

• 临床检验研究 •

流式细胞法检测人类白细胞抗原 B27/B7 表达在 诊断强直性脊柱炎中的价值

刘毓刚¹, 李琳^{2#}, 吴丽娟^{1△}, 帖儒修³

(成都军区总医院:1. 检验科;2. 骨科, 成都 610083;3. 第三军医大学大坪医院检验科, 重庆 400042)

摘要:目的 探讨流式法检测人类白细胞抗原 B27/B7(HLA-B27/B7)在临床上对强直性脊柱炎(AS)的诊断价值。方法 采用两色流式细胞术检测 121 例 AS 患者(AS 组)、157 例其他原因引起的腰腿痛患者(非 AS 组)和 88 例健康人(对照组)淋巴细胞 HLA-B27 及 HLA-B7 抗原的表达率及表达强度(MnX)。结果 AS 组 HLA-B27 表达率、MnX 和阳性率分别为(90.55±25.31)%、(16.87±9.13)%、90.9%,明显高于非 AS 组及对照组($P<0.05$);非 AS 组上述各项指标与对照组相比差异无统计学意义($P>0.05$)。将流式细胞法检测 HLA-B27 表达率、MnX 及 2 项指标联合分别用于临床 AS 的诊断,灵敏度依次为 90.9%、94.2%、98.3%,特异度依次为 89.8%、84.5%、83.7%,卡方检验显示,联合检测时灵敏度显著高于单独检测表达率($P<0.05$),且特异度差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 流式细胞法检测 HLA-B27 对 AS 的诊断和鉴别诊断准确、有效,是一种很有价值的实验诊断方法。

关键词:流式细胞术; 脊柱炎; HLA-B27; HLA-B7
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.02.005 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2012)02-0138-03

Clinical value of HLA-B27/B7 expression detected by flow cytometry for the diagnosis for ankylosing spondylitis

Liu Yugang¹, Li Lin^{2#}, Wu Lijuan^{1△}, Tie Ruxiu³

(1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Orthopedics, Chengdu Military General Hospital, Chengdu 610083, China; 3. Department of Medical Laboratory, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: **Objective** To analyze the diagnostic value of detection of HLA-B27/B7 by flow cytometry for ankylosing spondylitis(AS). **Methods** Flow cytometry was used to determine the fluorescence positive percentage and mean fluorescence of HLA-B27/B7 in lymphocytes in 121 patients with AS (AS group), 157 backleg pain patients without AS(non-AS group), and 88 health controls(control group), and results were analyzed statistically. **Results** Fluorescence positive percentage, mean fluorescence and positive percentage of HLA-B27 in AS group were (90.55±25.31)%, (16.87±9.13)%, 90.9% respectively, which were significantly higher than those in non-AS group and control group ($P<0.05$). No significantly difference between non-AS group and controls were demonstrated in the results. Fluorescence positive percentage, mean fluorescence and both of them, detected by flow cytometry, were with the diagnostic sensitivity of 90.9%, 94.2% and 98.3%, specificity of 89.8%, 84.5% and 83.7%. The sensitivity of combined detection was significantly higher than of single fluorescence positive percentage detection ($P<0.05$), and the specificity was close($P>0.05$) by Chi-Square test. **Conclusion** The determination of HLA-B27 by flow cytometry could be an accurate and effective method for the diagnosis and differential diagnosis of AS.

Key words: flow cytometry; myelitis; HLA-B27; HLA-B7

强直性脊柱炎(AS)是一种主要发病于年轻男性的慢性骨关节自身免疫性疾病,主要累及骶髂关节,易发展为全脊柱强直。该病诊断的直接证据是 X 线下脊柱的特征性改变及骶髂关节炎,但这种改变只有在疾病发展到一定程度时才能被观察到。早在 1973 年,国外研究就发现人类白细胞抗原 B27(HLA-B27)的表达与 AS 强烈相关^[1-2]。目前检测 HLA-B27/B7 表达的方法主要有微量淋巴细胞毒法、酶联免疫吸附实验和流式检验法等,前两种方法敏感性、特异性都较低,目前已很少使用,逐渐被流式检验法代替。本文用流式细胞仪检测 AS 患者外周血淋巴细胞 HLA-B27/B7 的表达,并探讨其在临床诊断中的价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 AS 组为 2009 年 4 月至 2010 年 7 月来本院就诊并被确诊的 AS 患者 121 例,诊断符合 WHO 强直性脊柱

炎标准,其中男性 85 例,女性 36 例,平均年龄(26.5±13.3)岁;非 AS 组为其他原因(如风湿性、类风湿性)引起腰腿痛的患者 157 例,男性 103 例,女性 54 例,平均年龄(37.8±10.6)岁。对照组为同期前往本院健康体检并被证实为健康个体者 88 例,男性 55 例,女性 25 例,平均年龄(30.9±15.1)岁。

1.2 仪器与试剂 HLA-B27/B7 表达用美国 Beckman-Coulter 公司 EPICS XL4 型流式细胞仪进行检测,HLA-B27-FITC/HLA-B7-PE、IgG2a-FITC/IgG1-PE、溶液 A(溶血剂)、B(终止剂)、C(固定剂)等试剂均为美国 Beckman-Coulter 公司产品。

1.3 方法 各组清晨空腹采集静脉血 2 mL,EDTA-K₂ 抗凝。向同型对照管和测定管各加入全血 50 μ L,同型对照管每管加入 IgG2a-FITC/IgG1-PE 抗体组合 10 μ L 进行标记,测定管每管加入 B27-FITC/B7-PE 抗体组合 10 μ L 进行标记。避光孵

共同第一作者。 △ 通讯作者, E-mail: wulijuan1638@126.com。

育 30 min,依次向各试管加入溶液 A 625 μ L 混匀 5~10 s,待完全溶血再向各试管加入溶液 B 265 μ L 继续混匀 5~10 s,然后向各试管加入溶液 C 265 μ L 再次混匀 5~10 s^[3]。上流式细胞仪进行检测。记录 HLA-B27、HLA-B7 阳性细胞所占总淋巴细胞的百分比及表达强度(MnX)。

1.4 统计学处理 应用统计软件 SPSS13.0 对数据进行统计分析,各组间率的差异采用卡方检验及 Fisher 精确检验,计量资料使用 *t* 检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。方法学比较中,灵敏度(Se)= $a/(a+c)\%$,特异度(Sp)= $d/(b+d)\%$,阳性预测值= $a/(a+b)\%$,阴性预测值= $d/(c+d)\%$,误诊率= $1-Sp$,漏诊率= $1-Se$,Youden 指数= $Sp+Se-1$ 。a 为金标准阳性且 HLA-B27 也为阳性的人数,b 为金标准阴性但 HLA-B27 为阳性的人数,c 为金标准阳性但 HLA-B27 阴性的人数,d 金标准阴性且 HLA-B27 也为阴性的人数。

2 结 果

2.1 流式细胞仪检测 HLA-B27/B7 表达率及 MnX 结果 见表 1。AS 组 HLA-B27⁺、HLA-B27⁺/HLA-B7⁻、HLA-B27⁺/HLA-B7⁺ 的表达率及 MnX 均显著高于非 AS 组及对照组,而非 AS 组和对照组之间差异无统计学意义。

表 1 流式细胞术 HLA-B27/B7 检测结果($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	HLA-B27 ⁺		HLA-B27 ⁺ /HLA-B7 ⁻		HLA-B27 ⁺ /HLA-B7 ⁺	
		表达率	平均荧光强度值	表达率	平均荧光强度值	表达率	平均荧光强度值
对照组	88	18.50 $\pm$ 9.64	2.61 $\pm$ 1.82	5.23 $\pm$ 2.99	1.71 $\pm$ 0.51	13.27 $\pm$ 7.38	2.90 $\pm$ 2.05
非 AS 组	157	20.16 $\pm$ 14.58	3.05 $\pm$ 2.10	7.12 $\pm$ 5.04	1.93 $\pm$ 0.78	14.04 $\pm$ 8.39	3.25 $\pm$ 2.58
AS 组	121	90.55 $\pm$ 25.31*	16.87 $\pm$ 9.13*	61.34 $\pm$ 15.58*	11.09 $\pm$ 4.13*	29.21 $\pm$ 12.58*	19.55 $\pm$ 11.06*

*: $P<0.05$,与对照组、非 AS 组比较。

表 2 AS 组、非 AS 腰腿痛组和对照组 B27 阳性率比较

分组	<i>n</i>	HLA-B27 表达			HLA-B27 平均荧光强度		
		HLA-B27 ⁺	HLA-B27 ⁻	阳性率(%)	HLA-B27 ⁺	HLA-B27 ⁻	阳性率(%)
对照组	88	8	80	9.1	13	75	14.8
非 AS 组	157	17	140	10.8	25	132	15.9
AS 组	121	110	11	90.9*	114	7	94.2*

*: $P<0.05$,与对照组、非 AS 组比较。

表 3 流式测定外周血淋巴细胞 HLA-B27 表达诊断 AS 的临床应用评价(%)

诊断指标	灵敏度	特异度	阳性预测值	阴性预测值	误诊率	漏诊率	Youden 指数
FPP	90.9	89.8	81.5	95.2	10.2	9.1	80.7
MF	94.2	84.5	75.0	96.7	15.5	5.8	78.7
FPP+MF	98.3*	83.7	74.8	99.0	16.3	1.7*	82.0

*: $P<0.05$,与 FPP 和 MF 比较。

3 讨 论

HLA-B27 抗原是由一种 I 类组织相容复合体(MHC)基因编码的抗原分子,几乎表达于所有有核细胞,特别是淋巴细胞表面,虽然目前对 HLA-B27 与 AS 发病机制之间的关联尚不清楚,但其与 AS 的高度相关已经得到公认。AS 到出现临床上 X 线片所见的特征性脊柱改变和骶髂关节炎症变化时,已经失去了最佳的治疗时机,致残率很高,但早期其发病隐匿,

2.2 AS 组、非 AS 组及对照组 B27 阳性率比较 取健康人群 HLA-B27 表达率及平均荧光强度($\pm 2s$)为参考范围,以 HLA-B27 表达率高于 60%,平均荧光强度大于 5 记为 AS 阳性诊断^[3],各组 AS 诊断结果见表 2。AS 组 HLA-B27 表达率及平均荧光强度阳性率较高,与非 AS 组及对照组相比差异有统计学意义,而非 AS 组和对照组 B27 间差异无统计学意义(卡方检验)。

2.3 流式测定外周血淋巴细胞 HLA-B27 表达诊断 AS 的临床应用评价 将非 AS 组和对照组合并与 AS 组进行比较,以 WHO 诊断标准,临床诊断为金标准对流式细胞法诊断 AS 进行方法学评价。流式细胞法单独检测荧光阳性百分率(FPP)及平均荧光强度(MF)与临床诊断(金标准)比较结果见表 2。HLA-B27 的 FPP 和 MF 联合诊断时,只要任何一项阳性就统计为 HLA-B27⁺,结果临床诊断为 AS 的患者,HLA-B27⁺ 的有 119 例,HLA-B7⁻ 的有 2 例;临床诊断为非 AS 的,HLA-B27⁺ 的有 40 例,HLA-B7⁻ 的有 205 例,3 种诊断方式的临床应用评价见表 3。卡方检验显示,联合检测的灵敏度显著高于 FPP 的灵敏度,漏诊率显著低于 FPP 的漏诊率。

症状多样,腰腿痛及晨僵症状与多种疾病类似,容易误诊,因此 HLA-B27 检测对 AS 进行早期诊断、治疗就有非常重要的意义。本研究结果显示,AS 患者淋巴细胞表面 HLA-B27 抗原表达诊断阳性率为 90.9%,平均荧光强度诊断阳性率为 94.2%,显著高于其他原因引起的腰腿痛人群及健康者,与国内外文献报道的 AS 患者 HLA-B27 阳性率大于 90.0%,而健康人阳性率在 5.0%左右相一致^[4-5]。需要指出的是,在本研

究的 121 例 AS 患者中有 11 例是 HLA-B27⁻, 同样的, 88 例健康对照中也有 8 例为 HLA-B27⁺, 所以 B27 的检测不能代替 X 线下所见作为确诊 AS 的证据, 它只能作为 AS 基因易感性的标志物, 其结果必须结合临床症状及配合其他检查作出分析。

HLA-B27 抗原检测目前常规使用流式细胞法, 陈志坚和李山^[6]报道, 其敏感性和特异性都远远高于传统的微量淋巴细胞毒法, 本文也对流式细胞法检测 HLA-B27 的 FPP 及 MF 进行了方法学评价, 发现 FPP 和 MF 的对诊断 AS 的灵敏度和特异度都很高, 尤其是 FPP 检测的特异度达到 89.8%, MF 检测的灵敏度达到 90.9%, 而联合检测 FPP 和 MF 可以大幅提高检测的灵敏度、阴性预测值, 大幅降低漏诊率, 且对特异度影响不大, 能对灵敏度和特异度进行综合分析的 Youden 指数为 82.0, 是最理想的检测方式, 可以为临床提供更准确的提示, 协助 AS 的早期确诊。并且国外经过长期的方法质量验证证明^[7], 流式细胞法检测 HLA-B27 标准化程度高, 可同时测定细胞多个参数, 准确、敏感、特异、重复性好, 且操作简便快捷, 所需标本量少, 无需分离单个淋巴细胞, 是目前最优的检测方法。

但流式细胞法所用的单克隆抗体在检测 HLA-B27 时会与多种其他 HLA 抗原(特别是 HLA-B7)发生交叉反应, 对检测结果造成影响。Ulrich^[8]使用 HLA-B7/B27 双色标记来排除这种干扰, 而 Darke 和 Coates^[9]则用 HLA-B27 及其亚型 B-2708 双抗体检测来减少交叉反应。目前, 国内常用的 Beckman-Coulter 有商品化 HLA-B27-FITC/HLA-B7-PE 双标单克隆抗体试剂, 本研究使用这种方法对 HLA-B27/B7 进行分析, 发现在非 AS 的两组 HLA-B27⁺/HLA-B7⁺ 模式 FPP 和 MF 都显著高于 HLA-B27⁺/HLA-B7⁻ 模式, 而 AS 组则与之相反, 证明了 HLA-B7⁻ 交叉反应可能会引起的 HLA-B27⁺ 假阳性。还有一些 AS 患者为 HLA-B27⁻, 其中有部分为 HLA-B7⁺, Sampaio-Barros 等^[10]也有过类似报道, 这可能是 AS 的易感性有多个基因操控, 除了 HLA-B27 这个主基因, 还有包

括 HLA-B7 在内的许多微效基因与之相关, HLA-B7 不仅是 HLA-B27 检测的干扰因子, 它也是 AS 的易感因子。但是由于本研究较局限, 对这一假说仍需进一步的研究证明。

参考文献

[1] Breweton DA, Hart FD. Ankylosing spondylitis and HLA-B27 [J]. Lancet, 1973, 1(13): 904-907.

[2] Schlosstein L, Terasaki PI, Bluestone R, et al. High association of HLA antigen, W27 with ankylosing spondylitis [J]. New Eng J Med, 1973, 288(14): 704-706.

[3] 吴丽娟. 临床流式细胞学检验技术 [M]. 北京: 人民军医出版社, 2010: 79-82.

[4] 陈国敏, 王东辰. 人白细胞抗原-B27 在强直性脊椎炎中的意义 [J]. 检验医学与临床, 2007, 4(10): 931-933.

[5] Brown MA. Human leucocyte antigen-B27 and ankylosing spondylitis [J]. Intern Med, 2007, 37(11): 739-740.

[6] 陈志坚, 李山. 强直性脊柱炎患者 HLA-B27 的检测 [J]. 华中医学杂志, 2004, 28(1): 13-14.

[7] Macardle PJ, McEvoy R, Jovanovich S. HLA-B27 expression by flow cytometry: an analysis of 7 years quality assurance data [J]. J Immunological Methods, 2000, 5(243): 51.

[8] Ulrich G. Use of flow cytometry for HLA B27 phenotyping: study of a HLA B7/HLA B27 double marker technique [J]. Allerg Immunol (Paris), 1997, 29(1): 11-14.

[9] Darke C, Coates E. One-tube HLA-B27/B2708 typing by flow cytometry using two "Anti-HLA-B27" monoclonal antibody reagents [J]. Cytometry B Clin Cytom, 2010, 78(1): 21-30.

[10] Sampaio-Barros PD, Conde RA, Donadi EA, et al. Undifferentiated spondyloarthropathies in Brazilians: importance of HLA-B27 and the B7-CREG alleles in characterization and disease progression [J]. J Rheumatol, 2003, 30(12): 2632-2637.

(收稿日期: 2011-08-11)

(上接第 137 页)

冲体系, 它能更有效地去除红细胞且作用时间更短; 在确保淋巴细胞损伤小于 10% 的情况下, ACK 可去除 90% 以上的红细胞, 而 Tris-HCl 则能去除 82% 的红细胞。说明缓冲体系具有缓冲和调控红细胞裂解过程, 避免溶血过度, 保护白细胞的形态和活性。可见, 通过控制裂解条件和采用合适的缓冲体系可以将氯化铵在完全裂解红细胞的同时对淋巴细胞的损害降到最小, 且对细胞生物活性无影响^[7-8]。

参考文献

[1] 徐志凯. 实用单克隆技术 [M]. 西安: 陕西科学出版社, 1992: 31-39, 65-68.

[2] Zhou XL, Zhao H, Gao XD. Preparation and characterization of monoclonal antibodies against a polysaccharide from flammulina velutipes mycelium [J]. Hybridoma, 2008, 27(6): 439-440.

[3] 王建中, 王淑娟. 当前临床流式细胞分析仪的发展趋势 [J]. 中华

检验医学杂志, 2002, 25(1): 5-6.

[4] 沈二霞. 流式细胞仪的原理和临床应用 [J]. 现代医学仪器与应用, 2008, 20(1): 49-53.

[5] 喻晶, 聂李平, 桂耀庭, 等. 流式细胞仪全血红细胞裂解液研究 [J]. 医学研究杂志, 2007, 36(7): 74-77.

[6] Louis KS, Siegel AC. Cell viability analysis using trypan blue: manual and automated methods [J]. Methods Mol Biol, 2011, 740: 7-12.

[7] Yang T, Zhong P, Qu L, et al. Preparation and identification of anti-2, 4-dinitrophenyl monoclonal antibodies [J]. Immunol Methods, 2006, 313(1-2): 20-28.

[8] Tucker KG, Chalder S, al-Rubeai M, et al. Measurement of hybridoma cell number, viability, and morphology using fully automated image analysis [J]. Enzyme Microb Technol, 1994, 16(1): 29-35.

(收稿日期: 2011-08-11)