

· 论 著 ·

流式荧光法检测血清胃蛋白酶原 I / II 的应用评价

王绍亮¹, 程 江^{2△}

(1. 石河子大学医学院, 新疆石河子 832000; 2. 石河子大学医学院第一附属医院检验科, 新疆石河子 832008)

摘要:目的 评价流式荧光法在血清胃蛋白酶原(PG) I / II 检测中的临床应用价值。方法 评价流式荧光法检测 PG I / II 的精密度, 通过检测临床血清标本与酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒进行方法学比对, 初步建立健康人群 PG I / PG I / PG II 比值的参考值范围, 并应用流式荧光法检测浅表性胃炎、萎缩性胃炎、胃癌患者血清。结果 PG I 检测批内变异系数($CV_{\text{批内}}$)为 4.26%~5.35%, 批间变异系数($CV_{\text{批间}}$)为 6.73%~7.75%。PG II 检测 $CV_{\text{批内}}$ 为 5.48%~6.42%, $CV_{\text{批间}}$ 为 8.46%~8.85%。与 ELISA 方法进行方法学比对存在线性关系, 线性方程分别为 PG I : $Y = 0.911X - 22.635$ ($r = 0.966, P < 0.05$); PG II : $Y = 0.892X - 0.548$ ($r = 0.980, P < 0.05$)。PG I 和 PG I / PG II 比值的参考区间下限分别为 32.77 ng/mL、4.16。萎缩性胃炎和胃癌患者血清 PG I 水平和 PG I / PG II 比值明显低于浅表性胃炎患者, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论 流式荧光法可以实现 PG I / PG II 的并行测试, 方法学性能良好, 可以提高检测效率, 流式荧光法对血清 PG I 和 PG II 的测定可以为早期胃癌和萎缩性胃炎的筛查及诊断提供实验室依据。

关键词:流式荧光法; 性能评价; 胃蛋白酶原 I; 胃蛋白酶原 II**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2015.13.016**文献标识码:**A**文章编号:**1673-4130(2015)13-1839-03

Application and evaluation of flow fluorescence assay in detection of serum pepsinogen I and II

Wang Shaoliang¹, Cheng Jiang^{2△}

(1. Medicine College, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832000, China; 2. Department of Clinical Laboratory, First Affiliated Hospital of the Medical College, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832008, China)

Abstract: Objective To evaluate the clinical application value of flow fluorescence assay in determination of serum pepsinogen I and II. **Methods** The precision of flow fluorescence assay in the detection of serum pepsinogen I and II were evaluated. Methodology comparison were conducted between flow fluorescence assay and enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) kit through detecting clinical samples. The reference ranges for PG I and PG II / PG I ratio of healthy population were established. The levels of PG I and PG II / PG I ratio were detected in serum samples of patients suffering superficial gastritis, atrophic gastritis and gastric cancer. **Results** The within-run and between-run coefficient of variation of PG I were 4.26%~5.35% and 6.73%~7.75%, respectively. And those of PG II were 5.48%~6.42% and 8.46%~8.85%, respectively. Methodology comparison between flow fluorescence assay and ELISA demonstrated good linear correlations. The linear equation was $Y = 0.911X - 22.635$ ($r = 0.966, P < 0.05$) and $Y = 0.892X - 0.548$ ($r = 0.980, P < 0.05$) for PG I and PG II, respectively. The lower limit of the reference range of PG I and PG II / PG I ratio were 32.77 ng/mL and 4.16, respectively. The PG I and PG I / PG II ratio of patients suffering atrophic gastritis and gastric cancer were statistically significantly lower than those in patients suffering superficial gastritis ($P < 0.05$). **Conclusion** The flow fluorescence assay could conduct simultaneous detection of PG I and PG II with good methodological performance and high efficiency. The determination of PG I and PG II levels through flow fluorescence assay could provide laboratory basis for the screening and diagnosis of atrophic gastritis and early gastric cancer.

Key words: flow fluorescence assay; performance evaluation; pepsinogen I; pepsinogen II

胃蛋白酶原(PG)是胃蛋白酶的前体, 分为 PG I 、PG II , 血清 PG 浓度的变化可以反映胃黏膜的功能状况^[1]。目前进行 PG 检测的常用方法有放射免疫分析法(RIA)、酶联免疫吸附试验(ELISA)、化学发光法(CLIA)、时间分辨荧光免疫分析法(TrFIA) 及乳胶增强免疫比浊法等^[2-4]。本研究应用流式荧光技术对 PG 进行检测, 并对 PG 定量检测试剂盒进行性能分析及临床诊断价值评估。

1 材料与方法

1.1 标本来源 2013 年 11 月至 2014 年 6 月于新疆石河子大学医学院第一附属医院健康体检无胃部疾病的健康人群(男 88 例、女 72 例, 年龄 26~62 岁)血清标本 160 份。另收集同期住院与门诊的浅表性胃炎患者血清 45 份(浅表性胃炎组)、萎

缩性胃炎患者血清 40 份(萎缩性胃炎组)、胃癌患者血清 38 份(胃癌组)。

1.2 仪器与试剂 Luminex 200 多功能流式点阵分析仪(美国 Luminex 公司), 全自动酶联免疫分析仪(山东艾德康公司)。PG I / PG II 流式荧光定量测定试剂盒(上海透景公司), ELISA 试剂盒(芬兰 Biohit 公司)。

1.3 方法

1.3.1 标本检测方法 (1)流式荧光法检测:按照 PG I / PG II 流式荧光定量试剂盒说明书进行操作, 在 Luminex 200 多功能流式点阵分析仪上检测血清 PG I 、PG II 水平。(2)ELISA 法检测:按照 PG I / PG II 的 ELISA 试剂盒说明书, 并利用全自动酶联免疫分析仪进行加样检测。按照上述方法检测浅表

性胃炎组、萎缩性胃炎组、胃癌组患者血清 PG I 、PG II 水平。

1.3.2 精密度试验 参考美国临床实验室标准化委员会(NCCLS)EP5-A2 文件^[5]标准进行试验与数据处理。用流式荧光法检测 PG I 、PG II 的低值和高值标本, 每个浓度各 1 份, 每天进行两个批次的测试, 每批测试对高、低值标本进行双份测量, 共做 20 d, PG I 、PG II 各获取 80 个测试结果, 分别求出批内变异系数($CV_{\text{批内}}$)和批间变异系数($CV_{\text{批间}}$)。

1.3.3 方法学比对试验 用流式荧光法检测 120 例患者血清标本 PG I 、PG II 水平(Y), 并与 ELISA 检测结果(X)进行相关回归分析, 建立回归方程。

1.3.4 参考区间建立方法 用流式荧光法检测 160 例健康人群血清 PG I 、PG II 水平, 并对 PG I 、PG I /PG II 进行正态性检验, 若不服从正态分布则采用百分位数法建立 PG I 、PG I /PG II 的参考区间。以第 5 百分位数(P_5)作为参考区间下限。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计学软件进行数据处理与统计分析。两种方法间的相关性分析采用 Person 相关性分析; 以百分位数法确定正常参考范围。偏态分布的计量资料以中位数与四分位数间距 [$M(P_{25} \sim P_{75})$] 表示, 多组间比较用 Kruskal-Wallis H 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 精密度 流式荧光法检测 PG I 、PG II 的批内精密度和批间精密度, 见表 1。

表 1 PG I 、PG II 不同浓度水平的精密度评估数据

指标	浓度 水平(ng/mL)	批内精密度		批间精密度		
		均值	标准差	$CV_{\text{批内}}(\%)$	标准差	$CV_{\text{批间}}(\%)$
PG I	高值	87.61	3.73	4.26	5.90	6.73
	低值	36.60	1.96	5.35	2.84	7.75
PG II	高值	12.76	0.82	6.42	1.13	8.85
	低值	6.38	0.35	5.48	0.54	8.46

2.2 方法学比对 通过计算, PG I 两种方法间的线性回归方程: $Y = 0.911X - 22.635$ ($r = 0.966, P < 0.05$); PG II 两种方法间的线性回归方程: $Y = 0.892X - 0.548$ ($r = 0.980, P < 0.05$)。结果表明, 两种方法检测 PG I 、PG II 的结果具有较好的相关性, 见图 1~2。

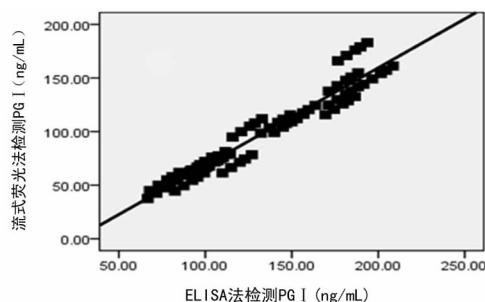


图 1 两种方法检测 PG I 的线性回归曲线

2.3 参考值区间建立 用流式荧光法检测 160 例健康人群血清 PG I 、PG II 水平。并对 PG I 、PG I /PG II 的数值进行正态性检验, 结果表明二者数据均不服从正态分布, 故采用百分位数法建立 PG I 、PG I /PG II 的参考区间。PG I 的 P_5 为 32.77 ng/mL, 第 1 百分位数(P_1)为 27.53 ng/mL; PG I /PG II 比值

的 P_5 为 4.16, P_1 为 3.47。以 PG I 、PG I /PG II 比值的 P_5 为参考区间下限。

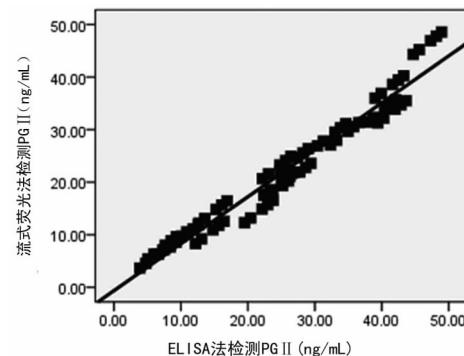


图 2 两种方法检测 PG II 的线性回归曲线

2.4 各试验组 PG I 、PG I /PG II 比值的检测结果 萎缩性胃炎组和胃癌组的 PG I 、PG I /PG II 比值明显低于浅表性胃炎组, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。不同组别 PG I 和 PG I /PG II 比值, 见表 2。

表 2 各试验组 PG I 和 PG I /PG II 比值比较
[$M(P_{25} \sim P_{75})$]

组别	PG I (ng/mL)	PG I /PG II
浅表性胃炎组	127.51(65.64~217.98)	7.31(5.71~9.93)
萎缩性胃炎组	57.69(36.90~70.72)	5.51(3.96~6.99)
胃癌组	45.25(21.96~69.02)	3.59(2.46~5.32)

3 讨 论

胃癌是一种常见的消化系统肿瘤, 在我国有着较高的病死率。长期以来, 胃癌的诊断主要依靠胃镜和病理检查, 但由于胃镜及病理检查对操作人员有着较高要求, 且患者依从性差, 未能做到很好的普及。因此, 寻找一种快速、简便、可靠的胃癌早期筛查方法则显得尤为重要。

近年来, 国内外一些学者对血清 PG 在胃癌早期筛查中的应用价值做了大量研究^[6-8]。PG 是胃蛋白酶的前体, 它有 PG I 和 PG II 两种同工酶原, PG I 主要由胃底腺的主细胞和颈黏液细胞分泌, PG II 除来源于上述细胞分泌外还来源于幽门腺及十二指肠腺^[9]。通过检测血清中 PG 浓度的变化, 可以反映胃黏膜的功能状况, 从而为胃癌的早期筛查提供实验室依据。

目前血清 PG 的检测方法很多, 但都只能进行单一项目检测, 本试验所应用的流式荧光技术是通过在不同荧光编码的微球上进行抗原-抗体结合反应, 并经红-绿两束激光分别检测微球编码和荧光信号来达到定性和定量的目的, 一个反应孔内可以完成多达 100 种不同生物学反应, 具有标本用量少, 联合检测速率快的优点^[10-11]。

本试验评估了流式荧光法检测血清 PG I 、PG II 的精密度, $CV_{\text{批内}} < 7\%$, $CV_{\text{批间}} < 9\%$ 。通过与 ELISA 法进行方法学比对, 结果表明两种方法检测 PG I 、PG II 具有较好的相关性(r 分别为 0.966、0.980), 但由于方法学不同, 流式荧光法检测的结果普遍低于 ELISA 法检测的结果。通过检测 160 例健康人群血清标本, 确定以 P_5 为参考区间下限, 初步建立本地区参考区间, PG I 和 PG I /PG II 比值的 P_5 分别是 32.77 ng/mL、4.16。通过应用流式荧光法检测浅表性胃炎患者、萎缩性胃炎患者、胃癌患者血清 PG I 、PG II, 结果(下转第 1843 页)

成像(MRI)不能提供有效的影像学诊断信息^[3],同时缺乏特异的临床表现,早期发现与诊断困难。脑脊液细胞学检查检出肿瘤细胞是诊断脑膜癌的可靠依据,但首次腰穿阳性率仅为 50%^[4],且操作繁琐、不同人员检测结果差异大。Sysmex XE-5000 全自动血液分析仪的 HF-BF 参数,可以提高检测灵敏度,且操作简单,结果重复性好,为脑膜癌的早期发现及诊断提供了一个新途径。

本研究首先对 HF-BF 参数进行了初步性能验证,对高、低 2 个浓度的肿瘤细胞悬液分别进行 20 次重复检测,2 组结果 CV% 均小于 20%,变异程度在可接受范围。在方法学比较试验中,仪器检测结果与脑脊液细胞学镜检分类结果具有较好的一致性。可见,HF-BF 是一个较为可靠的参数。

在脑脊液标本中,HF-BF 细胞主要是肿瘤细胞,该参数的升高可提示标本中存在肿瘤细胞。将脑膜癌组的 HF-BF% 与其他脑疾病组及对照组比较,脑膜癌组 HF-BF% 明显高于其他脑疾病组和对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。HF-BF% 在其他各型颅内感染疾病组也可出现轻微升高。脑膜癌组脑脊液细胞学检查均可检出肿瘤细胞,肿瘤细胞胞体增大,胞浆深染,可见核仁、多核或核分裂象。分裂象细胞也可一过性地出现在非癌性脑膜炎的脑脊液中,一般见于炎症急性期,炎症好转后该类细胞可消失。在细菌性脑膜炎、结核性脑膜炎、神经梅毒的脑脊液标本中均有检出。脑膜癌组以外的各个脑疾病组中 HF-BF% 无明显升高。可见 HF-BF% 在脑脊液检验中可作为一项有效的参考指标,对脑脊液中存在肿瘤细胞具有重要的提示意义。

HF-BF 作为脑脊液检验的一项参数,其医学决定水平仍未见报道。根据本研究绘制的 ROC 曲线,当 HF-BF% 为

(上接第 1840 页)

显示萎缩性胃炎和胃癌患者血清 PG I 水平和 PG I / PG II 比值,明显低于浅表性胃炎组,差异均有统计学意义($P < 0.05$),与相关文献报道基本相符^[12-18]。

综上所述,应用流式荧光法检测血清 PG I / II,具有良好的分析性能,为胃癌和萎缩性胃炎的早期诊断提供了较好的检测手段。

参考文献

- [1] 杨胜茹. 胃蛋白酶原的研究现状及应用[J]. 检测医学, 2009, 15(4): 605-606.
- [2] 张珏, 黄飚, 朱岚. 胃蛋白酶原双标记时间分辨荧光免疫分析及其初步临床应用[J]. 生物化学与生物物理进展, 2008, 35(4): 471-476.
- [3] 朱国民, 邱枫. 三种血清胃蛋白酶原检测方法在胃癌筛查中的比较分析[J]. 检验医学, 2012, 27(11): 9.
- [4] 杨瑞生, 韩大正, 马芬, 等. 胃癌筛查时血清胃蛋白酶原 4 中检测方法的比价分析[J]. 中国医学创新, 2012, 9(6): 78-79.
- [5] National Committee for Clinical Laboratory Standards. EP5-A2 Evaluation of precision performance of quantitative measurement methods[S]. 2nd ed. Wayne, PA, USA: NCCLS, 2004.
- [6] 陈智周, 范振冠. 胃蛋白酶原 I、II 在早期胃癌普查中的意义[J].

4.3% 时,灵敏度达 95.2%,特异度达 92.7%。即当采用 Sysmex XE-5000 全自动血液分析仪模式检测脑脊液标本时,结果显示 HF-BF% 大于 4.3%,提示脑脊液中检出肿瘤细胞的可能性大,需要细胞学进一步确认,应在细胞学镜检时特别注意有无肿瘤细胞。

在精密度试验中,肿瘤细胞仪器计数结果呈随时间衰减趋势,与显微镜手工计数结果相符,提示肿瘤细胞容易自行溶解破坏,是仪器精密度较低的原因之一,也是脑脊液中查到肿瘤细胞阳性率低的原因之一。因此,应注意脑脊液标本的及时送检与及时检验。

Sysmex XE-5000 全自动血液分析仪模式的 HF-BF 参数,是脑膜癌早期诊断的一项可靠指标,具有较好的临床应用前景,其临床应用还需要更多的临床试验进行完善。

参考文献

- [1] Lee JL, Kang YK, Kim TW, et al. Leptomeningeal carcinomatosis in gastric cancer[J]. J Neurooncol, 2004, 66(1/2): 167-174.
- [2] Martins SJ, Azevedo CR, Chinen LT, et al. Meningeal carcinomatosis in solid tumors[J]. Arq Neuropsiquiatr, 2011, 69(6): 973-980.
- [3] Chawla M, Reddy R, Kumar R, et al. PET-CT in detection of meningeal metastasis in neuroblastoma[J]. Pediatr Surg Int, 2009, 25(2): 211-215.
- [4] Miller E, Dy I, Herzog T. Leptomeningeal carcinomatosis from ovarian cancer[J]. Med Oncol, 2012, 29(3): 2010-2015.

(收稿日期:2015-05-12)

中华肿瘤杂志, 2002, 24(1): 1-3.

- [7] Mikl K, Fujishiro M, Kodashima S, et al. Long-term results of gastric cancer screening using the serum pepsinogen test method among an asymptomatic middle-aged Japanese population[J]. Dig Endosc, 2009, 21(2): 78-81.
- [8] Kim N, Jung HC. The role of serum pepsinogen in the detection of gastric cancer[J]. Gut & Liver, 2010, 4(3): 307-319.
- [9] Samloff IM, Varis K, Ihamaiki T, et al. Relationships among serum pepsinogen I, serum pepsinogen II and gastric mucosal histology: a study in relatives of patients with pernicious anemia[J]. Gastroenterology, 1982, 83(1/2): 204-209.
- [10] Seideman J, Peritt D. A novel monoclonal antibody screening method using the Luminex-100TM microsphere system[J]. J Immunol Methods, 2002, 267(2): 165-171.
- [11] 周晓芳, 盛海刚. Luminex 系统的技术原理与应用[J]. 临床检验杂志, 2010, 28(4): 247-249.
- [12] 邱志奇, 温少磊, 谭智毅. 胃蛋白酶原 I、II 及其比值在胃癌筛查中的应用[J]. 检验医学与临床, 2013, 10(14): 1806-1807.
- [13] 雷勇. 胃蛋白酶原亚群测定对胃癌早期诊断预测的研究[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2009, 23(5): 441-442.

(收稿日期:2015-03-08)