

免疫印迹技术检测多种风湿病多肽抗体的临床价值

张 晓 余步云 汤美安 朱承明

(附属第三医院 内科风湿病组)

提 要 本文对20例系统性红斑狼疮(SLE)、7例干燥综合征(SS)、9例类风湿关节炎(RA)、15例结缔组织病(CTD)及10名正常人用免疫印迹方法(IBT)进行了多肽抗体的检测,结果表明:抗 27.776×10^3 IU、 13.392×10^3 IU的抗体是SLE特征性抗体,而抗 44.64×10^3 IU、 46.624×10^3 IU/ 47.616×10^3 IU的抗体与SS密切相关,同时还提出IBT检测多肽抗体较对流免疫电泳(CIE)敏感,且能测到一些少见的抗体。

关键词 多肽抗体; 风湿病; 免疫印迹

中图分类号 R593

存在于多种风湿病中的多肽抗体与疾病的关系较密切,有些甚至是标记性的,对某些疾病的诊断起重要作用。近年来从分子水平检测细胞核内各种可抽提核抗原(ENA)日渐被重视^[1,2]。我们应用免疫印迹技术(IBT)从分子水平检测和分析多种风湿病中的多肽抗体,并与对流免疫电泳(CIE)相比较,探讨IBT在检测多肽抗体时对风湿病诊断的价值。

材 料 与 方 法

材 料

受检血清61份,包括各种血清——系统性红斑狼疮(SLE)20份、干燥综合症(SS)7份、类风湿关节炎(RA)9份、结缔组织病(CTD)15份和正常对照血清10份。各种风湿病均符合国际公认的诊断标准。印有兔胸腺ENA的硝酸纤维素膜及标准血清由上海仁济医院免疫室提供。

方 法

1. IBT检测ENA抗体 将印有ENA的硝酸纤维素膜切成0.3cm宽的长条,用含10%兔血清的缓冲液封闭,再加1:100倍稀释的待测血清,37℃反应1h,洗涤4次后,加1:1000倍稀释的辣根过氧化物酶标记的

兔抗人IgG抗体,37℃反应1h,同上洗涤5次,再加3,3-二氨基联苯胺底物溶液避光反应5~10min使之显色,2mol/L的硫酸液终止反应。

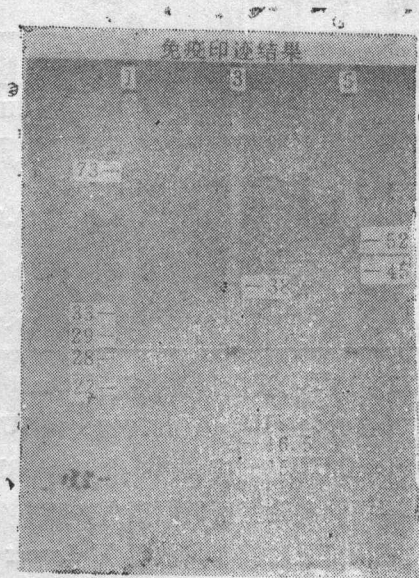
2. CIE法检测ENA抗体 按Kurata和Tan法^[2]。

结 果

IBT检测ENA各种多肽抗体结果

兔胸腺ENA中 27.716×10^3 IU(B)、 28.768×10^3 IU(B')、和 13.392×10^3 IU(D)多肽能与标准及待测血清中的抗Sm抗体反应; 72.416×10^3 IU、 32.736×10^3 IU(A)、 21.824×10^3 IU(C)能与抗RNP抗体反应; 51.584×10^3 IU能与抗SS-A抗体反应; 44.64×10^3 IU、 $46.624 / 47.616 \times 10^3$ IU能与抗SS-B抗体反应; 37.696×10^3 IU、 16.368×10^3 IU和 14.88×10^3 IU能与抗核糖抗体反应。由此可见硝酸纤维素膜上不同分子量位置的多肽具有Sm、RNP、SS-A、SS-B、核糖体(RIB)等的抗原性,可借以检测病人血清中的相应抗体,这种抗原抗体反应具有较高的特异性。详见附图。

IBT检测不同风湿病中ENA抗体的阳性率(见表1)



附图 1 IBT 检测 ENA 各种多肽抗体的结果

1. SLE 病人血清: 可见抗 Sm (27.8, 28.8, 13.4U) 和抗 RNP (72.4, 32.7, 21.8U) 抗体
3. SLE 病人血清: 可见抗 Sm 抗体和抗 RIB (37.7, 16.4, 14.8U) 抗体
5. SLE+SS 病人血清: 可见抗 Sm 抗体和抗 SS-A (51.6U) 和抗 SS-B (44.6U) 抗体

从表 1 结果可见: 抗 $27.776 \times 10^3 \text{IU}$ 、 $13.392 \times 10^3 \text{IU}$ 抗体阳性率在 SLE 中为 45%, 其中 $13.392 \times 10^3 \text{IU}$ 单独出现的阳性率为 0%, 而 $27.776 \times 10^3 \text{IU}$ 单独出现的阳性率为 20%。除 SLE 外, 其它各种风湿病中 $27.776 \times 10^3 \text{IU}$ 、 $13.392 \times 10^3 \text{IU}$ 多肽抗体均阴性, 因此针对 $27.776 \times 10^3 \text{IU}$ 及 $13.392 \times 10^3 \text{IU}$ 多肽的抗体对 SLE 的诊断具有特异性, 尤其是 $27.776 \times 10^3 \text{IU}$ 是不可缺少的。针对 $44.64 \times 10^3 \text{IU}$ 的多肽抗体在 SS 中阳性率为 57.1%, 在 SLE 中为 15%, 它在 SS 与其它各组风湿病中间有显著差别。 $51.584 \times 10^3 \text{IU}$ 多肽抗体在 SS 中阳性率是 57.1%, 在 SLE 中为 20%, 两者之间统计学上无差别。针对 $72.416 \times 10^3 \text{IU}$ 、 $32.736 \times 10^3 \text{IU}$ 和 $21.824 \times 10^3 \text{IU}$ 的抗体在 SLE 中的阳性率为 25%, 与其它各组风湿病之间无差别。

IBT 与 CIE 检测 ENA 抗体阳性率的比较 (见表 2)

从表 2 结果可见, 在 SLE 中 Sm 抗体用 IBT 法测阳性率为 45%, 而 CIE 法为 36.8%;

表 1 IBT 检测不同风湿病 ENA 多肽抗体的阳性率比较 (%)

ENA 抗体	SLE (n=20)	SS (n=7)	RA (n=9)	CTD (n=15)	正常对照 (n=10)
$27.776 \times 10^3 + 13.392 \times 10^3 \text{IU}$	45*	0	0	0	0
单独 $27.776 \times 10^3 \text{IU}$ (或单独 $13.392 \times 10^3 \text{IU}$)	20 (0)	0	0	0	0
$72.416 \times 10^3 \text{IU}$ $32.736 \times 10^3 \text{IU}$ $21.824 \times 10^3 \text{IU}$	25	0	0	6.7	0
$51.584 \times 10^3 \text{IU}$	20	57.1	0	0	0
$44.64 \times 10^3 \text{IU}$ $46.624 \times 10^3 \text{IU} / 47.616 \times 10^3 \text{IU}$	15	57.1*	0	13.3	0
$37.696 \times 10^3 \text{IU}$ $16.368 \times 10^3 \text{IU}$ $14.88 \times 10^3 \text{IU}$	5	0	0	0	0

* 与其它组风湿病比较 ($P < 0.05$); n = 例数

RNP 抗体 IBT 法阳性率为 25%, 而 CIE 法为 5.3%。在 SS 中 SS-A 和 SS-B 抗体 IBT 法阳性率均为 57.1%, 而 CIE 法为 42.9%。但在 SLE 中的抗 SS-A 抗体及在 CTD 中抗

RNP 抗体检测结果, 则 CIE 法的阳性率高于 IBT 法; 在 SLE 我们考虑为实验误差所致, CTD 中认为这些血清中存在着尚未识别的抗体。

表2 IBT 与 CIE 检测抗 ENA 抗体阳性率比较 (%)

抗 ENA 抗体	SLE		SS		RA		CTD	
	IBT	CIE	IBT	CIE	IBT	CIE	IBT	CIE
抗 Sm 抗体	45	36.8	0	0	0	0	0	0
抗 RNP 抗体	25	5.3	0	0	0	0	6.7	26.7
抗 SS-A 抗体	20	26.4	57.1	42.9	0	0	0	0
抗 SS-B 抗体	15	10.5	57.1	42.9	0	0	13.3	13.3

讨 论

80年代起国际上对自身抗核抗体的研究已进入了分子水平,通常采用固相免疫的方法来探测抗体所作用的抗原分子组成及抗原表位^[2]。IBT 是将核抗原不同的多肽成份按分子量大小分离开,再转移到硝酸纤维素膜上,经酶免疫显色方法检测到针对相应多肽分子量的特异性抗体。此法还可测出一些用常用方法难以检测的抗体(抗 RIB 抗体,抗 Jo-1 抗体,抗 SoL-70 抗体和抗 Ku 抗体等)。由于本试验的 ENA 来源于兔胸腺,缺少 59.52×10^3 IU 多肽成份,因而不能检出抗 59.52×10^3 IU 多肽的抗体。

从文献中所知,与 nsRNP 相连的多肽有 11 种以上,包括 69.44×10^3 IU、A、A'、B'/B''、B、C、D、E、F、和 G 等。其中与 B' (27.776×10^3 IU)、B (26.784×10^3 IU) 和 D

(15.872×10^3 IU)反应的抗体是抗 Sm 抗体,而与 67.456×10^3 IU、A(33.728×10^3 IU)和 C (21.824×10^3 IU)反应的抗体是抗 RNP 抗体^[1~4]不同的实验室所得的蛋白多肽的分子量不完全相同(见表 3),故沿用 Lerner 标记的代号表示^[5]。 51.584×10^3 IU 和 44.56×10^3 IU 多肽分别与 Y 族 RNA 和 RNA 聚合酶 I 的转录物相连,针对它们的抗体是抗 SS-A 和抗 SS-B 抗体^[2,6]。本文结论与上述理论完全一致,并再一次证实 Sm 抗体对 SLE 诊断,SS-B 抗体对 SS 的诊断具有高度特异性。我们还在一份 SLE 患者血清中发现抗 37.696×10^3 IU, 16.368×10^3 IU 和 14.88×10^3 IU 的多肽抗体,它属于抗 RIB 抗体。据资料记载该抗体的阳性率在 SLE 中为 5%~12%,并与中枢性狼疮损害或狼疮性肾病密切相关^[7]。由此这种抗体的发现为临床预防及治疗中枢性狼疮或狼疮肾提供了实验依据。

表3 文献中有关 Sm、RNP 抗原多肽的分子量

作 者	具有 Sm、RNP 抗原多肽的分子量 (10^3 IU)							
	A	B	C	D	E	F	G	
Lerner 等								
Hardin 等	67.456	33.728 32.736	26.784 27.776 28.272	21.824	15.872 15.376	11.904	10.912	9.027
Hinterberger 等	67.456	32.736 31.774	28.768 27.776	21.824	15.872	12.896	11.904	10.912
Habets 等	69.44	30.752	24.8	18.848	12.896	10.912	9.92	
陈顺乐等	67.456	31.774	28.768 27.776	17.36	13.392			

据许以华报道^[8]IBT 法检测 ENA 抗体的 敏感性较 CIE 为高,本文用 IBT 检测 ENA

抗体的阳性率虽高于 CIE, 但统计学上无显著差异($P>0.05$), 这可能与检测样本偏小有关。作者认为 IBT 是值得推广的一种特异和敏感的检测 ENA 抗体的方法, 有助于提高对风湿性疾病的诊断水平。

参 考 文 献

1. Hardin JA. The lupus autoantigens and the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1986;29:457
2. Tan EM, et al. Antinuclear antibodies (ANA): diagnostically specific immune markers and clues toward the understanding of systemic autoimmunity. *Clin Immunol Immunopathol* 1988;47:121
3. Conner GE, et al. Protein antigens of the RNA-protein complexes detected by anti-Sm and anti-RNP antibodies found in serum of patients with systemic lupus erythematosus and related disorders. *J Exp Med* 1982; 156:1475
4. Tsay GJ, et al. An immunoassay differentiating sera with antibodies to Sm alone, antibodies to Sm/RNP complex, and antibodies to RNP alone. *Arthritis Rheum* 1987;30:389
5. Lerner Mr, et al. Antibodies to small nuclear RNAs complexed with proteins are produced by patients with systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:5495
6. Chan EKL, Tan EM. The small nuclear ribonucleoprotein in SS-B/La binds RNA with a conserved protease-resistant domain of 28 kilodaltons. *Mol Cell Biol* 1987;7:2588
7. Koffler D, et al. Studies on the specificity and clinical correlation of antiribosomal antibodies in systemic lupus erythematosus sera. *Arthritis Rheum* 1979;22:463
8. 许以华, 等. 免疫印迹技术检测 Sm、RNP 及 SSB 多肽抗体的临床意义. *中华内科杂志* 1990;22(8):472
(1992-04-17收稿 1992-08-12修回)

CLINICAL VALUATION OF DETERMINATING POLYPEPTIDE ANTIBODIES IN VARIOUS RHEUMATOID DISEASES BY IMMUNOBLOTTING TECHNIQUE (IBT)

Zhang Xiao Yu Buyun Tang Meian Zhu Chengming

(The Third Hospital Affiliated to Sun Yat-sen University)

Polypeptide antibodies were determined in 20 cases of SLE, 7 cases of ss, 9 cases of RA, 15 cases of CTD (including MCTD, PSS, UCTD, etc.) and 10 normal persons by IBT. The result showed that antibodies against 27.8, 13.4U antigens were specific antibody of SLE, and those against 44.6, 46.6/47.6U were closely correlated with SS. In addition, this study suggested that IBT was not only more sensitive than CIE in determining polypeptide antibodies, but also could detect certain uncommon ENA polypeptide antibodies,

Key words polypeptide antibody; rheumatoid disease; immunoblotting technique