

· 临床流行病学 ·

蛋白质氧化损伤与系统性红斑狼疮疾病活动的相关性研究

章群 叶冬青 陈国平

【摘要】 目的 探讨系统性红斑狼疮(SLE)患者蛋白质氧化损伤程度与疾病活动的关联。方法 收集 SLE 患者临床资料,采用病例对照研究,应用分光光度法测定蛋白质羰基、巯基、超氧化物歧化酶(SOD)、髓过氧化物酶(MPO)和总抗氧化能力(TAOC)等蛋白质氧化损伤相关指标,ELISA 法定性测定血浆抗-dsDNA 抗体和抗核抗体的水平。结果 SLE 患者蛋白质氧化程度与健康对照组的差异有统计学意义,蛋白质羰基浓度升高 $[(0.101 \pm 0.033) \text{ nmol/mg}, (0.061 \pm 0.019) \text{ nmol/mg}, P < 0.01]$,蛋白质巯基浓度 $[(3.911 \pm 0.968) \text{ nmol/mg}, (4.655 \pm 0.798) \text{ nmol/mg}, P < 0.01]$ 和 T-SOD $[(67.01 \pm 12.22) \text{ U/ml}, (97.35 \pm 14.11) \text{ U/ml}, P < 0.01]$ 浓度降低,且与疾病活动相关指标有一定关联。抗-dsDNA 抗体阳性组血浆蛋白质巯基浓度、T-SOD 活性低于阴性组,差异有统计学意义。结论 处于疾病活动状态的 SLE 患者,存在一定程度的蛋白质过氧化现象。且氧化损伤程度与疾病活动正相关,提示蛋白质氧化对于 SLE 慢性器官损伤的发病机制是否有一定作用值得进一步研究。

【关键词】 系统性红斑狼疮;蛋白质过氧化;抗氧化物酶

Study on the relationship between protein oxidation and disease activity in systemic lupus erythematosus
ZHANG Qun, YE Dong-qing, CHEN Guo-ping. Department of Epidemiology and Health Statistics, School of Public Health, Anhui Medical University, Hefei 230032, China
Corresponding author: YE Dong-qing, Email: ydq@ahmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To examine the levels of protein oxidation in systemic lupus erythematosus (SLE) and to evaluate the relation between oxidative protein damage and disease activity index. **Method:** Plasma was collected from SLE patients and healthy subjects as controls. Protein-bound carbonyls, protein thiols, superoxide dismutase (SOD), myeloperoxidase (MPO) and total antioxidant capacity (TAOC) were determined by spectrophotometry. Levels of anti-double-stranded DNA (anti-dsDNA) and antinuclear antibody (ANA) were quantified by enzyme-linked immunosorbent assay. **Results** When comparing with the control subjects, SLE patients exhibited elevated levels of protein carbonyls $[(0.101 \pm 0.033) \text{ nmol/mg}, (0.061 \pm 0.019) \text{ nmol/mg}, P < 0.01]$, degraded levels of protein thiols $[(3.911 \pm 0.968) \text{ nmol/mg}, (4.655 \pm 0.798) \text{ nmol/mg}, P < 0.01]$ and activities of T-SOD $[(67.01 \pm 12.22) \text{ U/ml}, (97.35 \pm 14.11) \text{ U/ml}, P < 0.01]$. Levels of plasma protein thiols and activities of T-SOD were lower in SLE patients positive for anti-dsDNA antibody, compared with patients negative for anti-dsDNA antibody. **Conclusion** We found that the elevated levels of multiple markers of protein oxidation and degraded activities of antioxidant enzymes in plasma from SLE patients existed when comparing with the controls, and the all the levels were correlated with disease activity. Our findings suggested that protein oxidation might play a role in the pathogenesis of chronic organ damage in SLE.

【Key words】 Systemic lupus erythematosus; Protein oxidation; Antioxidant enzymes

系统性红斑狼疮(SLE)是一种累及多系统、多器官的自身免疫性疾病。近些年研究发现,SLE 患者合并动脉粥样硬化的发生率有上升趋势,而传统的危险因素无法解释 SLE 中动脉粥样硬化发生率

的升高^[1]。氧化应激是动脉粥样硬化的重要危险因素,提示 SLE 病程中氧化应激的存在。氧化应激可直接导致生物大分子的损伤,包括脂质、蛋白质、DNA 和碳水化合物的过氧化损伤。目前国内外研究均趋向于脂质过氧化和 DNA 氧化损伤与 SLE 的关系,蛋白质过氧化与 SLE 的相关研究较少。而蛋白质是机体的重要组成部分,且与氧自由基和非氧自由基存在动态学高反应速率^[2],是体内过氧化反

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30571608)

作者单位:230032 合肥,安徽医科大学公共卫生学院流行病与卫生统计学系

通讯作者:叶冬青, ydq@ahmu.edu.cn

应的重要靶标,其过氧化损伤与 SLE 病程进展的关系值得探讨。本研究通过对 SLE 患者蛋白质氧化标记物、抗氧化指标、疾病活动相关指标的检测,阐述 SLE 患者血浆蛋白质的氧化损伤程度与疾病活动可能的联系。

对象与方法

一、研究对象

病例组为 2006 年 8 月至 2007 年 2 月在安徽医科大学第一附属医院风湿科门诊及病房根据美国风湿病协会 1997 年修订的 SLE 分类标准确诊的 SLE 患者,剔除合并脂质代谢疾病和近期服用抗氧化药物治疗的病例。对照组为安徽医科大学第一附属医院安徽省立医院输血科无偿献血者,性别与病例组匹配,年龄相差小于 5 岁(排除有心血管病史、吸烟史以及工作环境中存在强氧化应激源的献血者)。

二、研究方法

1. 临床调查与标本取样:采用病例对照研究,收集研究对象的人口统计学资料、流行病学资料以及 SLE 患者临床检验资料。通过 SLE 疾病活动指数(SLE disease activity index, SLEDAI)和临床疾病活动相关指标评价 SLE 患者疾病活动情况。采集病例和对照者肘静脉血 10 ml, EDTA 抗凝管保存, 3500 r/min 离心 10 min 分离血浆,置 -20℃ 冰箱保存备测。

2. 实验方法:

(1)测定血浆蛋白质巯基浓度:按照 Hu^[3]的方法测定病例组和对照组血浆中蛋白质总巯基浓度。再通过谷胱甘肽(GSH)试剂盒(南京建成生物公司产品)测定血浆中 GSH 的浓度,血浆总巯基浓度减去 GSH 浓度得出血浆巯基浓度,再通过双缩脲试剂盒(南京建成生物公司产品)测定血浆蛋白质浓度,计算血浆蛋白质中巯基的含量(nmol/mg)。

(2)测定血浆蛋白质羰基浓度:按照 Reznick 和 Packer^[4]的方法测定病例组和对照组血浆中蛋白质羰基浓度,再通过双缩脲试剂盒(南京建成生物公司产品)测定血浆蛋白质浓度,计算血浆蛋白质中羰基的含量(nmol/mg)。

(3)测定血浆抗氧化指标:应用试剂盒(南京建成生物公司产品)检测病例组和对照组的血浆超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)和总抗氧化能力(total antioxidant capacity, TAOC)水平。以上指标均使用

722N 型可见光分光光度计(上海精密科学仪器有限公司产品)测定指标 A 值。

(4)测定血浆抗体水平:应用酶联免疫吸附试验(ELISA)法定性测定血浆抗核抗体(ANA)和抗-dsDNA 抗体滴度。检测试剂盒购自美国 TPI 生物医药公司,所用酶标仪为美国 Bio-TEC 仪器公司生产。

(5)疾病活动度的评价:根据 SLEDAI 评价 SLE 患者疾病活动度(0~4 分为基本无活动,5~9 分为轻度活动,10~14 分为中度活动,≥15 分为重度活动)。

三、统计学分析

数据通过 Epi Data 3.0 软件双重录入,运用 SPSS 13.0 软件分析病例组和对照组的基本情况、蛋白质氧化损伤指标及疾病活动情况。应用两样本 *t* 检验比较 SLE 组/正常对照组、狼疮肾炎(lupus nephritis, LN)组/非 LN 组以及抗体阳性/组间测定指标的差异。散点图显示部分实验数据不符合正态分布,故采用 Spearman 相关分析比较机体蛋白质氧化程度与 SLEDAI 及临床炎性指标的相关性。

结 果

一、一般情况

本次研究病例组调查病例 86 例,有效应答 78 例(应答率为 90.70%),排除合并脂质代谢疾病后共收集 SLE 患者血标本 60 份,其中男性 7 例,女性 53 例,平均年龄(38.15 ± 11.67)岁。其中, LN 患者 23 例(23/60, 38.33%)。正常对照共调查 82 人,应答 71 人(应答率为 86.59%),收回有效血标本 60 例,其中男性 7 例,女性 53 例,平均年龄(30.21 ± 9.89)岁。SLE 患者病程 < 1 年者 24 例(24/60, 40.00%), 1-3 年者 19 例(19/60, 31.67%), 3-6 年者 8 例(8/60, 13.33%), > 6 年者 9 例(9/60, 15.00%)。SLEDAI 评分显示,基本无活动者 12 例(12/60, 20.00%),轻度活动者 18 例(18/60, 30.00%),中度活动者 16 例(16/60, 26.67%),重度活动者 14 例(14/60, 23.33%)。

二、病例组与对照组蛋白质氧化相关指标和炎性指标

本次检测的蛋白质氧化相关指标为蛋白质羰基、蛋白质巯基、SOD、MPO 和 TAOC,临床炎性指标为 C 反应蛋白(CRP)和红细胞沉降率(ESR)。应用两样本 *t* 检验比较病例组/对照组以及 LN 组/非

LN 组的蛋白质氧化相关指标,结果见表 1。SLE 组蛋白质羰基水平高于对照组,而 SOD、TAOC、蛋白质巯基低于对照组,差异有统计学意义;SLE 组 MPO 水平高于对照组,但差异无统计学意义。LN 组 ESR、蛋白质羰基浓度均高于非 LN 组,蛋白质巯基浓度低于非 LN 组,差异有统计学意义。而 SOD、TAOC、MPO 和 C 反应蛋白水平非 LN 组与 LN 组差异无统计学意义。

表1 SLE 病例组/对照组以及 LN 组/非 LN 组蛋白质氧化相关指标、炎性指标的比较($\bar{x} \pm s$)

项目	SLE 组 (n=60)	对照组 (n=60)	LN 组 (n=23)	非 LN 组 (n=37)
巯基(nmol/mg)	3.911±0.968 ^a	4.655±0.798	3.705±0.945 ^b	4.243±0.931
羰基(nmol/mg)	0.101±0.033 ^a	0.061±0.019	0.114±0.028 ^b	0.093±0.033
MPO(U/L)	52.14±16.39	47.31±14.72	56.78±15.99	49.25±16.17
T-SOD(U/ml)	67.01±12.22 ^a	97.35±14.11	67.90±11.43	64.80±13.09
TAOC(U/ml)	7.60±4.72 ^a	10.16±1.88	6.32±4.23	8.37±4.85
CRP(mg/L)	14.06±5.65	-	68.99±22.01	56.90±23.74
ESR(mm/h)	36.18±24.29	-	44.91±26.35 ^b	30.76±21.53

注:^a P<0.01, ^b P<0.05

三、抗体活动情况与蛋白质氧化指标的联系

ELISA 试剂盒检测显示, SLE 病例中抗-dsDNA 抗体阳性者 21 例(阳性率 35.0%), ANA 阳性者 45 例(阳性率 75.0%)。用两样本 t 检验比较抗-dsDNA 抗体阳性组/阴性组和 ANA 阳性组/阴性组蛋白质氧化相关指标的差异,结果见表 2。抗-dsDNA 抗体阳性组血浆蛋白质巯基浓度、T-SOD 活性低于阴性组,差异有统计学意义;MPO 浓度抗-dsDNA 抗体阳性组高于阴性组,但差异无统计学意义(P=0.052);其余指标在抗-dsDNA 抗体和 ANA 阳性组和阴性组中差异均无统计学意义。

表2 抗-dsDNA 抗体(+)/(-)和 ANA(+)/(-)的 SLE 患者蛋白质氧化相关指标的比较($\bar{x} \pm s$)

项目	抗-dsDNA 抗体		ANA	
	(+) (n=21)	(-) (n=39)	(+) (n=45)	(-) (n=15)
巯基(nmol/mg)	3.714±0.971 ^a	4.245±0.905	3.818±0.970	4.190±0.937
羰基(nmol/mg)	0.111±0.030	0.095±0.033	0.099±0.033	0.108±0.030
MPO(U/L)	57.71±14.09	48.87±17.06	50.65±16.73	56.59±14.95
TAOC(U/ml)	6.51±4.58	8.17±4.71	7.72±4.91	7.19±4.09
T-SOD(U/ml)	64.24±11.90 ^a	71.28±10.99	69.56±9.81	65.75±12.58

注:^a P<0.05

四、SLE 患者氧化/抗氧化指标与疾病活动指标间相关性分析

对蛋白质氧化相关指标蛋白质羰基、蛋白质巯

基、T-SOD、TAOC、MPO 与 SLEDAI 进行相关性分析,结果见表 3。其中,蛋白质羰基与 SLEDAI、ESR 呈正相关,蛋白质巯基与 SLEDAI、C3、CRP 呈负相关,TAOC 与 SLEDAI、C3 呈负相关,T-SOD 与 SLEDAI 和 ESR 呈显著负相关,其余指标之间的相关性均无统计学意义。

表3 蛋白质氧化相关指标与 SLE 疾病活动指标间相关性分析(r, 值)

项目	蛋白质巯基	蛋白质羰基	MPO	TAOC	T-SOD
SLEDAI	-0.287 ^a	0.281 ^a	0.156	-0.288 ^a	-0.663 ^b
C3	-0.315 ^a	0.243	0.213	-0.263 ^a	0.107
C4	-0.190	0.203	0.172	-0.087	-0.027
CRP	-0.255 ^a	0.207	0.252	-0.192	-0.173
ESR	-0.241	0.261 ^a	0.224	-0.223	-0.315 ^a
IgG	-0.162	0.163	0.174	-0.037	0.183
IgA	-0.059	0.093	0.032	-0.137	0.114
IgM	-0.025	0.010	0.083	-0.064	-0.062

注:^a P<0.05, ^b P<0.01

讨 论

蛋白质是氧化损伤主要的靶标,是组织/细胞和血浆主要的组成部分。蛋白质的氧化损伤将导致其功能和结构的改变。以往研究显示:人类许多疾病,包括动脉粥样硬化、糖尿病等均有蛋白质氧化产物浓度的增加。提示蛋白质氧化损伤至少在一些条件下可诱发疾病或促进疾病发展。Tam 等^[5] 研究显示,SLE 患者存在一定程度的蛋白质过氧化现象,给予大剂量的抗氧化剂治疗后,患者临床体征和特异性指标(抗-dsDNA 抗体)均有改善,蛋白质过氧化程度也有所减轻。Scofield 等^[6] 提出蛋白质氧化后空间构象和疏水性均发生改变,而抗原抗体的结合必须由抗原位点占据抗体表面容易进入区域,疏水位点对此发挥重要作用。空间构象的改变可直接导致蛋白质抗原性的改变和抗原抗体结合力的增强,进而诱导抗体的产生和异常免疫反应。提示蛋白质过氧化可能与 SLE 的发病和病程进展存在一定联系。

蛋白质侧链氨基酸在烷氧自由基和过氧自由基的作用下生成羰基及其衍生物,是目前应用最多的蛋白质氧化损伤标志物;蛋白质巯基易被一氧化氮及其衍生物氧化而发生亚硝基化作用^[7],也是蛋白质氧化的灵敏指标。Morgan 等^[8] 的研究显示,SLE 患者蛋白质巯基和羰基浓度显著升高,且与疾病活动度正相关,这与本次研究相一致,提示 SLE 患者存在一定程度的蛋白质氧化损伤。中性粒细胞释放

的 MPO 与过氧化物 (H_2O_2) 反应可转化生成 HOCL, 而 HOCL 对蛋白质的氧化显著高于其他组织成分^[9], 提示 MPO 的大量产生可能与蛋白质氧化存在一定联系。Morgan 等^[8]研究发现, SLE 患者血清 MPO 浓度高于正常对照, 而本次研究未发现 SLE 病例和健康对照血浆中 MPO 浓度存在差别, 可能由于 Morgan 等^[8]的研究选取的病例均处于高疾病活动状态, 而本次 SLE 患者是临床随机选取的。SOD 是机体抵御氧自由基的第一道防线, 可与氧自由基反应生成过氧化氢, 国内外关于 SOD 与 SLE 关系的研究结果不太一致^[10-13]。本次研究显示, T-SOD 浓度病例组显著低于对照组。SLE 病例血浆蛋白质羰基浓度升高、蛋白质巯基浓度降低, 提示 SLE 患者体内存在较严重的蛋白质氧化损伤状况。T-SOD 活性的减弱以及机体 TAOC 的降低将导致产生的氧自由基无法清除而大量堆积, 使机体处于过氧化状态, 进而导致蛋白质的过氧化损伤。TAOC 可动态反应血清中抗氧化组分的交互作用, 以及机体抵御自由基侵袭的能力。李瑾等^[14]的研究显示, SLE 患者 TAOC 水平显著降低, 且与疾病活动呈负相关, 这与本次研究结果相一致。

本次研究显示, 蛋白质氧化程度与 SLEDAI 呈正相关, 而 T-SOD 和 TAOC 与 SLEDAI 呈负相关, 提示氧化应激以及蛋白质的过氧化损伤与 SLE 的疾病活动可能存在一定联系。蛋白质氧化与炎症指标呈正相关, 提示 SLE 患者出现炎症后机体受到更多的氧自由基的攻击, 导致蛋白质氧化程度加剧。ANA 和抗-dsDNA 抗体阳性病例与阴性病例蛋白质氧化程度的比较显示, 仅蛋白质巯基和 T-SOD 在抗-dsDNA 抗体阳性和阴性的病例中差异有统计学意义, 可能源于本次研究仅定性测定 SLE 病例抗体的滴度水平, 而 ANA 阴性的 SLE 病例较少, 样本量不足导致检验效能有所偏差, 这一问题有待于样本量的扩大和抗体滴度的定量检测。蛋白质氧化程度与 SLE 疾病活动的联系是否源于其抗原性的改变, 不同的氧化程度对应不同的疾病活动度是否可以解释为蛋白质的氧化程度与其抗原性的强弱存在一定关联, 或部分氧化的蛋白质可发挥促进抗原抗体结合

的免疫佐剂作用有待于进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Esdaile JM, Abrahamowicz M, Grodzicky T, et al. Traditional Framingham risk factors fail to fully account for accelerated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 2001, 44(10): 2331-2337.
- [2] Davies MJ, Fu S, Wang H, et al. Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in study of human disease. *Free Radic Biol Med*, 1999, 27(11-12): 1151-1161.
- [3] Hu ML. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. *Methods Enzymol*, 1994, 233: 380-385.
- [4] Reznick AZ, Packer L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol*, 1994, 233: 357-363.
- [5] Tam LS, Li EK, Leung VY, et al. Effects of vitamins C and E on oxidative stress markers and endothelial function in patients with systemic lupus erythematosus: a double blind, placebo controlled pilot study. *J Rheumatol*, 2005, 32(2): 275-282.
- [6] Scofield RH, Kurien BT, Ganick S, et al. Modification of lupus-associated 60-kDa Ro protein with the lipid oxidation product 4-hydroxy-2-nonenal increases antigenicity and facilitates epitope spreading. *Free Rad Biol Med*, 2005, 38(6): 719-728.
- [7] 陈畅, 黄波, 韩佩韦, 等. 蛋白质巯基亚硝基化——一种典型氧化还原依赖的蛋白质翻译后修饰. *生物化学与生物物理进展*, 2006, 33(7): 609-615.
- [8] Morgan PE, Sturgess AD, Davies MJ. Increased levels of serum protein oxidation and correlation with disease activity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 2005, 52(7): 2069-2079.
- [9] Pattison DI, Davies MJ. Reactions of myeloperoxidase-derived oxidants with biological substrates: gaining chemical insight into human inflammatory diseases. *Curr Med Chem*, 2006, 13(27): 3271-3290.
- [10] Mohan IK, Das UN. Oxidant stress, anti-oxidants and essential fatty acids in systemic lupus erythematosus. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 1997, 56(3): 193-198.
- [11] Serban MG, Balanescu E, Nita V. Lipid peroxidase and erythrocyte redox system in systemic vasculitides treated with corticoids. Effect of vitamin E administration. *Rom J Intern Med*, 1994, 32: 283-289.
- [12] Serban MG, Negru T. Antioxidant protection in collagenvascular diseases. *Rom J Intern Med*, 1998, 36: 245-250.
- [13] Taysi S, Gul M, Sari RA, et al. Serum oxidant/antioxidant status of patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Chem Lab Med*, 2002, 40(7): 684-688.
- [14] 李瑾, 肖传实, 王来远. 结缔组织病患者血清脂质过氧化及抗氧化水平的研究. *中国药物与临床*, 2004, 4(2): 113-115.

(收稿日期: 2007-09-17)

(本文编辑: 张林东)