

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.02.002

抗双链 DNA 抗体水平和抗体亲和力与 SLE 患者疾病状态的关系以及对两种方法检测能力的影响*

田野¹,张云聪²,冯珍如²,闫惠平³,张岩¹,张海萍³,李佩¹,
郑芳芳¹,聂秋燕¹,刘晴¹,王晓宁¹,张国军⁴,谭延国^{1△}

(1.首都医科大学附属复兴医院检验科 100038;2.北京大学第一医院检验科,北京 100034;3.首都医科大学附属北京佑安医院临床检验中心 100069;4.首都医科大学附属北京天坛医院实验诊断中心 100050)

摘要:目的 探讨抗双链 DNA(dsDNA)抗体水平和抗体亲和力与系统性红斑狼疮(SLE)疾病活动性的关系,分析两种抗 dsDNA 抗体检测方法检出能力差异的原因。方法 使用酶联免疫吸附试验(ELISA)和间接免疫荧光法(IIF)同时测定 300 例 SLE 患者(SLE 组)和 495 例非 SLE 自身免疫疾病患者(非 SLE 疾病组),以及 300 例健康人(健康对照组)血清中的抗 dsDNA 抗体,然后进一步测定 ELISA 检测为阳性标本的抗 dsDNA 抗体亲和力指数。结果 (1)SLE 组抗 dsDNA 抗体水平[285.8(164.5~463.3)IU/mL]明显高于非 SLE 疾病组[172.9(135.3~200.1)IU/mL],差异有统计学意义($P=0.038$);SLE 组抗体亲和力指数[32.3(19.2~50.7)]与非 SLE 疾病组[15.5(9.5~49.8)]差异无统计学意义($P=0.169$);SLE 组抗 dsDNA 抗体水平和抗体亲和力指数分别与 SLEDAI 评分呈显著正相关($P=0.000,0.002$)。(2)ELISA 和 IIF 同时检测为阳性的标本,其抗 dsDNA 抗体水平和亲和力指数均明显高于单独 ELISA 检测为阳性标本的抗体水平和抗体亲和力指数,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 抗 dsDNA 抗体水平及抗体亲和力指数与 SLE 疾病活动性密切相关,表明较高的抗体水平和抗体亲和力可能影响疾病进程,可作为病程监测的指标。IIF 相对于 ELISA,更倾向于检测出相对较高亲和力的抗 dsDNA 抗体。

关键词:抗双链 DNA 抗体; 抗体亲和力; 间接免疫荧光法; 系统性红斑狼疮

中图分类号:R446.1

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2018)02-0151-04

The correlation between the avidity or level of serum anti-dsDNA antibody with SLE disease progression and their influence on the performance of different detection techniques*

TIAN Ye¹,ZHANG Yuncong²,FENG Zhenru²,YAN Huiping³,ZHANG Yan¹,ZHANG Hai ping³,LI Pei¹,
ZHENG Fangfang¹,NIE Qiuyan¹,LIU Qing¹,WANG Xiaoning¹,ZHANG Guojun⁴,TAN Yanguo^{1△}

(1. Department of Laboratory, Fuxing Hospital, Capital Medical University, Beijing 100038, China;

2. Department of Laboratory, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China;

3. Center for Clinical Laboratory, Youan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100069, China;

4. Center for Laboratory Diagnosis, Beijing Tiantan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China)

Abstract: Objective To investigate the connection between the avidity or level of anti-dsDNA antibody with the progression of systemic lupus erythematosus (SLE), and their influence on the performance of two widely used techniques (ELISA and IIF). **Methods** Using commercially available kits based on ELISA and IIF techniques simultaneously, serum anti-dsDNA antibody was determined from 300 patients with SLE, 495 patients with non-SLE autoimmune disease, and 300 health controls (HCs). Positive samples by ELISA were further determined for anti-dsDNA antibody avidity index using urea based ELISA kits. **Results** (1) the level and avidity index of anti-dsDNA antibody were significantly and insignificantly higher in SLE than non-SLE patients [antibody level: 285.8(164.5–463.3) IU/mL vs. 172.9(135.3–200.1) IU/mL, $P=0.038$; antibody avidity index: 32.3(19.2–50.7) vs. 15.5(9.5–49.8), $P=0.169$], and significantly correlated with SLEDAI scores, respectively ($P=0.000,0.002$). (2) For samples whose anti-dsDNA antibody were positive by both ELISA and IIF, their anti-dsDNA antibody levels and avidity indices were significantly higher than those solely positive by ELISA ($P<0.05$). **Conclusion** The closely correlation of anti-dsDNA level and avidity index with SLE disease progression, signifies that antibody amount and avidity might have been involved in disease

* 基金项目:国家卫生和计划生育委员会医药卫生科技发展研究中心专项课题资助(28-5-5);首都临床特色应用研究(吴阶平)基金资助项目(Z141107006614008)。

作者简介:田野,男,主管技师,主要从事自身免疫性疾病相关研究。△ 通信作者,E-mail:tanyanguo61@126.com。

development, and could also be used to monitor disease progression. For the determination of anti-dsDNA antibody, IIF was more likely to detect antibodies of relatively higher avidity, in comparison with ELISA.

Key words: anti-dsDNA antibody; antibody avidity; indirect immunofluorescence; systemic lupus erythematosus

抗双链 DNA(dsDNA)抗体是系统性红斑狼疮(SLE)的特征性血清标志物,该抗体阳性是 SLE 的临床诊断标准之一,并用于 SLE 患者病情活动程度、肾脏受累和治疗监测的指标。抗体阳性的健康个体将来发生 SLE 的风险也较高。笔者先前的研究发现,采用酶联免疫吸附试验(ELISA)和间接免疫荧光法(IIF)检测抗 dsDNA 抗体,具有较好的互补性,联合两种方法可以较大程度地提升其在 SLE 患者中的检出率;在非 SLE 自身免疫性疾病抗 dsDNA 抗体阳性的个体中,ELISA 单独阳性的比例为 66.7%,而 SLE 患者中这一比例为 30.5%^[1]。基于上述发现,有必要进一步探讨 ELISA 和 IIF 对抗 dsDNA 抗体检出能力具有较明显差异的深层次原因,以及 SLE 与非 SLE 自身免疫性疾病患者血清中抗 dsDNA 抗体性质的异同。抗 dsDNA 抗体亲和力与 SLE 病情关系的相关研究提示造成上述现象深层次原因可能与抗 dsDNA 抗体的亲和力有关^[2-4]。为此,本研究使用 ELISA 和 IIF 同时检测 SLE 和非 SLE 自身免疫性疾病患者血清抗 dsDNA 抗体,对 ELISA 检测为阳性的标本进一步测定其抗体亲和力指数,并评估抗 dsDNA 抗体水平和抗体亲和力指数与 SLE 疾病状态以及检测方法间的关系。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 留取 2014 年 5 月至 2015 年 6 月于北京大学第一医院、首都医科大学附属复兴医院和北京佑安医院就诊患者血清标本共计 1 095 例。其中 SLE 患者 300 例(SLE 组),男 47 例、女 253 例,平均年龄(37±11)岁;非 SLE 自身免疫性疾病患者共 495 例(非 SLE 疾病组),包括干燥综合征(SS)100 例[男 12 例、女 88 例,平均年龄(54±16)岁],类风湿关节炎(RA)98 例[男 22 例、女 76 例,平均年龄(55±14)岁],原发性胆汁性肝硬化(PBC)100 例[男 9 例、女 91 例,平均年龄(54±12)岁],小血管炎(SV)100 例[男 43 例、女 57 例,平均年龄(58±14)岁],以及包括结缔组织病、克罗恩病、特发性血小板减少性紫癜等在内的 97 例患者[男 39 例、女 58 例,平均年龄(43±12)岁];300 例健康人作为健康对照组,男 150 例、女 150 例,平均年龄(34±10)岁。SLE 的诊断依据参照 1997 年美国风湿病协会(ACR)的标准进行。其他自身免疫性疾病的诊断分别按相关指南进行。并对 120 例 SLE 患者的疾病活动度进行评分(SLEDAI2000 评分标准)。SLEDAI 评分≤4 分患者被认为处于疾病稳定期,SLEDAI 评分>4 分则处于疾病活动期。

1.2 试剂与仪器 ELISA 试剂使用德国欧蒙公司的抗 dsDNA-NcX 抗体检测试剂盒,IIF 试剂选用欧蒙

公司的间接免疫荧光检测抗 dsDNA 抗体试剂盒。全自动酶标仪为爱得康公司 ADDCARE500,荧光显微镜为奥林巴斯 CX40。

1.3 方法 采用未加抗凝剂的普通采血管采集所有研究对象的静脉全血,分离血清后,置于-80℃冰箱保存待用。所有标本用 ELISA 和 IIF 同时检测抗 dsDNA 抗体,然后进一步测定 ELISA 检测为阳性标本的抗体亲和力指数。在保证实验环境和仪器处于最佳状态下,严格按试剂盒要求进行实验操作。抗 dsDNA 抗体亲和力指数检测方法(尿素变性法):对 ELISA 检测抗 dsDNA 抗体为阳性的标本重新用 ELISA 进行测定,每个标本设立实验孔和对照孔。加入稀释的血清标本温育后洗板 1 次,实验孔加入 200 μL 尿素溶液,对照孔加入 200 μL 洗液,作用 10 min 后洗板,以洗脱掉实验孔中的低亲和力抗体。其余检测步骤同抗 dsDNA 抗体。抗体亲和力指数= $A_{\text{实验孔}}/A_{\text{对照孔}} \times 100$ (A 为吸光度)。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 进行数据处理。偏态分布数据采用 $M(P_{25} \sim P_{75})$ 描述,使用 Spearman 相关性分析、直线回归分析。两标本间抗 dsDNA 抗体水平及抗体亲和力的比较采用两独立样本的秩和检验(Mann-Whitney U 检验),以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 抗 dsDNA 抗体水平及其亲和力指数在不同人群中的分布 健康对照组中未检出抗 dsDNA 抗体阳性个体。抗 dsDNA 抗体阳性个体中,SLE 组有 127 例,非 SLE 疾病组有 6 例。SLE 组抗 dsDNA 抗体水平明显高于非 SLE 疾病组,差异有统计学意义($P < 0.05$);SLE 组抗 dsDNA 抗体亲和力指数与非 SLE 疾病组差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。300 例 SLE 患者中,有 120 例进行了 SLEDAI 评分,明确为活动期的标本 96 例(其中 47 例抗 dsDNA 抗体阳性),稳定期为 24 例(其中 3 例抗 dsDNA 抗体阳性)。活动期的 SLE 患者抗 dsDNA 抗体水平[96.7(12.1~383.9)IU/mL]明显高于稳定期 SLE 患者的抗 dsDNA 抗体水平[20.9(0.001~52.6)IU/mL],差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 抗 dsDNA 抗体水平及抗体亲和力指数与 SLE 疾病活动度的关系 120 例 SLE 患者(其中 50 例抗 dsDNA 抗体阳性)抗 dsDNA 抗体水平与 SLEDAI 评分相关系数(r)=0.435, $P=0.000$,回归方程为 $Y=10.25+0.012X$;对于 50 例抗 dsDNA 抗体阳性患者,抗 dsDNA 抗体亲和力指数与 SLEDAI 评分呈显著正相关($r=0.326$, $P=0.02$),回归方程为 $Y=$

13.48±0.081X。

表 1 两组 ELISA 检测阳性患者抗 dsDNA 抗体水平和抗体亲和力指数比较[M(P₂₅~P₇₅)]

组别	n	抗 dsDNA 抗体水平(IU/mL)	抗体亲和力指数
SLE 组	127	285.8(164.5~463.3)*	32.3(19.2~50.7)
非 SLE 疾病组	6	172.9(135.3~200.1)	15.5(9.5~49.8)

注:与非 SLE 疾病组比较,* P<0.05

2.3 ELISA 和 IIF 对不同亲和力抗 dsDNA 抗体的检测能力 133 例 ELISA 检测抗 dsDNA 抗体为阳性的标本中,IIF 也呈阳性的为 77 例(ELISA 和 IIF 均阳性组),其抗体亲和力指数为 33.1(23.5~52.7); IIF 阴性为 56 例(ELISA 单阳性组),其抗体亲和力指数为 22.1(13.6~48.1)。ELISA 和 IIF 均呈阳性组抗 dsDNA 抗体亲和力指数明显高于 ELISA 单阳性组,差异有统计学意义(P=0.024)。就抗 dsDNA 抗体水平而言,ELISA 和 IIF 均阳性组为 355.6(236.1~547.1)IU/mL,明显高于 ELISA 单阳性组的 196.2(148.9~300.6)IU/mL,差异有统计学意义(P=0.000)。

3 讨论

在 SLE 患者体内,作为抗原物质的抗 dsDNA 诱导并活化 B 淋巴细胞,进而合成致病性抗 dsDNA 抗体。该抗体与疾病的关系已被广泛研究^[3-5]。检测抗 dsDNA 抗体最常用的方法是 ELISA 和 IIF,由于 ELISA 可以定量检测抗 dsDNA 抗体水平,便于观察治疗效果,故而被广泛使用。测定抗 dsDNA 抗体亲和力的方法有放射免疫方法、色谱技术及 ELISA 等,但以 ELISA 最常用。本研究在 ELISA 的基础上,采用尿素变性技术构建而成^[6]。笔者先前的研究显示,抗 dsDNA 抗体在 SLE 人群中的检出率(ELISA:42.3%,IIF:38%)明显高于非 SLE 疾病组(ELISA:1.2%,IIF:0.8%)和健康对照组(ELISA:0.0%,IIF:0.0%)^[1]。本研究进一步分析了抗 dsDNA 抗体阳性的标本,其抗体水平和亲和力指数在不同人群中的分布状况。

本研究在抗 dsDNA 抗体阳性的患者中,SLE 组抗 dsDNA 抗体水平明显高于非 SLE 疾病组,同时 SLE 疾病活动期抗 dsDNA 抗体水平也明显高于稳定期患者。抗 dsDNA 抗体水平增高则疾病活动程度(SLEDAI 评分)有增加趋势,这点与先前的研究结果相符^[7]。以上结果进一步验证了抗 dsDNA 抗体参与了 SLE 的病理生理过程,以及与 SLE 患者疾病活动性的紧密关系。

本研究抗 dsDNA 抗体亲和力指数 SLE 组为 32.3(19.2~50.7),与非 SLE 疾病组的 15.5(9.5~49.8)相比,虽然差异无统计学意义(P>0.05),还是可以明显看出前者高于后者的趋势。之所以差异无统计学意义,可能是非 SLE 疾病组抗 dsDNA 阳性例数过少所致(6 例)。另外,由于处于稳定期的 24 例

SLE 患者中,只有 3 例抗 dsDNA 抗体阳性,故未就活动期以及稳定期 SLE 患者抗 dsDNA 抗体的亲和力进行进一步比较。上述两部分内容需要增加样本量后进一步研究。

本研究显示,抗 dsDNA 抗体亲和力指数越高,SLE 患者疾病越活跃;而且随着抗体水平的增高,抗 dsDNA 抗体亲和力也逐渐趋于成熟,这也验证了 SUH-LAILAM 等^[4]的结果。故临床工作中,在对抗 dsDNA 抗体进行定性和定量检测的同时,测定抗 dsDNA 抗体的亲和力指数也能从另一个侧面反映疾病的严重程度。

ELISA 与 IIF 两种方法检测抗 dsDNA 抗体结果出现差异的原因可能是因为包被抗原的种类、来源及流程存在差别所致,导致对不同亲和力的抗 dsDNA 抗体的检出能力不同^[8-9]。本研究进一步证实,ELISA 和 IIF 均阳性的标本,其抗 dsDNA 抗体亲和力指数明显高于单独 ELISA 阳性标本。这与之之前缺乏证据支持的 IIF 检测抗 dsDNA 抗体所针对的亲和力谱位于中、高亲和力的观点相符。也就是说,某些 ELISA 检测抗 dsDNA 抗体单独阳性的 SLE 及非 SLE 自身免疫性疾病患者是因为体内抗体水平较低且为低亲和力抗体所致。但对于非 SLE 个体,随着抗体水平的增加和抗体亲和力成熟,其致病性逐渐增强,有机会发展为 SLE,这可能是抗 dsDNA 抗体阳性的个体将来发展为 SLE 的根源所在。

总之,尿素变性法检测抗 dsDNA 抗体亲和力指数切实可行。随着抗 dsDNA 抗体水平和抗体亲和力指数的增加,SLE 患者疾病有变得活跃和趋于恶化的倾向。IIF 和 ELISA 对抗 dsDNA 抗体亲和力谱具有不同的识别能力。

参考文献

- [1] 田野,张云聪,冯珍如,等.不同方法联合检测 SLE 患者血清中双链 DNA 抗体的性能评估[J].检验医学与临床,2016,13(19):2697-2699.
- [2] ANDREJEVIC S, JEREMIC I, SEFIK-BUKILICA M, et al. Immunoserological parameters in SLE: high-avidity anti-dsDNA detected by ELISA are the most closely associated with the disease activity[J]. Clin Rheumatol, 2013, 32(11):1619-1626.
- [3] 曹华,万朋杰,李卫平,等.高亲和力抗双链 DNA 抗体检测在系统性红斑狼疮诊断中的意义[J].中华风湿病学杂志,2014,18(4):244-247.
- [4] SUH-LAILAM B B, CHIARO T R, DAVIS K W, et al. Evaluation of a high avidity anti-dsDNA IgG enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of systemic lupus erythematosus[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2011, 4(8):748-754.
- [5] 刘艳慧,武丽君,李彩萍.抗双链 DNA 抗体、抗核小体抗体、抗 dsDNA-NcX 抗体在系统性红斑狼疮中的研究进展[J].新疆医学,2013,43(2):9-12. (下转第 156 页)

均较困难的消化系统恶性肿瘤,约 85%为起源于腺管上皮的导管腺癌。胰腺恶性肿瘤的早期确诊率不高,手术病死率较高,而治愈率很低。临床上胰腺恶性肿瘤多见于 50 岁以上人群,且发病率男性高于女性,男女之比为(1.5~2):1。根据其部位及组织类型,主要包括胰头癌、胰尾癌、腺泡细胞癌等,其中胰头癌占 60%~70%,胰尾癌占 5%~10%,腺泡细胞癌占 2%。由于其恶性程度较高、预后较差、发病率和病死率近年来逐渐上升(5 年生存率<1%),严重威胁人类的健康。临床上患者往往表现出腹痛、黄疸、腹水及高热等症状,在增加患者疾病负担的同时亦严重影响患者心理健康,因而寻找一种有效的治疗方法显得极为重要。现阶段根治性切除手术仍然是临床在治疗胰腺癌常用的方法,但该手术创伤较大、操作较复杂、术后并发症较多及围术期病死率较高,临床上在给予患者积极有效的手术治疗的同时,还应该给予个性化精细护理^[7-10]。

传统的护理仅针对患者的疾病提供对应的护理措施,随着医学模式的改变,人们对护理的要求也逐渐提高,采取适当的综合护理显得尤为重要。因此,完善术前准备、消除患者不良情绪,对患者进行个性化的精细护理,让患者正确认识疾病,消除患者紧张、焦虑等不良情绪,建立积极向上的态度战胜疾病。同时,术前对患者进行心理护理及健康教育,术后对患者的胰瘘、血糖异常、胃排空延迟等并发症进行积极的预防和处理,从而提升患者生活质量,可降低死亡风险^[11-15]。本研究结果显示,综合护理组患者的术后胰瘘、血糖异常、胃排空延迟发生率及住院时间均明显低于常规护理组。同时,综合护理组患者轻度不适、重度不适发生率均明显低于常规护理组,护理满意度明显高于常规护理组。

综上所述,胰腺癌根治性切除手术的围术期综合护理能够有效减少患者的术后胰瘘、血糖异常及胃排空延迟等并发症发生,同时能提升患者的术后舒适度及护理满意度,值得临床推广应用。

参考文献

[1] 刘梅,刘芳,蒋敏君. 胰十二指肠切除术后并发肠瘘的观察与护理[J]. 护士进修杂志,2014,29(15):1386-1388.
 [2] 薛碧英,黄卫平,卓小玲,等. 加速康复外科理念在环状湿

合痔患者围手术期护理中的应用[J]. 结直肠肛门外科,2013,19(1):56-59.

[3] 陶京,王春友,杨智勇,等. 胰腺癌切除术后并发症及其危险性预测[J]. 临床外科杂志,2004,12(4):217-219.
 [4] 简明,贺李江,胡菊华,等. 门诊手术患者舒适护理效果的相关因素社会文化分析[J]. 护理实践与研究,2012,9(12):58-59.
 [5] 张频,沈丹. 胰腺癌合并糖尿病患者术后血糖的控制及护理[J]. 中国实用护理杂志,2012,28(6):38-39.
 [6] 袁媛. 胰腺癌根治不同吻合术后并发症的观察与护理[J]. 护士进修杂志,2011,26(22):2104-2105.
 [7] 沈惠芳. 舒适护理在胰腺癌术后护理中的应用[J]. 临床合理用药杂志,2014,11(32):130-131.
 [8] 田碧. 胰腺癌的治疗现状[J]. 肿瘤基础与临床,2014,27(1):86-89.
 [9] TSENG D S, MOLENAAR I Q, BESSELINK M G, et al. Pancreatic exocrine insufficiency in patients with pancreatic or periampullary cancer a systematic review[J]. Pancreas,2016,45(3):325-330.
 [10] BIMONTE S, LEONGITO M, GRANATA V A, et al. Electrochemotherapy in pancreatic adenocarcinoma treatment:pre-clinical and clinical studies[J]. Radiol Oncol,2016,50(1):14-20.
 [11] ZHANG W W, ZHAN S H, GENG C X, et al. Activated leukocyte cell adhesion molecule regulates the interaction between pancreatic cancer cells and stellate cells[J]. Mol Med Rep,2016,14(4):3627-3633.
 [12] CHEN Q, LI P, LI P, et al. Isoquercitrin inhibits the progression of pancreatic cancer in vivo and in vitro by regulating opioid receptors and the mitogen-activated protein kinase signalling pathway[J]. Oncol Rep,2015,33(2):840-848.
 [13] CAO N D, ZHAO A G, ZHAO G, et al. Survival analysis of 272 patients with pancreatic cancer undergoing combined treatment[J]. Integr Cancer Ther,2015,14(2):133-139.
 [14] FRITZ F, SKORNITZKE S, HACKERT T, et al. Dual-Energy Perfusion-CT in recurrent pancreatic cancer - preliminary results[J]. Rofo,2016,188(6):559-565.
 [15] 陈杰. 胰腺肿瘤的病理诊断和鉴别诊断[J]. 临床肝胆病杂志,2013,29(1):45-49.

(收稿日期:2017-07-21 修回日期:2017-10-23)

(上接第 153 页)

[6] BLACKBURN N K, BESSELAAR T G, SCHOUB B D, et al. Differentiation of Primary Cytomegalovirus Infection From Reactivation Using the Urea Denaturation Test for Measuring Antibody-Avidity[J]. J Med Virol,1991,33(1):6-9.
 [7] 张宏,汪国生,李向培,等. 2 种方法检测抗双链 DNA 抗体的比较及临床意义[J]. 安徽医学,2012,33(11):1430-

1432.
 [8] 史晓敏,阎振林,隋宝环,等. 两种检测抗双链 DNA 抗体方法对系统性红斑狼疮的诊断价值比较[J]. 中华检验医学杂志,2012,35(8):742-745.
 [9] 谭太昌,王婷,张航烽,等. 抗双链 DNA 抗体检测策略研究[J]. 成都医学院学报,2014,9(2):128-133.

(收稿日期:2017-07-28 修回日期:2017-10-20)