

matase inhibitor therapy in postmenopausal breast cancer patients[J]. *Annals Oncology*, 2015, 26(Suppl 6): 24-25.

[9] Beaver JA, Amiri-Kordestani L, Charlab R, et al. FDA Approval: Palbociclib for the Treatment of Postmenopausal Patients with Estrogen Receptor-Positive, HER2-Negative Metastatic Breast Cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(21): 4760-4766.

[10] Clarke DB, Lloyd AS, Lawrence JM, et al. Development of a food compositional database for the estimation of dietary intake of phyto-oestrogens in a group of postmenopausal women previously treated for breast cancer and validation with urinary excretion[J]. *Br J Nutr*, 2013, 109

(12): 2261-2268.

[11] Munzone E, Giobbie-Hurder A, Gusterson BA, et al. Outcomes of special histotypes of breast cancer after adjuvant endocrine therapy with letrozole or tamoxifen in the monotherapy cohort of the BIG 1-98 trial[J]. *Ann Oncol*, 2015, 26(12): 2442-2449.

[12] Fejerman L, Stern MC, John EM, et al. Interaction between common breast cancer susceptibility variants, genetic ancestry, and nongenetic risk factors in Hispanic women[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2015, 24(11): 1731-1738.

(收稿日期: 2017-06-29 修回日期: 2017-09-12)

• 临床探讨 •

系统性红斑狼疮患者血清中不典型 ANCA 抗体检测及临床意义*

蒋麒俊, 蔡 枫[△]

(上海中医药大学附属市中医医院检验科 200071)

摘要:目的 探究抗中性粒细胞胞浆抗体(ANCA)及其不典型靶抗原在系统性红斑狼疮(SLE)患者血清中的检测率及其临床意义。**方法** 选取 2011 年 12 月至 2016 年 9 月该院确诊的 SLE 患者共 1 128 例作为研究对象,通过间接免疫荧光法(IIF)、免疫印迹法(WB)和酶联免疫吸附试验(ELISA)检测研究对象血清中典型与不典型 ANCA 水平,并分析 ANCA 及其不典型 ANCA 与 SLE 临床症状及其他实验室检测结果的关系。**结果** 采用 IIF 与 WB 检测 1 128 例 SLE 患者血清中 ANCA,其在 SLE 中的阳性率为 24.65%(278/1 128),其中核周型(pANCA)阳性率为 23.49%(265/1 128),胞浆型阳性率为 1.15%(13/1 128)。另随机选取 121 例 pANCA 阳性且抗髓过氧化物酶、抗蛋白酶-3 阴性的 SLE 患者,采用 ELISA 进行其他 6 种相关不典型靶抗原确认试验。不典型靶抗原检出结果有 24 例抗乳铁蛋白(LF)抗体阳性,1 例为 LF 与抗杀菌/通透性增强蛋白(BPI)抗体阳性,另 1 例有 LF 与弹性蛋白酶阳性同时检出,以及单独 2 例 BPI 阳性检出,不典型靶抗原阳性率为 23.14%(28/121)。**结论** 少数患者存在 LF 和 BPI 等非典型 ANCA,此外,ANCA 与 SLE 特定的临床表现(如皮肤血管炎等)及实验室检查指标有一定相关性,提示 ANCA 及其特异性靶抗原可能与 SLE 血管炎症的发病过程相关。

关键词:不典型抗中性粒细胞胞浆抗体; 系统性红斑狼疮; 间接免疫荧光法; 免疫印迹法; 酶联免疫吸附试验

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2017.24.030 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2017)24-3646-03

系统性红斑狼疮(SLE)是一类可溶性抗原-抗体免疫复合物沉积或自身抗体经过免疫介导,以 B 淋巴细胞高度活化为特征,临床表现有多系统损害,症状较为复杂,以皮肤血管炎及肾脏受累最常见,发病原因也较复杂。近年来,国内外关于在 SLE 患者血清中发现抗中性粒细胞胞浆抗体(ANCA)及其不典型靶抗原的报道很多,但关于不典型 ANCA 的研究较少,且缺乏相关临床调查的研究数据。ANCA 不仅存在于 SLE 患者血清中,而且广泛存在于溃疡性结肠炎、自身免疫性肝炎、类风湿关节炎、干燥综合征等自身免疫性疾病患者血清中。ANCA 作为一类免疫球蛋白,其产生在 SLE 发病机制中存在什么样的关系,检测 ANCA 在 SLE 患者临床用药前、后的变化及与临床中不同时期产生的症状有何关联,直接关系到 ANCA 在 SLE 患者血清检测中指导临床诊断及预后的判读。抗髓过氧化物酶(MPO)和抗蛋白酶-3(PR3)抗体是 ANCA 中比较典型的两种,一部分患者可表现为 ANCA 阳性,MPO 和 PR3 阴性。一些学者发现存在一类不典型的 ANCA,包括弹性蛋白

酶(HLE)、乳铁蛋白、杀菌/通透性增加蛋白(BPI)、组织蛋白酶 G 等^[1-2]。本研究旨在探究 ANCA 及其非典型 ANCA 抗原谱与 SLE 患者临床症状及实验室检查等指标的相关性,为临床诊断及预后提供可行的指导,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2011 年 12 月至 2016 年 9 月本院门诊及住院的 SLE 患者 1 128 例,男 112 例,女 1 016 例,年龄 10~87 岁,平均(40±5)岁,分为 ANCA 阳性组 278 例,ANCA 阴性组 850 例。均为排除自身免疫性疾病或炎症疾病的健康者,且无自身免疫性疾病家族史。两组研究对象性别和年龄差异均无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。

1.2 纳入和排除标准

1.2.1 纳入标准 (1)年龄大于或等于 10 岁,男女不限;(2)符合 1997 年美国风湿病学会的诊断标准。

1.2.2 排除标准 (1)合并严重高血压、糖尿病及重要器官功能不全等内科慢性疾病;(2)合并神经精神类疾病。

* 基金项目:上海申康医院发展中心市级医院临床辅助科室能力建设资助项目(SHDC22014009)。

[△] 通信作者, E-mail: caifeng51@126.com。

1.3 仪器与试剂

1.3.1 间接免疫荧光法(IIF)检测试剂 粒细胞马赛克检测试剂盒,新版检测区包括乙醇固定的中性粒细胞、HEp-2⁺ 粒细胞与甲醛固定的粒细胞的 3 种生物薄片。稀释样本与生物薄片温育,通过特异性 IgG、IgA、IgM 抗体与相应抗原结合,以及后荧光素标记的抗人抗体与结合在生物基质上的抗体反应,形成镜下特异性荧光模型。

1.3.2 免疫印迹法(WB)检测试剂 WB 抗 MPO、PR3 和肾小球基底膜(GBM)抗体 IgG 检测试剂盒,试剂盒中平行放置抗原高度纯化的检测膜条。利用 WB 将蛋白质转移到膜上,利用包被有 PR3、MPO、GBM 高纯度抗原做相应的抗体检测。

1.3.3 酶联免疫吸附试验(ELISA)检测试剂 ANCA 谱选取 6 种典型及不典型抗体,包括 MPO、PR3、LF、人白细胞 HLE、组织蛋白酶 G 及 BPI。微孔板 ELISA 检测试剂盒。

1.3.4 仪器 使用德国欧蒙 EUROBlotMaster II 型全自动蛋白印迹分析仪;美国赛默飞 MULTISKAN FC 酶标仪,型号: Thermo Multis;德国 EUROStar II 型荧光显微镜(含成像系统)。

1.4 试验方法 ANCA 的初筛采用 IIF 及 WB 检测,对核周型 ANCA(pANCA)阳性且排除 PR3、MPO、GBM 抗体为靶抗原的患者血清样本,再采用 ELISA 检测 ANCA 其他 6 种相关的不典型靶抗原。抗核抗体检测采用 IIF,抗 ds-DNA 抗体检测采用 ELISA,抗 ENA 抗体检测采用 WB。SLE 病情活动的判断依照系统性红斑狼疮疾病活动度积分:0~4 分为无活动,>4~9 分为轻度活动,>9~14 分为中度活动,>14 分为重度活动。

1.5 统计学处理 采用 SPSS21.0 统计学软件进行数据处理分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验,计数资料以百分率表示,采用 χ^2 检验。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 IIF 及 WB 检测 1 128 例 SLE 患者血清结果 ANCA 阳性患者 278 例(24.65%),其中 pANCA 265 例(23.49%),胞浆型 ANCA(cANCA)13 例(1.15%)。采用以上两种方法检测后,随机选取 121 例 pANCA 阳性且 MPO、PR3 阴性的患者,采用 ELISA 检测不典型靶抗原,有 24 例 LF 阳性,1 例为 LF 与 BPI 同时检出阳性,另 1 例为 LF 与 HLE 同时检出阳性,以及单独 2 例杀菌/BPI 检出阳性,不典型靶抗原共 28 例,在 pANCA 阳性且 MPO、PR3 阴性的 SLE 患者中阳性率为 23.14%。

2.2 ANCA 及不典型 ANCA 与 SLE 临床表现及实验室检查指标的关系 将 1 128 例患者分为 ANCA(+)与 ANCA(-),通过其临床症状分类,包括皮肤与黏膜表现,面部蝶形红斑、结节性红斑和口腔溃疡、皮肤血管炎等及关节与肌肉表现的关节炎,以及全身性表现有发热、脱发等,再具体到肾脏损害、神经系统损害和病情活动情况等。其次观察抗核抗体、抗 ENA 抗体、抗 ds-DNA 抗体之间的关系见表 1。经统计学处理发现,皮肤黏膜血管炎及肾脏与其他脏器损害、并伴有病情活动等 ANCA(+)的患者高于 ANCA(-)患者,而在这些高于 ANCA(-)的 ANCA(+)患者中,其不典型 ANCA 靶抗原主要以乳铁蛋白为主。此外,在选取的 121 例 pANCA 中不典型 ANCA 靶抗原在 ANCA 阳性患者血清中的临床表现及实验室检查意义见表 2。

表 1 各项指标在 ANCA(+)与 ANCA(-)组的分布情况(*n*)

症状与指标		ANCA(+)组 (<i>n</i> =278)	ANCA(-)组 (<i>n</i> =850)	χ^2	<i>P</i>
面部红斑	有	144	422	0.388	0.533
	无	134	428		
光过敏	有	151	416	2.421	0.120
	无	127	434		
口腔溃疡	有	122	410	1.591	0.207
	无	156	440		
脱发	有	137	374	2.357	0.125
	无	141	476		
浆膜炎	有	123	382	0.041	0.839
	无	155	468		
关节炎	有	158	442	1.967	0.161
	无	120	408		
发热	有	161	544	3.311	0.069
	无	117	306		
皮肤血管炎	有	169	371	24.674	0.000
	无	109	479		
肾脏损害	有	145	385	3.963	0.047
	无	133	465		
神经系统损害	有	156	535	4.113	0.043
	无	122	315		
病情活动	有	153	394	6.323	0.012
	无	125	456		
白细胞降低	有	145	411	1.214	0.271
	无	133	439		
血小板降低	有	117	397	1.802	0.179
	无	161	453		
贫血	有	116	400	2.400	0.121
	无	162	450		
抗核抗体	(+)	218	634	1.662	0.197
	(-)	60	216		
抗 Sm 抗体	(+)	106	274	3.258	0.071
	(-)	172	576		
抗 ds-DNA 抗体	(+)	176	373	31.647	0.000
	(-)	102	477		

表 2 各项指标在 121 例 pANCA 中的分布情况(*n*)

症状与指标		pANCA	不典型 ANCA	χ^2	<i>P</i>
皮肤血管炎	有	44	7	4.394	0.036
	无	49	21		
肾脏累及	有	39	6	3.874	0.049
	无	54	22		

续表 2 各项指标在 121 例 pANCA 中的分布情况(n)

症状与指标	pANCA	不典型 ANCA	χ^2	P
神经系统累及	有	18	1.120	0.290
	无	75		
病情活动	有	40	1.875	0.171
	无	53		
抗 ds-DNA 抗体	(+)	21	0.285	0.594
	(-)	72		

3 讨 论

近年来大量研究表明,除了原发性小血管炎外,在许多自身免疫性疾病中也可发现 ANCA,如 SLE、类风湿关节炎(RA)、溃疡性结肠炎等,其中以 SLE 的研究相对较多^[3]。有关 ANCA 在 SLE 患者血清中的阳性率国内外报道不一(25%~69%)^[4],其原因可能受研究对象疾病种类与病例样本量过小,导致 ANCA 检测结果存在一定局限性的影响,且不典型 ANCA 的研究相对较少,缺乏相关的临床研究数据,且非 MPO(-)、非 PR3-ANCA 抗体相关的疾病谱也比较复杂。此次对 1 128 例明确诊断为 SLE 的患者血清 ANCA 进行大量检测,旨在探究 ANCA 及其不典型靶抗原在 SLE 临床症状与实验室检查之间的关系。因国内尚少有不典型 ANCA 在 SLE 中的临床意义的报道,因此,本研究具有一定意义。

本研究结果显示,1 128 例 SLE 患者中 ANCA(+)患者共 278 例(24.65%),其中 pANCA 共 265 例(23.49%),cANCA 共 13 例(1.15%),后随机选取 121 例 pANCA 阳性且 MPO、PR3 阴性的患者,不典型靶抗原结果 24 例为 LF(+),1 例为 LF 与 BPI 同时检出阳性,另 1 例为 LF 与 HLE 同时检出阳性,还有 2 例单独 BPI 检出阳性,不典型靶抗原共 28 例,在 pANCA 阳性且 MPO、PR3 阴性的 SLE 患者中阳性率为 23.14%(28/121)。皮肤黏膜血管炎及肾脏与其他脏器损害、并伴有病情活动等 ANCA(+)的患者高于 ANCA(-)患者和对照组。此外,随机选取的 121 例非 MPO(-)、非 PR3-ANCA 中不典型靶抗原在相关的临床表现及实验室检查中显示可能和有皮肤血管炎及肾脏受累有一定相关性。国外也有研究显示,SLE 累及肾脏后表现出狼疮性肾炎的发病率高达 50%~75%,严重影响 SLE 患者的预后^[5-6]。本研究结果显示,不典型 ANCA 虽然检出率并不是很高,但其不典型的特异性靶抗原可能与血管炎症及肾脏疾病发病过程相关,且 SLE 伴有皮肤血管炎的患者血清中存在不典型靶抗原 LF 及其他不典型靶抗原,以 LF 为主,LF 在 SLE 发病过程,尤其是在同时伴有肾脏疾病时,如何参与具体发病机制值得进一步探究。此外,国外研究显示,LF 反映的自身抗体存在于 SLE 与 RA 且伴有血管炎的患者中比例约为 45%^[7]。同时 ANCA 在 RA 与 SLE 血清中的阳性率在国内外报道也不尽相同,国外 Spoerl 等^[8]发现 RA 阳性率为 16%~52%,多数为 pANCA。在 LF 致病机制方面,有研究从体液免疫与细胞免疫等角度发现,LF 能使体内自然杀伤细胞数量增加,同时并不增加自然杀伤细胞的细胞毒性,又能与成熟 T、B 淋巴细胞,抗原特异性 T 细胞,抗原递呈细胞涉及到免疫反应^[9-10]。LF 在机体发挥抗炎过程中也起到一定作用,体外试验表明,治疗老鼠肺炎利用 LF

能促使试验鼠肺泡巨噬细胞减少,促进 CD4⁺、CD8⁺ 细胞增加与淋巴细胞增加^[11]。由此提示 LF 作为 ANCA 的不典型靶抗原之一可能参与了炎症的发病过程^[12]。

综上所述,对于 ANCA 的不典型靶抗原在 SLE 患者血清中的临床研究,还需要对更多患者的不典型靶抗原进行检测,有待进一步探讨其与疾病发病的病因、临床表现及预后之间的关系,对进一步阐明 SLE 的发病机制有重要意义。

参考文献

- [1] Korkmaz B, Jenne DE, Gauthier F. Relevance of the mouse model as a therapeutic approach for neutrophil proteinase 3-associated human diseases [J]. *Int Immunopharmacol*, 2013, 17(4): 1198-1205.
- [2] Dobric S, Popovic D, Nikolic M, et al. Anti-neutrophil cytoplasmic anti-bodies (ANCA) specific for one or several antigens; useful markers for subtypes of ulcerative colitis and associated primary sclerosing cholangitis [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2012, 50(3): 503-509.
- [3] 蔡枫,谷丽华,夏莉婷.抗中性粒细胞胞浆抗体检测在自身免疫性疾病中的应用[J].*放射免疫学杂志*, 2013, 26(4): 464-466.
- [4] Calamia KT, Balabanova M. Vasculitis in systemic lupus erythematosus [J]. *Clin Dermatol*, 2004, 22(2): 148-156.
- [5] Doria A, Cutolo M, Ghirardello A, et al. Effect of pregnancy on serum cytokines in SLE patients [J]. *Arthritis Res Ther*, 2012, 14(2): R66.
- [6] Frutos MA, Praga M, Quereda C, et al. Lupus nephritis: in search of a better future [J]. *Nefrologia*, 2012, 32(2): 136-138.
- [7] Wang SB, Deng YQ, Ren J. Lactoferrin administration into the nostril alleviates murine allergic rhinitis and its mechanisms [J]. *Scand J Immunol*, 2013, 78(6): 507-515.
- [8] Spoerl D, Pers YM, Jorgensen C. Anti-neutrophil cytoplasmic anti-bodies in rheumatoid arthritis; two case reports and review of literature [J]. *Allergy Asthma Clin Immunol*, 2012, 8(1): 19-20.
- [9] Liu KY, Comstock SS, Shunk JM. Natural killer cell populations and cytotoxic activity in pigs fed mother's milk, formula, or formula supplemented with bovine lactoferrin [J]. *Pediatr Res*, 2013, 74(4): 402-407.
- [10] Michal J. Effects of lactoferrin on elicitation of the antigen-specific cellular and humoral cutaneous response in mice [J]. *Postepy Hig Med Dosw*, 2012, 1(66): 16-22.
- [11] 刘晓红. 乳铁蛋白与机体免疫 [J]. *中国临床医生*, 2014, 42(8): 14-16.
- [12] 蒋麒俊, 蔡枫. ANCA 相关免疫疾病发病机制及中医药治疗研究进展 [J]. *检验医学与临床*, 2016, 13(8): 1129-1132.