

· 临床论著 ·

运用液体芯片 - 飞行时间质谱技术建立类风湿关节炎及湿热瘀阻证血清多肽质谱分类模型

王新贤 殷海波 姜 泉 焦 娟

摘要 目的 建立风湿性关节炎(RA)及其RA湿热瘀阻证的血清多肽质谱分类模型,为RA的临床诊断提供依据。**方法** 60例RA患者根据证型分为湿热瘀阻证(30例)及非湿热瘀阻证(30例),30名健康体检者为健康对照组。分别以RA患者与健康对照组相比较、RA湿热瘀阻证患者与非湿热瘀阻证患者相比较,收集患者血清标本,以磁珠法分离血清多肽后,进行基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱进行分析。通过ClinProt Tools软件进行差异分析,建立诊断模型。**结果** RA血清多肽分类模型通过GA-5算法所建立分类模型为最优分类模型,由m/z分别为2 601.05、4 967.60、6 639.43、1 866.29、8 144.63的五个多肽组成,该模型识别率为94.74%,交叉验证率为81.96%,盲法验证准确率为97.50%。RA湿热瘀阻证血清分类模型由GA-7算法所建立分类模型为最优分类模型,由m/z分别为5 740.43、4 251.35、2 863.03、1 607.22、4 531.50的五个多肽组成,该模型识别率为97.50%,交叉验证率为80.05%,盲法验证准确率为90.00%。**结论** 本研究所建立的诊断指纹图谱模型对于RA及湿热瘀阻证的临床诊治具有一定的参考价值。

关键词 类风湿关节炎; 湿热瘀阻证; 磁珠; 质谱; 多肽; 蛋白质组学

Serum Peptidome Pattern Model for Rheumatoid Arthritis and Dampness-heat Stagnation Syndrome Based on Liquid Chip MALDI-TOF MS WANG Xin-xian, YIN Hai-bo, JIANG Quan, and JIAO Juan *Department of Rheumatology, Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing (100053)*

ABSTRACT Objective To establish the model of rheumatoid arthritis (RA) and dampness-heat stagnation syndrome (DHSS) serum peptidome pattern, thus supplying evidence for diagnosing RA. **Method** Totally 60 RA patients were assigned to DHSS(30 cases) and non-DHSS(30 cases). And 30 healthy volunteers were recruited as control group. Serum peptidome pattern model of RA with RA cases and control group, and with DHSS cases and non-DHSS cases was separately established. Magnetic beads enrichment technology was used to separate serum sample peptide. After targeting and drying, the serum sample peptides were detected by MALDI-TOF/TOF-MS. The mass spectrometric data was analyzed to make disease classification model by ClinPro Tools software. **Results** The model of RA serum peptidome pattern by GA-5 algorithm was considered to be the optimal, composed of 5 peptide with m/z 2 601.05, 4 967.60, 6 639.43, 1 866.29, 8 144.63. The recognition rate of this model was 94.74%, and its cross validation rate was 81.96%. After verification it had a accuracy rate of 97.50%. The DHSS model of RA by GA-7 algorithm was considered to be the optimal, composed of 5 peptide with m/z 5 740.43, 4 251.35, 2 863.03, 1 607.22, 4 531.50. The recognition rate of this model was 97.50%, its cross validation rate was 80.05%. After verification it had a accuracy rate of 90.00%. **Conclusion** The serum peptidome pattern models established lay a foundation for the further study of RA and DHSS.

基金项目: 国家自然科学基金青年项目(No. 81403364)

作者单位: 中国中医科学院广安门医院风湿病科(北京 100053)

通讯作者: 焦 娟, Tel: 010-88001132, E-mail: xianzhe1210@126.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20190224.080

KEYWORDS rheumatoid arthritis; dampness-heat stagnation syndrome; magnetic beads; mass spectrum; polypeptide; proteomics

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一类以关节炎为主要临床表现的系统性自身免疫病,主要累及外周关节的滑膜,主要表现为关节的肿胀、疼痛,长期发展可因骨质的破坏而导致关节变形^[1]。RA 可见于任何年龄,男女罹患本病的比例约为 3:1,全世界患病人数约占总人口的 1.0%^[2]。而我国的患病率约为 0.32%~0.36%^[3]。RA 是一种异质性疾病,其临床表现多种多样、个体差异明显。RA 的发病机制可能与环境、遗传、感染、性激素等因素密切相关,从基因层面讲,研究表明影响 RA 的易感基因已超过了 30 个,其中人类白细胞抗原(human leukocyte antigen DR, HLA-DR)是最重要的易感基因,其他如蛋白酪氨酸磷酸酶非受体型 22、肽酰基精氨酸脱亚胺酶 4^[4,5]等也与 RA 密切相关。在易感基因的基础上、在病毒感染、吸烟、有机溶剂等^[6]触发因素的影响下促分裂素原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)、c-jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)等一系列信号通路被激活,导致了大量异常细胞因子的释放,引起 T、B 淋巴细胞的免疫异常。研究 RA 的发病机制、寻找对于诊治 RA 特异的生物学标志物具有重要意义。

多肽是蛋白质的水解中间产物,其由 α -氨基酸以肽链连接而成,通常由 10~100 个氨基酸分子脱水缩合形成,是蛋白质发挥作用的活性基团,是人体代谢调控活动的重要物质^[7]。传统的多肽测定方法是通过将多肽水解,采用柱前或柱后衍生的氨基酸分析方法测定水解后形成的各种氨基酸及其含量,以此来确定其组成成分。质谱技术的出现为多肽的检测提供了新的手段,质谱检测得出的数据可形成多肽质量谱图,称为指纹图谱,近年来指纹图谱被广泛用于筛选疾病诊断、疗效预测和预后相关依据。

湿热瘀阻证作为 RA 活动期的主要证候,病情重、骨侵蚀明显。临床准确的辨证是中医治疗效的保证,对于证候规范化、客观化的研究一直是中医学与现代医学结合的必经之路。本研究采用液体芯片-飞行时间质谱技术,即 ClinProt 液体蛋白芯片结合基质辅助激光解吸电离飞行质谱(matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS),分别以 RA 患者与健康对照组相比较、RA 湿热瘀阻证患者与非湿热瘀阻证患者相比较,建立 RA 及其 RA 湿热瘀阻证的血清多

肽质谱分类模型,为 RA 的临床诊断提供依据。

资料与方法

1 诊断标准 西医标准符合 1987 年美国风湿病学会(ACR)修订的 RA 分类标准和(或)符合 2010 年 ACR 和欧洲抗风湿病联盟(EULAR)修订的 RA 分类标准^[8-10],中医标准参照《中药新药临床研究指导原则》^[11],符合中医辨证为湿热瘀阻证者和辨证为其他证候,如寒湿痹阻、痰瘀痹阻、气血两虚及肝肾亏虚证者。

2 纳入标准 (1)符合诊断标准;(2)年龄 18~65 岁。(3)所有患者及健康对照者均签署知情同意书。

3 排除标准 (1)合并严重肝肾疾病、心脑血管、呼吸系统或患有精神疾病或患有糖尿病且血糖控制不佳者;(2)合并血液病、肿瘤以及除 RA 外的其他自身免疫性疾病等。

4 一般资料 RA 患者 60 例来源于 2015 年 4 月—2016 年 8 月于广安门医院风湿病科门诊及病房,其中湿热瘀阻证组 30 例、非湿热瘀阻证组 30 例;健康对照组 30 名收集于 2015 年 4 月—2016 年 8 月广安门医院健康体检中心。每组中随机选取 20 例作为试验组,10 例患者为盲样验证组。湿热瘀阻证平均年龄(50.2±10.4)岁,非湿热瘀阻证组平均年龄(50.8±10.5)岁,健康志愿者组平均年龄(51.7±10.4)岁,各组间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。试验通过中国中医科学院广安门医院伦理委员会审核(No. 2015EC001)。

5 仪器与试剂 分离血清多肽采用北京毅新博创生物科技有限公司的蛋白、多肽提取试剂盒,血清样本质谱检测采用德国 Bruker 公司的 MALDI-TOF-MS(Ultraflex)质谱仪,进行质谱检测的血清样本预处理选用德国 Bruker 公司 α -氰基-4-羟基肉桂酸。

6 标本制备 采集所有研究对象外周静脉血 2 mL,于清晨空腹采集,以 4℃ 2 500 r/min,离心 10 min,取上清分装于 Eppendorf 管,标记后,放置于 -80℃ 冰箱保存。

7 磁珠法提取多肽 将磁珠试剂盒从 4℃ 冰箱中取出,手动摇匀,使磁珠相互之间混合均匀。将血清样品于冰上缓慢解冻后,取 200 μ L 八连排样品管放置于孔板之上,依次加入 10 μ L 样本 +95 μ L 磁珠结

合缓冲液 (CB) + 10 μL 磁珠,并用排枪上下轻轻吸打使之混合均匀,在此过程中要尽量避免气泡的产生,在室温下静止 5 min。将样品管在磁珠分离器上压紧,静置 1 min,磁珠在磁场作用下贴在靠近磁铁侧的 Eppendorf 管管壁上,与液体相分离,直至液体澄清。用移液器紧贴磁珠对侧样品管管壁,将澄清的液体吸取干净,注意要避免将磁珠吸走。将样品管放入孔板之上,加入 100 μL 磁珠清洗液缓冲液,用排枪上下吸打混合均匀,避免气泡的产生,静置 2 min 后,将样品管在磁珠分离器上再次静置 1 min,用移液器紧贴磁珠对侧样品管管壁吸去上清液。重复 1 次,保证上清液完全被吸走。将样品管放置于孔板之上,加入 10 μL 磁珠洗脱液反复吸打 10 次以上,静置 5 min,以使磁珠和洗脱液混悬均匀,吸打过程要严格避免产生气泡。将样品管放置于磁珠分离器上,静置 1 min,从而使磁珠与悬浮液充分分离,待磁珠完全贴壁后,将上清液移出到已标记的 0.2 mL 的样品管中。所得到的液体可以用来直接进行质谱分析,或冻存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中,在 24 h 之内进行质谱分析。

8 点靶 清洗 AnchorChip 600/384 不锈钢靶板后晾干,取 0.1% 的三氟乙酸 (TFA) 与 50% 的乙腈于 Eppendorf 管内混合,轻轻震荡,使之充分混合均匀,离心后可即得到饱和的 α -氰基-4-羟基肉桂酸,取 1 μL 提取的血清多肽样本与 1 μL 配制的基质溶液于 Eppendorf 管内混合,轻轻吹打使之混合均匀后,按标注顺序点于靶板之上,在室温下自然干燥,于 24 h 之内进行质谱检测。

9 质谱检测 将完成加样并编号的 MPT-AnchorChip 靶板放入质谱仪 (基质辅助激光解吸串联飞行时间质谱 Bruker Ultraflex III MALDI-TOF/TOF-MS)。具体参数设定如下:采用 Smart-beam 激光器,重复率设定 200 Hz,采用线性、正离子模式进行扫描;离子源电压设定为 25 和 23.50 kV;透镜电压设定 6.5 kV;离子延迟提取时间设定 100 ns;激光能量 43%;扫描范围设定 800 ~ 10 000 Da。

10 生物统计学方法 通过 MALDI-TOF-MS 多肽检测后得到的质谱数据,以 Clinprotocols 3.0 软件 (CPT3.0) 进行数据分析。CPT 软件中内置数学模型 (遗传算法 genetic algorithm, GA、监督神经网络算法 supervised neural network, SNN、快速分类算法 quick classifier, QC),可用于分析质谱数据,筛选差异肽段,建立多肽分类模型。对运算的每一个模型进行交叉验证,验证数据比例和循环数设置为 20 和 10。CPT 软件用交叉验证率及识别率评估所建模型的准

确性。通常以交叉验证率和识别率最高的模型作为最优分类模型。对所建立的最优分类模型进行盲法验证,判断其准确率,该验证需由独立实验人员完成,且实验人员不了解患者的数据资料。以 MALDI-TOF-MS 质谱分析所验证患者血清产生的质谱数据,通过 CPT 软件调入所选择分类模型,经运算产生分类数据。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 RA 诊断血清多肽谱分类模型的建立 (图 1, 表 1、2) 健康对照组 20 名及 RA 40 例患者入组,将 MALDI-TOF-MS 所生成数据调入 CPT 软件,其中 class 1 为健康对照组 (红色)、class 2 为 RA 患者 (绿色)。分别以 GA (number of neighbors 3、5、7)、SNN、QC 算法进行运算,得出血清多肽指纹图谱。

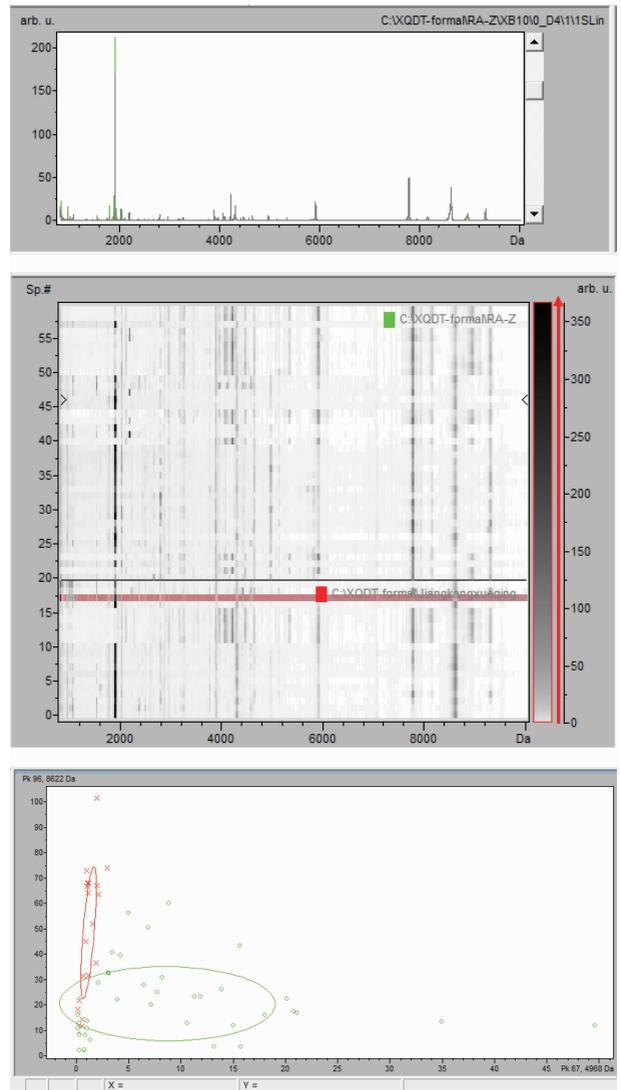


图 1 RA 模型 Clinprotocols 软件分析界面

表 1 RA 模型 CPT 统计学软件建立分类模型结果

| 算法 | 交叉验证率(%) | 识别率(%) |
|------|----------|--------|
| QC | 75.39 | 84.34 |
| SNN | 61.39 | 95.00 |
| GA-3 | 81.26 | 94.87 |
| GA-5 | 81.96 | 94.74 |
| GA-7 | 84.08 | 94.87 |

表 2 GA-5 算法建立分类模型盲法验证结果

| 实际分组 | 分类模型分组 | | 总计 | 准确率 (%) |
|------|--------|----|----|---------|
| | 健康对照 | RA | | |
| 健康对照 | 10 | 0 | 10 | 97.50 |
| RA | 1 | 19 | 20 | |

分析后鉴定出 m/z 在 800 ~ 10 000 Da 范围内表达的多肽峰共 103 个,其中有 41 个多肽峰在 RA 组中表达升高,且组间比较有统计学差异($P < 0.05$)。通过 CPT 软件聚类分析方法,以 GA (number of neighbors 3,5,7)、SNN、QC 算法进行运算后,其中 GA 算法所建立模型识别率与交叉验证率最高,拟定为最优模型。GA 算法分别选择 number of neighbors 3、5、7 建立分类模型。其中 GA-3 算法所建立分类模型由五个多肽组成,其 m/z 分别为 811.35、4 302.53、3 541.45、2 661.16、7 938.84,识别率为 94.87%,交叉验证率为 81.96%;GA-5 算法所建立分类模型由五个多肽组成,其 m/z 分别为 2 601.05、4 967.60、6 639.43、1 866.29、8 144.63,识别率为 94.74%,交叉验证率为 81.96%;GA-7 算法所建立分类模型由 5 个多肽组成,其 m/z 分别为 2 601.05、1 945.66、3 767.68、3 884.50、5 739.50,识别率为 94.87%,交叉验证率为 84.08%。

以 RA 患者 20 例(其中湿热瘀阻证 10 例、非湿热瘀阻证 10 例),健康对照组 10 名分别对 GA-3、GA-5、GA-7 算法建立分类模型,进行盲法验证。分别选择 GA-3、GA-5、GA-7 算法,选择 Classify 调入验证组 MALDI-TOF-MS 所生成数据,对两组患者进行验证。

综合三种分类模型,GA-3 分类模型准确率为 57.50%,GA-5 分类模型准确率为 97.50%、GA-7 分类模型准确率为 72.50%,GA-5 算法的分类模型盲法验证准确率最高,可选为 RA 诊断最优分类模型。

2 RA 湿热瘀阻证诊断血清多肽谱分类模型的建立(图 2,表 3、4) 将湿热瘀阻证 20 例及非湿热瘀阻证 20 例患者 MALDI-TOF-MS 所生成数据调入 CPT 软件,其中 class 1 为湿热瘀阻证(红色)、class 2 为非湿热瘀阻证(绿色)。分别以 GA (number of neighbors 3、5、7)、SNN、QC 算法进行运算,得出血清多肽指纹图谱。

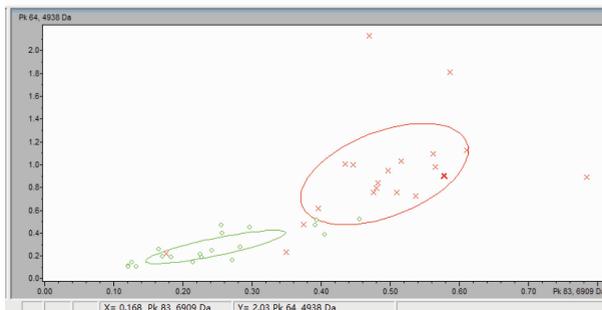
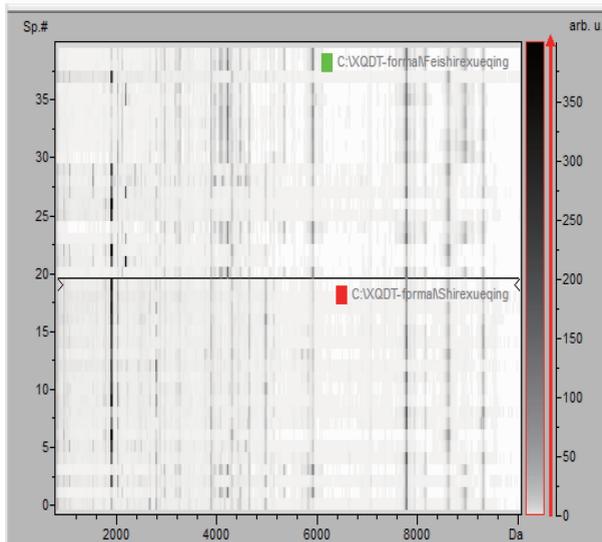
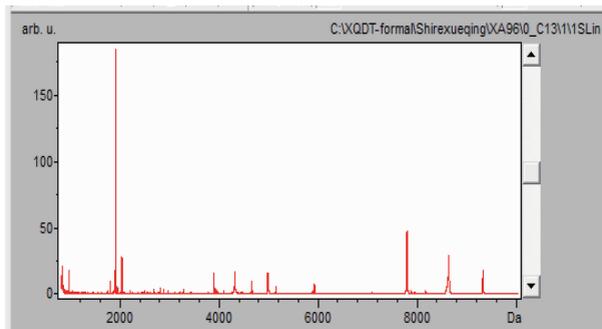


图 2 RA 模型 CPT 统计学软件建立分类模型结果

表 3 RA 湿热瘀阻证模型 CPT 统计学软件建立分类模型结果

| 算法 | 交叉验证率(%) | 识别率(%) |
|------|----------|--------|
| QC | 85.65 | 92.50 |
| SNN | 87.09 | 97.50 |
| GA-3 | 84.85 | 97.50 |
| GA-5 | 78.66 | 95.50 |
| GA-7 | 80.05 | 97.50 |

表 4 GA-7 算法建立分类模型盲法验证结果

| 实际分组 | 分类模型分组 | | 总计 | 准确率 (%) |
|-------|--------|--------|----|---------|
| | 湿热瘀阻证 | 非湿热瘀阻证 | | |
| 湿热瘀阻 | 9 | 1 | 10 | 90 |
| 非湿热瘀阻 | 1 | 9 | 10 | |

分析后鉴定出 m/z 在 800 ~ 10 000 Da 范围内表达的多肽峰共有 103 个, 其中有 15 个多肽峰在湿热瘀阻证中表达升高, 且组间比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。通过 CPT 软件聚类分析方法, 以 GA (number of neighbors 3, 5, 7)、SNN、QC 算法进行运算后, 其中 SNN 算法所建立模型识别率与交叉验证率最高, 但其建立分类模型所选择肽段为 25 个, 不予选择。根据 GA 算法 number of neighbors 3, 5, 7 建立分类模型。其中 GA-3 算法所建立分类模型由五个多肽组成, 其 m/z 分别为 4 251.35、5 740.43、1 866.43、973.82、7 070.19, 识别率为 97.50%, 交叉验证率为 84.85%; GA-5 算法所建立分类模型由五个多肽组成, 其 m/z 分别为 4 251.35、5 740.43、4 531.50、973.82、1 741.31, 识别率为 95.00%, 交叉验证率为 78.66%; GA-7 算法所建立分类模型由五个多肽组成, 其 m/z 分别为 5 740.43、4 251.35、2 863.03、1 607.22、4 531.50, 识别率为 97.50%, 交叉验证率为 80.05%。

以 RA 湿热瘀阻证 10 例、非湿热瘀阻证 10 例分别对 GA-3、GA-5、GA-7 算法建立分类模型进行盲法验证。分别选择 GA-3、GA-5、GA-7 算法, 选择 Classify 调入验证组 MALDI-TOF-MS 所生成数据, 对两组患者进行验证。综合三种分类模型, GA-3 算法准确率为 80%, GA-5 算法准确率为 75%、GA-7 算法准确率为 90.00%, GA-7 算法的分类模型盲法验证准确率最高, 可选为湿热瘀阻证最优分类模型。

讨 论

“证”是中医学中人体对病理状态的反应, “证”的动态性、整体性、模糊性、差异性、复杂性的特点, 又使得中医学“证”通过现代实验室检查所得到的单一理化指标缺乏足够的特异性。如何将中医学理论客观量化一直是中医与现代医学结合所面临的一个问题。中医证候学与蛋白质组学两者都以整体作为研究对象, 中医学的证候是人体阴阳、气血、脏腑之间相互作用、相互联系的结果。蛋白质组学是以一个细胞、组织、器官的全部蛋白质为研究对象, 蛋白质是生命活动功能的执行者, 其含量、结构、功能决定着机体的功能状态。两者都是动态的开放的, 中医学的证随着机体的状态的变化而发生变化, 并受外界环境的影响。蛋白质同样随着机体的状态的变化而进行着分解合成代谢, 蛋白质的代谢是自身基因与外界环境改变共同作用的结果。蛋白质的总体的组成变化是否可以反映中医证的本质是中西医沟通的一个交汇点。随着蛋白质组学技术的进步, 蛋白

质组学在中医学证候的研究中取得了一系列的进展。

在中医学证候的研究中, 有学者通过建立多肽分类模型来探讨中医证候的本质, 为临床诊治提供依据。周焯威等^[12]结合纳米金属螯合磁珠纯化和 MALDI-TOF-MS 质谱技术, 探讨肝硬化“正虚血瘀”的病机内涵, 筛选出 6 个特征蛋白质峰用以构成脾气虚弱证候诊断模型, 另有 17 个蛋白峰在肝肾阴虚证候患者表达有明显变化, 认为“正虚血瘀”肝硬化的基本病机, “正虚”包括了脾气虚弱和肝肾阴虚两方面内容, 虚证通常由脾气虚弱为主向肝肾阴虚转换, 血瘀则贯穿于肝硬化发病的全程。吴玮等^[13]结合磁珠、双向电泳、MALDI-TOF-MS 研究寻常型银屑病患者不同中医证型外周血 T 淋巴细胞膜上的差异表达蛋白, 发现寻常型银屑病组与健康对照组间有 4 个差异蛋白峰; 血热证患者与血瘀证患者之间差异蛋白峰仅为 1 个, 而血热证患者与血燥证患者之间无明显差异蛋白峰, 血瘀证患者与血燥证患者相比较有 1 个差异蛋白峰。杨鸿等^[14]以磁珠结合 MALDI-TOF MS 进行慢性心衰气阴虚证血液蛋白质组学的研究, 分析采集、蛋白的提取、反复冻融、重复性、基质样品比例等多方面因素对指纹图谱结果的影响。研究发现与血浆相比血清能够表达更多的质谱峰, 而弱阳离子磁珠出峰数量则要优于铜螯合磁珠, 气阴虚证患者与健康组相比较蛋白表达有着明显差异。杨艳玲等^[15]结合磁珠分选结合 MALDI-TOF-MS 分析建立缺血性心脏病心力衰竭气虚血瘀证患者诊断的血清多肽谱模型。筛选得出 5 个蛋白峰用来建立模型, 并进一步通过多肽氨基酸序列库查询这 5 种蛋白峰, 共得到补体 C3 f、纤维蛋白原和热休克蛋白 60 共 3 种肽段的氨基酸序列。从而认为补体 C3 f、纤维蛋白原和热休克蛋白 60 是缺血性心脏病心力衰竭气虚血瘀证的特异性标志物。

目前, 尚未有研究采用多肽组学技术对 RA 的湿热瘀阻证候进行探讨。本研究应用多肽组学技术, 分别筛选建立了 RA 血清多肽分类模型与 RA 湿热瘀阻证血清多肽分类模型。RA 血清多肽分类模型通过 GA-5 算法所建立分类模型为最优分类模型, 其由五个多肽组成, 其 m/z 分别为 2 601.05、4 967.60、6 639.43、1 866.29、8 144.63, 该模型中 m/z 4 967.60、6 639.43、8 144.63 经统计学分析组间差异 $P < 0.05$, 其中 m/z 4 967.60、6 639.43 的多肽在 RA 中表达增高, m/z 8 144.63 的多肽峰在 RA 中表达降低。该模型识别率为 94.74%, 交叉验证率为 81.96%, 盲法验证准确率为 97.50%。 m/z 4 967.60、6 639.43 的多肽具有作为 RA 诊断血清敏

感蛋白的潜在可能。从 GA-3、GA-7 的分类模型识别情况来看,对于健康对照组的识别明显准确率不高,从而影响了整体的识别率,从一定的程度来说,该模型可能还存在不足,是否可能与入组病例过少、个体差异过大有关,需在进一步的研究中进行验证。RA 湿热瘀阻证血清分类模型由 GA-7 算法所建立分类模型为最优分类模型,其由五个多肽组成,其 m/z 分别为 5 740.43、4 251.35、2 863.03、1 607.22、4 531.50,其中 m/z 5 740.43 的多肽峰经统计学分析组间差异 $P < 0.000001$,且在 RA 湿热瘀阻证中表达明显增高,该模型识别率为 97.50%,交叉验证率为 80.05%,盲法验证准确率为 90%,m/z 5740.43 的多肽具有作为 RA 湿热瘀阻证血清敏感蛋白的潜在可能。临床准确的辨证是疗效的保证,对于证候规范化、客观化的研究一直是中医学与现代医学结合的必经之路。湿热瘀阻证作为 RA 活动期的主要证候,病情重、骨侵蚀明显,因此探索 RA 湿热瘀阻证的发生、发展变化的微观物质基础,将使有针对性的预防及治疗成为可能。本研究所建立的诊断指纹图谱模型准确率较高,研究中筛选的湿热瘀阻多肽指纹图谱模型在一定程度上是湿热瘀阻证在机体的具体反映,对 RA 及湿热瘀阻证的临床诊断具有一定的价值,为进一步筛选其生物学标志物并研究疾病的发病机制奠定了一定基础。

多肽组学的发展,拓展了对于疾病认识的视野,但是所取得的数据,仍需在不同的实验室间及临床工作中进行验证。在研究过程中仍有许多的问题需要去克服,比如 Clinprot 技术在应用过程中,样本的采集、储存、运输、处理、生物学软件分析等环节都可能对样本造成影响。多肽的不稳定性、样本的个体差异都给检测结果带来了一定的不可预测性。本研究的样本量较小,尚需进一步扩大样本量验证其重复性。由于经费、时间的限制,未能进一步鉴定明确差异多肽究竟是何种多肽,在今后的科研工作中,进一步扩大样本量,明确差异多肽的种类,并在临床工作中进一步确认其真实性和可靠性是进一步的研究方向。

利益冲突:无。

参 考 文 献

- [1] 蒋明, YU D, 林孝义, 等主编. 中华风湿病学[M]. 北京: 华夏出版社, 2004: 737
- [2] Tobón GJ, Youinou P, Saraux A. The environ-

ment, geo-epidemiology, and autoimmune disease: rheumatoid arthritis [J]. J Autoimmun, 2010, 35(1): 10-14.

- [3] 陈灏珠, 林果为主编. 实用内科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 2708.
- [4] 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
- [5] Ates A, karaaslan Y, Karatayli E, et al. Association of the PTPN22 gene polymorphism with autoantibody positivity in Turkish rheumatoid arthritis patients[J] Tissue Antigens, 2011, 78(1): 56-59.
- [6] Catrina AI, Ytterberg AJ, Reynisdottir G, et al. Lungs, joints and immunity against citrullinated proteins in rheumatoid arthritis [J]. Nat Rev Rheumatol, 2014, 10(11): 645-653.
- [7] 李永振, 贺继东, 彭政, 等. 多肽的合成与应用进展[J] 化学与生物工程, 2010, 27(4): 9.
- [8] 吕芳, 李兴福. 2010 年美国风湿会联合会欧洲抗风湿病联盟的类风湿关节炎分类标准解读[J]. 诊断学理论与实践, 2010, 9(4): 307-310.
- [9] Funovits J, Aletaha D, Bykerk V, et al. The 2010 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism classification criteria for rheumatoid arthritis: methodological report phase I [J]. Ann Rheum Dis, 2010, 69(9): 1589-1595.
- [10] 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]. Arthritis Rheum, 2010, 62(9): 1580-1588.
- [11] 郑晓筱主编. 中药新药临床研究指导原则[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2002: 116.
- [12] 周焯威, 徐品初, 成扬, 等. 肝硬化正虚血瘀证与血清蛋白质组学所见[J]. 中国中西医结合杂志, 2011, 31(5): 595-602.
- [13] 吴玮, 范瑞强, 晏卉, 等. 利用 MALDI-TOF-MS 技术初步探讨不同中医证型的银屑病外周血 T 淋巴细胞膜蛋白[J]. 皮肤病学诊疗学杂志, 2014, 21(5): 363-366.
- [14] 杨鸿, 周春喜, 李晶哲, 等. 利用磁珠法结合 MALDI-TOF MS 进行慢性心衰气阴虚证血液蛋白质组学研究的方法探讨[J]. 中国中医基础医学杂志, 2011, 17(9): 957-959.
- [15] 杨艳玲, 曹雪滨, 解亚楠, 等. 缺血性心脏病心力衰竭气虚血瘀证患者特异性血清标志物研究[J]. 中医杂志, 2014, 55(7): 567-570.

(收稿: 2017-11-30 在线: 2019-09-09)

责任编辑: 汤 静