

· 临床论著 ·

基于 iTRAQ 蛋白质组学技术筛选类风湿关节炎湿热瘀阻证血清标志物

王新贤 殷海波 姜泉 焦娟

摘要 目的 筛选类风湿关节炎(RA)湿热瘀阻证差异蛋白,为进一步研究证候机制及临床辨治提供依据。**方法** 以 RA 湿热瘀阻证与 RA 非湿热瘀阻证以及健康对照组各 30 例,收集血清标本,采用同位素标记相对和绝对定量蛋白质组学技术(iTRAQ)进行定量标记,再以超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱(UPLC-QE-MS)进行分析检测。所得质谱数据选用 Thermo Proteome Discoverer 2.1 软件进行蛋白的检索和鉴定,并以 Western Blot 对筛选蛋白进行验证。**结果** 共得出 RA 湿热瘀阻证差异蛋白 72 个,其中上调蛋白 25 个,下调蛋白 47 个,RA 非湿热瘀阻证中得出上调差异蛋白 1 个,下调蛋白 11 个。湿热瘀阻证上调蛋白中有 6 个蛋白(SAA1、AGP1、HP、AGP2、SAA4、CRP)表达与急性期炎症直接相关;有 3 个蛋白(ACTB、FGA、FGG)表达与血小板聚集、凝血、纤维蛋白凝块形成相关。与健康对照组比较,湿热瘀阻证组差异蛋白富亮氨酸 $\alpha 2$ 糖蛋白(LRG1)表达水平差异有统计学意义($P < 0.05$);与非湿热瘀阻证组比较,湿热瘀阻证组 LRG1 蛋白表达差异亦有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** RA 湿热瘀阻证与疾病的活动性存在重要联系。LRG1 蛋白可作为 RA 湿热瘀阻证血清学标志物的价值之一。

关键词 类风湿关节炎;湿热瘀阻证;蛋白质组学;质谱;同位素标记相对和绝对定量技术

Screening Study for Serum Markers in Rheumatoid Arthritis Patients with Stagnant Dampness-heat Syndrome Based on ITRAQ Proteomic Technology WANG Xin-xian, YIN Hai-bo, JIANG Quan, and JIAO Juan Department of Rheumatology, Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medicine Sciences, Beijing (100053)

ABSTRACT Objective To screen differential proteins of rheumatoid arthritis (RA) patients with stagnant dampness-heat syndrome (SDHS), thus further studying possible mechanism and providing evidence for syndrome typing. **Methods** Serum samples were collected from 30 RA patients with SDHS, 30 RA patients with non-SDHS, and 30 healthy controls. Quantitation was labelled by isobaric tags for relative and absolute quantitation (iTRAQ), Ultra Performance Liquid Chromatography-Q-exactive-mass spectrometer (UPLC-QE-MS). All data were analyzed by Thermo Proteome Discoverer 2.1 Software to retrieve and identify proteins. Proteins screened were verified by Western Blot. **Results** A total of 72 differential proteins were obtained in RA patients with SDHS, including 25 up-regulated proteins and 47 down-regulated proteins. A total of 12 differential proteins were obtained in RA patients with non-SDHS, including 1 up-regulated protein and 11 down-regulated proteins. Of all up-regulated proteins of SDHS, 6 proteins (SAA1, AGP1, HP, AGP2, SAA4, and CRP) were directly related to acute inflammation, 3 (ACTB, FGA, and FGG) were related to platelet aggregation, coagulation, fibroprotein clot formation. Statistical difference existed in leucine-rich alpha-2-glycoprotein (LRG1) protein expression level between the healthy control group and the SDHS group ($P < 0.05$). Statistical difference existed in leucine-rich alpha-2-glycoprotein (LRG1) protein expression level between the SDHS group and the non-SDHS

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: jiao.juan@hotmail.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20190807.111

group ($P < 0.05$). Conclusions There existed important relations between RA patients with SDHS and disease activity of RA. LRG1 was one of valuable serum markers for RA patients with SDHS.

KEYWORDS rheumatoid arthritis; stagnant dampness-heat syndrome; proteomics; mass spectrum; isobaric tags for relative and absolute quantitation

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种以关节滑膜慢性炎症性病变为主的自身免疫性疾病,主要侵犯外周关节,滑膜病理表现为滑膜增生、炎性细胞的浸润、侵蚀性软骨及骨细胞的损伤,最终导致关节结构的破坏、畸形以及功能的丧失^[1]。RA 可见于任何年龄,男女罹患本病的比例约为 1:3,全世界患病人数约占总人口的 1.0%^[2],我国的患病率约为 0.32%~0.36%^[1]。湿热瘀阻证是 RA 临床的常见证型,来自重庆地区的流行病学调查结果显示 RA 湿热瘀阻证的疾病活动度评分、血沉、C-反应蛋白、白细胞和血小板计数及球蛋白水平均明显高于寒湿痹阻证^[3];桂中地区的结果亦显示,RA 证候以湿热阻络证最多见,且多见于疾病活动期^[4]。本院对 475 例 RA 患者进行中医临床证候分析发现湿热瘀阻证与 RA 活动性高度相关^[5]。辽宁地区的结果亦显示,RA 湿热痹阻证炎症反应剧烈,更易出现骨质侵袭^[6]。

蛋白质组学技术的出现为证候学的研究提供了新的手段,能定量考察疾病发生、发展过程中蛋白质种类及数量的改变,发现疾病诊治和预后的特异性标志物。同位素标记相对和绝对定量技术(isobaric tags for relative and absolute quantitation, iTRAQ)是一种定量蛋白质组学技术,其利用 iTRAQ 同位素试剂可同时标记 4 个或 8 个蛋白质样品进行同步比较。对筛选 RA 诊断、治疗的差异蛋白,寻找 RA 的生物学标志物,揭示其发病机制都有一定价值。本研究以 iTRAQ 技术为手段筛选 RA 湿热瘀阻证的蛋白标志物,探索证候的微观物质基础机制,现报告如下。

资料与方法

1 诊断标准

1.1 RA 西医诊断标准 参考 1987 年美国风湿病学会(American College of Rheumatology, 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(European League Against Rheumatism, EULAR)修订的 RA 分类标准^[8-10]。

1.2 中医辨证分型标准 参照《中药新药临床研究指导原则》^[11]中痹证的分型标准分为湿热瘀阻证 30 例,寒湿痹阻证 5 例,痰瘀痹阻证 12 例,气血两虚证 7 例及肝肾亏虚证 6 例。

2 纳入标准 (1)符合 RA 西医诊断标准及 RA 分类标准^[8-10];(2)符合中医湿热瘀阻证及寒湿痹阻、痰瘀痹阻、气血两虚及肝肾亏虚证;(3)年龄 18~65 岁;(4)所有患者及健康对照者均签署知情同意书。

3 排除标准 (1)辨证为寒湿痹阻、痰瘀痹阻、气血两虚及肝肾亏虚证同时兼夹湿热者;(2)合并严重肝肾疾病、心脑血管、呼吸系统或精神疾病者;(3)患有糖尿病且血糖控制不佳者;(4)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 60 例 RA 患者为 2015 年 4 月—2016 年 8 月广安门医院风湿病科门诊及病房患者。其中湿热瘀阻证 30 例,其中男性 4 例,女性 26 例;年龄 30~65 岁,平均(50.4±10.4)岁;病程 1~264 个月,平均(94.0±70.9)个月;非湿热瘀阻证 30 例,其中男性 4 例,女性 26 例;年龄 28~65 岁,平均(50.8±10.5)岁;病程 7~360 个月,平均(88.6±93.2)个月;另选取 30 名健康体检者作为健康对照组,其中男性 4 名,女性 26 名,年龄 35~65 岁,平均(51.3±10.4)岁。3 组一般资料比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。本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 观察项目及检测方法

5.1 血清制备 于清晨空腹采集外周静脉血 2 mL,以 4℃ 2 500 r/min,离心 10 min,取上清分装于 Eppendorf 管,放置于 -80℃ 冰箱保存。

5.2 质谱分析 选取冻存的健康对照组、RA 湿热瘀阻证、非湿热瘀阻证患者血清,各组每个样本血清取 10 μL,分别混合均匀,湿热瘀阻证组标记为 XA,非湿热瘀阻证组标记为 XB,健康组标记为 X。以血清蛋白柱对样本血清进行预处理,进行样品蛋白的收集与纯化,采用考马斯亮蓝法测定样品蛋白的浓度,以 FASP 溶液酶切后,以 iTRAQ 标记试剂盒对酶切样品进行标记,本研究将 114 标记为健康对照组,115 标记为湿热瘀阻证组,117 标记为非湿热瘀阻证组。选择超高效液相色谱(Ultra Performance Liquid Chromatography, UPLC)与四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱(Q-Exactive)联用进行蛋白质分析。

5.3 基因本体论(gene ontology, GO)功能注释 选用 Thermo Proteome Discoverer 2.1 软件

进行蛋白的检索和鉴定,并用质荷比(m/z)114、115、117 报告离子峰面积进行相对定量分析,以 m/z 114 作为对照,按 115:114、117:114 的比值,选择倍数差异 ≥1.5(上调) ≤0.7(下调)为定量比值,进行报告。对鉴定出的血清蛋白质进行 GO 功能注释。

5.4 Western Blot 验证差异蛋白表达 采用 Western Blot 对质谱分析所得差异蛋白进行验证,在差异蛋白验证的选择上,按以下标准:(1)在 RA 湿热瘀阻证与健康对照组之间差异显著,其表达差异 >1.5 倍;(2)差异重复性好,在重复实验中,重复率 >50%;(3)质谱检测信号强,信噪比高;(4)功能检索提示该蛋白具有较重要的生理功能,且目前在 RA 研究领域文献报道较少,与 RA 的基础研究与临床试验的关系有进一步研究的价值。

选取 RA 湿热瘀阻证、非湿热瘀阻证、健康对照组患者血清各 6 例。血清样本中蛋白质浓度以 BCA 蛋白定量试剂盒测定后,进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),进行转膜、封闭、抗体反应、ECL 显色、凝胶成像系统显像,最后进行数据的采集与分析。

6 统计学方法 采用 SPSS 19.0 对数据进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 3 组蛋白鉴定结果(表 1、2) 与健康对照组比较,湿热瘀阻证差异蛋白 72 个,其中上调蛋白 25 个,下调蛋白 47 个,而在非湿热瘀阻证中仅得出上调差异蛋白 1 个,下调蛋白 11 个。

2 GO 功能注释 湿热瘀阻证组上调蛋白相关生物功能主要涉及急性期反应、Fc-gamma 片段受体信号通路介导的吞噬作用、受体介导的内吞作用、补体激活、血小板脱粒、补体激活经典途径、血小板聚集、蛋白质水解、凝血及纤维蛋白凝块形成 9 个方面;差异蛋白位置分布涉及 10 个方面,其中胞外区、细胞外间隙、胞外分泌体占到了 78%;差异蛋白参与的生物过程主要有抗原结合、丝氨酸肽链内切酶激活 2 个方面。下调蛋白相关生物学功能主要涉及 26 个方面,包括补体激活的经典途径、补体激活、受体介导的内吞作用、免疫反应的调节、蛋白质水解、免疫反应等方面;差异蛋白所处细胞位置主要分布于胞外区、胞外分泌体、细胞外间隙、血液微粒、细胞膜等。12 个方面;所参与生物过程包括抗原结合、丝氨酸肽链内切酶激活、胆固醇结合、脂类结合等 10 个方面。

表 1 湿热瘀阻证组差异蛋白表达

差异蛋白	差异倍数
血清淀粉样蛋白 A1	5.119
主动脉平滑肌 肌动蛋白	3.723
脂联素	3.198
富含亮氨酸 α2 糖蛋白	2.476
α1 酸性糖蛋白	2.358
细胞质肌动蛋白	2.257
免疫球蛋白 γ3 链 C 区	2.193
触珠蛋白	2.046
纤维蛋白原 α 链	2.023
C 反应蛋白	2.001
免疫球蛋白 λ 链 V 区 4A	1.999
血清淀粉样蛋白 A4	1.990
吞噬和细胞运动蛋白 1	1.977
免疫球蛋白 κ 链 I 区 Mev	1.920
免疫球蛋白重链 V-I 区 EU	1.909
免疫球蛋白重链 V-II 区 ARH-77	1.840
纤维蛋白原 γ 链	1.833
妊娠带蛋白	1.809
免疫球蛋白 κ 链 V-III 区 CLL	1.781
免疫球蛋白重链 V-I 区 V35	1.776
α1 酸性糖蛋白 1	1.755
透明质酸结合蛋白 2	1.702
免疫球蛋白重链 V-III 区 GAL	1.675
碳酸酐酶 1	1.644
免疫球蛋白 κ 链 V-II 区 TEW	1.566
载脂蛋白 A-II	0.694
N 乙酰胞壁酸 L 酰胺酶	0.668
甘露糖结合蛋白 C	0.661
中间 α-球蛋白抑制因子 H 抑制重链 H2	0.633
补体 C1q 亚单位 B	0.630
血清白蛋白	0.627
Serotransferrin 血清转铁蛋白	0.624
中间 α-球蛋白抑制因子 H 抑制重链 H1	0.622
免疫球蛋白 κ 链 V-III 区 WOL	0.605
载脂蛋白 D	0.587
单核细胞分化抗原 CD14	0.587
免疫球蛋白 λ 链 V-I 区 NEW	0.578
四连接素	0.557
载脂蛋白(a)	0.513
载脂蛋白 A-I	0.504
免疫球蛋白重链 V-III 区 TUR	0.502
免疫球蛋白重链 V-III 区 BUT	0.501
甲状腺素转运蛋白	0.489
性激素结合蛋白	0.450
免疫球蛋白 κ 链 C 区	0.430
羧肽酶 N 催化链	0.373
载脂蛋白 C-III	0.330
免疫球蛋白 λ-7 链 C 区	0.309
免疫球蛋白 α 链 C 区	0.225
免疫球蛋白 κ 链 V-I 区 AG	0.161
免疫球蛋白 λ 链 V-IV 区 Bau	0.117
免疫球蛋白重链 V-III 区 BRO	0.051
细丝蛋白-C	0.010
腺苷酸环化酶 7 型	0.010
补体 C4-A	0.010
免疫球蛋白 λ 链 V-VI 区 AR	0.010
载脂蛋白 F	0.010
锌指 FYVE 结构域蛋白 16	0.010
补体 C1r 链	0.010
免疫球蛋白 κ 链 V-I 区 Wes	0.010
纤蛋白-1	0.010
多巴胺 β 羟化酶	0.010
免疫球蛋白 κ 链 V-III 区 B6	0.010
补体 C8α 链	0.010
免疫球蛋白重链 V-III 区 WEA	0.010
富含组氨酸糖蛋白	0.010
片段结合蛋白	0.010
胸腺素 β-4	0.010
免疫球蛋白 λ 链 V-IV 区 Hil	0.010
细胞黏附分子 2	0.010
羧肽酶 X1	0.010
人角蛋白 17	0.010

表 2 非湿热瘀阻证组差异蛋白表达

差异蛋白	差异倍数
免疫球蛋白 γ-1C 区	1.654
人角蛋白 5	0.296
人角蛋白 16	0.292
锌指蛋白 648	0.634
人角蛋白 1	0.554
人角蛋白 2	0.422
人角蛋白 9	0.624
卵磷脂胆固醇脂酰基转移酶	0.563
人角蛋白 10	0.598
单核分化抗原 CD14	0.673
免疫球蛋白 λ 链 V-IV 链 Bau	0.611
人角蛋白 17	0.447

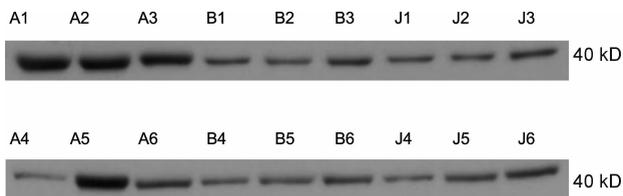
表 3 3 组 LRG1 蛋白水平比较 (pg/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	LRG1
湿热瘀阻证	6	82 576.83 ± 33 446.71* [△]
非湿热瘀阻证	6	34 955.17 ± 6 234.77
健康对照	6	35 539.00 ± 11 421.11

注:与健康对照组比较,* $P < 0.05$;与非湿热瘀阻证组比较,[△] $P < 0.05$

湿热瘀阻证有 6 个蛋白表达与急性期炎症直接相关,分别为血清淀粉样蛋白 A1 (serum amyloid A1, SAA1)、α1-酸性糖蛋白 (α1-acidglycoprotein1, AGP1)、触珠蛋白 (haptoglobin, HP)、α2-酸性糖蛋白 (α2-acidglycoprotein2, AGP2)、血清淀粉样蛋白 A4 (serum amyloid A4, SAA4) 及 C 反应蛋白 (C-reactive protein, CRP);有 3 个蛋白表达与血小板聚集、凝血、纤维蛋白凝块形成相关,分别为肌动蛋白 β (ACTB)、纤维蛋白原 α 链 (fibrinogenα, FGA)、纤维蛋白原 γ 链 (fibrinogenγ, FGG);另外 FGA、FGG、AGP1、AGP2 还与血小板脱粒相关。

3 3 组富亮氨酸 α2 糖蛋白 (leucine-rich alpha-2-glycoprotein, LRG1) 水平比较(表 3) LRG1 在湿热瘀阻证及活动性 RA 中呈高表达,湿热瘀阻证组与非湿热瘀阻证组及健康对照组比较,LRG1 蛋白表达水平差异均有统计学意义($P < 0.05$)。



注:A 为湿热瘀阻证组,A1、A2、A3、A4、A5、A6 为湿热瘀阻证 6 例血清样本;B 为非湿热瘀阻证组,B1、B2、B3、B4、B5、B6 为非湿热瘀阻证 6 例血清样本;J 为健康对照组,J1、J2、J3、J4、J5、J6 为健康对照组 6 例血清样本

图 1 LRG1 蛋白 Western Blot 检测结果

讨 论

在现代医家对于湿热证的客观物质基础的研究中,孙志岭等^[7]应用了 iTRAQ 技术开展风湿性疾病湿热证的血清蛋白组学研究,其以强直性脊柱炎湿热证、痛风湿热证、正常对照组各 20 例血清为研究对象,共获得 15 个湿热证差异蛋白,其中上调蛋白 12 种,

下调蛋白 3 种。通过 GO 分析发现包括 C 反应蛋白、血清淀粉样蛋白 A 在内的 12 个差异蛋白与炎症反应和(或)急性期反应相关,其研究结论与本研究有一定相似性。

LRG1 是富亮氨酸重复序列家庭成员之一,与蛋白间的相互作用、信号转导、细胞黏附及发育密切相关^[12]。LRG1 与 IL-6 关系密切,其可以通过增强 TGF-β-Smad2 通路从而上调 IL-6R 在初始 CD4 细胞中的表达并促进 TH17 细胞的分化从而导致关节炎的发展^[13]。LRG1 可由 IL-6 诱导产生^[14],有研究表明活动期 RA 患者的血清 LRG1 表达水平明显高于经 IL-6 受体阻滞剂 tocilizumab 治疗缓解 24 周后的 RA 患者^[15]。LRG1 也可由炎性细胞因子 IL-1β、TNF-α 和 IL-22 诱导表达^[16],在 tocilizumab 治疗中 LRG1 可能由这些细胞因子诱导,而在以糖皮质激素或甲氨蝶呤治疗后 LRG1 水平并未出现明显改变^[14]。此外,LRG1 可以通过调节内皮细胞 TGF-β 信号通路促进血管的形成^[17]。另一项纳入了 69 例 RA 患者及 48 例健康志愿者为研究对象的研究,发现 LRG1 表达水平与疾病活动度 DAS28、ESR、CRP 呈正相关,但与血清 TNF-α 水平无关^[18]。LRG1 与 RA 炎性因子的表达、血管的形成有着密切的关系,并与 RA 的疾病活动度相关,在本研究中 LRG1 在湿热瘀阻证组中高表达,其有作为 RA 湿热瘀阻证的蛋白标志物的可能,具有进一步研究的价值。

笔者通过湿热瘀阻证、非湿热瘀阻证与健康对照组的对照,得出一系列差异蛋白的表达,其中急性期炎性蛋白、凝血相关蛋白占重要地位,体现出 RA 湿热瘀阻证与疾病的活动性存在重要联系,也为清热活血法治疗活动性 RA 提供了参考依据。不能简单将湿热证等同于炎性蛋白的表达,但这一系列的差异蛋白的表达对于研究湿热瘀阻证的客观物质基础有一定的价值,在接下来的研究中有了更多的研究方向去探索 RA 及湿热瘀阻证的发病机制和微观诊断标准,对进一步探讨中医方药干预及对疾病中蛋白表达的影响都具有重要的意义。

利益冲突:无。

参 考 文 献

- [1] 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.
- [2] Tobón GJ, Youinou P, Saraux A. The environment, geo-epidemiology, and autoimmune disease: Rheumatoid arthritis [J]. *J Autoimmun*, 2010, 35(1): 10–14.
- [3] 王志中, 方勇飞, 罗彦, 等. 322 例湿热痹阻型及寒湿痹阻型类风湿关节炎中医证型的客观化研究[J]. *中国中西医结合杂志*, 2011, 31(4): 466–470.
- [4] 肖敬, 尹智功, 蒋耀平, 等. 桂中地区类风湿关节炎患者中医证候与血小板参数及病情活动指标的相关性研究[J]. *中华中医药学刊*, 2013, 37(4): 1314–1316.
- [5] 姜泉, 蒋红, 曹炜, 等. 475 例类风湿关节炎患者中医临床证候分析[J]. *中医杂志*, 2007, 48(3): 253–255.
- [6] 邢丽丽, 高明利. 辽宁地区类风湿关节炎患者中医证候规律的回顾性研究[J]. *风湿病与关节炎*, 2013, 2(7): 35–38.
- [7] 孙志岭, 王苗苗, 徐骁, 等. 基于 iTRAQ 标记结合生物信息学技术的风湿性疾病湿热证血清蛋白组学研究[J]. *南京中医药大学学报*, 2016, 32(4): 316–321.
- [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]. *Ann Rheum Dis*, 2010, 69(9): 1580–1588.
- [11] 郑筱萸主编. 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] Buchanan SG, Gay NJ. Structural and functional diversity in the leucine-rich repeat family of proteins [J]. *Prog Biophys Mol Biol*, 1996, 65(1–2): 1–44.
- [13] Urushima H, Fujimoto M, Mishima T, et al. Leucine-rich alpha 2 glycoprotein promotes Th17 differentiation and collagen-induced arthritis in mice through enhancement of TGF- β -Smad2 signaling in naive helper [J]. *T Cells Arthritis Res Therapy*, 2017, 19(137): 1–12.
- [14] Shirai R, Hirano F, Ohkura N, et al. Up-regulation of the expression of leucine-rich alpha(2)-glycoprotein in hepatocytes by the mediators of acute-phase response [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 382(4): 776–779.
- [15] Fujimoto M, Serada S, Suzuki K, et al. Leucine-rich alpha-2 glycoprotein as a potential biomarker for joint inflammation during anti-IL-6 biologic therapy in rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2015, 67(8): 2056–2060.
- [16] Serada S, Fujimoto M, Terabe F, et al. Serum leucine-rich alpha-2 glycoprotein is a disease activity biomarker in ulcerative colitis [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2012, 18(11): 2169–2179.
- [17] Wang X, Abraham S, McKenzie JA, et al. LRG1 promotes angiogenesis by modulating endothelial TGF-beta signaling [J]. *Nature*, 2013, 499(7458): 306–311.
- [18] Ha YJ, Kang EJ, Lee SW, et al. Usefulness of serum leucine-rich Alpha-2 glycoprotein as a disease activity biomarker in patients with rheumatoid arthritis [J]. *Kor Med Sci*, 2014, 29(9): 1199–1204.

(收稿: 2018-05-26 在线: 2019-09-19)

责任编辑: 段碧芳

英文责编: 张晶晶