

抗 α -胞衬蛋白多肽抗体 在干燥综合征诊断中的意义

何菁 李晶 栗占国 陈巧林

【摘要】目的 α -胞衬蛋白是干燥综合征(SS)患者涎腺中的一种较特异的自身抗原。本研究利用合成的 α -胞衬蛋白多肽,通过酶联免疫吸附(ELISA)法检测患者血清中 α -胞衬蛋白多肽抗体,以了解该多肽抗体在 SS 诊断中的意义。**方法** ①固相法合成 α -胞衬蛋白多肽;②以 α -胞衬蛋白多肽作为包被抗原,应用 ELISA 分别检测原发性 SS 患者 74 例,继发性 SS 患者 15 例,系统性红斑狼疮(SLE)患者 41 例,类风湿关节炎(RA)患者 44 例和正常人 59 名血清中抗 α -胞衬蛋白多肽抗体。**结果** α -胞衬蛋白多肽抗体在原发性 SS、继发性 SS 的阳性率分别为 73% 和 40%,而在 SLE、RA 及正常人分别为 19.5%、29.5% 和 3.8%。抗 α -胞衬蛋白多肽抗体对原发性 SS 诊断的敏感性为 73%,特异性为 88.7%。 α -胞衬蛋白多肽抗体在原发性 SS 患者中的阳性率(73%)明显高于继发性 SS、SLE、RA 患者及正常人($P < 0.01$)。与正常人相比,SLE 及 RA 患者的 α -胞衬蛋白多肽抗体的阳性率亦明显升高($P < 0.05$),但在 SLE 与 RA 之间差异无显著性($P > 0.05$)。 α -胞衬蛋白多肽抗体可能与 SS 患者的病情程度及预后有关。**结论** ①抗 α -胞衬蛋白多肽抗体对原发性干燥综合征的诊断具有参考意义,是与 SS 的病变过程有关的主要自身抗体之一。② α -胞衬蛋白多肽抗体与 SS 患者的病情严重程度及预后有关。

【关键词】 干燥综合征; α -胞衬蛋白; 印迹法,蛋白质; 酶联免疫吸附法

Significance of antibody against α -fodrin-derived polypeptide in diagnosis of Sjögren's syndrome HE Jing, LI Jing, LI Zhan-guo, CHEN Qiao-lin. Department of Rheumatology and Immunology, People's Hospital, Peking University Medical School, Beijing 100044, China

【Abstract】Objective To investigate the sensitivity and specificity of anti- α -fodrin polypeptide antibody in Sjögren's syndrome (SS) patients. **Methods** Synthesized α -fodrin polypeptide was used as substrate in enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to detect the specific antibody in sera of SS and other rheumatic diseases. **Results** Antibody against α -fodrin polypeptide were detected in 73% of patients with primary SS, 40% of patients with secondary SS, 19.5% of patients with SLE, 29.5% of patients with RA, and 3.8% of normal blood donors. The positive rates of α -fodrin polypeptide antibody in primary and secondary SS (73% and 40%, respectively) were significantly higher than those in SLE, RA and normal controls ($P < 0.05$). The sensitivity of anti- α -fodrin polypeptide antibody was 73% and the specificity was 88.7% in primary SS. The presence of anti- α -fodrin polypeptide antibody was associated with extraglandular manifestations, such as pulmonary fibrosis, cirrhosis of liver, spleen disorder, renal failure and vasculitis. **Conclusion** ① The α -fodrin polypeptide antibody is likely to be a diagnostic marker in primary SS. ② This novel autoantibody is associated with extraglandular manifestations in patients with primary SS. ③ The α -fodrin polypeptide protein may be an autoantigen involved in T and B cell activation leading to immune responses in SS.

【Key words】 Sjögren's syndrome; α -fodrin; Blotting, Western; Enzyme-linked immunosorbent assay

干燥综合征(Sjögren's syndrome, SS)是一种全身性自身免疫性疾病,临床上主要表现为由于外分泌腺分泌减少而引起口干、眼干等症状,并可有多个脏器受累。感染、免疫、遗传和环境等因素与 SS 的

发病有关,但其发病机制尚不清楚。在临床上,尚未发现理想的血清学诊断方法。除临床症状外,主要靠唇腺活检及腮腺造影等有创检查辅助诊断。由于患者的依从性差,常常延误诊断,并丧失最佳的治疗时机。因此,寻找一种敏感性强、特异性高而又简便易行的检测方法,对 SS 的早期诊断及治疗具有重要意义。

基金项目:北京市自然科学基金资助项目(7002023)

作者单位:100044 北京大学人民医院风湿免疫科

1997 年国外首次报道可从 SS 模型-NFS/sld 小鼠唇腺中提取出一种 120 000 的涎腺特异性自身抗原,该抗原物质被鉴定为胞衬蛋白的裂解产物— α -胞衬蛋白(α -Fodrin)^[1]。之后的研究发现, α -胞衬蛋白与 SS 的发病有关^[2,3],其抗体可能是本病的血清学标记之一^[4,5],但是 α -胞衬蛋白核心多肽的抗原性及其在 SS 的临床意义尚缺乏研究,国内外均未见相关报道。我们以 α -胞衬蛋白序列分析的结果为依据^[1],人工合成其核心多肽,建立酶联免疫吸附(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测法,以了解 α -胞衬蛋白多肽抗体在干燥综合征诊断中的意义。

1 资料与方法

1.1 临床资料

1.1.1 SS 患者:89 例,均为 1999 年 5 月至 2003 年 4 月我院的住院患者,根据患者口、眼干燥的主观和/或客观依据、唇腺活检及血清中出现类风湿因子(RF)、抗核抗体(ANA)、抗 SSA/SSB 抗体等,所有患者均符合 1986 年 SS 的圣地亚哥诊断分类标准。女性 85 例,男性 4 例,其中原发性 SS 74 例,继发于类风湿关节炎(RA)的 SS 11 例,继发于系统性红斑狼疮(SLE)者 4 例。平均年龄(54 ± 6)岁,平均病程(7 ± 4)年。

1.1.2 其他类风湿性疾病组:包括 SLE 患者 41 例,平均年龄(31 ± 7)岁,平均病程(5 ± 2)年;RA 患者 44 例,平均年龄(53 ± 10)岁,平均病程(4 ± 6)岁。以上病例全部来自 2000—2002 年在我院的住院患者,符合各自的国际诊断标准,而不符合原发性或继发性 SS 的条件。

1.1.3 正常对照组:59 名,均来自我院血库健康献血者。

1.2 研究方法

1.2.1 α -胞衬蛋白多肽抗原合成:根据胞衬蛋白的一级结构,选择人鼠同源,且具有多个保守及极性氨基酸的一段多肽序列^[6],由赛百盛生物公司(北京)采用固相法人工合成,纯度 >90%。

1.2.2 ELISA 法检测 α -胞衬蛋白多肽抗体:根据常规应用的 ELISA 检测方法, α -胞衬蛋白多肽浓度为 10 μ g/ml 包被 96 孔板,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。以 0.1% PBS-Tw 洗板 6 次,加入正常兔血清稀释液封闭 4 h。血清标本用 PBS 稀释 100 倍后加样,室温孵育 1 h,洗板 6 次后加入 PBS 1:1 000 稀释的辣根过氧化物标记的 IgG 二抗,室温孵育 1 h。洗板后加入

OPD 显色剂显色 20 min,加入 2.5 mol/L 的 H₂SO₄ 终止后测定标本在 450 nm 处的 A 值。每孔同时设空白对照、阳性对照、阴性对照。采用待测标本 A 值 > 正常标本均数 + 2 \times 标准差为阳性域值。

1.2.3 统计学处理:计算抗 α -胞衬蛋白多肽抗体在 SS 的敏感性和特异性。两组结果的相关性通过 χ^2 检验进行比较。

2 结果

2.1 α -胞衬蛋白多肽抗体在不同疾病的阳性率:研究结果显示, α -胞衬蛋白多肽抗体(α -FA)在原发和继发性 SS 的阳性率显著高于 RA、SLE 和正常人, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ (见表 1)。 α -胞衬蛋白多肽抗体在原发性 SS 患者中的阳性率明显高于继发性 SS 患者,但无统计学差异。而 α -胞衬蛋白多肽抗体在 SLE 和 RA 的阳性率显著高于正常人($P < 0.05$)。

表 1 α -胞衬蛋白多肽抗体在不同组别的阳性率

组别	例数	α -胞衬蛋白多肽抗体阳性		P 值*
		例数	%	
原发性 SS 组	74	54	73.0	—
继发性 SS 组	15	6	40.0	<0.05
SLE 组	41	8	19.5	<0.01
RA 组	44	13	29.5	<0.05
正常对照组	59	2	3.8	<0.01

注: * 与原发性 SS 组比较

2.2 抗 α -胞衬蛋白多肽抗体滴度的比较:抗 α -胞衬蛋白多肽抗体在 SS 组、SLE 组、RA 组及正常对照组滴度比较的结果见表 2。由表 2 可见, α -胞衬蛋白多肽抗体在 SS 组的滴度明显高于 SLE 组和正常对照组。但是,与 RA 患者相比, α -胞衬蛋白多肽抗体与 SS 组的滴度差异无显著性。本研究中,2 名正常人的血清与 α -胞衬蛋白反应,但其滴度显著低于 SS 组患者。

表 2 SS SLE RA 及正常人抗 α -胞衬蛋白多肽抗体滴度的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	检测例数	阳性例数	α -胞衬蛋白滴度 A 值	t 值	P 值*
原发 SS 组	74	60	0.29 \pm 0.08	—	—
继发 SS 组	15	6	0.34 \pm 0.09	1.322	0.194
SLE 组	41	8	0.23 \pm 0.09	2.933	0.005
RA 组	44	13	0.28 \pm 0.09	0.761	0.450
正常对照组	59	2	0.17 \pm 0.04	7.415	0.000

注: * 与原发性 SS 组比较

2.3 α -胞衬蛋白多肽抗体与原发性干燥综合征患

者脏器受累的关系:见表 3, α -胞衬蛋白多肽抗体阳性患者的肺间质纤维化、血管炎等脏器受累率高于 α -胞衬蛋白多肽抗体阴性患者,在统计学上差异显著。

表 3 74 例原发性 SS 患者 α -胞衬蛋白多肽 (α -FA) 抗体与脏器受累的关系

项目	α -FA 阳性		α -FA 阴性		P 值
	例数	%	例数	%	
脏器受累例数	27	50	5	20	<0.05
肺间质纤维化	23	43	3	15	<0.05
血管炎	15	28	1	5	<0.05
肾功能不全	5	19	0	0	<0.05
脾功能亢进	6	11	2	10	>0.05

注: P 值为 α -FA 阳性组与阴性组脏器受累的比较

2.4 α -胞衬蛋白多肽抗体与自身抗体在 SS 的敏感性和特异性的比较:见表 4, 显示了 α -胞衬蛋白多肽抗体在原发性 SS 的敏感性和特异性均高于 SSA 抗体、SSB 抗体及 ANA, α -胞衬蛋白多肽抗体的特异性与 SSB 抗体相近;其敏感性高达 73%, 显著高于 SSB 抗体 (18%)。因此, 结合敏感性和特异性, α -胞衬蛋白多肽抗体在原发性 SS 诊断中的意义明显优于 SSB 抗体及其他自身抗体。

表 4 自身抗体在 74 例原发性 SS 的敏感性和特异性

抗体类别	阳性例数	敏感性 %	特异性 %
α -F 多肽抗体	54	73	89
SSA 抗体	38	51	65
SSB 抗体	9	18	85
ANA	27	44	43

另外,我们还观察到, SSA 抗体阴性、SSB 抗体阴性和 ANA 阴性的原发性 SS 患者中 α -胞衬蛋白多肽抗体的阳性率分别为 56%、69% 和 60% (见表 5)。这些结果说明 α -胞衬蛋白多肽抗体的检测对于 SSA 抗体、SSB 抗体及 ANA 阴性的原发性 SS 患者的诊断具有重要意义。

表 5 α -胞衬蛋白多肽抗体 (α -FA) 在抗 SSA SSB 抗体及 ANA 阴性的原发性 SS 患者的阳性率

组别	例数	α -FA 阳性	
		例数	%
SSA 抗体 (-)	36	20	56
SSB 抗体 (-)	65	45	69
ANA (-)	57	34	60

2.5 α -胞衬蛋白多肽抗体与其他实验室指标的关

系:对 α -胞衬蛋白多肽抗体与其他自身抗体及免疫指标参数的分析发现, α -胞衬蛋白多肽抗体阳性患者的 ANA、SSA 抗体、SSB 抗体、RF 阳性率及 IgG、IgA 水平均较 α -胞衬蛋白多肽抗体阴性患者升高, 其中 ANA、SSA 抗体及 SSB 抗体阳性尤为常见, 统计学上有显著意义 (见表 6)。但是, 循环免疫复合物 (CIC)、血沉 (ESR)、白细胞及红细胞水平在两组间差异无显著性。血小板减低的发生率在 α -胞衬蛋白多肽抗体阳性组亦明显增加 ($P < 0.05$)。

表 6 α -胞衬蛋白多肽抗体 (α -FA) 与其他实验室指标的关系

项目	例数	α -FA 阳性		α -FA 阴性		P 值
		例数	%	例数	%	
ANA	49	41	76	8	40	<0.05
SSA 抗体	38	34	69	4	20	<0.05
SSB 抗体	9	8	15	1	5	<0.05
RF	38	27	50	11	55	>0.05
IgG 升高	54	39	72	15	75	>0.05
IgA 升高	34	24	44	10	50	>0.05
CIC 升高	40	24	44	16	80	>0.05
ESR 升高	49	36	67	13	65	>0.05
白细胞降低	25	19	35	6	30	>0.05
红细胞降低	21	16	30	5	20	>0.05
血小板降低	6	6	11	0	0	<0.05

2.6 α -胞衬蛋白多肽抗体与 SS 患者病程的关系: 本研究发现, SS 患者在病程的各个阶段均可出现 α -胞衬蛋白多肽抗体阳性, 该抗体在病程各个阶段的阳性率类似。病程超过 8 年的 8 例患者中 α -胞衬蛋白多肽抗体均为阳性。这一结果提示 α -胞衬蛋白多肽抗体对 SS 的早期诊断以及回顾性诊断均有意义。

3 讨论

由于缺乏敏感性高、特异性强的诊断方法, SS 患者的早期诊断一直是困扰临床医生的难题之一。目前, 国内外多数患者均是经唇腺活检或腮腺造影等创伤性检查而确诊, 此时, 患者往往已发病数年, 或已出现脏器受累, 治疗上比较棘手。因此, SS 的早期诊断, 尤其对不典型 SS 的诊断十分需要一种无创伤且特异性强的实验室辅助检查。本文的研究结果显示, α -胞衬蛋白多肽抗体对原发性干燥综合征诊断的敏感性为 73%, 特异性为 89%。其敏感性和特异性远高于 ANA、SSA 抗体及 SSB 抗体。该抗体在 SS 患者病程的任何阶段均可呈阳性, 提示对

SS 早期诊断及回顾性诊断均有意义。而在 ANA、SSB 抗体及 SSA 抗体阴性的原发性 SS 患者中, α -胞衬蛋白多肽抗体的阳性率分别达 56%、69% 和 60%。这些结果均证明, α -胞衬蛋白多肽抗体是 SS 的一种相对特异的自身抗体, 对 SS 的早期诊断具有重要意义。

最初, Hayashi 等以 Western blot 方法检测 α -胞衬蛋白抗体。结果显示, α -胞衬蛋白抗体的阳性率在原发性 SS 患者中为 95%, 继发性 SS 患者为 50%, 而在 RA、SLE 及正常人群中未检测到 α -胞衬蛋白抗体^[1]。之后, Masataka 等^[7]的研究发现, α -胞衬蛋白抗体在 SS 患者的阳性率为 50% (42/82), 敏感性为 52%, 特异性为 96%。由此可见, 这些研究结果不尽一致, 其原因可能与获取 α -胞衬蛋白的方法、检测手段及 α -胞衬蛋白抗原的纯度不同等有关。本文利用人工合成的 α -胞衬蛋白多肽作为抗原, 以 ELISA 方法检测更敏感、更稳定, 易于临床应用。

α -胞衬蛋白是细胞骨架的主要组成成分, 可参与细胞连接、运动及信号传导等多种正常生理活动^[8,9]。有研究显示, 完整的 α -胞衬蛋白为 240 000, 可在某种环境、酶、细胞因子及病毒, 特别是 EBV 作用下裂解成致病片段, 如钙一依赖蛋白酶 I 裂解 α 、 β 亚单位后将影响分子的四聚体结构, 将内源性胞衬蛋白水解成 120 000 ~ 150 000 的片段^[3]。另外, 转移生长因子 (TGF- β) 可诱导与凋亡同时发生的非 caspases3 依赖的 α -胞衬蛋白裂解^[2]。Inoue 等^[10]发现患者涎腺组织中具有活化的 EBV 裂解循环标记物。患者血清中抗 α -胞衬蛋白抗体的产生与 EBV 的再活化有明显的联系。体外实验显示, EBV 激活的淋巴细胞可将 α -胞衬蛋白裂解成 120 000 的片段。由此可见, α -胞衬蛋白可能是原发性 SS 的主要致病抗原之一, 可在某种刺激下通过介导 T 细胞激活, 活化 B 淋巴细胞, 导致自身抗体的产生, 进而引起 SS 患者的组织损伤及免疫病理

改变^[6]。因此, α -胞衬蛋白多肽可能在 SS 的发病中发挥了重要作用。

参考文献

- Haneji N, Nakamura T, Takio K, et al. Identification of alpha-fodrin as a candidate autoantigen in primary Sjögren's syndrome. *Science*, 1997, 276:604-607.
- Janicke RU, Ng P, Sprengart ML, et al. Caspase-3 is required for alpha-fodrin cleavage but dispensable for cleavage of other death substrates in apoptosis. *J Biol Chem*, 1998, 273:15540-15545.
- Harris AS, Crall DE, Morrow JS. Calmodulin regulates fodrin susceptibility to cleavage by calcium-dependent protease. *J Biol Chem*, 1989, 264:17401-17408.
- Witte T, Matthias T, Arnett FC, et al. IgA and IgG Autoantibodies against A-Fodrin as markers for Sjögren's syndrome. *J Rheumatol*, 2000, 27:2617-2620.
- Haneji N, Nakamura T, Takio K, et al. Identification of alpha-fodrin antibody in Sjögren's syndrome in children. *J Rheumatol*, 2001, 28:860.
- Adams MD, Kelly JM, Gocayne JD, et al. Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. *Science*, 1991, 252:1651-1656.
- Masataka K, Tetsuroh O, Yokoyama O, et al. Autoantibodies to the amino-terminal fragment of alpha-fodrin expressed in glandular epithelial cells in patients with Sjögren's syndrome. *J Immunol*, 2001, 167:5449-5456.
- McMahon AP, Giebelhaus DH, Champion JE, et al. cDNA cloning, sequencing and chromosome mapping of a non-erythroid spectrin, human alpha-Fodrin. *Differentiation*, 1987, 34:68-78.
- Nakano M, Nogami S, Sato S, et al. Interaction of syntaxin with alpha-fodrin, a major component of the submembranous cytoskeleton. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 288:468-475.
- Inoue H, Tsubota K, Ono M, et al. Possible involvement of EBV-mediated alpha-fodrin cleavage for organ-specific autoantigen in Sjögren's syndrome. *J Immunol*, 2001, 166:5801-5809.
- Yanagi K, Ishimaru N, Haneji N, et al. Anti-120-Kd alpha-fodrin immune response with Th1-cytokine profile in the NOD mouse model of Sjögren's syndrome. *Eur J Immunol*, 1998, 28: 3336-3345.

(收稿日期:2002-11-29)

(本文编辑:董海原)