离血清置入-80℃冰箱冷冻保存备用。血清CRT的含量应用双抗体夹心法96孔ELISA试剂盒进行检测,并严格按照试剂盒说明书进行操作。

1.3.2 魏氏法 应用一次性血沉真空采血管(枸橼酸钠抗凝管)采集受试者的空腹静脉血1.6 ml(静脉血与抗凝剂的比例为4:1),缓慢颠倒混匀8~10次。将混匀血吸取到魏氏血沉管至0刻度处。将血沉管垂直放置在血沉架上,室温下静止1 h,观察上层血浆高度(mm),即为血沉结果。正常参考值:男性<15 mm/h,女性<20 mm/h。

1.3.3 免疫散射比浊法 采集受试者的EDTA抗凝血,吸取2 μl全血标本加入预分装处理缓冲液的测量杯中,轻摇10 s充分混匀。将量杯放进Nephstar Plus蛋白分析仪的测量孔,仪器自动检测并显示结果。正常参考值:CRP<8 mg/L。

1.3.4 RA疾病活动度检测 RA疾病活动度测定采用DAS28评分系统,其计算公式为:DAS28评分= $0.56 \times \sqrt{\text{疼痛关节数}} + 0.28 \times \sqrt{\text{肿胀关节数}} + 0.7 \ln(\text{ESR}) + 0.014 \times \sqrt{\text{总体疼痛VAS评分}}$ 。DAS28评分 ≤ 2.6 提示病情缓解,2.6~3.2提示低度活动,3.2~5.1提示中度活动,>5.1提示高度活动。

1.4 统计学方法

数据分析采用SPSS 17.0统计软件,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用方差分析,两两比较用SNK-q检验;计数资料以率表示,用 χ^2 检验;采用Spearman等级相关进行相关性分析, $P<0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床资料

各组在年龄、性别方面比较,差异无统计学意义($P<0.05$)。3组ESR、CRP水平比较,差异有统计学意义($P<0.05$),RA组较OA组、HC组升高。见附表。

2.2 各组血清 CRT 水平比较

RA 组、OA 组及 HC 组的血清 CRT 浓度分别为 (6.7 ± 2.5) 、 (3.9 ± 0.9) 和 $(3.8 \pm 0.7) \mu\text{g/L}$, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=36.409, P=0.000$)。进一步两两比较, 经 SNK- q 检验, RA 组的血清 CRT 浓度高于 OA 组和 HC 组 ($P=0.000$), 而 OA 组与 HC 组的血清 CRT 浓度比较, 差异无统计学意义 ($P=0.816$)。

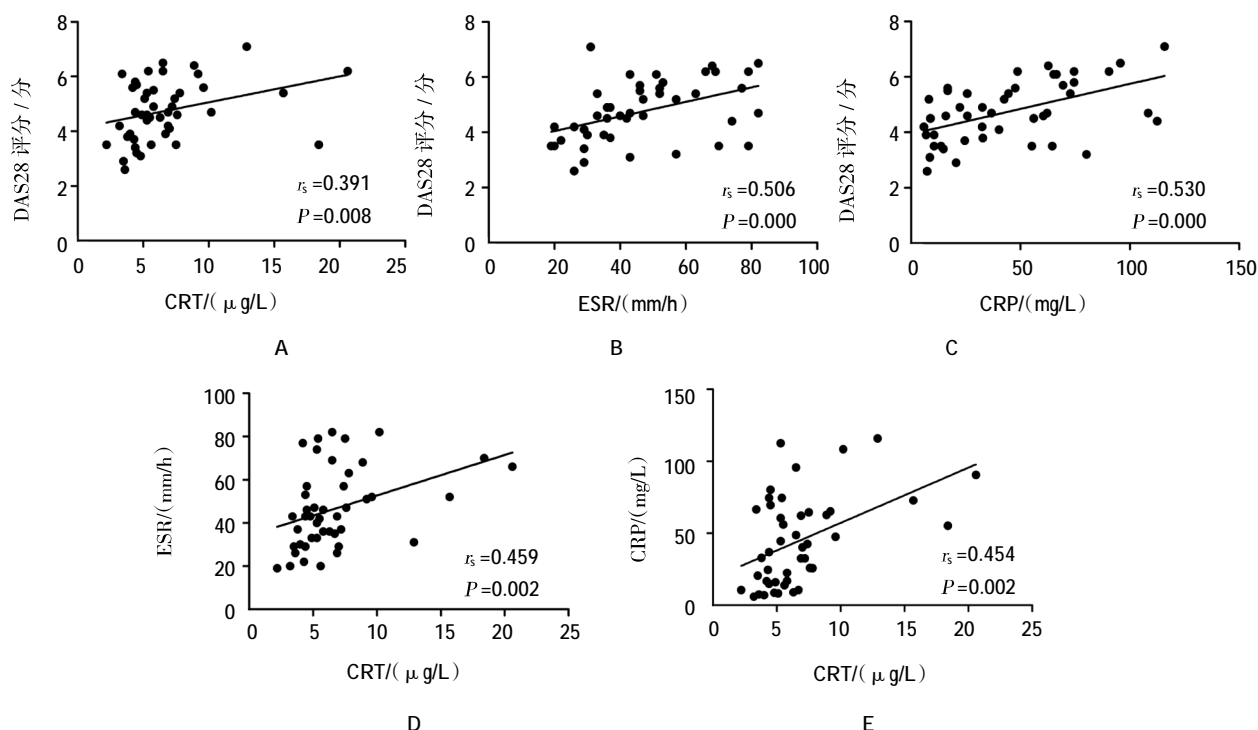
2.3 血清 CRT 与 DAS28 评分、ESR 及 CRP 的相关性分析

CRT 与 DAS28 评分呈正相关 ($r_s=0.391, P=0.008$)。

ESR、CRP 与 DAS28 评分呈正相关 ($r_s=0.506$ 和 0.530 , 均 $P=0.000$), 且 CRT 与 ESR、CRP 呈正相关 ($r_s=0.459$ 和 0.454 , 均 $P=0.002$)。见附图。

附表 3 组患者的临床资料比较

组别	例数	女/男/例	年龄/(岁, $\bar{x} \pm s$)	ESR/(mm/1 h, $\bar{x} \pm s$)	CRP/(mg/L, $\bar{x} \pm s$)
HC 组	30	23/7	54 ± 7	11.6 ± 8.2	4.8 ± 3.1
OA 组	35	26/9	56 ± 12	20.9 ± 15.1	22.4 ± 16.5
RA 组	45	34/11	57 ± 11	46.6 ± 14.2	44.7 ± 26.2
F/χ^2 值		0.050	0.749	72.920	39.871
P 值		0.975	0.475	0.000	0.000



附图 RA 患者血清 CRT 水平与 DAS28 评分、ESR 及 CRP 的相关分析散点图

3 讨论

RA 是最常见的炎性关节病, 具有较高的致残率。RA 治疗的关键在于早期明确诊断和治疗, 控制疾病活动度。因此, 正确判断 RA 病情的活动性对临床制定治疗方案、监测疗效及预后评估具有十分重要的指导意义。目前, 临床上评估 RA 疾病活动度的工具主要包括 ACR 反应标准、DAS28 评分、简化的疾病活动性指数及临床疾病活动指数等。尽管 DAS28 评分是目前临床上应用最广泛的疗效监测及病情活动性评估的综合指标, 但该评价方法较为繁杂, 限制其在临床实践中的应用。血清学指标, 如 ESR 和 CRP 等炎症标志物, 常用来反映 RA 疾病活动度。然

而, 该炎症指标缺乏特异性, 而且一部分可能进展的 RA 患者中, 并未检测到 ESR 和 CRP 升高。因此, 临床需要寻找更加特异的生物标志物, 用于开展 RA 患者的个性化诊疗及病情活动性评估。近年研究表明, 一些生物标志物, 如血清淀粉样蛋白 A[®]、白介素 17[®]等可用来评估 RA 的病情活动度。

CRT 是一个具有多种生物学功能的蛋白质分子。在内质网中, CRT 的主要功能包括维持 Ca^{2+} 稳态、分子伴侣及调节 MHC-I 类分子运载抗原肽等。此外, CRT 还表达在细胞质、细胞膜表面及胞外环境中, 参与细胞的黏附和迁移、伤口愈合、细胞凋亡的调节, 以及抗肿瘤免疫应答等多种生物学活动^[10-12]。

近年来,HONG 等^[13]发现,RA 患者血清中可溶性 CRT 浓度高于系统性红斑狼疮患者。TARR 等^[14]研究显示,CRT 在 RA 患者血浆和滑膜液中表达升高,并且与疾病活动度相关,CRT 可能通过与凋亡蛋白 FasL 结合,抑制 T 淋巴细胞的凋亡,进而参与 RA 的发病。LING 等^[15]研究发现,CRT 可作为 RA 共享表位的信号转导受体,介导促炎症信号的传导。最新研究表明,CRT 在 RA 患者体内表达升高,其可能通过促进新生血管形成,参与 RA 滑膜炎和血管翳形成的病理过程^[16]。本研究结果显示,RA 患者血清 CRT 水平高于 OA 组和 HC 组。本研究纳入的研究对象均为早期活动性 RA 患者,初步结果表明 CRT 可能成为 RA 早期诊断及病情评估的潜在血清学指标。

由于 DAS28 评分是目前临床上应用最广泛的评估 RA 活动度及药物治疗效果的综合指标。因此,本研究通过分析 CRT 水平与 DAS28 评分的相关性,进而分析 CRT 能否成为评估 RA 疾病活动度的新的血清学指标。结果显示,RA 患者血清 CRT 水平与 DAS28 评分呈正相关,提示 CRT 可作为 RA 活动度评估的潜在指标。ESR 和 CRP 是临床广泛应用的评估 RA 病情活动度的重要血清学指标,因此本研究进一步分析 CRT 与两者的相关性。结果表明,ESR、CRP 与 DAS28 评分呈正相关,且 CRT 与 ESR、CRP 也呈正相关。以上结果均提示 CRT 可能成为辅助 ESR、CRP 评估 RA 病情活动度的潜在指标。本研究纳入的样本数较少,在后续实验中,笔者将扩大样本量进行深入研究。

综上所述,早期活动性 RA 患者血清 CRT 的浓度升高,且与反映 RA 病情活动度的指标 DAS28 评分,以及血清学指标 ESR 和 CRP 呈正相关,提示 CRT 可能成为早期诊断 RA,以及辅助 ESR、CRP 评估 RA 疾病活动度的潜在血清学指标。

参 考 文 献:

- [1] SCOTT D L, WOLFE F, HUIZINGA T W. Rheumatoid arthritis[J]. *Lancet*, 2010, 376(9746): 1094-1108.
- [2] LI Z G. A new look at rheumatology in China-opportunities and challenges[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2015, 11(5): 313-317.
- [3] VERHEUL M K, FEARON U, TROUW L A, et al. Biomarkers for rheumatoid and psoriatic arthritis[J]. *Clin Immunol*, 2015, 161(1): 2-10.
- [4] MC ARDLE A, FLATLEY B, PENNINGTON S R, et al. Early biomarkers of joint damage in rheumatoid and psoriatic arthritis[J]. *Arthritis Res Ther*, 2015, 17: 141.
- [5] ZHAO J, SU Y, LI R, et al. Classification criteria of early rheumatoid arthritis and validation of its performance in a multi-centre cohort[J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2014, 32(5): 667-673.
- [6] ARNETT F C, EDWORTHY S M, BLOCH D A, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis[J]. *Arthritis Rheum*, 1988, 31(3): 315-324.
- [7] MANDELL B F, LIPANI J. Refractory osteoarthritis. Differential diagnosis and therapy[J]. *Rheum Dis Clin North Am*, 1995, 21(1): 163-178.
- [8] SHEN C, SUN X G, LIU N, et al. Increased serum amyloid A and its association with autoantibodies, acute phase reactants and disease activity in patients with rheumatoid arthritis [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 11(2): 1528-1534.
- [9] METAWI S A, ABBAS D, KAMAL M M, et al. Serum and synovial fluid levels of interleukin-17 in correlation with disease activity in patients with RA [J]. *Clin Rheumatol*, 2011, 30(9): 1201-1207.
- [10] GOLD L I, EGGLETON P, SWEETWYNE M T, et al. Calreticulin: non-endoplasmic reticulum functions in physiology and disease[J]. *FASEB J*, 2010, 24(3): 665-683.
- [11] RAGHAVAN M, WIJEYESAKERE S J, PETERS L R, et al. Calreticulin in the immune system: ins and outs[J]. *Trends Immunol*, 2013, 34(1): 13-21.
- [12] WIJEYESAKERE S J, BEDI S K, HUYNH D, et al. The c-terminal acidic region of calreticulin mediates phosphatidylserine binding and apoptotic cell phagocytosis [J]. *J Immunol*, 2016, 196: 3896-3909.
- [13] HONG C, QIU X, LI Y, et al. Functional analysis of recombinant calreticulin fragment 39-272: implications for immunobiological activities of calreticulin in health and disease[J]. *J Immunol*, 2010, 185(8): 4561-4569.
- [14] TARR J M, WINYARD P G, RYAN B, et al. Extracellular calreticulin is present in the joints of patients with rheumatoid arthritis and inhibits FasL (CD95L)-mediated apoptosis of T cells[J]. *Arthritis Rheum*, 2010, 62(10): 2919-2929.
- [15] LING S, CHENG A, PUMPENS P, et al. Identification of the rheumatoid arthritis shared epitope binding site on calreticulin[J]. *PLoS One*, 2010, 5(7): DOI: 10.1371/journal.pone.0011703.
- [16] DING H, HONG C, WANG Y, et al. Calreticulin promotes angiogenesis via activating nitric oxide signalling pathway in rheumatoid arthritis[J]. *Clin Exp Immunol*, 2014, 178(2): 236-244.

(童颖丹 编辑)