

## • 临床检验研究论著 •

## 抗中性粒细胞胞浆抗体检测在肺纤维化疾病中应用研究

赵 春,符布清<sup>△</sup>,杨 丽,陈秋霞

(江苏省中医院检验科,江苏南京 210029)

**摘要:**目的 探讨肺纤维化疾病患者的抗中性粒细胞胞浆抗体(ANCA)与血清胱抑素C(CysC)和高敏C反应蛋白等指标之间的变化规律。方法 检测69例肺间质纤维化伴感染患者和30例健康对照组的ANCA及血尿素氮、肌酐、CysC和高敏C反应蛋白等指标。ANCA检测先应用间接免疫荧光法,并用免疫印迹法确定靶抗原。生化指标用全自动生化分析仪测定。白细胞和血小板用血细胞分析仪测定。结果 肺纤ANCA(+)组CysC水平明显高于肺纤ANCA(-)组与健康对照组( $P<0.05$ ),而肺纤ANCA(-)组与健康对照组的CysC比较差异无统计学意义( $P>0.05$ );肺纤ANCA(+)组与肺纤ANCA(-)组CRP水平明显高于与健康对照组( $P<0.01$ ),其他指标各组比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。结论 肺纤ANCA(+)可能伴有肾功能损伤,应注重肺纤ANCA(+)患者的肾功能监测。

**关键词:**肺纤维化; 抗体,抗中性白细胞胞质; 半胱氨酸蛋白酶抑制剂; C反应蛋白

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.24.029

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)24-3332-03

**Study on the detection of antineutrophil cytoplasmic antibodies in pulmonary fibrosis**

Zhao Chun, Fu Buqing<sup>△</sup>, Yang Li, Chen Qiuxia

(Department of Clinical Laboratory, Traditional Chinese Medicine Hospital of Jiangsu Province, Nanjing, Jiangsu 210029, China)

**Abstract: Objective** To investigate variation between the anti neutrophil cytoplasmic antibody(ANCA) in patients with pulmonary fibrosis and serum cystatin C(CysC) and high sensitive C reactive protein index. **Methods** To determination the level of ANCA and serum urea nitrogen, creatinine, CysC and high sensitive C reactive protein and other indicators in patients with 95 cases of pulmonary interstitial fibrosis associated with infection and 30 cases of normal control group, indirect immunofluorescence was used to detect the ANCA(IIF) and Western blot, and biochemical indicators were determined by automatic biochemical analyzer. **Results** The levels of CysC of ANCA(+) in patients with pulmonary fibrosis group were significantly higher than that of ANCA(-) pulmonary fibrosis and normal control group( $P<0.05$ ), and the levels of CysC of ANCA(-) in patients with pulmonary fibrosis group has no significant difference compared with the normal control group( $P>0.05$ ); the levels of CRP in pulmonary fibrosis ANCA(+) group and pulmonary fibrosis ANCA(-) group were significantly higher than that of in normal control group( $P<0.01$ ), the other indexes of all groups had no significant difference( $P>0.05$ ). **Conclusion** Pulmonary fibrosis ANCA(+) may be associated with renal function damage, we should pay attention to the determination of renal function in pulmonary fibrosis ANCA(+) patients.

**Key words:** pulmonary fibrosis; antibodies, antineutrophil cytoplasmic; cysteine proteinase inhibitors; C-reactive protein

肺纤维化是由于多种原因引起肺泡壁炎症,继之肺间质形成大量纤维结缔组织和肺结构紊乱的一组异型疾病。近年来研究表明抗中性粒细胞胞浆抗体(ANCA)相关系统性血管炎多累及肾脏及肺等多种器官。肺受累表现为肺泡出血、间质炎症及纤维化<sup>[1-2]</sup>。肾脏受累多表现为急进性肾炎综合征,少数患者肾功能呈慢性减退<sup>[3-5]</sup>。本研究对69例肺纤维化的患者进行研究发现,肺纤维化ANCA阳性者肾功能损伤指标明显异常,提示ANCA阳性肺纤维化患者可能由小血管炎累及导致的肺纤维化,同时伴有肾功能损伤。具体研究如下。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 本院2011年11月至2013年8月江苏省中医院呼吸科肺间质纤维化伴感染住院患者共69例。肺间质纤维化伴ANCA阳性者[肺纤ANCA(+)组]29例,其中男11例,女18例,年龄44~84岁,平均年龄68岁。肺间质纤维化ANCA阴性者[肺纤ANCA(-)组]40例,其中男20例,女20例,年龄46~86岁,平均年龄65.9岁。肺纤维化均通过高分辨率CT诊断所证实。健康对照组为本院体检健康者30例,其中男18例,女12例,年龄55~79岁,平均年龄63.27岁。

## 1.2 方法

**1.2.1 ANCA检测** 用间接免疫荧光法(IIF)及免疫印迹法。间接免疫荧光法试剂由德国欧蒙公司提供以Hep-2细胞、猴肝、甲醛和乙醇固定的中性粒细胞共4种生物基质片组成的检测试剂,可排除抗核抗体干扰,提高结果的准确性。受检血清用PBS-TWEEN 1:10稀释,每批均设阴性对照。每孔加20 μL的血清到基质上,孵育30 min, PBS-TWEEN洗涤1次,浸泡5 min,加荧光二抗孵育30 min洗涤同上。缓冲甘油封片。结果在荧光显微镜下观察荧光模型。免疫印迹法检测ANCA靶抗原采用欧蒙(德国)医学实验诊断股份公司提供MPO、PR3(IgG)试剂盒,检测的ANCA的靶抗原共2种,分别是蛋白酶3(PR3)、髓过氧化物酶(MPO)。将MPO、PR3抗原包被于检测膜条上,膜条放置温育槽(室温)中,加入1.5 mL PBS-TWEEN液,孵育振荡15 min,弃液,加入1:100缓冲液稀释血清1.5 mL,孵育振荡15 min,用洗涤液清洗3次,每次5 min,加入酶标记抗人IgG再孵育振荡15 min,同上清洗后加NBT显色,以实际公司提供的阳性条带位置标准图判定膜条上阳性结果。也可用EURO-LineScan软件进行判读结果,条带浓度大于或等于1个“+”为阳性。

**1.2.2 肌酐、尿素氮和胱抑素C测定** 空腹抽血2 mL于生

化常规管中,等血液自然凝固后离心分离血清,用 Olympus2700 自动生化仪测定肌酐、尿素氮和胱抑素 C 指标,试剂均为厂家配套试剂。白细胞、血小板用 Coulter LH750 全自动血细胞分析仪检测。试剂均为厂家配套试剂。IMMAGE800 双光径免疫浊度仪检测高敏 C 反应蛋白。试剂均为厂家配套试剂。

**1.3 统计学处理** 用 SPSS16.0 软件进行分析统计,数据分析均数采用 *t* 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

表 1 肺纤患者不同 ANCA 结果相关指标比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	WBC( $\times 10^9/L$ )	PLT( $\times 10^9/L$ )	CRP(mg/L)	BUN(mmol/L)	CR(mmol/L)	胱抑素 C(mg/L)
肺纤 ANCA(+)组	29	6.91 $\pm$ 3.21	182.86 $\pm$ 65.15	43.24 $\pm$ 75.07 <sup>**</sup>	6.14 $\pm$ 3.00	84.35 $\pm$ 76.53	1.63 $\pm$ 2.04 <sup>*</sup>
肺纤 ANCA(-)组	40	7.72 $\pm$ 3.90	180.69 $\pm$ 66.35	28.03 $\pm$ 46.15 <sup>**</sup>	5.39 $\pm$ 2.53	64.43 $\pm$ 19.00	1.01 $\pm$ 0.33 <sup>#</sup>
健康对照组	30	5.91 $\pm$ 1.24	207.93 $\pm$ 49.41	3.26 $\pm$ 2.09	5.43 $\pm$ 0.89	71.68 $\pm$ 11.65	0.86 $\pm$ 0.11

<sup>\*\*</sup>:  $P < 0.01$ , <sup>\*</sup>:  $P < 0.05$ , 与健康对照组比较; <sup>#</sup>:  $P < 0.05$ , 与肺纤 ANCA(+)组比较。

表 2 各项相关指标比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	WBC( $\times 10^9/L$ )	PLT( $\times 10^9/L$ )	CRP(mg/L)	BUN(mmol/L)	CR(mmol/L)	胱抑素 C(mg/L)
肺纤 P-ANCA 抗性阳性	16	7.38 $\pm$ 3.76	188.50 $\pm$ 69.17	63.70 $\pm$ 95.65 <sup>*</sup>	7.23 $\pm$ 3.43	102.36 $\pm$ 100.14	2.00 $\pm$ 2.65 <sup>*</sup>
肺纤 P-ANCA 敏感	11	5.79 $\pm$ 1.76	177.10 $\pm$ 58.65	16.92 $\pm$ 20.61 <sup>*</sup>	4.79 $\pm$ 1.33	62.89 $\pm$ 13.50	1.18 $\pm$ 0.34 <sup>*</sup>
健康对照组	30	5.91 $\pm$ 1.24	207.93 $\pm$ 49.41	3.26 $\pm$ 2.09	5.43 $\pm$ 0.89	71.68 $\pm$ 11.65	0.86 $\pm$ 0.11

<sup>\*</sup>:  $P < 0.05$ , 与健康对照组比较。

## 3 讨 论

间质性肺纤维化是一组异型的疾病。主要发生于肺间质,亦可累及肺泡上皮细胞、肺毛细血管内皮细胞和肺动静脉。ANCA 检测是原发性小血管炎患者诊断的敏感性血清学指标,存在于多种自身免疫性疾病中。系统性血管炎是指以血管壁的炎症和纤维素样坏死为病理特征的一组系统性疾病,可分为原发性和继发性系统性血管炎。其中原发性系统性血管炎与 ANCA 密切相关,又称为 ANCA 相关系统性血管炎(AASV)<sup>[6-10]</sup>。ANCA 相关性肾炎的病理改变系统性血管炎病理特点是白细胞对血管壁的浸润和血管壁的坏死性变化。近年来研究证实肺病患者中也存在自身抗体。本文对 ANCA 的检测采用 IIF 法,对 ANCA 检测联合应用 Hep-2 细胞、猴肝、甲醛和乙醇固定的中性粒细胞基质片作对照,进行区分。应用乙醇固定的白细胞可产生两种荧光形态:在胞浆内呈粗大颗粒,均匀分布在整个中性粒细胞胞浆中的颗粒型荧光,细胞核无荧光为胞浆型-ANCA(CANCA),主要靶抗原为蛋白酶 3 (PR3);荧光围绕中性粒细胞核的平滑的带状荧光为核周型-ANCA(PANCA),而 PANCA 阳性仅在肝血窦的中性粒细胞出现荧光,甲醛固定的粒细胞荧光阳性称为甲醛抵抗型,靶抗原为髓过氧化物酶(MPO)。甲醛固定的粒细胞荧光阴性为甲醛敏感型<sup>[11-14]</sup>。本文统计的 69 例肺间质纤维化患者中 ANCA 阳性率分别是 42.02%, P-ANCA 抗性者 16 例(55.2%),抗 MPO-ANCA 者 11 例(37.9%);C-ANCA 者 3 例(10.3%),抗 PR3-ANCA 者 3 例。肺纤 ANCA(+)组 CysC 水平明显高于肺纤 ANCA(-)与健康对照组( $P < 0.05$ ),肺纤 ANCA(+)组与肺纤 ANCA(-)组 CRP 水平明显高于与健康对照组( $P < 0.01$ )。当肺纤维化患者出现 ANCA 阳性,尤其是特异性很高的抗 MPO 抗体或抗 PR3 抗体阳性,肺纤 ANCA 抗性的高敏 CRP 和 CysC 水平明显高于健康对照组,同时合并肾或其他脏器损害,应首先考虑 ANCA 相关性血管炎<sup>[15]</sup>。特发性肺纤维化和显微镜下多血管炎均多见于老年人<sup>[16]</sup>,本实验肺间质纤维化 29 例 ANCA 阳性者平均年龄 68 岁。与 ANCA 相关的肾小球肾炎 PR3-ANCA 也直接损害肾血管内皮细胞导致进

## 2.1 肺间质纤维化伴感染者中 ANCA 检测结果阳性率比较

用 IIF 方法检测 69 例肺间质纤维化伴感染者中 ANCA 阳性者共 29 例(42%)。用欧盟印迹法进行验证,结果 P-ANCA 抗性阳性者 16 例(55.2%)、抗 MPO-ANCA 阳性 11 例(37.9%);C-ANCA 阳性者 3 例(10.3%)、抗 PR3-ANCA 阳性者 3 例;P-ANCA 敏感 11 例(37.9%)。P-ANCA、C-ANCA 双阳性者 1 例。30 例健康对照者中未发现 ANCA 阳性者。

**2.2 ANCA 与肺间质纤维化伴感染患者的实验室指标检查关系** 见表 1~2。

行性肾功能损害,本文因抗 PR3-ANCA 阳性者 3 例,就未同健康对照组进行统计。临床若高度怀疑为血管炎,只要诊断不明,就应检测 ANCA,只要 ANCA 阳性强烈提示坏死性血管炎。因此对于拟诊特发性肺纤维化的患者常规进行 ANCA 的检查具有重要意义,可能先于肾脏损害出现前发现显微镜下多血管炎,并指导患者定期进行尿常规和肾功能定期监测。间质性肺纤维化炎性和免疫细胞的效应功能有关,中性粒细胞分泌炎性介质:如溶菌酶、人白细胞弹性蛋白酶、组织蛋白酶 D 和透性杀菌蛋白、乳铁蛋白等。本文统计的 69 例肺间质纤维化患者中 P-ANCA 敏感 11 例占 29 例 ANCA 阳性 37.9%,表明除存在 ANCA 阳性 MPO、PR3 以外的靶抗原外,还有溶菌酶、人白细胞弹性蛋白酶靶抗原等。两者和在一起是 ANCA 自身抗体的总称<sup>[17]</sup>。而且 P-ANCA 敏感者的高敏 CRP 和 CysC 水平也明显高于健康对照组。所以同样引起机体的炎症和肾的早期损伤。

研究发现肺间质纤维化 ANCA(+)组、P-ANCA 抗性和 P-ANCA 敏感高敏 CRP 水平明显高于健康对照组( $P < 0.05$ ),研究结果表明肺纤维化疾病均存在炎症反应,高敏 C 反应蛋白是急性时相蛋白,是血管炎症反应更敏感的指标,CRP 水平明显增高加速血管的坏死。肺纤维化 ANCA(+)阳性者肾功能指标胱抑素 C 明显增高,说明肺纤维化 ANCA(+)患者伴有肾早期损伤。CysC 是一种糖基化碱性蛋白质,能在所有有核细胞上进行表达,中性粒细胞表面抗原与 ANCA 结合,诱导中性粒细胞释放部分黏附分子结合在小血管表面,导致血管坏死<sup>[18]</sup>。而且 CysC 与血清肌酐相比,更具有敏感性和特异性。推测 ANCA(+)的肺纤维化可能是由系统性血管炎累及肺脏所致,同时伴有肾功能损伤。联合血 ANCA 与 CysC 检测可提高其诊断特异性,联合检测的阳性率明显高于单项检测。因此,对于肺纤维化患者应进行 ANCA 检测,以排除系统性血管炎累及肺脏所致,本实验仅对 29 例 ANCA 阳性的肺间质纤维化患者相关性小血管炎进行了分析,因此所得结论可能有一定的局限性,如有可能会进行更多样本的分析,观察更多种类的靶抗原与各种疾病之间的关系。

## 参考文献

[1] 曹然, 汪东方. ANCA 相关性小血管炎性肺炎的影像学表现及预防[J]. 中国医学影像技术, 2004, 20(1): 30-31.

[2] 孙凯, 黎磊石. 抗中性粒细胞胞浆抗体滴度检测对微型多动脉炎肾损害活动性的诊断价值[J]. 中华肾脏病杂志, 1997, 13(6): 359-360.

[3] 彭兴. 抗中性粒细胞胞浆抗体检测及其临床意义[J]. 中国实验诊断学, 2005, 9(1): 147-148.

[4] 赵明辉, 陈曼. 小血管炎肾损害[J]. 中国实用内科杂志, 2006, 26(5): 333-335.

[5] Mavrogeni S, Karabela G, Gialafos E, et al. Cardiac involvement in ANCA(+) and ANCA(-) churg-strauss syndrome evaluated by cardiovascular magnetic resonance[J]. Inflamm Allergy Drug Targets, 2013, 12(5): 322-327.

[6] Specks U, Merkel PA, Seo P, et al. Efficacy of remission-induction regimens for ANCA-associated vasculitis[J]. N Engl J Med, 2013, 369(5): 417-427.

[7] Csernok E, Gross WL. Current understanding of the pathogenesis of granulomatosis with polyangiitis (Wegener's)[J]. Expert Rev Clin Immunol, 2013, 9(7): 641-648.

[8] Perel SB, Prain KM, Wilson RJ, et al. Diagnostic value of distinguishing and reporting different perinuclear ANCA (P-ANCA) immunofluorescence patterns: a prospective study[J]. Am J Clin Pathol, 2013, 140(2): 184-192.

[9] Eschun GM, Mink SN, Sharma S. Pulmonary interstitial fibrosis as a presenting manifestation in perinuclear antineutrophilic cytoplasmic antibody microscopic polyangiitis [J]. Chest, 2003, 123(1): 297-301.

[10] Fauruschou M, Helleberg M, Obel N, et al. Incidence of granulomatosis with polyangiitis (Wegener's) in Greenland and the Faroe Islands.

[11] Islands; epidemiology of an ANCA-associated vasculitic syndrome in two ethnically distinct populations in the North Atlantic area [J]. Clin Exp Rheumatol, 2013, 31(1 Suppl 75): S52-55.

[12] Konstantinov KN, Harris AA, Barry M, et al. Sustained remission of antineutrophil cytoplasmic antibody-mediated glomerulonephritis and nephrotic syndrome in mixed connective tissue disease[J]. J Clin Med Res, 2013, 5(4): 316-321.

[13] Zycinska K, Kostrzewska-Janicka J, Nitsch-Osuch A, et al. Cancer incidence in pulmonary vasculitis[J]. Adv Exp Med Biol, 2013, 788(1): 349-353.

[14] Chebbi W, Zantour B, Alaya W, et al. Benzylthiouracil-induced antineutrophil cytoplasmic antibody-associated cutaneous vasculitis: A case report and literature review[J]. Rev Med Interne, 2013, 34(9): 561-564.

[15] 陈小文, 尹荣凤, 鞠北华, 等. 狼疮性肾炎中抗中性粒细胞胞浆抗体及其靶抗原的分析[J]. 免疫学杂志, 2012, 6(28): 516-517.

[16] Xin G, Zhao MH, Wang HY. Detection rate and antigenic specificities of antineutrophil cytoplasmic antibodies in Chinese patients with clinically suspected vasculitis[J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2004, 11(3): 559-562.

[17] 王锐, 赵明辉, 于静, 等. 老年人抗中性粒细胞胞浆抗体相关性小血管炎的临床病理表现[J]. 中华老年多器官疾病杂志, 2002, 1(1): 15-18.

[18] Gross WL, Csemok E. Immunodiagnostic and pathophysiological aspects of antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in vasculitides [J]. Curr Opin Rheumatol, 1995, 7(1): 11-19.

[19] Grubb A. Diagnostic value of analysis of Cystatin C and protein HC in biological fluids[J]. Clin Nephrol, 1992, 38(Suppl 1): S20-27.

(收稿日期: 2013-08-02)

(上接第 3331 页)

握使用甲状腺素的剂量, 尽量避免使用过量所造成患者甲状腺功能亢进或其他副作用的发生。目前无症状亚甲减患者是否治疗没有统一的推荐指南, 亚甲减需要治疗的指征为<sup>[15]</sup>: 高胆固醇血症、血清 HS-TSH>10 mU/L、甲状腺自身抗体阳性。其目的是针对心脑血管疾病和阻止发展为临床甲减, 对于血清 HS-TSH<10 mU/L, 甲状腺自身抗体阴性和伴有冠心病者不宜给予甲状腺素治疗, 需定期观察上述指标的变化。

## 参考文献

[1] 阳俊琴. 第一届全国老年人内分泌代谢系统疾病学术会议纪要[J]. 中华老年医学杂志, 2003, 22(7): 440-440.

[2] Gunduz H, Arinc H, Yolcu M, et al. A case of hypothyroidism mimicking acute coronary syndrome[J]. Int J Cardiovasc Imaging, 2006, 22(2): 141-145.

[3] 张玉芝. 甲状腺机能减低合并心血管疾病 41 例临床分析[J]. 右江医学, 1997, 25(2): 67-68.

[4] 宋庆璋, 徐风玲, 毕秀萍, 等. 甲状腺功能减退患者血清同型半胱氨酸及血脂水平检测的临床意义[J]. 检验医学, 2007, 22(2): 176-177.

[5] 陆再英, 钟南山. 内科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 722.

[6] Derwahl KM. 亚临床甲状腺功能减退症的治疗[J]. 国外医学: 内分泌学分册, 2003, 23(6): 375-375.

[7] 刘长江, 赵咏桔. 亚临床甲状腺功能减退与动脉粥样硬化[J]. 中国实用内科杂志, 2007, 27(15): 1223-1224.

[8] 滕卫平. 开展亚临床甲状腺功能减退症的临床研究[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2004, 20(2): 93-95.

[9] Folsom AR, Burke GL, Ballew C, et al. Relation of body fatness and its distribution to cardiovascular risk factors in young blacks and whites. The role of insulin[J]. Am J Epidemiol, 1989, 130(5): 911-924.

[10] Canaris GJ, Manowitz NR, Mayor G, et al. The Colorado thyroid disease prevalence study[J]. Arch Intern Med, 2000, 160(4): 526-534.

[11] Bindeis AJ, Westernsorp RG, Frolich M, et al. The prevalence of subclinical hypothyroidism at different total plasma cholesterol level in middle aged men and women; a need for case-finding[J]. Clin Endocrinol, 1999, 50(2): 217-220.

[12] Diekman MJM, Van der Put NM, Blom HJ, et al. Determinants of changes in plasma homocysteine in hyperthyroidism and hypothyroidism[J]. Clin Endocrinol, 2001, 54(2): 197-204.

[13] Catargi B, Parrot-Roulaud F, Cochet C, et al. Homocysteine, hypothyroidism, and effect of thyroid hormone replacement [J]. Thyroid, 1999, 9(12): 1163-1166.

[14] 姜晖, 刘殿新. 左旋甲状腺素对亚临床甲减患者的影响[J]. 中国误诊杂志, 2006, 46(28): 42-43.

[15] 滕卫平. 开展亚临床甲状腺功能减退症的临床研究[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2004, 20(2): 93-95.

(收稿日期: 2013-08-12)