**分类号：R592.3 学校代码：10392**

**学科专业代码：100102** 学 **号：2010030265**



**硕士学位论文**



**多发性肌炎合并肺间质病变的血清蛋白质组学分析**

**Analysis of serum proteomics in polymyositis patients with**

**interstitial lung disease (ILD)**

|  |  |
| --- | --- |
| **学** 位 类 **型：** | **医学硕士** |
| **所** 在 学 **院：** | **基础医学院** |
| **申 请 人 姓 名 ：** | **李 秋 兰** |
| **学 科 、 专 业 ：** | **免 疫 学** |
| **导**  **师** ： | **章 涛** 教授 |
| **研 究 起 止 日 期 ：** | **2013 年 10 月至 2015 年 1 月** |
| **答辩委员会主席：** | **王 玮** **教授** |
| **答** 辩 日 **期：** | **2015 年 05 月 29 日** |

**二◈一五年五月**

1



**目** 录

附 **录**

**英文缩略词表（Abbreviation）**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **英文缩写** | **英文全称** | **中文全称** |
| ACR | American College of Rheumatology | 美国风湿病学会 |
| AHSG | Alpha2-Hs-glycoprotein | ａ2Hs 糖蛋白 |
| A1BG | Alpha－1β－glycoprotein | ａ1β 糖蛋白 |
| ALB | Albumin | 白蛋白 |
| Apo A-1 | Apolipoprotein A-1 | 载脂蛋白 A1 |
| β2-GP1 | β-2- glycoprotein 1 | β2 糖蛋白 1 |
| CLU | Clusterin | 凝集素 |
| ELISA | Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay | 酶联免疫吸附法 |
| HDL | High-density lipoprotein | 高密度脂蛋白 |
| HLA | Human leukocyte antigen | 人类白细胞相关抗原表型 |
| IEF | Isoelectric focusing | 等电聚焦 |
| IIM | Idiopathic inflammatory myopathies | 特发性炎症性肌病 |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| ILD | Interstitial lung disease | 肺间质病变 |
| MALDI-TOF-MS | Matrix assisted laser desorption/inionation time of fight mass spectrometry | 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱 |
| MCP-1 | Monocyte chemoattractant protein-1 | 趋化因子 |
| MS | Mass spectrometry | 质谱 |
| PMF | Peptide mass fingerprint | 肽质量指纹图谱 |
| SAA | Serum Amyloid A | 血清淀粉样蛋白 A |
| SLE | Systemic lupus erythematosus | 系统性红斑狼疮 |
| SDS-PAGE | Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis | 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 |
| TC | Total cholesterol | 总胆固醇 |
| TG | Triglycerides | 甘油三酯 |
| TRF | Serotransferin | 转铁蛋白 |
| ZAG | Zinc-alpha2-glycoprotein | 锌ａ2 糖蛋白 |

**多发性肌炎合并肺间质病变的血清蛋白质组学分析**

# 中文摘要

**【目的】**

寻找可预测多发性肌炎（Polymyositis, PM）及合并肺间质病变(Interstitial lung

disease，ILD）疾病发生和发展的血清蛋白质。

**【方法】**

1．病例收集：收集确诊为PM患者血清3例，男性1例，女性2例，年龄为

46.35±16.24 y. PM +ILD患者血清3例，男性1例，女性2例，年龄为47.78±19.64 y。

同期健康体检者血清3例，男性1例，女性2例，年龄为45.66±17.62 y。三组人员的年龄，性别皆相匹配。

2. 三组血清在相同条件下进行三次双向凝胶电泳分离蛋白质点，考马斯亮兰染色后，各组凝胶用Image Master 2D Platinum7.0 software软件分析凝胶图像，三组所有的凝胶均取得清晰的2－DE 表达图谱。设置平滑（Smooth=10）、显著值

（Saliency=2）、最小区域（Min Area=5）等参数进行斑点检测，设置landmark蛋白点后进行匹配。数据分析后选取光密度差异（ratio）>2 且差别具统计学意义

（anova≤0.05）的蛋白质点为差异表达的蛋白质点。挖取差异表达蛋白质点，酶解后进行基质辅助激光解析电离飞行时间质谱（MALDI-TOF-MS）分析，并与数据库进行匹配，鉴定蛋白质。

3．第二部分实验：扩大样本量，入选PM组13例，年龄为47.26±15.40 y；PM+ILD组6例，年龄为47.33±19.14 y；SLE组年龄为46.8±17.05 y；健康对照组20例，年龄为44.76±13.64y，收集血清。应用酶联免疫吸附法（enzyme linked immunosorbent assay, ELISA）检测三组血清中的血清淀粉样蛋白A、凝集素、转铁蛋白及β2-糖蛋白1。

**【结果】**

1.第一部分：

（1）PM组找到的蛋白质点为252±11个，PM合并ILD组找到的蛋白质点235±8

个，健康对照组找到的蛋白质点为239±7个。

（2）与健康对照组比较，PM组有12个差异蛋白表达上调，1个差异蛋白表达下调；表达上调的差异蛋白成功鉴定出5种差异蛋白即血清淀粉样蛋白A、载脂蛋

白A1、血清白蛋白、凝集素、β2-糖蛋白-1；表达下调的差异蛋白鉴定为转铁蛋白；

PM合并ILD组有13个差异蛋白同时表达下调，成功鉴定出4种蛋白质即转铁蛋白、锌-ａ2-糖蛋白、ａ2-H2-糖蛋白、ａ1-β-糖蛋白。

（3）与PM组比较，PM合并ILD组的7个差异蛋白同时表达下调。成功鉴定出

2种蛋白质即β2-糖蛋白1和转铁蛋白。

2．第二部分：

（1）血清淀粉样蛋白A在PM、PM+ILD、SLE、HD组的血清浓度分别为609.0 ng/L、

798.5 ng/L、634.0 ng/L、617.0 ng/L，在各组间比较无显著性差异（*P*＞0.05）。

（2）凝集素在PM、PM+ILD、SLE、HD组的血清浓度分别为13.0ng/L、14.0 ng/L、

11.5 ng/L、8.0 ng/L；与健康对照组比较，PM、PM+ILD、SLE表达上调（差异显著，*P*＜0.05），其余组间比较无显著性差异（*P*＞0.05）。

（3）转铁蛋白在PM、PM+ILD、SLE、HD组的血清浓度分别为4.06 ng/L、4.67 ng/L、

3.34 ng/L、3.45 ng/L，在各组间比较无显著性差异（*P*＞0.05）。

（4）β2-糖蛋白1在PM、PM+ILD、SLE、HD组的血清浓度分别为5.0 ng/L、5.04

ng/L 、3.75 ng/L 、2.29 ng/L. 在各组间比较无显著性差异（*P*＞0.05）。

**【结论】**

凝集素可作为PM疾病血清生物学标志物的候选分子。

**【关键词】**

**蛋白质组学，多发性肌炎，肺间质病变，凝集素**

**Analysis of serum proteomics in polymyositis patients with**

**Interstitial lung disease (ILD)**

**[Objective]**

**Abstract**

The purpose of this study was to reveal the dynamics of plasma protein with differentially expression by proteomics in patients with polymyositis (PM) so as to find the diagnostic markers for evaluation of disease development and prognosis.

**[Methods]**

1. Plasma samples were collected from 3 PM patients, 3 PM patients with ILD and 3 HDs patients.

2. Two-dimensional electrophoresis was applied to separate the proteins in sera from PM patients, PM with ILD patients and healthy controls. Images from each gel were analysed by Image Master 2D Platinum7.0 software with the parameters of

Smooth=10、Saliency=2、Min Area=5 and defined the protein spots by setting protein

Landmark. The proteins with significant differential expression (ratio> 2 and anova≤0.05) among three groups were identified by matrix-assisted laser desorption/ionization tandem time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS)．

3. Amyloid A protein, Clusterin, transferrin, andβ2-glycoprotein 1, which were identificated by MALDI-TOF-MS, were detected by ELISA from serum in 13 patients with polymyositis, 6 PM patients with ILD, 20 patients with systemic lupus and 20 healthy donors.

**[Results]**

Part One

1. 252±11 protein points were comfirmed in PM patients, 235±8 points in PM+ILD patients, 239±7 points in healthy donors;

2. Expression of 12 proteins in serum from PM patients compared with healthy controls were differentially elevated in which 5 proteins were identified as amyloid A protein, apolipoprotein A1, Serum albumin, Clusterin and β2-glycoprotein1. And one

Decreased expression protein was identified as serotransferrin.

3. Expression of 13 proteins in serum from PM patients with ILD were decreased differentially compared to healthy controls, in which 4 proteins were identified as serotransferrin, zinc-a2- glycoprotein, a2-H2-glycoprotein, A1-beta glycoprotein.

4. Expression ofβ2-glycoprotein1 and serotransferrin were significantly decreased in PM patients with ILD compared with those in patients with PM.

Part Two

1. The Serum concentration of amyloid A protein in patients with PM, PM+ILD, SLE and HD were 609.0 ng/L、798.5 ng/L、634.8 ng/L、617.0 ng/L respectively. There was no significant difference between each groups (*P*＞0.05).

2. The Serum concentration of Clusterin in patients with PM, PM+ILD, SLE and HD were 13.0 ng/L、14.0 ng/L、11.5 ng/L、8.0 ng/L respectively. There was a significant difference compared with healthy controls(8.0 ng/L, P <0.05) except that in patients with HD. Meanwhile, without difference in other groups (P> 0.05).

3. The Serum concentration of transferrin in patients with PM, PM+ILD, SLE and HD were 4.06 ng/L、4.67 ng/L、3.34 ng/L、3.45 ng/L respectively. There was no significant difference between each groups (*P*＞0.05).

4. The Serum concentration ofβ2-glycoprotein1 in patients with PM, PM+ILD, SLE and HD were 5.0 ng/L、5.04 ng/L、3.75 ng/L、2.29ng/L respectively. There was no significant difference between each groups (*P*＞0.05)..

**[Conclusion]**

Clusterin could be served as candidate markers for diagnose of PM.

**[Key words]**

**Proteomics; Polymyositis; Interstitial lung disease; Clusterin**

前 **言**

多发性肌炎（Polymyositis, PM）是一种原因及发病机制不明的以横纹肌损害为主的全身性自身免疫性疾病，其主要侵害骨骼肌及其他内脏器官。由于支气管、肺血管、肺间质和胸膜均富含结缔组织，故肺部常为PM/DM的靶器官。肺间质疾病（interstitial lung disease, ILD）是常见且严重的并发症[1]，可发生于PM的任何阶段，发病率高达10%～60%，是影响PM患者预后和致死的主要因素之一[2]。美国多发性肌炎和皮肌炎（Dermatomyositis, DM）的发病率为5/106，男女比例为1: 2，各年龄段组均可发病，但主要的两个年龄发病高峰是5～16岁和45～65岁。

PM以及PM合并ILD的发病机制至今不明，国内外学者利用了生物组学和新兴技术所提供的新工具（如基因组学、表观基因组学、蛋白质组学、相互作用组学、代谢组学等）进行多方面的探索。研究发现，PM合并ILD的发病和进展与多方面的因素有关，如多种免疫细胞、细胞因子、自身抗体及遗传背景等。

目前，关于PM发病机制主要从以下几方面进行研究。第一，具有种族差异的人类白细胞抗原表型（human leukocyte antigen, HLA）。中国人的HLA单倍型为HLA-DRB1\*040x-DQB1\*0301、HLA-DRB1\*040x-DQB1\*0401单倍型；日本人

群则是HLA-DRB1\*0405-DQA1\*03-DQB1\*0401单倍型。第二，T细胞的杀伤作用。学说一：Fas/FasL信号传导途径诱导靶细胞凋亡及通过穿孔素和颗粒酶杀伤靶细胞。学说二：肌肉在炎性环境下，通过表达抗凋亡蛋白FLIP而获得对Fas介导的凋亡的抵抗，从而使细胞毒性T细胞损伤肌细胞。学说三：穿孔素与肌细胞接触的CD8+T细胞形成CD8 /MHC -I复合物，复合体侵入肌纤维，通过释放穿孔蛋白导致肌纤维坏死。第三，细胞因子介导的作用。类如I型干扰素信号通路及其诱导基因表达的改变[3]，白细胞介素（IL-2、IL-15、IL-27）的介导[4]。

PM+ILD发病机制方面的研究也有几个方面的发现。第一，中国人的HLA单倍 型 为 HLA- DQA1\*0501，而 日 本 人 则 为HLA-DRB1\*0405-DQA1\*03-DQB1\*0401. 第二，与ILD最相关的抗合成酶抗体自身抗体[5]。在PM患者血清中，抗丙氨酰t-RNA合成酶抗体（alanyl tRNA synthetase, PL-12）阳性率占3～3.6%[6-7]；抗苏氨酰t-RNA合成酶抗体（threonyl Trna synthetase, PL-7）占5～5.8%[8]；抗组氨酰t-RNA合成酶抗体(histidyl-t-RNA, Jo- 1)占15.9～30% [8-11]. 且当这些抗体阳性时，PM患者发生ILD的机率高达60～80% [8]. 第三，

单核细胞趋化蛋白-1 [2]、黏液病毒抗性蛋白-1 [3]的表达水平在PM及合并肺间质患者中较正常人高，这些蛋白与ILD的损害密切相关。

PM的病死率较高（20%～30%），PM合并ILD后的死亡率为20~86%[12-13]。但是，对PM的诊断当前仍然依靠血清学肌酶谱、影像学和临床异常表现。前者的敏感不高，后者则易受肺部其他疾病干扰。也有PM及合并ILD疾病的生物学指标被发现，但检测它们需要的仪器设备都颇昂贵，且检测方法没有标准化，无法得到普及。因此，发现PM的早期且易于普及的血清生物学指标势在必行。

蛋白组学是大规模分离和识别蛋白质的一门新兴学科，可从整体的角度全面研究细胞内成千上万种动态变化的蛋白质组成成分、表达水平与修饰状态，除可了解蛋白质之间的相互作用，还可揭示蛋白质功能与细胞生命活动的规律。蛋白质组研究包括2-DE、计算机图像分析及MS等三大基本技术。2-DE这一新的技术手段，具有高分辨率、高检出率及可重复性特点。蛋白组学在疾病研究中的应用非常广泛，几乎涉及所有疾病，但是至今国内外对PM合并ILD血清蛋白质组分析的研究少。本研究分析PM，PM合并ILD以及健康组血清蛋白质学，寻找差异蛋白质，探寻参与PM以及PM合并LLD的发病机制，并且尝试寻找帮助

PM诊断和预测PM合并ILD的血清学生物标志物。

目 录

[附](#_Toc686940797)[录](#_Toc686940797) 3

[中文摘要](#_Toc686940798) 6

**[Abstract](#_Toc686940799)** 7

[前](#_Toc686940800)[言](#_Toc686940800) 8

[第一部分 多发性肌炎合并肺间质病变血清标志物的筛查](#_Toc686940801) 8

[一、 材料及方法](#_Toc686940802) 8

[二、 结果](#_Toc686940803) 14

[三、 讨 论](#_Toc686940804) 30

[第二部分 多发性肌炎检测出的](#_Toc686940805)**[4](#_Toc686940805)**[种血清蛋白的验证](#_Toc686940805) 31

**[1](#_Toc686940806)**[.材料](#_Toc686940806) 31

**[2.](#_Toc686940807)** [方法](#_Toc686940807) 31

**[1. PM](#_Toc686940808)**[组、](#_Toc686940808)**[PM+ILD](#_Toc686940808)**[组、](#_Toc686940808)**[SLE](#_Toc686940808)**[组与](#_Toc686940808)**[HD](#_Toc686940808)**[组一般情况（表](#_Toc686940808)**[2.2、2.3](#_Toc686940808)**[）](#_Toc686940808) 33

**[2.](#_Toc686940809)** [测定差异蛋白的血清浓度](#_Toc686940809) 35

**[3.](#_Toc686940810)** [各组差异蛋白的比较与分析](#_Toc686940810) 37

[结](#_Toc686940811)[论](#_Toc686940811) 39

[参考文献](#_Toc686940812) 39

[参考文献](#_Toc686940813) 42

# 第一部分 多发性肌炎合并肺间质病变血清标志物的筛查

特发性炎症性肌病(idiopathic inflammatory myopathies, IIM)是一组以慢性肌肉炎症反应导致进行性肌萎缩为特点的系统性自身免疫病，包括多发性肌炎(polymyositis, PM)、皮肌炎(dermatomyositis, DM)和包涵体肌炎(inclusion-bodymyositis, IBM)等。临床目前对IIM诊断的血清学依据为以下几种：

1.自身抗体检测，包括抗核抗体（ANA），阳性率为20% ~30%,对肌炎诊断不具有特异性；抗Jo-1抗体，阳性率为25%，合并有肺间质病变时其阳性率达60%；抗信号识别颗粒(SRP)抗体，阳性率为84％，合并有肺间质病变时阳性率23％；血清肌酶，异常率为85%~87%。这些指标的敏感性及特异性均无法满足PM的早期诊断的要求。目前对PM合并ILD的诊断和预测疾病进展均缺乏有效的生化指标，因此，本实验用蛋白组学分析多发性肌炎合并肺间质病变患者血清标本，以期找到可作为PM早期诊断、具有诊断敏感性、特异性的血清标志物，同时探索PM合并ILD的诊断和预测疾病发生发展的血清学指标。

## 一、 材料及方法

### **1.** 材料

#### 1.1 病例来源

收集PM组3例，PM +ILD组3例，正常健康对照组3例。各组皆含男性1例，女性2例。所有患者皆来自2011年11月～2013年11月福建医科大学附属第二医院免疫内科住院患者，均处于急性期阶段。健康对照人员来源于我院同期健康体检的人群。PM组、PM+ILD组及健康对照组年龄、性别皆相匹配。所有患者及健康对照人员均知情同意，本研究获得福建医科大学附属第二医院的地方伦理委员会许可。

#### 1.2 入选标准

PM组、PM+ILD组均符合1975年Bohan和Peter提出了IIM的诊断标准，且满足无发生感染，无合并恶性肿瘤、甲状腺疾病及其它结缔组织病等因素。

#### 1.3 样本收集及预处理

每例取静脉血6ml，置室温20分钟，3000r/min，离心15分钟，取上清，分装

于EP管，-80度冰箱保存备用。

### **2.** 方法

#### 2.1 BCA法血清蛋白定量

##### 2.1.1 主要试剂 BCA蛋白定量试剂盒：碧云天，产品编号AR0146

##### 2.1.2 主要仪器和设备

酶标仪：德国TECAN公司

漩涡振荡器：海门市其林贝尔仪器制造有限公司隔热式恒温培养箱：上海跃进医疗器械厂

##### 2.1.3 实验步骤

###### 2.1.3.1 配制工作液：BCA试剂A液：B液以50：1比例配制，充分混匀。

2.1.3.2配制标准品：冻干标准品加入1ml的PBS液稀释成10mg/ml，充分混匀后再将浓度稀释为2000ug/ml，再按下表1.1进行倍比稀释：

表1.1 标准品的稀释

| 管号 | 稀释液体积(ul) | 标准液体积（ul） | 终浓度(ug/ml) |
| --- | --- | --- | --- |
| A | 240 | 60 | 2000 |
| B | 30 | 90（从 A 管取） | 1500 |
| C | 60 | 60（从 A 管取） | 1000 |
| D | 60 | 60（从 B 管取） | 750 |
| E | 60 | 60（从 C 管取） | 500 |
| F | 60 | 60（从 E 管取） | 250 |
| G | 60 | 60（从 F 管取） | 125 |
| H | 100 | 25（从 G 管取） | 25 |
| I | 60 | 0 | 0（空白孔） |

###### 2.1.3.3 稀释血清样本：血清样本用PBS液进行50倍数稀释。将25ul的标准品与血清样本分别加入96孔板的微孔中，各加入200ulBCA工作液，充分混匀。盖上

96孔板盖，37℃恒温箱孵育30分钟。冷却至室温，在酶标仪A620nm(主波长),450

nm（副波长）下测定96孔OD值。用EXCEL软件，以标准物的浓度为横坐标，OD值为纵坐标，绘制出标准曲线（图1.1）。



图1.1 BCA标准曲线

###### 2.1.3.4 按标准曲线查出各样品相应的浓度，再乘以稀释倍数（50倍）后的血清蛋白浓度就是实验所要的浓度（表1.2）。

2.1.3.5混合血清池，PM组的总体积为104.5 ul, PM+ILD组的总体积为88 ul，健康对照组总体积为87 ul，并计算出所需样品上样体积。每组混合血清池各分装成

3管，-80℃冰箱保存备用（表1.2）。

表 1.2 血清蛋白浓度及上样体积

| 血清号 | 测定蛋白浓度  （ ug/ml） | 血清蛋白浓度﹡  (ug/ul) | 混制血清样  品体积  (ul) | 上样体积  (ul) |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| PM1 | 1606 | 80.3 | 30.5 |  |
| PM2 | 1550 | 77.5 | 38.5 | 49.5 |
| PM3 | 1694 | 84.7 | 35.5 |  |
| PM+ILD1 | 1952 | 97.6 | 24.0 |  |
| PM+ILD2 | 2486 | 124.3 | 26.5 | 41.7 |
| PM+ILD3 | 2260 | 113.0 | 37.5 |  |
| 健康对照1 | 2012 | 100.6 | 30.0 |  |
| 健康对照2 | 2089 | 104.9 | 28.5 | 41.5 |
| 健康对照3 | 2110 | 105.5 | 28.5 |  |

注：实际血清蛋白浓度由测定蛋白浓度乘于稀释倍数（50倍）得出。

#### 2.2 2-DE双向电泳

##### 2.2.1 主要试剂

IPG Buffer: pH3-10，系列号17-6000-86，美国GE公司；

IPG预制胶条：pH3-10, 24cm，系列号17-5018-49，美国GE公司；

覆盖油（PlusOne DryStrip Cover Fluid）：系列号17-1335-01，美国GE公司；

3-[(3-胆酞胺醛) -二乙胺1-丙磺]（PlusOne CHAPS）：系列号17-1314-01，美国GE

公司；

二硫苏糖醇（PlusOne DTT）：系列号17-1318-01，美国GE公司；

丙烯酰胺（PlusOne Acrylamide PAGE）：系列号17-1302-02，美国GE公司；十二烷基磺酸钠（PlusOne SDS）：系列号17-1313-01，美国GE公司；

尿素（PlusOne Urea）：系列号17-1319-01，美国GE公司；

考马斯亮蓝R350（PhastGel Blue R）：系列号17-0518-01，美国GE公司；碘乙酰胺（IAA）：系列号RPN6302，美国GE公司；

甘氨酸（Glycine）：系列号56-40-6，美国Sigma公司；

低熔点琼脂糖（Agarose, low gelling temperature）：系列号1001122428， 美国Sigma

公司；

N, N'-甲叉双丙烯酰胺（N, N'-Methylenebisacrylamide）：系列号1001185585，美国

Sigma公司；

过硫酸铵（Ammonium persulfate）：系列号1001153327，美国Sigma公司；四甲基乙二胺（TEMED）：系列号1009473675，美国Sigma公司；

Tris碱(Tris(hydroxymethyl) aminomethane)：编号101140638，美国Sigma公司；溴酚蓝：系列号1001221668，美国Sigma公司；

甘油：西陇化工股份有限公司；正丁醇：西陇化工股份有限公司；甲醇：西陇化工股份有限公司；

无水乙酸：西陇化工股份有限公司；

##### 2.2.2 主要仪器和设备

Ettan IPGphorIII等电聚焦系统及附件：美国GE公司；垂直电泳系统ESP601及MultiTemp IV: 美国GE公司；ImageMaster 2D Platinum7.0 software: 美国GE公司；

Imagescanner扫描仪：美国GE公司；

实验室超纯水器：力德高端处理设备研发有限公司；上皿电子天平：上海天平仪器厂；

气浴式恒温振荡器：金坛市天宏实验仪器厂**；**

移液器：美国Thermo公司**；**

旋窝振荡器：海门市其林贝尔仪器制造有限公司**；**

PH酸碱计：赛多利斯科学仪器有限公司**；**

高速冷冻台式离心机：美国BECKMAN公司**；**

电热恒温水箱：上海博讯实业有限公司医疗设备厂**；**

-20℃低温冰箱：中国扬子有限公司**；**

-80℃低温冰箱：日本SANYO公司。

##### 2.2.3 主要试剂配制

1）尿素水化储备溶液

8M尿素+2%(w/v) CHAPS +0.002%溴酚蓝储备溶液+去离子水定容至10ml，分装为

1.0ml溶液储存于-20℃条件下。使用前每1.0ml水化储备溶液中加入2.8mg DTT及 5µl IPG buffer . 2）SDS平衡储备溶液

6 M尿素+ 75 mM Tris-HC(l pH 8.8) +29.3% (v/v)甘油+ 2%(w/v) SDS+0.002% (w/v)

溴酚蓝储备溶液，去离子水定容至100 ml。3）平衡缓冲液I（DTT液）

在使用之前，SDS平衡储备溶液加入1%(w/v) DTT, Max用量10ml/胶条。4)平衡缓冲液II（碘乙酰胺液）

在使用之前，SDS平衡储备溶液加入2.5%(w/v)碘乙酰胺，Max用量10ml/胶条。5) 10×Laemmli SDS电泳缓冲液

250 mM Tris碱+1.92 M甘氨酸+ 1%(w/v) SDS，去离子水定容至1.0L。

6）30% T, 2.6% C单体储液

30%丙烯酰胺+ 0.8%N, N'-甲叉双丙烯酰胺，去离子水定容至500mL

7）4×分离胶缓冲液

1.5 M Tris碱+去离子水150 ml，后用HCl液调至pH8.8，再用去离子水定容至200mL。

8）1%溴酚蓝储备溶液1%溴酚蓝+ 50 mM Tris碱，去离子水定容至10mL

9）10% SDS溶液10% (w/v) SDS+去离子水定容至20ml。

10）10%过硫酸铵溶液10% (w/v)过硫酸铵，去离子水定容至1ml

11）琼脂糖密封液

10xLaemmli电泳缓冲液+0.5%低熔点琼脂糖+0.002% (w/v)溴酚蓝储备溶液，去离子水定容至10 ml。加热直至琼脂糖完全溶解。

12）水饱和正丁醇正丁醇5ml+去离子水1ml，摇匀后静置分层，使用上层。

13）12.5％T,2.6%C SDS-PAGE 胶

单体储存液50.04ml+4×分离胶缓冲液30ml+10%SDS1.2ml+去离子水38.16ml+

TEMED39.6ul+10%过硫酸铵溶液0.6ml，终体积为120ml. （注：TEMED及10%

过硫酸铵溶液应在灌胶前再加。）

14）考马斯亮蓝染色固定液乙酸：甲醇：去离子水=1: 4: 5的比例进行配制。

15）考马斯亮蓝染色工作液

①、配制0.2%储液400ml 2片R350加入80ml去离子水搅拌至完全溶解，后加入240ml甲醇，充分搅拌。

②、染色工作液按储液：乙酸：去离子水=5: 1: 4配制。

16）考马斯亮蓝染色脱色液即10%乙酸。

##### 2.2.4 主要步骤

###### 2.2.4.1 第一向等电聚焦（IEF）

A、水化上样根据胶条pH为3-10L、24cm和考马斯亮兰染色方法，选择配制好的尿素水化储备溶液加入所需血清量（含上样蛋白量1250ug）配制500 ul，混合均匀后，取450ul上样液放入水化槽中。剥去IPG胶条的保护膜，胶面朝下，慢慢下压胶条，并前后移动，使水化液浸湿整个胶条，做上样本标记。避免生成气泡，水化过夜。

B、调IPGphor仪器水平，用圆形水平仪至于Ettan IPGphor3电泳仪的各个水平位置，确保其处于水平位置后安放Manifold胶条盘。

C、将水化好的IPG胶条从水化盘取出，胶面朝上放在滤纸上，吸取多余的油，然后转移至Manifold胶条槽，胶面朝上，阴极端对着槽底部的标记处。胶条必需横跨胶条槽的与IPGphor仪器的两个电极板接触的区域，并确保胶条的两端与槽的两端的电极接触。在IPG胶条表面上盖适量Immobiline DryStrip覆盖油(3-5ml)，空的胶条槽也需要覆盖覆盖油（整个多功能盘大约需覆盖油

108ml），并在胶条的两端安置预先用去离子水湿润的滤纸片，在胶条两端的滤纸片上水平放置电极，盖上电泳仪盖子。

D、设置Ettan IPGphorIII仪器运行参数：Ettan IPGphorIII的电流设置＜50μA，表面温度为20℃，水化时间设置为0；等电聚焦电泳时的梯度电压和时间（表

1.3)。

表 1.3 IEF参数设置

| step |  | U/[V] | Time |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 1 | step | 100 | 01: 00 | HH:mm |
| 2 | Grad | 500 | 00: 30 | HH:mm |
| 3 | Grad | 1000 | 00: 30 | HH:mm |
| 4 | Grad | 4000 | 00: 30 | HH:mm |
| 5 | Grad | 8000 | 00: 30 | HH:mm |
| 6 | step | 8000 | 7: 00 | HH:mm |
| 7 | step | 5000 | 15: 00 | HH:mm |

E、设置好参数，开始跑胶。整个跑胶时长23H, IEF终电流为0μA，总伏小时数为47150vhr。

F、IPG胶条平衡从胶条盘中取出胶条，胶条立于滤纸上吸干其表面的覆盖油。取出3个平衡管并做好标记。使用前每10ml/管平衡缓冲液中加入100mg DTT和适量溴酚蓝溶液（平衡缓冲液I），水平摇动使之完全溶解。将IPG胶条分别放入平衡管中（支持膜贴着管壁，每个平衡管中放入一条IPG胶条），在水平摇床上缓慢振荡15分钟。另取出3个平衡管并做好标记。使用前每10ml /管平衡缓冲液加入250mg 乙酰胺和适量溴酚蓝溶液（平衡缓冲液II），水平摇动使之完全溶解。将IPG胶条从平衡缓冲液I管转移到平衡缓冲液II管，在水平摇床上缓慢振荡15分钟。从平衡缓冲液II管取出IPG 胶条，用1×SDS电泳缓冲液冲洗胶条背面，冲洗3～4次，每次1mL。将胶条的边缘置于滤纸上几分钟，以去除多余的平衡缓冲液。

G、IPG胶条的转移安装凝胶盒，将夹子、垫片及玻璃板组成“三明治”结构的凝胶盒，通过锁扣固定并装入模具。

H、灌胶将预先配制好的300ml SDS-PAGE胶溶液缓慢注入玻璃板之间，注意不要有气泡产生，并检查是否有漏胶。灌胶后立即在每块凝胶上铺上一层用水饱和的正丁醇，以减少凝胶暴露于氧气，形成平展的凝胶面。室温下聚合

3小时。聚合后倒掉覆盖在凝胶上的正丁醇溶液，并用1×Laemmli SDS电泳缓冲液清洗胶面2-3次。量筒中倒入1×Laemmli SDS电泳缓冲液，将平衡好的IPG胶条浸入电泳缓冲液中几秒钟润滑，注意不要粘上泡沫。将IPG胶条放在位于玻璃板之间的凝胶面上，使胶条支持膜贴着其中的一块玻璃板，用一薄尺将IPG胶条轻轻地向下推，使整个胶条下部边缘与板胶的上表面完全接触。在IPG胶条上面覆盖1-2ml热的琼脂糖溶液（低于70°C），若两个胶平面间有气泡可用薄尺轻轻压胶条驱赶气泡。使琼脂糖在5分钟内凝固。其余的IPG胶条重复上述操作。待琼脂糖封胶液完全凝固后，将凝胶盒转移至电泳槽中。

###### 2.2.4.2 第二向SDS电泳

A、往电泳槽下槽中注入1×Laemmli SDS电泳缓冲液（2.5～3L），不要超过Max标记。打开循环水域Multi Temp IV温控系统，设置温度为15°C，开始冷却。

B、在上层电泳槽底部安装两块黑色垫片，注意安装方向。将三明治结构凝胶盒与上槽连接，放入电泳槽中。倒入上槽1×Laemmli SDS电泳缓冲液（约0.5L），不要超过Max标记。

C、恒电流进行电泳，设置参数P1 30mA（即10mA/gel）30min，P2 60mA（即

20mA/gel）4h。

D、当溴酚蓝染料若染料前沿距凝胶底部5mm时停止电泳。电泳结束后，卸下玻璃板，取出凝胶，并做好记号。

E、将胶转移到染色盒里固定，准备染色。

###### 2.2.4.3 染色(考马斯亮蓝染色)

A、固定将做好标记的胶放入预先配制好的固定液中，固定30min。

B、漂洗用去离子水漂洗2-3遍。 C、染色将固定后的凝胶置于染色工作液中，染色过夜。D、漂洗 染色后用去离子水漂洗2-3遍。

E、脱色凝胶放入10%乙酸中，置震荡器进行脱色，换弃10%乙酸三次，直至蛋白点清晰可见。

**同上述方法，对PM、PM+ILD、HD组的混合血清进行同等条件下三次双向电泳**。

###### 2.2.4.4 凝胶扫描及分析

A、扫描

进行扫描仪灰阶校准，原始的像素强度转换成OD值等参数设置。小心放入凝胶，凝胶和玻璃面之间不能有气泡。预扫描后对扫描图像进行对比度等适当调整后正式扫描，选择合适的存储格式进行存储。

B、分析

①处理凝胶通过手动、放大及区域工具进行处理，调整凝胶对比度及裁剪凝胶。

②检测斑点设置平滑（Smooth）、显著值（Saliency）、最小区域（Min Area）等参数进行斑点检测，亦可手动增加或删除点。

③匹配设置质量较好且蛋白质点较多而清晰的凝胶为参考胶；设置位置较固定，在每张凝胶图像中均出现，且点小而清晰的蛋白质点为界标（Landmark）后匹配。

④找点数据分析后选取光密度差异（ratio）> 2且差别具统计学意义

（anova≤0.05）的蛋白质点为差异表达的蛋白质点。

###### 2.2.4.5 取点挖取凝胶上的差异蛋白质点。

###### 2.2.4.6 质谱分析

送昆明赛金公司行MALDI-TOF-MS及与SwissProt数据库匹配，从而得出差异表达的蛋白质。

#### 2.3 统计分析

采用SPSS17.0统计软件包行统计分析，三组间比较时连续性计量资料资料以均数±标准差（*x*±s）表示，组间比较采用单因素方差分析，对于显著偏态分布的资料以中位数（M）及四分位间距表示，组间比较采用Mann-Whitney U检验。

## 二、 结果

**1. PM、PM+ILD组与HD组一般情况（表1.4）**

表 1.4 PM、PM+ILD及HD组的一般情况

| 组 别 | PM | PM+ILD | HD |
| --- | --- | --- | --- |
| 男（n） | 1 | 1 | 1 |
| 女（n） | 2 | 2 | 2 |
| 平均年龄（y） | 46.35±16.24 | 47.28±19.44 | 45.66±17.62 |

**2. 双向电泳图谱**

在相同条件下，同组实验重复双向电泳3次，IEF终电流均为0μA，历经时间均为23.0 h，总伏小时数平均为47150vhr, SDS-PAGE约经4h溴酚蓝染料迁移至胶的底部边缘。而后用图像分析软件对3组凝胶进行分析。其中PM组3张图找到的蛋白质点为252±11 个，匹配率平均为78.00％；PM+ILD组找到的蛋白质点

235±8个，匹配率平均为80.305％，健康对照组找到的蛋白质点为239±7个，匹配率平均为79.160%，具有较好的重复性。蛋白质双向电泳图谱从左到右等电点增加，从下往上分子质量增加。

### **3.** 差异蛋白质点分析

三组间蛋白点差异分析后，共发现有29个差异表达有显著统计学意义的蛋白质点，即满足ratio>2且Anova≤0.05的蛋白质点（详见表1.5、图1.2A、B、C）。

表 1.5 三组间差异表达的蛋白质点

| Match  ID | Max | Match  Count | PM 组  (VOL%) | PM+ILD 组  (VOL%) | 健康对照组  (VOL%) | Anova |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 9 | 0.21215 | 3 | 0.21215 | 0.103167 | 0.0252576 | 0.0124977 |
| 11 | 0.226204 | 3 | 0.226204 | 0.124036 | -0.226204 | 0.00119257 |
| 15 | 0.0874098 | 3 | 0.0874098 | 0.0277616 | -0.0277616 | 0.00250841 |
| 21 | 0.047482 | 3 | 0.0069499 | 0.047482 | -0.047482 | 0.0100789 |
| 22 | 0.12758 | 3 | 0.12758 | 0.016336 | -0.12758 | 0.00150196 |
| 28 | 0.213052 | 3 | 0.213052 | 0.137427 | -0.213052 | 0.0053675 |
| 38 | 0.0864083 | 3 | 0.0864083 | 0.0626317 | -0.0864083 | 0.00482957 |
| 47 | 0.0478826 | 3 | 0.0365753 | 0.0478826 | -0.0478826 | 0.00110235 |
| 49 | 0.317494 | 3 | 0.0327732 | 0.317494 | 0.0978748 | 0.0111446 |
| 52 | 0.489074 | 3 | 0.489074 | 0.157227 | 0.245061 | 2.30E-05 |
| 62 | 0.0437396 | 3 | 0.0329332 | 0.0437396 | -0.0329332 | 0.0103524 |
| 68 | 0.0903411 | 3 | 0.0903411 | 0.0835889 | -0.0903411 | 0.00333015 |
| 98 | 0.720092 | 3 | 0.299665 | 0.720092 | -0.720092 | 0.0190558 |
| 102 | 0.397222 | 3 | 0.100498 | 0.397222 | -0.397222 | 0.00913743 |
| 114 | 0.0224882 | 3 | 0.0224882 | 0.0109166 | -0.0224882 | 0.00794253 |
| 121 | 0.0261913 | 3 | 0.0261913 | 0.00516763 | -0.0261913 | 0.00855571 |
| 172 | 0.019911 | 3 | 0.0185682 | 0.019911 | -0.019911 | 0.00744571 |
| 173 | 0.0288609 | 3 | 0.0288609 | 0.00394709 | -0.0288609 | 0.0159847 |
| 195 | 0.0646041 | 3 | 0.0646041 | 0.0312367 | -0.0646041 | 0.0201086 |
| 256 | 0.06927 | 3 | 0.0365571 | 0.0191726 | 0.06927 | 5.09E-04 |
| 259 | 0.177617 | 3 | 0.0706753 | 0.0403842 | 0.177617 | 9.71E-04 |
| 261 | 0.212559 | 3 | 0.0787697 | 0.212559 | -0.212559 | 0.00802605 |

表1.5 （续）

| Match  ID | Max | Match  Count | PM 组  (VOL%) | PM+ILD 组  (VOL%) | 健康对照组  (VOL%) | Anova |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 263 | 0.1196 | 3 | 0.0459419 | 0.0351279 | 0.1196 | 2.50E-04 |
| 281 | 0.0490583 | 3 | 0.0114857 | 0.028765 | 0.0490583 | 0.00705634 |
| 342 | 0.0499302 | 3 | 0.0499302 | 0.0116181 | -0.0499302 | 0.0351809 |
| 383 | 0.150003 | 3 | 0.0284353 | 0.150003 | -0.150003 | 0.038958 |
| 389 | 0.0325107 | 3 | 0.00707626 | 0.0325107 | -0.0325107 | 0.0161621 |
| 396 | 0.0433983 | 3 | 0.0102596 | 0.0433983 | 0.019748 | 0.0101106 |
| 476 | 0.0605583 | 3 | -0.0605583 | 0.0605583 | -0.0605583 | 2.73E-07 |
| 478 | 0.120038 | 3 | -0.120038 | 0.120038 | -0.120038 | 7.72E-04 |
| 482 | 0.243631 | 3 | -0.243631 | 0.127134 | 0.243631 | 0.00652559 |
| 506 | 0.256317 | 3 | -0.027523 | 0.027523 | 0.256317 | 0.00134808 |

PH3 10



图 1.2 A PM组与对照组比较，差异蛋白质点的凝胶图

注：标签号（macth ID）1为landmark，其余macth ID号为所对应的差异蛋白点。

PH3 10



图 1.2 B PM+ILD组与对照组比较，差异蛋白质点的凝胶图PH3 10



图 1.2 C PM与PM+ILD组比较，差异蛋白质点的凝胶图

#### 3.1 组间比较

##### 3.1.1 与健康对照组比较，PM组和PM+ILD组同时表达，且表达上调的差异蛋白点有20个；PM组和PM+ILD组同时表达且表达下调的差异蛋白点有4个（表1.6）。

表 1.6 PM、PM+ILD组与HD组比较表达差异的蛋白质点

| Match ID | PM 组  (VOL%) | PM+ILD 组  (VOL%) | 健康对照组  (VOL%) | Anova |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 9 ▲ | 0.21215\* | 0.103167 | 0.0252576 | 0.0124977 |
| 11 ▲ | 0.226204\* | 0.124036 | -0.226204 | 0.00119257 |
| 15 ▲ | 0.0874098\* | 0.0277616 | -0.0277616 | 0.00250841 |
| 21 ▲ | 0.0069499\* | 0.047482 | -0.047482 | 0.0100789 |
| 22 ▲ | 0.12758\* | 0.016336 | -0.12758 | 0.00150196 |
| 28 ▲ | 0.213052\* | 0.137427 | -0.213052 | 0.0053675 |
| 38 ▲ | 0.0864083\* | 0.0626317 | -0.0864083 | 0.00482957 |
| 47 ▲ | 0.0365753\* | 0.0478826 | -0.0478826 | 0.00110235 |
| 62 ▲ | 0.0329332\* | 0.0437396 | -0.0329332 | 0.0103524 |
| 68 ▲ | 0.0903411\* | 0.0835889 | -0.0903411 | 0.00333015 |
| 98 ▲ | 0.299665 | 0.720092\*\* | -0.720092 | 0.0190558 |
| 102▲ | 0.100498 | 0.397222\*\* | -0.397222 | 0.00913743 |
| 114▲ | 0.0224882\* | 0.0109166 | -0.0224882 | 0.00794253 |
| 121 ▲ | 0.0261913\* | 0.00516763 | -0.0261913 | 0.00855571 |
| 172 ▲ | 0.0185682\* | 0.019911 | -0.019911 | 0.00744571 |
| 173 ▲ | 0.0288609\* | 0.00394709 | -0.0288609 | 0.0159847 |
| 195 ▲ | 0.0646041\* | 0.0312367 | -0.0646041 | 0.0201086 |
| 261 ▲ | 0.0787697 | 0.212559\*\* | -0.212559 | 0.00802605 |
| 342 ▲ | 0.0499302\* | 0.0116181 | -0.0499302 | 0.0351809 |
| 389 ▲ | 0.00707626 | 0.0325107\*\* | -0.0325107 | 0.0161621 |
| 256 ▽ | 0.0365571\* | 0.0191726 | 0.06927 | 5.09E-04 |
| 259 ▽ | 0.0706753 | 0.0403842\*\* | 0.177617 | 9.71E-04 |
| 263 ▽ | 0.0459419\* | 0.0351279 | 0.1196 | 2.50E-04 |
| 281 ▽ | 0.0114857\* | 0.028765 | 0.0490583 | 0.00705634 |

注：\*表示与健康对照组相比，PM组表达差别具显著统计学意义的蛋白质点；\*\*表示与健康对照组相比，PM+ILD组表达差别具显著统计学意义的蛋白质点。▲表示PM/PM+ILD组表达显著增加的蛋白质点；▽表示PM/PM+ILD组表达显著减少的蛋白质点。

##### 3.1.2 与PM组比较，PM+ILD组表达上调的差异蛋白点有2个，PM+ILD组表达下调的差异蛋白点有7个(表1.7)。

表 1.7 PM组与PM+ILD组比较表达差异的蛋白质点

| Match ID | PM 组  (VOL%) | PM+ILD 组  (VOL%) | Anova |
| --- | --- | --- | --- |
| 49 ◇ | 0.0327732 | 0.317494 | 0.0111446 |
| 281◇ | 0.0284353 | 0.150003 | 0.038958 |
| 15 ◆ | 0.0874098 | 0.0277616 | 0.00250841 |
| 22 ◆ | 0.12758 | 0.016336 | 0.00150196 |
| 28 ◆ | 0.213052 | 0.137427 | 0.0053675 |
| 114◆ | 0.0224882 | 0.0109166 | 0.00794253 |
| 121◆ | 0.0261913 | 0.00516763 | 0.00855571 |
| 173◆ | 0.0288609 | 0.00394709 | 0.0159847 |
| 195◆ | 0.0646041 | 0.0312367 | 0.0201086 |

注：◇表示PM+ILD组表达显著增加的蛋白质点；◆表示PM+ILD组表达显著减少的蛋白质点。

#### 3.2 差异蛋白质点质谱鉴定结果

##### 3.2.1 挖取29个表达差异蛋白质点的其中15个点，37℃下胰蛋白酶酶解，样品干燥后行MALDI-TOF质谱分析。与SwissProt数据库匹配，成功鉴定蛋白质和对应的match ID (表1.8)。

表 1.8 成功鉴定的蛋白质质谱结果

| Match ID | 序列号 | 蛋白质名称 | 分子量 | 等电点 | 鉴定分数 | 表达量 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 167 | P25311 | Zinc-alpha-2-glycoprotein  （锌-ａ2-糖蛋白） | 33850.9 | 5.57 | 276 | ↓ |
| 214, 269  441, 292 | P02787 | Serotransferrin  （转铁蛋白） | 76999.6 | 6.81 | 280 | ↓ |
| 231, 239  245, 248 | P02765 | Alpha-2-HS-glycoprotein  （ａ2-H2-糖蛋白） | 39299.7 | 5.43 | 321 | ↓ |
| 293 | P04217 | Alpha-1B-glycoprotein  （ａ-1β-糖蛋白） | 54238.6 | 5.58 | 595 | ↓ |
| 287 | P02749 | Beta-2-glycoprotein 1  （β2-糖蛋白 1） | 38272.7 | 8.34 | 396 | ↑ |
| 18 | P02735 | Serum amyloid A protein  （血清淀粉样蛋白 A） | 13523.5 | 6.28 | 301 | ↑ |

表1.8 （续）

| Match ID | 序列号 | 蛋白质名称 | 分子量 | 等电点 | 鉴定分数 | 表达量 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 78 | P02647 | Apolipoprotein A-I  （载脂蛋白 A1） | 30758.9 | 5.56 | 340 | ↑ |
| 148 | P10909 | Clusterin  （凝集素） | 52461 | 5.89 | 319 | ↑ |
| 13 | P02768 | Serum albumin  （血清白蛋白） | 69321.5 | 5.92 | 267 | ↑ |

注：\*蛋白质点以其Match ID号表示。ZAG(Zinc-alpha-2-glycoprotein, 锌-ａ2-糖蛋白)；TRF

（Serotransferrin ，血清铁转运蛋白）；AHSG (Alpha-2-HS-glycoprotein, ａ2-Hs-糖蛋白)；A1BG（Alpha-1B-glycoprotein, ａ-1β-糖蛋白）；β2-GP1(Beta-2-glycoprotein 1, β2-糖蛋白1)；ALB (Serum albumin，血清白蛋白)；SAA1(Serum amyloid A protein, 血清淀粉样蛋白A1)；APO-A1(Apolipoprotein A-I, 载脂蛋白A1)；CLU(Clusterin，凝集素)

##### 3.2.2 PM的9种差异蛋白质质谱图谱

1）蛋白质点Match ID 13的质谱分析鉴定为血清白蛋白（ALB），肽指纹图谱见图1.3A, 肽序列串联质谱（MS/MS）分析图见图1.3B。



图1.3 A蛋白质点Match ID 13的肽指纹图谱

注：图中的最高峰即表示该鉴定的蛋白峰。



图1.3B 蛋白质点Match ID 13的肽序列（质荷比1358.62）MS/MS分析图

2）蛋白质点Match ID 18的质谱分析鉴定为血清淀粉样蛋白A1（SAA1），肽指纹图谱见图1.4A，肽序列串联质谱（MS/MS）分析图见图1.4B。



图1.4 A蛋白质点Match ID 18的肽指纹图谱



图1.4B 蛋白质点Match ID 18肽序列（质荷比1670.78）MS/MS分析图

3）蛋白质点Match ID 78的质谱分析鉴定为载脂蛋白A1（APO-A1），肽指纹图谱见图1.5A，肽序列串联质谱（MS/MS）分析图见图1.5B。



图1.5 A蛋白质点Match ID 78的肽指纹图谱



图1.5B 蛋白质点Match ID 78的肽序列（质荷比1318.61）MS/MS分析图

4）蛋白质点Match ID 148的质谱分析鉴定为凝集素（CLU），肽指纹图谱见图1.6A，肽序列串联质谱（MS/MS）分析图见图1.6B。



图1.6 A蛋白质点Match ID 148的肽指纹图谱



图1.6B 蛋白质点Match ID 148肽序列（质荷比1872.86）MS/MS分析图

5）蛋白质点Match ID 167的质谱分析鉴定为锌-ａ2-糖蛋白（ZAG）、血清白蛋白

（ALB）。血清白蛋白肽指纹图谱\肽序列串联质谱见图1.3A、1.3B。锌-ａ2-糖蛋白

（ZAG）肽指纹图谱见图1.7A，肽序列串联质谱（MS/MS）分析图见图1.7B。



图1.7 A蛋白质点Match ID 167的肽指纹图谱



图1.7B 蛋白质点Match ID 167的肽序列（质荷比855.5）MS/MS分析图

6）蛋白质点Match ID 214、269、292、441的质谱分析都鉴定为血清铁转运蛋白

（TRF），肽指纹图谱见图1.8A，肽序列串联质谱（MS/MS）分析图见图1.8B



图1.8 A蛋白质点Match ID 214的肽指纹图谱



图1.8B 蛋白质点Match ID 214的肽序列（质荷比611.4）MS/MS分析图

7）蛋白质点Match ID 231、239、245、248 的质谱分析都鉴定为ａ2-Hs-糖蛋白

（AHSG），肽指纹图谱见图1.9A，肽序列串联质谱（MS/MS）分析图见图1.9B



图1.9 A蛋白质点Match ID 231的肽指纹图谱



图1.9B 蛋白质点Match ID 231的肽序列（质荷比1957.8）MS/MS分析图

8）蛋白质点Match ID 287的质谱分析鉴定为β2-糖蛋白1（β2-GP1），肽指纹图谱见图1.10A，肽序列串联质谱（MS/MS）分析图见图1.10B



图1.10 A蛋白质点Match ID 287的肽指纹图谱



图1.10B 蛋白质点Match ID 287的肽序列（质荷比1471.6）MS/MS分析图

9）蛋白质点Match ID 293的质谱分析鉴定为ａ-1β-糖蛋白（A1BG），肽指纹图谱见图1.11A，肽序列串联质谱（MS/MS）分析图见图1.11B



图1.11 A蛋白质点Match ID 293的肽指纹图谱



图1.11B 蛋白质点Match ID 293的肽序列（质荷比877.6）MS/MS分析图

## 三、 讨 论

多发性肌炎起病隐匿，PM患者在合并间质性肺病基础上，易发生肺部感染，加之由于肌炎引起的呼吸肌无力易导致分泌物潴留，糖皮质激素及免疫抑制剂的应用，部分抗风湿药物引起肺纤维化的副作用，故增加了患者的病死率。因此，国内外学者致力对多发性肌炎及合并肺间质病变的相关因素进行研究，旨在发现

PM及并ILD早期且有效诊治的指标。

蛋白质组学是一门新兴的学科，是以基因组编码全部蛋白质的表达及其活动方式（包括翻译后修饰、转运定位、结构变化、蛋白质间及其他相互作用等）为研究对象，采用高分辨率的蛋白质分离手段，结合高通量的蛋白质鉴定技术，可全面研究在特定情况下蛋白质表达谱。因蛋白质组学可以从细胞水平和整体水平研究蛋白质的组成及其变化规律，从而深入认识机体的各种生理和病理过程，故越来越多被应用于疾病的发病机制研究。关于蛋白质组学研究多发性肌炎的报道尚不多见，仅见于国外Passadore[13]初次报道，国内尚未见相关报道。但该研究具有两个缺陷，第一，仅检测出与疾病的预后相关的细胞骨架蛋白，并未深入探讨相关蛋白参与多发性肌炎的发病具体机制。第二，采用局限于病变部位肺泡灌洗液作为样本，而未采用蛋白质表达数量最多的血液标本。在血液里的表达蛋白质可反映全身各器官的协调功能而表达蛋白，与其疾病发病机制最有可能关联。

由于PM发病率低，合并ILD的病例少，加之我们在选择疾病组时要严格排除各种可能的影响因素，保证三组能较好的匹配，所以入组的病例较少。因此，本研究在应用蛋白质组学对PM、PM+ILD组与HD组三组血清进行分析时，将3组混合血清在同等条件下重复进行3次双向电泳，获得3组蛋白图谱。经软件分析，

获得15个表达明显差异蛋白点，经质谱分析技术成功鉴定为9种蛋白质，以下对它们可能发挥的功能进行讨论：

第一、可能参与PM发病进程的蛋白

作为载脂蛋白家族中的高度异质类蛋白的血清淀粉样蛋白A（Serum Amyloid

A，SAA）是一种非常敏感的急性时相反应物，同时也是监测炎症的指标[14]。SAA的前体即淀粉样原纤维（AA）对PM患者血管的基底膜、细胞、细胞器膜、核膜进行细胞毒性作用，促使PM的血管内皮增厚、基底膜改变及血管增殖等，造成PM皮肤损害与ILD. SAA可能参与多发性肌炎的炎症过程和发挥细胞毒功能从而破

坏肌细胞的作用。

凝集素（Clusterin, CLU）是一种硫化二聚体糖蛋白，相对分子量75000～

80000，因在体外可使细胞聚集故名，其执行功能的区域可能在脾脏生发中心而非淋巴结[15]。CLU具有组织损伤后重建、脂质转运、细胞粘附、调节细胞凋亡、调节补体活化等功能。PM是一种自身免疫性疾病，可产生多种抗体。CLU作为补体溶解抑制物，与C5b-9相作用，使免疫复合物丧失活性，阻止抗体依赖补体介导的细胞溶解及炎症反应，从而限制补体介导炎症反应。另外，细胞内CLU是新一代的惰性细胞毒素的变体，参与慢性内质网应激反应[16]，造成肌肉缺氧、损伤。CLU起保护机制因素还是致病性因素？值得进一步研究。

载脂蛋白A1（Apolipoprotein A-1, apo A-1）是一种负急性时相蛋白，可抑制炎症过程多个环节，起抗炎症保护作用[17]。PM、PM+ILD患者治疗前与治疗后的生化指标显示，治疗前后的HDL与apo A-1皆存在显著性差异，提示在自身免疫病中apo A-1以降低浓度以起保护作用，与其他报道一致[18]。

血清白蛋白（Serum albumin, ALB）在一定程度上反应体内炎症反应程度和患者一般消耗状态[19]。低白蛋白症是PM预后不良的独立危险因素，也是PM合并

ILD的预测因子[20]。在本次研究中，apo A-1、ALB对PM组患者可能起的是反馈性保护功能。

β2-糖蛋白1(Beta-2-glycoprotein 1, β2-GP1)是一种单链糖蛋白，主要由肝细胞产生。正常生理状态下，β2-GP1蛋白发挥着抗凝、参与细胞清除和脂质代谢的作用[21]。脂多糖和β2-GP1是对相互作用的蛋白，二者特异性结合后依赖Toll样受体4信号传导通路激活巨噬细胞的NF-κB[22]。持续激活NF-kB可释放大量炎症因子[23-24]，引发细胞损伤和炎症反应。β2-GP1可能参与了PM的炎症与损伤肌细胞的过程。β2-GP1还参与脂质代谢，促使动脉粥样硬化，增加患心血管病变的风险[25]。而其抗体—抗β2-GP1抗体也参与自身免疫性疾病（系统性红斑狼疮）的心血管病变[26-27]。故PM心血管病变可能有β2-GP1与其抗体的所共同参与。

第二、可能参与PM+ILD发病进程的蛋白

锌-ａ2-糖蛋白（Zinc-alpha2-glycoprotein, ZAG）是一种分泌性蛋白，参与癌性恶病质的形成[28]。主要通过促进机体脂肪分解和增加产热双重途径来减少体内脂肪。当小鼠患MAC16肿瘤后其ZAG分泌明显增高，表现出明显恶病质，体质量下降，同时脂肪含量显著减少。本研究对PM及PM+ILD组患者进行回顾性分析

其生化指标发现，PM与PM+ILD组患者的TC与TG水平均明显高于对照组（*P*<0.05），且PM+ILD组TC水平要高于PM组（*P*<0.05）。在本研究中，ZAG表达水平在PM+ILD组＜PM组。故推测PM合并ILD后使ZAG产生减少，同时也降低合并恶性肿瘤可能性，与国内外学者关于PM/DM合并恶性肿瘤时再发生ILD的现象相对少见的报道一致[29]。

ａ2-Hs-糖蛋白（Alpha2-Hs-glycoprotein, AHSG）是一种负急性时相反应蛋白，可通过抑制炎症细胞激活及炎症因子的释放达到抗炎症的作用。AHSG表达水平在

PM+ILD组＜PM组，提示由于AHSG的降低使得PM+ILD组患者体内炎症细胞激活及炎症因子释放的抑制作用减弱，加速ILD的进程。

ａ-1β-糖蛋白（Alpha－1β－glycoprotein, A1BG）是一种酸性球蛋白，在肺癌[30]、类风湿关节炎[31]等疾病发现过该蛋白，具体功能未知。A1BG可能参与了

PM+ILD的进展，或是疾病的一种伴发现象。第三、可能参与PM及PM+ILD疾病进展的蛋白

氧化应激参与了肺泡上皮细胞损伤和纤维化，氧化应激水平明显升高时，抗氧化物明显降低。当氧化与抗氧化失衡时，肺纤维化发生更为显著[32-33]。转铁蛋白（Serotransferin, TRF）是一种体内常见的抗氧化物质。在本次研究中，蛋白组学的TRF表达水平在PM+ILD组＜PM组＜对照组，提示TRF可能参与PM和PM+ILD疾病的进展。

目前，本实验仍存在一定的局限性：1）由于严格限制入选条件，故符合实验入选标准的病例太少。2）本次实验运用考马斯亮蓝染色法，其较银染法灵敏度明显减低（银染的灵敏度是考染的的50 倍），故凝胶蛋白质点较少，不利于发现异常表达的低丰度蛋白。3）2－DE方法学上的局限性，主要是对低丰度蛋白质、疏水性蛋白、极度酸性或碱性蛋白、极高或极低相对分子质量等蛋白不能进行有效分离。尤其是外周血清蛋白质数量多，来源广，蛋白质差别大，都在一定程度上限制蛋白质组学的研究。改进方案：在取材方面采用血清以外的标本，如提纯的淋巴细胞等应用于蛋白质组学，以提高生物学标志物的检出率与特异性。4）2－

DE方法学敏感度不高，对与疾病的免疫反应相关性指标获得较少。5）进一步扩大样本量，增加其它新技术做进一步验证。

综上所述，9种蛋白SAA、CLU、ALB、apo A-1、ZAG、AHSG、A1BG、β2-GP1、

TRF等为进一步深入研究PM及PM合并ILD的致病机制提供了方向，但它们如何参

与疾病的进程和具体的作用，以及是否所有的PM+ILD、PM病例都存在相同的差异表达蛋白仍然需要大样本的验证实验来进一步明确。详见第二部分内容。

# 第二部分 多发性肌炎检测出的**4**种血清蛋白的验证

初步判定有4种蛋白中最可能参与多发性肌炎及合并肺间质病变发病机制，即：转铁蛋白、血清淀粉样蛋白A、凝集素、β2-糖蛋白1。因此，本次试验采用ELISA的方法，以上述四种蛋白质作为验证对象，为进一步探讨它们在PM伴和PM不伴

ILD的发病机制中所起的作用奠定基础。

###### 一、材料及方法

## **1**.材料

#### 1.1 病例来源

本研究严格按照赫尔辛基宣言执行，所有患者样本及健康对照组样本均获得福建医科大学附属第二医院的地方伦理委员会许可。共收集PM组13例，男性 5

例，女性8例；PM+ILD组6例，男性2例，女性4例。疾病对照组SLE组20例，

男性1例，女性19例。正常健康对照组20例，男性7例，女性13例。

#### 1.2 入选标准

满足第一部分的入选标准，PM组、PM+ILD组均满足无发生感染，无合并恶性肿瘤、甲状腺疾病等因素，符合1975年Bohan和Peter提出了IIM的诊断标准。SLE组满足无合并肺间质疾病，无发生感染，无合并恶性肿瘤、甲状腺疾病等因素，SLE的诊断符合1997年美国风湿病学会(ACR)修订的SLE分类标准。

#### 1.3 样本收集及预处理

每例取静脉血6ml，置室温20分钟，3000r/min，离心15分钟，取上清，分装于EP管，-80度冰箱保存备用

## **2.** 方法

#### 2.1 临床免疫学指标与生化指标测定

抗核抗体、抗Jo-1抗体等采用德国欧蒙公司的免疫荧光和免疫印迹法检测。总胆固醇、甘油三酯、高密度脂蛋白、载脂蛋白A1、肌酸激酶、乳酸脱氢酶、天门冬氨酸氨基转移酶、丙氨酸氨基转移酶等采用CX-5型全自动生化分析仪检测（美

国BECKMAN公司)。

#### 2.2 主要试剂

人血清淀粉样蛋白A（SAA）酶联免疫分析试剂盒美国R& D公司人凝集素（Clusterin）酶联免疫分析试剂盒美国R& D公司人微量转铁蛋白（MTF）酶联免疫分析试剂盒 美国R& D公司人β2-糖蛋白1(β2-GP1)酶联免疫分析试剂盒 美国R& D公司

#### 2.3 主要设备

1）酶标仪：德国TECAN公司

2）漩涡振荡器：海门市其林贝尔仪器制造有限公司

3）隔热式恒温培养箱：上海跃进医疗器械厂

#### 2.4 实验步骤

##### 2.4.1 选取样本PM组13例，PM +ILD组6例，SLE组20例，健康对照组20

例。实验前将血清和试剂盒从冰箱取出，室温平衡30分钟。

##### 2.4.2 实验操作

###### 2.4.2.1 人血清淀粉样蛋白A和人凝集素采用酶联免疫吸附法间接法，具体的操作步骤如下。

A、标准品的稀释将原倍标准品一支在小试管中进行梯度稀释（表2.1）。

表 2.1 标准品的稀释

| 编 号 | 标准品体积  （ul） | 标准品稀释液体积  （ul） | 浓 度  （ng/ul） |
| --- | --- | --- | --- |
| 5 号标准品 | 原倍标准品 150 | 150 | 24 |
| 4 号标准品 | 5 号标准品 150 | 150 | 12 |
| 3 号标准品 | 4 号标准品 150 | 150 | 6 |
| 2 号标准品 | 3 号标准品 150 | 150 | 3 |
| 1 号标准品 | 2 号标准品 150 | 150 | 1.5 |

B、加样分别设空白孔（空白对照孔不加样品及酶标试剂，其余各步骤操作相同）、标准孔、待测样品孔。在酶标包被板上标准品准确加样50 ul，待测样

品孔中先加样品稀释液40 ul，然后再加待测样品10 ul（样品最终稀释度为 5

倍）。加样将样品加于酶标板孔底部，尽量不触及孔壁，轻轻晃动混匀。

C、温育用封板膜封板后置37℃恒温箱孵育30分钟。

D、配液将30倍浓缩洗涤液用蒸馏水稀释后备用。

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| E、 | 洗涤 | 小心揭掉封板膜，酶标板置于洗板机上洗涤 4 次，拍干。 |
| F、 | 加酶 | 每孔加入酶标试剂 50 ul，空白孔除外。 |
| G、 | 温育 | 操作同步骤 3. |
| H、 | 洗涤 | 操作同步骤 5. |
| I、 | 显色 | 每孔先加入显色剂 A 50 ul，再加入显色剂 B 50 ul，轻轻震荡混匀， |

37℃恒温箱孵育10分钟。

J、终止每孔加终止液50 ul，终止反应（此时蓝色产转黄色）。

K、测定以空白孔调零，450 nm波长依序测量各孔的吸光度。测定在加终止液后15分钟以内进行。

L、绘制标准曲线，并计算出各孔的浓度值。

###### 2.4.2.2 人微量转铁蛋白、人β2-糖蛋白1采用酶联免疫吸附法双抗体夹心一步法，具体的操作步骤如下。

A、从室温平衡20min后的铝箔袋中取出所需板条。

B、设置标准品孔和样本孔，标准品孔各加不同浓度的标准品50μL；

C、样本孔先加待测样本10μL，再加样本稀释液40μL；空白孔不加。

D、除空白孔外，标准品孔和样本孔中每孔加入辣根过氧化物酶标记的检测抗体

100μL，用封板膜封住反应孔，37℃水浴锅或恒温箱温育60min。

E、弃去液体，吸水纸上拍干，每孔加满洗涤液，静置1min，甩去洗涤液，吸水纸上拍干，如此重复洗板5 次。

F、每孔加入底物A、B各50μL，37℃避光孵育15min。

G、每孔加入终止液50μL，15min内，在450nm波长处测定各孔的吸光度。

H、绘制标准曲线，并计算出各孔的浓度值。

#### 2.5 统计学分析

用SPSS17.0统计软件包行统计分析，非参数检验方法。由于显著偏态分布的资料，以中位数（M）及四分位间距表示，组间比较采用Mann-Whitney U检验，当 *P*

＜0.05时为具有统计学意义。

###### 二、结果

## **1. PM**组、**PM+ILD**组、**SLE**组与**HD**组一般情况（表**2.2、2.3**）

表 2.2 PM、PM+ILD、SLE、HD组一般情况特征

例数性别年龄

间质性肺病

抗Jo-1抗体

抗核抗体

| 组别 ( n) | 男 | 女 | （岁） | ( n) | (n) | ( n) |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| HD 20 | 6 | 14 | 44.76±13.64 | 0 | 0 | 0 |
|  |  |  |  |  |  |  |
| PM 13 5 | | 8 | 47.26±15.40 | 0 | 3 | 4 |
| PM+ILD 6 2 | | 4 | 47.33±19. 14 | 6 | 5 | 2 |
| SLE 20 1 | | 19 | 46.8±1 7.05 | 0 | 0 | 20 |

注：PM：多发性肌炎；ILD：肺间质病变；SLE：系统性红斑狼疮；HD：健康对照组。

表 2.3 PM、PM +ILD与HD组部分生化指标

| 组 别 | PM | PM +ILD | HD |
| --- | --- | --- | --- |
| 总胆固醇(mmol·L -1) | 5.613±0.3194 | 7.28±0.4592 | 1.787±0.3194 |
| 甘油三脂(mmol·L -1) | 2.813±0.6969 | 2.01±0.1323 | 0.74±0.1670 |
| 高密度脂蛋白(mmol·L -1) | 0.97±0.226 | 0.837±0.380 | 1.073±0.167 |
| 载脂蛋白 A1(mmol·L -1) | 1.037±0.212 | 1.033±0.341 | 1.883±1.59 |
| 肌酸激酶（IU/L） | 2918.53±467.34 | 2718.53±412.34 | 55±4.3 |
| 乳酸脱氢酶（IU/L） | 528.16±84.57 | 512.13±67.50 | 115±3.2 |
| 天门冬氨酸氨基转移酶（IU/L） | 121.09±19.39 | 119.09±17.35 | 21±1.9 |
| 丙氨酸氨基转移酶（IU/L） | 147.5±23.6 | 167.5±32.1 | 19±4.5 |

注：PM：多发性肌炎；ILD：肺间质病变；HD：健康对照组。

## **2.** 测定差异蛋白的血清浓度

4种差异蛋白血清淀粉样蛋白A、凝集素、微量转铁蛋白、β2-糖蛋白1在PM、

PM+ILD、SLE、HD组的血清浓度（表2.4）。

表2.4 差异蛋白在PM、PM +ILD及HD组的血清浓度

| 组 别 | 例 数  （n） | SAA  中位数（IQR）  （ng/L） | CLU  中位数（IQR）  （ng/L） | MTF  中位数（IQR）  （ng/L） | β2-GP1  中位数（IQR）  （ng/L） |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| PM | 13 | 609.0  （371.0/843.0） | 13.0  （9.75/19.25） | 4.06  （3.76/4.83） | 5.00  （1.77/5.94） |

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |  |  |  |  |
|  | PM+ILD | 6 | 798.5  (536.3/1139.6) | 14.0  (10.3/16.1) | 4.67  (2.88/6.21) | 5.04  (2.76/5.22) |  |

表2.4 （续）

| 组 别 | 例 数  （n） | SAA  中位数（IQR）  （ng/L） | CLU  中位数（IQR）  （ng/L） | MTF  中位数（IQR）  （ng/L） | β2-GP1  中位数（IQR）  （ng/L） |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| SLE | 20 | 634.0  (516.3/1267.0) | 11.5  (9.0/22.5) | 3.34  (1.20/4.64) | 3.75  (1.74/4.42) |
| HD | 20 | 617.0  (456.25/799.25) | 8.0  (6.0/10.25) | 3.45  (2.0/9.59) | 2.29  (1.88/8.76) |

注：IQR代表四分位数间距；SAA：血清淀粉样蛋白A；CLU：人凝集素；MTF：人微量转铁蛋白；β2-GP1：人β2-糖蛋白1；PM：多发性肌炎；ILD:肺间质病变；SLE：系统性红斑狼疮；HD：健康对照。

## **3.** 各组差异蛋白的比较与分析

### 4 种差异蛋白的血清浓度在PM、PM+ILD、SLE、HD组的组间比较（表2.5）。表2.5差异蛋白在PM、PM +ILD、SLE、HD组的组间比较

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 组别 | SAA | CLU | MTF | β2-GP1 |
|  | Z 值 *P* 值 | Z 值 *P* 值 | Z 值 *P* 值 | Z 值 *P* 值 |
| PM: HD | -0.105 0.917 | -2.452 0.014 | -1.759 0.079 | -0.858 0.391 |
| ILD: HD | -1.121 0.263 | -2.454 0.014 | -0.841 0.401 | -1.121 0.263 |
| SLE: HD | -0.884 0.399 | -2.573 0.01 | -0.567 0.571 | -0.362 0.718 |
| PM: ILD | -1.052 0.293 | -0.132 0.895 | -0.263 0.792 | -0.001 1.0 |
| ILD: SLE | -0.21 0.834 | -0.491 0.623 | -1.4 0.161 | -1.54 0.123 |
| PM: SLE | -1.193 0.233 | -0.399 0.69 | -1.235 0.217 | -1.277 0.202 |

注：PM：多发性肌炎；ILD：肺间质病变；SLE：系统性红斑狼疮；HD：健康对照；SAA：血清淀粉样蛋白A；CLU：人凝集素；MTF：人微量转铁蛋白；β2-GP1：人β2-糖蛋白1；*P*

＜0.05有统计学意义。

**三、讨论**

由于第一部分PM伴和PM不伴ILD以及健康对照均只有3例，这是因为PM发病率低，合并ILD的病例少，加之我们在选择疾病组时要严格排除各种可能的影响因素，保证三组能较好的匹配，所以入组的病例较少。为了减少偏差，我们在ELISA的部分扩大了样本量，并对病例进行严格选择，保证了两部分实验的样本一致性。

PM、PM+ILD的疾病活动度与抗核抗体、抗Jo-1抗体[34-35]、肌酶谱水平相关[36]。

PM患者体内的I型干扰素调节的基因、趋化因子的表达水平同血清肌酶相关水平呈正相关[37-38]。本研究选择的PM、PM+ILD的病例组处于初诊活动期，患者的血清抗核抗体、抗Jo-1抗体、肌酶谱等表达水平与前面文献报道一致。

以下对进行验证的四种蛋白在PM及PM+ILD疾病中可能的作用进一步探讨：

CLU参与组织的损伤修复。在损伤组织中，作为一种退化或损伤组织中基因转录上行调节的蛋白, CLU基因表达升高[39]。且分泌型的CLU是通过抑制DNA合成而不是促进凋亡来阻止受损血管平滑肌细胞的过度增殖，并减少了TNF-α诱导的凋亡发生，促使内皮的一氧化氮合酶表达[40]。在本研究中，发现差异蛋白CLU在PM、

PM+ILD、SLE组患者血清表达增高，与HD组比较呈显著性差异。故推测，CLU由于血管损伤而在PM、PM+ILD、SLE组中表达增高。CLU可能是通过发挥了调节补体活化的功能，阻止抗体依赖补体介导的细胞溶解及炎症反应，从而限制补体介导炎症反应的作用，抑制补体活化及保护细胞膜；以及作为新一代的惰性细胞毒素的变体的CLU可能通过参与慢性内质网应激反应，对患者的肌肉及血管起损伤作用，故CLU在PM、PM+ILD、SLE组的表达水平高于HD组。CLU是否与自身抗体（如：抗信号识别颗粒抗体）引起的坏死性肌病有关？有待进一步研究。PM与ILD组的比较无明显差异，则说明了CLU不是肺间质病变的致病因子。

在病毒和细菌感染时，血清的SAA浓度可在5~6小时升高1000倍左右[41]，是一种非常敏感的急性时相反应物，同时也是监测炎症的指标[42-44]。但在本次研究中SAA在PM、PM+ILD、SLE及HD组间的血清表达皆无显著性差异（*P*＞0.05），说明PM、PM+ILD及SLE疾病的炎症并非由病毒或细菌感染引起，结果与本次收集病例样本的标准相符，同时推测PM、PM+ILD及SLE的炎症由于患者的自身抗体（如：抗核抗体、抗Jo-1抗体等）引起的自身免疫损伤所致。因此，SAA不能作为判断

PM炎症发生的血清生物学标志物。

TRF在蛋白组学的表达水平为PM+ILD组＜PM组＜正常对照组，提示TRF可能参与PM和PM+ILD疾病的进展。但在ELISA验证中，TRF在PM、PM+ILD与HD组间无统计学差异（*P*＞0.05），说明TRF与PM及PM+ILD疾病无关。同样，虽然β2-GP1在PM及PM+ILD组血清表达较HD组高，但三组间比较无显著性差异（*P*＞0.05）。β2-GP1不参与PM、PM+ILD的疾病进展。

综上所述，CLU可能是PM疾病血清生物学标志物的候选分子。SAA、β2-GP1、

TRF与PM及PM+ILD疾病的进展可能无关，是否与病例数不足有关。而未进行验证

的蛋白ALB、apo A-1、ZAG、AHSG、A1BG等为进一步深入研究PM及PM合并ILD的致病机制提供了方向，但它们如何参与疾病的进程和具体的作用，以及是否所有的PM+ILD、PM病例都存在相同的差异表达蛋白仍然需要大样本的验证实验来进一步明确。

结 **论**

CLU可作为PM疾病血清生物学标志物的候选分子。

参考文献

[1] 董建玲, 邹晋梅, 张羽, 等. 多发性肌炎和皮肌炎生存率及死亡原因分析. 华西班医学, 2014, 29（4）: 702-705.

[2] 陈芳, 舒晓明, 王冬雪, 等. 多发性肌炎/皮肌炎患者血清单核细胞趋化蛋白-1的测定及临床意义. 北京大学学报(医学版), 2012, 44(2) : 204－208.

[3] 郑小蔚, 陈小青, 章涛, 等. 特发性炎性肌病外周血干扰素诱导基因表达与临床相关性研究. 中华风湿病学杂志, 2015, 19（2）: 81-86.

[4] Shen H, Xia L, Lu J. Pilot study of interleukin-27 in pathogenesis of dermatomyositis and polymyositis: associated with interstitial lung diseases. Cytokine, 2012, 60(2): 334-337.

[5] 陈芳, 舒晓明, 王冬. 血清抗氨酰tRNA合成酶抗体检测在特发性炎性肌病伴间质性肺疾病中的意义. 中华风湿病学杂志, 2012, 16（2）: 96-101.

[6] Hervier B, Wallaert B. Hachulla E, et a1． Clinical manifestations of anti- synthetase syndrome positive for antialanyl-tRNA synthetase(anti-PLl2) antibodies: 8 retrospective study of 17 case. Rheumatology. 2010, 49: 972-976.

[7] 吴庆君, 张文, 李永哲, 等. 5例抗丙氨酸tRNA合成酶阳性患者临床特征. 中华临床免疫和变态反应杂志, 2014, 8(2): 129-133.

[8] Mileti LM, Strek ME, Niewold TB, et a1． Clinical characteristics of patients with anti-Jo-l antibodies. J Clin Rheumatol. 2009, 15: 254-255．

[9] Saketkoo LA, Ascherman DP, Cottin V, et al. Interstitial lung disease in idiopathic inflammatory myopathy. Curr Rheumatol Rev, 2010, 6(2): 108-119.

[10] 赵千子, 王国春, 刘湘源, 等. 成人多发性肌炎和（或）皮肌炎多器官损害多中心回顾性研究. 中华医学杂志, 2014, 94（1）: 43-46.

[11] 李然, 李向培, 厉小梅, 等. 炎性肌病相关间质肺炎病变的预测指标和预后不良因素分析. 中华医学杂志, 2012, 92（33）: 235-238.

[12] 盛君, 陆进明, 宣丹, 等. 92例多发性肌炎/皮肌炎患者短期生存预后相关因素分析. 中国临床药理学与治疗学. 2014, 19（6）: 674-679.

[13] Passadore I, Iadarola P, DiPoto C, et al. 2-DE and LC-MS/MS for a comparative proteomic analysis of BALf from subjects with different subsets of inflammatory myopathies. Proteome Res, 2009, 8(5): 2331-40.

[14] Susan H, Changjie S, Geczy Carolynl L, et al. A role for acutephase serum amyloid A and high-density lipoprotein in oxidative stress, endothelial dysfunotion and atherosclerosis. Redox Report, 2009, 14(5): 187-196.

[15] Afanasyeva MA, Britanova LV, Komeev KV, et al. Clusterin is a potential lymphotoxin beta receptor target that is upregulated and accumulates in germinal centers of mouse spleen during immune response. PLoS One, 2014, 9(5): e98349.

[16] Kang SW, Yoon SY, Park JY, et al. Unglycosylated clusterin variant accumulates in the endoplasmic reticulum and induces cytotoxicity. Int J Biochem Cell Biol, 2013, 45(2): 221-231.

[17] 林化, 马春林, 王荣辉等. 血清前清蛋白、C反应蛋白及载脂蛋白A1对重症肺炎患者预后评估的价值. 重庆医学, 2014, 43（5）: 529-531.

[18] Wilhelm AJ, Zabalawi M, Owen JS, et al. ApolipoproteinA-1 modulates regulatory T cells in automimmune LDLr-/-, ApoA-I-/-mice. Biol Chem. 2010, 285(46): 36158-36169.

[19] 张乃峥. 炎性肌病（多发性肌炎、皮肌炎）. 第1版上海: 上海科学技术出版社, 1999: 264-273.

[20] Ji SY, Zeng FQ, Guo Q, et al. Predictive factors and unfavourable prognostic factor of interstitial lung disease in patients with polymyositis or dermatomyosites : a retrospective study. Chin Med J(Engl), 2010, 123(5): 517-522.

[21] Agar C, de Groot PG, Levels JH, et al. Bata-2-glycoprotein I is in correctly named apolipoprotein H. Thromb Haemost, 2009, 7: 235-236.

[22] Laplante P, Amireault P, Subang R, et al. Interaction ofβ-2-GlycoproteinⅠwithlipopolysaccharide leads to Toll-like receptor 4 (TLR4)-dependent activation of macrophages. Biol Chem, 2011, 286: 42494-42503.

[23] Ikebe M, Kitaura Y, Nakamura M, et al. Lipopolysaccharide(LPS) increase the invasive ability of pancreatic cancer cells through the TLR4/MyD88 signaling

Pathway. Surg Oncol, 2009, 100: 725-731.

[24] Szajnik M, Szczepanski MJ, Czystowska M, et al. TLR4 signaling induced by lipopoiysaccharide or paclitaxel regulates tumor survival and chemoresistance in ovarian cancer. Oncogene, 2009, 28: 4353-4363.

[25] 孟娟, 郑毅. 血清抗B2糖蛋白I抗体与系统性红斑狼疮患者心血管病变的关系. 中华风湿病学杂志, 2012, 16(6): 414-417.

[[26] Habe K](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Habe%20K%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23378183), [Wada H](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Wada%20H%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23378183), [Matsumoto T](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Matsumoto%20T%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23378183), et al. Presence of antiphospholipid antibody is a risk factor in thrombotic events in patients with antiphospholipid syndrome or relevant diseases[J]. [Int J Hematol,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23378183) 2013, 97(3): 345-50.

[27] Petri M, Systemic Lupus International Collaborating Clinic(SLICC); SLICCRevision ofthe ACR Classification Criteria for SLE [J]. Arthritis Rheum. 2009, 60(Suppl10): 895．

[28] Bing C, Trayhum P. Regulation of adipose tissue metabolism in cancer cachexia. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2008, 11(3) 201-207.

[29] 苟丽娟, 苏金梅, 赵岩, 等. 皮肌炎和多发性肌炎伴发肿瘤临床特点及文献回顾. 中华临床免疫和变态反应杂志, 2012, 6（4）: 295－299.

[30] Yansheng Liu, Xiaoyang Luo, Haichuan Hu, et al. Integrative Proteomics and Tissue Microarray Profiling Indicate the Association between Overexpressed Serum Proteins and Non-Small Cell Lung Cancer. PLoS One. 2012; 7(12): e51748.

[31] Sagarika Biswas, Saurabh Sharma, Ashish Saroha, et al. Identification of Novel Autoantigen in the Synovial Fluid of Rheumatoid Arthritis Patients Using an Immunoproteomics Approach. PLoS One. 2013, 8(2): e56246.

[32] Walters DM, Cho HY, Kleeberger SR10xidateve stress and antioxidants in the pathogenesis of pulmonary fibrosis apotential role for nrf2. Antioxid Redox sigal, 2008, 10(2): 321-332.

[33] Liu R, Ahmed KM, Nantajit D, et al. Therapeutic effects of alpha-lipoic acid on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. Int J Mol Med, 2007, 19(6) 865-873.

[34] Connors G R, Christopher-Stine L, Oddis C V, et al. Interstitial lung disease

Associated with the idiopathic inflammatory myopathies: what progress has been made in the past 35 years. Chest, 2010, 138: 1464- 1474.

[35] 陈芳, 王国春. 多发陛肌炎／皮肌炎合并间质性肺疾病预测因素的Meta分析. 中华风湿病学杂志, 2011, 15（9）: 588-591.

[36] 谢瑶, 舒晓明, 卢昕, 等. 多发性肌炎和皮肌炎血清抗Jo-1抗体水平与疾病活动度相关性研究. 中华风湿病学杂志, 2011, 15（11）: 742-745.

[37] 王云霞, 方琪, 李旺俊, 等. 血清抗Jo-1抗体和抗核抗体与多发性肌炎患者心、肺损害的关系. 临床神经病学杂志, 2010, 23（3）: 214-215.

[38] Niewold TB, Kariuki SN, Morgan GA, et a1. Elevated serum interferon-activity in juvenile dermatomyositis: associations with disease activity at diagnosis and after thirty-six months of therapy. Arthritis Rheum, 2009, 60: 1815-1824.

[39] 郑晓梅, 刘亮, 李小刚. 载脂蛋白J在脑血管疾病中的研究进展. 华西医学. 2009, 24（12）: 3268-3270 .

[40] Kim H J, Yoo E K, Kim J Y, et al. Protective role of clusterin/apolipoprotein J against neointimal hyperplasia via antiproliferative effect on vascular smooth muscle cells and cytoprotective effect on endothelial cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2009, 29(10): 1558-1564.

[41] 邓文蓉, 肖桃源. 血清淀粉样蛋白A与疾病的相关性. 现代医药卫生. 2013, 29(7): 1032-1034 .

[42] Yang RZ, LeeM J, H u H, eta. l Acute-phase serumamy loid A: an inflammatory adipokine and potential link between obesity and its metabolic complications. PLosMed, 2006, 3(6): 884-894.

[43] 沈忱, 穆云, 刘娜. 血清淀粉样蛋白A与类风湿关节炎疾病活动度的相关性研. 天津医药, 2014, 42(3): 245-247.

[44] 杨学娟, 冯喜英, 张嫚, 等. 血清淀粉样蛋白A与呼吸系统疾病的研究进展. 临床肺科杂志. 2014, 19（8）: 1502-1504.

###### 综述

**特发性炎性肌病并肺间质疾病的发病机制研究进展**

特发性炎症性肌病( IIM)是以肌肉炎症为特征的全身性自身免疫病，包括皮肌炎、多发性肌炎、包涵体肌炎及儿童皮肌炎等，表现为横纹肌慢性、非化脓性炎症病变，横纹肌组织中有淋巴细胞浸润，血清中可出现肌炎特异性自身抗体。往往具有多脏器损害特点，尤以肺间质病变(interstitial lung disease, ILD)较为常见且严重[1]，ILD发生率可高达40％～60％。PM／DM患者五年死亡率较高(23.5％)，影响预后的因素有伴发其他结缔组织病、合并肿瘤[2]及间质性肺病[3]。合并ILD患者往往病情重[4]，进展快，预后差，病死率在20％～30％[5-9]。

继发于多发性肌炎、皮肌炎的ILD病程可分为急性、亚急性和慢性，慢性患者可出现急性加重，合并急性或亚急性间质性肺炎患者间质性肺病症状出现早，进展快，死亡率极高[10-11]。组织病理学类型可分为非特异性间质性肺炎、机化性肺炎、弥漫性肺泡损伤、普通型间质性肺炎以及混合型。间质性肺病基础上，糖皮质激素及免疫抑制剂的应用，此类患者易发生肺部感染，加之由于肌炎引起的呼吸肌无力易导致分泌物潴留，部分抗风湿药物引起肺纤维化的副作用，增加了患者的病死率。而对于间质性肺病的治疗，目前尚无切实有效的药物，仍以皮质激素及免疫抑制剂为主[12]，且治疗效果主要取决于肺部病理类型而非临床表现。且有患者对多种免疫抑制剂耐药，或在免疫抑制剂减量后复发，导致治疗失败

[13-14]。目前，国内已经出现评价PM／DM患者活动性及药物疗效的工具，在辨别疾病活动性变化方面具有较好的辨别能力[15]。但PM和PM并ILD的发病机制至今仍不明确，因此积极探索这种难治性疾病的发病机制，已渐引起学者们的关注。

目前，PM／DM诊断仍采用符合Bohan和Peter的诊断标准[16]：（1）对称性肌无力，肌痛；（2）肌酶增高；（3）皮疹：向阳疹表现为上眼睑紫红色水肿性红斑，Gottron征是在肌肉及远端指关节表面的紫红色角化、萎缩性红斑，远端关节伸侧红斑及在肘及膝关节处的高出皮面的红斑；（4）肌电图呈肌源性损害；（5）肌活检阳性：肌纤维大小不等，可见肌纤维变性、坏死和再生，间质血管增生，炎症细胞浸润。具备上述5条中任意4条。但是B／P标准对多发性肌炎存在过度诊断、误诊风险，

不能将PM与包涵休肌炎等其它炎性肌病鉴别。因此，2004年欧洲神经肌肉疾病中心国际会议中提出的IIM新的分类诊断标准（ENMC标准）,将ENMC纳入免疫病理，增加了临床与病理诊断的排除标准，其分型诊断准确性优于B／P标准，是目前临床最具有代表性、最常用的IIM诊断标准。该标准将IIM分为5类为：PM、

DM、IBM、非特异性肌炎（NSM）和免疫介导的坏死性肌炎（IMNM）。其中NSM和IMNM是第一次被明确定义。肺间质病变的诊断则依照标准：（1）无明确原因的干咳、轻微活动后气促或Velcro罗音。（2）胸片或肺部薄层CT扫描(HRCT)显示有间质性改变如条索影、毛玻璃影、实变影、蜂窝状改变等[17]。（3）肺功能检查示限制性通气功能障碍和/或肺换气功能障碍。具备上述两项即可诊断ILD。

随着对该病研究的不断深入和新的研究技术的使用，近年来人们对该病发病机制的认识不断加深，大都认为本病与自身免疫异常有关，非免疫机制亦牵涉其中。本文就该病发病的相关研究进展做一综述。

1. 遗传因素

①HLA基因在其发病过程中的作用[18]：HLA的糖链结构的异常变化与细胞恶性转化与机体病变有着密切的联系，可能引发自身免疫疾病[19]。IIM被认为是环境因素作用于遗传易感者而产生，有种族差异。HLA-Ⅱ类基因HLA-DRB1\*0301和与它连锁的等位基因DQA1\*0501 以及单体型AH8.1 已被许多研究证实是IIM的主要遗传危险因素，在白种人中表达最为显著。相同HLA等位基因在不同种族及表型中可为IIM遗传危险因素或保护因素。大量的基因分析，特定HLA等位基因被证实为各型肌炎的普遍危险因素，例如AH 8.1(HLA-A\*0101: B\*0801：

CW\*0701: DRB1\*0201: DQA1\*0501），且此单倍体还与抗JO-1相关[20]。有学者研究证实PM/DM存在遗传易感基因，有种族差异。在美国成人皮肌炎中，HLA\*A68是发病的危险因素，DQA1\*0301是成人及儿童皮肌炎的危险因素，而DQA1\*01和DQA1\*0201则为保护因素。中国人DM/PM的HLA单倍型基因

HLA-DRB1\*040x-DQB1\*0301、HLA-DRB1\*040x-DQB1\*0401单倍型频率在组出

现频率明显增加。而日本人单倍型显示：PM伴肺间质损害的患者表达

HLA-DRB1\*0405-DQA1\*03-DQB1\*0401单倍型(占50.0%), PM患者表达HLA

（占5.5%）。其中，当单倍型HLA- DQA1\*0501阳性时，肺间质纤维化发生率较高

（占39.1%），故HLA- DQA1\*0501是PM合并ILD的危险因素。Betteridge[21]发现基因HLA-DRB1\*03及HLA-DQA1\*05与抗JO-1，抗Mi-2，抗PM-Scl抗体阳性

相关。而抗JO-1抗体与肺间质病变相关。②非HLA基因和PM的关联：一些与其它自身免疫性疾病相关的基因多态性和PM也有关联，包括免疫球蛋白基因、细胞因子及其受体基因、T细胞受体基因等。

2. 感染因素

环境因素中，微生物感染被认为是主要的原因。关于微生物感染如何引起遗传易感者发病，目前主要存在3种理论：①微生物与宿主细胞组成性蛋白相作用而使后者暴露于机体的免疫系统，这种蛋白在个体的生长发育中从未与机体的免疫系统接触被识别，因此被视为非己，这就引发了自身免疫反应；②触发机体产生有致病作用的自身抗体（抗独特性抗体）；③病毒通过分子模拟机制产生与宿主蛋白相似的蛋白质，这使得宿主在清除异体蛋白时也引起自身组织受损。据报道，

PM与细小病毒B19、丙型肝炎病毒等感染相关[22]。例如HCV可能诱发自身抗体的产生促使PM伴发ILD。有研究者在HCV患者肺组织活检标本中发现EB病毒、

CMV的基因组、HCV病毒、抗Jo- 1抗体，但目前尚缺乏ILD是由病毒引起的直接损害证据。

3．非感染因素

D-青霉胺引起的肌病与PM很相似，可能由于遗传因素与环境因素的相互作用促使肌炎的发病。PM患者在治疗过程中，肺对某些药物，如甲氨蝶呤(MTX)、环磷酰胺(CTX) 过度敏感，导致合并ILD。诱发皮肌炎的药物包括乙醇、D- 青霉胺、西咪替丁、羟脲、非甾体类抗炎药、抗菌药、降脂药（如辛伐他丁）、特比萘芬、吐根和疫苗等。可能是药物促使人类内皮细胞凋亡，机体细胞抗原移位产生新的抗原性，导致抗内皮细胞的抗体形成，促使皮肌炎的发生。这些药物可诱发DM患者典型的临床表现，如发生皮肌炎样皮损，激发多发性肌炎、肌无力或肌损害，使血清肌酶升高[23]。而临床上使用干扰素或干扰素-β治疗时，又可导致皮肌炎和间质性肺炎症状加重。说明药物在PM/DM及并ILD的发病中具有一定的作用。

4.肿瘤

IIM患者男女均可伴发恶性肿瘤，以女性多见[22]，年龄大多数在40岁以上。在黄斌[24]等回顾性综合分析中，DM或PM共1749例，其中222例伴发恶性肿瘤，发生率为12.7%。伴发的恶性肿瘤类型繁多，前几位为鼻咽癌51例，肺癌47

例，卵巢18例，肝癌17例，乳腺癌16例，胃癌15例，共占73.9%，其中鼻咽

癌和肺癌最多见，占44.1%。对于皮肌炎并肿瘤患者的血清抗体检测[25]显示抗TIF1-r抗体可作为DM合并肿瘤敏感和特异的血清学指标。皮肌炎确诊同时检测抗TIF1-r抗体，对并发肿瘤的早期诊断、预后有重要意义。伴发肿瘤的患者预后差，而肿瘤在IIM中发病率高，其是否在IIM的发病机制中起重要作用，有待进一步研究。苟丽娟[26]等对北京协和医院的多发性肌炎患者/皮肌炎及伴发恶性肿瘤患者中发现，PM合并恶性肿瘤的5例患者均未发现肺间质病变，而同期未合并恶性肿瘤患者的100例中有55例存在肺间质病变。DM/PM合并恶性肿瘤患者的肺间质病变发生率低于未合并恶性肿瘤组，提示IIM合并恶性肿瘤患者肺间质病变相对少见，合并肺间质病变与肿瘤发生呈负相关关系。

5. 免疫细胞

其中，T淋巴细胞介导的细胞免疫可能是多发性肌炎肌肉组织损伤的主要发病机制，而T、B淋巴细胞参与的体液免疫在皮肌炎的发病中可能起更主要的作用[27]。

1）T细胞：Dalakas等对多发性肌炎、皮肌炎合并ILD患者BALF中T淋巴细胞TCR基因表达特征的研究表明，与健康对照不同，多发性肌炎／皮肌炎患者TCR，CDR3区域有一些保守的氨基酸序列，如RGS、GLA、LQG、SGG、DRG、GTS、TSGR、GGS、GQA、

GAG、GTG等，提示多发性肌炎／皮肌炎合并ILD患者B细胞活化因子(BAFF)中T细胞受到某种不明抗原的刺激并导致在肺部的聚集，从而参与ILD的发病过程。2) B细胞：当抗核抗体与抗JO-1抗体阳性时，PM、DM患者血清BAFF水平升高，两者呈正相关[28]。B细胞在自身免疫性疾病的免疫发病机制中起重要作用，不仅可以分化成浆细胞，合成和分泌大分子免疫球蛋白，还可以调节其他细胞，分泌细胞因子，提呈抗原[29]。近年来使用抗CD-20单抗(rituximab)治疗多发性肌炎/皮肌炎并ILD患者取得好的疗效，支持B细胞在多发性肌炎/皮肌炎并ILD发病中起一定的作用。

BAFF在B细胞介导的免疫反应中占有核心地位。研究表明，在多发性肌炎/皮肌炎患者中血清BAFF水平明显升高，而且这种升高在合并ILD或抗Jo-1抗体阳性的患者更为显著；血清BAFF水平同肌酶水平呈正相关，同糖皮质激素的使用累积剂量呈负相关，这些数据都提示B细胞介导的免疫反应参与多发性肌炎/皮肌炎并ILD的发病，BAFF可能是这类疾病的治疗靶点[28]。

6.干扰素、细胞因子、趋化因子等

I型干扰素（IFN）、多种白细胞介素类细胞因子参与多发性肌炎／皮肌炎的发病过程，并与病情活动性、严重性有一定的关系[30]。Eloranta等研究显示，由体

外诱导产生的IFN水平与肺间质病变具有明显的相关性。IIM并ILD患者的外周血清与坏死细胞物质混合可诱导正常巨噬产生α-IFN，其诱导能力要远高于无并ILD的IIM患者。郑小蔚[31]等发现I型IFN通路可能参与了IIM并ILD的发生发展，其趋化因子MX-1在ILD的发生中起重要作用。多种白细胞介素参与PM/DM并ILD发病过程，如IL-2、IL-15、IL-27[32]等。IL-15在生物学活性上类似于IL-2。在多发性肌炎

/皮肌炎中，炎症刺激可诱导肌细胞产生IL-15，进而促进局部组织中渗出的T淋巴细胞的动员和活化，从而参与疾病的发生。日本的研究小组发现，PM/DM患者的血清铁蛋白和IL-18水平较健康者显著升高，诱导、刺激机体肺泡巨噬细胞产生白三烯B4和IL-8，从而导致ILD的发生[33-34]。趋化因子( monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)在PM中起着重要的作用，MCP-1在PM患者合并ILD中的机制可能为：一方面通过募集和活化单核及淋巴细胞，参与肺纤维化进程中的炎症和纤维化应答；另一方面通过促进成纤维细胞增生、分泌胶原及产生促纤维化细胞因子TGF-β参与胞外基质沉积及正常肺结构的改变。陈芳[35]等在多发性肌炎患者血清中发现MCP-1的水平在合并ILD患者血清中水平高于未合并ILD者，升高的MCP-1与ILD显著正相关。MCP-1诊断ILD的敏感性为60.7%，特异性为68.2%。且PM合并ILD血清中MCP-1水平较肺部感染患者显著升高（大于3倍），提示MCP-1水平可以为临床鉴别PM患者肺部病变是ILD或者肺部感染提供依据。

7. 自身抗体

在IIM并ILD的发生发展中，抗合成酶抗体如抗PL-12[36]，抗PL-7，抗Jo- 1[37-38]抗体等与肺间质病变更密切相关。抗SSA抗体阳性在抗合成酶综合症患者中往往合并更严重的肺间质病变[39]。在所有的抗合成酶抗体中，以特异性抗体抗Jo- 1抗体多见[38]，其阳性率高达68%。陈芳[40]等对109例发性肌炎／皮肌炎伴ILD患者进行抗氨酰tRNA合成酶(ARS)抗体和抗Jo-1抗体检测比较，结果显示抗ARS抗体较抗Jo-1抗体对特发性肌炎伴ILD的诊断敏感性高（37.9%:17.2%），而特异性相对较低(84.6%:90.9%)。抗Jo- 1抗体阳性者肺活检中发现肺泡隔有免疫球蛋白和免疫复合物的沉积，提示抗Jo- 1抗体与组织损伤有关。可能是抗Jo- 1抗体参与肺部免疫复合物的形成，触发肺巨噬细胞活性，释放趋化因子，致中性粒细胞和淋巴细胞聚集在肺部，释放一些蛋白酶类物质和氧自由基，广泛破坏肺间质结构；同时，成纤维细胞活化，异常增殖，使胶原和弹性蛋白生成与代谢异常，引起弥漫性肺纤

维化。梅珏[41]等分析了39例多发性肌炎/皮肌炎并肺间质病变发现，PM／DM并ILD与无并ILD组相比，并ILD组患者的关节痛的发生率、免疫球蛋白G升高、抗Jo-1抗体阳性率均较无ILD组高。多项研究均显示抗Jo-1抗体与PM／DM合并ILD呈正相关[42-43]，抗Jo-1抗体可作为PM合并ILD的预测因素[44]。

8. 非免疫因素

骨骼肌炎性细胞浸润的程度与肌无力的程度缺乏相关性，因此，非免疫介导机制有可能参与肌纤维损伤。Nagaraju等研究发现炎症性肌病病人骨骼肌纤维表面及其内质网的主要组织相容性复合体-I（MHC-I）上调，炎症性肌病病人及小鼠模型肌组织内内质网应激反应、葡萄糖调节蛋白-78途径及内质网超负荷反应3条通路被激活。野生型小鼠MHC-I(H-2Kb)的异位表达及H-2Kb糖基化突变的增加诱导了骨骼肌细胞内质网的应激性反应。这些结果表明内质网负荷表达可能是炎症性肌病骨骼肌损伤及功能障碍的非免疫机制。

9. 蛋白质组学研究

蛋白质组学是在1994年由澳大利亚科学家Wilkins和Williams提出的，它是一门大规模、高通量、系统化的研究某一类型细胞、组织或体液中的所有蛋白质组成及其功能的新兴学科。可从细胞整体水平进行蛋白质属性的研究，如表达水平、翻译后修饰及相互作用等，并由此获得对于疾病过程、细胞生理生化特征和调控网络的广泛完整的认识。它在生物医学研究中的运用广泛，为阐明疾病的机制，并确定新的诊断标志物和治疗靶点提供了重要的手段。目前国外有开始尝试将其用于特发性炎症性肌病的研究。国外学者Passadore[45]应用蛋白质组学的方法在PM/DM的肺泡灌洗中找到9个差异蛋白，这些蛋白发挥着氧化应激、代谢活动及自身免疫炎症作用。他们认为这些蛋白可能与患者的预后相关，为进一步深入研究发病机制提供了方向。国内尚未见相关研究。

近年来，生物组学和新兴技术的涌现可为IIM分析提供的新工具，如表面遗传学、基因组学、表观基因组学、蛋白质组学、代谢组学等对PM/DM各个方面进行研究。虽然目前PM/DM及并ILD具体机制还不明确，但相信不久的将来，其发病机制的神秘面纱将被揭开。

参考文献

[1] 王艳艳, 任义乐, 梅焕, 等. 皮肌炎或多发性肌炎并发肺间质病变的临床分析. ft东医药, 2009, 49(45): 41-42.

[2] Woo JH, Kim YJ, Kim JJ, et al. Mortality factors in idiopathic inflammatory myopathy: focusing on malignancy and interstitial lung disease. Mod Rheumatol, 2013, 23(3): 503-508.

[3] 邸丽, 笪宇威, 王敏, 等. 多发性肌炎／皮肌炎85 例患者影响预后的因素分析. 中华临床医师杂志, 2013, 7(13): 5806-5809.

[4] 董建玲, 邹晋梅, 张羽, 等. 多发性肌炎和皮肌炎生存率及死亡原因分析. 华西医学, 2014, 29（4）: 702-705.

[5] C hen I J, Tsai WP, Wu YJ, et al. Infections in polymyositis and dermatomyositis: analysis of 192 cases. Rheumatology (Oxford), 2010, 49(12): 2429-2437.

[6] Saketkoo LA, Ascherman DP, Cottin V, et al. Interstitial lung disease in idiopathic inflammatory myopathy. Curr Rheumatol Rev, 2010, 6(2): 108-119.

[7] 赵千子, 王国春, 刘湘源, 等. 成人多发性肌炎和（或）皮肌炎多器官损害多中心回顾性研究. 中华医学杂志, 2014, 94（1）: 43-46.

[8] 李然, 李向培, 厉小梅, 等. 炎性肌病相关间质肺炎病变的预测指标和预后不良因素分析. 中华医学杂志, 2012, 92（33）: 235-238.

[9] 盛君, 陆进明, 宣丹, 等. 92例多发性肌炎/皮肌炎患者短期生存预后相关因素分析. 中国临床药理学与治疗学. 2014, 19（6）: 674-679.

[10] 叶珊慧, 肖楚吟, 高建全. 多发性肌炎／皮肌炎合并急性或亚急性间质性肺炎的临床分析. 广州医学院学报, 2010, 38（3）: 58-61.

[11] 周丽, 忻霞菲, 黄华, 等. 皮肌炎/多发性肌炎合并肺间质病变的临床特征及预后相关因素. 浙江医学, 2013, 35(18) : 1659-1663.

[12] 周琳, 曹华, 郑捷. 35例皮肌炎和临床无肌病型皮肌炎合并肺间质病变的临床分析. 诊断学理论与实践, 2014, 13（3）: 251-254.

[13] 汪泱, 赵兰兰, 陈晓梅, 等. 皮肌炎继发间质性肺疾病临床特征及预后分析. 临床荟萃, 2014, 29（3）: 301-304.

[14] 舒晓明, 马丽, 卢昕, 等. 肌炎活动性评价工具在中国多发性肌炎／皮肌炎患者中的应用. 中华医学杂志, 2011, 91（19）: 1328-1330.

[15] Bohan A, Peter JB. Polymyositisand dermatomyositis. N Eng l J Med, 1975, 292(7): 344-347; 1975, 292(8): 403-407.

[16] 钱倩, 李娜, 沈宏锐, 等. 特发性炎性肌病分型诊断标准的比较分析. 中华风湿病学杂志, 2013, 17(9): 620-622.

[17] 刘胜全, 王巧玲, 李云. 多发性肌炎/皮肌炎肺损害的高分辨率CT诊断. 实用放射学杂志, 2012, 28（5）: 671-674.

[18] 田小兰, 彭清林, 舒晓明, 等. 多发性肌炎／皮肌炎患者血清中可溶性人类白细胞抗原-G表达水平的研究. 中华风湿病学杂志, 2013, 17（5）: 313-317.

[19] 梁少楠, 李宇恒, 许春丽, 等. 应用凝集素芯片检测系统性红斑狼疮红细胞膜表面糖链变化. 基因组学与应用生物学. 2014, 33（4）: 722-728.

[20] O'Hanlon TP, Miller FW. Genetic risk andprotective factors for the idiopathic inflammatory myopathies. Curr Rheumatol Rep, 2009, 11(4): 287-298.

[21] Betteridge ZE, Gunawardens H, Mchugh NJ. Novel autoantibodies and clinical phenotypes in adult and juvenile myositis. Arthnitis Res Ther, 2011, 13(2): 209-216.

[22] Somani AK, Swick AR, Cooper KD, et al. Severe dermatomyositis triggered byinterferon beta-la therapy and associated with enhanced type I interferon signaling. Arch Dermatol, 2008, 144: 134l-1349.

[23] 陈丽, 李丽琴. 是皮肌炎的诊断与治疗. 皮肤病与性病. 2011, 33(4): 201-203.

[24] 黄斌, 吕冬华, 柯孔良, 等. 皮肌炎或多发性肌炎伴发恶性肿瘤222例国内文献复习. 临床荟萃, 2013, 28(7): 792-794.

[25] 杨阚波, 舒晓明, 彭清林, 等. 血清抗转录中介因子1-1抗体在多发性肌炎／皮肌炎合并肿瘤诊断中的价值. 中华风湿病学杂志, 2013, 17(1): 10-15.

[26] 苟丽娟, 苏金梅, 赵岩, 等. 皮肌炎和多发性肌炎伴发肿瘤临床特点及文献回顾. 中华临床免疫和变态反应杂志, 2012, 6（4）: 295-299.

[27] 王冬雪, 于雪莹, 舒晓明. 多发性肌炎／皮肌炎患者外周血淋巴细胞亚群检测的临床应用价值. 中华风湿病学杂志, 2012, 16（3）: 162-166.

[28] 彭清, 林谢瑶, 张荣. 多发性肌炎和皮肌炎患者血清B细胞活化因子水平及其临床意义. 中华内科杂志, 2012, 51（3）: 210-213.

[29] 曹孟淑, 陈智勇, 孙凌云. 多发性肌炎/皮肌炎合并间质性肺疾病发病机制的研究进展. 中华风湿病学杂志, 2012, 16(4): 282-285.

[30] 祖宁, 王国春. 多发性肌炎／皮肌炎患者干扰素表达及与临床的相关性. 中华医学杂志, 2011, 91（17）: 1157-1160.

[31] 郑小蔚, 陈小青, 章涛, 等. 特发性炎性肌病外周血干扰素诱导基因表达与临床相关性研究. 中华风湿病学杂志, 2015, 19（2）: 81-86.

[32] Shen H, Xia L, Lu J. Pilot study of interleukin-27 in pathogenesis of dermatomyositis and polymyositis: associated with interstitial lung diseases. Cytokine, 2012, 60(2): 334-337.

[33] Gone T, Kawaguchi Y, Sugiura T, et a1. Interleukin-18 is a key mediator in dermatomyositis: potential contribution to development of interstitial lung disease. Rheumatology, (Oxford), 2010, 49: 1878-1881.

[34] Gone T, Kawaguchi Y, Ham M, et a1. Increased ferritin predicts development and severity of acute interstitial lung disease as a complication of dermatomyositis. Rheumatology, (Oxford), 2010, 49: 1354-1360.

[35] 陈芳, 舒晓明, 王冬雪. 多发性肌炎/皮肌炎患者血清单核细胞趋化蛋白-1的测定及临床意义. 北京大学学报（医学版）, 2012, 44（2）: 204-208.

[36] Hervier B, Wallaert B. Hachulla E, et a1． Clinical manifestations of anti- synthetase syndrome positive for antialanyl-tRNA synthetase(anti-PLl2) antibodies: 8 retrospective study of 17 case. Rheumatology. 2010, 49: 972-976．

[37] 谢瑶, 舒晓明, 卢昕, 等. 多发性肌炎和皮肌炎血清抗Jo-1抗体水平与疾病活动度相关性研究. 中华风湿病学杂志, 2011, 15（11）: 742-745.

[38] Vuncsa A, Gergely L, Ponyi A, et a1. Myositis-specific and myositis-associated antibodies in overlap myositis in comparison to primary dermatopolymyositis: Relevance for clinical classification: retrospective study of 169 patients. Joint Bone Spine, 2010, 77: 125-130.

[39] 谢瑶, 王国春. 多发性肌炎和皮肌炎自身抗体研究进展. 临床内科杂志, 2010, 27(10): 656-659.

[40] 陈芳, 舒晓明, 王冬雪, 等. 血清抗氨酰tRNA合成酶抗体检测在特发性炎性肌病伴间质性肺疾病中的意义. 中华风湿病学杂志, 2012, 16(2): 96-101.

[41] 梅珏, 钟华杰. 多发性肌炎／皮肌炎合并肺间质病变39例临床分析. 现代实用医学, 2013, 25（8）: 864-865.

[42] 吴秀琳, 郭华, 张巧. 多发性肌炎与皮肌炎并发肺间质病变与抗Jo-1抗体的关系. 重庆医学, 2011, 40（19）: 1899-1903.

[43] 王云霞, 方琪, 李旺俊, 等. 血清抗Jo-1抗体和抗核抗体与多发性肌炎患者心、肺损害的关系. 临床神经病学杂志, 2010, 23(3): 214-215.

[44] 陈芳, 王国春. 多发陛肌炎／皮肌炎合并间质性肺疾病预测因素的Meta分析. 中华风湿病学杂志, 2011, 15（9）: 588-591.

[45] Passadore I, Iadarola P, DiPoto C, *et al*. 2-DE and LC-MS/MS for a comparative proteomic analysis of BALF from subjects with different subsets of inflammatory myopathies. Proteome Res, 2009, 8(5): 2331-2340.

致**谢**

本研究及学位论文是在我的导师章涛教授和陈小青博士的亲切关怀和悉心指导下完成的。从课题的选择到项目的最终完成，两位导师始终给予我细心的指导和不懈的支持。导师不仅在学业上给我以精心指导，同时还在思想、生活上给我以无微不至的关怀，在此谨向导师章涛教授和陈小青博士致以诚挚的谢意和崇高的敬意。

衷心感谢林夏鸿老师在课题设计、实验操作及论文撰写中的全程指导。感谢高宏志博士、洪文婷医师、陈杏婷硕士等对本实验的支持与帮助。感谢课题组全体成员的无私奉献和探索，本课题的建立是以导师领衔的科研团队多年来不断努力探索的结果，本研究所取得的成绩是以团队的研究为基础的。

感谢福建医科大学附属第二医院中心实验室全体工作人员和免疫内科全体医护人员对我在学习和工作中给予的大力支持和帮助！感谢我的家人，他们给我生活上的关怀和精神上的鼓励是我学习的动力。

最后，我要向在百忙之中抽时间对本文进行审阅、评议和参加本人论文答辩的各位师长表示感谢！