

• 论 著 •

联合检测 AchR-Ab 和抗横纹肌抗体对重症肌无力的诊断价值*

韩 波, 朱思绮, 朱敬轩, 张 程

辽宁中医药大学附属医院检验科, 辽宁沈阳 116600

摘 要:目的 研究乙酰胆碱受体抗体(AchR-Ab)和抗横纹肌抗体(AsM-Ab)两种血清自身抗体联合检测对重症肌无力(MG)的诊断价值。方法 选择从 2018 年 11 月至 2019 年 12 月在该院初次诊断为 MG 的患者 150 例为 MG 组,选取同期门诊或住院患有除 MG 之外的其他自身免疫病患者 70 例为其他自身免疫病(OAD)组,以及同期体检健康者 80 例作为健康对照组。采用酶联免疫吸附试验(ELISA)、间接荧光免疫法(IFA)分别测定 AchR-Ab、AsM-Ab,比较其抗体阳性率并对结果进行分析。结果 MG 患者 AchR-Ab 和 AsM-Ab 的阳性率分别为 80.67%、57.33%,均明显高于 OAD 组和健康对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);两种自身抗体联合检测,其灵敏度和特异度分别为 92.60%和 95.00%。不同 Osserman 分型患者 AsM-Ab 阳性率比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 AchR-Ab 和 AsM-Ab 是诊断 MG 的标志性抗体,联合检测提高了 MG 的诊断效率,可以降低单项检测的误诊和漏诊;此外,AsM-Ab 可作为判断 MG 病情严重程度的指标,有利于临床制订针对性的治疗方案。

关键词:重症肌无力; 乙酰胆碱受体抗体; 抗横纹肌抗体

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2021.14.006

中图法分类号:R746.1

文章编号:1673-4130(2021)14-1687-04

文献标志码:A

Diagnostic value of combined detection of AchR-Ab and anti rhabdomus antibody in myasthenia gravis*

HAN Bo, ZHU Siqi, ZHU Jingxuan, ZHANG Cheng

Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang, Liaoning 116600, China

Abstract: Objective To study the diagnostic value of combined detection of acetylcholine receptor antibody (AchR-Ab) and anti striated muscle antibody (AsM-Ab) in patients with myasthenia gravis (MG). **Methods** From November 2018 to December 2019, 150 patients with myasthenia gravis diagnosed for the first time in Affiliated Hospital of Liaoning university of traditional Chinese medicine were selected as MG group, 70 patients with other autoimmune diseases except myasthenia gravis in outpatient or inpatient during the same period were selected as OAD group, and 80 patients with physical examination during the same period were selected as control group. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect AchR-Ab and indirect fluorescent immunoassay (IFA) was used to AsM-Ab. The positive rate of antibody was compared and the result was analyzed. **Results** The positive rates of AchR-Ab and AsM-Ab in MG patients were 80.67% and 57.33% respectively, which were significantly higher than those in the OAD group and the control group, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). The sensitivity and specificity of the two autoantibodies were 92.60% and 95.00% respectively. Patients with modified Osserman has different positive rate of AsM-Ab, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** AchR-Ab and AsM-Ab are the markers of MG diagnosis. Combined detection can improve the efficiency of MG diagnosis and reduce the misdiagnosis and missed diagnosis of single detection. In addition, AsM-Ab can be used as an index to judge the severity of MG, which is conducive to the clinical development of targeted treatment programs.

Key words: myasthenia gravis; acetylcholine receptor antibody; anti striated muscle antibody

* 基金项目:辽宁省教育厅科学技术研究课题(L201917)。

作者简介:韩波,男,主任技师,主要从事自身免疫疾病诊断方面的研究。

本文引用格式:韩波,朱思绮,朱敬轩,等.联合检测 AchR-Ab 和抗横纹肌抗体对重症肌无力的诊断价值[J].国际检验医学杂志,2021,42

重症肌无力(MG)是一种多因素调控的器官特异性自身免疫性疾病,其临床表现为全身或部分骨骼肌无力和易疲劳。流行病学统计提示 MG 发病率为(0.3~2.8)/100 000,全球约有 70 万 MG 患者,而中国年平均发病率为(8.0~20.0)/100 000。MG 的女性患病率较男性高,且在各个年龄阶段均可发病。目前,诊断 MG 在具有临床特征的基础上,尚缺乏快速高效的实验室辅助诊断指标,需要探寻更高灵敏度和(或)特异度的诊断方法,因此,本研究联合检测乙酰胆碱受体抗体(AchR-Ab)和抗横纹肌抗体(AsM-Ab),评价这两种血清自身抗体联合检测对 MG 的诊断价值,为临床提供诊断客观依据,以便进一步展开治疗。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择本院 2018 年 11 月至 2019 年 12 月初步诊断为 MG 的患者 150 例为 MG 组,其中男 55 例、女 95 例,平均年龄(45.65±15.72)岁,眼肌型 30 例、全身型 66 例、重度激进型 28 例、迟发重度型 17 例、肌萎缩型 9 例^[1];选择同期在本院门诊和住院的除患有 MG 之外的其他自身免疫病患者 70 例为其他自身免疫病组(OAD 组),其中男 24 例、女 46 例,平均年龄(41.37±12.66)岁;选取同期体检健康者 80 例为健康对照组,其中男 28 例、女 52 例,平均年龄(42.16±11.44)岁。各组的年龄、性别比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。本研究经本院医学伦理委员会批准,患者及其家属均签署知情同意书。

1.1.1 MG 的西医诊断标准^[2] (1)临床表现:某些特定的横纹肌无力,晨轻暮重;(2)药理学表现:新斯的明试验阳性;(3)重复神经刺激(RNS)检查波幅递减 10.00%以上;(4)在多数全身型 MG 患者血中可检测到 AchR-Ab。在具备典型 MG 临床特征的基础上,同时具备药理学特征和(或)神经电生理学特征,临床上则可诊断为 MG。有条件的单位可检测患者血中的 AchR-Ab 等有助于进一步明确诊断。需要排除发病前 3 个月内曾使用激素或免疫抑制剂者,伴有其他自身免疫性疾病、其他肌肉疾病或合并心、肺、肝、肾等器官功能疾病及妊娠或哺乳期妇女。

1.1.2 MG 的临床分型 改良的 Osserman 分型^[2] I 型:眼肌型;II 型:全身型,II A 型(轻度全身型),II B 型(中度全身型);III 型:重度激进型;IV 型:迟发重度型;V 型:肌萎缩型。

1.2 仪器与试剂 抗核抗体谱(IgG)的检测采用 IgG 检测试剂盒(印迹法)[来自欧蒙公司(批号为 CD200721AA)],IgG 检测试剂盒(间接免疫荧光法)[来自欧蒙公司(批号为 CF200527AC)],AchR-Ab 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒[来自英国 RSR 公司(批号为 KAE88A)],欧蒙荧光显微镜 EUROStar、酶标仪 BIO-RAD(Model 680)。

1.3 方法 所有研究对象均空腹采集当日或入院后次日肘正中静脉血 3~5 mL 经 3 000 r/min 离心 10 min 后,取上清液,保存于-20℃冰箱待测。

1.3.1 ELISA 检测 AchR-Ab (1)分别取待检血清、阳性对照、阴性对照及校准血清 100 μ L 装入 1.5 mL 的 Eppendorf 管中,并做好相应标记。(2)加入 25 μ L 胎儿型和成人型 AchR 混合物并密封试管,确保所有液体都在试管底部(可 15 000 r/min 离心 10 s),振荡混匀,于 2~8℃孵育 16~20 h。(3)将每管样品 AchR 混合物振荡混匀后,分别取 50 μ L 加入 AchR MAb1 酶标板中,并留 2 个孔作为空白对照,在室温下用 ELISA 平板摇床(500 次/min)孵育 1 h。(4)将液体吸出,稀释液清洗酶标板 3 次。(5)将 50 μ L 重组 AchR MAb 生物素加入每孔中(除空白孔外),置室温下用 ELISA 平板摇床(500 次/min)孵育 1 h。(6)重复步骤(4)。(7)将 100 μ L 抗生蛋白链霉素-过氧化物酶(SA-POD)加入每孔中(除空白孔外),置室温下用 ELISA 平板摇床(500 次/min)孵育 30 min。(8)重复步骤(4),再用清水洗涤一次后。(9)将 100 μ L 显色物 TMB 加入每孔中(包括空白孔),在室温下黑暗中放置 30 min。(10)将 50 μ L 终止液加入每孔中,在摇板器上摇动约 5 s。(11)在 30 min 内于 450 nm 波长处读取每个孔的吸光度,血清抗 AchR 抗体 >0.45 nmol/L 即为阳性。

1.3.2 间接荧光免疫(IFA)检测 AsM-Ab (1)滴加 0.01 mol/L, pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液(PBS)于已知抗原标本片,10 min 后弃去,使标本片保持一定湿度。(2)用 PBS 缓冲液以 1:100, 1:1 000 两个稀释倍数稀释标本。(3)滴加 25 μ L 已稀释的待检抗体标本,37℃保温 30 min。(4)用 PBS 冲洗 1~2 次,于 PBS 浸泡 5 min。(5)用滤纸吸去多余水分,但不使标本干燥,滴加 25 μ L 荧光标记的抗人球蛋白抗体,37℃保温 30 min。(6)重复操作 4。(7)用滤纸吸去多余水分,滴加 1 滴缓冲甘油。(8)荧光显微镜高倍视野下观察。观察标本的特异性荧光强度:(-)无荧光;(±)极弱的可疑荧光;(+)荧光较弱,但清晰可见;(++)荧光明亮;(++++~+++++)荧光闪亮。待检标本特异性荧光染色强度达“++”以上,而各种对照显示为(±)或(-),即可判定为阳性。(9)根据判定结果决定标本最终的滴度。

阳性结果(荧光模式),猴髂腰肌:骨骼肌细胞胞质可见典型的横纹荧光见图 1。猴心肌:心肌细胞胞质可见典型的横纹荧光见图 2。

1.4 统计学处理 上述数据的统计学分析均采用 SPSS23.0 软件进行,以临床诊断为金标准,采用四格表分别计算各自身抗体单项及联合检测的灵敏度、特异度、阳性预测值和阴性预测值。3 组抗体阳性率比较及分析抗体与临床表型的关系均采用 χ^2 检验,检

验水准为 $\alpha = 0.05$, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 AchR-Ab、AsM-Ab 阳性率的比较 MG 组的 AchR-Ab、AsM-Ab 阳性检出率明显高于其他两组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

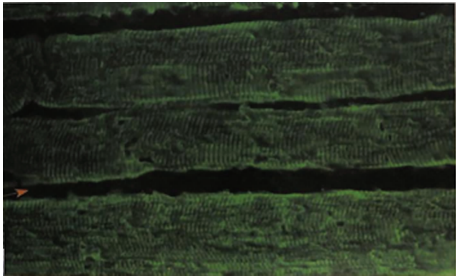


图 1 猴髂腰肌横纹荧光图

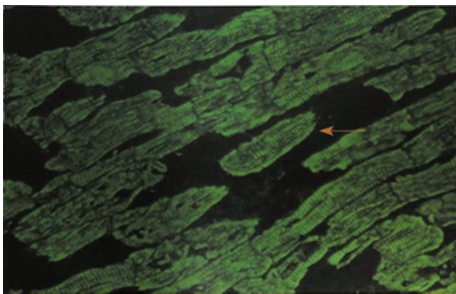


图 2 猴心肌横纹荧光图

表 1 AchR-Ab、AsM-Ab 阳性率的比较[n(%)]			
组别	n	AchR-Ab	AsM-Ab
MG 组	150	121(80.67)	86(57.33)
OAD 组	70	8(11.43)*	5(7.14)*
健康对照组	80	6(7.50)*	5(6.25)*

注:与 MG 组相比较, * $P < 0.05$ 。

2.2 单项和联合检测抗体对诊断 MG 的效能评价 单项指标比较, AchR-Ab 诊断 MG 的灵敏度高于 AsM-Ab, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 两指标联合检测诊断 MG 的灵敏度高于单项检测, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 联合检测的特异度、阳性预测值和阴性预测值均高于任意一项单项检测, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 单项和联合检测抗体对诊断 MG 的效能评价(%)				
项目	灵敏度	特异度	阳性预测值	阴性预测值
AchR-Ab	80.70	92.50	95.20	71.80
AsM-Ab	57.30*	93.70	94.50	53.90
AchR-Ab+AsM-Ab	92.60#	95.00#	97.20#	87.30#

注:与 AchR-Ab 比较, * $P < 0.05$; 分别与 AchR-Ab、AsM-Ab 比较, # $P < 0.05$ 。

2.3 AsM-Ab 与改良 Osserman 分型的关系 MG 组的 AsM-Ab 阳性率 I 型为 16.70%, II、III、IV、V

型依次高于 I 型, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 AsM-Ab 与改良 Osserman 分型的关系		
组别	n	AsM-Ab 阳性率(%)
I 型	30	16.70
II 型	66	57.60*
III 型	28	67.90*
IV 型	17	88.20*
V 型	9	100.00*

注:与 I 型比较, * $P < 0.05$ 。

3 讨 论

MG 是一类高发病率的器官特异性自身免疫性疾病, 严重影响患者的正常生活和身心健康, 给社会和家庭带来了严重的负担。MG 患者的临床和病理表现多样, 发病机制复杂, 且由于 MG 患者的个体化差异, 比如病情严重程度、发病年龄、体内抗体状态、并发症和不良反应等^[3], 应给予快速准确的诊断。

MG 的发病机制到目前为止并不十分清楚, 其主要病因是患者机体中出现针对神经-肌肉接头(NMJ)突触后膜上成分的自身抗体所致, 主要是 AchR-Ab。AchR 是由 4 种同源亚基构成的跨膜糖蛋白, 属于阳离子通道^[4]。人类肌肉有 2 种类型的 AchR, 其中胎儿型的亚基组成为 $2\alpha, \beta, \delta, \gamma$, 成人型中 γ 亚基被 ϵ 亚基所取代^[5]。AchR-Ab 的主要免疫原区(MIR)在 α 亚基, 其核心部位位于胞外段的第 67~76 位氨基酸。AchR-Ab 大多数为 IgG1 和 IgG3 亚型, 通过与突触后膜上的 AchR 结合, 可以激活补体级联反应, 致使突触后膜受体数目减少^[6], 阻断骨骼肌间神经信号传导。超过 85.00% 的全身型 MG 患者和大约一半的单纯眼部肌无力患者都有 AchR-Ab^[7], 且其阳性为诊断 MG 标准之一, 故 AchR-Ab 为诊断该病的必须检测项目。

MG 患者的外周血中除了 AchR-Ab 外, 还存在多种以肌肉为靶点的抗体, 称为抗肌抗体。有研究表明^[8]首先应用免疫荧光技术发现 MG 患者血清内存在一种与骨骼肌结合的球蛋白因子, 有研究^[9]表明此种球蛋白因子是 IgG, 荧光显微镜下它与骨骼肌结合的形式呈横纹状, 称之为 AsM-Ab, 有文献报道其抗体检测阳性率为 47.00%, 可应用于 MG 的诊断^[10]。有研究表明, 间接免疫荧光法(IFA)检测抗肌抗体有助于确诊疑似 MG 患者, 尤其是患者 AchR-Ab 阴性时, AsM-Ab 的检测尤为重要^[11]。间接免疫荧光法是以纯化的猴髂腰肌、心肌细胞作为检测 MG 自身抗体的抗原基质, 再以荧光示踪物质标记抗体而进行抗原定位。此方法特异性强、灵敏度高、速度快, 与放射免疫(RIPA)相比, 其无放射性污染且操作简单。与免疫印迹法相比, 其包含所有骨骼肌细胞及心肌细胞的

全部细胞结构,筛查范围更广,灵敏度更高。

本研究对 150 例 MG 患者、70 例其他自身免疫病患者及 80 例健康对照者的血清标本进行检测,结果显示 AchR-Ab 和 AsM-Ab 诊断 MG 的阳性检出率分别为 80.67% 和 57.33%,均高于 OAD 组和健康对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。AchR-Ab 在 MG 患者中阳性率高的原因^[12]为:(1)补体激活造成 AchR 破坏和突触后膜局灶性溶解,导致神经肌肉接头处终板膜上的 AchR 和 AchR 相关蛋白的破坏;(2)封闭乙酰胆碱受体导致其加速内化和降解;(3)AchR 阻断乙酰胆碱结合位点。AsM-Ab 在 MG 患者中阳性率偏高的原因为,在补体参与下,AsM-Ab 与其受体发生应答,经由补体介导的细胞膜溶解作用使骨骼肌成分被大量破坏,影响了神经肌肉组织的信号传导及肌纤维的收缩,导致肌无力^[12]。说明两种血清自身抗体是诊断 MG 的标志性抗体,也提示 AsM-Ab 检测有助于 MG 和其他自身免疫病的鉴别,且具有较满意的诊断价值,是诊断 MG 的新型免疫学指标,可在临床推广应用。其中,AchR-Ab 的阳性率高于张鹏等^[12]的研究,可能与不同的实验方法其灵敏度和特异度不同有关;AsM-Ab 的阳性率高于朱慧等^[9]的研究,可能与间接免疫荧光效价的判断有关,目前仍采用人工镜检的方式判读结果,且每个实验室的判读标准也不尽相同。

本研究同时分析了 AsM-Ab 与改良 Osserman 分型之间的关系,发现 MG 患者 II、III、IV、V 型的 AsM-Ab 阳性率依次高于 I 型,且差异有统计学意义($P < 0.05$)。有学者研究认为,AsM-Ab 存在于高达 95.00% 的胸腺瘤 MG 患者和 50.00% 的晚发型无胸腺瘤 MG 患者^[13],可初步推测 AsM-Ab 可能预示病情的严重程度和(或)伴随胸腺瘤的发生,尚待进一步的前瞻性研究。

本研究同时对 MG 患者的 AchR-Ab 和 AsM-Ab 进行单项指标检测,发现 AchR-Ab 的灵敏度高于 AsM-Ab,差异有统计学意义($P < 0.05$)。由于 AsM-Ab 的灵敏度(57.30%)较低,单独检测一种自身抗体诊断 MG 的灵敏度和准确性存在局限性,需将两种抗体联合检测,以提高诊断价值。本研究对 AchR-Ab、AsM-Ab 两种血清自身抗体联合检测,结果显示联合检测时比任意一项阳性时诊断 MG 的灵敏度明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),其特异度、阳性预测值及阴性预测值也均较单项检测有所提高,因此,联合检测可大幅度降低漏诊率、减少误诊率,具有很高的诊断价值。

综上所述,AchR-Ab 和 AsM-Ab 是诊断 MG 的标志性抗体,联合检测可提高诊断 MG 的灵敏度,降低因单项检测出现的漏诊和误诊;同时 AsM-Ab 可作为判断患者病情严重程度的指标,为临床进一步开展针对性治疗提供重要依据。

参考文献

- [1] 徐肖,李劲频,葛雪晴.重症肌无力合并胸腺异常患者胸腺切除术后的远期疗效分析[J].广西医科大学学报,2020,37(11):2009-2013.
- [2] 王立利,张淑敏,王红芳,等.血清 AchR-Ab 及补体在儿童重症肌无力中的水平及诊断价值[J].中国临床研究,2020,33(10):1383-1386.
- [3] 高丽,李壮林.重症肌无力的发病机制及临床治疗研究进展[J].中外医学研究,2019,17(9):173-176.
- [4] ZHAI Y R, WEI Y, FENG Q, et al. Myasthenia Gravis and prognosis of thymoma: a propensity score matching trial of 470 patients[J]. Front Oncol, 2020, 27(10): 583489.
- [5] LASCANO A M, LALIVE P H. Update in immunosuppressive therapy of myasthenia gravis[J]. Autoimmun Rev, 2021, 20(1): 102712.
- [6] JUAN P C, JAVIER D, WENDELL W, et al. Myasthenia gravis and thymoma surgery: a clinical update for the cardiothoracic anesthesiologist [J]. J Cardiothorac Vasc Anesth, 2019, 33(9): 2537-2545.
- [7] SOPHIE B, ANGELA V T, JACQUELINE P. Myasthenia gravis: a clinical-immunological update[J]. J Neurol, 2016, 263(4): 826-834.
- [8] BEKOOIJ TJS, GILHUIS H J, DAWSON L, et al. Dysautonomia as the presenting symptom in anti-muscle-specific kinase antibody myasthenia gravis[J]. J Neuromuscul Dis, 2019, 7(1): 47-50.
- [9] 朱慧,高枫,袁云,等.不同重症肌无力患者人群血清抗体检测的临床意义[J].中国神经免疫学和神经病学杂志,2018,25(2): 87-90.
- [10] 崔伟.抗骨骼肌抗体与重症肌无力[J].中国实用神经疾病杂志,2015,18(14): 140-141.
- [11] 邓书婧,檀叶青.重症肌无力相关自身抗体研究进展[J].当代医学,2018,24(24): 180-183.
- [12] 张鹏,龚源.重症肌无力患者血清 cortactin、ACh R-Ab、MuSK-Ab 检测的临床价值[J].现代诊断与治疗,2020,31(16): 2607-2609.
- [13] ROMIF, SKEIE G O, AARLI J A, et al. Muscle autoantibodies in subgroups of myasthenia gravis patients[J]. J Neurol, 2000, 247(5): 369-375.