

探讨流式细胞术检测 HLA-B27 在强直性脊柱炎中的临床应用价值

裴兵

作者单位:223900 泗洪县,江苏省泗洪县人民医院检验科

【摘要】 目的 以序列特异性引物-聚合酶链反应(sequence-specific primer polymerase chain reaction, PCR-SSP)作为金标准,探讨贝克曼-库尔特 EPICS XL HLA-B27 在强直性脊柱炎中的临床诊断价值。方法 上海交通大学附属瑞金医院进行 HLA-B27 流式细胞术检测的患者 187 例,分别进行流式细胞术 HLA-B27 抗原检测和 PCR-SSP 基因型检测,并对检测结果进行分析。结果 在 187 份 AS 患者标本中,DNA 抽提合格标本 157 份。PCR-SSP 结果显示 58 份阳性,99 份阴性,流式细胞术结果显示阳性标本 60 份,阴性标本 97 份。以 PCR-SSP 为金标准,流式细胞术检测 HLA-B27 的灵敏度为 100.0%,特异性为 96.7%,准确度为 98.7%。结论 流式细胞仪检测 HLA-B27 对 AS 有较高的灵敏度与特异性,适合于临床大规模样本量的筛查。

【关键词】 强直性脊柱炎;PCR-SSP;流式细胞术;HLA-B27

doi:10.3969/j.issn.1674-7151.2012.01.008

Evaluate the clinical value of HLA-B27 detecting by flow cytometry for ankylosing spondylitis

PEI Bing, Department of Clinical Laboratory, County People's Hospital of Sihong of Jiangsu Province, Sihong 223900, China

【Abstract】 **Objective** To evaluate the Beckman-Coulter EPICS XL HLA-B27 detection system of flow cytometry for detecting ankylosing spondylitis (AS) by sequence-specific primer polymerase chain reaction (PCR-SSP) as a gold standard. **Methods** 187 cases clinical specimens detecting HLA-B27 by flow cytometry were collected from AS patients in Shanghai Jiaotong University, Ruijing hospital. HLA-B27 antigen detection and PCR-SSP genotyping detection were done and the results were analyzed. **Results** In the 187 specimens, DNA extraction qualified samples were 157 cases. PCR-SSP showed that 58 cases were positive, 99 cases were negative, and flow cytometry showed positive samples were 60 cases, negative specimens were 97 cases. By PCR-SSP as the gold standard, the sensitivity of flow cytometry detecting HLA-B27 were 100.0%, specificity 96.7%, accuracy 98.7%. **Conclusion** HLA-B27 detection by flow cytometry has high sensitivity and specificity which suitable for large sample screening in clinical.

【Key words】 Ankylosing spondylitis; PCR-SSP; Flow cytometry; HLA-B27

强直性脊柱炎(ankylosing spondylitis, AS)是一组好发于 20~40 岁,以下腰痛、脊椎僵硬及运动范围受限为主要症状的疾病^[1]。影像学特征表现为两侧骶髂关节炎,该病属于血清阴性脊柱关节病(spondyloarthritis, SPA)的一种。自 1973 年研究人员发现 HLA-B27 抗原的表达与 AS 高度相关以来,HLA-B27 与 AS 的紧密联系就越来越被人们所肯定。主要组织相容性复合体与 SPA 的遗传学联系已经得到确定,在 HLA-B27 转基因动物中也模拟出人类脊柱关节炎的发生。与 HLA-B27 相关的 SPA 包括 AS,瑞特综合症(reiter's syndrome, RS),牛皮癣关节炎(psoriatic arthritis, PA)和炎性肠病(in-

flammatory bowel disease, IBD)。在各种 SPA 疾病中,HLA-B27 的发生频率亦不同,AS 最高,RS、PA 和 IBD 依次降低^[2]。正常人群的 HLA-B27 阳性率为 9%,而阳性人群中仅 1%~5%会发展成 AS,因此 HLA-B27 的检测并不能成为 AS 的确诊实验^[3]。然而,该检测指标对 HLA-B27 阴性人群不患 AS 的预测价值非常高。AS 患者中 HLA-B27 阳性率超过 90%,HLA-B27 阳性并伴有腰背痛和强直的约有 22.5%发展成 AS,因而对疑似 AS 患者进行 HLA-B27 检测,已成为 AS 重要的辅助诊断手段,尤其是对于未定型的 SPA 的临床评估和研究具有很大的帮助。

1 资料与方法

1.1 临床资料 选择 2009 年 9 月 22 日至 2010 年 8 月 15 日于上海交通大学附属瑞金医院进行 HLA-B27 流式细胞术检测的患者 187 例, 其中男性 109 例, 年龄 12~81 岁; 女性 78 例, 年龄 9~86 岁。经患者知情同意后, 留取两份 EDTA 抗凝血标本各 2 ml, 其中一份用于流式细胞术检测淋巴细胞上 HLA-B27 蛋白抗原的表达, 另一份抽提全血基因组 DNA 后进行序列特异性引物-聚合酶链反应 (sequence-specific primer polymerase chain reaction, PCR-SSP), 从 DNA 水平对 HLA-B27 进行检测。

1.2 主要试剂 IOTest IgG2a-FITC/IgG1-PE 混合同型对照抗体、IOTest 抗 HLA-B27-FITC/抗 HLA-B7-PE 混合单克隆抗体、OptilyseC 红细胞裂解液、鞘液均为美国 Beckman Coulter 公司产品。Taq DNA 聚合酶, 10mM dNTP, 2.5 mM MgCl₂, 10×Buffer 均为日本 TaKaRa 公司产品。PCR-SSP^[4] 的 B27 序列特异性引物与对照引物均由上海英骏 (Invitrogen) 公司合成。B27 序列特异性引物根据其 2 号外显子与其他 HLA-B 等位基因碱基不同而设计, 其上游序列为 5'-GGGCTACGTGGACGACACGCT-3', 下游序列为 5'-CAGTCTGTGCCCTTGGCCTTGC-3', 所得产物为 146 bp 片段。对照引物根据人生长激素基因设计, 其上游引物序列为: 5'-GCCTTCCCAACCATTCCCT-TA-3', 下游引物序列为: 5'-TCACGGATTCT-GTTGTGTTT-3', 产物为 429 bp 片段。所有引物纯度均为 PAGE 级。

1.3 标本处理 室温条件下在两支 4 ml 无菌流式管中分别加入 3 μl 荧光标记单克隆抗 HLA-B27-FITC/HLA-B7-PE 混合抗体和 3 μl 荧光标记的单克隆 IgG2a-FITC/IgG1-PE 同型对照抗体。取 2 ml 新鲜 EDTA 抗凝静脉血, 颠倒混匀数次后吸取 20 μl 全血分别加入检测管与同型对照管中, 轻轻摇匀使荧光标记抗体与全血中白细胞膜上相应抗原充分接触。避光, 室温孵育 15~20 min 后加入溶血素 110 μl, 用涡漩混合器充分振荡, 避光, 室温孵育 10~15 min 至溶液色泽通透, 随后加入 200 μl 鞘液, 置于 4℃ 冰箱中保存待测。

1.4 流式细胞仪检测 采用 Beckman Coulter 公司的 EPICS XL 流式细胞仪进行检测。首先以同型对照管中前向散射光 (forward scatter, FSC)、侧向散射光 (side scatter, SSC) 散点图设定淋巴细胞群门 (见图 1), 收集门内 10000 个细胞后停止收集, 随后根据细胞群在 HLA-B27-FITC (横坐标) 及 HLA-B7-

PE (纵坐标) 双参数图中占据位置的上沿与右沿设定 B7 及 B27 的阳性阈值, 使同型对照标记的细胞群绝大部分位于双参数图的右下象限。观察测定管中淋巴细胞群在 B7 与 B27 双参数图中的位置, 如果 90% 以上的淋巴细胞位于右下象限, 可直接判定为 HLA-B27 阳性, 若右下象限细胞群小于 90%, 但右上与右下象限之和大于 90%, 需进行复测, 若复测的结果维持原状, 则亦可判定为阳性, 否则判定为阴性。

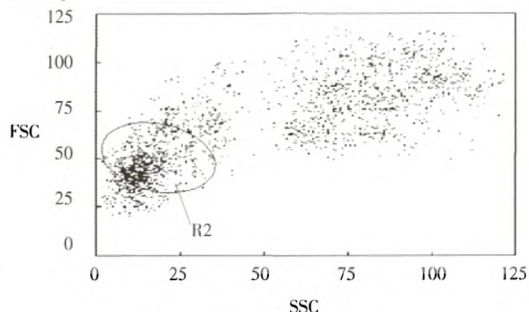


图 1 HLA-B27 检测结果

注: 散射光图 (双参数 FSC/SSC), R2 设为门圈出淋巴细胞群

1.5 PCR-SSP 检测 HLA-B27 DNA PCR 扩增采用 PTC-100 Programmable Thermal Controller PCR 扩增仪, 反应体系为 10 μl: 双蒸水 6.5 μl, 10 mM dNTP 0.4 μl, 2.5 mM Mg²⁺ 1 μl, 10×无 Mg²⁺ 缓冲液 1 μl, Taq 酶 0.2 μl, B27 序列特异性上下游引物各 0.2 μl, 生长激素 (对照) 上下游引物各 0.2 μl, DNA 模板 0.5 μl。若 PCR-SSP 结果与流式细胞术检测结果出现不一致情况, 则重新单独扩增 B27。具体反应体系如下: 双蒸水 6.9 μl, dNTP 0.4 μl, 2.5 mM Mg²⁺ 1 μl, 10×无 Mg²⁺ 缓冲液 1 μl, Taq 酶 0.2 μl, B27 序列特异性上下游引物各 0.2 μl, DNA 模板 0.5 μl, 总反应体系为 10 μl。扩增参数设置见表 1。扩增产物存于 -20℃ 冰箱中待 2% 琼脂糖凝胶电泳分析。在紫外灯下观察电泳条带。

表 1 HLA-B27 的 PCR 序列特异性引物扩增循环参数

组别	温度 (°C)	时间	循环数
1	95	5 min	-
2	95	45 s	2
3	72	60 s	2
4	95	45 s	35
5	60	40 s	35
6	72	45 s	35
7	72	5 min	-

1.6 PCR-SSP 检测结果的判读 阳性标本应出现 146 bp 和 429 bp 两条条带, 而阴性标本仅出现 429 bp 条带。若未见任何特异性条带, 表明 DNA 模板获

取质量不佳,该标本不再纳入最后的统计学处理。若 PCR-SSP 结果阴性而流式细胞仪测定结果阳性,则配制单 B27 引物体系重新扩增,以排除任何可能干扰 B27 扩增的因素。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件对数据进行分析。

2 结果

2.1 流式细胞术检测结果 187 AS 患者全血标本中,HLA-B27 阳性 AS 患者 75 份,占总数的 40.1%,阴性标本 112 份,占 59.9%。去除 30 份 DNA 抽提不合格标本后,流式细胞术检测阳性标本 60 份,占总数的 38.2%,阴性标本 97 例,占总数的 61.8%。60 例流式细胞术检测阳性的标本中,有 58 例 PCR-SSP 检测为阳性。其余 2 份阴性标本均为流式细胞术检测的疑似阳性,而复检后判断为阳性的标本,该 2 例 B27 阳性细胞群的百分比接近判断阈值,但主要均集中于右上象限,见图 2。

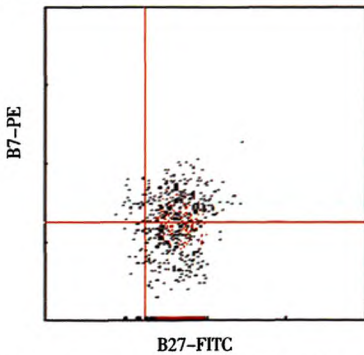


图 2 2 例 HLA-B27 经复测以后判断为阳性结果

2.2 PCR-SSP 检测结果 187 例全血标本的 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳,有 30 例未见条带,予以剔除。可见明显基因组 DNA 条带的共 157 例。有 58 例标本出现明显的双条带,判断为阳性,而其余 99 例标本仅能扩增出人生长激素基因 DNA 片段,无 B27 特异性条带,判断为阴性,见图 3。

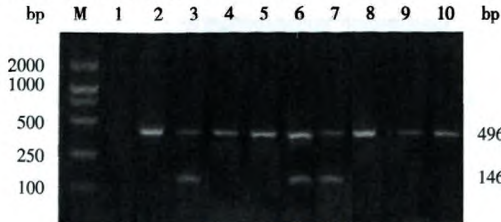


图 3 PCR-SSP 琼脂糖凝胶电泳结果

注:M:Marker;1:空白对照;2:阴性对照;3:阳性对照;4、5:两例假阳性;6、7:2 例阳性;8、9、10:3 例阴性

2.3 流式细胞术检测 HLA-B27 临床诊断性能评价

以 PCR-SSP 为金标准,流式细胞术检测 HLA-B27 的灵敏度为 100.0%,特异性为 96.7%,准确度为 98.7%。

3 讨论

目前常见的 HLA-B27 检测方法有流式细胞术、微量淋巴细胞毒试验和 PCR-SSP 等^[5]。早期常用的微量淋巴细胞毒试验,因其操作繁琐且易产生假阳性而逐渐被方便快捷的流式细胞术所取代。目前已有较多文献^[6]对流式细胞术检测 HLA-B27 的方法学做出了较为完备的评价。普遍认为流式细胞术虽操作简便,经济实惠,且具有较高的灵敏度与特异性,但仍存在一些问题,主要原因在于目前所使用的抗 HLA-B27 单克隆抗体一方面不能覆盖所有的 B27 亚型,另一方面也存在与交叉反应组抗原(由 B7、B13、B22、B40、B41、B42、B47 和 B48 组成)产生交叉反应的现象。现今临床上常用的抗 HLA-B27 单克隆抗体有三种:GS145.2、ABC-m3 和 FD705。其中,GS145.2 与 HLA-B7、HLA-B13、HLA-B40 有交叉反应;FD705 少见交叉反应,但其与抗原亲和力较弱而易造成假阴性。贝克曼-库尔特 EPICS XL HLA-B27 检测系统采用的抗体克隆型为 ABC-m3 (IgG2a),其不仅与 B7 家族抗原有较强的交叉反应,也与 B37、B38 和 B39 等稀有抗原存在交叉反应。为尽量排除交叉反应的影响,EPICS XL 系统采用同时测定淋巴细胞表面 B27 和 B7 抗原的 HLA-B27/B7 双标法。这在一定程度上减少了假阳性和假阴性的发生。但对于部分标本,尤其是 B7 呈强阳性表达的标本,仍有可能造成 B27 阳性表达的误判。

本文研究中以 PCR-SSP 为金标准对贝克曼-库尔特 EPICS XL HLA-B27 检测系统进行方法学评价。PCR-SSP 是基于设计针对靶序列的特异性引物序列,以达到检测特定模板的方法^[7]。本研究结果显示贝克曼-库尔特 EPICS XL 检测系统的特异性为 96.7%,这与国内其他研究^[8]报道的 96.4%基本相符。在 99 例 PCR-SSP 检测为阴性的标本中,有 2 例流式细胞术检测为阳性,提示流式细胞术可能存在假阳性结果。其原因可能为 ABC-m3 与 B7 抗原交叉反应所致,因为该 2 份标本淋巴细胞均出现高丰度的 B7 抗原表达(见图 2)。本文研究中 97 例流式细胞术检测阴性标本与 PCR-SSP 检测结果一致,与国外的报道^[9]一致。

本文研究中以 B27 编码序列的 2 号外显子为靶序列,设计 PCR-SSP 反应体系作为判断 HLA-B27 的金标准,这主要是基于东亚人群中 B27 等位

基因多态性主要集中于 2 号外显子的原因。若以更大规模的人群作为研究对象,3 号外显子的多态性亦是 HLA-B27 等位基因多态性的主要来源于之一。在 HLA-B27 等位基因中,2 号和 3 号外显子分别编码 α_1 和 α_2 两个结构域,其组成的多肽结合部位直接影响 HLA-B27 对抗原肽的递呈。经比对发现,本研究采用的特异性引物,可以扩增 B2701~B2709 等 9 种亚型。研究^[10]已证实,B2704 和 B2705 均与 AS 有密切关系。国外文献^[11]报道其他与 AS 相关的亚型还有 HLA-B2713、B2714、B2715、B2719 和 B2725,这些亚型的基因多态性涉及 3 号外显子等其他非 2 号外显子。本文研究采用的 PCR-SSP 体系无法扩增出此类 B27 亚型,因此,从严格意义上讲,本文研究中发现 2 份 PCR-SSP 与流式细胞术检测结果不一致的标本,最好还应以其他方式进行进一步确认,例如设计针对 3 号外显子的 PCR-SSP 扩增体系进行检测。

另外,考虑到 PCR-SSP 技术检测的是 HLA-B27 的基因型,而流式细胞术检测的是 HLA-B27 表型,两者所反应的情况并不一致,即携带 B27 基因并不等于细胞表面一定有 B27 抗原的表达^[12]。因此,PCR-SSP 和流式细胞术仍可能产生不一致的结果。当前对 B27 在 AS 中的致病机制,有一种观点认为某些致病亚型的 B27 分子如 HLA-B2705 分子在体外细胞系培养中,折叠速度较其他 HLA 分子(非 HLA-B27 分子)慢,易导致非折叠蛋白反应^[13],从而引发 AS,因此,B27 抗原的表达对临床诊断似乎更为重要。

本文研究结果显示,流式细胞术检测 HLA-B27 抗原有良好的灵敏度(100.0%)、特异性(96.7%)和准确度(98.7%)。两种方法在临床应用上各有优缺点,流式细胞术检测所需血量少(可少于 100 μ l),操作时间一般在 30 min 至 1 h 以内,较 PCR-SSP(用 Kit 抽提 DNA 也要 3 h 以上)用时少,但若血液久置而血细胞表面抗原肽改变就会影响抗 B27 单克隆抗体的结合,因此流式细胞术对血样新鲜度要求较 PCR-SSP 严格。再者,若 PCR-SSP 后还需进行产物的后续鉴定过程,如琼脂糖凝胶电泳、直接测序或等位基因特异性杂交分析也增加了临床检测的时耗及不便,相比而言,流式细胞术在临床应用中有一定的优越性。因此,在实际的临床操作中,如果能结合使用两种方法,先通过流式细胞术进行筛选,疑似病例

再通过 PCR-SSP 进一步确认,将使该项目的检测更为准确合理。

4 参考文献

- 1 方懿,蒋宗滨. HLA-B27 与强直性脊柱炎的相关性研究进展. 国际麻醉学与复苏杂志,2011,6:323-325.
- 2 Rudwaleit M, Revand E, Holeyk P, et al. Adalimumab effectively reduces the rate of anterior uveitis flares in patients with active ankylosing spondylitis: results of a prospective open-label study. *Ann Rheum Dis*,2009,68:696-701.
- 3 邓志辉,高素青,曾健强,等. 南方汉族强直性脊柱炎患者及健康人群 HLA-B27 基因的分子多态性及分布. *中国输血杂志*,2009,22:722-725.
- 4 金冬雁,主编. 分子克隆实验指南. 北京:科学技术出版社,1998:415-420.
- 5 洪俊,张平安,李艳,等. 强直性脊柱炎患者人类白细胞抗原 B27 三种检测方法的对比. *检验医学杂志*,2006,21:1-3.
- 6 陈春伟,陈海霞. 流式细胞术检测 HLA-B27 抗原的表达及临床意义. *中国医学工程*,2010,18:39-40.
- 7 Liu SQ, Yu HC, Gong YZ, et al. Quantitative measurement of HLA-B27 mRNA in patients with ankylosing spondylitis—correlation with clinical activity. *J Rheumatol*,2006,33:1128-1132.
- 8 陈志坚,李山. 强直性脊柱炎患者 HLA-B27 的检测. *中华医学杂志*,2004,28:13-14.
- 9 Dowling J, Coates E, Street J, et al. A high-resolution polymerase chain reaction sequence-specific primer HLA-B27 typing set and its application in routine HLA-B27 testing. *Genet Test*,2006,10:98-103.
- 10 Downing J, Guttridge MG, Thompson J, et al. Five-locus HLA typing of haematopoietic stem cell donor volunteers by PCR using sequence specific primers. *Genet Test*,2004,8:301-312.
- 11 Taurog JD. The mystery of HLA-B27: if it isn't one thing, it's another. *Arthritis Rheum*,2007,56:2478-2481.
- 12 Varnavidou-Nicolaidou A, Karpasitou K, Georgiou D, et al. HLA-B27 in the Greek Cypriot population: distribution of sub-types in patients with ankylosing spondylitis and other HLA-B27 related diseases. The possible protective role of B2707. *Hum Immunol*,2004,65:1451-1454.
- 13 Chou CT, Tsai YF, Liu J, et al. The detection of the HLA-B27 antigen by immunomagnetic separation and enzyme-linked immunosorbent assay: comparison with a flow cytometric procedure. *J Immunol Methods*,2001,255:15-22.

(收稿日期:2011-12-27)

(本文编辑:陈淑莲)