

# 类风湿性关节炎患者血清 RA-CP, 抗 CCP 抗体及 RF 检测对 RA 的实验诊断意义

陈建芸<sup>a</sup>, 廖海平<sup>a</sup>, 孙朝晖<sup>a</sup>, 李林海<sup>a</sup>, 张宏斌<sup>b</sup> (南部战区总医院 a. 检验科; b. 医学实验科, 广州 510010)

**摘要:** 目的 分析不同血清类型的类风湿性关节炎 (RA) 患者血清中的类风湿性关节炎特异性抗原瓜氨酸化蛋白 (RA-CP) 的水平, 比较 RA-CP 与抗环瓜氨酸多肽 (CCP) 抗体、类风湿因子 (RF) 在 RA 诊断中的价值。方法 用酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测 103 例 RA 患者、71 例其他风湿病患者、105 例健康体检者血清中 RA-CP, 抗 CCP 抗体和 RF 的水平。根据抗 CCP 抗体和 RF 测定结果将 RA 患者分为 4 种血清类型: 抗 CCP 抗体阳性/RF 阳性的 RA、抗 CCP 抗体阳性/RF 阴性的 RA、抗 CCP 抗体阴性/RF 阳性的 RA、抗 CCP 抗体阴性/RF 阴性的 RA, 分析各种血清类型 RA 患者血清中 RA-CP 的水平。结果 RA 组的血清中 RA-CP 浓度水平中位数为 4.51 (1.80~7.49) 单位, 高于其他疾病组的 0.53 (0.40~0.76) 单位和健康对照组的 0.52 (0.35~0.69) 单位。RA-CP, 抗 CCP 抗体和 RF 对 RA 的敏感度分别为 77.7%, 65.0% 和 69.9%, RA-CP 对 RA 的敏感度高于抗 CCP 抗体和 RF ( $P < 0.05$ ); 特异度分别为 95.5%, 97.2% 和 89.2%。在 4 种血清型的 RA 中 RA-CP 的检出率分别为 100.0% (57/57), 40.0% (4/10), 100.0% (15/15) 和 19.0% (4/21)。在抗 CCP 抗体阴性的 RA 中 RA-CP 的检出率为 52.8% (19/36)。结论 血清中 RA-CP 对 RA 的诊断比抗 CCP 抗体和 RF 具有更高的敏感度, 可提高类风湿性关节炎的检出率。因此 RA-CP 可作为 RA 临床诊断的新辅助指标。

**关键词:** 类风湿性关节炎特异性抗原瓜氨酸化蛋白; 类风湿性关节炎; 抗环瓜氨酸多肽抗体; 类风湿因子  
中图分类号: R593.22; R392.11 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414 (2020) 05-038-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2020.05.010

## Significance of the Detection of RA-CP, Anti-CCP Antibody and RF in the Laboratory Diagnosis of Rheumatoid Arthritis

CHEN Jian-yun<sup>a</sup>, LIAO Hai-ping<sup>a</sup>, SUN Zhao-hui<sup>a</sup>, LI Lin-hai<sup>a</sup>, ZHANG Hong-bin<sup>b</sup>

(a. Department of Clinical Laboratory; b. Department of Medical Research, General Hospital of Southern Theater Command, Guangzhou 510010, China)

**Abstract: Objective** To analyze the level of the rheumatoid arthritis-specific citrullinated protein (RA-CP) in patients of different serum types with rheumatoid arthritis (RA), and compare the value of RA-CP, anti-cyclic citrullinated polypeptide (CCP) and rheumatoid factor (RF) in the diagnosis of RA. **Methods** Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the levels of RA-CP, anti-CCP antibodies and RF in the serum of 103 RA patients, 71 other rheumatism patients and 105 healthy person. According to the results of CCP and RF, RA patients were divided into 4 serotypes: anti-CCP antibody positive/RF positive RA, anti-CCP antibody positive/RF negative RA, anti-CCP antibody negative/RF positive RA, anti-CCP antibody-negative/RF-negative RA. The level of RA-CP in various serum types RA were test. **Results** The median RA-CP concentration in serum of RA group was 4.51 (1.80 ~ 7.49) units, which was higher than 0.53 (0.40 ~ 0.76) units of other disease groups and 0.52 (0.35 ~ 0.69) units of healthy controls. The sensitivity of RA-CP, anti-CCP antibody and RF to RA was 77.7%, 65.0% and 69.9% respectively and the sensitivity of RA-CP was higher than anti CCP antibody and RF ( $P < 0.05$ ). The specificity was 95.5%, 97.2% and 89.2% respectively. For the four serotypes of RA, RA-CP detection rates were 100.0% (57/57), 40.0% (4/10), 100.0% (15/15) and 19.0% (4/21). Specially, in anti-CCP antibody negative RA group, the detection rate of RA-CP was 52.8% (19/36). **Conclusion** RA-CP had higher sensitivity for the diagnosis of RA than anti-CCP antibody and RF, and RA-CP test could improve the detection rate of rheumatoid arthritis. Therefore, RA-CP can be used as a new target for clinical diagnosis of RA.

**Keywords:** rheumatoid arthritis-specific citrullinated protein (RA-CP); rheumatoid arthritis (RA); anti-cyclic citrullinated polypeptide (CCP) antibody; Rheumatoid factor (RF)

类风湿性关节炎 (RA) 是一种慢性自身免疫性疾病, 在世界范围内的发病率约为 1%<sup>[1]</sup>。针对瓜氨酸化蛋白的自身免疫性可能与 RA 的发病机制相关, 因此, 跟踪该自身免疫性路径 (自身免疫性抗原)

基金项目: 广州市科技计划项目 (201604020106)。

作者简介: 陈建芸 (1974-), 女, 副主任技师, 研究方向: 免疫检验及相关疾病, E-mail: 380350681@qq.com。

通讯作者: 张宏斌 (1973-), 男, 博士, 主任技师, 硕士研究生导师, E-mail: zhangwater@tom.com。

有望发现该疾病发病机理的更多证据。尽管在 RA 的实验室诊断和监测中,监测针对血清中的瓜氨酸化肽,尤其是抗环瓜氨酸多肽(CCP)的抗体是诊断 RA 的标准检测靶标,但很少有研究关注血清或血浆中瓜氨酸化蛋白测定对 RA 诊断的临床应用意义。本研究采用了一种新型的类风湿性关节炎特异性抗原瓜氨酸化蛋白(RA-CP)测定试剂盒,测定的标志物是一组类风湿性关节炎特异性的瓜氨酸化蛋白抗原,比较分析了 RA 患者血清中 RA-CP 与传统的国际指南靶标抗 CCP 抗体及 RF 的水平,对其临床的诊断价值进行了分析。

## 1 材料与方法

1.1 研究对象 RA 组选择 2019 年 3 月至 2019 年 5 月在中国人民解放军南部战区总医院门诊及住院就诊的 RA 患者共 103 例,其中女性 78 例,男性 25 例,年龄 17~86 岁平均年龄 52 岁,诊断符合 2010 年 ACR 与欧洲风湿病学会(EULAR)联合修订的 RA 分类标准。健康对照组选择健康体检者共 105 例,女性 48 例,男性 57 例,年龄 22~88 岁,平均年龄 50 岁。疾病对照组选择系统性红斑狼疮(SLE)25 例,痛风性关节炎 14 例,硬皮病 12 例,舍格伦综合征(SS)10 例,骨关节炎(OA)5 例,强制性脊柱炎(AS)5 例。抽取被检者的早晨空腹静脉血 3ml(不抗凝),离心收集血清,-80℃冻存待检。

1.2 主要试剂与仪器 RA-CP 检测试剂盒(广州市雷德生物科技有限公司),抗 CCP 抗体检测试剂盒(德国欧蒙公司),RF 检测试剂盒及特种蛋白仪(德国西门子公司)。Spectramax M3 多功能酶标仪(美国 Molecular Devices 公司)。

## 1.3 方法

1.3.1 测定方法:血清 RA-CP 和抗 CCP 抗体测定采用 ELISA 方法,血清 RF 测定采用特种蛋白仪及配套试剂。RA-CP 和抗 CCP 抗体的检测按照试剂盒说明书和酶标仪的操作说明书进行,采用  $A_{450nm}$  和  $A_{630nm}$  双波长读取吸光度  $A$  值,测定结果根据试剂盒说明书提供的参考值计算样本的吸光度比值(即样本吸光度值  $A_s$  与临界对照吸光度值  $A_{Co}$  的比值,  $A_s/A_{Co}$  比值等于 1 浓度计为 1 个单位( $\geq 1$  为阳性)。RF 测定结果根据定标曲线进行定量。

1.3.2 结果计算:分别计算 RA-CP,抗 CCP 抗体和 RF 对 RA 诊断的敏感度、特异度、阳性似然比和阴性似然比。用 GraphPad prism 7.0 软件绘制受试者工作特征曲线(ROC 曲线)并计算曲线下面积(AUC)。

1.4 统计学分析 实验数据采用 SPSS24.0 进行统

计学分析,非正态分布计量资料用中位数和四分位数描述,配对样本的非参数检验采用 McNemar 检验。不同检测指标对 RA 诊断的应用价值用 ROC 曲线进行评估。 $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 RA-CP 对不同血清类型 RA 的检出率 根据抗 CCP 抗体和 RF 的检测结果将 RA 患者分为四种血清类型,分别为抗 CCP 抗体阳性/RF 阳性 RA、抗 CCP 抗体阳性/RF 阴性 RA、抗 CCP 抗体阴性/RF 阳性 RA 和抗 CCP 抗体阴性/RF 阴性 RA。RA-CP 在四种血清类型 RA 中的检出率分别为 100.0% (57/57), 40.0% (4/10), 100.0% (15/15), 19.0% (4/21)。在 36 例抗 CCP 抗体阴性的 RA 患者中,19 例 RA-CP 检测为阳性,检出率为 52.8%。

2.2 RA-CP 检测对 RA 诊断的效能 RA 组的 RA-CP 浓度水平中位数(四分位间距)为 4.51 (1.80~7.49)单位,高于其他疾病组的 0.53 (0.40~0.76)单位和健康对照组的 0.52 (0.35~0.69)单位,见图 1。RA-CP 在 RA 组、其他疾病组和健康对照组中的阳性检出率分别为 77.7%, 8.5% 和 2.0%, 在 RA 组的阳性检出率高于其他疾病组和健康对照组。

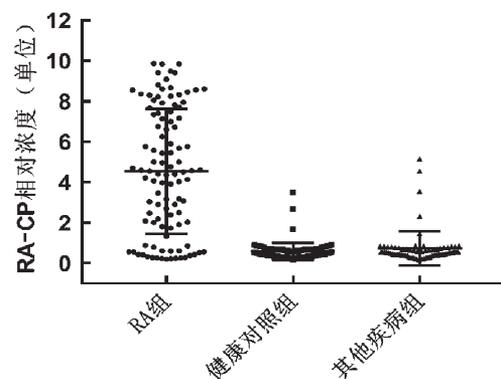


图 1 不同类型样本组 RA-CP 浓度比较

2.3 血清中 RA-CP,抗 CCP 抗体、RF 的比较 三种指标的 ROC 曲线见图 2。RA-CP,抗 CCP 抗体、RF 检测对 RA 诊断的曲线下面积分别为 0.854 (95%CI: 0.797~0.911), 0.820 (95%CI: 0.760~0.879), 0.812 (95%CI: 0.754~0.871), 敏感度分别为 77.7%, 65.0%, 69.9%, 见附表 1。特异度分别为 95.5%, 97.2%, 89.2%。采用配对设计的样本率比较的 McNemar 检验显示, RA-CP 在 RA 患者血清中的敏感度高于抗 CCP 抗体和 RF, 差异具有统计学意义 ( $P=0.015, 0.008$ , 均  $P < 0.05$ )。单指标中,抗 CCP 抗体的特异度和阳性似然比最高,分别为 97.2% 和 23.2; RA-CP 的敏感度最高,阴性似然比最低,分别为 77.7% 和 0.234 (见附表 1)。

表1 三种指标单独和联合检测诊断 RA 效能的比较

检测指标	敏感度 (%)	特异度 (%)	阳性似然比	阴性似然比
RA-CP 抗原	77.7	95.5	17.3	0.234
抗 CCP 抗体	65.0	97.2	23.2	0.360
RF	69.9	89.2	6.5	0.337
抗 CCP 抗体 / RF	79.6	87.5	6.4	0.233
RA-CP 抗原 / 抗 CCP 抗体	83.5	93.8	13.4	0.176
RA-CP 抗原 / RF	77.7	86.4	5.7	0.259
RA-CP 抗原 / 抗 CCP 抗体 / RF	83.5	84.7	5.4	0.195

三种指标中的两个或三个进行组合分析诊断的敏感度和特异度结果显示: RA-CP 与抗 CCP 抗体两者的组合检测能提高 RA 诊断的敏感度, 与 RF 两者或三者组合检测的特异度均会下降。RA-CP 和抗 CCP 抗体组合的特异度和敏感度均高于或等于其它组合, 分别为 93.8% 和 83.5%。

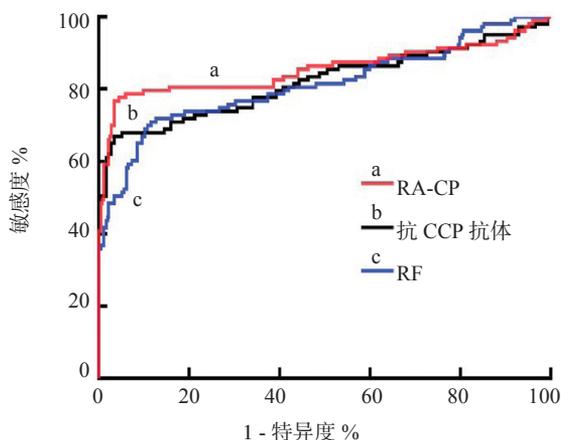


图2 RA-CP, 抗 CCP 抗体、RF 用于 RA 诊断的 ROC 曲线

### 3 讨论

抗瓜氨酸化蛋白抗体 (ACPA) 被认为是 RA 最重要的有诊断意义的生物标记物, 也是多年来 RA 最热门的研究方向。SCHELLEKENS 等<sup>[2]</sup>和 GIBBAL-NEUHAUSER 等<sup>[3]</sup>分别于 1998 年和 1999 年证实瓜氨酸残基是 RA 特异性的抗聚丝蛋白抗体 (AFA) 所识别的主要抗原表位。DESPRES 等发现的 Sa 抗原后来被研究证实为瓜氨酸化的波形蛋白, 巨噬细胞内含有 Sa 抗原, 当滑膜炎时会有大量的巨噬细胞聚集, 巨噬细胞活化后可向细胞外分泌瓜氨酸化的波形蛋白<sup>[4-5]</sup>。研究发现抗瓜氨酸化蛋白的抗体可由炎症关节局部的 B 细胞产生, 由此推断关节内可能存在瓜氨酸化抗原<sup>[6]</sup>。催化蛋白内精氨酸转化为瓜氨酸的酶 - 肽酰精氨酸脱亚氨基酶 (PAD), 存在于滑膜组织等多种组织和细胞中, 因此关节局部可以产生瓜氨酸化蛋白。瓜氨酸化的

纤维蛋白  $\alpha$  链和  $\beta$  链被证实存在于滑膜内, 而且被 AFA 识别<sup>[7]</sup>, 这说明瓜氨酸化的纤维蛋白在 RA 的发病机制中可能发挥着重要的作用。近年来人们利用 PAD 酶在体外使蛋白瓜氨酸化或合成含有瓜氨酸多肽的方法先后发现了多种 RA 中可能存在的瓜氨酸化抗原, 包括瓜氨酸化的 II 型胶原、纤维连接蛋白、 $\alpha$ -烯醇酶等<sup>[8]</sup>。

在 2010 年 ACR 与欧洲风湿病学会 (EULAR) 联合修订的 RA 分类标准中, ACPA 和 RF 作为 RA 血清检测的指标被应用在指南中<sup>[9]</sup>。随着 RA 相关新的自身抗体不断发现, 研究表明这些抗体对 RA 不但单独具有一定的诊断意义<sup>[10]</sup>, 而且不同自身抗体组合检测可提高 RA 的临床诊断<sup>[11]</sup>。另外, ACPA 和 RF 均属于自身抗体, 文献报道抗 CCP 抗体和 RF 有显著的相关性<sup>[12]</sup>, 二者应该属于同类性质的检测靶标。ACPA 种类很多, 包括抗角蛋白抗体 (AKA)、AFA, 抗核周因子抗体 (APF)、抗瓜氨酸化波形蛋白抗体 (MCV) 和抗 CCP 抗体等。抗 CCP 抗体检测产品目前已开发到第 3 代 (CCP3), 虽然 CCP2 和 CCP3 联合检测可以提高 RA 的诊断, 但二者单独检测却无显著性差异<sup>[13]</sup>。因此以第二代 CCP (CCP2) 最为常见, 虽然其特异度很高 (95.3%), 且具有较高的敏感度 (71.6%)<sup>[14]</sup>, 但仍有 20%~30% 的 RA 患者抗 CCP2 抗体检测结果为阴性。RF 特异度差, 在其他自身免疫性疾病、慢性感染性疾病中也常呈现阳性。除本研究外, 目前没有文献报道对血清或血浆中类风湿性关节炎瓜氨酸化蛋白 (RA-CP) 测定的临床应用研究。

从检测原理上对比, RA-CP 检测的是抗原, ACPA 和 RF 均属于检测自身抗体, 检测抗原更具有早发现 and 早诊断的技术优势。而且体内存在细胞免疫和体液免疫两条途径, 部分自身免疫不产生抗体, 这可能就是部分 RA 患者临床抗 CCP 抗体检测阴性的原因。本研究通过单项指标检 (下转第 50 页)

- CCAT1 negatively regulates miR-181a-5p to promote endometrial carcinoma cell proliferation and migration [J]. *Exp Ther Med*, 2019,17(5):4259-4266.
- [17] KONG Y, REN Z. Overexpression of lncRNA fer114 in endometrial carcinoma is associated with favorable survival outcome [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018,22(23):8113-8118.
- [18] CHU Z P, DAI J, JIA L G, et al. Increased expression of long noncoding RNA HMMR-AS1 in epithelial ovarian cancer: An independent prognostic factor [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018,22(23):8145-8150.
- [19] LI Junyang, Ji Xiangjun, WANG Handong. Targeting long noncoding RNA HMMR-AS1 suppresses and radiosensitizes glioblastoma [J]. *Neoplasia*, 2018,20(5):456-466.
- [20] 王冉冉, 董珊珊, 龙瀛, 等. HMMR-AS1 介导 EMT 在上皮性卵巢癌顺铂获得性耐药中的作用 [J]. *肿瘤药学*, 2018,8(4):498-504.
- WANG Ranran, DONG Shanshan, LONG Ying, et al. HMMR-AS1 mediated EMT in acquired cisplatin resistance of epithelial ovarian cancer [J]. *Anti-tumor Pharmacy*, 2018,8(4):498-504.

收稿日期: 2019-08-13

修回日期: 2020-07-15

(上接第40页)测结果的分析同样显示, RA-CP 对 RA 具有很好的诊断价值, 与抗 CCP 抗体和 RF 相比, RA-CP 可以检出超 50% 的抗 CCP 抗体阴性 RA, 极大地提高了血清阴性 RA 的检出率; 而且通过联合检测分析, RA-CP 与抗 CCP 抗体的组合检测可显著提高 RA 诊断的敏感度且保持高的特异度, 联合诊断效能高于目前临床采用的抗 CCP 抗体与 RF 的组合。

综上所述, RA-CP 作为一种新的检测靶标, 不仅与 RA 自身免疫的发病机制有着密切的相关性, 而且可以作为 RA 临床诊断的新指标并有望成为更有效的辅助诊断指标。

#### 参考文献:

- [1] SCOTT D L, WOLFE F, HUIZINGA T W J. Rheumatoid arthritis [J]. *2010*, 376(9746):1094-1108.
- [2] SCHELLEKENS G A, DE JONG B A, VAN DEN HOOGEN F H, et al. Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies [J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 1998, 101(1): 273-281.
- [3] GIRBAL-NEUHAUSER E, DURIEUX J J, ARNAUD M, et al. The epitopes targeted by the rheumatoid arthritis-associated antifilaggrin autoantibodies are posttranslationally generated on various sites of (pro) filaggrin by deimination of arginine residues [J]. *Journal of Immunology*, 1999, 162(1): 585-594.
- [4] VOSSENAAR E R, DESPRES N, LAPOINTE E, et al. Rheumatoid arthritis specific anti-Sa antibodies target citrullinated vimentin [J]. *Arthritis Research and Therapy*, 2004, 6(2): R142-R150.
- [5] DESPRES N, BOIRE G, LOPEZ-LONGO F J, et al. The Sa system: a novel antigen-antibody system specific for rheumatoid arthritis [J]. *Journal of Rheumatology*, 1994, 21(6): 1027-1033.
- [6] REPARON-SCHUIJT C C, VAN ESCH W J, VAN KOOTEN C, et al. Secretion of anti-citrulline-containing peptide antibody by B lymphocytes in rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis and Rheumatism*, 2001, 44(1): 41-47.
- [7] MASSON-BESSIÈRE C, MIREILLE S, GIRBAL-NEUHAUSER E, et al. The major synovial targets of the rheumatoid Arthritis-Specific antifilaggrin autoantibodies are deiminated forms of the  $\alpha$ - and  $\beta$ -Chains of fibrin [J]. *Journal of Immunology*, 2001, 166(6): 4177-4184.
- [8] 田昕, 许忠, 栗占国. 瓜氨酸化作用与类风湿关节炎 [J]. *中华风湿病学杂志*, 2008, 12(8): 576-579.
- TIAN Xin, XU Zhong, LI Zhanguo. Citrullination and rheumatoid arthritis [J]. *Chinese Journal of Rheumatology*, 2008, 12(8): 576-579.
- [9] ALETAHA D, NEOGI T, SILMAN A J, et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative [J]. *Arthritis and Rheumatism*, 2010, 62(9): 2569-2581.
- [10] ZHU Jiaming, NIE Liuyan, LU Xiaoyong, et al. Meta-analysis: compared with anti-CCP and rheumatoid factor, could anti-MCV be the next biomarker in the rheumatoid arthritis classification criteria [J]. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2019, 57(11): 1668-1679.
- [11] SUN Pingping, WANG Wanhai, CHEN Ling, et al. Diagnostic value of autoantibodies combined detection for rheumatoid arthritis [J]. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 2017, 31(5): e22086.
- [12] SULAIMAN F N, WONG K K, WAN AHMAD W A, et al. Anti-cyclic citrullinated peptide antibody is highly associated with rheumatoid factor and radiological defects in rheumatoid arthritis patients [J]. *Medicine*, 2019, 98(12): e14945.
- [13] VOS I, VAN MOL C, TROUW L A, et al. Anti-citrullinated protein antibodies in the diagnosis of rheumatoid arthritis (RA): diagnostic performance of automated anti-CCP-2 and anti-CCP-3 antibodies assays [J]. *Clinical rheumatology*, 2017, 36(7): 1487-1492.
- [14] PRUIJN G J, WIJK A, VAN VENROOIJ W J. The use of citrullinated peptides and proteins for the diagnosis of rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Research & Therapy*, 2010, 12(1): 203.

收稿日期: 2020-05-13

修回日期: 2020-06-25