

论著 · 临床研究

脑脊液寡克隆区带及鞘内 IgG 合成相关指标分析 在多发性硬化症诊断中的应用

陈柯霖, 张雪, 李国歌, 康熙雄, 张国军[△]

(首都医科大学附属北京天坛医院检验科/北京市免疫试剂临床工程技术研究中心, 北京 100050)

摘要:目的 探讨脑脊液特异寡克隆区带(CSF-OCB)及鞘内免疫球蛋白 G(IgG)合成相关指标分析在多发性硬化(MS)诊断中的意义。方法 回顾性分析 2014 年 1 月至 2017 年 12 月于北京天坛医院确诊的 77 例 MS 患者的临床资料, 并选取同期非 MS 患者 493 例为对照组, 包括视神经脊髓炎(NMO) 97 例(NMO 组), 格林巴利综合征(GBS) 67 例(GBS 组), 神经系统炎性疾病(NID) 86 例(NID 组), 神经系统非炎性疾病(NIND) 243 例(NIND 组)。采用琼脂糖凝胶等电聚焦法测定 CSF-OCB, 速率散射比浊法定量检测 IgG 和清蛋白(Alb), 利用公式计算 IgG 指数、24 h IgG 合成率, 并分析上述相关指标对 MS 的诊断意义。结果 MS 组 CSF-OCB 阳性率明显高于对照组各组, 差异均有统计学意义($P < 0.01$)。MS 组与 NMO 组、NID 组、NIND 组 IgG 指数比较, 差异均有统计学意义($P_1 < 0.01$)。MS 组与 NMO 组及 NIND 组 24 h IgG 合成率比较, 差异均有统计学意义($P < 0.01$)。结论 CSF-OCB、IgG 指数、24 h IgG 合成率测定, 尤其是明确 CSF-OCB, 对 MS 的诊断和鉴别诊断具有重要临床意义。

关键词:多发性硬化; 寡克隆区带; 脑脊液; 免疫球蛋白 G; IgG 指数; 24 h IgG 合成率

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.23.007

中图法分类号:R446.6; R744.5+1

文章编号:1673-4130(2018)23-2873-04

文献标识码:A

Clinical significance of CSF-OCB and intrathecal IgG synthesis related indicators in multiple sclerosis

CHEN Kelin, ZHANG Xue, LI Guoge, KANG Xixiong, ZHANG Guojun[△]

(Department of Clinical Laboratory, Beijing Tiantan Hospital Affiliated to Capital Medical University/Beijing Immunology and Clinical Engineering Technology Research Center, Beijing 100050, China)

Abstract: Objective To investigate the clinical significances of oligoclonal band (OCB) and intrathecal immunoglobulin G (IgG) synthesis related indicators in patients with multiple sclerosis (MS). **Methods** The clinical data of 77 patients with multiple sclerosis confirmed by Beijing Tiantan Hospital from January 2014 to December 2017 were analyzed retrospectively. 493 cases of non-multiple sclerosis during the same period were selected as the control group including 97 cases of Neuromyelitis Optica (NMO), 67 cases of Guillain-Barre syndrome (GBS), 86 cases of neurological inflammatory disease (NID) and 243 cases of neurological non-inflammatory disease (NIND). CSF-OCB was measured by agarose gel isoelectric focusing, and levels of IgG and albumin (Alb) were quantitatively detected by rate scattering turbidimetry. The IgG index and 24 h IgG synthesis rate were calculated by using the formula, and the diagnostic significance of the above related indicators for MS was analyzed. **Results** The positive rate of CSF-OCB in MS group was significantly higher than that in control group ($P < 0.05$). There was a statistically significant difference in IgG index between MS group and NMO group, NID group and NIND group ($P_1 < 0.05$). There was a statistical difference in the 24 h IgG synthesis rate between MS group and NMO group and NIND group ($P_2 < 0.05$). **Conclusion** The determinations of CSF-OCB, IgG index and 24 h IgG synthesis rate, especially the determination of CSF-OCB, have important clinical significance in the diagnosis and differential diagnosis of MS.

Key words:multiple sclerosis; oligoclonal bands; cerebrospinal fluid; immunoglobulin G; IgG index; 24 h IgG synthesis rate

多发性硬化(MS)是以中枢神经系统(CNS)白质炎性脱髓鞘病变为主要病理特点的自身免疫性疾病,

由免疫细胞浸润到 CNS, 攻击保护性髓鞘, 引起局部炎症和脱髓鞘反应。主要临床特点为 CNS 白质散在

作者简介: 陈柯霖, 女, 主治医师, 主要从事分子生物学研究。 △ 通信作者, E-mail: tiantanzj@163.com。

本文引用格式: 陈柯霖, 张雪, 李国歌, 等. 脑脊液寡克隆区带及鞘内 IgG 合成相关指标分析在多发性硬化症诊断中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(23): 2873-2875.

分布的多病灶与病程中呈现的缓解复发,症状和体征的空间多发性和病程的时间多发性^[1],其特征是丧失运动和感觉功能^[2]。临床多以急性或亚急性起病,肢体无力最多见,约50%的患者首发症状包括一个或多个肢体无力,首次发病后可有一定时间的缓解期,再复发可为原有症状也可出现新的症状,病情大多呈阶梯式进展。因其临床表现具有多样化,影像学检查呈现多样性,且没有特异的生物标志物,容易误诊,导致较高的致残率,因此,提高早期诊断可延缓病程进展^[3]。目前,MS的诊断常依靠临床特点与影像学检查,但其无法在早期与其他CNS疾病鉴别。

脑脊液(CSF)是存在于脑室及蛛网膜下腔和脊髓中央管内的一种无色透明液体,由脑室中的脉络丛产生,为CNS稳定的内环境提供保障,血脑屏障是指脑毛细血管壁与神经胶质细胞形成的血浆与脑细胞之间的屏障及由脉络丛形成的血浆和CSF之间的屏障,能够阻止某些物质由血液进入脑组织,对维持CNS正常生理状态具有重要的生物学意义。在正常情况下,由于血脑屏障的存在,CNS不直接接触抗原,同时缺少免疫活性细胞,造成CNS的免疫“特免状态”。当CNS发生炎症、感染、肿瘤、出血等使血脑屏障破坏,导致其通透性增加,使CSF成分随之发生改变^[4]。在病理免疫情况下,几个克隆株浆细胞异常增生,合成的免疫球蛋白(Ig)在电泳时在γ球蛋白区域形成几条比较狭窄且不均匀的不连续条带,称为寡克隆区带(OCB),仅在CSF中存在的特异性OCB的出现,提示CNS内存在体液免疫反应,是判定鞘内IgG合成的定性指标,为MS的早期诊断提供了重要的实验室依据。据报道,在MS患者中,95%以上都会出现脑脊液特异寡克隆区带(CSF-OCB),可见CSF-OCB检测对于MS诊断具有重要意义^[5];另外,IgG指数和24 h IgG合成率是反映鞘内合成增加的有效指标。因此,本研究拟总结近年来在北京天坛医院确诊的MS患者的临床特点和实验室指标,回顾性研究CSF-OCB及IgG指数、24 h IgG合成率对MS的诊断价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取2014年1月至2017年12月在北京天坛医院确诊的77例MS患者的CSF及血清标本,其中男28例,女49例,男女比例为1:1.75;平均年龄35.6岁。同时选取同期非MS患者为对照组,包括视神经脊髓炎(NMO)患者97例(NMO组),其中男28例,女69例,男女比例为0.41:1,平均年龄39.8岁;格林巴利综合征(GBS)患者67例(GBS组),其中男43例,女24例,男女比例为1.79:1,平均年龄46.4岁;神经系统炎性疾病(NID)患者86例(NID组),其中男56例,女30例,男女比例为1.87:1,平均年龄39.3岁;神经系统非炎性疾病(NIND)患者243例(NIND组),其中男130例,女113例,男女比例为1.15:1,平均年龄39.6岁。

1.2 方法

1.2.1 资料分析 回顾性分析77例MS患者的病历资料,对所有病例进行归纳总结,分析患者的一般情况(性别、年龄、起病形式)、临床表现(诱因、首发症状、神经系统症状和体征、病变部位)、辅助检查结果等。

1.2.2 检测指标 收集患者肘静脉血5 mL,通过离心分离血清,同时行常规腰椎穿刺,留取CSF标本2 mL。使用法国Sebia HYDRASYS蛋白电泳仪,通过琼脂糖凝胶等电聚焦电泳检测CSF中的特异OCB,其阳性判断标准为出现2条或2条以上分开的、较狭窄、不均一、不连续的仅见于CSF而未见于血清当中的清晰蛋白区带;使用德灵BN II全自动蛋白分析仪,通过速率散射比浊法对血清和CSF中的Alb和IgG进行定量检测,按照公式计算IgG指数和24 h IgG合成率。

1.3 统计学处理 应用SPSS17.0统计软件进行数据分析,计量资料非正态分布以中位数表示,采用秩和检验;计数资料以率表示,采用χ²检验;以P<0.05为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 MS组患者临床资料和辅助检查结果回顾性分析

2.1.1 年龄分布 77例MS患者中男28例(36.4%),女49例(63.6%),男女比例为1:1.75;年龄6~72岁,平均35.6岁,其中0~17岁3例(3.9%),>17~30岁23例(29.9%),>30~40岁23例(29.9%),>40~50岁17例(22.1%),>50~60岁6例(7.8%),>60~70岁3例(3.9%),>70岁2例(2.6%)。

2.1.2 发病诱因 首次发作前存在明确诱因共21例(27.3%),以感冒、受凉和疲劳为主,其中感冒9例(11.7%),受凉5例(6.5%),疲劳3例(3.9%),食用不洁、食后恶心呕吐3例(3.9%),左耳发热感、无疼痛、异常分泌物及听力下降1例(1.3%);无明显诱因56例(72.7%)。

2.1.3 起病形式 急性起病(病情1周内达高峰)32例,亚急性起病(病情1周至1个月内达高峰)29例,慢性起病(病情1个月以上达高峰)16例。

2.1.4 病程 具有2次或2次以上发作者61例,男21例,女40例。

2.1.5 首发症状 以一个或多个肢体无力、麻木或视力障碍为首发症状。肢体麻木21例(27.2%),肢体无力18例(23.4%),肢体麻木并无力14例(18.2%),视物不清7例(9.1%),头晕5例(6.5%),视物成双2例(2.6%),呕吐2例(2.6%),下肢发热2例(2.6%),表达不能1例(1.3%),肢体抽搐1例(1.3%),温度觉丧失1例(1.3%),拇指针刺感1例(1.3%),肩部疼痛1例(1.3%),昏厥1例(1.3%)。

2.1.6 辅助检查 本研究77例MS患者均进行OCB检测,其中阳性56例(72.7%),阴性21例(27.3%)。77例患者均行磁共振成像(MRI)检测,异

常例数为 68 例(88.3%),其中头部 MRI 异常 38 例(49.4%),累及脊髓(颈髓和胸髓)64 例(83.1%)。

2.2 各组 CSF-OCB 阳性率比较 本研究中 OCB 阳性率 MS 组为 72.7%, NMO 组为 44.4%, GBS 组为 9.0%, NID 组为 38.4%, NIND 组为 20.6%, MS 组 OCB 阳性率与对照组各组比较, 差异均有统计学意义($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 各组 CSF-OCB 阳性率比较

组别	n	OCB 阳性[n(%)]	χ^2	P
MS 组	77	56(72.7)		
NMO 组	97	43(44.3)	14.115	<0.001
GBS 组	67	6(9.0)	59.427	<0.001
NID 组	86	33(38.4)	19.344	<0.001
NIND 组	243	50(20.6)	71.789	<0.001

注: 表中 χ^2 值、P 值是与 MS 组比较所得数据

2.3 各组 CSF IgG 指数、24 h IgG 合成率比较 NMO、GBS、NID、NIND 患者 IgG 指数中位数 < 0.7 , 提示鞘内没有 IgG 合成; MS 组 IgG 指数 > 0.7 , 与 NMO、NID、NIND 组比较, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。MS 患者 24 h IgG 合成率(33.8%)高于 NMO 组(18.6%)和 NIND 组(16.9%), 差异有统计学意义($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 各组 IgG 指数、24 h IgG 合成率比较

组别	n	IgG 指数		24 h IgG 合成	
		中位数	P	[n(%)]	P
MS 组	77	0.76		26(33.8)	
NMO 组	97	0.53	0.000	18(18.6)	0.002
GBS 组	67	0.57	0.097	33(49.3)	0.111
NID 组	86	0.51	0.003	21(24.4)	0.250
NIND 组	243	0.52	0.000	41(16.9)	0.000

2.4 诊断指标的多因素 Logistic 回归分析在 MS 中的诊断价值 将单因素分析有统计学差异的诊断指标进行多因素 Logistic 回归分析显示, MS 组与 NMO 组和 NIND 组 CSF-OCB、IgG 指数及 24 h IgG 合成率比较, 只有 CSF-OCB 的差异有统计学意义($P < 0.01$), 提示 CSF-OCB 可以作为 MS 的独立诊断指标。见表 3。

表 3 诊断指标的多因素 Logistic 回归分析在 MS 中的诊断价值

组别	诊断指标	95%CI	P
MS 组与 NMO 组	CSF-OCB	0.177~0.674	0.002
	IgG 指数	0.313~2.446	0.800
	24 h IgG 合成率	0.208~1.647	0.310
MS 组与 NIND 组	CSF-OCB	0.054~0.187	0.000
	IgG 指数	0.621~4.182	0.327
	24 h IgG 合成率	0.166~1.127	0.086

3 讨 论

MS 是一种以 CNS 脱髓鞘病变(斑块)为特征的慢性炎性脱髓鞘疾病。许多证据表明, MS 的发病机制包括外周免疫系统的激活及免疫细胞和抗体进入 CNS^[6]。以往研究认为, 纬度与 MS 患病率呈正相关

趋势。我国应是 MS 低发区域, 但随着对 MS 诊断技术的逐步提高, 目前发现的病例数明显增多。近年文献报道, 全国各地 MS 发病率逐年增高, 我国 MS 并不属于少见疾病^[7]。

本研究对北京天坛医院 77 例 MS 患者的临床特点进行了回顾性分析。据文献报道, MS 主要影响年龄在 20~45 岁的年轻人, 在女性中更为普遍, 性别比例随地理区域的不同而变化, 为 2:1~3:1^[8]。本研究发病年龄为 6~72 岁, 以 18~49 岁居多, 男女比例为 1:1.75, 与国内外文献报道一致^[9]。起病方式以急性、亚急性为主, 首发症状以肢体麻木无力为最常见。本研究的患者全部行 MRI 检查, 其中异常 68 例(88.3%), 脊髓和大脑半球发病率基本接近, 脊髓发病以颈髓和胸髓多见, 与国内报道相近^[10]。

目前公认的对 MS 诊断具有重要意义的辅助检查包括 CSF 检查、诱发电位和 MRI 等, 其中 CSF 中特异性寡克隆 IgG 区带是诊断 MS 一项重要的常规检查。在 McDonald 多发性硬化诊断标准(2010 年修订版本)中^[11], 将 CSF-OCB 阳性[等电聚焦电泳证据有寡克隆区带和(或)IgG 指数增高]作为诊断 MS 的重要实验室附加依据。CSF-OCB 作为 MS 常见的免疫学异常表现, 是神经影像学检查所不可替代的诊断 MS 有意义的辅助检查, 并且对判断 MS 的疾病严重程度、疾病进程、病灶是否处于活动期等具有重要临床意义, 在欧洲人群中, MS 患者阳性率为 48%~100%^[12], 而亚洲人群报道的诊断敏感性低得多(7%~63%), 包括来自中国、日本的患者^[13]。本研究 2014—2017 年间确诊的 77 例 MS 患者中 CSF-OCB 阳性率为 72.7%, 明显高于 NMO 组、GBS 组、NID 组和 NIND 组, 说明 CSF-OCB 对 MS 的诊断和鉴别诊断具有重要参考价值。

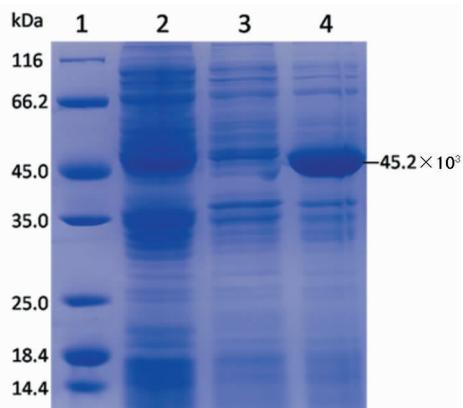
目前除外 CSF-OCB, 与鞘内 IgG 合成相关的实验室指标为 IgG 指数和 24 h IgG 合成率, 它们是反映鞘内异常体液免疫的常用指标, 可用作鞘内 Ig 合成的定量检测^[14]。考虑到血脑屏障的作用, 通过计算 IgG 指数和 24 h IgG 合成率摒除了血脑屏障受损血清 IgG 对 CSF 中 IgG 水平的影响, 能够真正反映内源性 IgG 的合成, 故可定量评价鞘内 IgG 合成情况, 进而推测是否存在有 CNS 的体液免疫应答, 评价其免疫功能状态^[15]。本研究中 MS 组 IgG 指数、24 h IgG 合成率明显高于 NMO 和 NIND 组, 说明有鞘内 Ig 的合成。

4 结 论

通过对 CSF 中 OCB、IgG 指数、24 h IgG 合成率等免疫指标的检测可以了解 CNS 疾病的免疫情况, 对于 MS 的诊断、鉴别诊断具有重要临床意义。

参 考 文 献

- [1] 邓雪梅, 苏全喜, 危智盛, 等. 多发性硬化中 T 淋巴细胞的作用及雌激素对其影响的研究进展[J]. 中国免疫学杂志, 2013, 29(8): 885~888. (下转第 2888 页)



注:1. 蛋白质分子量标准;2. 诱导的空载体对照;3. 未诱导总蛋白;
4. 诱导后总蛋白

图3 APE 重组蛋白的 SDS-PAGE 分析

3 讨 论

提取金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 基因组之前本研究先采用全自动细菌鉴定及药敏分析系统鉴定确认菌种,确保挑选到的是金黄色葡萄球菌菌落,避免挑到可能存在的杂菌菌落。为使金黄色葡萄球菌的生化反应更加典型,在鉴定前采用血平板进行培养。通过鉴定,确认菌种后再抽提基因组 DNA。以提取到的基因组 DNA 作为模板进行 PCR 反应,成功获得了 687 bp 的基因扩增产物。

APE 基因两端 A、T 含量较高,所以,本研究设计了较长的引物,上、下游引物均为 36 nt, Tm 值在 50 ℃以上,有效避免了杂带的产生,获得了理想的扩增产物。

质粒小量抽提试剂盒提取的质粒 DNA 浓度较低,对重组表达质粒 pET-32a(+) -APE 进行双酶切鉴定时 5 900 bp 的 pET-32a(+) 线性片段在琼脂糖凝胶中的条带较为明显,而只有 670 bp 左右的插入片段的条带,其亮度只有 pET-32a(+) 条带的 1/10 左右,常规检测方法看不到该条带。本研究对抽提到的重组质粒采用常规乙醇沉淀方法加以浓缩,双酶切鉴定时才显示了两条带。

不同种类的细菌其 N-乙酰甘露糖胺-6-磷酸 2-异构酶存在差异,弄清该异构酶的保守结构对研发新的药物具有积极意义^[10-12]。由于缺乏关于该酶结构的相关文献,目前还很难预测参与催化的残基^[13-15]。本研究克隆了 N-乙酰甘露糖胺-6-磷酸 2-异构酶基因并成功表达了融合蛋白,且目的蛋白占菌体总蛋白量的一半以上。为进一步研究 APE,开发以 APE 为靶点的新型抗感染药物奠定了一定基础。

参考文献

- [1] 钱鑫,谢娟.耐万古霉素金黄色葡萄球菌的研究进展[J].中国医院药学杂志,2014,34(15):1314-1319.
- [2] FOSTER TJ. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Current status and future prospects[J]. FEMS Microbiol Rev, 2017, 41(3): 430-449.
- [3] Mangasuli SN, Hosamani KM, Devarajegowda HC, et al. Synthesis of coumarin-theophylline hybrids as a new class of anti-tubercular and anti-microbial agents[J]. Eur J Med Chem, 2018, 146: 747-756.
- [4] ASSIS LM, NEDELJKOVIC M, DESSEN A. New strategies for targeting and treatment of multi-drug resistant *Staphylococcus aureus* [J]. Drug Resistance Updates, 2017, 31: 1-14.
- [5] KOCH G, WERMER C, ACOSTA I C, et al. Attenuating *staphylococcus aureus* virulence by targeting flotillin protein scaffold activity[J]. Cell Chem Biol, 2017, 24(7): 845-857.
- [6] VIMR ER, KALIVODA KA, DESZO EL, et al. Diversity of microbial sialic acid metabolism[J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2004, 68(1): 132-153.
- [7] BLUNDELL PA, LE NPL, ALLEN J, et al. Engineering the fragment crystallizable (Fc) region of human IgG1 multimers and monomers to fine-tune interactions with sialic acid-dependent receptors[J]. J Biol Chem, 2017, 292(31): 12994-13007.
- [8] OLSON ME, KING JM, YAHR TL. Sialic acid catabolism in *Staphylococcus aureus*[J]. J Bacteriol, 2013, 195(8): 1779-1788.
- [9] SIEGEL SJ, ROCHE AM, WEISER JN. Influenza promotes pneumococcal growth during coinfection by providing host sialylated substrates as a nutrient source[J]. Cell Host Microbe, 2014, 16(1): 55-67.
- [10] NORTH RA, KESSANS SA, GRIFFIN MD, et al. Cloning, expression, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of N-acetylmannosamine-6-phosphate 2-epimerase from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. Acta Crystallogr F Struct Biol Commun, 2014, 70(Pt 5): 650-655.
- [11] ITO S. Features and applications of microbial sugar epimerases[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2009, 84 (6): 1053-1060.
- [12] STEENBERGEN S M, LICHTENSTEIGER C A, CAUGHLAN R, et al. Sialic acid metabolism and systemic pasteurellosis[J]. Infect Immun, 2005, 73(3): 1284-1294.
- [13] HWANG J, KIM BS, JANG SY, et al. Structural insights into the regulation of sialic acid catabolism by the *Vibrio vulnificus* transcriptional repressor NanR[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110(30): E2829-2837.
- [14] GARRON ML, CYGLER M. Structural and mechanistic classification of uronic acid-containing polysaccharide lyases [J]. Glycobiology, 2010, 20(12): 1547-1573.
- [15] FUJIWARA T, SABURI W, MATSUI H, et al. Structural insights into the epimerization of β-1,4-linked oligosaccharides catalyzed by cellobiose 2-epimerase, the sole enzyme epimerizing non-anomeric hydroxyl groups of unmodified sugars[J]. J Biol Chem, 2014, 289 (6): 3405-3415.