

外周血淋巴细胞 HLA-B27 表达强度与强直性脊柱炎临床分期的关系

吴丽娟¹, 李茂圆^{1,2}, 刘霞³, 刘毓刚¹, 李运明⁴, 刘彤¹, 谢静¹ (1. 解放军成都军区总医院临床实验医学研究与保障中心, 成都 610083; 2. 第三军医大学大坪医院感染控制科, 重庆 400042; 3. 解放军成都军区总医院体检中心, 成都 610083; 4. 解放军成都军区总医院质管科统计学室, 成都 610083)

【摘要】 目的 了解强直性脊柱炎(AS)不同临床分期患者外周血淋巴细胞人类白细胞抗原 B27(HLA-B27)表达量与疾病临床分期之间的关系。方法 采用三色流式细胞学检测技术分析 88 例不同阶段 AS 患者及 132 例健康人的外周血淋巴细胞 HLA-B27 表达率及表达强度(MNX)。结果 AS 进展期患者外周血淋巴细胞 HLA-B27 表达率的中位数、P25、P75 分别是 95.34%、86.60%、97.39%, MNX 的中位数、P25、P75 分别为 8.70、5.20、10.80; 强直期患者外周血淋巴细胞 HLA-B27 表达率的中位数、P25、P75 分别是 94.51%、90.40%、97.83%, MNX 的中位数、P25、P75 分别为 8.40、6.05、15.95。健康对照组的外周血淋巴细胞 HLA-B27 表达率的中位数、P25、P75 分别是 3.69%、1.03%、11.13%, MNX 的中位数、P25、P75 分别为 1.50、1.30、1.90。Mann-Whitney U 检验显示, AS 患者进展期与强直期的外周血淋巴细胞 HLA-B27 表达率及 MNX 均差异无统计学意义($P>0.05$); 进展期、强直期与健康对照组的外周血淋巴细胞 HLA-B27 表达率及 MNX 均差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 外周血淋巴细胞 HLA-B27 的表达率及 MNX 适合于 AS 诊断, 对 AS 病情判断无辅助意义。

【关键词】 强直性脊柱炎; 临床分期; HLA-B27; 蛋白质表达; 流式细胞术

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2014.21.011 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2014)22-2971-03

Relationship between expression intensity of HLA-B27 in peripheral blood lymphocyte and clinical stage of ankylosing spondylitis WU Li-juan¹, LI Mao-yuan^{1,2}, LIU Xia³, LIU Yu-gang¹, LI Yun-ming⁴, LIU Tong¹, XIE Jing¹ (1. Research and Service Center of Clinical Laboratory Medicine, General Hospital of Chengdu Military Region, Chengdu, Sichuan 610083, China; 2. Department of Infection Control, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China; 3. Medical Examination Center, General Hospital of Chengdu Military Region, Chengdu, Sichuan 610083, China; 4. Medical Statistics Room, Department of Quality Management, General Hospital of Chengdu Military Region, Chengdu, Sichuan 610083, China)

【Abstract】 **Objective** To study the relationship between the expression amount of peripheral blood lymphocyte HLA-B27 with the clinical stages in the patients with different clinical stages of ankylosing spondylitis(AS). **Methods** The expression rate and the expression intensity(MNX) of peripheral blood lymphocyte HLA-B27 were detected in 88 cases of different stages of AS and 132 healthy individuals by the three-color flow cytometry and the results were analyzed statistically. **Results** The median number, P25 and P75 of peripheral blood lymphocyte HLA-B27 expression rate in the patients with progressive stage of AS were 95.34%, 86.60% and 97.39% respectively, the median number, P25 and P75 of MNX were 8.70, 5.20 and 10.80 respectively; the median number, P25 and P75 of peripheral blood lymphocyte HLA-B27 expression rate in the rigidity stage were 94.51%, 90.40% and 97.83% respectively, the median number, P25 and P75 of MNX were 8.40, 6.05 and 15.95 respectively. The median number, P25, P75 of peripheral blood lymphocyte HLA-B27 expression rate in the healthy control group were 3.69%, 1.03% and 11.13%, respectively, the median number, P25 and P75 of MNX were 1.50, 1.30 and 1.90 respectively. The Mann-Whitney U test showed that the expression rate and MNX of peripheral blood lymphocyte HLA-B27 no statistically significant differences between the progressive stage and the rigidity stage in AS patients ($P>0.05$); the differences in the expression rate and MNX of peripheral blood lymphocyte HLA-B27 among the progressive stage, rigidity stage and the healthy control group had statistical significance. **Conclusion** The expression rate and MNX of peripheral blood lymphocyte HLA-B27 are suitable for the diagnosis of AS and have no auxiliary significance in the judgment of AS condition.

【Key words】 ankylosing spondylitis; clinical stage; HLA-B27; protein expressing; flow cytometry

强直性脊柱炎(AS)是一种主要发病于年轻男性的慢性骨、关节自身免疫性疾病,主要累及骶髂关节、脊柱骨突、脊柱旁软组织及外周关节,并可伴发关节外表现,其致残率极高。有研究表明 AS 患者存在不同程度的特异性免疫及非特异性免疫功能亢进^[1]。人们早已发现人类白细胞抗原 B27(HLA-B27)与 AS 发病具有高度相关性^[2-3],90%左右的患者外周血淋巴细胞 HLA-B27 阳性^[4]。故目前以外周血淋巴细胞 HLA-B27 是否表达作为 AS 诊断的重要依据。而对于 AS 的临床病程,国内大多数学者都是按照骶髂关节炎程度来判断分期^[5-6]。为了探讨外周血淋巴细胞 HLA-B27 的表达量与 AS 临床分期的关系,本文采用流式细胞术检测 AS 各期患者及健康对照人员的 HLA-B27 表达率及表达强度(MNX),现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2009 年 6 月至 2012 年 11 月中国人民解放军成都军区总医院门诊及住院患者 2 303 例。依照 1984 年修订的纽约标准^[4],被明确诊断为 AS 的患者 88 例,包括 AS 进展期 51 例(进展期组),其中女 8 例,男 43 例,年龄 12~53 岁;AS 强直期 37 例(强直期组),女 2 例,男 35 例,年龄 13~60 岁;健康对照组为同期来院体检合格的健康者 132 例,其中女 55 例,男 77 例,年龄 4~91 岁。

1.2 AS 诊断标准及分期标准

1.2.1 诊断标准 (1)临床标准为腰痛、晨僵 3 个月以上,活动改善,休息无改善;腰椎额状面和矢状面活动受限;胸廓活动度低于相应年龄、性别的健康人。(2)放射学标准(骶髂关节炎分级同纽约标准):双侧大于或等于 II 级或单侧 III~IV 级骶髂关节炎。诊断符合放射学标准和 1 项及以上临床标准者为肯定诊断;符合 3 项临床标准,或符合放射学标准而不伴临床症状者为可能 AS^[4]。

1.2.2 分期标准 综合 X 线片表现、临床症状与体征、预后等方面将 AS 患者大致分为 3 期:隐匿期(早期)、进展期、强直期^[7]。(1)隐匿期(早期),对应于轻型 AS:尚无脊柱或外周关节活动受限的 AS 患者,此时尚未达到 1984 年纽约标准,临床上难以确诊,基本上属于回顾性诊断;(2)进展期,对应于中度 AS:达到 1984 年纽约标准,病情进展,脊柱和(或)外周关节轻、中度活动受限,对药物治疗仍有较好反应;(3)强直期,对应于重型 AS,脊柱和(或)外周关节活动严重受限,影像学显示关节部分或完全融合,常规药物治疗改善甚微^[7]。

1.3 试剂及仪器 HLA-B27 表达采用美国 Beckman-Coulter 公司 EPICS XL4 型流式细胞仪进行检测,HLA-B27-FITC/HLA-B7-PE、IgG_{2a}-FITC/ IgG₁-PE、溶液 A(溶血剂)、B(终止剂)、C(固定剂)等试剂均为美国 Beckman-Coulter 公司产品。

1.4 试验方法 各组清晨空腹采集静脉血 2 mL,乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K₂)抗凝。向同型对照管和测定管各加入全血 50 μL,同型对照管每管加入 IgG_{2a}-FITC/ IgG₁-PE 抗体组合 10 μL 进行标记,测定管每管加入 B27-FITC/B7-PE 抗体组合 10 μL 进行标记。避光孵育 30 min,依次向各试管加入溶液 A 625 μL,混匀 5~10 s;待完全溶血再向各试管加入溶液 B 265 μL,继续混匀 5~10 s;然后向各试管加入溶液 C 265 μL,再次混匀 5~10 s。用流式细胞仪进行检测。记录 HLA-B27 阳性

细胞占总淋巴细胞的百分数(即表达率)及 MNX^[8]。

1.5 统计学处理 采用 SPSS16.0 统计软件进行分析,各组数据(包括表达率和 MNX)先分别用 Kolmogorov-Smirnov Test 做正态分布检验,因检验结果均显示为非正态数据,故健康对照组、进展期组、强直期组三组数据间的两两比较采用 Mann-Whitney U 检验。以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

健康对照组与 AS 进展期组及强直期组比较,HLA-B27 表达率和 MNX 均差异有统计学意义(P<0.05);而进展期组与强直期组 HLA-B27 表达率和 MNX 差异无统计学意义(P>0.05)。见表 1、2。

表 1 流式细胞术外周血 HLA-B27 表达率结果(%)

组别	n	中位数	25 百分位数	75 百分位数
健康对照组	132	3.69	1.03	11.13
进展期组	51	95.34*	86.60*	97.39*
强直期组	37	94.51*	90.40*	97.83*

注:与健康对照组比较,*P<0.05。

表 2 流式细胞术外周血 HLA-B27 MNX 结果(%)

组别	n	中位数	25 百分位数	75 百分位数
健康对照组	132	1.50	1.30	1.90
进展期组	51	8.70*	5.20*	10.80*
强直期组	37	8.40*	6.05*	15.95*

注:与健康对照组比较,*P<0.05。

3 讨论

AS 属自身免疫性疾病类型,具有明显的家族聚集倾向^[1],在我国患病率为 0.25%左右,男性多见,20~30 岁为发病高峰^[4]。发病机制现在尚未完全清楚,一般认为是一组多基因遗传病。研究已证实 AS 发病与淋巴细胞 HLA-B27 表达高度相关,现国内外对 AS 的发病机制不管是连锁不平衡假说、免疫应答基因学说、关节源性肽假说,还是未折叠蛋白质应答假说,均支持患者由于存在 HLA-B27 的高表达引起了体内异常的免疫应答,从而导致了脊柱关节病的发生^[8-9],其他易感因素还包括微生物感染等^[9]。AS 致残率极高,早期诊断,积极防治可降低其致残率、提高患者的生活质量。该病的诊断主要靠临床症状体征和放射学标准诊断,而放射学标准要到疾病发展到一定阶段后才有明显表现,不利于早期诊断。HLA-B27 作为 AS 的重要实验室检测指标,对 AS 的早期诊断具有重要意义,故 HLA-B27 的检测已作为 AS 诊断非常重要的检测方式。但是,淋巴细胞 HLA-B27 表达检测结果对于 AS 患者的临床分期有无价值,是否可用于病情监测目前仍不得而知。

本研究采用流式细胞术检测 AS 各期患者及健康对照者的淋巴细胞 HLA-B27 表达率及 MNX,将各组数据对比研究,发现 AS 进展期与强直期患者的 HLA-B27 表达率及 MNX 间差异无统计学意义(P>0.05),说明外周血淋巴细胞 HLA-B27 的表达率及 MNX 与 AS 临床分期没有相关性,这也进一步说明外周血淋巴细胞 HLA-B27 的检测不能反映 AS 患者病情程度、判断病情,也不是疗效监测的指标。而 AS 各临床分期患者的外周血淋巴细胞 HLA-B27 表达率及 MNX 与健康对

照组外周血淋巴细胞 HLA-B27 表达率及 MNX 对比之后均差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 与国内外文献[10-12]报道 AS 患者 HLA-B27 阳性率大于 90%, 健康者阳性率也在 5% 左右的结果一致, 所以 HLA-B27 的检测不能作为 AS 的确诊依据, 只能作为 AS 的基因易感标志物。所以 HLA-B27 的检测只能作为 AS 诊断的重要辅助手段, 而不能作为诊断 AS 的唯一指标, 而且并不是所有的 AS 患者都会出现 HLA-B27 阳性^[13], 故 HLA-B27 阴性也不可作为排除 AS 的指标。

遗憾的是由于 AS 早期患者尚未达到 1984 年纽约诊断标准^[7], 临床上多数回顾性诊断, 未能统计到早期 AS 数据, 故早期数据欠缺, 且疑似 AS 患者太少, 未用于本研究。要想把外周血淋巴细胞 HLA-B27 表达与 AS 临床分期的关系这一课题研究透彻, 临床上必须做好对外周血淋巴细胞 HLA-B27 表达阳性而临床现诊断标准为阴性患者的长期定期随访, 只有对大量这类早期 HLA-B27 已异常表达的潜在 AS 患者数据掌握后, 才可最终明确 HLA-B27 表达测定在预防 AS 发生中的作用与意义。

参考文献

[1] 何元虎, 吴雪梅, 吴丽娟. 强直性脊柱炎患者外周血淋巴细胞亚群分析[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(2): 141-142.

[2] Braun J, Bollow M, Remlinger G, et al. Prevalence of spondylarthropathies in HLA-B27 positive and negative blood donors[J]. Arthritis Rheum, 1998, 41(1): 58-67.

(上接第 2970 页)

[12] Fattovich G, Bortolotti F, Donato F. Natural history of chronic hepatitis B; special emphasis on disease progression and prognostic factors[J]. J Hepatol, 2008, 48(2): 335-352.

[13] Grimm D, Heeg M, Thimme R. Hepatitis B virus; from immunobiology to immunotherapy[J]. Clin Sci (Lond), 2013, 124(2): 77-85.

[14] Chu CM, Liaw YF. HBsAg seroclearance in asymptomatic carriers of high endemic areas: appreciably high rates during a long-term follow-up[J]. Hepatology, 2007, 45(5): 1187-1192.

[15] Liu J, Yang HI, Lee MH, et al. Incidence and determinants of spontaneous hepatitis B surface antigen seroclearance; a community-based follow-up study[J]. Gastroenterology, 2010, 139(2): 474-482.

[16] Pondé RA. The underlying mechanisms for the “simultaneous HBsAg and anti-HBs serological profile”[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2011, 30(11): 1325-1340.

[17] Pondé RA. Atypical serological profiles in hepatitis B virus infection[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2013, 32

[3] 王建中. 临床流式细胞分析[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2005: 491-493.

[4] 陆再英, 钟南山. 内科学[M]. 7 版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 866-870.

[5] 孟家晓, 沈君, 梁碧玲, 等. 骶髂关节强直性脊柱炎的 CT 诊断价值[J]. 中国 CT 和 MRI 杂志, 2004, 4(2): 46-48.

[6] 邹清旭, 孟凯, 柳澄. 强直性脊柱炎 CT 与临床表现[J]. 医学影像学杂志, 2002, 12(4): 285-287.

[7] 廖志鹏, 汪青春, 谢秋屏, 等. 强直性脊柱炎临床分期探讨[J]. 南方医科大学学报, 2006, 26(8): 1176-1178.

[8] 吴丽娟. 临床流式细胞学检验技术[M]. 北京: 人民军医出版社, 2010: 78-88.

[9] 刘巍, 方方. 强直性脊柱炎病因及发病机制的研究进展[J]. 山东医药, 2010, 50(15): 108-109.

[10] 陈国敏, 王东辰. 人白细胞抗原-B27 在诊断强直性脊柱炎中的意义[J]. 检验医学与临床, 2007, 4(10): 931.

[11] Brown MA. Human leucocyte antigen-B27 and ankylosing spondylitis[J]. Intern Med J, 2007, 37(11): 739-740.

[12] 黄烽, 杨春花. 强直性脊柱炎临床及免疫发病机制的研究进展[J]. 中国免疫学杂志, 2001, 17(6): 281-285.

[13] 阎小萍. 强直性脊柱炎[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2004: 114-115.

(收稿日期: 2014-03-11 修回日期: 2014-05-20)

(4): 461-476.

[18] Chen Y, Qian F, Yuan Q, et al. Mutations in hepatitis B virus DNA from patients with coexisting HBsAg and anti-HBs[J]. J Clin Virol, 2011, 52(3): 198-203.

[19] Huang X, Qin Y, Zhang P, et al. PreS deletion mutations of hepatitis B virus in chronically infected patients with simultaneous seropositivity for hepatitis-B surface antigen and anti-HBs antibodies[J]. J Med Virol, 2010, 82(1): 23-31.

[20] Colson P, Borentain P, Motte A, et al. Clinical and virological significance of the co-existence of HBsAg and anti-HBs antibodies in hepatitis B chronic carriers[J]. Virology, 2007, 367(1): 30-40.

[21] Zhang JM, Xu Y, Wang XY, et al. Coexistence of hepatitis B surface antigen(HBsAg) and heterologous subtype-specific antibodies to HBsAg among patients with chronic hepatitis B virus infection[J]. Clin Infect Dis, 2007, 44(9): 1161-1169.

(收稿日期: 2014-02-25 修回日期: 2014-04-19)