

• 论 著 •

5 种胰岛自身抗体在糖尿病患者血清中检测的临床意义

何应中¹, 韩昵薇¹, 邹 焰², 何 灿³

(1. 遵义医学院附属医院医学检验科, 贵州遵义 563000; 2. 遵义医学院公共卫生学院流行病与卫生统计学教研室, 贵州遵义 563000; 3. 遵义医学院医学检验系 2009 级, 贵州遵义 563000)

摘 要:目的 观察酪氨酸磷酸酶抗体(IA-2A)、谷氨酸脱羧酶抗体(GADA)、胰岛细胞抗体 64KD(ICA-64KD)、胰岛细胞抗体 40KD(ICA-40KD)、胰岛素抗体(IAA)在 1 型糖尿病(T1DM)、2 型糖尿病(T2DM)和健康人群中的阳性检出率并探讨其临床意义。方法 采用免疫印迹法检测 22 例 T1DM(T1DM 组)、160 例 T2DM(T2DM 组)及 20 例健康人群(健康对照组)血清中的 IA-2A、GADA、ICA-64KD、ICA-40KD 和 IAA 的阳性检出率, 并对其结果进行分析。结果 T1DM 组 IA-2A、GADA、ICA-64KD、ICA-40KD 和 IAA 这 5 种胰岛自身抗体阳性检出率分别为 45.5%、72.7%、45.5%、9.1% 和 9.1%; T2DM 组阳性检出率依次为 23.8%、28.8%、8.8%、3.8%、3.8%, 健康对照组的这 5 种胰岛自身抗体阳性检出率均为 0%。IA-2A 阳性检出率 T1DM 组高于健康对照组($P=0.002$), GADA 阳性检出率 T1DM 组和 T2DM 组均高于健康对照组($P<0.01$, $P=0.005$), T1DM 组高于 T2DM 组($P<0.01$), ICA-64KD 阳性检出率 T1DM 组高于健康对照组($P=0.002$)和 T2DM 组($P<0.01$), 其余各组间比较差异无统计学意义($P>0.017$)。结论 GADA 和 IA-2A 对 T1DM 有诊断价值, GADA 对 T2DM 也有诊断意义, GADA 和 ICA-64KD 对 T1DM 和 T2DM 具有鉴别诊断意义。

关键词: 自身抗体; 糖尿病; 免疫印迹法

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2015.06.021

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2015)06-0768-03

Clinical significance of detection of five kinds of serum pancreas islet auto-antibodies in patients with diabetes mellitus

He Yingzhong¹, Han Niwei¹, Zou Yan², He Can³

(1. Department of Clinical Laboratory, Affiliated hospital of Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou 563000, China;

2. Teaching and Researching Section of Epidemiology and Health Statistics, Zunyi

Medical College, Zunyi, Guizhou 563000, China; 3. Grade 2009, Department of

Laboratory Medicine, Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou 563000, China)

Abstract: Objective To observe the positive rates of five kinds of serum pancreas islet auto-antibodies IA-2A, GADA, ICA-64KD, ICA-40KD, IAA in type 1 diabetes mellitus(T1DM), type 2 diabetes mellitus(T2DM) and the normal population and their clinical significance. **Methods** The above 5 kinds of serum auto-antibodies were detected in 22 cases of T1DM, 160 cases of T2DM and 20 healthy people by using the immunoblotting test. Then the detection results were analyzed. **Results** The positive rates of IA-2A, GADA, ICA-64KD, ICA-40KD and IAA were 45.5%, 72.7%, 45.5%, 9.1% and 9.1% respectively in the T1DM group, 23.8%, 28.8%, 8.8%, 3.8% and 3.8% respectively in the group T2DM, and 0% in the normal control group. The IA-2A positive rate in the T1DM group was higher than that in the healthy control group($P<0.05$). The positive rate of GADA in the T1DM group and T2DM group was higher than that in the healthy control group($P<0.01$, $P=0.005$), the T1DM group was higher than the T2DM group($P<0.01$), the positive rate of ICA-64KD in the T1DM group was higher than that in the healthy control group and the T2DM group($P=0.002$, $P<0.01$), the differences in the comparison among other groups had no statistical significance($P>0.017$). **Conclusion** GADA and IA-2A have the diagnostic value to T1DM, GADA also has the diagnostic significance to T2DM, GADA and ICA-64KD have the differentiating diagnostic significance to T1DM and T2DM.

Key words: autoantibody; diabetes mellitus; immunoblotting test

糖尿病(DM)是以慢性高血糖为特征、以脂糖代谢紊乱为主要表现的一组代谢性疾病。是由于各种不同的原因通过胰岛 β 细胞分泌胰岛素不足或(和)周围组织细胞对胰岛素的生物效应有抵抗或耐受作用, 或者两者兼有而致血糖升高^[1]。根据 DM 临床表现主要分为 1 型糖尿病(T1DM)或称胰岛素依赖型糖尿病(IDDM)和 2 型糖尿病(T2DM)或称非胰岛素依赖型糖尿病(NIDDM)两大类。T1DM 是由于自身免疫系统错误地攻击和损伤胰岛 β 细胞, 致使胰岛素合成和分泌减少或缺乏引起的自身免疫性疾病; T2DM 是以胰岛素抵抗(IR)为主伴胰岛素分泌不足, 致胰岛素分泌不足为主, 伴胰岛素抵抗^[2]。因此对 DM 确诊分型是对其实施预防和治疗的前提。近年来

胰岛自身抗体在 DM 分型和治疗中的作用日趋突显。本研究通过对 22 例 T1DM 患者、160 例 T2DM 患者及 20 例健康人群酪氨酸磷酸酶抗体(IA-2A)、谷氨酸脱羧酶抗体(GADA)、胰岛细胞抗体 64KD(ICA-64KD)、胰岛细胞抗体 40KD(ICA-40KD)、胰岛素抗体(IAA)这 5 种胰岛自身抗体的检测, 比较 T1DM、T2DM 和健康人群阳性检出率间的差异, 探讨 5 种胰岛自身抗体在糖尿病诊断和分型中的意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2012 年 5 月至 2013 年 1 月遵义医学院附属医院收集 22 例 T1DM 患者(T1DM 组), 男 12 例, 女 10 例, 年龄 23~45 岁, 平均 49.1 岁, 160 例 T2DM 患者(T2DM 组), 男

106 例、女 54 例,年龄 20~83 岁、平均 58.1 岁,以上诊断符合 1999 年世界卫生组织(WHO)公布的《糖尿病最新诊断标准》^[3]。另选取遵义医学院附属医院体检中心健康人群体检者 20 例作为健康对照组,男 14 例,女 6 例,年龄 33~82 岁,平均 47.9 岁。

1.2 方法 IA-2A、GADA、ICA-64KD、ICA-40KD 和 IAA 检测采用免疫印迹法,试剂购自于深圳伯劳特生物有限公司,仪器为 VERY Tech 生产的 VT-BT3.0 摇摆平台。严格按照厂家提供的参数和操作说明书进行检测。结果判读:比照标准带模板,抗体位置着色深于 Cut off 值者为阳性,否则为阴性。再参比标准带位置判别出何种抗体。在检测标本的同时检测阳性质控品,质控品在控时实验有效。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.00 软件进行处理,资料均为分类资料,以阳性检出率对其进行描述,三组间差异比较采用 χ^2 检验,不满足 χ^2 检验条件的采用 Fisher 确切概率法,检验

水准为 0.05,三组间有差异后的两两比较再进行 χ^2 分割检验,检验水准调整为 0.017。

2 结 果

3 组血清 5 种胰岛自身抗体阳性检出率比较见表 1。三组间 IA-2A 阳性检出率比较差异有统计学意义($P=0.003$),T1DM 组高于健康对照组($P=0.002$),T2DM 组与健康对照组、T2DM 组与 T1DM 组差异无统计学意义($P>0.017$)。三组间 GADA 阳性检出率比较差异有统计学意义($P=0.003$),T1DM 组高于健康对照组($P<0.01$),T2DM 组高于健康对照组($P=0.005$),T1DM 组高于 T2DM 组($P<0.01$)。三组间 ICA-64KD 阳性检出率比较差异有统计学意义($P<0.01$),T1DM 组高于健康对照组($P=0.002$),T2DM 组与健康对照组比较差异无统计学意义($P>0.017$),T1DM 组高于 T2DM 组($P<0.01$)。三组间 ICA-40KD 和 IAA 阳性检出率比较差异无统计学意义($P=0.367$)。

表 1 3 组血清 5 种胰岛自身抗体检测结果比较[n(%)]

组别	n	IA-2A	GADA	ICA-64KD	ICA-40KD	IAA
健康对照组	20	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
T1DM 组	22	10(45.5)*	16(72.7)*	10(45.5)*	2(9.1)	2(9.1)
T2DM 组	160	38(23.8)	46(28.8)*▲	14(8.8)▲	6(3.8)	6(3.8)

*: $P<0.017$,与健康对照组比较;▲: $P<0.017$,与 T1DM 组比较。

3 讨 论

胰岛自身抗体是一组针对胰岛细胞内抗原成分为靶抗原的血清自身抗体的总称,主要有 IA-2A、GADA、ICA、IAA 等^[4]。其中 GADA 是 T1DM 出现最早、持续时间最长,阳性检出率较高、最具特异性的自身抗体^[5]。GADA 与谷氨酸脱羧酶结合,可干扰胰岛素的分泌与合成,其阳性提示内源性胰岛素的缺乏或丧失^[6]。IA-2A 是胰岛细胞免疫的早期成分,是近年来新发现的一种重要的胰岛自身抗体^[7],检测 IA-2A 对 T1DM 的诊断和预测有重要的临床意义,而在 T2DM 中研究和报道较少,国外研究报道阳性检出率仅为 0.1~3.0%^[8]。ICA 是发现和应用最早的胰岛自身抗体,随着病程的延长,阳性检出率下降最快^[9],但其阳性检出率报道各异。IAA 存在于接受过外源性胰岛素治疗过的患者体内,阻止胰岛素发挥其生物活性,但不能预测糖尿病,只能作为糖尿病患者自身抗体的标志^[10]。

本研究结果显示 T1DM 组 5 种胰岛自身抗体的阳性检出率分别为 45.5%、72.7%、45.5%、9.1%和 9.1%;T2DM 组阳性检出率依次分别为 23.8%、28.8%、8.8%、3.8%、3.8%;健康对照组的 5 种胰岛自身抗体阳性检出率均为 0%。三组间 IA-2A 阳性检出率比较差异有统计学意义($P=0.003$),T1DM 组高于健康对照组($P=0.002$)。三组间 GADA 阳性检出率比较差异有统计学意义($P=0.003$),T1DM 组高于健康对照组($P<0.01$),T2DM 组高于健康对照组($P=0.005$),T1DM 组高于 T2DM 组($P<0.01$)。三组间 ICA-64KD 阳性检出率比较差异有统计学意义($P<0.01$),T1DM 组高于健康对照组($P=0.002$),T1DM 组高于 T2DM 组($P<0.01$)。三组间 ICA-40KD 和 IAA 阳性检出率比较差异无统计学意义($P=0.367$)。结果表明 IA-2A、GADA 和 ICA-64KD 三种胰岛自身抗体对 DM 有一定的诊断价值,ICA-40KD 和 IAA 对 DM 诊断意义有限,只是本次研究的 T1DM 患者和健康对照人群较

少,未能发现对 T1DM 患者的诊断价值,还可进一步扩大样本再观察对该疾病的诊断作用。GADA 和 ICA-64KD 在 T1DM 患者组中均高于 T2DM 患者组,表明 GADA 和 ICA-64KD 对 DM 的分型诊断有临床指导意义,而 IA-2A 对 DM 的分型诊断价值还不清楚,但样本仍提示 T1DM 患者可能高于 T2DM 患者,此指标还有待扩大样本进一步观察研究。

综上所述,GADA 诊断价值较高,对 T1DM 和 T2DM 的诊断和鉴别诊断均有意义,ICA-64KD 对 T1DM 与 T2DM 的鉴别有一定的诊断价值,IA-2A 对 T1DM 诊断有价值,值得临床广泛应用。

参考文献

[1] 陆永绥. 糖尿病基础知识讲座[J]. 检验与临床,2002,10(5):20-23.

[2] 郭莉,单路娟,邱阳,等. 糖尿病患者血清 GAD-Ab、ICA、IAA 联合检测的临床意义[J]. 大连医科大学学报,2004,26(2):136-138.

[3] Lenzi L, Mirri S, Generoso M, et al. Thyroid autoimmunity and type 1 diabetes in children and adolescents: screening data from Juvenile Diabetes Tuscany Regional Centre[J]. Acta Biomed, 2009,80(3):203-206.

[4] Wenzlau JM, Juhl K, Yu L, et al. The cation efflux transporter ZnT8(Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007,104(43):17040-17045.

[5] Kaufman DL, Tobin AJ. Glutamate decarboxylases and autoimmunity in insulindependent diabetes[J]. Trends Pharmacol Scil, 1993,14(1):107-108.

[6] Borg H, Gottsäter A, Fernlund P, et al. A 12 year prospective study of the relationship between islet antibodies and beta cell function at and after the diagnosis in patients with adult-onset diabetes[J]. Diabetes, 2002,51(6):1754-1762.

[7] Kawasaki E, Nakamura K, Kuriya G, et al. Autoantibodies to insulin, insulinoma-associated antigen-2, and zinc trans- (下转第 771 页)

未被相应抗体致敏。

1.3.2 MGIA 间接法测定游离血小板抗体 (1)应用抗凝管采集被检对象静脉血 2~5 mL,轻轻摇动混匀 2 min,离心 2 000 r/min,5 min,取上清。(2)取微柱凝胶血小板检测卡,标记 S、N、P(S 受检标本、N 阴性对照、P 阳性对照)。将 S 孔加入受检者血清、N 孔加入阴性血清、P 孔加入阳性血清,然后每孔依次加入稀释液、血小板广谱裂解抗原、指示红细胞各 50 μ L。(3)将卡置 37 $^{\circ}$ C 孵育 15 min。(4)应用 MGIA 专用离心机离心。(5)在阴性对照成立的条件下,判定结果;阳性结果表明受检者血清中存在加入的血小板相对应的血小板抗体。阴性结果表明受检者血清中不存在加入的血小板相对应的血小板抗体。

1.3.3 FCM 检测血小板抗体 (1)将 0.109 mol/L 枸橼酸钠 400 μ L 注入全血 3 mL 混匀,790 r/min 离心 15 min。(2)取血浆加 1 mL 2%PFA,避光固定 15 min。(3)5 000 r/min 离心 5 min。(4)弃上清后加 2 mL PBS 混匀,5 000 r/min 离心 5 min。(5)弃上清,混匀。(6)配置抗体,根据血小板计数配置抗体,血小板 3×10^9 /L 加 1 μ L,血小板 $(4\sim 5)\times 10^9$ /L 加 1.5 μ L,血小板 $(5\sim 7)\times 10^9$ /L 加 2 μ L,血小板计数大于 7×10^9 /L 加 2.5 μ L。(7)取 1 支上样管标记阳性对照,加 5 μ L 浓血小板悬液,10 μ L 抗体,另取 1 支上样管标记阴性对照,加 5 μ L 浓血小板悬液。(8)混匀,避光 20 min,加 0.5 mL PBS 上机。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计学软件,计数资料采用 χ^2 检验进行比较, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

血小板抗体检测结果显示,FCM 阳性率为[37(25.3%)],MGIA 直接法阳性率为[31(21.2%)],MGIA 间接法阳性率为[18(12.3%)],MGIA 间接法和 FCM 血小板抗体阳性率比较差异有统计学意义($P<0.05$)。

3 讨 论

新生儿血小板减少的原因常见的有获得性免疫性、感染性、药物性、遗传性等,但以获得性免疫性为主。实验所观察的 146 例血小板减少患儿样本,血小板计数为 $(23\sim 85)\times 10^9$ /L,平均 50.9×10^9 /L。NAIT 是由于胎儿和母亲血小板血型不合,免疫母体产生的敏感性同种抗体引起,抗体经胎盘进入胎儿体内,与新生儿血小板抗原反应后在经过网状内皮系统时被破坏而导致胎儿和新生儿血小板减少症,类似新生儿 Rh 溶血病。研究表明^[6-7],约 2.5% 的妊娠妇女会产生血小板抗体,Castro 等^[8]在巴西新生儿中筛查 FNAIT 中,发现其发病率为 1.5% 左右,Ohto 等^[9]对亚洲人群中频率较低的 HPA-4b 阴性孕妇中检出相应抗体的阳性率为 24%,其中 26% 发展为 FNAIT。

MGIA 直接法测定致敏血小板,检测血小板是否已经在体内与相应的抗体发生免疫反应。实验中在微柱凝胶中依次加

入被检血小板、稀释液、指示红细胞;如果被检血小板已被致敏,即血小板抗体的 Fab 段与血小板抗原结合,Fc 段游离;同时指示细胞上包被的鼠抗人血小板单克隆抗体的 Fab 段也结合血小板抗原,形成人血清抗血小板抗体-血小板-指示红细胞复合物。相邻的复合物上血小板抗体 Fc 段通过凝胶中抗人球蛋白连接成网状凝集复合物,即以抗人球蛋白为桥,形成免疫凝集复合物。该复合物在一定离心力下,浮于胶表面或胶中,出现肉眼可见的凝集反应,即阳性反应,表示在体内血小板与相应的抗体已经发生了免疫反应,即已经被致敏。由于血小板本身有易活化自凝聚的特点,实验中使用血小板保存缓冲液,同时把孵育时间和温度进行适当的调节,杜绝了假阳性的发生,确保了整个检测过程的顺利完成。

通过比较可见,MGIA 间接法灵敏度较差,MGIA 直接法对 NAIT 检测与 FCM 检测结果相似,但操作简单方便,实验时间短,设备要求低、结果判读直观,重复性较好,实验试剂成本较低,值得推广运用。此种检测方法的建立将有助于 NAIT 的早期确诊,对预防 NAIT 引起的颅内出血,减少颅内出血引起的病死率和神经系统后遗症具有重要意义。

参考文献

- [1] Metcalfe P, Watkins NA, Ouwehand WH, et al. Nomenclature of human platelet antigens[J]. Vox Sang, 2003, 85(3): 240-245.
- [2] Metcalfe P. Platelet antigens and antibody detection[J]. Vox Sang, 2004, 87(1): 582-586.
- [3] Nguyen XD, Dugrillon A, Beck C, et al. A novel method for simultaneous analysis of specific platelet antibodies: SASPA[J]. Br Haematol, 2004, 127(2): 552-553.
- [4] 李岚, 薛俭成, 党鑫堂. 血小板抗体检测的方法学研究[J]. 中国现代医学杂志, 2008, 30(17): 2554-2556.
- [5] 程洪波. 微柱凝胶技术检测血小板抗体[J]. 现代诊断与治疗, 2007, 20(2): 79-80.
- [6] Boehlen F, Bulla O, Michel M, et al. HPA-genotyping and anti-platelet antibodies in female blood donors[J]. Hematol J, 2003, 4(6): 441-444.
- [7] Kiefel V, Konig C, Kroll H, et al. Platelet alloantibodies in transfused patients[J]. Transfusion, 2001, 41(6): 766-770.
- [8] Castro V, Kroll H, Origa AF, et al. A prospective study on the prevalence and risk factors for neonatal thrombocytopenia and platelet alloimmunization among 9332 unselected Brazilian newborns[J]. Transfusion, 2007, 47(1): 59-66.
- [9] Ohto H, Miura S, Ariga H, et al. The natural history of maternal immunization against foetal platelet alloantigens [J]. Transfus Med, 2004, 14(6): 399-408.

(收稿日期: 2014-11-05)

(上接第 769 页)

- porter 8 improve the prediction of early insulin requirement in adult-onset autoimmune diabetes[J]. Clin Endocrinol Metab, 2010, 95(2): 707-713.
- [8] Hawa M, Fava D, Medici F, et al. Antibodies to IA-2 and GAD65 in type 1 and type 2 diabetes[J]. Diabetes Care, 2000, 23(2): 228-233.
- [9] 毕永春, 胡伟, 张葵. 2 型糖尿病患者血清中 4 种胰岛自身抗体检

测的临床意义[J]. 现代医学, 2011, 39(6): 647-649.

- [10] Achenbach P, Schlosser M, Williams AJ, et al. Combined testing of antibody titer and affinity improves insulin autoantibody measurement; diabetes antibody standardization program[J]. Clin Immunol, 2007, 122(1): 85-90.

(收稿日期: 2014-11-08)