

抗水通道蛋白 4 抗体诊断视神经脊髓炎的临床价值

苏国华,冯丽萍,刘立海(河北省沧州市人民医院神经内科 061000)

【摘要】 目的 通过检查视神经系统脊髓炎疾病患者的空腹抗水通道蛋白 4 抗体(抗 AQP4 抗体)水平,探讨神经脊髓型多发性硬化疾病中抗 AQP4 抗体的敏感性,并进一步研究抗 AQP4 抗体在神经脊髓炎临床诊断中的应用价值。**方法** 选取沧州市人民医院 2012 年 1 月至 2014 年 1 月 100 例神经神经脊髓炎疾病患者,采用间接免疫荧光法检测患者抗 AQP4 抗体水平。**结果** 按照研究界定标准,100 例视神经脊髓炎患者中 53 例为阳性。在分别转染至 pcDNA3.1 及 pcDNA3.1-hAQP4 质粒的 FRT 细胞上视神经脊髓炎患者血清免疫染色结果提示,AQP4 抗体与视神经脊髓炎血清识别靶抗原为同种蛋白。**结论** 抗 AQP4 抗体是视神经脊髓炎患者血清中自身抗体 NMO-IgG 所识别的靶蛋白,在人体视神经脊髓炎的发病过程中起到了十分重要的作用。

【关键词】 抗水通道蛋白 4 抗体; 视神经脊髓炎; 诊断价值

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2014.24.034 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2014)24-3465-02

视神经脊髓炎是一种炎性中枢神经系统脱髓鞘神经疾病,主要影响人体的视神经和脊髓,临床表现为选择性的累及人体神经和脊髓,诱发脊髓炎或视神经炎,其病理改变的关键在于脱髓鞘、硬化斑、坏死空洞的形成,并伴随血管周围炎性细胞浸润^[1]。近年来,随着大量临床研究的问世,视神经脊髓炎的免疫机制也逐渐确定,基本认为该病是一种选择性、侵袭性损伤视神经和脊髓的自身免疫性疾病^[2]。本研究通过检查视神经脊髓炎患者的空腹抗水通道蛋白 4 抗体(抗 AQP4 抗体)水平,探讨神经脊髓型多发性硬化疾病中抗 AQP4 抗体的敏感性,并进一步研究抗 AQP4 抗体在神经脊髓炎临床诊断中的应用价值。现将相关研究结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2012 年 1 月至 2014 年 1 月本院视神经脊髓炎患者 100 例,其中男 10 例,女 90 例。经伦理委员会审核批准,在事先征得患者同意的条件下,取 100 例视神经脊髓炎患者的血清标本进行临床检验,入选 100 例患者在不考虑抗 AQP4 抗体阳性的基础上按照 2006 年视神经脊髓炎的诊断标准进行临床诊断。

1.2 仪器与试剂 间接免疫荧光检测法试剂选择 F12 coon's、胎牛血清、Lipofectamine™ 2000、牛血清清蛋白(BSA)、兔抗人 AQP4 抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗人和羊抗兔 IgG 二抗、Cy3 标记羊抗人 IgG 二抗、琼脂糖等。

1.3 检测方法 所有患者血清中 AQP4 抗体水平的检测均采用人 AQP4 转染细胞间接免疫荧光法,于转染前 1 d 将 FRT 细胞(37 ℃,5% CO₂ 条件下培养)应用 0.25% 的胰酶予以消化,在 60%~80% 的合适密度下将培养处理后的细胞接种于 12 孔板中;根据 Lipofectamine™ 2000 的说明书上的操作流程,将人 AQP4 质粒导入至 FRT 细胞中,并于细胞转染后 45 h 使用磷酸盐缓冲液(PBS)(含有 4% 多聚甲醛)进行固定,经 0.1% 聚氧乙烯辛基苯及醚磷酸盐缓冲液(Triton X-100PBS)通透后,应用 PBS(含有 2% 的 BSA)封闭液予以室温封闭;随后加入视神经脊髓炎患者血清,在 4 ℃ 下孵育 12 h,用 PBS 清洗 3 遍,加入 Cy3 标记羊抗人 IgG 二抗中和后使用 PBS 洗掉非特异性结合抗体,最后奥林巴斯 BX60 荧光显微镜下观察并摄取影像资料^[3]。研究过程中阳性标本滴度的确定以

1:1 000 作为阳性滴度最大值,以 64× 为界值作为最小阳性滴度^[3]。

2 结果

按照研究界定标准,100 例视神经脊髓炎患者中 53 例为阳性。在分别转染至 pcDNA3.1 及 pcDNA3.1-hAQP4 质粒的 FRT 细胞上视神经脊髓炎患者血清免疫染色结果提示:(1)转染空质粒 FRT 细胞中并不存在特异性染色;(2)转染 AQP4 基因 FRT 细胞中存在明显细胞膜染色;(3)水通道蛋白 AQP4 在细胞膜上的表达说明视神经脊髓炎患者血清中抗体有极大可能识别水通道蛋白 AQP4。利用表达人 AQP4 抗体的 FRT 细胞通过高特异性的 AQP4 抗体阳性作为对照,检测视神经脊髓炎患者血清中含有的抗体识别靶蛋白,研究结果表明,AQP4 抗体与视神经脊髓炎血清识别靶抗原为同种蛋白,即 AQP4 蛋白。抗 AQP4 抗体针对男性以及女性患者阳性率的比较情况,见表 1。

表 1 抗 AQP4 抗体在男性及女性患者阳性率的比较

性别	抗 AQP4 抗体阳性(n)	抗 AQP4 抗体阴性(n)	阳性率(%)
男	2	8	20.00
女	65	25	72.22

3 讨论

临床上将视神经脊髓炎称为 Devic 病、Devic 综合征等,其他亚洲国家称其为视神经脊髓炎型多发性硬化,属于先后或同时累及视神经及脊髓的急性或亚急性脱髓鞘疾病^[4]。本研究主要探讨抗 AQP4 抗体在视神经脊髓炎患者血清中的表达,以及抗 AQP4 抗体在视神经脊髓炎临床诊断中的应用价值。作为水通道中在人体中枢神经系统表达最为丰富的成员,抗 AQP4 抗体参与了视神经脊髓炎、脑水肿等多种常见临床疾病的发病过程^[4]。大量临床研究表明,抗 AQP4 抗体在大鼠脑中主要表达于星形胶质细胞及室管膜细胞当中,在与毛细血管及软脑膜直接相连接的胶质细胞表达十分丰富^[5]。自从临床研究确认视神经脊髓炎-IgG 靶抗原为 AQP4 抗体以来,临床对于视神经脊髓炎这一疾病检测的灵敏度与特异性有了较为显著的提高,但 AQP4 抗体的特异性在视神经脊髓炎发病期

间的确切作用临床上尚无明确解释^[5]。

在许多临床研究中,AQP4 抗体的特异性和高灵敏度均有助于视神经脊髓炎的临床诊断,本组研究显示 100 例视神经脊髓炎患者血清中自身免疫性抗体靶抗原为水通道 AQP4 抗体,进一步证实了 AQP4 抗体在视神经脊髓炎生理及病理过程中的重要作用。目前 AQP4 抗体已经成为视神经脊髓炎临床诊断标准中所包含的一项指标,并且 AQP4 抗体也是其他中枢神经系统免疫性疾病鉴别的重要实验室指标^[6]。尽管 AQP4 抗体已经作为视神经脊髓炎临床诊断中一项必要的支持条件,但该诊断标准是建立在临床以及磁共振成像(MRI)检查的基础上的,AQP4 抗体作为视神经脊髓炎疾病的一项支持诊断条件,能够明显提升诊断视神经脊髓炎的特异性。此外,尤为重要的是在其他中枢神经系统脱髓鞘疾病中,如临床尚不满足于 MRI 诊断,AQP4 抗体则是唯一具有高特异性的能够鉴别视神经脊髓炎的诊断指标^[6]。

本研究还发现,抗 AQP4 针对男性患者表现的阳性率为 20.00%,针对女性患者的阳性率为 72.22%,女性患者的阳性率明显高于男性患者($P<0.05$)。视神经脊髓炎在东西方的临床诊断中存在一定争论,日本一般将此类患者鉴别为多发性硬化,而欧美国家通常将此类患者诊断为视神经脊髓炎^[7];本研究用于检测 AQP4 抗体在视神经脊髓炎患者血清中高表达的实验室方法是目前国内最敏感的 AQP4 抗体检测法。与 AQP4 抗体阳性相关的一些临床表型,如不满足视神经脊髓炎发展成为中枢神经系统脱髓鞘疾病的常规诊断标准,这更加证实了 AQP4 抗体在视神经脊髓炎临床诊断鉴别中的价值及其在免疫性疾病特异性标记物和预测预后方面的临床价值。一般来说,AQP4 抗体血清阳性患者的疾病有进一步发展或致残的危险性。因此,作者提倡检测视神经脊髓炎患者血清中的 AQP4 抗体表达,并且对于 AQP4 抗体阳性患者应给予免疫抑

制剂治疗,以有效控制疾病的发展。

参考文献

[1] Waters PJ,McKeon A,Leite MI,et al. Serologic diagnosis of NMO: a multicenter comparison of aquamarine-4-IgG assays[J]. Neurology,2012,78(9):665-671.

[2] Granieri L,Marnetto F,Valentino P,et al. Evaluation of a multiparametric immunofluorescence assay for standardization of neuromyelitis optica serology[J]. PLoS ONE, 2012,7(6):e38896.

[3] Matiello M,Schaefer-Klein JL,Hebrink DD,et al. Genetic analysis of aquamarine-4 in neuromyelitis optica[J]. Neurology,2011,77(12):1149-1155.

[4] Gosselin N,Bottari C,Chen JK,et al. Electrophysiology and functional MRI in post-acute mild traumatic brain injury[J]. J Neurotrauma,2011,28(3):329-342.

[5] Rao KV,Reddy PV,Curtis KM,et al. Aquaporin-4 expression in cultured astrocytes after fluid percussion injury[J]. J Neurotrauma,2011,28(3):371-381.

[6] Wang KC,Tsai CP,Lee CL,et al. The prevalence of long spinal cord lesions and anti-aquamarine 4 antibodies in osteomyelitis optical patients in Taiwan[J]. Eur Neurol, 2011,65(2):99-104.

[7] Sharma R,Fischer MT,Bauer J,et al. Inflammation induced by innate immunity in the central nervous system leads to primary astrocyte dysfunction followed by demyelination[J]. Acta Neuropathol,2010,120(2):223-236.

(收稿日期:2014-03-10 修回日期:2014-06-12)

(上接第 3464 页)

[J]. 中国骨与关节损伤杂志,2013,28(4):399-340.

[7] Magalini S,Pepe G,Panunzi S,et al. Observational study on preoperative surgical field disinfection: povidone-iodine and chlorhexidine-alcohol[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2013,17(24):3367-3375.

[8] Dresing K. Infections in trauma and orthopedic surgery [J]. Oper Orthop Traumatol,2013,25(3):220-224.

[9] 张艳. 急诊外科创伤手术切口感染的临床分析及预防研究[J]. 中国医药导刊,2013,15(11):1785-1786.

[10] Korim MT,Payne R,Bhatia M. A case-control study of surgical site infection following operative fixation of fractures of the ankle in a large UK trauma unit[J]. Bone Joint J,2014,96-B(5):636-640.

[11] 马冰. 急诊外科创伤手术切口感染的预防和控制研究 [J]. 中国医药指南,2013,11(22):561-562.

[12] Walaszek M,Zieñczuk W,Wolak Z,et al. Surgical site infections in patients of orthopedic - trauma unit in district hospital in 2008-2012[J]. Przegl Epidemiol,2013,67(3): 439-444.

[13] 玉山江·买买提. 324 例外科手术中应用抗生素预防切口感染临床观察[J]. 中国社区医师(医学专业),2011,13 (21):178.

[14] May C,Yen YM,Nasreddine AY,et al. Complications of plate fixation of femoral shaft fractures in children and adolescents[J]. J Child Orthop,2013,7(3):235-243.

(收稿日期:2014-03-20 修回日期:2014-07-26)

欢迎投稿

欢迎订阅