

· 免疫检测 ·

胃蛋白酶原 I 时间分辨荧光
免疫分析法的建立

黄彪 肖华龙 张祥瑞 朱岚 蒋叶华 王翌 蒋孟军 王铁生

【摘要】 目的 采用时间分辨荧光免疫分析技术建立高灵敏的胃蛋白酶原 I 的快速全自动检测方法。方法 以 PG I 单克隆抗体 8003 # 包被板, 双功能螯合剂异氰酸苄基二乙烯三胺四乙酸络合 Eu^{3+} 及标记 PG I 单克隆抗体 8016 #, 发光增强系统为以 β -二酮体为主的增强液。采用平衡饱和法建立 PG I 时间分辨荧光免疫分析, 数据采用 Log-Logit 法函数和四参数 Logitc 函数数据处理程序处理。结果 方法的批内和批间 CV 分别为 1.9% 和 4.7%, 平均回收率为 102.65%, 灵敏度为 $0.05 \mu\text{g/L}$, 可测范围为 $3.5 \sim 328 \mu\text{g/L}$, ED_{20} 、 ED_{50} 和 ED_{80} 分别为 $11.34 \mu\text{g/L}$ 、 $38.73 \mu\text{g/L}$ 和 $132.3 \mu\text{g/L}$ 。 Eu^{3+} 标记抗体 -20°C 保存 8 个月免疫反应性基本无损失, 同批试剂连续 8 个月应用分析结果稳定, 临床结果与免疫放射分析的结果相符。结论 胃蛋白酶原 I 时间分辨荧光免疫分析法是目前胃蛋白酶原 I 检测中最灵敏的方法, 该分析法稳定性好, 具有很好的应用前景。

【关键词】 时间分辨荧光免疫分析; 胃蛋白酶原 I

Time-resolved fluorimmunoassay of pepsinogen I HUANG Biao, XIAO Hua-long, ZHANG Xiang-rui, ZHU Lan, JIANG Ye-hua, WANG Yi, Jiang Meng-jun, Wang Tie-sheng. Jiangsu Institute of Nuclear Medicine, Wuxi 214063, China

Corresponding author: HUANG Biao, Email: hhjz@wx88.net

【Abstract】 Objective To establish a two-site time-resolved fluorimmunoassay (TRFIA) of pepsinogen I (PG I) based on the direct sandwich technique. PG I-TRFIA was used to detect serum PG I concentration. Methods In the equilibrium procedure, the monoclonal antibodies (McAb) against a specific antigenic site on the PG I was 8016 #, the europium-labelled McAb was prepared by europium-chelate of N-(p-isothiocyanatobenzyl)-diethylenetriamine-N, N, N, N-tetraacetic acid directed against a different antigenic site on the PG I molecule was 8003 #. The luminescent enhancement system was enhancement solution containing 2-naphthoyltrifluoroacetone. PG I in sera from patients and healthy controls were examined by PG I-TRFIA with auto DELFIA1235 system. Results The intra- and inter-assay CV of the PG I-TRFIA were 1.9% and 4.7%, respectively, and the recovery rate was 102.65%, the sensitivity was $0.05 \mu\text{g/L}$. The McAb provided a linear response from 3.5 to $328 \mu\text{g/L}$ with ED_{50} of $38.73 \mu\text{g/L}$. The cross-reacting rate with pepsinogen II was negligible. The europium-labelled 8003 # was stable for at least eight months at -20°C and the results of the TRFIA with same reagents were stable for eight months. Conclusion The newly developed PG I-TRFIA was high sensitivity and very stable. The method can be used in serum immunoassay such as gastric cancer detection. The detection of PG I in sera will show patient an early warning of developing gastric cancer in future.

【Key words】 Time-resolved fluorimmunoassay; Pepsinogen I

胃蛋白酶原(PG)是胃蛋白酶的前体,由胃黏膜组织分泌,有部分进入血液中。PG包括胃蛋白酶原 I (PG I)和胃蛋白酶原 II (PG II),当胃部有病理变化时,如胃炎、疾病均会影响 PG 进入血液。由幽门螺杆菌 (*Hp*) 感染到萎缩性胃炎再到胃癌的发展过程中,均伴随着胃蛋白酶原的变化,所以该指标与胃炎、*Hp* 感染、胃溃疡、胃出血、胃癌等等有关,它们作为胃病的体外检测已越来越受到关注^[1,2]。我国是

胃癌高发国家之一,一些胃癌高发区胃癌高发率为 1%,各种胃病患病率达 82%,胃癌是国家重点防治的四大肿瘤之一。对人群进行大规模的筛查,早期发现胃癌是非常有效的措施,建立灵敏、便捷的 PG 检测方法可利于胃癌的早期诊断以及胃癌的预防干预。我们采用时间分辨荧光测量技术,以稀土离子为示踪材料,建立了 PG I 的全自动时间分辨荧光免疫分析法 (Time-resolved fluorimmunoassay, TRFIA),该方法具有测量灵敏度高、操作简便、示踪物稳定、定量分析量程宽、无放射性污染等优点^[3,4],非常有利于大规模的普查筛选及患者病程检测。

基金项目:江苏省自然科学基金资助项目 (BK020133)

作者单位:214063 无锡,江苏省原子医学研究所

通讯作者:黄彪,Email:hhjz@wx88.net,电话:0510-5520770

材料和方法

材料与试剂:抗 PG I 单克隆抗体 8003 # 和 8016 #、PG I 免疫放射试剂盒由北京佳瑞生物技术公司提供。Eu³⁺ 标记盒 (1244-302) EG&G-Wallac 产品、二乙烯三胺五乙酸酐 (DTPA), Sigma 产品。PD-10 和 Sepharose CL-6B, Pharmacia 产品。去离子超纯水由本室采用 Barnstead 公司的超水器 (D7033) 制备。增强液, 洗涤液由本室自配, 其它试剂均为国产分析纯。全自动 TRFIA 检测仪 (Auto DELFIA 1235) 为 EG&G-Wallac 产品。

固相抗体制备:将 8016 # 单抗用 50mmol/L Na₂CO₃-NaHCO₃ pH9.6 缓冲液稀释至 10mg/L 的包被液, 96 孔微孔板各孔加 200 μ l, 4 $^{\circ}$ C 放置过夜。弃去包被液, 冲洗 3 次, 加 200 μ l 含 3g/L BSA 的上述缓冲液封闭, 4 $^{\circ}$ C 放置过夜。弃去封闭液, 真空抽干, 板条密封后置 -20 $^{\circ}$ C 冷冻保存。

Eu³⁺ - 8003 # 制备:参照 Eu³⁺ 标记盒说明书操作。取溶解于 50mmol/L PBS pH7.0 的 2g/L 8003 # 1ml, 经 PD-10 柱转换缓冲条件, 洗脱液为含 0.155 mol/L NaCl 的 50mmol/L Na₂CO₃-NaHCO₃, pH8.5 缓冲液。收集蛋白峰, 经紫外吸收分析定量 (1.46A₂₈₀-0.74A₂₆₀), 浓缩至 2g/L。取 500 μ l 加入含 0.2mg 的 Eu³⁺-N₂-[p-异氰酸-苄基]-二乙烯三胺四乙酸 (Eu³⁺-DTTA) 冻干粉的小瓶中, 30 $^{\circ}$ C 磁力搅拌反应 20 h。反应液经用 80mmol/L Tris-HCl pH7.8 缓冲液平衡的 Sepharose CL-6B 柱 (1 \times 40cm) 层析, A₂₈₀ 监测收集蛋白峰, 稀释后分装冻干保存。

PG I 标准用抗原的制备:从人胃组织中提取^[5], 并与北京佳瑞生物技术公司提供 PG I 参考标准对照。

测定方法:用含 8mmol/L NaCl、0.1% BSA、0.2% 牛 IgG、50 μ mol/L DTPA、0.1ml/L Tween-80 和 0.1% NaN₃ 的 50mmol/L Tris-HCl pH7.8 为反应缓冲液; 以含 14.5mmol/L NaCl、0.2ml/L Tween-80 和 0.2% NaN₃ 的上述缓冲液为洗涤液。采用平衡法建立 PG I-TRFIA, 即在包被有 8016 # 的 96 孔微孔板上, 每孔依次加入 25 μ l PG I 参考标准或待测血清, 200 μ l 反应缓冲液, 25 $^{\circ}$ C 振荡孵育 1 h 后, 用洗涤液洗涤 2 次, 再加 200 μ l 以反应缓冲液 1:50 稀释的 Eu³⁺-8003 #, 25 $^{\circ}$ C 振荡孵育 1 h 后, 用洗涤液洗涤 6 次。再加增强液 200 μ l, 25 $^{\circ}$ C 振荡反应 5 min, 荧光检测。全部过程均在 Auto DELFIA 1235 上自动完成, 软件设置由本所自编。

正常参考值测定:选择体检证实无胃痛病史、无消化道、肝、肾疾病的健康正常人 300 例进行血清 PG 检测。

数据分析:PG I-TRFIA 标准曲线由 Auto DELFIA 1235 自带的 Log-Logit 函数处理。其它均用 *t* 检验。

结果

1. Eu³⁺-8003 # 的理化和免疫学鉴定: Eu³⁺-8003 # 经 Sepharose CL-6B 层析, 收集第一洗脱峰。以 EG&G Wallac 提供的 Eu³⁺ 标准为参考, 第一洗脱峰的 Eu³⁺ 含量为 53.3 μ mol/L, 8003 # 蛋白含量为 6.2 μ mol/L, 即平均每个 8003 # IgG 上连接了 8.6 个 Eu³⁺。选择 PG I 参考标准高点 (300 μ g/L), Eu³⁺-8003 # 1:50 稀释, 进行 TRFIA, B_{max}/T 为 4.7%, 与低点 (5 μ g/L) 的发光计数差达 2 个数量级以上。说明 Eu³⁺-8003 # 的免疫反应性基本无损失, 定量分辨率较好, 被测物和反应发光计数基本成算术级数正比关系。

2. PG I-TRFIA 的考核: 经 Log-Logit 函数数据处理程序处理所得的 PG I-TRFIA 标准曲线见图 1。

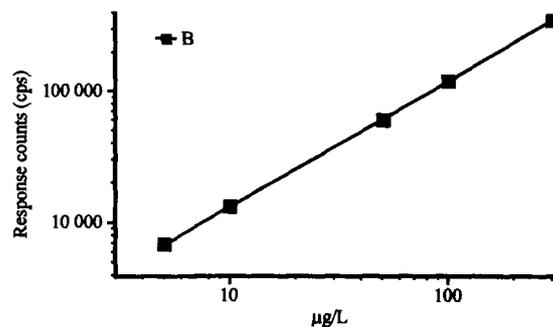


图 1 PG I-TRFIA 标准曲线

Fig 1. Standard curve of PG I-TRFIA

(1) 方法的特异性: 将 PG II 配成 10~50 μ g/L 一系列不同浓度, 代替标准曲线中的 PG I 参考标准。在上述浓度范围内, PG II 对 PG I-TRFIA 无交叉反应。

(2) 精密度和回收率: 本方法的批内和批间 CV 分别为 1.9% 和 4.7%, 精密图显示可测范围为 3.5~328 μ g/L。平均回收率为 102.65%。

(3) 灵敏度和稳定性: 以零剂量点发光值均值加 2 s 后的发光值在标准曲线上得到的相应值为 0.05 μ g/L。8 条不同时间进行的 PG I-TRFIA 的效点均值 ED₂₀、ED₅₀ 和 ED₈₀ 分别为 11.34 \pm 0.2 μ g/L、38.73 \pm 0.8 μ g/L 和 132.3 \pm 2.9 μ g/L。

正常参考值为 155 \pm 42 μ g/L, 我们以平均值 \pm 2 s 为正常值参考范围, 约在 70~240 μ g/L 之间 (表 1)。

表 1 300 例正常人群 PG I -TRFIA 测定值分布频数

Table 1. Serum PG I -TRFIA of volunteers (n = 300)

Distribution frequency of PG I -TRFIA assay value for volunteers											
Concentration($\mu\text{g/L}$)	< 70	70-90	90-110	110-130	130-150	150-170	170-190	190-210	210-230	230-250	250
Volunteers (n)	5	17	25	40	76	34	43	22	13	14	11

50 例样品同时采用 TRFIA 即 IRMA 法检测, 两者的相关系数为 0.926, $Y = 3.1338X - 6.8823$, 见图 2。IRMA 以血清 PG I $< 20\mu\text{g/L}$ 为萎缩性胃炎和胃癌的临界值, 由于标记方法及缓冲体系等的不同, 各种检测方法所得到的样品值会有所不同, 这里 TRFIA 所得的样品值一般比 IRMA 的高 3 倍, 我们根据 TRFIA 所得的正常值参考范围为依据, 以血清 PG I $< 70\mu\text{g/L}$ 、PG I / II ≤ 3 为萎缩性胃炎和胃癌的临界值, 与一些参考文献报道相符^[1,2,6]。

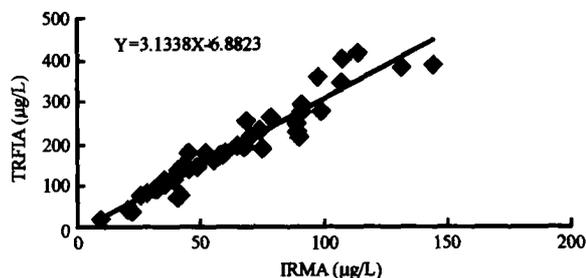


图 2 TRFIA-IRMA 相关性

Fig 2. Comparison of PG I -TRFIA and IRMA

讨 论

由于分布和免疫原性不同, 胃蛋白酶原可分为 PG I、PG II, PG I 主要由胃底腺的主细胞和颈黏液细胞分泌, PG II 是由胃贲门的贲门腺、胃窦的幽门腺及近十二指肠的 Brunner's 产生。PG 在血清中的变化可反映胃黏膜的功能变化, 如感染、炎症、溃疡、出血、萎缩、癌变等。有报道在确诊胃癌患者中有 1/3 的病人几年前的血清 PG 值已不正常^[1]。PG 作为非常有效的早期体外诊断技术, 相对于内镜和病理活检而言, 病人痛苦少, 简便易行。在国外, 特别在日本、芬兰等国, PG 的检测已得到普遍的应用, 利用 PG 进行大面积的人群普查, 使胃癌的早诊率提高到 90%, 所以应用 PG 进行大面积的人群普查非常有意义。当前, 国内外主要采用酶联或放免分析, 我们以前在这方面也做了一些工作^[5]。采用放免方法进行检测, 由于存在如高纯度抗原的来源、保存、标记等方面的问题, 一直未能使该技术在国内得到普及。为此, 在此基础上我们建立了夹心法, 采用可

以大量得到的稳定的单克隆抗体进行包被和标记, 利用新近发展的 TRFIA 技术, 可以大大提高该项检测的灵敏度、稳定性及检测范围, 而且由于无放射性污染和可以全自动操作, 更适应于临床检验医学的发展, 利于临床的普及。目前有关 PG I 检测灵敏度的报道一般只有 $0.1 \sim 3\mu\text{g/L}$ ^[5,8], 而 PG I -TRFIA 的灵敏度非常高, 可达 $0.05\mu\text{g/L}$, 这是目前其它方法无法达到的。胃癌患者常表现为 PG I 降低, 故提高灵敏度有其现实的意义。以往超微量免疫分析技术应用的普遍问题是稳定性难以满足临床工作的需要, 每次分析, 即使单样品检测也必须做标准曲线作为相对测量的依据。我们建立的全自动 PG I -TRFIA, 同批试剂连续 8 个月应用分析, 发现标准曲线基本重合, 无明显漂移, 可以用同批试剂单次标准曲线为今后分析的固定参考, 这既可减轻临床应用的工作强度, 又可提高药盒的经济价值。我们所建的 PG I -TRFIA 采用两步法, 这样有利于减少样品对分析系统的干扰。PG I -TRFIA 的分析时间仅为 2 h, 且分析系统高度自动化, 这样可提高临床检验结果的速度, 又可大幅度降低人为误差, 增加检出结果的可靠性。由于 PG I -TRFIA 的分析技术国内外还未见应用报道, 目前我们正采用此方法结合 PG II -TRFIA 进行临床的考核, 已完成了近 3000 例的检测。受检者 PG I 血清含量超出正常值范围时, 我们建议其进行胃镜检查, 从结果中看到血清 PG I 浓度的升高与胃溃疡、十二指肠溃疡、糜烂性胃炎等密切相关; 血清 PG I 浓度的降低与萎缩性胃炎、胃癌等有关。在检查中发现了许多胃病者, 其中还有早期胃癌, 其血清 PG I 浓度有超出正常值范围上限的也有超出正常值范围下限的, 所以我们认为 PG I 应是反映胃黏膜的功能变化的一种指标。由于促使该变化的特异性不是很高, 因此一味关注低于正常值范围下限的结果并把它作为胃癌的指标是不妥的, 也没有充分利用其价值。实际上, 在需体检的人群中, 将胃部有疾病的患者筛选出来, 再通过内镜、活检, 不只是萎缩性胃炎、胃癌而且及早发现胃溃疡、十二指肠溃疡、糜烂性胃炎也是非常有意义的, 为此我们将做进一步的研究。

参 考 文 献

- 1 陈智周, 范振符. 胃蛋白酶原 I、II 在早期胃癌普查中的意义. 中华肿瘤杂志, 2002, 24: 1-3.
- 2 孙丽萍, 袁媛. 胃蛋白酶原含量检测及其在胃疾病诊治中的应用. 世界华人消化杂志, 2001, 9: 1174-1176.
- 3 Hemmila I, Dakubu S, Makkala VM, et al. Europium as a label in time-resolved immunofluorometric assays. Anal Biochem, 1984, 137: 335-338.
- 4 黄彪, 肖华龙, 朱利国, 等. 糖蛋白抗原 19-9 时间分辨荧光免疫分析. 中华检验医学杂志, 2000, 23: 171.
- 5 蒋孟军, 肖志坚, 黄旭焱, 等. 胃蛋白酶原的分离纯化及初步临床应用. 中国实验临床免疫杂志, 1999, 11: 32-35.
- 6 Konishi N, Matsumoto K, Hiase Y, et al. Tissue and serum pepsinogen I and II in gastric cancer identified using immunohistochemistry and rapid ELISA. J Clin Pathol, 1995, 48: 364-367.
- 7 Sipponen P. Serum levels of amidated gastrin-17 and pepsinogen I in atrophic gastritis: an observational case-control study. Can J Gastroenterol, 2002, 37: 785-791.
- 8 Samloff IM. Pepsinogen I and II: Purification from gastric mucosa and radioimmunoassay in serum. Gastroenterology, 1982, 82: 26-33.

(收稿日期:2003-09-04)

· 免疫检测 ·

银屑病外周血单核细胞衍生的树突状细胞的检测

朱可建 王建有 茅晓红 劳力民

研究证明, 皮肤中的 DC 与外周血单核细胞衍生的树突状细胞 (MoDC) 的细胞表型一致, 由此认为银屑病皮损中数量增加的 DC 主要由外周血单核细胞游走到局部组织并分化而成。我们最近的研究发现银屑病患者的外周血单核细胞向 DC 分化的能力增强。在此, 我们进一步探讨银屑病患者的 MoDC 的吞噬功能, 以正常人为对照评价它们在抗原摄取阶段的改变。

寻常型银屑病患者 28 例 (男 17 例, 女 11 例), 年龄 18 ~ 68 岁, 病程 2 周至 21 年。所有患者在半年内未用系统治疗, 2 周内未用局部治疗。对照组为医院职工和医学院大学生共 12 例 (男 6 例, 女 6 例), 年龄 24 ~ 51 岁。

单核细胞的获取和 DC 的培养参见

作者单位: 310009 杭州, 浙江大学医学院附属第二医院皮肤科

通讯作者: 朱可建, Email: zhukejian@mail.hz.zj.cn, 电话: 0571-87783753

文献 (中华皮肤科学杂志 2002, 35: 88)。超氧离子产量的测定根据 Mrowietz 的方法 (Scand J Immunol 1988, 28: 139), 通过测定受超氧化物歧化酶抑制的细胞色素 C 的减少来分析 MoDC 产生的超氧离子。结果以经过酵母多糖刺激后的细胞产生的超氧化物量与自发产生的超氧化物量之间的差异来表示。用 EPICS-XL 流式细胞仪 (美国 Coulter 公司) 分析细胞表面表达甘露糖受体和 Fcγ 受体的水平, 结果以荧光强度表示, 反映每个细胞上表达抗原分子的量。统计学分析采用两样本均数的 *t* 检验。

结果发现患者组和对照组的 MoDC 均高表达甘露糖受体, 中等强度表达 Fcγ 受体 II (CD32) 和 Fcγ 受体 III (CD16), 不表达 Fcγ 受体 I (CD64), 患者组 MoDC 表达 MR 和 Fcγ 受体 II 的水平 (分别为 210.59 ± 22.83 和 29.46 ± 4.10) 显著高于对照组 (分别为 144.52 ± 35.24 和 20.60 ± 6.02), $P < 0.01$, 而 Fcγ 受体

I 和 Fcγ 受体 III 的表达在两组间差异无显著性 ($P > 0.05$)。同时, 我们用检测细胞色素 C 的方法间接评估银屑病患者的 MoDC 的吞噬功能。实验结果表明银屑病患者 MoDC 超氧离子的产生能力 (细胞色素 C 减少 $26.23\% \pm 7.33\%$) 强于正常对照组 (细胞色素 C 减少 $13.08\% \pm 3.55\%$), 差异有显著性 ($P < 0.01$), 银屑病患者 MoDC 的吞噬功能有增强的倾向。我们先前的研究发现银屑病患者外周血单核细胞向 DC 分化的能力增强, 分化而成的 DC 具有很强的提呈抗原能力。我们的检测结果表明: 患者的 DC 在免疫应答的开始阶段即结合和摄取外来抗原的阶段已存在异常, 这有利于后续的抗原提呈过程。但患者 MoDC 吞噬功能的改变是否与细胞表面两个与吞噬有关的受体 MR 和 Fcγ 受体的异常有关值得进一步探讨。

(收稿日期:2003-12-01)