

• 基础实验研究论著 •

系统性红斑狼疮患者抗双链 DNA 抗体检测及其与免疫学指标的相关性^{*}

荀新菊¹, 赵 勇², 荀春华³

(1. 九江县港口中心医院内科, 江西九江 332105; 2 九江学院基础医学院, 江西九江 332000;

3. 九江学院临床医学院/九江学院附属医院, 江西九江 332000)

摘 要:目的 探讨系统性红斑狼疮患者抗双链 DNA(dsDNA)抗体与免疫学指标的相关性。方法 收集 77 例系统性红斑狼疮患者血清, 采用短膜虫间接免疫荧光法(CLIFT)及酶联免疫吸附测定(ELISA)检测血清抗 dsDNA 抗体、总补体、补体 C3、补体 C4 水平。结果 77 例系统性红斑狼疮患者 50 例抗 dsDNA 抗体阳性, 27 例抗 dsDNA 抗体阴性。抗 dsDNA 抗体阳性组和阴性组患者血清 IgG、IgM、IgA 水平的差异没有统计学意义($P>0.05$), 抗 dsDNA 抗体阳性组患者血清总补体、补体 C3、补体 C4 水平明显低于阴性患者($P<0.05$)。抗 dsDNA 抗体阳性患者血清抗 dsDNA 抗体水平与总补体、补体 C3 显著相关($P<0.05$)。结论 抗 dsDNA 抗体可能通过补体旁路途径而非经典途径抑制补体生成。

关键词:补体 C3; 补体 C4; 红斑狼疮, 系统性; 抗双链 DNA 抗体

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.23.005

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)23-3114-02

Detection of anti-double-stranded DNA antibody and its correlation with immunological parameters in patients with systemic lupus erythematosus^{*}

Xun Xinju¹, Zhao Yong², Xun Chunhua³

(1. Department of General Internal Medicine, Central Hospital of Jiujiang County Port, Jiujiang, Jiangxi 332105, China;

2. School of Basic Medical Sciences, Jiujiang University, Jiujiang, Jiangxi 332000, China; 3. Clinical Medical

College of Jiujiang University/Affiliated Hospital of Jiujiang University, Jiujiang, Jiangxi 332000, China)

Abstract: Objective To investigate anti-double-stranded DNA(dsDNA) antibody and its correlation with immunological parameters in patients with systemic lupus erythematosus. **Methods** 77 patients with systemic lupus erythematosus were enrolled. Crithidia luciliae immunofluorescence test(CLIFT) and enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) were used to detect serum levels of anti-dsDNA antibodies, total complement, complement C3 and complement C4. **Results** Among 77 patients with systemic lupus erythematosus, 50 were found anti-dsDNA antibody positive, 27 were found anti-dsDNA antibody negative. The differences of serum IgG, IgM, IgA levels between anti-dsDNA antibody positive and negative group were not statistically significant($P>0.05$). The serum levels of total complement, complement C3, complement C4 of patients with positive anti-dsDNA antibody were markedly lower than those of patients with negative anti-dsDNA antibody($P<0.05$). Serum level of anti-dsDNA antibody of patients with positive anti-dsDNA antibody demonstrated significant correlation with serum levels of total complement and complement C3($P<0.05$). **Conclusion** The anti-dsDNA antibodies may inhibit complement production via complement alternative pathway rather than classical pathway.

Key words: complement C3; complement C4; lupus erythematosus, systemic; anti-double-stranded DNA

系统性红斑狼疮是一种多系统自身免疫性疾病, 抗双链 DNA(dsDNA)抗体是该病标志性抗体^[1-2]。血清自身抗体与疾病活性相关, 组织中发现 DNA-抗-DNA 免疫复合物, 提示抗 dsDNA 抗体自身抗体参与了系统性红斑狼疮发病过程^[3]。狼疮疾病的生化检测标志物较少, 狼疮血清学指标有抗 dsDNA 抗体、补体 C3 和补体 C4, 是监测狼疮疾病活动指标^[4-5]。然而, 抗 dsDNA 抗体作用机制及其与补体相关性仍然尚未阐明。本文比较抗 dsDNA 抗体阳性和阴性的系统性红斑狼疮患者血清中免疫学指标, 分析抗 dsDNA 抗体抗体阳性患者中抗 dsDNA 抗体与免疫学指标的相关性, 以阐明 dsDNA 的可能作用机制。

1 材料与与方法

1.1 标本来源 77 例经美国风湿病学会(ACR)^[1-2]制订的诊断标准确诊的系统性红斑狼疮患者, 其中, 男 11 例, 女 66 例;

年龄 12~60 岁, 平均 33 岁。统一时间清晨空腹抽取静脉血, 分离血清于-80℃保存。本次研究经九江学院附属医院医学伦理委员会同意, 并获得患者的知情同意。

1.2 抗 dsDNA 抗体检测 采用短膜虫间接免疫荧光法(CLIFT)^[6-7]进行检测, 阳性标本采用酶联免疫吸附测定(ELISA)检测抗 dsDNA 抗体水平。

1.3 CLIFT 检测抗 dsDNA 抗体 采用绿蝇短膜虫为基质的间接免疫荧光法检测抗 dsDNA IgG 抗体^[8], 严格按照试剂盒说明书进行。将加样板放在泡沫塑料板上, 加 25 μL 稀释后血清至加样板, 将载片覆有生物薄片的一面朝下, 盖在加样板的凹槽里, 室温(18~25℃)30 min; 磷酸盐缓冲溶液(PBS)吐温缓冲液流水冲洗载片, 然后立即将其浸入装有 PBS 吐温缓冲液的洗杯中浸泡至少 5 min。滴加 25 μL 异硫氰酸荧光素(FITC)标记的抗人球蛋白(荧光第二抗体)至洁净加样板的反

^{*} 基金项目:江西省教育厅青年科学基金(GJJ12625)。 作者简介:荀新菊(1976~), 女, 主治医师, 主要从事自身免疫疾病的临床工作。

[△] 通讯作者, E-mail: z6x2m@163.com。

应区,从洗杯中取出载片,吸水纸擦洗背面和边缘的水分后,立即盖在加样板的凹槽里。室温(18~25℃)温育 30 min,PBS 吐温缓冲液冲洗载片,然后立即将其浸入装有 PBS 吐温缓冲液的洗杯中浸泡至少 5 min 后封片,最后显微镜下观察荧光模型。临界(CO)值为 1:10。

1.4 ELISA 检测抗 dsDNA IgG 抗体 ELISA 按说明书进行。将校准品、阳性和阴性对照品及已稀释的患者血清分别加入微孔板,所有样本均做复孔,室温(18~25℃)温育 30 min 后洗涤,再加过氧化物标记的 IgG 抗体,室温(18~25℃)温育 30 min 后洗涤,加底物显色 30 min 后加入终止液。然后在酶标仪比色,记录 OD 值,结果以样本 OD 值(RU/mL)代入标准曲线计算样本浓度。

1.5 免疫学指标的检测 采用全自动生化分析仪检测血清 IgG、IgM、IgA、总补体、补体 C3 和补体 C4 水平。

表 1 抗 dsDNA 抗体阳性和阴性组患者血清免疫学指标的比较

组别	总补体(U/mL)	补体 C3(g/L)	补体 C4(g/L)	IgG(g/L)	IgA(g/L)	IgM(g/L)
抗 dsDNA 抗体阳性组	39.76±16.12	0.74±0.28	0.13±0.07	16.73±7.61	2.94±1.41	0.90±0.44
抗 dsDNA 抗体阴性组	53.93±13.94	1.08±0.33	0.22±0.10	14.63±6.06	2.83±1.45	1.11±0.75
P	0.000	0.000	0.000	0.221	0.752	0.120

2.3 抗 dsDNA 抗体阳性患者血清免疫学指标的相关性分析 抗 dsDNA 抗体阳性患者血清抗 dsDNA 抗体水平与补体 C4、IgG、IgA、IgM 无显著相关性($P>0.05$);而与总补体、补体 C3 显著相关($P<0.05$),见表 2。

表 2 抗 dsDNA 抗体阳性患者血清免疫学指标的相关性分析

指标	$\bar{x}\pm s$	CO 值(RU/mL)	P
总补体	(39.76±16.12)U/mL	-0.305	0.032
补体 C3	(0.74±0.28)g/L	-0.304	0.032
补体 C4	(0.13±0.07)g/L	-0.253	0.077
IgG	(299.00±197.00)g/L	0.176	0.221
IgA	(2.94±1.41)g/L	0.173	0.230
IgM	(0.90±0.44)g/L	0.238	0.096

3 讨 论

血清抗 dsDNA IgG 自身抗体、补体 C3 和补体 C4 临床上用来监测系统性红斑狼疮患者病情,抗 dsDNA 自身抗体和补体与系统性红斑狼疮患者疾病活动指数相关^[9]。众多研究者检测了自身免疫性疾病患者循环血液中抗 dsDNA IgG 自身抗体且阐明了其对自身免疫性疾病的诊断价值。CLIFT 法检测抗 dsDNA IgG 抗体是一种简单且具备高度特异性的方法,但缺乏定量检测系统;而 ELISA 法检测该抗体简易、安全,且可快速定量分析,适于临床推广和应用^[6,8,10]。因此,笔者首先采用 CLIFT 法检测,如果是阳性,再采用 ELISA 法进行定量。

补体激活级联反应是一种重要的先天性免疫反应,补体系统在 3 种激活途径(经典途径、替代途径和旁路途径)中起着重要的作用^[11-12]。补体系统涉及的自身免疫性疾病存在争议。然而,补体失调和系统性红斑狼疮的关系被广泛报道^[13],补体 C3、补体 C4、抗 dsDNA 抗体与狼疮疾病活性相关,因此,采用补体 C3、补体 C4 和抗 dsDNA 抗体评估系统性红斑狼疮患者病情^[14]。本研究表明,抗 dsDNA 抗体阳性患者血清总补体、

1.6 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行统计学分析,计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,两样本计量资料比较采用独立样本 t 检验,相关分析应用 Pearson 相关系数法,以 $\alpha=0.05$ 为检验水准,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 CLIFT 法检测抗 dsDNA 抗体 77 例系统性红斑狼疮患者 50 例抗 dsDNA 抗体阳性,27 例抗 dsDNA 抗体阴性。抗 dsDNA 抗体阳性率为 64.9%(50/77)。绿蝇短膜虫动基体呈现绿色荧光为抗 dsDNA 抗体阳性。

2.2 抗 dsDNA 抗体阳性和阴性组患者血清免疫学指标的比较 抗 dsDNA 抗体阳性组和阴性组患者血清 IgG、IgM、IgA 水平的差异没有统计学意义($P>0.05$),抗 dsDNA 抗体阳性组患者血清总补体、补体 C3、补体 C4 水平明显低于阴性组($P<0.05$),见表 1。

补体 C3 和补体 C4 水平明显低于阴性患者,且与补体 C3 水平与抗 dsDNA 抗体存在明显负相关,而与补体 C4 没有明显的相关性。使用血清补体 C3 和补体 C4 水平作为狼疮生物诊断指标仍然存在争议,而补体 C3 和补体 C4 已被广泛用于临床,一些其他研究表明,可溶性补体激活产物,如补体 C3d 和补体 C4d 对于监测狼疮疾病活性具有重要价值^[15-16],然而,它们仍然不能代替补体 C3 和补体 C4 的价值,补体 C3d 和补体 C4d 的检测需要流式细胞仪进行检测,在临床上很难开展,而补体 C3 和补体 C4 只需要常规生化仪即可进行检测,方便可行。抗 dsDNA 抗体阳性患者中,其血清检测水平与补体 C3 呈明显负相关,而与补体 C4 不相关,提示该抗体可能通过旁途径抑制补体的激活,而补体系统不仅参与机体的免疫防御功能,而且参与免疫清除功能,结合既往研究成果,笔者认为补体 C3 可作为系统性红斑狼疮的生物标志物之一,这需要大量样本来证实。

参考文献

[1] Tan EM, Cohen AS, Fries JF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus[J]. Arthritis Rheum, 1982, 25(11): 1271-1277.

[2] Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus[J]. Arthritis Rheum, 1997, 40(9): 1725.

[3] Solomon DH, Kavanaugh AJ, Schur PH. Evidence-based guidelines for the use of immunologic tests: antinuclear antibody testing[J]. Arthritis Rheum, 2002, 47(4): 434-444.

[4] Herbst R, Liu Z, Jallal B, et al. Biomarkers for systemic lupus erythematosus[J]. Int J Rheum Dis, 2012, 15(5): 433-444.

[5] Illei GG, Tackey E, Lapteva L, et al. Biomarkers in systemic lupus erythematosus: II. Markers of disease activity [J]. Arthritis Rheum, 2004, 50(7): 2048-2065.

[6] Chiaro TR, Davis KW, Wilson A, et al. Significant differences in the analytic concordance between anti-dsDNA (下转第 3118 页)

显著差异($P>0.05$);对比 ALT 轻、中度升高的 C 组和 E 组、以及 ALT 正常的 A 组和 B 组的 C3b 水平,发现差异无统计学意义($P>0.05$),但这 4 组患者血清 C3b 水平均高于对照组($P<0.05$),提示 C3b 可能与肝细胞的损伤有关,可作为慢性乙型肝炎患者疾病预后的一个监测指标。其可能通过直接活化补体导致感染病毒的肝细胞死亡,而引起 ALT、AST 升高,也可通过调理作用活化巨噬细胞等免疫细胞,导致更严重的肝细胞损伤;而且,由于 HBV 活跃复制,在患者体内产生抗病毒抗体,继而在循环中形成特异性免疫复合物,大量免疫复合物沉积于肝内,导致毛细胆管栓塞、激活补体、趋化炎症细胞、激活多种炎症因子,导致更广泛的细胞损伤或坏死,免疫复合物引起Ⅲ型过敏反应所致的组织损伤在慢性乙型肝炎的发病机制中也不容忽视^[9]。

本研究发现,C3b 的水平分别与 ALT、AST 及 HBsAg 水平呈正相关($P<0.05$),而与 HBeAg、HBV-DNA 水平无显著相关性($P>0.05$),进一步提示 C3b 的升高与病毒感染有关,与肝细胞损伤程度有关,但与病毒复制的水平无关。这可能是由于病毒复制和 DNA 合成是在肝细胞内完成,HBeAg 在血液中属于游离的可溶性抗原,其并不是病毒体的结构蛋白,即使可以活化补体也难以形成稳定的 C3b 产物,C3b 容易灭活;而 HBsAg 是 HBV 的重要结构蛋白,且位于 HBV 表面,病毒复制后大量病毒颗粒从肝细胞内释放,激活补体后容易形成稳定的 C3b,并继续活化补体的其他成分,最终清除抗原并导致过敏反应。研究说明,补体,尤其是补体 C3,参与了 HBV 的抗感染免疫和由其导致的肝细胞损伤。C3b 虽与 ALT、AST、HBsAg 存在正相关,但相关系数并不高,最大 r 值仅为 0.475。分析其原因可能是由于 C3b 属于补体,其水平相对较为恒定,个体间的变异度较小,且导致补体的活化和 C3b 水平变化的原因很多,与特异性抗体相比,研究的干扰因素复杂。

综上所述,很多学者都认为慢性感染的乙型肝炎与 C3b 表达水平高度相关,但是慢性 HBV 的不同感染程度与 C3b 的

表达水平之间的相关性还需要进一步的研究来验证,本研究认为乙型肝炎病变程度的加重可促进病毒抗原或特异性免疫复合物激活补体系统,促进 C3 被 C3 转化酶裂解成 C3b 片段,使 C3b 的水平增高并结合到病毒上,引起一系列肝组织损害的免疫效应。高表达的 C3b 与肝细胞损伤有关,也与 HBV 的病变程度的加重和疾病不良预后有关系,有关 C3b 表达和肝细胞受损程度之间的关系还需要进行更多的研究。

参考文献

[1] 余新沛,陈政良. C3 研究进展[J]. 免疫学杂志,2004,20(6):483-486.
[2] 韩根成. 补体受体与病毒感染[J]. 国外医学:免疫学分册,2000,23(5):257-259.
[3] 陈小初. 细胞因子对补体急性时相蛋白合成调控的分子机制[J]. 国外医学:免疫学分册,1999,22(1):21-22.
[4] 中华医学会肝病学会,中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2010 年版)[J]. 中华肝脏病杂志,2011,19(1):13-24.
[5] 苏成豪,许龙善. 乙型肝炎流行病学研究进展[J]. 旅行医学科学,2008,14(1):5-8.
[6] Van Damme P, Van Herck K. A review of the efficacy, immunogenicity and tolerability of a combined hepatitis A and B vaccine[J]. Expert Rev Vaccines,2004,3(3): 249-267.
[7] Kane MA. World-wide status of hepatitis B vaccination 1998[J]. Soz Praventivmed,1998,43 Suppl S1:S44-46.
[8] 安云庆. 医学免疫学[M]. 2 版. 北京:北京大学医学出版社,2009.
[9] Miyaike J, Iwasaki Y, Takahashi A, et al. Regulation of circulating immune complexes by complement receptor type 1 on erythrocytes in chronic viral liver diseases[J]. Gut,2002,51(4):591-596.

(收稿日期:2013-07-16)

(上接第 3115 页)

IgG antibody assays for the diagnosis of systemic lupus erythematosus—implications for inter-laboratory testing[J]. Clin Chim Acta,2011,412(11-12): 1076-1080.
[7] Ghirardello A, Villalta D, Morozzi G, et al. Diagnostic accuracy of currently available anti-double-stranded DNA antibody assays. An Italian multicentre study[J]. Clin Exp Rheumatol,2011,29(1): 50-56.
[8] Tong DW, Zhang SL, Li YZ, et al. The comparison of the three anti-dsDNA antibody detecting test[J]. Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi,2009,23(1): 74-75.
[9] Villegas-Zambrano N, Martinez-Taboada VM, Bolivar A, et al. Correlation between clinical activity and serological markers in a wide cohort of patients with systemic lupus erythematosus: an eight-year prospective study[J]. Ann N Y Acad Sci,2009,1173(1):60-66.
[10] Isenberg DA, Manson JJ, Ehrenstein MR, et al. Fifty years of anti-ds DNA antibodies: are we approaching journey's end[J]. Rheumatology (Oxford),2007,46(7):1052-1056.
[11] Munoz LE, Gaipal US, Herrmann M. Predictive value of anti-dsDNA autoantibodies: importance of the assay[J]. Autoimmun Rev,

2008,7(8): 594-597.
[12] Ceribelli A, Andreoli L, Cavazzana I, et al. Complement cascade in systemic lupus erythematosus: analyses of the three activation pathways[J]. Ann N Y Acad Sci,2009,1173:427-434.
[13] Kallel-Sellami M, Laadhar L, Zerzeri Y, et al. Complement deficiency and systemic lupus erythematosus: consensus and dilemma [J]. Expert Rev Clin Immunol,2008,4(5): 629-637.
[14] Nasiri S, Karimifar M, Bonakdar ZS, et al. Correlation of ESR, C3, C4, anti-DNA and lupus activity based on British Isles Lupus Assessment Group Index in patients of rheumatology clinic[J]. Rheumatol Int,2010,30(12):1605-1609.
[15] Yang DH, Chang DM, Lai JH, et al. Usefulness of erythrocyte-bound C4d as a biomarker to predict disease activity in patients with systemic lupus erythematosus[J]. Rheumatology,2009,48(9): 1083-1087.
[16] Liu CC, Kao AH, Hawkins DM, et al. Lymphocyte-bound complement activation products as biomarkers for diagnosis of systemic lupus erythematosus[J]. Clin Transl Sci,2009,2(4):300-308.

(收稿日期:2013-06-14)