

• 论 著 •

流式免疫多重微球芯片技术检测干燥综合征自身抗体的评价及应用*

牛广华, 高玉洁[△], 张程, 张艺凡, 吕丹, 崔百慧
(辽宁中医药大学附属医院, 沈阳 110032)

摘要:目的 建立多重微球芯片流式免疫荧光发光法检测原发性干燥综合征(pSS)自身抗体的评价及应用。方法 采用多重微球流式免疫荧光发光法,以聚苯乙烯微球为反应界面,将 8 种[SSA(60 kD)、SSB、 α -fodrin、M3、ds-DNA、nRNP/Sm、Sm、M2]抗人 IgG 单克隆抗体包被微球后,用该方法检测同一血清样本中的多种可溶性蛋白抗体。选取 pSS 患者 206 例、非 pSS 患者 110 例和健康人 69 例,用多重微球流式免疫荧光发光法检测 8 种自身抗体。结果 多重微球流式免疫荧光发光法检测 8 种抗体的批内差异及批间差异均较小;检测 pSS 组的 8 种抗体水平与非 pSS 组、健康组比较,差异均有统计学意义($P < 0.01$);诊断 pSS 的总敏感度可达 97.20%,总特异性可达 96.34%。结论 多重微球流式免疫荧光发光法检测 pSS 自身抗体方法可以一次同时进行 8 种自身抗体的联合检测,为 pSS 及其他自身免疫病的确诊创造了一种准确、便捷的检测新方法。

关键词:原发性干燥综合征; 多重微球芯片流式免疫荧光发光法; 血清生物标志物; 自身抗原; 自身抗体

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2016.14.003 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2016)14-1911-03

Establishment and clinical application of multiplex flow cytometric immuno-bead array assay technology in detecting primary sjogren's syndrome*

NIU Guanghua, GAO Yujie[△], ZHANG Cheng, ZHANG Yifan, LV Dan, CUI Baihui

(Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shengyang, Liaoning 110032, China)

Abstract: Objective To establish and applicata a method of multiplex flow cytometric immuno-bead array assay technology in detecting primary sjogren's syndrome (pSS). **Methods** By multiplex flow cytometric immuno-bead array assay technology, polystyrene microspheres were coated by eight monoclonal antibodies[SSA(60 kD), SSB, α -fodrin, M3, ds-DNA, nRNP/Sm, Sm, M2], which were also regarded as reaction interface. And the varieties of soluble protein were detected in one sample at the same time by this kind of method. A total of 206 pSS patients, 110 non-pSS patients and 96 healthy people were selected as subjects of our study. The new method was used for detecting 8 autoantibodies in the pSS group, non-pSS group and normal group. **Results** The coefficient of variation (CV) of intra-repetition and inter-repetition were small in difference in detection of 8 autoantibodies; compared with the pSS group, the difference in the non-pSS group and normal group had statistical significance($P < 0.01$). The sensitivity for the diagnosis of pSS group was 97.20% and specificity was 96.34%. **Conclusion** Multiplex flow cytometric immuno-bead array assay technology can be used to detect eight antibodies of pSS, which might provide for clinical diagnosis of pSS and other autoimmune diseases a quick and accurate method.

Key words: primary sjogren's syndrome; multiplex flow cytometric immuno-bead array assay technology; serum biomarkers; autoantigen; autoantibodies

原发性干燥综合征(pSS)属于慢性炎性自身免疫病,该病侵犯多系统特别是外分泌腺。血清中可检出多种自身抗体,以具有较高敏感性的 SSA 抗体和较高特异性的 SSB 抗体而备受关注。近年新发现的与干燥综合征(SS)有关且有较高敏感性和特异性的胞衬蛋白(α -fodrin)抗体有望成为继 SSA/SSB 抗体后,辅助诊断 SS 的另一个生物标记物^[1]。M3 受体抗体是新近研究发现的 SS 中唯一一个器官特异性抗体^[2]。其引导了对 SS 的发病机制及用药治疗的新思路。另外一些继发性 SS 同时存在其他相关抗体,对于其他抗体的检测,如 nRNP/Sm、Sm、Scl-70、Jo-1 抗体的测定也大量的应用于临床。

国内测定 SSA、SSB、 α -fodrin 抗体的方法很多,例如酶联免疫吸附法(ELISA)、双向免疫扩散法、间接免疫荧光法等,但因为各类检测方式都存在利弊而导致检测结果存在误差。另

外,目前对 M3 受体抗体检测的试剂盒在国内尚未商品化生产。

多重微球芯片流式免疫荧光发光技术是在流式细胞术的基础上发展起来的新技术。该技术是将多个单抗包被在以聚苯乙烯为反应界面的微球上,可同时检测样本中多种可溶性抗体。为此课题组在国内外首次通过使用多重微球流式免疫荧光发光技术,检测 pSS 敏感性 & 特异性强的 SSA(60 kD)、SSB、 α -fodrin、M3 受体抗体,及与疾病发生发展有关的 ds-DNA、nRNP/Sm、Sm、M2 抗体等 8 种抗体,并对其进行了方法学评价。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2013 年 3 月至 2015 年 10 月在辽宁中医药大学附属医院初诊为 pSS 的患者 206 例,作为 pSS 组,其

* 基金项目:辽宁省自然科学基金课题(2014010058-301)。

作者简介:牛广华,男,主任技师,主要从事风湿免疫分子生物研究。 [△] 通讯作者, E-mail: gaoyujie_54@126.com。

中男 135 例,女 71 例,年龄 20~78 岁,平均年龄 39 岁。入选患者均符合 2002 年欧洲美国 pSS 分类(诊断)标准^[3]。选取同期到该院初诊非 pSS 患者 110 例,作为非 pSS 组,其中男 42 例,女 68 例,年龄 50~78 岁,平均年龄 42 岁。选取同期本院体检正常者 69 例作为健康对照组,其中男 24 例,女 45 例。年龄 22~51 岁,平均年龄 37 岁。样本留取:采集外周静脉血 2 h 内分离血清,-80 °C 冰箱分装保存。

1.2 仪器和试剂 Lumindex 200 多功能流式点阵仪,由美国 Lumindex corporation 公司生产。主要试剂为聚苯乙烯微球,直径为 4 μm,浓度为 1×10⁸,共有 5 个荧光梯度,为 Spherotech 公司产品;SSA(60 kD)、SSB、α-fodrin、M3 受体抗抗体均由本实验室自行制备,类型为鼠抗人 IgG;ds-DNA、nRNP/Sm、Sm、M2 等 6 种单抗,异硫氰酸荧光素(FITC)标记的羊抗人 IgG 多克隆抗体(FITC BAH)、羊抗鼠 IgG 多克隆抗体(FITC SAM)均购自美国 Beckman Coulter 公司。

1.3 原理及方法

1.3.1 检测原理 首先在反应孔中加入待测稀释血清及复合微球悬浮液(简称微球悬液)温育。聚苯乙烯微球由不同荧光标记,各种颜色微球上有相应的单抗。待测血清中对应的一种或几种抗体可特异性的结合于各色微球表面。洗去血清中未能反应的蛋白。然后加入荧光素(藻红蛋白)标记的羊抗人 IgG 并温育,使其与结合在微球表面的抗体结合从而标记自身抗体。用 AtheNA Multi-Lyte® 设备对微球悬液进行分析。该仪器可辨别微球颜色并检测微球的荧光强度(PE)。将 PE 换算成浓度结果,荧光强度中位数(MFI)则是利用了孔内校正技术。

1.3.2 微球包被 用 0.1 mol/L 碳酸盐缓冲液(pH9.6)稀释好的单抗 SSA(60 kD)、SSB、α-fodrin、M3、ds-DNA、nRNP/Sm、Sm、M2 各 160 μg。取 5 个荧光梯度微球各 100 μL,分别与单抗混合摇床混匀,4 °C 过夜。次日用含 0.05%吐温-20 的 pH7.4 的磷酸盐缓冲液(PBS 缓冲液)洗涤 3 次,3% BSA 稀释液(PBS 稀释液配置)摇床混匀封闭微球,4 °C 过夜。以等渗盐溶液 0.02%的叠氮钠重悬微球,4 °C 保存。于第 1、10、20、30、40、60、80、100 天分别应用 FITC SAM(阳性对照)及 FITC

BAH(阴性对照)检测微球,判断微球包被效果和稳定性。

1.3.3 检测方法 血清 1:21 稀释,混匀;在反应板的每孔内分别加入 50 μL 微球悬液和 10 μL 稀释后样本,混匀;室温温育 30 min;洗涤液洗板 3 次;轻轻吸干反应板底部,在空气干燥 3~5 min;每孔中加入 150 μL 荧光素,混匀;室温温育 30 min;摇匀;60 min 内读取结果。检测结果分析判断标准:阴性样本,<100 AU/mL;阳性样本,>120 AU/mL;临界值样本,100~120 AU/mL。

1.4 统计学处理 采用 SPSS16.0 进行数据分析。3 组样本间比较,采用独立样本 t 检验;联合检测 8 种抗体的敏感性 & 特异性采用行×列表 χ² 检验,P<0.05 视为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 微球固相化单抗的载量 8 种抗体 SSA(60 kD)、SSB、α-fodrin、M3、ds-DNA、nRNP/Sm、Sm、M2 包被微球的 MFI 分别为 15.2±1.02、19.8±1.24、24.5±1.32、27.12±1.21、13.13±1.15、18.42±1.35、16.2±1.03 和 18.6±1.04。

2.2 微球稳定性测定 保存在 4 °C 时微球稳定性好,SSA(60 kD)、SSB、α-fodrin、M3、ds-DNA、nRNP/Sm、Sm、M2 变异系数分别为 8.93%、9.09%、10.39%、12.07%、19.54%、9.61%、12.19%和 9.30%。4 °C 条件下可稳定存储 100 d。

2.3 精密度检测 用变异系数(CV)表示。

2.3.1 批内精密度 取 1 份标本反复测定 10 次。10 次测定结果:SSA(60 kD)、SSB、α-fodrin、M3、ds-DNA、nRNP/Sm、Sm、M2 测定的 MFI 的 CV 分别为 2.63%、2.81%、3.01%、2.33%、2.51%、2.42%、2.71%和 2.81%。

2.3.2 批间精密度 取 1 份标本进行每天 1 次测定,连测 20 天。20 天测定结果:SSA(60 kD)、SSB、α-fodrin、M3、ds-DNA、nRNP/Sm、Sm、M2 测定的 MFI 的 CV 分别为 3.06%、2.88%、2.90%、3.21%、4.16%、3.68%、3.26%和 2.98%。

2.4 多重微球流式免疫荧光发光法检测三组抗体水平比较 结果显示,8 种抗体水平的 MFI 在 pSS 组与非 pSS 组、pSS 组与健康组间存在差异,差异均有统计学意义(P<0.01),非 pSS 组与健康组比较差异无统计学意义(P>0.05),详见表 1。

表 1 pSS 组、非 pSS 组和健康对照组 8 种抗体检测结果(AU/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	SSA	SSB	α-fodrin	M3	ds-DNA	nRNP/Sm	Sm	M2
健康对照组	69	19.65±5.71	31.96±4.23	21.30±6.12	34.70±7.65	25.36±5.14	22.13±4.53	23.16±4.39	17.74±4.66
非 pSS 组	110	20.20±6.80	30.18±8.46	23.40±5.19	35.83±8.65	24.61±5.62	23.44±5.10	22.38±5.89	18.80±5.40
pSS 组	206	399.20±19.80*#	544.18±24.23*#	369.38±21.1*#	522.70±23.65*#	631.36±18.12*#	258.13±16.42*#	348.26±15.29*#	640.00±25.46*#

注:与非 pSS 组比较,*P<0.01;与健康对照组比较,#P<0.01。

2.5 交叉反应 为评价本方法与其他 IgG 抗体的潜在交叉反应,共测试了 46 例对不同自身免疫和感染性疾病的抗体阳性的样本。这 46 例对本试剂的各个分析物检测都为阴性。研究试验表明本方式同上述 IgG 抗体无交叉反应。

2.6 三组抗体联合检测的敏感度和特异度 对 pSS 组、非 pSS 组和健康组进行 SSA(60 kD)、SSB、α-fodrin、M3、ds-DNA、nRNP/Sm、Sm、M2 抗体的敏感度和特异度的检测,结果显示,pSS 组、非 pSS 组和健康组各单抗之间及 8 种单抗联合检测总敏感性为 97.2%;总特异性为 96.34%。见表 2。

表 2 8 种单抗联合检测的敏感度及特异度

分析物	相对灵敏度(%)	相对特异性(%)	相对符合率(%)
SSA	100.0	93.7	95.1
SSB	95.3	98.3	96.9
α-fodrin	100.0	98.8	98.5
M3	100.0	99.3	99.4
ds-DNA	96.6	93.8	96.2
nRNP/Sm	96.2	93.8	95.2
Sm	93.6	96.9	97.9
M2	95.9	96.1	96.3

3 讨 论

自身抗体广义上指人体免疫系统因某种原因功能紊乱,从而对本身正常或变性的抗原类物质发生错误的免疫应答,并由 B 淋巴细胞产生相应的抗体。不同自身免疫病可具有一种或几种特异性的自身抗体,因此自身抗体可谓是自身免疫病的特异性标志。血清中出现高效价的自身抗体可以为临床医师诊断相关自身免疫病、确定治疗方案及判断预后提供有力依据。

自身抗体检测常用的方法如酶联免疫吸附法、双向免疫扩散法、间接免疫荧光法等大多有操作繁琐,耗时长的缺点。近年新兴的多重微球液相芯片技术将微球与双抗夹心法结合应用于自身抗体的检测,可实现多种抗体同时快速检测,弥补了传统方法的弊端。

目前,国际上 Rouquette 等^[4]对 9 种自身抗体(dsDNA, Sm, Sm/RNP, Scl-70, Jo-1, SSA, SSB, ribosome, and centromere B)进行检测便是利用了液相芯片技术,此技术的灵敏度为 99.1%,特异性达到 100%,变异系数 10%。Shovman 等^[5]则利用 AtheNA 液相芯片技术检测 9 项抗核抗体,其中 418 份标本分别为 95 份健康标本、86 份抗核抗体标本、236 份自身免疫患者标本。与 ELISA 相比,抗核抗体标本和自免病患者标本吻合度分别为 97.7%、92%~97.7%,健康标本吻合度为 99%。Ahreu 等^[6]对比 FIDIS 液相芯片技术和 ELISA 方法分别检测人和动物类风湿因子(RF)发现,FIDIS 法检测人 RF 特异性 90.2%、敏感性 98.9%,检测动物 RF 特异性 84.9%、敏感性 97.5%;ELISA 法检测人 RF 特异性 94.6%、敏感性 88.5%,检测动物 RF 特异性 71.9%、敏感性 98.4%。

目前,国外的液相芯片技术发展迅速且日益成熟,Luminex 公司^[7-8]等已形成多色微球配套检测及销售系统,Bio-Rad 公司等^[9-10]进一步完成了临床检验实验并研发出了商品化试剂盒。相比国内,该技术渐渐受到人们关注,但仍处于初步研究探索阶段。

本文采用半定量(多重微球流式免疫荧光发光法)检测 pSS 患者血清中 8 种不同分析物的 IgG 抗体。还可用于各种自身免疫病的体外辅助诊断,如类风湿关节炎、系统性硬皮病、系统性红斑狼疮、混合型结缔组织疾病(MCTD)、药物诱导的红斑狼疮和干燥综合征等自身免疫病。虽然目前自身免疫病的确切病因不详,但此类疾病的患者存在特异性的自身抗体是确定的。对疑似各类结缔组织病患者,要联合和经常检测这些自身抗体。

本研究采用多重微球流式免疫荧光发光法技术检测抗核抗体及 pSS,结果显示,在 4℃ 时保存被包被的微球稳定性好,可存储 100 天,同时精密度试验也显示该方法反复检测变异较小,具有很好的重复性。检测 pSS 组与非 pSS 组、健康组 8 种抗体的 MFI 比较,差异均有统计学意义($P < 0.01$),非 pSS 组与健康组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。其检测的抗体的总敏感度和总特异度分别为 97.2%、96.34%,同文献报道基本一致^[7]。说明同时联合检测多种自身抗体可增加对自身免疫病筛选的阳性率,以免漏诊,适合临床应用。传统固相芯片法配套设备价格昂贵,检测时间长,且只有一种分子处于游离状态可以自由移动,而多重微球液相芯片技术大大降低了成本,检测过程缩短至 3 h,且整个反应在液体中进行更接近生物自然反应状态。

另外可以同时复合免疫分析中提供几种不同的分析,操作人员可以在同一时间同一孔内对一个患者样本做多个自身抗原的检测,为临床提供了一个有效的实验室检测手段。

参考文献

- [1] 何菁,郭嘉隆,李英妮,等. 抗 α -胞衬蛋白多肽 IgA 抗体对干燥综合征的诊断价值[J]. 中华临床免疫和变态反应杂志,2010,4(2):91-96.
- [2] 罗静,李小峰,王彩虹,等. 初步探讨抗 M3 受体抗体在干燥综合征的临床意义[J]. 临床医药实践,2009,18(3):207-209.
- [3] 赵岩,贾宁,魏丽,等. 原发性干燥综合征 2002 年国际分类(诊断)标准的临床验证[J]. 中华风湿病学杂志,2003,7(9):537-540.
- [4] Rouquette AM, Desgruelles C, Iaroché P. Evaluation of the new multiplexed immunoassay, FIDIS, for simultaneous quantitative determination of antinuclear antibodies and comparison with conventional methods[J]. Am J Clin Pathol, 2003, 120(5):676-681.
- [5] Shovman O, Gilburd B, Zandman-Goddard G, et al. Multiplexed AtheNA multi-lyte immunoassay for ANA screening in autoimmune diseases[J]. Autoimmunity, 2005, 38(1):105-109.
- [6] Abreu I, Laroche P, Bastos A, et al. Multiplexed immunoassay for detection of rheumatoid factors by FIDIS TM technology[J]. Ann N Y Acad Sci, 2005, 1050(1):357-363.
- [7] Li W, Zhang N, Gong P, et al. A novel multiplex PCR coupled with Luminex assay for the simultaneous detection of Cryptosporidium spp., Cryptosporidium parvum and Giardia duodenalis[J]. Vet Parasitol, 2010, 173(1-2):11-18.
- [8] Anderson S, Wakeley P, Wibberley G, et al. Development and evaluation of a Luminex multiplex serology assay to detect antibodies to bovine herpes virus 1, parainfluenza 3 virus, bovine viral diarrhoea virus, and bovine respiratory syncytial virus, with comparison to existing ELISA detection methods[J]. J Immunol Methods, 2011, 366(1-2):79-88.
- [9] Vauloup-Fellous C, Gaidot N, Paris L, et al. PX-2 Evaluation of new multiplex assays for the BioPlex™ 2200 (Bio-Rad): preferential Toxoplasma gondii and cytomegalovirus IgM response for recently acquired infections[J]. J Clin Virol, 2009, 46(Suppl 1):548.
- [10] Gerson H, Porter V, Gnanasantharam P, et al. P107 Comparison of Remel Staphaurex Plus@ and Bio-Rad Pastorex Staph Plus@ kits for distinguishing Staphylococcus aureus from other staphylococci[J]. Int J Antimicrob Agents, 2009, 34(Suppl 2):S60-61.

(收稿日期:2016-01-05 修回日期:2016-03-14)