

两种方法检测抗着丝点抗体比较

韩 峰, 荀春华(江西省九江学院附属医院检验科 332000)

【摘要】 目的 评估免疫印迹(IB)和间接免疫荧光(IIF)法检测抗着丝点抗体(ACA)的临床应用价值;观察 ACA 检测的 IIF 法与斑点印迹法之间的相关性。**方法** 收集经 IIF 法和(或)欧盟印迹法检测 ACA 和着丝点蛋白 B 抗体阳性患者血清,同时检测 50 例健康人血清为对照。**结果** IIF 法和 IB 法检测 76 份不同自身免疫病患者血清差异无统计学意义($P > 0.05$),且呈明显的正相关($kappa = 0.871, P < 0.01$)。50 份健康人血清两种方法检测均无阳性。IIF/IB 阳性符合率是 91.9%(68/74),IB/IIF 阳性符合率是 97.1%(68/70)。**结论** 两种方法检测 ACA 效果几乎等价,但 IIF 法检测 ACA 简单、快速、准确,适用于临床 ACA 的常规检测。

【关键词】 抗着丝点抗体; 间接免疫荧光; 免疫印迹

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2012.23.019 文章编号:1672-9455(2012)23-2951-02

Comparison of indirect indirect immunofluorescence and immunoblotting for detecting ACA HAN Feng, XUN Chunhua (Department of Clinical Laboratory, Jiujiang University Hospital, Jiangxi 332000, China)

【Abstract】 Objective To investigate clinical application value of anti-centromere antibody(ACA) detected by indirect indirect immunofluorescence (IIF) and immunoblotting (IB) methods. **Methods** Serum collected from 76 patients with different autoimmune diseases and 50 healthy volunteers were detected by IIF and IB. **Results** There was no significant difference between IIF and IB methods for ACA ($P > 0.05$). IIF ACA positively correlated with the number of immunofixed CENP-B bands ($r = 0.871, P < 0.01$). The positive coincidence rates for IIF/IB and IB/IIF were 91.9%(68/74) and 97.1%(68/70), respectively. While the negative coincidence rate was 100.0%(50/50). **Conclusion** The measure effects of IIF and IB for ACA are almost equivalent. But IIF is a simple, rapid and accurate method for detecting ACA, which can be applied in clinical routine test.

【Key words】 anti-centromere antibody; indirect immunofluorescence; immunoblotting

抗着丝点抗体(ACA)其靶抗原为着丝点蛋白,位于在细胞分裂时与纺锤体相互作用的动原体(动粒体)的内板与外板上。目前已知与 ACA 反应的着丝点蛋白通常有多种:着丝点蛋白 A(CENP-A, 17×10^3)、着丝点蛋白 B(CENP-B, 80×10^3)、着丝点蛋白 C(CENP-C, 140×10^3)、着丝点蛋白 D(CENP-D)等系列。近年来陆续发现了识别着丝点蛋白 E(CENP-E)、着丝点蛋白 F(CENP-F)、着丝点蛋白 G(CENP-G)等多种抗着丝点抗体,但比较少见^[1-4]。ACA 的检测方法包括免疫印迹(IB)和间接免疫荧光(IIF)、酶联免疫吸附试验(ELISA)等方法。以培养细胞为实验基质的 IIF 法,是目前检测 ACA 常用的方法。人喉癌上皮细胞株(HEp-2)细胞抗原底物要求应至少含有少量分裂期细胞(分裂中期或后期细胞),HEp-2 细胞抗原底物富含分裂期细胞,适合于 ACA 检测。采用分子生物学技术克隆、表达、纯化的 CENP-B 能够被 ACA 抗血清识别^[5],ACA 主要靶抗原 CENP-B 能与含有各种抗着丝点抗体的血清起反应^[3-4],因此欧盟公司 ANA 谱试剂盒中多以提纯或重组的 CENP-B 为包被抗原。本文分析 IIF 法和 IB 法检测 ACA 的符合性,旨在评估两种方法检测 ACA 的价值。

1 材料与方 法

1.1 标本 收集 2010 年 9 月至 2011 年 6 月在本院检查的 76 份经临床诊断和欧盟 ANA 谱印迹法免疫学检测为不同类型的自身免疫病的患者血清,包括系统性红斑狼疮、干燥综合征、多发性皮炎等,符合美国风湿病协会(ARA)1997 年修订的

诊断标准,以及 50 份健康人血清,均为本科室保存。

1.2 仪器与试剂 仪器采用荧光显微镜和转移脱色摇床。ACA 检测采用 HEp-2 为抗原底物的 IIF 法检测,IIF 法检测试剂盒和 ANA 谱检测试剂盒均购自德国欧盟公司。

1.3 结果判断标准

1.3.1 IIF 法检测 ACA 将血清按 1:100 稀释,按试剂说明书操作。荧光显微镜下在非分裂期 HEp-2 细胞的细胞核内散在分布相同大小的颗粒荧光(每个细胞核为 46 或 92 个不等),在有丝分裂期,荧光颗粒聚集在细胞中板上或于两侧呈带状排列,ACA 为阳性。

1.3.2 IB 法检测 ACA 将血清在反应槽中按 1:100 稀释,按试剂说明书操作。试剂条显色区带与质控带进行对照,显紫色为阳性,不显色为阴性。

2 结 果

2.1 IIF 和 IB 法检测 ACA 模式 HEp-2 细胞抗着丝点荧光图形为有丝分裂期细胞染色体区呈现棒状或带状与浓缩染色体相应排列的着丝点荧光染色,分裂中期细胞呈现位于细胞中央的密集棒状排列的着丝点荧光染色,分裂后期浓缩的着丝点以 2 条连接中心的平行带形式出现;可呈现 46~92 个荧光颗粒;IB 法每条带质控带均出现紫色条带,CENP-B 对应位置出现条带为阳性。见图 1。

2.2 两种方法结果分析 IIF 法检测 ACA 阳性通常伴有其他核型的出现,如胞浆型、核模型、核仁型、均质型、斑点型、均质斑点型等。68 例 ACA 和 CENP-B 同时阳性,6 例 CENP-B

阳性而 ACA 阴性的抗核抗体荧光核型为 4 例颗粒型, 2 例均质型均是强阳性; 2 例 ACA 阳性而 CENP-B 阴性。50 例健康对照组均无 1 例阳性, 特异性均高达 100%。两种方法吻合程度良好 ($P < 0.01$)。IIF/IB 阳性符合率是 91.9% (68/74), IB/IIF 阳性符合率是 97.1% (68/70)。见表 1。

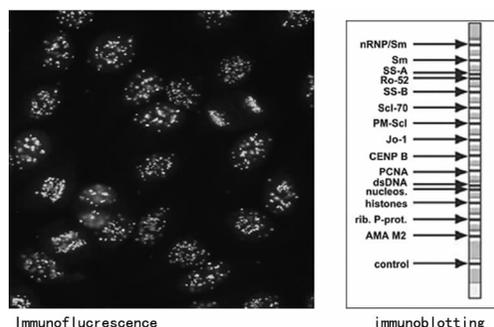


图 1 两种检测方法的模式

表 1 两种方法检测 ACA 结果

IIF 法	IB 法		合计	McNemary χ^2 检验		Kappa 一致性检验	
	+	-		χ^2	P	kappa	P
+	68	2	70				
-	6	50	56	1.125	0.289	0.871	0.000
合计	74	52	126				

注: McNemary χ^2 检验两种试验方法阳性率之间差异, $P > 0.05$, 差异无统计学意义。Kappa 表示一致性检验两种实验结果间的吻合程度, $P < 0.01$, 二者之间吻合程度好。

3 讨论

本研究结果显示 IIF 法检测出的 ACA 荧光模式符合文献报道, IB 法所检测的 ACA 阳性条带符合说明书的要求。76 例患者血清中有 68 例两种方法均为阳性, 6 例仅斑点印迹法测出 ACA 阳性标本, 其抗核抗体均强阳性, 众所周知, 血清低稀释倍数时, 多种自身抗体可能相互掩盖。应将该样本进一步稀释再确定核型。2 例 IIF 法测出阳性而 CENP-B 阴性, 可能是该样本特异性的靶抗原不含 CENP-B。

ACA 是系统性硬化症皮肤僵硬综合症 (CREST) 的特异性抗体, 阳性率可达 80%~98%^[6]。CREST 综合征属系统性硬化症中的一种良性变异型, 临床表现主要包括钙质沉着、雷诺现象、食管运动障碍、指(趾)硬皮病和毛细血管扩张 (telangiectasias, T) 等。ACA 阳性往往预示患者较少涉及内脏损害, 是预后较好的一个指标。此外, 原发性雷诺现象患者 (无其他 CREST 症状或体征) 中 ACA 的阳性率为 25%, 抗体阳性患者易发展成系统性硬化症局限型, 此类患者可能是 CREST 综合征的早期变异型或顿挫型。弥漫性系统性硬化症中 ACA 较为少见, 阳性率仅为 8%。ACA 很少与抗 SCL-70 抗体同时存在。ACA 除主要与局限型系统性硬化症相关外, 还偶见于局限性肺动脉高压、其他结缔组织疾病、关节痛和原发性甲状腺炎伴雷诺现象等患者中。此外, ACA 还见于原发性胆汁性肝硬化 (PBC) 患者中, 阳性率 10%~20%。ACA 阳性的 PBC 患者常同时存在 CREST 综合征的临床症状。PBC 患者中 ACA

阳性常伴 PBC 其他相关自身抗体, 最常见的是抗线粒体抗体 (AMA), PBC 患者中约 20% 的 AMA 阳性伴 ACA 阳性。ACA 伴抗核点抗体、抗核包膜蛋白抗体的荧光染色模型也可见到^[6-8]。最近研究表明 ACA 阳性自身免疫性肝病患者血清 IgG 水平低于 ACA 阴性患者, 提示 ACA 可能与免疫水平相关^[9]。

综上所述, ACA 的检测临床意义重大。但是采用何种方法能够准确且经济适用检测出 ACA 是检验人员考虑的问题。欧盟 ANA 谱免疫印迹操作繁琐, 且必须 14 项检测同时做, 试剂昂贵, 给患者带来不必要的经济负担; 而 IIF 法不仅可以得出 ACA 的结果, 也可以看出是否有其他核型的存在。因此, 两种方法检测 ACA 效果几乎等价, 但 IIF 法经济适用、快速、准确, 适用于临床 ACA 的常规检测。

参考文献

- [1] Figueroal J, Pendon C, Valdivia MM. Molecular cloning and sequence analysis of hamster CENP-A cDNA [J]. BMC Genomics, 2002, 3(1): 11-14.
- [2] Masumoto H, Nakano M, Ohzeki J. The role of CENP-B and a-satellite DNA: de novo assembly and epigenetic maintenance of human centromeres [J]. Chromosome Res, 2004, 12(6): 543-556.
- [3] Marshall OJ, Choo KH. Putative CENP-B paralogues are not present at mammalian centromeres [J]. Chromosoma, 2012, 121(2): 169-79.
- [4] Mahler M, Mierau R, Bluthner M. Fine-specificity of the anti-CENP-A B-cell autoimmune response [J]. J Mol Med, 2000, 78(8): 460-467.
- [5] Robitaille G, Hénault J, Christin MS, et al. The nuclear autoantigen CENP-B displays cytokine-like activities toward vascular smooth muscle cells [J]. Arthritis Rheum, 2007, 56(11): 3814-3826.
- [6] González-Buitrago JM, González C, et al. Antibodies to centromere antigens measured by an automated enzyme immunoassay [J]. Clin Chim Acta, 2003, 328(1-2): 135-138.
- [7] Cavazzana I, Ceribelli A, Taraborelli M, et al. Primary biliary cirrhosis-related autoantibodies in a large cohort of Italian patients with systemic sclerosis. J Rheumatol, 2011, 38(10): 2180-2185.
- [8] Okada T, Ohzeki J, Nakano M, et al. CENP-B controls centromere formation depending on the chromatin context [J]. Cell, 2007, 131(7): 1287-1300.
- [9] Himoto T, Murota M, Yoneyama H, et al. Clinical characteristics of patients with autoimmune hepatitis seropositive for anticentromere antibody [J]. Hepatol Res, 2010, 40(8): 786-792.