

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.25.014

酶联免疫吸附试验检测对大疱性皮肤病诊断的评价

李彦希¹, 杜宇¹, 石宇^{2△}

(1. 重庆市中医院皮肤科 400011; 2. 重庆医科大学附属儿童医院检验科 400014)

摘要:目的 评价酶联免疫吸附试验(ELISA)用于大疱性皮肤病血清学诊断的临床应用及意义。方法 用 ELISA 法检测 34 例天疱疮患者、32 例大疱性类天疱疮患者和 33 例非大疱性皮肤病患者血清,分别检测血清中的 Dsg1、Dsg3 和 BP180 的表达。结果 ELISA 法检测大疱性皮肤病抗体的特异度为 93.94%, 敏感度为 87.88%。结论 ELISA 法对大疱性疾病具有诊断价值,在疾病的分型上有重要意义。

关键词:天疱疮;类天疱疮,大疱性;酶联免疫吸附测定

中图分类号:R758.66

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)25-3305-02

Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosing bullous dermatosis

Li Yanxi¹, Du Yu¹, Shi Yu^{2△}

(1. Department of Dermatology and Venereal Disease, Chongqing Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Chongqing 400011, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China)

Abstract: Objective To evaluate the clinical application and significance of enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) for serologically diagnosing bullous dermatosis. **Methods** Serum Dsg1, Dsg3 and BP180 expressions were detected in 34 cases of pemphigus, 32 cases of bullous pemphigoid and 33 cases of non-bullous dermatosis by ELISA. **Results** The sensitivity and specificity of ELISA for detecting the bullous dermatosis antibody were 87.88% and 93.94% respectively. **Conclusion** The ELISA method has the diagnostic value on bullous dermatosis and the important significance in the disease classification.

Key words: pemphigus; pemphigoid, bullous; enzyme-linked immunosorbent assay

大疱性皮肤病是一类慢性、复发性、严重性表皮内棘层松解或表皮下大疱的皮肤病,临床常见的大疱性皮肤病主要为天疱疮和大疱性类天疱疮(bullous pemphigoid, BP),好发于中老年人,此类疾病诊断的主要方法依赖皮肤活检。随着分子生物学的进展,酶联免疫吸附试验(ELISA)成为大疱性疾病新的诊断方法。本研究评价 ELISA 用于大疱性皮肤病血清学诊断的临床应用及意义,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 采集 2010 年 3 月至 2012 年 12 月来重庆市中医院就诊患者。其中天疱疮 34 例,包括寻常型天疱疮(pemphigus vulgaris, PV)25 例,落叶型天疱疮(pemphigus foliaceus, PF)9 例;BP 32 例,非大疱性皮肤病患者 33 例(对照组)。所有病例均经临床、组织病理和免疫病理确诊。PV 的诊断标准为皮肤出现松弛性水疱或糜烂,可累及黏膜,尼氏征阳性。组织病理表现是基底层上水疱或裂隙形成并出现棘刺松解细胞,直接免疫荧光显示表皮细胞间 IgG 和 C3 的沉积。PF 的诊断标准为头面及躯干出现的红斑、糜烂、结痂,无黏膜受累,尼氏征呈阳性,组织病理表现是颗粒层及其下方出现棘刺松解水疱,直接免疫荧光显示表皮细胞间 IgG 和 C3 的沉积。BP 的诊断标准为躯干、四肢出现厚壁、紧张的水疱,尼氏征阴性,组织病理表现是表皮下水疱,免疫荧光显示基底膜带有 IgG 和 C3 的沉积。

1.2 主要仪器与试剂 试剂盒由 Medical & Biological Labo-

ratory Co. Ltd. 提供,按照试剂盒说明进行操作。分别加入 100 L 标准液 1(阴性对照)、标准液 2(阳性对照)、PBS(空白对照)和稀释后(1:101)的患者和对照组血清,均设复孔,取 100 μL 加入包被有桥粒芯糖蛋白 1(Dsg1)、Dsg3、BP 抗原 2(BP180)抗原的微孔条带,置 25 ℃ 孵育 60 min。用 PBS 清洗 4 次,每孔加入结合有辣根过氧化物酶小鼠抗人 IgG 100 mL, 25 ℃ 孵育 60 min, PBS 清洗 4 次,并加入过氧化物酶底物(TMB) 100 mL, 25 ℃ 孵育 30 min,最后加入终止液 100 mL,将反应板置于酶标仪 450 nm 波长下读取各孔吸光度(A 值),以 2 个孔的平均值作为每份样本的结果,计算 ELISA 值。

1.3 实验质控 Dsg1、Dsg3 ELISA 阳性对照 A 值需大于或等于 0.70, 阴性对照 A 值需小于或等于 0.10, 否则实验结果无效。BP180 阳性对照 A 值需大于或等于 0.50, 阴性对照 A 值需小于或等于 0.10, 否则实验结果无效。

1.4 结果判断 Dsg3 ELISA ≥ 20 为+, ≥ 7 ~ < 20 为±, < 7 为一。Dsg1 ELISA ≥ 20 为+, ≥ 14 ~ < 20 为±, < 14 为一。BP 180 ELISA ≥ 9 为+, < 9 为一。

2 结果

34 例天疱疮患者, 32 例 BP 患者临床表现、组织病理及直接免疫荧光作为诊断的金标准,对 99 例血清标本进行检测,见表 1,如果血清抗 Dsg1 结果阳性而抗 Dsg3 为阴性,则诊断落叶型天疱疮。如果抗 Dsg3 为阳性,不论抗 Dsg1 为阴性还是阳性则诊断寻常型天疱疮。ELISA 法检测在大疱性皮肤病抗

体的特异度为 93.94%，敏感度为 87.88%。

表 1 天疱疮患者 Dsg1、Dsg3 和 BP180 的表达情况

病例	n	Dsg1		Dsg3		BP180	
		+	-	+	-	+	-
PV	25	2	1	22	3	0	0
PF	9	7	2	0	0	0	0
BP180	32	0	0	0	0	29	3
对照组	33	0	0	2	0	0	0

3 讨论

天疱疮和 BP 是临床上常见的大疱性皮肤病,诊断主要依赖临床表现、组织病理及免疫荧光检测,但组织病理及直接免疫荧光检测均需要有创的皮肤活检,且因需做免疫荧光获取的皮肤组织大于一般的皮肤病患者,患者以中老年为主,由于使用激素和免疫抑制剂,活检伤口愈合时间较长,感染风险增加,且免疫荧光检测的准确性与取材部位、发病时间等相关,易受标本染色及诊断者主观判定的多种影响,因此随着分子生物学的进展,应用 ELISA 检测天疱疮患者血清中抗桥粒芯糖蛋白 (desmoglein, Dsg) 及 BP 血清的 BP180 的特异性抗体应用于临床,并与直接免疫荧光法 (DIF) 进行比较,以评价检测 ELISA 检测作为诊断大疱性皮肤病的意义^[1]。天疱疮抗原的 Dsg 是位于桥粒中的一种糖蛋白,在皮肤中, Dsg1 通常表达于整个表皮层,但在表皮上部表达最强烈, Dsg3 表达于表皮的下半部分,尤其是基底层及靠近基底层的部位,在黏膜部位, Dsg1 和 Dsg3 主要表达于鳞状上皮细胞, Dsg3 的表达通常高于 Dsg1^[2-3]。寻常型天疱疮的抗原为相对分子质量 130×10^3 的 Dsg3,落叶型天疱疮的抗原为相对分子质量 160×10^3 的 Dsg1,当天疱疮抗体与 Dsg1 或 Dsg3 结合后,引起表皮细胞产生并释放纤维蛋白酶原激活因子,它将纤维蛋白酶原转化为纤维蛋白酶,导致细胞间粘合物破坏,而发生棘层细胞松解,出现临床上的大疱^[4-5]。抗 Dsg1 IgG 的血清能使正常皮肤出现表皮内水泡,有学者提出当 Dsg1 和 Dsg3 同时表达于细胞中会有协同作用,认为抗 Dsg1 IgG 能引起皮肤病变而抗 Dsg3 IgG 引起黏膜病变,血清中同时存在抗 Dsg1 IgG 和抗 Dsg3 IgG,因此引起皮肤和黏膜的病变。认为以皮肤病变为主的天疱疮检测到 Dsg1 的概率更大,而以黏膜为主的病变 Dsg3 更易检出^[6],皮肤黏膜都受累病变两者均可检出。在本次检测结果中, PF 主要累及皮肤,主要检出 Dsg1,对于 PV 而言,两者均检出,但以 Dsg3 为主。近年的研究还显示 PV 的易感性与 Dsg3 的多态性密切相关^[7], Dsg3 的表达可影响表皮的分化和角质细胞的黏附。天疱疮和将患者的血清放在经重组 Dsg1 或 Dsg3 蛋白包被的板上进行 ELISA 检测,这样就可以检测出直接抗 Dsg1 或抗 Dsg3 的特异性抗体。有学者在对 232 例寻常型天疱疮的回顾性研究表明 Dsg3 的特异性为 98.7%,敏感性为 90.5%,认为对 PV 具有诊断价值^[8]。有报道认为检测者可以通过此方法在血清学上鉴别寻常型和落叶型天疱疮这两个亚型,而且 ELISA 的评分与疾病活动程度有关,并有利于监测病情活动、制定激素减量计划、在临床表现出现前预测疾病的复发^[9-10]。但有人认为 ELISA 检测抗体的滴度与疾病的严重程度、复发等不一定呈正相关,在 PV 的消退期检

测到相关抗体,而在疾病发作期间未检测到,认为桥粒芯蛋白仅是细胞间黏附作用的一方面,电镜发现即使在棘刺松解的状态下,细胞桥粒仍然是完整的,且近年来又发现新的抗原和自身抗体结合引起表皮松解,用 ELISA 方法查出的抗原仅为一个“结果”而不是天疱疮棘刺松解的始发原因^[11]。

BP 患者血清中自身抗体的靶抗原主要是 BP230 和 BP180,原来认为 BP180 是自身抗体的直接靶点, BP180 与疾病严重程度及瘙痒呈正相关^[12],而抗 BP230 自身抗体则被认为是其继发产物,目前认为抗 BP230 抗体加重炎症反应,同时对 BP180 和 BP230 抗体检测能增加实验的敏感性^[13-14]。BP180 的主要表位位于接近细胞膜的区域,称为 NC16a,大多数患者的血清对重组的 NC16a 蛋白起反应,有少数 BP 患者用 NC16a 试剂盒检测为阴性反应。本实验 32 例患者有 3 例为阴性,其原因是这些患者的抗原表位在 NC16a 之外^[15]。

本实验表明 ELISA 方法对大疱性皮肤病的诊断具有重要的价值,敏感性和特异性分别为 87.88% 和 93.94%,对于老年或者内科疾病严重的患者,没有条件做皮肤活检或患者拒绝皮肤活检的,此方法能被广泛接受。作者认为该法可作为大疱性皮肤病的筛查方法,如结果与临床吻合则无需进一步检测,如结果与临床诊断有争议,进一步做病理及免疫荧光检测,这不仅减轻患者痛苦,也降低了医疗负担。

参考文献:

- [1] Lapeyre-Lienard H, Joly P. Pemphigus [J]. Presse Med, 2010, 39(10):1066-1070.
- [2] Grando SA. Pemphigus autoimmunity: hypotheses and realities [J]. Autoimmunity, 2012, 45(1):7-35.
- [3] Ishii K, Amagai M. In vitro pathogenicity assay for anti-desmoglein in autoantibodies in pemphigus [J]. Methods Mol Biol, 2013, 961:219-225.
- [4] Spindler V, Rötzer V, Dehner C, et al. Peptide-mediated desmoglein 3 crosslinking prevents pemphigus vulgaris autoantibody-induced skin blistering [J]. J Clin Invest, 2013, 123(2):800-811.
- [5] Yokoyama T, Amagai M. Immune dysregulation of pemphigus in humans and mice [J]. J Dermatol, 2010, 37(3):205-213.
- [6] Daneshpazhooh M, Kamyab K, Kalantari MS, et al. Comparison of desmoglein 1 and 3 enzyme-linked immunosorbent assay and direct immunofluorescence for evaluation of immunological remission in pemphigus vulgaris [J]. Clin Exp Dermatol, 2014, 39(1):41-47.
- [7] Capon F, Boulding H, Quaranta M, et al. Genetic analysis of desmoglein 3 (DSG3) sequence variants in patients with pemphigus vulgaris [J]. Br J Dermatol, 2009, 161(6):1403-1405.
- [8] Wiwanitkit V. A systematic meta-analysis on diagnostic value of Dsg3 ELISA for pemphigus vulgaris [J]. Indian J Dermatol, 2009, 54(2):192.
- [9] Mortazavi H, Shahdi M, Amirzargar AA, et al. Desmoglein ELISA in the diagnosis of pemphigus and its correlation with the severity of pemphigus (下转第 3310 页)

C-myc 作为重要的转录调节因子,其表达产物是调控细胞增殖过程中基因转录的反式作用因子,参与细胞内多种信号传递和基因表达的启动,是细胞增殖中信号传导的必须调节因子,其基因内含多个转录因子的结合位点,同时细胞内多种信号通路也对其进行调控^[10-11]。影响细胞增殖是 c-myc 的主要生物学功能,同时它也与细胞生长、分化、增殖、凋亡、周期调控关联密切,其调节方向取决于外界信号对细胞的刺激以及细胞所处的周围生理环境^[12-13]。c-myc 可影响细胞周期,减少 G₀/G₁ 期细胞数量,促进更多细胞进入 S 期,使静息细胞进入分裂周期,因此,降低 c-myc 基因的表达可引起细胞周期阻滞^[3]。猜测阻断 p38MAPK 信号通路引起的 HSCs 增殖受抑制与 c-myc 因子作用于 HSC 周期调控有关。为证实以上猜测,我们进一步检测了 HSCs 周期分布以及 c-myc 基因的表达阳性率。结果表明,SB203580 阻断 p38 信号通路能使 HSC 细胞的增殖活性受到抑制,同时处于周期 G₀/G₁ 期的细胞所占比例上升,S 期的细胞所占比例下降,而且 c-myc 基因表达阳性的细胞减少。提示阻断 p38MAPK 信号通路能使大鼠 HSC 的增殖活性降低,其作用机制可能与引起 HSC 中 c-myc 基因表达的下调以及减少细胞由 G₀/G₁ 期进入 S 期的 DNA 合成有关。

通过抑制 HSC 的活性,能减少其细胞外基质分泌,阻止以及逆转肝纤维化的发生。本实验初步研究了 p38MAPK 信号通路影响 HSC 活性的相关机制,证实了 c-myc 因子在其中发挥的调控作用。结果对进一步阐明肝纤维化发生的信号机制,寻找防治肝纤维化的可能途径以及抗肝纤维化新药的开发均有重要意义。

参考文献:

- [1] Mormone E, George J, Nieto N. Molecular pathogenesis of hepatic fibrosis and current therapeutic approaches[J]. *Chem Biol Interact*, 2011, 193(3): 225-231.
- [2] Samuel I, Zaheer A, Fisher RA. In vitro evidence for role of ERK, p38, and JNK in exocrine pancreatic cytokine production[J]. *J Gastrointest Surg*, 2006, 10(10): 1376-1383.
- [3] Pez F, Dayan F, Durivault J, et al. The HIF-1-inducible lysyl oxidase activates HIF-1 via the Akt pathway in a positive regulation loop and synergizes with HIF-1 in promoting tumor cell growth[J]. *Cancer Res*, 2011, 71(5): 1647-1657.
- [4] Eng FJ, Friedman SL, Fibrogenesis I. new insights into hepatic stellate cell activation; the simple becomes complex[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2000, 279(1): 7-11.
- [5] D'ambrosio DN, Walewski JL, Clugston RD, et al. Distinct populations of hepatic stellate cells in the mouse liver have different capacities for retinoid and lipid storage[J]. *PLoS One*, 2011, 6(9): e24993.
- [6] Brown MD, Sacks DB. Compartmentalised MAPK pathways[J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2008(186): 205-235.
- [7] Aouadi M, Binetruy B, Caron L, et al. Role of MAPKs in development and differentiation; lessons from knockout mice[J]. *Biochimie*, 2006, 88(9): 1091-1098.
- [8] Zarubin T, Han J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway[J]. *Cell Res*, 2005, 15(1): 11-18.
- [9] Gum RJ, McLaughlin MM, Kumar S, et al. Acquisition of sensitivity of stress-activated protein kinases to the p38 inhibitor, SB 203580, by alteration of one or more amino acids within the ATP binding pocket[J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(25): 15605-15610.
- [10] Marinkovic D, Marinkovic T, Kokai E, et al. Identification of novel Myc target genes with a potential role in lymphomagenesis[J]. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(18): 5368-5378.
- [11] He C, Hu H, Braren R, et al. C-myc in the hematopoietic lineage is crucial for its angiogenic function in the mouse embryo[J]. *Development*, 2008, 135(14): 2467-2477.
- [12] Sanders JA, Gruppuso PA. Coordinated regulation of c-Myc and Max in rat liver development[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2006, 290(1): G145-G155.
- [13] Patel JH, McMahon SB. Targeting of Miz-1 is essential for Myc-mediated apoptosis[J]. *Biol Chem*, 2006, 281(6): 3283-3289.
- [14] Mutasim DF. Levels of antibodies to BP180 correlate with disease activity in bullous pemphigoid[J]. *Arch Dermatol*, 2000, 136(2): 253-254.
- [15] Yang B, Wang C, Chen S, et al. Evaluation of the combination of BP180-NC16a enzyme-linked immunosorbent assay and BP230 enzyme-linked immunosorbent assay in the diagnosis of bullous pemphigoid[J]. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*, 2012, 78(6): 722-727.
- [16] Fairley JA, Bream M, Fullenkamp C, et al. Missing the target: characterization of bullous pemphigoid patients who are negative using the BP180 enzyme-linked immunosorbent assay[J]. *J Am Acad Dermatol*, 2013, 68(3): 395-403.
- [17] Wong MM, Giudice GJ, Fairley JA. Autoimmunity in bullous pemphigoid[J]. *G Ital Dermatol Venereol*, 2009, 144(4): 411-421.
- [18] Mutasim DF. Levels of antibodies to BP180 correlate with disease activity in bullous pemphigoid[J]. *Arch Dermatol*, 2000, 136(2): 253-254.
- [19] Yang B, Wang C, Chen S, et al. Evaluation of the combination of BP180-NC16a enzyme-linked immunosorbent assay and BP230 enzyme-linked immunosorbent assay in the diagnosis of bullous pemphigoid[J]. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*, 2012, 78(6): 722-727.
- [20] Fairley JA, Bream M, Fullenkamp C, et al. Missing the target: characterization of bullous pemphigoid patients who are negative using the BP180 enzyme-linked immunosorbent assay[J]. *J Am Acad Dermatol*, 2013, 68(3): 395-403.

(收稿日期:2014-03-14 修回日期:2014-06-20)

(上接第 3306 页)

- [9] vulgaris[J]. *Iran J Allergy Asthma Immunol*, 2009, 8(1): 53-56.
- [10] Bracke S, Speeckaert R, Van Geel N, et al. Evaluation of commercially available ELISA assays as a tool for monitoring and managing pemphigus patients: a prospective study[J]. *Eur J Dermatol*, 2013, 23(1): 33-39.
- [11] Sardana K, Garg VK, Agarwal P. Is there an emergent need to modify the desmoglein compensation theory in pemphigus on the basis of Dsg ELISA data and alternative pathogenic mechanisms[J]. *Br J Dermatol*, 2013, 168(3): 669-674.
- [12] Wong MM, Giudice GJ, Fairley JA. Autoimmunity in bullous pemphigoid[J]. *G Ital Dermatol Venereol*, 2009, 144(4): 411-421.

(收稿日期:2014-04-17 修回日期:2014-06-20)