

荧光定量 PCR 染料法检测强直性脊柱炎患者 HLA-B27 基因及分型*

罗秀霞,尹志华,张春容,陈杰,叶志中[△],黄进贤

(深圳市福田区风湿病专科医院,广东深圳 518040)

摘要:目的 探讨荧光定量 PCR 染料法检测强直性脊柱炎(AS)患者人类白细胞抗原 B27(HLA-B27)基因及亚型的临床应用价值。方法 收集 2014 年 1 月至 2015 年 3 月深圳市福田区风湿病专科医院已确诊的强直性脊柱炎患者血液标本 43 例和体检健康者血液标本 56 例,采用流式细胞法检测 HLA-B27 基因,同时采用荧光定量 PCR 染料法检测 HLA-B27 基因及分型。结果 流式细胞法检测 43 例 AS 患者中 40 例阳性(93.02%),荧光定量 PCR 染料法检测 39 例阳性(90.70%),两者符合率为 97.50%。39 例 HLA-B27 者中 B2704 亚型者有 32 例(82.05%),B2705 亚型者有 7 例(17.95%)。结论 荧光定量 PCR 染料法检测 HLA-B27 基因准确率高,与流式细胞法有高度一致性,同时还能检测 HLA-B27 基因亚型,具有很好的临床推广价值和前景。

关键词:人类白细胞抗原 B27; 荧光定量 PCR 染料法; 流式细胞法; 强直性脊柱炎

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.13.005

中图法分类号:R593.23

文章编号:1673-4130(2018)13-1550-03

文献标识码:A

The detection of HLA-B27 gene and gene typing of ankylosing spondylitis patients by fluorescence PCR*

LUO Xiuxia, YIN Zhihua, ZHANG Chunrong, CHEN Jie, YE Zhizhong[△], HUANG Jinxian

(Shenzhen Futian Hospital for Rheumatic Diseases, Shenzhen, Guangdong 518040, China)

Abstract: **Objective** To investigate the clinical application value of fluorescence polymerase chain reaction (PCR) in the human leucocyte antigen-B27 (HLA-B27) gene and gene typing detection of ankylosing spondylitis (AS) patients. **Methods** A total of 43 clinical blood samples of AS and 56 samples of healthy controls were collected in Shenzhen Futian hospital for rheumatic diseases from January 2014 to March 2015. HLA-B27 gene was detected by flow cytometry. HLA-B27 gene and gene typing was also detected by the fluorescence PCR method. **Results** Among 43 samples, 40 samples were HLA-B27 positive (93.02%) by flow cytometry while 39 samples were HLA-B27 positive (90.70%) by fluorescence PCR. The total coincidence rate was 97.50%. Among 39 positive samples, 32 samples were HLA-B2704 positive (82.05%) and 7 samples were HLA-B2705 positive (17.95%). **Conclusion** The fluorescence PCR is an accurate method to detect HLA-B27 gene and presents high consistency with flow cytometry. It can also detect the HLA-B27 gene typing. It may have great clinical application value and prospects.

Key words: human leucocyte antigen-B27; fluorescence polymerase chain reaction; flow cytometry; ankylosing spondylitis

人类白细胞抗原 B27 (HLA-B27) 是 B 基因座编码的主要组织相容性复合体 I 类 (MHC I) 表面抗原, 位于第 6 染色体上。研究发现 HLA-B27 与强直性脊柱炎 (AS) 高度相关, 是迄今为止所知的与疾病相关性中最强的白细胞抗原。在世界不同地区, 约 90%~96% 的强直性脊柱炎患者携带 HLA-B27 基因^[2], 该病起病大多缓慢而隐匿, 当影像学检查出现痕迹确诊时, 患者病情已经发展到比较严重的阶段, 因此病程早期是治疗的关键期。临床检测 HLA-B27

为早期诊断疑似 AS 患者提供参考。本研究采用荧光定量 PCR 染料法检测 HLA-B27 基因及分型, 并与流式细胞术法进行比较, 探讨荧光定量 PCR 染料法检测 HLA-B27 基因及亚型的临床应用价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2014 年 1 月至 2015 年 3 月在深圳市福田区风湿病专科医院体检的健康者 56 例, 其中男 43 例, 女 13 例, 平均年龄 (40.28±10.21) 岁; 住院并已确诊的 AS 患者 43 例, 其中男 34 例, 女 9

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81102266、81301529); 广东省自然科学基金 (S2013040012296); 深圳市科技计划项目 (JCYJ20140416094256891); 福田区科技计划项目 (FTWS201308); 深圳市医疗卫生三名工程资助项目 (SZSM201602087)。

作者简介: 罗秀霞, 女, 主管技师, 主要从事自身免疫性疾病的实验室检查研究。 [△] 通信作者, E-mail: yezhizhong@126.com。

本文引用格式: 罗秀霞, 尹志华, 张春容, 等. 荧光定量 PCR 染料法检测强直性脊柱炎患者 HLA-B27 基因及分型[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(13): 1550-1552.

例,平均年龄(37.95±9.01)岁。根据修订的纽约标准(1984 年)进行 AS 诊断:(1)下腰背痛的病程至少持续 3 个月,疼痛随活动改善,但休息不减轻;(2)腰椎在前后和侧屈方向活动受限;(3)胸廓扩展范围小于同年龄和性别的正常值;(4)双侧骶髂关节炎Ⅱ~Ⅳ级,或单侧骶髂关节炎Ⅲ~Ⅳ级。如果患者具备(4)并分别附加(1)~(3)条中的任何 1 条可确诊为 AS。

1.2 仪器与试剂 流式细胞法检测 HLA-B27 基因采用美国 BD 公司生产的 FACS Calibur 流式细胞仪。HLA-B27 检测试剂盒(流式细胞法)[国食药监械(进)字 2010 第 3402056]购自美国 BD 公司。荧光定量 PCR 染料法检测 HLA-B27 基因及分型采用美国 ABI 公司生产的荧光定量 PCR 仪(7300 型),血液基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱法)购自天根(北京)生化技术有限公司;HLA-B27 基因分型测定试剂盒(荧光定量 PCR 染料法)[国食药监械(进)字 2013 第 3401564]购自天津市秀鹏生物技术开发有限公司。

1.3 方法

1.3.1 DNA 提取 取乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝血 300 μL,按试剂盒说明提取 DNA,DNA 产物-20 ℃保存备用。

1.3.2 荧光定量 PCR 染料法检测 HLA-B27 及分型 按试剂盒说明进行操作。PCR 循环参数:96 ℃ 2 min;96 ℃ 20 s,68 ℃ 60 s 共 5 个循环;96 ℃ 20 s,65 ℃ 50 s,72 ℃ 45 s 共 10 个循环;96 ℃ 20 s,63 ℃ 50 s,72 ℃ 45 s 共 15 个循环,72 ℃ 45 s 采集荧光;72 ℃ 2 min;最后加上一个 DNA 溶解曲线。按说明书进行结果判断。

1.3.3 流式细胞法检测 HLA-B27 在测定管中加入 30 μL 抗 HLA-B27 FITC/CD3 PE 抗体和 60 μL 抗凝血,混匀后室温避光染色 15 min;加入 2 mL 溶血素,2 000 r/min 离心 5 min 后弃上清,用磷酸盐缓冲液(PBS)洗两次后,再用 PBS 混悬后上机检测。上机获取细胞 15 000 个检测,结果使用 BD 公司专用 HLA-B27 分析软件进行分析。以 CD3-PE 标记的 T 淋巴细胞设门,检测门内细胞抗 HLA-B27 FITC 信号的平均荧光强度,并与参考值相比较,大于或等于此值判定为 HLA-B27 阳性,小于则为 HLA-B27 阴性。

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计学软件进行分析,根据资料类型采用 χ^2 检验进行统计分析, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 流式细胞检测结果 流式细胞检测结果显示 43 例 AS 患者中 40 例 HLA-B27 阳性(93.02%),3 例阴性;56 例健康体检者中 1 例阳性,55 例阴性。

2.2 荧光定量 PCR 染料法检测 AS 患者 HLA-B27 及其分型 荧光定量 PCR 染料法结果显示 43 例 AS 患者中 39 例 HLA-B27 阳性(90.70%),4 例阴性;56 例健康体检者全部阴性。39 例 HLA-B27 阳性者中,HLA-B2704 亚型的有 32 例(82.05%),HLA-B2705

亚型的有 7 例(17.95%),未检测出其他亚型。

2.3 两种方法检测 HLA-B27 的一致性 两种方法检测 HLA-B27,只有 1 例流式细胞法阳性,而荧光 PCR 法阴性,其余相同。以流式细胞法试剂盒检测结果作为参照,两种试剂盒阳性符合率为 97.50%(39/40),差异有统计学意义($\chi^2=31.444, P<0.05$),两种方法具有高度的一致性,见表 1。

表 1 两种方法检测 HLA-B27 比较(n)			
流式细胞法	荧光定量 PCR 染料法		合计
	阳性(+)	阴性(-)	
阳性(+)	39	1	40
阴性(-)	0	3	3
合计	39	4	43

2.4 两种方法灵敏度、特异度、阳性预测值和阴性预测值比较 流式细胞检测的灵敏度为 93.02%,特异度为 98.21%,阳性预测值为 97.56%,阴性预测值为 94.83%;荧光定量 PCR 染料法检测的灵敏度为 90.70%,特异度为 100.00%,阳性预测值为 100.00%,阴性预测值为 93.33%。两种方法差别不明显,见表 2。

表 2 两种检测方法的灵敏度、特异度、阳性预测值和阴性预测值(%)				
检测方法	灵敏度	特异度	阳性预测值	阴性预测值
流式细胞法	93.02	98.21	97.56	94.83
荧光定量 PCR 染料法	90.70	100.00	100.00	93.33

3 讨论

HLA-B27 是 HLA B 座上的一组重要等位基因,在免疫系统中主要负责细胞间的相互识别,诱导免疫反应和调节免疫应答。大量的研究证明 AS 与 HLA-B27 强相关^[1]。

目前,检测 HLA-B27 的方法主要有微量淋巴细胞毒试验检测法、流式细胞法、聚合酶链反应-序列特异性引物(PCR-SSP)法与荧光定量 PCR 染料法等^[2]。微量淋巴细胞毒试验检测法、流式细胞术法的检测对象是人类白细胞表面的 HLA-B27 抗原,其检测结果受细胞纯度、补体差异、单抗效价及 HLA 高度多态性的影响,并且会因抗体交叉性反应的影响而可能出现假阳性^[3],目前在临床上最常用的就是流式细胞法^[4-5]。PCR-SSP 法与荧光定量 PCR 等分子生物学检测方法具有特异度强、灵敏度高、稳定性好,标本可保存及可重复鉴定的特点^[6]。荧光定量 PCR 染料法因无需电泳而具有简单,快速的优势;并且试验中不需要取出 PCR 产物,因此可防止 PCR 产物污染^[7]。

本研究采用了流式细胞法和荧光定量 PCR 染料法同时对已经确诊的 AS 患者进行检测,结果流式细胞法的阳性率为 93.02%(40/43),而荧光定量 PCR 染料法的阳性率为 90.70%(39/43),两种方法阳性符合率达到 97.50%,具有高度的一致性,这与侯伟等^[8]、白世杰等^[9]、刘巧灵等^[10]及叶阿里等^[11]的结果

相似。

人类白细胞抗原是已知人类最复杂的显性多态遗传系统,近年来随着基因分型技术的发展,证实 HLA-B27 不是单一抗原,而是由多种等位基因所构成的亚型构成,现已确定有 44 个等位基因,这些亚型存在着人种和地区的差异,同时不同的亚型虽然可能只相差 1 个或几个氨基酸,但却显示出对 AS 的易感性和抗性,因此对疑似 AS 患者进行 HLA-B27 分型检测,有助于 AS 的诊断和鉴别诊断。本研究对 39 例 HLA-B27 阳性标本检测结果显示 HLA-B2704 亚型占 82.05%,HLA-B2705 亚型占 17.95%。国内不同地区(包括湖南、上海、陕西、四川)^[12-15]的相关报道结果均显示 AS 患者 HLA-B27 的亚型以 B2704 和 B2705 为主,其中 B2704 占大多数;而山东地区 HLA-B2705 亚型占 63.33%,HLA-B2704 占 36.67%^[16];内蒙古地区 HLA-B2705 亚型占 49.40%,HLA-B2704 占 44.50%^[9];有可能存在南北地区的差异。而深圳地区外来人口很多,大多数来自中国南方地区,因此本研究结果与上述的 4 个南方地区的结果相符,主要以 HLA-B2704 为主。由于本研究的样本数太少,临床资料不是很全,未进行亚型与临床特征的相关性分析,根据已有的研究暂未发现亚型与临床特征如病程、活动度、分期等有明显的相关性。

4 结 论

荧光定量 PCR 染料法和流式细胞法都是检测 HLA-B27 的好方法,特异度好、准确度高。相比之下,荧光定量 PCR 染料法还具有设备通用性强,对样本要求低,制备简单,高通量等特点,加上还能同时进行分型检测,因此具有很好的临床推广价值和应用前景。

参考文献

[1] ROSTOM S, DOUGADOS M, GOSSEC L, et al. New tools for diagnosing spondyloarthritis [J]. J Int Bone Spine, 2010, 77(2): 108-114.

[2] 杨霄鹏, 惠玲. 人类白细胞抗原 B27 的实验室诊断[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2015, 7(4): 276-279.

[3] 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.

[4] 洪俊, 饶永彩. 流式 HLA-B27 测定法在强直性脊柱炎诊断中的临床价值[J]. 职业与健康, 2012, 28(6): 693-695.

[5] 卢峰, 上官莉娟, 陈涛, 等. 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[J]. 国际检验医学杂志, 2017, 38(13): 1779-1783.

[6] DUANQ M, PUAPAIROJ C, ROMPHRUK A, et al. HLA-B * 27 subtypes in Northern and Northeastern Thais, Karens, and Bamars determined by a high-resolution PCR-SSP technique [J]. Tissue Antigens, 2009, 73(6): 590-594.

[7] 闻海丰, 冯忠军, 韩文龙, 等. 实时荧光聚合酶链反应熔解曲线检测人类白细胞抗原 B27 方法建立及评价[J]. 临床荟萃, 2015, 30(6): 674-676.

[8] 侯伟, 许晓东. 2 种 HLA-B27 检测方法在强直性脊柱炎诊断中的比较[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(24): 3398-3400.

[9] 白世杰, 托娅, 张保平, 等. 流式细胞术与 PCR-SSP 法检测 HLA-B27 的对比及 HLA-B27 亚型的研究[J]. 检验医学与临床, 2016, 13(5): 586-587.

[10] 刘巧灵, 范春梅, 苏丽丽. HLA-B27 抗原检测与基因检测在强直性脊柱炎诊断中的应用[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2017, 33(6): 826-828.

[11] 叶阿里, 窦亚玲, 孔令君, 等. 实时荧光 PCR 法和流式细胞术检测 HLA-B27 的结果分析[J]. 国际检验医学杂志, 2017, 38(7): 892-894.

[12] MA H J, HU F P. Diversity of human leukocyte antigen-B27 alleles in Han population of Hunan province, southern China[J]. Tissue Antigens, 2006, 68(2): 163-166.

[13] 汪薇, 李志强. HLA-B * 27 基因亚型与强直性脊柱炎临床特征的相关性[J]. 临床输血与检验, 2010, 12(1): 31-35.

[14] 王华, 甄拴平, 党丽君, 等. 强直性脊柱炎与 HLA-B27 基因亚型的相关性研究[J]. 国际检验医学杂志, 2016, 37(14): 1954-1956.

[15] 黄波, 万小涛, 张有辉. 强直性脊柱炎患者 HLA-B27 及基因亚型检测分析[J]. 检验医学与临床, 2016, 13(21): 3052-3053.

[16] 宋永红, 李文超, 吕红娟, 等. 山东地区强直性脊柱炎患者 HLA-B27 基因高分辨分型结果分析[J]. 现代检验医学杂志, 2007, 22(2): 66-67.

(收稿日期: 2017-11-21 修回日期: 2018-02-22)

(上接第 1549 页)

[7] LIN C, ZHANG Z, XU Y, et al. High tumor vascular endothelial growth factor expression is associated with poorer clinical outcomes in resected T3 gastric adenocarcinoma[J]. Am J Clin Pathol, 2016, 146(3): 278-288.

[8] BLAKE S J, TENG M W. Role of IL-17 and IL-22 in autoimmunity and cancer[J]. Acta Dermo, 2014, 105 (Suppl 1): 41-50.

[9] JIA L, WU C. The biology and functions of Th22 cells [J]. Adv Exp Med Biol, 2014, 841(1): 209-230.

[10] 张轶, 李晓英, 师雷锋. 白细胞介素 22 在疾病中的作用

[J]. 免疫学杂志, 2017, 8(1): 711-716.

[11] SAALIM M, RESHAM S, MANZOOR S, et al. IL-22: a promising candidate to inhibit viral-induced liver disease progression and hepatocellular carcinoma[J]. Tumour Biol, 2016, 37(1): 105-114.

[12] YANG X, ZHENG S G. Interleukin-22: a likely target for treatment of autoimmune diseases[J]. Autoimmun Rev, 2014, 13(6): 615-620.

(收稿日期: 2017-11-21 修回日期: 2018-02-22)