DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.08.032
第25卷第8期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 8
2003年4月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Apr. 2003

文章编号:1000-5404(2003)08-0727-03

论著

流式细胞术检测98例献血者外周血HLA-B27的临床意义

李 维,府伟灵,王 芳,王蓉感 (第三军医大学附属西南医院检验科,重庆 400038)

提 要:目的 通过对98例献血者外周血HLA-B27的检测,建立并优化测定HLA-B27的流式细胞术,并评价B27在早期辅助临床诊断以强直性脊柱炎为代表的脊柱关节病中的应用价值。方法 分别采用EDTA和肝素钠两种不同的抗凝剂,以及加单抗不同的量(7~30μl)检测2个B27阳性和9个B27阴性个体的全血,采用EDTA抗凝和15μl的单抗剂量检测献血者外周血,探寻流式细胞术检测HLA-B27的最佳实验条件;另以微量淋巴细胞毒实验分别对2例阳性标本和9例阴性标本进行验证。结果 通过微量淋巴细胞毒和流式细胞术两种方法检测98例献血者外周血HLA-B27中2例为阳性,96例为阴性,且EDTA和肝素钠两种不同的抗凝剂,以及加单抗不同的量(7~30μl)对流式细胞术检测HLA-B27无任何影响。结论 优化并建立了一种简便省时、稳定性和重复性皆好的流式细胞仪用于检测HLA-B27的方法;HLA-B27与强直性脊柱炎高度相关,HLA-B27检测已成为临床支持以强直性脊柱炎为首的脊柱关节病的诊断与鉴别诊断的重要依据,具有重要的临床意义。

关键词:HLA-B27;流式细胞术;强直性脊柱炎
中图法分类号:R392.11;R446.62 文献标识码:A

Clinical significance for the detection of HLA-B27 in 98 donors' peripheral blood

LI Wei, FU Wei-ling, WANG Fang, WANG Rong-gan (Department of Clinical Laboratories, Southwest Hospital, Third Military University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To establish and optimize flow cytometry method for the detection of human leukocyte antigen B27 (HLA-B27) and compare it with serological method. Methods A total of 98 samples from blood donors were entered into the study. HLA-B27 was detected with ethylenediaminetetra-aceticacid (EDTA), heparin sodium and different dosages of B27 monoclonal antibody, respectively. Other 30 samples were typed by microlymphocytotoxicity test(serological method). Results Genotyping for HLA-B27 was successfully performed in 98 samples by flow cytometry, containing 2 cases with B27-positive, 96 cases with B27-negative. The types of anticoagulant agents and dosages of monoclonal antibody (7~30 μl) had no remarkable effect on the results. The results of serological method for the detection of 30 samples were consistent with those by flow cytometry method. Conclusion Genotyping for HLA-B27 by flow cytometry is a rapid and accurate technique with high-sensitivity, suitable for clinical application. Detection of HLA-B27, a very important basis for the diagnosis and differential diagnosis of ankylosing spondylitis (AS) and other joint diseases of the vertebral column, is of a remarkable clinical significance.

Key words: HLA-B27; flow cytometry; ankylosing-spondylitis

人类白细胞抗原(Human leucocyte antigen, HLA)是机体内具有高度多态性的抗原系统,它不仅在器官移植、输血、民族调查等领域具有广泛的应用,而且与许多疾病呈密切关联。B27是HLA-B位点上的一个重要的等位基因,实验与研究证实:它与强直性脊柱炎(Ankylosing spondylitis, AS)密切相关,而且这种相关是迄今已知的HLA与疾病的关联中是最强和最典型的。由于二者的强相关性,HLA-B27的检测已成为临床诊断和鉴别诊断AS的重要辅助手段,因此,改进实验条件、提高实验的精确度、杜绝漏检和假阳性的发生率,是实验室为临床提供实验依据的关键。目前检测HLA-B27的主要方法有补体依赖性微量淋巴细胞毒试验、玫瑰花法、ELISA法、流式细胞术、PCR法等,其中以标准的NIH微量细胞毒法最为常用,这种方法尽管其操作简便准确性尚可,但仍受细胞纯度、补体差异、单抗效价及HLA高度多态性的影响,易出现漏诊或假阳性(错判、误判)。我们用流式细胞术对98例献血者HLA-B27进行检测,并探讨了不同抗凝剂,单抗的不同量,流式细胞术与经典的血清学方法的比较,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本来源 98例献血者均来自我血液中心,其中男性61例,女性37例;年龄19~55岁;其血液检查指标均在正常

作者简介:李 维(1971—),女,重庆市人,博士研究生,主管检验师,主要从事基因诊断方面的研究,发表论文7篇。电话:(023)68754000-73105

收稿日期:2002-06-20;修回日期:2002-12-27

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

范围，取上述人员静脉血 1 ml，分别以肝素和 EDTA-Na 抗凝。

1.1.2 试剂 美国 Becton Dickinson 公司 HLA-B27 kit（HLA-B27 FITC/CD3 PE），Cat No. & Kat Nr. 为 340183，Lot ID 为 26370；143；HLA-B27 Calibration Beads（标准），Lot ID 为 26371/141；溶血剂（Lysing solution，lys S），批号为 340183；鞘液为 BD 公司，批号为 342003。

1.1.3 仪器 美国 BD 公司 FACS Calibur 双激光四色分选流式细胞仪。

1.2 方法

1.2.1 标本处理 处理标本前先将 10× lys S 用蒸馏水稀释成 1× lys S，然后用 50 μl 的外周血加 7～30 μl 的单抗，室温反应 15～30 min，加 2 ml 1× lys，室温反应（10±2）min，300× *g* 离心 5 min，弃上清液，以 2 ml PBS 洗涤 2 遍，最后以 1% 的甲醛（PMA）固定 30 min，2～8 ℃保存，上机获取细胞 15 000 个，检测。

1.2.2 检测与结果判断 使用专用 HLA-B27 分析软件进行分析，以 CD3-PE 标记的 T 淋巴细胞设门并检测这群细胞 HLA-B27$^+$ 的平均荧光强度（Sample FL1 Median），与标准物道数值（FL1 Marker）比较，大于或等于此值为阳性，否则为阴性性。

1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 t 检验。

2 结果

2.1 98 例献血者 HLA-B27 检测结果

96 例献血者 HLA-B27 为阴性，其 Sample FL1 Median 的均值为 82.04±6.28，与 FL1 Marker 值 143 相比，具有显著的统计学差异（$P<0.01$）。2 例为阳性，其 Sample FL1 Median 值均大于 FL1 Marker 值（143），分别为 152 和 165，见图 1～6。

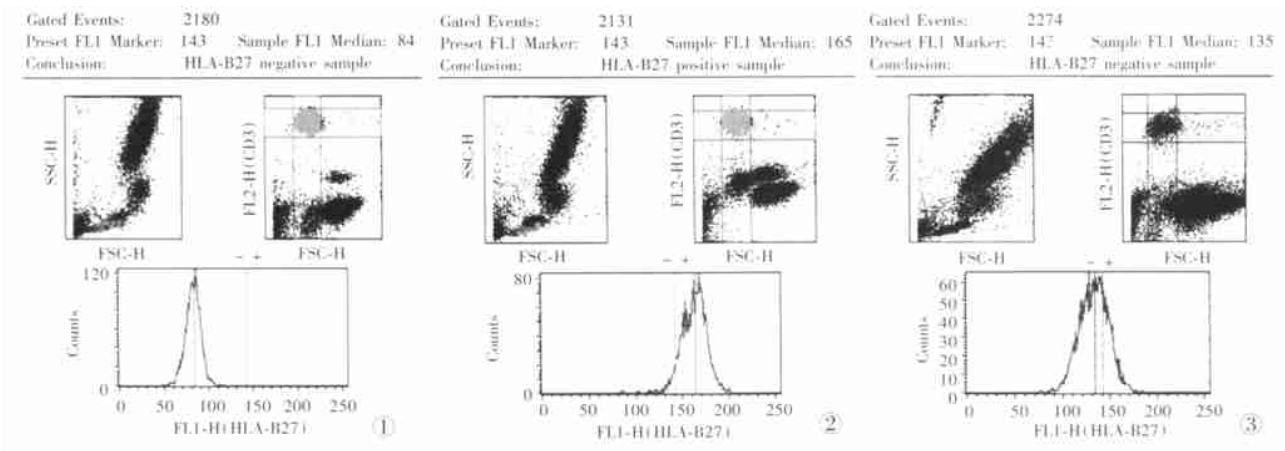


图 1 HLA-B27 阴性结果报告

Fig 1 Report of HLA-B27 negative sample

图 2 HLA-B27 阳性结果报告

Fig 2 Report of HLA-B27 positive sample

图 3 肝素抗凝样本 HLA-B27 结果报告

Fig 3 Report of HLA-B27 sample anti-coagulated with heparin

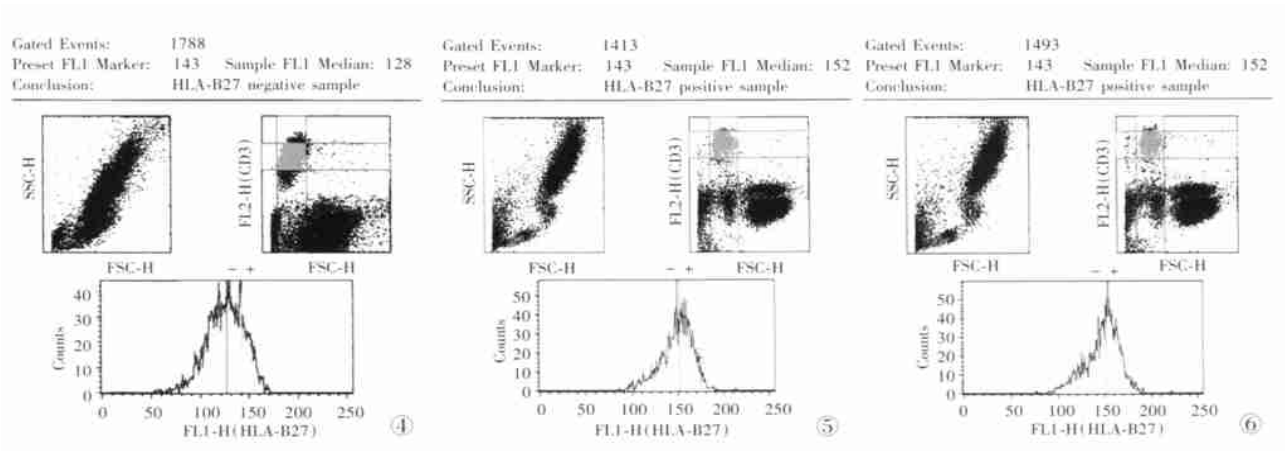


图 4 EDTA 抗凝样本 HLA-B27 结果报告

Fig 4 Report of HLA-B27 sample anti-coagulated with EDTA

图 5 单抗 15 μl 样本 HLA-B27 结果报告

Fig 5 Report of HLA-B27 sample with 15 μl monoclonal antibody

图 6 单抗 30 μl 样本 HLA-B27 结果报告

Fig 6 Report of HLA-B27 sample with 30 μl monoclonal antibody

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3　讨论

HLA-B27 基因是人类MHCⅠ类分子 B 位点上的等位基因, 它位于人第 6 号染色体的短臂上, 由 8 个外显子和 7 个内含子组成, 编码分子量为 43×10^3 的糖蛋白。早在 20 多年前, 人们就已发现 HLA-B27 抗原的表达与强直性脊柱炎有着高度相关性[1~3], 超过 90% 的强直性脊柱炎患者其 HLA-B27 抗原的表达为阳性, 普通人群中仅 5%~10% 的为阳性。除了强直性脊柱炎以外, 还有许多其它疾病与 HLA-B27 抗原的表达有着或多或少的相关性。比如 Reiters 综合征, HLA-B27 阳性率为 70%~90%; 关节炎性银屑病, HLA-B27 阳性率为 50%~60%; 葡萄膜炎(眼色素层炎), HLA-B27 阳性率为 40%~50%; 溃疡性结肠炎伴有关节病, HLA-B27 阳性率为 5%~10% 等, 因此 HLA-B27 的检测在这些疾病的诊断中是一个非常有价值的指标。本实验结果表明 98 例献血者经流式细胞术和微量淋巴细胞毒法两种方法检测 HLA-B27 的结果符合率为 100%。不同抗凝剂对该实验无影响, 2 个 B27 阳性和 9 个阴性个体的全血分别用 EDTA 和肝素钠抗凝, 结果没有发现 2 种抗凝剂对实验结果有何影响。另外, 我们对加单抗的不同量进行了比较, 对 2 个 B27 阳性和 9 个阴性个体分别加 7、10、15、30 μl, 结果显示无影响, 当然我们并不提倡将单抗的量减至最低。虽然 B27 已能被血清学方法很好的检测, 且过去一直认为 B27 只有一种型别, 但是利用单克隆抗体技术或同种异型反应的细胞毒性 T 淋巴细胞或通过等电聚焦电泳分析 B27 分子重链电荷的方法证明 B27 代表至少 22 种以上不同的同种异型基因型(亚型: $B^{*}2701$~$B^{*}2722$)组成的家族[4]。

流式细胞术是根据直接荧光染色的原理, 利用荧光标记的抗 B27 的单克隆抗体和淋巴细胞表面的 B27 抗原结合, 使细胞具有一定的荧光强度, 这种荧光的强度可被流式细胞仪测得的通道值反映。根据通道值的高低判断 B27 抗原阳性或阴性。Kellner 等[5] 将P3X63-Ag8.653 鼠的骨髓瘤细胞和被 B27 阳性细胞免疫过的 CB6F1 鼠的脾细胞采用常规的细胞融合技术获得一个抗 B27 单克隆抗体(FD705), 利用 FD705 根据直接荧光染色的原理建立了一种分型 B27 方法: D705 用亲合层析法提纯, 标记异硫氢酸荧光磺(FD705-FITC)。分别将 EB 病毒转化的 B2701, B2702, B2703, B2704, B2705, B2706, B2707 亚型的 B 淋巴细胞和 FD705-FITC 作用, 流式细胞术结果显示 FD705-FITC 能和 B27 所有的亚型反应。Lee 等[6] 以 CD3 设门检测了 61 例 AS 患者的 HLA-B27, 这些患者包括 AS 和 SPA, 结果显示 HLA-B27 的荧光强度 AS> SPA。

我们对本院风湿中医科及骨科门诊怀疑强直性脊柱炎等脊柱关节病的 80 例临床病例分别以流式细胞术和微量淋巴细胞毒法两种方法检测 HLA-B27, 其结果符合率为 97.5%, 有 2 例流式细胞术检测值临近 Marker 值, 微量淋巴细胞毒法计分结果显示为阴性, 拟以 PCR 法来判定; 另 38 例临床明确符合诊断标准的强直性脊柱炎患者其 HLA-B27 检测均为阳性, 两种方法的符合率为 100%。本实验表明流式细胞术快捷、简便、省时且稳定性和重复性皆好, 当临床根据症状、体征及 X 线检查怀疑为 AS 时, HLA-B27 阳性可作为早期诊断及支持临床的重要指标[7]。

参考文献:

[1] Mcmichel A, Bell J. HLA-B27: a diease-associated immune response gene [J]. Res Immunol, 1991, 142(5-6): 475—482.

[2] Liu Y, Li J, Chen B, *et al*. Familial aggregation ankylosing spondylitis in Southern China[J]. J Rheumatol, 2001, 28(3): 550—554.

[3] 曹孟得, 秦东春, 孙含笑. HLA 分子生物学及临床应用[M]. 郑州: 河南医科大学出版社, 1998.203—215.

[4] Archer J, Keat A C. Ankylosing spondylitis: time to focus on ankylosis[J]. J Rheumatol, 1999, 26(4): 761—764.

[5] Kellner H, Wen J, Wang J, *et al*. Serum antibodies from patients with ankylosing spondylitis and Reiter's syndrome are reactive with HCA-B27 cells transfected with the mycobacterium tuberculosis hsp60 gene[J]. Infect Immun, 1994, 62(2): 484—491.

[6] Lee S, Khare S D, Griffiths M M, *et al*. HLA-B27 transgenic mice are susceptible to collagen-induced arthritis: type Ⅱ collagen as a potential target in human diease[J]. Hum Immunol, 2000, 61(2): 140—147.

[7] 王德启, 王　勋. HLA-B27 与脊柱关节病: 对早期诊断有无价值[J]? 国外医学遗传学分册, 1996, 19(2): 79—81.

(编辑　张大春)

(上接 726 页)

讨论

幼儿支气管异物常见, 而成人支气管异物较少见, 存留达 13 年者更是少见。临床常因肺部并发症而就诊。虽然异物可以自行咳出, 但咳出机会极少, 国外报道为 2.2%, 国内报道在 0.6%~4%[2]。本例患者有较明确的异物吸入史, 且吸入时反应剧烈, 就诊时临床医师对其病史询问不够, 未进行必要的相关检查, 以及 X 线胸片阅读不仔细而导致延误治疗 13 年。故临床医师对有可疑异物吸入的患者应详细询问病史, 及时进行 X 线及纤支镜检查等, 确定异物部位, 及时行异物取出术, 避免因异物长期存留导致局部感染、阻塞性肺炎、肺不张、肺脓肿及大咯血等严重并发症。

关键词: 支气管异物; 误诊; 治疗
中图法分类号: R655.3　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 古秀萍, 段娥英. 支气管异物纤支镜检查及安全性探讨[J]. 中国内镜杂志, 1998, 6(324): 42.

(编辑　薛国文)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net