

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2020.06.001

系统性红斑狼疮的诊断新方法 with 临床验证^{*}

廖秋燕¹, 汤冬娥¹, 赵鑫¹, 何慧燕¹, 李琼英², 刘富菊²,

上官美荣², 林连成², 李林煜龙², 戴勇^{1,3△}

1. 暨南大学第二临床医学院/广东省深圳市人民医院临床医学研究中心, 广东深圳 518020;

2. 广东省深圳市赛尔生物技术有限公司, 广东深圳 518126; 3. 解放军联勤保障

部队第九二四医院中心实验室, 广西桂林 541002

摘要:目的 验证 IFI44L 基因甲基化位点作为系统性红斑狼疮(SLE)标志物在临床诊断中的意义, 评估采用该方法的试剂盒检测结果的准确性和有效性。方法 收集患者外周血标本共 136 份, 经临床诊断, SLE 确诊患者标本 74 份, 非 SLE 患者标本 62 份。对标本随机编号后, 使用 SLE 基因甲基化检测试剂盒[甲基化特异性高分辨率溶解曲线法(MS-HRM 法)]对标本的 IFI44L 基因甲基化位点进行检测, 并根据检测结果区分 SLE 与非 SLE 患者标本, 标本揭盲后, 对结果的灵敏度、特异度、总符合率及一致性系数 Kappa 值进行评价。结果 IFI44L 患者结果显示, 该方法与临床确诊结果的总符合率为 94.85%, 灵敏度为 93.24%, 特异度为 96.77%, Kappa 值为 0.896 7。该检测方法 with 临床确诊方法对于 SLE 的诊断差异无统计学意义($\chi^2=0.133, P>0.05$)。结论 IFI44L 基因甲基化水平可作为诊断 SLE 及判断 SLE 病情变化的重要指标。IFI44L 基因甲基化位点检测方法是除了 SLE 传统诊断方法外的另一种有效诊断手段, 并从表观遗传学角度提供了 SLE 发生的证据。

关键词: 系统性红斑狼疮; IFI44L 基因; 甲基化; 基因诊断

中图法分类号: R593.2

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2020)06-0721-04

New diagnostic method and clinical validation of systemic lupus erythematosus^{*}

LIAO Qiuyan¹, TANG Dong'e¹, ZHAO Xin¹, HE Huiyan¹, LI Qiongying²,

LIU Fujun², SHANGGUAN Meirong², LIN Liancheng², LI-LIN Yulong², DAI Yong^{1,3△}

1. Clinical Medicine Research Center, Second Clinical Medical College of Jinan University/

Shenzhen People's Hospital, Shenzhen, Guangdong 518020, China; 2. Shenzhen

Sciarray Biotech Co., Ltd., Shenzhen, Guangdong 518126, China; 3. Central

Laboratory, No. 924 Hospital of PLA, Guilin, Guangxi 541002, China

Abstract: **Objective** To verify the clinical significance of IFI44L gene methylation site as the systemic lupus erythematosus (SLE) marker in clinical diagnosis, and to evaluate the accuracy and validity of the relevant kit in clinical detection. **Methods** The peripheral blood samples were collected from 136 patients. Among them, there were 74 cases of definitely diagnosed SLE samples and 62 cases of non-SLE samples. After randomly numbering the samples, the methylation sites of IFI44L gene in the samples were detected by the methylation detection kit of SLE (MS-HRM method). The samples of SLE and non-SLE were distinguished according to the detection results. After the sample unblinding, the sensitivity, specificity, total coincidence rate and consistency coefficient Kappa value of the results were evaluated. **Results** The IFI44L results showed that the total coincidence rate of this method with the clinical definitely diagnosed method was 94.85%, the sensitivity and specificity were 93.24% and 96.77% respectively. The Kappa index was 0.896 7. The difference in diagnosing SLE between this detection method and clinical diagnosis method was not statistically significant ($\chi^2=0.133, P>0.05$). **Conclusion** The methylation level of IFI44L gene can serve as an important index for diagnosing SLE and judging the changes of SLE. The IFI44L gene methylation site detection method is another effective diagnostic method besides the traditional diagnostic method of SLE, and provides an evidence of SLE occurrence from the angle of epigenetics.

Key words: systemic lupus erythematosus; IFI44L gene; methylation; gene diagnosis

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81671596); 国家自然科学基金青年科学基金项目(31700795); 广西壮族自治区自然科学基金项目(2017GXNSFAA198375); 广东省深圳市基础研究计划(JCYJ20160422164313440)。

作者简介: 廖秋燕, 女, 技师, 主要从事临床医学检验研究。△ 通信作者, E-mail: daiyong22@aliyun.com。

系统性红斑狼疮(SLE)是一种全身多个器官和系统均可受累的自身免疫性疾病,以免疫性炎症为突出表现^[1-2],主要受累人群为中青年女性,如不及时治疗可引起肾衰竭等致死性损害,严重危害人类健康,其病因及发病机制至今未明^[3]。目前临床上对于SLE的诊断主要依据美国风湿病学会(ACR)1997年推荐的SLE分类标准:患者满足11条标准中的4条或以上,并排除了感染、肿瘤和其他结缔组织病后,可诊断为SLE^[1]。此标准为免疫学方法、临床化学及部分病理学方法的汇总,一直沿用至今。但这种诊断方法由于缺乏足够的敏感性及特异性,往往容易造成患者的误诊或漏诊^[4]。相关研究表明,SLE患者若及早发现并予以治疗,可更好地控制病情进展^[5]。因此,找到具备高敏感性和高特异性的诊断标志物对于提高SLE的诊断准确率非常重要。研究发现,干扰素相关基因(包括IFI44L、IFIT1、MX1、STAT1、USP18、BST2和TRIM22基因^[6])在SLE患者的CD4⁺幼稚T细胞中处于低甲基化水平。之后研究人员使用DNA甲基化芯片技术从大量SLE患者外周血基因中发现IFI44L基因启动子区两个甲基化位点可以作为诊断SLE的高敏感性和特异性的生物学标志物^[7]。为了验证IFI44L基因甲基化位点作为SLE标志物在临床诊断中的意义,本研究收集患者外周血标本共136份(SLE确诊患者标本及非SLE患者标本),对标本进行随机排列并编号处理后,使用SLE基因甲基化检测试剂盒对标本的IFI44L基因甲基化位点进行检测,检测完毕后进行揭盲,对灵敏度、特异度、总符合率和一致性系数Kappa值进行评价,验证该试剂盒检测结果的准确性和有效性,评价IFI44L基因甲基化位点作为SLE标志物在临床诊断中的意义,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本研究收集患者外周血标本共136份,根据ACR推荐的SLE分类标准对患者进行诊断,其中SLE确诊患者标本74份(来源于深圳市风湿病院检验科45份、北京大学深圳医院检验科29份),非SLE患者标本共62份(来源于深圳市人民医院中心实验室)。136份标本中男50例(年龄20~67岁),女86例(年龄15~57岁)。

1.2 仪器与试剂 SLE基因甲基化检测试剂盒[甲基化特异性高分辨率溶解曲线法(MS-HRM法)]由深圳市赛尔生物技术有限公司提供,批号为20180517。DNA提取试剂盒采购自Thermo Scientific Gene Jet Whole Blood Genomic DNA Purification Mini Kit, #ko782,由深圳市赛尔生物技术有限公司提供。其他仪器还包括罗氏lightcycler 480 II实时荧光定量PCR仪、ABI-Q3荧光定量PCR仪、Nanodrop2000核酸蛋白分析仪、恒温水浴箱、旋涡振荡器等。

1.3 方法

1.3.1 标本编号及盲法处理 将136份外周血标本进行随机排列并编号,新编号与患者的标本号或住院号保持一一对应,以便能够清楚地溯源。

1.3.2 DNA提取及MS-HRM法操作 按照Thermo Scientific公司试剂盒说明书进行DNA提取,提取完毕后在Nanodrop2000分析仪上测定DNA含量,所有标本提取完毕后置于-20℃保存待用。按照深圳市赛尔生物技术有限公司提供的试剂盒进行操作(MS-HRM法),使用获得的数据对SLE患者进行诊断。

1.3.3 评价方法 研究表明,SLE患者IFI44L基因启动子的两个CpG位点甲基化水平显著性降低^[7]。SLE基因甲基化检测试剂盒(MS-HRM法)的结果判定标准:当患者检测结果显示IFI44L基因CpG位点甲基化水平在0~25%时,即可判定该患者为SLE患者。对136份标本全部检测完毕后,根据患者的标本号或住院号对检测标本进行揭盲,将检测结果与临床确诊结果进行对比,评价检测方法的灵敏度、特异度、总符合率、一致性系数Kappa值,以及进行 χ^2 检验,验证使用该方法的试剂盒在临床检测上的准确性和有效性,评价IFI44L基因甲基化位点作为SLE标志物在临床诊断中的意义。

1.4 统计学处理 采用SPSS20.0统计软件进行分析,计数资料以例数或率表示,组间比较采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 试剂盒检测结果 经SLE基因甲基化检测试剂盒(MS-HRM法)检测后,136例患者中有71例为SLE患者,其中男10例,女61例;65例为非SLE患者,其中男40例,女25例。IFI44L基因甲基化水平为0~25%、>25%~50%、>50%~75%的例数分别为71、41、24例。

2.2 试剂盒检测结果与临床确诊结果比较 与临床确诊结果对比,试剂盒判定的71例SLE患者中,有2例为非SLE患者;试剂盒判定的65例非SLE患者中有5例为SLE患者。结果显示,试剂盒检测SLE的灵敏度、特异度及总符合率分别为93.24%、96.77%和94.85%,Kappa值为0.8967。两种方法的检测结果比较,差异无统计学意义($\chi^2=0.133, P>0.05$)。见表1。

表1 IFI44L基因甲基化检测结果与临床确诊结果对比(n)

IFI44L基因甲基化检测结果	临床确诊结果		
	阳性	阴性	合计
阳性	69	2	71
阴性	5	60	65
合计	74	62	136

3 讨 论

SLE 是一种自身免疫介导的弥漫性结缔组织病, 免疫性炎症是其主要表现。SLE 发病以 15~45 岁的育龄期女性为主, 目前世界范围内 SLE 的发病率为 40/10 万~70/10 万, 男女比例为 1:9。而我国的 SLE 患者目前预计超过 100 万, 女性患者患病率约为 113/10 万, 且我国 SLE 患病率有逐年递增的趋势^[8]。SLE 以患者免疫系统的异常活化和自身抗体异常增多为特征, 患者全身多个部位及系统均可受累, 如皮肤、关节、肾脏、心脏、肺、大脑、血液系统、神经系统等^[9-10], 若不及时治疗可导致多种致死性损害, 如肾衰竭等。研究表明, SLE 患者合并恶性肿瘤的发生率增加, 非霍奇金淋巴瘤、宫颈癌、乳腺癌及支气管肺癌是常见的恶性肿瘤类型^[11-12], 由此可见 SLE 严重危害人类健康。IFI44L 基因是 I 型干扰素刺激性应答基因 (ISG), 属于 FIF44 家族^[13]。相关研究表明, IFI44L 蛋白在抗病毒及癌症治疗中均有着重要的作用^[14]。

本研究以 IFI44L 基因甲基化位点作为 SLE 的基因诊断标志物, 对 136 例患者的外周血进行 IFI44L 基因甲基化水平检测, 以判定 SLE 患者, 判定结果与临床确诊结果的总符合率为 94.85%, 灵敏度达 93.24%, 特异度达 96.77%, Kappa 值为 0.896 7, 一致性良好。这与相关研究结果基本符合^[7]。本研究两种方法的检测结果差异无统计学意义 ($\chi^2=0.133$, $P>0.05$), 说明 IFI44L 基因甲基化位点可作为 SLE 的基因诊断标志物。

其中, 74 例 SLE 患者的标本中有 69 份与临床确诊结果相符合, 有 5 例 SLE 患者被判定为非 SLE, 经确认这 5 例标本的甲基化水平均在 25%~50%, 经过揭盲, 5 例标本均为 SLE 缓解期的标本, 这一结果与相关研究结果一致^[7]; SLE 患者 IFI44L 基因甲基化水平显著降低, 而 SLE 缓解期患者 IFI44L 基因甲基化水平显著升高。这一结果从侧面说明 SLE 患者在治疗过程中还可以通过检测 IFI44L 基因甲基化水平来监测 SLE 病情变化。62 例非 SLE 患者的标本中, 有 60 例标本检测结果与临床确诊结果完全一致, 但有 2 例标本被诊断为 SLE, 经过揭盲, 发现这 2 例标本均为肺癌患者的标本, 且其 IFI44L 基因甲基化程度都在 25% 的曲线附近, 近乎重叠, 按照试剂盒判定标准判定为 SLE。相关研究证实, IFI44L 在肝癌患者的 met/Src 信号调节通路中作为一种新型的肿瘤抑制因子, 当 IFI44L 蛋白减少时可导致肝癌细胞的肺转移^[15]。因此, 虽然该检测方法对 2 例非 SLE 患者进行了误判, 但也有利于筛选出癌症患者, 有利于患者的尽早确诊和治疗。

作为本研究的检测试剂盒, SLE 基因甲基化检测试剂盒 (MS-HRM 法) 对 SLE 患者判定的准确度高、有效性好, 其灵敏度及特异度高于目前市场的同类基因甲基化检测试剂产品 (大肠癌 septin9 基因甲基化

检测试剂盒的灵敏度为 79%~85%, 特异度为 90%~93%), 表明该试剂盒作为 SLE 的诊断试剂盒, 已能够满足临床的需求。此外, 目前国际上较缺乏 SLE 的基因诊断方法, 本试剂为国际上较早使用基因甲基化的方法诊断 SLE, 对于 SLE 的诊断标准是一种扩展。

综上所述, 选取 IFI44L 基因甲基化位点作为 SLE 的生物标志物对 SLE 患者进行诊断是可行的。这是除传统方法外的另一种有效的 SLE 诊断手段, 可辅助判断 SLE 患者病情变化, 并可从表观遗传学角度提供 SLE 发生的证据。同时 SLE 基因甲基化检测试剂盒 (MS-HRM 法) 测试方法简便、准确度高, 甚至可以在肾损害发生之前明确 SLE 的发生, 对于疾病的干预有重要的临床应用价值, 建议推广使用。

(志谢: 在此感谢深圳市风湿病院及北京大学深圳医院, 本研究的部分标本获深圳市风湿病院检验科及北京大学深圳医院检验科的支持。)

参考文献

- [1] 刘蕾. 系统性红斑狼疮的诊治[J]. 中国实用乡村医生杂志, 2017, 24(7): 31-33.
- [2] 邓红莉. SLE 诊断中 ENA 抗体和体液免疫检验的价值研究[J/CD]. 临床医药文献电子杂志, 2018, 5(79): 8-12.
- [3] 陆前进, 罗帅寒天. 系统性红斑狼疮的诊疗进展[J]. 中华皮肤科杂志, 2018, 51(1): 1-4.
- [4] 李磊, 安园, 刘微微. 自身抗体联合检测在系统性红斑狼疮诊断中的临床价值[J]. 江苏医药, 2016, 42(11): 1255-1257.
- [5] ALJOHANI R, GLADMAN D D, SU J D, et al. Comparison of systemic lupus erythematosus (SLE) patients managed early after diagnosis in specialty versus community care clinics[J]. Clin Rheumatol, 2017, 36(8): 1773-1778.
- [6] SAWALHA A, JEFFRIES M, ALTOROK N, et al. Genome-wide DNA methylation study suggests epigenetic accessibility and transcriptional poising of interferon-regulated genes in naive CD4⁺ T cells from lupus patients[J]. J Immunol, 2013, 190(1): 78-84.
- [7] ZHAO M, ZHOU Y, ZHU B, et al. IFI44L promoter methylation as a blood biomarker for systemic lupus erythematosus[J]. Ann Rheum Dis, 2016, 75(11): 1998-2006.
- [8] 刘相东, 李丽. 系统性红斑狼疮发病机制的研究进展[J]. 滨州医学院学报, 2007, 30(3): 210-212.
- [9] 崔钰杰, 杨敏. 系统性红斑狼疮脑病发生的相关危险因素分析[J]. 山西医科大学学报, 2015, 46(6): 575-578.
- [10] 汪涛, 崔勇, 张学军. 系统性红斑狼疮的皮肤外临床表现[J]. 实用皮肤病学杂志, 2013, 6(4): 215-218.
- [11] 胡鑫, 崔勇, 杨森. 系统性红斑狼疮与恶性肿瘤相关性研究进展[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2012, 26(1): 74-76.
- [12] 温琦, 吴美容, 何颖芝, 等. IKZF1 基因与恶性肿瘤及系统性红斑狼疮的相关性研究进展[J]. 中国实验血液学杂志, 2015, 23(2): 591-595.

产生复杂的抗原抗体,这也是导致血液输注无效的另一重要因素。因此,建议对发生输血不良反应但又需反复输血的患者输注洗涤红细胞、去白细胞红细胞悬液等以减少或预防非溶血性发热反应和过敏反应的发生^[14]。由于血小板抗原系统较为复杂,除红细胞血型系统同型相输外,还需考虑血小板抗原(HPA)和HLA系统,有条件者可进行血小板配型后输注^[20]。

随着国家全面实施无偿献血,临床合理输血水平明显提升,输血安全性要求也随之提高。为进一步减少输血不良反应,在今后工作中不仅要加强输血不良反应患者的识别和管理,也要加强整个输血过程各项不良事件的监管^[21]。临床科室需严格把握血液成分输注指征,持续开展并扩大自体输血覆盖面,加强与输血科的沟通联系,保障临床科学、合理、安全用血。

参考文献

[1] GREENAWALT J A,ZERNELL D. Autologous blood transfusion to decrease the negative effects of postpartum hemorrhage[J]. J Obstet Gynecol Neonat Nurs, 2019, 48(3): S17-S25.

[2] 中华人民共和国卫生部. 关于印发《临床输血技术规范》的通知: 卫医发[2000]184号[A/OL]. (2000-06-02)[2019-03-09]. <http://www.csbt.org.cn/plus/view.php aid=145>.

[3] ROBERT C, ALIOSKA E, FARZANA T, et al. Feeling the burn; the significant burden of febrile nonhemolytic transfusion reactions[J]. Transfusion, 2017, 57(7): 1674-1683.

[4] 原敏,唐聪海,甘玮玮,等. 血浆过敏原筛查在预防输血过敏反应中的应用研究[J]. 中国输血杂志, 2016, 29(2): 153-156.

[5] DE KRUIJFF E, VAN GAMMEREN A J, PORCELJN L, et al. Post-transfusion purpura in a woman with acute myeloid leukemia[J]. Netherlands J Med, 2019, 77(2): 81-83.

[6] PETERS A L, VAN DE WEERDT E K, GOUDSWAARD E J, et al. Reporting transfusion-related acute lung injury by clinical and preclinical disciplines[J] Blood Transfus, 2018, 16(3): 227-234.

[7] KOPOLOVIC I, OSTRO J, TSUBOTA H, et al. A sys-

tematic review of transfusion-associated graft-versus-host disease[J]. Blood, 2015, 126(3): 406-414.

[8] 谭春泽,杨雪,傅明玮,等. 119例输血不良反应原因及情况分析[J]. 中国输血杂志, 2018, 31(7): 776-780.

[9] 赵小燕,贺小艳,栗兵,等. 一家三甲医院输血不良反应的回顾性评估[J]. 中国输血杂志, 2018, 31(7): 773-775.

[10] 胡佳林,周浩锋. 214例患者输血不良反应临床分析[J]. 重庆医学, 2018, 47(8): 1068-1069.

[11] PIERRE M, ELODIE Q, GRÉGORY B, et al. Adverse transfusion reactions in patients with aplastic anaemia or myelodysplastic syndromes[J]. Vox Sanguinis, 2019, 114(4): 349-354.

[12] 王瑞,王韶双,王伟. 急性高容量血液稀释联合控制性降压及自体血回输在骨科脊柱手术中的应用[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2018, 39(4): 558-561.

[13] 齐祺,张琦,夏荣. 输血与肿瘤疾病转归相关性的研究进展[J]. 中国输血杂志, 2018, 31(4): 437-440.

[14] 周炜鑫,黄远帅. 特殊需求红细胞制品的临床应用[J]. 中国输血杂志, 2018, 31(5): 563-567.

[15] 刘威,乐爱平,刘景汉,等. 新生儿 ABO、RhD 配合型输血的实验研究[J]. 中国实验血液学杂志, 2017, 25(3): 916-920.

[16] 周水梅,王娇,宋晶晶,等. 69例输血不良反应的回顾性分析[J]. 武汉大学学报(医学版), 2018, 39(6): 966-969.

[17] 陈大伟,夏文杰,叶欣,等. 无偿献血人群中已育女性 HLA 抗体筛查及特异性分析[J]. 中国输血杂志, 2014, 27(3): 251-253.

[18] 林静霞,任俊,肖帆,等. 输血不良反应的临床特点及影响因素分析[J]. 中国输血杂志, 2015, 28(3): 291-294.

[19] DAURAT G. Reporting and notification of transfusion serious adverse events in France[J]. Transfus Clin Biol, 2010, 17(5/6): 362-369.

[20] 江灵,王洁,王雨涵,等. 血小板抗体检测及交叉配型在血小板输注患者中的运用[J]. 中国输血杂志, 2019, 32(3): 263-266.

[21] 刘璇,陈麟凤,庄健美,等. 除输血不良反应外临床用血相关不良事件分析[J]. 中华医学杂志, 2019, 99(6): 438-441.

(收稿日期:2019-05-20 修回日期:2019-09-18)

(上接第 723 页)

[13] MCDOWELL I C, MODAK T H, LANE C E. Multi-species protein similarity clustering reveals novel expanded immune gene families in the eastern oyster crassostrea virginica[J]. Fish Shellfish Immunol, 2016, 53(1): 13-23.

[14] MENG X, YANG D, YU R, et al. EPSTI1 is involved in IL-28A-Mediated inhibition of HCV infection[J]. Mediators Inflamm, 2015, 2015: 716315.

[15] HUANG W C, TUNG S L, CHEN Y L, et al. IFI44L is a novel tumor suppressor in human hepatocellular carcinoma affecting cancer stemness, metastasis, and drug resistance via regulating Met/Src signaling pathway[J]. BMC Cancer, 2018, 18(1): 609-612.

(收稿日期:2019-05-04 修回日期:2019-09-11)