

HLA-DR53, anti-Sa 和 anti-CCP 抗体联合检测对诊断类风湿关节炎的临床应用价值*

赵娜¹, 王兴宁², 贾良勇² (1. 延安大学附属医院心脑血管分院输血科, 陕西延安 716000; 2. 延安大学附属医院检验科, 陕西延安 716000)

摘要:目的 探究人类白细胞抗原(HLA)-DR53, 抗 Sa(anti-Sa)和抗环瓜氨酸肽抗体(anti-CCP)联合检测对诊断类风湿关节炎(RA)的临床价值。方法 对170例RA患者及50例健康体检者,用PCR-SSP法检测HLA-DR53, ELISA法检测anti-Sa和anti-CCP抗体,回顾性分析检测结果。结果 RA患者anti-Sa, HLA-DR53和anti-CCP抗体检测敏感度分别为44.07% ($P=0.00$, $\chi^2=165.214$), 68.65% ($P=0.00$, $\chi^2=9.837$)和79.45% ($P=0.00$, $\chi^2=48.028$),与对照组比较差异均有统计学意义($P<0.01$);相关性分析, HLA-DR53, anti-CCP和anti-Sa抗体的OR值分别为3.94, 38.16和184.52,均为RA关联较强的正相关危险因素;anti-CCP敏感度、约登指数最高, anti-Sa和anti-CCP抗体并联检测敏感度增高为88.51%, HLA-DR53和anti-CCP抗体并联检测敏感度高达93.56%, anti-Sa和anti-CCP对检测RA的特异度高达100%。结论 HLA-DR53, anti-CCP和anti-Sa抗体均是RA的正相关危险因素,联合检测可提高RA的诊断率。

关键词:人类白细胞抗原-DR53;抗Sa;抗环瓜氨酸肽;类风湿关节炎

中图分类号:R593.22;R392.11 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2017)02-078-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2017.02.021

Diagnostic Value and Significance of the HLA-DR53, Anti-Sa and Anti-CCP Antibody Factors Combination in Rheumatoid Arthritis

ZHAO Na¹, WANG Xing-ning², JIA Liang-yong²

(1. Department of Blood Transfusion Affiliated Hospital of Yan'an University Cardiovascular Branch, Shaanxi Yan'an 716000, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of Yan'an University, Shaanxi Yan'an 716000, China)

Abstract: Objective To explore the value of human leucocyte antigen-DR53 (HLA-DR53), anti-Sa antibody and anti-cyclic citrullinated peptide antibody(anti-CCP) factors combination in rheumatoid arthritis. **Methods** 170 patients with rheumatoid arthritis and 50 healthy individuals in the hospital were chosen. The levels of HLA-DR53 by PCR-SSP, the levels of anti-Sa and anti-CCP by ELISA, compared their diagnostic value by consistency analysis and joint detection analysis. **Results** The sensibility of anti-Sa, HLA-DR53 and anti-CCP in RA were 44.07% ($P=0.00$, $\chi^2=165.214$), 68.65% ($P=0.00$, $\chi^2=9.837$) and 79.45% ($P=0.00$, $\chi^2=48.028$). Consistency analysis in RA, HLA-DR53, anti-CCP and anti-Sa highly consistent, OR were 3.94, 38.6 and 184.52. The sensitivity and Youden index of anti-CCP were the highest. The sensitivity of anti-Sa and anti-CCP paralleled was 88.51%. The sensitivity of HLA-DR53 and anti-CCP paralleled was 93.56%, and the specificity of anti-Sa and anti-CCP of RA were 100%. **Conclusion** There is a certain correlation between HLA-DR53, anti-Sa and anti-CCP antibody, which are related risk factors of RA, co-detection will improve the diagnosis of RA.

Keywords: Rheumatoid arthritis(RA); HLA-DR53; anti-Sa antibody; anti-CCP antibody

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是由关节疼痛、晨僵逐渐发展为关节破坏、畸形等功能丧失的不可逆性自身免疫性疾病^[1], RA存在3~6个月病情可缓解的优化管理窗口期,早发现早治疗尤为重要。研究发现RA与免疫调节和遗传易感因素有着密切关联,遗传因素占60%^[2]。RA患者病程早期体内就产生自身抗体,如anti-Sa, anti-CCP, APF等^[3],全基因组对不同遗传背景的RA患者进行关联研究发现,RA患者体内含有40多种新的易感基因,且与其他自身免疫性疾

病存在共同的遗传基础^[4]。笔者对170例RA患者及50例健康体检者分别检测HLA-DR53, 抗Sa抗体(anti-Sa)和抗环瓜氨酸肽抗体(anticyclic citrullinated peptide antibody, anti-CCP),回顾性分析检测结果,探讨HLA-DR53, anti-Sa, anti-CCP抗体联合检测对RA的临床价值。

1 材料与方法

1.1 研究对象 选取2010年2月~2015年2月在延安大学附属医院心脑血管分院门诊、住院确诊的170例RA患者,其中男性51例,女性119例,

* 基金项目:延安市惠民计划,项目编号:2015HM-06-01。

作者简介:赵娜(1967-),女,本科,副主任检验师,研究方向:免疫检验学, Tel:13509110868, E-mail: zhaona197611@163.com。

年龄11~73岁,平均年龄46岁。选取本院体检中心的50例健康体检者作为对照组,其中男性17例,女性33例,年龄18~69岁,平均年龄43岁。所有试验参与者自愿签署知情同意书。

1.1.1 诊断依据:RA参考美国风湿病学学会(ACR)和欧洲抗风湿病联盟(EULAR)2010年修订的RA诊疗指南^[5]。

1.1.2 选择标准:符合以下所有条件者予以纳入:①知情、自愿参与并自愿签署知情同意书。②健康对照组者常规检查无异常。③符合诊断标准,临床确诊资料完整。④重新评估病人临床资料,确定无并发其他自身免疫性疾病。

1.1.3 排除标准:符合以下任何一条情况者予以剔除:①不符合纳入标准。②有血栓、栓塞病及器官移植史。③并发严重心、肺、肝、肾脏等系统疾病。④并发甲状腺疾病、糖尿病等慢性疾病。⑤妊娠或哺乳期妇女。

1.2 试剂和仪器

1.2.1 主要试剂:Taq酶(立陶宛Fermentas公司),MorganTM HLA-DR4 SSP分型试剂盒(美国Texas BioGene公司),EZHighTM DNA提取试剂盒(美国Texas BioGene公司),由上海吉盈科技生物技术有限公司提供。

1.2.2 主要仪器:Multiskan MK3全自动酶标仪,ABI9700 PCR扩增仪(美国PE公司),凝胶成像系统(北京市亚力恩机电技术研究所),电泳仪(台湾今日仪器股份有限公司),电泳槽(美国Texas BioGene公司)。

1.3 方法

1.3.1 抗体检测:采集空腹静脉不抗凝血2.0~3.0 ml,1 000 g分离血清,-20℃冷冻待检,避免反复冻融。

1.3.2 基因组DNA提取:按试剂盒说明书提取DNA,取全血200 μ l,加入红细胞裂解液900 μ l,振荡混匀,9 000 r/min离心1 min,去上清液,留有核细胞,加入400 μ l有核细胞裂解液,振荡混匀至透明为止,将其加入至DNA吸附在硅胶柱上,9 000 r/min离心1 min,分别加入蛋白清洗液200 μ l和离子清洗液500 μ l进行DNA清洗纯化,最后使用DNA洗脱液200 μ l洗脱DNA,用紫外分光光度计检测DNA的质量,纯度一般在1.6~1.8之间,浓度在50 ng/ μ l左右。

1.3.3 检测方法

1.3.3.1 anti-Sa和anti-CCP抗体检测:均采用德国欧蒙医学实验诊断股份有限公司生产的ELISA法试剂,严格按操作说明书进行检测。

1.3.3.2 PCR-SSP法:采用美国Texas BioGene

公司的MorganTM HLA-DR4 SSP分型试剂盒。引物设计:设有内对照引物和特异性引物两组引物,内对照引物(internal control primer pair)采用人类囊肿性纤维化跨膜传导调节基因(human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene),扩增产物为600bp;其引物序列如下:上游:5'-TGCATCTGGACATGCTTGCT-3',下游:5'-TGGCTGGAGGAGACTCCAAA-3'。DR53特异性引物序列为:上游:5'-GTACGCGCGCTACAA-CAGT-3'和5'-CTACCTTTTTTTTCTCCTA GTCCAA-3';下游:5'-CTGCACTGTGAAGC TCTCCA-3'和5'-CAGCCTTCTCTTCCTGGC T-3'。试验步骤:将样本DNA、底物、Taq酶混匀,加入干板中(有引物包被)。在扩增仪上按以下条件扩增:96℃孵育2.5 min,96℃15 s→65℃60 s 10个循环,96℃15 s→62℃50 s→72℃35 s 22个循环,4℃保存,扩增产物用2 g/dl琼脂糖凝胶,以200伏恒压电泳8 min,在凝胶成像系统上拍照,记录结果。

1.4 统计学分析 统计分析应用SPSS19.0软件,计数资料以例数(百分比)描述当 $P<0.05$ 时,对比组之间的差异有统计学意义。组间单因素分析采用 χ^2 检验,DR基因与RA相关性用比值比(Odds Risk,OR)及OR的显著性 χ^2 确定,OR >1 ,正关联危险因素;OR <1 ,保护因素。对定量资料作受试者特征曲线(receiver operating characteristic,ROC),计算ROC曲线下面积(area under the curve,AUC)。临床评价指标包括敏感度、特异度、准确度和约登指数。串联试验(Series),联合灵敏度=A敏感度 \times B敏感度,联合特异度=A特异度+[(1-A特异度) \times B特异度];并联试验(Parallel),联合敏感度=A敏感度+[(1-A敏感度) \times B敏感度],联合特异度=A特异度 \times B特异度。

2 结果

2.1 RA患者HLA-DR53,anti-CCP和anti-Sa抗体检测结果 见表1。RA组患者与对照组比较,HLA-DR53,anti-Sa和anti-CCP抗体检测阳性率分别经两独立样本的卡方检验,差异均有统计学意义($P<0.01$);单因素与RA患病相关性分析计算OR值均 >1 ,HLA-DR53,anti-Sa和anti-CCP抗体均为RA关联较强的正相关危险因素。

2.2 RA患者HLA-DR53,anti-Sa和anti-CCP抗体检测的临床评价指标 见表2。anti-Sa,anti-CCP抗体对检测RA的特异度均高达100%,并联检测anti-Sa和anti-CCP抗体敏感度增高为88.51%,HLA-DR53和anti-CCP抗体并联敏感

度高达 93.61%。

表 1 RA 患者 HLA-DR53, anti-CCP 和 anti-Sa 抗体检测结果[n(%)]

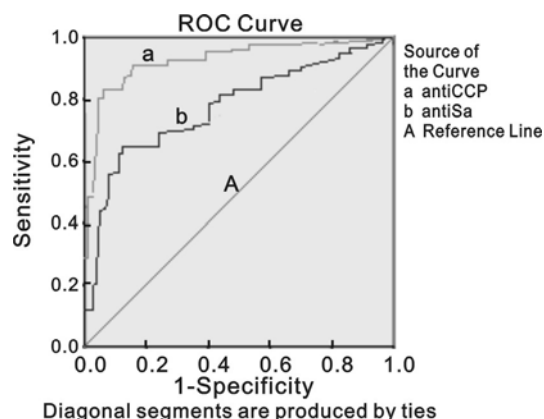
项 目	RA(n=170)	Control(n=50)	OR	P	χ^2
HLA-DR53	117(68.82)	15(30.00)	3.94	0.00	9.837
anti-Sa	75(44.12)	0(0.00)	184.52	0.00	165.214
anti-CCP	135(79.41)	0(0.00)	38.16	0.00	48.028

注:关联很强(10.0~),关联强(3.0~9.0),关联中等(1.5~2.9)。

表 2 RA 患者 HLA-DR53, anti-Sa 和 anti-CCP 抗体检测临床评价指标(%)

指 标	敏感度	特异度	可利用性	登约指数
HLA-DR53	68.65	70.00	69.09	0.39
anti-Sa	44.07	100	56.82	0.44
anti-CCP	79.45	100	84.09	0.79
anti-Sa 与 anti-CCP 并联	88.51	100	-	0.89
HLA-DR53 与 anti-CCP 并联	93.56	70.00	-	0.63

2.3 anti-Sa, anti-CCP 诊断 RA 的 ROC 曲线
anti-Sa, anti-CCP 抗体的 ROC 曲线下面积 AUC 分别为 0.931, 0.754, 对 RA 的诊断有较高准确性。



注:anti-Sa, anti-CCP 对诊断 RA 的 ROC 曲线下面积为 0.75, 0.931(AUC 0.5~0.7 诊断价值较差, 0.7~0.9 诊断价值中等, > 0.9 诊断价值较高)。

图 1 anti-Sa, anti-CCP 对诊断 RA 的 ROC 曲线

3 讨论 RA 是一种自身免疫性结缔组织疾病, 主要表现为关节慢性炎症, 其早期诊断一直是国内外学者的研究热点。RA 在我国患病率约 0.4%, 多见于中年女性, 致残率高, 影响患者日常生活, 严重的丧失劳动能力^[6], 给患者、家庭及社会带来严重的精神和经济负担。研究发现多种免疫细胞及细胞因子存在 RA 患者关节滑膜组织及滑膜液中, 自身抗体如 anti-CCP, anti-Sa 在 RA 早期就可表现为阳性, 全基因组关联研究(GWAS)在不同的遗传背景的 RA 患者发现 40 多种新的易感基因^[7], 学者证实 HLA-DR 抗原的等位基因对 RA 的遗传

易感性有影响。人类白细胞抗原(HLA)存在高度多态性, HLA 等位基因存在多种亚型, 与自身免疫性疾病易感性相关。笔者检测 RA 组 HLA-DR53 阳性率为 68.65%, 经 χ^2 检验, 与健康对照组差异有统计学非常显著性意义($P < 0.01$); RA 组 HLA-DR53 OR 值为 3.94, 为 RA 的强相关危险因素, HLA-DR53 阳性者患 RA 远远高出阴性者, HLA-DR53 阳性但无临床表现者可提前采取干预措施, 截断 RA 的发展之路。

在早期 RA 患者血清中存在一种能预测疾病严重程度及预后情况的高度特异性 IgG 抗体-anti-CCP^[8~10], 对诊断 RA 有很好的敏感度和特异度^[11], 是诊断 RA 的一种良好血清学指标。研究^[12]表明 anti-CCP 抗体阳性与 RA 疾病的严重程度有关。Sa 抗原是存在人脾脏、关节滑膜及胚胎的非酰基化多肽, 学者在关节滑膜液中发现 anti-Sa 抗体, 最新发现 anti-Sa 对抗瓜氨酸波形蛋白, anti-Sa 在 RA 的敏感性受病程影响, 被认为与 RA 的病程发展相关联。本研究检测 RA 组 anti-Sa, anti-CCP 敏感度为 44.07%, 79.45%, 经 χ^2 检验, 与健康对照组比较差异有统计学非常显著性意义($P < 0.01$), 健康组无 1 例阳性, anti-Sa, anti-CCP 对诊断 RA 的特异度均高达 100%, 结果与报道相近^[13]。

绘制 anti-Sa, anti-CCP 对诊断 RA 的 ROC 曲线, ACU 分别为 0.931 和 0.754, 准确性较高。分析显示 anti-Sa, anti-CCP 抗体为 RA 患者的特异性抗体, 对诊断 RA 有重要价值, OR 值分别为 184.52 和 38.16, 均与 RA 的关联很强, 与 RA 发生发展及预后存在密切联系^[14], 具体作用机制有待进一步探究。anti-Sa 和 anti-CCP 抗体并联检测敏感度增高为 88.51%, HLA-DR53 和 anti-CCP 抗体并联检测敏感度高达 93.56%, 联合检测 HLA-DR53 和自身抗体可提高诊断 RA 的敏感度、特异度, 约登指数明显增大, 当患者出现多种抗体阳性时诊断为 RA 的准确度较高, 联合检测可提高 RA 的诊断率。

综上所述, HLA-DR53, anti-Sa 和 anti-CCP 抗

体是 RA 关联较强的正相关危险因素,且可能共同参与 RA 的活动过程,联合检测 HLA-DR53, anti-CCP, anti-Sa 抗体对提高 RA 的诊断率及预后具有重要价值。

参考文献:

- [1] Scott DL, Wolfe F, Huizinga TW. Rheumatoid arthritis[J]. Lancet, 2010, 376(9746): 1094-1108.
- [2] Kochi Y, Suzuki A, Yamada R. Genetics of rheumatoid arthritis: underlying evidence of ethnic differences[J]. J Autoimmun 2009, 32(3/4): 158-162.
- [3] Van Venrooij WJ, Van Beers JJ, Pruijn GJ, et al. Anti-CCP antibodies: the past the present and the future [J]. Nat Rev Rheumatol, 2011, 7(7): 391-398.
- [4] Julia A, Marsal S. The genetic architecture of rheumatoid arthritis: from susceptibility to clinical subphenotype associations[J]. Curr Top Med Chem, 2013, 13(6): 720-731.
- [5] Aletaha D, Neogi T, Silman AI, et al. 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League against rheumatism collaborative initiative[J]. Ann Rheum Dis, 2010, 62(9): 2569-2581.
- [6] 王绍文, 余林健, 万晓春, 等. 类风湿性关节炎免疫发病机制的研究进展[J]. 集成技术, 2015, 4(4): 64-74. Wang SW, Yu LJ, Wan XC, et al. Immunologic mechanisms in the progress of immune pathogenesis of rheumatoid arthritis[J]. Journal Integration Technology, 2015, 4(4): 64-74.
- [7] Julia M, Marsal S. The Genetic architecture of rheumatoid arthritis: from susceptibility to clinical subphenotype associations[J]. Current Topics in Medicinal Chemistry, 2013, 13(6): 720-731.
- [8] de Mota LM, Cruz BA, Brenol CV, et al. 2011 consen-

sus of the brazilian society of rheumatology for diagnosis and early assessment of rheumatoid arthritis [J]. Rev Bras Reumato, 2011, 51(3): 199-219.

- [9] 常晓天, 郑亚冰. 类风湿性关节炎瓜氨酸化反应研究的最新进展[J]. 中国免疫学杂志, 2016, 32(2): 279-283. Chang XT, Zheng YB. The latest progress in the study of citrulline reaction of rheumatoid arthritis[J]. Chinese Journal of Immunology, 2016, 32(2): 279-283.
- [10] 陈保锋, 曾军英, 冯群芳, 等. 类风湿关节炎早期诊断研究概况[J]. 现代检验医学杂志, 2006, 21(2): 83-85. Chen BF, Zeng JY, Feng QF, et al. Early diagnosis of rheumatoid arthritis[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2006, 21(2): 83-85.
- [11] Lee AN, Beck CE, Hall M. Rheumatoid factor and anti-CCP autoantibodies in rheumatoid arthritis: a review[J]. Clin Lab Sci, 2008, 21(1): 15-18.
- [12] Meyer O, Labarre C, Douquados M, et al. Anticitrullinated protein/peptide antibody assays in early rheumatoid arthritis for predicting five year radiographic damage[J]. Ann Rheum Dis, 2003, 62(2): 120-126.
- [13] Debaugnies F, Servais G, Badot V, et al. Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies: a comparison of different assays for the diagnosis of rheumatoid arthritis[J]. Scandinavian Journal of Rheumatology, 2013, 42(2): 108-114.
- [14] Kim HH, Kim J, Park SH, et al. Correlation of anti-cyclic citrullinated antibody with hand joint erosion score in rheumatoid arthritis patients [J]. Korean Journal of Internal Medicine, 2010, 25(2): 201-206.

收稿日期: 2016-12-12

修回日期: 2017-02-15

(上接 77 页)

- [7] 李莉, 刘凌云, 赵元明. 测定血清胱抑素 C 在肾脏疾病中的诊断价值[J]. 中华全科医学, 2011, 9(3): 457-458. Li L, Liu LY, Zhao YM, et al. Value of detecting serum Cystatin C in diagnosis of kidney disease[J]. Chinese Journal of General Practice, 2011, 9(3): 457-458.
- [8] Li JP, Dowdy S, Tipton T, et al. HE4 as a biomarker for ovarian and endometrial cancer management[J]. Expert Rev Mol Diagn, 2009, 9(6): 555-566.
- [9] 石少凤, 田德明, 黄文斌, 等. 人附睾分泌蛋白 4 在卵巢上皮性肿瘤中的表达及其临床意义[J]. 皖南医学院学报, 2014, 33(5): 402-404, 408. Shi SF, Tian DM, Huang WB, et al. Expression of human epididymis protein 4 in ovarian epithelial tumors and its clinical significance [J]. Journal of Wannan Medical College, 2014, 33(5): 402-404, 408.
- [10] Chen Y, Chen Q, Liu Q, et al. Human epididymis protein 4 expression positively correlated with miR-21 and served as a prognostic indicator in ovarian

cancer[J]. Tumour Biol, 2016, 37(6): 8359-8365.

- [11] 闫先侠, 孙晓, 张华, 等. 血清人附睾蛋白 4 联合 CA125 检测在卵巢癌诊断中的应用[J]. 现代检验医学杂志, 2015, 30(1): 134-136. Yan XX, Sun X, Zhang H, et al. Combined detection serum human epididym protein 4 with carbohydrate antigen 125 and its implication in the diagnosis of ovarian cancer [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2015, 30(1): 134-136.
- [12] Escudero JM, Auge JM, Filella X, et al. Comparison of serum human epididymis protein 4 with cancer antigen 125 as a tumor marker in patients with malignant and nonmalignant diseases [J]. Clin Chem, 2011, 57(11): 1534-1544.
- [13] Nagy B, Krasznai ZT, Balla H, et al. Elevated human epididymis protein 4 concentrations in chronic kidney disease[J]. Ann Clin Biochem, 2012, 49(Pt 4): 377-380.

收稿日期: 2016-10-20

修回日期: 2017-01-24