

• 论 著 •

流式细胞仪检测 HLA-B27 在强直性脊柱炎筛查中的应用及分析*

卢峰¹, 上官莉娟², 陈涛¹, 王钢¹, 李甫罡¹, 罗志刚^{1△}, 郭晓兰¹

(简阳市人民医院: 1. 中心实验室; 2. 骨科, 四川简阳 641400)

摘要:目的 回顾性分析该院人类白细胞抗原(HLA)B27 的检测结果, 探讨其在强直性脊柱炎(AS)筛查中的应用价值。方法 采用多参数流式细胞仪对 2015 年 1 月至 2016 年 6 月于该院就诊的疑似 AS 的患者 1 335 例进行 HLA-B27 检测。1 335 例疑似 AS 患者中, 最终诊断为 AS 患者 201 例(AS 组), 1 134 例为风湿类风湿性关节炎等相关疾病患者(非 AS 组)。检测结果以 HLA-B27 的平均荧光强度和阳性淋巴细胞表达率表示。另外选取于该院体检中心体检的 120 例健康者作为对照组。结果 疑似 AS 患者 HLA-B27 筛查阳性率为 15.73%(210/1 335); 对照组 HLA-B27 筛查阳性率为 2.50%(3/120)。AS 组患者 HLA-B27 筛查阳性率、细胞表达率、平均荧光强度分别为 92.03%(185/201)、(85.34±17.99)%、8.74±4.20, 明显高于非 AS 组及对照组($P<0.01$)。对照组上述指标与非 AS 组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。HLA-B27 筛查阳性者主要集中在青少年期, 且男性的阳性率明显高于女性($P<0.05$)。结论 流式细胞术检测 HLA-B27 可为 AS 的诊断与鉴别诊断提供重要依据。

关键词: 流式细胞术; 强直性脊柱炎; 人类白细胞抗原

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2017.13.019

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2017)13-1779-03

The application and analysis of HLA-B27 in the screening of ankylosing spondylitis by flow cytometry*

LU Feng¹, SHANGGUAN Lijuan², CHEN Tao¹, WANG Gang¹, LI Fugang¹, LUO Zhigang^{1△}, GUO Xiaolan¹

(1. Central Laboratory; 2. Department of Orthopaedic Surgery, the People's Hospital of Jianyang City, Jianyang, Sichuan 641400, China)

Abstract: Objective To retrospectively analyse the detection results of human leukocyte antigen(HLA) B27, and discuss its diagnosis value in disease such as ankylosing spondylitis(AS). **Methods** HLA-B27 detection was performed on 1 335 suspected AS patients treated in the hospital from January 2015 to June 2016 by using multiparameter flow cytometry instrument. The test results showed 201 patients were diagnosed with AS(AS group), 1 134 patients were diagnosed with rheumatoid arthritis and other related diseases (non AS group). The test results were shown by using mean fluorescence intensity and positive lymphocyte expression rate. In addition, 120 healthy people were enrolled as the control group in the physical examination center of the hospital. **Results** The positive rate of HLA-B27 screening in suspected AS patients was 15.73% (210/1 335), and the positive rate of HLA-B27 screening in the control group was 2.50% (3/120). The positive rate of HLA-B27 screening, the rate of cell expression and the average fluorescence intensity of AS group were 92.03%(185/201), (85.34±17.99)%, 8.74±4.20, significantly higher than the non AS group and the control group($P<0.01$). There was no significant difference between the control group and the non AS group ($P>0.05$). HLA-B27 screening positive patients were mainly concentrated in adolescence, and the positive rate of male was higher than that of female ($P<0.05$). **Conclusion** Flow cytometry examination of HLA-B27 can provide important basis for the diagnosis and differential diagnosis of AS.

Key words: flow cytometry; ankylosing spondylitis; human leukocyte antigen

强直性脊柱炎(AS)多发于青少年, 我国发病率为 0.20%~0.45%, 男、女比例为 3:1~6:1^[1]。AS 是一种病因未明的慢性全身性疾病, 严重危害人体的骨骼系统, 主要表现为关节部位的疼痛及活动障碍, 可造成畸形、关节强直而丧失劳动力。该病诊断的直接证据是 X 线下脊柱的特征性变化及骶髂关节炎, 但是这种改变只有在疾病发展到一定程度时才能被发现。人类白细胞抗原(HLA)B27 是 HLA-B 位点上的一个重要的等位基因, 早在 1973 年, 国外研究证实 HLA-B27 抗原的表达与 AS 密切相关^[2], 而且这种相关是迄今已知的 HLA 与疾病的关联中是最强和最典型的。目前检测 HLA-B27 的方法有微量细胞毒法、酶联免疫吸附测定、流式细胞术、序列特异引物引导的 PCR 反应(PCR-SSP)等, 前两种方法敏感性、特异性都较差, 已逐渐被流式细胞术替代。本课题组利用流式细胞仪检测纳入研究者外周血淋巴细胞 HLA-B27 的

表达情况, 旨在探讨其在临床诊断中的价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 将 2015 年 1 月至 2016 年 6 月于本院进行 HLA-B27 检测的简阳地区各类人群共 1 335 例纳入本研究, 男 574 例、女 761 例, 平均年龄 45.9 岁。最终诊断为 AS 的患者 210 例(AS 组), 男 107 例、女 103 例, 平均年龄 36.5 岁; 1 134 例非 AS 患者作为非 AS 组。另外, 选取本院 120 例于体检中心体检的健康人员作为对照组, 男 76 例、女 44 例, 平均年龄 45.3 岁。

1.2 仪器与试剂 主要的仪器为美国贝克曼库尔特公司 FC500 流式细胞仪, 用于 HLA-B27 表达情况的检测; HLA-B27-FITC/HLA-B7-PE、IgG1-FITC/IgG1-PE、OPTILYSE C 溶血剂、鞘液等试剂均为美国贝克曼库尔特公司产品。

1.3 方法 于清晨采集空腹静脉血 2 mL, 乙二胺四乙酸二钾

* 基金项目: 2016 年四川省医学科研课题(S16034)。

作者简介: 卢峰, 男, 主管技师, 主要从事临床血液学与检验的研究。△ 通信作者, E-mail: 358424970@qq.com。

(EDTA-K₂) 抗凝。向测定管和同型对照管中各加入抗凝全血 50 μL, 测定管加入 10 μL HLA-B27-FITC/HLA-B7-PE 组合抗体进行标记, 对照管加入 10 μL IgG1-FITC/IgG1-PE 组合抗体进行标记。避光孵育 30 min, 向测定管和对照管中均加入 500 μL OPTILYSE C 溶血剂, 混匀, 避光孵育 30 min。向各管加入 4 mL PBS 混匀, 400×g 离心 5 min, 弃上清液, 以 500 μL PBS 混悬, 上流式细胞仪进行检测。记录淋巴细胞中 HLA-B27+/B7- 细胞的平均荧光强度和细胞表达率。HLA-B27+/B7- 占总淋巴细胞比例大于 60% 且平均荧光强度大于 5 判断为 HLA-B27 筛查阳性。

1.4 统计学处理 运用统计学软件 SPSS13.0 对数据进行处理, 计量资料采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 位差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 HLA-B27 的检测情况 1 335 例疑似 AS 患者中 HLA-B27 筛查阳性率为 15.73% (210/1 335), 男性中的阳性率为 18.64%, 女性中的阳性率为 13.53%, 男性 AS 的阳性率高于女性 ($P < 0.05$), 见表 1。

表 1 不同性别人群 HLA-B27 的筛查情况

性别	阳性(n)	阴性(n)	合计(n)	阳性率[% (n/n)]
男性	107	467	574	18.64(107/574)*
女性	103	658	761	13.53(103/761)
合计	210	1 125	1 335	15.73(210/1 335)

注: 与女性比较, * $P < 0.05$ 。

2.2 不同年龄人群 HLA-B27 的检测情况 0~<30 岁年龄段共筛查 246 例, 阳性率为 28.04% (69/246); 30~60 岁年龄段共筛查 840 例, 阳性率为 14.52% (122/840); >60 岁年龄段共筛查 249 例, 阳性率为 7.63% (19/249), 3 个年龄段间两两比较, 阳性率的差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 2。

表 2 HLA-B27 筛查结果与年龄的关系

年龄(岁)	n	阳性(n)	阳性率(%)
0~<30	246	69	28.04(69/246)*
30~60	840	122	14.52(122/840)*
>60	249	19	7.63(19/249)*
合计	1 335	210	15.73(210/1 335)

注: 与其他两个年龄段比较, * $P < 0.01$ 。

2.3 各组人群 HLA-B27 的检测情况 AS 组 HLA-B27 的细胞表达率及平均荧光强度均高于对照组及非 AS 组 ($P < 0.05$), 而对照组与非 AS 组之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 3。

表 3 各组人群的 HLA-B27 检测结果

组别	n	阳性(n)	阳性率(%)	细胞表达率(%)	平均荧光强度($\bar{x} \pm s$)
AS 组	201	185	92.03	85.34 ± 17.99*	8.74 ± 4.20
非 AS 组	1 134	25	2.20*	3.20 ± 7.55	0.60 ± 0.53*
对照组	120	3	2.50*	2.10 ± 4.20	0.41 ± 0.33*

注: 与 AS 组比较, * $P < 0.01$ 。

3 讨 论

HLA-B27 位于人体第 6 号染色体短臂上, 由 8 个外显子和 7 个内含子组成。是一种主要组织相容性复合体 I 类蛋白, 几乎表达于所有有核细胞表面, 特别是淋巴细胞表面。虽然目

前 HLA-B27 与 AS 的发病机制尚未最终明确, 但是其与 AS 的关联性早已经得到公认^[3]。AS 患者出现临床上所见的特征性骶髂关节炎和脊柱改变时, 疾病均非早期, 骶髂关节已经发生明确的局限性骨侵蚀、硬化, 病程已经进入中期, 治疗已经失去最佳的时机, 这也是造成 AS 高致残率的原因之一。早期 AS 发病隐匿症状多样, 容易漏诊或误诊。因此 HLA-B27 检测对 AS 进行早期诊断、治疗有非常重要的意义。

流式细胞仪检测 HLA-B27, 操作简便、快速、重复性好、标准化程度高, 无需分离单个核细胞, 标本用量少, 是目前最佳的检测方法。但是流式细胞仪检测 HLA-B27 有时会与其他 HLA 抗原(特别是 HLA-B7、HLA-B37)发生交叉反应, 对实验产生影响。有研究者采用 HLA-B27/B7 双色标记来排除这种干扰^[4]。本研究采用 HLA-B27 FITC/HLA-B7 PE 双荧光单克隆标记, 最大程度的避免 HLA-B27 单克隆抗体与其他 HLA-B 等位基因产物发生交叉反应。先在 FSC 和 SSC 散点图上圈定淋巴细胞群, 然后在 FITC 荧光通道和 PE 荧光通道组成的双荧光散点图上分析淋巴细胞表达 HLA-B27 FITC 和 HLA-B7 PE 情况, 来判断 HLA-B27 阴阳性。

本研究对本院 1 335 例疑似 AS 患者 HLA-B27 检测结果进行了回顾性分析, 结果显示 HLA-B27 阳性 210 例, 阳性率 15.73%, 远高于健康人群的阳性率(2.50%)。因此, 对疑似 AS 患者进行 HLA-B27 检测是很有必要的。而确诊为 AS 患者的 HLA-B27 阳性率为 92.03%, 明显高于非 AS 组与对照组 HLA-B27 阳性率, 与国内文献报道一致^[5-6]。这表明 HLA-B27 与 AS 高度相关。另外需要注意的是 201 例 AS 患者中有 16 例 HLA-B27 为阴性, 同样的 120 例健康者中也有 3 例 HLA-B27 阳性。所以 HLA-B27 检测不能完全替代 X 线检查作为确诊的证据。基于这种情况, 笔者认为若患者有腰骶髂关节疼痛症状, X 线检查阴性, 且 HLA-B27 检测阴性, 可基本排除 AS。若患者有腰骶髂关节疼痛症状, X 线检查阴性, 而 HLA-B27 检测阳性, 应引起高度重视, 患者可能处于强直性脊柱发病早期。疑似 AS 的患者中, 男性 HLA-B27 阳性率明显高于女 ($P < 0.05$), 提示 HLA-B27 阳性多见于男性。本次统计的 1 335 例疑似 AS 患者中, 0~<30 岁年龄段共检测 246 例, 阳性率为 [28.04% (69/246)], 高于其他年龄段检测者阳性率 ($P < 0.01$)。提示 HLA-B27 阳性主要集中在青少年期, 这与大多数文献报道的流行情况基本一致^[7-8]。

目前, 随着分子生物学技术的发展, HLA-B27 基因亚型的检测已经被逐步推广。有研究显示不同的 HLA-B27 基因亚型与 AS 的关联程度不同, 其中与 B* 2704 关联性最强, 其次是 B* 2705、B* 2702 和 B* 2707, 在中国人群中 81% 的 HLA-B27 阳性患者携带 B* 2704^[9-10]。这也为从 HLA-B27 基因亚型水平探讨强直性脊柱的发病机制奠定了基础。流式细胞仪检测淋巴细胞表面 HLA-B27 抗原表达情况, 相对于基因检测属于间接检测。在平时的工作中, 笔者也经常会遇到处于临界值跨门位置的 HLA-B27 抗原弱表达的标本, 这种情况结果的判断就存在难度。此时建议加做分子生物学检测以提高检测的准确性。

参考文献

[1] 林蔚, 肖平, 吴祖常. HLA-B27 抗原检测在强直性脊柱炎诊断中的意义[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(3): 371-372.
 [2] Brewerton DA, Hart FD. Ankylosing spondylitis and HLA-B27[J]. Lancet, 1973, 1(13): 904-907. (下转第 1783 页)

平关系发现, COPD 患者 TNF- α 、IL-6 水平明显高于健康人群, 这就提示 COPD 稳定期患者存在微炎症状态。

GOLD 分期是当前 COPD 患者评价的主要量表之一^[13-14], GOLD 分期根据患者肺功能结果进行分级, 本研究发现 GOLD 分级与患者 MEF25、MEF50、MEF25-75 具有较好的相关性, GOLD 分级越严重患者 FEV1/FVC、MEF25、MEF50、MEF25-75 越低, 可见 GOLD 分级是评价患者肺功能总体状态的良好指标^[15], 本研究进一步对比不同 GOLD 分级患者炎症因子水平及患者呼吸困难评分的程度, 结果发现 GOLD 分级越严重, 患者 TNF- α 、IL-6 炎症因子水平越高、呼吸困难评分越重。

本研究进一步分析了血清中炎症因子 TNF- α 、IL-6 水平与患者性别、年龄、病情程度及 GOLD 分级的关系, 结果发现 TNF- α 、IL-6 水平均与 GOLD 分级、症状评分及肺功能呈正相关, 这就意味着炎症因子可能参与 COPD 患者病情严重程度和结构异常的发展, 炎症因子水平与患者症状评分呈正相关, 可见炎症因子水平增高可能加重患者呼吸困难的进展, 在以后的临床工作中需要注意加强炎症因子水平的监测, 必要时可以给予药物进行抗炎治疗, 可能有助于延缓患者病情的发展。

综上所述, 目前 COPD 发病率高, 不同病情患者治疗方案不同, 血清中炎症因子 TNF- α 、IL-6 水平与 COPD 疾病分期、症状评分及患者肺功能均具有较好的相关性, 有助于评价 COPD 患者病情, 临床工作中监测 TNF- α 、IL-6 水平并及时进行临床干预, 可能有助于患者病情的控制。

参考文献

[1] 吴亮亮, 颜春松. 慢性阻塞性肺疾病并发症研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2016, 36(16): 4127-4130.
 [2] 付强, 况九龙, 施德全. C 反应蛋白在慢性阻塞性肺疾病急性加重期中的临床意义[J]. 国际呼吸杂志, 2009, 29(15): 897-900.
 [3] 史菲. 呼出气一氧化氮对哮喘-COPD 重叠综合征的诊疗价值[J]. 中华急诊医学杂志, 2015, 24(6): 634-638.
 [4] 李春芝, 刘洪英, 刘军肖. 慢性阻塞性肺疾病患者脂代谢和血清促血管生成素 2 水平与病情严重程度的关系[J].

中国全科医学, 2015, 18(34): 4210-4215.

[5] 陈兴无, 张丽琴. 临床指标与气道炎症标志物对预示 COPD 病情的意义[J]. 临床肺科杂志, 2007, 12(7): 712-714.
 [6] 中华医学会呼吸病学分会慢性阻塞性肺疾病学组. 慢性阻塞性肺疾病诊治指南(2013 年修订版)[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2013, 36(4): 255-264.
 [7] 熊国江, 吴俊宏, 吕伟, 等. 痰热清注射液对合并 COPD 肺癌患者围手术期 TNF- α 、IL-6、IL-8 和 IL-10 的影响[J]. 世界科学技术(中医药现代化), 2015, 17(10): 2083-2087.
 [8] 玉敏, 吕静, 杜俊凤, 等. 联合吸入噻托溴铵及沙美特罗替卡松对稳定期 COPD 患者血清炎症细胞因子及肺功能的影响迟[J]. 临床肺科杂志, 2013, 18(9): 1560-1562.
 [9] 梁蕊, 张薇, 金寿德, 等. 慢性阻塞性肺疾病中瘦素及白介素-6 的作用和意义[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2013, 47(5): 428-430.
 [10] 刘温娟, 梁蕊. COPD 患者血清 hs-CRP、TNF- α 和 IL-6 的检测及其与肺功能和生活质量的相关性研究[J]. 临床肺科杂志, 2013, 18(4): 616-617.
 [11] 郭式敦, 蒋庆贺. COPD 的炎症机制[J]. 山东医药, 2010, 50(27): 106-107.
 [12] 杨柳, 谢丽华, 孙圣华. 慢性阻塞性肺疾病全身炎症表型的特点[J]. 国际呼吸杂志, 2014, 34(5): 390-394.
 [13] 胡晓飞, 戴然然, 周敏, 等. GOLD 2011 对稳定期 COPD 患者病情评估和治疗选择的影响[J]. 国际呼吸杂志, 2014, 34(17): 1281-1285.
 [14] 任红岩, 陈正贤. 运动心肺功能与慢性阻塞性肺疾病严重程度相关性分析[J]. 临床肺科杂志, 2012, 17(4): 607-610.
 [15] 王亦军, 徐云, 张慎峰. 6 分钟步行试验与稳定期 COPD 分级相关性探讨[J]. 泰山医学院学报, 2014, 36(12): 1294-1295.

(收稿日期: 2017-02-12 修回日期: 2017-04-12)

(上接第 1780 页)

[3] 李维, 府伟灵. 强直性脊柱炎与 HLA-B27[J]. 国外医学临床生物化学与检验学分册, 2002, 23(5): 295-296.
 [4] Ulrich G. Use of flow cytometry for HLA B27 phenotyping: study of a HLA B7/HLA B27 double marker technique[J]. Allerg Immunol(Paris), 1997, 29(1): 11-14.
 [5] 胡庆宏, 易诚予, 彭燕, 等. 江西地区强直性脊柱炎与 HLA-B27 基因关联性[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(46): 9183-9186.
 [6] 刘毓刚, 李琳, 吴丽娟, 等. 流式细胞法检测人类白细胞抗原 B27/B7 表达在诊断强直性脊柱炎中的价值[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(2): 138-140.
 [7] 戴宇东, 孙启俊, 张益红, 等. 1 842 例疑似强直性脊柱炎患者 HLA-B27 抗原分型结果的分析[J]. 江苏医药,

2002, 28(6): 476-477.

[8] 罗奇志, 李立新, 孙科柱, 等. 湖南地区强直性脊柱炎与 HLA-B27 关联性的观察[J]. 实用预防医学, 2002, 9(3): 218-219.
 [9] Lin ZM, Bei JX, Shen MX, et al. A genome-wide association study in Han Chinese identifies new susceptibility loci for ankylosing spondylitis[J]. Nat Genet, 2012, 44(1): 73-104.
 [10] Downing J, Coates E, Street J, et al. A high-resolution polymerase chain reaction-sequence-specific primer HLA-B* 27 typing set and its application in routine HLA-B27 testing[J]. Genet Test, 2006, 10(2): 98-103.

(收稿日期: 2017-02-02 修回日期: 2017-04-02)