

抗核抗体及特异性自身抗体检测结果的应用分析

邱蕴文¹, 吴俊渊² (1. 江苏省南通市第一人民医院检验科 226001; 2. 南通大学附属第二医院检验科, 江苏南通 226001)

【摘要】 目的 探讨间接免疫荧光法(IIF)检测抗核抗体(ANA)及线性免疫印迹法(LIA)检测特异性自身抗体在自身免疫性疾病(AID)诊断中的应用价值。**方法** 1 386 例患者标本同时采用 IIF 法检测 ANA 和用 LIA 法检测特异性自身抗体, 结合临床诊断将患者分为 AID 组和非 AID 组, 将两种方法检测结果进行比较分析。**结果** IIF 和 LIA 诊断 AID 的灵敏度分别为 83.02% 和 60.38%, 特异度分别为 65.87% 和 84.13%, 两者联合检测诊断 AID 的灵敏度和特异度分别为 83.73% 和 94.58%, 阴性预期值为 85.22%; 在 222 例 IIF 与 LIA 结果不一致的 AID 患者中, 有 129 例诊断为类风湿性关节炎(RA), 其中结果为 IIF(+)LIA(-)的, 诊断为 RA 的 114 例, 占 62.30%; 结果为 IIF(-)LIA(+), 诊断为 RA 的 15 例, 占 38.46%, 其次诊断为多发性肌炎/皮肌炎(PM/DM)的占 30.77%, 没有诊断为系统性红斑狼疮的病例。**结论** IIF 和 LIA 联合检测, 可提高 AID 诊断的特异性和准确性, 且对排除 AID 诊断是有一定意义的。当两种检测结果不一致时, 应根据患者临床症状, 作进一步相关检查, 以便明确诊断。

【关键词】 抗核抗体; 特异性自身抗体; 间接免疫荧光法; 线性免疫印迹法; 自身免疫性疾病

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2016.06.015 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2016)06-0763-02

Application analysis of determination results of anti-nuclear antibody and specific autoantibodies QIU Yun-wen¹, WU Jun-yuan² (1. Department of Clinical Laboratory, Nantong First People's Hospital, Nantong, Jiangsu 226001, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Second Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong, Jiangsu 226001, China)

【Abstract】 Objective To explore the application value of the indirect immunofluorescence(IIF) method for detecting anti-nuclear antibody(ANA) and the linear immunoblotting(LIA) method for detecting specific autoantibodies in the diagnosis of autoimmune disease(AID). **Methods** Totally 1 386 of samples from the patients were simultaneously detected ANA by IIF and the specific autoantibodies by LIA. These patients were divided into the AID group and the non-AID group by combining with the clinical diagnosis. The results detected by the two kinds of method were performed the comparative analysis. **Results** The sensitivities of IIF and LIA in the diagnosis of AID were 83.02% and 60.38%, their specificities were 65.87% and 84.13% respectively, while the sensitivity and specificity of combined detection in the diagnosis of AID were 83.73% and 94.58%, the negative predictive value was 85.22%. In 222 patients with inconsistent IIF and LIA results, 129 cases were diagnosed as rheumatoid arthritis(RA), in which, 114 cases were IIF(+) LIA(-) and accounted for 62.30%; 15 cases were IIF(-) LIA(+) and accounted for 38.46%; followed by a diagnosis of polymyositis/dermatomyositis (PM/DM), which accounted for 30.77%, there was no diagnosis of systemic lupus erythematosus (SLE). **Conclusion** The combined detection of IIF and LIA can improve the specificity and accuracy of AID diagnosis, and has certain significance to rule out the diagnosis of AID. When the two detection results are inconsistent, the further related detection should be conducted according to clinical symptoms for clarifying the diagnosis.

【Key words】 antinuclear antibody; specific autoantibody; indirect immunofluorescence; linear immunoblotting; autoimmune diseases

抗核抗体(ANA)是针对自身真核细胞的多种细胞核成分为靶抗原的自身抗体, 通常临床上将 ANA 作为自身免疫性疾病(AID)的筛查项目^[1]。当 ANA 检测阳性时, 再做特异性自身抗体检测^[2]。但在实际工作中发现, 有时一些明确诊断为 AID 的患者, ANA 筛查试验结果为阴性^[3-4], 而部分筛查结果为阳性的, 最后诊断为非 AID 患者, 如果将患者标本同时进行检测, 也常发现两种检测结果并不完全相符。本研究对 1 386 例临床就诊患者血清标本, 采用间接免疫荧光法(IIF)检测 ANA, 用线性免疫印迹法(LIA)检测 15 种特异性自身抗体, 对

结果进行比较分析, 探讨两种检测方法在自身免疫性疾病诊断中的应用价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2013 年 11 月至 2014 年 4 月就诊于南通市第一人民医院和南通市良春风湿病医院申请自身抗体谱检测的患者 1 386 例, 其中明确诊断为 AID 的 636 例中, 男 232 例, 女 404 例; 年龄 12~81 岁, 平均(51.5±15.6)岁, AID 患者诊断均符合国际相关学会的诊疗指南。所有确诊患者均具有典型 AID 临床特征, 包括骨关节病变、结缔组织病变、皮肤黏

膜病变、神经血管病变及其他辅助检查如 X 线改变等;诊断为其他疾病的非 AID 患者 750 例,其中男 304 例,女 444 例;年龄 14~82 岁,平均(49.7±12.2)岁。所有患者均采集清晨空腹静脉血,离心分离血清后,同时采用 IIF 法检测 ANA 和用 LIA 法检测 15 种特异性自身抗体。

1.2 IIF 法检测 ANA 采用德国欧蒙公司提供的 ANA (Hep-2/猴肝马赛克)IIF 试剂盒。将人血清样本用 PBS 吐温缓冲液 1:100 稀释后与 Hep-2 和猴肝生物载片室温反应 30 min,再用 PBS 吐温缓冲液流水冲洗载片后浸泡 5 min,加入 FITC 标记的抗人球蛋白(荧光二抗)后避光温育 30 min 后,再用 PBS 缓冲液清洗后浸泡 5 min,待干后以甘油封片,由专业人员在荧光显微镜下观察。根据特异性荧光模式来进行定性和抗体滴度的结果判断,以抗体滴度大于或等于 1:100 为阳性。

1.3 LIA 法检测特异性自身抗体 采用德国欧蒙公司的特异性自身抗体谱(IgG)检测试剂盒检测抗 nRNP、抗 Sm、抗 SS-A、抗 Ro-52、抗 SS-B、抗 Scl-70、抗 PM-Scl、抗 Jo-1、抗 CENP-B、抗 PCNA、抗 dsDNA、抗核小体、抗组蛋白、抗核糖体 P 蛋白和抗 AMA M2。先将模条放入温育槽,加入 1:101 稀释的血清 15.0 mL,于摇床温育 30 min,再用 1.5 mL 清洗缓冲液洗 3 次,每次 5 min。加入酶结合物 1.5 mL,温育 30 min,再清洗 3 次后加入 1.5 mL 底物液,10 min 后加蒸馏水冲洗终止,待干后用 CANON 台式扫描仪扫描模条,用 EUROLiScan 软件判读结果;着色强度大于或等于 11 为阳性。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件对数据进行处理及统计学分析,计数资料采用百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验。以 $\alpha=0.05$ 为检验水准, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 IIF 和 LIA 诊断 AID 的灵敏度和特异度比较 两组 IIF、LIA 检测结果见表 1,其中单独用 IIF 诊断 AID 的灵敏度为 83.02%,特异度为 65.87%,单独用 LIA 诊断灵敏度为

60.38%,特异度为 84.13%。在两种检测结果一致的 835 例患者中,IIF 和 LIA 联合应用诊断 AID 的灵敏度 83.73%,特异度为 94.58%,阴性预期值为 85.22%。

表 1 两组 IIF、LIA 检测结果比较(n)

组别	n	IIF(+)LIA(+)	IIF(+)LIA(-)	IIF(-)LIA(+)	IIF(-)LIA(-)
		LIA(+)	LIA(-)	LIA(+)	LIA(-)
AID 组	636	345	183	39	69
非 AID 组	750	23	233	96	398

2.2 IIF 和 LIA 检测结果不一致分析 表 2 显示,共有 551 例患者两种检测结果不一致,其中结果为 IIF(+)LIA(-)的 AID 和非 AID 患者分别占 82.42%和 70.82%,结果为 IIF(-)LIA(+)的 AID 和非 AID 患者分别占 17.58%和 29.18%,差异有统计学意义($\chi^2=9.66,P<0.05$)。

表 2 IIF 和 LIA 检测结果不一致分析[n(%)]

组别	n	IIF(+)LIA(-)	IIF(-)LIA(+)
AID 组	222	183(82.42)	39(17.58)
非 AID 组	329	233(70.82)	96(29.18)

注:与非 AID 组比较, $\chi^2=9.66,P<0.05$ 。

从表 3 中可看出,在 IIF 与 LIA 检测结果不一致的 222 例 AID 患者中,诊断为类风湿性关节炎(RA)的比例较高。其中结果为 IIF(+)LIA(-)的诊断 RA 的 114 例,占 62.30%;结果为 IIF(-)LIA(+)的诊断 RA 的 15 例,占 38.46%,诊断为多发性肌炎/皮肌炎(PM/DM)的 12 例,占 30.77%,另外诊断为系统性硬化症(SSc)、干燥综合征(SS)的各 4 例,诊断为风湿性心脏病/心肌炎(RHD/RHM)、未分化结缔组织病(MCTD)、血管炎的各 2 例,无诊断为系统性红斑狼疮(SLE)、自身免疫性溶血性贫血(AIHA)、特发性血小板减少性紫癜(ITP)、克罗恩病(Crohn 病)的病例。

表 3 IIF 与 LIA 检测结果不一致的临床诊断(n)

组别	n	SLE	RA	SSc	PM/DM	SS	RHD/RHM	MCTD	AIHA	ITP	Crohn 病	血管炎
IIF(-)LIA(+)	39	0	15	4	12	4	2	2	0	0	0	2
IIF(+)LIA(-)	183	21	114	9	3	3	15	5	8	6	0	0

3 讨 论

以 Hep-2 为抗原底物的 IIF 法检测 ANA 被认为是筛查自身抗体的有效方法,免疫荧光染色模型有助于相关自身抗原的确认,对临床有重要的提示作用^[5]。由于细胞构成的复杂性,不同成分的抗原不同,各种自身抗体在不同的 AID 中出现不同组合,可形成特征性抗体谱,要明确自身抗体的靶抗原就必须作进一步的特异性自身抗体检测。LIA 法可选择不同的组合一次检测多种特异性抗体,该法有操作简便快捷、结果判读方便、易自动化等优点^[6-8]。本研究结果显示 IIF 和 LIA 诊断 AID 的灵敏度分别为 83.42%和 60.38%,特异度分别为 65.87%和 84.13%,前者灵敏度较高,后者特异度较好。在两种试验结果一致的 835 例患者中,IIF 和 LIA 联合检测诊断 AID 的灵敏度为 83.73%,特异度为 94.58%,阴性预期值为 85.22%,说明用 IIF 筛查能检出多数 AID 患者,但特异性不

高,IIF 和 LIA 联合检测能有效提高 AID 诊断的特异性和准确性,并有较好的阴性预期值,对排除 AID 诊断有一定的意义。

本研究还显示,共有 551 例患者两种检测结果不一致,其中结果为 IIF(+)LIA(-)的 AID 和非 AID 患者分别占 82.42%和 70.82%,结果为 IIF(-)LIA(+)的 AID 和非 AID 患者分别占 17.58%和 29.18%,差异有统计学意义($P<0.05$)。但在临床实践中显然以此无法区分 AID 和非 AID。进一步分析显示,在 222 例 IIF 与 LIA 检测结果不一致的 AID 患者中,有 129 例诊断为 RA,其中结果为 IIF(+)LIA(-)的,诊断为 RA 的占 62.30%;结果为 IIF(-)LIA(+)的,诊断为 RA 者占 38.46%,其次诊断为 PM/DM 的占 30.77%,没有诊断为 SLE 的病例。提示临床疑似 RA、PM/DM 等疾病的患者,即使 IIF 筛查阴性,亦应用 LIA 法检测抗 Ro-52、抗 SSA、抗 nRNP-Sm、抗 SSB 和抗 Jo-1 等特异性自身(下转第 767 页)

其表达相对量与强度均明显高于低级别肿瘤。survivin 在胶质瘤低恶性与高恶性组别中差异有统计学意义($P<0.05$),提示它在胶质瘤恶变过程中起着重要的作用。

G_2/M 调控点是细胞内外信号调控细胞增殖的关键点,与肿瘤的发生发展关系密切。cyclin b1 活性的发挥对细胞能否通过 G_2/M 检验点进入 M 期起重要作用。cyclin b1 与细胞周期蛋白依赖性激酶 1(CDK1)结合形成成熟促进因子(MPF),MPF 激活为真核细胞启动有丝分裂所必需。cyclin b1 在部分恶性肿瘤中呈过度表达,引起细胞内 MPF 的累积,核内重要蛋白结构的改变。cyclin b1 作为一种细胞周期进程调节剂在肿瘤细胞内的表达量是判断肿瘤恶性程度高低的指标之一^[8]。本研究发现 cyclin b1 的表达与胶质瘤的分级差异有统计学意义($P<0.01$),表明 cyclin b1 可作为反映胶质瘤增殖能力的指标。

有学者认为,survivin 在有丝分裂结构上与 CDK 相连,cyclin b1 与 CDK 结合并激活之,引导 CDK 发挥激酶作用,磷酸化不同底物(尤其是与启动有丝分裂有关的蛋白),进而启动有丝分裂^[9]。本文 survivin 与 cyclin b1 表达的相关性研究表明,二者密切正相关($r_s=0.836$),提示协同促进肿瘤细胞的恶性进展,支持上述学者观点,二者可能协同在 G_2/M 期转化促进,发挥抗凋亡作用。

综上所述,survivin 与 cyclin b1 在 G_2/M 期高表达,提示二者在 G_2/M 期可能通过一定机制协同促进肿瘤细胞的进展。对该领域的深入研究,有望通过调节 survivin 的表达来阻碍肿瘤细胞的增殖,为胶质瘤免疫治疗或基因治疗提供一个理想的靶点。

参考文献

[1] Yamamoto T, Tanigawa N. The role of survivin as a new target of diagnosis and treatment in human cancer[J].

(上接第 764 页)

抗体,以提高相关疾病的检出率^[9]。在 IIF 筛查阴性时,可基本排除 SLE。在 IIF 筛查阳性,而 LIA 检测结果为阴性时,可结合检测类风湿因子、抗角蛋白抗体、抗环瓜氨酸肽抗体等,以辅助 RA 诊断^[10]。

参考文献

[1] 张延林. 自身免疫性疾病抗核抗体与抗 ENA 抗体相关分析[J]. 医药论坛杂志, 2008, 29(24): 51-52.

[2] Hahm D, Anderer U. Establishment of HEp-2 cell preparation for automated analysis of ANA fluorescence pattern[J]. Cytometry, 2006, 69(3): 178-181.

[3] 董晓微, 胡朝军, 张道强, 等. 抗核抗体与特异性自身抗体检测结果不一致的临床意义分析[J]. 检验医学, 2011, 26(9): 606-609.

[4] 谭太昌, 吴雅娟, 腾飞鹏. 抗核抗体检测策略研究[J]. 成都医学院学报, 2013, 26(5): 517-520.

[5] Žigon P, Lakota K, Cucnik S, et al. Comparison and evaluation of different methodologies and tests for detection of anti-dsDNA antibodies on 889 Slovenian patients' and blood donors' sera[J]. Croat Med J, 2011, 52(6): 694-

Med Electron Microsc, 2001, 34(4): 207-212.

[2] 赵继宗. 神经外科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 393.

[3] Hanser HP, Bardrotton M, Pyronolakis G, et al. A giant ubiquitin-conjugating enzyme related to IAP apoptosis inhibitors[J]. J Cell Biol, 1998, 141(6): 1415-1422.

[4] Li F, Ambrosinin G, Chu EY, et al. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin[J]. Nature, 2011, 396(6711): 580-584.

[5] Adida C, Crotty PL, Mc Grath J, et al. Developmentally regulated expression of the novel cancer anti-apoptosis gene survivin in human and mouse differentiation[J]. Am J Pathol, 1998, 152(1): 43-49.

[6] Zhao J, Tenev T, Martins LM, et al. The ubiquitin-proteasome pathway regulates survivin degradation in a cell cycle-dependent manner[J]. J Cell Sci, 2012, 113(Pt23): 4363-4371.

[7] Uren AG, Wong L, Pakusch M, et al. Survivin and the inner Centromere protein INCENP show similar cell-cycle localization and gene knockout phenotype[J]. Current Biology, 2000, 10(21): 1319-1328.

[8] Aunter T, Pines J. Cyclins and cancer II cyclin D and CDK inhibitors come and age[J]. Cell, 2012, 79(4): 573-582.

[9] Connor DS, Grossman D, Plescia J, et al. Regulation of apoptosis at cell division by p34cdc2 phosphorylation of surviving[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 97(24): 13103-13107.

(收稿日期: 2015-10-30 修回日期: 2015-12-10)

702.

[6] Damoiseaux J, Boesten K, Giesen J, et al. Evaluation of a novel line-blot immunoassay for the detection of antibodies to extractable nuclear antigens[J]. Ann NY Acad Sci, 2005, 1050(8): 340-347.

[7] 周仁芳, 胡朝军, 张蜀澜, 等. 抗核抗体筛查试验与特异性抗体确认试验的相关性研究[J]. 中华检验医学杂志, 2009, 32(12): 1344-1348.

[8] Bossuyt X, Luyckx A. Antibodies to extractable nuclear antigens in antinuclear antibody-negative samples[J]. Clin Chem, 2005, 51(12): 2426-2427.

[9] 王兰兰. 自身免疫性疾病实验室检测路径与临床应用[J]. 实用检验医师杂志, 2012, 4(3): 131-134.

[10] Galati S, Beauvillain C, Renier G, et al. Comparison and relevance of rheumatoid factors, antikeratin antibodies and anti-cyclic citrullinated peptides antibodies in rheumatoid arthritis[J]. Ann Biol Clin Paris, 2008, 66(2): 157-164.

(收稿日期: 2015-10-25 修回日期: 2015-12-20)