

肺癌标志物流式微球阵列的分析性能评价

张唯伟¹, 闫磊², 门振华¹, 林燕敏¹, 嵇晨皓², 兰文军^{1*}

1. 齐鲁工业大学生物试剂&生物医学工程研究所, 济南 250353

2. 山东信力生物科技有限公司, 济南 250000

摘要: 目的 通过探讨检测下限、精密度、特异性、方法学比对和线性范围, 评价基于流式细胞仪的肺癌标志物流式微球阵列的分析性能。方法 利用流式细胞仪, 测试肺癌标志物流式微球阵列试剂盒检测血清中肺癌标志物癌胚抗原 (CEA)、细胞角蛋白 19 片段 (Cyfra21-1) 和神经元特异性烯醇化酶 (NSE) 的检测下限、精密度、特异性和线性范围; 以蛋白质印迹 (Western blotting) 法验证抗体识别抗原的专一性; 检测血红蛋白、三酰甘油、胆红素对 CEA、Cyfra21-1 和 NSE 检测的干扰作用; 通过与电化学发光免疫分析法比对, 考察了肺癌标志物流式微球阵列的准确性。结果 CEA、Cyfra21-1 和 NSE 的检测下限分别为 1.71、3.97、2.27 pg/mL, 批内精密度均 $\leq 10\%$, 批间精密度均 $\leq 15\%$; 特异性结果显示, CEA、Cyfra21-1、NSE 的配对抗体能分别专一识别抗原, CEA 与同源类似物癌胚抗原相关黏附分子 6 (CEACAM6)、cyfra21-1 与重组人细胞角蛋白 18 (CK18)、NSE 与非神经元特异性烯醇化酶 (NNE) 无明显交叉反应; 三酰甘油、胆红素对血清样本检测无显著干扰作用, 500 ng/mL 的血红蛋白能够明显干扰 Cyfra21-1 ($P < 0.05$) 和 NSE ($P < 0.05$) 的检测; 流式微球阵列和电化学发光免疫分析的 CEA、Cyfra21-1、NSE 检测结果的相关系数值分别为 0.984 2、0.962 2、0.982 0; CEA、Cyfra21-1、NSE 的线性范围分别为 355.76 pg/mL~367.74 ng/mL、87.89 pg/mL~107.8 ng/mL、90.12 pg/mL~86.07 ng/mL。结论 肺癌标志物流式微球阵列的分析性能符合要求。

关键词: 肺癌标志物; 流式微球阵列; 肺癌标志物; 癌胚抗原 (CEA); 细胞角蛋白 19 片段 (Cyfra21-1); 神经元特异性烯醇化酶 (NSE)

中图分类号: R965.2

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2017)06-0801-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2017.06.014

Analytical capability of flow cytometric bead array for lung cancer markers

ZHANG Wei-Wei¹, YAN Lei², MENG Zhen-Hua¹, LIN Yan-Min¹, ZHUO Cheng-Hao², LAN Wen-Jun¹

1. Institute of Bioreagent & Biomedical Engineering, Qilu University of Technology, Jinan 250353, China

2. Shandong Xinlike Technologies Co., Ltd., Jinan 25000, China

Abstract: Objective To appraise the analytical capability of flow cytometric bead array for lung cancer markers through the tests of limit of detection, relative standard deviation, specificity, methods comparison and linearity rang. **Methods** The limit of detection, relative standard deviation, specificity and linearity rang in detection of Carcinoembryonic antigen (CEA), cytokeratin 19 (Cyfra21-1) and neuron specific enolase (NSE) in serum were evaluated by flow cytometer. Western blotting method was utilized to validate the specificity of antibody-antigen recognition. The interference of hemoglobin, three acyl glycerol and bilirubin on the detection of CEA, Cyfra21-1 and NSE was tested. Compared to electrochemiluminescence immunoassay, the relative error for flow cytometric bead array was assessed. **Results** Flow cytometric bead array demonstrated that the limit of detection was 1.71 pg/mL for CEA, 3.97 pg/mL for cyfra21-1, and 2.27 pg/mL for NSE. The relative standard deviation for intra-assay and inter-assay were below 10% and 15%, respectively. The pair of antibodies can defferentially recognize antigens. The measurement for CEACAM6, CK18, NSE appeared that there was no significant cross-talking reaction. Three acyl glycerol and bilirubin did not significantly interfere with the detection for serum samples. Hemoglobin of 500 ng/mL can significantly interfere with the detection of Cyfra21-1 ($P < 0.05$) and NSE ($P < 0.05$). The correlation coefficient between flow cytometric array and electrochemiluminescence immunoassay

收稿日期: 2016-12-19

基金项目: 国家自然科学基金 (81171413)

作者简介: 张唯伟 (1993-), 女, 硕士研究生, 研究方向为体外分子识别 (体外诊断试剂)。

*通信作者 兰文军, 男, 博士, 教授, 硕士生导师, 研究方向为体外分子识别。E-mail: lanwenjun0522@163.com Tel: 13668809993

was 0.984 2 for serum CEA, 0.962 2 for serum cyfra 21-1 and 0.982 0 for serum NSE. The linearity ranged from 355.76 pg/mL to 367.74 ng/mL for CEA, from 87.89 pg/mL to 107.8 ng/mL for cyfra21-1, and from 90.12 pg/mL to 86.07 ng/mL for NSE.

Conclusion Flow cytometric array for lung cancer markers may be of use in clinical detection.

Key words: lung cancer markers; flow cytometric bead array; carcinoembryonic antigen (CEA); cytokeratin 19 (Cyfra21-1); neuron specific enolase (NSE)

肺癌目前是全球和中国首位恶性肿瘤死亡原因,血清蛋白标志物的检测能够达到早期肺癌辅助诊断的目的。肺癌恶性程度高且预后差,约80%的病人在诊断明确后一年内死亡,中位生存期为6个月左右,肺癌患者总的5年生存率只有5%~10%,因此争取尽快采用以手术为主的治疗措施是提高5年生存率的关键。肺癌的诊断方法包括影像学(如X光、B超和CT-PET等)和病理穿刺活检等,肺癌血清蛋白标志物的异常往往早于影像学或组织学的异常,血清标志物的检测能够达到早期肺癌辅助诊断的目的。

近年,声波聚焦^[1]、显微成像^[2]和质谱等新体制流式细胞仪被持续推出,研究和基于流式细胞仪的流式微球阵列具有重大价值。流式微球阵列(flow cytometric bead array)是一种多指标并行检测生物芯片平台,原理类似液相芯片:荧光编码微球偶联抗原-抗体复合物,两个波长的荧光发射光分别检测编码微球和报道信号,以此实现多指标并行检测。本研究评价了该肺癌标志物流式微球阵列免疫分析试剂盒并行检测癌胚抗原(Carcinoembryonic antigen, CEA)、细胞角蛋白19片段(cytokeratin 19 fragment, Cyfra21-1)和神经元特异性烯醇化酶(neuron specific enolase, NSE)的分析性能。

1 材料

1.1 主要试剂

正常人血清(山东省生物制品研究所惠赠);肺癌标志物流式微球阵列免疫分析试剂盒(山东信力科生物科技有限公司);流式三色质控试剂盒(Calibrator 3 color, 美国BD公司);电化学发光法CEA/cyfra21-1/NSE检测试剂盒(瑞士罗氏公司);校准品和质控品为试剂盒原装配套、血红蛋白、三酰甘油(山东西亚化学公司);胆红素(北京北纳创联生物技术研究院);癌胚抗原相关黏附分子6(CEACAM6, 北京义翘神州公司);重组人细胞角蛋白18(CK18, 武汉云克隆公司);非神经元特异性烯醇化酶(NNE, 美国abcam公司)。

1.2 主要仪器

流式细胞仪(FACSCalibur, 美国BD公司);真空抽滤装置(Multiscreen vacuum manifold)、96孔滤板(MSBN1250), 美国密理博公司;电化学发光免疫分析系统(Elecsys 2010, 瑞士罗氏公司);全自动蛋白质印迹系统(wes, 美国普诺森公司);台式高速离心机(Eppendorf 5804R, 德国艾本德公司)。

2 方法

2.1 流式微球阵列

(1) 样本加入 试剂盒室温平衡30 min, 各试剂加样前充分混匀。96孔抽滤板中, 校准品孔分别加入50 μ L校准品液和40 μ L分析液I, 血清样本孔中分别加入10 μ L血清样本和80 μ L/孔分析液II, 孔总体积90 μ L。

(2) 校准品和样本孵育 校准品和血清样本孔再加入10 μ L/孔捕获抗体包被的微球液, 混匀, 避光、37 $^{\circ}$ C反应45 min。真空抽滤洗涤2次, 加入100 μ L/孔的分析液I、10 μ L/孔的生物素标记抗体CEA、Cyfra21-1和NSE, 混匀, 避光、37 $^{\circ}$ C反应30 min。抽滤洗涤2次, 加入50 μ L/孔链霉亲和素-藻红蛋白(SA-PE), 混匀, 避光、室温反应15 min。

(3) 上机检测 抽滤洗涤2次, 加入50 μ L/孔流式鞘液, 混匀, 上机测试。每次开机先运行FACScompe 质控软件和Calibrator 三色微球。Cell quest pro 流式点图(PE vs FITC)的荧光补偿方法参见试剂盒说明书。

(4) 数据收集 Cell quest pro 软件获取的FCS文件导入FCAP array 软件, 计算蛋白定量值。

2.2 电化学发光免疫分析

采用 Elecsys 2010 电化学发光免疫分析系统及其配套试剂进行检测, 严格按照仪器及试剂的说明书操作。

2.3 蛋白质印迹

利用 Wes 全自动蛋白质印迹系统及其配套试剂进行检测, 严格按照仪器及试剂的说明书操作。

2.4 统计学分析

采用 SPSS 18.0 统计软件进行统计学分析, 计

量资料各指标数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组指标间的差异采用学生氏 t 检验。

3 结果

3.1 检测下限

以含 5% 牛血清白蛋白的 PBS 液为空白样本液, 流式微球阵列技术重复检测 20 次, 计算测定结果的均值与标准差。各指标的检测下限为 (均值 + 2 × 标准差) 所对应的质量浓度值, 结果显示, CEA、Cyfra21-1 和 NSE 的检测下限分别为 1.71、3.97 和 2.27 pg/mL。

3.2 精密度试验

正常人血清加入 CEA、Cyfra21-1、NSE 混合冻干标准品配制样本, 每天 2 个批次, 每个批次不同操作者检测高、中、低浓度 (高、低浓度在有医学意义的测量范围内, 中浓度在医学决定水平左右) 样本各 8 次, 连续测定 5 个工作日。以 10 个批次中每一样本 8 次批内精密度的均值计算批内精密度, 从所有 80 个结果计算出批间精密度。结果显示, CEA、Cyfra21-1 和 NSE 的批内精密度变异系数 (CV) 均 ≤ 10%, 批间精密度 CV 均 ≤ 15%, 符合生

物样本检测标准。

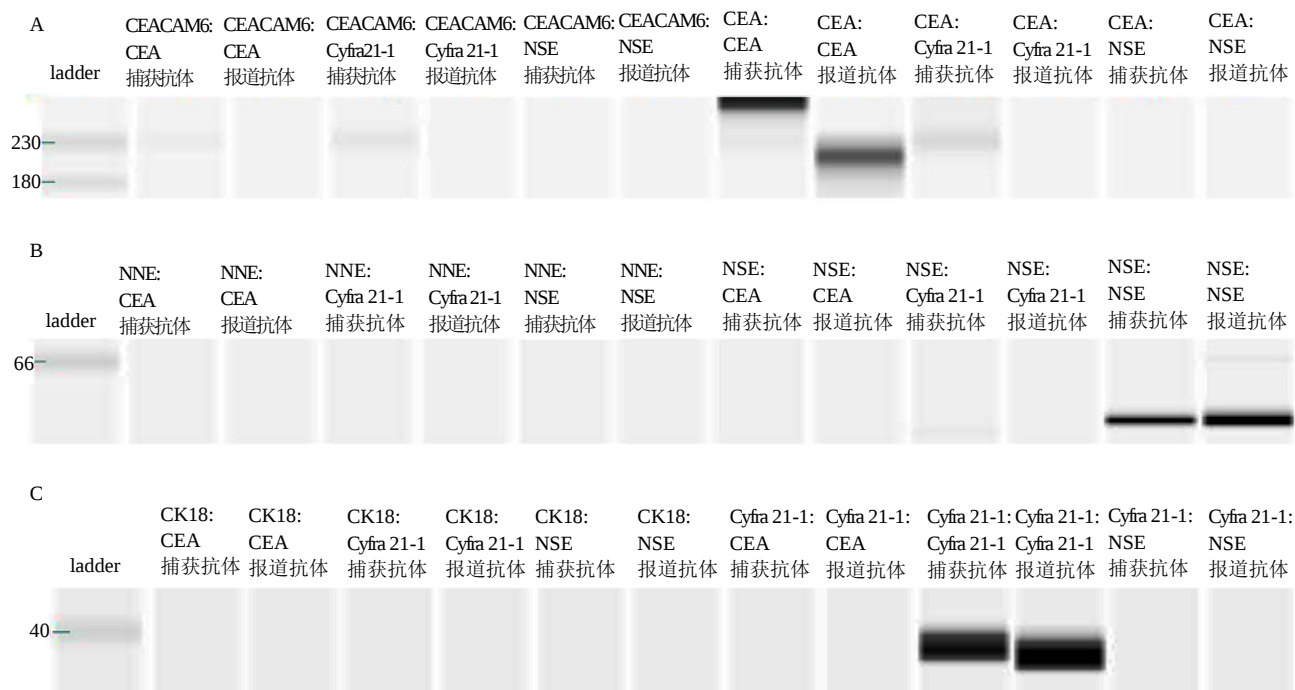
3.3 特异性试验

3.3.1 专一性 利用试剂盒内分析液 I 配制 3 管校准品液, 分别只含 CEA 或 Cyfra21-1 或 NSE 抗原, 质量浓度范围为 1~100 ng/mL, 肺癌标志物流式微球阵列专一性检测结果见表 1。同时使用全自动 Western blotting 验证了抗体识别抗原的专一性 (图 1)。

表 1 肺癌标志物流式微球阵列的专一性

Table 1 Selectivity of flow cytometric bead array for lung cancer markers

检测抗原	配对抗体	结果 1/ (ng mL ⁻¹)	结果 2/ (ng mL ⁻¹)
CEA	CEA	76.65	38.83
	Cyfra21-1	0	0
	NSE	0	0
Cyfra21-1	CEA	0	0
	Cyfra21-1	73.36	38.09
	NSE	0	0
NSE	CEA	0	0
	Cyfra21-1	0	0
	NSE	33.32	26.70



A-CEA 配对抗体专一识别 CEA B-NSE 配对抗体专一识别 NSE C-Cyfra21-1 配对抗体专一识别 Cyfra21-1

A-CEA paired antibody specific recognition CEA B-NSE paired antibody specific recognition NSE C-Cyfra21-1 paired antibody specific recognition Cyfra21-1

图 1 抗体识别专一性的 Western blotting 验证

Fig. 1 Validation for antibody recognition selectivity by Western blotting

结果表明, CEA、Cyfra21-1 和 NSE 的配对抗体能够专一性地分别识别 CEA、Cyfra21-1 和 NSE 抗原 (CEA 同源类似物为 CEACAM6、Cyfra21-1 同源类似物为 CK18、NSE 同源类似物为 NNE)。

3.3.2 交叉反应 利用肺癌标志物流式微球阵列, 分别检测了 CEA 同源类似物 CEACAM6、Cyfra21-1 同源类似物 CK18、NSE 同源类似物 NNE 与 CEA、Cyfra21-1、NSE 的交叉反应, 交叉率=同源类似物检测浓度/同源类似物加样浓度。结果显示, CK18 与 NSE 的交叉率为 5.66%, 其余未检测到交叉反应, 这表明 CEA 与 CEACAM6、cyfra21-1 与 CK18、NSE 与 NNE 无明显交叉反应 (表 2)。

表 2 肺癌标志物流式微球阵列的交叉反应

Table 2 Cross-talking of flow cytometric bead array for lung cancer markers

检测抗原/ (50 ng·mL ⁻¹)	配对抗体	检测结果/ (ng·mL ⁻¹)	交叉率/ %
CEACAM6	CEA	0	0
	Cyfra21-1	0	0
	NSE	0	0
CK18	CEA	0	0
	Cyfra21-1	0	0
	NSE	2.83	5.66
NNE	CEA	0	0
	Cyfra21-1	0	0
	NSE	0	0

3.3.3 干扰实验 血清样本中, 分别单独加入血红蛋白、三酰甘油、胆红素 3 种常见血清干扰物中的 1 种, 空白对照组不加干扰物质, 每种干扰物分为高、低质量浓度 (血红蛋白、三酰甘油为 1000、500 ng/mL, 胆红素为 50、25 ng/mL) 组, 肺癌标志物流式微球阵列三复管检测, 空白对照组和干扰组的均数比较采用学生氏 *t* 检验。检测结果显示, 血红蛋白、三酰甘油、胆红素均未见剂量依赖性干扰作用 (表 3)。500 ng/mL 的血红蛋白能够明显干扰 Cyfra21-1 ($P<0.05$) 和 NSE ($P<0.05$) 的检测结果, 说明红细胞中血红蛋白的释放会对检测结果有显著影响。

表 3 肺癌标志物流式微球阵列的干扰实验

Table 3 Interferential experiment of flow cytometric bead array for lung cancer markers

组别	剂量/ (ng mL ⁻¹)	CEA	Cyfra21-1	NSE
空白对照	—	4.55±0.15	2.73±0.08	8.27±0.24
血红蛋白	1000	4.35±0.42	2.70±0.06	7.89±0.27
	500	4.87±0.46	2.43±0.03*	7.32±0.27*
三酰甘油	1000	4.34±0.11	2.83±0.1	8.07±0.34
	500	4.48±0.14	2.57±0.11	7.83±0.31
胆红素	50	4.43±0.34	2.84±0.09	8.12±0.18
	25	4.16±0.29	2.66±0.06	7.86±0.05*

与空白对照组比较: * $P<0.05$

* $P<0.05$ vs black control group

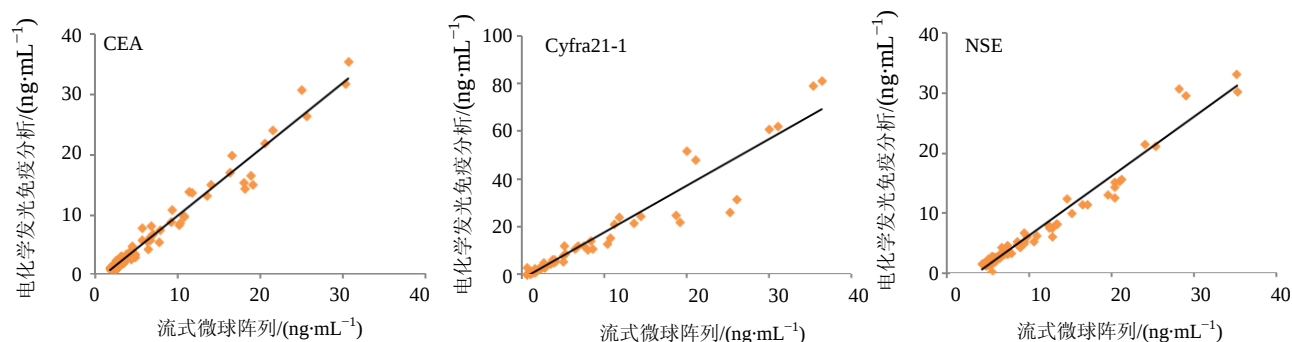


图 2 肺癌流式微球阵列与电化学发光的相关性

Fig. 2 Correlation between flow cytometric bead array and electrochemiluminescence immunoassay

3.4 方法学比对

本研究以与电化学发光法比较的方法, 考察了肺癌标志物流式微球阵列的准确性。每天检测 8 个不同质量浓度的血清样本, 按 1 到 8 的顺序编号。两种方法均按照 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 的样本顺序进行测定 (双复管),

连续检测 5 个工作日。利用所有样本双份测定值进行计算 $Y=a+bX$ (X 为流式微球阵列检测结果, Y 为电化学发光免疫分析检测结果)。在医学决定水平, 计算预期偏差 $B_x=a+(b-1)X$ 和相对偏差 B_x/X 。结果见图 2, CEA、Cyfra21-1、NSE 的相关系数 r 值分别为 0.984 2、0.962 2、0.982, 表明两种

方法有良好的相关性; CEA、Cyfra21-1、NSE 的医学决定水平预期偏差分别为 $-0.602\ 6$ 、 $1.137\ 51$ 、 -3.791 , 相对偏差分别为 $-0.120\ 52$ 、 $0.344\ 7$ 、 $-0.189\ 55$, 表明两种方法有可比性。

3.5 线性范围

双复管测定 10 个浓度的血清样本, log (荧光强度) vs (log 样本浓度) 建立一级多项式回归方程, 两端逐步减少数据点, 直至表现出线性关系。结果显示, CEA、Cyfra21-1、NSE 的线性范围分别为 $355.76\ \text{pg/mL} \sim 367.74\ \text{ng/mL}$ ($R^2=0.994$)、 $87.89\ \text{pg/mL} \sim 107.8\ \text{ng/mL}$ ($R^2=0.991$)、 $90.12\ \text{pg/mL} \sim 86.07\ \text{ng/mL}$ ($R^2=0.995$)。

4 讨论

CEA、Cyfra21-1、NSE 是欧洲肿瘤标志物组织 (EGTM) 建议的肺癌标志物。CEA 的分子量为 180×10^3 , 一种广谱肿瘤标志物, 血清 CEA 水平的检测对非小细胞肺癌 (NSCLC)、乳腺癌、甲状腺髓样癌的诊断具有辅助价值。Cyfra21-1 是一种酸性多肽, 分子量为 40×10^3 , 对于辅助诊断 NSCLC 有很高的应用价值, 在多变异分析中是一个显著的预后因子^[3]。NSE 是烯醇化酶的同工酶, 相对分子质量约为 87×10^3 , 其既是神经母细胞瘤的肿瘤标志物, 也是目前小细胞肺癌诊断的重要血清标志物^[4]。虽然美国临床生物化学学会 (NACB) 将 proGRP 也列为小细胞肺癌标志物之一, 但血清 proGRP 医学决定水平较低 (40 或 $100\ \text{pg/mL}$), 检测结果稳定性有待提高, 以 CEA、Cyfra21-1、NSE 为肺癌血清标志物基本能满足 NSCLC 和小细胞肺癌 (SCLC) 的辅助诊断、治疗监测和预后的需要。

CEA、Cyfra21-1 和 NSE 的医学决定水平 (电化学发光免疫分析) 分别为 5 、 3.3 、 $15\ \text{ng/mL}$, 本文中 CEA、Cyfra21-1 和 NSE 的流式微球阵列检测下限分别为 1.71 、 3.97 、 $2.27\ \text{pg/mL}$, 表明肺癌标志物流式微球阵列的检测下限可以满足临床需要。

若血清收集过程中发生溶血, 红细胞中血红蛋白的释放会对检测结果有显著影响, 这在本文干扰实验中也再次得到证实。结果表明, $500\ \text{ng/mL}$ 的血红蛋白能够明显干扰 Cyfra21-1 ($P<0.05$) 和 NSE ($P<0.05$) 的检测结果。

目前常用的体外诊断试剂分析性能准确度的评价方法有回收实验、标准品核对^[5]和方法学比对^[6]等, 本文采用方法学比对初步评价了肺癌标志物流式微球阵列的准确性。与 CEA 和 NSE 结果相比,

流式微球阵列与电化学发光法检测 Cyfra21-1 的相关系数 r 值稍低 ($0.962\ 2$), 这可能是由于 Cyfra21-1 易黏附管壁而导致的检测结果波动。因此, 处理血清样本时, 应尽量轻柔吹打混匀, 以避免剧烈震荡后细胞角蛋白可能会附着在试管壁上。

已有报道^[7], 肺癌 IV 期患者 CEA、Cyfra21-1 和 NSE 的水平分别为 (31.3 ± 6.7)、(51.1 ± 9.9)、(19.5 ± 2.7) ng/mL , 本文中 CEA、Cyfra21-1 和 NSE 的线性范围分别为 $355.76\ \text{pg/mL} \sim 367.74\ \text{ng/mL}$ 、 $87.89\ \text{pg/mL} \sim 107.8\ \text{ng/mL}$ 、 $90.12\ \text{pg/mL} \sim 86.07\ \text{ng/mL}$, 表明肺癌标志物流式微球阵列的线性范围也可以满足临床需要。

基于流式细胞仪的流式微球阵列是多指标并行检测技术, 已用于药物先导物筛选^[8]、免疫因子^[9]和融合基因^[10]等多指标并行检测, 尤其适用于单一肿瘤多标志物的联合检测。电化学发光免疫分析法能够实现全自动样本检测, 但只能单指标检测。流式微球阵列能在同一份样品中并行检测多指标, 可以很好的进行样品内不同指标的内参对照, 得到具备独特价值的数值。配合全自动移液工作站 (含温控、震荡混匀和真空抽滤模块), 流式微球阵列检测基本实现自动化。国外公司也正在开发包含样本自动处理的全自动流式细胞仪。与液相芯片相比, 流式微球阵列平台开放、数据图像化, 且更加降低成本、更加高内涵。理论上, 液相芯片可以进行 500 项指标并行免疫分析, 但是由于 Hook-effect 效应和交叉反应, 实际应用中与流式微球阵列大致相同, 只能并行检测约 40 个左右的抗原。本文流式微球阵列中的微球是单荧光 (FITC) 编码微球, 在流式细胞仪上能实现约 8 指标并行检测。目前单一肿瘤标志物多为 2~5 个, 因此使用单荧光微球的流式微球阵列可以较好地满足单一肿瘤多标志物的联合检测。

参考文献

- [1] Goddard G, Martin J C, Graves S W, et al. Ultrasonic particle-concentration for sheathless focusing of particles for analysis in a flow cytometer [J]. Cytometry A, 2006, 69(2): 66-74.
- [2] Hui H, Fuller K A, Erber W N, et al. Imaging flow cytometry in the assessment of leukocyte-platelet aggregates [J]. Methods, 2016, doi: 10.1016/j.jymeth.2016.10.002. Epub 2016 Oct 5.
- [3] Takahashi H, Kurishima K, Ishikawa H, et al. Optimal cutoff points of CYFRA21-1 for survival prediction in non-smallcell lung cancer patients based on running

- statistical analysis [J]. Anticancer Res, 2010, 30(9): 3833-3837.
- [4] Thomas L. Clinical Laboratory Diagnostics: Use and Assessment of Clinical Laboratory Results [M]. Frankfurt/Main, Germany: TH-Books Verlagsgesellschaft, 1998.
- [5] 徐伟文. 体外诊断试剂研制常用技术指标之分析性能评估 [J]. 分子诊断与治疗杂志, 2010, 2(2): 140-144.
- [6] 李耀华. 流式细胞仪配套用检测试剂注册申报技术要求 [J]. 中华血液学杂志, 2013, 34(4): 370-373.
- [7] 杜立平. 中晚期肺腺癌患者体内 CEA、NSE、CYFRA21-1、CA125 水平的改变 [J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(16): 1939-1940.
- [8] Lan W J, Hao G K, Wang J, et al. Duplexed on-microbead binding assay for competitive inhibitor of epidermal growth factor receptor by quantitative flow cytometry [J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2010, 107(1): 560-564.
- [9] Pandey A, Rizvi M, Shah B A, et al. Anti-arthritis effect of Saponin-1 by alteration of Th1/Th2 cytokine paradigm in arthritic mice [J]. Cytokine, 2016, 79: 103-113.
- [10] Pihan G. Current Protocols in Cytometry [M]. 2006, DOI: 10.1002/0471142956.