

细胞角蛋白 19 片段抗原 21-1 含量化学发光微粒子定量免疫检测方法的建立

王英雪¹, 郭小怡², 刘江武³, 翁祖星³, 葛胜祥¹, 陈毅歆^{1,2}

1. 厦门大学 分子疫苗学与分子诊断学国家重点实验室 公共卫生学院 福建 厦门 361102;

2. 厦门大学 国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心 生命科学学院 福建 厦门 361102;

3. 厦门万泰凯瑞生物技术有限公司 福建 厦门 361000

摘要: 目的 建立细胞角蛋白 19 片段抗原 21-1(cytokeratin 19 fragment 21-1, CYFRA21-1, 简称 CY21-1)含量的化学发光微粒子免疫检测方法(chemiluminescent microparticle immunoassay, CMIA)。方法 原核表达制备重组 CY21-1(rCY21-1),用其免疫 BALB/c 小鼠后,收集小鼠脾脏细胞,常规杂交瘤技术与 Sp2/0 进行融合,制备 CY21-1 单抗。间接 ELISA 法筛选可稳定分泌 CY21-1 抗体的杂交瘤细胞,分别标记微磁性磁珠(magnetic beads, MB)和吖啶酯(acridinium ester, AE) 筛选可特异检测 CY21-1 的单抗配对,建立 CY21-1 CMIA,同时验证方法的线性及灵敏度,并与同类试剂盒进行比较。结果 经筛选获得了一组能特异检测 CY21-1 的单抗配对 MB * 26B5-3E4 * AE,建立的 CY21-1 CMIA 对检测 CY21-1 校准品的线性范围为 0.1 ~ 1 000 ng/mL, $R^2 = 0.9923$ 检测灵敏度为 0.076 ng/mL。该方法与美国雅培公司生产的 Abbott CY21-1 CMIA 诊断试剂盒平行检测 250 份临床血清标本的结果具有良好的相关性($R^2 = 0.9616$)。结论 成功建立了 CY21-1 CMIA,且具有良好的线性及灵敏度,为我国肺癌的临床筛查和早期诊断奠定了基础。

关键词: 细胞角蛋白 19 片段抗原 21-1;单克隆抗体;化学发光微粒子免疫检测方法;非小细胞肺癌

中图分类号: R392-33 文献标识码: A 文章编号: 1004-5503(2018)05-0523-05

DOI:10.13200/j.cnki.cjb.002178

Development of chemiluminescent microparticle immunoassay for cytokeratin 19 fragment 21-1 content

WANG Ying-xue*, GUO Xiao-yi, LIU Jiang-wu, WENG Zu-xing, GE Sheng-xiang, CHEN Yi-xin

*State Key Laboratory of Molecular Vaccinology and Molecular Diagnostics, School of Public Health, Xiamen University, Xiamen 361102, Fujian Province, China

Corresponding author: CHEN Yi-xin, E-mail: yxchen2008@xmu.edu.cn

Abstract: **Objective** To develop a chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA) for cytokeratin 19 fragment 21-1 (CYFRA21-1, CY21-1 for short) content. **Methods** Recombinant CY21-1 antigen was prepared by prokaryotic expression and used for immunization of BALB/c mice. The splenocytes of mice were collected and fused with Sp2/0 cells by routine hybridoma technique. The hybridoma cells stably secreting the monoclonal antibody (mAb) against CY21-1 were screened by indirect ELISA and labeled with magnetic beads (MB) and acridinium ester (AE) respectively. The mAb pair for specific detection of CY21-1 were screened, based on which CY21-1 CMIA was developed, verified for linearity and sensitivity, and compared with the kits of same kind. **Results** An antibody pair MB * 26B5-3E4 * AE was obtained, with which CY21-1 CMIA was developed. The linear range of the developed method for determination of CY21-1 calibrator was 0.1 ~ 1 000 ng/mL, with a R^2 value of 0.9923, while the sensitivity was 0.076 ng/mL. The determination results of 250 human serum samples by the developed method showed good correlation with that by commercial Abbott CY21-1 CMIA kit ($R^2 = 0.9616$). **Conclusion** CY21-1 CMIA was developed successfully, which showed high linearity and sensitivity. It laid a foundation of clinical screening and early diagnosis of lung cancer in China.

Key words: Cytokeratin 19 fragment 21-1 (CYFRA21-1); Monoclonal antibody (mAb); Chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA); Non-small cell lung cancer

基金项目:福建省科技重大专项(2015Y0051 2011YZ0002-1) 厦门市科技计划项目(3502Z20120008).

通讯作者:陈毅歆, E-mail: yxchen2008@xmu.edu.cn

细胞角蛋白 19 片段抗原 21-1(cytokeratin 19 fragment 21-1 ,CYFRA21-1)是型细胞角蛋白 19 (CK19)的第 239 ~ 400 aa 的可溶性片段 ,由于该片段可被 KS19. 1 和 BM19. 21 两株单克隆抗体特异性结合而命名为 CY21-1^[1]。恶性肿瘤细胞生长速度较快 ,细胞凋亡可引起 Caspase 介导的型细胞角蛋白的水解 ,使大量 CK19 形成可溶性的 CY21-1 进入血液中 ,而正常人血清中 CY21-1 的含量较低 ($< 3. 3 \text{ ng/mL}$)^[2] ,因此 ,血液 CY21-1 浓度的升高可被用于肿瘤患者的诊断。

肺癌分为小细胞肺癌(20%)和非小细胞肺癌(80% ,包括肺腺癌和肺鳞癌)。临床上 ,CY21-1 常作为非小细胞肺癌的肿瘤标志物 ,对非小细胞肺癌的诊断灵敏度为 40% ~ 76% ,特异性为 87% ~ 94% ,优于癌胚抗原(carcino-embryonic antigen ,CEA)的灵敏度(18%)^[3-6]和鳞状上皮细胞癌抗原(squamous cell carcinoma antigen ,SCC-Ag)的灵敏度(31%)^[7]。CY21-1 与 SCC-Ag、神经元特异性烯醇化酶(neuron-specific enolase ,NSE)与 CEA 等肿瘤标志物的联合检测对肺癌的敏感性可达 97% ,特异性为 82%^[8]。另外 ,CY21-1 的含量与肺癌分期、生存率、治疗的有效性转移情况等有关 ,因此 CY21-1 还常用于非小细胞肺癌疗效评价和预后监测^[3,6]。

目前 ,我国大多数三甲医院在临床上使用的 CY21-1 诊断试剂主要通过国外进口 ,且需与大型分析仪器配套使用 ,由于其检测价格较昂贵 ,不利于我国普及肺癌的早期筛查。国内诊断试剂公司正在研发 CY21-1 诊断试剂 ,但其关键单抗原料多依赖于进口 ,且多是基于 ELISA 法开发的产品^[9]。虽然化学发光免疫分析检测技术的原理与 ELISA 相似 ,但与 ELISA 法比较 ,具有灵敏度高、线性范围宽、分析速度快等优点 ,可更好地满足疾病诊断需求^[10]。本研究通过制备灵敏度高、特异性好的抗 CY21-1 蛋白单抗 ,应用于建立一种可准确定量检测 CY21-1 的化学发光微粒子免疫检测方法(chemiluminescent micro-particle immunoassay ,CMIA) ,同时验证方法的线性及灵敏度。

1 材料与方 法

1. 1 细胞、菌株及载体 小鼠骨髓瘤细胞株 Sp2/0-Ag14(Sp2/0)由国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心保存 ,工程菌 *E. coli* ER2566 由该中心制备 ,载体 pET-28a 购自美国 Novagen 公司。

1. 2 校准品及血清 细胞 CK19 校准品(含人类细

胞系的抗原成分)购自美国雅培贸易(上海)有限公司 ,临床血清标本来自浙江大学医学院附属第一医院。

1. 3 主要试剂及仪器 PEG1350、次黄嘌呤、胸腺嘧啶、氨基碟呤、DMSO、HRP 及佐剂均购自美国 Sigma 公司 ;RPMI1640 基础培养基购自美国 Gibco 公司 ;胎牛血清购自美国 Hyclone 公司 ;硝酸纤维素膜购自美国 MDI 公司 ;抗体亚型鉴定试剂购自美国 Bio-Rad 公司 ;Ni²⁺ 柱购自美国 GE 公司 ;Abbott CY21-1 CMIA 诊断试剂盒购自美国雅培公司 ;磁性磁珠(magnetic beads ,MB)购自厦门万泰凯瑞生物技术有限公司 ;吖啶酯(Acridininium ester ,AE)购自厦门万泰凯瑞生物技术有限公司 ;其他化学试剂均为国产分析纯。

1. 4 实验动物 SPF 级 BALB/c 小鼠 ,6 ~ 8 周龄 ,体重 17 ~ 21 g ,购自上海斯莱克实验动物有限公司 ,动物合格证号为 SCXK(沪)2011-0003。

1. 5 重组蛋白 CY21-1(rCY21-1)的表达 通过 RT-PCR 法从人非小细胞肺癌胸水(厦门大学附属中山医院提供)中扩增 CY21-1 基因 ,送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。将测序正确的基因片段通过常规方法克隆至载体 pET-28a ,构建表达质粒 pET-28a-CY21-1 ,于工程菌 *E. coli* ER2566 中进行大量表达 ,用 Ni²⁺ 亲和层析柱从破壁细菌上清液中纯化出 rCY21-1 ,经 15% SDS-PAGE 分析蛋白纯度。

1. 6 rCY21-1 活性的鉴定 用 Abbott CY21-1 CMIA 诊断试剂盒平行检测 rCY21-1 及雅培商品化 CY21-1 校准品的活性 ,校准品浓度梯度为 0. 05、0. 18、0. 73、2. 93、11. 72、46. 88、187. 50、750、3 000 ng/mL ,以稀释度为横坐标 ,化学发光值(RLU)对数为纵坐标建立线性回归标准曲线。

1. 7 CY21-1 单抗的制备 取 100 μg 重组蛋白 rCY21-1 ,稀释至 250 μL ,与等体积的弗氏完全佐剂混匀 ,经小鼠四肢腋下部位皮下多点注射 ,500 μL /只 ,共免疫 5 只。初次免疫后第 15 和 29 天 ,分别用相同剂量的重组蛋白加弗氏不完全佐剂进行加强免疫。第 3 针免疫后第 14 天 ,采用间接 ELISA 法检测小鼠眼球血清抗体效价。在进行融合前 3 d ,以 50 μg 重组蛋白经脾脏注射进行加强免疫。在无菌条件下 ,收集小鼠脾脏细胞 ,按常规杂交瘤技术与 Sp2/0 进行融合 ,再经 ELISA 检测、细胞克隆化、腹水诱导及纯化(Protein A 亲和层析) ,获得抗 CY21-1 单抗。采用 AbD Serotec 羊抗鼠分型酶检测单抗的亚型。

1. 8 CY21-1 单抗的筛选 采用间接 ELISA 法。用碳酸盐缓冲液(CB ,pH 9. 6)稀释 rCY21-1 ,包被 96

孔板, 100 ng/孔, 37 °C 孵育 2 h; 用含 2% 明胶的磷酸盐缓冲液 (PB, pH 7.2) 于 37 °C 封闭 2 h; 弃封闭液, 每孔加入 50 μL 杂交瘤细胞上清, 37 °C 孵育 30 min; 用 1 × PBST (含 0.05% Tween-20 的磷酸盐缓冲液) 洗板 5 次, 加入 HRP 标记的羊抗鼠 IgG (1:5 000 稀释), 37 °C 孵育 30 min; 用 1 × PBST 洗板 5 次, 加入显色液, 100 μL/孔, 37 °C 孵育 15 min, 酶标仪检测 A_{450} 值。

1.9 CY21-1 CMIA 的建立 用筛选出来的 CY21-1 单抗分别标记 MB 和 AE, 平衡至室温, 将 50 μL 磁珠标记抗体、25 μL 抗原标准品或待测物及 50 μL 分析缓冲液 (PBS) 依次加入 96 孔板, 室温孵育 15 min; 置磁力板上静置, 使磁珠完全被吸附, 用 1 × PBST 洗涤 3 次, 吸干, 将 AE 标记抗体按 1:100 用分析缓冲液稀释, 加入 96 孔板, 50 μL/孔, 室温孵育 10 min; 置磁力板上静置, 使磁珠完全被吸附, 用 1 × PBST 洗涤 3 次, 吸干, 加入 1 × PBST 200 μL/孔, 混匀, 转移至 2 mL 玻璃质发光管中。置磁力架上静置, 使磁珠完全吸附, 吸干上清, 加入预激发液 A, 100 μL/孔, 再加入激发液 B, 100 μL/孔, 用化学发光微粒子分析仪检测发光值 RLU。P/N 为阳性样品检测平均值/阴性样品检测平均值, 比值越大, 阴阳性区分度越大。

1.10 方法的验证

1.10.1 线性范围 用建立的方法检测浓度梯度为 0.045、0.183、0.732、2.930、11.719、46.875、187.5、750、3 000 ng/mL 的细胞 CK19 校准品, 采用四参数方程模拟曲线 $Y = (a - d) / [1 + (X/c)^b] + d$ 分析确定该检测方法的线性范围。

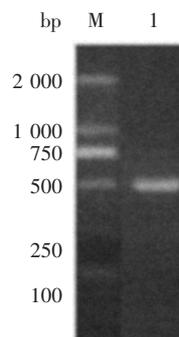
1.10.2 灵敏度 将零浓度标准品, 即样本稀释液作为样本, 进行重复检查 20 次, 得出 20 次的相对发光值 RLU。

1.11 CY21-1 CMIA 与同类试剂盒的比较 分别用美国雅培公司生产的 Abbott CY21-1 CMIA 诊断试剂盒及本实验建立的 CY21-1 CMIA 对 250 份临床血清标本进行平行检测, 以 Abbott CY21-1 CMIA 的检测结果为横坐标, 本实验建立的 CY21-1 CMIA 检测结果为纵坐标进行线性回归分析。

2 结果

2.1 目的基因及 rCY21-1 的鉴定 CY21-1 基因 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 可见约 500 bp 的目的条带, 大小与预期相符, 见图 1。测序结果表明, 扩增基因序列正确。纯化的 rCY21-1 经 15% SDS-

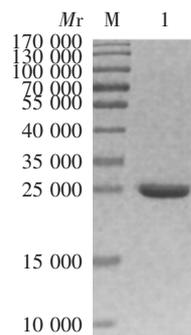
PAGE 分析, 可见相对分子质量约 25 000 的目的蛋白条带, 纯度 > 90%, 见图 2。



M: DNA marker DL2000; 1: CY21-1 基因的 PCR 产物。

图 1 CY21-1 基因 PCR 产物的鉴定

Fig 1. Identification of PCR product of CY21-1 gene



M: 蛋白质 marker; 1: 纯化的 rCY21-1。

图 2 纯化 rCY21-1 的 SDS-PAGE 鉴定

Fig 2. SDS-PAGE profile of purified rCY21-1

2.2 rCY21-1 的活性鉴定 不同稀释度的 rCY21-1 与雅培商品化 CY21-1 校准品的 RLU 基本一致, 线性方程分别为 $y = 0.9281x + 4.1441$ 和 $y = 0.7510x + 5.0786$, R^2 分别为 0.9871 和 0.9369, 见图 3。表明制备的 rCY21-1 与其天然抗原具有类似抗原性, 可用于制备 rCY21-1 单抗。

2.3 小鼠免疫多抗血清效价 5 只小鼠免疫血清效价达 $1:10^5$, 可用于制备单抗, 见图 4。

2.4 CY21-1 单抗的制备 间接 ELISA 法筛选出 13 株可稳定分泌 CY21-1 抗体的杂交瘤细胞, 分别命名为 3E4、16B11、13E1、2E11、28B8、28C4、3D2、2B11、21E9、23D5、26B5、14D11 和 9D10, 均为 IgG1 亚类。

2.5 CY21-1 CMIA 法的建立 将 13 株抗体分别标记 MB 和 AE, 经正交配对筛选得到 3 个 P/N 比值较大的单抗配对: MB * 26B5-3E4 * AE、MB * 26B5-28C4 * AE 和 MB * 26B5-2B11 * AE。对这 3 个配对

进行初步特异性评价,获得对小量样本检测特异性最佳单抗配对 MB * 26B5-3E4 * AE,从而建立了 CY21-1 CMIA。

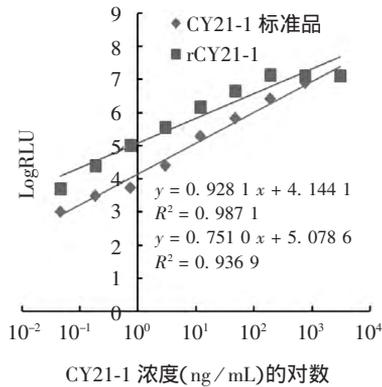


图 3 rCY21-1 与商品化 CY21-1 校准品 Abbott CY21-1 CMIA 检测的标准曲线

Fig 3. Standard curves of rCY21-1 and commercial CY21-1 calibrator by using Abbott CY21-1 CMIA

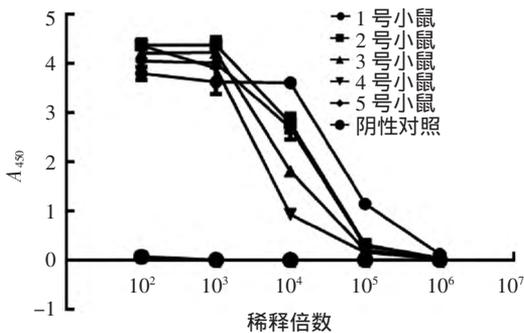


图 4 重组蛋白 rCY21-1 免疫小鼠的血清效价

Fig 4. Serum titer of mice immunized with rCY21-1

2.6 方法的验证

2.6.1 线性范围 检测结果显示, CY21-1 CMIA 对浓度介于 0.1 ~ 1 000 ng/mL 之间的 CY21-1 抗原有良好的检测线性,四参数方程为 $Y = (2.373 \times 10^6 - 520.6) / [1 + (X/1299)^{-0.9948}] + 520.6$, $R^2 = 0.9923$,见图 5。

2.6.2 灵敏度 稀释样本重复检查 20 次的相对 RLU 平均值为 603,标准差(*s*)为 85,空白限值($\bar{x} \pm 2s$)为 773,确定该单抗配对的灵敏度为 0.076 ng/mL。

2.7 CY21-1CMIA 与同类试剂盒的比较 美国雅培公司的 Abbott CY21-1 CMIA 诊断试剂盒及本研究建立的 CY21-1 CMIA 平行检测 250 份临床血清标本的结果经线性回归分析显示,两者检测结果基本

一致,线性回归方程为 $y = 0.9809x + 0.1321$, $R^2 = 0.9616$,具有良好的相关性,见图 6。

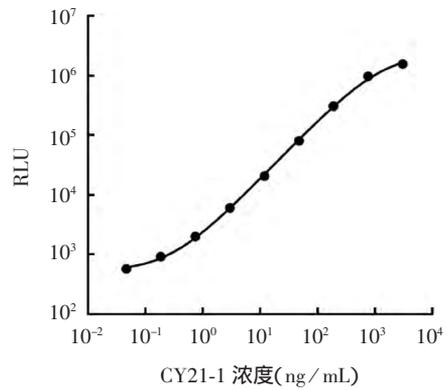


图 5 CY21-1 CMIA 检测 CY21-1 标准品的标准曲线

Fig 5. Calibration curve of CY21-1 CMIA for CY21-1 calibrator

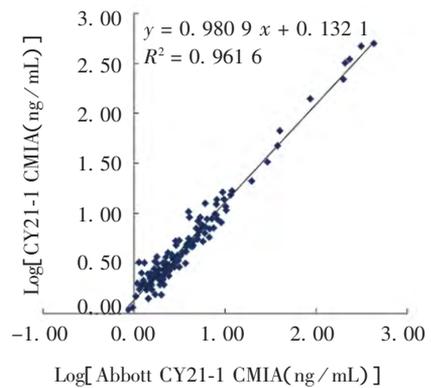


图 6 本实验建立的 CY21-1 CMIA 与 Abbott CY21-1 CMIA 对临床标本的检测相关性

Fig 6. Relationship between determination results by developed CY21-1 CMIA and by Abbott CY21-1 CMIA

3 讨论

肺癌是全球最为常见的恶性肿瘤之一,其发病率和病死率均居各大癌症首位^[11]。由于早期常无特殊临床表现,80%的肺癌患者就诊时已属于中晚期,导致难以治疗,致使生存率较低。临床上如能早期诊断肺癌,治愈率即可得到显著提升,早期肺癌(A 期)的 5 年生存率可超过 70%^[12]。CY21-1 在临床上多用于非小细胞肺的诊断,目前国内现有的 CY21-1 的临床诊断试剂多为 ELISA 法^[9],该方法存在灵敏度较低和定量效果较差等问题,与国外雅培等基于化学发光原理的 CY21-1 免疫诊断试剂盒相

比仍存在一定差距。免疫化学发光法以其灵敏度高、测量线性范围宽和稳定性好等优点已逐渐占据了诊断试剂的主流市场,并已应用于许多疾病的检测^[13-14],但国产 CY21-1 的化学发光免疫检测试剂相关研究仍罕见报道。

本研究利用原核表达法获得了纯度较高的模拟天然抗原性质的 rCY21-1,经免疫小鼠后,筛选出两株适合建立化学发光免疫检测方法的 CY21-1 单抗 26B5 和 3E4,该单抗配对的研制为建立国产化 CY21-1 诊断试剂提供了关键的活性原料,有利于促进我国诊断试剂公司实现 CY21-1 诊断试剂的国产化。本研究结果证实,单抗 26B5 作为包被抗体与微性磁珠结合,而单抗 3E4 作为标记抗体与 AE 结合,两者组成的抗体配对 MB*26B5-3E4*AE 所建立的 CY21-1 CMIA 具有最佳的检测性能,其检测分析灵敏度为 0.076 ng/mL,与雅培商品化定量试剂相当(≤ 0.1 ng/mL)。美国雅培公司生产的 Abbott CY21-1 CMIA 是一种已通过美国 FDA 和中国 CFDA 认证的 CY21-1 商品化定量试剂盒,在对临床血清样本的检测中,本实验制备的试剂与雅培商品化定量试剂的检测结果也具有良好的可比性($R^2 > 0.96$),表明本研究建立的 CY21-1 CMIA 可满足建立商品化 CY21-1 诊断试剂盒的需求,为我国肺癌患者的早期诊断及临床研究奠定了基础。

参考文献

- [1] SAKAHARA H, KOUSAKA T, HATTORI N, *et al.* Evaluation of a cytokeratin 19 assay kit "BALL ELSA CYFRA21-1" [J]. *Kaku Igaku*, 1993, 30 (12): 1475-1479.
- [2] 银新, 贺永梅, 宁守斌. 细胞角蛋白的临床研究进展 [J]. *实用医学杂志*, 2011, 27 (16): 3064-3066.
- [3] VAN DER GAAST A, SCHOENMAKERS C H, KOK T C, *et al.* Evaluation of a new tumour marker in patients with non-small-cell lung cancer : Cyfra 21. 1 [J]. *Br J Cancer*, 1994, 69 (3): 525-528.
- [4] MOLINA R, AUGE J M, FILELLA X, *et al.* Pro-gastrin-releasing peptide (proGRP) in patients with benign and malignant diseases : comparison with CEA, SCC, CYFRA 21-1 and NSE in patients with lung cancer [J]. *Anticancer Res*, 2005, 25 (3A): 1773-1778.
- [5] HOLDENRIEDER S, WEHNL B, HETTWER K, *et al.* Carcinoembryonic antigen and cytokeratin-19 fragments for assessment of therapy response in non-small cell lung cancer : a systematic review and meta-analysis [J]. *Br J Cancer*, 2017, 116 (8): 1037-1045.

- [6] WIESKOPF B, DEMANGEAT C, PUROHIT A, *et al.* Cyfra 21-1 as a biologic marker of non-small cell lung cancer. Evaluation of sensitivity, specificity, and prognostic role [J]. *Chest*, 1995, 108 (1): 163-169.
- [7] STIEBER P, HASHOLZNER U, BODENMÜLLER H, *et al.* CYFRA 21-1. A new marker in lung cancer [J]. *Cancer*, 1993, 72 (3): 707-713.
- [8] CHEN Z Y. Application of joint detection of tumor markers such as SCC Ag, NSE, CYFRA21-1, and CEA in the diagnosis of lung cancer [J]. *J Clin Pulmonary Med*, 2013, 18 (1): 10-11. (in Chinese)
陈邹阳. 肿瘤标志物 SCC-Ag、NSE、CYFRA21-1、CEA 联合检测在肺癌诊断中的应用价值 [J]. *临床肺科杂志*, 2013, 18 (1): 10-11.
- [9] ZHANG H R, ZHAI J Y, WANG X Q, *et al.* Preparation and preliminary application of double antibody sandwich ELISA for CYFRA21-1 [J]. *Chin J Immunol*, 2014, 30 (5): 644-647. (in Chinese)
张慧茹, 翟晋豫, 王雪琴, 等. CYFRA21-1 双抗体夹心酶联免疫检测方法的研制 [J]. *中国免疫学杂志*, 2014, 30 (5): 644-647.
- [10] LU L F, GE S X, ZHANG J. Review on the development of chemiluminescence immunoassay [J]. *J Mol Diag Ther*, 2015, 7 (5): 289-295, 284. (in Chinese)
陆龙飞, 葛胜祥, 张军. 化学发光免疫分析法研究进展 [J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2015, 7 (5): 289-295, 284.
- [11] CHEN W Q, ZHENG R S, ZHANG S W, *et al.* Report of cancer incidence and mortality in China, 2012 [J]. *China Cancer*, 2016, 25 (1): 1-8. (in Chinese)
陈万青, 郑荣寿, 张思维, 等. 2012 年中国恶性肿瘤发病和死亡分析 [J]. *中国肿瘤*, 2016, 25 (1): 1-8.
- [12] ABERLE D R, BERG C D, BLACK W C, *et al.* The national lung screening trial : overview and study design [J]. *Radiology*, 2011, 258 (1): 243-253.
- [13] DUAN M T, LAN L Z. Comparison of the effects of chemical luminescence method and enzyme-linked immunosorbent assay on the detection of HIV in blood [J]. *Mod Instr Med Treat*, 2016, 22 (5): 78-80. (in Chinese)
段美婷, 兰良子. 化学发光法与酶联免疫吸附法进行血 HIV 检测效果评价 [J]. *现代仪器与医疗*, 2016, 22 (5): 78-80.
- [14] ZHANG L J. Comparison of chemiluminescent microparticle immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay for determination of anti-neutrophil cytoplasm antibodies [J]. *Chin J Immunol*, 2016, 32 (8): 1175-1178. (in Chinese)
张立娟. 磁微粒化学发光法与酶联免疫吸附法测定抗中性粒细胞胞浆抗体的结果比较 [J]. *中国免疫学杂志*, 2016, 32 (8): 1175-1178.