

HLA-DRB1*0405 联合抗 CCP 抗体 诊断类风湿性关节炎的价值

许泼实 孙长义 赵静 万震 胡宏 刘晓丽

基金项目:河南省科技厅攻关课题(No.0524410097)

作者单位:450003 郑州市,河南省人民医院检验科

【摘要】 目的 研究 HLA-DR 共同表位基因多态性与类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)的相关性,及其与抗环瓜氨酸肽(cyclic citrullinated peptide, CCP)抗体联合检测在 RA 早期诊断中的价值。**方法** 选择 130 例 RA 患者和 80 例健康体检者,采用聚合酶链反应-序列特异性引物技术检测受检者 HLA-DRB1*0405 和 DRB1*0401 等位基因频率,ELISA 法检测抗 CCP 抗体,并比较两组间的差异。**结果** RA 患者组和对照组比较,DRB1*0401 基因频率差异无统计学意义($P > 0.05$),而 DRB1*0405 基因频率差异有统计学意义($P < 0.001$);抗 CCP 抗体阳性检出率差异也具有统计学意义($P < 0.001$)。另外,患者组中既有 DRB1*0405 基因型同时抗 CCP 抗体为阳性的检出率以及患者组中仅有 DRB1*0405 基因型或仅有抗 CCP 抗体为阳性的检出率与对照组的比较差异均具有统计学意义(P 均 < 0.001)。DRB1*0405 基因频率与抗 CCP 抗体阳性率显著相关($r = 0.4172, P < 0.01$);DRB1*0405 基因与抗 CCP 抗体联合诊断 RA 的敏感性为 52.3%,特异性为 90.0%,与单独检测 DRB1*0405 基因或抗 CCP 抗体相比,具有最高的阳性似然比(1.53)和最低的阴性似然比(0.53)。**结论** HLA-DRB1*0405 基因与抗 CCP 抗体联合用于 RA 的诊断具有较好的诊断价值。

【关键词】 关节炎,类风湿;HLA-DR 抗原;抗 CCP 抗体

Diagnostic value of combined detection of HLA-DRB1*0405 and anti-CCP antibody in rheumatoid arthritis

XU Po-shi, SUN Chang-yi, ZHAO Jing, et al. Department of Clinical Laboratory, Henan People's Hospital, Zhengzhou 450003, China

【Abstract】 Objective To explore the association between expression of HLA-DRB1*0405 and rheumatoid arthritis (RA) and diagnostic value of combination of HLA-DRB1*0405 and anti-CCP antibody in RA. **Methods** 130 patients with RA and 80 healthy controls were selected as subjects. Polymerase chain reaction with sequence-specific primers was used to determine HLA-DRB1*0405 and DRB1*0401 alleles, and anti-CCP antibody was measured by ELISA, and do statistical analysis. **Results** There was no statistical significance in the difference of HLA-DRB1*0401 between RA group and control group ($P > 0.05$). There were statistical significance in the differences of HLA-DRB1*0405 and positive detection rate of anti-CCP antibody between the two groups (P all < 0.001). There was statistical significance in the difference of both had HLA-DRB1*0405 and anti-CCP antibody between RA group and control group ($P < 0.001$). There was statistical significance in the difference of only had HLA-DRB1*0405 or only had anti-CCP antibody between the two groups ($P < 0.001$). In RA group, there was significant correlation between HLA-DRB1*0405 and anti-CCP antibody ($r = 0.4172, P < 0.01$). The sensitivity of combined HLA-DRB1*0405 with anti-CCP antibody to diagnose RA was 52.3%, and the specificity was 90.0%. Compared with HLA-DRB1*0405 and anti-CCP antibody detecting alone, there was a highest positive likelihood ratio (1.53) and lowest negative likelihood ratio (0.53). **Conclusion** To unit HLA-DRB1*0405 and anti-CCP antibody may be a useful marker for diagnosis of RA.

【Key words】 Arthritis, rheumatoid; HLA-DR antigen; Anti-cyclic citrullinated peptide antibody

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种以慢性、对称性、进行性多关节炎为主的自身免疫性疾病,以双手、腕、肘、膝、踝和足关节受累最常见,

反复发作,迁延多年,最终易导致关节畸形及功能丧失^[1,2]。早期诊断对提高治愈率,减少致残非常重要,遗传因素和环境因素共同作用是 RA 的主要诱发原

因, 研究表明人类白细胞抗原 (human leucocyte antigen, HLA)DR 抗原的多态性与 RA 易感性有密切的关系^[1], 抗环瓜氨酸肽 (cyclic citrullinated peptide, CCP) 抗体是 RA 的一个主要实验诊断指标^[2], 本文采集 130 例 RA 患者病例资料, 分析 HLA-DR 共同表位 (shared epitope, SE) 基因多态性联合抗 CCP 抗体诊断 RA 的临床价值, 现报告如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料 选择我院 2005-2007 年间门诊及住院 RA 患者, 共 130 例, 均为本地汉族居民, 其中男性 50 例, 19-67 岁, 女性 80 例, 17-72 岁。平均病程 35 个月 (4-360 个月)。所有患者均符合 1987 年美国风湿病学会 (ARA) 修订的 RA 分类标准。选择 80 名健康体检者为对照组, 男性 30 例, 22-65 岁, 女性 50 例, 19-69 岁, 均为本地汉族居民, 无 RA 病史及相关症状。经平衡检验两组间性别、年龄差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 具有可比性。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 采集受检者外周血 3 ml, 2% 的 EDTA 按 1:10 体积抗凝, 血样按常规酚氯仿方法抽提 DNA。经紫外可见分光光度仪测定含量及纯度, A260/280 在 1.7-1.8 范围内。所有血液样本分离出的基因组 DNA 在 -70 °C 保存, 直到最终批量检测。

1.2.2 HLA-DR4 等位基因 DRB1*0405 和 DRB1*0401 亚型检测 采用 PCR-SSP 法, 采用高分辨 HLA-DRB1 SSP UniTray Kit 试剂盒 (美国 PEL-FREEZ 公司), PCR 反应条件参照试剂盒的说明。扩增产物在 2% 的琼脂糖凝胶中以 150 V 稳压电泳 10 min, 紫外检测仪观察结果, 与试剂盒中的标准板对照确定等位基因, 等位基因的命名和序列按 2001 年 WHO 公布的方法。

1.2.3 抗 CCP 抗体的检测 采用 ELISA 法测定抗 CCP-IgG 型抗体, 试剂购自德国 AESKU 公司。操作严格按照试剂盒说明书进行。

1.2.4 统计学处理 应用 SPSS 17.0 软件做统计学分析, 计数资料比较采用 χ^2 检验。评价 HLA-DRB1*0405 与抗 CCP 抗体联合在 RA 诊断中的临

床价值采用 logistic 回归分析。

2 结果

2.1 RA 患者组和对照组 SE 的基因频率及抗 CCP 抗体阳性检出率的比较 由表 1 可见, 两组经比较 DRB1*0401 基因频率差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 而 DRB1*0405 基因频率差异有统计学意义 ($P < 0.001$); 抗 CCP 抗体阳性检出率差异也具有统计学意义 ($P < 0.001$)。另外, 患者组中既有 DRB1*0405 基因型同时抗 CCP 抗体为阳性的检出率以及患者组中仅有 DRB1*0405 基因型或仅有抗 CCP 抗体为阳性的检出率与对照组的比较差异均具有统计学意义 (P 均 < 0.001)。

2.2 HLA-DRB1*0405 与抗 CCP 抗体相关性检验 RA 患者组 DRB1*0405 阳性 42 例 (32.31%), 抗 CCP 抗体阳性 57 例 (43.85%), 统计结果显示 DRB1*0405 基因频率与抗 CCP 抗体阳性率具有相关性 ($r = 0.4172, P < 0.01$), 结果见表 2。

表 2 HLA-DRB1*0405 与抗 CCP 抗体相关性检验

指标	DRB1*0405(+)	DRB1*0405(-)	r 值	P 值
抗 CCP 抗体(+)	31	26	0.4172	< 0.01
抗 CCP 抗体(-)	11	62		

2.3 HLA-DRB1*0405 基因频率与抗 CCP 抗体组合在诊断 RA 中的特异性和灵敏度 结果见表 3。

表 3 HLA-DRB1*0405 基因频率与抗 CCP 抗体在诊断 RA 中的灵敏度和特异性 (%)

指标	灵敏度	特异性
抗 CCP 抗体(+)	43.8	97.5
DRB1*0405(+)	32.3	92.5
DRB1*0405(+)和抗 CCP 抗体(+)	23.8	100.0
DRB1*0405(+)或抗 CCP 抗体(+)	52.3	90.0

2.4 HLA-DRB1*0405 基因频率与抗 CCP 抗体不同组合在 RA 诊断中的 logistic 回归分析 结果见表 4。

3 讨论

关于 RA 的发病机制的研究一直是风湿病及自

表 1 HLA-DRB1*0405 和 HLA-DRB1*0401 基因频率及抗 CCP 抗体阳性检出率[n(%)]

组别	DRB1*0401(+)	DRB1*0405(+)	抗 CCP 抗体(+)	DRB1*0405(+)和抗 CCP 抗体(+)	DRB1*0405(+)或抗 CCP 抗体(+)
RA 患者组	11(8.46)	42(32.31)	57(43.85)	31(23.85)	68(52.31)
对照组	3(3.75)	6(7.50)	2(2.50)	0(0.00)	8(10.00)
χ^2 值	1.767	17.285	41.908	22.381	38.386
P 值	> 0.05	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

表 4 HLA-DRB1*0405 基因频率与抗 CCP 抗体组合在 RA 诊断中的 logistic 回归分析

指标组合	RA 组例数	对照组例数	OR	95%CI	+PV	-PV	+LR	-LR
DRB1*0405(-)+抗 CCP 抗体(-)	62	72	1.0	-	-	-	-	-
DRB1*0405(+)+抗 CCP 抗体(-)	11	6	2.1	0.7-6.1	64.7	92.3	0.16	0.92
DRB1*0405(-)+抗 CCP 抗体(+)	26	2	15.1	3.4-66.2	92.8	97.3	0.30	0.72
DRB1*0405(+)+抗 CCP 抗体(+)	31	0	-	-	100.0	100.0	0.33	0.67
DRB1*0405(+)+抗 CCP 抗体(+)	68	8	9.9	4.4-22.1	89.5	90.0	1.53	0.53

注:OR:比值比;CI:置信区间;+PV:阳性预测值;-PV:阴性预测值;+LR:阳性似然比;-LR:阴性似然比

身免疫病的研究热点,较一致的观点认为,环境因素和遗传因素均在 RA 的发生和发展中起着重要的作用^[6]。随着近几年分子生物学手段的发展及应用,关于 RA 发生的遗传易感因素的研究有了长足深入的发现。目前已有许多研究证实 RA 与 HLA 复合体相关^[6],HLA 复合体位于人类第 6 号染色体短臂上,其中 HLA-II 类基因具有高度多态性,是参与机体特异性识别和免疫应答的主要成分。HLA 等位基因多态性决定了个体免疫反应的表型,通过对 T 细胞的自身调节,影响抗原提呈过程。至今已发现与 RA 有关的基因型有:DRB1*0401、DRB1*0404、DRB1*0405、DRB1*0408、DRB1*0101、DRB1*0102、DRB1*1001、DRB1*1402,这些基因编码 DR 抗原的第三高变区氨基酸序列均为 QKRAA 或 QRRAA 或 RRRRAA(SE 学说)。上述序列中个别氨基酸如果被带相反电荷的氨基酸取代,将降低 RA 易感风险。SE 学说认为这些由不同基因编码的 SE QRRAA 或 QKRAA,他们的氨基酸残基恰好位于 HLA-II 类分子抗原结合槽的 α 螺旋部位,这些氨基酸具有与共同抗原结合的特性,可与致关节炎抗原肽结合,并将其呈递给 T 细胞,从而导致 RA 发病。国内研究^[6]显示,我国 RA 患者关联的 HLA-DR 基因型以 DRB1*0405 为主,其基因频率与 RA 患者许多临床指标如关节压痛数、侵蚀性病损(放射分数)、关节外表现(如类风湿结节)有较强相关性,发现 SE 阳性组 RA 患者的腕关节、肘关节以及膝关节受累的频率高于 SE 阴性组,而且治疗及预后效果较差。推测 HLA-DR4 基因频率可作为判断疾病严重性和预后的参考指标,在 RA 患者发病早期,可根据 SE 的检测情况采取针对性治疗,以及时控制病情。

本文研究了 RA 患者的 HLA-DRB1*0405 和 HLA-DRB1*0401 基因频率,结果显示 HLA-DRB1*0401 与 RA 发病无相关性 ($\chi^2=1.767, P>0.05$),HLA-DRB1*0405 基因与 RA 易感性显著相

关 ($P<0.001$)。就 HLA-DRB1*0405 基因频率与抗 CCP 抗体指标之间研究发现,57 例抗 CCP 抗体阳性的 RA 患者中 31 例出现 DRB1*0405 基因,统计结果显示二者阳性率密切相关 ($P<0.01, r=0.4172$),与文献报道一致^[7,8],将 HLA-DRB1*0405 基因频率和抗 CCP 抗体联合诊断 RA 的敏感性为 52.3%,高于单纯检测抗 CCP 抗体阳性率(43.8%),与单独检测抗 CCP 抗体或 DRB1*0405 基因频率相比具有最高的阳性似然比(1.53)和最低的阴性似然比(0.53),表明二者联合用于 RA 的诊断优于单独检测抗 CCP 抗体或 DRB1*0405 基因频率,具有较好的诊断准确性。

本文同时研究了已在欧美发现的 RA 易感基因蛋白酪氨酸磷酸酶非受体型 (protein tyrosine phosphatase nonreceptor 22, PTPN22)1858C/T 频率^[9],没有检测到 1858T 基因,与其他亚洲区域研究结果一致^[10],表明 PTPN22 基因多态性可能与亚洲人种 RA 易感性无相关性。

综上所述,HLA-DRB1*0405 基因与抗 CCP 抗体联合诊断可提高对 RA 患者的检出率,为 RA 患者的早期诊断及治疗提供依据。

4 参考文献

- Strietholt S, Maurer B, Peters MA, et al. Epigenetic modifications in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*, 2008, 10: 219.
- Smolen JS, Aletaha D. Developments in the clinical understanding of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*, 2009, 11: 204.
- Hrynaszkiewicz I, Lipsky PE, Maini RN. Introducing Arthritis Research & Therapy's 10th anniversary issue, 'The Scientific Basis of Rheumatology: A Decade of Progress'. *Arthritis Res Ther*, 2008, 10: 119.
- Aotsuka S, Okawa-Takatsuji M, Nagatani K, et al. A retrospective study of the fluctuation in serum levels of anti-cyclic citrullinated peptide antibody in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*, 2005, 23: 475-481.

5 Lundstrom E, Kallberg H, Alfredsson L, et al. Gene-environment interaction between the DRB1 shared epitope and smoking in the risk of anti-citrullinated protein antibody-positive rheumatoid arthritis: all alleles are important. *Arthritis Rheum*, 2009, 60: 1597-1603.

6 张红卫, 陈国强, 颜美心, 等. HLA-DR4 基因与类风湿关节炎临床特征的关系. *广东医学*, 2005, 11: 1518-1519.

7 Huizinga TW, Amos CI, van der Helm-van Mil AH, et al. Refining the complex rheumatoid arthritis phenotype based on specificity of the HLA-DRB1 shared epitope for antibodies to citrullinated proteins. *Arthritis Rheum*, 2005, 52: 3433-3438.

8 Kapitany A, Szabo Z, Lakos G, et al. Associations between serum anti-CCP antibody, rheumatoid factor levels and HLA-DR4 expression in Hungarian patients with rheumatoid arthritis. *Isr Med Assoc J*, 2008, 10: 32-36.

9 Michou L, Lasbleiz S, Rat AC, et al. Linkage proof for PTPN22, a rheumatoid arthritis susceptibility gene and a human autoimmunity gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 1649-1654.

10 赵丽, 裴宇容. PTPN22 基因多态性与中国广东汉族人群 RA 发病的相关性研究. *热带医学杂志*, 2009, 9: 493-495.

(收稿日期: 2010-02-27)

(本文编辑: 陈淑莲)

(上接第 64 页)

杂志, 2003, 26654-657.

[2] George JN, Thoi LL, McManus LM, et al. Isolation of human platelet membrane microparticles from plasma and serum. *Blood*, 1982, 60: 834-840.

[3] 叶应妩, 王毓三, 等主编. 全国临床检验操作规程. 第 2 版. 南京: 东南大学出版社, 1997, 472-531.

4 稿件处理

4.1 本刊实行以同行审稿为基础的三审制(编辑初审、专家外审、编委会终审)。在投稿时作者须告知与该研究有关的潜在利益冲突(即: 是否有经济利益或其他关系造成的利益冲突)。审稿过程中保护作者稿件的私密权。对不拟刊用的稿件将告知退稿意见, 对稿件处理有不同意见者, 作者有权申请复议, 并提出申诉的文字说明。

4.2 经审核拟定刊用的稿件按退修意见修改整理后, 为缩短刊出周期和减少错误, 请将修改稿以 E-mail 发送, 且修改稿打印件、原稿、退修意见单一并寄回本刊编辑部。

4.3 论文“快速通道”要求 论文具备本专业领域的创新性、科学性和重要性, 该论文的早日公布将对临床和科研工作产生重大影响。“快速通道”投稿要求: (1) 稿件应符合本刊约约的要求。(2) 作者在投稿前应与编辑部联系说明研究的基本情况, 应提供说明论文需要通过“快速通道”发表理由的书面材料, 同时, 还应提供省级或省级以上文献检索机构出具的“查新报告”。同时有 2 位高级职称的同行专家(至少有 1 位为非本单位专家)书面推荐意见。(3) 经编辑部同意后, 将论文发送到指定的电子信箱, 并邮寄单位介绍信。(4) 作者可推荐 3-5 名审稿专家(包括详细联系方式)供编辑部参考。(5) 来稿应提供作者的通讯地址、电话、手机、传真、E-mail 等联系方式。凡要求进入“快速通道”稿件, 需交纳审稿费每篇 400 元。汇款至实用检验医师杂志编辑部, 附言中请务必注明“快速通道审稿费”。对符合“快速通道”要求的论文采用特定审稿流程, 在收稿后 1 个月内就论文审稿结果给予答复, 对符合要求的论文在收稿后 4 个月内予以发表。

4.4 根据《中华人民共和国著作权法》, 并结合本刊实际情况, 凡接到本刊收稿回执后 3 个月内未接到稿件处理通知者, 系仍在审阅中。作者如欲投他刊, 请先与本刊联系, 切勿一稿两投。一旦发现一稿两投, 将立即退稿; 而一旦发现一稿两用, 本刊将进行如下处理: (1) 刊登撤销该论文及该文系重复发表的声明, 并在中国医师协会系列杂志上通报; (2) 向作者所在单位和该领域内的其他科技期刊进行通报; (3) 2 年内拒绝发表以该文第一作者为作者的任何来稿。已在非公开发行的刊物上发表, 或在学术会议交流过, 或已用其他文种发表过(需征得首次刊登期刊的同意)的文稿, 不属于一稿两投, 但作者在投稿时必须注明。已在一种杂志以摘要形式发表的论文可将全文投给其他杂志, 但须征得欲投期刊的同意。

5 投稿地址

来稿请寄: 《实用检验医师杂志》编辑部收, 地址: 天津市河东区成林道 220 号 武警医学院附属医院, 邮政编码: 300162, 电话: (022)60577728, 传真: (022)60577729, E-mail: jianyanyishi@163.com