临床研究 文章编号:0253-3626(2010)03-0421-03

抗中性粒细胞抗体在血栓闭塞性脉管炎中的临床应用

张 伟,赖俊谕,代远斌
(重庆医科大学附属第一医院血管外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探索抗中性粒细胞胞浆抗体(Antineutrophil cytoplasmic antibody, ANCA)及其特异性抗原在血栓闭塞性脉管炎(Thromboangiitis obliterans,TAO)中的表达。方法:TAO 组 23 例,动脉硬化闭塞组(Arteriosclerosis obliterans,ASO)25 例,健康组 25 例。采用间接免疫荧光法(Endirect immunofluorescence,IIF)检测 3 组中 ANCA。用酶联免疫吸附法(Enzyme-linked -immunosorbentassay,ELISA)检测 TAO 组和健康组 ANCA 抗蛋白酶 3(PR3)、髓过氧化物酶(MPO)、人白细胞弹性蛋白酶(HLE)、乳铁蛋白酶(LF)、组织蛋白酶 G(CG)、杀菌/渗透性增高蛋白(BPI)抗体。结果:(1)23 例 TAO 组患者中有 12 例 ANCA 阳性,检测率为 52.2%。25 例 ASO 组患者有 1 例 ANCA 阳性,检测率 4%。健康组未检测出 ANCA 阳性。(2)TAO 组重度患者 ANCA 的临床检出率(66.7%;10/15)及 ANCA 滴度均要高于中度患者(25%;2/8)。(3)12 例 ANCA 阳性血清中有 5 例抗髓过氧化物酶(MPO)抗体为阳性,有 3 例抗乳铁蛋白酶(LF)抗体为阳性,1 例抗人白细胞弹性蛋白酶(HLE)抗体为阳性,1 例抗杀菌/渗透性增高蛋白(BPI)抗体为阳性,抗蛋白酶 3(PR3)抗体,抗组织蛋白酶 G(CG)抗体均为阴性。(4)4 种阳性抗体均发现于严重血栓闭塞性脉管炎患者中。结论:ANCA 的检测率和抗体水平与疾病的严重程度有关,ANCA 的检测对临床血栓闭塞性脉管炎是 1 个有效的血清学检查。

【关键词】抗中性粒细胞浆抗体;血栓闭塞性脉管炎;抗原
【中国图书分类法分类号】R36;R392 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-12-10

Clinical application of antineutrophil cytoplasmic antibodies on thromboangiitis obliterans (buerger's disease)

ZHANG Wei, et al
(*Department of Vascular Surgery, the First Affliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the presence of Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antibodies (ANCA) and their specific antigens in the patients with thromboangiitis obliterans (Buerger's disease, TAO). *Methods*: The TAO group includes 23 patients. The arteriosclerosis obliterans (ASO) group includs 25 pantients and the control group is health group includs 25 volunteers. Serum samples were investigated for ANCA prevalence by indirect immunofluorescent technique in TAO group, ASOgroup and health group. the reactivity to proteinase 3 (PR3), myeloperoxidase (MPO), cathepsin G (CG), bactericidal/permesbility-increasing protein (BPI), elastase (HLE) and lactoferrin (LF) was measured by ELISA in TAO group and health group. *Results*: (1) There are 13 of 23 patients with TAO who are tested ANCA positive by indirect immunofluorescence, the ANCA prevalence is 52.2%. Only one patient is pANCA positive among 25 patients with ASO, the prevalence is 4%, and no ANCA are found in healthy controls. (2) ANCA were predominantly found in group II (66.7%; 12/18) compared to group I (33.3%; 3/9) and the levels of the titre of ANCA in the group II was higher than group I. (3) Only five of 12 ANCA-positive sera reacted with MPO, three of the twelve reacted with LF, one serum is HLE positive and one is BPI positive. No serum reacted with PR3 and CG. (4) Anti-MPO, anti-LF, anti-BPI and anti-HLE autoantibodies were found only in the severe group. *Conclusion*: The prevalence of ANCA and levels of Anti-MPO, anti-LF, anti-BPI and anti-HLE correlated with disease severity. Therefore, detection of ANCA can be a helpful serological test for the diagnosis of thromboangiitis obliterans.

【Key words】Antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA); Thromboangiitis obliterans (buerger's disease, TAO); Antigen

血栓闭塞性脉管炎(Thromboangiitis obliterans,TAO),是一种特发的、非动脉粥样硬化性、节段性、阻塞性血管疾病,主要累及肢体中小动脉和静脉[1]。TAO 的发病机理复杂,各家诊断标准不统一,治疗困难。我们通过实验研究抗中性粒细胞浆抗体(Antineutrophil cytoplasmic antibody,ANCA)及其特异性抗原在 TAO 中的表达,探讨 TAO 诊断、治疗及相关疾病的鉴别诊断;ANCA 阳性率和 TAO 严重程度及临床转归等关系。初步探讨 ANCA 对 TAO 免疫损伤作用机制。

作者介绍:张 伟(1967-),男,讲师,主治医师,硕士,研究方向:普外科、胃肠外科。

1 资料和方法

1.1 临床资料

1.1.1 研究对象和实验分组 TAO 组：23 例 2005 年 12 月～2008 年 3 月在重庆医科大学附属第一院血管外科住院患者，年龄 24～58 岁，平均 39 岁。经 64 排 CT 三维动脉血管成像或 DSA 动脉造影检查，最终经手术或截肢行病理活检诊断为血栓闭塞性脉管炎的患者。根据患者临床症状分为：中度（Ⅱ期 营养障碍期）；重度（Ⅲ期坏疽期）。

动脉硬化闭塞（Arteriosclerosis Obliterans，ASO）组：25 例 2005 年 12 月～2008 年 3 月在重庆医科大学附属第一院血管外科住院患者，具有下肢缺血性肌萎缩，溃疡等典型的临床症状，年龄 51～87 岁，平均 76 岁。经 64 排 CT 三维动脉血管成像或 DSA 动脉造影检查，手术或截肢行病理活检诊断为动脉硬化闭塞症的患者。

健康组（Control）：25 例健康志愿者（为重庆医科大学研究生）。年龄 23～32 岁，平均 26 岁。

1.1.2 试剂和仪器 粒细胞马赛克间接免疫荧光法检测试剂盒及抗粒细胞胞浆抗体谱检测试剂盒（ELISA）（欧蒙（德国）医学实验诊断有限公司），高速离心机 TGL16-C 型，酶联免疫检测仪 DG3022A 型，隔水式电热恒温培养箱 PYX-DHS-40，落射正置荧光显微镜 DMLB 型。

1.1.3 实验方法 采集 TAO 组、ASO 组、健康组肘正中静脉或头静脉血于抗凝管中，3 000 r/min 离心 10 min，提取上清液分装于 EP 管中，放 -80℃冰箱保存，采用间接免疫荧光法（Endirect immunofluorescence，IIF）检测 TAO 组，ASO 组和健康组中 ANCA。用酶联免疫吸附法（Enzyme-linked-immunosorbentassay，ELISA）检测 TAO 组和健康组 ANCA 抗蛋白酶 3（PR3）、髓过氧化物酶（MPO）、人白细胞弹性蛋白酶（HLE）、乳铁蛋白酶（LF）、组织蛋白酶 G（CG）、杀菌/渗透性增高蛋白（BPI）抗体。

1.2 统计学处理

采用 SPSS11.5 统计软件进行统计学分析，计量资料用均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，组间比较采用两独立样本间的 t 检验或方差分析检验，计数资料采用 χ^2 检验和 Fisher 精确概率检验法，$P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

23 例 TAO 组中有 12 例 ANCA 阳性，检测率为 52.2%（12/23）。动脉硬化闭塞组有 1 例 ANCA 阳性，检测率 4%（1/25）。健康组未检测出 ANCA 阳性。TAO 组中 ANCA 的阳性检测率较 ASO 组，健康组均具有显著差异性（$P<0.05$）；ASO 组中 ANCA 的检测率与健康组比较差异性无显著意义（$P>0.05$）。见表 1。

TAO 组中度组检测出的 ANCA 例数为 2 例，检测率为25%（2/9），重度组检测出 ANCA 例数为 10 例，检测率为 66.7%（10/15），TAO 组中度组中 ANCA 的阳性检测率较重度组，具有显著差异性（$P<0.05$）。TAO 组中度组滴度均数（用 log 表示）0.375 ± 0.463，中度组滴度均数 0.869 ± 0.669，TAO 组中度组滴度均数较重度组，差异具有统计学意义（$P<0.05$）。见表 2。

TAO 重度组血清中 anti-MPO、anti-LF、anti-HLE、anti-BPI OD 值较 TAO 中度组明显增高，差异有统计学意义（$P<0.05$）。TAO 重度组血清中 anti-MPO、anti-LF、anti-HLE、anti-BPI OD 值较健康组明显增高，差异有统计学意义（$P<0.05$）。TAO 重度组血清与中度组 anti-PR3、anti-CG OD 值比较，统计学无显著性差异（$P>0.05$）；TAO 重度组血清与健康组的 anti-PR3、anti-CG OD 值比较，差异无统计学意义（$P>0.05$）。见表 3。

3 讨 论

自 1982 年 Davies 首次在免疫复合物型节段坏死性新月体性肾小球肾炎患者中发现 ANCA 以来[2]，其作为自身免疫性抗体，已经成为检测许多自身免疫性疾病和和血管炎患者的一种特异性指标。目前，已有 10 余种中性粒细胞胞浆成分被证实为 ANCA 的靶抗原。不同的抗原抗体系统往往与不同

表 1 ANCA 在 TAO 组，ASO 组和健康组中检测率的比较

组别	例数（n）	ANCA	
		阴性	阳性
TAO 组	23	11(48.8%)	12(52.2%)***
ASO 组	25	24(96%)	1(4%)
健康组	25	25(100%)	0(0%)

与健康组比较 *$P<0.05$，与 ASO 组比较 **$P<0.05$

表 2 TAO 组中度组和重度组检测出的 ANCA 例数及滴度均数比较

组别	例数	ANCA		阴性
		阳性	滴度（$\bar{x} \pm s$）	
中度组	8	6(75%)	2(25%)	0.375 ± 0.463
重度组	15	5(33.3%)	10(66.7%)*	0.869 ± 0.669*

2 组比较，*$P<0.05$

表 3 血栓闭塞性脉管炎中度组,重度组和健康组 ANCA 抗体谱 OD 均值的比较($\bar{x} \pm s$)

组别		PR3	MPO	LF	HLE	CG	BPI
健康组		0.10 ± 0.02	0.11 ± 0.04	0.11 ± 0.03	0.10 ± 0.02	0.10 ± 0.02	0.11 ± 0.03
TAO 组	中度组	0.10 ± 0.03	0.11 ± 0.03	0.11 ± 0.20	0.10 ± 0.03	0.10 ± 0.02	0.10 ± 0.02
	重度组	0.14 ± 0.05	0.31 ± 0.22*,**	0.21 ± 0.12*,**	0.18 ± 0.03*,**	0.13 ± 0.04	0.16 ± 0.06*,**

与健康组比较,$^{*}P<0.05$,与中度组比较,$^{**}P<0.05$

的临床疾病相关。

临床上 ANCA 的检查多见于 ANCA 相关疾病的诊断,而这些疾病又都与免疫有关,而与感染关系不大[3]。主要见于系统性血管炎性疾病,如 Wegener 肉芽肿(WG),结节性多动脉炎、显微镜下多动脉炎、变应性肉芽肿血管炎等[4,5]。ANCA 的检测可作为系统性血管炎的诊断指标及对病情活动进行评定。其他的疾病如系统性硬化症、SLE、类风湿关节炎、急进性肾炎、肺肾病综合征、IgA 肾病、链球菌感染后急性肾小球肾炎、紫癜性肾炎、溃疡性结肠炎以及在肾移植和病毒性肝炎中都有表达[6-8,13]。因此检测 ANCA 对于这些疾病的诊断都有一定的辅助意义。

实验表明 TAO 组和 ASO 组,健康组对比,TAO 中 ANCA 的检测率为 52.2%(12/23),明显高于 ASO 中的 4%(1/25)和健康组的阴性,统计学分析有显著差异性。由此表明临床上 TAO 和 ASO 有时因临床表现相似易于混淆时,ANCA 的检测可以作为两者鉴别诊断的一种有效的方法,两者比较时 ANCA 特异性达 96%。相对健康组,ANCA 在做普查的筛选中有一定意义。TAO 重度组和中度组比较,重度组 ANCA 的检测率为 66.7%(10/15),中度组 ANCA 的检测率为 25%(2/8),重度组 ANCA 的滴度 0.869 ± 0.669,中度组 ANCA 的滴度 0.375 ± 0.463,两者比较重度组 ANCA 的检测率和滴度都明显高于中度组,统计学分析差异有统计学意义。说明 ANCA 可作为临床 TAO 病情转归的 1 个血清学标志。

目前已有 10 余种中性粒细胞胞浆成分被证实为 ANCA 的靶抗原。其中包括:蛋白酶 3(PR3)、髓过氧化物酶(MPO)、人白细胞弹性蛋白酶(HLE)、乳铁蛋白酶(LF)、组织蛋白酶 G、杀菌/渗透性增高蛋白(BPI)、溶酶体、天杀青素、防御素等。不同的抗原抗体系统往往与不同的临床疾病相关。23 例 TAO 病人中发现 12 例 ANCA 阳性,在对 TAO 病人进行 ANCA 抗体谱检测中,并没有发现 PR3 及 CG 阳性病例,而是检验出 MPO 阳性 5 例,LF 阳性 3 例,HLE 阳性 1 例,BPI 阳性 1 例,也比较符合 ANCA 靶抗原和 ANCA 荧光型别的关系,并且抗体滴度阳性患者均为重度组病例。在进行 ANCA 抗体谱重度组和中度组的抗体滴度比较时可以得出:重度组中 MPO、LF、HLE、BPI 滴度明显高于中度组,统计学分析具有显著性差异。而重度组中 PR3,CG 滴度虽然高于中度组,但统计学分析没有显著性差异。从 ANCA 抗体谱定性和定量的实验结果得出,ELISA 的检测对疾病的动态了解有重要帮助。并借此推断出 TAO 损伤机制主要是由 MPO 介导的,通过催化过氧化氢(H_2O_2)和卤素(Cl^-)反应产生次氯酸,在中性粒细胞中发生氧爆炸或产生超氧阴离子,释放氧自由基对血管内皮细胞产生损伤,导致血管炎。

许多学者认为 ANCA 是相关疾病的始发因素。ANCA 的致病机理包括:①ANCA 可直接激活中性粒细胞,使粘附因子表达上调,产生大量超氧阴离子及炎症介质,造成血管的损伤性炎症[9];②ANCA 可激活单核细胞,ANCA-IgG 诱导单核细胞 IL-8 的释放是正常对照的 45 倍,故而认为其在 ANCA 相关疾病中起着重要作用[10];③ANCA 可直接损伤内皮细胞,Kobold 等人用从活动期血管炎患者血清中分离的 IgG 与人脐静脉内皮细胞孵育后,内皮细胞 E 一选择素及 IL-6 表达上调[11],表明内皮细胞被活化;④ANCA 可直接激活 T 淋巴细胞,Eliane 等人的研究表明 ANCA 阳性患者的 T 细胞表达内皮细胞粘附因子增加,并且血管炎患者外周血中 T 淋巴细胞明显活化[12];⑤ANCA 相关疾病的发生与 a 抗胰蛋白酶(al-AT)的缺乏有关:al-AT 是 PR3 蛋白酶的抑制剂,可抑制中性粒细胞的活化,而 al-AT 缺乏时,此种机制受阻,故可造成血管损伤。ANCA 除了作为免疫紊乱的标志,有人提出 ANCA 还可能作为一种遗传标志[13]。

目前在临床上血栓闭塞性脉管炎的诊断仍然是靠临床症状、年龄、性别、吸烟史、CT 等辅助检查,确诊靠病理诊断,还没有有效的临床血清学实验,国内也尚未有血栓闭塞性血管炎的 ANCA 检查的详尽临床报道。我们通过采用间接免疫荧光法 IIF,对中、重度的血栓闭塞性脉管炎作 ANCA 定性及定量测定用 ELISA 测定血栓闭塞性脉管炎患者血清中抗蛋白酶 3(PR3)、髓过氧化物酶(MPO)、人白细胞弹性蛋白酶(HLE)、乳铁蛋白酶(LF)、组织蛋白酶 G、杀菌/渗透性增高蛋白(BPI)抗体,对 TAO 诊断治疗及相关疾病的鉴别诊断,ANCA 阳性率和 TAO 临床活动性和严重程度的关系等方面提供。由此表明实验依据,ANCA 的检测对临床血栓闭塞性脉管炎是一个有效的血清学检查。

参 考 文 献

[1] Buerger L Thromlxmngiitis obliterans:a study of vascular lesions leading to presenile Spontaneous gangrene[J]. Am J Med Sci,1980,135:567-580.

[2] Davies D J,Moron J E,Nill T F,et al. Segmental necrotizing nephritis with antineutrophil antibodey[J] Br Med J,1982,285:606-610.

[3] Falk R T,Nachman P H,Hogan S L,et al. ANCA-glomerulonephritis and vasculitis: a Chapel Hill perspective [J].Semin-Nephol,2000,20(3):233.

[4] Vizjak A, Negode B, Rott T, et al. Antineutrophil cytoplasmic au-

临床研究 文章编号:0253-3626(2010)03-0424-03

Chiari 畸形合并脊髓空洞症后颅窝扩大成形手术方式探讨

张云东[1],谢家洪[3],周 济[1],沈光建[1],任明亮[1],顾小红[2]
(1.第三军医大学大坪医院野战外科研究所神经外科;2.老年科,重庆 400014;3.万州区中西医结合医院,重庆 400042)

【摘 要】目的:探讨扩大重建后颅窝不同大小减压骨窗对治疗 Chiari 畸形合并脊髓空洞症脊髓功能恢复的作用。方法:87 例 Chiari 畸形合并脊髓空洞症病人行枕大池成形术,其中 51 例行后颅窝大骨窗减压与 36 例行后颅窝小骨窗减压手术治疗效果分析,定期随访。结果:术后大骨窗减压 51 例患者中,22(43.1 %)例症状改善明显,10 例症状无明显变化,5 例病情加重;小骨窗减压 36 例患者中,28(77.8 %)例症状改善明显,3 例病情稳定。小骨窗减压术后症状改善明显、远期效果稳定。结论:后颅窝骨窗减压硬脑膜修补术是治疗 Chiari 的有效方法,小骨窗减压具有创伤小、症状改善明显和疗效稳定的优势。

【关键词】Chiari 畸形;脊髓空洞症;后颅窝扩大减压术
【中国图书分类法分类号】R651.1+1 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-07-16

Surgical treatment of Chiari malformation accompanied by syringomyelia

ZHANG Yun-dong, et al
(*Department of Neurosurgery, Daping Hospital Research Institut of Field Surgery, the Third Military Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the different modus operandi of posterior fossa decompression on function recovery of spine cord in patients with Chiari malformation and syringomyelia. *Methods*: Of 87 patients with Chiari malformation and syringomyelia, 51 patients were selected and big craniectomy was performed in all cases. The effects of big craniectomy in 51 patients and mini craniectomy in 36 patients were compared. *Results*: Among the 51 patients, 22 patients (43.1%) improved significanly in their clinical symptoms, 10 cases were stabilized, and 5 cases deteriorated. Among the 36 patients, 28 patients (77.8%) improved significanly in their clinical symptoms, and 3 cases were stabilized. *Conclusion*: Surgical treatment may fully ameliorate the clinical syndromes. Mini craniectomy and expansile reconstruction of posterior fossa is a preferred surgery for the treatment of Chiari Ⅰ malformation.

【Key words】Chiari malformation; Syringomyelia; Posterior fossa decompression

作者介绍:张云东(1968-),男,副教授、副主任医师,博士后,研究方向:颅内、椎管内肿瘤发病机理和临床治疗。
通讯作者:顾小红,女,副教授,E-mail:zhanggxh68@sina.com。
基金项目:第三军医大学大坪医院临床研究项目(编号:2007XG071)。

toantibodies-antigen specificity and associatied diseased[J].Wien Klin Wochenschr,2000,112(15-16):665.

[5] 李桂英.ANCA 的秘密[J].国外医学·泌尿系统分册,2001,21(2):54.

[6] Bartunkova J,Janakova I,Tesar V,et al.The spectrum of disease associated with antineutrophil cytoplasmic antibodies[J].Cas Lek Csk,1995,134(1):18.

[7] Noel L H.ANCA:description and immunopathological role[J].Ann Med Interne(Paris),2000,15(3):178.

[8] Sehultz P R, Diego J M.ANCA and systemic vasculitis;update of assays [J].Semin Arthritis Rheum,2000,29(5):267.

[9] Franssen C F,Huitema M G,Muller kobold A G,et al. Invitro neutrophil activation by antibodies to proteinase 3 and myeloperoxidase from patients with crescentic glomerulonephritis [J].J Am Soc Nephrol,1999,10(7):1506.

[10] Ralston D R,Marsh C B,Lowe M P,et al. Antineutrophil cytoplasmic antibodies induce monocyte IL-8 release: Role of surface proteinase 3 alphal-antilrypsin and FC gamma receptors[J]. Clin Invest,1997,100:1416.

[11] Muller kobold A C,van Wijk R T,Franssen C F M.et al. Invitro up-regulation of E-selection and introduction of Il-6 in endothelial cells by auto antibodies in Wengener's granulomatosis and microscopic polyaniitis [J]. Clin Exp. Rheunatol, 1999,17:433.

[12] Tomer Y, Lider O, Gilburd B, et al. Antinutrophil cytoplasmic antibody-enriched. IgG induces adhedsion of human T lymphocytes to extracellular matrix proteins [J]. Clin Immunol Inmunopathol,1997,83(3):245.

[13] Savige J, Nassis L,Cooper T, et al. ANCA-associated systemic vasculitis after immunization with bacterial proteins[J].Clin Immunol Inmunopathol.2002,20(6):783.

(责任编辑:冉明会)