

• 论 著 •

人组织激肽释放酶 6 双抗夹心 ELISA 方法的建立及临床初步应用*

张 华,胡成进[△],陈奎香

(济南军区总医院实验诊断科,济南 250031)

摘 要:目的 通过制备的人组织型激肽释放酶 6(hK6)单克隆抗体(mAb),建立双抗夹心酶联免疫吸附测定(ELISA)检测方法,并用于胃癌诊断。**方法** 采用该实验室保存的 hK6 重组蛋白,免疫 BALB/c 小鼠后通过杂交瘤技术制备特异性的 mAb,经鉴定纯化、酶标记后,建立双抗夹心 ELISA 方法,检测胃癌患者血清中 hK6 水平,并联合检测血清中的癌胚抗原(CEA)水平,探讨 hK6 作为胃癌生物标记的可行性。**结果** 成功建立了检测血清中 hK6 的双抗夹心 ELISA 方法,并确定该方法包被抗体的最适浓度为 5 μg/mL,酶标记抗体的最佳稀释比例为 1:2 000。该方法检测各组血清中的 hK6 水平,与胃溃疡组 hK6 水平[(3.59 ± 1.02)ng/mL]和健康体检组 hK6 水平[(3.35 ± 0.67)ng/mL]比较,胃癌组 hK6 水平[(5.78 ± 1.66)ng/mL]明显高于其他两组,差异有统计学意义($P < 0.05$);而胃溃疡组与健康体检组 hK6 水平比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。胃癌患者 hK6 和 CEA 检测的阳性率分别为 69.70%和 45.46%,两者联合检测的阳性率为 78.79%。**结论** 成功建立了 hK6 双抗夹心 ELISA 检测方法;hK6 是较好的胃癌血清肿瘤标记物,同时检测 hK6 与 CEA 可提高胃癌的检出率,减少漏诊的发生,有助于胃癌的诊断。

关键词:人组织激肽释放酶 6; 单克隆抗体; 酶联免疫吸附测定

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.17.001

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)17-2337-03

Development and clinical application of a Sandwich ELISA for hK6 detection*

ZHANG Hua, HU Chengjin[△], CHEN Kuixiang

(Department of Laboratory Diagnosis, General Hospital of Ji'nan Military Command, Ji'nan, Shandong 250031, China)

Abstract: Objective To prepare the mAbs against hK6 for establishing a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of hK6, and exploring its clinical value. **Methods** The hybridoma technique was used to prepare mAbs against hK6. The mAbs were purified and labelled with horseradish peroxidase for the sandwich ELISA method. The sandwich ELISA method was used to detect the serum hK6 concentrations in patients with malignant gastric neoplasm. Then the best antibody pair was selected from coating antibody and enzyme-linked antibody to establish a sandwich ELISA method through the chessboard titrations. Compared with CEA, we explored the feasibility of hK6 as gastric cancer biomarkers. **Results** A sandwich ELISA method was established for quantifying hK6 in serum. The results showed that the optimal concentration of coating antibody was 5 μg/mL. The optimal concentration of enzyme-linked antibody was 1:2 000. Serum hK6 in the patients with gastric cancer groups[(5.78 ± 1.66) ng/mL] than healthy individuals groups[(3.35 ± 0.67)ng/mL] and those in gastric ulcer groups[(3.59 ± 1.02)ng/mL], the difference was statistically significant($P < 0.05$). Furthermore, there was no significant difference in values of serum hK6 between patients with gastric ulcer groups and healthy individuals groups($P > 0.05$). The hK6 positive rate of gastric cancer was 69.70%, and CEA was 45.46%. In the combined detection, the positive rate was 78.79%. **Conclusion** A sandwich ELISA is established successfully. As a favorable serum biomarker for gastric cancer, the detection of hK6 together with CEA is helpful in the diagnosis of gastric cancer.

Key words: human kallikrein 6; monoclonal antibody; enzyme-linked immunosorbent assay

人组织型激肽释放酶基因家族(KLKs)是一类新型的肿瘤标志物家族^[1],近年来愈来愈受到重视,该基因家族定位于19q13.3~13.4染色体上,15个家族成员中的 KLK6 编码人组织型激肽释放酶 6(hK6)。该酶分布广泛在人体组织和体液中^[2],具有胰蛋白酶样活性^[3],在肿瘤的发生、发展中发挥重要作用。前期工作中已获得原核表达的 hK6 重组蛋白和分泌 hK6 抗体的杂交瘤细胞株,本研究先制备 hK6 单克隆抗体(mAb),建立双抗夹心酶联免疫吸附测定(ELISA)检测方法,然后检测胃癌患者血清 hK6 水平,并与癌胚抗原(CEA)比较,研究 hK6 在胃癌诊断中的临床应用价值。

1 材料与方

1.1 材料 分泌 hK6 抗体的杂交瘤细胞株为本实验室保存;动物为 BALB/c 小鼠,6~8 周龄,雌性,购自山东大学动物实

验中心。分别收集胃癌组患者血清 165 例,胃溃疡组患者及健康体检组血清各 50 例。所有患者血液标本为手术前采集,分离血清后-80℃保存待用。

1.2 仪器与试剂 hK6 重组蛋白(本实验室保存),胎牛血清、1640 培养基(美国 Hyclone 公司),完全弗氏佐剂、不完全弗氏佐剂(美国 Sigma 公司),protein A agarose 亲和层析柱(美国 Pierce 公司),CEA 试剂盒(武汉中美科技公司)。

1.3 方法

1.3.1 抗体制备 (1)mAb 制备:用本实验室保存的 hK6 重组蛋白,免疫 BALB/c 小鼠后通过杂交瘤技术获得产生特异性 mAb 的杂交瘤细胞株,扩大培养后,将细胞回输 BALB/c 小鼠腹腔中使其产生腹腔积液,收集腹腔积液,提取 mAbs。(2)抗体检测:亲和层析法纯化抗体;二辛可酸(BCA)法测定蛋白浓

* 基金项目:全军“十一五”计划面上项目(06MA101)。

作者简介:张华,女,主管技师,主要从事恶性肿瘤分子诊断及临床免疫检验研究。△ 通信作者,E-mail:hcj6289@163.com。

度;间接 ELISA 方法检测抗体效价。

1.3.2 ELISA 试剂盒的建立 (1)辣根过氧化物酶标记抗体及酶标抗体检测:酶标抗体的制备按说明书步骤进行;酶标抗体检测通过以下进行,稀释 hK6 重组蛋白包被酶标板,加入不同稀释倍数的酶标抗体,反应终止后读取 OD 值。(2)最适工作条件确定:采用棋盘滴定法,稀释 mAb 包被酶标板,每个浓度包被三横行三纵行,横行中加入不同稀释倍数的 hK6 重组蛋白,水浴 2 h 后在纵行加入不同稀释倍数的酶标抗体,反应终止读取 OD 值。(3)标准曲线的制定:hK6 mAb 包被酶标板,加入不同浓度的 hK6 重组蛋白,反应终止后,读取 OD 值。根据各孔的吸光度值绘制标准曲线。

1.4 临床标本 hK6 蛋白水平测定 利用优化的双抗夹心 ELISA 方法分别检测胃癌、胃溃疡及健康体检者血清中 hK6 蛋白水平,hK6 水平大于健康体检者($\bar{x}\pm s$)定为阳性。

1.5 胃癌患者血清中 CEA 水平测定 按照说明书步骤进行,检测胃癌患者血清中 CEA 水平,CEA>5 ng/mL 为阳性。

1.6 统计学处理 采用 SPSS15.0 统计学软件,计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,比较采用 *t* 检验,率比较采用 χ^2 检验。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 抗体制备及检测 以 hK6 重组蛋白为抗原,免疫 BALB/c 小鼠 4 次,通过杂交瘤技术获得 4 株稳定分泌特异性 mAb 的杂交瘤细胞株。该杂交瘤细胞株,在体外连续传代 20 次以上,培养上清抗体效价在 $1:10^3$ 左右。

2.2 ELISA 检测方法的建立 以 10 ng/mL hK6 重组蛋白作为强阳性抗原,5 ng/mL hK6 重组蛋白作为弱阳性抗原,并设置阴性对照。随酶标抗体稀释度增加,OD 值逐渐变小,说明标记抗体成功。从表 1 中可以看出,包被抗体浓度 5 μ g/mL,酶标抗体的稀释度 1:2 000 为最适工作条件。

表 1 包被抗体及酶标抗体的浓度确定(OD 值)			
稀释度	强阳性抗原	弱阳性抗原	阴性对照
3 μ g/mL			
1:1 000	0.848	0.593	0.102
1:2 000	0.723	0.421	0.093
1:4 000	0.499	0.225	0.059
5 μ g/mL			
1:1 000	1.368	0.804	0.165
1:2 000	1.178	0.648	0.098
1:4 000	0.683	0.297	0.074
7 μ g/mL			
1:1 000	1.396	0.836	0.234
1:2 000	1.204	0.673	0.156
1:4 000	0.697	0.451	0.084

2.3 hK6 标准曲线 应用建立的双 mAb 夹心 ELISA,在最适工作条件下检测血清中 hK6,制定标准曲线,见图 1。

2.4 双 mAb 夹心 ELISA 方法的临床初步应用 胃癌组 hK6 水平明显高于胃溃疡组和健康体检组,差异有统计学意义($P<0.05$);而胃溃疡组 hK6 水平与健康体检组比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见表 2。

2.5 hK6 与 CEA 联合检测 hK6 检测胃癌的阳性率为

69.70%,CEA 检测胃癌的阳性率为 45.46%,两者联合检测的阳性率为 78.79%(130/165)。

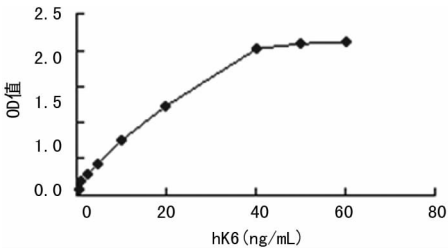


图 1 双 mAb 夹心 ELISA 检测血清中 hK6 标准曲线

表 2 血清中的 hK6 表达水平			
组别	<i>n</i>	hK6(ng/mL)	阳性率(%)
胃癌组	165	5.78 \pm 1.66 *	69.70
胃溃疡组	50	3.59 \pm 1.02	28.00
健康体检组	50	3.35 \pm 0.67	16.00

注: * $P<0.05$,与其他两组比较。

3 讨 论

hK6 为由肝脏、胰腺、脑神经等多器官组织合成的分泌型丝氨酸蛋白酶^[4],具有胰蛋白酶样活性,在多种组织和体液中都有表达。hK6 参与多种生理过程如降解细胞外基质(ECM)^[5],诱导 E-钙黏连素胞外脱落,降低细胞间的黏附性^[6],促进生长因子和血管生成因子的生成、血液凝固等,从而促进肿瘤的浸润、转移、肿瘤细胞的增殖,对肿瘤发生、发展过程发挥重要作用。

本研究发现,KLK6 在乳腺癌^[7]、卵巢癌^[8]、胃癌^[9]、胶质瘤组织中都有异常表达^[10]。笔者前期工作中建立了免疫组织化学方法,利用制备的 mAb 检测胃癌组织中的 hK6 表达情况,发现胃癌组织中阳性定位于细胞质,成颗粒样染色,而在癌旁胃黏膜呈阴性表达。本研究进一步探讨了 hK6 在胃癌、胃溃疡、健康体检者血清中的表达水平有无不同,以及其在胃癌诊断中的临床应用价值。

ELISA 方法具有灵敏度高、特异度强、操作简便、检测迅速并易于临床推广的优点^[11-12]。研究者利用双 hK6 mAb 来建立 ELISA 方法,提高了方法的灵敏度和特异度。对该方法进行了优化,首先选择标记酶,目前标记酶主要有辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -D-半乳糖苷酶、葡萄糖氧化酶、青霉素酶及乙酰胆碱酯酶等^[11]。而选择 Glue B 型活化辣根过氧化物酶标记抗体,该酶标率可达 90%,不需透析、活性好、本底低、灵敏度高。另外,采用棋盘滴定法确定该方法的包被抗体浓度和酶标抗体稀释度,并确定包被抗体浓度 5 μ g/mL 和酶标抗体稀释度 1:2 000 时为最佳工作条件。

在最佳工作条件下应用该 ELISA 方法分别检测血清中的 hK6,发现胃癌组 hK6 水平明显高于胃溃疡组与健康体检组,而胃溃疡组与健康体检组中 hK6 的表达比较差异无统计学意义($P>0.05$),说明 hK6 是良好的胃癌肿瘤标志物。研究发现 hK6 检测胃癌的阳性率为 69.70%,明显高于 CEA 检测胃癌的阳性率(45.46%)。与 CEA 联合检测,有一项标志物结果大于正常范围,即定为阳性,则阳性率达 78.79%,说明联合检测可提高胃癌阳性率,减少了漏诊的发生,有助于胃癌的诊断。

因此研究者建立的双 hK6 mAb 夹心 ELISA 方法具有灵敏度高、特异度强、操作简单,且适用于临床(下转第 2341 页)

降低感染率、提高双方的生殖健康水平。

综上所述,HR-HPV 感染女性与配偶之间存在病毒交叉感染,有必要对女性感染者配偶进行 HR-HPV 检测,对于预防病毒传播、促进夫妻共同防治感染有着积极的意义。

参考文献

[1] 朱艳,李永霞,刘丽利. 西北 4 省女性 13 种高危型人乳头瘤病毒感染年龄阶段的评估[J]. 国际检验医学杂志, 2016,37(3):408-409.

[2] Reyes JC, Sánchez-Díaz CT, Tortolero-Luna G, et al. Demographic and high-risk behaviors associated with HPV and HPV vaccine awareness among persons aged 15-74 years in puerto rico[J]. PR Health Sci J, 2015, 34(4): 195-200.

[3] 杨晓芳,张英,王欣. 新疆地区男性不育患者人乳头瘤病毒感染和抗精子抗体的回顾性研究[J]. 国际检验医学杂志, 2015,36(13):1910-1912.

[4] 宋磊,付晓宇. 多型别人乳头瘤病毒感染与宫颈癌[J]. 中国计划生育与妇产科, 2016,8(10):12-14.

[5] 龙秀荣,耿建祥,李丽,等. 176 例男性尿道口细胞中 HPV 感染基因型分布的研究[J]. 国际检验医学杂志, 2013,34(6):723-725.

[6] 刘北陆,栾建兵,郭文潮,等. 女性 HPV16,18 长期感染与其性伴侣感染相关性的研究[J]. 现代预防医学, 2013,40(17):3307-3309.

[7] 张倩,曹岷,马茜,等. 760 名女性生殖道高危型人乳头瘤病毒感染自然转归规律及影响因素[J]. 中国医学科学院学报, 2015,37(5):534-540.

[8] 陈雪,张敏,张翠,等. 高危型人乳头瘤病毒感染的病毒清除和持续感染的随访与观察[J]. 山西医科大学学报, 2016,47(7):628-632.

[9] 刘学伟,赵学英,张喜庄,等. 高危型人乳头瘤病毒感染女性及其配偶病毒检测结果分析[J]. 现代中西医结合杂志, 2016,25(8):807-809.

[10] 张靖,高波,康赟,等. 中国女性宫颈人乳头瘤病毒感染型别分布区域性特征的 Meta 分析[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2014,34(12):913-920.

[11] 赵字倩,赵方辉,胡尚英,等. 中国女性人群宫颈人乳头瘤病毒感染及型别分布的多中心横断面研究[J]. 中华流行病学杂志, 2015,36(12):1351-1356.

[12] 宋晓霞,贺慧,徐继跃,等. 常见 HR-HPV 各型在子宫颈组织中致癌能力的评估[J]. 临床与实验病理学杂志, 2016,32(3):272-277.

[13] Huh WK, Ault KA, Chelmow D, et al. Use of primary high-risk human papillomavirus testing for cervical cancer screening: interim clinical guidance[J]. Gynecol Oncol, 2015,136(2):178-182.

[14] 胥莎莎,何鑫,刘英俏,等. 高危型人乳头瘤病毒感染患者病毒清除及持续感染的随访性研究[J]. 首都医科大学学报, 2015,36(2):212-218.

[15] 赵学英,刘学伟,李莉蕊,等. 包皮环切术在防治夫妻共患高危型人乳头瘤病毒感染中的作用[J]. 中国医药导报, 2016,13(6):38-41.

(收稿日期:2017-03-06 修回日期:2017-05-01)

(上接第 2338 页)

应用的特点。联合检测血清中 hK6 和 CEA 水平,对提高胃癌检出率有积极作用。本研究为 hK6 ELISA 试剂盒的研发提供了重要的实验依据和临床数据,为今后的临床推广奠定了基础。

参考文献

[1] Clements JA, Willemsen NW, Myers SA, et al. The tissue kallikrein family of serine proteases: functional roles in human disease and potential as clinical biomarkers[J]. Criti Rev Clini Lab Sci, 2004,41(3):265-312.

[2] Gomis-Ruth FX, Bayes A, Sotiropoulou G, et al. The structure of human prokallikrein 6 reveals a novel activation mechanism for the kallikrein family[J]. J Biol Chem, 2002,277(30):27273-27281.

[3] Borgono CA, Diamandis EP. The emerging roles of human tissue kallikreins in cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2004, 4(11):876-890.

[4] Julie L, Shaw V, Eleftherios P. Diamandis. Distribution of 15 Human Kallikreins in Tissues and Biological Fluids [J]. Clinical Chemistry, 2007,53(8):1423-1432.

[5] Ghosh MC, Grass L, Soosaipillai A, et al. Human kallikrein 6 degrades extracellular matrix proteins and may

enhance the metastatic potential of tumour cells[J]. Tumour Biol, 2004,25(4):193-199.

[6] Klucky B, Mueller R, Vogt I, et al. Kallikrein 6 induce E-cadherin shedding and promotes cell proliferation, migration, and invasion[J]. Cancer Res, 2007, 67(17): 8198-8206.

[7] 胡成进,陈英剑,闻新棉,等. KLK6mRNA 在乳腺癌中的表达及其临床病理和生物学意义[J]. 解放军医学杂志, 2007,32(10):1085-1087.

[8] 张芳,陈英剑,胡成进. 17-β 雌二醇对人卵巢癌细胞株 HO8910KLK6 基因表达的调节[J]. 山东大学学报, 2007,45(1):42-54.

[9] 陈奎香,胡成进,陈英剑,等. 人组织激肽释放酶 6 在胃癌中的表达及其临床意义[J]. 中华检验医学杂志, 2009,32(11):1279-1281.

[10] 娄江涛,陈英剑,孙晓明,等. KLK6 在脑胶质瘤中的表达及生物学意义[J]. 中国医学工程, 2011,19(4):77-78.

[11] 焦奎,张书圣. 酶联免疫分析技术及应用[M]. 北京:化学工业出版社, 2004:84-141.

[12] 李文敏. 酶联免疫吸附反应的技术进展及应用[J]. 湖北职业技术学院学报, 2003,4(6):65-69.

(收稿日期:2017-02-03 修回日期:2017-04-03)