

血清抗核小体抗体表达与系统性红斑狼疮疾病活动相关性评价^{*}

龚淑琪, 徐江霞, 邓连瑞, 龚初平, 徐志华 (南昌大学第四附属医院检验科, 南昌 330003)

【摘要】 目的 研究抗核小体抗体与系统性红斑狼疮(SLE)疾病活动的相关性、灵敏度、特异度等。**方法** 收集 SLE 病例 58 例,按 SLE 疾病活动指数分为非活动组、轻度、中度、重度活动组,同时设对照组 25 例。采用间接免疫荧光法、免疫印迹法、速率散射比浊法、全自动血沉分析仪等分别检测抗核心抗体(ANA)、抗核小体抗体、抗-ds-DNA、抗-Sm、C3、红细胞沉降率(ESR)。**结果** (1)抗核小体抗体阳性检出率与 SLE 疾病活动程度呈正相关($r=0.638, \chi^2=40.235, P=0.00$)。(2)抗核小体抗体对 SLE 疾病诊断的灵敏度(51.72%)高于抗-ds-DNA(20.69%)和抗-Sm(41.38%),其特异度(92%)也与抗-ds-DNA(96%)和抗-Sm(92%)接近。(3)SLE 患者血清抗核小体抗体表达水平与 C3 呈负相关($r=-0.595, P=0.00$),与 ESR 呈正相关($r=-0.783, P=0.00$),而与 ANA 核型、滴度水平无明显相关性($P>0.05$)。**结论** 抗核小体抗体检测作为一项新的与 SLE 疾病活动密切相关、灵敏度高、特异性强且操作简便的实验室评价指标,将在 SLE 疾病诊断、合理治疗及疗效评估方面发挥重要价值。

【关键词】 抗核小体抗体; 系统性红斑狼疮; C3; 抗核抗体

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2013.05.001 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2013)05-0513-02

Evaluation on correlation between serum anti-nucleosome antibody and activity of systemic lupus erythematosus^{*}

GONG Shu-qi, XU Jiang-xia, DENG Lian-rui, GONG Chu-ping, XU Zhi-hua (Department of Clinical Laboratory, Fourth Affiliated Hospital, Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330003, China)

【Abstract】 Objective To study the correlation between anti-nucleosome antibody(ANuA) and the activity of systemic lupus erythematosus(SLE),and the sensitivity and specificity of ANuA in SLE diagnosis. **Methods** 58 SLE patients were collected and divided into three groups according to SLE disease activity index(DAI),inactive group, mild activity group,moderate and severe activity group. Other 25 cases including other rheumatic diseases and health subjects were collected as the control group. Then ANA,ANuA,ds-DNA antibody,anti-Sm,C3 and ESR were detected by using indirect immunofluorescence,Western blotting,rate nephelometry assay and automatic ESR analyzers, etc. **Results** (1) The positive rate of ANuA was positively correlated with the disease activity level of SLE($r=0.638, \chi^2=40.235, P=0.00$). (2) The sensitivity of ANuA in diagnosing SLE was 51.72%,which was higher than 20.69% of ds-DNA antibody and 41.38% of anti-Sm,the specificity of ANuA was 92%,which was close to 96% of ds-DNA antibody and 92% of anti-Sm. 3. The ANuA expression level in SLE's serum was negatively correlated with C3($r=-0.595, P=0.00$),and positively correlated with ESR($r=-0.783, P=0.00$),but had no significant correlation with ANA karyotype and titer($P>0.05$). **Conclusion** The ANuA detection is regarded as a new laboratory evaluation index with the close correlation with SLE activity,high sensitivity and strong specificity in diagnosing SLE, and is easy to operate,which will play an important role in SLE diagnosis,rational therapy and curative effects assessment.

【Key words】 ANuA; SLE; C3; ANA

系统性红斑狼疮(SLE)是一种好发于青年女性的全身性自身免疫病,可以累及机体几乎所有的器官或系统,其发病率有逐年上升的趋势,是危害我国人民身体健康的常见风湿免疫性疾病之一。其血清学特点是具有多种自身抗体,以抗核抗体(ANA)为代表,特别是针对染色体及其各组成成分(如:ds-DNA、组蛋白、核糖体等)的抗体。目前治疗 SLE 的药物主要是糖皮质激素、免疫抑制剂等,其在缓解病情的同时,也给机体带来很多不良反应。因此,明确 SLE 疾病诊断、活动度对指导临床合理用药具有重要意义。目前已肯定的用于 SLE 疾病诊断的自身抗体指标只有抗-ds-DNA,但其敏感性较低,只有 28%~51.6%^[1-2],而用于判断 SLE 疾病活动的实验室指标主

要有补体 C3、红细胞沉降率(ESR)、C-反应蛋白(CRP)等非特异性评价指标^[3]。近年来,抗核小体抗体在 SLE 疾病发生、发展中的作用日益受到国内外学者们的关注^[4-6]。研究发现抗核小体抗体对 SLE 诊断的敏感性明显高于抗-ds-DNA^[4-5,7],而有关抗核小体抗体与 SLE 疾病活动相关性方面的文献报道还不多。本研究通过分析抗核小体抗体阳性检出率与 SLE 疾病活动度的相关性以及抗核小体抗体表达与 ANA、C3、ESR 等传统疾病活动评价指标之间的相关性,试图寻找一项新的与 SLE 疾病活动密切相关、灵敏度高、特异性强且操作简便的实验室评价指标,为 SLE 疾病诊断、合理治疗及疗效评估提供实验室依据。

^{*} 基金项目:江西省卫生厅科技计划项目(20091178)。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2009 年 1 月至 2012 年 7 月本院诊断符合美国风湿病学会 1997 年修订的 SLE 诊断标准且近期末使用激素及细胞毒类药物治疗的 SLE 病例 58 例。依据 1997 年美国风湿学会制定的 SLE 疾病活动指数(SLE DAI)评分标准对所选病例评分,0~4 分为非活动组,5~9 分为轻度活动组,≥10 分为中、重度活动组。同时收集对照组病例 25 例(包括类风湿关节炎 10 例、干燥综合征 10 例、健康体检者 5 例)。

1.2 仪器及试剂 免疫印迹法 ANA 谱检测试剂盒、ANA 间接免疫荧光法检测试剂盒均由德国欧蒙公司提供。Olympus 荧光显微镜、EUROLineScan 扫描分析软件、DRAGONMED 2010 全自动血沉分析仪、美国德灵全自动特定蛋白分析仪 BN-100 及配套 C3 检测试剂盒。

1.3 检测步骤 间接免疫荧光法检测 ANA 滴度、核型(颗粒型、均质型);免疫印迹法检测抗核小体抗体、抗-ds-DNA、抗-Sm,EUROLineScan 扫描分析软件判读结果,依据显色条带的灰度值不同可分为-、+、++、+++不同等级;速率散射比浊法检测 C3(单位:g/L),全自动血沉分析仪检测 ESR(单位:mm/h)。所有检测项目均严格按说明书操作。

1.4 统计学方法 采用 SPSS17.0 软件统计分析,定性数据用 χ^2 检验,定量数据用 Bivariate correlation 检验,相关性分析均采用 Pearson 检验得到 Pearson 相关系数(r), $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 抗核小体抗体阳性率在 SLE 不同活动组比较 结果如表 1 显示,抗核小体抗体阳性检出率在 SLE 不同活动组差异有统计学意义($\chi^2=40.235, P=0.00$),且与 SLE 疾病活动程度呈正相关($r=0.638$)。

2.2 比较抗核小体抗体、抗-ds-DNA、抗-Sm 在 SLE 疾病诊断中灵敏度和特异度 根据表 1 结果计算出抗核小体抗体、抗-ds-DNA、抗-Sm 在 SLE 疾病诊断中灵敏度分别为 51.72%、20.69%、41.38%,特异度分别为 92%、96%、92%。结果表明抗核小体抗体灵敏度高于抗-ds-DNA、抗-Sm,特异度也与后两者接近。

2.3 比较 SLE 患者血清抗核小体抗体表达水平与 C3、ESR 的相关性 结果如表 2 显示,抗核小体抗体的表达水平与 C3 呈负相关($r=-0.595, P=0.00$),与 ESR 呈正相关($r=-0.783, P=0.00$)。

表 1 3 种自身抗体在 SLE 不同疾病活动组及对照组中阳性率[n(%)]

组别	总例数	抗核小体抗体 [#]	抗-ds-DNA	抗-Sm
非活动组	16	0(0.0)	0(0.0)	6(37.5)
轻度活动组	22	14(63.6)	2(9.1)	2(9.1)
中、重度活动组	20	16(80.0)	10(50.0)	16(80.0)
对照组	25	2(8.0)	1(4.0)	2(8.0)

注:[#] 抗核小体抗体阳性率在 SLE 不同疾病活动组中差异有统计学意义, $\chi^2=40.235, P=0.00$ 。

2.4 比较 SLE 患者血清抗核小体抗体表达与 ANA 滴度、核型的相关性 结果如表 3 显示,抗核小体抗体阳性组 ANA 滴度略高于抗核小体抗体阴性组,且均质型核型多于抗核小体抗体阴性组,但差异无统计学意义($P>0.05$)。因此,抗核小体

抗体表达与 ANA 滴度、核型无相关性。

表 2 比较 SLE 患者抗核小体表达与 C3、ESR 水平

抗核小体抗体	<i>n</i>	C3 [#] (g/L)	ESR [#] (mm/h)
—	28	0.68±0.14	22.63±11.06
+	20	0.62±0.20	39.85±16.18
++	10	0.32±0.08	98.9±25.03

注:[#] C3、ESR 水平与抗核小体抗体表达水平相关, $P<0.05$ 。

表 3 SLE 患者抗核小体抗体表达与 ANA 核型、滴度比较(*n*)

抗核小体 抗体	<i>n</i>	ANA 核型		ANA 滴度		
		颗粒型	均质型	1:100	1:320	≥1:1 000
阴性	28	20	8	3	10	15
阳性	30	14	16	0	10	20

3 讨 论

核小体是细胞凋亡过程中释放的自身抗原成分之一,是真核细胞染色质基本重复结构的亚单位,由 ds-DNA 和组蛋白构成。生理情况下,凋亡形成的少量核小体可被邻近单核-巨噬细胞迅速吞噬清除,不会诱导机体产生自身抗体。病理情况下,大量细胞发生坏死或凋亡所产生的核小体不能被及时清除,大量释放到细胞间质中,其作为一种触发性自身抗原可诱导机体产生一系列自身抗体,早期以抗核小体抗体为主,后期可出现抗-ds-DNA、组蛋白抗体等^[8]。核小体除了它的触发性自身抗原作用外,还可与抗核小体抗体结合形成免疫复合物,沉积在局部组织,激活补体,介导组织损伤,参与 SLE 的疾病发生、发展,尤其是狼疮性肾炎的发生^[9]。随着人们对核小体及抗核小体抗体致病机制的深入认识,评价抗核小体抗体检测在 SLE 疾病诊断中的应用已成为一个研究热点。

本研究通过对本院近两年来诊断的 SLE 病例数据进行回顾性分析,发现抗核小体抗体阳性检出率与 SLE 疾病活动程度呈正相关,抗核小体抗体在 SLE 疾病诊断中的灵敏度高于抗-ds-DNA 和抗-Sm,特异度也与抗-ds-DNA 和抗-Sm 接近。SLE 患者血清抗核小体抗体表达水平与 C3 呈负相关,与 ESR 呈正相关,而与 ANA 核型、滴度水平无明显相关性。

综上所述,抗核小体抗体检测作为一项新的与 SLE 疾病活动密切相关、灵敏度高、特异性强且操作简便的实验室评价指标,将在 SLE 疾病诊断、合理治疗及疗效评估方面发挥重要作用。

参考文献

[1] Kiss E,Lakos G,Nemeth J,et al. Significance of anti-nucleosome(anti-chromatin) auto-antibodies in systemic lupus erythematosus [J]. Orv Hetil,2001,142(32):1731-1736.
[2] Carins AP,Mcmillan SA,Crockard AD,et al. Antinucleosome antibodies in the diagnosis of systemic lupus Erythematosus [J]. Ann Rheuma Dis,2003,62(3):272-273.
[3] 袁风红,孙凌云,潘文友,等. 系统性红斑狼疮患者活动性发热特点及相关性分析[J]. 中华风湿病学杂志,2011,15(10):666-670.
[4] Min DJ,Kim SJ,Park SH,et al. Anti-nucleosome antibody;significance in lupus patients lacking (下转第 517 页)

绝,导致精子运动能力减弱甚至死亡。已有研究表明,精子质膜的破坏必然伴随着精子内容物的丢失,其中包括酶的渗漏^[6-8]。在人类和哺乳动物的精子中存在着 AST 及其同工酶^[8]。它具有两种同工酶,一种主要分布于胞质中称胞质 AST(cytosolic AST,c-AST),一种紧密附着于线粒体上称线粒体型 AST(mitochondrial AST,m-AST)。在精子轻度损伤时,主要是细胞质内的 c-AST 透过精子膜释放入精浆,而线粒体内的 m-AST 有两层线粒体膜的保护,不易释放入精浆。当精子坏死,线粒体崩解时,附着在线粒体上的 m-AST 大量释放入精浆,导致精浆中 m-AST 急剧升高。所以精浆中 m-AST 不仅能反映精子膜的受损,更能反映精子坏死的严重程度。

作者在前期采用速率法试剂盒对精浆 AST 活性进行了方法学评价^[9-10],而本实验对精浆 AST 和 m-AST 活性进行测定,发现精浆中存在 AST 和 m-AST 活性,平均活性分别为(238±125)U/L 和(147±79)U/L,两者呈明显正相关性($r=0.740,P=0.000$),反映了精子膜的受损伴随着 AST 和 m-AST 的渗漏。与 HOS-EY 实验结果比较表明:精浆 AST 和 m-AST 活性均与(I+II+III)型精子呈明显正相关性,由于精子头部或(和)尾部受损,精子内 AST 和 m-AST 渗漏到精浆中,说明了精子膜功能不完整性与 AST 和 m-AST 活性具有相关性,AST 和 m-AST 活性越高,(I+II+III)型精子数量就越多;而精浆 AST 和 m-AST 活性均与 IV 型精子呈明显负相关性,进一步说明了精子膜功能完整性与 AST 和 m-AST 的相关性。有研究表明精浆中 AST 活性的增加是线粒体受损害所致^[11],本实验结果显示精浆 AST 活性与精子 SDH 阳性率呈无明显相关性,而精浆 m-AST 活性与精子 SDH 阳性率呈明显负相关性,说明了精浆 m-AST 活性越高,精子 SDH 阳性率就越低,精子膜不仅受损,而且它受损严重并累及线粒体受到损害,反映了精液质量的严重程度。

总之,本实验的结果显示,通过对精浆 AST 和 m-AST 活性的检测能反映精子膜功能的完整性,而 m-AST 活性检测更适合评价精子膜受损程度以及精子线粒体受损状况。

参考文献

[1] Katsoff D, Check ML, Check JH. Evidence that sperm

with low hypoosmotic swelling scores cause embryo implantation defects[J]. Arch Androl, 2000, 44(3): 227-230.

[2] Patankar SS, Deshkar AM, Sawane MV, et al. The role of hypo-osmotic swelling test in recurrent abortions[J]. Indian J Physiol Pharmacol, 2001, 45(3): 373-377.

[3] 岳林. 精子膜完整性与精子功能评估的相关性研究[J]. 中国计划生育学杂志, 2005, 13(6): 363-364.

[4] 丰一兴, 朱伟杰. 应用人精子头-尾膜完整性试验对生育力组及不育组精液的评价[J]. 中国优生与遗传杂志, 2005, 13(2): 101-102.

[5] 熊承良, 吴明章, 刘继红, 等. 人类精子学[M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 2002: 416.

[6] Alvarez JG, Storey BT. Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation[J]. J Androl, 1992, 13(3): 232-241.

[7] Mortimer D, Bramley TA. Glutamic-oxalacetic transaminase leakage from human spermatozoa as an indicator of cryodamage [J]. Arch Androl, 1981, 6(4): 337-341.

[8] Mortimer D, Johnson AV, Long-Simpson LK. Glutamic-oxaloacetic transaminase isozymes in human seminal plasma and sperm extracts[J]. Int J Fertil, 1988, 33(4): 291-295.

[9] 彭明, 顾向明. 精浆天门冬氨酸氨基转移酶活性检测及方法学评价[J]. 检验医学与临床, 2011, 8(5): 516-517.

[10] 彭明, 顾向明. 不同保存温度对精浆天门冬氨酸氨基转移酶活性和稳定性的影响[J]. 检验医学与临床, 2011, 8(8): 901-904.

[11] Roychoudhury PN, Gowda HC, Pareek PK. Effect of different glycerol levels on the release of glutamic oxaloacetic transaminase(GOT) from deep frozen ram spermatozoa [J]. Andrologia, 1975, 7(3): 211-215.

(收稿日期: 2012-08-19 修回日期: 2012-12-04)

(上接第 514 页)

anti-double-stranded DNA antibody[J]. Clin Exp Rheumatol, 2002, 20(1): 13-18.

[5] 苏茵, 韩蕾, 栗占国, 等. 抗核小体抗体测定在系统性红斑狼疮诊断中的意义[J]. 中华风湿病学杂志, 2003, 7(8): 474-477.

[6] 郝进, 郝飞, 钟白玉, 等. 系统性红斑狼疮患者外周血单一核细胞核小体释放水平及其临床意义[J]. 中华皮肤科杂志, 2003, 36(7): 372-374.

[7] Bizzaro N, Villalta D, Giavarina D, et al. Are anti-nucleosome antibodies a better diagnostic marker than anti-dsD-

NA antibodies for systemic lupus erythematosus? A systematic review and a study of metanalysis[J]. Autoimmun Rev, 2012, 12(2): 97-106.

[8] Monestier M. Autoantibodies to nucleosomes and histone-DNA complexes [J]. Methods, 1997, 11(1): 36-43.

[9] Hung WT, Chen YM, Lan JL, et al. Antinucleosome antibodies as a potential biomarker for the evaluation of renal pathological activity in patients with proliferative lupus nephritis [J]. Lupus, 2011, 20(13): 1404-1410.

(收稿日期: 2012-08-31 修回日期: 2012-12-07)