

DOI:10.13602/j.cnki.jcls.2019.09.03

抗磷脂综合征实验室检查项目的结果解读*

郭晗, 乔蕊(北京大学第三医院检验科, 北京 100191)

摘要:抗磷脂抗体(狼疮抗凝物、抗心磷脂抗体和抗 $\beta 2$ 糖蛋白 I 抗体)是诊断抗磷脂综合征的重要组成部分,但并非每个试验的阳性结果都具有相同的诊断价值,因此正确理解抗磷脂抗体试验阳性的本质内涵,对于 APS 的诊断、危险分层,进而指导个体化治疗具有重要意义。

关键词:抗磷脂综合征;抗磷脂抗体;狼疮抗凝物;抗心磷脂抗体;抗 $\beta 2$ 糖蛋白 I 抗体;抗 $\beta 2$ 糖蛋白 I 结构域 I 抗体

中图分类号:R446 **文献标志码:**A

抗磷脂综合征(antiphospholipid syndrome, APS)是一种以血栓形成和/或病态妊娠为特征,伴抗磷脂抗体(antiphospholipid antibody, aPL)持续阳性的系统性自身免疫病。根据发病原因,可分为原发性 APS(primary APS)和与其他疾病相关的 APS(APS associated with disease),后者通常发生于 SLE 等自身免疫病。

APS 的诊断需结合临床特征和实验室检查,目前根据 2006 年修订的 Sapporo 抗磷脂综合征分类标准(表 1)诊断^[1],需要同时满足至少一条临床标准和一条实验室标准。然而,APS 的发病可涉及全身各个系统,除了分类标准之内的以血栓形成为特征的血栓性 APS(thrombotic APS)和不良妊娠事件发生的产科 APS(obstetrical APS),部分患者会出现心脏瓣膜病、网状青斑、血小板减少等分类标准之外的临床表现。由此看出,APS 的临床表现复杂多样。除此之外,APS 的临床表现不特异,血栓和不良妊娠等可在其他疾病患者群中普遍存在,且可能具有多因素的病因学。因此,aPL 的检测对 APS 的诊断非常重要。然而,并非 aPL 阳性即具有重要诊断价值,如不能理解 aPL 的本质,可能出现对临床体征或症状的认识不足导致的误诊以及对 aPL 阳性过度解读而导致的过度诊断。因此,本文将从实验室的角度解读 aPL 检测的本质,并分析不同 aPL 阳性组合的危险程度,帮助临床合理诊治。

表 1 2006 年修订的 Sapporo 抗磷脂综合征分类标准^[1]

标准角度	内容
临床标准	1. 血管血栓形成 任何组织或器官发生 1 次或 1 次以上动、静脉或小血管血栓形成(浅表静脉血栓不作为诊断指标),必须有客观证据(影像学或组织病理学),组织病理学检测显示如有血栓形成,必须是血栓部位的血管壁无血管炎表现 2. 病态妊娠 1) 1 次或多次不明原因的形态学正常的胎龄 ≥ 10 周的胎儿死亡; 2) 在妊娠 34 周之前因子痫、子痫前期或胎盘功能不全所致一次或多次形态学正常的胎儿早产; 3) 连续 3 次或 3 次以上无法解释的胎龄 < 10 周的自然流产,需除外母亲生殖系统解剖异常或激素水平异常,或因母亲或父亲染色体异常等因素所致 实验室标准 1. 血浆中的 LA 阳性(按照国际 LA/磷脂依赖性抗体研究组制定的血栓和止血指南检测) 2. 采用标准化的 ELISA 检测血清或血浆中抗心磷脂抗体(aCL):中-高滴度的 IgG 和/或 IgM 型抗体阳性 3. 采用标准化的 ELISA 检测血清或血浆中抗 $\beta 2$ 糖蛋白 I 抗体($\beta 2$ GP I):中-高滴度的 IgG 和/或 IgM 型抗体阳性

注:1.至少满足一条临床标准和一条实验室标准方可诊断;2.上述实验室检测均要求间隔 12 周以上,至少 2 次或者 2 次以上阳性。

1 什么样的人群需要进行 aPL 筛查?

aPL 是一组针对阴性磷脂或者磷脂蛋白复合物的自身抗体,具有极强的异质性,根据识别抗原的特点,其可分为以下 4 类:(1)识别磷脂蛋白复合物的抗体,如辅因子依赖的抗心磷脂抗体(anticardiolipin, aCL);(2)直接识别蛋白质的抗体,如抗 $\beta 2$ 糖蛋白 I 抗体(anti- $\beta 2$ glycoprotein I, anti- $\beta 2$ GP I);(3)

* 基金项目:国家自然科学基金(81601824);北京大学第三医院临床重点项目(BYSY2017008)。
作者简介:郭晗,1995 年生,女,硕士研究生,主要从事血栓与出血研究;乔蕊,1979 年生,女,副主任技师,博士,主要从事血栓与出血研究。二者对该文具有同等贡献,同为第一作者。
通信作者:乔蕊, E-mail: qrqiaorui@163.com。

影响磷脂依赖性凝血反应的抗体,这类抗体被统称为狼疮抗凝物(lupus anticoagulant, LA);(4)直接结合磷脂的抗体^[2],如梅毒血清学试验,因为梅毒、链球菌、莱姆病等感染时,可产生大量直接针对磷脂的抗体。此外,氯丙嗪、普鲁卡因胺等药物也可诱导抗磷脂抗体表达;甚至健康人群中,aPL 阳性率也可达 5%^[3]。根据 APS 发病特点,一般认为具备表 2 特征的人群才需筛查 aPL。若患者被检出 aPL 阳性,仍需再次检测以验证,且间隔时间至少 12 周。

表 2 aPL 的筛查指征^[1-5]

序号	筛查指征
1	难以解释的静脉血栓事件
2	反复发作的血栓事件
3	非常见部位的血栓事件:肠系膜、肝静脉、颅内静脉窦血栓等
4	SLE 及其他自身免疫病合并血栓事件者
5	青年卒中(<50 岁)
6	反复流产或伴有早产的妊娠并发症
7	网状青斑或其他血栓事件相关的皮肤表现
8	难以解释的血小板减少症
9	实验室检查意外发现 APTT 延长,血清梅毒试验假阳性

2 不同 aPL 试验阳性对 APS 的诊断价值孰轻孰重?

如表 1,目前用于诊断 APS 的实验室指标是 aCL、anti-β2GP I 和 LA,这 3 种指标阳性对 APS 诊断和危险分层的意义存在差异。

2.1 aCL、anti-β2GP I 和 LA 测定结果阳性的本质内涵 由于 aPL 异质性极强,至今尚无任何一种单一检测方法足以诊断 APS,所以国际专家共识推荐 aCL(IgM 和 IgG)、anti-β2GP I (IgM 和 IgG)和 LA 联合用于诊断 APS,习惯称为 aPL 谱检测。表面上看,aPL 谱中 3 个试验针对不同抗体,实际却交错重叠,互为补充,不同排列组合阳性的检测结果本质上存在差异,了解这一点对恰当解释 aPL 谱的结果非常重要。

目前对 aCL 的检测主要采用 ELISA 和化学发光法,当试验阳性时,可能存在 2 种情况:一是直接针对心磷脂的抗体阳性;二是体内与 aCL 结合的磷脂结合蛋白(也称为辅因子)抗体阳性,辅因子以 β2GP I 为主,也可以是 C4、H 因子等生理蛋白,抗体通过结合辅因子增强与磷脂的亲合性(如图 1 所示)。因此,本质上,aCL 并不只是心磷脂的抗体,其也是 β2GP I、C4、H 因子等抗原的抗体。研究发现,结合不同靶抗原的 aCL 发挥的作用不同,直接针对心磷脂的 aCL,多在梅毒等感染时大量检出,而与血栓形成以及不良妊娠事件发生相关的主要是 β2GP I 依赖的 aCL^[6]。因此,为增加 aCL 对 APS 诊断的特异性,aCL 试剂盒目前多采用包被 β2GP I 抗原的微孔板或微球,从而提高 β2GP I 依赖的 aCL 的检出率。

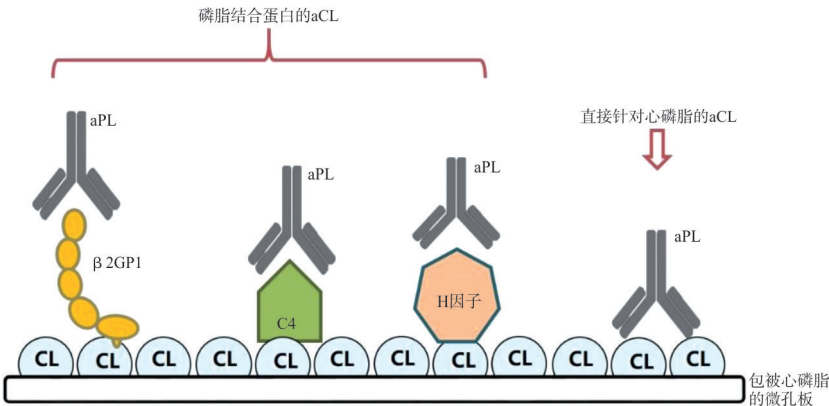


图 1 aCL 检测阳性的可能情况

LA 检测通过磷脂依赖的凝血功能试验,指南推荐至少选择 2 种磷脂依赖的凝固时间试验,目前常用的是特异性较高的稀释蝰蛇毒试验(dilute Russell's viper venom time, dRVVT)和敏感性较高的以硅土作为激活剂的凝血试验(silica clotting time, SCT),二者中任何一种试验阳性即为 LA 阳性^[4]。LA 筛查试验的磷脂浓度低,血浆中的 LA 竞争抑制凝血因子与磷脂的结合,使凝血时间延长;确认试验

加入高浓度的磷脂,从而纠正凝血时间。由此看出,LA 试验阳性的本质是提示存在干扰凝血因子与磷脂结合的抑制物,而该抑制物可以是磷脂的抗体,也可以是其他可竞争结合磷脂的物质。研究表明该抑制物主要是 β2GP I 和凝血酶原(prothrombin)介导的抗体^[6]。

那么,β2GP I 抗体为什么可以竞争结合磷脂,干扰凝血因子与磷脂结合呢?

$\beta 2\text{GP I}$, 相对分子质量(M_r)大小 50 000, 是一种可与阴性磷脂结合的糖蛋白(单独与磷脂结合时, 亲和性低), 在血液循环中浓度高, 进化高度保守, 几乎存在于所有哺乳动物中。 $\beta 2\text{GP I}$ 属于补体调节蛋白(complement control protein, CCP, CCP 结构域的功能是促进蛋白质与蛋白质相互作用)超家族, 由 5 个 CCP 结构域(domain I ~ V)构成。结构域 I、II、III 和 IV 由常规且保守的 CCP 序列组成, 结构域 V 额外含有一个二硫键和 C 端的残基, 从而富含正电荷, 对阴性磷脂具有亲和性。 $\beta 2\text{GP I}$ 有 2 种结构, 游离状态时, 结构域 I 和 V 相互作用, 形成闭合的环状, 当遇到暴露的阴性磷脂表面时, 由于结构域 V 与阴性磷脂亲和性强, 闭合环状会打开, 并形成鱼钩状结构, 锚定在阴性磷脂表面, 结构域 I 此时可完全暴露(图 2)。若体内存在抗 $\beta 2\text{GP I}$ 结构域 I 的抗体(antibody to domain 1 of $\beta 2\text{GP I}$, aD1), 由于该抗体的功能获得性(gain-of-function), 当 aD1 与结构域 I 的抗原决定簇结合, 可增强 $\beta 2\text{GP I}$ 与磷脂

的亲和性(抗体结合 $\beta 2\text{GP I}$ 二聚体, 与磷脂的亲和性增加 1 000 倍)(图 2)^[7], 从而干扰磷脂参与的生理作用。对于 anti- $\beta 2\text{GP I}$ 的检测, 目前大多通过将人源性 $\beta 2\text{GP I}$ 包被在微板, 患者血浆中的抗体直接结合蛋白从而检测出该抗体。

由此可以看出 $\beta 2\text{GP I}$ 抗体, 尤其 aD1 阳性是 aCL、anti- $\beta 2\text{GP I}$ 和 LA 均阳性的基础, 即 aPL 谱三阳(triple positivity)的本质是体内出现了可与磷脂高亲和性结合的 aD1, 所以 aD1 与 aPL 谱三阳有良好的一致性。研究发现, 将 anti- $\beta 2\text{GP I}$ 注入小鼠体内, 可增加小鼠的血栓风险^[8-9]; aD1 阳性的患者发生血栓或病态妊娠的风险增加^[10-11]; 提示 $\beta 2\text{GP I}$ 抗体参与 APS 的发病机制。然而大量临床报道, anti- $\beta 2\text{GP I}$ 与不良事件的相关性弱于 LA^[12-14], 提示必须是可与磷脂高亲和性结合的 anti- $\beta 2\text{GP I}$ 才与不良事件相关, 因为大部分 LA 试验阳性实际上是 aD1 高亲和性结合磷脂的功能表现。

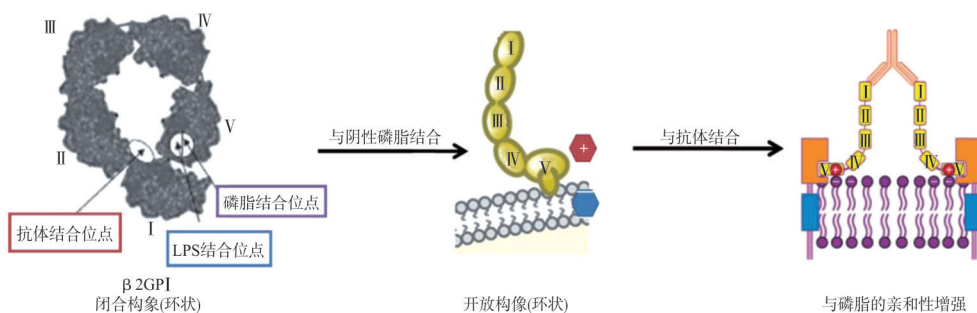


图 2 $\beta 2\text{GP I}$ 和抗 $\beta 2\text{GP I}$ 抗体

2.2 $\beta 2\text{GP I}$ 依赖的 aPL 致病机制 动物实验研究证实, 从 APS 患者中纯化的 aD1 可以引起小鼠发生血栓和胎儿丢失的表现^[15-16], 而给 aPL 诱导的 APS 小鼠模型注射 D1, 可降低小鼠出现血栓的风险^[17]。体外实验也发现, aD1 具有 LA 的活性。临床研究也进一步证实, 相比于 $\beta 2\text{GP I}$ 的其他结构域, aD1 与血栓和病态妊娠具有更强的相关性^[10-11]。其可能的致病机制: (1) aD1 与 $\beta 2\text{GP I}$ 结合锚定在阴性磷脂表面, 破坏膜联蛋白 A5 (Annexin A5) 抗凝保护屏障的完整性, 暴露阴性磷脂, 形成促凝表面; (2) aD1 与 $\beta 2\text{GP I}$ 形成的复合物, 可以与内皮细胞表面受体 Annexin A2、Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLR) 2/4、载脂蛋白 E2 (apolipoprotein E2, ApoE2) 等结合, 上调组织因子 (tissue factor, TF) 和黏附分子 (adhesion molecules, AM) 表达, 形成促凝和促炎的表现型; (3) aD1 与 $\beta 2\text{GP I}$ 形成的复合物可抑制纤溶和抗凝系统; (4) aD1 与 $\beta 2\text{GP I}$ 的复合物能直接激

活血小板, 促进凝集^[6, 18-19]。因此, $\beta 2\text{GP I}$ 介导的 aPL 致病机制主要是通过 aD1 结合 $\beta 2\text{GP I}$, 稳定其钩状构象, 促进其与靶位点的结合, 从而发挥致病作用。因此, aPL 不仅是 APS 的诊断工具, 其也参与 APS 的致病过程。

2.3 aPL 谱检测有助于 APS 的危险分层 上述论述发现, 关于 aPL 的循证医学和参与 APS 的发病机制研究都提示 aPL 谱的检测结果显示有助于 APS 的危险分层。aPL 谱中, 只有 LA 是检测 aPL 的功能性凝血试验, 所以相比于 aCL 和 anti- $\beta 2\text{GP I}$, LA 与临床事件的相关性最好, 但是 LA 的检测步骤繁琐, 要求严格, 结果报告不能标准化, 因此需要结合临床, 减少假阳性率和假阴性率。aCL 和 anti- $\beta 2\text{GP I}$ 的特异性较差, 感染或药物等因素存在时也可检测出阳性结果, 除持续表达阳性(至少间隔 12 周)外, 也应关注滴度水平, 中~高滴度 aCL 和 anti- $\beta 2\text{GP I}$ 与 aPL 介导的临床不良事件相关性更强, 另外, IgG 与

事件的相关性好于 IgM。限于目前 aPL 谱检测方法的局限性,单独一个抗体在对 APS 的诊断或者不良事件发生风险的评估上,敏感性和特异性都不尽人意,因此分析一个抗体的情况显然不够,对抗磷脂抗体谱的整体评估,才能更好地对 aPL 阳性的患者进行危险分层。根据抗体检测原理和特点,将其分为高、中、低危,具体见表 3^[3]。

表 3 抗磷脂抗体谱的危险分层^[3]

危险分层	LA	aCL	anti-β2GP I
高危	+	中~高滴度 IgG/IgM	中~高滴度 IgG/IgM
	+	-	-
中危	-	中~高滴度 IgG/IgM	中~高滴度 IgG/IgM
低危	-	低滴度 IgG/IgM	低高滴度 IgG/IgM

尽管目前仅将 aCL、anti-β2GP I 和 LA 作为 APS 的诊断试验,但其他 aPL 日益受关注,研究报道,与血栓和妊娠不良事件相关性更强的 aD1,与血栓事件显著相关的抗磷脂酰丝氨酸-凝血酶原复合物(antibody to phosphatidylserine/prothrombin, aPS/PT),能帮助对 aPL 阳性的患者进行危险分层^[20],但这些研究样本量小,多为回顾性研究,仍需多中心、前瞻性的研究。

3 LA 导致 APTT 延长,为什么 APS 却容易发生血栓?

LA 由于干扰凝血因子与磷脂的结合,所以在体外会导致 APTT 延长。但大部分 LA 阳性其本质是提示体内存在可与磷脂高亲和性结合的 β2GP I 的结构域 I 抗体。上述 aPL 介导 APS 发生的机制提示,aPL 的存在主要引起患者止血平衡向高凝方向改变(图 3),导致体内止血平衡的“第一重打击”;当出现“第二重打击”时,如感染、手术等,止血平衡将彻底被打破,导致血栓形成^[21]。动物实验也证实,aPL 诱导的血栓模型需要触发因素存在,如注射少量的 LPS 或者轻度损伤血管^[8-9]。因此,APS 的患者在严重感染时,极易多发血栓,发生多脏器衰竭,发展成灾难性的 APS(catastrophic APS,CAPS)。

4 结语

APS 的临床表现复杂多样,需要依靠阳性的 aPL 进行诊断,但并不是所有的 aPL 试验阳性结果都具有相同的诊断价值,正确理解 aPL 试验阳性的本质内涵,对于 APS 的诊断、危险分层,进而指导个体化治疗具有重要意义。

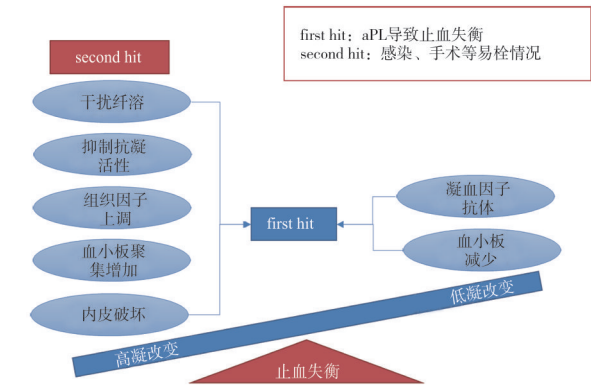


图 3 血栓形成的“二次打击学说”

5 参考文献

[1] Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, *et al.* International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS) [J]. J Thromb Haemost, 2006, 4 (2): 295-306.

[2] Houghton DE, Moll S. Antiphospholipid antibodies [J]. Vasc Med, 2017, 22(6): 545-550.

[3] Garcia D, Erkan D. Diagnosis and management of the antiphospholipid syndrome [J]. N Engl J Med, 2018, 378(21): 2010-2021.

[4] Pengo V, Tripodi A, Reber G, *et al.* Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection. Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis [J]. J Thromb Haemost, 2009, 7(10): 1737-1740.

[5] Sciascia S, Amigo MC, Roccatello D, *et al.* Diagnosing antiphospholipid syndrome: 'extra-criteria' manifestations and technical advances [J]. Nat Rev Rheumatol, 2017, 13(9): 548-560.

[6] De Groot PG, Urbanus RT. The significance of autoantibodies against β2-glycoprotein I [J]. Blood, 2012, 120(2): 266-274.

[7] De Groot PG, Meijers JCM. β2-Glycoprotein I: evolution, structure and function [J]. J Thromb Haemost, 2011, 9(7): 1275-1284.

[8] Fischetti F, Durigutto P, Pellis V, *et al.* Thrombus formation induced by antibodies to β2-glycoprotein I is complement dependent and requires a priming factor [J]. Blood, 2005, 106(7): 2340-2346.

[9] Arad A, Proulle V, Furie RA, *et al.* β2-glycoprotein-1 autoantibodies from patients with antiphospholipid syndrome are sufficient to potentiate arterial thrombus formation in a mouse model [J]. Blood, 2011, 117(12): 3453-3459.

[10] Guo H, Zhang Y, Li A, *et al.* Anti-domain 1 of β2-glycoprotein I aids risk stratification in lupus anticoagulant-positive patients [J]. Clin Exp Med, 2019, 19(3): 339-345.

[11] Pengo V, Ruffatti A, Tonello M, *et al.* Antiphospholipid syndrome: antibodies to domain 1 of β2-glycoprotein I correctly classify patients at risk [J]. J Thromb Haemost, 2015, 13(5): 782-787.

[12] Lockshin MD, Kim M, Laskin CA, *et al.* Prediction of adverse pregnancy outcome by the presence of lupus anticoagulant, but not anticardiolipin antibody, in patients with antiphospholipid antibodies [J]. Arthritis Rheum, 2012, 64(7): 2311-2318.

[13] Yelnik CM, Laskin CA, Porter TF, *et al.* Lupus anticoagulant is

the main predictor of adverse pregnancy outcomes in aPL-positive patients; validation of PROMISSE study results [J]. Lupus Sci Med, 2016, 3: e000131.

[14] Gebhart J, Posch F, Koder S, *et al.* Increased mortality in patients with the lupus anticoagulant: the Vienna Lupus Anticoagulant and Thrombosis Study (LATS) [J]. Blood, 2015, 125 (22): 3477-3483.

[15] Pericleous C, Ruiz-Limon P, Romay-Penabad Z, *et al.* Proof-of-concept study demonstrating the pathogenicity of affinity-purified IgG antibodies directed to domain I of β 2-glycoprotein I in a mouse model of anti-phospholipid antibody-induced thrombosis [J]. Rheumatology (Oxford), 2015, 54(4): 722-727.

[16] Agostinis C, Durigutto P, Sblattero D, *et al.* A non-complement-fixing antibody to β 2 glycoprotein I as a novel therapy for antiphospholipid syndrome [J]. Blood, 2014, 123(22): 3478-3487.

[17] Ioannou Y, Romay-Penabad Z, Pericleous C, *et al.* In vivo inhibition of antiphospholipid antibody-induced pathogenicity utilizing the antigenic target peptide domain I of β 2-glycoprotein I: proof of concept [J]. J Thromb Haemost, 2009, 7(5): 833-842.

[18] Meroni PL, Borghi MO, Raschi E, *et al.* Pathogenesis of antiphospholipid syndrome: understanding the antibodies [J]. Nat Rev Rheumatol, 2011, 7(6): 330-339.

[19] Giannakopoulos B, Krilis SA. The pathogenesis of the antiphospholipid syndrome [J]. N Engl J Med, 2013, 368(11): 1033-1044.

[20] Bertolaccini ML, Amengual O, Andreoli L, *et al.* 14th International Congress on Antiphospholipid Antibodies Task Force. Report on antiphospholipid syndrome laboratory diagnostics and trends [J]. Autoimmun Rev, 2014, 13(9): 917-930.

[21] Schreiber K, Sciascia S, De Groot PG, *et al.* Antiphospholipid syndrome [J]. Nat Rev Dis Primers, 2018, 4:17103.

(收稿日期:2019-06-13)
(本文编辑:王海燕)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

对一稿两投和一稿两用问题处理的声明

为维护本刊声誉和广大读者的利益,对于一稿两投和一稿两用问题的处理声明如下。

1.本声明中所说的“一稿两投”或“一稿两用”,均指同一原始研究的报告“两投”或“两用”或虽然 2 篇文稿在文字的表达和讨论的叙述上有某些不同,但其主要数据和图表是相同的。所指文稿不包括重要会议的纪要、疾病的诊断标准和防治指南、有关组织达成的共识性文件、新闻报道类文稿以及在一种刊物发表过摘要或初步报道而将全文投向另一种期刊的文稿,即:如果 1 篇文稿已以全文方式在某刊物发表,除非文种不同,否则不可再将该文投寄给他刊。

2.读者举报文稿涉嫌一稿两投时,编辑部将认真收集有关资料并仔细核实。确认属于一稿两投时,将立即进行退稿处理。

3.一稿两投或两用一经证实,本刊将择期在杂志中发布撤销该论文的声明;两年内拒绝刊登该文作者作为第一作者所撰写的一切文稿,并向作者所在单位和该领域内的其他科技期刊进行通报。

《临床检验杂志》编辑部