

## 抗 SUMO 抗体在原发性胆汁性胆管炎临床诊疗中的价值\*

祁 双<sup>1</sup>, 舒李鑫<sup>2</sup>, 韩崇旭<sup>3△</sup>

(1. 扬州大学医学院 江苏扬州 225009; 2. 南京东南大学生命科学研究院, 江苏南京 210096;

3. 扬州大学临床医学院/江苏省苏北人民医院, 江苏扬州 225001)

**摘要:**目的 通过构建质粒特异性的表达类泛素化修饰物(SUMO), 并初步研究抗 SUMO 抗体在原发性胆汁性胆管炎(PBC)、系统性红斑狼疮(SLE)、类风湿性关节炎(RA)、结缔组织病(CTD)、干燥综合征(SS)多种典型性自身免疫性疾病患者血清中的表达水平, 探究抗 SUMO 抗体是否可作为 PBC 的特异性血清标志物。**方法** 采用 PCR 和 ET 克隆制备含有 SUMO1、SUMO2、SUMO3 片段的质粒, 将其分别导入大肠杆菌进行蛋白的诱导和纯化; 采用斑点印迹法初步筛查 PBC 患者血清样本中抗 SUMO 抗体阳性标本, 并通过 Western blot 进行验证, 获取阳性参考血清; 通过建立的最适抗 SUMO 抗体 ELISA 诊断体系, 分别检测抗 SUMO 抗体 3 种亚型在 PBC、SLE、SS、RA 及 CTD 中的阳性率表达, 并通过  $\chi^2$  检验分析其差异性。**结果** 抗 SUMO 抗体标记物在 PBC 中的特异度高达 99%, 灵敏度保持在 86% 左右; 经  $\chi^2$  检验分析, 抗 SUMO 抗体在 PBC 中的阳性检出率较非 PBC 自身免疫性疾病和健康对照高, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ ); 抗 SUMO 抗体在其他自身免疫性疾病人群(非 PBC 自身免疫性疾病)中的阳性率表达差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。**结论** 高特异度的抗 SUMO 抗体有望成为 PBC 诊断的一种新型抗体, 对于提高 PBC 的临床诊断效率意义重大。

**关键词:**原发性胆汁性胆管炎; 微小泛素相关修饰因子; 特异度抗体; 临床诊断价值**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2019.03.011**中图法分类号:**R575.7;R446.6**文章编号:**1673-4130(2019)03-0298-07**文献标识码:**A

## The value of anti-SUMO antibody in the clinical diagnosis and treatment of primary biliary cholangitis\*

QI Shuang<sup>1</sup>, SHU Lixin<sup>2</sup>, HAN Chongxu<sup>3△</sup>

(1. Medical College of Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009, China;

2. Academy of Life Sciences of Nanjing Southeast University, Nanjing, Jiangsu 210096, China;

3. Clinical Medical College of Yangzhou University/Jiangsu Subei  
People's Hospital, Yangzhou, Jiangsu 225001, China)

**Abstract: Objective** In this study, we constructed a plasmid, specifically expressed SUMO protein, and to study the expression level of anti-SUMO antibody in the serum of patients with primary biliary cholangitis, systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, Connective tissue disease, sjogren's syndrome which were typical of autoimmune diseases. And to investigate whether anti-SUMO antibodies can be used as specific serum markers of PBC. **Methods** Plasmids containing SUMO1, SUMO2 and SUMO3 fragments were prepared by PCR and ET cloning and introduced into E. coli for protein induction and purification, respectively. Dot blot was used to preliminarily screen anti-SUMO antibody-positive specimens from serum samples of PBC patients and were verified by western blot to obtain positive reference serum. Through the establishment of the optimal anti-SUMO antibody ELISA diagnostic system, the positive rates of three subtypes of anti-SUMO antibody in PBC, SLE, SS, RA and CTD were detected, and their differences were analyzed by chi-square test. **Results** The anti-SUMO antibody label has a specificity of up to 99% in PBC and a sensitivity of around 86%. After chi-square test analysis, the positive detection rate of anti-SUMO antibody in PBC was higher than that of non-PBC autoimmune disease and healthy controls ( $P < 0.01$ ). There was no significant difference in the expression of anti-SUMO antibody in other autoimmune disease populations (non-PBC autoimmune diseases) ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** The highly specific anti-SUMO antibody is expected to become a novel antibody for diag-

\* 基金项目: 国家“973”计划子课题项目(2015CB755402-004), 苏北人民医院扶持技术项目(fcjs201748/fcjs201435)。

作者简介: 祁双, 女, 硕士研究生, 主要从事临床检验诊断学研究。△ 通信作者, E-mail: hanchongxu@126.com。

本文引用格式: 祁双, 舒李鑫, 韩崇旭. 抗 SUMO 抗体在原发性胆汁性胆管炎临床诊疗中的价值[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(3): 298-

nosis of PBC, which is of great significance for improving the clinical diagnosis efficiency of PBC.

**Key words:** primary biliary cholangitis; micro-ubiquitin-related modifier; specific antibody; clinical value

原发性胆汁性胆管炎(PBC)是一种最终导致肝硬化和肝衰竭的典型慢性进展性自身免疫性疾病。病变特点是累及病人肝内胆管系统,表现为由自身免疫性 T 细胞引起的非化脓性胆管炎和门静脉浸润,并伴随小叶间的胆管损伤<sup>[1]</sup>。经美国肝病研究协会认可,满足以下 3 大标准任意 2 条即可确诊为 PBC:(1)表明胆汁淤积的生化指标——碱性磷酸酶(ALP)水平的升高;(2)抗线粒体抗体(AMA)阳性;(3)肝组织活检显示非化脓性破坏性胆管炎及小叶间胆管破坏。约 90%~95% PBC 患者可检测出 AMA 的血清自身抗体,与 AMAs 相比,大约 50% PBC 患者具有血清抗核抗体(ANA)的存在<sup>[2]</sup>。ANA 在 PBC 中的致病作用尚不清楚,但了解这些特异性自身抗体的发展过程似乎对解析 PBC 的致病机制至关重要。近来,表达类泛素化修饰物(SUMO)在疾病中的表达研究已初见成效,但其在 PBC 等自身免疫性疾病中的作用才刚刚研究。因此,基于先前的研究结果,笔者旨在探讨 PBC 和其他自身免疫性疾病中抗 SUMO 抗体的表达是否存在差异,抗 SUMO 抗体是否是潜在性的 PBC 特异性抗体。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 本研究将于江苏省各大医院采集的 412 例 PBC 和 596 例其他自身免疫性疾病[包括 296 例系统性红斑狼疮(SLE),103 例干燥综合征(SS),117 例类风湿性关节炎(RA)及 80 例结缔组织病(CTD)]血清样本纳入研究。纳入的 PBC 患者均符合以下几条标准:(1)中国汉族人群;(2)肝脏的生化检测指标碱性磷酸酶(ALP)水平的异常升高;(3)生化指标显示胆汁淤积;(4)抗线粒体抗体/抗线粒体抗体亚型 2(AMA-M2)血清学检测为阳性或 ANA 血清学检测为阳性;(5)无血吸虫感染史;(6)各类肝炎病毒感染以及人类免疫缺陷病毒抗体阴性(乙肝病毒表面抗原阴性、血清中乙肝病毒 DNA 小于 200 拷贝数/mL、血清中丙肝病毒 RNA 小于 500 拷贝数/mL、戊肝抗原阴性、人类免疫缺陷病毒抗体阴性);(7)患者主诉饮酒量小于 100 mL/d。纳入的其他自身免疫性疾病患者满足的条件如下:(1)中国汉族人群;(2)各类肝炎病毒感染以及人类免疫缺陷病毒抗体阴性;(3)ANA 血清学检测为阳性;(4)通过病理结果等手段明确疾病的诊断,确诊为其他自身免疫性疾病中的一种。本课题选用的健康对照人数 500 例,对照来源于东南大学校医院健康体检的汉族人群(健康对照的纳入标准为临床基本检查处于正常范围内,包括临检常规检查和生化常规检查)。其中 PBC 样本包括男

60 例,女 352 例,平均年龄(55.1±11.3)岁。非 PBC 自身免疫性疾病样本包括男 51 例,女 545 例,平均年龄(45.1±14.9)岁。

## 1.2 仪器与试剂

**1.2.1 仪器** 电泳仪(上海天能科技有限公司);PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司);紫外分光光度计(上海美谱达仪器有限公司);凝胶成像系统(上海天能科技有限公司);超声波细胞破碎仪 XO-650D(南京先欧仪器制造有限公司);狭缝式杂交点样器(乐购化工仪器 BJKP-KP-31A);冷冻离心机(德国 Eppendorf 5810R)。

**1.2.2 试剂** DNA 6×Loading Buffer(日本 TAKARA 公司);明胶(美国 SIGMA 公司);脱脂奶粉(德国 BIOFROXX 公司);Western Blot 化学发光 HRP 底物 ECL 发光液(美国 Millipore 公司);孔径 0.22μm 的 PVDF 膜(美国 Millipore 公司);HRP 标记山羊抗人 IgG 二抗(南京金斯瑞生物科技有限公司);96 孔酶标板(美国 Thermo 公司);Tween-20(美国 BIOSHARP 公司)。

## 1.3 方法

**1.3.1 菌种和质粒** pET-28a 质粒购自南京金斯瑞生物科技有限公司;GB05-Dir 大肠杆菌、BL21-DE3 等由本实验室保存。

**1.3.2 引物的设计与合成** 利用 NCBI 找到 SUMO1、SUMO2、SUMO3 3 种蛋白的编码序列,分别设计 3 对引物对 3 种目的片段进行 PCR 扩增。其中 SUMO1 蛋白上游引物 FP:AGA AGG AGA TAT ACC ATG GGC ATG TCT GAC CAG GAG GCA,下游引物 RP:GTG GTG GTG GTG GTG CTC GAG AAC TGT TGA ATG ACC CCC;SUMO2 蛋白上游引物 FP:AGA AGG AGA TAT ACC ATG GGC ATG GCC GAC GAA AAG CCC,下游引物 RP:GTG GTG GTG GTG GTG CTC GAG GTA GAC ACA TCA CGT CTG;SUMO3 蛋白上游引物 FP:TTA AGA AGG AGA TAT ACC ATG TCC GAG GAG AAG CCC AAA GAG,下游引物 RP:GTG GTG GTG GTG GTG CTC GAG GAA ACT GTG CCC TGC CAA GCT。

**1.3.3 人 SUMO1、SUMO2、SUMO3 基因原核表达载体的构建** 利用聚合酶链式反应(PCR)扩增 3 种目的蛋白的 DNA 片段。PCR 反应体系为:95℃,预变性 3 min,95℃变性 30 s,60℃复性 30 s,72℃延伸 35 s,30 个循环后 72℃ 5min 终止反应。选择已构建好的含 His 标签序列的 pET-28a 质粒,根据多克隆位

点以 NcoI 和 XhoI 作为酶切位点,对该质粒进行双酶切。将扩增的 PCR 产物和酶切后的质粒混合,导入 GB05-Dir 大肠杆菌培养。通过卡纳抗性筛选阳性单克隆,经 PCR 进行菌落扩增。采用成品试剂盒对过夜培养的菌种提取含目的 DNA 片段的重组质粒,采用紫外分光光度计测试其浓度。将提取的重组质粒送南京金斯瑞公司测序,以检测重组质粒是否构建成功。

**1.3.4 人 SUMO1、SUMO2、SUMO3 蛋白在大肠杆菌中的诱导表达** 将测序正确的人 SUMO1、SUMO2、SUMO3 重组质粒转化至 BL21-DE3,选取阳性单克隆于液体培养基 37 °C 振荡培养至 OD 值约为 0.6。在诱导剂 IPTG(1M/L)的条件下分别于 37 °C 摇床培养 4 h 和 25 °C 摇床过夜。收获不同条件下的菌液,SDS-PAGE 电泳检测。最终确定菌种的最适诱导表达条件为 37 °C 摇床培养 4 h。

**1.3.5 人 SUMO1、SUMO2、SUMO3 蛋白表达产物分离与纯化** 将置于 -80 °C 冰箱保存的菌体取出,用 20 mL 5mM 咪唑(作为裂解缓冲液)(Lysis buffer)重悬。期间按 1 : 500 添加 PMSF 以防止蛋白降解。再按 1 : 100 添加溶菌酶(1 M/L),之后每隔 5 min 涡旋振荡 1 次,冰上孵育 30 min。超声破菌,功率 36%,每次工作 2 s,间歇 3 s,待上清液澄清可透光提示破菌完成。采用亲和层析柱和超滤管进行蛋白的纯化。为防止蛋白降解,在超滤之后需将目的蛋白分装到若干个 EP 管中,做冷干,制成蛋白干粉并置于 -80 °C 超低温冰箱长久保存。

**1.3.6 筛选 PBC 中抗 SUMO 抗体阳性样品** 采用斑点印迹法初步大量筛查 PBC 患者血清样本中抗 SUMO 抗体阳性标本,实验保证每孔的蛋白上样量 500 ng 左右。通过 Western blot 验证斑点印迹法筛选出的抗 SUMO 抗体阳性样品,获取阳性参考血清。SDS-PAGE 分离凝胶浓度为 15%,样品量约为 2.5 μg;SDS 电泳条件:先低压再高压(从 80 V,40 min 至 140 V,1 h);转膜条件:恒定电流,200 mA,1 h。

**1.3.7 建立抗 SUMO 抗体 ELISA 诊断体系** 采用碳酸盐缓冲液作为 SUMO 蛋白(抗原)的包被液,分别设置 100、200、300、500 ng 4 个梯度进行实验以选取最适抗原包被量。加样后,用保鲜膜覆盖整块微孔板,4 °C 冰箱过夜。次日,弃去包被液,用 PBST 洗 3 遍,拍干。使用 1% 的明胶作为封闭液(1 × PBS 作为稀释液)封闭酶标反应孔,每孔加 300 μL 封闭液,室温下封闭 2 h。2 h 后弃去封闭液,用 PBST 洗 3 遍。加入稀释好的待检样品(PBC 患者血清,稀释比为 1 : 200,稀释液为 1% 的 BSA 磷酸盐缓冲液),每孔加样 100 μL,室温下孵育 2 h。实验设置 1 : 200、1 : 500、1 : 1 000、1 : 2 000、1 : 4 000、1 : 8 000 6 个稀释梯度以确认最适一抗滴度。据说明书推荐的

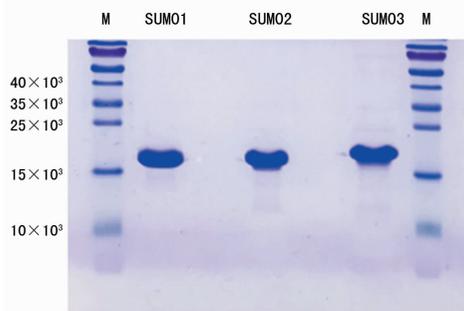
HRP 标记的山羊抗人 IgG 二抗最适稀释比(1 : 40 000,稀释液为 1% 的 BSA 磷酸盐缓冲液)进行实验。最终 A 液和 B 液 1 : 1 等比例(各 50 uL)混合显色,2M H2SO4 终止反应。

**1.3.8 Western blot 和斑点印迹法验证 ELISA 筛选出的抗 SUMO 抗体阳性样品** 将 ELISA 筛选出的抗 SUMO 抗体阳性标本通过 Western blot 和斑点印迹法验证,证明 cutoff 值的正确性和 ELISA 体系的有效性。实验步骤同上述 1.3.6。

**1.4 统计学处理** 实验标本的所有计量资料描述为  $\bar{x} \pm s$ ,采用  $\chi^2$  检验比较不同血清群体中抗 SUMO 抗体阳性表达率, $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。统计分析工具由 SPSS16.0 执行。

**2 结果**

**2.1 SUMO 3 种蛋白亚型的纯化结果** 通过 NCBI 找到 SUMO1、SUMO2、SUMO3 3 种蛋白亚型的编码序列,构建 3 种重组质粒。待质粒构建成功后,将其分别导入大肠杆菌进行蛋白的诱导与表达。通过条件的不断改进,获得条带单一、纯度较高的目的蛋白。3 种蛋白亚型纯化结果如图 1 所示。



注:图中 M 代表蛋白 Marker,目的蛋白在(17~18) × 10<sup>3</sup> 左右

图 1 3 种 SUMO 蛋白亚型的纯化结果

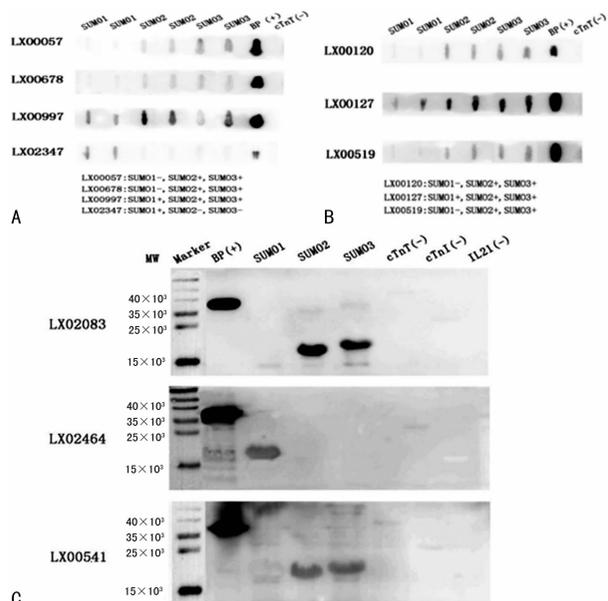
**2.2 抗 SUMO 抗体 ELISA 诊断体系的构建**

**2.2.1 获取抗 SUMO 抗体阳性样本** 412 例 PBC 患者样本进行抗 SUMO 抗体阳性的初步筛查。部分结果如图 2 示。为证明斑点印迹检验系统的有效性,笔者从初筛出的抗 SUMO 阳性样品中随机挑选出部分,采用 Western blot 方法再次验证。结果显示 2 种检验方法的结果基本上是一致的。

**2.2.2 确定最适 ELISA 抗原包被量和一抗滴度** 经实验条件的不断改进,以阳参和阴参样品的 OD 值能拉开较大差距的抗原包被量和一抗滴度为最佳浓度,确定本实验选取的最佳抗原包被量为 500 ng,1 : 200 为最佳血清稀释比。

**2.3 ELISA 诊断效率的评价** 在构建抗 SUMO 抗体检测的最佳 ELISA 诊断体系后需要对该体系的诊断效率进行评价。用已验证的抗 SUMO 抗体阳性的 PBC 标本作为阳性样本,健康人的体检样本作为阴性样本进行 ELISA 诊断性能的评价,分别统计实验的

阴性性例数,计算灵敏度和特异度[特异度=真阴性/(真阴性+假阳性)×100%;灵敏度=真阳性/(真阳性+假阴性)×100%]。如表1所示。



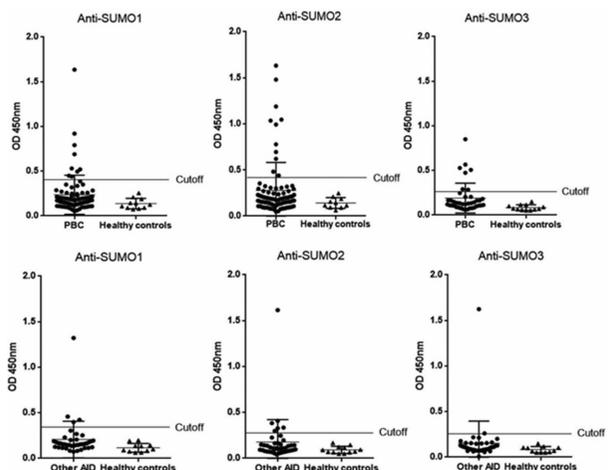
注:图中BP(BCOADC-PDC耦联的抗原)为PBC患者的检验标志物,作为阳参;cTnT,cTnI,IL21为阴参;图左边编号为PBC患者的样本编号;图A和图B是PBC样品的斑点印迹图,图C是PBC样品的Western blot图

图2 PBC样本的部分斑点印迹图和Western blot图

表1 抗SUMO抗体ELISA诊断效率评价(%)

ELISA评价指标	抗SUMO1抗体	抗SUMO2抗体	抗SUMO3抗体
灵敏度	86.40	85.70	88.20
特异度	99.10	99.80	98.40

注:cut off值=3×mean control OD,OD值大于1.1×cut off值的样品定义为阳性,OD值介于0.9×cut off值和1.1×cut off值之间的样品定义为灰区,灰区样品二次验证,若仍处于灰区,则定义为阳性



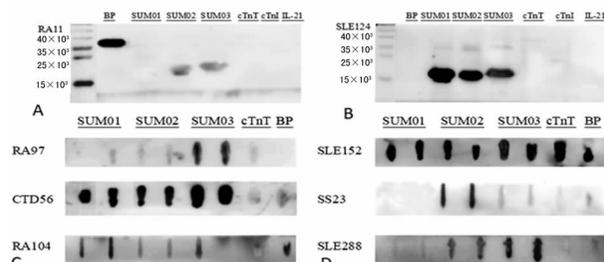
注:图中AID代表自身免疫性疾病,A显示抗SUMO抗体在PBC和健康对照中的表达;B显示非PBC自身免疫性疾病和健康对照中抗SUMO抗体的表达分布

图3 抗SUMO抗体在PBC,其他自身免疫性疾病及健康对照中的表达

2.4 ELISA检验PBC和其他自身免疫性疾病血清

样本 用构建的ELISA诊断体系对412例PBC血清样本和596例其他自身免疫性疾病(包括CTD 80例,SLE 296例,RA 117例,SS 103例)血清样本进行ELISA检验。结果如图3所示。

2.5 Western blot和斑点印迹法验证其他自身免疫性疾病中抗SUMO抗体阳性标本 随机挑选通过ELISA筛选出的其他自身免疫性疾病中的抗SUMO抗体阳性标本进行Western blot和斑点印迹法的验证,以证明ELISA检测系统的有效性。见图4。



注:图中BP(BCOADC-PDC耦联的抗原)为PBC患者的检验标志物;cTnT,cTnI,IL21为阴参。样品SLE152经查病历证实患有心肌梗死性疾病

图4 其他自身免疫性疾病样品的部分Western blot和斑点印迹图

2.6 PBC和其他自身免疫性疾病中抗SUMO抗体阳性率比较 对412例PBC样本和596例其他自身免疫性疾病样本进行ELISA检测,统计抗SUMO抗体两组样本中的阳性率。采用统计学方法 $\chi^2$ 检验计算二者的阳性率差异。实验结果如表2所示。结果显示3种抗SUMO抗体在PBC和其他自身免疫性疾病人群中的阳性率存在显著差异,差异有统计学意义( $P<0.01$ )。

表2 抗SUMO抗体在PBC及其他自身免疫性疾病中的阳性率比较[n(%)]

抗体结果	样品		P
	PBC患者 (n=412)	其他自免疾病 患者(n=596)	
抗SUMO1抗体(+)	30(0.073)	21(0.035)	<0.05
抗SUMO1抗体(-)	382(0.927)	575(0.965)	
抗SUMO2抗体(+)	66(0.160)	17(0.029)	<0.001
抗SUMO2抗体(-)	346(0.840)	579(0.971)	
抗SUMO3抗体(+)	64(0.155)	20(0.034)	<0.001
抗SUMO3抗体(-)	348(0.845)	576(0.966)	

注:其他自免疾病包括CTD 80例,SLE 296例,RA 117例及SS 103例

2.7 其他自身免疫性疾病中的抗SUMO抗体阳性率表达 实验对596例其他自身免疫性疾病(CTD 80例,SLE 296例,RA 117例及SS 103例)进行ELISA检测,统计抗SUMO抗体的阳性率(图5)。采用 $\chi^2$ 检验分析比较4组间的阳性率差异,结果如表3所

示。结果显示,抗 SUMO 抗体在其他自身免疫性疾病中的阳性率差异无统计学意义( $P>0.05$ ),因此认

为抗 SUMO 抗体对于鉴定其他自身免疫性疾病无意义。

表 3 抗 SUMO 抗体在其他自身免疫性疾病中的阳性率比较[n(%)]

抗体结果	样品				P
	SLE(n=296)	SS(n=103)	CTD(n=80)	RA(n=117)	
抗 SUMO1 抗体(+)	8(0.027)	5(0.049)	3(0.038)	5(0.043)	0.722
抗 SUMO1 抗体(-)	288(0.973)	98(0.951)	77(0.963)	112(0.957)	
抗 SUMO2 抗体(+)	4(0.014)	6(0.058)	3(0.038)	4(0.034)	0.109
抗 SUMO2 抗体(-)	292(0.986)	97(0.942)	77(0.963)	113(0.966)	
抗 SUMO3 抗体(+)	7(0.024)	5(0.049)	3(0.038)	5(0.043)	0.583
抗 SUMO3 抗体(-)	289(0.976)	98(0.951)	77(0.963)	112(0.957)	

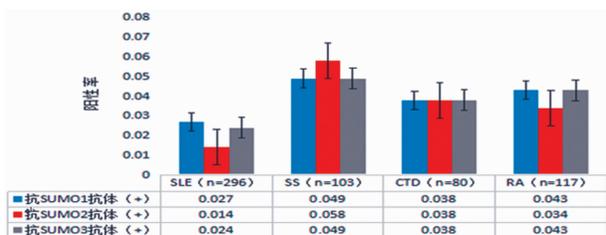


图 5 其他自身免疫性疾病中抗 SUMO 抗体的阳性率表达分布

### 3 讨 论

PBC 的治疗效果不佳,早期诊断和治疗是控制 PBC 疾病发展的最有效手段。但不同的 PBC 患者,他们的病症表现不尽相同,同时也伴随不同的并发症,这对患者的对症治疗产生很大的难度。

目前,针对 PBC 的特异性抗体包括 AMA-M2、抗核抗体 Sp100 及抗 Gp210。AMA 因其特异度高,是 PBC 的关键性诊断标志。PBC 的血清学特征是高滴度的 AMA,其主要靶点为 BCOADC-E2、PDC-E2 和 OGDC-E2。但是,AMA 也可在其他疾病如硬皮病中检测到。因此,寻找新的血清标志物,如抗 SUMO 抗体,对于区分 PBC 与其他自身免疫性疾病至关重要<sup>[3-4]</sup>。

SUMO 蛋白分布广泛。人类基因组主要编码 4 种 SUMO 蛋白亚型 SUMO1、SUMO2、SUMO3 和 SUMO4<sup>[5]</sup>。其中,SUMO1~3 起主要作用并在各种组织中均有表达,而 SUMO4 主要在肾、脾和淋巴结中表达<sup>[6]</sup>。在各亚型中,SUMO1 和 SUMO2 具有 50% 的序列同源性,SUMO2 和 SUMO3 高度相似,仅有 3 个氨基酸差异,同源性高达 95%,所以经常共写为 SUMO2/3<sup>[7-8]</sup>。在针对 3 种 SUMO 蛋白亚型的实验组中,笔者发现抗 SUMO2 抗体和抗 SUMO3 抗体在 PBC 和其他自身免疫性疾病两组间的阳性率差异 P 值接近(表 2),表明 SUMO2 和 SUMO3 二者同源性高。鉴于成熟 SUMO2 和 SUMO3 蛋白之间的高

度同源性,笔者推测识别抗 SUMO2 抗体的疾病也可能同时识别抗 SUMO3 抗体,这有待后续实验进一步考证。

PBC 起病隐匿,表现为慢性进行性胆汁淤积性肝病,最终导致肝硬化和肝功能衰竭。其作为典型的自身免疫性疾病的一种,目前诊断依赖于临床表现,特异性自身抗体的检测和病理组织学检查<sup>[9-11]</sup>。AMA-M2 是 PBC 的特异性抗体,其特异度高达 95%,但 AMA 对 PBC 的诊断仍有局限性,约有 10% 的 PBC 患者 AMA 阴性,这给诊断带来一定困难,有时需依赖有创检查肝活检,存在一定风险且患者依从性差<sup>[12-13]</sup>。本研究发现抗 SUMO 抗体在 PBC 中的诊断特异度高达 99%,其灵敏度保持在 86% 左右(表 1)。表明抗 SUMO 抗体可以成为辅助诊断 PBC 的一个新的血清标志物。

PBC 常伴有其他自身免疫性疾病,包括 SS、SLE、CTD、RA 等。本研究发现上述其他自身免疫性疾病中 3 种抗 SUMO 抗体均有一定的检出率,尤以 SS 和 RA 较高,提示这类患者有合并潜在的亚临床 PBC 的可能性,需要密切随访,以便于早期发现,早期治疗,改善疾病预后<sup>[14]</sup>。笔者还发现抗 SUMO 抗体在 PBC 中的阳性率明显高于其他自身免疫性疾病组和健康对照组,阳性表达率差异有统计学意义(表 2),说明抗 SUMO 抗体和 PBC 存在很好的相关性,对于辅助诊断 PBC 具有良好的效益。鉴于非 PBC 的自身免疫性疾病中的抗 SUMO 抗体的低阳性率(图 5),笔者对 296 例 SLE,103 例 SS,80 例 CTD 及 117 例 RA 进行研究,发现抗 SUMO 抗体在其他自身免疫性疾病人群中的阳性率无明显差异(表 3),说明抗 SUMO 抗体对于鉴定其他非 PBC 的自身免疫性疾病无特异度,抗 SUMO 抗体有望成为诊断 PBC 的潜在性特异性抗体。

像其他 PBC 自身抗体一样,抗 SUMO 抗体在

PBC 或其他自身免疫性疾病中的发病机制仍然未知。有趣的是,一项研究表明大量的 SUMO 结合物可以在线粒体中找到,尽管构成 AMA 自身抗原的线粒体复合物的 SUMO 化尚未报道。线粒体抗原的异常表达归因于在应激条件下失调的自噬,最终导致自身免疫介导的细胞毒性反应,特别是小胆管的损伤。因此后期研究抗 SUMO 抗体产生是否是细胞因子依赖性将是有意义的。另外据文献报道,抗 Sp100 抗体表达可能通过介导胆管细胞增生参与 PBC 发病<sup>[15]</sup>。胆管细胞增生在 PBC 组织病理中较常见,胆管性界面炎含有增生胆管和肉芽肿的碎屑样坏死,提示胆管细胞增生在 PBC 的进展中起到一定作用。而 SUMO 蛋白可以通过修饰 Sp100 蛋白发挥 SUMO 化修饰作用,表明 SUMO 对于 PBC 的致病机制也有可能一部分是通过介导胆管细胞增生实现的。

PBC 是复杂性自身免疫性疾病研究的极佳模型,与其他自身免疫性疾病相比,PBC 具有明显的组织专一性和很强的遗传易感性。目前,熊去氧胆酸是对早期 PBC 患者(尤其是黄疸没有出现的患者)进行有效控制的药物,但无治愈作用。而挽救晚期 PBC 患者的唯一手段是实施肝脏移植手术治疗<sup>[16-17]</sup>。鉴于 SUMO 在 PBC 中可以作为一种新的抗原成分,而 SUMO 化修饰和去 SUMO 化修饰过程的失控可能使细胞不能维持动态平衡,进而暗示着疾病的发展。所以,对 SUMO 化的研究可能蕴含着治疗 PBC 疾病的潜在靶点。

诊断试验的持续改进导致对轻度或明显无症状疾病的个体的检测陷入热潮。另外,特别是基于患者基因型和表型的分层将在未来变得重要。本研究结果表明,抗 SUMO 抗体是高特异度的 PBC 新标记物,有必要将抗 SUMO 抗体纳入 PBC 的血清学评估。这将有助于消除 PBC 诊断不确定性,提高诊断效率,建立 PBC 早期诊断方法和诊断指标,并评估 PBC 预后药物的个体化以提供标准化的临床诊断和治疗方案。

#### 4 结 论

本研究通过建立抗 SUMO 抗体的 ELISA 诊断体系,分别检测抗 SUMO 抗体在 PBC、SLE、SS、CTD、RA 5 种典型性自身免疫性疾病血清样本中的阳性率表达,最终证实抗 SUMO 抗体和 PBC 存在很好相关性,有望成为诊断 PBC 的特异度抗体。其创新之处在于分别构建了 SUMO1、SUMO2、SUMO3 3 种蛋白亚型的表达质粒并分别研究 3 种抗 SUMO 抗体在 5 种自身免疫性疾病中的表达,其有利于后期提高疾病的诊断效率,并具有广泛的临床应用和推广前景。但本实验并未证明抗 SUMO 抗体与 PBC 间的直接因果性,因此未来研究方向将进一步揭示抗 SUMO

抗体的状态是否与 PBC 的临床进程相关并分析 PBC 患者接受熊去氧胆酸前后抗 SUMO 抗体的变化等。

#### 参考文献

- [1] MURATORI P, MURATORI L, FERRARI R, et al. Characterization and clinical impact of antinuclear antibodies in primary biliary cirrhosis[J]. *Am J Gastroenterol*, 2003, 98(2): 431-437.
- [2] GRANITO A, MURATORI P, QUARNETI C, et al. Antinuclear antibodies as ancillary markers in primary biliary cirrhosis[J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2012, 12(1): 65-74.
- [3] BÖHM S, MIHALEVIC M J, CASAL M A, et al. Disruption of SUMO-targeted ubiquitin ligases Slx5-Slx8/RNF4 alters RecQ-like helicase Sgs1/BLM localization in yeast and human cells[J]. *DNA Repair (Amst)*, 2015, 26(1): 1-14.
- [4] ANAYA J M. The diagnosis and clinical significance of polyautoimmunity[J]. *Autoimmun Rev*, 2014, 13(4/5): 423-426.
- [5] GIUDICE G L, A A, F L, et al. The coronal tooth fractures: preliminary evaluation of a Three-Year Follow-Up of the anterior teeth direct fragment reattachment technique without additional preparation[J]. *Open Dent J*, 2017, 11(2): 266-275.
- [6] GOODMAN C D, USEGLIO M, PEIRÙ S, et al. Chemobiosynthesis of new antimalarial macrolides[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013, 57(2): 907-913.
- [7] HENDRIKS I A, TREFFERS L W, VERLAAN-DE VRIES M, et al. SUMO-2 orchestrates chromatin modifiers in response to DNA damage[J]. *Cell Rep*, 2015, 10(10): 1778-1791.
- [8] KLIONSKY D J, ABDELMOHSEN K, ABE A, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition) [J]. *Autophagy*, 2016, 12(1): 1-222.
- [9] KÖHLER J B, TAMMSALU T, JØRGENSEN M M, et al. Targeting of SUMO substrates to a Cdc48-Ufd1-Npl4 segregase and STUbL pathway in fission yeast[J]. *Nat Commun*, 2015, 6(8): 8827.
- [10] LAMOLIATTE F, MCMANUS F P, MAARIFI G, et al. Uncovering the SUMOylation and ubiquitylation crosstalk in human cells using sequential peptide immunopurification[J]. *Nat Commun*, 2017, 8(141): 14109.
- [11] LECONA E, RODRIGUEZ-ACEBES S, SPECKS J, et al. USP7 is a SUMO deubiquitinase essential for DNA replication[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2016, 23(4): 270-277.
- [12] NISTICÓ R, FERRAINA C, MARCONI V, et al. Age-related changes of protein SUMOylation balance in the A $\beta$ PP Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease[J]. *Front Pharmacol*, 2014, 5(6): 63.
- [13] ANAMIKA, SPYRACOPOULOS L. Mol-(下转第 307 页)

各个指标单独检出率,说明其联合诊断可有效提示患者子宫内膜癌的发生发展状况,提高子宫内膜癌的临床诊断性。

及时有效地检测女性患者体内 CEA、CA19-9、CA125、HE4 和 ROMA 值的水平变化,有助于提示患者生殖系统相关组织的癌变情况;联合检测患者体内 CEA、CA19-9、CA125、HE4 和 ROMA 值的水平变化可有效提高患者子宫内膜癌的诊断率,为临床诊断、治疗和评价子宫内膜癌提供了良好的数据依据。选择血清肿瘤标志物 CEA、CA19-9、CA125 和 HE4 的检测,并计算患者 ROMA 指数在鉴别诊断子宫内膜癌及高危人群的筛查方面具有很好的临床应用价值,联合诊断有助于提高诊断效能,值得临床实验室推广使用。

#### 4 结 论

检测女性患者体内 CEA、CA19-9、CA125、HE4 水平和 ROMA 测定值可有效提高患者子宫内膜癌的诊断率。对于临床鉴别诊断子宫内膜癌、筛查高危人群具有很好的临床应用价值,值得临床实验室推广使用。

#### 参考文献

[1] 张正宇,米非司酮联合腹腔镜手术对子宫内膜异位症患者血清 VEGF、VEGFR 及 MIF 水平的影响[J]. 标记免疫分析与临床,2016,23(9):1038-1040.

[2] 陈瑞芳,鹿欣. 子宫内膜癌血清肿瘤标志物研究进展[J]. 国际肿瘤学杂志,2014,41(5):364-367.

[3] 高慧娟,李小毛. 子宫内膜癌肿瘤标志物研究进展[J]. 广东医学,2014,25(6):940-943.

[4] 张智,陈红霞,徐晓霞. 血清人附睾蛋白-4、CA125、CA199 联合诊断子宫内膜癌的价值[J]. 实用医学杂志,2016,32(7):1108-1112.

[5] 白韬,杜潇,卜君,等. 乳腺超声光散射成像联合血清 CA15-3、CEA 检测在乳腺肿瘤中的诊断价值[J]. 标记免

疫分析与临床,2017,24(7):762-765.

[6] 徐定华,蔡春仙,黄光学. 乳腺钼靶 X 射线摄片联合四种血清肿瘤标志物对乳腺癌的诊断价值[J]. 海南医学院学报,2015,21(9):1294-1296

[7] WULF H U. At last-A new and precise International Set of menopause-related definitions[J]. Menopause Management,2000,9(1):47.

[8] 彭鸿灵,赵霞. 2015 年 NCCN 子宫内膜癌临床实践指南解读[J]. 中国医师杂志,2015,17(8):1144-1146

[9] 余祝英,曾维红. CA125 在子宫内膜癌组织中的表达及与 ER 和 PR 的相关性研究[J]. 解剖学研究,2016,38(6):465-467.

[10] 徐仁根,王君. 7 种血清肿瘤标志物对原发性卵巢癌患者的临床诊断研究[J]. 检验医学与临床,2016,13(4):480-481.

[11] 屈明利,邓晓红,赵侃侃,等. 血清 CA125、CEA、AFP 联合检测在卵巢恶性肿瘤诊断中的临床价值[J]. 实用癌症杂志,2017,32(7):1065-1068.

[12] 戴仕芬,郭苑莉. 联合检测子宫内膜样腺癌组织 Ki-67、ER 与 CEA 表达的临床诊断价值[J]. 解剖学研究,2017,39(1):5-8.

[13] 王淑贞,王秋红. HIF-1 $\alpha$  和 VEGF 在子宫内膜癌中的临床表达及相关性[J]. 实用癌症杂志,2017,32(4):536-538.

[14] 灵琴,陈曦,陈鲁,等. 人附睾分泌蛋白-4 和 CA-125 联合检测在子宫内膜恶性肿瘤与子宫良性肿瘤鉴别诊断中的价值[J]. 中国癌症杂志,2012,22(11):820-824.

[15] CHEN W T, GAO X, HAN X D, et al. HE4 as a serum biomarker for ROMA prediction and prognosis of epithelial ovarian cancer[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014, 15(1):101-105.

[16] 曾磊. 恶性肿瘤风险指数与肿瘤标志物用于盆腔包块良恶性诊断的临床价值[J]. 东南大学学报(医学版),2016,35(6):965-969.

(收稿日期:2018-08-22 修回日期:2018-10-25)

(上接第 303 页)

ecular basis for phosphorylation-dependent SUMO recognition by the DNA repair protein RAP80 [J]. J Biol Chem, 2016, 291(9):4417-4428.

[14] KONSTANTIN, TOMANOV, CHRISTIAN, et al. Small Ubiquitin-Like modifier conjugating enzyme with active site mutation Acts as dominant negative inhibitor of SUMO conjugation in arabidopsis [J]. J Integr Plant Biol, 2013, 55(1):75-82.

[15] CHEN A J, GAO L, WANG X W, et al. SUMO-conjugating enzyme E2 UBC9 mediates viral immediate-early protein SUMOylation in crayfish to facilitate reproduction of

white spot syndrome virus [J]. J Virol, 2013, 87(1):636-647.

[16] ERKER Y, NEYRET-KAHN H, SEELER J S, et al. Arkadia, a novel SUMO-targeted ubiquitin ligase involved in PML degradation [J]. Mol Cell Biol, 2013, 33(11):2163-2177.

[17] GALANTY Y, BELOTSEKOVSKAYA R, COATES J, et al. RNF4, a SUMO-targeted ubiquitin E3 ligase, promotes DNA double-strand break repair [J]. Genes Dev, 2012, 26(11):1179-1195.

(收稿日期:2018-08-14 修回日期:2018-10-22)