

药物对血液透析患者心肌重构有抑制作用,能改善患者心脏射血功能。

当机体血管内皮遭受持续高血压刺激时,可导致血管内皮细胞损伤分泌血管 ET-1。血清 ET-1 水平能反应患者血管内皮功能损伤的程度,与患者高血压程度和血管功能成正相关<sup>[12-13]</sup>。慢性肾脏病患者存在微炎症状态,持续微炎症状态会导致患者血压控制不佳,血清 TGF- $\beta$  水平与机体炎症状态呈密切相关。本研究结果发现,观察组在对照组基础上联合贝那普利片进行治疗后,血清 ET-1 水平、TGF- $\beta$  明显下降。这表明贝那普利有助于改善患者内皮功能和血清中炎症因子状态<sup>[14-15]</sup>。血管紧张素在血液透析患者中运用的主要风险是高钾血症。本研究发现采用贝那普利治疗的观察组出现高钾血症的风险并未增加,仅干咳患者比对照组多出 2 例,提示 ACE I 类药物在血液透析患者中运用时具有较高的安全性。

综上所述,贝那普利联合硝苯地平联合治疗血液透析患者高血压能够有效改善患者心脏功能和血管功能,抑制微炎症状态,值得临床推广运用。

#### 参考文献

- [1] 毕志辉,王维华,熊妙华. 硝苯地平控释片与盐酸贝那普利治疗血液透析高血压患者的疗效观察[J]. 中国当代医药,2013,20(3):84-85,87.
- [2] 邹晓荣,卢晓昭,李芳,等. ACE I 联合 ARB 对维持性血液透析患者 CRP、IL-1 和 IL-6 的影响[J]. 海南医学,2016,27(20):3293-3294,3295.
- [3] 迟雁青,王保兴,高建,等. 老年维持性血液透析患者高血压控制及降压药物应用情况分析[C]. 成都:中华医学会老年医学分会,2014:190-190.
- [4] 马丽洁,周亦伦,孙芳,等. 贝那普利和氯沙坦对血液透析患者血钾的影响[J]. 中国血液净化,2010,9(9):490-494.
- [5] 武彤,彭启华. 盐酸贝那普利对维持性血液透析患者血浆内皮素水平的影响[J]. 武警医学,2008,19(9):779-781.

#### • 临床研究 •

- [6] 孙保党. 血液透析高血压患者应用硝苯地平控释片与盐酸贝那普利的疗效观察[J]. 齐齐哈尔医学院学报,2014,35(19):2884-2885.
- [7] 美国 NKF-KDOQI 工作组. 慢性肾脏病及透析的临床实践指南[M]. 王海燕,王梅主译. 北京:人民卫生出版社,2005:307-310.
- [8] 唐文庄,海燕,王彧. 奥美沙坦联合贝那普利对 CGN 患者蛋白尿及肾功能转归的影响[J]. 重庆医学,2015,44(25):3570-3572.
- [9] 郑义,李会娟,赵建霞,等. 苯磺酸氨氯地平联合贝那普利对维持性血液透析患者左心室重构的影响[J]. 临床合理用药杂志,2015,8(10):15-16.
- [10] 周雪莲. 硝苯地平控释片与盐酸贝那普利治疗血液透析高血压患者的疗效[J]. 中国现代药物应用,2016,10(24):62-63.
- [11] 王凯,曲青山,邢利,等. 血液灌流清除内皮素、瘦素对血液透析患者难治性高血压疗效分析[J]. 实用医学杂志,2014,30(4):597-598.
- [12] 杨道理,罗南萍,孙晓明. CD95、Bcl-2 和 TGF- $\alpha$  表达在慢性肾衰及血液透析患者的临床应用[J]. 放射免疫学杂志,2005,18(3):161-163.
- [13] 白亚玲,徐金升,孙利军,等. 维持性血液透析中并发高血压患者血清 ET-1、NO 水平变化[J]. 山东医药,2013,53(18):6-8.
- [14] 尤燕舞,林栩,杨发奋,等. 联机血液透析滤过对维持血液透析患者血 TGF- $\beta$ 、CRP 的影响[J]. 右江医学,2011,39(6):691-693.
- [15] 罗南萍,杨道理,孟建中,等. TGF- $\alpha$  与 IGF- II 在血液透析前后的变化及意义[J]. 免疫学杂志,2000,16(2):134-135.

(收稿日期:2017-04-06 修回日期:2017-07-26)

## 人血清层粘连蛋白直接化学发光免疫分析法的建立及评价

方亮,王芬,刘献文,邬期望

(美康生物科技股份有限公司,浙江宁波 315040)

**摘要:**目的 建立检测人血清层粘连蛋白(LN)的直接化学发光免疫分析法(CLIA),并对检测性能进行方法学评价。方法 采用包被有抗人 LN 单抗的微米级磁珠和吡啶酯标记抗人 LN 单抗分别作为固相试剂和发光试剂,建立并优化定量检测人血清 LN 水平的 CLIA 法,评价该方法的线性范围、灵敏度、精密度和特异性等性能指标,并与市场上同方法学的 LN 检测试剂盒进行相关性对比分析。结果 该方法线性范围为 5.00~1 000.00 ng/mL,检测灵敏度小于 5.00 ng/mL,血清平均回收率为 97.60%,批内变异系数(CV)小于 5.00%,批间 CV 小于 8.00%,特异性、稳定性良好,与市场上同方法学的 LN 检测试剂盒具有较好相关性。结论 建立的人血清 LN 直接化学发光免疫分析法能够满足临床检测需求。

**关键词:**肝纤维化; 层粘连蛋白; 化学发光; 吡啶酯

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.21.047

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)21-3055-03

层粘连蛋白(LN)是相对分子质量约为  $900 \times 10^3$  的非胶原糖蛋白,由 3 条肽链组成<sup>[1]</sup>。作为血清肝纤维化标志物之一,LN 可准确地反映患者炎症活动度及纤维化程度<sup>[2-3]</sup>。LN 检测作为一种非创伤性辅助肝纤维化诊断方法,具有较大的应用价值。目前,LN 检测方法有放射免疫测定法、酶联免疫吸附测定(ELISA)法、时间分辨荧光免疫分析法、上转换发光法、

化学发光酶免疫分析(CLEIA)法和直接化学发光免疫分析(CLIA)法,其中 CLEIA 法和 CLIA 法已广泛应用于临床检测及科学研究<sup>[4-5]</sup>。本研究建立人血清 LN 的 CLIA 法,为临床提供参考。

### 1 资料与方法

**1.1 标本来源** 选取 186 例健康人群及肝纤维化患者临床血

清作为研究标本。

**1.2 仪器与试剂** 羧基磁珠(1.0 μm)购自德国 Merck 公司,吡啶酯活化物由本公司合成,脱盐柱 Sephadex G-25 购自美国 GE 公司,牛血清清蛋白购自生工生物工程(上海)股份有限公司, LN 及抗体、其他生化试剂均购自美国 Sigma-Aldrich 公司, LN 对照试剂盒购于深圳市新产业生物医学工程股份有限公司, 临床血清标本来自宁波美康盛德医学检验所, 全自动化学发光仪 MS-C120 由宁波美康盛德生物科技有限公司提供。

**1.3 方法**

**1.3.1 固相试剂制备** 采用 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)/N-羧基琥珀酰亚胺(NHS)法将羧基磁珠活化后与抗人 LN 单抗交联,以制得固相试剂。具体方法为:用包被缓冲液(50 mmol/L 吗啉乙磺酸, pH6.0)清洗羧基磁珠 3 次,随后加入等质量的 EDC 和 NHS(1 mg 磁珠对应 1.2 mg EDC),置于室温下活化 30 min;用包被缓冲液洗去未反应的活化剂,加入抗人 LN 单抗置于室温反应 4 h;用封闭缓冲液(50 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷、1.00% 牛血清清蛋白、0.01% 聚乙二醇辛基苯基醚、0.09% 叠氮化钠, pH8.0)置换反应液 3 次后,再加入封闭缓冲液将固相试剂浓度调整为 5 mg/mL,置于 2~8 °C 保存。

**1.3.2 发光试剂制备** 用无水二甲基亚砜将吡啶酯活化物溶解至 5 mg/mL,将吡啶酯活化物与抗人 LN 单抗按 20:1 加入至标记缓冲液(0.05 mol/L 碳酸缓冲液, pH9.0)中,置于室温避光反应 2 h(抗体反应浓度控制在 2 mg/mL 以上),随后加入 1 mol/L 的甘氨酸溶液终止反应。用经 PB 缓冲液(0.10 mol/L, pH7.4)平衡过的 Sephadex G25 柱分离纯化反应液,得到吡啶酯标记抗人 LN 单抗,加入等体积甘油后置于 -20 °C 保存备用。

**1.3.3 校准品制备** 用校准品稀释液(0.05 mol/L 三羟甲基氨基甲烷-盐酸、0.50% 牛血清清蛋白、0.90% 氯化钠, pH7.4)将 LN 配置成 10 种浓度(0、5、10、50、100、200、400、600、800、1 000 ng/mL),按每瓶 0.50 mL 分装, -20 °C 保存备用。

**1.3.4 测定方法** 采用双抗体夹心一步法定量检测血清 LN 水平,整个检测过程由全自动化学发光仪 MS-C120 完成。在透明的反应管中,依次加入 50 μL 待测血清标本、80 μL 发光试剂、40 μL 固相试剂,震荡混匀,于 37 °C 孵育反应 15 min,随后在磁场作用下清洗 3 次。当反应管进入检测暗室后,仪器先后泵入底物激发液 A(1.00 mol/L 硝酸、0.50% 双氧水)和 B(0.30 mol/L 氢氧化钠、7 mmol/L 十六烷基三甲基氯化铵),自动记录 3 s 内的相对发光强度(RLU),最终根据内置的标准曲线自动计算出待测的血清 LN 水平。

**1.3.5 检测试剂工作浓度选择** 分别配置不同工作浓度的固相试剂(0.01、0.05、0.10、0.20、0.50 mg/mL)及发光试剂(0.50、0.80、1.00、1.20、1.50 μg/mL)检测所配置的校准品。在不出现钩状效应前提下,选择信噪比最高的浓度作为检测试剂的最佳工作浓度。

**1.4 检测性能评价方法**

**1.4.1 检测限** 重复测定 LN 零值校准品 20 次,计算 20 次 RLU 的平均值( $\bar{x}$ )和标准差(SD),将  $\bar{x} + 2SD$  代入标准曲线中,得出最低检测限,该值应不高于 5 ng/mL。

**1.4.2 线性范围** 取高浓度(约 1 000 ng/mL)标本(H 标本)和低浓度(约 5 ng/mL)标本(L 标本),将 H 标本和 L 标本按 9H、8H+L、7H+2L、6H+3L、5H+4L、4H+5L、3H+6L、2H+7L、H+8L、9L 的比例混合制成 10 个标本,每个标本平

行测定 3 次。以理论值为 X,实测值为 Y 作图并线性拟合,拟合方程的相关系数  $R^2$  应大于 0.99。

**1.4.3 准确度** 采用回收率试验进行准确度考察,回收率应在 85%~115% 内。

**1.4.4 精密性** 取低值、中值和高值 3 份标本,每份标本用 3 个批次(批次 A、B、C)的试剂重复测定 10 次,计算不同批次的变异系数(CV)及 30 次测定的总 CV。批内 CV 应小于 10%,总 CV 应小于 15%。

**1.4.5 特异性** 平行测定 1 000 ng/mL IV 型胶原(CIV)、1 000 ng/mL III 型前胶原氨基端肽(PⅢP NP)、1 000 ng/mL 透明质酸(HA)3 次,并计算平均值。当 3 种物质测试浓度均低于 5 ng/mL 时,可认为无交叉反应。

**1.4.6 抗干扰能力** 取健康人群的新鲜血清,制成混合血清,用校准品稀释液将干扰物质纯品稀释至一定浓度(血红蛋白为 10 000 mg/dL、维生素 C 为 60 mg/dL、非结合胆红素为 400 mg/dL、结合胆红素为 576 mg/dL、乳糜为 29 000 FTU)。按混合血清:干扰物质为 19:1 的体积比制备成干扰血清,按混合血清:校准品稀释液为 19:1 的体积比制备成对照血清,平行测定 LN 水平 3 次。当干扰血清与对照血清的 LN 测值偏差小于 10% 时,认为无干扰。

**1.4.7 相关性** 将新产业生物医学工程股份有限公司生产的 LN 检测试剂盒(对照试剂盒)与本研究自制的 LN 检测试剂盒(自制试剂盒)进行比较,并用线性回归的方式计算两种测试方法的相关系数  $R^2$  及斜率。

**1.5 统计学处理** 采用 Excel2007 软件进行统计学处理。

**2 结 果**

**2.1 检测条件优化** 当固相试剂浓度和发光试剂浓度分别为 0.1 mg/mL 和 1 μg/mL 时,检测不同浓度校准品时的信噪比均达到最大值且无钩状效应出现。因此,选择上述浓度作为本检测试剂的最佳工作浓度。

**2.2 检测方法学结果评价**

**2.2.1 最低检测限值** 本方法的最低检测限为 3.73 ng/mL。

**2.2.2 线性范围检测结果** 取 5.03 ng/mL 的低值血清及 997.31 ng/mL 的高值血清进行试验,本试剂的线性范围为 5.03~997.31 ng/mL。见图 1。

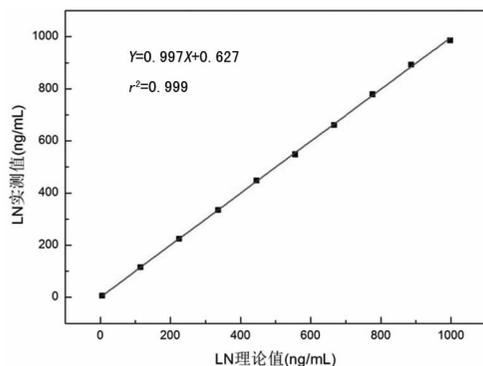


图 1 线性范围验证结果

**2.2.3 准确度检测结果** 在血清 LN 水平为 25.32 ng/mL 和 83.26 ng/mL 的标本中,分别添加 10.00、50.00、100.00 ng/mL 的血清 LN 抗原进行测定。血清 LN 的回收率介于 90.2%~112.3%,平均回收率为 97.6%。

**2.2.4 精密性检测结果** 分别测定血清 LN 水平为 5.36、48.19、217.21 ng/mL 的标本 10 次。见表 1。

**2.2.5 特异性检测结果** CIV、PⅢP NP、HA 对血清 LN 的

检测无干扰。见表 2。

**2.2.6 抗干扰能力检测结果** 对常见的干扰物质有良好的抗干扰能力。见表 3。

**2.2.7 加速热稳定性比较** 将固相试剂及标记试剂置于 37℃ 热加速 7 d 后,检测校准品。与未进行热加速试验的试剂相比,其 RLU 仅降低了 2%。

**2.2.8 比对结果** 见图 2。两种检测试剂具有较好相关性 ( $R^2=0.972$ )。

表 1 精密度检测结果 (%)

血清 LN(ng/mL)	批次 A	批次 B	批次 C	总 CV
5.36	4.87	4.92	4.53	5.46
48.19	3.13	2.66	2.23	3.24
217.21	2.01	1.53	2.45	2.77

表 2 特异性检测结果 (ng/mL)

检测次数	C IV	PIIP NP	HA
1 次	2.21	3.12	3.21
2 次	2.34	3.13	3.14
3 次	2.18	2.97	3.23
平均	2.24	3.07	3.19

表 3 抗干扰能力检测结果 (ng/mL)

检测次数	对照血清	血红蛋白	维生素 C	非结合胆红素	结合胆红素	乳糜
1 次	21.12	21.68	20.45	21.12	21.33	22.78
2 次	21.33	20.12	20.75	20.82	21.42	21.87
3 次	20.82	20.74	20.92	21.36	20.87	21.46
平均	21.09	20.84	20.71	21.1	21.21	22.04

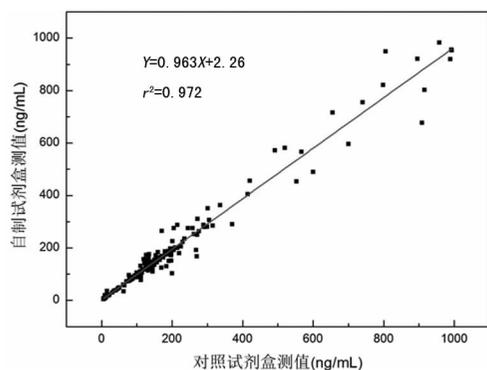


图 2 比对结果

### 3 讨论

肝纤维化是慢性肝病发展为肝硬化的必经之路,也是急性肝损伤患者病理转归的主要体现<sup>[6]</sup>。正常肝组织中 LN 水平很低,当肝纤维化时会伴有 LN 的大量分泌,因此 LN 水平的高低是反映肝纤维化的进展和严重程度重要指标<sup>[7]</sup>。有研究报道,目前 LN 的检测方法主要为放射免疫分析法、酶联免疫分析法及时间分辨荧光法<sup>[6,8-9]</sup>。本研究所采用的 CLIA 法,是继上述方法之后的一项全新的免疫分析主流技术,具有灵敏度高、线性范围宽、自动化程度好、安全无毒无污染等优

势<sup>[10]</sup>。

本研究以包被有抗人 LN 单抗的微米级磁珠作为固相试剂,以吖啶酯标记抗人 LN 单抗作为发光试剂,建立了双抗体夹心免疫分析法。相比于微孔板作为固相载体,微米级磁珠具有更大的比表面积,更有利于免疫反应的进行,进一步提高了整个检测体系的灵敏度,并且抗体用量少。同时,微米级磁珠的使用也更利于检测自动化的实现,从而提高检测结果的准确性。此外,相对于生物素-亲和素介导的放大系统,羧基磁珠包被抗体的工艺技术较为简单,羧基磁珠的使用也能避免标本中游离生物素对检测体系的干扰。

在此基础上,本研究还对试剂盒的其他工艺条件进行优化。与市售的同类产品(最低检测限约为 5 ng/mL)相比,本试剂盒的最低检测限为 3.73 ng/mL,降低了约 25.40%,这表明本试剂盒具有更高的灵敏度。此外,本研究还进一步拓宽了线性范围,从市售产品的 50~1000 ng/mL 扩展至 5.03~997.31 ng/mL。在准确度方面,本研究结果显示 LN 回收率为 90.20%~112.30%,与市售产品的回收率(约 90.00~110.00%)基本相当。在精密度方面,本试剂盒总 CV 小于 10.00%,这表明本试剂盒测试重现性好。CIV,PIIP NP 和 HA 三种物质也对 LN 的检测均不会产生干扰,并且对热加速处理后的试剂进行检测时,其 RLU 仅下降了 2.00%,这表明本试剂盒具备良好的稳定性。综上所述,本研究建立的 LN 直接化学发光检测方法符合临床检验需求,在临床检验中具备应用价值。

### 参考文献

- [1] 徐彤. 层粘连蛋白的结构与功能[J]. 国际免疫学, 1996, 19(5):253-256.
- [2] Domogatskaya A, Rodin S, Tryggvason K, et al. Functional diversity of laminins[J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2012, 28(7):523-553.
- [3] Solís Herruzo JA, Solís Muñoz P, Muñoz YT, et al. Molecular targets in the design of antifibrotic therapy in chronic liver disease[J]. Rev Esp Enferm Dig, 2011, 103(6):310-323.
- [4] Safi MA. An overview of various labeled assays used in medical laboratory diagnosis. Immune and non-immune assays[J]. Saudi Med J, 2010, 31(4):359-368.
- [5] Yang Z, Lu M, Li J, et al. Nitrogen-doped grapheme-chitosan matrix based efficient chemiluminescent immunosensor for detection of chicken interleukin-4[J]. Biosens Bioelectron, 2017, 89(3):558-564.
- [6] 王迪, 王慧, 张锦伟. 时间分辨荧光免疫分析法检测肝病患者肝纤四项的临床探讨[J]. 中国医药指南, 2016, 14(28):65-66.
- [7] 刘金丽. 层粘连蛋白研究进展[J]. 国外医学皮肤病学分册, 2000, 26(6):352-354.
- [8] 尹石华. 血清层粘连蛋白和透明质酸的放射免疫分析[J]. 同位素, 1996(2):98-101.
- [9] 高峰, 孔涛涛. 层粘连蛋白酶联免疫吸附法的建立及临床应用[J]. 第二军医大学学报, 1994(4):31-33.
- [10] 卢安. 化学发光法的研究进展综述[J]. 中国保健营养月刊, 2012, 22(8):2967-2968.