

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.14.004

人附睾蛋白 4 在类风湿关节炎滑膜细胞中的作用及机制*

洪宏海, 王 征, 林丽英

(广州医科大学附属第三医院检验科, 广州 510000)

摘要:目的 探讨人附睾蛋白 4(HE4)在类风湿关节炎滑膜细胞中作用及机制。方法 选择 2015 年 6 月至 2017 年 6 月在该院治疗的类风湿关节炎患者和骨关节置换手术患者共 34 例。采用实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)、免疫印迹试验(Western blot)和酶联免疫吸附试验(ELISA)检测类风湿关节炎患者滑膜细胞和血清中 HE4 水平。结果 类风湿关节炎患者滑膜细胞 HE4 转录水平(2.27 ± 0.26)明显高于骨关节置换手术患者滑膜细胞 HE4 转录水平(1.28 ± 0.14),且类风湿关节炎患者血清中 HE4 水平[(101.11 ± 24.05) pmol/L]也明显高于与骨关节置换手术患者血清中 HE4 水平[(61.53 ± 14.04) pmol/L],差异均有统计学意义($P < 0.05$);受试者工作特征曲线(ROC 曲线)分析显示,HE4 诊断类风湿关节炎的曲线下面积为 0.883,灵敏度和特异度分别为 80.0%和 83.3%。Pearson 相关分析显示,血清 HE4 与血清类风湿因子(RF)和抗环瓜氨酸抗体(ACPA)呈正相关($r = 0.762, 0.533$)。干扰 HE4 后明显抑制类风湿关节炎滑膜细胞 MH7A 生长,且下调增殖细胞核抗原(PCNA)和上调 p21 表达水平。结论 类风湿关节炎患者滑膜细胞 HE4 水平上调,通过调控 PCNA 和 p21 表达进而促进类风湿关节炎滑膜细胞增殖。

关键词: 类风湿关节炎; 人附睾蛋白 4; 增殖细胞核抗原; 滑膜细胞

中图分类号: R446

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2018)14-2039-04

Mechanism of human epididymis protein 4 in the proliferation of synovial cells in rheumatoid arthritis*

HONG Honghai, WANG Zheng, LIN Liying

(Department of Clinical Laboratory, Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510000, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect and mechanism of human epididymal protein 4(HE4) on the synovial cells in rheumatoid arthritis. **Methods** Totally 34 patients with rheumatoid arthritis and bone and joint replacement were selected as subjects. Real time fluorescence quantitative PCR(qRT-PCR), Western blot and ELISA were used to detect the expression of HE4 in synovium and serum of patients with rheumatoid arthritis. The effect and molecular mechanism of human epididymal protein 4 on the proliferation of synoviocytes were investigated using small interfering RNA interfered with HE4. **Results** The level of HE4 in synovium of patients with rheumatoid arthritis(2.27 ± 0.26) was significantly higher than that of patients with bone and joint replacement surgery (1.26 ± 0.14) ($P < 0.05$). And the serum HE4 level of rheumatoid arthritis patients [(101.11 ± 24.05) pmol/L] was significantly higher than that of patients with bone and joint replacement surgery [(61.53 ± 14.04) pmol/L] ($P < 0.05$). ROC curve showed that AUC of HE4 in diagnosing rheumatoid arthritis was 0.883, the sensitivity and specificity was 80.0% and 83.3%. Pearson correlation analysis showed that HE4 was positively correlated with rheumatoid factors(RF) and anti-cyclic citrullinated peptide antibody (ACPA) ($r = 0.762, 0.533$). HE4 interference inhibited MH7A cells growth, and obviously down regulated proliferating cell nuclear antigen(PCNA) and up regulated p21 expression level. **Conclusion** The level of HE4 in synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis is up regulated, and promotes the proliferation of synovial cells by regulating PCNA and p21 expression.

Key words: rheumatoid arthritis; human epididymal protein 4; proliferating cell nuclear antigen; synovial cells

类风湿关节炎是一种自身免疫性疾病,其病理特征为炎症反应、炎症因子分泌增多及滑膜细胞异常增殖,其临床表现为长期的慢性炎症浸润、关节疼痛、关节肿大和畸形,且女性发病率约为 1.16%,男性约为

* 基金项目:广州医科大学博士启动基金项目(2015C24);广州市卫生和计划生育委员会一般引导项目(20171A011312)。

作者简介:洪宏海,男,技师,主要从事医学检验方面的研究。

0.44%^[1]。该病的发病机制目前尚不清楚。目前认为炎症反应过度激活和滑膜细胞异常增殖是类风湿关节炎最重要的致病机制^[2]。肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、脂多糖(LPS)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)等促炎因子刺激关节纤维样滑膜细胞后激活 NF- κ B 信号通路,诱导 IL-6、IL-8、IL-1 β 和金属蛋白酶(MMPs)表达,最终导致关节炎症和骨关节破坏^[3-5]。人附睾蛋白 4(HE4)普遍存在于正常女性生殖道、乳腺、附睾、呼吸道上皮细胞、肾小管等部位^[6-7]。HE4 基因位于 20 号染色体,长度约为 12 kb,由 5 个外显子和 4 个内含子组成^[8]。HE4 有着广泛的生物学功能,其与精子成熟、天然免疫和肿瘤增殖有关^[9]。最近研究发现,HE4 在调控增殖细胞核抗原(PCNA)和 p21 基因中发挥着重要作用,可促进卵巢癌和胰腺癌增殖^[10-11]。但 HE4 在类风湿关节炎患者中表达及其是否调控类风湿滑膜细胞增殖尚未清楚。本研究旨在探讨 HE4 在类风湿关节炎患者滑膜细胞中表达及其诊断价值,以及 HE4 在滑膜细胞中调控 PCNA 和 p21 的分子机制。现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选择 2015 年 6 月至 2017 年 6 月在本院治疗的类风湿关节炎患者(SiHE4 组)和骨关节置换患者(对照组)共 34 例。SiHE4 组 22 例,其中男 7 例,女 15 例;平均年龄(69.2 \pm 4.2)岁,平均病程(8.5 \pm 3.4)月;类风湿因子(RF)阳性 18 例,其水平为(141.6 \pm 61.4)IU/mL;IgG RF 阳性 18 例(81.8%),IgM RF 阳性 6 例(27.3%),IgA RF 阳性 4 例(18.2%);抗环瓜氨酸抗体(ACPA)阳性 13 例(59.1%),其水平为(135.8 \pm 78.6)U/mL。对照组 12 例,其中男 5 例,女 7 例;平均年龄(67.5 \pm 5.4)岁;RF 水平(4.4 \pm 2.2)IU/mL;IgA RF 阳性 1 例(8.3%);ACPA 水平为(4.5 \pm 1.9)U/mL。两组研究对象年龄、性别构成、病程比较,差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。所有患者资料和标本收集都严格按照广州医科大学附属第三医院伦理委员会相关规定执行。

1.2 仪器与试剂

酶联免疫吸附试验(ELISA)检测

HE4 试剂盒购自北京普利莱公司。实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)的双链嵌合荧光染色试剂和逆转录酶试剂盒购自 Takara 公司。RNA 提取试剂盒购自康为世纪公司。HE4 小分子干扰片段购自锐博公司。转染试剂 Lipo2000 购自 Invitrogen 公司。细胞培养液购 Hyclone 公司。细胞培养皿购自康宁公司。PCNA、p21、 β -actin 抗体购自 CST 公司,HE4 抗体购自 Abcam 公司。

1.3 方法

1.3.1 检测滑膜成纤维细胞增殖能力

采用噻唑兰颜色反应法(MTT 法)行细胞增殖活力的测定。其原理为活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使外源性 MTT 还原为水不溶性的蓝紫色晶体——甲瓩,并沉淀在细胞中,而死细胞无此功能。类风湿关节炎成纤维细胞 MH7A 处理至相应时间点后,每孔避光加入 100 μ L 的 MTT 工作液(浓度为 5 mg/mL),继续培养 4 h;吸除上清后每孔加入 1 mL 二甲基亚砷,用脱色平板摇床摇匀,使甲瓩完全溶解,用酶标仪测定光密度(OD)570 的值。试验中每份样品设 4 个复孔,至少重复测量 3 次。

1.3.2 检测 HE4、PCNA 和 p21 水平

采用 qRT-PCR 检测 HE4、PCNA 和 p21 相对表达水平。收集处理好滑膜细胞或是 MH7A 细胞 RNA,逆转录为 cDNA,用 Takara 公司的 SYBR green 试剂盒进行 qRT-PCR。qRT-PCR 条件:95 $^{\circ}$ C, 30 s, 1 个循环;95 $^{\circ}$ C、5 s, 60 $^{\circ}$ C、15 s, 45 个循环;溶解,95 $^{\circ}$ C、0 s, 65 $^{\circ}$ C、20 s, 95 $^{\circ}$ C、0 s, 1 个循环。qRT-PCR 结束后,根据反应得到的 Cp 值,使用相对定量的分析方法,以标准曲线进行校正,最后计算出样品中各 mRNA 的相对浓度。qRT-PCR 引物序列见表 1。

1.3.3 HE4 干扰试验

HE4 干扰试验具体方法如下:MH7A 细胞种植于 6 孔板中,待其融合度为 50%~60%时,用 Lipo2000 转染试剂转染 HE4 干扰小分子片段,36 h 后收集细胞 RNA 和蛋白,检测 HE4、PCNA 和 p21 转录和蛋白水平。干扰 HE4 小分子序列见表 2。

表 1 qRT-PCR 引物

NCBI ID	基因	引物	引物序列	产物大小(bp)
NM_002592.2	PCNA	上游	5'-GCT CTT CCC TTA CGC AAG TCT-3'	85
		下游	5'-AGT CTA GCT GGT TTC GGC TT-3'	
NM_000389.4	p21	上游	5'-TGC CGA AGT CAG TTC CTT GT-3'	86
		下游	5'-GTT CTG ACA TGG CGC CTC C-3'	
NM_002046.5	GAPDH	上游	5'-ACC ATC TTC CAG GAG CGA GA-3'	71
		下游	5'-GAC TCC ACG ACG TAC TCA GC-3'	
NM_000389.4	HE4	上游	5'-TAG CAC CAT GCC TGC TTG TC-3'	94
		下游	5'-TCC TGT GCC TGA GAC TAG GG-3'	

表 2 HE4 干扰序列

基因	干扰片段	引物	引物序列
HE4	Si-1	上游	5'-CCG GGG ACA GCG AAT GCG CCG ACA ACT CGA GTT GTC GGC GCA TTC GCT GTC CTT TTT G-3'
		下游	5'-AAT TCA AAA AGG ACA GCG AAT GCG CCG ACA ACT CGA GTT GTC GGC GCA TTC GCT GTC C-3'
	Si-2	上游	5'-CCG GCC GCA ATG GCT GTG GGA AGG TCT CGA GAC CTT CCC ACA GCC ATT GCG GTT TTT G-3'
		下游	5'-AAT TCA AAA ACC GCA ATG GCT GTG GGA AGG TCT CGA GAC CTT CCC ACA GCC ATT GCG G-3'

1.3.4 免疫印迹试验(Western blot) 采用 Western blot 检测 PCNA 和 p21 蛋白水平,具体方法如下:收集处理好的 MH7A 细胞蛋白,进行蛋白定量,跑胶。加入 PCNA 和 p21 一抗,4 °C 过夜,收集一抗,加入二抗,然后加入化学发光显色液显色,拍照。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行统计学处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验。采用受试者工作特征曲线(ROC)分析 HE4 对类风湿关节炎诊断价值。采用 Pearson 相关分析对两指标间的相关性进行分析。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 干扰 HE4 后 MH7A 关节滑膜细胞增殖情况 MTT 试验显示,关节滑膜细胞 MH7A 干扰 HE4 后,在 24、48、72 h 都明显抑制 MH7A 生长,见表 3。

表 3 干扰 HE4 后 MH7A 在关节滑膜细胞的水平

组别	n	时间(h)	MH7A($\bar{x} \pm s$)
对照组	12	24	1.10 ± 0.10
SiHE4 组	22		0.70 ± 0.10
P			<0.01
对照组	12	48	1.33 ± 0.16
SiHE4 组	22		1.00 ± 0.10
P			<0.05
对照组	12	72	1.95 ± 0.09
SiHE4 组	22		1.35 ± 0.05
P			<0.001

2.2 HE4 调控 MH7A 细胞增殖的分子机制 qRT-PCR 结果显示,PCNA 转录水平明显下调,而 p21 转录水平则升高,见表 4,表明 PCNA 和 p21 参与 HE4 调控类风湿关节炎增殖作用。与此类似,Western blot 结果也表明,干扰 HE4 后,PCNA 蛋白水平下调,p21 蛋白水平明显上调,表明 HE4 可能通过调控 PCNA 和 p21 水平进而调控类风湿关节炎滑膜细胞增殖,见图 1。

表 4 干扰 HE4 后关节滑膜细胞中 PCNA 和 p21 转录水平($\bar{x} \pm s$)

组别	n	PCNA 转录水平	p21 转录水平
对照组	12	1.10 ± 0.10	1.27 ± 0.25
SiHE4 组	22	0.66 ± 0.08	1.90 ± 0.10
P		<0.01	<0.05

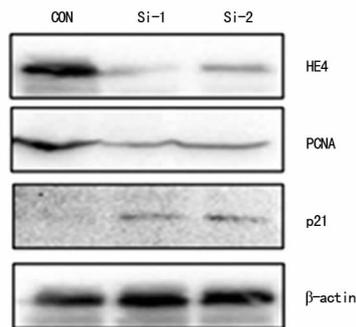


图 1 干扰 HE4 后 PCNA 和 p21 蛋白水平

2.3 滑膜细胞和血清中 HE4 水平检测 qRT-PCR 结果显示, SiHE4 组患者滑膜中 HE4 水平(2.27 ± 0.26)明显高于对照组(1.28 ± 0.14),差异有统计学意义($P < 0.001$)。此外,Western blot 结果显示 SiHE4 患者滑膜细胞 HE4 蛋白水平明显高于对照组患者,见图 2。另外,也收集患者的血清,检测血清中 HE4 水平。与滑膜细胞结果相似,ELISA 检测结果显示 SiHE4 组患者血清中 HE4 水平[(101.11 ± 24.05) pmol/L]明显高于对照组患者[(61.53 ± 14.04) pmol/L],差异有统计学意义($P < 0.05$)。

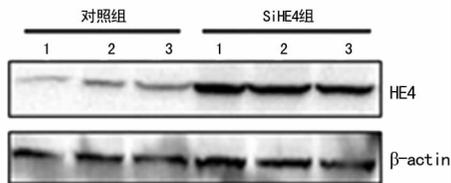


图 2 两组患者滑膜细胞中 HE4 蛋白水平

2.4 血清中 HE4 水平对类风湿关节炎诊断价值 ROC 曲线分析结果显示,曲线下面积(AUC)为 0.883,表明血清 HE4 对类风湿关节炎诊断具有较高的价值。同时 ROC 曲线分析表明血清 HE4 对类风湿关节炎诊断的灵敏度和特异度分别为 80.0% 和 83.3%;95%CI 为 0.762~1.004。同时,Pearson 相关分析显示,血清 HE4 与类风湿关节炎患者血清 RF 和 ACPA 水平呈正相关,相关系数分别为 0.762 和 0.533($P < 0.05$)。

3 讨 论

类风湿关节炎是一种自身免疫性疾病,其基本病理特征为炎症反应和滑膜细胞异常增殖。有研究显示,在人附睾远端上皮细胞发现并成功克隆 HE4,其与精子成熟和天然免疫有关^[8]。随后发现其具有促

进肿瘤细胞增殖作用,并且可作为卵巢癌诊断的标志物^[10-11]。与 HE4 促进肿瘤细胞增殖作用类似,研究发现 HE4 在类风湿关节炎滑膜增殖中起着关键作用^[9]。目前,在类风湿关节炎患者中,针对炎性因子 IL-1 β 和 IL-6 的治疗取得一定的效果,但是,在一部分患者中效果较差,表明在类风湿关节炎发病机制中,除了炎性反应外,还存在其他致病因素^[4]。最近研究发现,关节炎滑膜细胞异常增殖导致关节肿大和畸形,是类风湿关节炎治疗效果较差的关键因素^[8]。PCNA 是细胞有丝分裂的关键调控蛋白,其可与细胞周期蛋白相互作用调控 DNA 合成,进而调控细胞周期和细胞增殖^[12]。p21 是细胞周期的负性调控蛋白,具有抑制细胞周期蛋白激酶活性,诱导细胞凋亡作用^[13-14]。本研究结果显示,干扰 HE4 后,PCNA 水平下调,p21 水平上调,表明 HE4 可能调控 PCNA 和 p21 蛋白进而调控类风湿关节炎滑膜细胞增殖作用,且 ROC 曲线分析其对类风湿关节炎诊断具有一定价值,灵敏度和特异度分别为 80.0% 和 83.3%;进一步研究其与类风湿关节炎 RF 和 ACPA 水平呈正相关。但是,HE4 调控 PCNA 和 p21 蛋白的具体分子机制及是否具有抑制类风湿关节炎炎性反应还值得进一步研究。

综上所述,HE4 在类风湿关节炎患者滑膜细胞和血清中表达上调,且与类风湿关节炎 RF 和 ACPA 水平密切相关。ROC 曲线分析表明血清 HE4 对类风湿关节炎诊断具有良好价值。此外,HE4 通过调控 PCNA 和 p21 蛋白从而调控滑膜细胞增殖作用,这些结果提示 HE4 可能成为类风湿关节炎治疗新的靶点,具有一定的临床意义。

参考文献

- [1] CHARLES J, BRITT H, PAN Y. Rheumatoid arthritis [J]. Aust Fam Physician, 2013, 42(11): 765.
- [2] ALGHASHAM A, RASHEED Z. Therapeutic targets for rheumatoid arthritis: Progress and promises [J]. Autoimmunity, 2014, 47(2): 77-94.
- [3] 席向红, 苏荣, 贾韶彤, 等. 精浆中人附睾蛋白 4 与男性不

育症的相关性 [J]. 山东大学学报(医学版), 2016, 54(5): 66-69.

- [4] 章淦, 王飞, 冯阳春, 等. 血清 CA125 和人附睾蛋白 4 联合检测在维吾尔族女性卵巢癌中诊断的研究 [J]. 检验医学与临床, 2016, 13(4): 503-505.
- [5] CALMON-HAMATY F, AUDE R, COMBE B, et al. Targeting the Fas/FasL system in Rheumatoid Arthritis therapy: Promising or risky? [J] Cytokine, 2015, 75(2): 228-233.
- [6] 张剑, 董灵敏, 吴婧, 等. 血清人附睾蛋白 4 在肺癌诊断中的临床应用探讨 [J]. 中华全科医学, 2016, 14(8): 1302-1304.
- [7] JIANG S W, CHEN H, DOWDY S, et al. HE4 transcription- and splice variants-specific expression in endometrial cancer and correlation with patient survival [J]. Int J Mol Sci, 2013, 14(11): 22655-22677.
- [8] 李轲, 谢付静, 李军. 血清人附睾蛋白 4 联合糖类抗原 125 检测对浆液性卵巢癌的诊断价值 [J]. 山东医药, 2016, 56(9): 79-80.
- [9] 杨晓霞, 柏明, 刘丽敏, 等. 慢性肾脏病患者血清人附睾蛋白 4 与疾病进展的关系 [J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2016, 25(2): 128-133.
- [10] LI J, CHEN H, MARIANI A, et al. HE4(WFDC2) Promotes Tumor Growth in Endometrial Cancer Cell Lines [J]. Int J Mol Sci, 2013, 14(3): 6026-6043.
- [11] LU Q, CHEN H, SENKOWSKI C, et al. Recombinant HE4 protein promotes proliferation of pancreatic and endometrial cancer cell lines [J]. Oncol Rep, 2016, 35(1): 163-170.
- [12] 李安平, 刘洪梅, 李婵, 等. 血清 ProGRP 和 HE4 在慢性肾脏病患者中的临床意义 [J]. 标记免疫分析与临床, 2017, 24(10): 1123-1125.
- [13] 马潇潇, 任瑞锋, 张建杰, 等. 慢性肾脏疾病患者人附睾蛋白 4 水平变化 [J]. 河北医药, 2015, 37(7): 1019-1021.
- [14] Bottini N, Firestein G S. Duality of fibroblast-like synovocytes in RA: passive responders and imprinted aggressors [J]. Nat Rev Rheumatol, 2013, 9(1): 24-33.

(收稿日期: 2017-11-21 修回日期: 2018-01-29)

(上接第 2038 页)

- [12] 周晶晶, 汪国生, 李向培, 等. 系统性红斑狼疮患者外周血干扰素 α 、白介素 6 和肿瘤坏死因子 α 水平 [J]. 中华临床免疫和变态反应杂志, 2013, 7(2): 109-114.
- [13] MAHAPARN P, UAPRASERT N, ROJNUCKARIN P. Risk Factors for Thrombosis in Systemic Lupus Erythematosus(SLE) [J]. Thromb Res, 2014, 133(3): S58-S59.

- [14] 王坤, 贾兴旺, 颜光涛. 红细胞分布宽度和 D-二聚体联合评估系统性红斑狼疮病情活动程度 [J]. 标记免疫分析与临床, 2017, 24(2): 130-132.

- [15] 李春, 穆荣, 任立敏, 等. D-二聚体水平在系统性红斑狼疮的临床意义 [J]. 中华内科杂志, 2010, 49(12): 1039-1042.

(收稿日期: 2017-11-06 修回日期: 2018-02-23)