DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.17.009 文章编号: 1005-8982 (2019) 17-0048-06

抗细胞膜 DNA 抗体联合抗核抗体检测 在系统性红斑狼疮诊断中的价值

那红字¹, 高荣海¹, 邵运禄¹, 梁宁², 周君霞³

(1. 海南省中医院 检验科,海南 海口 570203; 2. 海口市第三人民医院,海南 海口 571199; 3. 海口市人民医院 中心实验室,海南 海口 570208)

摘要:目的 探讨抗细胞膜 DNA(cmDNA)抗体联合抗核抗体(ANA)检测在系统性红斑狼疮(SLE)诊断中的应用价值。方法 选取 2016 年 1 月—2017 年 12 月海南省中医院检验科确诊的 182 例 SLE 患者为观察组,纳入同期确诊的 85 例其他自身免疫性疾病患者为疾病对照组,包括类风湿关节炎患者 29 例、原发干燥综合征患者 33 例、脊柱关节病患者 12 例、其他结缔组织病患者 11 例,纳入 50 例健康志愿者为健康对照组。采用间接免疫荧光法检测 3 组对象 ANA 及抗 cmDNA 抗体,采用欧蒙印迹法测定抗史密斯(Sm)抗体、抗核小体抗体(AnuA)。结果 观察组抗 cmDNA 抗体、ANA、抗 Sm 抗体、AnuA 阳性率均高于其他各组(P<0.05)。各抗体对诊断 SLE 敏感性,ANA 最高,其次为 AnuA、抗 cmDNA 抗体,抗 Sm 抗体最低;特异性,抗 Sm 抗体和AnuA 最高,其次为抗 cmDNA 抗体,ANA 最低;阴性预测值,AnuA 最高,其次为抗 Sm 抗体和抗 cmDNA 抗体,和AnuA 最低;阴性预测值,ANA 最高,其次为 AnuA 和抗 cmDNA 抗体,抗 Sm 抗体最低,上述总体差异有统计学意义(P<0.05)。观察组中 ANA、抗 Sm 抗体、AnuA 阴性者,抗 cmDNA 粒体率分别 54.55%、64.54% 和59.57%。抗 cmDNA 抗体并联常规方案诊断 SLE 的敏感性最高,抗 cmDNA 抗体串联 ANA 诊断 SLE 的特异性最高。结论 抗 cmDNA 抗体有助于检出 ANA、抗 Sm 抗体及 AnuA 阴性的 SLE 患者,抗 cmDNA 抗体联合常规方案诊断 SLE 具备较可靠的诊断效能。

关键词: 红斑狼疮,系统性;抗核抗体;抗核抗体谱;抗细胞膜 DNA 抗体

中图分类号: R593.2 文献标识码: A

Diagnostic value of anti-cell membrane DNA antibody combined with antinuclear antibody for systemic lupus erythematosus

Hong-yu Xing¹, Rong-hai Gao¹, Yun-lu Shao¹, Ning Liang², Jun-xia Zhou³
(1. Department of Laboratory Medicine, Hainan Provincial Hospital, Haikou, Hainan 570203, China; 2. Haikou Third People's Hospital, Haikou, Hainan 571199, China; 3. Department of Central Laboratory, Haikou People's Hospital, Haikou, Hainan 570208, China)

Abstract: Objective To explore the diagnostic value of anti-cell membrane DNA (cmDNA) antibody combined with antinuclear antibody (ANA) for systemic lupus erythematosus (SLE). **Methods** A total of 182 patients diagnosed with SLE from January 2016 to December 2017 were included in the observation group, and 85 patients with other autoimmune diseases including 29 cases with rheumatoid arthritis, 33 cases with primary Sjogren syndrome, 12 cases with spondylitis and 11 cases with other connective tissue diseases were involved in case-control group. A total of 50 healthy volunteers were included in the healthy-control group. ANA and anti-cmDNA antibodies were detected by indirect immunofluorescence. Anti-Smith (Sm) antibody and anti-nucleosome antibody

收稿日期:2019-03-11

(AnuA) were measured by the EURO line. **Results** The positive rate of anti cmDNA antibody, ANA, anti Sm antibody and AnuA in the observation group were significantly increased when compared with those in the other groups (P < 0.05). ANA exerted the highest sensitivity for diagnosis of SLE, followed by AnuA and anti-cmdna antibodies and anti-sm antibodies. Anti-sm antibody and AnuA exerted the highest specificity for diagnosis of SLE, followed by anti-cmdna antibody and ANA. AnuA manifested the highest positive predictive value, followed by anti-sm antibody, anti-cmdna antibody, and ANA. ANA manifested the highest negative predictive value, followed by AnuA, anti-cmdna antibody, and anti-sm antibody. In the observation group, the detection rate of anti cmDNA antibody in ANA negative patients, anti-Sm negative patients and AnuA negative patients were 54.55%, 64.54% and 59.57%, respectively. Anti-cmDNA antibody in parallel with conventional scheme exerted the highest sensitivity in the diagnosis of SLE, while cmDNA antibody in series with conventional scheme exerted the highest specificity in the diagnosis of SLE. **Conclusions** Anti-cmDNA antibody combined with ANA may provide increased efficacy in the diagnosis of SLE for patients with negative detection of ANA, anti Sm antibody and AnuA

Keywords: lupus erythematosus, systemic; antinuclear antibody; antinuclear antibody spectrum; anti cell membrane DNA antibody

系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE) 是一种由免疫复合物介导和沉积所致的结缔组 织慢性炎症性自身免疫性疾病,较为常见,国内 SLE 患病率约为 70/10 万人, 妇女中则高达 113/10 万人 [1]; 韩国报道 [2] 其患病率约 26.5/10 万人,且女性患病 率约为男性的6倍。该疾病尚不能治愈,但早诊 断、早治疗能够有效改善患者预后,国内患者10年 生存率 >90%^[3]。自身抗体检测是 SLE 诊断的重要 方案,其中抗核抗体(antinuclear antibody, ANA)及 ANA 谱检测在临床应用中最为广泛, ANA 谱中抗双 链 DNA (distrand-DNA, dsDNA) 抗体、抗核小体抗 体 (antinucleosome antibody, AnuA) 等对诊断 SLE 特 异性较高,但敏感性较差^[4];ANA敏感性较高,但 特异性较低^[5]。近期报道^[6]提示抗细胞膜 DNA (cell membrane associated DNA, cmDNA) 抗体对诊断 SLE 的敏感性及特异性均相对较高。本研究拟重点探讨抗 cmDNA 抗体与 ANA 联合检测,对诊断 SLE 的价值, 现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

1.1.1 观察组 选取 2016年1月—2017年12月海南省中医院检验科确诊的182例 SLE 患者为观察组。纳入标准:①年龄≥18岁;②符合 SLE 国际合作组织提出的诊断标准[□]。排除标准:①慢性感染、近2个月严重感染病史、近6个月有过机会感染;②严重的系统性疾病、胃肠道及肝肾疾病患者;③伴其他风

湿性疾病,如类风湿关节炎等;④妊娠及哺乳期妇女。 其中男性 17 例,女性 165 例;年龄 21 ~ 57 岁,平均 (30.25 ± 7.45)岁;病程 0.5 ~ 12 年,平均(3.17 ± 0.58)年。

1.1.2 疾病对照组 选取 2016年1月—2017年12月海南省中医院检验科确诊的85例其他自身免疫病患者为疾病对照组。纳入标准:①年龄、性别与观察组相匹配;②符合各自疾病的公认诊断标准;③不符合SLE诊断标准。排除标准:参考观察组排除标准。其中,类风湿关节炎患者29例,原发干燥综合征患者33例,脊柱关节病患者12例,其他结缔组织病患者11例;男性7例,女性77例;年龄20~55岁,平均(30.76±8.13)岁。

1.1.3 健康对照组 2017年6~12月面向海南省中医院内部,募集健康医护工作者50例为健康对照组。纳入标准:①年龄、性别与观察组相匹配;②身体健康。排除标准:参考观察组排除标准。其中男性5例,女性45例;年龄22~53岁,平均(30.58±8.58)岁。

1.2 试剂与仪器

主要试剂: RPMI 1640 (美国 Gibco 公司), 胎牛血清(杭州四季青公司), PBS 粉剂、ANA 检测试剂盒、ANA 谱检测试剂盒(德国欧蒙公司), 异硫氰酸炭光素结合的羊抗人 IgG (美国 Sigma 公司)。主要仪器:高速离心机、微量移液器(德国 Eppendorf 公司), 37℃温箱 BSP-250 (上海博迅公司), 二氧化碳 CO,

培养箱(美国 Thermo Fisher 公司),超净工作台(苏州净化公司),冷冻冰柜(日本三洋公司)。

1.3 检测方案

所有患者取空腹静脉血 10 ml, 3 000 r/min 离心,取血清,冷冻保存待测各指标。

1.3.1 抗 cmDNA 抗体检测 参考茹晋丽等 ® 研 究,采用间接免疫荧光法 (indirect immunofluorescence assay, IIF) 检测 cmDNA, 底物选择人 B 淋巴细胞株 Raji。检测步骤:①在 37℃、5% CO,条件下,以 RPMI 1640+10% 胎牛血清培养基培养人 Burkitt's 淋巴瘤细胞 (Raji)细胞,培养至对数生长期,离心收集。②Raji细 胞以磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)洗 涤 2 次, 调整密度至 0.5×10°个/ml 悬浮, 在分割的玻 片上点成 15μl 的点, 室温下干燥, 甲醛固定 3 min, PBS 洗 1 次, 烘干。再以稀释胎牛血清孵化 5 min, 用 缓冲液和 PBS 各洗 1次。③待测血清与一抗结合。 取待测血清,以 0.2% PBS-聚山梨醇 20 稀释血清至 1: 40, 与 Raji 细胞在室温下孵育 30 min, 再以 0.2% PBS- 聚山梨醇 20 洗涤 1 次, 以 PBS 洗涤 2 次。 ④加 入二抗。加入异硫氰酸荧光素结合的羊抗人 IgG, 室 温孵育 30 min, 再以 0.2% PBS- 聚山梨醇 20 洗涤 1次, 以 PBS 洗涤 2 次。最后以甘油 PBS 封片剂封固为玻 片标本,置于荧光显微镜下观察。⑤结果判定。荧光 显微镜下,细胞膜可能产生3种不同的图形:无荧光、 淡的膜荧光、细胞膜周连续的环状强荧光, 其中后两 者为阳性, 无荧光为阴性。

1.3.2 ANA 检测 采用 IIF 法检测 ANA, 基本方案与抗 cmDNA 检测类似。血清 1 : 100 稀释,取 25 μl,加入反应板,在室温下与 HEP-2 细胞和猴肝基质片反应 30 min,冲洗,加 20 μl 异硫氰酸荧光素标记的抗人球蛋白,室温下孵育 30 min,冲洗,封片,置于荧

光显微镜下观察。

1.3.3 常规 ANA 谱检测 参考文献 [9], 选取对 SLE 诊断特异性较高的自身抗体,包括抗史密斯(Smith,Sm)抗体、AnuA 进行检测。均采用免疫斑点法检测,检测方案参考试剂说明书,待测血清与膜条上包被抗原反应着色判断为阳性。

1.4 诊断方案

设3种诊断方案,对比分析以确定抗cmDNA抗体联合ANA对诊断SLE的价值。方案一:ANA串联常规ANA谱诊断,此为目前常规诊断方案;方案二:抗cmDNA串联常规诊断方案;方案三:抗cmDNA 市体并联常规诊断方案。其中常规ANA谱诊断中,任一自身抗体阳性,为常规ANA谱阳性。串联:当且仅当两者诊断均阳性,联合方案才阳性,否则联合方案为阴性。并联:两者诊断中至少一个阳性,联合方案为阳性,否则联合方案为阴性。

1.5 统计学方法

数据分析采用 SPSS 19.0 统计软件,计数资料以构成比或率(%)表示,比较采用 χ^2 检验或配对 χ^2 检验或 Kappa 检验, χ^2 检验的两两比较用 Bonferroni 法校正 P,不需校正时,P < 0.05 为差异有统计学意义,校正后 3 组两两比较,P < 0.017 为差异有统计学意义,4 组两两比较,P < 0.008 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3组不同自身抗体阳性情况

3 组抗 cmDNA 抗体、ANA、抗 Sm 抗体、AnuA 阳性率比较,差异有统计学意义(P < 0.05),观察组抗 cmDNA 抗体、ANA、抗 Sm 抗体、AnuA 阳性率均高于其他各组(P < 0.017)。见表 1。

			13772370111112 1 701	× 1/4 (/ /	
组别	n	抗 cmDNA 抗体	ANA	抗 Sm 抗体	AnuA
观察组	182	132 (72.53)	171 (93.96)	41 (22.53)	135 (74.18)
疾病对照组	85	9 (10.59) $^{\odot}$	48 (56.47)	$2\left(2.35 ight){}^{\scriptscriptstyle{\textcircled{1}}}$	1 (1.78) ^①
健康对照组	50	0~(~0.00~)	2 (4.00) 102	$0~(~0.00~)~^{\scriptscriptstyle{\scriptsize{\scriptsize{\scriptsize{\scriptsize{0}}}}}}$	0~(~0.00~)
χ ² 值		137.570	149.650	29.430	170.647
P值		0.000	0.000	0.000	0.000

表 1 3 组不同自身抗体阳性率比较 例 (%)

注: ①与观察组比较, P < 0.017; ②与疾病对照组比较, P < 0.017。

2.2 不同自身抗体对 SLE 检出效能比较

以 3 组共 317 例对象为样本总体进行分析。敏感性: ANA 最高, 其次为 AnuA、抗 cmDNA 抗体, 抗Sm 抗体最低, 差异有统计学意义 (*P* <0.05)。特异性: 抗Sm 抗体和 AnuA 最高, 其次为抗 cmDNA 抗体,

ANA 最低,差异有统计学意义 (P < 0.05)。阳性预测值:AnuA 最高,其次为抗 Sm 抗体和抗 cmDNA 抗体,ANA 最低,差异有统计学意义(P < 0.05)。阴性预测值:ANA 最高,其次为 AnuA 和抗 cmDNA 抗体,抗 Sm 抗体最低,差异有统计学意义 (P < 0.05)。见表 2。

表 2 不同自身抗体对 SLE 检出效能比较 %

自身抗体类型	敏感性	特异性	阳性预测值	阴性预测值
抗 cmDNA 抗体	72.53(132/182)	93.33 (126/135)	93.62 (132/141)	71.59(126/176)
ANA	93.96 (171/182) $^{\odot}$	62.96 (85/135) ^①	77.38 (171/221) ^①	88.54 (85/96) ^①
抗 Sm 抗体	22.53 (41/182) ************************************	98.52 (133/135) ²	95.35 (41/43) ²	48.54 (133/274) ***********************************
AnuA	74.18 (135/182) 23	99.26 (134/135) ²	99.26 (135/136) ^②	74.03 (134/181) 23
χ ² 值	224.880	118.437	48.110	66.362
P值	0.000	0.000	0.000	0.000

注: ①与抗 cmDNA 比较, P<0.008; ②与 ANA 比较, P<0.008; ③与 AnuA 比较, P<0.008。

2.3 观察组 ANA 和常规 ANA 谱阴性者抗 cmDNA 检出率

观察组 ANA 及 ANA 谱阴性者, 抗 cmDNA 检出率均 >50%。见表 3。

2.4 方案 2 与方案 1 诊断 SLE 一致性分析

以 3 组共 317 例对象为样本总体进行分析。经 McNemar 检验,两种诊断方案的结论不一致,差异有统计学意义(P=0.000);经 Kappa 一致性检验,两种诊断方案有中等的一致性(κ =0.541,P=0.000)。见表 4。

2.5 方案 3 与方案 1 诊断 SLE 一致性分析

经 McNemar 检验,两种诊断方案的结论不一致, 差异有统计学意义 (P =0.000);经 Kappa 一致性检 验,两种诊断方案有几乎完全一致性 (κ =0.894, P =

表 3 观察组 ANA 及 ANA 谱阴性者抗 cmDNA 检出率

自身抗体类型	阴性例数	抗 cmDNA 抗体阳性率 例(%)
抗 Sm 抗体	141	91 (64.54)
AnuA	47	28 (59.57)
ANA	11	6 (54.55)

0.000)。见表 5。

2.6 3 种诊断方案对 SLE 的诊断效能

敏感性:方案 3 均具备最高的敏感性。特异性:方案 2 具备最高的特异性。阳性预测值:方案 2 具备最高的阳性预测值。阴性预测值:方案 3 均具备最高的阴性预测值。见表 6。

表 4 方案 2 与方案 1 诊断 SLE 一致性分析 例

方案 2	方案 1 阳性	方案1阴性	总计
阳性	126	0	126
阴性	77	114	191
总计	203	114	317

表 5 方案 3 与方案 1 诊断 SLE 一致性分析 例

方案 3	方案 1 阳性	方案1阴性	总计
阳性	203	15	218
阴性	0	99	99
总计	203	114	317

诊断方案	敏感性	特异性	阳性预测值	阴性预测值
方案 1	92.31 (168/182)	74.07(100/135)	82.76 (168/203)	87.72 (100/114)
方案 2	64.29 (117/182) $^{\odot}$	93.33 (126/135) ^①	92.86 (117/126) ^①	65.97 (126/191) ^①
方案 3	93.41 (170/182) ^②	64.44 (87/135) ^②	77.98 (170/218) ^②	87.88 (87/99) ^②
χ ² 值	71.393	33.277	12.671	27.487
P 值	0.000	0.000	0.001	0.000

表 6 3 种诊断方案对 SLE 的诊断效能比较 %

注: ①与方案 1 比较, P < 0.017; ②与方案 2 比较, P < 0.017。

3 讨论

SLE 是一种对人体健康危害严重的自身免疫性疾病,目前尚不能完全治愈该疾病,但由于自身抗体检测方案的出现与发展,临床已能够做到早期诊断、早期治疗,患者的生存率因此得到显著提升[10-12]。迄今为止,SLE 患者血清中已发现百余种相关自身抗体,其中 ANA、抗 Sm 抗体、AnuA 在临床中应用较广泛,是诊断 SLE 的相对特异性抗体[13-15]。但上述抗体单独应用均存在一定缺陷,本研究显示 ANA 敏感性较高,但特异性较差,抗 Sm 抗体及 AnuA 特异性提升,但敏感性相对较差,与既往报道[16-17]结论相符,因此临床多建议联合检测各种自身抗体。

本研究显示,抗 cmDNA 抗体对诊断 SLE 有较可靠的价值:其对 SLE 的诊断敏感性虽然低于 ANA,但高于抗 Sm 抗体,与 AnuA 接近,同时其对 SLE 的诊断特异性亦可达到 93.33%,戚建锋等 [18] 报道该抗体对诊断 SLE 的敏感性为 62.8%,特异性为 92.9%,提示其兼具良好的诊断敏感性与特异性。cmDNA 分子主要表达于人 B 淋巴细胞、单核细胞和外周血白细胞膜,细胞膜的 cmDNA 结合蛋白可能为其受体,由于SLE 患者存在 cmDNA 受体功能障碍,因此 cmDNA 不能正常清除,故其能够作为独特的靶抗原,诱导患者产生抗 cmDNA 抗体 [19]。

本研究观察组中 ANA、抗 Sm 抗体、AnuA 阴性者,均有超过 50% 患者能够检出抗 cmDNA 抗体,提示后者是 ANA 及常规 ANA 谱的有效补充,能够避免漏诊,与既往报道 ^[20] 结论相符。各项诊断方案对比显示,抗 cmDNA 抗体串联常规诊断方案,具有最高的敏感性,而抗 cmDNA 抗体并联常规诊断方案,具有最高的特异性,说明其联合常规诊断方案,对 SLE 有较可靠的诊断作用。但联合方案中仍存在一定的漏诊及误诊,

说明联合诊断方案仍不足以完全有效地检出 SLE 患者,因此抗 cmDNA 抗体可能仍仅能作为传统诊断方案的补充。

综上所述, 抗 cmDNA 抗体有助于检出 ANA、抗 Sm 抗体及 AnuA 阴性的 SLE 患者, 抗 cmDNA 抗体联合常规方案诊断 SLE 具备较可靠的诊断效能。

参考文献:

- [1] 中国系统性红斑狼疮研究协作组专家组.糖皮质激素在系统性 红斑狼疮患者合理应用的专家共识[J].中华内科杂志,2014, 53(6):502-504.
- [2] SHIM J S, SUNG Y K, JOO Y B, et al. Prevalence and incidence of systemic lupus erythematosus in South Korea[J]. Rheumatol Int, 2014, 34(7): 909-917.
- [3] 杨程德.系统性红斑狼疮的治疗应以减少器官损伤,提高生活质量及改善远期预后为目标[J].中华医学杂志,2014,94(13):961-962
- [4] 王永芹, 王胜玉, 张雪峰. 抗核抗体谱检测对系统性红斑狼疮的诊断意义[J]. 现代预防医学, 2015, 42(4): 753-754.
- [5] 高启健,向波,刘忠民. 抗核抗体两种检测方法在系统性红斑 狼疮中的诊断性能比较 [J]. 实用医学杂志, 2017, 33(9): 1498-1502.
- [6] RU J L, ZHAO Y, XIE X X, et al. Clinical applications of the indirect immunofluorescence assay for detection of anticell membrane-associated DNA antibodies in juvenile systemic lupus erythematosus[J]. Pediatr Res, 2015, 77(2): 376-380.
- [7] PETRI M, ORBAI A M, ALARCÓN G S, et al. Derivation and validation of the systemic lupus international collaborating clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus[J]. Arthritis Rheum, 2012, 64(8): 2677-286.
- [8] 茹晋丽,赵华明,吴铁鹰,等.抗细胞膜 DNA 抗体对系统性红斑狼疮临床价值的研究 [J]. 中华风湿病学杂志, 2015, 19(2): 97-101
- [9] 王许娜, 边菁, 尹光辉, 等. 联合检测抗核小体, 抗双链 DNA, 抗组蛋白和抗 Sm 抗体在系统性红斑狼疮诊断中的临床意义 [J]. 中国现代医学杂志, 2015, 25(14): 59-62.
- [10] TUNNICLIFFE D J, SINGH-GREWAL D, KIM S, et al.

- Diagnosis, monitoring, and treatment of systemic lupus erythematosus: a systematic review of clinical practice guidelines[J]. Arthritis Care Res (Hoboken), 2015, 67(10): 1440-1452
- [11] 王永芹,王胜玉,张雪峰. 抗核抗体谱检测对系统性红斑狼疮的诊断意义[J]. 现代预防医学, 2015, 42(4): 753-754.
- [12] 毕丹艳,张虹,郑红梅,等.环磷酰胺联合人免疫球蛋白治疗老年 SLE 的有效性及安全性分析 [J]. 中国现代医学杂志, 2018, 28(5): 103–105.
- [13] MOHAN C, PUTTERMAN C. Genetics and pathogenesis of systemic lupus erythematosus and lupus nephritis[J]. Nat Rev Nephrol, 2015, 11(6): 329-341.
- [14] 郑朝晖,荣玉玺,吴振彪.系统性红斑狼疮相关生物标志物的研究进展[J].细胞与分子免疫学杂志,2015,31(8):1128-1132.
- [15] MIRABELLI G, CANNARILE F, BRUNI C, et al. One year in review 2015: systemic lupus erythematosus[J]. Clin Exp

- Rheumatol, 2015, 33(3): 414-425.
- [16] 王淑英,王峰,王贞美,等.86 例系统性红斑狼疮患者抗核抗 体谱检测结果分析 [J]. 中国实验诊断学,2016,20(3):422-424.
- [17] SEBASTIANI G D, PREVETE I, PIGA M, et al. Early lupus project A multicentre Italian study on systemic lupus erythematosus of recent onset[J]. Lupus, 2015, 24(12): 1276-
- [18] 戚建锋, 吴翡斐, 施金俏, 等. 抗细胞膜 DNA 抗体在系统性红斑狼疮诊断中的应用价值 [J]. 浙江医学, 2017, 39(21): 1865-1867
- [19] 胡静, 李立新, 武永康, 等. 抗细胞膜 DNA 抗体与其他自身抗体的检测及相关分析 [J]. 华西医学, 2016, 31(8): 1372–1375.
- [20] 茹晋丽, 靳雪琴, 吴铁鹰, 等. 不同底物间接免疫荧光法检测细胞膜 DNA 抗体在儿童系统性红斑狼疮的临床价值研究 [J]. 国际儿科学杂志, 2016, 43(1): 74-77.

(王荣兵 编辑)