DOI:10.15972/j.cnki.43-1509/r.2017.02.022

·小专论·

ANCA 相关性疾病及血清学检测进展

阮慧杰[1],许翠萍*

(山西医科大学第一医院消化内科,山西 太原 030001)

摘 要: 抗中性粒细胞胞浆抗体(ANCA)是一组以人中性粒细胞及单核细胞胞浆成分为靶抗原的自身抗体,ANCA 不仅是 ANCA 相关性系统性血管炎的血清学标志物,也在多种非血管炎疾病中起重要作用。ANCA 靶抗原种类繁多,在不同疾病中阳性率分布不同,所累积的器官和程度也不同。因此,本文主要对近年来 ANCA 相关性疾病的临床意义及 ANCA 的血清学检测作一详细阐述。

关键词: 抗中性粒细胞胞浆抗体; 靶抗原; 临床意义; 血清学检测

中图分类号:R574.62 **文献标识码:**A

抗中性粒细胞胞浆抗体是一类以中性粒细胞胞浆成分为靶抗原的自身抗体,通常认为是其中的特异性颗粒和嗜苯胺蓝颗粒。抗中性粒细胞胞浆抗体(anti-neutrophil cytoplastic antibody, ANCA)于 1982 年由 Davis 等在坏死性肾小球肾炎患者血清中发现,目前已作为系统性血管炎(systemic vasculitides,SV)诊疗的重要血清学标志物。医学上将 ANCA 检出率较高的 SV 被称为 ANCA 相关 SV(ANCA relevant systemic vasculitis,AASV),其主要包括韦格纳氏肉芽肿(Wegener's granulomatosis,WG)、变应性肉芽肿血管炎(Allergic Granulomatosis with Polyangiitis,AGPA)、显微镜下多血管炎(micros-Scopic polyangitis,MPA)[1]。随着 ANCA 检测技术的不断发展及各项研究进展,发现 ANCA 与多种非血管炎疾病之间存在密切联系,如炎症性肠病(inflammatorybowel disease,IBD)、系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus,SLE)、类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis,RA)、自身免疫性肝炎(autoimmunehepatitis,AIH)等[2]。临床上通常将上述与 ANCA 有关的诸多疾病统称 ANCA 相关性疾病,随着对 ANCA 相关性疾病的逐渐认知,作为诊断 ANCA 相关性疾病的特异性血清学标志物,ANCA 的临床检测方法也日臻完善,现将相关进展综述。

1 ANCA 靶抗原分类

ANCA 根据间接免疫荧光法(indirect immunofluorescence,IIF)荧光染色形态的不同分为环核型(p-ANCA)和胞浆型(c-ANCA),p-ANCA 多与 IBD、MPA、SLE、RA 等疾病有关,c-ANCA 则多与 WG 等疾病相关。利用酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay,ELISA)对其进行检测则可见其内含有多种抗原成分,以髓过氧化物酶(myeloperoxidase,MPO)和蛋白酶 3(proteinase 3,PR3)为主,还包括乳铁蛋白(lactoferrin,LF)、杀菌渗透性增强蛋白(bacterieidal/permeability -increasing protein,BPI)、溶菌酶、弹性蛋白酶等[3]。p-ANCA 主要识别的靶抗原为 MPO,可在多种疾病中检出,包括 AGPA、IBD、AIH、MPA、SLE 等。c-ANCA 主要识别的靶抗原则为 PR3,c-ANCA 阳性主要见于 WG。

2 ANCA 相关性疾病患者血清 ANCA 检测的临床意义

2.1 ANCA 相关系统性血管炎

2.1.1 韦格纳氏肉芽肿(WG) WG 是一种累及小动、静脉及毛细血管的弥漫性坏死性肉芽肿性炎症[4],主要侵犯上、下呼吸道和肾脏。WG 中 ANCA 的检出敏感性还与其疾病累及范围相关,当 WG 累及到肾、肺等脏器时表现为全身性 WG,其敏感性可高达 90%以上;而当 WG 仅累及到耳、鼻、喉等器官时表现为局限性 WG,其敏感性则仅有 50%[5]。Kinney,等[6]的研究表明,ANCA 阳性同疾病程度有关,ANCA 阳性的 WG 可诱发新月体坏死性肾炎、肺部弥漫性出血,同时还会累及心脏、皮肤、眼等器官。有研究应用 IIF 对 26 例 WG 患者血清 ANCA 进行

收稿日期:2017-01-14;**修回日期:**2017-02-26

* **通讯作者,**E-mail:cuipingxu@hotmail.com.

检测,检出 16 例 ANCA 阳性,阳性率为 62%,其中 15 例为 c-ANCA 型,1 例为 p-ANCA 型,说明 c-ANCA 阳性对 WG 的诊断特异性明显高于 p-ANCA 阳性,使用抗原特异性 ELISA 检测 WG,结果提示 PR3 的阳性率可达 70%~80%,而 MPO 的阳性率仅有不足 10%,可见小血管炎的类型与 ANCA 的亚型之间有一定的关系,并且当 c-ANCA 和抗 PR3 同时阳性时诊断 WG 的特异性可达 99%。ANCA 常在 WG 病变尚未严重影响肾、肺动能及其他器官损伤之前出现,故对 ANCA 的检测,有助于该疾病的早期辅助诊断。

2.1.2 显微镜下多血管炎(MPA) MPA 是一种主要表现为不含肉芽肿性的寡免疫性小血管炎,它主要影响的血管为中、小动脉,偶尔也会影响微动脉及微静脉。该病主要累及肾脏,其中 90%以上患者会出现新月形的肾脏损伤,较少出现肺、眼、鼻、喉等器官的损伤。有研究结果显示 MPA 患者 ANCA 阳性率为 43.3%,全部为 p-ANCA 型,说明 MPA 的主要表现型为 p-ANCA;在 MPA 患者中,使用抗原特异性 ELISA 检测 ANCA 提示 MPO-ANCA 阳性率可占 60%,PR3-ANCA 则占 30%;在 MPA 中 p-ANCA 特异性虽较低,但可联合抗 MPO-ELISA 同时进行检测,从而使 MPA 的诊断特异性提高至 99%[7]。

2.1.3 变应性肉芽肿性血管炎(AGPA) AGPA 是 1951 年由 Churg 和 Strauss 首次描述,是以哮喘、外周血嗜酸性粒细胞增多以及血管外肉芽肿为特征的血管炎,故又将其命名为 Churg-Strauss 综合征(CSS),又称为嗜酸性肉芽肿性血管炎。它是一种主要累及中、小动脉的系统性血管炎,较 WG 与 MPA 少见。该病常出现多器官受累,包括肺、心脏、肝脏、皮肤、肾脏等,其肾脏及肺部的损伤程度较 WG、MPA 轻,而更易发生致死性心力衰竭。MPO-ANCA 与 PR3-ANCA 的阳性率均约为 30%[8]。

2.2 ANCA 相关非血管炎疾病

2.2.1 炎症性肠病(IBD) IBD 是一种病因不明的慢性非特异性肠道炎症性疾病,包括溃疡性结肠炎(ulcerative colitis,UC)和克罗恩病(Crohn's disease,CD),目前其诊断尚缺乏特异性血清标志物。有研究认为 ANCA 是与 IBD 易感性相关的免疫学指标,其中 p-ANCA 与 IBD 的发生关系最为密切,p-ANCA 在 UC 患者中的检出率明显高于 CD 患者,并且在 UC 患者中的特异性、敏感性、阳性率均较高。国外多项研究表明 UC 患者 ANCA 阳性率达 40%~80%,在 CD 患者中的阳性率为 15%~25%,诊断 UC 的特异性和敏感性分别为 98%和 42%[9~10];邱丽,等[11]的研究发现,ANCA 诊断 UC 的灵敏性为 65.9%,特异性为 92.7%。对于 UC 患者 ANCA 水平是否与疾病的严重程度有关,目前尚存在争议。何斌[12]研究认为 ANCA 水平与 UC 严重程度有关,认为 ANCA 阳性的 UC 患者较 ANCA 阴性 UC 患者肠粘膜血管炎的发生率高;杨冬,等[13]研究则表明,ANCA 的表达水平与 UC 的严重程度无关。定性和/或定量检测 IBD 患者血清 ANCA,不仅有助于其诊断及鉴别诊断,同时也可达到监测病情变化、指导临床用药、提示预后情况等作用。

2.2.2 系统性红斑狼疮(SLE) SLE 是一种累及全身多系统的自身免疫性疾病[14],可能是在遗传、感染和环境因素等多种因素的共同相互作用下导致的细胞免疫和体液免疫异常。临床上除了主要表现为面部红斑、紫癜、结节红斑等皮肤受累外,还常有心血管、消化、神经等全身多系统损伤。近年来在 SLE 病患中陆续检测到 ANCA,其中以 p-ANCA 为主,靶抗原主要为乳铁蛋白和组蛋白酶 G。ANCA 在该疾病的诊断中起到重要的作用,但国内外对 SLE 患者中 ANCA 阳性率报道结果不一,国内多个相关研究中 SLE 的 ANCA 阳性率分别为 25%、21.4%、23.5%、24.5%;国外的报道 SLE 的 ANCA 阳性率为 25%~69%。有研究表明 ANCA 阳性可能提示 SLE 患者肾脏的受累,临床上血管炎的存在,从而得出 ANCA 阳性可能与 SLE 的活动性相关的结论,但 ANCA 是否能够成为 SLE 活动性的判断指标,仍需进一步的临床研究进行验证。目前国内针对 ANCA 检测对于 SLE 临床指导意义的相关研究较少,其原因可能是不同靶抗原的 ANCA 在 SLE 中作用及阳性率大不相同,而使用 IIF 法检测 ANCA 无法特异性区分靶抗原,故 ELISA 检测不同靶抗原对 SLE 的诊断是必不可少的。

2.2.3 类风湿性关节炎(RA) RA 是一种全身性自身免疫性疾病,多以手、足小关节的多关节、对称性、侵袭性关节炎为主要表现,还常伴有关节外器官受累[15]。相关研究发现类风湿因子(rheumatoid factor, RF)、抗环瓜氨酸肽抗体(anti-cyclic citrullinated peptide antibody,抗 CCP 抗体)、抗角蛋白抗体(anti-keratin antibody,AKA)、抗聚角蛋白微丝蛋白抗体(anti-filaggrin antibody,AFA)等是 RA 的特异性抗体,可用于 RA 的早期诊断。国内的相关

研究提示 ANCA 可能参与了 RA 的发病机制,可以作为 RA 的早期诊断指标用于临床;RA 组患者 ANCA 阳性率达 73.3%,其中 MPO-ANCA 阳性率 45%,PR3-ANCA 阳性率为 28.3%;在 RA 中,p-ANCA 为主要表现形式,c-ANCA 则比较少见。国外 Spoerl D 等[16] 的研究表明 RA 中 ANCA 阳性率为 16%~52%,还提示 ANCA 在 RA 病情程度的评估中起到一定作用。ANCA 的检测可用于 RA 的早期诊断,尤其同 RF、抗 CCP 抗体、AKA 等抗体联合检测有助于确诊 RA,为其早期治疗提供时机。

2.2.4 自身免疫性肝炎(AIH) AIH 是由自身免疫紊乱导致的一组慢性肝炎综合征,由于其临床表现和自身抗体与 SLE 相似,也被称为“狼疮样肝炎”。尽管自身抗体的检测对 AIH 的诊断有重要意义,但尚缺乏此类特异性自身抗体的相关标志性检查指标。目前 ANCA 虽不能被认为是 AIH 的特异性自身抗体,但已发现 AIH 患者血清中 ANCA 的阳性率较高。朱烨等的研究采用 IIF 及 ELISA 法进行检测,提示 AIH 患者血清中以 p-ANCA 阳性为主,在已知的靶抗原中 BPI 的阳性率最高;Deniziaut ,等[17] 的研究表明 ANCA 在 AIH 患者中的阳性率也较高,达 37%~96%。国外相关研究报道一致认为联合检测 ANCA 及抗核抗体(antinuclear antibody, ANA)等其他自身抗体,不仅有助于 AIH 的早期诊断而且有助于 AIH 的分型。至于 ANCA 是否对 AIH 的预后具有预测价值目前仍存在争议。如能明确 ANCA 的靶抗原,将更有助于 AIH 早期的辅助诊断,使得更多的 AIH 患者得到及时的诊断及治疗。

3 ANCA 实验室检测方法

目前,国内外常用的 ANCA 实验室检测方法有间接免疫荧光法(IIF)、酶联免疫吸附法(ELISA)、免疫印迹法(immunoblotting, IB)、放射免疫法(radioimmunoassav, RIA)、流式细胞术(Flow Cytometry, FCM)、免疫沉淀法(immunoprecipitation, IP)、斑点杂交法(dotblotting)以及近几年发展的磁微粒化学发光法等[18~19]。

经典的 ANCA 实验室检测方法是 IIF,一度被认为是检测 ANCA 的金标准。机理是应用乙醇固定的人中性粒细胞,可区分出两种荧光形态:一种 c-ANCA 的特异性荧光,表现为布满整个细胞浆区域的粗颗粒样荧光,核小叶之间也可见荧光增强;另一种为 p-ANCA 的荧光表现,为围绕核周边的连续丝带样荧光;然而除了 p-ANCA 与 c-ANCA 阳性时可获得典型的荧光图谱以外,当血清中的抗核抗体、抗线粒体抗体、抗核糖体 P 蛋白等自身抗体阳性时也会出现荧光图形而造成假阳性。国内外研究还发现当样本内的靶抗原浓度过低时会导致 IIF 表现为极弱的荧光或阴性,IIF 检测方法为定性检测且主观性较高,容易导致误诊或漏诊。ELISA 是自 80 年代后期开始应用的定量检测 ANCA 的方法,包括总抗原 ELISA 和抗原特异性 ELISA。该方法具有准确区分靶抗原并且定量检测靶抗原水平的优点,从而更有效地指导相关性疾病的诊断与鉴别诊断,并且对疾病的判断疗效、估计复发、指导临床治疗提供帮助。然而抗原特异性 ELISA 只能检测单一的抗原成分,且要依赖于商业化试剂的开发,考虑到检测成本及可行性,该方法具有并非所有 ANCA 靶抗原均能常规检测的缺点。FCM 主要用于细胞内细胞因子和细胞表面黏附分子的检测,故其应用范围受到限制,但其具有准确判断不同细胞亚群的细胞因子和膜分子的表达情况的优点。IP 是一种研究蛋白质间交互作用的生物技术,其优点为蛋白的相互作用是在自然状态下进行的,可以避免人为的影响,缺点是低亲和力的蛋白质—蛋白质相互作用可能检测不到。其他检测方法在平时的临床及实验中应用较少,其优缺点在这里不进行赘述。

基于以上几种 ANCA 实验室检测方法的优点及缺点、考虑检测成本和最优化选择因素,并结合国际 ANCA 检测和报告工作组于 1999 年修订的实验室检测 ANCA 推荐导则,其建议首先采用 IIF 对 ANCA 进行初筛检测,对有阳性结果的血清进一步行特异性 ELISA 检测以确认;还有其他学者提出以 ELISA 为初筛,IIF 为确认检测的建议。故对于临床上高度怀疑 ANCA 相关性疾病的患者,可联合 IIF 和 ELISA 两种方法进行共同检测。

4 结 语

ANCA 长期以来被认为是 AASV 的特异性自身抗体指标,随着 ANCA 检测的普及,越来越多的非血管炎疾病中也可以检测到 ANCA。值得注意的是在 AASV 中,ANCA 的靶抗原以 MPO 和 PR3 为主;而在 ANCA 相关非血管炎中以非典型靶抗原为主。这提醒我们在 ANCA 相关性疾病的鉴别诊断中,需

要注意以下两个方面:一方面注重 IIF 和特异性 ELISA 联合检测 ANCA,可进一步确认在不同疾病中起作用的特异 ANCA 靶抗原;另一方面,目前已知的 ANCA 靶抗原数目有限,在后续研究中应通过各种手段加强对 ANCA 特异性靶抗原的认识。ANCA 的检测对 ANCA 相关性疾病的临床表现、诊断与鉴别诊断、病情活动度、治疗及预后等方面的知识也在不断积累,虽然相关研究大多没有确定性的结论,但可通过今后丰富临床资料的积累以及科学谨慎的实验设计来进一步确证。

综上所述,深入研究 ANCA 靶抗原的表达,对 ANCA 相关性疾病的早期诊断、鉴别诊断、治疗和预后等方面均有极其重要的临床指导意义。

参考文献:

[1] Syed R, Rehman A, Valecha G, et al. Pauci-immune crescentic glomerulonephritis: an aNCA-associated vasculitis [J]. Biomed Res Int, 2015, 2015: 402826.

[2] Csernok E. ANCA testing: the current stage and perspectives [J]. Clin Exp Nephrol, 2013, 17: 615-618.

[3] 赵玲莉. ANCA 检测在非血管炎疾病诊断中的研究进展[J]. 实用检验医师杂志, 2014, 6(2): 1113-1116.

[4] 刘霞, 胡伟新. 抗中性粒细胞胞浆抗体相关性血管炎的临床研究进展[J]. 医学研究生学报, 2016, 29(3): 323-326.

[5] 殷丽. 抗中性粒细胞胞质抗体的实验室检测及临床应用[J]. 山西医药杂志, 2014, 43(13): 1522-1524.

[6] Kinney MA, Jorizzo JL. Small-vessel vasculitis[J]. Dermatol Ther, 2012, 25(2): 148-157.

[7] 蔡少华. 抗中性粒细胞胞浆抗体相关性系统性小血管炎[J]. 中华耳科学杂志, 2009, 7(4): 282-295.

[8] Jayne D, Rasmussen N, Andrassy K, et al. A randomized trial of maintenance therapy for vasculitis associated with antineutrophil cytoplasmic autoantibodies [J]. N Engl J Med, 2003, 349(1): 36-44.

[9] Bahari A, Aarabi M, Hedayati M, et al. Target antigens for perinuclear antineutro-phil cytoplasmic antibodies in Iranian patients with ulcerative colitis[J]. Middle East J Diq Dis, 2014, 6(4): 203-207.

[10] Szigethy E, McLafferty L, Goyal A. Inflammatory bowel disease[J]. Pediatr Clin N Am, 2011, 58(4): 903-920.

[11] 邱丽. 检测核周型抗中性粒细胞胞浆抗体在溃疡性结肠炎中的意义[J]. 浙江临床医学, 2012, (12): 1471-1472.

[12] 何斌, 孔超美, 张振玉, 等. 抗中性粒细胞胞浆抗体对溃疡性结肠炎诊断的意义[J]. 临床荟萃, 2008, 23(10): 746.

[13] 杨冬, 王贞. 炎症性肠病血清相关抗体检测的临床价值[J]. 大连医医科大学学报, 2010, 132(3): 343-347.

[14] 赵凌杰, 张群英, 蔡辉. 抗中性粒细胞胞浆抗体在系统性红斑狼疮中的研究进展[J]. 安徽医学, 2016, 20(5): 821-824.

[15] Handa R. Rheumatoid arthritis--at the cross roads of inflammation and atheroscle- rosis[J]. J Assoc Physicians India, 2013, 61(8): 529.

[16] Spoerl D, Pers YM, Jorgensen C. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in rehum-Atoid arthritis: two case reports and review of literature[J]. Allergy Clin Immunol, 2012, 8: 19.

[17] Deniziaut G, Ballot E, Johanet C. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies (ANC-A) in autoimmune hepatitis and primary sclerosing cholangitis[J]. Clin Res Hepatol Gastroenterol, 2013, 37: 105-107.

[18] Söderberg D, Kurz T, Motamedi A, et al. Increased levels of neutrophil extracellular trap remnants in the circulation of patients with small vesselvasculitis, but an inverse correlation to anti-neutrophil cytoplasmic antibodies during remission [J]. Rheumatology (Oxford), 2015, 54(11): 2085-2094.

[19] Krzeminska E, Wyczalkowska-Tomasik A, Korytowska N, et al. Comparison of two methods for determination of NGAL level in urine: ELISA and CMIA[J]. J Clin Lab Anal, 2016, 30(6): 956-960.

(本文编辑:秦旭平)