

新型肝损伤血清标志物 Pep5 定量检测方法的建立及临床应用*

傅海媛^{1,2,3}, 侯利平², 周晓明², 黄亚娟², 宋纯艳², 孙云波², 汪 洋², 杨保安⁴, 肖汉族⁵, 甄 蓓², 魏开华^{2,3,△}, 王海滨⁶ (1. 解放军总医院, 北京 100853; 2. 军事医学科学院放射与辐射医学研究所, 北京蛋白质组研究中心, 蛋白质组学国家重点实验室, 国家蛋白质科学中心(北京), 北京 102206; 3. 安徽省芜湖市第二人民医院 241000; 4. 北京正旦国际科技有限责任公司, 北京 102206; 5. 湖南金健药业有限责任公司, 常德 415001; 6. 解放军三〇二医院, 北京 100039)

【摘要】 目的 建立定量检测血清多肽 Pep5 的酶联免疫吸附法(ELISA), 用于判定肝损伤进程的研究。**方法** 以待测血清样本稀释液包被酶联板, 5% 脱脂奶粉封闭, 辣根过氧化物酶标记的抗 Pep5 单克隆抗体作为标记抗体, 建立定量检测人血清多肽 Pep5 的 ELISA, 并用于临床检测 690 例肝损伤及健康血清样本。**结果** 灵敏度为 1.25 ng/mL; 线性范围(0~24 ng/mL)内相关系数为 0.998 7; 与乙酰胆碱酯酶、层黏连蛋白、透明质酸、三型前胶原交叉反应率小于 1.00%; 添加回收率在 99.09%~107.08%; 批内、批间变异系数(CV)分别为 5.62%~7.32%、6.21%~6.45%。与其他肝损伤指标乙酰胆碱酯酶试剂盒进行对比试验, 表明两种检测方法有一定的相关性($r=0.68$)。临床检测结果表明血清多肽 Pep5 水平随着肝损伤程度加重而升高, 与正常血清差异有统计学意义($P<0.01$)。**结论** 多肽 Pep5 可用于肝损伤进程定量血清学检测, 检测方法简便、可靠, 为后续深入研究多肽 Pep5 的功能及相关诊断试剂盒的研制和开发提供了科学依据。

【关键词】 多肽 Pep5; 酶联免疫吸附法; 肝损伤; 血清学诊断

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2013.20.001 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2013)20-2641-03

Development and application of quantitate assay for serum biomarker polypeptide5 of liver injury* FU Hai-yuan^{1,2,3}, HOU Li-ping², ZHOU Xiao-ming², HUANG Ya-juan², SONG Chun-yan², SUN Yun-bo², WANG Yang², YANG Bao-an⁴, XIAO Han-zu⁵, ZHEN Pei², WEI Kai-hua^{2,3,△}, WNAG Hai-bin⁶ (1. General Hospital of PLA, Beijing 100853, China; 2. Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing Proteomics Research Center, State Key Laboratory of Proteomics, National Center for Protein Sciences Beijing, Beijing 102206, China; 3. Wuhu Second People's Hospital of Anhui, Anhui 241000, China; 4. Beijing C&N International Sci-Tech Co., Ltd, Beijing 102206, China; 5. Hunan Jinjian Pharmaceutical Co., Ltd, Changde, Hunan 415001, China; 6. 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China)

【Abstract】 Objective To establish an enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) for polypeptide5(Pep5) in human serum and apply it to the serological diagnosis of the progression of liver injury. **Methods** Microplate was precoated with sample diluents, blocked with 5% milk, and samples were detected with anti Pep5 McAb labled with HRP. And 690 clinical samples were detected by method metioned above. **Results** Sensitivity was 1.25 ng/mL. Linear measurement range was 0—24 ng/mL. Recovery rate was 99.09%—107.08%. Intra-and inter-assay coefficinet of variation were 7.32% and 6.45% respectively, or less. The cross-reaction rate with acetylcholinesterase, laminin, hyaluronic and procollagen were all less than 1.00%. Clinical detecting showed that levels of Pep5 increased with the exacerbation of liver injury($P<0.01$). Compared with acetylcholinesterase kit, the relative coefficient(r) was 0.68.

Conclusion Pep5 could be used for the quantitative serological tests for the progression of liver injury, which might be reliable, simple and convenient, and could provide scientific evidences for the further study of Pep5 function and development of related diagnostic kits.

【Key words】 polypeptide5; enzyme-linked immunosorbent assay; liver injury; serological diagnosis

多种损肝因素引起的肝脏损害和炎症反应是肝纤维化、肝硬化的病理学基础, 也是导致发展为肝癌的必经过程^[1]。尽管对于肝硬化转为肝癌概率的报道不尽相同, 多数认为肝硬化是发生肝癌的最大风险因素^[2-3]; 并且 80% 左右的肝癌患者伴有肝硬化或晚期肝纤维化^[4-5]。现今大量的试验及临床研究已证实肝纤维化是可以逆转的, 是阻止向肝硬化发展的惟一时期, 也是临床上最佳的治疗时机, 因此在肝损伤初期肝纤维化阶段早期诊断治疗, 将有效降低肝硬化、肝癌的发病率及病死率^[6-8]。为此, 作者前期研究了一个新型肝损伤潜在血清多肽

标志物 Pep5, 它与肝病进程有着密切关系^[9-10]。本文旨在建立血清学诊断肝损伤病程进展的 Pep5 多肽酶联免疫吸附试验(pep ELISA)检测方法, 并初步应用于临床, 取得了满意效果, 现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集解放军 302 医院、空军总医院、北京肿瘤医院 469 例住院患者血清样本为阳性对照, 其中慢性肝炎 123 例、肝纤维化 30 例、肝硬化 176 例、肝癌 140 例。同时收集 3 家医院门诊健康体检者(查体无肝炎)血清 221 例为阴性对照。

* 基金项目: 国家高技术研究发展计划 863 项目(2012AA020205); 卫生部传染病重大专项(2008ZX10002-016)。

△ 通讯作者, E-mail: wkh@cnhupo.cn。

1.2 试剂及仪器 DEM-Ⅲ型自动酶标洗板机(北京拓普分析仪器有限公司);MK3 型酶联检测仪(Thermo, USA);电热恒温水箱(北京长安永创科学仪器有限公司);美国 Costor 96 孔可分拆聚苯乙烯酶联板;胆碱酯酶检测试剂盒(北京万泰德瑞诊断技术有限公司);合成多肽 Pep5(北京中科亚光生物科技有限公司);乙酰胆碱酯酶(AChE)、层黏连蛋白(LN)、透明质酸(HA)、三型前胶原(PCⅢ)(上海江莱生物科技有限公司)。

1.3 血清样品的采集 真空采血 4~6 mL,不加入抗凝血物质,室温放置 30 min,3 000 r/min 离心 10~15 min,取上清液分装每管 50 μ L,取 1 管进行检测,剩余样本置于一 80 $^{\circ}$ C 冻存备查。一般应该“当天采集、当天检测”。如当天无法检测,待检样本应置于 4 $^{\circ}$ C 储存。如果无法在采血后 2 d 内进行测定,则应将血清样本置于一 20 $^{\circ}$ C 保存,并避免反复冻融。

1.4 校准品的配制及阴阳性质控品 取合成多肽纯品(分子量误差允许 ± 0.5 Da,纯度大于 98%)配制 0.6 mg/mL 的校准品原料液,用校准品稀释液按比例稀释成 24、18、12、6、3、0 ng/mL 系列溶液作为本检测方法的校准品,每瓶 1 mL 分装冻存于一 20 $^{\circ}$ C 保存。

1.5 酶结合物反应液的配制 抗体稀释液(10 g/L BSA)将辣根过氧化物酶(HRP)标记抗 Pep5 抗体以 1:5 000 稀释后,4 $^{\circ}$ C 保存。

1.6 试验条件及方法 本试验方法采用前期建立的血清多肽 Pep5 ELISA 检测方法^[11],包被液为 0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液(pH 9.6),将一定比例稀释的待测血清样本和校准品分别滴加在 96 孔聚苯乙烯酶联板孔内,100 微升/孔,并设阴性对照、空白对照,4 $^{\circ}$ C 过夜;次日甩尽包被液,用 0.05% (v/v) Tween-20 磷酸盐缓冲液(PBST)洗板 5 次,每次 3 min;拍干后加封闭液(含 5% 脱脂奶粉的 PBST)300 微升/孔,37 $^{\circ}$ C 2 h;PBST 洗涤同上,拍干后加 HRP-抗 Pep5 抗体 100 微升/孔,37 $^{\circ}$ C 1 h;洗涤彻底拍干后加入 TMB 显色剂,100 微升/孔,37 $^{\circ}$ C 10 min;加 2 mol/L H_2SO_4 50 微升/孔终止反应,酶标仪 450 nm 处测量吸光度 A 值。

1.7 方法学评价

1.7.1 检测灵敏度及线性 将合成多肽 Pep5 溶液(纯度大于 98%,100 ng/mL)按比例稀释成 24、18、12、6、3 各重复检测 2 次,将结果平均值(平均 A 值)和稀释比例用最小二乘法进行直线拟合,并计算相关系数(r);测定 20 份空白对照孔(0 ng/mL),计算结果平均值、标准偏差(SD),分析灵敏度是平均值 $\pm 2SD$ 。

1.7.2 特异性 取肝损伤常用生化检测指标 AChE、LN、HA、PCⅢ对本方法进行特异性反应检测,重复检测 3 次。将各交叉反应物 A 值代入标准曲线中,计算各交叉反应值及交叉反应率(即交叉反应值与理论值的比)。

1.7.3 准确性及重复性 将合成多肽 Pep5 溶液(纯度大于 98%,100 ng/mL)按体积比 1:9 加入阴性质控血清中,与阴性质控血清同时平行重复测定 3 次。计算阴性质控血清添加前后实测值及添加回收率(R);对阴阳质控血清(正常、肝硬化)分别进行 10 孔平行重复测定,重复测定 3 次,计算批内、批间测定精密度。

1.7.4 健全性分析 采用零值校准品将高值血样(20.31 ng/mL),依次稀释 0.5、1、2、4 倍后与校准品同时测定,并计算实测浓度,以稀释倍数的倒数和实测浓度绘制曲线,计算线性相关系数。

1.7.5 样本干扰因素 取 20 份血清样本分别于 4 $^{\circ}$ C 放置 1、3、5、7 d,与一 20 $^{\circ}$ C 放置的血清样本平行检测,重复测定 2 次,

并计算 Pep5 含量在 4 $^{\circ}$ C 与一 20 $^{\circ}$ C 保存条件下的百分比。

1.8 统计学处理 组间数据通过 GraphPad Prism5 软件进行 t 检验分析获得 P 值;采用 MedCalc 软件绘制受试者工作曲线(ROC 曲线)对方法检测特异性、灵敏度进行分析。

2 结 果

2.1 本方法的主要技术指标 计算本方法线性范围 0~24 ng/mL 内的 r 为 0.998 7;分析灵敏度为 1.25 ng/mL(该样品孔与阴性对照孔吸光度比值大于 2.1)。特异性考察本方法与 AChE、LN、HA、PCⅢ的交叉反应率均不高于 1%(表 1),说明多肽 Pep5 的检测方法与上述 4 种指标检测结果无交叉。准确性考察结果显示,阴性质控血清添加前实测平均值为 4.59 ng/mL,计算添加回收率(R)为 99.09%~107.08%。平行测定 10 孔,重复性 3 次,获得批内精密密度为 5.62%~7.32%(表 2),批间精密密度不大于 6.45%,显示该方法具有良好的回收率及精密密度。健全性分析计算线性方程为 $Y=21.842X-0.3527$, r^2 为 0.995 0,呈良好的线性关系,说明具有良好的健全性。

表 1 特异性考察结果

交叉反应物及理论值	AChE250	LN100	HA300	PCⅢ150
实测反应值(ng/mL)	0.88	0.59	0.58	0.58
	0.76	0.63	0.59	0.59
	0.90	0.58	0.62	0.67
交叉反应率(%)	0.34	0.60	0.20	0.41

表 2 批内精密密度($n=10$,ng/mL)

质控	1 次		2 次		3 次	
	$\bar{x}\pm s$	CV(%)	$\bar{x}\pm s$	CV(%)	$\bar{x}\pm s$	CV(%)
阴性	4.65 $\pm$ 0.30	6.43	4.63 $\pm$ 0.29	6.22	4.61 $\pm$ 0.30	6.61
阳性	15.97 $\pm$ 1.17	7.32	16.33 $\pm$ 1.07	6.57	15.83 $\pm$ 0.89	5.62

2.2 样本干扰因素 干扰试验结果显示,当血清样本 4 $^{\circ}$ C 存放时间超过 5 d 时,与一 20 $^{\circ}$ C 存放样本测定偏差大于 10%,且样本测定结果普遍偏低,经 t 检验分析,两组检测结果差异有统计学意义($P<0.01$,图 1)。因此,对于多肽标志物检测来说,其血清样本 4 $^{\circ}$ C 存放不宜超过 3 d,较长时间保存时建议在一 20 $^{\circ}$ C 或一 80 $^{\circ}$ C。

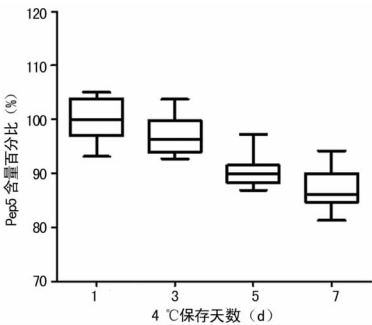
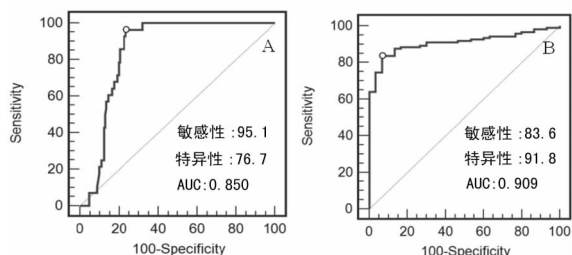


图 1 血清样本的稳定性试验

2.3 初步检测应用 用本方法检测 469 例肝损伤患者及 221 例健康对照血清样本。结果显示,随着肝损伤程度加重(肝炎 $\rightarrow$ 肝纤维化 $\rightarrow$ 肝硬化 $\rightarrow$ 肝癌),血清样本中多肽 Pep5 水平呈“S 型”曲线变化。正常健康血清多肽 Pep5 平均含量是(4.33 $\pm$ 2.90)ng/mL、肝炎、肝纤维化、肝硬化、肝癌患者多肽 Pep5 平均含量分别是(4.23 $\pm$ 3.46)、(6.69 $\pm$ 2.38)、(16.29 $\pm$ 5.60)、(15.62 $\pm$ 3.15) ng/mL。正常组与肝炎组中 Pep5 含量差异无统计学意义($P=0.6534$),肝硬化组与肝癌组间 Pep5 含量差异无统计学意义($P=0.4406$),而肝纤维化与各疾病组间多肽

Pep5 含量差异均有统计学意义($P<0.05$),说明肝纤维化是判别肝损伤进程、早期预警肝硬化、肝癌发生的关键阶段。

2.4 敏感性分析及特异性分析 进一步评价血清多肽 Pep5 用于诊断肝损伤病程进展的应用价值,应用 MedCalc 软件对检测的血清样本进行受试者特征工作曲线(ROC 曲线)的绘制。以阴性对照组与肝纤维化组绘制曲线,可得出曲线下面积为 0.850,敏感性为 95.1%,特异性为 76.7%(图 2A);以肝纤维化组与肝硬化组绘制曲线,可得出曲线下面积为 0.909,敏感性为 83.6%,特异性为 91.8%(图 2B)。



A:肝纤维化组及阴性对照组;B:肝纤维化组及肝硬化组。

图 2 临床血清样本的 Pep5 检测结果

2.5 试剂盒的对比试验 随机取 164 份正常及临床肝损伤血清样本,用本法与万泰德瑞生产的 AChE 试剂盒(批号:GG2104AA21)进行对比试验。检测结果用 GraphpadPrism 4.0 软件进行相关性分析,以血清样本中 Pep5 含量为横坐标, AChE 活性的自然对数为纵坐标绘制散点图,计算两组数据的 Kappa=0.68,表明肝损伤样本中 Pep5 含量与 AChE 活性呈负相关,且具有可靠的一致性(图 3)。

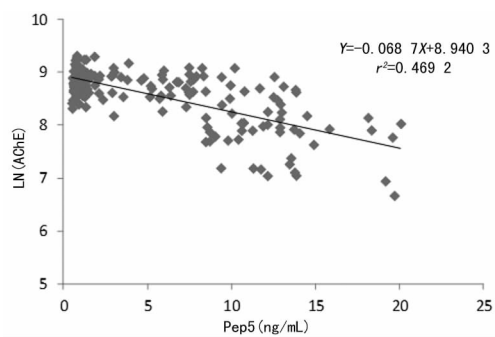


图 3 Pep5 含量与 AChE 水平的相关性分析

3 讨论

通过检测血清标志物观察慢性肝病患者肝组织损害严重程度,判断病程发展和预后有很重要的临床意义。临床常用的肝损伤生化指标有:丙氨酸氨基转移酶、天门冬氨酸氨基转移酶、碱性磷酸酶、 γ -谷氨酰转氨酶、总胆红素、血清清蛋白、胆碱酯酶及凝血酶原时间等,但各有其局限性,因此很少独立使用作为肝损伤严重程度的判别标准^[12]。

随着血清多肽组学的发展,血清多肽用于疾病的诊断越来越受到重视。多肽标志物 Pep5 在国际肿瘤标志物研究中已有报道。Villanueva 等^[13]发现 Pep5 可分别作为前列腺癌、乳腺癌和膀胱癌的肿瘤多肽标志物之一。本实验室研究发现,Pep5 作为肝癌肿瘤标志物亦有很好效果,判断肝病组(肝硬化、肝癌)与阴性对照的灵敏性为 80%,特异性 95%^[11]。然而,血清多肽 Pep5 水平在肝硬化与肝癌组间差异无统计学意义($P=0.4406$),说明在肝硬化阶段诊断为多肽 Pep5 高水平时,很有可能同时已伴随肝癌的发生。因此,作者进一步扩大样本研究范围,寻找多肽 Pep5 与肝病进程的关系。研究发现,Pep5 水平与肝损伤程度密切相关并呈现“S 型”曲线变化。肝纤维化

阶段血清样本中多肽 Pep5 水平明显上升,并伴随肝损伤严重程度继续升高,至肝硬化、肝癌阶段多肽 Pep5 含量变化趋于平缓,说明肝损伤程度到肝硬化阶段时,Pep5 水平变化已进入平台期,与报道称 80%左右的肝癌患者伴随有肝硬化或晚期肝纤维化一致^[5]。因此在肝纤维化阶段早期预警肝硬化、肝癌,通过治疗逆转或终止肝损伤进一步发展,将有效降低肝硬化、肝癌的发病率^[14]。血清多肽 Pep5 是一个新型的血清多肽标志物,在肝损伤进程监测方面具有重要的临床应用前景。

参考文献

- [1] Huang T, Wang J, Cai YD, et al. Hepatitis C virus network based classification of hepatocellular cirrhosis and carcinoma[J]. PLoS One, 2012, 7(4): e34460.
- [2] Gish RG. Hepatocellular carcinoma: overcoming challenges in disease management[J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2006, 4(3): 252-261.
- [3] Debruyne EN, Delanghe JR. Diagnosing and monitoring hepatocellular carcinoma with alpha-fetoprotein: new aspects and applications[J]. Clin Chim Acta, 2008, 395(1-2): 19-26.
- [4] El-Serag HB, Marrero JA, Rudolph L, et al. Diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma[J]. Gastroenterology, 2008, 134(6): 1752-1763.
- [5] Severi T, van Malenstein H, Verslype C, et al. Tumor initiation and progression in hepatocellular carcinoma: risk factors, classification, and therapeutic targets[J]. Acta Pharmacol Sin, 2010, 31(11): 1409-1420.
- [6] Hoffman LR, Bonnie WR. Cystic fibrosis therapeutics current and future cystic fibrosis therapies: the road ahead[J]. Chest, 2013, 143(1): 207-213.
- [7] Shang S, Plymoth A, Ge S, et al. Identification of osteopontin as a novel marker for early hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 2012, 55(2): 483-490.
- [8] Zhang Z, Xu L, Wang Z. Screening serum biomarkers for early primary hepatocellular carcinoma using a phage display technique[J]. J Clin Lab Anal, 2011, 25(6): 402-408.
- [9] 原剑,孙云波,周晓明,等. 多肽抗体免疫富集-质谱法检测肝癌患者血清多肽标志物[J]. 分析化学, 2011, 39(8): 1129-1133.
- [10] 傅海媛,原剑,周晓明,等. 免疫质谱法检测肝癌血清多肽标志物[J]. 分析化学, 2012, 40(12): 1803-1806.
- [11] 周晓明,傅海媛,黄亚娟,等. 多肽抗体检测原发性肝癌血清标志物 ELISA 方法的建立及应用[J]. 生物技术通报, 2012(5): 179-184.
- [12] 樊锡凤,尹志辉. 用 ROC 曲线分析八种常用检测指标在病毒性肝损伤中的诊断价值[J]. 河北医药, 2010, 32(1): 116-117.
- [13] Villanueva J, Shaffer DR, Philip J, et al. Differential exoprotease activities confer tumor-specific serum peptidome patterns[J]. J Clin Invest, 2006, 116(1): 271-284.
- [14] 张晓玲,王小云,谢会忠,等. 血清生化指标对慢性肝炎病变程度的评价[J]. 世界华人消化杂志, 2009, 17(14): 1458-1461.