

• 论 著 •

类风湿性关节炎患者外周血 HFLC 检测的临床意义

杜振华, 鲍布和, 张明华[△]

(武警后勤学院附属医院检验科, 天津 300162)

摘要:目的 探讨外周血高荧光强度淋巴细胞(HFLC)与类风湿性关节炎(RA)发作的关系。方法 选取 2013 年 3 月至 2014 年 7 月在武警后勤学院附属医院就诊的 RA 患者 91 例, 含活动期患者(ARA)39 例, 静止期患者(SRA)52 例, 并选择同期 114 例该院查体患者作为健康对照组(HC), 采用 Sysmex XE-5000 检测外周血 HFLC 的两参数绝对计数(HFLC#)和占白细胞百分比(HFLC%), 采用 SIEMENS BNII 全自动免疫散射比浊仪检测 C 反应蛋白(CRP)、血清免疫球蛋白(IgA、IgG、IgM)、类风湿因子(RF)、抗链 O(ASO)、补体(C3、C4)。结果 HC 组 $[0.00(0.00 \sim 1.00) \times 10^9/L]$ 和 SRA 组 $[0.00(0.00 \sim 1.00) \times 10^9/L]$ 间 HFLC 差异无统计学意义($P > 0.05$), 但均明显低于 ARA 组 $[1.00(0.00 \sim 2.00) \times 10^9/L]$ ($P < 0.05$)。ARA 组 HFLC% $[0.10\% (0.00\% \sim 0.22\%)]$ 明显高于 HC 组 $[0.00\% (0.00\% \sim 0.14\%)]$ ($P < 0.05$)。ARA 组中 HFLC# 与 IgE、CRP 为正相关($P < 0.05$), HFLC% 与 RF 正相关($P < 0.05$)。HFLC# 与 HFLC% 的 ROC 曲线下面积分别为 0.637($P < 0.05$)、0.632($P < 0.05$)。当 HFLC% 界值为 0.14% 时, 灵敏度为 46.15%, 特异度为 78.85%。结论 HFLC% 与 HFLC# 可以反映 RA 的发作, 虽然其诊断效能不高, 但是由于这些参数获取经济、便捷, 可以为 RA 发作的诊断提供新的观察指标, 为指导下一步的检查和治理提供帮助。

关键词: 高荧光强度淋巴细胞; B 淋巴细胞; 浆细胞; 类风湿性关节炎

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.09.023

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)09-1219-03

Clinical significance of peripheral blood high fluorescent lymphocyte detection in patients with rheumatoid arthritis

Du Zhenhua, Bao Buhe, Zhang Minghua

(Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of Logistics

University of Armed Police Force, Tianjin 300162, China)

Abstract: Objective To explore the relationship between the level of peripheral blood high fluorescent lymphocyte (HFLC) and rheumatoid arthritis (RA) attack. Methods 91 cases RA including 39 cases of active RA (ARA) and 52 cases of silence RA (SRA) in our hospital from March 2013 to July 2014 were selected and contemporaneous 114 individuals of healthy physical examination were selected as the control group (HC). The peripheral blood HFLC absolute counts (HFLC#) and HFLC percentage (HFLC%) of WBC were detected by the Sysmex XE-5000. The levels of C reactive protein(CRP), IgA, IgM, IgE, IgG, rheumatoid factor (RF), anti-streptolysin O (ASO) and complements (C3, C4) were measured with Siemens BN II automatic scattering immune turbidimetric instrument. Results There were no significant differences in HFLC# between the HC group $[0.00(0.00 \sim 1.00) \times 10^9/L]$ and the SRA group $[0.00(0.00 \sim 1.00) \times 10^9/L, P > 0.05]$, however, which in both two groups were lower than that in the ARA group $[1.00(0 \sim 2.00) \times 10^9/L, P < 0.05]$. HFLC% in the ARA group $[0.10\% (0.00\% \sim 0.22\%)]$ was significantly higher than that in the HC group $[0.00\% (0.00\% \sim 0.14\%), P < 0.05]$. HFLC# in the ARA group was positively correlated with IgE and CRP ($P < 0.05$), while HFLC% was positively correlated with RF ($P < 0.05$). The area under ROC curve of HFLC# and HFLC% was 0.637 ($P < 0.05$) and 0.632 ($P < 0.05$) respectively. When setting the cutoff value of HFLC% as 0.14%, the sensitivity was 46.15 and the specificity was 78.85%. Conclusion HFLC# and HFLC% could reflect the RA attack. Though there is limitation in diagnostic efficiency, because obtaining these parameters is economical, convenient and fast, which can provide new observation indicators for diagnosing RA attack and help for guiding the next step examination and treatment.

Key words: high fluorescent lymphocyte; B lymphocyte; plasma cell; rheumatoid arthritis

外周血高荧光强度淋巴细胞(HFLC)代表活化的抗体合成或分泌的 B 细胞(ASC)^[1-3], 已被用于感染性疾病的诊断和治疗监测研究^[4-5]。类风湿性关节炎(RA)是一种常见的关节组织慢性病变的自身免疫性疾病, 免疫复合物激活补体是其主要病理机制^[6]。近年来研究发现 B 淋巴细胞在自身免疫性疾病发病机制中发挥重要的作用^[7-8]。由于活化 B 淋巴细胞产生的自身抗体和炎性因子是 RA 的主要致病因子, 本课题组推测外周血 ASC 细胞水平应能反映 RA 的发作。本研究通过 Sysmex XE-5000 检测活动期 RA 患者及健康对照组外周血

HFLC 水平, 评估 HFLC 检测对 RA 诊断的临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2013 年 3 月至 2014 年 7 月在武警后勤学院附属医院就诊的 RA 患者 91 例其中 26 例, 女 65 例, 年龄 (64.11 ± 13.48) 岁, 见表 1。所有 RA 患者的诊断均符合 1987 年美国风湿学会的诊断标准。91 例患者按照以下标准分为两组, 活动期组(ARA): 39 例, 其中男 14 例, 女 25 例, 平均 (62.44 ± 12.89) 岁。活动期判断标准: (1) 关节肿胀数不低于 6 个; (2) 关节压痛数不低于 6 个; (3) 晨僵不低于 45 min; (4) 血细胞

沉降率(ESR)不低于 30 mm/h;(5)C 反应蛋白(CRP)大于正常上限 1.5 倍。必须同时具备(1)、(2)两项条件且同时伴有(3)、(4)、(5)中的两项者判为活动期。静止期组(SRA):52 例,其中男 12 例,女 40 例,平均(65.37±14.32)岁。静止期判断标准为:仅具备或不具备活动期判断标准的(1)、(2)中的一项且(3)、(4)、(5)仅具备一项者判为静止期。两组年龄、性别、

职业构成等方面比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。RA 患者符合《类风湿关节炎诊断及治疗指南》^[9],排除其他风湿性疾病、感染、肿瘤、严重肝肾损伤及心脑血管疾病等。选择 114 例本院查体患者作为健康对照组(HC),其中男 24 例,女 90 例,平均(64.55±9.26)岁,见表 1。该研究得到医院医学伦理学会批准,并获得所有患者的知情同意。

表 1 各组患者实验室指标统计

	例数(男/女)	年龄(岁)	ESR(mm/h)	RF(IU/mL)	CRP(mg/L)
健康对照组	114(24/90)	64.55±9.26	10.13±7.65	15.81±9.22	2.69±1.18
活动期 RA	39(14/25)	62.44±12.89	53.25±12.84	68.30±11.90	23.05±5.32
静止期 RA	52(12/40)	65.37±14.32	21.30±6.15	55.00±10.70	8.00±3.11

1.2 仪器与试剂 Sysmex XE-5000 全自动血液细胞分析仪及其原装配套试剂(包括在线质控品)均来自日本希森美康公司。德国 Simens BNII 全自动免疫散射比浊仪及其配套试剂(包括质控品)。

1.3 方法 取患者空腹静脉血 5 mL,3 500 r/min 离心 10 min 后取血清检测。采用全自动免疫速率散射比浊法测定 CRP、血清免疫球蛋白(IgA、IgG、IgM)、类风湿因子(RF)、抗链 O(ASO)、补体(C3、C4)。HFLC 检测在 Sysmex XE-5000 全自动血液细胞分析仪上进行。ESR 检测采用魏氏法。HC 组和 SRA 组只检测 ESR、RF、CRP、HFLC。所有试验固定操作人员严格按照仪器操作规程说明操作。试剂、质控品及校准品均在有效期内,试验前用各自的校准物定标,试验中采用各自配套的质控物对仪器运行状态进行监控。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件和 GraphPad Prism 5.0 软件进行数据分析,正态分布资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,非正态分布资料用 M(Q1~Q3)表示。组间比较采用独立样本 Kruskal-Wallis 检验,两两比较采用 Dunns 检验。采用受试者工作特征(ROC)曲线评价 HFLC 占白细胞比例(HFLC%)、HFLC 数量(HFLC#)诊断活动期 RA 效能。相关性采用 Pearson 相关分析。

2 结 果

2.1 各组 HFLC 指标比较 HC 组、ARA 组、SRA 组 HFLC# 分别为 $0.00(0\sim1.00)\times10^9/L$ 、 $1.00(0\sim2.00)\times10^9/L$ 、 $0.00(0\sim1.00)\times10^9/L$,3 组间差异有统计学意义($P<0.05$),HC 组和 SRA 组间差异无统计学意义($P>0.05$),但均显著低于 ARA 组水平($P<0.05$)。3 组 HFLC% 分别为 $0.00\%(0.00\%\sim0.14\%)$ 、 $0.10\%(0.00\%\sim0.22\%)$ 、 $0.00\%(0.00\%\sim0.13\%)$,其中 ARA 组明显高于 HC 组($P<0.05$),HC 组与 SRA 组差异无统计学意义($P>0.05$),见图 1。

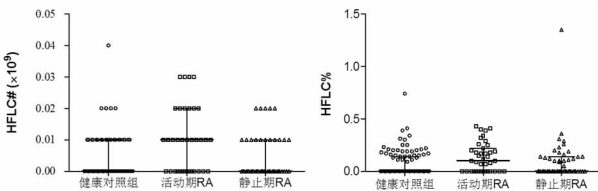


图 1 各组 HFLC 水平比较

2.2 ARA 组患者 HFLC 与常规免疫指标的相关性 ARA 组中 HFLC# 与 IgE、CRP 的相关系数分别为 0.503、0.352 ($P<0.05$);与 IgA、IgG、IgM、ASO、C3、C4 无相关性。HFLC% 与 RF 的相关系数为 0.659 ($P<0.05$);与 IgA、IgE、IgG、IgM、ASO(x)、C3、C4、CRP 无相关性($P>0.05$),见表 2。

2.3 HFLC 的诊断能力 对 ARA 组和 SRA 组分别作 HFLC# 与 HFLC% 的 ROC 曲线,曲线下面积分别为 0.637 ($P<0.05$)、0.632 ($P<0.05$)。当 HFLC# 界值为 0.005×10^9 时,灵敏度 63.10%,特异度 57.71%;当 HFLC% 界值为 0.14% 时,灵敏度为 46.15%,特异度为 78.85%,见图 2。

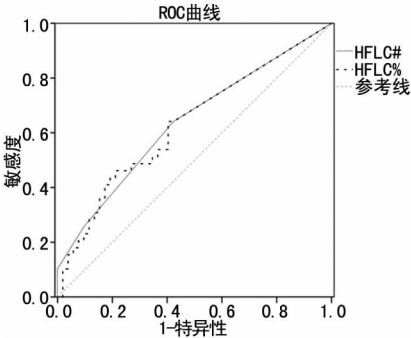


图 2 HFLC 诊断活动性 RA 的 ROC 曲线

表 2 HFLC 与实验室免疫学指标的相关性

		IgA	IgE	IgG	IgM	RF	ASO(x)	C3	C4	CRP
HFLC#	r	-0.003	0.503	-0.075	-0.300	-0.071	-0.167	0.028	-0.026	0.352
	P	0.990	0.017	0.740	0.187	0.698	0.353	0.903	0.910	0.045
HFLC%	r	0.381	0.086	0.096	0.344	0.659	-0.144	0.062	-0.034	0.223
	P	0.080	0.703	0.670	0.126	0.000	0.424	0.783	0.880	0.213

3 讨 论

RA 是一个以累及周围关节为主的多系统炎症性自身免疫性疾病,患者外周血中可见多种自身抗体(其中研究最多的为 RFs 和抗瓜氨酸蛋白抗体),体液免疫混乱是 RA 发病的重要环节之一,血清免疫球蛋白可以作为临床 RA 活动的指标。浆细胞是机体内唯一产生抗体的细胞,研究发现 Sysmex XE-5000 全自动血液分析仪的 HFLC 参数可以很好地反映外周血中浆细胞水平^[1,3],因此推测外周血 HFLC 水平应可以反映 RA 的活动。

本研究发现 ARA 组 HFLC# 和 HFLC% 水平明显高于 SRA 组和 HC 组,而两组间 HFLC 参数差异无统计学意义($P>0.05$),证实了上述推测。这主要表现为 RA 发作时,自身抗原刺激 B 淋巴细胞,使其增殖分化为浆细胞,而后分泌大量抗体,这些抗体与自身抗原结合,形成大量免疫复合物,沉积在骨关节、滑膜、血管壁等处,这些免疫复合物通过激活补体,而造成进一步的损伤,导致迁延不愈的滑膜炎和软骨破坏^[10]。本研究发现 HFLC 与免疫球蛋白相关性不好, HFLC# 只与 IgE 呈正相关,与 IgA、IgM 无相关性。这主要是因为浆细胞在体内有多重激活途径, HFLC 只能反映通过特定途径活化的浆细胞。研究发现产 IgG、IgA、IgE 的浆细胞或记忆浆细胞存在于淋巴滤泡中,形成生发中心^[11],因此不能被 HFLC 反映。而通过非 T 细胞依赖途径活化的浆细胞(主要产生 IgM)和一部分在淋巴滤泡外通过 T 细胞依赖途径活化的产 IgM 短寿浆细胞能够随淋巴液进入血液后到达远端部位^[12-13],故能够被 HFLC 反映。研究者发现 RF(针对自身 IgG 的自身抗体,绝大多数为 IgM)的产生可能最初通过 T 细胞依赖途径在淋巴结滤泡生发中心外产生^[14],其相应的浆细胞应能被 HFLC 反映^[15]。本研究发现 HFLC% 与 RF 呈正相关,可以从上述观点中得到支持。由于这些浆细胞反应均发生于机体对抗原刺激的早期,可见 HFLC 反映的是机体在 RA 发病早期的免疫活动。由于本研究纳入患者的 RA 活动度不同,病程进展不一致,因此大多数活动期患者体内浆细胞反应已处于 T 细胞依赖途径和 T 细胞非依赖途径对循环抗原的晚期反应^[1],故本研究中外周血 HFLC 参数与免疫球蛋白水平相关性不好,若想进一步研究二者关系则需对 RA 组患者进行严格筛选,确保均处于 RA 发作早期。本研究还发现 HFLC# 与反映 RA 发作的常规指标 CRP 相关,且 HFLC# 和 HFLC% 的 ROC 曲线下面积均大于 0.5,可见 HFLC 可以反映 RA 的发作,而 HFLC% 对 RA 发作的诊断又有较好的特异度。尽管本研究中两个 HFLC 参数对 RA 的诊断效能表现一般,但是由于 HFLC% 与 HFLC# 是血常规检测分析的检测参数,获取简便,无需额外的试剂成本,在排除患者感染和肿瘤的情况下可以反映体液免疫早期反应,对 RA 发作的判断有一定的临床价值。

随着流式技术与传统血常规分析技术的结合,现代血常规分析仪提供越来越丰富的细胞相关参数,但是其临床应用还停留在传统的分类计数模式当中,如何发掘这些新参数的临床价值,为临床疾病的诊疗提供更便捷、丰富的信息,应当成为检验工作者思考和解决的问题。本课题组首次将 HFLC 参数用于 RA 发作的评估研究当中,发现 HFLC% 与 HFLC# 可以反映

RA 的发作,虽然其诊断效能不高,但是由于这些参数获取经济、便捷,可以为 RA 发作的诊断提供新的观察指标,为指导下一步的检查和治疗提供帮助。

参考文献

- [1] Linssen J, Jennissen V, Hildmann J, et al. Identification and quantification of high fluorescence-stained lymphocytes as antibody synthesizing/secreting cells using the automated routine hematology analyzer XE-2100[J]. Cytometry B Clin Cytom, 2007, 72(3): 157-166.
- [2] Zimmermann M, Otto C, Gonzalez JB, et al. Cellular origin and diagnostic significance of high-fluorescent cells in cerebrospinal fluid detected by the XE-5000 hematology analyzer[J]. Int J Lab Hematol, 2013, 35(6): 580-588.
- [3] van Mirre E, Vrielink GJ, Tjon-a-Tsoi N, et al. Sensitivity and specificity of the high fluorescent lymphocyte count-gate on the Sysmex XE-5000 hematology analyzer for detection of peripheral plasma cells[J]. Clin Chem Lab Med, 2011, 49(4): 685-688.
- [4] 罗耀凌, 徐培光, 彭颂国, 等. 外周血 HFLC% 检测在快速诊断肿瘤患者败血症中的价值[J]. 中华医学杂志, 2013, 93(24): 1894-1896.
- [5] Arneth BM, Ragaller M, Hommel K, et al. Novel parameters of extended complete blood cell count under fluorescence flow cytometry in patients with sepsis[J]. J Clin Lab Anal, 2014, 28(2): 130-135.
- [6] Kunkel HG, Williams RC. Rheumatoid arthritis[J]. Annu Rev Med, 1964, 15(1): 37-52.
- [7] Gj T, Izquierdo JH, Cañas CA. B lymphocytes: development, tolerance, and their role in autoimmunity-focus on systemic lupus erythematosus[Z], 2013: 827254.
- [8] Bugatti S, Codullo V, Caporali R, et al. B cells in rheumatoid arthritis[J]. Autoimmun Rev, 2007, 6(7): 482-487.
- [9] 中华医学会风湿病学分会. 类风湿关节炎诊断及治疗指南[J]. 中华风湿病学杂志, 2010, 14(4): 265-270.
- [10] 罗孟兰. C 反应蛋白、红细胞沉降率及血清免疫球蛋白检测对类风湿性关节炎患者的临床价值[J]. 临床和实验医学杂志, 2012, 11(19): 1568-1569.
- [11] Vinuesa CG, Tangye SG, Moser B, et al. Follicular B helper T cells in antibody responses and autoimmunity[J]. Nat Rev Immunol, 2005, 5(11): 853-865.
- [12] Shapiro-Shelef M, Calame K. Regulation of plasma-cell development[J]. Nat Rev Immunol, 2005, 5(3): 230-242.
- [13] Martin F, Kearney JF. Marginal-zone B cells[J]. Nat Rev Immunol, 2002, 2(5): 323-335.
- [14] Herlands RA, Christensen SR, Sweet RA, et al. T cell-independent and toll-like receptor-dependent antigen-driven activation of autoreactive B cells[J]. Immunity, 2008, 29(2): 249-260.
- [15] Bugatti S, Vitolo B, Caporali R, et al. B cells in rheumatoid arthritis: from pathogenic players to disease biomarkers[Z], 2014: 681678.

(收稿日期: 2015-01-15)