



血清中总 cTnI、全长 cTnI 与 cTnI-C 复合物 联合检测方法的建立及其临床应用

陈浩¹, 张丽¹, 吴健², 黄彪¹, 周秀梅¹

(1. 浙江理工大学生命科学与医药学院, 杭州 310018; 2. 江苏省盐城市第一人民医院, 盐城 224005)

摘要: 通过时间分辨荧光免疫分析法(Time-resolved fluorescence immunoassay, TRFIA)建立血清中全长 cTnI、总 cTnI、cTnI-C 复合物的联合检测方法并进行方法学评估, 并采用总 cTnI、cTnI-C 复合物及全长 cTnI/总 cTnI 比值分析心肌损伤程度、发病时长及疗效。结果表明: Total-cTnI-TRFIA(检测总 cTnI)灵敏度为 0.030 ng/mL, 检测范围为 0.030~40.000 ng/mL, 回收率为 106.62%, 与临床检测方法相关性最高($R^2=0.9225$), 阳性检出率为 100.00%; Full-cTnI-TRFIA(检测全长 cTnI)灵敏度为 0.007 ng/mL, 检测范围为 0.007~40.000 ng/mL, 回收率为 102.23%, 与临床检测方法相关性最低($R^2=0.6238$), 阳性检出率为 90.90%; cTnI-C-TRFIA(检测 cTnI-C)灵敏度为 0.011 ng/mL, 检测范围为 0.011~40.000 ng/mL, 回收率为 92.15%, 与临床检测方法相关性居中($R^2=0.8868$), 阳性检出率为 98.70%。三种方法批内和批间的变异系数均小于 10.00%。对 3 名心肌损伤患者进行连续检测, 结果表明: 总 cTnI 和 cTnI-C 复合物的浓度可以准确反映患者心肌损伤的程度; 全长 cTnI 占比可以更好地提示发病时间, 对预后的提示更早。联合检测血清全长 cTnI 与总 cTnI 并计算全长 cTnI 占比具有更好的临床诊疗前瞻性, 有助于心肌损伤的诊断与疗效评估。

关键词: 心肌损伤; 总 cTnI; 全长 cTnI; cTnI 降解; 时间分辨荧光免疫分析

中图分类号: R542.2

文献标志码: A

文章编号: 1673-3851(2021)01-0094-09

Establishment and clinical application of combined detection of total serum cTnI, full-length cTnI and cTnI-C compound

CHEN Hao¹, ZHANG Li¹, WU Jian², HUANG Biao¹, ZHOU Xiumei¹

(1. College of Life Sciences and Medicine, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China;
2. Department of Laboratory Medicine, The First People's Hospital of
Yancheng City, Yancheng 224005, China)

Abstract: The time-resolved fluorescence immunoassay (TRFIA) was used to establish a combined detection method for full-length cTnI, total cTnI, and cTnI-C compound in serum for methodological evaluation. Total cTnI, cTnI-C compound and the specific value between full-length cTnI and total cTnI were used to analyze the degree of myocardial damage, onset time and curative effect. The results showed that the sensitivity of Total-cTnI-TRFIA (detection of total cTnI) was 0.030 ng/mL; the detection range was 0.030~40.000 ng/mL; the recovery rate was 106.62%; the correlation with the clinical detection method was the highest ($R^2=0.9225$), and the positive detection rate was 100%. The sensitivity of Full-cTnI-TRFIA (detection of full-length cTnI) was 0.007 ng/mL; the detection range was 0.007~40.000 ng/mL; the recovery rate was 102.23%; the correlation with the clinical detection method was the lowest ($R^2=0.6238$), and the positive detection rate was 90.90%. The sensitivity of cTnI-C-TRFIA (detection

收稿日期: 2020-07-13 网络出版日期: 2020-10-09

作者简介: 陈浩(1993-), 男, 浙江绍兴人, 硕士研究生, 主要从事免疫分析方面的研究。

通信作者: 周秀梅, E-mail: zhouxiumei824@163.com

of cTnI-C) was 0.011 ng/mL; the detection range was 0.011 ~ 40.000 ng/mL; the recovery rate was 92.15%; the correlation with the clinical detection method was moderate ($R^2 = 0.8868$); the positive detection rate was 98.70%. In the above three methods, the variable coefficients within and between batches were $<10.00\%$. In the analysis of three consecutively tested patients, the concentration of total cTnI and cTnI-C compound can accurately reflect the degree of myocardial injury in patients, and the proportion of full-length cTnI can prompt the prognosis earlier and better indicate the time of onset. The combined detection of serum full-length cTnI and total cTnI and the calculation of the proportion of full-length cTnI have better prospect for clinical diagnosis and treatment, and are helpful for the diagnosis and therapeutic effect evaluation of myocardial injury.

Key words: myocardial injury; total cTnI; full-length cTnI; cTnI degradation; time-resolved fluorescence immunoassay

0 引 言

近年来我国心血管疾病患者人数逐年增加,心血管疾病是目前导致国人死亡的首要病因^[1]。常见的心血管疾病有冠心病、急性冠状动脉综合征和心力衰竭等,这些疾病均可引起心肌损伤^[1]。临床上常用的心肌损伤血清学标志物有 Myo、BNP、NT-proBNP、CK-MB 和 cTn 等^[2]。

心肌肌钙蛋白(Cardiac troponin, cTn)是一种存在于心肌细胞中的调节蛋白,是心肌特异性的肌钙蛋白^[3],是由心肌肌钙蛋白 I(cTnI)和心肌肌钙蛋白 T(cTnT)和心肌肌钙蛋白 C(cTnC)一起组成的三元复合物^[4],其中 cTnI 和 cTnT 都是心肌特异性蛋白^[5],在心肌损伤发生 1~2 h 后通过高灵敏检测手段可将 cTn 从血液中检测出来^[6-7]。cTn 在敏感性和特异性上均高于 CK-MB^[3],已经取代后者成为临床上的首选心肌损伤标志物^[4]。cTn 在对各种因素所造成的心肌损伤的诊断和预测上具有重大价值^[8],在急性心肌梗死的诊断上,高敏 cTn 检测能发现普通酶学检查无法发现的轻微心肌损伤^[7-8];在急性心肌梗死患者的预后上,患者发病后的死亡率与血清 cTn 浓度成正比^[3]。

完整的 cTnI 序列包含 209 个氨基酸^[9]。cTnI 在血液中大致存在形式有 cTnI-C-T、cTnI-C 和游离 cTnI^[9],其中 cTnI-C 是其主要形式^[10]。在 cTnI 分子序列中占有 2/3 长度的第 30~110 氨基酸序列是最稳定的区域,该区域是 cTnC 和 cTnT 的主要结合区域,受到 cTn 复合结构的保护,cTnC 是 cTnI 的天然稳定剂,与 cTnI 形成高亲和复合物防止后者被蛋白酶降解^[7],血液中没有与 cTnC 结合的游离 cTnI 会快速降解并被人体清除,而难以被检测到^[9]。cTnI 检测有两个难题:蛋白水解和自身抗体

干扰。cTnI 的 N 端的 1~30 氨基酸和 C 端的 110~209 氨基酸区域很容易发生降解,同时多数识别中间区域的抗体易受血清 cTnI 自身抗体的干扰^[7]。

心肌损伤发生后 cTnI 被释放到血液中,cTnI 从受损的心肌细胞进入血液后会随时间逐渐降解为不同的片段^[10]。鉴于 cTnI 在血液中的多种存在形式,本文采用高灵敏 TRFIA 法(结合双抗体夹心法),分别建立检测血清中总 cTnI、全长 cTnI、cTnI-C 复合物的三种方法,并通过血清 cTnI 降解情况(全长 cTnI/总 cTnI)来评估病程的发展情况,比较 cTnI 浓度单指标检测与 cTnI 多指标联合检测在判断心肌损伤恢复情况上的价值。

1 实验部分

1.1 实验仪器及试剂

仪器:时间分辨荧光免疫分析仪(DR6608 型,佛山达安医疗设备有限公司)、自动部份收集器(BSZ-160 型,上海青浦沪西仪器厂)、微量振荡器(KJ-201C 型,江苏康健医疗用品有限公司)、电热恒温培养箱(DNP-9022,上海精宏实验设备有限公司)、蠕动泵(BT-100 型,上海青浦沪西仪器厂)、全自动洗板机(DEM-3 型,广州达瑞生物技术股份有限公司);恒温超速离心机(D-37520 osterode 型,美国科峻仪器公司)、精密电子天平(BSA2202S 型,德国赛多利斯科学仪器有限公司)和层析柱(Sephadex-G50 型,上海西宝生物科技有限公司)。

主要试剂:天然 cTnI 抗原(含 cTnI-C 复合物)与标记用抗 cTnI 抗体 L_{20C6},购于海肽生物科技有限公司;标记用抗 cTnI 抗体 L₈₃、标记用抗 cTnI 抗体 L₁₉₀、包被用抗 cTnI 抗体 C₃₀、Eu-DTTA 螯合物,购于浙江博实生物科技有限公司;Tris 和 BSA,购于广州赛国生物科技有限公司。

缓冲液:50 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐缓冲液(Tris-HCl),含有0.20% BSA、0.90% NaCl、0.01% 吐温-20、20 μmol 二乙烯三胺五乙酸(DTPA)和0.05% proclin-300(pH值7.8);0.05 mol/L Tris-HCl缓冲液,含有1.00% BSA和0.10% proclin-300(pH值7.8);50 mmol/L Tris-HCl缓冲液,含有0.90% NaCl和0.05% proclin-300(pH值7.8);50 mmol/L Tris-HCl缓冲液,含有0.90% NaCl、1.00% BSA和0.05% proclin-300(pH值7.8);50 mmol/L Na_2CO_3 - NaHCO_3 缓冲液(pH值9.6);50 mmol/L Na_2CO_3 - NaHCO_3 缓冲液(pH值9.0);增强液,每升增强溶液中含有15 μmol β -萘甲酰三氟丙酮(β -NTA)、50 μmol 氧化三辛基膦和1 mL 聚乙二醇辛基苯基醚(Triton X-100)(pH值3.2)。

1.2 临床血清样本

93份cTnI血清样本来自74名就诊者,经初步诊断,其中有急性冠状动脉综合征患者8例、心肌梗死患者27例、酒精中毒患者1例、其它非心血管疾病患者31例以及健康体检者7例,部分患者根据病情在不同时间连续采集2~4次血样。血清于-20℃下冷冻保存。样本由盐城市第一人民医院提供。

疾病的诊断标准以医院临床诊断结果为准,医院根据患者临床症状、心电图、血清cTnI值和既往病史进行综合判断;患者恢复情况以住院期间临床观察和诊断结果进行判断。本文的实验方法符合国际通用医学实验伦理标准,获得盐城市人民医院伦理委员会的批准。

1.3 实验方法

将针对cTnI稳定区域的 C_{30} 抗体作为捕获抗体包被于酶标板上,将针对稳定区域另一端的 L_{83} 抗体标记用于检测总cTnI、将针对cTnI末端的 L_{190} 抗体标记用于检测全长cTnI、将针对cTnI-C复合物的 L_{20C6} 抗体标记用于检测cTnI-C复合物,分别建立Total-cTnI-TRFIA法(检测总cTnI)、Full-cTnI-TRFIA法(检测全长cTnI)、cTnI-C-TRFIA法(检测cTnI-C),并进行方法学评估,获得各方法的灵敏度、精密度、回收率,以确定方法的可靠性。

1.3.1 固相包被抗体的制备

用 Na_2CO_3 - NaHCO_3 缓冲溶液(pH值9.6,0.01 mol/L)将捕获抗体 C_{30} 稀释成工作浓度3.00 $\mu\text{g/mL}$ 作为包被抗体。在酶标板中每孔加入100 μL 包被抗体溶液,4℃下孵育过夜;孵育后洗涤3次除去未吸附的抗体,每孔加入150 μL 的封闭

液进行封闭。将酶标板在室温下放置2 h后拍干、吹干,装入自封袋中-20℃下冷冻保存。

1.3.2 检测抗体的标记

分别将200 μL 的 L_{83} 、 L_{190} 抗体和 L_{20C6} 抗体加入3个超滤管中,以10000 r/min的速度离心5 min;加入标记缓冲液,以同样速度离心5 min后去掉滤液,重复7次;将3个超滤管分别倒扣于3个新超滤管中并加入100 μL 标记缓冲液,以3000 r/min的速度离心1 min,重复2次以将超滤膜上的抗体完全转移到新管中。在各个新超滤管中加入50 μL 的铺离子螯合物溶液(2.00 mg/mL),于恒温箱中振荡(28℃,16 h)。次日用层析柱先后纯化标记抗体 L_{83} 、标记抗体 L_{190} 、标记抗体 L_{20C6} ,用含0.20% BSA的洗脱缓冲液将三种标记抗体洗脱下来。各收集管按顺序取样测荧光信号,收集合并头一个信号峰对应的收集管中溶液,将所得的三种标记抗体纯化液于-20℃条件下保存、备用。

1.3.3 三种形式cTnI检测步骤

每份样本做复孔,在固相包被抗体板中每孔加入100 μL 待测标准品或样本,于37℃恒温箱中振荡反应;洗板3次除去未结合样本,每孔加入100 μL 检测抗体,于37℃恒温箱中振荡反应,使检测抗体与cTnI结合;洗板6次除去游离检测抗体,加入增强液后振荡3 min,使用时间分辨荧光免疫分析仪测量样本的荧光信号强度。利用各自的标准曲线计算出样本中三种形式的cTnI浓度。

1.3.4 实验反应条件的优化

包被抗体浓度的优化选择:将捕获抗体 C_{30} 稀释到不同浓度,其浓度分别为0.75、1.50、3.00 $\mu\text{g/mL}$ 和6.00 $\mu\text{g/mL}$,并将每种浓度的抗体包被到酶标板上,每孔加入100 μL 。包被封闭后进行0点和高浓度标准品的检测,选择结合率高的包被抗体浓度。

双抗体夹心法反应时间的优化选择:双抗体夹心法分两步进行,第一步是包被抗体与抗原标准品进行反应,第二步是标记抗体与抗原-抗体复合物进行反应。通过不同的两步反应时间组合以选出最佳的时间方案:首先固定第一步反应时间,调整第二步反应时间以确定第二步反应的最佳时间。将第一步反应时间定为60 min,对应的第二步反应时间分别定为10、20、30、40、50 min和60 min,检测荧光计数值。根据实验结果确定第二步的最佳反应时间。然后将第一步反应时间分别定为10、20、30、40、60 min和100 min,对应的第二步反应时间定为60 min,检测荧光计数值。根据检测结果确定适宜

的二步法反应时间组合方案。

标记抗体稀释比例的选择: 稀释三种检测抗体: 将标记抗体 L_{83} 分别按照 1:50、1:100、1:200、1:400 和 1:800 的稀释比例稀释。将标记抗体 L_{190} 和 L_{20C6} 分别按照 1:100、1:200、1:400、1:600 和 1:800 的稀释比例稀释。分别将各稀释度的每种检测抗体与 cTnI 标准品溶液和包被抗体进行双抗体夹心反应, 空白对照为样品稀释液。每种反应条件做复孔, 每孔加入 100 μ L 的 cTnI 标准品溶液 (40.000 ng/mL) 或者同体积的样品稀释液, 于 37 $^{\circ}$ C 恒温箱中振荡反应 1 h, 孵育后洗涤除去未结合的 cTnI; 每孔加入 100 μ L 不同稀释度的每种检测抗体, 于 37 $^{\circ}$ C 恒温箱中振荡反应 1 h, 孵育后洗涤除去未结合的检测抗体。加入增强液振荡 3 min 后检测荧光计数值, 反应完毕后检测荧光信号强度, 选择信噪比最高的标记抗体稀释度。

1.3.5 方法学评价

灵敏度和线性: 分别使用不同浓度 cTnI 标准品 (0、0.500、1.000、2.000、5.000、10.000 ng/mL 和 40.000 ng/mL) 绘制 Total-cTnI-TRFIA、Full-cTnI-TRFIA、cTnI-C-TRFIA 的标准曲线, 回归方式为线性回归, 线性指标为 R^2 (相关系数)。分别使用以上三种方法测定 10 份 0 ng/mL 标准品的荧光强度, 各取其平均值 ($mean$) 并计算标准差 (SD)。将三种方法下 $mean + 2SD$ 的值代入各自的标准曲线中, 计算出的浓度值即是每种方法的灵敏度。

精密度: 分别用实验中建立的三种方法检测低、高浓度的 cTnI 标准品溶液各 10 份, 计算各自的批内精密度; 进行 3 次独立重复实验, 计算批间精密度。精密度以变异系数 (CV) 表示。精密度计算公式为: $CV/\% = \frac{SD}{mean} \times 100$ 。其中 CV 为精密度, SD 为标准偏差, $mean$ 为计算结果的算术平均值。以批内 $CV < 10\%$ 、批间 $CV < 15\%$ 为精密度合格标准。

回收率: 将两份高浓度 cTnI 标准品以 1:9 的比例分别加入低浓度的血清样本, 分别用实验中建立的三种方法检测样品的总 cTnI 浓度、全长 cTnI 浓度与 cTnI-C 复合物浓度, 分别计算回收率。回收率计算公式为: $\eta/\% = \frac{C_1}{C_2} \times 100$ 。其中 C_1 代表测量浓度, C_2 代表理论浓度, η 代表回收率, 取平均值得到每种方法的回收率, 以回收率介于 85%~115% 之间为回收率合格标准。

1.3.6 方法学比较

采用 Total-cTnI-TRFIA、Full-cTnI-TRFIA 和 cTnI-C-TRFIA 分别检测 93 份血清样本中的 cTnI 浓度, 与医院提供的临床检测结果作对比, 分析各自与临床检测法的相关性。以 $p < 0.05$ 为差异有统计学意义, $0.01 < p \leq 0.05$ 说明 2 组数据之间有一定统计学差异, $0.001 \leq p \leq 0.01$ 说明 2 组数据之间有显著统计学差异, $p < 0.001$ 说明 2 组数据之间有极其显著的统计学差异。同时计算三种方法各自测得的 cTnI 平均浓度, 与临床检测法对比。

1.3.7 临床应用

诊断性能对比: 采用临床诊断值作为标准, 对比 Total-cTnI-TRFIA、Full-cTnI-TRFIA 和 cTnI-C-TRFIA 各自的诊断性能 (以阳性检出率为标准)。临床 cTnI-CLIA 的 cut-off 值是 0.110 ng/mL, 超过该值即判定为 cTnI 浓度异常。样本中有 77 例阳性, 16 例阴性, 其中 77 份阳性血清被所有方法检测。

2 结果与分析

2.1 实验反应条件的优化

2.1.1 包被抗体浓度优化选择

随着包被抗体浓度的升高, cTnI 高浓度点标准品荧光计数也逐渐升高, 结果如表 1 所示, 最后确定最适合的包被抗体浓度为 3.00 μ g/mL, 超过此浓度 cTnI 标准品荧光信号增强不明显。

表 1 cTnI 包被抗体浓度选择

荧光计数点	包被浓度/(μ g \cdot mL $^{-1}$)			
	0.75	1.50	3.00	6.00
0	1253	1377	1598	1522
40	111858	203339	387655	412290

2.1.2 反应时间优化选择

双抗体夹心法反应时间的优化选择的结果如表 2 和表 3 所示, 表 2 和表 3 结果显示, 第二步的最佳反应时间为 40 min, 此时反应接近饱和; 第一步最佳反应时间为 40 min, 此时反应接近饱和。最终确定最合适的时间组合方案: 第一步反应 40 min, 第二步也反应 40 min。

表 2 第二步反应时间选择

反应时间/min	10	20	30	40	50	60
荧光计数	33678	51224	54871	68545	67638	68022

表 3 第一步反应时间选择

反应时间/min	10	20	30	40	60	100
荧光计数	30189	45818	55846	68460	67563	68119

2.1.3 标记抗体稀释比例选择

标记抗体 L_{83} 稀释比例选择结果如表 4 所示,检测抗体 L_{83} 的最佳稀释比例为 1:200,稀释比例下信噪比最高;标记抗体 L_{190} 稀释比例选择结果如表 5 所示,确定检测抗体 L_{190} 的最佳稀释比例为 1:400,此稀释比例下信噪比最高;标记抗体 L_{20C6} 稀释比例选择结果如表 6 所示,检测抗体 L_{20C6} 的最佳稀释比例为 1:400,此稀释比例下信噪比最高。

表 4 抗体 L_{83} 稀释比例选择

荧光计 数点	稀释倍数				
	50	100	200	400	800
0	8799	3712	1320	1120	890
40	1286532	704478	376891	187676	112323
信噪比	146.2	189.8	285.5	167.6	126.2

表 5 抗体 L_{190} 稀释比例选择

荧光计 数点	稀释倍数				
	100	200	400	600	800
0	21098	8663	3053	2877	2611
40	5343210	3755675	2012398	1543922	1122977
信噪比	253.3	433.5	659.2	536.6	430.1

表 6 抗体 L_{20C6} 稀释比例选择

荧光计 数点	稀释倍数				
	100	200	400	600	800
0	29877	9808	4320	3321	2879
40	3988018	2437781	1456531	975502	598907
信噪比	133.5	248.6	337.2	293.7	208.0

2.2 方法学评估

2.2.1 灵敏度和线性

Total-cTnI-TRFIA(检测总 cTnI)的标准曲线如图 1(a),由图 1(a)可知, $y=10123x+3657.4$,相关系数 $R^2=0.9993$,灵敏度为 0.030 ng/mL ,检测范围为 $0.030\sim 40.000\text{ ng/mL}$ 。Full-cTnI-TRFIA(检测全长 cTnI)的标准曲线如图 1(b),图 1(b)显示, $y=41645x+41299$,相关系数 $R^2=0.9979$,灵敏度为 0.007 ng/mL ,检测范围为 $0.007\sim 40.000\text{ ng/mL}$ 。cTnI-C-TRFIA(检测 cTnI-C 复合物)的标准曲线如图 1(c),由图 1(c)可知, $y=30358x+7705.9$,相关系数 $R^2=0.999$,灵敏度为 0.011 ng/mL ,检测范围为 $0.011\sim 40.000\text{ ng/mL}$ 。

2.2.2 精密度

分别采用实验中建立的三种方法重复测定不同浓度样本各 10 次、连续测 3 批,分别计算三种方法各自的批内与批间 CV,实验结果如表 7 所示,表 7 显示,本文建立的三种方法在批内和批间精密度上均符合要求。

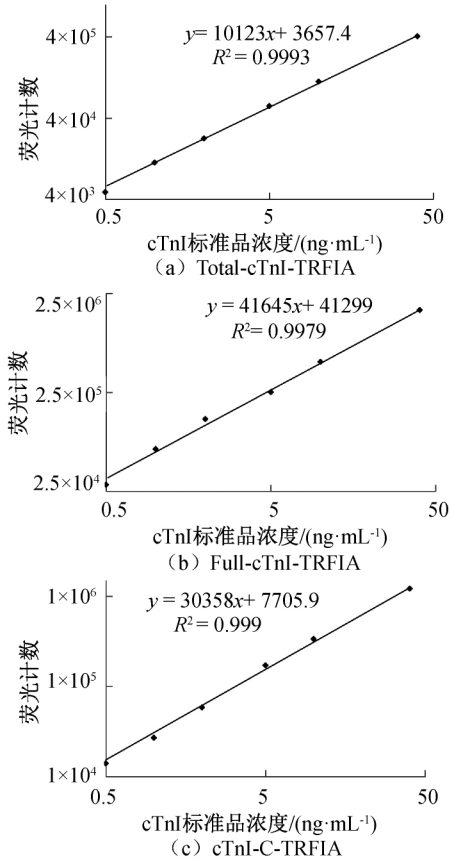


图 1 三种 cTnI 检测法的标准曲线

表 7 三种 cTnI 检测法精密度 单位: %

批次	检测方法		
	Total-cTnI-TRFIA	Full-cTnI-TRFIA	cTnI-C-TRFIA
批内	4.78	3.59	4.72
批间	7.94	8.06	8.83

2.2.3 回收率

分别计算两种高浓度 cTnI 标准品 (10.000 、 40.000 ng/mL)与低 cTnI 浓度血清按比例 ($1:9$)混合后的三种形式 cTnI 理论浓度,并分别检测出三种形式 cTnI 的测量浓度,结果表明,三种方法在回收率上均符合要求(表 8)。

表 8 三种 cTnI 检测法回收率

荧光计 数点	三种方法回收率/%		
	Total-cTnI-TRFIA	Full-cTnI-TRFIA	cTnI-C-TRFIA
10	110.67	106.22	93.98
40	102.56	98.23	90.32
平均值	106.62	102.23	92.15

2.3 方法学比较

2.3.1 Total-cTnI-TRFIA 与临床检测法的比较

采用实验中建立的 Total-cTnI-TRFIA 法检测 93 份血清样本中的总 cTnI 浓度,与医院提供的临床 cTnI-CLIA 检测结果作对比,绘制临床 cTnI-

CLIA与Total-cTnI-TRFIA结果的相关性曲线(图2),并计算对应的相关系数,根据相关系数判断二者之间相关性,并分析原因。图2表明,两者的回归方程为 $y = 1.2598x - 0.8108$,相关系数 $R^2 = 0.9225$ 。线性回归结果表明它们之间有很好的相关性,2组数据之间的 p 值为0.6833,说明临床cTnI-CLIA与Total-cTnI-TRFIA结果之间没有显著的统计学差异,临床结果相一致。

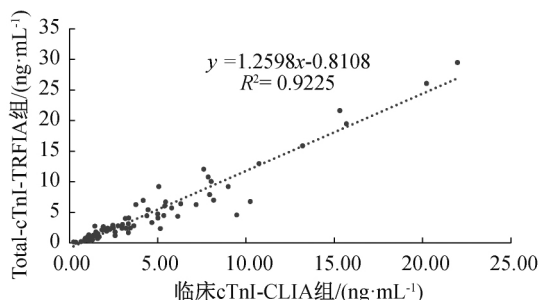


图2 临床cTnI-CLIA与Total-cTnI-TRFIA的相关性曲线

2.3.2 Full-cTnI-TRFIA与临床检测法的比较

采用实验中建立的Full-cTnI-TRFIA检测93份血清样本中的全长cTnI浓度,与医院提供的临床cTnI-CLIA检测结果作对比,绘制临床cTnI-CLIA与Full-cTnI-TRFIA结果的相关性曲线(图3)。由图3可知,回归方程为 $y = 0.7529x - 1.1666$,相关系数 $R^2 = 0.6238$,线性回归结果显示两者相关性较差,两组数据之间的 p 值为0.0013,表明临床cTnI-CLIA与Full-cTnI-TRFIA之间有很显著的统计学差异。

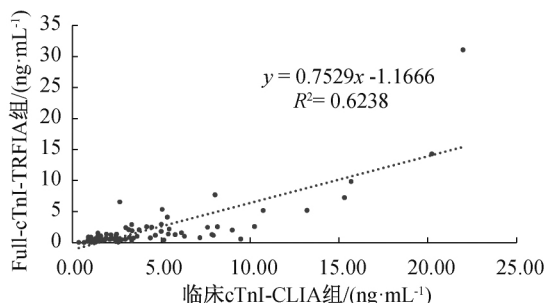


图3 临床cTnI-CLIA与Full-cTnI-TRFIA法的相关性曲线

使用Full-cTnI-TRFIA法检测所得结果因为与临床cTnI-CLIA相关性较低,将结果按检测时间进一步拆分成两部分进行深入分析。第一部分是每个患者在医院第一次抽血cTnI-CLIA检测结果与Full-cTnI-TRFIA检测结果的相关性(图4)。由图4可知,首诊样品cTnI-CLIA与Full-cTnI-TRFIA之间回归方程为 $y = 0.8105x - 1.4023$,相关系数 $R^2 = 0.65$ 。相关性虽然较全部样品的有所提高,但两组数据之间的 p 值为0.0129,说明cTnI-CLIA

与Full-cTnI-TRFIA之间有较显著的统计学差异,两者的结果不一致。第二部分是随访过程中的血清标本的cTnI-CLIA检测结果与Full-cTnI-TRFIA检测结果的相关性(图5),图5表明,随访样品cTnI-CLIA与Full-cTnI-TRFIA之间的相关性曲线回归方程为 $y = 0.1467x + 0.3837$,相关系数 $R^2 = 0.1935$,2者相关性差,比起首诊的相关性更低。两组数据之间的 p 值为0.0004,说明随访样品cTnI-CLIA与Full-cTnI-TRFIA之间有显著的统计学差异;相对临床采用的cTnI-CLIA,Full-cTnI-TRFIA检测随访样品会比检测首诊样品产生更大的差异,而且浓度更低。其原因可能是是Full-cTnI-TRFIA采用的标记抗体针对的190~203氨基酸位点在cTnI的靠近C末端,当cTnI释放到血液中后容易首先被降解,由于首诊时与发病时有长短短的时间差,所以造成全长与总cTnI的浓度差别,而且该差别随着发病时间的延长而更明显,两者的相关性进一步降低。

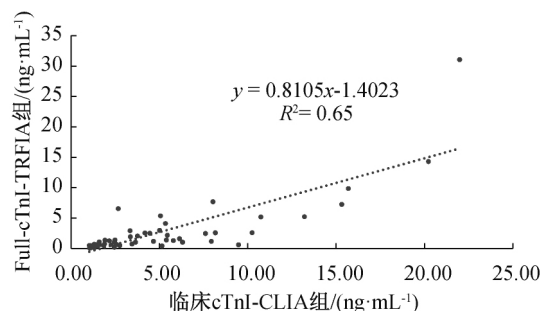


图4 首诊样品cTnI-CLIA与Full-cTnI-TRFIA之间的相关性曲线

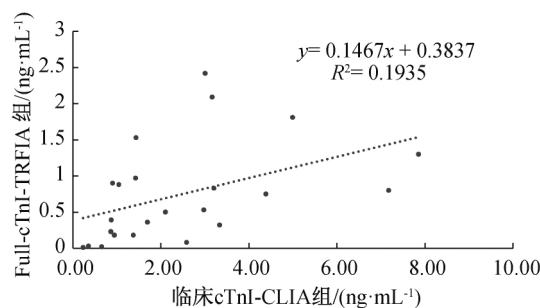


图5 随访样品cTnI-CLIA与Full-cTnI-TRFIA之间的相关性曲线

2.3.3 cTnI-C-TRFIA与临床检测法的比较

采用实验中建立的cTnI-C-TRFIA法检测93份血清样本中的cTnI-C复合物浓度,与临床采用的cTnI-CLIA检测结果作对比,分析cTnI-C-TRFIA与临床检测法的相关性,结果如所示图6。图6表明,cTnI-CLIA与cTnI-C-TRFIA之间的相关性曲线回归方程为 $y = 0.9038x + 0.0507$,相关系数

$R^2=0.8868$ 。两组数据之间的 p 值为 0.5879,说明 cTnI-CLIA 与 cTnI-C-TRFIA 之间没有明显差异,结果也相一致,因此检测 cTnI-C 复合物,其浓度接近总的 cTnI 值。

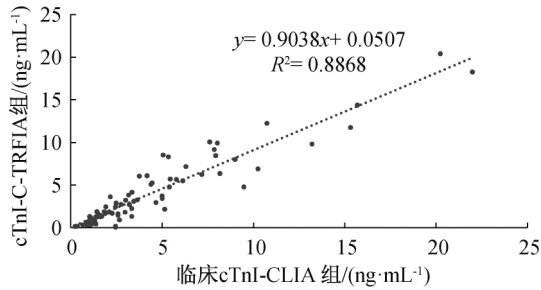


图6 cTnI-CLIA 与 cTnI-C-TRFIA 之间的相关性曲线

2.3.4 三种方法与临床检测法的对比

相关性对比:Total-cTnI-TRFIA 法与临床检测方法相关性最高($R^2=0.9225$),Full-cTnI-TRFIA 法与临床检测方法相关性最低($R^2=0.6238$),

表9 77份临床阳性血清样本的检测结果

检测方法	临床 cTnI-CLIA	Total-cTnI-TRFIA	Full-cTnI-TRFIA	cTnI-C-TRFIA
阳性数量/个	77	77	70	76
检出率/%	100.0	100.0	90.9	98.7

2.4.2 cTnI 联合检测的临床意义

2.4.2.1 心肌梗死患者1#情况分析

患者1#,胸痛7h及时就诊,其血清cTnI浓度检测结果见表10。入院时临床诊断为心肌梗死,临床cTnI、全长cTnI和总cTnI浓度很高,都大于30.000 ng/mL,就诊后马上手术,在第4天、第7天和第10天的cTnI浓度明显降低,而且全长cTnI浓度的降幅更明显,全长cTnI/总cTnI比值降到60%以下,初诊时总cTnI和全长cTnI浓度都很高,

表10 患者1#血清cTnI浓度变化情况

检测时间	临床 cTnI 浓度/ (ng · mL ⁻¹)	总 cTnI 浓度/ (ng · mL ⁻¹)	cTnI-C 复合物浓度/ (ng · mL ⁻¹)	全长 cTnI 浓度/ (ng · mL ⁻¹)	全长 cTnI 占比/%
第1天	>30.000	39.300	22.320	36.930	93.97
第4天	5.780	6.010	5.920	2.190	36.42
第7天	3.200	2.450	2.860	0.830	33.82
第10天	0.860	0.430	0.540	0.250	58.72

2.4.2.2 急性冠状动脉综合征患者2#情况分析

患者情况:65岁女性,该患者因意识不清3h后入院,入院时初步诊断为急性冠状动脉综合征,住院期间确诊患有急性冠状动脉综合征、急性心肌梗死,入院前患者多次就诊并诊断为冠心病。该患者住院期间先后采集3次血清样本,3份血清样本分别采集于入院后第1天、第2天和第8天。其血清

cTnI-C-TRFIA 法与临床检测方法相关性居中且较高($R^2=0.8868$)。

平均浓度对比:Total-cTnI-TRFIA 法测得的cTnI平均浓度最高,为5.590 ng/mL;cTnI-C-TRFIA 法测得的cTnI平均浓度次之,为4.010 ng/mL;Full-cTnI-TRFIA 法测得的cTnI平均浓度最低,为2.120 ng/mL。临床cTnI-CLIA测得的cTnI平均浓度为4.380 ng/mL,介于Total-cTnI-TRFIA法和cTnI-C-TRFIA法的结果之间。

2.4 临床应用

2.4.1 诊断性能对比

若采用cTnI-CLIA的同一临界值(0.110 ng/mL)作为本实验诊断cTnI异常的标准,诊断结果如表9所示。由表9可知,在cTnI异常的阳性检出率上Total-cTnI-TRFIA与临床cTnI-CLIA并列第一,cTnI-C-TRFIA的阳性检出率居中;Full-cTnI-TRFIA的阳性检出率最低。

说明心肌损伤严重,急性发病,cTnI连续释放到血液中;全长cTnI/总cTnI比为93.97%,说明血液中的cTnI还没有更多降解,提示发病时间较短;手术后第2天全长cTnI和总cTnI浓度都大幅降低,但大于2.000 ng/mL,单从总cTnI看,有明显的心肌损伤,但全长cTnI/总cTnI比值大幅降低,说明术后血液中的cTnI以降解产物为主,新释放到血液中的cTnI已很少,全长cTnI/总cTnI比值可以更早的提示好的预后,患者第10天后明显好转。

cTnI浓度检测结果见表11。单从该患者首诊的cTnI浓度评估,其总cTnI及cTnI-C复合物的浓度都很高,明显的心肌梗死症状,全长cTnI浓度也升高,但全长cTnI/总cTnI的比值为45.69%,较1#患者首诊时的全长cTnI/总cTnI比值93.97%低很多,该患者心肌损伤急性程度小于1#患者;第2天,该患者临床检测额cTnI浓度进一步升高,由4.450 ng/mL升

到 4.990 ng/mL, 临床数据看不出病情是否恢复。本文检测的总 cTnI 浓度略有下降, 由 5.450 ng/mL 降到 4.770 ng/mL, 降幅 12.47%, 全长 cTnI 浓度由 2.490 ng/mL 降到 1.810 ng/mL, 降幅 27.31%, 全长 cTnI/总 cTnI 比值为 37.95%, 联合检测的数据说明患者心肌损伤应该在逐步恢复, 由于患者不适合手术, 进行药物治疗; 第 8 天, 总 cTnI 及 cTnI-C

复合物的浓度已接近阈值, 而全长 cTnI 已在阈值以内, 全长 cTnI/总 cTnI 比值为 18.75%, 患者明显恢复, 当天出院。以上结果表明, 患者入院时与心肌损伤发生的时间较长, 检测全长 cTnI/总 cTnI 比值可以较单独检测总 cTnI 或 cTnI-C 复合物更早的预判治疗效果, 联合检测全长 cTnI 和总 cTnI 并计算 cTnI/总 cTnI 比值具有更好的临床价值。

表 11 患者 2# 血清 cTnI 浓度变化情况

检测时间	临床 cTnI 浓度/ (ng·mL ⁻¹)	总 cTnI 浓度/ (ng·mL ⁻¹)	cTnI-C 复合物浓度/ (ng·mL ⁻¹)	全长 cTnI 浓度/ (ng·mL ⁻¹)	全长 cTnI 占比/%
第 1 天	4.450	5.450	5.250	2.490	45.69
第 2 天	4.990	4.770	3.710	1.810	37.95
第 8 天	0.350	0.160	0.180	0.030	18.75

2.4.2.3 急性酒精中毒患者 3# 情况分析

患者情况: 79 岁男性, 该患者因饮用烈酒后持续 2 h 出现心慌、心脏不适症状入院, 入院时初步诊断为急性酒精中毒, 住院期间确诊为酒精中毒, 且患者无冠心病或急性心肌梗死病史。酒精中毒患者会因短时间内摄入过量的酒精而导致严重的心脏功能受损, 饮酒后仅有 10% 的酒精可经由尿液、汗液和呼吸排出体外, 余下的 90% 都会在肝脏代谢并转化为具有毒性的乙醛^[11]。急性酒精中毒所造成的心脏损害不但会改变心肌细胞的兴奋性(抑制钠钾泵的活性和钙泵 ATP 酶活性)从而引起心率失常或者心肌收缩力的减弱, 还会改变心肌细胞膜的通透性并损害心肌细胞的完整性(肌浆网和线粒体都会遭到破坏), 导致心肌损害的发生^[12]。严重的急性酒精中毒甚至会导致急性心肌梗死^[13], 但是心肌损

害在及时治疗的情况下可逆转^[14]。该患者入院后未进行手术治疗, 通过药物治疗第 6 天病情平稳并出院。患者住院期间先后采集了 3 次血清样本, 三份血清样本分别采集于入院后第 1 天、第 3 天和第 4 天, 其血清 cTnI 浓度检测结果见表 12。第 3 天, 不管采用哪种方法检测, 临床 cTnI、总 cTnI、cTnI-C 复合物、全长 cTnI 较首诊当天都轻微升高, 而且全长 cTnI/总 cTnI 的比值不但没有下降, 而是略有升高, 从 72.04% 升高到 82.91%, 说明酒精中毒后心肌呈现持续性轻微损伤, 不断有少量的 cTnI 释放。经过住院治疗, 在第 4 天的 cTnI 浓度有所下降, 而且全长 cTnI/总 cTnI 下降更明显, 说明心肌损伤在逐步恢复。通过联合检测说明, 检测总 cTnI 和全长 cTnI, 计算全长 cTnI/总 cTnI 的比值, 可以发现持续性的心肌损伤。

表 12 患者 3# 血清 cTnI 浓度变化情况

检测时间	临床 cTnI 浓度/ (ng·mL ⁻¹)	总 cTnI 浓度/ (ng·mL ⁻¹)	cTnI-C 复合物浓度/ (ng·mL ⁻¹)	全长 cTnI 浓度/ (ng·mL ⁻¹)	全长 cTnI 占比/%
第 1 天	1.300	0.930	0.850	0.670	72.04
第 3 天	1.420	1.170	1.250	0.970	82.91
第 4 天	0.870	0.670	0.640	0.390	58.21

3 讨 论

cTnT 比起 cTnI 在心肌特异性上较低, 更容易产生假阳性结果。血清 cTnT 含量在患者存在骨骼肌病变、肾功能衰退时也会上升, 而 cTnI 不受影响^[3]; 血清中的高分子量蛋白也能引起 cTnT 的假阳性^[15]; 除此之外, 一些神经肌肉性疾病和骨骼肌疾病能在不影响 cTnI 的情况下引起 cTnT 的假阳性升高^[10], 同样会导致假阳性。

目前在 cTnI 的测定上, 主要有以下免疫分析方

法: 胶体金免疫分析法、酶联免疫分析法、化学发光免疫分析法、荧光免疫分析法^[16]。TRFIA 与其它免疫分析技术相比具有灵敏度更高、检测范围更广、准确性更高和操作相对简便等优点^[17]。TRFIA 法与传统的免疫荧光技术不同, 使用镧系元素(如 Eu, Sm, Dy, Tb)的螯合物作为标记物。镧系元素吸收激发光后可以产生衰变时间长的高强度荧光信号, 其存在时间要比背景噪音的存在时间高几个数量级, 而传统的免疫荧光标记物产生的荧光信号衰减时间很短^[18]。镧系元素产生的荧光信号发射峰尖、

波长范围窄^[17-18]、斯托克斯位移大,其荧光发射波长与激发光波长差距明显且不容易互相混淆^[17]。镧系元素的这些特殊荧光性质使得 TRFIA 的检测结果具有高信噪比^[18]。

在急性冠状动脉综合征和心肌梗死中常会出现心肌细胞坏死这一重要病理特征。心肌细胞坏死不可逆转,且心肌细胞坏死后会释放 cTnI 到血液中。在心肌损伤患者病情判断上,现有方法只考虑患者血清 cTnI 的含量变化而没有考虑其降解情况变化,而血清 cTnI 既包含未降解的全长 cTnI 也包括降解后的 cTnI 片段。本文通过联合检测血清中的全长 cTnI 与总 cTnI 来反映血清 cTnI 的降解情况,分析全长 cTnI/总 cTnI 的值与患者病情恢复情况的关系。

4 结 论

本文建立的三种形式 cTnI 联合检测方法在方法学评估上符合 WHO 对体外检测试剂的临床要求,在临床诊断上性能优秀。主要结论如下:

a) 在血清 cTnI 浓度的检测上,本文建立的 Total-cTnI-TRFIA 法、cTnI-C-TRFIA 法和临床 cTnI-CLIA 检测方法具有很高相关性,且检测结果浓度接近。Full-cTnI-TRFIA 的检测浓度较临床 cTnI-CLIA 检测方法低。

b) 联合应用其中总 cTnI 和全长 cTnI 的检测方法时可以得到血清 cTnI 的降解情况,血清全长 cTnI/总 cTnI 值可以反映心肌损伤患者的恢复情况,该值越高说明距心肌损伤发病越近。

c) 联合检测血清中全长 cTnI 与总 cTnI 对于判断急性心肌梗死和急性冠状动脉综合征等心肌损伤相关疾病病情进展有良好的临床价值,对于患者病情恢复情况的判断和指导治疗有重要的参考意义。

d) 联合检测全长 cTnI 和总 cTnI 并计算全长 cTnI/总 cTnI 比值,其结果较单独检测 cTnI 对临床疗效评估更具有前瞻性。

参考文献:

- [1] 韩雅玲,周玉杰,霍勇,等. 冠心病合理用药指南[J]. 中国医学前沿杂志(电子版), 2016, 8(6): 19-108.
- [2] 潘柏申. 心肌损伤标志物的研究进展与心肌梗死诊断标准的修订[J]. 临床检验杂志, 2002(3): 129-132.
- [3] 何秉贤. 急性冠状动脉综合征心肌标志物检测的现状[J]. 中华心血管病杂志, 2003(1): 70-71.

- [4] 姚磊. 心肌损伤标志物对急性心肌梗死早期诊断的意义[J]. 实用检验医师杂志, 2019, 11(1): 26-29.
- [5] 李萌辉,胡志东. 高敏心肌肌钙蛋白的临床研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(12): 1561-1562.
- [6] 尹建华,朱见伟,顾立超,等. 不同血液检测指标对冠状动脉粥样硬化性心脏病临床诊治应用价值[J]. 临床军医杂志, 2019, 47(7): 723-724.
- [7] Katrukha Ivan A, Kogan Alexander E, Vylegzhanina Alexandra V, et al. Full-size cardiac troponin I and its proteolytic fragments in blood of patients with acute myocardial infarction: antibody selection for assay development[J]. Clinical chemistry, 2018, 64 (7): 1104-1112.
- [8] 张洁,卢玲玲,潘晓夫,等. 时间分辨荧光免疫分析法检测心肌肌钙蛋白 I 方法学的建立及临床应用[J]. 中国免疫学杂志, 2014, 30(8):1093-1097.
- [9] Vylegzhanina A V, Kogan A E, Katrukha I A, et al. Full-size and partially truncated cardiac troponin complexes in the blood of patients with acute myocardial infarction[J]. Clin Chem, 2019, 65(7): 882-892.
- [10] Apple F S, Sandoval Y, Jaffe A S, et al. Cardiac troponin assays: guide to understanding analytical characteristics and their impact on clinical care[J]. Clin Chem, 2017, 63(1): 73-81.
- [11] 王华萍,朱先存. 急性酒精中毒患者心电图异常 120 例分析[J]. 淮海医药, 2015, 33(2): 170.
- [12] 滕秋叶,张志坤,覃碧云. 急性酒精中毒对心脏损害 98 例临床分析[J]. 现代医药卫生, 2009, 25(18): 2799-2799.
- [13] 赵广珍. 急性酒精中毒患者心电图改变及临床分析[J]. 青海医药杂志, 2016, 46(10): 61-62.
- [14] 秦卫胜,杨文东. 急性酒精中毒心肌损害的早期诊断[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(1): 98-99.
- [15] Franekova J, Blaha M, Belohoubek J, et al. A clinical and laboratory approach used to elucidate discordant results of high-sensitivity troponin T and troponin I[J]. Clin Chim Acta, 2015, 446(2): 128-131.
- [16] 郭会时. 人心肌肌钙蛋白 I 的几种检测方法及其应用研究[D]. 南京:东南大学, 2005:53-61.
- [17] Huang B, Xiao H, Zhang X, et al. Ultrasensitive detection of pepsinogen I and pepsinogen II by a time-resolved fluoroimmunoassay and its preliminary clinical applications[J]. Anal Chim Acta, 2006, 571(1): 74-78.
- [18] Zhang J, Guo J Z, Xiao H L, et al. Simultaneous detection of different serum pepsinogens and its primary application[J]. World J Gastroenterol, 2010, 16(24): 3072-3077.