

抗环瓜氨酸肽抗体用于类风湿关节炎临床检测的价值

李禹龙 张瑞 李金明

【摘要】 类风湿关节炎(RA)作为一类常见的自身免疫疾病严重影响人们的健康,过去对于 RA 的血清学诊断仅仅依靠类风湿因子(RF)的检测,但是 RF 对于 RA 诊断的特异性不够理想。后来,有人发现抗环瓜氨酸肽(CCP)抗体可以作为 RA 的一种血清学检测指标,目前已经出现了用于检测抗 CCP 抗体的诊断试剂盒用来诊断 RA,抗 CCP 抗体对于检测 RA 的敏感度和特异度都优于 RF 检测。本文回顾了近几年关于抗 CCP 抗体用于临床诊断的意义和应用价值,同时比较了目前市场上常见的几种抗 CCP 抗体的试剂盒,并对不同试剂盒之间方法的敏感度和特异度进行了系统性评估。(中华检验医学杂志,2014,37:903-906)

【关键词】 关节炎,类风湿; 肽类,环; 类风湿因子

Clinical relevance of anti-CCP antibody in the clinical testing Li Yulong*, Zhang Rui, Li Jinming.
* Graduate School, Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730, China

Corresponding author: Li Jinming, Email: jmli63hn@gmail.com

【Abstract】 As a kind of common autoimmune diseases, rheumatoid arthritis (RA) affected the health of human beings seriously. In the past, serological diagnosis of RA solely relied on the detection of rheumatoid factor (RF), but its specificity was not satisfactory. Lately, people found that anti-cyclic citrullinated peptide (CCP) antibody was a serological indicator of RA. Now, there have been a series of kits for the detection of anti-CCP antibodies to diagnose RA. The sensitivity and specificity of anti-CCP antibody detection are better than those of RF detection. This paper reviews the significance and value of anti-CCP antibody detection used for clinical diagnosis in the recent years, while systematically compares the sensitivities and specificities between several common commercial kits and methods of anti-CCP antibodies detection. (Chin J Lab Med, 2014, 37: 903-906)

【Key words】 Arthritis, rheumatoid; Peptides, cyclic; Rheumatoid factor

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种较普遍的系统性的自身免疫疾病,它危害着全球 0.5% ~ 1% 的人类健康。它是一种由于自身免疫系统发生紊乱并且开始攻击自身组织器官所导致的一种自身免疫疾病。它的特点是出现滑膜关节部位的炎症反应,这种滑膜关节炎会导致不断进展的关节结构损坏,严重降低患者的生活质量。其早期预防在防止其不可逆的关节损伤的发生中起了至关重要的作用,所以诊断越早,其治愈和缓解的可能性越大。

目前,对于 RA 的诊断有许多种方法,其中就包括很多血清学的检测手段。在各种血清学检测方法中,较早并且较常用的血清学检测是进行类风湿因子(rheumatoid factor, RF)的检测。但是,由于 RF 对 RA 检测的特异性不高,其在很多其他疾病中也会存在,人们更希望能找到一种特异性高的血清学指标用于 RA 的检测。有研究显示,抗环瓜氨酸肽(cyclic citrullinated peptide, CCP)抗体检测与 RF 检测相比拥有着更好的敏感度,其特异度也要远远高于 RF,特别是用于早期 RA 的检测中更为明显^[1]。抗 CCP 抗体的检测可以提供更多的疾病信息,有时候还能进行更早和更特异性的诊断。

一、抗 CCP 抗体检测的发展史

DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-9158.2014.12.008

作者单位:100730 中国医学科学院北京协和医学院研究生院(李禹龙);卫生部北京医院 卫生部临床检验中心(张瑞、李金明)

通信作者:李金明,电子信箱:jmli63hn@gmail.com

抗 CCP 抗体是由 RA 患者 B 淋巴细胞分泌的特异性较高的自身抗体,其他疾病和正常人群的 B 淋巴细胞几乎不分泌抗 CCP 抗体。抗 CCP 抗体是由存在某种基因修饰的 RA 患者产生的,当然,除了 RA,在一些其他疾病的炎症组织中也检测到含有瓜氨酸的蛋白质^[2]。

1998 年 Schellkens 等^[3]对基因库中各种不同序列丝聚合蛋白的氨基酸序列进行分析,合成了一条以瓜氨酸取代精氨酸的约 20 个氨基酸残基的肽链,同时证明瓜氨酸是 RA 患者血清中抗丝聚合蛋白相关抗体识别的主要抗原决定簇。到 1999 年,越来越多的证据显示这些抗体可能以瓜氨酸化的蛋白作为抗原靶位。

2000 年 Schellekens 等^[4]报道了用 ELISA 法检测抗瓜氨酸肽抗体,该方法所采用的是环状瓜氨酸肽作为抗原。CCP 是在含有 19 个氨基酸的直链线性瓜氨酸肽段中将其中的两个丝氨酸替换成半胱氨酸,从而使其形成一种类似于 β 转角结构的二硫键而成为环瓜氨酸肽。这种合成肽在诊断方面的优化在于将瓜氨酸肽转变成一个 β 转角的结构,模拟环形的 β 转角结构是通过半胱氨酸取代 2 个丝氨酸残基,之后再经过氧化得到,这就是第一代的 CCP。用于早期诊断的第一代的 CCP 试验(2000-2001)是以一种起源于丝聚合蛋白的独立的环状瓜氨酸肽作为其抗原进行检测,它能够在 68% 的 RA 患者中检测到抗 CCP 抗体。由于一代的抗 CCP 抗体的 ELISA 应用了几种丝聚合蛋白的表位,它对于 RA 的诊断具有高度的特异度和 65%~70% 的敏感度。通过研究了大量的多肽库,在 2003 年获得了新的瓜氨酸肽并组成了第二代的 CCP,是一种包含了大量的在瓜氨酸肽文库中被挑选出来的模拟真正构象表位的环状表位而合成的新 CCP,目前这个检测方法已经广泛商品化,和一代 CCP 相比它的检测特异度和敏感度都有所提高。随着技术的发展,近年第三代 CCP 也被 InovaDiagnostic 公司合成出来并被少数公司使用,第三代 CCP 是通过环状瓜氨酸多肽库进行筛选而建立起来的,以使 CCP 检测更好地用于临床。用第三代 CCP3 的 ELISA 显示了在检测 RA 患者的方面仍具有高特异度的特点^[5]。目前,只有一代 CCP 中单一环状多肽序列是公开的,而二代和三代 CCP 中采用的混合多肽由于涉及专利权暂时均处于保密状态^[6]。

二、抗 CCP 抗体对 RA 的诊断价值

目前,对于抗 CCP 抗体的检测存在着很多的检测方法,其中较常用的是 ELISA 的方法。ELISA 方法用于检测抗 CCP 抗体的原理是基于体外丝聚合蛋白的瓜氨酸表位,使用不同的 CCP 对于抗 CCP 抗体检测具有不同的诊断准确度。除了 ELISA 方法以外,还有化学发光、免疫分析和时间分辨荧光免疫分析等方法^[7]。

目前有较多采用 ELISA 等方法检测抗 CCP 抗体的诊断试剂。由于其试剂盒使用抗原不同,检测敏感度和特异度有较大差别。一代 CCP 的特异度较好,但敏感度仅仅为 68%。第二代 CCP 较一代 CCP 具有更有利于抗体检测的抗原表位,明显增加了与抗 CCP 抗体的结合能力,第二代抗 CCP 抗体试剂在诊断 RA 的准确性及对 RA 预后方面都优于第一代抗 CCP 抗体试剂。尽管其敏感度较第一代 CCP 已经有所提高,但是其敏感度仍在 80% 以下。而随后出现的第三代 CCP,与第二代 CCP 比较在敏感度特异度方面并没有显著提高。也有报道称,用载体连接 CCP 包被 ELISA 板比直接用 CCP 包被 ELISA 板的敏感度要大大提高^[8]。目前 3 家公司(美国 Eurodiagnostica 公司、挪威 Axis-Shield 公司和美国 Inova 公司)使用的是相同的 CCP2 抗原。

对于当今市场上不同的 CCP 试剂盒厂家使用的不同 CCP 抗原。美国 Eurodiagnostica 公司:合成 CCP2;德国 Aesku 公司:IgG 衍生合成多肽;挪威 Axis-Shield 公司:合成 CCP2;德国 Euroimmun 公司:合成 CCP2;美国 Inova 公司 2 代试剂盒:合成 CCP2;美国 Inova 公司 3.1 代试剂盒:多个合成多肽;德国 Orgentec 公司:人源突变波形蛋白(vimentin MCV);瑞典 Phadia 公司:合成 CCP2 等^[9]。由于各公司应用不同的抗原,其诊断的临界值各不相同,诊断的敏感度和特异度也都不同。我们检索并比较了相关 CCP 试剂盒方法学比较类文章^[9-17],分析其敏感度和特异度。通过比较分析,目前市场上仍是抗-CCP2 ELISA 试剂盒生产厂家较多,其敏感度和特异度与其他试剂盒相比也普遍较高,见表 1。

试剂盒的检测性能除了与使用的抗原有关以外,使用方法也是影响因素。与手工法 ELISA 相比,自动化化学发光法检测的批间差异更小,有研究比较了自动化 Roche 化学发光法和其他方法的批间差,发现罗氏的批间变异系数 <3% 而批内变异系数 <7%^[18],均远小于手工法的批间差异,说明自动化仪器方法的使用可以减小批间差。同时,自动化仪器分析在临床诊断方面也优于手工法^[19]。

由于抗 CCP 抗体检测在 RA 早期具有高特异性表现,所以特别适用于对 RA 的早期诊断^[20-21],同时更容易确认 RA 患者是否会发生严重并发症和不可逆性损伤^[22],抗 CCP 抗体也能够准确地区分侵袭性 RA 和非

侵袭性 RA^[23]。研究表明,检测到抗 CCP 抗体阳性说明 RA 患者可能存在着严重的关节外症状。

如今,抗 CCP 抗体已经被列入到新的 RA 的诊断标准当中。2010 年在确定 RA 的诊断标准修订的时候,首次在血清学的标准中加入了抗 CCP 抗体等相关抗体的检测。具体的评分标准^[24]从关节受累(根据受累关节数和关节情况评分 0~5 分)、血清学(根据 RF 或抗 CCP 抗体的滴度评分 0~3 分)、滑膜炎持续时间(根据是否大于 6 周评分 0 或 1 分)、急性时相反应物(根据 CRP 和 ESR 情况评分 0 或 1 分)四个方面统计评分,患者如果标准评分 ≥ 6 分,则明确诊断为 RA。

三、抗 CCP 抗体和 RF 检测对 RA 的诊断比较

RF 是一种抗变性 IgG 的自身抗体,可分为 IgM、IgA、IgG、IgD、IgE 五型,通常为 IgM 类,多出现于类风湿关节炎患者血清或滑膜液,是类风湿关节炎血清中针对自身 IgG FC 片段上抗原表位的一类自身抗体,RF 阳性患者较多伴有有关节外表现,如皮下结节及血管炎等,过去一直是重要的诊断 RA 的血清学指标。

然而,抗 CCP 抗体在诊断 RA 方面是比 RF 更加敏感和特异的血清学指标。Whiting 等^[25]研究了 151 个病例,发现抗 CCP 抗体的检测比 RF 的检测更加特异(特异度分别是 96% 和 86%),而它们的敏感度相似(敏感度分别是 56% 和 58%)。研究显示对于早期和确定 RA 的患者的诊断上检测抗 CCP 抗体的敏感度和特异度都优于 RF 的检测,特别是对于滑膜炎持续时间长的 RA 患者的诊断敏感度更高。若能够联合检测抗 CCP 抗体和其他 RA 相关的自身抗体,则敏感度可高达 94.0%,特异度可高达 96.9%^[26]。抗 CCP 抗体对于临床症状差别不大的关节炎诊断的特异度大约是 95%~98%。IgM 类型的 RF 也常在这些患者体内发现,但是诊断 RA 的特异度要低得多。

较高水平的抗 CCP 抗体和疾病进展有关,与疾病的缓解程度成负相关,这种情况在 RF 也是阳性 RA 患者中更为突出。抗 CCP 抗体阳性并且 RF 检测阳性的患者显示更容易发生关节侵蚀性进展而抗 CCP 抗体阴性且 RF 阴性的患者则多不发生侵蚀性进展。关节侵蚀性进展也多见于抗 CCP 抗体阳性和 RF 阴性的患者中,而在抗 CCP 抗体阴性,RF 阳性的患者中仅能被发现较轻微的关节侵蚀性进展^[23]。

另外,抗 CCP 抗体的检测可以帮助解释一些不存在典型 RA 症状的患者体内出现了大量的不明原因 RF 的情况。在这种情况下,抗 CCP 抗体的阴性结果提示了非风湿性疾病,例如丙肝病毒的感染或者心内膜炎;而抗 CCP 抗体结果阳性则更可能是早期甚至是临床前期的 RA。这主要是因为抗 CCP 抗体的临床意义和 RF 不同,它在一般的感染性疾病中是阴性的^[2]。

四、结语

抗 CCP 抗体已经作为一项血清学诊断被列入到对 RA 的诊断的标准当中,这和其所具有的敏感度好、特异度高的特点是分不开的,它比 RF 对于 RA 的诊断更具有价值和意义,与 RF 相比,诊断 RA 的敏感度在 56% 左右,而特异度高达 96% 左右。如今,对于抗 CCP 抗体的检测也存在了很多的方法,市场上也有很多抗 CCP 抗体的检测试剂供选择,其中用的较为广泛的是二代 CCP 试剂,与一代 CCP 相比敏感度更高。目前各公司选用的抗 CCP 抗体检测的抗原多不相同,不同试剂盒的临界值不同,敏感度和特异度也不一样。随着技术的发展,对于抗 CCP 抗体的检测试剂也在不断改进中,现已制造出三代 CCP 试剂,但它较二代 CCP 试剂敏感度仅仅提升了 5%,对于抗 CCP 抗体的研究和对于新试剂的研发还是一个热点的话题,之后对于抗 CCP 抗体检测试剂的研究应着重如何在特异度不降低的基础上继续提高其敏感度方面,同时进一步提高抗

表 1 不同试剂盒敏感度和特异性的比较

试剂盒种类	研究个数	临界值	平均敏感度(%)	平均特异度(%)
抗-MCV 试剂盒(德国 Orgentec 公司)	10	20 IU/ml	74.9	92
抗-CCP2 ELISA 试剂盒(挪威 Axis-Shield 公司)	1	5 U/ml	80.0	98
抗-CCP2 ELISA 试剂盒(美国 Eurodiagnostica 公司)	7	25 IU/ml	71.8	94.6
抗-CCP2 ELISA 试剂盒(德国 Euroimmun 公司)	4	5 RU/ml	75.5	96.8
抗-CCP2 ELISA 试剂盒(瑞典 Phadia 公司)	2	10 IU/ml	76.0	97.5
抗-CCP2 ECLIA 试剂盒(瑞士 Roche 公司)	1	17 U/ml	76.8	91.2
抗-CCP2 CLIA 试剂盒(意大利 Zenit 公司)	1	5 U/ml	78.6	79.4
抗-CCP3 ELISA 试剂盒(美国 Inova 公司)	3	20 U/ml	77.5	94.8
抗-CCP MFA 试剂盒(美国 Bio-Rad 公司)	1	2.9 kU/ml	70.7	92.3
抗-CCP2 ELISA 试剂盒(美国 Inova 公司)	1	12 U/ml	74.8	95.7

CCP 抗体检测的应用价值。

参 考 文 献

- [1] Conrad K, Roggenbuck D, Reinhold D, et al. Profiling of rheumatoid arthritis associated autoantibodies[J]. *Autoimmun Rev*, 2010, 9:431-435.
- [2] Bose N, Calabrese LH. Q: Should I order an anti-CCP antibody test to diagnose rheumatoid arthritis? [J]. *Cleve Clin J Med*, 2012, 79: 249-252.
- [3] Schellekens GA, de Jong BA, van den Hoogen FH, et al. Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies[J]. *J Clin Invest*, 1998, 101: 273-281.
- [4] Schellekens GA, Visser H, de Jong BA, et al. The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide [J]. *Arthritis Rheum*, 2000, 43:155-163.
- [5] Kuldeep Singh, Prachi Mahajan. Anti-CCP antibodies in the diagnosis and prognosis of rheumatoid arthritis[J]. *JK Science*, 2011, 13:3-5.
- [6] 汪维, 李金明. 类风湿关节炎特异性自身抗体研究进展[J]. *中华检验医学杂志*, 2010, 33:185-188.
- [7] 吴俊渊, 谢玮, 朱易华, 等. 用国产时间分辨荧光免疫分析仪建立检测抗 CCP 抗体的 TrFIA 法[J]. *临床检验杂志*, 2012, 30:503-504.
- [8] 虞伟, 张瑾, 顾晨曦, 等. 三种不同固相化方法用于抗环瓜氨酸肽抗体测定的研究[J]. *中华检验医学杂志*, 2008, 31:1227-1229.
- [9] Bizzaro N, Tonutti E, Tozzoli R, et al. Analytical and diagnostic characteristics of 11 2nd- and 3rd-generation immunoenzymatic methods for the detection of antibodies to citrullinated proteins[J]. *ClinChem*, 2007, 53:1527-1533.
- [10] Mathsson L, Mullazehi M, Wick MC, et al. Antibodies against citrullinated vimentin in rheumatoid arthritis: higher sensitivity and extended prognostic value concerning future radiographic progression as compared with antibodies against cyclic citrullinated peptides[J]. *Arthritis Rheum*, 2008, 58:36-45.
- [11] Innala L, Kokkonen H, Eriksson C, et al. Antibodies against mutated citrullinated vimentin are a better predictor of disease activity at 24 months in early rheumatoid arthritis than antibodies against cyclic citrullinated peptides[J]. *J Rheumatol*, 2008, 35:1002-1008.
- [12] Sghiri R, Bouajina E, Bargaoui D, et al. Value of anti-mutated citrullinated vimentin antibodies in diagnosing rheumatoid arthritis [J]. *Rheumatol Int*, 2008, 29:59-62.
- [13] Ursum J, Nielen MM, van Schaardenburg D, et al. Antibodies to mutated citrullinated vimentin and disease activity score in early arthritis: a cohort study[J]. *Arthritis Res Ther*, 2008, 10:R12.
- [14] Debaugnies F, Servais G, Badot V, et al. Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies: a comparison of different assays for the diagnosis of rheumatoid arthritis[J]. *Scand J Rheumatol*, 2013, 42:108-114.
- [15] Harich R, Roger C, Garnier L, et al. Comparison of anti-CCP autoantibodies measurement by ELISA and a bead-based assay in a large patient cohort[J]. *ClinBiochem*, 2014, 47:485-488.
- [16] Yousefghahari B, Alhoeei S, Soleimani-Amiri MJ, et al. Comparison of sensitivity and specificity of anti-CCP and anti-MCV antibodies in an Iranian cohort of patients with rheumatoid arthritis[J]. *Caspian J Intern Med*, 2013, 4:702-706.
- [17] Szekanez Z, Szabó Z, Zeher M, et al. Superior performance of the CCP3. 1 test compared to CCP2 and MCV in the rheumatoid factor-negative RA population[J]. *Immunol Res*, 2013, 56:439-443.
- [18] Block DR, Jenkins SM, Saenger AK, et al. Analytical and clinical comparison of anti-CCP assays with rheumatoid factor for the diagnosis of rheumatoid arthritis[J]. *ClinChimActa*. 2012, 413:1015-1017.
- [19] Elrefaei M, Boose K, McGee M, et al. Second generation automated anti-CCP test better predicts the clinical diagnosis of rheumatoid arthritis[J]. *J Clin Immunol*, 2012, 32:131-137.
- [20] Nicaise-Roland P, Nogueira L, Demattei C, et al. Autoantibodies to citrullinated fibrinogen compared with anti-MCV and anti-CCP2 antibodies in diagnosing rheumatoid arthritis at an early stage: data from the French ESPOIR cohort[J]. *Ann Rheum Dis*, 2013, 72:357-362.
- [21] 邵晓凤, 栗占国. 类风湿关节炎免疫学诊断方法及其临床意义[J]. *中华检验医学杂志*, 2007, 30:592-594.
- [22] 赵金霞, 栗占国. 风湿免疫性疾病相关抗原的研究进展[J]. *中华检验医学杂志*, 2006, 29:757-760.
- [23] Manivelavan D, C K V. Anti-cyclic citrullinated Peptide antibody: an early diagnostic and prognostic biomarker of rheumatoid arthritis[J]. *J Clin Diagn Res*, 2012, 6:1393-1396.
- [24] Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism Collaborative Initiative[J]. *Arthritis Rheum*, 2010, 62:2569-2581.
- [25] Whiting PF, Smidt N, Sterne JA, et al. Systematic review: accuracy of anti-citrullinated peptide antibodies for diagnosing rheumatoid arthritis [J]. *Ann Intern Med*, 2010, 152:456-464.
- [26] 陈捷, 王兰兰, 秦莉, 等. 类风湿关节炎五项诊断指标的应用价值评价[J]. *中华检验医学杂志*, 2008, 31:1007-1010.

(收稿日期:2014-01-02)

(本文编辑:武昱)