DOI:10.13602/j.cnki.jcls.2021.10.06

· 自身免疫病实验室检测 ·

汉族原发性胆汁性胆管炎患者抗线粒体抗体 M2 亚型抗原表位分布及其临床价值*

邱方[1,2],诸萍[2],王婵[2],江鹏[2],刘向东[2](1.南京医科大学第四附属医院检验科,南京 210031;2.东南大学生命科学与技术学院,南京 210096)

摘要:目的 探讨汉族原发性胆汁性胆管炎(PBC)患者抗线粒体抗体 M2 亚型(AMA-M2)抗原表位分布情况及其临床价值。**方法** 采用 Red/ET 重组技术制备 AMA-M2 抗原表位蛋白 PDC-E2、BCOADC-E2 和 OGDC-E2,建立相应的 ELISA 检测方法,对 374 例 PBC 患者抗原表位分布进行分析。比较 AMA-M2 主要抗原表位组合模式间清蛋白-胆红素评分(ALBI)结果的差异,熊去氧胆酸(UDCA)药物生化应答和不应答患者抗原表位分布的差异。**结果** 374 例 PBC 患者血清与 PDC-E2、BCOADC-E2 和 OGDC-E2 抗原表位有反应率分别为 86.6%、88.0%和 35.0%。与 PBC 患者血清有反应性的常见抗原表位模式(PDC-E2+BCOADC-E2+OGDC-E2、PDC-E2+BCOADC-E2、PDC-E2 和 BCOADC-E2)间 ALBI 结果的差异有统计学意义($P<0.05$),UDCA 生化不应答患者血清与 BCOADC-E2 的反应率(89.9%)高于应答患者(77.9%),差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 与 AMA-M2抗原表位 PDC-E2、BCOADC-E2 和 OGDC-E2 同时有反应性的 PBC 患者疾病预后不佳的风险较高,PDC-E2 和 BCOADC-E2抗原表位可能与 UDCA 治疗应答相关。

关键词:原发性胆汁性胆管炎;抗线粒体抗体 M2 亚型;抗原表位;清蛋白-胆红素评分;生化应答

中图分类号:R446.6 **文献标志码:**A

Distribution of antigen epitopes of anti-mitochondrial antibody M2 subtype and its clinical significance for primary biliary cholangitis patients in Chinese Han population

QIU Fang[1,2], *ZHU Ping*[2], *WANG Chang*[2], *JIANG Peng*[2], *LIU Xiangdong*[2](1. *Department of Laboratory Medicine, The Forth Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing* 210031, *Jiangsu*; 2. *Life Science and Technology College, Southeast University, Nanjing* 210096, *Jiangsu, China*)

Abstract: Objective To investigate the distribution of antigen epitopes of anti-mitochondrial antibody-M2 (AMA-M2) and its clinical value for the patients with primary biliary cholangitis (PBC) in Chinese Han population. **Methods** The epitope proteins of AMA-M2, PCD-E2, BCOADC-E2 and OGDC-E2, were prepared by RED/ET recombinant technique. An ELISA method was established to detect the distribution of epitope proteins in 374 patients with PBC. The differences of albumin-bilirubin (ALBI) score among the various patterns of the main epitopes (combined or single) of AMA-M2 were compared and the differences of the epitope distribution between biochemical responsive and non-responsive patients for ursodeoxycholic acid (UDCA) were also compared. **Results** The reaction rates of the serum samples from 374 PBC patients with the epitopes PDC-E2, BCoADC-E2 and OGDC-E2 were 86.6%, 88.0% and 35.0%, respectively. There were ofThe ALBI scores among the four common patterns of epitope (combined PDC-E2+BCOADC-E2+OGDC-E2 or PDC-E2+BCOADC-E2, single PDC-E2 or BCOADC-E2) reacted to AMA-M2 showed statistically significant differences in most of the serum samples from PBC patients ($P<0.05$). The reaction rate of the serum samples to epitope BCOADC-E2 in the patients presenting UDCA-biochemical non-response(89.9%) was higher than that in the patients with UDCA response(77.9%) with statistically significant difference ($P<0.05$). **Conclusion** The patients whose serum reacted to all the three epitopes (PDC-E2, BCOADC-E2 and OGDC-E2) of AMA-M2 antibodies have showed the high risk of poor prognosis for PBC. The epitopes of PDC-E2 and BCOADC-E2 may likely to associate with responses of UDCA treatment.

Key words: primary biliary cholangitis; anti-mitochondrial antibody-M2 subtype; antigen epitope; albumin-bilirubin score; biochemical reponse

原发性胆汁性胆管炎(primary biliary cholangitis,PBC)是一种累及肝内胆管系统的慢性进行性自身免疫病,实验室检查常见血清碱性磷酸酶(alkaline phosphatase,ALP)活性持续异常升高、抗线

* **基金项目:**江苏省自然科学基金面上项目(BK20201131)。

作者简介:邱方,1974 年生,男,副主任技师,博士,主要从事自身免疫性肝病基础和实验诊断研究,E-mail:13675107990@163.com。

粒体抗体－M2（anti mitochondrial antibody-M2, AMA-M2）阳性，病理学检查显示肝脏内非化脓性胆汁淤积和小叶间胆管炎性损伤，只要符合两点即可确诊[1-2]。熊去氧胆酸（ursodeoxycholic acid, UDCA）是美国和欧洲肝病学会推荐的 PBC 治疗唯一的一线药物，能有效改善 PBC 的自然病史，但有约 40%的患者对 UDCA 无药物生化应答[1]。多个基于生化变量的预后预测量化模型已广泛应用于 PBC 患者的风险分层管理，其中清蛋白（albumin, Alb）-胆红素（bilirubin, TBil）评分（ALBI）是近年来被用于 PBC 预后预测的新模型，被证实与 Mayo 评分等主要预后评价标准及肝脏组织学有很好的相关性[3-4]。

AMA-M2 阳性率在 PBC 中可达 90%～95%，其靶抗原是线粒体内膜上的 2－氧酸脱氢酶复合体（2-OADC），识别的抗原表位是 2-OADC 的主要组分丙酮酸脱氢酶复合体 E2（PDC-E2）、支链二酮酸脱氢酶复合体 E2（BCOADC-E2）和 2－酮戊二酸脱氢酶复合体 E2（OGDC-E2）[5]。国外学者曾对 PBC 患者上述抗原表位分布进行分析，但未进一步研究不同抗原表位的临床价值，国内也未见此类报道。本研究拟分析 374 例汉族 PBC 患者 PDC-E2、BCOADC-E2和 OGDC-E2 3 种 AMA-M2 抗原表位的分布情况，并探讨其临床价值。

1　材料与方法

1.1　标本来源　选取江苏省 PBC 研究协作组建立的 PBC 生物样本库保存的 2008 年至 2014 年有完整临床资料的汉族 PBC 患者血清标本 374 例（主要来自苏州市第五人民医院、无锡市第五人民医院、镇江市第三人民医院、南京市第二医院、东部战区总医院秦淮医疗区、常州第三人民医院），其中男 63 例，女 311 例，年龄（55.6±11.8）岁。所有纳入分析的患者均符合以下标准：（1）AMA-M2 血清学检测呈阳性；（2）生化胆汁淤积指标（如 ALP 和 TBil）异常升高；（3）各类肝炎病毒感染指标阴性；（4）无血吸虫感染史、药物性肝炎史、酒精性肝炎病史。AMA-M2 血清学检测结果均经东南大学教育部发育与疾病相关基因重点实验室建立的酶联免疫吸附法（ELISA）检测验证，该方法与商品化 AMA-M2 ELISA 试剂盒检测结果比较符合率为98.3%[6]。其中，184 例 PBC 患者有跨度在 1 年以上的多次临床资料，可用于 UDCA 药物生化应答情况的分析。

1.2　临床资料收集　计算 ALBI 评分，公式：ALBI＝$0.66\times\lg[\text{TBil}(\mu\text{mol/L})]-0.085\times[\text{Alb}(\text{g/L})]$。ALBI 分级标准：1 级，ALBI 评分≤－2.60；2 级，－2.60<ALBI 评分≤－1.39；3 级，ALBI 评分>－1.39，1、2、3 级 PBC 预后不佳的风险依次升高[3]。采用巴黎Ⅰ标准[2]对 PBC 患者进行 UDCA 生化应答分类，有生化应答的判断标准如下：UDCA 治疗 1 年后，ALP ≤ 3 × 正常上限（upper limit of normal, ULN），天冬氨酸氨基转移酶（aspartate transaminase, AST）≤2×ULN，TBil≤17.1 μmol/L。

1.3　主要仪器与试剂　96 孔酶联板（Thermo 公司），1575 洗板机、iMark 酶标仪（Bio-Rad 公司），小牛血清（BSA，Sigma 公司），辣根过氧化酶标记抗人 IgG 抗体（Millipore 公司）。pET28a 载体、GB05-Dir 大肠埃希菌（东南大学教育部发育与疾病相关基因重点实验室保存）。

1.4　PDC-E2、BCOADC-E2 和 OGDC-E2 重组蛋白的制备　采用 Red/ET 重组技术制备 PDC-E2、BCOADC-E2 和 OGDC-E2 重组蛋白[6-7]。应用 Primer Premier 3.0 软件设计含 Red/ET 重组同源臂的引物，引物序列见表 1，由南京金斯瑞公司合成。以 HepG2 细胞 cDNA 为模板，用 PCR 技术扩增 PDC-E2 cDNA（1 686 bp）、BCOADC-E2 cDNA（1 260 bp）和 OGDC-E2 cDNA（1 161 bp）。采用 Red/ET 重组技术将扩增的 cDNA 与 pET28a 载体共同转入 GB05-Dir 大肠埃希菌中，送南京金斯瑞公司进行 Sanger 法基因测序比对后，将正确的克隆导入大肠埃希菌 BL21 中大量诱导表达，获得 N 端带有 6-His 标签的 PDC-E2、BCOADC-E2 和 C 端带有 6-His 标签的 OGDC-E2 重组蛋白。经 Ni-NTA 凝胶纯化后，采用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳（sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE）检测鉴定。

1.5　ELISA 方法的建立　分别以 PDC-E2（100 ng）、BCOADC-E2（100 ng）和 OGDC-E2（300 ng）为靶抗原，4 ℃过夜包被酶联板，次日使用 1575 洗板机，用磷酸盐吐温缓冲液（PBST）洗板 4 次。用 1%小牛血清（BSA）封闭酶联板反应孔，室温放置 2 h 后，用 PBST 洗板 4 次。待测样本用 1%BSA 按1∶1 000稀释，取 100 μL 加入反应孔，经室温温育 1 h 后用 PBST 洗板 5 次。用 1%BSA 按 1∶50 000稀释辣根过氧化酶标记抗人 IgG 抗体，取 100 μL 加入反应孔，经室温温育 1 h 后用 PBST 洗板 5 次，分别加入底物 B（过氧化氢溶液）和底物 A（四甲基联苯胺溶液）各 50 μL，室温放置 20 min，

加入终止液(H_2SO_4 溶液)50 μL,用 iMark 酶联仪测定 450 nm 波长处吸光度值(A 值)。结果判定:分别测定 20 例 AMA-M2 阴性的健康人血清,计算 A 均值和标准差(s),以 A 均值+3s 为 cut-off 值,大于 cut-off 值判定为有反应性。

表 1　各抗原表位蛋白 cDNA PCR 扩增引物

抗原表位	引物序列(5′→3′)
PDC-E2	F:CAGCCATCATCATCATCATCACGGATCCAGTCTTCCCCCGCATCAGAA
	R:TGCTCGAGTGCGGCCGCAAGCTTCATTACAACAACATAGTGATAG
BCOADC-E2	F:CATCATCATCATCATCACGGATCCGGACAGGTTGTTCAGTTCAA
	R:GTGGTGGTGGTGGTGCTCGAGTTCAATCTAGTAGCATAAAAGCTGG
OGDC-E2	F:ACTTTAAGAAGGAGATATACCATGGATGACTTGGTTACAGTC
	R:GTGGTGGTGGTGGTGCTCGAGAAGATCCAGGAGGAGGACTCTG

注:下划线是连接的同源臂。

1.6　统计学分析　用 SPSS 22.0 软件进行统计分析。计量资料中多组数据比较采用 K-W 检验,两组间数据比较采用 Mann-Whitney U 检验;分类变量比较采用 Pearson 卡方检验。以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　PDC-E2、BCOADC-E2 和 OGDC-E2 重组蛋白的鉴定　SDS-PAGE 结果见图 1。

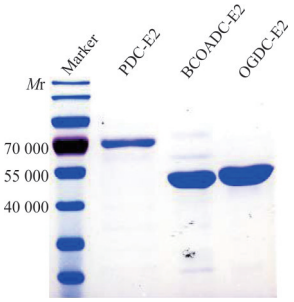


图 1　SDS-PAGE 鉴定纯化后 3 种 AMA-M2 抗原表位的重组蛋白

2.2　3 种 AMA-M2 抗原表位与 PBC 患者血清反应性的分布情况　ELISA 测定抗 PDC-E2、BCOADC-E2和 OGDC-E2 重组蛋白的 cut-off 值分别为 0.332、0.359 和 0.257。374 例 PBC 患者血清与 PDC-E2、BCOADC-E2 和 OGDC-E2 3 个抗原表位有反应性的比例分别为 86.6%(324/374)、88.0%(329/374)和 35.0%(131/374),有 3 例与 3 个抗原表位均无反应性,但其 AMA-M2 检测结果为阳性。PBC 患者血清对 PDC-E2+BCOADC-E2+OGDC-E2、PDC-E2 + BCOADC-E2、PDC-E2、BCOADC-E2、PDC-E2 + OGDC-E2、BCOADC-E2 + OGDC-E2 和 OGDC-E2有反应性的例数分别为 119、164、33、43、8、3 和 1 例,PDC-E2 + BCOADC-E2 + OGDC-E2、PDC-E2 + BCOADC-E2、PDC-E2、BCOADC-E2 是 PBC 患者血清有反应性的常见抗原表位反应模式,分别以 A、B、C 和 D 模式表示。

2.3　常见抗原表位反应模式间 PBC 患者 ALBI 分级结果的比较　根据 ALBI 公式计算 PBC 患者的评分结果,按照分级标准分为 ALBI-1、2、3 级。4 种常见抗原表位反应模式间 A 模式 ALBI-1 患者比例低于 C 和 D 模式,ALBI-3 级患者比例高于 C 和 D 模式,差异有统计学意义(χ^2 分别为 14.174 和 14.167,P 均<0.05)。B 模式 ALBI-1 级患者的比例低于 C 和 D 模式,差异有统计学意义(χ^2 分别为 10.350 和 9.510,P 均<0.05)。见表 2。

表 2　常见抗原表位反应模式间 PBC 患者 ALBI 分级情况比较[n(%)]

反应模式	ALBI-1 级	ALBI-2 级	ALBI-3 级
A 模式(n=119)*	28(23.5)	66(55.5)	25(21.0)
B 模式(n=164)**	47(28.7)	95(57.9)	22(13.4)
C 模式(n=33)	19(57.6)	11(33.3)	3(9.1)
D 模式(n=43)	23(53.5)	17(39.5)	3(7.0)
χ^2		16.243	
P 值		0.013	

注:*,A 模式与 C 模式比较,χ^2=14.174,P=0.001;A 模式与 D 模式比较,χ^2=14.167,P=0.001;**,B 模式与 C 模式比较,χ^2=10.350,P=0.006;B 模式与 D 模式比较,χ^2=9.510,P=0.009。

2.4　UDCA 生化应答和不应答患者间 3 种抗原表位分布比较　采用巴黎Ⅰ标准对有治疗 1 年前后生化检验结果的 184 例患者进行 UDCA 药物生化应答分类,应答和不应答患者各有 95 例和 89 例,药物应答比例为 51.6%。不应答患者血清与 BCOADC-E2的反应率(89.9%)高于不应答者(77.9%),差异有统计学意义(P<0.05),见表 3。C 模式中不应答患者的比例高于 A、B 和 D 模式,差异有统计学意义(χ^2 分别为 5.096、9.403 和 7.993,P 均< 0.05),见表 4。

表 3　应答和不应答患者间抗原表位反应率比较

组别	抗 PDC-E2 (%)	抗 BCOADC-E2 (%)	抗 OGDC-E2 (%)
应答组(n=95)	93.7	77.9	37.9
不应答组(n=89)	89.9	89.9	37.1
χ^2	0.885	4.843	0.013
P 值	0.341	0.028	0.909

表 4　常见抗原表位反应模式间应答和不应答患者分布比较[n(%)]

组别	应答患者	不应答患者
A 模式(n=64)	29(45.3)	35(54.7)
B 模式(n=78)	43(55.1)	35(44.9)
C 模式#(n=22)	4(18.2)	18(81.8)
D 模式(n=12)	8(66.7)	4(33.3)
χ^2	11.285	
P 值	0.010	

注：#，C 模式与 A 模式比较，χ^2 = 5.096，P=0.024；C 模式与 B 模式比较，χ^2=9.403，P=0.002；C 模式与 D 模式比较，χ^2=7.993，P=0.005。

3　讨论

上世纪 60 年代 Walker 等发现 PBC 患者血清中存在 AMA，80 年代 Gershwin 等发现并成功克隆 AMA 的抗原表位 PDC-E2，90 年代进一步确认BCOADC-E2 和 OOGDC-E2 也是 AMA 的抗原表位[8]。

欧美学者采用免疫印迹法检测 PBC 患者血清与 PDC-E2、BCOADC-E2 和 OGDC-E2 的反应率分别为 81.7%、59.1%和 27.4%[9]，与本研究结果的 86.6%、88.0%和 35.0%有一定的差异，尤其是 BCOADC-E2。本研究采用的 BCOADC-E2 是全长片段，Leung 等[10]认为 AMA-M2 的结合能力与 BCOADC-E2 肽段的长度呈正相关，这可能是导致结果差异的主要原因。PBC 患者血清与 3 个抗原表位的反应模式共有 7 种，本研究结果表明汉族 PBC 患者以 PDC-E2+BCOADC-E2+OGDC-E2(A 模式)、PDC-E2+BCOADC-E2(B 模式)、PDC-E2(C 模式)和 BCOADC-E2(D 模式)4 种反应模式为主。分析抗原表位与 PBC 预后不佳的风险程度的关系表明，PBC 预后不佳高风险级的 ALBI-3 级患者在 A、B、C 和 D 模式中的比例依次降低，其中 A 与 C、D 模式的差异均具有统计学意义，提示不同抗原表位对 PBC 预后的影响存在叠加效应，与 PDC-E2、BCOADC-E2 和 OGDC-E2 3 个抗原表位同时有反应性的 PBC 患者疾病预后不佳的风险较高。

本研究采用被美国肝病学会认为最简单有效的巴黎Ⅰ标准对 PBC 患者 UDCA 生化应答进行分类[2]，并分析应答和不应答患者血清与 3 个 AMA-M2抗原表位和常见抗原表位反应模式分布的差异，结果表明不应答患者对 BCOADC-E2 的反应率明显高于应答组，但应答组的阳性率也高达 77.9%。本研究结果还显示仅与 BCOADC-E2 有反应的 UDCA 应答 PBC 患者比例是不应答患者的 2 倍，仅与 PDC-E2 有反应的不应答患者比例则远高于应答患者，而与 3 个或 2 个抗原表位同时有反应性的应答和不应答患者的比例相差却不明显。提示 BCOADC-E2 和 PDC-E2 抗原表位可能与 UDCA 应答相关，但可能存在交互作用。在今后的研究中需要通过定量方法确定 2 类患者血清与 BCOADC-E2和 PDC-E2 反应强度的差异，并跟踪其反应强度及肝功能生化指标的动态变化，分析其与 UDCA 疗效的相关性。

4　参考文献

[1] Terziroli Beretta-Piccoli B, Mieli-Vergani G, Vergani D, *et al*. The challenges of primary biliary cholangitis: What is new and what needs to be done? [J]. J Autoimmun, 2019, 105: 102328.

[2] Lindor KD, Bowlus CL, Boyer J, *et al*. Primary biliary cholangitis: 2018 practice guidance from the American association for the study of liver diseases[J]. Hepatology, 2019, 69(1): 394-419.

[3] Chan AW, Chan RC, Wong GL, *et al*. New simple prognostic score for primary biliary cirrhosis: Albumin-bilirubin score[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2015, 30(9): 1391-1396.

[4] Ito T, Ishigami M, Morooka H, *et al*. The albumin-bilirubin score as a predictor of outcomes in Japanese patients with PBC: an analysis using time-dependent ROC[J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 17812.

[5] Bassendine MF, Jones DE, Yeaman SJ. Biochemistry and autoimmune response to the 2-oxoacid dehydrogenase complexes in primary biliary cirrhosis[J]. Semin Liver Dis, 1997, 17(1): 49-60.

[6] 诸萍. 中国汉族人群原发性胆汁性肝硬化的临床特点及易感基因 TNFSF15 的研究[D]. 南京：东南大学, 2016: 13-15.

[7] Zhang Y, Muyrers JP, Testa G, *et al*. DNA cloning by homologous recombination in *Escherichia coli*[J]. Nat Biotechnol, 2000, 18(12): 1314-1317.

[8] Selmi C, Bowlus CL, Gershwin ME, *et al*. Primary biliary cirrhosis [J]. Lancet, 2011, 377(9777): 1600-1609.

[9] Moteki S, Leung PS, Coppel RL, *et al*. Use of a designer triple expression hybrid clone for three different lipoyl domain for the detection of antimitochondrial autoantibodies[J]. Hepatology, 1996, 24(1): 97-103.

[10] Leung PS, Chuang DT, Wynn RM, *et al*. Autoantibodies to BCOADC-E2 in patients with primary biliary cirrhosis recognize a conformational epitope[J]. Hepatology, 1995, 22(2): 505-513.

（收稿日期：2021-06-20）

（本文编辑：刘群）