

· 论 著 ·

抗核抗体 Topo I 型的临床应用研究

曹杰龙, 谢丽云

(岳阳市中心医院检验科, 湖南 岳阳 414000)

[摘要] **目的** 探讨抗核抗体(ANA)DNA 拓扑异构酶 I (Topo I)型的核型特点及临床应用价值。**方法** 选取 2020 年 5 月至 2022 年 8 月该院 Topo I 型阳性患者 24 例,并分为 SSc 组(18 例)和非 SSc 组(6 例)。分析 ANA、抗核抗体谱(ANAs)检测结果,并比较 2 组 Topo I 型滴度分布情况。**结果** Topo I 型为包含 5 种要素的 HEp-2 复合染色模式,包括细胞核染色、分裂中期染色体染色、核仁组织区染色、细胞质染色和核仁染色,HEp-2 细胞分裂中期染色体可出现不一致的染色特征,高滴度标本在高倍稀释下才能辨认。24 例患者抗 Scl-70 抗体检测均为阳性。SSc 组 Topo I 型滴度以 $\geq 1:1\ 000$ 为主,显著高于非 SSc 组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** Topo I 型是一种特征明显、包含 5 种要素的 HEp-2 IIF 复合染色模式,与抗 Scl-70 抗体联系密切。Topo I 型滴度越高,对 SSc 诊断的临床意义越大。

[关键词] 抗核抗体; HEp-2 细胞; 间接免疫荧光法; DNA 拓扑异构酶 I 型

DOI:10.3969/j.issn.1009-5519.2023.13.005 **中图分类号:**R392.7

文章编号:1009-5519(2023)13-2185-04 **文献标识码:**A

Clinical application of Antinuclear antibody Topo I

CAO Jielong, XIE Liyun

(Department of Laboratory, Yueyang Central Hospital, Yueyang, Hunan 414000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the characteristics and clinical value of antinuclear antibody(ANA) DNA topoisomerase I (Topo I). **Methods** A total of 24 Topo I positive patients in the hospital from May 2020 to August 2022 were selected and divided into SSc group(18 cases) and non-SSc group(6 cases). The test results of ANA and ANAs were analyzed, and the distributions of Topo I titer in the two groups were compared. **Results** Topo I was a HEp-2 composite staining mode containing five elements, including nuclear staining, metaphase chromosome staining, nucleolus organizer region staining, cytoplasmic staining and nucleolar staining. HEp-2 cells might exhibit inconsistent chromosomal staining characteristics during metaphase division, and high titer specimens needed to be identified at high dilution. All 24 patients tested positive for anti Scl-70 antibodies. The Topo I titer in the SSc group was mainly $\geq 1:1\ 000$, which was significantly higher than that in the non-SSc group, with statistically significant difference($P < 0.05$). **Conclusion** Topo I is a distinctive HEp-2 composite staining pattern that contains five elements and is closely associated with anti Scl-70 antibodies. The higher the Topo Type I titer, the greater the clinical significance for the diagnosis of SSc.

[Key words] Antinuclear antibody; HEp-2 cells; Indirect immunofluorescence assay; DNA topoisomerase I

抗核抗体(ANA)作为自身免疫性疾病最常见的自身抗体,已在国内外得到广泛应用,以 HEp-2 细胞为实验基质的间接免疫荧光法(IIF)被认为是 ANA 检测的参考方法^[1-2]。2014 年 8 月,在第 12 届自身抗体和自身免疫国际研讨会上,形成了 ANA 荧光模型国际共识(ICAP),定义了 28 种 HEp-2 IIF 荧光模型(AC1~AC28)^[3];2017 年,在第 4 届 ICAP 会议上增加并定义了与 DNA 拓扑异构酶 I (Topo I)抗体相

关的荧光模型:Topo I 型,编码为 AC-29^[4]。Topo I 型对系统性硬化症(SSc)具有高度特异性,特别是对弥漫型 SSc 和进行性 SSc^[5]。2018 年,中国医师协会风湿免疫科医师分会自身抗体检测专业委员会发布了《抗核抗体检测的临床应用专家共识》^[7],将 28 种荧光报告模型引入国内并进行了详细解读,但尚未纳入最新的 Topo I 型(AC-29),国内关于此核型的报道较少见。本院检验科在 2020—2022 年检出 24 例

ANA Topo I 型阳性患者,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2020 年 5 月至 2022 年 8 月,本院共有 11 133 例住院患者 ANA 检测标本,其中 24 例 ANA(IIF)检测为 Topo I 型阳性。24 例患者中,男 5 例,女 19 例;年龄 31~80 岁。根据患者入院时间依次对病例编号为 1~24 号,其中 18 例患者临床诊断为 SSc(SSc 组,根据 2013 年美国风湿病学会及欧洲抗风湿病联盟联合制定的 SSc 分类诊断标准),其余 6 例为非 SSc(非 SSc 组,包括系统性红斑狼疮、间质性肺炎、系统性血管炎、IgA 肾病、溶血性贫血、糜烂性胃炎)。

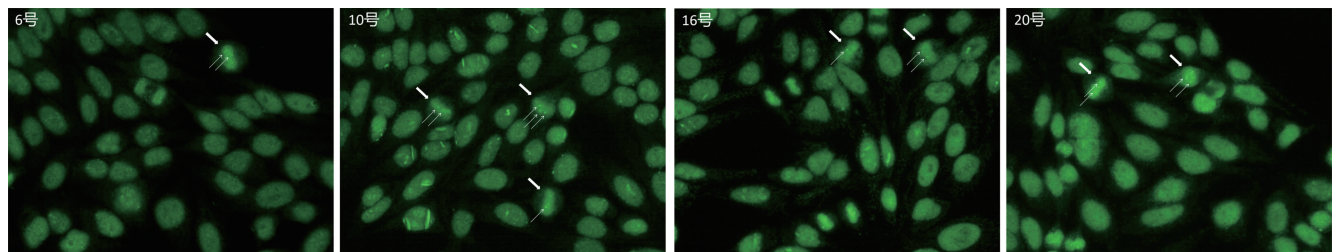
1.2 方法 (1)ANA 检测:采用 IIF,严格按照试剂盒说明书进行操作,血清起始稀释度为 1:100,采用 3.2 倍稀释系统,最后在 EUROStar III Plus 荧光显微镜下(40×)观察是否出现特征性荧光染色,出现特异性荧光且滴度大于或等于 1:100 判为阳性。(2)抗核抗体谱(ANAs)检测:用免疫印迹法检测 ANAs,采用欧蒙 ANAs(IgG)检测试剂盒在全自动免疫印迹仪 EUROBlotOne 上进行检测和结果判读。ANAs 包括抗核糖核酸蛋白/Sm 抗体、抗 Sm 抗体、抗 SS-A

抗体、抗 Ro-52 抗体、抗 SS-B 抗体、抗 Scl-70 抗体、抗 PM-Scl 抗体、抗 Jo-1 抗体、抗着丝点蛋白 B 抗体、抗增殖细胞核抗原抗体、抗 dsDNA 抗体、抗核小体抗体、抗组蛋白抗体、抗核糖体 P 蛋白抗体和抗线粒体 M2 抗体共 15 种。IgG 型 ANA 检测试剂盒(IIF)、ANAs(IgG)检测试剂盒(免疫印迹法)均购自欧蒙(杭州)医学实验诊断有限公司。

1.3 统计学处理 采用 SPSS26.0 软件进行统计分析,计数资料以率或百分比表示,组间比较采用 Fisher 确切概率法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

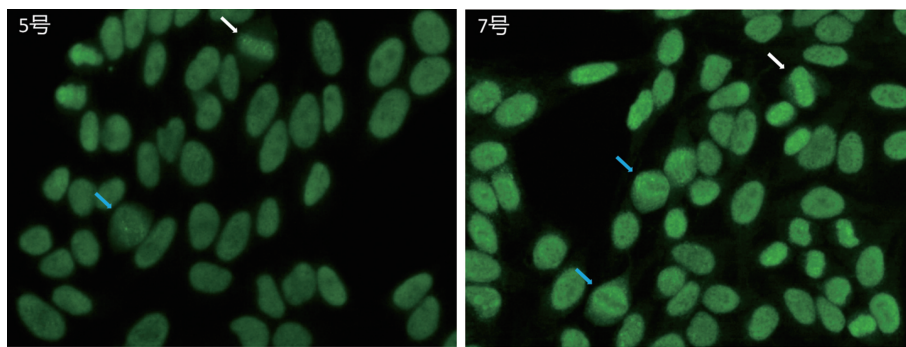
2 结果

2.1 ANA 检测结果 分裂间期细胞核呈细颗粒荧光染色;分裂中期细胞浓缩染色体呈细颗粒样增强荧光;分裂期细胞与浓缩染色体相关的核仁组织区域(NOR)有离散的点状荧光;分裂间期细胞质有较弱的网状结构染色,核周模糊;核仁染色不一致。见图 1。Topo I 型分裂中期,细胞浓缩染色体一般呈细颗粒样增强荧光,但也有患者呈减弱的颗粒样荧光[6 例(25%)患者出现此特征]。见图 2。对于高滴度标本,在起始稀释度为 1:100 时,Topo I 型的部分特征可能被掩盖或发生改变,容易被误判为其他核型。见图 3。



注:细颗粒样增强荧光(大箭头);离散的点状荧光(小箭头);标本稀释度为 1:100。

图 1 Topo I 型一般染色特征(400×)



注:标本稀释度为 1:100,在同一张 HEp-2 细胞片中,分裂中期染色体可出现不一致的染色特征,有的呈阳性(白色箭头),有的呈阴性(蓝色箭头)。

图 2 Topo I 型特殊染色特征(400×)

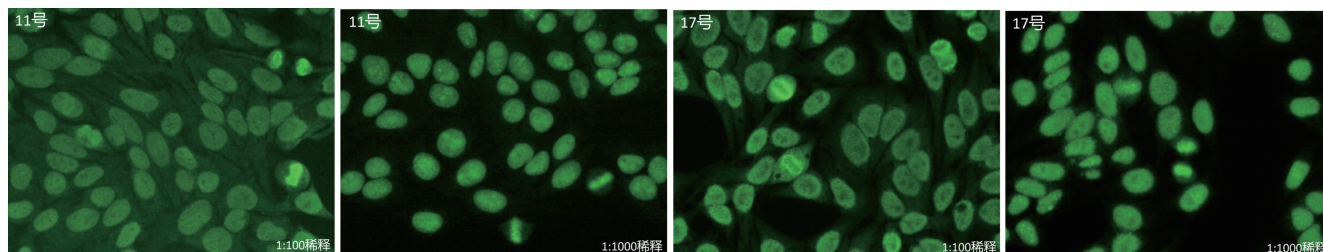
2.2 ANAs 检测结果 24 例患者 ANAs 检测结果如下:抗 SS-A 抗体阳性 3 例,抗 Ro-52 抗体阳性 3 例,抗 SS-B 抗体阳性 3 例,抗 Scl-70 抗体阳性 24 例,抗 PM-Scl 抗体阳性 1 例,抗着丝点蛋白 B 抗体阳性 2

例,抗核小体抗体阳性 2 例,抗组蛋白抗体阳性 1 例,其余 0 例,其中抗 Scl-70 抗体阳性率为 100%。24 例抗 Scl-70 抗体阳性患者中,10 例合并有其他特异性自身抗体。

2.3 SSc 组与非 SSc 组 Topo I 型滴度分布情况比较

SSc 组 Topo I 型滴度以 $\geq 1:1000$ 为主,占

66.7%,显著高于非 SSc 组的 1.7%,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。



注:11号患者按 1:100 稀释时表现为核均质型,按 1:1000 稀释时表现为 Topo I 型;17号患者按 1:100 稀释时表现为核颗粒型,按 1:1000 稀释时表现为 Topo I 型。

图 3 高滴度标本在起始稀释度时的染色变化(400×)

表 1 SSc 组与非 SSc 组 Topo I 型滴度分布情况比较[n(%)]

组别	n	1:100	1:320	$\geq 1:1000$
SSc 组	18	0	6(33.3)	12(66.7)*
非 SSc 组	6	2(33.3)	3(50.0)	1(1.7)

注:与非 SSc 组比较,* $P < 0.05$ 。

3 讨论

以 HEp-2 细胞为基质的 IIF 作为 ANA 检测的参考方法,在自身免疫性疾病的筛查中具有重要作用,HEp-2 IIF 荧光模型可提示标本中可能存在相关特异性自身抗体,ICAP 目前共定义了 29 种阳性荧光模型,并在 ICAP 网站(www.ANAPatterns.org)归纳了不同荧光核型所对应的临床意义^[5],其中 Topo I 型即为最新的 HEp-2 IIF 荧光模型。抗 DNA Topo I 抗体于 1979 年首次在 SSc 患者血清中经免疫印迹法发现,其可识别 70 kDa 的 Scl-70 抗原^[7]。随后,Scl-70 抗原被证明是 100 kDa DNA Topo I 的 1 个片段^[8-9],因此抗 Topo I 抗体又称为抗 Scl-70 抗体。2009 年,DELLAVANCE 等^[10]重新定义了 Scl-70 IIF 模式,并论证了其抗 DNA Topo I 抗体产生的复合荧光模式相关。该荧光模式包含 5 个细胞区域的染色:(1)分裂间期细胞核呈细颗粒染色;(2)分裂中期浓缩染色体持续染色;(3)分裂中期染色体类似 NOR,有散在增强的点状荧光;(4)细胞质有微弱的网状染色,从核周区域延伸到细胞膜;(5)核仁染色微弱且荧光增强不一致。2017 年,DNA Topo I 型终于得到专家们的一致认可,并将其纳入 ANA 模型国际共识体系。

本研究中,24 例患者的 ANA 荧光表现均符合 Topo I 型特点,且患者 ANAs 检测结果显示,抗 Scl-70 抗体阳性率为 100%,与 ANA 检测结果相吻合。本研究结果显示,Topo I 型除了满足上述 5 个一般特征外,还有 1 个特殊的现象:HEp-2 细胞分裂中期,浓

缩染色体并不总是出现增强的荧光染色,有时还会呈减弱的荧光染色,甚至为阴性。本研究中,25%的患者中期染色体呈减弱的颗粒样荧光,排除手工操作不当的原因,从 5 号患者与 7 号患者的 HEp-2 细胞片中可清楚地看到在同一个高倍镜视野中,分裂中期染色体可出现不一致的染色特征,有的呈阳性,有的呈阴性,在其他 ANA 核型中很少见到。其可能原因有以下 3 个方面:(1)抗原因素。Topo I 为存在于细胞核的一类酶,HEp-2 细胞分裂中期染色体的浓缩可能影响 Topo I 的分布,也可能是细胞分裂的某一过程中,Topo I 水平减少。(2)抗体因素。抗 DNA Topo I 抗体可识别 Topo I 上的多个位点,对不同位点的亲和力可能存在差异。(3)试剂生产厂家因素。不同厂家生产工艺的差别也可导致荧光染色度的变化。陶月等^[11]也介绍了新核型 AC-29 的特点,提到分裂中期浓缩染色体呈均一、细斑点样荧光染色,但未提及浓缩染色体可能呈阴性的情况,这或许是 Topo I 型的另一个特征性表现。

作为 ANA 最新的荧光核型,对于 Topo I 型的判读具有一定的挑战性,在其 5 个核型特征中,间期细胞浆网状染色不易被观察到,这主要是由于胞浆染色较弱,在 1:80 或 1:100 稀释度下不易被观察到^[12]。另外,当染色体染色强度较高时,NOR 区点状染色不易发现,镜检时缓慢上下微调有助于观察 NOR 区染色。当滴度较高时,Topo I 型的部分特征会发生改变或被掩盖,如 NOR 区点状染色不可见,浓缩染色体可呈阴性,给判读带来困难,容易导致核型判断错误。本研究结果显示,在起始稀释度时,11 号患者表现为核均质型,17 号患者表现为核颗粒型,当进一步稀释 1000 倍时,Topo I 型的 5 个特征才表现出来,这或许与抗原抗体反应的前带效应有关,抗原与抗体的结合具有比例性^[13],当标本中抗体浓度过高时,反而不能与 HEp-2 细胞中相应的抗原牢固结合,从而导致荧光

染色特征发生变化。胡琼文等^[14]研究显示,采用 IIF 检测高滴度 ANA 标本时,在低稀释度时容易产生前带效应,从而导致错误的判断。这与本研究结果一致,因此应引起临床检验实验室的重视。本研究结果显示,SSc 组 Topo I 型滴度以 $\geq 1:1\ 000$ 为主,占 66.7%,显著高于非 SSc 组的 1.7%,差异有统计学意义($P < 0.05$)。提示 Topo I 型滴度越高,对 SSc 诊断的临床意义越大。TEBO 等^[15]研究认为,单独采用抗 Topo I 抗体可能不足以诊断 SSc,有 63% 的抗 Topo I 抗体阳性患者被诊断为非 SSc,ANA IIF 检测阳性且抗 Topo I 抗体水平显著升高时可支持 SSc 的诊断。

综上所述,Topo I 型是一种特征明显、包含 5 种要素的 HEp-2 IIF 复合染色模式,与抗 Scl-70 抗体联系密切,可提示临床进一步进行抗 Scl-70 抗体的检查。Topo I 型滴度越高,对 SSc 诊断的临床意义越大。但是,对于高滴度标本,在起始稀释度较低时,Topo I 型容易被误判为其他核型。准确判读 Topo I 型还具有一定的挑战性,国内医学免疫检验人员应加强对 ANA 新型荧光模式 Topo I 型的学习。

参考文献

- [1] AGMON-LEVIN N, DAMOISEAUX J, KALLENBERG C, et al. International recommendations for the assessment of autoantibodies to cellular antigens referred to as anti-nuclear antibodies[J]. *Ann Rheum Dis*, 2014, 73(1): 17-23.
- [2] 中国免疫学会临床免疫分会. 自身抗体检测在自身免疫病中的临床应用专家建议[J]. *中华风湿病学杂志*, 2014, 18(7): 437-443.
- [3] CHAN E K, DAMOISEAUX J, CARBALLO O G, 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.
- [4] ANDRADE L, KLOTZ W, HEROLD M, et al. International consensus on antinuclear antibody patterns: Definition of the AC-29 pattern associated with antibodies to DNA topoisomerase I [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2018, 56(10): 1783-1788.
- [5] DAMOISEAUX J, ANDRADE L E C, CARBALLO O G, et al. Clinical relevance of HEp-2 indirect immunofluorescent patterns: The international consensus on ANA patterns(ICAP) perspective[J]. *Ann Rheum Dis*, 2019, 78(7): 879-889.
- [6] 中国医师协会风湿免疫科医师分会自身抗体检测专业委员会. 抗核抗体检测的临床应用专家共识[J]. *中华检验医学杂志*, 2018, 41(4): 275-280.
- [7] DOUVAS A S, ACHTEN M, TAN E M. Identification of a nuclear protein (Scl-70) as a unique target of human antinuclear antibodies in scleroderma[J]. *Biol Chem*, 1979, 254: 10514-10522.
- [8] VAN VENROOIJ W J, STAPEL S O, HOUBEN H, et al. Scl-86, a marker antigen for diffuse scleroderma [J]. *Clin Invest*, 1985, 75: 1053-1060.
- [9] GULDNER H H, SZOSTECKI C, VOSBERG H P, et al. Scl 70 autoantibodies from scleroderma patients recognize a 95 kDa protein identified as DNA topoisomerase I [J]. *Chromosoma*, 1986, 94: 132-138.
- [10] DELLAVANCE A, GALLINDO C, SOARES M G, et al. Redefining the Scl-70 indirect immunofluorescence pattern: Autoantibodies to DNA topoisomerase I yield a specific immunofluorescence pattern [J]. *Rheumatology*, 2009, 48(6): 632-637.
- [11] 陶月, 朱益佳, 朱文波, 等. 抗核抗体人喉癌上皮细胞细胞核型中 AC-29 的临床应用 [J]. *中华风湿病学杂志*, 2019, 23(12): 845-847.
- [12] 郑冰, 吕良敬, 李敏. 抗核抗体荧光核型图谱及病例判读 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2021: 57.
- [13] 王兰兰, 许化溪. 临床免疫学检验 [M]. 5 版. 北京: 人民卫生出版社, 2012: 12-15.
- [14] 胡琼文, 胡朝军, 李萍, 等. 间接免疫荧光试验检测抗核抗体的前带效应分析 [J]. *国际检验医学杂志*, 2019, 40(2): 210-213.
- [15] TEBO A E, SCHMIDT R L, FRECH T M. Presence of antitopoisomerase I antibody alone may not be sufficient for the diagnosis of systemic sclerosis [J]. *Rheumatol*, 2019, 46(4): 440-442.

(收稿日期: 2022-11-04 修回日期: 2023-03-25)