

间接免疫荧光法与蛋白质免疫印迹试验检测自身免疫性肝炎抗体的效果

张婷

作者单位: 661199 云南红河, 云南省滇南中心医院(红河哈尼族彝族自治州第一人民医院)医学检验科

通信作者: 张婷, Email: ui8441gdb2875@163.com

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2021.01.006

【摘要】 目的 分析采用间接免疫荧光法与蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测自身免疫性肝炎(AIH)抗体的效果。**方法** 选择 2017 年 2 月—2018 年 6 月云南省滇南中心医院(红河哈尼族彝族自治州第一人民医院)收治的 231 例肝炎患者作为研究对象,包括 AIH 组(33 例)、病毒性肝炎组(136 例)、原发性胆汁性肝硬化(PBC)组(59 例)和原发性硬化性胆管炎(PSC)组(3 例);另选择同期 63 名健康体检者作为健康对照组。采用间接免疫荧光法检测 AIH 中抗核抗体(ANA),采用 Western blotting 检测抗线粒体抗体 M2(AMA-M2)、抗肝/肾微粒体抗体 I 型(LKM-1)、抗可溶性肝抗原抗体/肝胰抗原抗体(SLA/LP)、抗平滑肌抗体(ASMA)与抗肝细胞溶质抗原 I 型抗体(LC-1)等。**结果** ANA 在 AIH 组、PBC 组、PSC 组的阳性检出率明显高于病毒性肝炎组和健康对照组[72.73%(24/33)、88.14%(52/59)、66.67%(2/3)比 30.15%(41/136)、6.35%(4/63),均 $P < 0.05$];AIH 组中 LKM-1、LC-1、SLA/LP、ASMA 的阳性率以及 PBC 组中 AMA-M2 的阳性率均明显高于病毒性肝炎组和健康对照组[LKM-1: 15.15%(5/33)比 0.74%(1/136)、0.00%(0/63), LC-1: 9.09%(3/33)比 0.00%(0/136)、0.00%(0/63), SLA/LP: 3.03%(1/33)比 0.00%(0/136)、0.00%(0/63), ASMA: 57.58%(19/33)比 0.74%(1/136)、0.00%(0/63), AMA-M2: 93.22%(55/59)比 4.41%(6/136)、0.00%(0/63),均 $P < 0.05$]。**结论** 临床上针对 AIH 抗体采用间接免疫荧光法联合 Western blotting 检测,具有较高的诊断效率,值得推广应用。

【关键词】 自身免疫性肝炎; 抗体; 蛋白质免疫印迹试验; 间接免疫荧光法

Detection of autoimmune hepatitis antibodies by indirect immunofluorescence and Western blotting

Zhang Ting. Clinical Laboratory, Yunnan Diannan Central Hospital (the First People's Hospital of Honghe Hani Yi Autonomous Prefecture), Honghe 661199, Yunnan, China

Corresponding author: Zhang Ting, Email: ui8441gdb2875@163.com

【Abstract】 Objective To analyze the effect of indirect immunofluorescence and Western blotting in detection of autoimmune hepatitis (AIH) antibodies. **Methods** The patients with hepatitis admitted to Yunnan Diannan Central Hospital (the First People's Hospital of Honghe Hani Yi Autonomous Prefecture) from February 2017 to June 2018 were selected as research objects, including AIH group (33 cases), viral hepatitis group (136 cases), primary biliary cirrhosis (PBC) group (59 cases) and primary sclerosing cholangitis (PSC) group (3 cases). In addition, 63 healthy people in the same period were selected as the healthy control group. The antinuclear antibody (ANA) test was carried out using indirect immunofluorescence, and anti-mitochondrial M2 antibody (AMA-M2), anti-liver/renal microsomal antibody type- I (LKM-1), anti-soluble liver antigen antibody/liver pancreatic antigen antibody (SLA/LP), anti-smooth muscle antibody (ASMA) and anti-hepatocyte solute antigen type I antibodies (LC-1) detection was performed by Western blotting. **Results** The positive rates of ANA in AIH group, PBC group and PSC group were significantly higher than those in viral hepatitis group and healthy control group [72.73% (24/33), 88.14% (52/59), 66.67% (2/3) vs. 30.15% (41/136), 6.35% (4/63), all $P < 0.05$]. The positive rates of LKM-1, LC-1, SLA/LP, ASMA in AIH group and AMA-M2 in PBC group were significantly higher than those in viral hepatitis group and healthy control group [LKM-1: 15.15% (5/33) vs. 0.74% (1/136), 0.00% (0/63), LC-1: 9.09% (3/33) vs. 0.00% (0/136), 0.00% (0/63), SLA/LP: 3.03% (1/33) vs. 0.00% (0/136), 0.00% (0/63), ASMA: 57.58% (19/33) vs. 0.74% (1/136), 0.00% (0/63), AMA-M2: 93.22% (55/59) vs. 4.41% (6/136), 0.00% (0/63), all $P < 0.05$]. **Conclusion** The clinical use of indirect immunofluorescence and Western blotting to detect AIH antibodies has a high diagnostic efficiency and is worthy of popularization.

【Key words】 Autoimmune hepatitis; Antibody; Western blotting; Indirect immunofluorescence

自身免疫性肝炎(autoimmune hepatitis, AIH)是临床常见的一种肝脏炎性病变,以肝实质细胞损害为主要症状^[1],但具体发病原因尚不明确。AIH可分为1型和2型,女性患者多于男性患者。有研究表明,AIH可能与人类白细胞抗原-DR4(human leukocyte antigen-DR4,HLA-DR4)和HLA-DR3等有关,临床特征是高丙种球蛋白血症和一系列自身免疫反应,患者的肝脏汇管区会出现碎屑样坏死^[2-3]。有研究表明,AIH患者血清中可检出一种或多种自身抗体,检测自身抗体对AIH的诊断有重要意义。为做好AIH的防控工作,本院采用间接免疫荧光法联合蛋白质免疫印迹法(Western blotting)检测AIH患者自身抗体,获得了良好成效,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 研究对象与分组 选择2017年2月—2018年6月本院收治的231例肝炎患者作为研究对象,所有患者均接受常规治疗;排除合并肝硬化或肝肿瘤患者、对本次实验不配合患者以及精神障碍和沟通障碍患者^[4-5]。根据不同疾病类型将患者分为病毒性肝炎组(136例)、AIH组(33例)、原发性胆汁性肝硬化(primary biliary cirrhosis, PBC)组(59例)以及原发性硬化性胆管炎(primary sclerosing cholangitis, PSC)组(3例);另选同期63名健康体检者作为健康对照组。

1.2 检测方法

1.2.1 仪器与试剂 EURO Blot MASTER II免疫印迹仪购自欧蒙医学诊断(中国)有限公司,AIH IgG类抗体检测试剂盒以及其他试剂均为德国高规格实验医学临床诊断公司生产的统一规格试剂。

1.2.2 抗核抗体(antinuclear antibody, ANA)检测 采用间接免疫荧光法,选择相同标准检测试剂进行检测,选用的抗原基质为猴肝组织细胞和人喉癌上皮细胞(HEP-2细胞),操作严格按照试剂盒上对于检测项目的执行要求与步骤进行,制片后利用甘油

完全封闭,以防检测结果发生改变。在荧光显微镜下观察,若在组织与细胞内部可见特异性荧光,则判定为阳性^[6]。

1.2.3 抗肝抗原自身抗体检测 采用Western blotting测定抗线粒体抗体(anti-mitochondrial antibody, AMA)、抗线粒体抗体M2(anti-mitochondrial antibody M2, AMA-M2)、抗肝/肾微粒体抗体I型(anti-liver/renal microsomal antibody type-I, LKM-1)、抗可溶性肝抗原抗体/肝胰抗原抗体(anti-soluble liver antigen antibody/liver pancreatic antigen antibody, SLA/LP)、抗平滑肌抗体(anti-smooth muscle antibody, ASMA)与抗肝细胞溶质抗原I型抗体(anti-hepatocyte solute antigen type I antibodies, LC-1)。主要步骤为:将合适的膜条置于印迹检测仪中,将仪器设置为可自动运行的参数标准,并与符合标准的对照条带图进行比较,尤其注意特定观察区条带情况,若可见色带且色带清晰,则判定检测对象为阳性,反之为阴性^[7]。

1.3 伦理学 本研究符合医学伦理学标准,并通过本院伦理审批(审批号:20201012),对受试者的检测均获得过本人或家属的知情同意。

1.4 统计学方法 采用SPSS 22.0统计软件对数据进行处理,符合正态分布的计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 t 检验;计数资料以例(%)表示,采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 采用间接免疫荧光法对各组ANA的检出率比较 AIH组、PBC组、PSC组的ANA阳性率均明显高于病毒性肝炎组和健康对照组(均 $P < 0.05$)。见表1。

2.2 采用Western blotting对各组抗肝抗原自身抗体的检出率比较 在AIH组中,LKM-1、LC-1、SLA/LP和ASMA的阳性率均明显高于病毒性肝炎组和健康对照组,PBC组中AMA-M2的阳性率明显高于病毒性肝炎组和健康对照组(均 $P < 0.05$)。见表2。

表1 间接免疫荧光法对各组ANA的检出率比较

组别	例数 (例)	ANA 检出率 〔%(例)〕	ANA 类型〔%(%)〕					
			核颗粒	均质	细胞质	核仁	核点	核膜
AIH组	33	72.73(24) ^{ab}	12(50.00)	5(20.83)	6(25.00)	1(4.17)	0(0.00)	0(0.00)
PBC组	59	88.14(52) ^{ab}	20(38.46)	4(7.69)	23(44.23)	2(3.85)	2(3.85)	1(1.92)
PSC组	3	66.67(2) ^{ab}	1(50.00)	1(50.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)
病毒性肝炎组	136	30.15(41)	25(60.96)	7(17.07)	9(21.95)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)
健康对照组	63	6.35(4)	3(75.00)	0(0.00)	1(25.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)

注:ANA为抗核抗体,AIH为自身免疫性肝病,PBC为原发性胆汁性肝硬化,PSC为原发性硬化性胆管炎;与病毒性肝炎组比较,^a $P < 0.05$;与健康对照组比较,^b $P < 0.05$

表 2 Western blotting 对各组抗肝抗原自身抗体的检出率比较

组别	例数 (例)	抗肝抗原自身抗体检出率[%(例)]		
		LKM-1	LC-1	SLA/LP
AIH 组	33	15.15(5) ^{ab}	9.09(3) ^{ab}	3.03(1) ^{ab}
PBC 组	59	0.00(0)	0.00(0)	0.00(0)
PSC 组	3	0.00(0)	0.00(0)	0.00(0)
病毒性肝炎组	136	0.74(1)	0.00(0)	0.00(0)
健康对照组	63	0.00(0)	0.00(0)	0.00(0)

组别	例数 (例)	抗肝抗原自身抗体检出率[%(例)]	
		AMA-M2	ASMA
AIH 组	33	0.00(0)	57.58(19) ^{ab}
PBC 组	59	93.22(55) ^b	0.00(0)
PSC 组	3	0.00(0)	0.00(0)
病毒性肝炎组	136	0.00(0)	0.00(0)
健康对照组	63	0.00(0)	0.00(0)

注: Western blotting 为蛋白质免疫印迹试验, AIH 为自身免疫性肝病, PBC 为原发性胆汁性肝硬化, PSC 为原发性硬化性胆管炎, LKM-1 为抗肝/肾微粒体抗体 I 型, LC-1 为抗肝细胞溶质抗原 I 型抗体, SLA/LP 为抗可溶性肝抗原抗体/肝胰抗原抗体, AMA-M2 为抗线粒体抗体 M2, ASMA 为抗平滑肌抗体;与病毒性肝炎组比较, ^a $P < 0.05$;与健康对照组比较, ^b $P < 0.05$

3 讨论

我国作为慢性肝病的高发地区,需要加大防控力度。近几年数据调查显示,虽然病毒性肝炎仍旧占较大比例,但非病毒性肝病的患者数也在不断上升, AIH 就是其中一种^[8-9]。AIH 患者最主要的临床表现为肝脏损伤,还有可能出现和急性肝病与慢性肝病相似的非特异性症状,因此常与病毒性肝炎混淆,易出现误诊和漏诊^[10]。但是这两种疾病的治疗方法截然不同,因此及时辨别诊断并给予针对性治疗对改善患者预后十分重要。AIH 为实质性肝脏病变,多发于青年女性,患者肝小叶周围会逐渐出现碎屑样坏死,肝细胞呈气球样变和水肿变性,肝小胆管在此期间并未发生明显损伤^[11]。而在一段时间后若未能给予有效的干预措施,肝小叶组织就会异常增生,逐渐发展为肝硬化^[12]。老年 AIH 患者常伴有一种或多种肝外自身免疫疾病,如系统性红斑狼疮、类风湿关节炎、干燥综合征等,需引起临床重视^[1]。

AIH 在临床上不具备典型特征,既往由于对 AIH 认识不足以及检测水平限制,常出现漏诊和误诊^[13]。除了食欲减退、乏力、腹胀等临床表现外,医师通常根据患者的多种自身抗体(包括 ASMA、ANA、LC-1、SLA/LP、LKM-1 等)检测结果对 AIH 进行诊断^[14]。其中 ANA 是最常见的一种自身抗体,但并不是特异性诊断指标,ANA 也可能出现在其他自身免疫疾病患者体内。本研究结果显示, AIH 组的 ANA 阳性率达到了 72.73%,核型主要为核颗粒型和细胞质型, PBC 组患者的 ANA 阳性率高达

88.14%,且 AMA-M2 阳性率高达 93.22%。根据自身抗体的不同种类,国际相关组织将 AIH 分为 3 种亚型,其中 I 型 AIH 以 ANA 和 ASMA 阳性为主要特征; II 型 AIH 以 LC-1 和 LKM-1 阳性为主要特征, III 型 AIH 以 SLA/LP 阳性为主要特征^[15]。

由于临床诊断 AIH 存在较多的漏诊和误诊,因此可以采用间接免疫荧光法联合 Western blotting 进行检测,不仅能提高诊断的准确率,还能帮助临床进行疾病分型,具有十分广阔的应用前景。

利益冲突 作者声明不存在利益冲突

参考文献

- 伍玉. 老年人自身免疫性肝病自身抗体谱的检测及临床特征分析[J]. 实用检验医师杂志, 2019, 11 (4): 221-223. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2019.04.009.
- 任忠萍. 自身免疫性肝病相关抗体(IgAGM)的联合检测(间接免疫荧光法)及其临床应用[J]. 科学中国人, 2017, 25 (8X): 78. DOI: CNKI:SUN:KXZG.0.2017-24-065.
- 刘旭. 自身抗体和血清生化指标检测在自身免疫性肝炎诊断及鉴别诊断中的应用价值探讨[J]. 现代诊断与治疗, 2018, 29 (19): 3040-3042. DOI: 10.3969/j.issn.1001-8174.2018.19.009.
- 刘小慧. 自身抗体及肝功能检测在自身免疫性肝病与病毒性肝炎鉴别诊断中的价值[J]. 河南医学研究, 2017, 26 (18): 3382-3383. DOI: 10.3969/j.issn.1004-437X.2017.18.075.
- 葛绍锋, 张忠源, 杨香洪. 抗核抗体和自身免疫抗体谱检测在原发性胆汁性肝硬化诊断中的应用价值[J]. 医疗装备, 2018, 31 (10): 55-56. DOI: 10.3969/j.issn.1002-2376.2018.10.039.
- 戚建峰, 吴翥斐, 施金俏, 等. 抗细胞膜 DNA 抗体在系统性红斑狼疮诊断中的应用价值[J]. 浙江医学, 2017, 39 (21): 1865-1867, 1871. DOI: 10.12056/j.issn.1006-2785.2017.39.21.2017-1602.
- 李娜, 孔宁, 邹和建, 等. 抗双链 DNA 抗体和抗核小体抗体定性检测对系统性红斑狼疮的诊断价值[J]. 中国临床医学, 2018, 25 (1): 70-73. DOI: 10.12025/j.issn.1008-6358.2018.20170355.
- 孙萍, 唐志琴, 穆红. 225 例肝病患者自身抗体检测结果分析[J]. 实用检验医师杂志, 2014, 6 (2): 98-101. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2014.02.009.
- 汪永强, 周振忠, 项明, 等. 肝病相关自身抗体与 Th17、Treg 细胞在自身免疫性肝炎中的临床意义[J]. 中国卫生检验杂志, 2017, 27 (10): 1422-1425.
- 贾自晓. CLIA 法在乙型肝炎患者病毒血清学标志物检验中的应用价值[J]. 检验医学与临床, 2019, 16 (18): 2683-2685. DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2019.18.029.
- 陈卉. 输血前 HBsAg、抗-HCV、抗-HIV、抗梅毒螺旋体抗体筛查的临床意义[J]. 检验医学与临床, 2019, 16 (18): 2723-2725. DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2019.18.045.
- 王晓燕, 李娇, 石启洋, 等. 肝病相关抗体和生化检测指标在自身免疫性肝炎诊断中的意义[J]. 国际检验医学杂志, 2017, 38 (8): 1038-1039, 1042. DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2017.08.010.
- 李吉明, 陈春梅. 化学发光免疫分析技术和酶联免疫吸附试验在乙型肝炎病毒血清学检验中的应用[J/CD]. 世界最新医学信息文摘(连续型电子期刊), 2019, 19 (55): 185-188. DOI: 10.19613/j.cnki.1671-3141.2019.55.125.
- 王国强, 杨少峰, 张晟春, 等. PCR 法和 Elisa 法测定乙型肝炎病毒大蛋白的方法比较[J]. 解放军预防医学杂志, 2019, 37 (12): 170-172, 198.
- 张婷, 段云寿. 特异性自身抗体对自身免疫性疾病的诊断价值[J]. 实用检验医师杂志, 2019, 11 (1): 19-21. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2019.01.006.

(收稿日期: 2020-09-08)

(本文编辑: 邵文)