

自身免疫性肝病相关自身抗体的检测和临床意义

陈欣欣 张海萍 闫惠平*

首都医科大学附属北京佑安医院 临床检验中心/自身免疫性肝病临床研究中心(100069)

摘要 自身免疫性肝病(AILD)是一组由自身免疫异常导致的肝脏疾病,患者血清中通常存在一种或多种自身抗体,自身抗体的检测已成为 AILD 诊断和鉴别诊断的重要工具。由于各级医师认识水平的不同、医院检测方法和项目组合多样,在自身抗体结果的解读方面目前尚有一些困惑。本文主要对 AILD 的自身抗体检测方法及其临床意义作一简单概述,以有助于临床对自身抗体意义的解读。

关键词 自身免疫性肝炎; 原发性胆汁性胆管炎; 原发性硬化性胆管炎; 自身抗体; 诊断

Detection and Clinical Significance of Autoantibodies in Autoimmune Liver Diseases CHEN Xinxin, ZHANG Haiping, YAN Huiping. *Clinical Laboratory Center/Clinical Research Center for Autoimmune Liver Disease, Beijing Youan Hospital, Capital Medical University, Beijing (100069)*

Correspondence to: YAN Huiping, Email: yhp503@126.com

Abstract Autoimmune liver diseases (AILD) are a group of chronic liver disease induced by autoimmune disorders, one or multiple autoantibodies usually present in AILD patients, and detection of autoantibodies has become an important tool for the diagnosis and differential diagnosis of AILD. For some reasons, such as the differences of physicians' understanding for autoantibodies, the diversity of methodology and combination of items detected in different hospitals, there are still some puzzles in interpretation of results of autoantibodies. In this article, the detection of autoantibodies in AILD is discussed along with their clinical significance to help the clinical interpretation of the significance of autoantibodies.

Key words Autoimmune Hepatitis; Primary Biliary Cholangitis; Primary Sclerosing Cholangitis; Autoantibodies; Diagnosis

自身免疫性肝病(autoimmune liver diseases, AILD)是一组由自身免疫异常导致的肝脏疾病,包括自身免疫性肝炎(autoimmune hepatitis, AIH)、原发性胆汁性胆管炎(primary biliary cholangitis, PBC)、原发性硬化性胆管炎(primary sclerosing cholangitis, PSC)以及其中两种疾病之间的重叠综合征。AILD起病隐匿,自然病程差异大,可逐渐进展为肝纤维化、肝硬化甚至肝癌,严重威胁患者的生命。AILD的发病率在我国尚缺乏系统的流行病学报道。

近年来,随着自身抗体检测水平的提高、特异性和敏感性更高的检测学方法的使用和优化以及临床医师认识水平的提升,AILD患者检出率呈快速增加的趋势。自身抗体作为自身免疫性疾病的“预警”因子,其价值不仅体现在疾病诊断上,可能在发

现早期病例、评价疗效、预后判断等方面亦具有重要的临床意义。本文主要对近年 AILD 相关自身抗体的检测及其临床意义作一概述。

一、AIH

AIH 是一种由针对肝细胞的自身免疫反应介导的肝脏实质炎症。大多数 AIH 患者血清中存在一种或多种自身抗体,根据自身抗体的不同,AIH 一般分为两种类型:1 型 AIH 以抗核抗体(anti-nuclear antibody, ANA)和抗平滑肌抗体(anti-smooth muscle antibody, ASMA)阳性为主,抗肌动蛋白抗体或抗可溶性肝抗原/肝胰抗原抗体(anti-soluble liver antigen/liver pancreas antigen, 抗 SLA/LP)亦可阳性,多见于成人;2 型 AIH 以抗肝肾微粒体抗体(anti-liver kidney microsomal antibody, 抗 LKM)-1 和(或)抗肝细胞溶质抗原 I 型抗体(anti-liver cytosol type 1, 抗 LC-1)阳性为标志,多见于儿童和青少年。与 1 型 AIH 相比,2 型 AIH 往往表现出更

严重的疾病进展^[1]。

1. ANA: ANA 是血清中最先发现的 AIH 自身抗体,是 1 型 AIH 的血清学标记物,70% ~ 80% 的 1 型 AIH 患者 ANA 阳性,但该抗体并不具有特异性,其在多种肝脏疾病、非肝脏自身免疫性疾病以及部分健康老年人群中均可出现。ANA 常与 ASMA 同时出现,也可单独出现,高滴度 ANA 可提示 1 型 AIH。间接免疫荧光法是 ANA 的首选检测方法,一般以 HEP-2 细胞作为检测基质^[2],检测 ANA 的总抗体。ANA 的荧光模型表现多样,主要为核均质型(34% ~ 58%)、颗粒型(21% ~ 34%)和混合核型。对于间接免疫荧光法检测 ANA 阳性或 ANA 阴性但临床高度疑似 AILD 的患者,建议进一步利用 ELISA 或免疫印迹法检测 ANA 中的特异性抗体(如 dsDNA、SSA、gp210 等),以便帮助临床医师进行诊断和鉴别诊断^[3]。

尽管 ANA 的滴度和荧光模型在 AIH 不同的疾病阶段有所变化,但尚未见 ANA 与疾病进程和预后关系的报道,目前仅能将 ANA 作为诊断指标之一。

2. ASMA: ASMA 亦是 1 型 AIH 患者中常见的抗体,同样缺乏诊断疾病的特异性。ASMA 常与 ANA 同时出现,也可单独出现,高滴度 ASMA 提示 AIH,而低滴度常出现于病毒性肝炎患者中。间接免疫荧光法是 ASMA 首选的检测方法。有研究指出,ASMA 抗体滴度 $\geq 1: 80$,并表现为某种特征性荧光模型时,诊断 AIH 的可能性为 80%^[4]。

ASMA 与多种细胞骨架成分包括微丝(F-actin 和 G-actin)、中间丝以及微管反应,其中 F-actin 抗体在 1 型 AIH 患者中的检出率较高(41%),与 ASMA 联合检测有助于提高 AIH 的诊断率。Couto 等^[5]的研究发现,持续存在的 ASMA($> 1: 80$,间接免疫荧光法)和抗 F-actin($> 1: 40$,ELISA 法)与 1 型 AIH 患者的血清生化指标(分别为 76.9% 和 79.8%)和组织学特征(分别为 100% 和 100%)呈显著相关性($P < 0.001$)。ASMA(1: 80)和 F-actin(1: 40)与 1 型 AIH 患者的血清生化学和组织学疾病活动有关,并预示着治疗失败率较高^[3]。

3. 抗 SLA/LP 抗体: 抗 SLA/LP 抗体是 1 型 AIH 最具特异性的自身抗体(约 100%),但检出率低(我国约 6%,欧美国家相对较高,约 30%),几乎仅见于 AIH 患者中,具有较高的诊断价值。抗 SLA/LP 抗体的靶抗原为 SepSecS。利用间接免疫

荧光法检测抗 SLA/LP 抗体的敏感性和特异性均不理想,EASL-AIH 指南推荐,可应用基于重组抗原的方法(如 ELISA、免疫印迹法)进行检测^[6]。

抗 SLA/LP 抗体阳性与 AIH 的疾病严重程度存在一定联系,其组织学改变更严重,复发率、肝移植率和死亡率更高^[7]。Chen 等^[8]对包括美国、德国、日本在内的 8 个研究中心的 1 297 例 AIH 患者行 meta 分析发现,与抗 SLA/LP 抗体阴性患者相比,阳性患者肝脏死亡风险增加 3 倍以上,治疗复发风险增加近 2 倍。抗 SLA/LP 抗体对疾病的影响机制尚不清楚,1 型 AIH 患者中抗 Ro52 抗体常与抗 SLA/LP 抗体同时存在(约 96%)^[9],推测抗 SLA/LP 抗体对疾病的不良结局可能与抗 Ro52 抗体同时存在相关,但结论还有待进一步验证。

4. 抗 LKM 抗体: 抗 LKM 抗体包括三种亚型: 抗 LKM-1 抗体、抗 LKM-2 抗体和抗 LKM-3 抗体。抗 LKM-1 抗体为 2 型 AIH 的血清标记性抗体,敏感性为 90%,但在 AIH 中检出率很低,也可与抗 LC-1 同时存在。通常使用间接免疫荧光法检测抗 LKM 总抗体,阳性结果应进一步利用特异性重组抗原方法(如 ELISA、免疫印迹法)确认抗 LKM 亚型抗体,也可直接应用免疫印迹法或 ELISA 法定性或相对定量地检测抗 LKM 抗体的亚型。

但抗 LKM-1 抗体在少数慢性丙型肝炎(HCV)患者中呈阳性。韩莹等^[10]对北京佑安医院多年积累的 15 例抗 LKM-1 抗体阳性患者进行分析,7 例诊断为 2 型 AIH,8 例为 HCV。抗 LKM-1 抗体的靶抗原为 CYP2D6,CYP2D6 与 HCV 蛋白之间存在同源序列,可能是 HCV 患者抗 LKM-1 抗体阳性的分子基础,使 HCV 患者从基因角度通过分子模拟机制对 AIH(DRB1 * 07 阳性)易感^[6]。抗 LKM-1 抗体阳性的 AIH 患者多有典型的自身免疫现象,且多为青年女性,自身抗体滴度较高,病情相对较重^[11]。

5. 抗 LC-1 抗体: 抗 LC-1 抗体是 2 型 AIH 的另一个标记性抗体。高滴度的抗 LC-1 抗体可提示 2 型 AIH。抗 LC-1 抗体常与抗 LKM-1 抗体同时存在,在 10% 的 2 型 AIH 患者中,抗 LC-1 抗体是惟一可检测到的自身抗体,且诊断特异性优于抗 LKM-1 抗体,当抗 LC-1 抗体与抗 LKM 抗体同时存在时,其荧光信号易被抗 LKM 抗体掩盖,因此抗 LC-1 抗体常用 ELISA 或免疫印迹法进行检测。有研究指出,抗 LC-1 抗体与 AIH 的疾病活动度和进展有关^[6,12]。但基于笔者

数年的临床经验发现,此抗体在肝病中极为罕见,国内亦罕见文献报道。故上述研究结果尚待证实。

二、PBC

PBC 是一种以肝内小胆管病变为主的 AILD。PBC 患者存在的自身抗体主要分为两类,即抗线粒体抗体 (anti-mitochondrial antibody, AMA) 类和 ANA 类。其中,AMA 是临床诊断 PBC 的重要血清学标记物^[13]。

1. AMA:AMA 是诊断 PBC 的标记性自身抗体,阳性率为 90%~95%。但在某些地区的正常人群、乙型肝炎患者和部分肝内胆汁淤积疾病中亦可伴随 AMA 阳性^[14-15]。根据不同的靶抗原,AMA 分为 9 个亚类,即 M1~M9。其中,AMA-M2 与 PBC 的关联度最高,95% 的 PBC 患者中可检出高滴度 IgG 型 AMA-M2。一般采用间接免疫荧光法检测 AMA 总抗体,而 AMA-M2 可由 ELISA、免疫印迹、化学发光法等多种方法进行检测。Dährich 等^[16]的研究将纯化 PDC 和 MIT3 的混合物 (M2-3E) 作为靶抗原,建立了较为敏感的 ELISA 法,其 M2-3E ELISA 检测敏感性 (93.6%) 高于 MIT3-ELISA (91.3%)、纯化 PDC-ELISA (83.8%) 或间接免疫荧光 (87.3%) 的敏感性,各检测方法的特异性均为 98.8%。由于不同方法学之间存在的差异、包被抗原的不同,笔者建议对疑似“AMA 抗体阴性的 PBC 患者”,应采用不同方法学检测 AMA 和 AMA-M2,排除各种干扰因素后作出诊断。

2. ANA:与 AIH 不同的是,PBC 患者表现出疾病特异性 ANA,间接免疫荧光法的荧光模型一般为核点型和核周型,免疫印迹或 ELISA 法可检测到抗 sp100 (核点型 ANA 的靶抗原之一) 或抗 gp210 (核周型 ANA 的靶抗原之一) 阳性。这些特异性 ANA 对 PBC 的诊断 (尤其是 AMA 阴性 PBC) 以及评估疾病进展、治疗、预后具有重要临床意义^[17-18]。

①抗 gp210 抗体:抗 gp210 抗体是 PBC 高度特异性的抗体,诊断 PBC 的敏感性约为 10%~41%,而特异性 >95%。抗 gp210 抗体可与 AMA 同时出现,也存在于 AMA 阴性的 PBC 患者中,因此,抗 gp210 抗体可作为 AMA 阴性 PBC 患者的辅助诊断指标。文献报道,抗 gp210 抗体与更严重的胆汁淤积症和长期预后更差相关^[19-20]。多项日本队列研究^[21-23]发现,抗 gp210 抗体滴度可随 PBC 疾病活动度或病情进展而由阴性变为阳性,反之亦然;抗

gp210 抗体阳性与组织学有关,与更严重的界面性肝炎、小叶性炎症和导管反应相关;抗 gp210 抗体持续阳性是疾病进展至终末期肝功能衰竭 (黄疸型进展) 的重要危险因素。

②抗 sp100 抗体:抗 sp100 抗体是对 PBC 具有较高敏感性和特异性的自身抗体,阳性率为 10%~30%。抗 sp100 抗体在 AMA 阴性 PBC 患者中的阳性率 (60%) 显著高于 AMA 阳性者 (20%),故对 AMA 阴性 PBC 患者更具有辅助诊断意义。研究发现欧洲人群中抗 sp100 抗体阳性与疾病严重程度和预后不良有关^[24],但结论还有待在其他种族人群中验证。

三、PSC

PSC 是一种以特发性肝内外胆管炎性反应和纤维化导致的多灶性胆管狭窄为特征、慢性胆汁淤积病变为主要临床表现的 AILD^[25]。PSC 患者血清中含有多种自身抗体,但大多数抗体对 PSC 的特异性较低,仅抗中性粒细胞胞浆抗体 (anti-neutrophil cytoplasmic antibody, ANCA) 的特异性相对较高 (42%~93%),间接免疫荧光法检测 ANCA 可见两种荧光模型,分别为细胞浆型 ANCA (cANCA) 和核周型 ANCA (pANCA),后者又进一步分为典型 pANCA 和不典型 pANCA。约 80% 的 PSC 患者存在不典型 pANCA^[26]。目前,ANCA 作为 PSC 辅助诊断的作用有限,亦不能作为疗效观察的指标^[27]。影像学检查对诊断 PSC 具有更重要的作用。

四、小结

自身抗体是 AILD 主要的诊断指标之一。随着免疫发病机制研究的深入以及免疫学、分子生物学技术的快速发展,未来会有更多特异性强、敏感性高的标记物问世,为 AILD 的临床诊断、治疗和预后评估提供更多科学依据。

参考文献

- 1 Sener AG. Autoantibodies in autoimmune liver diseases[J]. APMIS, 2015, 123 (11): 915-919.
- 2 Chan EK, Damoiseaux J, Carballo OG, et al. Report of the First International Consensus on Standardized Nomenclature of Antinuclear Antibody HEp-2 Cell Patterns 2014-2015 [J]. Front Immunol, 2015, 6: 412.
- 3 中华医学会肝病学分会;中华医学会消化病学分会;中华医学会感染病学分会. 自身免疫性肝炎诊断和治疗共识(2015)[J]. 中华肝脏病杂志, 2016, 24 (1): 23-35.

- 4 Strassburg CP, Manns MP. Autoantibodies and autoantigens in autoimmune hepatitis [J]. *Semin Liver Dis*, 2002, 22 (4): 339-352.
- 5 Couto CA, Bittencourt PL, Porta G, et al. Antismooth muscle and antiactin antibodies are indirect markers of histological and biochemical activity of autoimmune hepatitis [J]. *Hepatology*, 2014, 59 (2): 592-600.
- 6 European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: Autoimmune hepatitis [J]. *J Hepatol*, 2015, 63 (4): 971-1004.
- 7 Ma Y, Okamoto M, Thomas MG, et al. Antibodies to conformational epitopes of soluble liver antigen define a severe form of autoimmune liver disease [J]. *Hepatology*, 2002, 35 (3): 658-664.
- 8 Chen ZX, Shao JG, Shen Y, et al. Prognostic Implications of Antibodies to Soluble Liver Antigen in Autoimmune Hepatitis: A PRISMA-Compliant Meta-Analysis [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2015, 94 (23): e953.
- 9 Montano-Loza AJ, Shums Z, Norman GL, et al. Prognostic implications of antibodies to Ro/SSA and soluble liver antigen in type 1 autoimmune hepatitis [J]. *Liver Int*, 2012, 32 (1): 85-92.
- 10 韩莹, 闫惠平, 廖慧钰, 等. 抗肝肾微粒体抗体在肝病患者中的临床意义评价 [J]. *中华肝脏病杂志*, 2017, 25 (11): 852-857.
- 11 Terziroli Beretta-Piccoli B, Mieli-Vergani G, Vergani D. Serology in autoimmune hepatitis: A clinical-practice approach [J]. *Eur J Intern Med*, 2018, 48: 35-43.
- 12 Mitra S, Minz RW. Autoantibodies in Autoimmune Liver Diseases-Methods of Detection and Interpretation: An Update for the Reporting Pathologist [J]. *Int J Surg Pathol*, 2016, 24 (7): 576-585.
- 13 中华医学会肝病学分会; 中华医学会消化病学分会; 中华医学会感染病学分会. 原发性胆汁性肝硬化(又名原发性胆汁性胆管炎)诊断和治疗共识(2015) [J]. *临床肝胆病杂志*, 2015, 31 (12): 1980-1988.
- 14 European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: The diagnosis and management of patients with primary biliary cholangitis [J]. *J Hepatol*, 2017, 67 (1): 145-172.
- 15 张海萍, 闫惠平, 张欣, 等. 全自动 ELISA 系统检测抗线粒体 M2 抗体及临床意义 [J]. *检验医学*, 2015, 30 (12): 1234-1237.
- 16 Dähnrich C, Pares A, Caballeria L, et al. New ELISA for detecting primary biliary cirrhosis-specific antimitochondrial antibodies [J]. *Clin Chem*, 2009, 55 (5): 978-985.
- 17 闫惠平, 张海萍, 陈欣欣. 如何认识原发性胆汁性胆管炎自身抗体的临床意义 [J]. *中华肝脏病杂志*, 2017, 25 (11): 810-813.
- 18 de Liso F, Matinato C, Ronchi M, et al. The diagnostic accuracy of biomarkers for diagnosis of primary biliary cholangitis (PBC) in anti-mitochondrial antibody (AMA)-negative PBC patients: a review of literature [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2017, 56 (1): 25-31.
- 19 Yang F, Yang Y, Wang Q, et al. The risk predictive values of UK-PBC and GLOBE scoring system in Chinese patients with primary biliary cholangitis: the additional effect of anti-gp210 [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2017, 45 (5): 733-743.
- 20 Lleo A, Marzorati S, Anaya JM, et al. Primary biliary cholangitis: a comprehensive overview [J]. *Hepatol Int*, 2017, 11 (6): 485-499.
- 21 Nakamura M, Shimizu-Yoshida Y, Takii Y, et al. Antibody titer to gp210-C terminal peptide as a clinical parameter for monitoring primary biliary cirrhosis [J]. *J Hepatol*, 2005, 42 (3): 386-392.
- 22 Nakamura M, Kondo H, Mori T, et al. Anti-gp210 and anti-centromere antibodies are different risk factors for the progression of primary biliary cirrhosis [J]. *Hepatology*, 2007, 45 (1): 118-127.
- 23 Nakamura M, Yasunami M, Kondo H, et al; PBC Study Group in NHOSLJ. Analysis of HLA-DRB1 polymorphisms in Japanese patients with primary biliary cirrhosis (PBC): The HLA-DRB1 polymorphism determines the relative risk of antinuclear antibodies for disease progression in PBC [J]. *Hepatol Res*, 2010, 40 (5): 494-504.
- 24 Mytilinaou MG, Meyer W, Scheper T, et al. Diagnostic and clinical utility of antibodies against the nuclear body promyelocytic leukaemia and Sp100 antigens in patients with primary biliary cirrhosis [J]. *Clin Chim Acta*, 2012, 413 (15-16): 1211-1216.
- 25 中华医学会肝病学分会; 中华医学会消化病学分会; 中华医学会感染病学分会. 原发性硬化性胆管炎诊断和治疗专家共识(2015) [J]. *中华传染病杂志*, 2016, 34 (8): 449-458.
- 26 Csernok E, Moosig F. Current and emerging techniques for ANCA detection in vasculitis [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2014, 10 (8): 494-501.
- 27 Sirpal S, Chandok N. Primary sclerosing cholangitis: diagnostic and management challenges [J]. *Clin Exp Gastroenterol*, 2017, 10: 265-273.