

多种自身抗体联合检测在原发性胆汁性肝硬化中的诊断价值

杜慧慧, 李青梅, 周希禛, 刘洋, 王俐琼, 王磊, 张玮 (上海市中医药大学附属龙华医院, 上海 200032)

摘要: **目的** 探讨3种自身抗体(抗-线粒体M2亚型、抗-gp210、抗-Sp100)的联合检测在原发性胆汁性肝硬化中的诊断价值。**方法** 选择2000例隐匿性肝炎患者, 根据疾病诊断分为原发性胆汁性肝硬化(PBC)组129例(6.45%)、自身免疫性肝炎(AIH)组205例(10.25%)、AIH-PBC重叠综合征组15例(0.75%)、脂肪肝病组514例(25.70%)、药物性肝炎组379例(18.96%)、其他不明原因肝炎组758例(37.90%)。选择同期健康者15例作为对照组。采用ELISA法检测2000例隐匿性肝炎患者血清中抗-线粒体M2亚型(AMA-M2)、抗-核包膜蛋白gp210(anti-gp210)、抗-可溶性酸性磷酸化核蛋白Sp100(anti-Sp100), 结合自身免疫性肝病、脂肪性肝病、药物性肝病等疾病的诊断标准进行筛查分析。**结果** PBC组AMA-M2、抗-gp210、抗-Sp100阳性率分别为97.67%(126/129)、41.86%(54/129)、27.91%(36/129), 抗-gp210、抗-Sp100两者同时出现的阳性率为9.30%(12/129)。12例抗-gp210和抗Sp100抗体阳性的不明原因肝炎患者经肝组织活检后有3例诊断为PBC。PBC组有62.80%(81/129)的AMA-M2抗体滴度水平在1:800以上, 有13.95%(18/129)的AMA-M2抗体滴度水平为1:25~100, 有9.30%(12/129)的AMA-M2抗体滴度水平为1:100~200。**结论** AMA-M2阳性仍是诊断PBC的主要诊断指标, AMA-M2、抗-gp210、抗-Sp100的联合检测对PBC的诊断具有较高的应用价值, 对筛查其他自身免疫肝病有较好的辅助作用。

关键词: 肝硬化; 胆汁性; 抗体

Diagnostic value of a variety of autoantibodies detection in patients with primary biliary cirrhosis

DU Hui-hui, LI Qing-mei, ZHOU Xi-zhen, LIU Yang, WANG Li-qiong, WANG Lei, ZHANG Wei (Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of TCM, Shanghai 200032, China)

Abstract: **Objective** To evaluate the diagnostic value of anti-mitochondrial antibodies-M2 subtype, anti-gp210, anti-Sp100 by detecting in patients with primary biliary cirrhosis (PBC). **Methods** Serum samples were detected for AMA-M2, anti-gp210 and anti-Sp100 by immunoblotting assay in 2000 patients with cryptogenic hepatitis, and other 15 healthy

individuals were taken as control group. Patients were diagnosed as PBC (129 cases, 6.45%), AIH (205 cases, 10.25%), AIH-PBC overlap syndrome (15 cases, 0.75%), fatty liver (514 cases, 25.70%), drug-induced hepatitis (379 cases, 18.96%), and other unexplained hepatitis (758 cases, 37.90%). **Results** The positive rates of these three antibodies were 97.67% (126/129), 41.86% (54/129), 27.91% (36/129), respectively. The simultaneous occurrence rate of anti-gp210 and anti-Sp100 was 9.30% (12/129). There were 12 cases with positive anti-gp210 and anti-Sp100 antibody, 3 of whom were diagnosed as PBC through liver puncture. In PBC group, patients with AMA-M2 antibody titer high than 1 : 800 accounted for 62.80% (81/129), while the percents of patients with titers ranged from 1 : 25 to 1 : 100 and from 1 : 100 to 1 : 200 were 13.95% (18/129) and 30% (12/129), respectively. **Conclusions** AMA-M2 antibody is still the main marker for PBC diagnosis. The combined detection of AMA-M2 antibody, anti-gp210, anti-Sp100 in PBC have a higher value and play a good supporting role in screening other autoimmune liver diseases.

Key words: Liver cirrhosis, Biliary; Antibodies

自身免疫性肝病(autoimmune liver disease, ALD)主要包括自身免疫性肝炎(autoimmune hepatitis, AIH)、原发性胆汁性肝硬化(primary biliary cirrhosis, PBC)、原发性硬化性胆管炎(primary sclerosing cholangitis, PSC)以及重叠综合征(overlap syndrome, OS),是一类原因尚未完全明确的慢性自身免疫性疾病。近年来国内对自身免疫性肝病的认识不断提高,有关自身抗体的检测技术也有了迅速的发展。而原发性胆汁性肝硬化也因其发病率的升高以及实验检测技术的发展而受到越来越多的关注。本文针对2000例隐匿性肝炎患者的抗-线粒体M2亚型(anti-mitochondrial antibodies-M2, AMA-M2)、抗-核包膜蛋白gp210(anti-gp210 antibodies, anti-gp210)、抗-可溶性酸性磷酸化核蛋白Sp100(anti-Sp100 antibodies, anti-Sp100)进行检测,结合患者的临床资料对疾病种类进行筛选,以评估3种不同自身抗体的联合检测在PBC诊断中的特征性表达和诊断价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择本院2009年1月至2012年6月门诊、住院诊断为隐匿性肝炎患者2000例,其中男性809例,女性1191例,平均年龄(42.6 ± 14.8)岁。所有患者除外各类病毒性肝炎、其他疾病引

起的肝功能损伤,以及肝内占位性病变和胆管系统疾患,另选15例健康者作为对照组。根据PBC、AIH、AIH-PBC重叠综合征、脂肪肝、药物性肝炎等疾病诊断标准分为PBC组129例(6.45%), AIH组205例(10.25%), AIH-PBC重叠综合征(AIH-PBC OS)组15例(0.75%), 脂肪肝组514例(25.70%), 药物性肝炎组379例(18.96%), 不明原因肝炎组758例(37.90%)。

1.2 诊断标准 PBC的诊断根据2000年美国肝病学会(AASLD)指导建议^[1],即①碱性磷酸酶(ALP)等反映胆汁淤积的生物化学指标升高;②超声或胆管造影检查示胆管正常;③血清抗-线粒体(anti-mitochondrial antibody, AMA)或AMA-M2亚型阳性;④若血清AMA/AMA-M2阴性,则肝脏病理学检查符合PBC的改变。经血清学和超声检查等排除非PBC病变。

AIH诊断根据2010年AASLD更新的AIH诊断和治疗指南^[2]。

AIH-PBC 重叠综合征诊断符合以下条件中的两条或两条以上的即可:① $ALT \geq 5$ ULN(正常上限);② $IgG \geq 2$ ULN;③SMA阳性和(或)ANA滴度 $\geq 1:1000$;④治疗前后肝组织活检提示中至重度汇管区周围炎和(或)小叶性肝炎^[3]。

脂肪肝诊断参照20003年中华医学会肝脏病学分会脂肪肝和酒精病学组的诊断标准^[4]。

药物性肝炎诊断参照2001年Drug Saf中的诊断标准^[5]。

1.3 标本采集 抽取空腹肘静脉血5 ml, 常温静置2小时自然凝固后, 4℃ 3000 r/min离心10分钟, 取上层血清, 分装后-80℃冰箱保存。

1.4 试剂及检测方法 检测AMA-M2、抗-gp210、抗-Sp100等ELISA试剂盒购自上海富苑科芯生物技术股份有限公司。操作方法严格按照说明书进行, 记录各抗体检测结果。

1.5 统计学处理 采用SPSS 16.0统计软件进行数据整理和分析。计数资料采用行×列 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组自身抗体检测结果 PBC组中AMA-M2、抗-gp210、抗-Sp100及后两者同时阳性的检出率比较高, 分别为97.67%、41.86%、27.91%、9.30%, 且PBC组中各抗体检出率与其他各组分别比较, 差异均有显著统计学意义($P < 0.01$)。AMA-M2阴性的3例PBC患者为抗-gp210、抗-Sp100同时阳性的患者经肝组织活检后诊断。此外脂肪肝组、药物性肝炎组中也有几例患者AMA-M2抗体存在阳性表达, 见表1。

2.2 PBC组与非PBC组但AMA-M2阳性的患者其AMA-M2抗体滴度与诊断的相关性分析 PBC组有62.80%

(81/129)的AMA-M2抗体滴度在800以上, 有13.95%(18/129)为25~100, 有9.30%(12/129)为100~200。非PBC组但AMA-M2阳性的患者为26例。回归统计分析显示, AMA-M2抗体滴度和PBC诊断呈线性相关($F = 41.211$, $P < 0.01$), 提示AMA-M2抗体滴度水平越高越可诊断为PBC, 见表2。

2.3 PBC组各期的AMA-M2抗体滴度比较 回归统计分析结果显示AMA-M2抗体滴度与PBC病情严重程度无显著相关性($F = 3.208$, $P = 0.073$)。AMA-M2抗体滴度在800以上的81例PBC患者中, 11例患者处于肝功能异常的无症状期, 有10例处于症状期, 有60例患者处于肝硬化期。抗体滴度在25~800的45例PBC患者有9例处于肝功能异常的无症状期, 有10例处于症状期, 有27例处于肝硬化期, 见表3。

3 讨论

PBC是以肝内细小胆管非化脓性进行性破坏, 伴门脉炎症性改变为主要特征, 并有长期持续性肝内胆汁淤积, 最终导致肝纤维化和肝硬化的慢性进展性自身免疫性肝病^[6]。该病在北欧和北美出现的频率较高, 美国普通人群患病率为15/100 000, 而妇女可高达40/100 000^[7], 近年来该病在我国发病率也明显上升。有关PBC的诊断主要根据病史、临床表现、症状体征及实验室检查结果, 但因该类疾病无特征性症状, 临床诊断比较困难, 容易出现漏诊、误诊。自身抗体检测对疾病的诊断、分型以及鉴别诊断具有重要意义。美国肝脏病研究联合会

表 1 各组患者3种抗体联合检测结果比较[例(%)]

组别	例数	AMA-M2阳性	抗-gp210阳性	抗-Sp100阳性	抗-gp210、抗-Sp100同时阳性
PBC组	129 (6.45)	126 (97.67) ^a	54 (41.86) ^a	36 (27.91) ^a	12 (9.30) ^a
AIH组	205 (10.25)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)
AIH-PBC重叠综合征组	15 (0.75)	11 (73.3)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)
脂肪肝组	514 (25.70)	7 (1.36)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)
药物性肝炎组	379 (18.96)	4 (1.06)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)
不明原因肝炎组	758 (37.90)	4 (0.53)	15 (1.98)	26 (3.43)	9 (1.19)
正常组	15 (100.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)

注: ^a与其他各组分别比较, P 均 < 0.01

表 2 AMA-M2抗体滴度水平与PBC相关性分析[例(%)]

	AMA-M2抗体滴度					
	< 25	25 ~ 100	100 ~ 200	200 ~ 300	300 ~ 800	≥ 800
PBC组 (129例)	3 (2.32)	18 (13.95)	12 (9.30)	9 (6.98) ^a	6 (4.65) ^a	81 (62.80)
非PBC但AMA-M2阳性组 (26例)	0 (0.00)	15 (57.70)	11 (42.30)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)

注: ^a与非PBC但AMA-M2阳性组比较, $P < 0.05$

表 3 129例PBC组各期的AMA-M2抗体滴度比较

	AMA-M2抗体滴度					
	< 25	25 ~ 100	100 ~ 200	200 ~ 300	300 ~ 800	≥ 800
肝功能正常的无症状期（例）	0	0	0	0	0	0
肝功能异常的无症状期（例）	1	4	3	1	1	11
症状期（例）	1	4	2	3	1	10
肝硬化期（例）	1	10	7	5	4	60
总例数比[例（%）]	3（2.32）	18（13.95）	12（9.30）	9（6.98）	6（4.65）	81（62.80）

注：各个分期两两比较，*P*均> 0.05

2009年PBC诊疗指南中AMA存在仍然是确诊 PBC 的标准之一^[8]，但对于AMA阴性的PBC患者，抗核膜抗体gp210、抗核点抗体sp100的检测有助于本病的诊断。本研究PBC组血清中的多种自身抗体进行联合检测，现对PBC中几种自身抗体进行简要概述。

3.1 抗线粒体抗体 1965年，Maokey等^[9]首次在PBC患者的血清中发现AMA，一种无器官特异性也无种属特异性的自身抗体，在近几年的研究中AMA以极其高的敏感性和特异性使其成为人类疾病最重要的诊断指标之一。

AMA分为M1~M9共9个亚型，而只有M2为PBC特异抗体，AMA-M2对PBC检测的敏感性达93%以上，特异性几乎为100%^[10]。尽管有核细胞均含有线粒体自身抗原，但AMA仅对肝胆管线粒体自身抗原进行免疫攻击，影响肝脏胆汁代谢^[11]。此外对无肝脏疾病表现的AMA阳性患者的随访观察显示可在PBC开始出现之前的几年检测到自身抗体的存在^[12]，其具体免疫机制目前尚不清楚。文献报道抗线粒体谱检测对PBC患者临床分期有意义^[13]，但近期也有学者认为AMA与疾病的分期和严重程度关系不大。

在本研究中，AMA-M2的阳性率为97.67%（126/129）与文献报道相符，未发现AMA-M2抗体滴度与疾病严重程度的相关性，PBC患者诊断明确时多数已经进入4期即肝硬化阶段，且此时多数患者AMA-M2阳性抗体滴度较高，但在1期即肝功能正常的无症状阶段，AMA-M2多为正常，可见AMA-M2早期筛查在PBC早期诊断中的重要性。AMA-M2抗体的检测结合临床生化指标可极大地提高PBC的检出率，有助于尽早明确病因，采取相应

治疗，防止疾病进一步发展，特别是对于早期无明显症状及体征表现的患者，对疾病的筛查起到很好的辅助效果。

3.2 抗-核包膜蛋白gp210 1990年，Courvalin等^[14]首次报道了PBC患者血清中呈环型的gp210抗体，其靶抗原为位于核孔复合物上的210 kD跨膜糖蛋白，该自身抗体被一致认为是PBC高度特异性抗体之一。本研究应用ELISA法检测抗-gp210，其诊断PBC的阳性率可达41.86%。抗-gp210可与AMA同时出现在约1/4（10%~40%）的PBC患者中，此外有20%~47% AMA阴性的PBC患者也发现抗-gp210的存在^[15]。有文献^[16]报道抗-gp210的存在与PBC患者的预后具有一定的相关性，且抗体阳性与阴性患者的预后具有显著性差异，阳性患者预后较差，易进展为肝衰竭。PBC患者肝组织活检发现，几乎所有患者的小胆管上皮细胞（BECs）核膜上都有gp210的高表达，而正常肝组织gp210为阴性^[17]。因此抗-gp210可作为一种独立的预后指标，对PBC的进展、预后都有十分重要的意义。

3.3 抗-可溶性酸性磷酸化核蛋白Sp100 AMA是诊断PBC的重要血清学标志，但5%~10%的PBC患者AMA为阴性^[18]，抗-Sp100可在大部分AMA阴性的患者中检测到。抗-Sp100分子量为100 kD，是一种可溶性酸性磷酸化核蛋白。本研究中，PBC组抗-Sp100阳性率为27.91%。有文献^[19]称抗-Sp100与PBC的临床表现密切相关，该抗体阳性的PBC患者出现肝硬化的几率明显增高，血清中胆红素升高，患者病情进展速度快，预后较差，检测抗-Sp100和抗-gp210对缺乏一般临床特征或AMA阴性PBC患者的确诊、病情及预后评估等均具有重要意义。

本研究的2000例隐匿性肝炎患者中,结合3种自身抗体的检测以及临床实验室检查,PBC组、AIH组、AIH-PBC重叠综合征组、脂肪肝组、药物性肝炎组在2000例隐匿性肝炎患者中的检出率分别为6.45%、10.25%、0.75%、25.70%、18.96%,不明原因肝炎组为37.90%。PBC组中AMA-M2的阳性检出率为97.67%,AMA-M2阳性仍是诊断PBC的主要指标,其滴度水平越高,对PBC诊断更具意义($P < 0.01$),但AMA-M2抗体滴度水平与疾病严重程度之间,差异无统计学意义($P > 0.05$)。与其他疾病相比,PBC组AMA-M2、抗-gp210、抗-Sp100阳性率分别为97.67% (126/129)、41.86% (54/129)、27.91% (36/129),其抗-gp210、抗-Sp100同时出现的阳性率为9.30% (12/129),与其他各组比较,差异有显著统计学意义($P < 0.01$)。

需注意的是,本研究中有4例脂肪肝患者、4例药物性肝炎患者的AMA-M2亦为阳性,但其滴度水平相对较低(均低于100),且无明显的PBC症状表现,说明AMA-M2阳性偶见于其他肝脏疾病中,但往往滴度较低,是否与肝细胞损伤引起的免疫异常有关,还是实验误差尚无明确报道,有待进一步探讨。

对PBC组中抗-gp210、抗-Sp100同时阳性的12例患者行肝组织活检,有3例病理学诊断为PBC,提示对于AMA阴性患者来说,抗-gp210、抗-Sp100的联合检测有助于PBC的辅助诊断。由于未对所有病例进行肝组织活检,故其临床诊断PBC价值有待进一步完善和研究。

参考文献

- [1] Muratori P, Muratori L, Ferrari R, et al. Characterization and impact of antinuclear antibodies in primary biliary cirrhosis[J]. *Am J Gastroenterol*,2003,98:431-437.
- [2] Manns MP, Czaja AJ, Gorham JD, et al. Diagnosis and management of autoimmune hepatitis[J]. *Hepatology*,2010,51:2193-2213.
- [3] Joshi S, Cauch-Dudeck K, Wanless IR, et al. Primary biliary cirrhosis additional features of autoimmune hepatitis response to therapy with ursodeoxycholic acid[J]. *Hepatology*,2002,35:409-413.
- [4] 中华医学会肝病学分会脂肪肝和酒精性肝病组. 脂肪性肝病诊断标准[J]. *中华肝脏病杂志*,2003,11:71-72.
- [5] Kaplovitz N. Drug induced liver disorders implication for drug development and regulation[J]. *Drug Saf*,2001,24:483-490.
- [6] Invernizzi P. Update on primary biliary cirrhosis[J]. *Dig Liver Dis*,2010,42:401-408.
- [7] Lazaridis KN, Talwalkar JA. Clinical epidemiology of primary biliary cirrhosis: incidence, prevalence, and impact of therapy[J]. *Clin Gastroenterol*,2007,41:494-500.
- [8] Lindor KD, Gershwin ME, Poupon R, et al. Primary biliary cirrhosis[J]. *Hepatology*,2009,50:291-308.
- [9] Oertelt S, Rieger R, Selmi C, et al. A sensitive bead assay for antimitochondrial antibodies: chipping away at AMA-negative primary biliary cirrhosis[J]. *Hepatology*,2007,45:659-665.
- [10] 杜慧慧, 张玮. 原发性胆汁性肝硬化发病机制[J]. *肝脏*, 2012,17:50-53.
- [11] Vleggaar FP, van Buuren HR. No prognostic significance of antimitochondrial antibody profile testing in primary biliary cirrhosis[J]. *Hepatogastroenterology*,2004,51:937-940.
- [12] Invernizzi P, Lleo A, Podda M. Interpreting serological tests in diagnosing autoimmune liver disease[J]. *Semin Liver Dis*,2007,27:161-172.
- [13] Parés A. Natural history of primary biliary cirrhosis[J]. *Hepatol Res*,2008,38:639-645.
- [14] Courvalin JC, Lassoued K, Bartnik E, et al. The 210-kD nuclear envelope polypeptide recognized by human autoantibodies in primary biliary cirrhosis[J]. *J Clin Invest*,1990,86:279-285.
- [15] Czaja AJ. Autoantibodies as prognostic markers in autoimmune liver disease[J]. *Dig Dis Sci*,2010,55:2144-2161.
- [16] Milkiewicz P, Buwaneswaran H, Coltescu C, et al. Value of autoantibody analysis in the differential diagnosis of chronic cholestatic liver disease[J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*,2009,7:1355-1360.
- [17] Nakamura M, Takii Y, Ito M, et al. Increased expression of nuclear envelope gp210 antigen in small bile ducts in primary biliary cirrhosis[J]. *J Autoimmune*,2006,26:138-145.
- [18] Assassi S, Fritzler MJ, Arnett FC, et al. Primary biliary cirrhosis (PBC), PBC autoantibodies, and hepatic parameter abnormalities in a large population of systemic sclerosis patients[J]. *J Rheumatol*,2009,36:2250-2256.
- [19] 潘盈, 史旭华, 张垣, 等. 原发性胆汁性肝硬化自身抗体特征及其对药物治疗的反应[J]. *中华临床免疫和变态反应杂志*,2009,3:178-183.

收稿日期: 2012-12-21