

· 临床研究 ·

120 例肝功能损伤患者线粒体抗体及其 M2 亚型检测结果分析*

邹麟,肖然,陈瀑

(重庆医科大学附属第一医院检验科 400016)

摘要:目的 检测肝功能损伤患者血清中抗线粒体抗体(AMA)、AMA-M2 水平,探讨肝功能损伤患者抗线粒体抗体、抗线粒体抗体 M2 检测对诊断原发性胆汁性肝硬化(PBC)的重要性。方法 应用酶联免疫法检测丙氨酸氨基转移酶(ALT)高于 70 U/L 的患者血清样本中的 AMA-M2,阳性者同时用免疫印迹法进行 AMA-M2 检测,间接荧光免疫法(IIF)检测 AMA。结果 120 例血清样本中 ELISA 法、免疫印迹法 AMA-M2 阳性 6 例,间接免疫荧光法 AMA 均为阳性。结论 临床上应重视对血清 AMA、AMA-M2 抗体测定,有助于早期 PBC 的诊断。

关键词:肝硬化,胆汁性;抗体;线粒体;肝功能损伤

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.17.007

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)17-1946-03

The analysis of the detection results of antimitochondrial antibody and sub-type M2 in the diagnosis of 120 liver injury patients*

Zou Lin, Xiao Ran, Chen Pu

(Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

Abstract: Objective To analyzed clinical significance of detection of antimitochondrial antibody in patients with liver injury, and emphasize the meaning for detecting antimitochondrial antibody in patients with liver injury. Methods Apply Fluorescence immunity technology(IIF)and antigen specificity ELISA indirectly to detect 120 cases that Alanine amino transferase(ALT)was higher than 70, and prove it using immune imprinting method. Results The results of AMA testing were positive in 7 cases; clinical diagnoses separately are Biliary infections(1 case), Pleural bolt compressibility fractures(1 case), dermatomyositis(1 case), Multiple organ failure(1 case), primary biliary cirrhosis(1 case), primary hypertension(1 case), drug-induced hepatitis(1 case). Conclusion The detection of antimitochondrial antibody is worthy of being popularized, since it's beneficial for diagnosing patients with liver injury.

Key words: liver cirrhosis, biliary; antibodies; mitochondria; liver injury

抗线粒体抗体(AMA)由 Maokey 等于 1958 年首次于原发性胆汁性肝硬化(primary biliary cirrhosis, PBC)患者血清中发现,是一种无器官特异性也无种属特异性的自身抗体。根据靶抗原不同,AMA 可被分为 M1~M9 共 9 个亚型^[1]。PBC 是一种由自身免疫机制导致的慢性进行性胆汁淤积性肝脏疾病,好发于 35~65 岁妇女^[2]。PBC 并无特异性临床症状,多数患者仅表现为不明原因的肝功能异常,病程持续数年至数十年,最后进展为胆汁性肝硬化。目前,诊断依赖于临床表现、病理组织学检查和特异性自身抗体检测。在 PBC 患者中发现 4 种类型的抗线粒体抗体(抗 M2、M4、M8 和 M9 抗体)。AMA-M2 是 PBC 最为灵敏和最为特异的诊断标志,疾病早期即可出现,在 94% PBC 患者血清中检测到 AMA-M2^[3,4]。本研究旨在通过对肝功能损伤患者血清中 AMA 及 AMA-M2 水平回顾性分析,强调检测血清 AMA、AMA-M2 抗体水平,能为临床医生早期鉴别诊断 PBC 提供重要依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2010 年 11 月至 2011 年 2 月于重庆医科大学附属第一医院病毒性肝炎标志物(甲、乙、丙、戊)检测均为阴性,丙氨酸氨基转移酶(ALT)高于 70 U/L 的 120 例住院患者血清进行回顾性分析,收集 20 例 20~60 岁健康体检者(男、女各 10 例)血清作为健康对照血清,进行 AMA、AMA-

M2 检测。

1.2 试剂 欧蒙公司提供自身抗体 IgG 检测试剂盒(间接免疫荧光法)检测线粒体抗体,抗 M2-3E 抗体 ELISA 法、抗核抗体谱(IgG)检测试剂盒(欧蒙印迹法)检测线粒体抗体 M2。

1.3 方法

1.3.1 酶联免疫法 检测线粒体抗体 AMA-M2,按照试剂说明书标准操作程序,分别以 3 份标准血清的浓度(相对单位数)和其吸光度为横、纵坐标(线性/线性)以点对点的方式做标准曲线,并根据标准曲线点对点求出患者血清中抗体浓度,以大于或等于 20 U/mL 为阳性。

1.3.2 欧蒙线性免疫印迹法 检测线粒体抗体 AMA-M2。将高纯度的包括 AMA-M2 等 14 种抗原分别平行包被于检测膜条上,试验时将膜条放置于温育槽中,按照试剂说明书提供标准操作程序,进行孵育、清洗、加入碱性磷酸酶标记第二抗体再孵育,清洗、显色后,运用欧蒙厂家提供 EUROLINESCAN 软件进行扫描分析。

1.3.3 间接免疫荧光法检测线粒体抗体 AMA 采用 HEP-2 细胞和三种组织(猴肝脏、大鼠肾和胃组织)的冰冻切片作为抗原,采用生物薄片马赛克技术将带有细胞和组织的 3 种切片组合成一个反应区。血清稀释度为大于或等于 1:100 为阳性。以上 3 种方法均阳性的 6 例标本结果见表 1。

1.3.4 对 3 种方法测定为阳性的患者肝功能进行比较分析判断血清肝功能异常指标采用重庆医科大学附属第一医院检验科制定的正常值参考范围:ALT 为 0~40 U/L,门冬氨酸氨基转移酶(AST)为 0~40 U/L, γ -谷氨酰基转移酶(γ -GT)为 0~40 U/L,碱性磷酸酶(ALP)为 40~150 U/L。

2 结 果

2.1 20 例健康体检者血清用上述试剂检测 AMA-M2 抗体水平分布在 0.2~15.9 U/mL 范围内,均值为 3.9 U/mL (SD=±3.2 U/mL),间接免疫荧光法,印迹法结果均为阴性。ALT 高于 70 U/L 的 120 例血清样本中 AMA 阳性样本 6 例,间接免疫荧光法检测滴度在 1:100~1:10 000,AMA-M2 抗体浓度在 23.1~400.7,印迹法 M2 抗体检测,阳性程度在 +~++++ 之间,结果见表 1。

2.2 6 例 AMA-M2 阳性患者均有不同程度的 ALT、 γ -GT 升高,5 例患者 AST 升高,5 例患者 ALP 升高,结果见表 2。

表 1 AMA、AMA-M2 检测结果

编号	AMA-M2 抗体浓度(RU/mL)	AMA-M2 (线性免疫印迹法)	AMA (IIF 法)
1	30.3	阳性 2+	阳性 1:100
2	400.7	阳性 4+	阳性 1:32 000
3	31.99	阳性 2+	阳性 1:320
4	85.73	阳性 3+	阳性 1:320
5	27.9	阳性 1+	阳性 1:100
6	263.45	阳性 4+	阳性 1:10 000

表 2 AMA、AMA-M2 阳性患者肝功能指标情况

编号	诊断	性别	年龄(岁)	ALT(U/L)	AST(U/L)	ALP(U/L)	γ -GT(U/L)
1	胆道感染	女	77	75	94	1079	914
2	胸膜栓压缩性骨折	女	75	97	75	126	156
3	多器官功能衰竭	男	20	233	83	170	360
4	原发性胆汁性肝硬化	男	73	169	189	126	225
5	原发性高血压	女	72	101	151	438	462
6	药物性肝炎	女	39	197	30	1 751	230

2.3 将 AMA-M2 阳性患者与阴性患者的 ALT、AST、ALP、 γ -GT 分别进行统计,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,虽然由于阳性组的例数太少,不能将两组数据进行统计学分析,但可以清楚看出 AMA-M2 阳性组的患者 ALP、 γ -GT 有明显高于阴性组患者的趋势,这与其他相关报道一致^[5],结果见表 3。

表 3 ALT、AST、ALP、 γ -GT 结果比较($\bar{x} \pm s$, U/L)

实验室指标	AMA M2 阴性患者 检测值	AMA M2 阳性患者 检测值
ALT	173.9±195.7	145.3±63.5
AST	118.9±149.1	103.6±57.1
ALP	119.8±69.9	615.0±665.3
γ -GT	133.7±126.9	391.1±278.7

3 讨 论

美国肝脏病学学会 2009 年制定的有关 PBC 的诊断标准包括^[6]:(1)存在胆汁淤积的生化证据;(2)AMA 阳性;(3)组织学上存在非化脓性破坏性胆管炎以及小叶间胆管损伤的表现。当满足以上三条标准中的两条可诊断 PBC。由此可见,如果 AMA 阳性,可以不做肝脏穿刺活检,如果 AMA 阴性,则一定要有肝脏穿刺组织病理学证据才能诊断为 PBC。其他众多研究者提出的 PBC 诊断标准都将 AMA 作为诊断 PBC 的重要实验室指标^[7],但 AMA 阳性并不等于一定是 PBC。研究者发现 PBC 患者中有 4 种类型的抗线粒体抗体(抗 M2、M4、M8 和 M9 抗体),其中 M2 亚型是 PBC 患者早期血清中 AMA 反应的主要成分,其本质是线粒体内膜上的丙酮酸脱氢酶和 α -酮酸脱氢酶的复合物,对 PBC 诊断最具特异性^[8]。本研究 120 例肝功能损伤患者,用酶联免疫法检测发现有 6 例 AMA-M2 抗

体阳性,其次用免疫印迹法和 AMA 间接免疫荧光法验证均为阳性。虽然 AMA-M2 为 AMA 的亚型,但间接免疫荧光法检测 AMA 诊断 PBC 的敏感性低于 ELISA 法检测 AMA-M2,会漏掉部分 AMA 阴性而 AMA-M2 阳性的患者^[9],因而本实验对 120 例标本均先采用酶联免疫法测定其 AMA-M2 抗体。AMA-M2 靶抗原主要有 3 个:PDC-E2、BCOADC-E2 和 OG-DC-E2^[10]。本实验采用抗 AMA、M2-3E 抗体 ELISA 法试剂进行检验,与经典抗 M2 抗体 ELISA 相比,人工多肽 BPO 与天然 PDH 组合作为基质的抗 M2-3E 抗体 ELISA 敏感性提高了 14%,特异性基本相同^[11-12]。

本研究 6 例 AMA 阳性患者中,其病毒肝炎标志物均为阴性。1 例入院初期诊断为酒精性肝硬化,检测 AMA 为阳性后为明确诊断为 PBC 提供了重要依据。其余 5 例阳性患者均未进行过 AMA、AMA-M2 检测,也并未诊断为 PBC,但其生化指标以反映胆汁淤积的血清 γ -GT、ALP 升高为突出表现,尤以 γ -GT 最为突出,均大于 3 倍参考值,ALT 和 AST 水平仅为轻度至中度升高,其 AMA-M2 水平升高明显,且以大于 35 岁女性居多,这与其他相关报道一致^[5]。Metcalfe 等对 29 例 AMA-M2 亚型阳性而无临床表现患者进行肝穿刺病理研究,发现 93% 患者表现提示或符合 PBC,经随访,76% 的患者在 2 年内出现 PBC 临床表现^[13]。病理检查为 PBC 诊断的“金标准”,但患者对肝穿刺活检的依从性差,且肝穿刺活检不一定能取到病变典型部位,临床实用价值有限。因而有学者认为 AMA-M2 抗体阳性者,即使无相应的临床症状和生化指标改变,也应考虑为 PBC,而不必进行病理检查^[9]。通过对本实验结果的分析,认为此 6 例 AMA-M2 阳性的病例如果当时进行了 AMA、AMA-M2 检测,会为医生诊断提供重要的思路,也应该被诊断为 PBC。

PBC 有一个漫长的疾病过程,可分为 4 个阶段:(1)AMA-M2 阳性,肝功能正常,无症状;(2)AMA-M2 阳性,肝功能异常(特别是碱性磷酸酶),无症状;(3)出现慢性胆汁淤积的临床表现;(4)肝硬化。PBC 患者初起无典型症状,易误诊为病毒性肝炎等^[14]。因此,对肝功能常规检查时发现 ALP 和 GGT 增高的高危人群,应及时检测 AMA-M2 抗体,有助于早期诊断和治疗。一般来说,PBC 患者从无症状到出现症状,平均约 6~8 年或更长时间。血清 AMA、AMA-M2 阳性是 PBC 最突出的异常免疫学指标,在肝功能正常和无症状时即可出现,其阳性率可达 95% 以上,是重要的早期诊断手段^[15]。因此,对于无症状患者,早期作 AMA 的检查是十分必要的,无症状阶段不易诊断,一旦肝脏损害进入失代偿期阶段病情则难以控制,可以引起多系统受损,通过本实验的分析发现,对于原因不明的肝功能损伤,临床上重视 AMA 及 AMA-M2 的检测,能提高对疾病诊断及鉴别诊断的临床应用价值,使更多患者得到早期的正确治疗。

参考文献:

- [1] 姜小华,仲人前,孔宪涛.原发性胆汁性肝硬化发病机制研究进展[J].中国免疫学杂志,2002,18(5):586-589.
- [2] Nguyen DL,Juran BD,Lazaridis KN.Primary biliary cirrhosis[J].Best Pract Res Clin Gastroenterol,2010,24(5):647-654.
- [3] Saito H,Takahashi A,Abe K,et al.Autoantibodies by line immunoassay in patients with primary biliary cirrhosis[J].Fukushima J Med Sci,2012,58(2):107-116.
- [4] 肖华,陈进伟,谢希,等.自身抗体检测在原发性胆汁性肝硬化诊断中的价值[J].北京大学学报:医学版,2012,44(2):209-214.
- [5] 姜小华,傅青春,孙建文,等.AMA-M2 抗体阳性原发性胆汁性肝硬化患者的实验室指标特征分析[J].中华肝脏病杂志,2010,15(2):84-86.
- [6] Lindor KD,Gershwin ME,Poupon R,et al.Primary biliary cirrhosis[J].Hepatology,2009,50(2):291-308.
- [7] Heathcote EJ.Management of primary biliary cirrhosis.The American Association for the Study of Liver Diseases practice guidelines[J].Hepatology,2000,31(9):1005-1013.
- [8] Leung PS, Van de Water J,Coppel RL,et al.Molecular aspects and the pathological basis of primary biliary cirrhosis[J].J Autoimmun,1996,9(1):119-128.
- [9] Zuber MA,Recktenwald C.Clinical correlation of anti-mitochondrial antibodies[J].Eur J Med Res,2003,8(2):61-70.
- [10] 姜小华,仲人前,方晓云,等.原发性胆汁性肝硬化特异性 AMA-M2 抗体在 5011 名体检者中的筛查分析[J].中华检验医学杂志,2003,26(5):553-555.
- [11] 姜小华,仲人前,胡寅,等.用重组 M2 三联体抗原建立原发性胆汁性肝硬化免疫检测法[J].中华检验医学杂志,2002,25(1):75-77.
- [12] 姜小华,仲人前,范列英,等.M2 自身抗原及其三联体的克隆表达和初步鉴定[J].中华消化杂志,2001,21(5):530-533.
- [13] 姚光弼.中国人的原发性胆汁性肝硬化的前瞻性研究[J].中华肝脏病杂志,2002,9(3):160-161.
- [14] Jiang XH,Fang XY,Zhong RQ,et al.Development of an enzyme immune assay for detecting M2 autoantibodies specific for primary biliary cirrhosis[J].Hepatobiliary Pancreat Dis Int,2003,13(2):290-294.
- [15] Bogdanos DP,Komorowski L.Disease-specific autoantibodies in primary biliary cirrhosis[J].Clin Chim Acta,2011,412(7):502-506.

(收稿日期:2012-12-08 修回日期:2013-01-22)

(上接第 1945 页)

- with histology of tissues sampled by atherectomy[J].Am J Cardiol,1996,77(3):344-349.
- [6] Davies MJ,Thomas AC.Plaque fissuring the cause of acute myocardial infarction,sudden ischaemic death,and crescendo angina[J].Br Heart,1985,53(3):363-373.
 - [7] Rioufol G,Gilard M,Finet G,et al.Evolution of spontaneous atherosclerotic plaque rupture with medical treatment,long-term follow-up with intravascular ultrasound[J].Circulation,2004,110(17):2875-2880.
 - [8] Farb A,Burke AP,Tang AL,et al.Coronary plaque erosion with rupture into a lipid core,a frequent cause of coronary thrombosis in sudden coronary death[J].Circulation,1996,93(12):1354-1363.
 - [9] Virmani R,Burke AP,Farb A,et al.Pathology of the vulnerable plaque[J].J Am Coll Cardiol,2006,47(1):13-18.
 - [10] Abedin M,Tintut Y,Demer LL.Vascular calcification:mechanisms and clinical ramifications[J].Arterioscler Thromb Vasc Biol,2004,24(11):1161-1170.
 - [11] Yamagishi M,Terashima M,Awano K,et al.Morphology of vulnerable coronary plaque:insights from follow-up of patients examined by intravascular ultrasound before an acute coronary syndrome[J].J Am Coll Cardiol,2000,35(1):106-111.
 - [12] Glagov S,Weisenberg E,Zarins CK,et al.Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries[J].N Engl J Med,1987,316(12):1371-1375.
 - [13] Schoenhagen P,Ziada KM,Kapadia SR,et al.Extent and direction of arterial remodeling in stable versus unstable coronary syndromes:an intravascular ultrasound study[J].Circulation,2000,101(5):598-603.

(收稿日期:2012-12-11 修回日期:2013-01-21)