

• 论 著 •

B 细胞激活因子水平 ELISA 检测方法的建立及临床初评

周 琳,屠小卿,朱 烨,刘海英,陆慧琦,候晓菁,陈 洁,谭龙益,孔宪涛,仲人前*

(第二军医大学长征医院实验诊断科,上海 200003)

[摘要] **目的:**建立血清 B 细胞激活因子(B lymphocyte stimulator, BlyS)水平的 ELISA 检测方法,并初步探讨其临床价值。**方法:**以商品化的抗人 BlyS 单克隆抗体、生物素化抗人 BlyS 多克隆抗体,采用双抗夹心法自行建立 BlyS 血清水平的 ELISA 检测方法;并对 80 例风湿性疾病患者[50 例系统性红斑狼疮(SLE)、20 例类风湿性关节炎(RA)、10 例干燥综合征(SS)]、60 例自身免疫性肝病患者[35 例原发性胆汁性肝硬化(PBC)、25 例自身免疫性肝炎(AIH)]和 40 例正常人的血清 BlyS 水平进行检测。**结果:**成功建立血清 BlyS 水平的 ELISA 检测法且重复性较好,80 例风湿性疾病患者的血清 BlyS 水平为 (8.23 ± 1.42) ng/ml,60 例自身免疫性肝病患者的血清 BlyS 水平为 (3.40 ± 0.79) ng/ml,40 例正常人的血清 BlyS 水平为 (3.19 ± 0.88) ng/ml。与正常人相比,风湿性疾病组的 BlyS 血清水平明显升高($P < 0.01$),而自身免疫性肝病组的 BlyS 血清水平升高则不明显。**结论:**本研究建立的 BlyS 血清水平 ELISA 检测方法简便、可靠、准确,为后续研究 BlyS 与自身免疫性疾病尤其是风湿性疾病的关系奠定了基础。

[关键词] B 细胞激活因子;酶联免疫吸附测定;自身免疫疾病

[中图分类号] R 593.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2004)12-1317-03

An ELISA method for determination of serum B lymphocyte stimulator levels and its clinical assessment

ZHOU Lin, TU Xiao-Qing, ZHU Ye, LIU Hai-Ying, LU Hui-Qi, HOU Xiao-Qing, CHEN Jie, TAN Long-Yi, KONG Xi-an-Tao, ZHONG Ren-Qian* (Department of Laboratory Medicine, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To establish an ELISA method for determining the serum levels of B lymphocyte stimulator (BlyS) and to evaluate its clinical significance. **Methods:** Anti-human BlyS monoclonal antibody and biotinylated anti-human BlyS polyclonal antibody were used to detect serum BlyS levels by ELISA. Serum samples from 80 systemic immune-based rheumatic disease patients (50 with systemic lupus erythematosus [SLE], 20 with rheumatoid arthritis [RA], 10 with primary Sjögren's syndrome [SS]), 60 with autoimmune liver disease (ALD) patients (35 with primary biliary cirrhosis [PBC], 25 with autoimmune hepatitis [AIH]) were assayed for BlyS levels, and the results were compared with those of 40 healthy controls. **Results:** The median level of serum BlyS was (8.23 ± 1.42) ng/ml in rheumatic disease patients, (3.40 ± 0.79) ng/ml in ALD patients, and (3.19 ± 0.88) ng/ml in healthy controls. The serum levels of BlyS in rheumatic disease patients were significantly higher than those in the normal cohort ($P < 0.01$), while the levels in ALD patients showed no significant differences. **Conclusion:** ELISA assay established in this study is reliable, simple and has precise results, which might be used for later study on BlyS and autoimmune diseases, such as rheumatic diseases.

[KEY WORDS] B lymphocyte stimulator; enzyme-linked immunosorbent assay; immunologic diseases

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(12): 1317-1319]

人 B 细胞激活因子(B lymphocyte stimulator, BlyS)是 1999 年发现的肿瘤坏死因子家族(TNF)新成员,主要表达于单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞等骨髓系细胞。BlyS 通过其 3 种特异性的细胞膜受体在促进 B 淋巴细胞增殖、分化和免疫球蛋白产生,调节免疫反应、多数自身免疫性疾病过程中起着重要的作用^[1~5]。检测研究自身免疫性疾病患者的血清 BlyS 水平,对于探讨 BlyS 与自身免疫病发病机制的关联性是至关重要的。本实验室自行建立血清 BlyS 水平的 ELISA 检测方法,检测了 80 例风湿性疾病患者、60 例自身免疫性肝病患者的血清 BlyS

水平,并比较其与正常人的血清 BlyS 水平的差异。

1 材料和方法

1.1 研究对象 风湿性疾病[50 例系统性红斑狼疮(SLE)、20 例类风湿性关节炎(RA)、10 例干燥综合征(SS)]临床确诊患者 80 例,均为 2001 年 10 月至 2003 年 3 月间在我院的住院、门诊患者,其中女

[基金项目] 上海市基础研究重大项目(02JC14005);上海市卫生系统百人跨世纪优秀学科带头人培养基金(沪卫科 9713)。

[作者简介] 周 琳(1977),女(汉族),博士生。

*Corresponding author. E-mail:rqzhong@guomai.sh.cn

65 例,男 15 例,年龄 35~55 岁,平均年龄(45 ± 3)岁;均符合美国风湿病学会(ARA)修订的诊断标准。60 例自身免疫性肝病[35 例原发性胆汁性肝硬化(PBC)、25 例自身免疫性肝炎(AIH)]临床确诊患者均为 2001 年 10 月至 2003 年 4 月间在我院的住院、门诊患者,其中女 42 例、男 18 例,年龄 32~58 岁,平均年龄(45 ± 5)岁。PBC 诊断依据:胆内淤胆的临床症状和体征,肝生化指标 ALP、GGT 异常增高表现为肝内淤胆的特征,线粒体抗体阳性($\geq 1:40$),影像学检查胆道系统无阻塞等;AIH 按照国际自身免疫性肝炎研究小组推荐的评分诊断标准进行诊断。40 份正常健康志愿者均为 2003 年 2 月至 2003 年 4 月间本院门诊健康体检者(各生化指标正常、肝炎病毒及自身抗体阴性),其中女 30 例,男 10 例,年龄 35~56 岁,平均年龄(46 ± 2)岁,均填写知情同意书并报伦理委员会批准。各组的年龄、性别构成差异均无显著性。采集上述 3 组血样后,分离血清,置 -20°C 保存待测。

1.2 主要试剂与仪器 重组人 BlyS 标准品(相对分子质量 17 000、153aa)、抗人 BlyS 单克隆抗体、生物素化抗人 BlyS 多克隆抗体(均为美国 PeproTech 公司产品),辣根过氧化物酶(HRP)标记的亲本素(美国 Serotec 公司产品),牛血清白蛋白(BSA,华美生物工程公司产品),KUBOTA 5420 台式高速离心机(日本 Kubota 公司),550 型酶联免疫检测仪(Model 550 Microplate Reader, Bio-Rad 公司生产)。

1.3 ELISA 检测法的建立 (1)包被:以 10 mmol/L 磷酸盐缓冲液(PBS, pH7.4)将抗人 BlyS 单克隆抗体稀释成 $2 \mu\text{g/ml}$ 溶液,包被 96 孔微孔板, $100 \mu\text{l/孔}$, 4°C 过夜;0.02% Tween20 PBS 洗板 3 次。(2)封闭:含 1%牛血清白蛋白(BSA)的 10 mmol/L PBS(pH7.4), $150 \mu\text{l/孔}$, 4°C 过夜;0.02% Tween20 PBS 洗板 3 次。(3)加样:以含 3%BSA 的 10 mmol/L PBS 缓冲液(pH7.4)稀释重组人 BlyS 标准品,待测血清按 1:10 稀释。分别加入 $100 \mu\text{l}$ 的标准液或待测血清至标准品和标本孔(每份标准品及待测样本均作复孔), 37°C 孵育 4 h;洗涤 3 次。(4)加入生物素化抗人 BlyS 多克隆抗体,以含 0.1%BSA 的 10 mmol/L PBS 缓冲液将生物素化抗人 BlyS 抗体稀释成 $0.2 \mu\text{g/ml}$, $100 \mu\text{l/孔}$, 37°C 孵育 1 h;洗涤 3 次。(5)加入酶标亲和素,以 10 mmol/L PBS 缓冲液 1:1 000 稀释辣根过氧化物酶(HRP)标记的亲本素, $100 \mu\text{l/孔}$, 37°C 孵育 1 h;洗涤 3 次。(6)显色:DAB/ H_2O_2 显色 20 min, 2 mol/L H_2SO_4 终止反应后,492 nm 读取光密度(D),Cut-off 值为

40 份正常人平均 $D_{490}(\bar{x} \pm 2s)$ 。(7)绘制标准曲线,计算待测样本中血清 BlyS 浓度。

1.4 重复性实验 取低(1.6 ng/ml)、中(5.5 ng/ml)、高(11.0 ng/ml)BlyS 浓度的 3 份血清标本,用上述 ELISA 方法,分别同批测定 10 次,计算平均批内变异系数;同样 3 份样本,隔天测定 1 次,连续测定 8 次,计算平均批间变异系数。

1.5 阻断性试验 将已知 BlyS 浓度(5.5 ng/ml)的患者血清与 $0.2 \mu\text{g}$ 的抗 BlyS 单克隆抗体等体积混合, 37°C 作用 1 h, 4°C 过夜,次日离心取上清,用本实验所建立的 ELISA 方法检测该上清液的 BlyS 浓度,观察用抗 BlyS 的单克隆抗体对患者血清进行预吸附后对本实验检测结果的影响。

1.6 统计学处理 采用 SAS 软件,率的比较采用 χ^2 检验,计量资料用 t 检验和方差分析。

2 结果

2.1 实验条件 包被浓度、血清标本稀释度、反应温度、反应时间等实验条件均由棋盘滴定法确定优化,且由于采用商品化的抗体和标准品,所建立的最佳实验条件比较稳定。单克隆抗体包被浓度为 $2 \mu\text{g/ml}$,血清最佳稀释度为 1:10,并选取 0.5、1、5、10、20、50 ng/ml 的 6 种系列浓度的 BlyS 标准品建立反应的标准曲线(图 1)。回归方程为: $Y=0.265 \pm 0.017X$ 。

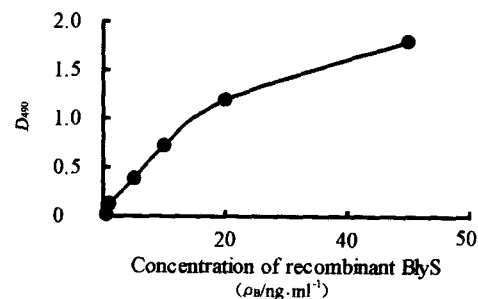


图 1 血清 BlyS 检测的标准曲线

Fig 1 Standard curve of ELISA assay for serum BlyS

2.2 重复性及阻断性实验结果 低、中、高 3 种浓度血清标本的平均批内变异系数为 4.6%,平均批间变异系数为 12.5%(表 1)。在阻断实验中,经过预处理标本的 BlyS 浓度为 1.79 ng/ml,相对其原先的 BlyS 浓度 5.5 ng/ml 而言,检测值下降了 67.5%;说明检测方法中的标本血清与抗 BlyS 抗体之间的结合反应能被抗 BlyS 单克隆抗体的预吸附所阻断。

表1 重复性实验检测结果
Tab 1 Precision analysis of ELISA assay

(n=10)

Precision	Mean ($\rho_B/\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$)	Standard deviation	CV(%)
Intra-assay			
Low	1.61	0.076	4.75
Median	5.52	0.255	4.62
High	11.03	0.489	4.43
Inter-assay			
Low	1.63	0.230	14.1
Median	5.54	0.681	12.3
High	10.96	1.217	11.1

2.3 标本检测结果 所有标本和标准品均作双孔,取两孔平均 D_{490} 为测定值。80例风湿性疾病(SLE、RA、SS)患者的血清BlyS平均水平为 $(8.23 \pm 1.42) \text{ ng/ml}$,60例自身免疫性肝病(PBC、AIH)患者的血清BlyS水平为 $(3.40 \pm 0.79) \text{ ng/ml}$,40例正常人的血清BlyS水平为 $(3.19 \pm 0.88) \text{ ng/ml}$ 。且风湿性疾病组的BlyS血清水平显著高于正常对照组($P < 0.01$),而自身免疫性肝病组的BlyS血清水平升高则不明显。

3 讨论

自身免疫性疾病的发生主要是由于机体免疫识别功能异常,产生针对自身组织的自身抗体或致敏淋巴细胞,损伤含相应自身抗原的器官组织。该类疾病的突出特点是B细胞的过度增殖活化,产生多种自身抗体。BlyS对调节B淋巴细胞活化的重要作用,近3年在国外已经逐渐形成一个研究热点^[6~8]。而国内对BlyS的基础研究则刚刚起步,有关自身免疫病患者的BlyS血清含量的报道也尚少见。我们在前期的研究中建立了检测外周血中BlyS基因水平的荧光定量RT-PCR方法^[9],为进一步研究检测自身免疫病患者的血清BlyS水平,探讨其BlyS血清水平与基因水平是否相关,我们自行建立了血清BlyS水平的ELISA检测法。该方法简单易行、准确、重复性好,有助于进一步探讨BlyS与自身免疫性疾病尤其是风湿性疾病的关系。

值得注意的是,我们的检测结果显示,SLE、RA、SS等风湿性疾病患者的血清BlyS水平明显升高,而PBC、AIH等自身免疫性肝病患者的血清BlyS水平则接近正常,这与国外的动物实验及相关临床研究的结果^[10,11]相一致。我们推测可能不同的

自身免疫病中,BlyS的调控作用各不相同,从而,血清BlyS水平也有所不同。相对PBC、AIH等损伤较局限的自身免疫性肝病而言,SLE、RA、SS等风湿性疾病属于非器官特异性自身免疫病,病变较广泛,可能其B细胞异常增殖活化的程度较高,故BlyS的血清含量也较高。至于BlyS对自身免疫性肝病的影响究竟如何,还有待于我们的进一步研究。

参考文献

- [1] Moore PA, Belvedere O, Orr A, et al. BlyS: member of the tumor necrosis factor family and B lymphocyte stimulator[J]. *Science*, 1999, 285(5425): 260-263.
- [2] Batten M, Groom J, Cachero TG, et al. BAFF mediates survival of peripheral immature B lymphocyte[J]. *J Exp Med*, 2000, 192(10): 1453-1466.
- [3] Do RK, Harada E, Lee H, et al. Attenuation of apoptosis underlies B lymphocyte stimulator enhancement of humoral immune response[J]. *J Exp Med*, 2000, 192(7): 953-964.
- [4] Gross JA, Johnston J, Mudri S, et al. TACI and BCMA are receptors for a TNF homologue implicated in B-cell autoimmune disease[J]. *Nature*, 2000, 404(6871): 995-999.
- [5] Thompson JS, Bixler SA, Qian F, et al. BAFF-R, a newly identified TNF receptor that specifically interacts with BAFF[J]. *Science*, 2001, 293(5537): 2108-2111.
- [6] Khare SD, Sarosi I, Xia XZ, et al. Severe B cell hyperplasia and autoimmune disease in TALL-1 transgenic mice[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(7): 3370-3375.
- [7] Groom J, Kallal SL, Cutler AH, et al. Association of BAFF/BlyS overexpression and altered B cell differentiation with Sjögren's syndrome[J]. *J Clin Invest*, 2002, 109(1): 59-68.
- [8] Mariette X, Roux S, Zhang J, et al. The level of BlyS correlates with the titres of autoantibodies in human Sjögren's syndrome[J]. *Annals of Rheumatic Diseases*, 2003, 62(2): 168-171.
- [9] 周琳, 范列英, 王皓, 等. 人B细胞激活因子基因表达水平的荧光定量的测定[J]. *中华检验医学杂志*, 2004, 27(5): 299-302.
Zhou L, Fan LY, Wang H, et al. Establishment of fluorogenic quantitative method for the measurement of the B-lymphocyte stimulator gene expression[J]. *Zhonghua Jianshan Yixue Zazhi (Chin J Lab Med)*, 2004, 27(5): 299-302.
- [10] Cheema GS, Roschke V, Hilber DM, et al. Elevated serum B lymphocyte stimulator levels in patients with systemic immune-based rheumatic diseases[J]. *Arthritis Rheum*, 2001, 44(6): 1313-1319.
- [11] Mackay IR, Groom J, Mackay CR. Levels of BAFF in serum in primary biliary cirrhosis and autoimmune diabetes[J]. *Autoimmunity*, 2002, 35(8): 551-553.

[收稿日期] 2004-07-23

[修回日期] 2004-09-09

[本文编辑] 曹静