

• 临床检验研究论著 •

类风湿关节炎患者血清 GPI 检测及其诊断价值的研究*

沈宝岩¹, 黄建军^{2△}

(1. 上海交通大学医学院附属新华医院崇明分院检验科, 上海崇明 202150;
2. 皖南医学院弋矶山医院检验科, 安徽芜湖 241001)

摘要:目的 探讨血清葡萄糖-6-磷酸异构酶(GPI)水平与类风湿关节炎(RA)发病的相关性及其对 RA 诊断的价值。
方法 采用 ELISA 法检测 68 例 RA 患者、69 例非 RA 自身免疫性疾病患者和 77 例健康体检者血清 GPI 水平,常规检测 RA 患者类风湿因子(RF)、红细胞沉降率(ESR)、C 反应蛋白(CRP)和抗 CCP 抗体水平。**结果** RA 患者血清 GPI 水平为(7.01±8.03)mg/L,非 RA 自身免疫性疾病患者为(0.30±0.57)mg/L,健康体检者为(0.22±0.65)mg/L,RA 患者血清 GPI 浓度显著高于非 RA 自身免疫性疾病患者和健康体检者($P<0.001$)。活动性 RA 患者和非活动性 RA 患者血清 GPI 水平比较,差异有统计学意义($P<0.01$)。以 0.332 mg/L 为临界值,GPI 检测用于 RA 诊断的灵敏度和特异度分别为 70.6%和 92.2%,ROC 曲线下面积为 0.901;GPI 水平与 RF、ESR、CRP 及抗 CCP 抗体水平呈正关,相关系数分别为 0.645、0.480、0.389 和 0.623(均 $P<0.05$)。**结论** RA 患者血清 GPI 水平显著升高,GPI 有可能成为诊断 RA 及判断 RA 活动性的一个新指标。

关键词:关节炎,类风湿; 葡萄糖-6-磷酸异构酶; 诊断
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.04.006 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2014)04-0396-03

Serum glucose-6-phosphate isomerase measurement and its diagnostic value on rheumatoid arthritis*

Shen Baoyan¹, Huang Jianjun^{2△}

(1 Department of Laboratory Medicine, Xinhua Hospital Chongming Branch Affiliated to Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 202150, China; 2 Department of Laboratory Medicine, Yijishan Hospital of Wannan Medical College, Wuhu, Anhui 241001, China)

Abstract: **Objective** To detect the serum level of glucose-6-phosphate isomerase (GPI) and evaluate the diagnostic value on rheumatoid arthritis (RA). **Methods** The concentration of serum GPI in 68 patients with RA, 69 non-RA patients with other autoimmune diseases and 77 normal controls were assayed by ELISA. The level of RF, CRP, anti-CCP antibody and ESR were also assayed in RA patients. **Results** GPI serum level were (7.01±8.03)mg/L in RA patients, (0.30±0.57)mg/L in non-RA patients with other autoimmune diseases and (0.22±0.65)mg/L in control group. The level of GPI was statistically higher in RA patients than the other two groups ($P<0.05$), and it was also statistically higher in active RA patients than inactive RA patients. When 0.332 mg/L was regarded as cut-off value, the sensitivity and specificity of GPI for RA were 70.6% and 92.2% respectively, and the area under the ROC curve was 0.901. Spearman rank correlation analysis showed the level of serum GPI positively correlated with ESR, CRP and anti-CCP antibody, with correlation coefficients of 0.480, 0.389 and 0.623 respectively. **Conclusion** Serum level of GPI increases significantly in RA patients and it could be used as a new indicator for RA diagnosis and activity judgment.

Key words: arthritis, rheumatoid; glucose-6-phosphate isomerase; diagnosis

早期诊断对类风湿关节炎(RA)患者的治疗和预后有重要意义,目前 RA 的诊断主要依靠临床症状和血清学指标,如类风湿因子(RF)和抗环瓜氨酸肽(CCP)抗体等。RF 在 RA 患者中的阳性率较高,但特异性较差;抗 CCP 抗体虽然能用于早期诊断 RA,但灵敏度较低。有文献报道,血清葡萄糖-6-磷酸异构酶(GPI)在 RA 患者血清和关节液中明显升高^[1-2],转基因小鼠模型 K/BxN 中,GPI 可通过内皮细胞或者关节滑液中的可溶性蛋白呈递给免疫系统,从而引起 RA 患者的免疫系统紊乱^[3],诱导小鼠关节炎的发生,与人类 RA 非常一致^[1]。本研究采用 ELISA 法检测 RA 患者、非 RA 自身免疫性疾病患者和健康体检者 3 组人群血清 GPI 的水平,比较 GPI 水平的差异,分析 GPI 水平与 RA 其他血清学指标的相关性,评价 GPI 对 RA 的诊断价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 RA 患者 68 例作为 RA 组,其中,男 10

例,女 58 例,年龄 15~74 岁,年龄(46.2±13.9)岁。RA 患者中 39 例处于活动期,29 例为非活动期,所有 RA 患者均符合 2009 年美国风湿病学会(ACR)和欧洲抗风湿病联盟(EULAR)联合颁布新的 RA 诊断标准。69 例非 RA 自身免疫性疾病患者作为疾病对照组,包括例 24 例 SLE 患者、18 例 AS 患者、16 例硬皮病患者和 11 例干燥综合征患者。健康对照组 77 例,均为健康体检者,男 21 例,女 56 例,年龄 24~71 岁,平均(42.1±10.9)岁。

1.2 方法

1.2.1 RA 活动的判断标准 (1)关节肿胀大于或等于 6 个;(2)关节压痛大于或等于 6 个;(3)晨僵持续时间大于或等于 45 min;(4)红细胞沉降率(ESR)≥40 mm/h;(5)C 反应蛋白(CRP)≥正常值上限的 1.5 倍。RA 患者同时存在(1)、(2)2 项并伴有(3)、(4)、(5)项的任何 2 项,被认为患活动性 RA;不同时满足同时存在(1)、(2)2 项或(3)、(4)、(5)仅 1 项,则认为

* 基金项目:安徽省教育厅高校自然科学基金资助项目(KJ2013B316)。 作者简介:沈宝岩,男,检验技师,主要从事临床免疫学检验的研究。 △ 通讯作者,E-mail:terranonline@126.com。

RA 不活动或活动度低。

1.2.2 各指标的检测 采用 ELISA 法进行检测,GPI 试剂盒和标准品由上海北加生化试剂公司提供(标准品浓度分别为:0、3、10、30、100、300 U/mL),检测值在 0.20 mg/L 以下为正常;抗 CCP 抗体检测的试剂盒和标准品由 Aeskulisa 公司提供。严格按照试剂盒说明书进行操作。用散射比浊法测定 RF 和 CRP,自然沉降法检测 ESR。RF、CRP 的检测采用常规免疫比浊法,ESR 采用魏氏血沉法。

1.3 统计学处理 用 SPSS 13.0 统计软件包进行数据处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间均数比较采用单因素方差分析或 t 检验。百分率的比较采用 χ^2 检验。根据 GPI 在不同浓度时对 RA 诊断的灵敏度和特异度,绘制 ROC 曲线并计算曲线下面积。用 Spearman 秩相关分析,评价两指标之间的相关性。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组人群血清 GPI 水平的比较 RA 组患者血清 GPI 水平显著高于疾病对照组和健康对照组($P < 0.001$);活动性 RA 组中 GPI 的表达水平显著高于非活动性 RA 组($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 不同组别人群血清 GPI 水平的比较		
组别	<i>n</i>	GPI 水平(mg/L)
RA 组	68	7.01±8.03
活动性 RA 组	39	9.32±8.63 [△]
非活动性 RA 组	29	3.92±5.97
疾病对照组	69	0.30±0.57 [*]
健康对照组	77	0.22±0.65 [*]

^{*}: $P < 0.001$,与 RA 组比较;[△]: $P < 0.01$,与 RA 非活动性 RA 组比较。

2.2 GPI 诊断截断点的选择和 ROC 曲线 GPI 检测用于 RA 诊断的 ROC 曲线,见附图 1(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。以灵敏度和特异度之和最大时的 GPI 值为诊断截断点。当血清 GPI 浓度为 0.332 mg/L 时,GPI 对 RA 的诊断灵敏度和特异度分别为 70.6%和 92.2%,ROC 曲线下面积为 0.901,诊断效果最佳。

2.3 GPI 与 RF、ESR、CRP 和抗 CCP 抗体之间的相关性分析 GPI 与 RF 水平间的相关系数为 0.645, $P < 0.01$;GPI 与 ESR 之间的相关系数为 0.480, $P < 0.001$;GPI 与 CRP 之间的相关系数为 0.389, $P = 0.01$;GPI 与抗 CCP 抗体之间的相关系数为 0.623, $P < 0.001$;四者均呈显著性相关。

2.4 GPI 与 RF 单独及联合检测用于 RA 诊断 以血清 GPI 浓度 0.332 mg/L 为截断点,大于该值为阳性,小于该值为阴性。GPI 与 RF 单独及联合检测用于 RA 诊断的灵敏度和特异度见表 2,在以 GPI 和 RF 检测结果单独 1 项或 2 项同时阳性作为阳性样本时,联合起来对 RA 的诊断灵敏度为 85.3%,特异度为 81.8%。

表 2 GPI 与 RF 单独及联合检测用于 RA 诊断的灵敏度、特异度[%(<i>n</i> / <i>n</i>)]		
检测指标	灵敏度	特异度
GPI	70.6(48/68)	92.2(71/77)
RF	79.4(54/68)	84.4(65/77)
GPI+RF	85.3(58/68)	81.8(63/77)

3 讨 论

葡萄糖-6-磷酸异构酶(GPI)最早于 1968 年因非球形红细胞溶血性贫血的发生而被认识,GPI 存在于各种细胞胞质内,是糖酵解和糖异生的重要酶类。在转基因小鼠模型 K/BxN 中,Schaller 等^[4]发现小鼠所发生的炎症性关节炎与人类 RA 相似,而且会持续产生抗 GPI 抗体^[5-6]。随后的研究认为,抗 GPI 抗体并非 RA 的特异性抗体,而且该抗体在 RA 患者中的阳性率很低^[2];Matsumoto 等^[7]报道不同 RA 患者组抗 GPI 抗体的阳性率平均为 15%,认为抗 GPI 抗体检测对 RA 的早期诊断、分类没有帮助^[2];Herve 等^[8]在 RA 患者中也未检测到抗 GPI 抗体,抗 GPI 抗体检测可能对 RA 的诊断没有帮助。但 Kassahn 等^[9]在 RA 患者的血清和关节液中发现高水平的 GPI 及其免疫复合物,通过激光共聚焦显微镜和免疫组织化学观察发现 RA 患者的关节滑膜或滑膜的小动脉及毛细血管有高密度的 GPI 表达,认为 GPI 可能与血管内皮生长因子(VEGF)有关。因此,GPI 在 RA 的发病过程中可能具有重要作用,并且可能成为 RA 诊断或活动度判断的指标。

本研究通过 ELISA 法检测 RA 组、疾病对照组和健康对照组 3 组人群血清 GPI 浓度,发现 RA 患者血清 GPI 的浓度显著高于非 RA 自身免疫性疾病患者和健康体检者,这与鲍春德等^[10]、卿之驹等^[11]的研究结果一致。GPI 选择性地在 RA 患者中表达增高,说明血清 GPI 检测对 RA 的诊断有意义。绘制得到的 GPI 检测用于 RA 诊断的 ROC 曲线表明,以血清 GPI 浓度 0.332 mg/L 为诊断截断点时,GPI 检测用于 RA 诊断的灵敏度和特异度分别为 70.6%和 92.2%,这与鲍春德等^[10] GPI 诊断截断点的选取基本一致,灵敏度和特异度也较为一致;较卿之驹等^[11]以 0.19 mg/L 为阳性临界值时的特异度为低。本研究结果显示,在 68 例 RA 患者和 77 例健康对照者中,RF 的灵敏度和特异度分别为 79.4%和 84.4%,GPI 和 RF 联合检测用于 RA 诊断的灵敏度提高为 85.3%,对疾病的诊断具有重要意义。

本研究发现活动性 RA 患者血清 GPI 水平显著高于非活动性 RA 患者,说明 GPI 可能促使 RA 患者的病情发展,原因之一可能是 GPI 诱导炎症细胞向关节损伤部位迁移所致,这有待进一步证实。Yu 等^[1]在肿瘤细胞内发现 GPI 可以调节基质金属蛋白酶-3(MMP-3)的表达,而 MMP-3 在 RA 患者的滑膜细胞、血管内皮细胞和成纤维细胞中高表达。早期研究发现,GPI 与人类神经白细胞素(NLK)有 90%的序列同源性,GPI 能促进体外运动神经元的再生,有助于外周和中枢神经元的生存,并影响 B 细胞免疫球蛋白的合成^[12-13]。本研究显示,GPI 与 RF、抗 CCP 抗体水平呈显著正相关。

此外,在 GPI 诱导的动物关节炎模型的研究中发现,GPI 诱导的慢性小鼠关节炎是与 MHC 的表达相关的,并且是 B 细胞依赖性的,去除 B 细胞的小鼠不会发生慢性关节炎^[14]。进一步的研究发现 B 细胞可以提呈 GPI 抗原给 T 细胞,在 T 细胞的刺激下产生抗 GPI 抗体,与 T 细胞分泌的 TNF- α 和 IL-6 协同作用导致小鼠患关节炎^[15]。不仅如此,近年来广受关注的 Th17 细胞及其分泌的 IL-17 在 GPI 诱导的小鼠关节炎中也有很重要的作用^[16-17]。

总之,GPI 可能是 RA 病原性物质,其在 RA 患者中具体的致病机制还需要深入地研究。GPI 在 RA 患者中选择性的高表达对 RA 的诊断具有重要意义。GPI 可能成为继 RF、抗 CCP 抗体之后的新的诊断指标。

参考文献

[1] Yu FL,Liao MH, Lee JW, et al. Induction of hepatoma cells mi-

gration by phosphoglucose isomerase/autocrine motility factor through the upregulation of matrix metalloproteinase-3[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 314(1): 76-82.

[2] Jouen F, Vittecoq O, Leguillou F, et al. Diagnostic and prognostic values of anti glucose-6-phosphate isomerase antibodies in community-recruited patients with very early arthritis[J]. Clin Exp Immunol, 2004, 137(3): 606-611.

[3] Maccioni M, Zeder-Lutz G, Huang H, et al. Arthritogenic monoclonal antibodies from K/BxN mice[J]. J Exp Med, 2002, 195(8): 1071-1077.

[4] Schaller M, Burton DR, Ditzel HJ. Autoantibodies to GPI in rheumatoid arthritis: linkage between an animal model and human disease[J]. Nat Immunol, 2001, 2(8): 746-753.

[5] Cha HS, Kim TJ, Kim JY, et al. Autoantibodies to glucose-6-phosphate isomerase are elevated in the synovial fluid of rheumatoid arthritis patients[J]. Scand J Rheumatol, 2004, 33(3): 179-184.

[6] Kim JY, Lee MH, Jung KI, et al. Detection of antibodies against glucose 6-phosphate isomerase in synovial fluid of rheumatoid arthritis using surface plasmon resonance (BIAcore)[J]. Exp Mol Med, 2003, 35(4): 310-316.

[7] Matsumoto I, Lee DM, Goldbach-Mansky R, et al. Low prevalence of antibodies to glucose-6-phosphate isomerase in patients with rheumatoid arthritis and a spectrum of other chronic autoimmune disorders[J]. Arthritis Rheum, 2003, 48(4): 944-954.

[8] Herve CA, Wait R, Venables PJ. Glucose-6-phosphate isomerase is not a specific autoantigen in rheumatoid arthritis[J]. Rheumatology, Oxford, 2003, 42(8): 986-988.

[9] Kassahn D, Kolb C, Solomon S, et al. Few human autoimmune se-

ra detect GPI[J]. Nat Immunol, 2002, 3(5): 411-412.

[10] 鲍春德, 叶萍, 秦立新. 血清中 6-磷酸葡萄糖异构酶抗原升高在类风湿性关节炎中的意义探讨[J]. 中华风湿病学杂志, 2005, 9(5): 277-279.

[11] 卿之驹, 贾凯, 秦立新. 葡萄糖 6-磷酸异构酶在类风湿性关节炎中的诊断意义[J]. 实用预防医学, 2005, 12(3): 481-482.

[12] Mizrahi Y. Neurotrophic activity of monomeric glucophosphoisomerase was blocked by human immunodeficiency virus (HIV-1) and peptides from HIV-1 envelope glycoprotein[J]. J Neurosci Res, 1989, 23(2): 217-224.

[13] Chaput M, Claes V, Portetelle D, et al. The neurotrophic factor neuroleukin is 90% homologous with phosphohexose isomerase[J]. Nature, 1988, 332(6163): 454-455.

[14] Bockermann R, Schubert D, Kamradt T, et al. Induction of a B-cell-dependent chronic arthritis with glucose-6-phosphate isomerase[J]. Arthritis Res Ther, 2005, 7(6): 1316-1324.

[15] Tanaka-Watanabe Y, Matsumoto I, Iwanami K, et al. B cells play a crucial role as antigen-presenting cells and collaborate with inflammatory cytokines in glucose-6-phosphate isomerase-induced arthritis[J]. Clin Exp Immunol, 2009, 155(2): 285-294.

[16] Iwanami K, Matsumoto I, Tanaka Y, et al. Arthritogenic T cell epitope in glucose-6-phosphate isomerase-induced arthritis[J]. Arthritis Res Ther, 2008, 10(6): R130.

[17] Jacobs JP, Wu HJ, Benoist C, et al. IL-17-producing T cells can augment autoantibody-induced arthritis[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(51): 21789-21794.

(收稿日期: 2013-10-08)

(上接第 395 页)

红细胞增加越明显, 有核红细胞数量随缺氧程度的加重而增加^[6-7]。HIE 组除了未成熟红细胞包括有核红细胞(NRBC)、网织红细胞(RET)及未成熟网织红细胞(IRF)数量增多之外, 红细胞相关参数 HCT、MCV、RDW-CV、RDW-SD、HFR 比对照组增高, 而 RBC、HGB、MCH 等参数未见有显著性差异, 与国内文献报道不一致^[8], 虽然本资料 HIE 组中 RBC、HGB、MCH 的检测数值比对照组数值略有增加, 但差异无统计学意义, 可能与观察的例数太少有关。

造成 HIE 患儿 PLT 减少和 PCT 减低的原因, 与新生儿缺氧缺血导致脑部损伤发生的机制有关^[4]; HIE 患儿缺氧缺血引起脑部微血管内皮细胞的损伤, 致使前列环素(PGI₂)生成减少, PAF 被激活并生成增多, 活化的血小板与内皮细胞发生作用, 加剧了局部脑损伤。而损伤部位所暴露出的胶原纤维和肌纤维使血小板迅速在此黏附、聚集、活化及消耗, 导致循环血液中的 PLT 减少, PCT 减低。但随着 HIE 患儿病情好转及脑部微血管病变的修复, PLT 逐渐恢复正常, 因此动态检测血小板参数, 对判断患儿缺氧的严重程度至关重要。

本研究提示, 通过动态监测患儿血常规, 观察白细胞、红细胞及血小板等参数, 可以及时了解到 HIE 患儿病情的变化, 减少新生儿缺氧缺血性脑损伤后遗症的发生。而血液中白细胞、红细胞及血小板参数的检测只需临床检验实验室中最基本的设备—全自动血细胞分析仪。血细胞分析仪在基层医疗机构中已经普及, 而且能快速提供灵敏、高效的检测结果, 对 HIE 初步筛查、判定严重程度、早期诊断及救治, 预测新生儿缺氧缺

血后器官功能的损伤及预后的评估具有重要意义。

参考文献

[1] 韩玉昆, 杨于嘉, 邵肖梅, 等. 新生儿缺氧缺血性脑病[M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 149-159.

[2] 彭小明, 高喜容, 孙正香, 等. 新生儿缺氧缺血性脑病血清超敏 C 反应蛋白的变化及临床意义[J]. 中国优生与遗传杂志, 2008, 16(6): 88-88.

[3] 赵秋剑, 柳小红. 窒息新生儿血液中白细胞计数与血小板参数的动态变化研究[J]. 临床和实验医学杂志, 2006, 5(9): 1386-1387.

[4] 肖吉群, 蔡苗. 超敏 C 反应蛋白和血小板参数变化预测新生儿缺氧缺血性脑病发生危险性的研究[J]. 重庆医学, 2012, 41(32): 3430-3431.

[5] 刘成玉, 罗春丽. 临床检验基础[M]. 5 版. 北京: 人民卫生出版社, 2012: 120-122.

[6] 杨晓菊, 叶元华, 赵金霞, 等. 应用孕妇外周血胎儿有核红细胞数量及胎儿脐动脉血流变化预测胎儿慢性缺氧[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(5): 466-470.

[7] Walsh BH, Boylan GB, Dempsey EM, et al. Association of nucleated red blood cells and severity of encephalopathy in normothermic and hypothermic infants[J]. Acta Paediatr, 2013, 102(2): 64-67.

[8] 郝素媛, 史桂芝, 范秀芳, 等. 脐血有核红细胞数量与胎儿/新生儿围产期缺氧的关系[J]. 中国优生与遗传杂志, 2006, 14(11): 81-82.

(收稿日期: 2013-09-28)