

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790( 2007 )22-2047-03

## 强直性脊柱炎与 HLA-B2704 , 05 亚型分布关系

王静成<sup>1</sup>, 王晓铃<sup>2</sup>, 王 强<sup>1</sup>, 陶玉平<sup>1</sup>, 解松刚<sup>2</sup>, 沈维干<sup>2</sup>, 王 骅<sup>1</sup>, 费文勇<sup>1</sup>( 苏北人民医院: <sup>1</sup> 骨科, <sup>2</sup> 中心实验室, 江苏 扬州 225001 )

### Distribution of HLA-B2704 , 05 subtypes in patients with ankylosing spondylitis

WANG Jing-Cheng<sup>1</sup>, WANG Xiao-Ling<sup>2</sup>, WANG Qiang<sup>1</sup>, TAO Yu-Ping<sup>1</sup>, XIE Song-Gang<sup>2</sup>, SHEN Wei-Gan<sup>2</sup>, WANG Ye<sup>1</sup>, FEI Wen-Yong<sup>1</sup><sup>1</sup>Department of Orthopaedics, <sup>2</sup>Central Laboratory, Subei People's Hospital, Yangzhou 225001, China

**【Abstract】**AIM: To evaluate the subtypes of homologous leucocytic antigen B27 ( HLA-B27 ) with the fluidic chip assay and PCR technique so as to provide a new method for diagnosing ankylosing spondylitis ( AS ). **METHODS:** Flow cytometry and PCR-fluidic chip technique were respectively used to detect HLA-B27 and assay the subtypes of HLA-B2704 and HLA-B2705 in 124 patients with AS and 50 health adults. **RESULTS:** 94% of the 124 patients with AS ( 116/124 ) were HLA-B27 positive. Among them 68 samples were HLA-B2704 positive, accounting for 58.6% ( 68/116 ) and 48 samples were HLA-B2705 positive with a percentage of 41.4% ( 48/116 ). Only one HLA-B2704 positive specimen was found in all the 50 healthy samples. **CONCLUSION:** The pathogenesis of AS might be independent with the specific sequences of the subtypes in HLA-B27 and only related to the consensus sequence of the subtypes. The fluidic chip technique can make an accurate and fast analysis on HLA-B27 relevant subtypes. This study establishes a foundation for probing into the pathogenesis of AS and offers a new clinical diagnosis method of AS.

**【Keywords】**spondylitis; ankylosing; HLA-B27 antigen; fluidic chip technique

**【摘 要】**目的: 用流式芯片以及 PCR 技术检测 HLA-B2704 , 05 亚型, 提供临床诊断强直性脊柱炎的新方法。方法: 对 124 例强直性脊柱炎患者及 50 例正常人采用流式细胞方法检测 HLA-B27, 采用流式芯片方法检测 HLA-B27 亚型。结果: 124 例强直性脊柱炎患者 HLA-B27 阳性数 116 例, 阳性率 94%, 其中 HLA-B2704 亚型 68 例, 占总阳性数的 58.6%, HLA-

B2705 亚型 48 例, 占总阳性数的 41.4%。50 例正常人的亚型检测结果均为 HLA-B2704 阳性。结论: 强直性脊柱炎患者的发病机制与各亚型的特异序列无关, 仅与 HLA-B27 各亚型共有序列有关。流式芯片技术可以快速准确地对 HLA-B27 相关亚型作出分析, 为深入探讨强直性脊柱炎发病机制奠定工作基础, 并提供强直性脊柱炎临床诊断的新方法。

**【关键词】**脊柱炎; 强直性; HLA-B27 抗原; 流式芯片

**【中图分类号】**R593.23 **【文献标识码】**A

## 0 引言

强直性脊柱炎( Ankylosing Spondylitis, AS )是一种原因不明的以中轴关节慢性炎症为主要表现的全身性疾病, 主要侵犯骶髂关节、髋关节、脊柱旁软组织及外周关节等。该病早期进展较慢, 但后期发展较快, 很短时间内形成驼背畸形, 髋、膝等关节强直, 待诊断明确时再予以正确治疗效果较差, 故早期诊断尤为重要。HLA-B27 分子由 2 条多肽链组成, 一条  $\alpha$  链或重链,  $M_r$  约 44 000。它们与另一条  $\beta$  链或轻链即  $\beta_2$  微球蛋白(  $M_r$  约 12 000 )结合共同组成 B27 分子<sup>[1]</sup>。迄今已检出 25 个 HLA-B27 等位基因( 亚型 ), 可编码 23 种蛋白质( B2701-B2723 )<sup>[2]</sup>。随着 HLA 基因分型性技术的成熟和发展, 从亚型水平探讨 AS 的发病机制已成为可能。我们采用的流式芯片技术是近年来新发展的分子生物学研究方法, 可以快速准确地对 HLA-B27 的相关亚型进行快速准确的检测, 可以进一步深入探讨 AS 的发病机制, 提供临床上早期诊断 AS 的新方法。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 研究样本为 2003/2005 年苏北人民医院骨科门诊或病房 AS 患者( 按 1997 年 Englemen 提出的诊断标准<sup>[3]</sup> ) 外周血, 共 124( 男 88 女 36 ) 例, 全部为汉族, 年龄分布为 17 ~ 54 岁, 另有 50 例正常人门诊样本。流式细胞仪 FACSCalibur 及所用 HLA-B27 检测试剂盒均为 BD 公司产品, Caliper1000 微流芯片分析仪来自德国安捷伦公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 流式细胞方法检测 HLA-B27** ① 取专用试

收稿日期 2007-07-03; 接受日期 2007-08-30

基金项目 江苏省科委社会发展指导项目( BS2004531 )

通讯作者: 王静成, 教授。Tel: 0514 7937400 Email: sbwywjc@163.com

管1支,加入mAb 30  $\mu$ L,再加入肝素50  $\mu$ L抗凝血,充分混匀后置暗处于15%~22% 20 min. ② 荧光染色后,加入溶血剂2 mL,充分混匀,准确放置暗处10 min. ③ 以1500 r/min离心5 min. 弃上清,用PBS洗涤1次,加入PBS液0.5 mL,混匀,上流式细胞仪分析.

### 1.2.2 流式芯片方法检测 HLA-B27 亚型

1.2.2.1 引物设计 HLA-B27 亚型引物序列为:上游5'-CCA CTC CAT GAG GTA TTT CC-3',下游5'-GTC TGT GCC TTG GCC TTG C -3'(由上海捷倍恩基因公司合成).

1.2.2.2 基因组 DNA 提取 抽取静脉血0.5 mL, EDTA 抗凝,盐析法提取 DNA,并用紫外分光光度计读取260 nm,280 nm 两个波长下的吸光度检测 DNA 浓度.

1.2.2.3 PCR 反应 PCR 反应体系中含0.2 mmol/L dATP 双侧引物各0.5  $\mu$ mol/L, DNA 模板0.1  $\mu$ g, TaqDNA 多聚酶1~1.5 U,总体积50  $\mu$ L,PCR 反应在全自动 PCR 仪上进行,96 $^{\circ}$ C 30 s 变性,65 $^{\circ}$ C 50 s 退火,70 $^{\circ}$ C 1 min 延伸,30 个循环,72 $^{\circ}$ C 延伸5 min.

1.2.2.4 流式芯片确定 HLA-B27 亚型 扩增产物混匀,取1  $\mu$ L加入芯片样品孔中,再加入染色胶,将芯片平稳置于 Caliper 1000 微流芯片分析仪上,应用分析软件读取 HLA-B27 各亚型峰图形.

统计学分析:AS 患者和正常人两组间的阳性率比较采用  $\chi^2$  检验.

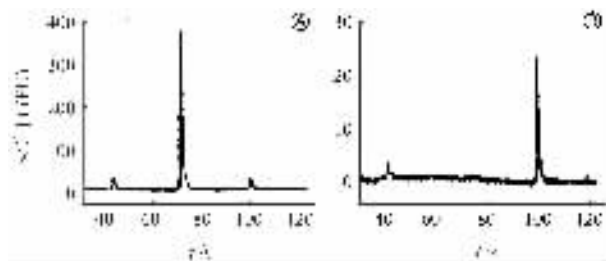
## 2 结果

2.1 HLA-B27 采用流式细胞技术共检测 AS 患者外周血124 例,结果阳性116(男94,女22)例.另外还检测正常人外周血50 例,仅发现 HLA-B27 阳性1 例.

2.2 HLA-B27 亚型 对所有 HLA-B27 阳性样本应用流式芯片技术,进一步确定 HLA-B27 的亚型.典型的 HLA-B27 04,05 亚型流式芯片检测结果见图1A,B.在124 例 AS 患者中:HLA-B2704 亚型阳性68 人,占 HLA-B27 阳性总数的58.6%,HLA-B2705 亚型阳性为48 人,占 HLA-B27 阳性总数的41.4%;50 例正常人对照组中仅有1 例 HLA-B27 阳性,且亚型检测结果为 HLA-B2704. AS 患者组与正常人对照组的 HLA-B27 阳性率有显著性差异(93.5% vs 0.5%, $P < 0.05$ ).

## 3 讨论

HLA-B27 是一种 I 类组织相容复合体(MHC)基因即人类白细胞抗原基因,其表达产物即 HLA-B27 抗原分子<sup>[4]</sup>. HLA-B27 是第一个被发现的人类某一



A: HLA-B2704 阳性峰; B: HLA-B2705 阳性峰.

图1 HLA-B27 亚型流式芯片检测结果

疾病与一种 MHC 分子相关的抗原.1973 由 Brewerton<sup>[5]</sup>报道了 HLA-B27 与 AS 的密切相关性,这在迄今已知的 HLA 与疾病的关联中是最强和最典型的. HLA-B27 传统检测方法为免疫学和血清学技术(微量淋巴细胞毒试验),现渐为流式细胞技术替代<sup>[6]</sup>.我们采用流式细胞技术对临床 AS 患者和正常人进行研究,所得结果也进一步验证上述这种相关性,在所研究的124 例 AS 患者中,有116 例 HLA-B27 阳性,阳性率为93.5%,50 例正常人中有1 例 HLA-B27 阳性,阳性率为0.5%.但是,因为普通人群 HLA-B27 阳性率达4%~7%,而 AS 的患病率仅0.3%左右<sup>[7]</sup>,即40~70 名 HLA-B27 阳性的个体中,只有3 名左右可能是 AS. AS 患者中,还有10%左右 HLA-B27 阴性.因此单凭 HLA-B27 阳性不能确诊 AS,而 HLA-B27 阴性也不能排除 AS.因此进一步研究 AS 患者 HLA-B27 的亚型分布具有十分重要的临床价值.

随着 HLA 基因分型技术的成熟和发展,从亚型水平探讨 AS 的发病机制成为可能.目前的研究显示,不同亚型可表现出对 AS 的正相关和负相关,所以在亚型水平上对疑为 AS 的患者作 HLA-B27 检测,对 AS 的诊断和鉴别诊断具有重要价值<sup>[8]</sup>.目前检测 HLA-B27 亚型的主要方法有 DNA 限制性片段长度多态性分析、PCR-单链构象多态性及 PCR-DNA 测序等方法,这些方法通常是结果判读复杂,定量分析困难,不利于临床诊断上的推广普及.我们采用先进的流式芯片技术,可以快速准确地对 HLA-B27 相关亚型作出分析,但由于抗体的交叉反应,有产生假阳性结果的可能<sup>[9]</sup>.我们在后面的分型实验中,由于采用灵敏度和特异性更高的 PCR 加流式芯片方法,从而对第一步的结果进一步加以确定,试验结果证明不存在假阳性.通常采用基因分型技术鉴定 HLA-B 时,约有1%的样本因 DNA 抽提失败而致假阴性<sup>[10]</sup>.我们在采用 PCR 加流式芯片方法进行基因分型时,在扩增之前对所有样本 DNA 都进行了含量检测,避免了因 DNA 抽提失败而致的假阴性结果.

总之,本研究为分析 HLA-B27 阳性 AS 患者的亚型分布关系提供临床资料,也为进一步深入探讨 AS 的发病机制以及与 HLA-B27 的确切关系奠定基础,并为临床 AS 疾病诊断提供辅助性的新方法。

## 【参考文献】

- [1] Archr J, Keat A. Ankylosing spondylitis: Time to focus on ankylosis [J]. J Rheumatol, 1999, 26(4): 761-764.
- [2] Khan MA. Update on spoudy loaythrophathitis [J]. Ann Intern Med, 2002, 136(12): 896-907.
- [3] Englemen EG, Englemen EG. Ankylosing Spoudylitis recent advances in diagnosis and treatment [J]. Med clin North Am, 1977, 61(2): 347-364.
- [4] Amelt FC. Seronegative spondylarthropathies [J]. Bull Rheum Dis, 1987, 37(1): 1.

- [5] Brewerton DA, Hart FD, Nicholls A, et al. Ankylosing spondylitis and HLA-B27 [J]. Lancet, 1973, 1(7809): 904-907.
- [6] Seipp MT, Erali M, Wies RL, et al. HLA-B27 typing: Evaluation of an allele-specific PCR melting assay and two flow cytometric antigen assays [J]. Cytometry B Clin Cytom, 2005, 63(1): 10-15.
- [7] 杨再兴, 梁艳, 朱烨等. 强直性脊柱炎患者血清 IL-12 水平及临床意义研究 [J]. 中国实验诊断学, 2007, 11(5): 619-621.
- [8] 杨志梅, 武大林. PCR-SSP HLA-B27 亚型检测及意义 [J]. 中国现代医学杂志, 2004, 14(17): 71-73.
- [9] Levering WH, Wind H, Sintnicolaas K, et al. Flow cytometric HLA-B27 screening: Cross-reactivity patterns of commercially available anti-HLA-B27 monoclonal antibodies with other HLA-B antigens [J]. Cytometry B Clin Cytom, 2003, 54(1): 28-38.
- [10] 董魁, 吴俊柱, 沈青. PCR-SSP 检测 HLA-B 基因分型诊断强直性脊柱炎 [J]. 山东医药, 2004, 44(25): 61-61.

编辑 许福明

· 经验交流 · 文章编号 1000-2790(2007)22-2049-01

## 慢性结核性脓胸 48 例的手术治疗

金哲 (南阳市中心医院胸外科, 河南 南阳 473009)

【关键词】脓胸, 慢性, 肺结核, 外科手术

【中图分类号】R561.6 【文献标识码】B

1 临床资料 2000-01/2006-10 我院收治结核性脓胸 48 例 (男 35 例, 女 13 例), 年龄 14~65 岁。局限性脓胸 40 例, 全脓胸 8 例, 合并肺结核或既往有肺结核病史者 25 例, 合并支气管胸膜瘘者 4 例, 有结核性渗出性胸膜炎者 33 例。手术均采用气管插管复合全麻方式, 其中胸膜纤维板剥脱术 38 例, 胸廓成形术 6 例, 胸膜全肺切除术 2 例, 瘘修补术 4 例, 胸腔病灶清除术 3 例。全组术前采用胸腔闭式引流术 35 例。术后均行胸腔持续引流, 其中 5 例行胸腔碳酸氢钠、生理盐水反复灌洗, 脓腔得以闭合。结果本组均临床治愈, 术后脓腔全部消灭, 支气管胸膜瘘闭合, 追踪随访 1~1.5 a, 患者肺结核病灶稳定, 全身情况良好, 无死亡病例。

2 讨论 近年来结核病发病率明显回升, 慢性结核性脓胸亦逐渐增多。结核性脓胸多由结核性渗出性胸膜炎继发而来, 也可由肺结核病灶破裂, 脊柱、肋骨和胸骨结核侵及胸腔所致。结核性脓胸起病 4~6 wk 后即形成难以吸收的增厚纤维板, 包裹肺组织, 肺顺应性严重下降, 内科保守治疗难以治愈, 应尽早行外科手术治疗。徐志全等<sup>[1]</sup>认为结核性脓胸病程超过 6 wk 者都可行胸膜纤维板剥脱术。脓腔较大, 临床症状较重, 或形成支气管胸膜瘘时, 应先行胸腔闭式引流, 待症状缓解、每天引流量 <50 mL 时, 方可开胸手术治疗。

胸膜纤维板剥脱术创伤小, 能够较好地保持胸廓的完整性, 最大限度保护和改善肺功能, 是治疗慢性结核性脓胸的首选方法和最佳术式。①对肺内无病变的单纯脓胸, 应尽可能行全胸膜剥脱术, 肺及胸膜的纤维粘连较轻, 纤维包裹较小者易剥离。对病史较短, 脓腔较大甚至全脓胸病例, 可先试行剥开部分脏层纤维板, 如患肺经加压充气复张良好, 全部剥开

后可以膨满患侧胸腔容积的 1/2 以上, 肺内无活动性结核病灶, 即可选择胸膜纤维板剥脱术。不但要剥脱构成脓腔的增厚纤维板, 肺与纵膈、膈面应充分分离、松解, 肋膈角区纤维板剥离尤为重要, 术后较长时间留置胸腔引流管, 大部分病肺可复张膨满胸腔<sup>[2]</sup>。本组采用胸膜剥脱术 38 例, 均临床治愈, 术后无复发。②对估计不能耐受全胸膜纤维板剥脱术, 或剥脱术后可能遗留残腔者, 可采用保留壁层的纤维板剥脱术。清创后的壁层纤维板作为充填脓腔的良好材料并不引起脓胸复发<sup>[3]</sup>。保留壁层的纤维板剥脱术后仍遗留残腔者, 可一期附加局部胸廓成形术。

胸廓成形术适用于合并肺部严重不可逆结核病灶或复杂性支气管胸膜瘘者。我们采用改良的 Heller 胸廓成形术, 术中根据脓腔范围, 充分切除覆盖脓腔的肋骨, 肋骨两端要超过脓腔两边 3 cm 以上, 以使胸壁萎陷充分, 彻底消灭残腔, 同时清除脓腔中的脓汁、干酪物、坏死组织, 保留肋间肌和壁层增厚的纤维板, 充分堵塞脓腔, 但脏层纤维板尽量切除, 不能切除的做“井”字切开, 以松解肺组织, 使肺膨胀。对复杂性支气管胸膜瘘, 可用肩胛岗下切除的带蒂肩胛下肌瓣填塞修补于瘘口表面, 其肌肉瓣体积大, 血运丰富, 为支气管胸膜瘘的愈合提供了最佳条件。本组支气管胸膜瘘修补 4 例, 效果满意, 无复发。胸膜肺切除术创伤大、并发症多, 临床治疗中已很少采用。但对耐药结核杆菌感染的脓胸并发肺内较大结核灶者, 应采用胸膜肺切除, 否则术后肺部遗留病灶难以用药物控制, 从而导致术后肺部病灶浸润进展。可同时加用胸廓成形术或带蒂大网膜移植术。

本组有 3 例术中发现脓胸局限、相应肺组织内病灶较多, 身体条件差, 予以胸腔病灶清除术, 术后用碳酸氢钠、生理盐水反复灌洗脓腔得以闭合, 但胸管引流时间较长。术后肺破口漏气影响肺复张往往是手术失败的主要原因, 应根据肺破口漏气情况充分引流, 必要时上、下胸腔各安放一粗胸管引流, 还可加用负压吸引。

## 【参考文献】

- [1] 徐志全, 杨怀远. 胸膜纤维板剥脱术治疗慢性结核性脓胸分析 [J]. 临床肺科杂志, 2002, 2(7): 10-11.
- [2] 席启江, 王志荣等. 简化式胸膜纤维板剥脱术治疗慢性脓胸 108 例 [J]. 中华胸心血管外科杂志, 1994, 10: 1341.
- [3] 苏志衡, 顾恺时. 胸心外科手术学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1985: 499-509.

编辑 袁天峰

收稿日期 2007-10-22; 接受日期 2007-11-08

作者简介 金哲, 本科, 副主任医师, 科主任. Tel: (0377) 63200265

Email jin\_skysnow@sohu.com