

• 检验技术与方法 •

SSP-PCR 法与流式细胞仪检测 HLA-B27 的相关性比较

沈 静¹, 张 肖¹, 俞 刚¹, 陈 瑜¹, 严佳斌^{1△}, 颜承靖^{1,2}

(1. 江苏盛泽医院检验科, 江苏苏州 215228; 2. 南京医科大学第一附属医院检验学部, 江苏南京 210029)

摘 要:目的 比较序列特异性引物-聚合酶链式反应(SSP-PCR)法和流式细胞术(FCM)法两种方法对人类白细胞抗原-B27(HLA-B27)的检测结果, 为实验室检测提供参考。方法 将 100 份待测标本分别采用 SSP-PCR 法和 FCM 法检测 HLA-B27, 用 χ^2 检测统计这两种方法的结果有无差异。结果 两种方法检测结果差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 SSP-PCR 法与 FCM 法均适用于实验室对 HLA-B27 的检测。

关键词: HLA 抗原; 脊柱炎, 强直性; 聚合酶链反应

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.01.029

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)01-0070-03

Comparison on correlation of SSP-PCR and flow cytometry for HLA-B27 detection

Shen Jing¹, Zhang Xiao¹, Yu Gang¹, Chen Yu¹, Yan Jiabin^{1△}, Yan Chenjing^{1,2}

(1. Department of Laboratory Medicine, Jiangsu Shengze Hospital, Jiangsu, Suzhou 215228, China; 2. Department of Laboratory Medicine, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

Abstract: **Objective** To compare the detection result of HLA-B27(human leukocyte antigen-B27) by the SSP-PCR(polymerase chain reaction sequence specific primers) and the FCM(flow cytometry), in order to provide a reference for laboratory testing. **Methods** We collected the whole blood of 100 patients, and statistically analyzed the results of HLA-B27 by SSP-PCR and FCM. **Results** The results of two methods had no statistically significant differences($P>0.05$). **Conclusion** Both the SSP-PCR and FCM methods are suitable for the laboratory diagnosis of the HLA-B27.

Key words: human leukocyte antigen-B27; spondylitis, ankylosing; polymerase chain reaction

强直性脊柱炎(ankylosing spondylitis, AS)是一种类风湿因子阴性、累及中轴关节和肌腱韧带附着点的慢性炎症反应疾病,被认为是一种复杂性疾病,也称为多基因遗传病^[1]。研究表明,AS 与人类白细胞抗原(human leukocyte antigen-B27, HLA-B27)具有很高的关联性,MHC I 编码的 HLA-B27 是迄今所知的、与疾病相关性最强的 HLA 抗原^[2-3]。目前,检测 HLA-B27 常用的方法有:淋巴细胞毒法、流式细胞术(FCM)法和序列特异性引物-聚合酶链式反应法(SSP-PCR)等^[4]。FCM 法测定淋巴细胞表面 HLA-B27 蛋白的表达,而 SSP-PCR 法则是扩增 HLA-B27 基因片段,为了比较这两种检测方法有无差异,本研究对 100 例临床疑似 AS 患者的外周血标本同时进行这两种方法的检测,统计并分析检测结果。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2011 年 1~12 月从苏州大学第一附属医院取得疑似 AS 男性患者标本 100 例外周血 2 mL, EDTA-Na₂ 抗凝。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 FCM HLA-B27 FITC 及相应的同型对照、红细胞裂解液,均由美国 Beckman Coulter 公司生产。流式细胞仪为美国 Beckman Coulter 公司 EPICS-XL 型流式细胞仪。

1.2.2 SSP-PCR 采用美国 TBG 公司生产的 BioGene-Ex-puzeTMDNA 提取试剂盒,所用 PCR 仪为美国 MJ Research 公司生产的 Opticon 型实时荧光定量 PCR 仪。DYY-III 型电泳槽,WD-9413B 型凝胶成像分析仪,均由北京六一仪器厂生产。

1.3 SSP-PCR 检测 HLA-B27 表达 根据已公布的 HLA-B27 基因序列,设计 HLA-B27 序列特异性引物,并用人生长激

素基因作内对照,引物由上海博亚生物有限公司合成。HLA-B27 基因引物序列为:上游引物 5'-CAG TCT GTG CCT TGG CGT TGC-3',下游引物 5'-GCT ACG TGG ACG ACA CGC T-3',扩增片段 144 bp。人肌动蛋白基因(β -actin)引物序列为:上游引物 5'-GCC TTC CCA ACC ATT CCC TTA-3',下游引物 5'-TAC CGG ATT TCT GTT GTG TTT C-F3',扩增片段 429 bp。用 TBG 公司 DNA 提取液,完全溶解 DNA。取 6 μ L PCR 产物加样至含 2 mg/mL 溴乙锭的 2%琼脂糖凝胶上,100 V 电泳 30 min,以 100 bp Ladder 作标准相对分子质量,于凝胶成像系统中分析电泳结果。根据是否出现 144 bp 特异性区带判定样本中是否具有 HLA-B27 基因。

1.4 FCM 检测 HLA-B27 表达 在试管中加全血标本 100 μ L,抗体试剂 30 μ L,充分混匀,避光孵育 15 min。加溶血剂 2 mL,避光孵育 15 min,待完全溶血后,1 500 r/min 离心 15 min,弃去上清液。加 PBS 2 mL,1 500 r/min 离心 15 min,弃去上清液,加入 0.5 mL PBS 上流式细胞仪测定,用 HLA-B27 自动检测分析软件测定。

1.5 临床确诊标准 依据 1988 年 4 月昆明全国中西医结合风湿类疾病学术会议修订通过的诊断标准。

1.6 统计学处理 敏感性=真阳性/(真阴性+假阴性);特异性=真阴性/(真阴性+假阴性);阳性预测值=真阳性/(真阳性+假阳性);阴性预测值=真阴性/(真阴性+假阴性)。采用 χ^2 检验比较差异性, $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 AS 确诊结果 依据 1988 年 4 月昆明全国中西医结

合风湿类疾病学术会议修订通过的诊断金标准,100 例男性疑似患者经自主症状陈述、家族史调查,X 线检查骶髂关节、脊柱、髋关节改变情况,室实验室内血沉等相关检查,确诊 AS 患者 41 例,非 AS 者 59 例。

2.2 SSP-PCR 法检测结果 从图 1 可见,在 429 bp 的位置所有泳道中均出现阳性,在 144 bp 的位置 1、3、5 泳道为阳性,2、4 泳道为阴性。根据实验设计可以得出,图中 1、3、5 号标本为 HLA-B27 阳性,2、4 号标本为 HLA-B27 阴性。SSP-PCR 法检测 100 例标本结果为 40 例阳性,60 例阴性。

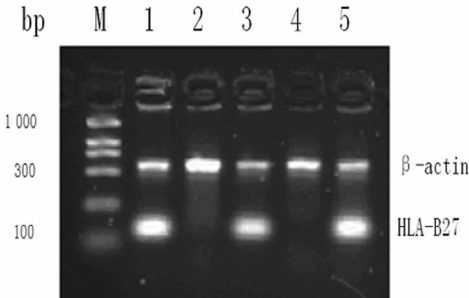


图 1 电泳结果示意图

2.3 FCM 法检测结果 分析结果如图 2 所示,在图 2-2 中分析软件自动圈出 CD3 阳性的 T 淋巴细胞,图 2-1 显示所圈定的细胞均出现在 FSC-SSC 散点图淋巴细胞的位置。

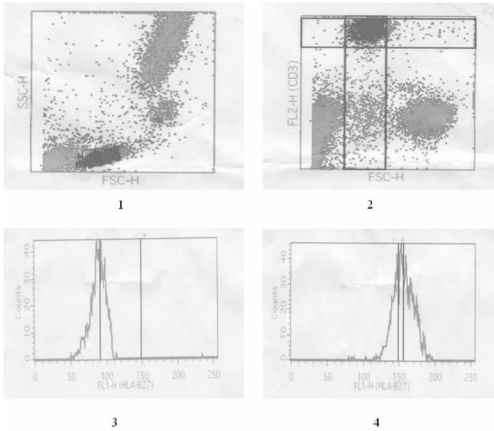


图 2 FCM 法检测示意图

2.4 两种检测方法与金标准的结果比较 两种方法检测结果见表 1,两种检测方法的敏感度、特异性、预测值比较见表 2。经统计学检验比较,两种方法均具有较高的敏感度和特异性,两者相比差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 1 两种方法检测结果

金标准	SSP-PCR		FCM	
	+	-	+	-
+	40	1	32	9
-	0	59	0	59

表 2 两种检测方法敏感度、特异性、阴、阳性预测值比较

方法	敏感度	特异性	阳性预测值	阴性预测值
SSP-PCR	0.976	1.000	1.000	0.983
FCM	0.781	1.000	1.000	0.868

3 讨 论

AS 是一种慢性、进行性和炎性疾病,其主要累及骶髂关

节、脊柱骨软组织及四肢关节,又名类风湿性脊柱炎、畸形性脊柱炎、类风湿中心型等。本病一般类风湿因子呈阴性,故与 Reiter 综合征、牛皮癣关节炎、肠病性关节炎等统属血清阴性脊柱病^[5]。HLA 复合体位于第 6 号染色体短臂上,该区 DNA 片段长度为 3 000~4 000 kb,占整个基因长度的 1/3 000,HLA-B27 是 HLA-I 类基因中 B 位点上的一个等位基因^[6-8]。大量研究证实,AS 与 HLA-I 类基因中 B 位点等位基因 B27 密切相关^[9]。当临床根据症状、体征及 X 线检查怀疑为 AS 或其他脊柱关节病时,HLA-B27 阳性可作为早期诊断及支持临床的重要指标。

本文对 100 例临床疑似 AS 患者的全血标本分别进行 FCM 与 SSP-PCR 检测,统计其敏感度、特异性和阴阳性预测值,结果显示差异无统计学意义($P>0.05$)。

SSP-PCR 检测阳性率高于 FCM,其原因可能在于 SSP-PCR 检测的是 HLA-27 的基因型,而 FCM 检测的是 HLA-27 的表型,两者所反映情况并不一致,即携带 B27 基因并不等于细胞表面一定有 B27 抗原的表达。本实验中经 SSP-PCR 检测为阳性,FCM 法测定阴性的标本可能与某些患者细胞表面 HLA-B27 抗原不表达有关。样本可能为携带有 HLA-B27 基因而抗原不表达或弱表达者。

FCM 阳性、SSP-PCR 阴性的结果可能是由于 HLA-B27 等位基因较多,不除外未能进行正确扩增的可能性。现知 B27、B7 抗原均属于交叉反应的 B7 群,B27 单抗在识别 B27 抗原时可与 B7 抗原发生交叉反应,造成假阳性结果。一些文献中有记载,大量实验证明,用 FCM B27/B7 双标法检测的 HLA-B27 阳性的标本,SSP-PCR 均为阳性^[10]。也可证明 FCM 阳性、SSP-PCR 阴性的结果大部分均由于 B27、B7 抗原的交叉反应造成的假阳性。FCM 检测 HLA-B27 的单克隆抗体时单克隆抗体不同程度与其他 HLA-B 等位基因产物发生交叉反应,其中以 HLA-B7 的交叉最为多,而出现假阳性。

FCM 与 SSP-PCR 的检测差异还可能是由于 PCR 手工操作步骤多而复杂,易引起诸多不可控的人为操作失误,从而导致结果不准确。

两种方法检测敏感度、特异性、阴、阳性预测值差异虽无统计学意义($P>0.05$),但各有特点:SSP-PCR 法具有结果准确、成本低、标本可长期保存,便于进行实验室间质量评价,临床应用时需要实验人员和实验室标准化等特点;FCM 具有简便快捷、自动化程度高,结果判断客观性强,标本要求新鲜等特点。各实验室在进行 HLA-B27 检测时,可根据本单位条件,选择合适的检测方法。

参考文献

[1] 王静成,王晓玲,费文勇,等. 相对定量检测 HLA-B27 mRNA 表达水平的方法建立[J]. 国际检验医学杂志,2009,30(6):535-537.

[2] 杨再兴,梁艳,曾贤铭,等. Toll 样受体 4 在强直性脊柱炎患者外周血白细胞中的表达及临床意义初探[J]. 临床检验杂志,2007,25(4):293-294.

[3] Rueda B,Orozco G,Raya E,et al. The IL23R Arg381Gln non-synonymous polymorphism confers susceptibility to ankylosing spondylitis[J]. Ann Rheum Dis,2008,29(13):1451-1454.

[4] 单卫民,冯萍,俞秋兴. 流式细胞仪检测 HLA-B27[J]. 临床检验杂志,2000,18(2):366-366.

[5] Ouedraogo DD,Palazzo E,Nlome-Nze M,et al. (下转第 74 页)

2.2 表 2 为实验组脂血异常标本处理前后各生化项目的部分结果,其中脂血影响较大的项目有 Ca、P、Cr、UA、TP、ALB、ALT、AST、TBIL、TG 等,经处理后结果明显得到改善,能反映患者机体内的真实水平。

3 讨 论

脂血的产生多见于脂类代谢异常、淋巴管阻塞、急性胰腺炎以及治疗性输注脂肪乳制品等。特别是严重脂血者,由于血浆中含有大量的乳糜微粒,而乳糜微粒的大小范围可在 70~1 000 nm 之间,其不同个体在大小分布及数量上差异很大。因此,会对入射光产生光散射作用,此时如采用以光传导部分检测方法检验,脂血就可能会造成干扰^[5]。尽管目前由于生化分析仪不断改进,采用了双波长、双试剂检测等措施^[6-7],可避免轻、中度脂血的影响,但重度脂血如乳糜血标本则会使检测结果出现负值或检测失败,因此消除脂血对检测结果的影响并为临床提供正确的结果十分重要。

对脂血干扰的消除方法,国内有不少报道,并各有其优缺点。如采用最多的是利用高速离心来消除乳糜微粒的干扰^[8],但另有学者报道^[9],经离心后某些生化指标的结果会有差异,如 CK、CK-MB、LDH、HBDH、CRE、UA、TP 等,并且认为高速离心的速度、时间、取下层清澈液体的方式、体积等均可能影响测定结果,即没有相应的标准操作程序。而采用乙醚分离仅能对部分生化项目进行测定^[10]。另有作者采用磷酸-镁-PEG 法消除脂血的干扰^[11],结果较好,但操作相对繁琐,且 PEG 不能用于酶类及甲状腺类激素的测定^[12]。

Lipoclear 脂质清除剂是一种无毒非离子聚合物,去脂效果好,对测定的项目影响较小。从本实验的研究中发现,对照组中除 P、TP、TG 项目外,其他生化项目检测结果相对偏差均小于 1/2 CLIA '88 TEa,说明 Lipoclear 脂质清除剂对该项目的干扰较小,去脂能力强,属临床可接受范围。其中总蛋白的结果处理前后影响最大,这是因为血浆中的脂类不溶或微溶于水,因此无论是外源性或内源性脂类均以溶解度较大的脂蛋白复合体的形式在血液中运输,故在除脂过程中有少量的蛋白质的丢失;另外 P 项目也有一定的差异,原因有待进一步研究,但其相关系数较高为 0.959,故各实验室可根据自身实验条件设置校准系数,以保证该项目准确。对照组加入的是脂肪乳,即形成人工模拟脂血,其乳糜微粒的大小较恒定,与正常人体形成的脂血有一定差异。而实验组选择的是人体病理性脂血标本,可以更好地反映 Lipoclear 脂质清除剂的去脂能力。从实验组的结果分析看,电解质结果在处理前后差异较小,主要是因为脂血对 ISE 法的测定一般无干扰^[13];而其他多数生化

项目的结果差异较大,由于部分项目如 ALT、AST 等在实测中有负值出现或检测失败,因此不便于统计处理,故表 2 仅列出了部分标本的生化结果;TG 平均浓度为 17.38 mmol/L,经 Lipoclear 处理后降为 1.57 mmol/L,去脂率达到 90%,且处理后的血清明显变得澄清,其各种常规生化结果均得到较好的改善。

因此,Lipoclear 脂质清除剂消除脂血的干扰效果较好,且操作简单、快速,对于临床常规生化项目,特别是危急值项目的测定无明显干扰现象,故值得在临床中推广应用。

参考文献

- [1] 彭华,载盛明. 高脂血标本对临床检验项目的干扰及消除[J]. 国际检验医学杂志,2010,31(10):1140-1142.
- [2] Anderson NR. Lipaemia; an overrated interference? [J]. BJBS, 2003,60(3):141-143.
- [3] Vermeer HJ. Correction of patient results for Beckman Coulter LX-20 assays affected by interference due to hemoglobin, bilirubin or lipids; a practical approach[J]. Clin Chem Lab Med, 2007, 45(1):114-119.
- [4] 刘怀平,孙金芳,陈欣. 不同检测系统 21 项常规生化结果的比与临床可接受性评价[J]. 中国实验诊断学,2009,13(10):1406-1408.
- [5] 赵建华. 脂血造成干扰的评估[J]. 齐鲁医学检验,2005,16(1):16.
- [6] 臧素纲,吴李培. 消除溶血黄疸及脂血对生化检测干扰的探讨[J]. 实用医技杂志,2008,15(27):3742-3743.
- [7] 张淑文. 应用二点终点法消除乳糜血对血清总蛋白测定的干扰[J]. 检验医学,2004,19(1):65-66.
- [8] 石凌波,史惠群. 利用高速离心法消除脂血对生化测定的干扰[J]. 检验医学,2004,19(2):138-140.
- [9] 张帆. 高速离心对临床常规系列生化项目测定结果的影响[J]. 国际检验医学杂志,2010,31(8):887-888.
- [10] 郑治纲,杨可. 脂血经乙醚处理后对生化指标测定结果的影响[J]. 陕西医学检验,2008,22(2):28-29.
- [11] 熊俊,石文静,闪全忠. 磷酸-镁-PEG 法消除脂血干扰的方法学评估[J]. 现代检验医学杂志,2008,23(1):50-52.
- [12] Rasbold K, Rendell MS, Goljan E. Simple removal of lipids from serum[J]. Clin Chem, 1985, 31(5):782.
- [13] 传良敏,黄文方,饶绍琴. 内源性干扰物质对酶法测定钾钠氯结果的影响[J]. 现代检验医学杂志,2006,21(2):39-40.

(收稿日期:2013-09-08)

(上接第 71 页)

- Ankylo-sing spondylitis and systemic sclerosis: A rare combination[J]. Joint Bone Spine, 2009, 14(8):938-940.
- [6] Sung IH, Kim TH, Bang SY, et al. IL-23R polymorphisms in patients with ankylosing spondylitis in korea[J]. J Rheumatol, 2009, 15(4):511-515.
 - [7] Leden I, GÖtherström A, Drenzel L, et al. HLA-B27 sequences identified in a mediaeval skeleton with ankylosing spondylitis[J]. Ann Rheum Dis, 2009, 68(5):757-758.

- [8] Colbert RA, Delay MI, Layh-Schmitt G, et al. HLA-B27 misfolding and spondyloarthropathies[J]. Prion, 2009, 3(1):15-26.
- [9] 方懿,蒋宗滨. HLA-B27 与强直性脊柱炎的相关性研究进展[J]. 国际麻醉学与复苏杂志, 2011, 32(3):323-327.
- [10] Peter J, Maearde, McEvoy R, et al. HLA-B27 expression by flow cytometry: all analysis of 7 years quality assure data. [J]. Immun Meth, 2000, 243(1):51.

(收稿日期:2013-09-10)