

背景荧光猝灭-免疫层析定量检测尿纤维连接蛋白及膀胱癌辅助诊断的应用*

宋建忠^{1,2} 赵欣³ 李新霞¹ 李久彤¹

【摘要】 目的:采用基于背景荧光猝灭-免疫层析技术研制的尿纤维连接蛋白(Fn)定量检测卡,建立一种快速、简单、无创的定量检测膀胱癌肿瘤标记物的方法。**方法:**使用Fn定量检测卡,分别检测尿液样本膀胱癌组50例、健康人组100例、其他部位肿瘤组50例和良性泌尿系统疾病组14例,利用统计分析确定出膀胱癌患者cut-off值、灵敏度、特异度,对检测结果进行LSD-*t*多重比较显著性分析。**结果:**在Fn检测结果统计分析中,膀胱癌患者组与其他各组Fn值比较差异均有统计学意义($P < 0.05$),而其他各组之间两两比较差异均无统计学意义($P > 0.05$),ROC-Fn曲线中得出cut-off为324.05 ng/ml,灵敏度为70.0%,特异度为99.9%。**结论:**Fn检测卡能定量检测尿液中Fn含量,有较高的专属性,检测速度快,有望成为膀胱癌辅助诊疗的新方法。

【关键词】 背景荧光猝灭-免疫层析技术;膀胱癌;尿纤维连接蛋白;ROC曲线

doi:10.13201/j.issn.1001-1420.2019.07.007

【中图分类号】 R737.14 **【文献标志码】** A

Background fluorescence quenching--application of immunochromatography for quantitative detection of fibronectin in urine and auxiliary diagnosis of bladder cancer

SONG Jianzhong^{1,2} ZHAO Xin³ LI Xinxia¹ LI Jiutong¹

(¹College of pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi, 830000, China; ²Office of Drug Clinical Trial Institution, Affiliated Tumor Hospital of Xinjiang Medical University; ³Department of Pharmacy, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University)

Corresponding author: LI Xinxia, E-mail: lxx6668@163.com

Abstract Objective: Based on background fluorescence quenching-immunochromatography technology and the principle of antigen-antibody reaction, the paper developed a quantitative detection card for urinary fibronectin (Fn), and established a rapid, simple, non-invasive and highly accurate method for the quantitative detection of bladder cancer tumor markers. **Method:** Fn quantitative detection card was used to detect 50 urine samples in bladder cancer group, 100 healthy people group, 50 in other tumor group and 14 in benign urinary system diseases group, and statistical analysis was used to determine cut-off value, sensitivity and specificity of bladder cancer patients, LSD-*t* multiple significant analysis was performed on the test results. **Result:** In the statistical analysis of Fn test results, Fn values of bladder cancer patients group and other groups showed extremely significant difference ($P < 0.05$), while no significant difference was found among other groups ($P > 0.05$). Cut-off=324.05 ng/ml was obtained from the ROC Fn curve, with a sensitivity of 70.0% and a specificity of 99.9%. **Conclusion:** Fn detection card can quantitatively detect the content of Fn in urine, which has high specificity and fast detection speed. It is expected to become a new method for auxiliary diagnosis and treatment of bladder cancer.

Key words background fluorescence quenching-immunochromatographic technique; bladder cancer; urinary fibronectin; ROC curve

尿纤维连接蛋白(fibronectin,Fn)是一种高分子糖蛋白,广泛分布于成纤维细胞表面、基膜,是细胞外连接组织的主要组成部分,正常膀胱组织中Fn分布在基底膜及黏膜下组织,上皮层无Fn^[1]。在肿瘤细胞侵犯膀胱组织基底膜后,随着浸润程度

不同,尿中Fn的浓度会随着侵犯程度增大而增加。Fn在膀胱肿瘤发生发展中可以作为诊断的标志物,对膀胱癌诊断有较高的灵敏度与特异度,为膀胱癌临床早诊早治提供了较好依据^[2]。

目前,国内外常用的Fn检测方法主要是酶联免疫分析(ELISA)、Fn试纸等。ELISA具有检测过程冗长、重复性较差、试剂寿命短、需要低温保存等缺点;也有文献报道采用胶体纳米金免疫层析试纸法(GICA)测定Fn,但该方法只能定性不能定量,且无规格化商品。上述方法均不适合临床快速

*基金项目:新疆维吾尔自治区科技支疆项目(编号2016E02036)

¹新疆医科大学药学院(乌鲁木齐,830000)

²新疆医科大学附属肿瘤医院药物临床研究机构办公室

³新疆医科大学第一附属医院药学部

通信作者:李新霞,E-mail:lxx6668@163.com

检测。因此,建立非侵入、简单、低成本、快速的 Fn 定量检测技术,依据检测的 Fn 浓度快速确诊膀胱癌,是临床研究的热点课题。

背景荧光猝灭-免疫层析法(background fluorescence quenching immunochromatographic assay, bFQICA)是将免疫层析与荧光光谱技术结合的定量检测技术^[3~5]。本课题组人员已利用该技术原理研制的检测卡准确成功的定量检测出人体液中敏感炎症递质指标 C-反应蛋白^[6]及食用油中黄曲霉毒素 B₁ 含量^[7],使该技术在医疗卫生、食品安全中应用奠定了基础。本研究采用背景荧光猝灭-免疫层析原理研制的 Fn 检测卡定量检测 Fn 含量,利用该方法检出的 50 例膀胱癌患者及 100 例健康人尿液样本 Fn 浓度,绘制 ROC 曲线,求得 cut-off 值(区分膀胱癌患者和健康人的 Fn 最佳临界值)并利用该 cut-off 值对 50 例其他部位肿瘤患者及 14 例良性泌尿系统疾病患者尿检测结果进行统计验证,确认该 cut-off 准确性,从而评价依据背景荧光猝灭-免疫层析原理制备的 Fn 定量检测卡在诊断膀胱癌中的意义。

1 资料与方法

1.1 仪器与材料

背景荧光猝灭-免疫分析仪;示踪抗体(25 nm 胶体金加 5.5 μ l K₃CO₃);Fn 标准品(批号 211305615QH);捕获抗体(克隆号 1G10);示踪抗体(克隆号 2F6);Na₂HPO₄;K₂HPO₄;NaCl;肌酐(Sigma C4255);尿素(Bio Froox GmbH);尿液标本(新疆医科大学附属肿瘤医院)。

1.2 溶液的配制

2% 小牛血清 PBS 溶液:取 NaH₂PO₄、Na₂HPO₄、NaCl 各 100、500、1 500 mg,精密称定,与 20 g 小牛血清,加入蒸馏水 1 L,混匀,即得。基质溶液的配制:将随机获取的 20 例健康人尿液混合,用 2% 小牛血清 PBS 溶液稀释 5 倍,作为基质溶液。Fn 系列标准溶液的配制:用基质溶液将 Fn 标准品配成浓度为 31.25、62.50、125.00、250.00、500.00、1 000.00、2 000.00 ng/ml 的系列标准溶液备用。供试样品的制备:分别量取尿液样本 200 μ l,用 2% 小牛血清 PBS 溶液稀释 5 倍备用。

1.3 样本收集

1.3.1 研究对象分组 膀胱癌组尿样:50 例,其中男 28 例,女 22 例,年龄 30~80 岁,平均 46 岁,均来自于新疆医科大学附属肿瘤医院检验科,患者均行膀胱癌镜检证实为膀胱恶性肿瘤。良性泌尿系统疾病组尿样:患者 14 例,其中男 8 例;女 6 例,年龄 25~75 岁,平均 35 岁;均来自于新疆医科大学附属肿瘤医院确诊为非肿瘤泌尿系统疾病患者。健康人组尿样:患者 100 例,其中男 55 例,女 45

例;年龄 15~79 岁,平均 38 岁;均来自于新疆医科大学附属肿瘤医院体检健康人群,所有人均排除良性泌尿系统相关疾病。其他部位肿瘤组尿样:患者 50 例,其中消化道肿瘤 20 例,男 11 例,女 9 例,年龄 26~85 岁,平均 40 岁;淋巴瘤 16 例,男 7 例,女 9 例,年龄 30~82 岁,平均 44 岁;肺部肿瘤 14 例,男 6 例,女 8 例,年龄 32~80 岁,平均 42 岁,均来自于新疆医科大学附属肿瘤医院经过相关检验确认为相关部位肿瘤的患者。

1.3.2 尿液样本收集 采集人群前 1 d 晚上 10 点起禁水,晨起后第 1 次中段尿,样本收集后离心 10 min,取上清,置 -80℃ 冰箱保存。

1.4 实验原理及检测方法

1.4.1 实验原理 取一定量待测样品溶液,加入固定有金标抗体的小杯中,充分混匀,定量吸取该混匀溶液于检测卡加样孔,层析 15 min。若检测样本中含有待测物,则在层析至 T 线处(包被有捕获抗体)时会形成“抗体-目标物-抗体”的双抗体夹心复合物而被截留此处,由于胶体金的猝灭作用,从而使得硝酸纤维素膜上 T 线处的背景荧光发生猝灭,测量值记为 F₂,T 线处的荧光猝灭程度与目标物浓度相关。若检测样品中不含待测物,则该处保留原有背景荧光 F₁。荧光猝灭程度(F₁/F₂)与供试品中待测目标物含量有关(图 1)。C 线为检测卡质量控制线^[8]。

1.4.2 检测方法 吸取待测液 100 μ l,加入固定有 Fn 金标抗体的小试杯中,充分混匀,吸取 60 μ l 滴加到加样孔,层析 15 min,将检测卡插入背景荧光猝灭-免疫分析仪的插卡口,点击检测界面上的测样图标,即可读出 F₁/F₂ 值,仪器自动带入已建立的标准曲线方程,即可得出 Fn 浓度。

1.5 统计学方法

基于 SPSS 19.0 软件根据各组 Fn 浓度检测结果,绘制工作特征曲线(ROC)^[9,10],计算曲线下面积 Az 值及相应的灵敏度与特异度,并求出最佳 cut-off 值。并对膀胱癌患者组、其他部位肿瘤患者组、良性泌尿系统疾病组、健康人组 Fn 浓度检测结果进行 LSD-*t* 检验。

2 结果

2.1 100 例健康人及 50 例膀胱癌患者尿液样本检测结果

用含 2% 小牛血清 PBS 溶液稀释 5 倍待测尿样进行检测,记录数据见表 1。150 例样本中 Fn 的约登指数列出见表 2,约登指数最大的 0.69 对应的 Fn 浓度为 324.05 ng/ml 即为 cut-off 值,相应的灵敏度为 70.0%,特异度为 99.9%。本检测方法 ROC 曲线下面积 Az 值为 0.795(图 2)。

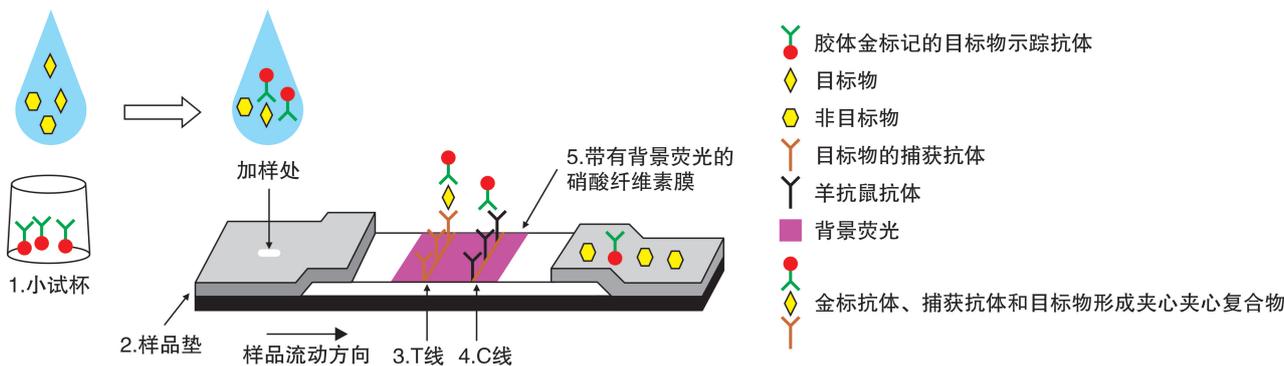


图 1 背景荧光猝灭-免疫层析检测示意图

表 1 150 例样本 Fn 含量测定统计结果

组别	例数	Fn 含量/(ng · ml ⁻¹)			
		中位数	均数	最大值	最小值
健康人组	100	72.4	93.7	416.0	4.4
膀胱癌组	50	647.0	1 615.7	12 313.0	11.2

表 2 Fn 约登指数

Fn 含量/(ng · ml ⁻¹)	灵敏度	特异度	特异度	约登指数
...
299.3000	0.700	0.030	0.970	0.670
301.1500	0.700	0.020	0.980	0.680
324.0500	0.700	0.010	0.990	0.690
352.4000	0.680	0.010	0.990	0.670
383.0426	0.660	0.010	0.990	0.650
...

注:表中“...”表示已检测 150 份样本中未列出的检测结果。

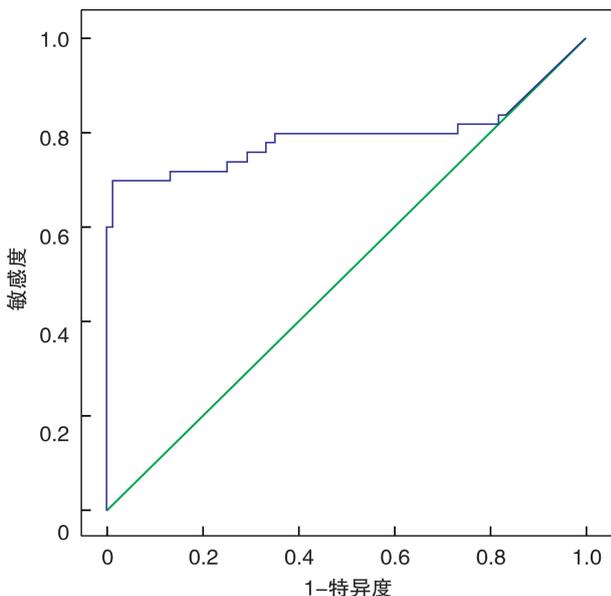


图 2 Fn ROC 曲线面积诊断膀胱癌分析图

100 例健康人尿样检出结果大于 cut-off 值 (324.05 ng/ml) 的阳性样本为 1 例, 小于 cut-off 值及未检出样本判定阴性样本为 99 例; 50 例膀胱癌患者尿样中检出结果大于 cut-off 值确诊为阳性膀胱样本为 35 例, 小于 cut-off 值及检出阴性样本为 15 例。说明 ROC 得出的 cut-off 值符合临床诊断实际。

2.2 临床尿液样本检测验证

2.2.1 50 例其他部位肿瘤患者尿液样本检测结果 用 2% 小牛血清 PBS 溶液稀释 5 倍尿液样本, 检测, 记录数据。由表 3 可见, 在背景荧光猝灭-免疫层析检测技术检测 50 例其他部位肿瘤尿液样本中, 低于 cut-off 值 47 例, 高于 cut-off 值 3 例, 符合临床诊断结果。高于 cut-off 值 3 例患者均为临床已确定的其他部位肿瘤患者, 但未做膀胱癌检测, 可以跟踪确认。

2.2.2 14 例良性泌尿系统疾病患者尿液样本检测结果 用 2% 小牛血清 PBS 溶液稀释 5 倍良性泌尿系统疾病患者尿液, 检测, 记录数据。由表 4 可见, 在 14 例良性泌尿系统疾病患者尿液样本中检测结果均低于 cut-off 值, 且有 8 例未检出, 与临床实际检测结果相符。

表 3 50 例其他部位肿瘤尿液样本检测结果 例

指标	Fn 检出	Fn 未检出	合计
高于 cut-off 值	3	0	3
低于 cut-off 值	32	15	47
合计	35	15	50

表 4 14 例良性泌尿系统疾病患者尿液样本检测结果 例

指标	Fn 检出	Fn 未检出	合计
高于 cut-off 值	0	0	0
低于 cut-off 值	6	8	14
合计	6	8	14

2.3 统计结果分析

ROC 曲线下面积 A_z 值为 0.795, 证明背景荧光猝灭-免疫层析检测技术在诊断膀胱癌中具有较好的准确性, 与 $A_z=0.5$ 比较差异有统计学意义 ($P<0.05$), 说明该方法检测出的 Fn 指标在膀胱癌患者和健康人尿液之间存在显著性差异, 该检测卡有临床诊断应用价值。LSD- t 检验膀胱癌组与其他部位肿瘤组、良性泌尿系统疾病组、健康人组比较差异有统计学意义 ($P<0.05$), 而其他部位肿瘤组、良性泌尿系统疾病组、健康人组两两比较差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

3 讨论

本研究利用背景荧光猝灭-免疫层析原理制得的检测卡检测 100 例健康人和 50 例膀胱癌患者获得的 Fn 含量, 利用 ROC 曲线原理得到 cut-off 值为 324.05 ng/ml, 检测灵敏度为 70.0%, 特异度为 99.9%, 约登指数为 0.690。利用确立的 cut-off 值统计分析了膀胱癌患者与正常人、其他部位肿瘤患者、良性泌尿系统疾病患者的尿液样本, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。

通过检测 50 例其他部位肿瘤患者和 14 例良性泌尿系统疾病患者尿液样本验证该检测方法, 数据结果表明该方法是可靠的, 但在 50 例其他部位肿瘤患者检测结果中 3 例高于 cut-off 值, 将进一步追踪确认这 3 例患者是否也患有膀胱癌。

目前, 膀胱癌的早期诊断和术后随诊主要依靠尿脱落细胞学和膀胱镜检查, 分析研究表明尿细胞学 (UC) 诊断膀胱癌检测灵敏度为 61.0%, 特异度为 95.0%^[11], 本检测方法灵敏度和特异度分别为 70.0% 和 99.9%, 均高于 UC 检查方法。此外, 当尿液标本中癌细胞数量少、细胞的不典型或退行性变、泌尿系统感染均会影响 UC 检查结果, 本检测方法原理为抗原-抗体反应, 特异度强, 保证了检测结果有较高的专属性。膀胱镜检查属于侵入性检查, 但该方法有创伤较大、操作不便、费用相对较高、某些情况下尚有导致尿路感染的可能等缺点, 不适用于膀胱癌群体性筛查和随诊^[12]。基于背景荧光猝灭-免疫层析技术研制的 Fn 定量检测卡, 检测时尿液样本无需前处理, 可以直接加至检测卡孔, 15 min 即可完成待检者尿液中 Fn 含量检测。对于临床身体状况较差不能直接做膀胱镜检查的患者, 可取患者尿液检测, 方便无创, 实现“床旁检测”; 对于健康人体检群体, 可大样本批量检测。本定量检测技术灵敏度、特异度均较高, 操作简便, 反应时间短, 既可用于医疗机构及社区体检人群膀胱癌初筛, 又可用于膀胱癌患者复查随诊, 有望成为膀胱癌临床诊断新方法。在后续的研究中, 本课题

组拟在此定量检测技术的基础上进行大样本量的随机对照试验验证, 并对膀胱癌不同分型、分级、制定出相对应的临界值, 进一步研究 Fn 定量检测技术与各型、各级膀胱癌之间的内在联系, 为 Fn 检测卡商品化奠定基础。

综上所述, 基于背景荧光猝灭-免疫层析技术研制的 Fn 定量检测卡是一种灵敏度高、特异度强、优于传统的尿脱落细胞学检查, 适合于临床大样本筛查的无创性定量检测技术, 对膀胱癌的早期辅助诊断及检测复发都有重要的意义。

[参考文献]

- 1 孙光, 左杰, 张强, 等. 膀胱癌患者尿 NMP22 测定的临床意义[J]. 中华泌尿外科杂志, 2001, 22(10): 625-627.
- 2 陈子坚, 陈明坤, 黄仲曦, 等. 纤维连接蛋白 1 在膀胱癌组织的表达及临床意义[J]. 中华实验外科杂志, 2016, 33(6): 1444-1447.
- 3 Wang Y J. Antigen Detection Based on Background Fluorescence Quenching Immunochromatographic Assay [J]. Anal Chim Acta, 2014, 7: 23-26.
- 4 Wu X, Tian X, Xu L, et al. Determination of Aflatoxin M1 and Chloramphenicol in Milk Based on Background Fluorescence Quenching Immunochromatographic Assay [J]. Bio Med Res Int, 2017, 2017: 8649314.
- 5 Zhang W, Chen J L, Wang Y W, et al. Development of a quantitative detection card for Hear-Type Fatty Acid-Binding Protein based on background fluorescence quenching immune chromatography [J]. J Med Biochem, 2018, 37: 1-9.
- 6 陈俊蕾, 张唯, 李新霞, 等. 背景荧光猝灭-免疫层析法检测 C-反应蛋白[J]. 高等学校化学学报, 2018, 39(1): 41-47.
- 7 吴晓霞, 周晓燕, 李久彤, 等. 基于背景荧光猝灭-免疫层析法黄曲霉毒素 B₁ 检测卡的研制[J]. 分析试验室, 2017, 36(2): 189-193.
- 8 Chen X J, Xu Y Y, Yu J S, et al. Antigen detection based on background fluorescence quenching immunochromatographic assay [J]. Anal Chim Acta, 2014, 841: 44-50.
- 9 徐林发, 汪素珍, 王柏省. 应用 ROC 曲线求解最佳切点的方法介绍[J]. 中国卫生统计, 2011, 28(6): 701-702.
- 10 刘妍, 王红宇, 田娇妮, 等. 无金标准条件下含协变量的 ROC 曲线估计方法[J]. 中国卫生统计, 2012, 29(3): 321-324.
- 11 孔令启, 屈艳琳. 尿液中 LncRNA UCA1 检测对膀胱癌诊断的 Meta 分析[J]. 临床泌尿外科杂志, 2017, 32(12): 968-970.
- 12 徐子程, 蔡宏宙, 喻彬, 等. 膀胱肿瘤相关抗原在人群膀胱尿路上皮癌诊断中的应用[J]. 临床泌尿外科杂志, 2016, 31(10): 900-902.

(收稿日期: 2018-09-25)