

• 论 著 •

多指标联合检测对类风湿关节炎的临床诊断价值

潘秋荣¹, 孙肖依²

(1. 南京中医药大学附属常州中医院检验科, 江苏常州 213003;

2. 江苏大学京江学院医学检验系, 江苏镇江 212000)

摘要:目的 探讨类风湿因子(RF)、葡萄糖-6-磷酸异构酶(GPI)、抗突变型瓜氨酸波形蛋白(MCV)抗体(抗 MCV)和抗环瓜氨酸肽(CCP)抗体(抗 CCP)联合检测对类风湿关节炎(RA)的临床诊断价值。**方法** 以 108 例 RA 患者(RA 组)及 86 例非 RA 患者(非 RA 组)为研究对象,检测 RF、GPI、抗 MCV 和抗 CCP 血清浓度。**结果** 4 个指标检测结果在 RA 组和非 RA 组间的差异有统计学意义($P < 0.05$);任意 2 项及其以上指标联合诊断 RA 的敏感度、特异性、阳性预测值、阴性预测值、诊断效率、Youden 指数、受试者工作特征曲线下面积分别为 97.2、100.0、100.0、100.0、98.8、0.97 和 0.984。**结论** 上述 4 个指标的联合检测有助于提高诊断 RA 的灵敏度和特异性,可弥补单指标检测的不足,从而有效避免漏诊和误诊。

关键词:类风湿因子; 葡糖-6-磷酸异构酶; 关节炎,内风湿; 抗突变型瓜氨酸波形蛋白抗体; 抗环瓜氨酸肽抗体

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.13.016

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)13-1436-02

The clinic value of combined detection of RF, GPI, anti-MCV and anti-CCP antibody in diagnosis of rheumatoid arthritis

Pan Qiurong¹, Sun Xiaoyi²

(1. Department of Clinical Laboratory, Changzhou Chinese Traditional Medical Hospital Affiliated to Chinese Traditional Medical University of Nanjing, Jiangsu 213003, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Jingjiang College of Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212000, China)

Abstract: **Objective** To explore the clinic value of combined detection of rheumatoid factor (RF), glucose-6-phosphate isomerase (GPI), anti-mutated citrullinated vimentin antibody (anti-MCV) and anti-cyclic citrullinated peptide antibody (anti-CCP) in the diagnosis of rheumatoid arthritis (RA). **Methods** 108 cases of patients with RA (RA group), 86 cases of patients without RA (non-RA group), 54 cases of healthy controls were enrolled and detected for serum concentration of RF, GPI, anti-MCV and anti-CCP. **Results** There were significant differences of the serum levels of the four parameters between RA group and non-RA group ($P < 0.05$). The sensitivity, specificity, positive and negative predictive value, diagnostic efficiency, Youden index and area under receiver operating characteristic curve were 97.2, 100.0, 100.0, 100.0, 98.8, 0.97 and 0.984 respectively. **Conclusion** Combined detection of the four parameters could have great clinic value in the diagnosis of RA.

Key words: rheumatoid factor; glucose-6-phosphate isomerase; arthritis, rheumatoid; anti-mutated citrullinated vimentin; anticyclic citrullinated peptide antibodies

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是较为常见的致畸性自身免疫性疾病,患者发病 2 年即出现不可逆转的骨关节破坏,进而丧失运动能力。现行的诊断标准主要为临床表现、X 线检查以及类风湿因子(rheumatoid factor, RF)检测,符合此标准的患者常已出现骨关节破坏,且 RF 检测缺乏特异性,不利于早期诊断和及时治疗。因此,寻找特异性检测指标对 RA 进行早期诊断十分必要。笔者对 4 个与 RA 相关的检测指标进行了分析,以明确其临床诊断价值。结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 (1)试验组:本院 RA 患者 108 例,其中男 32 例,女 76 例,年龄 8~78 岁,平均(45.2±15.1)岁;均符合美国风湿病学会 1987 年修订的诊断分类标准。(2)对照组:本院非 RA 患者 86 例,其中男 27 例,女 59 例,年龄 9~74 岁,平均(45.9±15.4)岁;其中系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)30 例、系统性硬化病(system scleredema, SS)3 例、多发性肌炎/皮肌炎(polymyositis/dermatomyositis, PM/DM)5 例、原发性干燥综合征(primary Sjogren syndrome, pSS)14 例、未分化结缔组织病(undifferentiated connective tissue disease, UCTD)6 例、强直性脊柱炎(ankylosing spondylitis, AS)19 例、血清阴性脊柱关节病(seronegative spondyloarthropathies, SpA)9 例,均符合国内或国际相应的诊断标准^[1]。

(3)健康对照组:本院体检健康者 54 例,其中男 16 例、女 38 例,年龄 8~72 岁,平均(46.6±15.7)岁。

1.2 仪器与试剂 (1)试剂:速率散射免疫比浊法 RF 定量检测试剂盒(西门子,德国);双抗体夹心酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)葡萄糖-6-磷酸异构酶(glucose-6-phosphate isomerase, GPI)半定量检测试剂盒(北加,中国),GPI>0.20 mg/L 时判为阳性;抗突变型瓜氨酸波形蛋白(mutant citrullinated vimentin antibody, MCV)抗体(抗 MCV)ELISA 试剂盒(ORGENTEC, 德国),抗 MCV>50 U/mL 时判为阳性;抗环瓜氨酸肽(cyclic citrullinated peptide antibody, CCP)抗体(抗 CCP)ELISA 试剂盒(Euroimmune, 德国)。(2)仪器:BN II 型特种蛋白仪(德灵,美国)、Model680 型酶标仪(BIO-Rad, 美国)。

1.3 方法 各组受试对象均抽取非抗凝晨起空腹静脉血 3 mL, 3 000 g 离心 5 min, 分离血清后严格按试剂盒说明书进行 RF、GPI、抗 MCV 和抗 CCP 检测。

1.4 统计学处理 用 SPSS18.0 统计软件进行统计学分析。根据各指标在不同浓度时诊断 RA 的灵敏度和特异性,计算受试者操作特征曲线(receiver operating characteristic curve, ROC)及 ROC 曲线下面积(area under ROC, AUC)。以 t 检验分析相关比较差异,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组 RF、GPI、抗 MCV 和抗 CCP 检测结果 4 个指标检测结果在 RA 组和非 RA 组间的差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。各组 RF、GPI、抗 MCV 和抗 CCP 检测结果见表 1。

表 1 RF、GPI、抗 MCV 和抗 CCP 检测结果($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	RF(IU/mL)	GPI(mg/L)	抗 MCV(U/mL)	抗 CCP(RU/mL)
RA 组	108	315.9±116.2*	1.27±0.48*	356.4±105.3*	142.50±51.4*
非 RA 组	86	21.6±11.3	0.43±0.26	27.6±11.3	3.41±1.59
健康对照组	54	10.7±5.9	0.11±0.042	16.8±4.7	2.01±1.28

*: $P<0.05$, 与非 RA 组比较。

表 2 各指标检测阳性率[*n* 或 *n*(%)]

组别	<i>n</i>	RF-IgM	GPI	抗 MCV	抗 CCP	任意 2 项或 2 项以上
RA 组	108	82(75.9)	86(79.6)	83(76.9)	78(72.2)	105(97.2)
非 RA 组	86	11(12.8)	14(16.2)	7(8.1)	5(5.8)	0(0.0)
健康对照组	54	2(3.7)	3(5.6)	2(3.7)	1(1.9)	0(0.0)

表 3 RF、GPI、抗 MCV 和抗 CCP 诊断性能评价

指标	灵敏度(%)	特异性(%)	阳性预测值(%)	阴性预测值(%)	诊断效率(%)	Youden 指数	AUC
RF	75.9	92.1	86.3	83.2	85.1	0.68	0.857
GPI	79.6	87.9	83.5	84.8	84.3	0.68	0.851
抗 MCV	76.9	93.6	90.2	84.0	86.3	0.71	0.875
抗 CCP	72.2	95.7	92.9	81.7	85.5	0.68	0.856
任意 2 项或 2 项以上	97.2	100.0	100.0	100.0	98.8	0.97	0.984

3 讨 论

本研究显示各指标在诊断 RA 时都有一定的诊断价值,但各性能指标存在一定的差异;各指标的灵敏度及特异性不是太理想,存在较大的漏诊率和误诊率;通过多指标联合检测,可明显提高诊断灵敏度和特异性等。

RF 是诊断 RA 的血清学指标,其检测方法简便、快速。本研究显示,其诊断灵敏度低(75.9%),但特异性相对较高(92.1%)。除 RA、SLE 外,RF 在其他自身免疫性疾病患者中的阳性率也较高,甚至在部分传染性疾病患者以及老年人中也有一定的阳性率,因此不能作为 RA 早期诊断的独立指标。

GPI 在 RA 患者血清中的浓度异常增高,被认为是极有希望广泛应用于 RA 诊断及判断疾病活动性的检测指标之一[2]。苏娜等[3]的研究发现,RA 患者血清 GPI 浓度较其他风湿病患者及健康者显著增高,提示 GPI 可以作为 RA 的诊断指标之一,也可用于判断疾病活动性。本研究中,GPI 用于 RA 诊断的敏感度、特异性及诊断效率与参考文献[4]报道的结果相近。

波形蛋白(原命名为 Sa 抗原)的瓜氨酸修饰残基的异常暴露可引起自身免疫反应,诱导抗 MCV 的产生[5-7]。本项研究发现,抗 MCV 用于 RA 诊断的灵敏度可达 76.9%,特异性可达 93.6%,可用于 RA 和其他自身免疫性疾病的鉴别诊断,与国外研究结果相近[8-10]。

随着 RA 血清学特异性标记物研究的深入,抗核周因子(anti-perinuclear factor,APF)、抗角蛋白抗体(anti-keratin antibody,AKA)、抗 CCP 等逐渐引起研究人员的重视。AKA 虽对 RF 的诊断特异性高达近 100%,但由于难以制备和保存其抗体底物,所采用的检测方法为间接免疫荧光法,结果判断受多种人为因素干扰,缺乏标准化检测方法,使其难以在临床中推广应用。抗 CCP、AKA 和 APF 在化学结构上具有关联性,其靶抗原均为上皮细胞分化终末阶段的细胞骨架成分中间丝

2.2 RF、GPI、抗 MCV 和抗 CCP 诊断性能评价 各组 4 个检测指标的阳性率见表 2,由表 2 计算获得的各检测指标诊断性能评价指标结果见表 3。

相关蛋白,而瓜氨酸是该蛋白的组成成分之一,因此被统称为瓜氨酸相关自身免疫系统[11]。抗 CCP 检测具有以下优势:在 RA 发病早期,甚至在临床症状出现前,抗 CCP 即可出现阳性,可用于 RA 的早期诊断;抗 CCP 阳性的 RA 患者较阴性者更有可能发展为侵袭性疾病,在判断关节破坏等方面也具有一定的临床意义,可用于 RA 的预后判断[12-13];以化学方法合成的 CCP 作为抗原,采用 ELISA 检测抗 CCP,既具有良好的重复性和稳定性,便于实现标准化操作,能够保证检测结果的可信度。因此,已有研究人员提出将抗 CCP 列入 RA 分类诊断标准之中[14]。

ROC 曲线是将诊断试验的结果划分为若干个临界点,在以敏感度为纵坐标、(1-特异度)为横坐标的坐标图中连接每个临界点而得出的曲线,所以 AUC 能够综合反映多个临界点的敏感度、特异性,从而全面反映诊断试验的诊断性能。本研究中 AUC 计算结果显示各指标对 RA 的诊断都有一定的临床价值,但联合检测的诊断价值更高。

参考文献

[1] 陈灏珠,丁训杰,翁心华,等.实用内科学[M].11 版.北京:人民卫生出版社,2004:2318-2327.

[2] 罗怡,张阳根.葡萄糖-6-磷酸异构酶与类风湿性关节炎的研究进展[J].国际检验医学杂志,2010,31(2):146-147.

[3] 苏娜,窦存瑞,谭宝云,等.血清 6-磷酸葡萄糖异构酶及抗 CCP 抗体等联合检测对类风湿关节炎临床诊断应用的研究[J].国际检验医学杂志,2009,30(10):971-973.

[4] 杨永泉,李薇,张速林,等.6-磷酸葡萄糖异构酶检测对类风湿关节炎的诊断意义[J].广东医学,2010,31(4):475-476.

[5] Boire G, Cossette P, de Brum-Fernandes AJ, et al. Anti-Sa antibodies and antibodies against cyclic citrullinated (下转第 1440 页)

其多克隆位点和 EGFP 编码区基因之间设计有核糖体进入位点,确保插入的 hGLP-1 基因与 GFP 编码基因共同转录,但翻译合成的 hGLP-1 并不与 GFP 融合,可保证 hGLP-1 的构象与生理活性。脂质体作为体内和体外输送载体的工具,其介导的外源基因导入法以无毒、无免疫原性,简单高效而备受青睐^[9]。采用以上载体和转染方法即可在保证目的蛋白的天然生理活性,也可获得较高的转染效率和表达量。GFP 观察及细胞培养液 hGLP-1 含量检测结果均提示重组载体成功转染至靶细胞,且目的基因得以表达。

β -TC-6 细胞是以经 SV40 病毒转染的胰岛细胞为基础构建的,有较好的稳定性,能够分泌胰岛素、胰高血糖素和生长抑素,对氧化损伤敏感,可作为研究 GLP-1 功能的来源细胞。目前认为,AXN 通过产生超氧自由基,损伤细胞膜结构而导致胰岛 β 细胞受损。氧自由基可造成细胞膜产生脂质过氧化作用,线粒体氧化应激使胞内活性氧增加,进而触发核因子 κ B(nuclear factor, NF- κ B)、C-Jun 氨基端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)、丝裂原活化蛋白激酶 p38 亚族(p38 mitogen-activated protein kinase, p38MAPK)的激活,从而诱导胰岛 β 细胞的凋亡^[10]。本研究中, Hoechst 染色显示,经诱导后 β -TC-6 细胞核体积缩小,形态变圆,出现明显的核碎裂现象,说明 AXN 可诱导 β -TC-6 细胞凋亡,尽管转染空载体和转染重组载体的细胞均出现了细胞凋亡现象,但多数转染空载体的细胞已处于核碎裂阶段,而多数转染重组载体的细胞都处于核固缩状态。WST-1 在电子耦合剂存在的情况下,可以将线粒体内的部分脱氢酶还原为橙黄色的甲月替(formazan)。细胞增殖越快,颜色越深,细胞毒性越大,颜色越浅;颜色的深浅与吸光度值成正比。本研究中,WST-1 实验结果显示,转染重组载体后细胞的毒性作用减低。综上所述,经重组载体转染后的细胞毒性减低,凋亡率下降。

体外实验表明,若在诱导大鼠胰岛细胞 RINm5f 凋亡的同时将 GLP-1 加入细胞培养液中,RINm5f 细胞内抗凋亡基因 Bcl-2 表达增加,而凋亡基因 BAX 表达下降,说明 GLP-1 对胰岛细胞的抗凋亡作用源于其对凋亡相关基因的调控^[11]。也有研究发现, GLP-1 能够通过抑制 NF- κ B 的表达,而抵抗由白介素-1 β 介导的大鼠胰岛素细胞 INS-1 的凋亡^[12]。本研究采用基因转染的方式,将 2 $\times$ Val2-hGLP-1 成功转染入 AXN 诱导

凋亡的 β -TC-6 细胞,并使其分泌,发现 hGLP-1 的表达对胰岛 β 细胞的凋亡具有一定的影响。笔者将在后续实验中在细胞内基因表达水平对 hGLP-1 抗凋亡机制进一步研究,为糖尿病的基因治疗提供一定的实验基础。

参考文献

[1] Buteau J. GLP-1 receptor signaling: effects on pancreatic beta-cell proliferation and survival[J]. Diabetes Metab, 2008, 34(2): 73-77.

[2] Ranagnath LR. Incretins: physiological and therapeutic implications of glucose-dependent insulin tropic polypeptide and glucagon-like peptide-1[J]. J Clin Pathol, 2008, 61(4): 4012-4091.

[3] Tahrani AA, Piya MK, Barnett AH. Saxagliptin: a new DPP-4 inhibitor for the treatment of type 2 diabetes mellitus[J]. Adv Ther, 2009, 26(3): 249-262.

[4] 李晓丽, 刘振, 张志珍. 人胰高血糖素样肽-1 类似物基因克隆及真核表达载体构建[J]. 中国现代医学杂志, 2009, 19(7): 3046-3049.

[5] 李明, 王超, 刘跃平, 等. 糖尿病主要临床化学检测指标应用[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(2): 199-200.

[6] 冯春颜, 张永顶, 胡纪文. 免疫印迹法检测 I 型糖尿病自身抗体的临床应用[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(6): 593-594.

[7] Chang-chen KJ, Mullur R, Bernal-Mizrachi E. Beta-cell failure as a complication of diabetes[J]. Rev Endocr Metab Disord, 2008, 9(4): 329-343.

[8] Holst JJ. The physiology of glucagon-like peptide 1[J]. Physiol Rev, 2007, 87(4): 1409-1439.

[9] 张蕾, 郭克民, 温洪涛, 等. Bcl-Xl 基因反义寡核苷酸诱导食管癌细胞凋亡的研究[J]. 中华检验医学杂志, 2005, 28(9): 953-956.

[10] Ye YL, Yuan ZY, Shen B, et al. Diabetes mouse model made by alloxan[J]. Lab Animal Sci Adminstrat, 2001, 18(2): 54-59.

[11] 崔岱, 刘超, 唐伟. GLP-1 对大鼠胰岛细胞增殖及凋亡的影响[J]. 中国糖尿病杂志, 2007, 15(5): 310-312.

[12] Li SJ, Xue YM, Li J, et al. Glucagon-like peptide-1 protects INS-1 cells from interleukin-1 β -induced damage by inhibiting the nuclear factor-kappa β pathway[J]. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao, 2010, 30(9): 2119-2121.

(收稿日期: 2011-01-13)

(上接第 1437 页)

peptide are not equivalent as predictors of severe outcomes in patients with recent-onset polyarthritis[J]. Arthritis Res Ther, 2005, 7(3): 592-603.

[6] Bang H, Egerer K, Gauliard A, et al. Mutation and citrullination modifies vimentin to a novel autoantigen for rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Rheum, 2007, 56(8): 2503-2511.

[7] 晋淑慧, 王艾丽, 王娟, 等. 抗 Sa、抗 KA、抗 RA54 抗体和 RF 联合检测对类风湿性关节炎诊断的意义[J]. 临床检验杂志, 2004, 22(3): 178-180.

[8] Schellekens GA, Visser H, de Jong BA, et al. The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide[J]. Arthritis Rheum, 2000, 43(1): 155-163.

[9] Vossenaar ER, Després N, Lapointe E, et al. Rheumatoid arthritis specific anti-Sa antibodies target citrullinated vimentin[J]. Arthritis Res Ther, 2004, 6(2): 142-150.

[10] Dejaco C, Klotz W, Larcher H, et al. Diagnostic value of antibodies against a modified citrullinated vimentin in rheumatoid arthritis

[J/OL]. Arthritis Res Ther, 2006[2010-12-25], <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1779400/>.

[11] Ménard HA, Lapointe E, Rochdi MD, et al. Insights into rheumatoid arthritis derived from the Sa immune system[J]. Arthritis Res, 2000, 2(6): 429-432.

[12] Kroot EJ, de Jong BA, van Leeuwen MA, et al. The prognostic value of anti-cyclic citrullinated peptide antibody in patients with recent-onset rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Rheum, 2000, 43(8): 1831-1835.

[13] 戴冽. 抗环瓜氨酸肽抗体检测在关节病中的临床应用[J]. 中华内科杂志, 2005, 44(4): 315-317.

[14] Silveira IG, Burlingame RW, von Mühlen CA, et al. Anti-CCP antibodies have more diagnostic impact than rheumatoid factor (RF) in a population tested for RF[J]. Clin Rheumatol, 2007, 26(11): 1883-1889.

(收稿日期: 2011-01-09)