

• 短篇论著 •

两种方法联合检测自身免疫性疾病中 ANCA 的临床意义^{*}

陈维蓓,向瑜,张莉萍

(重庆医科大学附属第一医院检验科,重庆 400016)

摘要:目的 评价间接免疫荧光法(IIF)和免疫印迹法检测抗中性粒细胞胞质抗体(ANCA)的临床意义。方法 采用 IIF 和免疫印迹法联合对 126 例自身免疫性疾病患者的血清进行 ANCA 检测。结果 在 126 例患者中类风湿关节炎(RA)、韦格纳肉芽肿(WG)、皮肌炎(DM)和过敏性紫癜患者血清检测 cANCA 阳性与 PR3-ANCA 阳性是一一对应的;而在 51 例 SLE 患者中,有 17 例(33.3%)pANCA 阳性,7 例(13.7%)骨髓过氧化物酶(MPO)-ANCA 阳性;在 29 例 RA 中 3 例(10.3%)pANCA 阳性,而 4 例(13.7%)MPO-ANCA 阳性。WG 和 ANCA 相关性血管炎患者检测 ANCA 阳性率较高,分别为 87.5% 和 93.7%。结论 IIF 一般情况下可以作为临床常规检测 ANCA 的筛选试验,免疫印迹法可以作为特异 ANCA 确证试验。二者联合应用可以提高 ANCA 的检出率,减少 ANCA 的误诊率。

关键词:荧光抗体技术,间接;免疫印迹法;自身免疫疾病

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.19.029

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)19-2559-03

The clinical significance of ANCA in autoimmune diseases detected by the combination of immunofluorescence technique and western blotting test^{*}

Chen Weibei, Xiang Yu, Zhang Liping

(Department of Laboratory, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To evaluate the clinical significance by combining immunofluorescence technique(IIF) and Western blotting tests in detecting anti neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA). **Methods** ANCA fluorescent patterns and its target antigens in sera of 126 patients with autoimmune disease were detected by IIF and Western blotting test. **Results** cANCA detected by IIF was nearly always directed against PR3-ANCA in the sera of the 126 patients, whereas among 51 patients with SLE, 17 samples were positive for pANCA, 7 samples were positive for MPO-ANCA. Among 29 patients with RA, 3 samples were positive for pANCA and 4 samples were positive for MPO-ANCA. In the patients of WG and ANCA associated vasculitis, the positive rates of ANCA were 87.5% and 93.7% respectively. **Conclusion** The method of IIF under normal circumstances could be used for testing ANCA in clinical routine screening test, and the method of Western blotting test can be used as specific ANCA confirmatory test. Combination of the two tests can increase the detection rate and reduce the misdiagnosis rate of ANCA.

Key words: fluorescent antibody technique, indirect; immunoblotting; autoimmune diseases

抗中性粒细胞胞质抗体(ANCA)是以中性粒细胞和单核细胞胞质成份为靶抗原的自身抗体,其中以丝氨酸蛋白酶 3(PR3)和髓过氧化物酶(MPO)与血管炎相关密切。ANCA 最初发现于原发性小血管炎患者血清中,随着研究的深入,对疾病的诊断鉴别及预后判定受到了医学界的重视^[1]。本研究应用间接免疫荧光法(IIF)和免疫印迹法检测了 126 例自身免疫性疾病患者血清中的 ANCA,探讨 IIF 和免疫印迹法联合检测 ANCA 的临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2011 年 4 月至 2012 年 6 月本院肾内科和中西医结合科的住院患者且明确诊断为自身免疫性疾病的患者(符合美国风湿病学会 ACR 诊断标准)。126 例自身免疫性疾病患者[51 例系统性红斑狼疮(SLE),29 例类风湿性关节炎(RA),16 例 ANCA 相关性血管炎,11 例结缔组织病,8 例韦格纳肉芽肿(WG),2 例皮肌炎(DM),3 例过敏性紫癜,1 例干燥综合征,2 例强直性脊柱炎,1 例硬皮病,2 例自身免疫性肝炎]。其中男 36 例(占 28.5%),年龄 14~84 岁,平均(53.3±17.8)岁;女 90 例(占 71.4%),年龄 16~78 岁,平均(48.2±17.9)岁。

1.2 试剂 IIF 检测 ANCA:采用德国欧蒙公司的滴定平板

TM 技术,以马赛克生物技术薄片载片(基质含甲醛、乙醇固定的中性粒细胞、猴肝组织、Hep-2 细胞)进行检测中性粒细胞特异抗体。免疫印迹法检测 ANCA:试剂盒来自德国欧蒙公司,试剂盒含平行包被高度纯化抗原的检测膜条。

1.3 试验方法

1.3.1 IIF 法检测 ANCA 的主要步骤 加 1:10 稀释的患者血清和试剂盒里的阴阳对照血清,25 μL 于生物薄片上,室温反应 30 min,用 PBS-Tween 缓冲液浸泡至少 1 min,加 FITC 标记羊抗人 IgG,避光放置 30 min,再用 PBS-Tween 缓冲液浸泡至少 1 min,之后用甘油封片,荧光显微镜下判读荧光模型。均匀分布于整个胞质中的颗粒性荧光,细胞核无荧光,为 cANCA;围绕中性粒细胞核的平滑带状荧光为 pANCA。

1.3.2 免疫印迹法检测 ANCA 的主要步骤 将放有膜条的槽中加 1.5 mL 封闭液,室温摇 15 min 去除液体,加 1:101 稀释的患者血清和试剂盒里的阴阳对照血清,1.5 mL 于各槽内摇 15 min 去除液体,用 1.5 mL 通用缓冲液清洗膜条 3 次,每次 5 min,再加入 1.5 mL 已稀释的酶标记结合物(碱性磷酸酶标记的羊抗人 IgG)温育 15 min,用通用缓冲液同样清洗后,加入 1.5 mL 底物液,室温摇 15 min 后去除液体,用蒸馏水洗膜条 3 次,待膜条风干后判断结果。将干的检测膜条上出现的与

* 基金项目:国家临床重点专科建设项目经费资助项目。 作者简介:陈维蓓,女,检验技师,主要从事医学检验工作。

参照膜条上的标志对应的清晰可见的条带记录在结果判定板上,在相应抗原的位置出现白色条带为阴性。用EUROLINEScan软件自动判断结果,条带浓度大于或等于1个十为阳性。

2 结 果

2.1 126例患者的一般临床特征 在126例患者中,51例SLE患者,年龄16~73岁,平均(42.5±16.2)岁,抗核抗体(ANA)阳性者35例,阳性率为68.6(35/51),SLE患者检测ANA阳性率较高。29例RA患者,年龄16~78岁,平均(51.4±16.8)岁,ANA阳性者4例,阳性率为13.8(4/29)。8例WG患者,年龄39~74岁,平均(54.0±10.8)岁,ANA阳性者1例,阳性率为12.5(1/8)。16例ANCA相关性血管炎患者,年龄16~84岁,平均(59.8±17.1)岁,ANA阳性者3例,阳性率为18.7(3/16)。11例其他疾病,年龄14~78岁,平均(46.5±20.4)岁,ANA阳性者3例,阳性率为27.2(6/22)。126例自身免疫性疾病男女患者比例,女性所占百分比均大于男性所占的百分比。

表1 IIF法和免疫印迹法检测ANCA结果(n)

疾病	n	IIF阳性		免疫印迹法阳性	
		pANCA	cANCA	MPO-ANCA	PR3-ANCA
SLE	51	17	0	7	0
RA	29	3	2	4	2
MCTD	11	7	0	4	0
WG	8	1	6	1	6
ANCA相关性血管炎	16	13	2	13	2
过敏性紫癜	3	0	1	0	1
皮肌炎	2	1	0	1	0
强直性脊柱炎	2	0	1	0	0
硬皮病	1	0	0	0	0
干燥综合征	1	0	0	0	0
自身免疫性肝炎	2	0	0	0	0

表2 IIF法和免疫印迹法检测ANCA阳性率的比较

疾病	IIF法		免疫印迹法阳性 ANCA阳性率(%)
	ANCA阳性率(%)	ANCA阳性率(%)	
SLE	33.3	13.7	
RA	17.2	20.6	
MCTD	63.6	13.7	
WG	87.5	87.5	
ANCA相关性血管炎	93.7	93.7	
过敏性紫癜	33.3	33.3	
皮肌炎	50.0	50.0	
强直性脊柱炎	50.0	50.0	
硬皮病	0.0	0.0	
干燥综合征	0.0	0.0	
自身免疫性肝炎	0.0	0.0	

2.2 126例患者ANCA检测结果 在126例患者中RA、WG、DM和过敏性紫癜患者血清检测cANCA阳性与PR3-

ANCA阳性是一一对应的;而在51例SLE患者中,有17例(33.3%)pANCA阳性,骨髓过氧化物酶(MPO)-ANCA阳性者7例(13.7%);在29例RA中3例pANCA阳性,而4例MPO-ANCA阳性。在8例WG患者和16例ANCA相关性血管炎患者中,cANCA和PR3-ANCA同时阳性,pANCA和MPO-ANCA同时阳性。WG和ANCA相关性血管炎患者检测ANCA阳性率较高,分别为87.5%和93.7%,见表1、2。

3 讨 论

ANCA是一种以中性粒细胞和单核细胞胞质成分为靶抗原的自身抗体^[1-3]。检测ANCA的方法有:IIF、放射免疫法、酶联免疫吸附法(ELISA)、流式细胞术分析法和免疫印迹法。最常用的是IIF法,也是较好的初筛方法,被称为金标准法。ANCA在检测中会与其他抗体如抗核抗体的发生交叉反应,因此要采用标准的技术,利于获得可重复的结果。同时需进一步做特异性抗原的分析才能有助于临床诊断。应用免疫印迹法检测ANCA,采用了纯化的特异性抗原包被,可改善反应的特异性;结果不受抗核抗体等其他自身抗体的干扰,结果容易判断,有利于临床监测病情或疗效。

IIF法检测ANCA时,有2种荧光分布模型:胞质型(cANCA)胞质内成大颗粒不均匀分布的荧光,核周型(pANCA)细胞核周围呈现条状分布。免疫印迹法检测ANCA时,试剂盒平行包被高度纯化抗原的检测膜条,用EUROLINEScan软件自动判断结果。cANCA的靶抗原主要为蛋白酶3,其相对分子质量为 29×10^3 ;pANCA的靶抗原主要为髓过氧化物酶(MPO),其相对分子质量为 120×10^3 ^[4-5]。在检验标本中RA、WG、DM和过敏性紫癜患者血清检测cANCA阳性与PR3-ANCA阳性是一一对应的,与文献报道相似^[6]。

SLE是一种侵犯多系统器官的自身免疫性疾病,可由遗传、免疫功能异常、内分泌异常和环境因素等引起。其免疫功能异常在SLE的发病中具有重要地位^[7]。由表1可知,51例SLE患者,有17例pANCA阳性,7例MPO-ANCA阳性。由此我们可以看出P-ANCA和MPO-ANCA并不一一对应关系,ANCA在SLE患者中的阳性率为33.3%,主要为pANCA抗体,与文献报道一致^[8]。Savier等^[9]报道pANCA的靶抗原有90%是MPO,其他靶抗原的作用还不太清楚。ANCA阳性且滴度高患者可迅速出现脑肾、脏病变和神经系统症状。因此ANCA是SLE患者神经系统受累的一种标志性抗体^[10],也可作为临幊上判断SLE疾病活动的一个有用指标^[11]。

RA和SLE的ANCA的相关靶抗原主要为乳铁蛋白(LF)和组织蛋白酶G(CG),ANCA可能参与SLE血管炎的发病,可能与RA的血管损害有关。本文RA中ANCA阳性率为20%左右。

ANCA相关性血管炎病因未明,研究认为该类疾病的发生有可能是在某些遗传背景下由某些环境因素诱发的。WG可能与人类白细胞抗原HLA-B50、HLA-B55、HLA-DR1、HLA-DQw7等基因表达有关。ANCA在血管炎或严重感染的发展过程中激活中性粒细胞,活化的中性粒细胞胞内原静止的PR-3移向细胞表面进而被ANCA所识别。而经正常调节的内皮细胞内的PR-3也可移位到胞膜与ANCA结合,并激活循环中的补体产生补体介导的细胞毒损伤^[12],导致释放大量的溶酶体酶而引起局部微血管损伤,这是ANCA介导的与小血管炎的发病机制之一。抗MPO和抗PR-3自身抗体还可使活化的中性粒细胞产生脱颗粒反应,释放大量有害的蛋白水解酶和氧自由基,抗PR-3还具有分解和灭活人补体C1抑制剂的能力^[13],有利于促进补体活化而导致小血管损害造成血管

炎。在 ANCA 相关疾病性血管炎损害过程中,被活化的中性粒细胞胞浆蛋白酶可致血管内皮损伤和细胞溶解。研究表明,不同的 ANCA 类型和靶抗原往往与临床不同疾病相关^[14],其中 PR3-ANCA 与 WG 密切相关,而抗 MPO 阳性则少见,活动期的 WG 患者其 ANCA 阳性率可达 80-100%^[15],本文中 WG 活动期阳性率为 87.5%,ANCA 相关性血管炎病阳性率为 93.7%,与文献报道相同。

随着 ANCA 所识别的靶细胞抗原不断增加,与其相关的疾病也不断被发现。因此用 IIF 和免疫印迹法两种联合检测 ANCA 更加可靠、客观,同时提高 ANCA 的检出率。不同的荧光模式和不同的靶抗原对疾病诊断和鉴别及预测具有重要的意义。

参考文献

- [1] kallenberg CG, Mulder AH, Teraert JW. Antineutrophil cytoplasmic antibodies a still-growing class of autoantibodies in inflammatory disorders[J]. AM J Med, 1992, 93(6): 675-682.
- [2] 马洪升,欧阳钦. 抗中性粒细胞胞浆抗体及其与溃疡性结肠炎的关系[J]. 四川医学, 1999, 20(3): 168-171.
- [3] 鲍春德. 提高抗中性粒细胞胞浆抗体相关性血管炎的诊治水平[J]. 上海医学, 2008, 31(12): 837-840.
- [4] 仲人前,范列英. 自身抗体基础与临床[M]. 北京:人民军医出版社, 2006: 95.
- [5] 徐三荣,林庚金. 溃疡性结肠炎与抗中性粒细胞胞浆自身抗体[J]. 国外医学生理、病理科学与临床分册, 1998, 18(3): 173-176.
- [6] 李贵玲,郑岚,谢风等. 两种方法联合检测风湿性疾病中 ANCA

(上接第 2558 页)

低三水平质控物原料的方法,从而解决了实验室在制备中、高水平质控物时遇到的困难。与此同时,液态质控物所使用的 30% EG,其价格低廉,且具有高渗和抗氧化性质,可防止细菌生长和某些被测物的氧化,还能够降低自制液态质控物的凝固点,减小了冻融对血清的影响^[8-10]。在收集血清过程中,严格按照标准进行样品收集,同时最后一步采用离心去除颗粒物的方法以确保质控物的物理性状满足中国卫生部临床检验中心对所配液性质控物的一般性状,如 pH、细菌菌落数、吸光度和基质效应等的要求。

从表 1 和 2 的数据可以看出,自制的质控血清在观察的时间范围内是稳定的。在实验中,以 BIO-RAD 冻干质控物作为参照,自制的质控血清的标准差和变异系数与 BIO-RAD 质控的实测值相近,甚至有些项目比 BIO-RAD 质控的更理想。在自制质控血清和 BIO-RAD 质控作配对 *t* 检验,差异无统计学意义,表明了两者的相关性良好,两者的 CV% 变化都在 15% 以内^[11]。从总的情况分析,自制液性质控物的标准差和变异系数是比较理想的。但要制成一种稳定的质控品,还需要进行更长时间的检测,以观察其时间稳定性。

综上所述,自制液性质控物取材于日常废旧的检测标本,成本低,稳定剂价格低廉,容易购得。因此,自制质控品可以基本替代昂贵的进口质控品,适合于各大、中医院的室内质控,也特别适合于广大的基层医院使用。

参考文献

- [1] Goi G, Besozzi M, Bairati C, et al. Preparation of a stable liquid material for calibration and quality control for lysosomal enzymes

的临床意义[J]. 中国实验诊断学, 2008, 12(10): 1249-1251.

- [7] 曹建平,姜志明,张小晨. SLE 患者血清中可溶性肿瘤坏死因子受体水平及意义[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2000, 16(4): 329-331.
- [8] 靳淑玲,王北宁. 抗中性粒细胞胞浆抗体的检测方法及临床意义[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2001, 17(6): 599-600.
- [9] Savage J, Gillis D, Benson E, et al. International consensus statement on testing and reporting of antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA)[J]. Am J Clin Pathol, 1999, 111: 507.
- [10] Nissberger, L, Jonsson, H, Sjohom, A G, et al. Circulating anti-elastase in systemic lupus erythematosus[J]. Lancet, 1989, 8636: 509
- [11] 侯巍,惠艳. 65 例系统性红斑狼疮患者抗中性粒细胞胞浆抗体的检测分析[J]. 地方病通报, 2005, 20(2): 98.
- [12] 李多孚,任莉平. 抗中性粒细胞胞浆抗体的实验进展[J]. 陕西医学检验, 1997, 12(4): 60-62.
- [13] Leid RW, Ballieux BE, Van-der-heijden I, et al. Cleavage and inactivation of human Cl inhibitor by the human leukocyte proteinase, proteinase[J]. Eur J Immunol, 1993, 23(11): 2939-2944.
- [14] Gross WL, Csemok E, Helmchen U. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies, autoantigen, and, systemic vasculitis (Review)[J]. APMIS, 1995, 103: 81.
- [15] Rai JK, Weinberger M, Oddone EZ, et al. The role of antineutrophil cytoplasmic antibody testing in the diagnosis of Wegener's granulomatosis[J]. Annals Intern Med, 1995, 123(13): 925.

(收稿日期:2013-02-19)

in plasma. Assay of enzymes of lysosomal origin in plasma, I[J]. Eur J Clin Chem Clin Biochem, 1992, 30(10): 595-598.

- [2] 许凯声,杨志刚. 自制全血质控物在室内质控中的运用[J]. 浙江医科大学学报, 1998, 27(5): 231-233.
- [3] 赵令君. 自制高、中、低浓度质控血清在甲状腺激素放免分析质控中的应用[J]. 长春医学, 2006, 4(2): 11-13.
- [4] 林增文,欧佩兰. 液态质控血清制备的探讨[J]. 陕西医学检验, 2000, 15(2): 47-48.
- [5] 马德均,刘福成. 稳定的液态质控血清制备法[J]. 临床检验杂志, 1988, 6(3): 165-169.
- [6] 何思春,王利君,焦鑫. 质控血清冷冻保存对电化学发光测定甲状腺激素的影响[J]. 检验医学, 2010(04): 321-322.
- [7] 段勇,王玉明,赵瑾,等. 临床化学检验的液性质控血清的制备研究[J]. 昆明医学院学报, 2003, 24(2): 24-27.
- [8] Piiroinen T, Pettersson K, Suonpaa M, et al. In vitro stability of free prostate-specific antigen (PSA) and prostate-specific antigen (PSA) complexed to alpha 1-antichymotrypsin in blood samples [J]. Urology, 1996, 48(6A Suppl): S81-87.
- [9] Masse J, Forest J C, Moutquin J M, et al. Effect of repeated freeze-thaw cycles on maternal serum biological markers for the detection of fetal trisomies[J]. Clin Biochem, 1997, 30(7): 527-530.
- [10] 高云朝,顾建英,陆汉魁,等. 血清反复冻融对肿瘤标志物浓度的影响[J]. 中国实验诊断学, 2007(01): 119-120.
- [11] Wilson J F. Survey of reference ranges and clinical measurements for psychoactive drugs in serum[J]. Ther Drug Monit, 2003, 25(2): 243-247.

(收稿日期:2013-06-17)