

系统性红斑狼疮抗 SmD1 抗体与 SmD1 抗原 mRNA 水平的关系

王奔放¹, 陈兴国², 曾庆娣², 王自正²

[摘要] 目的:分析 SmD1 抗原的 mRNA 水平与抗 SmD1 抗体的关系。方法:收集 30 例抗 SmD1 抗体升高的系统性红斑狼疮(SLE)患者、30 例抗 SmD1 抗体正常的 SLE 患者、30 名健康体检者的血标本。用荧光定量 RT-PCR 检测 SLE 组和正常对照组 SmD1 抗原的 mRNA 水平。所得数据应用 SPSS11.5 软件包进行统计分析。结果:抗 SmD1 抗体升高、抗 SmD1 抗体正常的 SLE 患者以及正常对照组中,SmD1 抗原的荧光定量 PCR 结果 $-\Delta\Delta CT$ 分别为 -0.60 ± 2.99 、 -0.04 ± 1.92 和 -0.00 ± 2.80 , 差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论:SmD1 基因的表达在各组中无明显不同,SLE 患者免疫异常,表型特别丰富,几乎涉及整个免疫系统,仅以 SmD1 mRNA 表达异常不可能完全解释免疫系统的紊乱。

[关键词] 红斑狼疮,全身性;抗 SmD1 抗体;荧光定量 PCR

[中国图书资料分类法分类号] R 593.241 **[文献标识码]** A

Relationship between level of anti-SmD1 antibody and the mRNA level of SmD1 antigen in patients with systemic lupus erythematosus

WANG Ben-fang¹, CHEN Xing-guo², ZENG Qing-di², WANG Zi-zheng²

(1. Department of Clinical Laboratory, Jiangyin Hospital Affiliated Medical College of South-East University, Jiangyin Jiangsu 214400; 2. Nanjing Clinical Nuclear Medicine Center, Nanjing Jiangsu 210006, China)

[Abstract] **Objective:** To analyze the relationship between the mRNA level of SmD1 antigen and the level of anti-SmD1 antibody in patients with systemic lupus erythematosus (SLE). **Methods:** The blood samples from 30 SLE patients with high level of anti-SmD1 antibody, 30 cases with normal level of anti-SmD1 antibody and 30 normal controls were collected. The mRNA level of SmD1 antigen was detected by real-time PCR in all the cases. SPSS11.5 was used for statistical analysis. **Results:** In the SLE patients with high level of anti-SmD1 antibody, patients with normal level of anti-SmD1 antibody and the normal controls, $-\Delta\Delta CT$ of real-time PCR was -0.60 ± 2.99 , -0.04 ± 1.92 and -0.00 ± 2.80 , respectively. The difference was not significant ($P > 0.05$). **Conclusions:** The gene expression level of SmD1 has no significant different among the three groups. The immune abnormality in the cases with SLE is almost involved in the whole immune system. It is impossible to explain the disorder of immune system by the abnormality of mRNA level of SmD1 antigen.

[Key words] lupus erythematosus, systemic; anti-SmD1 antibody; Real-time PCR

系统性红斑狼疮(SLE)为典型的自身免疫性疾病,其特点为血清中有抗核抗体等多种自身抗体。其中抗双链 DNA 抗体及 Sm 抗体为该病特异性抗体。除抗核抗体外,还发现有抗其它细胞成分的自身抗体,如抗红细胞抗体、抗血小板抗体、抗神经元抗体、抗淋巴细胞抗体等,还可见类风湿因子、抗磷脂抗体等,自身抗体检测已成为 SLE 实验诊断的主要指标。近年来,抗 SmD1 抗体和抗核小体抗体成为研究热点,并逐步地深入到基因领域。为探讨 SmD1 在 SLE 的发生中所起的作用,我们应用 SYBR Green 实时荧光定量 RT-PCR 检测 SLE 中 SmD1 抗

原的 mRNA 表达,现作报道。

1 资料与方法

1.1 病例选择 所有病例选自 2007 年 12 月至 2009 年 3 月东南大学医学院附属江阴医院门诊及住院患者。SLE 病例均符合 1987 年美国风湿病协会 SLE 分类诊断标准,用 ELISA 定量法测抗 SmD1 抗体,选取抗 SmD1 抗体升高组 30 例,男 3 例,女 27 例;年龄 21~42 岁。抗 SmD1 抗体正常组 30 例,男 3 例,女 27 例;年龄 23~43 岁。对照组为健康体检者 30 名,男 4 名,女 26 名;年龄 23~44 岁。

1.2 主要仪器和试剂 MJ-PTC-200 型 PCR 扩增仪(MJ Research Inc, USA), Light Cycler 荧光定量 PCR 仪(Roche 公司, USA), 低温高速离心机 5417R (Eppendorf 公司, USA), 低速离心机 KDC-40 (科大创新股份有限公司中佳分公司);人淋巴细胞分离

[收稿日期] 2009-07-03

[作者单位] 1. 东南大学附属江阴市人民医院 检验科,江苏 江阴 214400; 2. 江苏省南京临床核医学中心,210006

[作者简介] 王奔放(1969-),女,硕士,副主任技师。

液 Cat# LTS1077(天津市灏洋生物制品科技有限责任公司), Trizol 试剂(Invitrogen 公司), DNase I (RNase Free)(TaKaRa 公司), PrimeScript™ RT reagent Kit Perfect Real Time(TaKaRa 公司), Real-time PCR Master Mix(TOYOBO 公司) sybgreen。所有试剂均购自南京布克生物公司。

1.3 方法 收集3组病例的血液标本,分离出单个核细胞, -80℃冻存,提取 mRNA,进行荧光定量 RT-PCR。Pubmed 上检索 Nucleotide 数据库查到人类 SmD1 mRNA 全长序列,登录号为 BC072427,借助 Primer 5.0 软件设计引物。同向引物:5'-GCT AGG ATG AAG CTC GTG-3',对应的序列:(43)3'-CGA TCC TAC TTC GAG CAC-5'(60),反向引物:5'-GAC ATT ATC GCC TAG GAC C-3',对应的序列:(412)3'-CTG TAA TAG CCG ATC CTG G-5'(394);参照 GAPDH 正向引物:5'-GAA GGT GAA GGT CCG AGT C-3',反向引物:5'-GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC-3'。

1.4 统计学方法 采用方差分析。

2 结果

对照组、SLE 抗 SmD1 抗体升高组和 SLE 抗 SmD1 抗体正常组的 mRNA 表达水平差异均无统计学意义($P > 0.05$)(见表1)。

表1 3组人群 SmD1 抗原的 mRNA 水平比较($\bar{x} \pm s$)

| 分组 | n | ΔCT | $-\Delta \Delta CT$ |
|------------------|----|-------------|---------------------|
| 抗 SmD1 抗体升高组 | 30 | 2.44 ± 2.99 | -0.60 ± 2.99 |
| 抗 SmD1 抗体正常组 | 30 | 1.87 ± 1.92 | -0.04 ± 1.92 |
| 对照组 | 30 | 1.83 ± 2.80 | -0.00 ± 2.80 |
| F | — | 0.51 | 0.00 |
| P | — | >0.05 | >0.05 |
| MS _{组内} | — | 6.822 | 6.822 |

3 讨论

自身免疫性疾病是自身免疫耐受因某些原因遭破坏或终止而引起的自身免疫反应。由于在胚胎期自身反应性细胞克隆已被排除,从而建立了自身耐受,对自身成分不予排斥,但对外源性“非己”成分能发生免疫反应予以清除,此即免疫系统维持机体自身稳定。当这种稳定被包括自身成分分子结构改变、隐蔽抗原的释放、禁忌克隆出现、与自身成分有共同抗原决定簇的外源性抗原进入、机体组织细胞表面 MHC 抗原异常表达等因素打破时,自身免疫

性疾病的发生就成为必然。SLE 是一种自身免疫性疾病,表现为产生一系列直接对应于细胞核、细胞质、细胞膜抗原的自身抗体谱^[1]。除了抗 dsDNA 抗体外,抗 Sm 抗体对 SLE 具有特异性,因此被美国风湿病学会认定为该疾病的一种标志性抗体^[2]。然而,它们在 SLE 患者中的发生率很低,根据使用的血清学检测和患者的种群不同,变化范围为 5% ~ 30%^[3-4]。Sm 抗原是由至少 9 种成分组成的共同核心(common core),即 SmB、SmB'、SmN、SmD1、SmD2、SmD3、SmE、SmF 和 SmG,其中以 SmB/B' 和 SmD 为主要靶位点,而 SmD 中又以 SmD1 为主,目前研究发现 SmD1 的抗原位点主要集中在第 83 ~ 119 氨基酸上。根据公布的 SmD1 序列,Rokeach 等^[5]发现合成最长的 SmD1 肽包含了 83 ~ 119 个氨基酸序列在酶联免疫吸附试验(ELISA)中被大多数 SLE 患者的血清特异性识别。检测 167 例 SLE 患者的抗 SmD1,阳性率 70%,105 名健康人全部为阴性,267 例其他自身免疫性疾病阳性率为 8.3%。证明 SmD1 83 ~ 119 肽为 SLE 自身免疫反应重要和高特异性的靶抗原。并推测此 ELISA 的高度敏感性或许由抗原决定基的构象决定,而不是由全部的 SmD1 蛋白决定^[6]。段京明等^[7]用线性印迹法检测抗 SmD1 抗体敏感性为 84.9%,特异性为 96.0%,抗 SmD1 抗体定量对判断 SLE 病情活动有一定的参考价值。

鉴于 SLE 中抗 SmD1 抗体的高阳性率,为了探讨 SmD1 在 SLE 的发生中所起的作用,本实验通过使用 SYBR Green I 实时荧光定量 RT-PCR 检测 SLE 组和对照组外周血单个核细胞 SmD1 抗原的 mRNA 表达,结果发现,对照组、SLE 抗 SmD1 抗体升高组、SLE 抗 SmD1 抗体正常组 SmD1 的 mRNA 表达水平差异均无统计学意义($P > 0.05$),说明抗 SmD1 抗体的产生并不是由 mRNA 决定,即与 SmD1 抗原的表达量无关,而可能是与抗原的空间结构密切相关,如优势表位的暴露、隐蔽抗原的释放等,因此仅以 SmD1 mRNA 表达异常不可能解释 SLE 免疫系统的紊乱,我们还应该从蛋白质水平对 SmD1 进行深入研究。

[参 考 文 献]

- [1] Von Mühlen C, Tan EM. Autoantibodies in the diagnosis of systemic rheumatic diseases[J]. Semin Arthritis Rheum, 1995, 24(5):323-358.
- [2] Tan EM, Cohen AS, Fries JF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus [J]. Arthritis Rheum, 1982, 25(11):1271-1277.

[文章编号] 1000-2200(2010)11-1143-02

· 检验医学 ·

两种生化分析仪部分生化项目检测结果比较

刘 刚

[摘要] 目的:比较 VITROS 250 干式化学生化分析仪与 HITACHI 7600-020 型全自动生化分析仪部分生化项目检测结果。方法:50 份样本,分别在两台仪器上测定丙氨酸氨基转移酶(ALT)、门冬氨酸氨基转移酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、L-γ-谷氨酰基转移酶(GGT)、总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)、总胆红素(TBIL)、直接胆红素(DBIL),并记录数据。结果:两种分析方法测定 AST、GGT、TP 和 TBIL 的结果差异均无统计学意义($P > 0.05$),且均具有较好相关性;而 ALT、ALP、ALB、DBIL 的测定结果差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论:同一实验室有两台或者两台以上的生化分析仪开展相同的检验项目时,定期对不同分析仪结果之间进行比对和校准,是保证测定结果准确性的必要措施。

[关键词] 血液化学分析;生化分析仪

[中国图书资料分类法分类号] R 446.12 [文献标识码] A

Compar asion of the test results of partial biochemical parameters by two types of chemical analyzer

LIU Gang

(Department of Clinical Laboratory, Bengbu Third People's Hospital, Bengbu Anhui 233000, China)

[Abstract] **Objective:** To compare the test results of partial biochemical items verified by VITROS 250 dry chemical analyzer and HITACHI 7600-200 automatic biochemistry instrument. **Methods:** The parameters including ALT, AST, ALP, GGT, TP, ALB, TBIL and DBIL in fifty samples were analyzed and recorded with these two instruments. **Results:** There was no statistical significance of the results of AST, GGT, TP and TBIL detected by these two analytical methods ($P > 0.05$), and these results had preferable correlation. While there was statistical differences between the results of ALT, ALP, ALB and DBIL with these two analytical methods ($P < 0.05$). **Conclusions:** If there are two or more biochemical analyzers to detect the same testing items, it is necessary to compare and calibrate the different testing results regularly to insure the accuracy of testing results.

[Key words] blood chemical analyzer; biochemical analyzer

同一实验室有两台或者两台以上的生化分析仪开展相同的检验项目时,应定期进行仪器间的比对,特别是一般生化分析仪与干式生化分析仪测定结果的比对。我科原有 HITACHI 7600-020 型全自动生化分析仪及 VITROS 250 型干式化学生化分析仪,由于方法学上的差异和部分项目参考值范围的不统一,临床上对检验数据产生困惑,也给检验科对临床的解释带来一定的难度。为了提高这两种不同类型

生化分析仪间测定结果的可比性,笔者对肝功能常见组合项目进行检测,并对结果进行分析。

1 材料与方法

1.1 标本来源 收集 50 份新鲜、无溶血、无脂浊样本,其中 20 份来自我院 2007 年就诊患者当天血清,30 份来自 2007 年我院职工当天健康体检标本。

1.2 仪器与试剂 HITACHI 7600-020 型全自动生化分析仪(日本),血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、门冬氨酸氨基转移酶(AST)为日本世诺公司产品,总胆红素(TBIL)、直接胆红素(DBIL)试剂为日本

[收稿日期] 2009-09-07

[作者单位] 安徽省蚌埠市第三人民医院 检验科,233000

[作者简介] 刘 刚(1966-),男,副主任医师。

[3] Hiepe F, Kiessig ST, Yamamoto K, et al. Detection of autoantibodies to extractable nuclear antigens in autoimmune diseases of rheumatic origin using immunoblotting comparison with counter-electrophoresis[J]. Z Rheumatol, 1990, 49(5):304-309.

[4] Abuaf N, Johanet C, Chretien P, et al. Detection of autoantibodies to Sm antigen in systemic lupus erythematosus by immunodiffusion, ELISA and immunoblotting: variability of incidence related to assays and ethnic origin of patients[J]. Eur J Clin Invest, 1990, 20(4):354-359.

[5] Rokeach LA, Haselby JA, Hoch SO. Molecular cloning of a cDNA

encoding the human Sm-D autoantigen[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1988, 85(13):4832-4836.

[6] Riemekasten G, Marell J, Trebeljahr G, et al. A novel epitope on the C-terminus of SmD1 is recognized by the majority of sera from patients with systemic lupus erythematosus[J]. J Clin Invest, 1998, 102(4):754-763.

[7] 段京明,李茂胜,李志军,等.抗 SmD1 抗体测定对系统性红斑狼疮的诊断意义[J].蚌埠医学院学报,2006,31(3):255-257.