

RA 患者血清 TNF- α 和外周血单个核细胞 TIPE2 表达的意义

张青汶

摘 要 **目的** 探讨类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)患者血清中肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor, TNF- α) 和外周血单个核细胞中肿瘤坏死因子 α 诱导蛋白家族 8 样蛋白 2 (tumor necrosis factor- α induced protein 8 like 2, TIPE2) 的表达在 RA 的诊断及疗效评价中的价值。**方法** 选取开封市第二人民医院风湿科近两年收治的 RA 患者 86 例,包括活动期患者 42 例,缓解期患者 44 例,门诊健康对照 40 例,用酶联免疫吸附法检测 3 组的血清中 TNF- α 的浓度,无菌抽取各组外周血,提取外周血单个核细胞,用荧光定量 PCR 及 Western blot 法检测 TIPE2 在 mRNA 及蛋白水平的表达。**结果** RA 活动组和缓解组患者血清中的 TNF- α 浓度高于健康对照组,RA 活动组血清中 TNF- α 明显高于缓解组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。TNF- α 和 RF 联合检测的敏感度和特异性分别为 75.5% 和 90%,特异性与单独检测 RF 相比,差异有统计学意义($P < 0.05$)。RA 活动期患者血清中 TNF- α 的浓度及 TIPE2 在 mRNA 表达水平和 DAS28 评分呈正相关($P < 0.01$),RA 患者血清中 TNF- α 的浓度和 TIPE2 在 mRNA 表达水平呈正相关($P < 0.01$)。RA 患者外周血 TIPE2 在 mRNA 及蛋白水平平均高于对照组,而且活动组高于缓解组($P < 0.01$)。**结论** 联合检测 RA 患者血清中的 TNF- α 对患者的诊断和病情的监测有重要临床价值, TIPE2 参与了 RA 的发病过程,可以和 TNF- α 一起作为判断疾病严重程度的指标。

关键词 类风湿关节炎 肿瘤坏死因子 α TIPE2

中图分类号 R593.22

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.07.038

Clinical Values of TNF- α in Sera and TIPE2 in Peripheral Blood Lymphocytes for Rheumatoid Arthritis. Zhang Qingwen. Department of Physician, The No 2 People's Hospital of Kaifeng, Henan 475000, China

Abstract **Objective** To investigate the clinical values of TNF- α in sera and TIPE2 in peripheral blood mononuclear cells for the diagnosis and therapeutic evaluation of rheumatoid arthritis. **Methods** Serum samples and peripheral blood mononuclear cells were obtained from 86 RA patients and 40 normal controls in the NO.2 Hospital of Kaifeng. The patients were divided into two groups including 42 active RA patients and 44 inactive RA patients. The concentration of serum TNF- α were measured by ELISA test. The TIPE2 mRNA and protein expression was measured by quantitative RT-PCR and Western blot. **Results** The concentration of serum TNF- α in RA patients were higher than in healthy controls($P < 0.01$). The concentration of serum TNF- α in active RA patients were higher than in inactive RA patients($P < 0.01$). The specificity and sensitivity of combined detection RF and TNF- α were 90% and 75.5% which were higher than single detection. The concentration of serum TNF- α and mRNA level of TIPE2 was positively correlated to DAS28. The concentration of serum TNF- α was positively correlated to mRNA level of TIPE2. The mRNA and protein level of TIPE2 in RA patients were higher than in healthy controls($P < 0.01$). The mRNA and protein level of TIPE2 in active RA patients were higher than in inactive RA patients($P < 0.01$). **Conclusion** Combined detection of RF and TNF- α had high diagnostic value and contributed to estimate the clinical observation. TIPE2 plays a role in the RA pathogenesis and TIPE2 may be a surrogate for severity of rheumatoid arthritis.

Key words Rheumatoid arthritis; TNF- α ; TIPE2

类风湿关节炎(RA)以慢性对称性关节损害反复发作作为特点,晚期出现关节强直、畸形,关节功能受损,严重影响患者生活质量。TNF- α 被认为是RA发病中首先动员的细胞因子,能启动和维持RA的炎性反应^[1]。TIPE2基因在实验性自身免疫性脑脊髓

炎小鼠动物模型中首次发现,是维持机体免疫稳态的一种必要蛋白,对固有免疫及适应性免疫发挥负性调节作用^[2]。有实验证明 TNF- α 能上调 TIPE2 的表达^[3]。在 RA 的发病过程中, TNF- α 和 TIPE2 之间有无关系鲜有报导。本实验通过测定 RA 患者血清中的 TNF- α 浓度及外周血单个核细胞 TIPE2 在 mRNA 及蛋白水平的表达,探讨二者在 RA 的诊断及疗

效评价中的价值。

材料与方法

1. 临床资料:选取笔者医院风湿科 2015 年 1 月 ~ 2017 年 1 月收治 RA 患者 86 例,符合 2010 年美国风湿病学会 RA 分类标准^[4],根据临床症状及疾病活动指数 DAS28,分为活动期 42 例,缓解期 44 例,其中男性 14 例,女性 72 例,患者年龄 30 ~ 64 岁;病程 8 ~ 82 个月,所有入选病例排除结核病、慢性病毒性肝炎等感染性疾病和肿瘤、血液病引起的关节肿痛。门诊健康对照组 40 例,其中男性 8 例,女性 32 例,年龄 30 ~ 62 岁,对照组与观察组患者在年龄 ($F = 0.78$, $P = 0.45$)、性别构成等方面比较,差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.27$, $P = 0.87$)。

表 1 各组年龄和性别构成

组别	年龄(岁)	男性	女性
RA 活动组	48.2 ± 12.1	7	35
RA 缓解组	47.8 ± 11.3	7	37
健康对照组	48.6 ± 10.6	8	32

2. 主要试剂:Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司),反转录试剂盒(美国 Promega 公司),引物合成(北京金唯智公司)。TNF- α ELISA 试剂盒(美国 BioLegend 公司),兔抗人 TIPE2 抗体(美国 CST 公司)。

3. 方法:无菌条件下抽取患者及健康对照静脉血 10ml,做常规的 RF、血沉等检测。(1)RF 检测操作步骤:提前 30min 从冰箱中取出试剂和患者标本,于 37℃ 解冻后使用;生化仪开机预温、设置参数、标准品定标;输入待检测项目,放入标本进行检测,检测完成后接受结果。RF 值 > 20IU/ml 为阳性。(2)TNF- α 的检测:按照 TNF- α 定量检测 ELISA 试剂盒说明书(美国 BioLegend 公司),同时检测血清 TNF- α 的值,重复 3 次求平均值。步骤如下:配制 TNF- α 标准品:标准品管加 160 μ l 稀释液配制 50ng/ml 的标准品,继续稀释成 960、384、153.6、61.44、24.58、12.5、6.25pg/ml,空白对照为稀释液,将 100 μ l 不同浓度的标准品及待检血清加入,4℃ 过夜;弃去微孔板内液体,洗板 4 次;每孔加入 100 μ l 生物素化抗体,室温下孵育 1h,弃去孔内液体,洗板 4 次;每孔加入 100 μ l 辣根过氧化物酶 - Streptavidin 液,室温孵育 45min;弃去孔内液体,洗板 4 次;每孔加 100 μ l 底物,避光室温下孵育 30min;加入 50 μ l 终止液;酶标仪检测 450nm 吸光度值,根据稀释倍数和标准曲线计算出 TNF- α 的浓度。(3)分离外周血单个核细胞:无

菌法抽取患者及健康对照静脉全血 10ml,用人淋巴细胞分离液按常规方法分离外周血单个核细胞,细胞分为两份,一份提取细胞总 RNA。荧光定量 PCR 扩增 TIPE2 基因,目的片段为 214bp,引物(上游)5'-GCCCAGCGCGTATCAAGGA-3',(下游)5'-GCA-CATCCCGGCACTCGGTC-3'。 β -actin 作为内参,用荧光定量 PCR 仪所配软件对实验结果进行分析。TIPE2 的 mRNA 相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行计算。(4)Western blot 法检测 TIPE2 蛋白表达差异:收集 3 组外周血单个核细胞,提取蛋白,SDS-PAGE 电泳,电泳结束后转移到 PVDF 膜上封闭 1h,加兔抗人 TIPE2 抗体 4℃ 孵育过夜;TBST 洗涤 3 次后加二抗孵育 1h,洗膜 3 次,然后暗室压片显影,用 GADPH 做内参。(5)RA 活动评分:根据患者临床症状及疾病活动指数 DAS28 将 RA 患者分为活动组(DAS28 > 2.6)和缓解组(DAS28 ≤ 2.6),DAS28 的计算公式如下: DAS28 = 0.56 × 压痛关节数 + 0.28 × 肿胀关节数 + 0.7 × ln(ESR) × 1.08 + 0.16。

4. 统计学方法:应用 SPSS 17.0 软件学软件进行统计分析,计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,3 组间比较采用单因素方差分析,计数资料采用 χ^2 检验,TNF- α 水平与 TIPE2 及各种临床指标的相关性采用 Spearman 相关性分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义,TIPE2 的 mRNA 相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行计算。

结 果

RA 活动组和缓解组患者的血清中 TNF- α 浓度均高于健康对照组,RA 活动组血清 TNF- α 浓度比 RA 缓解组明显升高,各组间比较差异有统计学意义 ($F = 15.700$, $P = 0.000$,表 2)。

表 2 各组血清中 TNF- α 的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TNF- α (pg/ml)
RA 活动组	42	248.3 ± 62.8
RA 缓解组	44	102.4 ± 58.4
健康对照组	40	25.6 ± 18.7

TNF- α 和 RF 单独检测及联合检测的敏感度和特异性见表 3。86 例 RA 组患者的 RF 和 TNF- α 敏感度分别为 80.3% 和 77.9%,特异性分别为 72.5% 和 87.5%,TNF- α 和 RF 联合检测的敏感度和特异性分别为 75.6% 和 90.0%,特异性与单独检测 RF 比较,差异有统计学意义 ($\chi^2 = 5.54$, $P = 0.02$)。

表 3 研究对象各指标检测结果

指标	RA 组 (n = 86)		敏感度 (%)	非 RA 组 (n = 40)		特异性 (%)	阳性预测值 (%)	阴性预测值 (%)
	+(a)	-(c)		+(b)	-(d)			
RF	69	17	80.3	11	29	72.5	86.2	62.3
TNF-α	67	19	77.9	5	35	87.5	93.6	69.7
RF 和 TNF-α	65	21	75.6	3	37	90.0	94.4	63.5

敏感度 = $a/(a+c)$, 特异性 = $d/(b+d)$, 阳性预测值 = $a/(a+b)$, 阴性预测值 = $d/(c+d)$; a. RA 组阳性例数; b. 非 RA 组阳性例数; c. RA 组阴性例数; d. 非 RA 组阴性例数

RA 患者外周血 TNF-α 浓度及单个核细胞 TIPE2 在 mRNA 的表达水平与 DAS28 评分的相关性。RA 活动期患者外周血 TNF-α 浓度与 DAS28 评分呈正相关 ($r^2 = 0.838, P < 0.01$), 详见图 1。单个核细胞 TIPE2 在 mRNA 表达水平与 DAS28 评分呈明显正相关 ($r^2 = 0.796, P < 0.01$), 详见图 2。

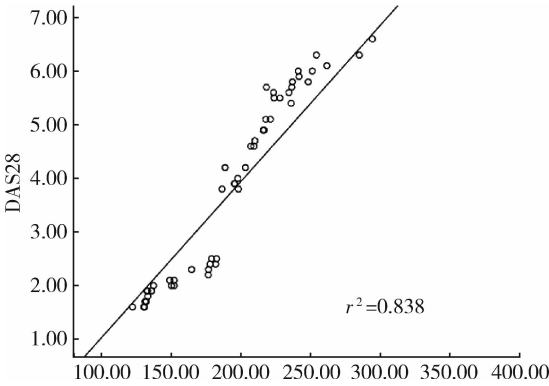


图 1 RA 活动期患者血清 TNF-α 浓度与 DAS28 评分的相关性分析

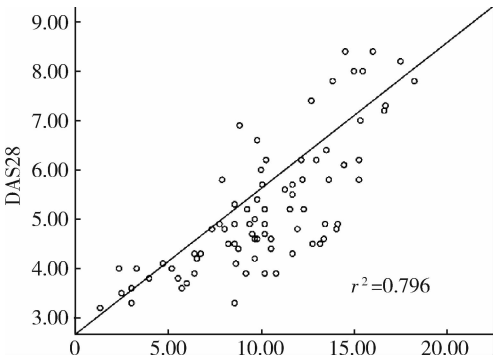


图 2 RA 患者外周血单个核细胞 TIPE2 在 mRNA 水平的表达与 DAS28 评分的相关性分析

RA 缓解组及活动组患者外周血 TIPE2 在 mRNA 水平表达的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值分别为 3.39 ± 0.98 和 9.46 ± 3.28 , 明显高于健康对照组, RA 活动组高于 RA 缓解组, 组间比较差异有统计学意义 ($F = 11.19, P = 0.00$), 详见图 3。

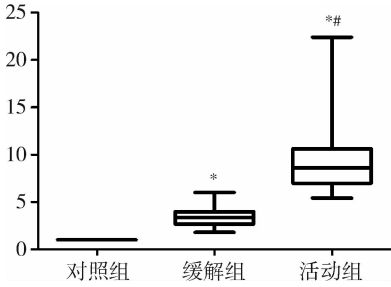


图 3 对照组、RA 缓解组及 RA 活动组外周血 TIPE2 在 mRNA 水平的表达
与对照组比较, * $P < 0.05$; 与缓解组比较, # $P < 0.05$

如图 4 所示, RA 活动期患者外周血中 TIPE2 和 TIPE2 在蛋白水平的表达高于缓解期, 缓解期高于对照组, 组间比较差异有统计学意义 ($F = 10.32, P = 0.00$)。

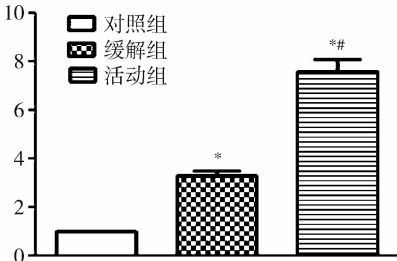
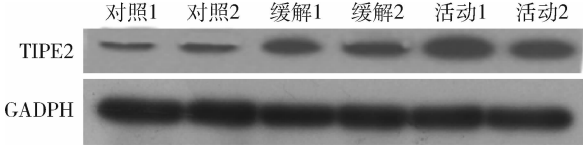


图 4 对照组、RA 缓解组及 RA 活动组外周血 TIPE2 在蛋白水平的表达
与对照组比较, * $P < 0.05$; 与缓解组比较, # $P < 0.05$

讨 论

RA 是一种自身免疫性疾病, 以关节炎症的多变性、关节破坏和进行性功能障碍为特点。细胞因子在 RA 的发病过程中具有重要作用, 是引起 RA 关节损伤和滑膜炎症的重要介质, 如 TNF-α、IL-1、IL-8 等^[5]。TNF-α 是重要的促炎性因子, 可以趋化并活化白细胞、激活内皮细胞和破骨细胞等, 促进炎症持

续发生、引起骨与软骨渐进性的破坏。TNF- α 在 RA 的局部滑膜炎、血管翳的生成和组织损伤中都发挥重要的作用^[6,7]。

研究发现,TNF- α 在血清中的浓度随患者病情严重程度的增加而升高,与病情程度呈正相关^[8]。本实验对健康对照、缓解期和活动期患者血清的 TNF- α 进行测定并比较发现,RA 活动组和缓解组患者血清 TNF- α 抗体均高于健康对照组,RA 活动组的血清 TNF- α 水平比 RA 缓解组明显升高,和其他研究者的结论是一致的,TNF- α 在 RA 患者血清中的浓度显著升高,且与 DAS28 呈明显正相关,可以用于 RA 病情监测。

TNF- α 诱导蛋白(tumor necrosis factor- α -induced protein, TNFAIP)是由 TNF- α 诱导产生的蛋白,参与多种生命过程,在自身免疫性疾病的发生、发展中发挥一定作用^[9]。TNFAIP 家族包括 TNFAIP1~9、TNFAIP8L2 即 TIPE2,可以调节免疫反应的稳定性。有研究者发现,TIPE2 具有抗动脉粥样硬化的作用^[10]。本实验发现,RA 患者外周血 TNF- α 及单个核细胞 TIPE2 表达水平与 DAS28 评分呈正相关,TIPE2 的定量 PCR 结果显示,RA 缓解组及 RA 活动组外周血 TIPE2 在 mRNA 水平的表达均明显高于健康对照组,RA 活动组明显高于 RA 缓解组,TNF- α 和 TIPE2 的表达可以作为判断 RA 活动度的指标,TNF- α 是 RA 治疗的一个靶点,临床上应用 TNF- α 抑制剂对 RA 患者进行治疗,取得良好效果,TIPE2 也有望成为 RA 治疗的靶点。

本实验统计了 RF、TNF- α 单独检测及联合检测的敏感度和特异性。86 例 RA 组患者的 RF 和 TNF- α 敏感度分别为 80.3% 和 77.9%,特异性分别为 72.5% 和 87.5%。TNF- α 和 RF 联合检测的敏感度和特异性分别为 75.6% 和 90.0%,特异性与单独检测 RF 相比,差异有统计学意义($P <$

0.05)。综上所述,本实验认为联合检测 RA 患者血清中的 RF 和 TNF- α 的表达水平,可以提高诊断的特异性,检测 TNF- α 的浓度和外周血单个核细胞的 TIPE2 在 mRNA 水平的表达对患者的治疗效果和病情的监测有重要临床价值。

参考文献

- Wei ST, Sun YH, Zong SH, *et al.* Serum levels of IL-6 and TNF- α may correlate with activity and severity of rheumatoid arthritis[J]. *Med Sci Monit*, 2015, 24(21): 4030-4038
- Wang Y, Jiang Y, Zhou J, *et al.* Hepatitis C virus promotes hepatocellular carcinogenesis by targeting TIPE2, a new regulator of DNA damage response[J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(11): 15265-15274
- Wang Y, Chen J, Luo X, *et al.* Ginsenoside metabolite compound K exerts joint-protective effect by interfering with synovocyte function mediated by TNF- α and Tumor necrosis factor receptor type 2[J]. *Eur J Pharmacol*, 2015, 771: 48-55
- Villeneuve E, Nam J, Emery P. 2010 ACR-EULAR classification criteria for rheumatoid arthritis[J]. *Rev Bras Reumatol*, 2010, 50(1): 481-483
- Ursini F, Leporini C, Bene F, *et al.* Anti-TNF- α agents and endothelial function in rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 5346
- Lee SA, Yang HW, Um JY, *et al.* Vitamin D attenuates myofibroblast differentiation and extracellular matrix accumulation in nasal polyp-derived fibroblasts through smad2/3 signaling pathway[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 7299
- Okumura N, Hashimoto K, Kitahara M, *et al.* Activation of TGF- β signaling induces cell death via the unfolded protein response in Fuchs endothelial corneal dystrophy[J]. *Sci Rep*, 2017, (1): 6801
- Fan YC, Zhang YY, Wang N, *et al.* Tumor necrosis factor- α -induced protein 8-like 2 (TIPE2) is associated with immune phases of patients with chronic hepatitis B[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(19): 30781-30792
- Sun X, Chen L, Yan W. TIPE2 inhibits the expression of asthma-related inflammatory factors in hyperstretched bronchial epithelial cells through the Wnt/ β -Catenin pathway[J]. *Inflammation*, 2017, 40(3): 770-777
- 王娟, 崔景晶, 李小梅, 等. 冠心病相关炎症因子与冠心病患者 TIPE2 mRNA 水平的关系[J]. *实用医学杂志*, 2015, 31(12): 1980-1982 (收稿日期: 2017-07-27) (修回日期: 2017-10-12)

(上接第 54 页)

- Hsieh C, Chang A, Brandt D, *et al.* Predicting outcomes of lupus nephritis with tubulointerstitial inflammation and scarring[J]. *Arthritis Care Res*; Hoboken, 2011, 63(6): 865-874
- 杜云霞, 张玮, 李宏博, 等. S31-201 在狼疮鼠肾小管间质病变中的作用[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2016, 32(12): 1357-1360
- 任丽, 蒋素华, 刘红, 等. 肌酐水平、MDRD-GFR、CG-GFR 与肾小管间质病变相关性研究[J]. *检验医学与临床*, 2010, 07(22): 2436-2438
- Schaub S, Wilkins JA, Antonovici M, *et al.* Proteomic-based identification of cleaved urinary beta2-microglobulin as a potential mark-

er for acute tubular injury in renal allografts[J]. *Am J Transplant*, 2005, 5(41): 729-738

- 杨帆, 黄黎英, 周全荣, 等. 肾小管间质病变与狼疮性肾炎临床和病理的相关性研究[J]. *浙江医学*, 2008, 30(11): 1180-1182
- 陈德君, 厉春萍. 血清补体及抗 ds-DNA 水平与狼疮病理分型及活动性的相关性分析[J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2012, 13(10): 910-911
- 闭闯, 李家燕. 肾脏病理学参数对狼疮性肾炎治疗指导意义的探讨[J]. *广西医学*, 2003, 25(9): 1597-1598 (收稿日期: 2017-10-14) (修回日期: 2017-11-15)