• 综 述 •

自身抗体及其在系统性自身免疫性疾病的检测及应用

马艳侠¹综述, 张建平²审校

(1. 陕西中医学院附属医院, 陕西咸阳 712000; 2. 陕西省咸阳市中心医院 712000)

关键词: 自身抗体; 自身免疫疾病; 实验室检测

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.18.019

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)18-2087-03

系统性自身免疫性疾病是由于抗原抗体复合物广泛沉积于血管壁, 免疫损伤导致血管壁、间质的纤维素样坏死性炎性反应以及随后产生多器官的胶原纤维增生, 导致全身多器官损害^[1]。常见的系统性自身免疫性疾病有: 系统性红斑狼疮、干燥综合征、类风湿关节炎、强直性脊柱炎、硬皮病、结节性多动脉炎、Wegener 肉芽肿病等。许多系统性自身免疫性疾病均可产生各种自身抗体, 检测抗核抗体(ANA)对系统性自身免疫性疾病的诊断有着重要意义, 现分别从各种常见的系统性自身免疫性疾病作一综述。

1 系统性红斑狼疮(SLE)

血清中出现以 ANA 为代表的多种自身抗体和多系统受累是 SLE 的两个主要临床特征^[2]。SLE 多发于生育年龄的女性, 主要在 15~45 岁年龄段, 男、女性比为 1:8。肾功能衰竭、感染中枢神经系统损伤是死亡的主要因素。

1.1 抗双链 DNA 抗体 抗双链 DNA(ds-DNA)抗体对 SLE 有较高的特异性, 且与 SLE 的活动性, 特别是狼疮肾炎的活动密切相关^[3]。约有 40%~75% 的 SLE 患者抗 ds-DNA 抗体呈阳性^[4-5]。

1.2 抗 Sm 抗体 Sm 抗原出现在 U 族小分子细胞核糖核蛋白(UsnRNP)中, 如 U2、U4/U6 和 U5, 在 SLE 特异性达 98%, 但敏感性较低, 仅 20%~30%。用 Sm 复合抗原中 D1 蛋白的一个多肽序列(氨基酸 80~119)取代整个 Sm 分子作为抗原可极大地提高其检测的灵敏度, 达 70%。抗 Sm 抗体的滴度可能与 SLE 的活动有关, 滴度升高可能预示着 SLE 的复发^[2]。

1.3 细胞核糖核蛋白抗体 此复合物包括富含尿嘧啶核苷(U)的 RNA 及各种蛋白, 如 Sm 蛋白、U1 特异核糖核蛋白 A、C 和 68×10³ 蛋白, 对 SLE 的诊断有一定意义, 阳性率 45%~60%, 抗 Sm 抗体和抗 nRNP 抗体常并存^[6]。被认为是混合性结缔组织疾病(MCTD)的诊断标志, 在抗 Sm 抗体和抗 ds-DNA 抗体阴性的情况下, 此抗体的灵敏度可达 100%, 特异性可达 98%^[7]。

1.4 抗核小体抗体 其抗原是核小体复合物, 抗核小体抗体 AnuA 包含抗双链 DNA 抗体和抗组蛋白抗体, 在 SLE 的诱导和致病中有重要作用, 为 SLE 的特异性抗体, 阳性率达 82%~86%, 特异性达 98%。联合检测 AnuA、抗 ds-DNA、抗 Sm 抗体能有效提高 SLE 的实验诊断率^[8]。抗组蛋白抗体在药物性狼疮的阳性率达 95%, 在 SLE 的阳性率为 50%, 在类风湿关节炎的阳性率为 23.1%^[9]。

1.5 抗核糖体 P 蛋白 抗核糖体 P 蛋白主要识别 60S 核糖体上 3 个相对分子质量约为 38×10³、19×10³ 和 17×10³ 的磷蛋白亚单位 P0、P1 和 P2, 该抗体对抗 ds-DNA 抗体或抗 Sm 抗体阴性的 SLE 患者诊断具有参考意义, 并且与 SLE 的精神症状有关, 在 SLE 的阳性率约为 20%~30%^[8]。

1.6 抗增殖细胞核抗原抗体(PCNA) 增殖细胞核抗原是一

种参与真核细胞 DNA 复制的蛋白质, 由 3 个相同亚基组成的环状三聚体。由 Miyachi 等于 1978 年在 SLE 患者的血清中首次发现并命名, 以后的研究发现 PCNA 与细胞 DNA 合成关系密切, 是 SLE 的高度特异性抗体, 可作为 SLE 的标志性抗体, 其阳性率为 1%~5%^[10]。

2 干燥综合征(SS)

是一种主要累及全身外分泌腺的慢性自身免疫性疾病, 以唾液腺和泪腺的症状为主, 呼吸系统、消化系统、皮肤、阴道等亦有相应表现, 其血清中则有多种自身抗体和高免疫球蛋白血症^[11]。原发性干燥综合征女性多见, 男、女性比为 1:9~1:20, 在老年人群中患病率为 3%~4%^[12]。

2.1 抗 SSA 抗体 抗 SSA/Ro 抗体在干燥综合征和 SLE 具有极高的特异性, 尤其是抗 Ro 抗体与 60×10³ Ro 蛋白和 52×10³ Ro 蛋白的免疫反应, 分别用于辨别 SLE 和原发性干燥综合征, 抗 Ro52 抗体与抗 Ro60 抗体相比, 对原发性干燥综合征具有更高的特异性, 超过 60% 的原发性干燥综合征患者中可单独检测到 Ro52 自身抗体^[13]。在 100% 的新生儿红斑狼疮中抗 SSA 抗体阳性, 该抗体可经过胎盘感染胎儿引起炎症反应和新生儿先天性心脏传导阻滞。

2.2 抗 SS-B 抗体 1969 年 Clark 等首次报道了自 SLE 患者检出自身抗体抗 Ro, 5 年后相继报道了抗 La; 1975 年 Als-paugh 报道了干燥综合征患者体内可检出抗 SS-A 和抗 SS-B。1979 年, 两个实验通过交换抗原和血清证实 Ro 就是 SS-A, 而 La 就是 SS-B, SS-B/La 几乎仅见于干燥综合征(40%~80%)和 SLE(10%~20%), 在干燥综合征中常与抗 SSA/Ro 抗体同时出现^[14]。

3 多发性肌炎(PM)和皮肌炎(DM)

临床上以对称性颈肌及咽肌无力为特征, 常累及多种脏器, 亦可伴发肿瘤和其他结缔组织疾病。1975 年 Bohan 和 Peter 将 PM/DM 分为 5 类: 原发性多肌炎; 原发性皮肌炎; PM/DM 合并肿瘤; 儿童 PM 或 DM; PM 或 DM 伴发其他结缔组织疾病(重叠综合征)。1982 年 Witaker 在此分类基础上增加了两类, 即包涵体肌炎和其他(结节性、局灶性及眶周性肌炎、嗜酸性肌炎、肉芽肿性肌炎和增殖性肌炎)^[15]。

3.1 抗 Jo-1 抗体 1980 年 Nishikai 等首次报道了在原发性多发性肌炎(PM)患者血清中发现了抗 Jo-1 抗体。抗 Jo-1 抗体又称抗 PL-1 抗体, 其靶抗原为相对分子质量 50×10³ 的组氨酰 tRNA 合成酶, 是一种细胞质磷酸蛋白, 在胞质中以小分子核糖核蛋白(scRNP)形式出现。此抗体在 ANA 抗体中较为独特, 位于胞浆。抗 Jo-1 抗体尤其见于自发性炎性肌炎, 其检出率在原发性多肌炎(PM)为 33%, 原发性皮肌炎(DM)为 25%, 超过 70% 抗 Jo-1 抗体阳性的患者出现纤维化肺泡炎, 因此抗 Jo-1 抗体被认为是肺病相关肌炎的标志性抗体, 常与合并肺间质纤维化有关^[14]。

3.2 抗 Mi-2 抗体 1976 年 Reichlin 和 Mattioli 首先在 1 例叫“Mi”的 DM 患者血清中,发现了一种与小牛胸腺细胞核盐水提取物有沉淀反应的新的抗核抗体^[16],命名为抗 Mi 抗体,1980 年 Mishikari 等将它们命名为抗 Mi-1 抗体和抗 Mi-2 抗体,其中抗 Mi-2 抗体属肌炎特异性抗体,其靶抗原位于细胞核核质内,是相对分子质量为 $(34\sim 240)\times 10^3$ 的 8 种核蛋白质复合物,不含任何核酸成份,对肌炎的诊断具有重要意义,可以在 10%~15%的急性皮肌炎患者中检测到,诊断特异性大于 96%。

3.3 抗 PM-Scl 抗体 1977 年 Wolfe 等在 PM/DM 及肌炎与系统性硬化相重叠的患者血清中首先报道了抗 PM-1 抗体。此抗体因多见于 PM 患者而得名,但后来研究发现该抗体更多见于 PM 和硬皮病(Scl)相重叠的患者中,故又称为抗 PM-Scl 抗体。该抗体在多肌炎与硬化症的重叠综合征中的阳性率为 50%,也可仅出现在多肌炎患者中,阳性率为 8%,弥散性硬化症中的阳性率为 2%~5%^[17]。

3.4 抗 Ku 抗体 抗 Ku 抗体是由 Mimori 等于 1981 年报道的,他们发现 1 例全身性硬化症/多发性肌炎重叠综合征患者(Ku)的血清能与一种 DNA 结合蛋白发生沉淀反应,这种核蛋白称为 Ku 抗原,其蛋白部分由 P70 和 P80(相对分子质量分别为 70×10^3 和 80×10^3)两亚基构成异二聚体。许多自身免疫性疾病都发现抗 Ku 抗体,包括多发性肌炎、狼疮及硬皮病。有研究显示,抗 Ku 抗体的出现可能意味着有发展成为肌炎的高度危险^[18]。

4 系统性硬化

是一种原因不明的临床上以局限性或弥散性皮肤增厚和纤维化为特征的结缔组织疾病。除皮肤受累外,它也可影响内脏(心、肺和消化道等器官)。女性发病率约为男性的 4 倍。系统性硬化分为多种亚型,局限性硬皮病:皮肤增厚限于肘(膝)的远端,可累及面、颈部;弥漫性硬皮病:皮肤增厚累及躯干;无皮肤硬化的硬皮病:临床无皮肤增厚的表现,但有特征性的内脏表现和血管、血清学异常;重叠综合征:上述 3 种情况中任何一种与诊断明确的类风湿关节炎、SLE、PM/DM 同时出现^[19]。

4.1 抗着丝点抗体 CENP 其抗原位于着丝点内外层,但不包括 DNA,其 3 个主要抗原为 CENP-A 蛋白(19×10^3)、CENP-B 蛋白(80×10^3)和 CENP-C 蛋白(140×10^3),其中 CENP-B 抗原在诊断中起主要作用。主要出现在系统性硬化症(PSS)中,尤其是 CREST 综合征(系统性硬化症的变异型,临床表现为软组织钙化、雷诺现象、食道功能障碍、指端硬化、毛细血管扩张),其检出率为 50%~70%,对 PSS 的预后较好,出现此抗体时,在 CREST 综合征患者中极少观察到心肺肾的病变,有助于硬皮病的诊断和分类,也可见于原发性胆汁性肝硬化^[20]。

4.2 抗 Scl-70 抗体 Scl-70 抗原是细胞核内的碱性核蛋白,因其主要见于硬皮病,相应抗原相对分子质量为 70×10^3 ,故取名为抗 Scl-70 抗体。首先在皮肤弥漫型多发性系统性硬化症患者血清中发现抗 Scl-70 抗体。被认为是系统性硬化症的标志性抗体,特异性达 100%。抗 Scl-70 抗体阳性表明病情进展较迅速,皮肤病变往往弥漫广泛,易发生肺间质纤维化和指骨末端吸收^[21]。

5 结 语

综上所述,系统性自身免疫性疾病是由于人体免疫功能紊乱,使得人体对自己的组织和细胞产生了免疫反应,其重要标志之一是形成了自身抗体^[22]。所以,自身抗体的检查是辅助

诊断系统性自身免疫性疾病的重要手段^[23]。随着研究的不断深入、免疫学等学科的飞速发展以及实验室检测技术的更新,系统性自身免疫性疾病的发病机制将逐步被揭示,将来还会发现更多的血清标志物与自身免疫性疾病发生、发展的关系,从而为其靶向治疗提供新的帮助,这也将是今后免疫学和临床医学研究的新热点^[24-25]。

参考文献

- [1] 陈慰峰. 医学免疫学[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社,2004:45-52.
- [2] 何宏. 自身抗体的免疫学检测对系统性红斑狼疮的诊断意义[J]. 标记免疫分析与临床,2005,12(2):127.
- [3] Witte T. IgM antibodies against dsDNA in SLE[J]. Clin Rev Allergy Immunol,2007,13(21):1135-1139.
- [4] 王树祥,苏艳丽. ANA 和抗 ds-DNA 抗体联合检测对自身免疫性疾病的临床应用[J]. 中国误诊学杂志,2002,2(6):872.
- [5] 刘京平,林有坤,何钠. 首诊系统性红斑狼疮住院患者 ANA、抗 ds-DNA 与病情活动的研究[J]. 中国皮肤性病学杂志,2008,22(1):26-28.
- [6] 张天奇,曹香花. 以消化道症状为首表现的系统性红斑狼疮 9 例[J]. 实用医学杂志,2008,24(16):2913-2920.
- [7] 李茹,孙晓云,栗占国,等. 自身抗体在风湿诊断中的意义及其研究进展[J]. 中国实验诊断学,2005,9(1):27-28.
- [8] 谷秀娟,雷光星,王庭慧. 免疫学检验联合检测对系统性红斑狼疮的诊断价值[J]. 中国误诊学杂志,2004,4(9):1412-1413.
- [9] 孙灵芬,张瑾. SLE 患者血清学检测的临床诊断价值[J]. 中国热带医学,2007,8(4):582-583.
- [10] 罗招云,蔡意和,黄泽伟. 抗 ENA 抗体谱和 ANA 联合检测对系统性红斑狼疮诊断的意义[J]. 中国误诊学杂志,2005,5(16):3014-3015.
- [11] 韦三华,刘昕阳,张婧,等. 123 例干燥综合征患者自身抗体及免疫球蛋白和补体检测分析[J]. 国际检验医学杂志,2010,31(7):648-649.
- [12] 宁克勤,艾辉,谢妮,等. SLE 和 PSS 患者的自身免疫抗体检测及临床价值[J]. 深圳中西医结合杂志,2007,17(4):255-257.
- [13] 耿芹,王林萍. 干燥综合征 65 例临床分析[J]. 中国临床研究,2010,23(11):981-982.
- [14] Damoiseaux JG, Tervaert JW. From ANA to ENA: how to proceed[J]. Autoimmun Rev,2006,5(1):10-17.
- [15] 黄春梅,李永哲. 多发性肌炎/皮肌炎自身抗体谱的研究进展[J]. 国际检验医学杂志,2006,27(1):33-35.
- [16] Mittoo S, Gelber AC, Christopher SL. Ascertainment of collagen vascular disease in patients presenting with interstitial lung disease[J]. Respiratory Medicine,2009,103(89):1152-1158.
- [17] Chloraki BA, Megalaki C, Repousis P, et al. Prevalence of autoantibodies(CANA, anti ds-DNA, ENA, IMF) and rheumatic syndromes in patients with lymphoproliferative diseases [J]. J BUON,2006,11(4):485-489.
- [18] 郭强,鲍春德. 结缔组织病与肺间质病变进展[J]. 上海医学,2009,32(10):918-923.
- [19] Hoxha A, Ruffatti A, Grypiotis P, et al. Antinuclear, anti-dsDNA and anti-ENA antibodies in patients affected with rheumatoid arthritis or ankylosing spondylitis during treatment with infliximab [J]. Reumatismo,2006,58(2):121-126.
- [20] 柯琳建,黄立群,郑高哲. 系统性硬皮病抗核抗体谱的检测意义[J]. 国际检验医学杂志,2009,30(7):635-636.
- [21] 韩建华,李永哲,佟大伟,等. 系统性硬皮病抗核抗体谱的检测分析[J]. 中国实验诊断学,2007,11(6):756-759.

- [22] 许聆雁, 黄宪章, 庄俊华. 类风湿关节炎的免疫学检测方法进展[J]. 国际检验医学杂志, 2008, 29(1): 51-53.
- [23] 吴庆. 抗可提取性核抗原抗体与抗核抗体的对照分析[J]. 国际检验医学杂志, 2006, 27(8): 679-680.
- [24] 刘军锋, 贾克刚, 刘运德. 免疫印迹法检测在自身免疫性疾病 ENA 多肽抗体谱及临床意义[J]. 国际检验医学杂志, 2006, 27

(7): 669-670.

- [25] Mitsudomi T, Kosaka T, Yatabe Y. Biological and clinical implications of EGFR mutations in lung cancer[J]. Int J Clin Oncol, 2006, 11(3): 190-198.

(收稿日期: 2011-08-21)

• 综 述 •

流行性乙型脑炎病毒基因结构的研究进展

许丽娟 综述, 朱朝敏 审核

(重庆医科大学儿童医院 400016)

关键词: 脑炎; 脑炎病毒; 基因**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.18.020**文献标识码:** A**文章编号:** 1673-4130(2011)18-2089-03

流行性乙型脑炎(简称乙脑)每年大约有 $(35 \sim 50) \times 10^3$ 例患者, 其中约 10×10^3 例患者死亡^[1]。乙脑患者中重症患者往往留下各种神经系统后遗症, 乙脑病毒主要经蚊虫或吸血昆虫传播, 携带乙脑病毒的蚊虫叮咬人体后, 病毒先在单核-巨噬细胞内增殖, 随后进入血流, 引起免疫反应, 抗体与病毒抗原结合, 沉积于脑实质和血管内皮细胞, 激活补体, 产生免疫损伤^[2]。

乙脑主要发病于亚洲地区和太平洋地区, 我国地域广阔, 占亚洲四分之一区域, 除了新疆、青海、西藏外, 其余各地均有病例发生^[1]。因此深入研究中国流行乙脑病毒的分子生物学, 对于了解亚洲乃至全世界的乙脑病毒的特性具有举足轻重的作用。现主要叙述乙脑病毒有关基因结构方面的进展。

1 乙脑病毒的基本基因组结构

乙脑病毒同其他黄病毒一样, 为一单股正链的 RNA 病毒, 全长约 11 kb, 中间有一个开放读码框。乙脑病毒的血清学包括有 8 种类型和 2 种亚型, 分别为 West Nile virus(WNV)、Kunjin virus(a subtype of WNV)、Murray Valley encephalitis virus(MVEV)、Alfuy virus(a subtype of MVEV)、St. Louis encephalitis virus(SLEV)、Usutu virus(USUV)、Koutango virus, Yaounde virus and Cacipacore virus^[3]。乙脑病毒的基因顺序从 5' 端到 3' 端依次为 C-preM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5^[4]。

2 乙脑病毒基因结构的编码区

乙脑病毒的编码区能编码 3 种结构蛋白(核衣壳蛋白 C、膜蛋白 M 和包膜蛋白 E)和 7 种非结构蛋白(包括 NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B 和 NS5)^[5]。乙脑病毒的生物学性质主要由其编码的结构蛋白决定, 如和细胞受体的结合、机体免疫反应的产生等^[6]。

核衣壳蛋白(C 蛋白)由 127 个氨基酸组成, C 蛋白的 C 端疏水性氨基酸将其固定在宿主细胞的粗面内质网膜上, 以便装配成包裹基因组的核衣壳, 使之免受核酸酶的破坏^[7]。

膜蛋白(M 蛋白)由 75 个氨基酸残基组成, 是病毒诱发保护性免疫的协同成份。M 蛋白能诱发中和抗体, 现在的一些研究表明在乙脑病毒的 PrM/M 蛋白上有一线性的表位, 并证明是一个线性的 B 细胞表位, 即 M14-13。这个线性的 B 细胞表位是乙脑病毒所特有的, 它只能和乙脑病毒猪血清或者兔血清发生反应, 而不能和抗 DENV、抗 WNV 血清反应, 且在不同的乙脑病毒序列中具有高度的保守性, 这对根据病毒特异性的

表位诊断乙脑提供了潜在的重要性依据, 并有助于进一步阐明乙脑病毒 PrM/M 的抗原结构和生物学功能^[8]。

E 蛋白是乙脑病毒最主要的结构蛋白, 位于病毒的表面, 由 500 个氨基酸残基组成, 具有决定病毒毒力、病毒入侵和病毒的免疫原性的作用^[7]。E 蛋白的这种作用机制是因为其作为一种膜融合蛋白, 能介导病毒包膜和细胞膜的结合, 这种结合使得病毒进入细胞并感染细胞^[9]。E 蛋白的氨基酸序列具有高度保守性, 但在其结构的部分区域是会有变化的, 如在乙脑病毒持续感染细胞的过程中 E 蛋白的氨基酸序列会有部分发生突变^[9]。许多研究还表明, 氨基酸序列中位于 E60~68 的 Cys-Tyr-His-Ala-Ser-Val-Thr-Asp-Thr, 在诱导产生细胞免疫中起最关键的作用^[10]。乙脑病毒 E 蛋白的三维结构主要由 3 个结构域(I、II、III)组成, 其中结构域 III(E310~E411)可独立地在病毒表面折叠成为免疫球蛋白样结构, 由于它的这种构象, 许多抗原中和表位都集中于此结构域。Zhao 等^[11]的研究表明位于第 I 和第 II 结构域部位连接处的 E-138 残基, 对乙脑病毒的神经毒力和神经侵袭力有重要的决定作用。

3 乙脑病毒基因结构的变异

在以往关于乙脑病毒基因变异的研究中, 比较了分离于一个国家内部(如日本)和分离于不同国家的病毒的差异(如日本和泰国或者日本和印度)。总的发现, 分离于不同时间和不同地区的病毒有序列上的差异^[6]。在 Chen 等^[6]的研究中, 他们观察了来自于较广泛地区和 52 年时间跨度的 46 例乙脑病毒的 pre M 序列, 结果显示分离于同一地区同一时间段的病毒的 pre M 序列非常相近, 但是分离于不同地区不同时间段的病毒之间存在变异, 不过大多数核苷酸的改变都是属于沉默突变, 并没有改变所编码的氨基酸。这些都提示乙脑病毒在自然界存在不断的进化。但是 Yun 等^[12]对分离于朝鲜的乙脑病毒稳定性的研究表明 E 基因具有高度的稳定性, 在他们研究的 10 株毒株中, 尽管分离于不同的地区, 而且有了 5 年的时间跨度, 但是所得到的 E 基因的序列是一致的。

Wang 等^[13]将从三带喙库蚊分离出来的病毒与减毒活疫苗株 SA14-14-2 相比, 发现 E 蛋白在核苷酸与氨基酸的同源性分别为 88.0% 和 97.2%, 并且在 E 蛋白上一共有 14 处氨基酸差异。Zhang 等^[14]于 2007 年从中国南部的三带喙库蚊中分离得到的病毒株 SH17M, 发现其有 5 个独特的氨基酸, 其中一处是位于 E 蛋白第 306 位点(谷氨酸变异为赖氨酸)。姜红月等^[15]2008 年新分离的 2 株乙脑病毒(HBZG08-09 和 HBZG08-