

流式细胞术与 PCR-SSP 法检测 HLA-B27 的比对及 HLA-B27 亚型的研究*

白世杰¹, 托 娅^{2△}, 张保平², 王丽娟¹, 王雅菲¹ (1. 内蒙古医科大学研究生院, 呼和浩特 010050; 2. 内蒙古医科大学附属医院检验科, 呼和浩特 010050)

【摘要】 目的 探讨流式细胞术(FCM)与序列特异性引物聚合酶链式反应(PCR-SSP)在人类白细胞表面抗原-B27(HLA-B27)检测中的应用,并观察 HLA-B27 亚型在本地区的分布情况。**方法** 采用 PCR-SSP 和 FCM 检测 88 例疑似强直性脊柱炎(AS)患者 HLA-B27。**结果** 88 例 AS 疑似患者中 FCM 法检测 HLA-B27 结果阳性 82 例,阴性 6 例,阳性率为 93.2%;PCR-SSP 法检测阳性 83 例、阴性 5 例、阳性率为 94.3%。分型结果 B*2705 型 41 例占 49.4%;B*2704 型 37 例占 44.5%;B*2702 型 1 例占 1.2%;阳性但未分辨型别 4 例。**结论** Kappa 一致性系数 $K=0.905$,PCR-SSP 法与 FCM 检测 HLA-B27 结果具有较高的一致性。本地区易感 HLA-B27 等位基因亚型主要以 HLA-B*2704 和 HLA-B*2705 为主。

【关键词】 强直性脊柱炎; HLA-B27; PCR-SSP; 流式细胞术

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2016.05.004 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2016)05-0586-02

Comparison of HLA-B27 detection by flow cytometry and SSP-PCR and study on HLA-B27 subtypes* BAI Shi-jie¹, TUO Ya^{2△}, ZHANG Bao-ping², WANG Li-juan¹, WANG Ya-fei¹ (1. Graduate School of Inner Mongolia Medical University, Huhehaote, Inner Mongolia 010050, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Huhehaote, Inner Mongolia 010050, China)

【Abstract】 **Objective** To investigate the application of flow cytometry (FCM) and sequence-specific primer polymerase chain reaction (PCR-SSP) method in the detection of human leukocyte antigen-B27 (HLA-B27) and to observe the distribution of HLA-B27 subtypes in the local region. **Methods** The HLA-B27 level in 88 cases of suspected ankylosing spondylitis (AS) was detected by FCM and PCR-SSP. **Results** Among 88 cases of suspected AS, 82 cases were HLA-B27 positive and 6 cases were HLA-B27 negative by FCM, the positive rate was 93.2%; whereas 83 cases were HLA-B27 positive and 5 cases were HLA-B27 negative by PCR-SSP, the positive rate was 94.3%. In the subtyping results, 41 cases were B*2705 genotype, accounting for 49.4%, 37 cases were B*2704 genotype, accounting for 44.5%, 1 case was B*2702 genotype, accounting for 1.2%, 4 cases were positive without distinguished genotype. **Conclusion** The Kappa consistency coefficient is 0.905, the detection results of HLA-B27 by PCR-SSP and FCM have higher consistency. The susceptible HLA-B27 allele subtypes are mainly HLA-B*2704 and HLA-B*2705.

【Key words】 ankylosing spondylitis; HLA-B27; PCR-SSP; flow cytometry

强直性脊柱炎(AS)是骶髂关节组织及中轴骨骼发生病变的慢性自身免疫疾病^[1]。1973 年首次发现人类白细胞表面抗原 B27(HLA-B27)与 AS 之间存在密切相关性,随后的研究证实了此观点,自此 HLA-B27 成为了临床诊断 AS 的重要辅助检查指标。随着研究的深入,HLA-B27 被发现存在多种等位基因亚型,各亚型在不同人种和地域中的分布不同,了解不同地区人群的易感基因亚型对今后疾病的个体化诊断有重要意义^[2-4]。目前,流式细胞术(FCM)法是国际公认的 HLA-B27 的检测方法,FCM 法虽然检测灵敏度和特异性都很高,但其仪器昂贵,标本不易存放,而分子生物学方法检测结果准确性高,操作简单,因此对 HLA-B27 基因分型检测成为一种趋势^[5]。本研究采用 HLA-B27 序列特异性引物聚合酶链式反应试剂盒对 FCM 检测结果阳性以及结果位于灰区的样本进行分型,观察两种方法检测 HLA-B27 的一致性和本地区的易感基因亚型。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2014 年 3~7 月内蒙古医科大学附属医

院临床检验中心收治的 FCM 法检测 HLA-B27 抗原的患者,从中选取检测结果阳性及结果位于灰区标本 88 例,其中男 63 例,女 25 例;年龄 16~75 岁,平均(35.0±9.7)岁。

1.2 仪器与试剂 FACS Calibur 流式细胞仪(美国 BD 公司);PCR 热循环仪(ABI-2720);电泳仪(BIO-RAD);凝胶成像系统(SAGECREATION);生物安全柜;BD HLA-B27 kit (HLA-B27 FITC/CD3 PE);DNA 提取试剂盒(美国 Promega 公司);HLA-B27 高分辨基因分型试剂盒(天津秀鹏生物技术有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 FCM 检测 样本淋巴细胞表面 HLA-B27 抗原及结果判断 采用 EDTA-K₂ 抗凝真空采血管采集患者静脉外周血 2 mL,使用美国 BD 公司 FACS Calibur 流式细胞仪 24 h 内上机检测。操作过程完全按照试剂盒说明书进行,使用 BD 公司 HLA-B27 专用分析软件对结果进行分析。

1.3.2 模板 DNA 提取 采用美国 Promega 公司的全血 DNA 提取试剂盒从 EDTA 抗凝的静脉全血中提取模板

* 基金项目:内蒙古自治区自然科学基金(2014MS0854);内蒙古医科大学附属医院重大科研项目(NYFY-ZD2012015)。

作者简介:白世杰,男,在读硕士,主要从事机体免疫功能与疾病的分子诊断方面的研究。△ 通讯作者,E-mail:antuoya@163.com。

DNA,操作过程完全按照试剂盒说明书进行。

1.3.3 PCR 扩增 通过 ABI-2720 PCR 热循环仪采用天津秀鹏生物技术有限公司的 HLA-B27 高分辨试剂盒进行检测,操作流程严格按照操作说明书进行并严防污染。

1.3.4 凝胶电泳及成像 配制 2.5% 琼脂糖凝胶,按要求将 6 μL PCR 反应产物转移至凝胶孔中,使用电泳仪在 140 V 电压下电泳 7 min,电泳结束后将凝胶转移至凝胶成像仪内,应用 UVP 凝胶成像系统记录结果,参照试剂盒附的结果判读表判断结果。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件对数据进行处理及统

计学分析,一致性检验采用 Kappa 检验。

2 结 果

88 例疑似 AS 患者中 FCM 法检测 HLA-B27 抗原结果阳性 82 例阴性 6 例,阳性率为 93.2%;PCR-SSP 法检测阳性 83 例,阴性 5 例,阳性率为 94.3%,见表 1。83 例 PCR-SSP 法的分型结果(电泳条带见图 1),B*2705 型 41 例占 49.4%;B*2704 型 37 例占 44.5%;B*2702 型 1 例占 1.2%;阳性但未分辩型别 4 例占 4.9%。根据 Landis 等^[6]的 Kappa 一致性系数划分方法,本次试验两种方法检测 HLA-B27 的 Kappa 一致性系数 K=0.905,两种方法的一致性极高。

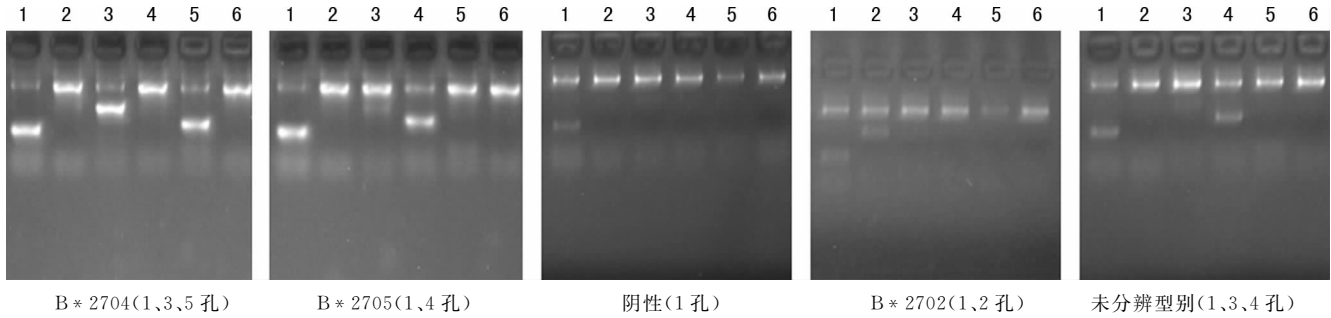


图 1 HLA-B27 凝胶电泳部分结果图像

表 1 两种方法检测 HLA-B27 结果比较

PCR-SSP	FCM		合计	所占比例 (%)
	阳性	阴性		
阳性	82	1	83	94.3
阴性	0	5	5	5.7
合计	82	6	88	—
所占比例 (%)	93.2	6.8	—	—

注:—表示无数据。

3 讨 论

国际上对 AS 的诊断标准主要是 1966 年纽约标准和 1984 年的纽约修订标准^[7],均主要以影像学改变来明确诊断,而多数 AS 患者病程发展 10~20 年之后才会出现明显的影像学改变,故常被漏诊和误诊为类风湿关节炎、骨关节炎等疾病。研究表明,AS 患者 HLA-B27 阳性率为 90% 左右,而健康人群中的阳性率仅为 8%,同时 HLA-B27 阳性者 AS 的发病率可达 15%~20%,普通人群中仅为 0.1%~0.2%,HLA-B27 对疾病有强烈预示意义^[8-9]。目前检测 B27 的手段主要有微量淋巴细胞毒法 (MLCT)、ELISA 法和 FCM、分子生物学法。MLCT 和 ELISA 法因为灵敏度和特异度相对较差等原因被很少使用。本次研究对 FCM 法和 PCR-SSP 法的方法学一致性进行了分析,得到结果两种方法学一致性极高。在对 33 例 FCM 法检测结果位于灰区标本进行 PCR-SSP 法检测,其中 4 例 PCR-SSP 结果为未分辩型别,与试剂盒厂家工程师沟通认为结果是 B44、B13、B38 中的一种型别和(或)B27 的杂合子,需进一步进行基因测序。这也是 PCR-SSP 法检测 B27 的缺点之一。本次试验通过 PCR-SSP 法检测样本 88 例得到 B*2705 型 41 例占 49.4%;B*2704 型 37 例占 44.5%;B*2702 型 1 例占 1.2%,可以判断内蒙古呼和浩特地区的易感基因亚型仍以 B*2704 和 B*2705 为主,两者合占 93.9%。

综上所述,HLA-B27 的检测可以作为早期诊断 AS 的辅助指标,但不可放大其作用。截止到 2014 年已发现 HLA-B27 的等位基因数达到 105 个之多,而各亚型的分布是有地理差异的,所以了解本地区的易感基因亚型,是非常有必要的^[10]。PCR-SSP 法在等位基因水平检测 HLA-B27 将在明确 AS 的

致病机制和个体化治疗方面发挥重要作用。

参考文献

- [1] 黄宝英,杨菁,富显果,等. HLA-B27 基因亚型分型检测[J]. 中国实验诊断学,2013,17(6):983-985.
- [2] Acar M, Cora T, Tunc R, et al. HLA-B27 subtypes in Turkish patients with ankylosing spondylitis and healthy controls[J]. Rheumatol Int, 2012, 32(10):3103-3105.
- [3] Roberts RL, Wallace MC, Jones GT, et al. Prevalence of HLA-B27 in the New Zealand population; effect of age and ethnicity[J]. Arthritis Res Ther, 2013, 15(5):R158.
- [4] 托娅,张军力. 内蒙古地区疑似强直性脊柱炎患者 HLA-B27 抗原阳性率观察[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2013, 5(5):311-314.
- [5] Pazár B, Sáfrány E, Gergely P, et al. Association of AR-TS1 gene polymorphisms with ankylosing spondylitis in the Hungarian population; the rs27044 variant is associated with HLA-B*2705 subtype in Hungarian patients with ankylosing spondylitis[J]. J Rheumatol, 2010, 37(2):379-384.
- [6] Landis JR, Koch GG. The measurement of observe agreement for gategorical data[J]. Biometrics, 1977, 33(1):159-174.
- [7] 刘越,赵艳梅,夏群. 强直性脊柱炎的诊断与治疗进展[J]. 中国矫形外科杂志, 2015, 23(3):235-238.
- [8] 邹玲莉,贾妙兴,常志娟,等. 流式细胞术检测 4 272 例人类白细胞抗原-B27 表达的临床意义[J]. 浙江中医药大学学报, 2012, 36(3):258-260.
- [9] 林蔚,肖平,吴祖常. HLA-B27 抗原检测在强直性脊柱炎诊断中的意义[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(3):371-372.
- [10] 程四国,王艺芳,张伯伟. HLA-B27 基因亚型与强直性脊柱炎的相关性调查[J]. 中国输血杂志, 2010, 2(5):392-393.