

两种方法联合检测抗核抗体结果分析

方小娟, 廖胡君, 戎燕丽

(汕头市皮肤性病防治院, 广东汕头 515041)

摘要:目的 探讨间接免疫荧光法检测抗核抗体(ANA)结果与蛋白质印迹法检测 ANA 结果之间的相关性,以及两种方法联合检测在自身免疫性疾病中的诊断价值。方法 收集 2011 年 4 月至 2013 年 4 月同时用间接免疫荧光法与蛋白质印迹法检测 ANA 的患者资料,并对检测结果进行对比分析。结果 间接免疫荧光法检出 ANA 阳性率明显低于蛋白质印迹法($\chi^2=158.69$, $P<0.01$)。间接免疫荧光法检测 ANA 阳性标本中,有 20 例蛋白质印迹法检测为阴性;蛋白质印迹法检测 ANA 为阳性的 775 例标本中,有 295 例(38.06%)间接免疫荧光法检测为阴性。间接免疫荧光法检测 ANA 的荧光模型与特异性 ANA 之间没有绝对的规律。结论 蛋白质印迹法检测 ANA 的敏感性较高,间接免疫荧光存在假阴性的可能,选择一个敏感性较高的检测组合十分必要。

关键词:抗核抗体; 间接免疫荧光法; 蛋白质印迹法

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.08.043

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)08-1036-03

Indirect immunofluorescence combined with Western blot assay for the diagnosis of antinuclear antibody

Fang Xiaojian, Liao Hujun, Rong Yanli

(The Shantou Hospital of Dermatology, Shantou, Guangdong 515041, China)

Abstract: Objective To investigate the correlation between indirect immunofluorescence (IFT) method and Western blot assay for the diagnosis of antinuclear antibody (ANA), based on which to evaluate the diagnostic value of IFT combined with Western blot for the autoimmune disease. **Methods** Medical materials from patients received IFT combined with Western blot for the diagnosis of autoimmune disease from April 2011 to April 2013 were included in this study. On this basis, a comparative study was performed to evaluate the diagnosis results. **Results** The positive rates obtained using IFT method were significantly lower than that of Western blot assay ($\chi^2=158.69$, $P<0.01$). Among the samples with positive results using IFT method, 20 samples were considered as negative using Western blot assay. On the contrary, among the 775 samples with positive results using Western blot assay, 295 samples (38.06%) were considered to be negative using IFT method. No absolute association was established between the fluorescent pattern and specificity of the IFT method in the diagnosis of ANA. **Conclusion** The sensitivity of Western blot assay for the diagnosis of ANA was comparatively higher than that of IFT method. A possibility of false negative was noted in the IFT method. It is necessary to select a combined method with higher sensitivity for the diagnosis of ANA.

Key words: antinuclear antibody; indirect immunofluorescence assay; Western blotting.

抗核抗体(ANA)是最常出现于自身免疫性疾病(autoimmune disease, AID)患者血清中的一组自身抗体的总称,其靶抗原为真核细胞的核成分,但也包括某些细胞质和细胞骨架成分。核抗原由 3 个组成部分,组蛋白、DNA、可溶性核抗原,后者是一组可溶于磷酸盐缓冲液(或生理盐水)中的多肽抗原,故名可提取的核抗原(extractable nuclear antigen, ENA),现已发现的有临床诊断价值的 ANA 超过 10 种,如:抗尿嘧啶-1 低分子量核糖核蛋白(U1-nRNP),Smith 抗原(sm),可溶性物质 A、B(SS-A/SS-B),DNA 拓扑异构酶 1(Scl-70)、细胞质组氨-tRNA 合成酶(Jo-1)等^[1],最常用的 ANA 检测方法有间接免疫荧光法、免疫扩散法、酶联免疫吸附法和蛋白质印迹法等^[2],ANA 和特异性自身抗体的检测在自身免疫性疾病的诊断中起重要作用^[3],目前已有多家医院开展了自身抗体谱的联合检测。为探讨间接免疫荧光法与蛋白质印迹法对特异性 ANA 检测结果之间的相关性,以及两种方法联合检测在自身免疫性疾病诊断中的价值与优缺点。作者对 2011 年 4 月至 2013 年 4 月在本院皮肤科门诊就诊,且同时用上述两种方法检测 ANA 的患者资料及检测结果进行统计和对比分析。

1 资料与方法

1.1 一般资料 所有标本均来自 2011 年 4 月至 2013 年 4 月在本院皮肤科门诊就诊且同时用间接免疫荧光法与蛋白质印迹

法联合检测 ANA 的患者,共 1 018 例,其中,女性 810 例,男性 208 例,男女比例为 1:3.89;患者年龄 14 个月至 84 岁。

1.2 标本采集 严格按全国临床检验操作规程采集静脉血 2 mL,待凝后分离血清,置于 2~8 ℃ 冰箱保存待检。

1.3 仪器与试剂 仪器:日本 Olympus BH2-RFCA 荧光显微镜,江苏海门麒麟医用仪器厂生产的 TS-8 型转移脱色摇床,台式扫描仪及配套评价软件(由德国欧蒙医学实验诊断股份公司提供)。试剂:间接免疫荧光法检测试剂盒与蛋白质印迹法检测试剂盒均由德国欧蒙医学实验诊断股份公司生产。

1.4 检测方法与结果判断 (1)间接免疫荧光法 ANA 检测:采用人上皮细胞(HEp-2)和灵长类肝脏冰冻组织切片两种基质联合检测患者血清中的 ANA,通过特异性荧光模式判断荧光模型,根据血清样本稀释度及荧光强弱判断抗体滴度,检测过程均按试剂盒要求严格执行。(2)蛋白质印迹法 ANA 检测:试剂膜条包被有 nRNP/sm(天然 U1-nRNP)、sm、SS-A、SS-B、SCL-70、11-16 多肽复合体抗原(PM-SCL)、Jo-1、着丝粒蛋白 B(CENP B)、增殖细胞核抗原(PCNA)、抗双链脱氧核糖核酸(ds-DNA)、核小体、组蛋白、核糖体 P 蛋白和 E2 酶和丙酮酸脱氢酶复合体蛋白 X(AMA-M2)等抗原及质控带,可用于检测这 14 种不同抗原 IgG 类特异性抗体。检测过程严格按试剂说明书要求进行,实验完成后将膜条固定在绿色纸的黏性塑

料膜上,干透后,用台式扫描仪扫描,并采用配套软件评价结果。

1.5 统计学处理 利用 Excel 2003 建立数据库进行数据处理及资料分析,计数资料以率表示,采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 间接免疫荧光法检测 ANA 结果 (1)1 018 例标本共检出 ANA 阳性标本 500 例(49.12%),其中,208 名男性患者共检出 ANA 阳性 76 例(36.54%),810 名女性患者共检出 ANA 阳性 424 例(52.35%),女性患者 ANA 阳性率明显高于男性患者($\chi^2 = 16.55, P < 0.01$)。(2)间接免疫荧光法检出的 500 例 ANA 阳性标本荧光模型分布情况见表 1。

表 1 间接免疫荧光法检出的 500 例 ANA 阳性标本荧光模型分布情况

ANA 荧光模型	阳性例数(n)	阳性率(%)
核颗粒型	362	72.40
均质型	63	12.60
核仁型	28	5.60
胞浆颗粒型	8	1.60
着丝点型	4	0.80
核点型	1	0.20
波型蛋白抗体	1	0.20
混合型	32	6.40
不确定型	1	0.20

2.2 蛋白质印迹法检测 ANA 结果 1 018 例标本共检出 1

924 项特异性 ANA 阳性,至少一项特异性 ANA 阳性的标本 775 例,阳性率为 76.13%,见表 2。

表 2 蛋白质印迹法检测 ANA 结果

特异性 ANA	阳性例数(n)	阳性率(%)
抗 nRNP/sm 抗体	306	30.06
抗 SS-A 抗体	453	44.50
抗 SS-B 抗体	113	11.10
抗 SCL-70 抗体	60	5.94
抗 PM-SCL 抗体	46	4.19
抗 Jo-1 抗体	36	3.36
抗 CENP B 抗体	23	2.26
抗 PCNA 抗体	72	70.73
抗 ds-DNA 抗体	136	13.36
抗核小体抗体	141	13.85
抗组蛋白抗体	151	14.83
抗核糖体 P 蛋白抗体	214	21.02
抗 AMA M2 抗体	173	16.99
合计	1 924	100.00

2.3 两种方法检测结果比较 间接免疫荧光法检出 ANA 阳性率明显低于蛋白质印迹法($\chi^2 = 158.69, P < 0.01$)。间接免疫荧光法检测 ANA 阳性标本中,有 20 例蛋白质印迹法检测为阴性。蛋白质印迹法检测 ANA 为阳性的 775 例标本中,有 295 例间接免疫荧光法检测为阴性(38.06%)。两种方法检测结果比较见表 3。

表 3 两种方法检测结果比较

特异性 ANA [n(%)]	核颗粒型 [n(%)]	均质型 [n(%)]	核仁型 [n(%)]	胞浆颗粒型[n(%)]	着丝点型 [n(%)]	核点型 (n)	波型蛋白抗体(n)	混合型 [n(%)]	不确定型 [n(%)]	阴性[n(%)]	合计 (n)
抗 nRNP/sm 抗体	202(66.01)	34(11.11)	8(2.61)	2(0.65)	0(0.00)	0	0	16(5.23)	1(0.33)	43(14.05)	306
抗 SS-A 抗体	264(58.28)	38(8.39)	16(3.53)	2(0.44)	2(0.44)	0	0	25(5.52)	0(0.00)	106(23.39)	453
抗 SS-B 抗体	71(62.83)	4(3.54)	8(7.08)	0(0.00)	1(0.88)	0	0	10(8.85)	0(0.00)	20(17.70)	113
抗 SCL-70 抗体	27(45.00)	6(10.00)	2(0.33)	2(0.33)	0(0.00)	0	0	4(6.67)	0(0.00)	19(31.67)	60
抗 PM-SCL 抗体	15(32.61)	1(2.17)	0	1(2.17)	0(0.00)	0	0	3(6.52)	1(2.17)	25(54.35)	46
抗 Jo-1 抗体	8(22.86)	3(8.57)	1(2.86)	0(0.00)	2(5.71)	0	0	0(0.00)	0(0.00)	20(57.14)	35
抗 CENP B 抗体	4(17.39)	1(4.35)	0(0.00)	0(0.00)	2(8.70)	0	0	0(0.00)	0(0.00)	16(69.57)	23
抗 PCNA 抗体	28(38.89)	5(6.94)	4(5.56)	1(1.39)	0(0.00)	0	0	1(1.39)	0(0.00)	33(45.83)	72
抗 ds-DNA 抗体	72(52.94)	26(19.11)	3(2.21)	0(0.00)	0(0.00)	0	0	11(8.09)	0(0.00)	24(17.65)	136
抗核小体抗体	99(70.21)	26(18.44)	1(0.71)	0(0.00)	1(0.71)	0	0	6(4.26)	0(0.00)	8(5.67)	141
抗组蛋白抗体	86(58.96)	25(16.56)	3(1.99)	0(0.00)	0(0.00)	0	0	5(3.31)	0(0.00)	32(2.12)	151
抗核糖体 P 蛋白抗体	152(71.03)	21(9.81)	6(2.80)	3(1.40)	1(0.47)	0	0	14(6.54)	0(0.00)	17(7.94)	214
抗 AMAM2 抗体	76(43.93)	15(8.67)	8(4.62)	1(0.58)	1(0.58)	0	0	13(7.51)	0(0.00)	59(34.10)	173

3 讨 论

在皮肤科较常见的自身免疫性疾病有系统性红斑狼疮、皮炎与多发性皮炎、局限性和系统性硬皮病、混合性结缔组织病、干燥综合征等^[4]。自身抗体是自身免疫性疾病的重要标志,患者血清中存在高效价的自身抗体是自身免疫性疾病的特征之一,也是临床确诊自身免疫性疾病的重要依据^[5]。狭义的 ANA 指抗细胞核抗原成分的自身抗体的总称,广义的 ANA 是一组针对多种细胞核、细胞质成分的自身抗体,包括细胞核、细胞质、细胞骨架、细胞分裂周期物质^[6]。

本研究中,间接免疫荧光法检测 ANA 结果显示,女性患者 ANA 阳性率明显高于男性患者($\chi^2 = 16.55, P < 0.01$),这与国内报导自身免疫性疾病以女性多见基本相符^[4,7]。本研究中,间接免疫荧光法检测 ANA 荧光模型分布与邓学新等^[8]的报道均存在一定的差异,可能是因为接受调查人群不同的原

因;另一方面目前 ANA 的检测还没有一个较为统一的质量控制体系^[9-10],各实验室由于使用的荧光显微镜、检测试剂盒、检测人员的操作和结果判断经验等差异,也是导致各实验室间结果差异的一个重要原因。

本研究发现,间接免疫荧光法检出 ANA 阳性率明显低于蛋白质印迹法($\chi^2 = 158.69, P < 0.01$)。间接免疫荧光法检测 ANA 阳性标本中,有 20 例蛋白质印迹法检测为阴性,可能是因为蛋白质印迹法没有包被相应特异性抗原而无法检出。蛋白质印迹法检测 ANA 为阳性的 775 例标本中,有 295 例间接免疫荧光法检测为阴性(38.06%),提示间接免疫荧光检测 ANA 可能存在假阴性的可能性,因而选择一个敏感性较高的检测组合显得十分必要。

本研究发现,几乎每一种特异性 ANA 阳性的标本都或多或少有间接免疫荧光法检测阴性的结果,其中以抗 CENP B 抗

体出现阴性的情况最高,其次是抗 Jo-1 抗体、抗 PM-SCL 抗体,抗 PCNA 抗体、抗 AMA M2 抗体、抗 SCL-70 抗体,国内邓学新等^[8]、吴庆等^[11]、魏方等^[12]也有类似报道。本研究发现,间接免疫荧光法检测 ANA 的荧光模型与特异性 ANA 之间没有绝对的规律可言,尽管荧光模型具有一定的提示作用,但一种自身抗体可以出现不同的荧光模型,不同的自身抗体可以出现不同的荧光模型,仅依靠荧光模型很难推断特异性 ANA 的种类。蛋白质印迹法所使用的包被抗原必须是纯化的抗原,才能保证被测定抗原的准确性和特异性,但目前许多自身抗体的确切抗原尚不明确,许多抗原不易被纯化,故仅有少部分抗原有纯化的产品能用于特异性检测^[2];另外,一条检测膜条也很难做到包被所有特异性抗原,膜条检测项目的增加引起的成本增加,也会相应加重患者负担,因此,临床应根据患者的实际情况选择针对性的初筛试验与确认试验检测组合,在保证实验质量的情况下尽量减少患者的负担。

自身免疫性疾病的诊断除依赖于临床症状、体征及相应辅助检查外,很大程度取决于免疫学诊断,特别是自身抗体的检测结果,目前新的自身抗体还在不断涌现,各种新的检测方法被用于自身抗体的检测,这些变化一方面为医务工作者提供了更多的选择和诊断指标,另一方面也带来困惑,如何根据患者的病情选择针对性的自身抗体的检测组合十分必要。检验工作者应在了解各种测定方法的特性情况下尽量向临床宣传解释有关自身抗体及各种技术在临床检测的价值与优缺点,为临床合理地选择自身抗体及检测方法提供帮助。

参考文献

[1] 叶应妩,王毓三,申子瑜,等. 全国临床检验操作规程[M]. 南京:

(上接第 1035 页)

抗体是检测的重要工具,虽然现在国内市场有许多 ADMA 试剂盒在出售,但抗体都是依靠进口,成本较高。本文设计了 3 种抗原,包括:免疫原(KLH-nADMA)和两种筛选抗原(BSA-nADMA 和 BSA-ADMA)。在筛选杂交瘤细胞株的过程中,首先经过间接 ELISA 双筛,免疫原为 KLH-nADMA,利用 BSA-nADMA 包板进行 ELISA 阳性筛选的同时,还用 BSA 蛋白包板进行阴性筛选,这样得到的杂交瘤细胞株只是针对 nADMA 多肽段,再用 BSA-ADMA 和 BSA 进行筛选,最后得到的杂交瘤细胞只是针对单个 ADMA。Jurkat 细胞株属急性 T 细胞白血病细胞系,含有 ADMA 蛋白。

本文获得的 ADMA 单克隆抗体不仅使 ADMA 抗体国产化,并为 ADMA 的临床检验应用奠定了基础。

参考文献

- [1] Sedoris KC, Ovechkin AV, Gozal E, et al. Differential effects of nitric oxide synthesis on pulmonary vascular function during lung ischemia-reperfusion injury[J]. Arch Physiol Biochem, 2009, 115(1):34-46.
- [2] Ogawa T, Kimoto M, Sasaoka K. Purification and properties of a new enzyme, NG, NG-dimethylarginine dimethylaminohydrolase, from rat kidney[J]. J Biol Chem, 1989, 264(17):10205-10209.
- [3] Moncada S, Higgs EA. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology[J]. Br J Pharmacol, 2006, 147 Suppl 1:S193-201.
- [4] Mookerjee RP, Malaki M, Davies NA, et al. Increasing dimethylarginine levels are associated with adverse clinical outcome in severe alcoholic hepatitis[J]. Hepatology, 2007, 45(1):62-71.
- [5] Meinitzer A, Puchinger M, Winklhofer-Roob BM, et al. Reference values for plasma concentrations of asymmetrical dimethylarginine

东南大学出版社, 2006:655-662.

- [2] 王兰兰. 自身抗体检测的应用与质量保障原则[J]. 中华检验医学杂志, 2005, 10(28):987-990.
- [3] 仇宁, 陈志强. 抗核抗体和特异性自身抗体检测的临床应用[J]. 国外医学皮肤病学分册, 2001, 4(27):229-231.
- [4] 赵辨. 临床皮肤病学[M]. 3 版. 南京:江苏科学技术出版社, 2001:648-704.
- [5] 周厚清, 董敏, 马路. ANA、抗抗 ds-DNA 抗体和 ENA 多肽抗体与自身免疫性疾病的关系[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 12(18):2675-2676.
- [6] 王兰兰. 临床免疫学及免疫检验[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社, 2003:190-199.
- [7] 赖永才, 毛炜. 自身免疫性疾病中抗核抗体与抗 ENA 抗体的相关性分析[J]. 检验医学与临床, 2011, 4(8):815-816.
- [8] 邓学新, 曲昌华. 818 例自身免疫性疾病抗 ENA 抗体与抗核抗体的对照分析[J]. 临床检验杂志, 2005, 4(23):302-303.
- [9] 彭晓东, 王兰兰, 张瑞薇, 等. 抗核抗体荧光免疫检测质量控制方法的建立和应用[J]. 中华检验医学杂志, 2004, 3(27):190-192.
- [10] 肖艳群, 陈慧英, 叶萍, 等. 上海地区自身抗体检测质量现状调查分析[J]. 检验医学, 2008, 5(23):298-300.
- [11] 吴庆. 抗可提取性核抗原抗体与抗核抗体的对照分析[J]. 国际检验医学杂志, 2006, 8(27):679-680.
- [12] 魏方. 抗核抗体与抗 ENA 抗体的相关性分析[J]. 实验与检验医学, 2009, 2(27):61-62.

(收稿日期:2013-12-15)

(ADMA) and other arginine metabolites in men after validation of a chromatographic method[J]. Clin Chim Acta, 2007, 384(1/2):141-148.

- [6] Heresztyn T, Worthley MI, Horowitz JD. Determination of L-arginine and NG, NG - and NG, NG' -dimethyl-L-arginine in plasma by liquid chromatography as AccQ-Fluor fluorescent derivatives[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2004, 805(2):325-329.
- [7] Pettersson A, Uggla L, Backman V. Determination of dimethylated arginines in human plasma by high-performance liquid chromatography[J]. J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 1997, 692(2):257-262.
- [8] Bishop MJ, Crow B, Norton D, et al. Direct analysis of un-derivatized asymmetric dimethylarginine (ADMA) and L-arginine from plasma using mixed-mode ion-exchange liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2007, 859(2):164-169.
- [9] Tsikas D, Schubert B, Gutzki FM, et al. Quantitative determination of circulating and urinary asymmetric dimethylarginine (ADMA) in humans by gas chromatography-tandem mass spectrometry as methyl ester tri(N-pentafluoropropionyl) derivative[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2003, 798(1):87-99.
- [10] Teerlink T. ADMA metabolism and clearance[J]. Vasc Med, 2005, 10 Suppl 1:S73-81.
- [11] Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine[J]. Nature, 1988, 333(6174):664-666.

(收稿日期:2014-01-23)