

· 论 著 ·

# 实时荧光 PCR 法和流式细胞术检测 HLA-B27 的结果分析

叶阿里, 窦亚玲<sup>△</sup>, 孔令君, 张 睿, 伊 洁

(中国医学科学院北京协和医院检验科, 北京 100730)

**摘要:**目的 比较实时荧光 PCR 法和流式细胞术两种方法检测人类白细胞抗原 B27(HLA-B27)的临床应用价值。方法 分别采用实时荧光 PCR 法和流式细胞术两种方法检测 225 例疑似强直性脊柱炎患者血中 HLA-B27, 比较和分析两种方法的检测结果。结果 95.11% 样本检测结果相同, 差异不具有统计学意义( $P > 0.05$ ), 将存在差异的标本进行基因测序后, 结果与实时荧光 PCR 的检测结果一致。结论 两种方法检测 HLA-B27 均具有较高的灵敏度和特异度, 实时荧光 PCR 法在结果的准确性上更优于流式细胞术。

**关键词:**HLA-B27; 荧光 PCR; 流式细胞术; 脊柱炎

**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2017.07.009

**文献标识码:**A

**文章编号:**1673-4130(2017)07-0892-03

## Analysis on HLA B27 results detected by real-time fluorescence PCR method and flow cytometry

YE Ali, DONG Yaling<sup>△</sup>, KONG Lingjun, ZHANG Rui, YI Jie

(Department of Clinical Laboratory, Peking Union Medical College Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing Union Medical College, Beijing 100730, China)

**Abstract: Objective** To compare the clinical application value of the real-time fluorescence PCR method and flow cytometry method for detecting human leukocyte antigen B27(HLA-B27). **Methods** Blood HLA-B27 level in 225 patients with suspected ankylosing spondylitis was detected by using real-time fluorescence PCR method and flow cytometry method. The detection results were compared and analyzed between the two methods. **Results** The results of 95.1% sample were identical detected by two methods without statistically significant difference( $P > 0.05$ ). Taken the results of flow cytometry as reference, the sensitivity of real-time fluorescence PCR for detecting HLA-B27 was 94%, the specificity was 96%. Gene sequencing was performed if results of a sample detected by two methods were different, which was identical with the result detected by real-time fluorescence PCR. **Conclusion** Both methods for detecting HLA-B27 all have high sensitivity and specificity. Real-time fluorescence PCR method is more superior to the flow cytometry method in the results accuracy.

**Key words:**HLA-B27; real-time PCR; flow cytometry; spondylitis

人类白细胞抗原 B27(HLA-B27)为一种主要组织相容性复合体(MHC) I 类分子, 是位于 HLA B 座位上的一组等位基因, 具有极高的多态性。现代研究表明, HLA-B27 与强直性脊柱炎(ankylosing spondylitis, AS)的发生密切相关。AS 为主要侵犯脊柱, 并可不同程度地累及骶髂关节和周围关节的慢性进行性炎性疾病, 是以骶髂关节和脊柱附着点炎症为主要症状, 类风湿因子阴性, 发病原因尚不明确的自身免疫性疾病, 有一定遗传性。AS 可侵犯全身多个系统, 并伴发多种疾病, 因此, 对 AS 的早期诊断尤显重要。目前, 已明确 AS 与 HLA-B27 强关联, 所以快速、准确的检测 HLA-B27, 对辅助临床诊治尤为重要<sup>[1-3]</sup>。目前检测 HLA-B27 的常见方法有: 流式细胞术检查法、微量细胞毒试验、酶联免疫法, 以及 PCR 方法。微量细胞毒试验, 需新鲜血至少 2 mL, 要有足够数量及活力的淋巴细胞, 对于不同厂家、不同批号的血清定型板, 检验结果会有一定的差异, 实验操作近 5 h, 实验结果的判断很大程度上依赖于检验者的经验和主观评价, 很难实现标准化, 影响实验结果的准确性。酶联免疫法检测的灵敏度和特异度均不理想。流式细胞术检查法是将单克隆抗体(mAb)与外周血共孵育, 裂解红细胞, 洗涤固定后, 上机检测。本法为抗原检测, 检测需要新鲜血, 且需具备流式细胞仪。而流式细胞仪本身费用较高, 不适合多数医院。传统的 PCR 方法如 PCR-SSP 法等需要

在扩增后进行凝胶电泳, 检测时间较长, PCR 扩增后需开盖加样检测, 具有一定的污染性, 染料具有致癌性, 致使其应用受限。近年来发展迅速的实时荧光 PCR 技术, 可实时监测 PCR 扩增的每一循环荧光信号的变化, 无需扩增后的处理, 直接分析结果, 已越来越多的应用于实验检测<sup>[4]</sup>。本研究采用实时荧光 PCR 法和流式细胞术检测 HLA-B27, 比较和分析两种方法的结果, 探讨其临床应用价值。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 收集 2015 年 2—10 月北京协和医院门诊和住院患者 EDTA 抗凝血标本 225 例, 其中男 133 例, 女 92 例, 年龄 4~68 岁, 平均 35.3 岁。

#### 1.2 仪器与试剂

**1.2.1 荧光 PCR 法所用仪器** 为 Roche 公司的 LightCycler 480 II, 试剂为江苏默乐生物科技有限公司生产的 HLA-B27 核酸检测试剂盒(荧光 PCR 法)。

**1.2.2 流式细胞法** 采用美国 BD 公司生产的 FACS Calibur 流式细胞仪, 其试剂购于美国 BD 公司, HLA-B27 检测试剂盒(流式细胞法)。

#### 1.3 方法

**1.3.1 实时荧光 PCR 法** 采用江苏默乐生物科技有限公司生产的 HLA-B27 核酸检测试剂盒中配套的提取试剂, 对样本

进行核酸提取,经过紫外分光光度计测定核酸浓度及纯度,确保提取的核酸符合实验要求。按说明书步骤进行扩增。该试剂在第 3 外显子上设计 B2704 和 B2705 特异度引物和探针,内标设计于 K-ras 基因保守区域,为非竞争性内标。其中目的基因检测探针使用 FAM 荧光标记,内标基因检测探针使用 HEX 荧光标记。

**1.3.2 流式细胞术** 反应管中加入 15  $\mu$ L 的 FITC/CD3PE 抗体试剂和 50  $\mu$ L 的全血,混匀后室温避光静置 10 min,加入 2 mL 稀释为 1 $\times$  的溶血素,混匀后室温避光静置 10 min 后,立即 300 $\times$ g 离心 5 min,弃上清加入 2 mL PBS 洗涤,加入 0.25 mL 含 1% 多聚甲醛的 PBS,混匀后上机检测。用 HLA-B27 的自动分析软件分析结果。

**1.3.3 测序** 将两种检测方法结果不同的 11 例标本进行测序分析。测序公司为生工生物工程(上海)股份有限公司。

**1.3.4 EBV-DNA 检测** 将测序结果为 HLA-F 型的标本进行 EBV-DNA 的检出测定。EBV-DNA 检测试剂为中山大学达安基因股份有限公司生产,检测仪器 Roche 公司的 LightCycler 480 II。

**1.4 统计学处理** 采用 Excel 2007 及 SPSS17.0 统计软件,进行 Kappa 一致性分析。

## 2 结 果

**2.1 两种方法比较** 225 例标本,用实时荧光 PCR 法检测,HLA-B27 基因阳性 100 例,阴性 125 例;用流式细胞术检测,阳性标本 99 例,阴性 124 例,结果可疑标本 2 例(按阴性计算)。有 11 例结果不一致。两种方法的总符合率为 95.11%,Kappa 值为 0.95,两种检测方法的一致性较高,见表 1。

表 1 实时荧光 PCR 与流式细胞术检测法四格表(n)

实时荧光 PCR 检测法	流式细胞术检测法		合计
	阳性	阴性	
阳性	94	6	100
阴性	5	120	125
合计	99	126	225

**2.2 不同结果的测序验证** 将两种方法 11 例结果不一致的标本进行测序确认,6 例样本(4 例流式细胞术检测为阴性及 2 例流式细胞术检测为可疑的样本)PCR 方法结果均为阳性,测序结果基因型为 HLA-B27 型。另外 5 例样本(流式细胞术检测阳性,PCR 结果阴性),测序结果基因型为 HLA-F 型。结果显示 11 例样本测序结果与荧光 PCR 法完全一致。

**2.3 将测序结果基因型为 HLA-F 型的 5 例标本进行 EBV-DNA 的检出测定** 其中 1 例为阳性,700 copies/mL,1 例可疑,150 copies/mL,3 例阴性(EBV-DNA 的参考范围: $\geq$ 500 copies/mL 为阳性,0 $\sim$ <500 copies/mL 为可疑,0 copies/mL 为阴性)。

## 3 讨 论

AS 是一种慢性、进行性和炎性疾病,主要累及骶髂关节和脊柱软组织及四肢关节,严重侵犯了人体健康。AS 的早期诊断对 AS 患者非常重要,目前该病的确诊方法主要依靠临床表现,影像学 and 实验室的检查结果,进行 HLA-B27 检测已成为辅助临床诊断强直性脊柱炎的重要手段。自 1973 年 Brewerton 等<sup>[3]</sup>首次报道 HLA-B27 和 AS 相关 40 余年以来,大量研究报道证实了 AS 和 HLA-B27 的强相关性。AS 患者 HLA-

B27 阳性率为 90% 以上,而在健康人群中仅为 6%~8%。目前最常见检测 HLA-B27 的两种方法:实时荧光 PCR 法和流式细胞术<sup>[4-8]</sup>。本研究将这两种方法进行比对分析,以期临床提供更有效、准确的检测方法。通过对 225 例临床样本进行分析比对,结果显示,两种方法的符合率为 95.11%,特异度和灵敏度均符合临床检测需要。

分析 11 例检验结果不同的样本,两种方法检测结果不相同的样本数占总数的 4.89%。测序结果与荧光 PCR 方法检测结果一致。荧光 PCR 技术检测的是 HLA-B27 的基因型,而流式细胞术检测的是 HLA-B27 的表型,两种方法检测的原理不同。如果样本携带 HLA-B27 基因,但抗原不表达或表达较弱,则会造成荧光 PCR 法检测结果阳性,而流式细胞术结果阴性。测序复检结果与荧光 PCR 检测法的一致,说明该试剂盒在检测 HLA-B27 基因上具有较高的准确度和灵敏度。另外,流式细胞术检测是基于抗原抗体反应,对单个细胞或生物粒子进行分析,荧光标记的单克隆抗体与细胞表面的 HLA-B27 抗原相结合,被荧光染色的细胞形成的荧光信号强度代表了所测细胞膜表面抗原的强度。流式细胞术较方便,检测时间不长,但需要特定的仪器设备,对检测样本要求较高,需要新鲜血标本,以确保其表面标志不丢失,但易受感染、抗体交叉反应等因素影响,易出现假阳性或假阴性。已知 HLA-B27 与 HLA-B7,HLA-B44 等存在交叉反应,多数文献报道流式细胞术测定 HLA-B27 的假阳性结果,大多是由于 HLA-B7 的干扰<sup>[8-9]</sup>。本研究结果显示,流式细胞术检测阳性,PCR 结果阴性的 5 例样本,其测序结果基因型均为 HLA-F 型,这与大多数的报道有所不同。HLA-F 是具有生物活性的 MHC-IIb 类分子,具有相对较低的多态性,与 MHC-Ia 类分子在各核细胞上均有表达不同,HLA-F 仅表达在少数细胞上。目前公认的仅 EBV 转染的 B 淋巴细胞系能在细胞表面表达 HLA-F 抗原。HLA-F 能在 B 淋巴细胞的胞内表达,体外转染的 EBV 病毒在细胞内增殖可能改变了 HLA-F 的结构,从而使 HLA-F 抗原转运到细胞表面<sup>[9-10]</sup>。将本实验中 5 例 HLA-F 型的样本进行 EBV-DNA 检测,1 例阳性,1 例可疑,3 例阴性,部分与上述研究一致。但是否因此导致流式细胞术检测结果阳性而 PCR 方法检测为阴性的样本,还需要大量数据进一步的验证。研究证明:抗原肽转运相关蛋白(TAP)曾经与 HLA-F 结合,但后又分离,在此过程中它可能与 TAP 的某些特殊蛋白结合,这些蛋白只有在某些免疫原刺激下才会产生,因而 HLA-F 只有在一定条件下才会在细胞表面表达<sup>[11]</sup>。Lee 和 Geraghty 用 HLA-F 重链免疫 HLA-B27 转基因鼠产生抗 HLA-F 的单克隆抗体(3D11、4A11 和 3D12),发现在膀胱、皮肤、肝细胞系和 B 淋巴细胞系内均表达 HLA-F,而 EBV 转染的 B 细胞和一些单核细胞表面能检测到 HLA-F 的表达。HLA-F 是否和 HLA-B7 一样与 HLA-B27 存在抗原交叉反应,从而导致流式细胞术检测结果阳性? 目前没有相关的报道,可以进一步的研究分析。

实时荧光 PCR 技术日臻成熟,对样本要求低,操作简单,操作规范,几乎无污染,可高通量,已被越来越多的检测机构接受。HLA-B27 基因型不受细胞状态及表面构象影响,且能够避免与 HLA-B7 的交叉反应。尽管 HLA-B27 的检测结果不能作为诊断依据,但可以作为辅助诊断重要指标之一,尤其在患者临床体征、症状显示为炎性关节病或脊柱关节炎时,HLA-B27 阳性提示发生 AS 的可能性大。

综上所述,实时荧光 PCR 法和流式细胞术在检测 HLA-

B27 的灵敏度和特异度上均具有较高的临床适用性。实时荧光 PCR 技术易于标准化,准确性高,更具优势。

### 参考文献

- [1] Van den Berg R, Hooge M, Van Gaalen F, et al. Percentage of patients with spondyloarthritis in patients referred because of chronic back pain and performance of classification criteria: experience from the Spondyloarthritis Caught Early (SPACE) cohort[J]. *Rheumatology(Oxford)*, 2013, 52(8): 1492-1499.
- [2] Liu X, Li YR, Hu LH, et al. High frequencies of HLA-B27 in Chinese patients with suspected of ankylosing spondylitis[J]. *Rheumatol Int*, 2010, 30(10): 1305-1309.
- [3] Brewerton DA, Cafrey M, Hart FD, et al. Ankylosing spondylitis and HLA-B27[J]. *Lancet*, 1973, 27(9): 904.
- [4] Roelandse-Koop EA, Buisman B, Vanhannen EJ, et al. Rapid HLA-B27 screening with real-time TaqMan PCR: a clinical validation in the Dutch population [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2011, 49(12): 1979-1985.
- [5] 侯伟,许晓东. 2 种 HLA-B27 检测方法在强直性脊柱炎诊断中的比较[J]. *国际检验医学杂志*, 2014, 35(24): 3398-3400.
- [6] 陈慧毅,褚为靖,张会英,等. 实时荧光 PCR 法与流式细胞术两种方法检测 HLA-B27 的比较[J]. *中国实验诊断学*, 2012, 16(12): 2251-2254.

- [7] 贺秋萍,隋秀丽. 流式细胞术检测 HLA-B27 抗原在强直性脊柱炎诊断中的价值[J]. *中国误诊学杂志*, 2008, 8(27): 6654-6655.
- [8] 刘毓刚,李琳. 流式细胞法检测人类白细胞抗原 B27/B7 表达在诊断强直性脊柱炎中的价值[J]. *国际检验医学杂志*, 2012, 33(2): 138-140.
- [9] 李伯利,陈葆国,徐丹萍,等. HLA-E、HLA-F 及 HLA-G 与母胎免疫耐受研究进展[J]. *医学研究杂志*, 2013, 42(1): 178-179.
- [10] Jucaud V, Ravindranath MH, Terasaki PI, et al. Serum antibodies to human leucocyte antigen (HLA)-E, HLA-F and HLA-G in patients with systemic lupus erythematosus (SLE) during disease flares: Clinical relevance of HLA-F autoantibodies[J]. *Clin Exp Immunol*, 2016, 183(3): 326-340.
- [11] Goodridge JP, Lee N, Burian A, et al. HLA-F and MHC-I Open Conformers Cooperate in a MHC-I Antigen Cross-Presentation Pathway [J]. *J Immunol*, 2013, 191(14): 1567-1577.
- [12] Lee N, Geraghty DE. HLA-F surface expression on B cell and monocyte cell lines is partially independent from tapasin and completely independent from TAP[J]. *Immunol*, 2003, 171(50): 5264-5271.

(收稿日期:2016-08-23 修回日期:2016-11-25)

(上接第 891 页)

可适当应用一些调节免疫功能的药物<sup>[12]</sup>。及早干预患儿机体疾病免疫的进程,以避免或减少继发性损害的发生。

### 参考文献

- [1] Zaffanello M, Brugnara M, Franchini M. Therapy for children with Henoch-Schonlein purpura nephritis: a systematic review[J]. *Sci World J*, 2007(1): 20-30.
- [2] Donadio ME, Loiacono E, Peruzzi L, et al. Toll-like receptors, immunoproteasome and regulatory T cells in children with Henoch-Schonlein purpura and primary IgA nephropathy[J]. *Pediatr Nephrol*, 2014, 29(9): 1545-1551.
- [3] 张之南,沈悌. 血液病诊断及疗效标准[M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2007: 168-170.
- [4] Johnson EF, Lehman JS, Wetter DA, et al. Henoch-Schonlein purpura and systemic disease in children: retrospective study of clinic findings, histopathology and direct immunofluorescence in 34 paediatric patients[J]. *Br J Dermatol*, 2015, 172(5): 1358-1363.
- [5] Chang H, Zhang QY, Lin Y, et al. Correlation of TLR2 and TLR4 expressions in peripheral blood mononuclear cells to Th1 and Th2-type immune responses in children with Henoch-Schonlein purpura[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(8): 13532-13539.
- [6] Li YY, Li CR, Wang GB, et al. Investigation of the change in CD4(+) T cell subset in children with Henoch-Schon-

lein purpura[J]. *Rheumatol Int*, 2012, 32(12): 3785-3792.

- [7] Yuan LP, Ling L, Bo H. T-cell immunoglobulin and Mucin-domain-containing molecule-1 in peripheral blood mononuclear cells in Henoch-Schonlein purpura[J]. *Indian Pediatrics*, 2012, 49(3): 225-227.
- [8] Jen HY, Chuang YH, Lin SC, et al. Increased serum interleukin-17 and peripheral cells in children with acute Henoch-Schonlein purpura [J]. *Pediatr Allergy Immunol*, 2011, 22(8): 862-868.
- [9] Dorothy Y. The role of CD2 family members in NK-cell regulation of B-cell antibody production[J]. *Antibodies*, 2014, 3(1): 1-15.
- [10] Yang YH, Chuang YH, Wang LC, et al. The immunobiology of Henoch-Schonlein purpura [J]. *Autoimmu Rev*, 2008, 7(3): 179-184.
- [11] Li YH, Feng XC, Huang L, et al. Hematologic and immunological characteristics of Henoch-Schonlein purpura in rat and rabbit models induced with ovalbumin based on type III hypersensitivity[J]. *Sci Rep*, 2015, 5(1): 1-6.
- [12] Ohara S, Kawasaki Y, Miyazaki K, et al. Efficacy of cyclosporine A for steroid-resistant severe Henoch-Schonlein purpura nephritis[J]. *Fukushima J Med Sci*, 2013, 59(2): 102-107.

(收稿日期:2016-10-21 修回日期:2017-01-23)