

· 论 著 ·

自建流式微球分析技术联合检测动脉粥样硬化破裂标志物 对急性冠脉综合征诊断价值的评价*

黄 山¹, 陈 艳², 张 程², 令狐颖¹, 许 健¹, 刘志琴³

(1. 贵州省人民医院临床检验中心, 贵阳 550002; 2. 贵阳医学院 2009 级硕士研究生, 贵阳 550002;
3. 贵州省人民医院心内科, 贵阳 550002)

摘要:目的 探讨人血清中基质金属蛋白酶-9(MMP-9)、髓过氧化物酶(MPO)、CD40 配体(CD40L)和组织型血浆纤溶酶原激活物(t-PA)水平含量对冠心病诊断的临床价值。方法 采用自建的流式微球分析技术联合检测健康人群和冠心病患者血清中 MMP-9、MPO、CD40L 和 t-PA 水平, 并进行酶联免疫吸附试验(ELISA)方法比对, 用统计软件对这些因子的临床诊断效能进行评价。结果 健康对照人群和患者血清标本中 MMP-9、MPO、CD40L 和 t-PA 水平比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 病例组内不同病例类型(稳定型心绞痛、不稳定型心绞痛和急性心肌梗死)之间各因子的检测结果比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 与 ELISA 方法比较差异无统计学意义($P > 0.05$), 根据对各个因子工作特征曲线(ROC)下面积(AUC)进行统计分析, 血清 MMP-9、MPO、CD40L 和 t-PA 水平用于诊断冠心病有显著意义, 各因子的诊断灵敏度分别为 86.80%、83.43%、86.27% 和 88.58%; 特异性分别为 80.44%、84.62%、84.86% 和 78.27%。结论 血清中 MMP-9、MPO、CD40L 和 t-PA 水平对冠心病的诊断和分层有一定的应用价值, 值得在临床上推广。

关键词: 基质金属蛋白酶-9; 过氧化物酶; 纤溶酶原激活物; 流式微球分析技术; 急性冠脉综合征; CD40 配体

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.03.002

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)03-0211-03

By development of cytometric bead array multiplex detection method to detect the levels of inflammation factors (MMP-9, MPO, CD40L and t-PA) for diagnostic value of coronary heart disease*

Huang Shan¹, Chen Yan², Zhang Cheng², Linghu Ying¹, Xu Jian¹, Liu Zhiqin³

(1. Center for Clinical Laboratory, Guizhou Province People's Hospital, Guiyang 550002, China; 2. Guiyang Medical College, Guiyang 550002, China; 3. Department of Cardiac Guizhou Province People's Hospital, Guiyang 550002, China)

Abstract: Objective To explore the contents of MMP-9, MPO, CD40L and t-PA in serum for diagnostic value of coronary heart disease. Methods By using development of cytometric bead array multiplex detection method to detect the levels of MMP-9, MPO, CD40L and t-PA in healthy people and patients with coronary artery disease, and compared with the method of ELISA, then using software to analyze the diagnostic performance. Results Compared with the healthy people, the levels of serum MMP-9, MPO, CD40L and t-PA in patients with coronary artery disease were significant difference, and there were significant differences of the levels of serum MMP-9, MPO, CD40L and t-PA for the patients with coronary artery disease in each type (stable angina, unstable angina, acute myocardial infarction), and there was no significant difference with ELISA. By using statistical analysis for ROC curve (AUC) of inflammation factors, there was significant difference for according the the levels of serum MMP-9, MPO, CD40L and t-PA to diagnose coronary heart disease. Diagnostic sensitivity of each factor were 86.80%, 83.43%, 86.27% and 88.58%, specificity of each factor are 80.44%, 84.62%, 84.86% and 78.27%. Conclusion The levels of serum MMP-9, MPO, CD40L and t-PA can be helped to clinical diagnosis of coronary heart disease and it is worth to be popularized.

Key words: matrix metalloproteinase; peroxidase; plasminogen activators; cytometric bead array multiplex detection method; coronary heart disease; CD40L

急性冠脉综合征(acute coronary syndrome, ACS)是以冠状动脉粥样硬化斑块破裂或侵蚀, 继发完全或不完全闭塞性血栓形成病理基础的一组临床综合征^[1]。许多与动脉粥样硬化和血栓形成相关的心脏标志物, 如基质金属蛋白酶-9(MMP-9)、髓过氧化物酶(MPO)、CD40 配体(CD40L)和组织型血浆纤溶酶原激活物(t-PA)等都参与了这一过程^[2-5]。为了探讨这些标志物对冠心病的临床诊断价值, 作者应用微球编码技术^[6], 在流式细胞仪上建立了流式微球分析技术(cytometric bead assay, CBA)^[7]联合检测 MMP-9、MPO、CD40L 和 t-PA 的方法, 对冠心病患者血清进行检测, 效果较为满意, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 标本来源 血清标本采自 2010 年 9 月至 2011 年 3 月贵州省人民医院心内科住院患者和健康体检者。清晨空腹采血, 分离血清, -80℃ 保存待检。健康对照组收集 50 例, 均来自各项体检指标正常的健康人群; 冠心病组经冠状动脉造影术等检查确诊, 稳定型心绞痛组、不稳定型心绞痛组和急性心肌梗死组血清标本各 50 例。疾病组患者排除以下情况: 合并周围血管疾病或周围血管栓塞性疾病者; 脑卒中、严重的肝肾功能不全、糖尿病等患者; 合并感染性疾病患者; 高热、恶性肿瘤、风湿活动、红斑狼疮(SLE)、组织损伤以及应用炎症抑制药物等患者。

* 基金项目: 贵阳市科技局社会发展领域科技攻关项目([2010]筑科农合同字第 1-社-35 号); 贵州省卫生厅立项资助项目[Gzwlj2009-1-007]。

1.2 主要试剂与仪器 人 MMP-9、MPO、CD40L 和 t-PA 的酶联免疫吸附测定(ELISA)检测试剂盒(R&D 公司产品,批号分别为 CK-E11105H、CK-E11082H、CK-E10118H 和 CK-E11529H),BD Array 流式细胞仪,酶标仪和洗板机(均为北京普朗公司产品)等。

1.3 方法 采用棋盘法^[8],根据荧光素(PE)的平均荧光强度 MFI 选择最适的生物素标记抗体的工作浓度、加入二抗的免疫反应时间及加入 PE 标记的亲本素孵育时间等试验条件。以羧基化微球标记的不同的荧光素为定性基础,按优化的试验条件选择实验参数,照仪器说明书操作,即建立了流式微球联合检测 MMP-9、MPO、CD40L 和 t-PA 的分析技术,即可对待检血清标本进行检测。同时用 MMP-9、MPO、CD40L 和 t-PA 的 ELISA 法检测试剂盒对血清标本进行检测。

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行统计学数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验。采用受试者工作特征曲线(ROC),计算曲线下面积(AUC),评价各指标。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 健康对照组及疾病组血清中 MMP-9、MPO、CD40L 和 t-PA 检测结果 运用自建 CBA 方法对健康对照组及冠心病不同疾病组血清中 MMP-9、MPO、CD40L 和 t-PA 进行检测,结果见表 1。通过统计软件对健康对照组、稳定型心绞痛组、不稳定型心绞痛组、急性心肌梗死组血清中 MMP-9、MPO、CD40L 和 t-PA 水平进行 *t* 检验,差异有统计学意义($P < 0.01$)。同时,对血清中 MMP-9、MPO、CD40L 和 t-PA 之间进

行 Spearman 相关分析显示,各标志物之间存在正相关,并且其水平均与急性冠状动脉综合症的诊断呈正相关。

2.2 自建 CBA 技术与 ELISA 法检测结果比较 对 80 份冠心病患者血清标本同时分别用自建 CBA 法和 ELISA 法进行检测,结果见表 2。对检测数据采用配对 *t* 检验,两种方法检测结果比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.3 自建 CBA 技术联合检测 MMP-9、MPO、CD40L 和 t-PA 对冠心病诊断效能评价 采用 SPSS13.0 软件,得出 CBA 技术联合检测 MMP-9、MPO、CD40L 和 t-PA 的 ROC 曲线如图 1。ROC 曲线 AUC 分别为 0.904、0.914、0.930 和 0.912($P < 0.01$),说明血清 MMP-9、MPO、CD40L 和 t-PA 水平用于诊断急性冠状动脉综合症有显著意义。血清中 IL-6、TNF- α 和 MCP-1 水平用于诊断冠心病有显著意义。根据 ROC 曲线,得出 MMP-9、MPO、CD40L 和 t-PA 用于诊断急性冠状动脉综合症的 cut-off 值分别为 15.36、9.92、18.94、12.12 ng/mL。其他各项参数见表 3。

表 1 自建 CBA 法检测各组标本中 MMP-9、MPO、CD40L 和 t-PA 结果比较 (ng/mL, $n=50$)

组别	MMP-9	MPO	CD40L	t-PA
健康对照组	4.42 \pm 1.89	6.45 \pm 2.20	9.95 \pm 0.96	7.91 \pm 3.40
稳定型心绞痛组	11.18 \pm 4.30	12.00 \pm 8.89	14.50 \pm 5.75	9.59 \pm 2.13
不稳定型心绞痛组	22.31 \pm 5.34	15.80 \pm 3.60	20.31 \pm 1.70	12.03 \pm 3.70
心肌梗死组	36.56 \pm 1.68	28.00 \pm 3.65	27.90 \pm 4.55	20.72 \pm 4.78

表 2 自建 CBA 法和 ELISA 法检测 MMP-9、MPO、CD40L 和 t-PA 结果比较 (ng/mL, $n=80$)

方法	MMP-9	MPO	CD40L	t-PA
流式微球联合检测法	9.91 \pm 4.38*	15.48 \pm 9.38*	72.19 \pm 4.11*	12.51 \pm 4.56*
ELISA 法	9.76 \pm 4.18	15.52 \pm 9.41	73.82 \pm 4.16	11.96 \pm 2.32

*: $P > 0.05$, 与 ELISA 法组数据比较。

表 3 MMP-9、MPO、CD40L 和 t-PA 在急性冠状动脉综合症诊断中的性能参数

项目	灵敏度(%)	特异性(%)	阳性似然比	阴性似然比	阳性预测值	阴性预测值	Youden 指数
MMP-9	86.80	80.44	4.32	0.18	0.90	0.74	0.66
MPO	83.43	84.62	5.19	0.20	0.91	0.71	0.67
CD40L	86.27	84.86	5.38	0.17	0.92	0.78	0.70
t-PA	88.58	78.27	4.05	0.15	0.89	0.77	0.66

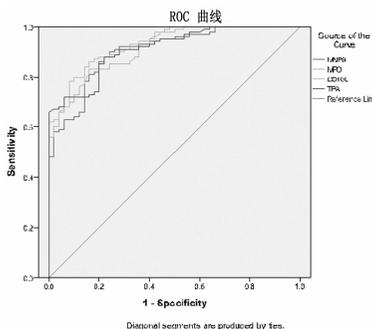


图 1 MMP-9、MPO、CD40L 和 t-PA 诊断急性冠状动脉综合症的 ROC 曲线图

3 讨论

ACS 的主要病理基础是斑块不稳定、破裂及其触发的血栓形成。目前,有效可行的识别易损斑块的方法不多,冠状动

脉内造影、冠状动脉内血管镜等有创检查费用高、难度大,临床应用受到限制,而临床症状、心电图及常规的实验室检查又不能很好地预测 ACS 患者的预后,因此,探讨识别动脉粥样硬化斑块稳定性的血清检测指标,用于 ACS 患者的危险分层及预后评估,依此而拟定早期最佳治疗方案就显得尤为重要。易损斑块的破裂及血栓形成是 ACS 的中心启动环节, MMP-9、MPO、CD40L 和 t-PA 等都与之密切相关。

MMP-9 在冠脉斑块破裂区域表达增强,通过降解斑块纤维帽内细胞外基质的主要成分——胶原蛋白和弹性蛋白而削弱纤维帽促进斑块破裂^[9]; MPO 有促进动脉粥样硬化形成的作用,并能通过多种机制影响粥样斑块的稳定性,成为新的预测急性冠脉综合症的标志物^[10-11]。CD40 配体是一类膜蛋白,它参与细胞内外的信号转导,在血小板、炎症和血栓形成与动脉粥样硬化之间的联系中起了很关键的作用^[12]; t-PA 是反映体内纤溶活性的重要指标,能激活纤溶酶原,降解细胞周围基质所构成的细胞支架,促使血管平滑肌细胞增殖和迁移,使血

管内膜增厚,促进动脉粥样硬化^[13]。在动脉粥样硬化斑块破裂标志物的检验中,方法较多,常用的有 ELISA、放射免疫试验、免疫比浊等^[14]。ELISA 法影响因素较多,而且存在着标准化问题^[14]。放射免疫法由于存在放射性污染问题,在临床上的应用也逐渐减少。免疫比浊法对抗体和增浊剂的质量要求很高,试剂和仪器较昂贵^[15]。近年来,流式细胞分析仪在临床不断普及,拓展流式细胞分析技术,延伸流式细胞仪应用领域,有着非常重要的意义。为此,本文建立的 MMP-9、MPO、CD40L 和 t-PA 的联合检测方法,具有检测速度快、采集数据量大、分析全面、方法灵活等特点,可实现多参数分析,大大降低成本。经对临床标本检测应用,结果显示,健康对照组、稳定型心绞痛组、不稳定型心绞痛组、急性心肌梗死组血清中 MMP-9、MPO、CD40L 和 t-PA 水平两两比较差异有统计学意义($P<0.05$),对冠心病的诊断、分层和疗效评价具有一定的意义,与 ELISA 法检测无差异。各标志物的诊断灵敏度、特异性、阳性似然比、阳性预测值、阴性预测值和 Youden 指数等指标均较为满意,值得在临床上推广使用。

参考文献:

- [1] 王继贵. 急性冠脉综合征生物标志物研究的进展[J]. 实验与检验医学, 2009, 27(5): 514-516.
- [2] 陈力量, 王守力. 急性冠脉综合征患者血清基质金属蛋白酶-2、-9 水平及其临床意义[J]. 安徽医学, 2010, 31(9): 1087-1089.
- [3] Hojo Y, Ikeda U, Takahashi M, et al. Increased levels of monocyte related cytokines in patients with unstable angina[J]. Atherosclerosis, 2002, 161(2): 403-408.
- [4] Aukrust P, Damas JK, Solum NO. Soluble CD40 ligand and platelets; self-perpetuating pathogenic loop in thrombosis and inflammation[J]. J Am Coll Cardiol, 2004, 43(12): 2326-2328.
- [5] 黄山, 许健, 令狐颖, 等. 心脏标志物新分类概述[J]. 吉林

医学, 2010, 31(16): 2559-2561.

- [6] 牟颖, 金钦汉. 荧光编码微球-流式细胞和生化分析及其最新发展[J]. 生命科学仪器, 2003, 1(1): 31-36.
- [7] Vignali DAA. Multiplexed particle-based flow cytometric assays[J]. J Immunol Methods, 2000, 243: 243-255.
- [8] 吴晓巍, 金涌, 田世民, 等. 玉米内州萎焉病菌免疫学检测方法的建立[J]. 微生物学通报, 2010, 37(6): 929-934.
- [9] Pifarre R, Scanlon P. Evidence based management of the acute coronary syndrome [M]. Philadelphia Hanley & Belfus Inc, 2001: 401-452.
- [10] 欧阳茂, 杨侃, 张梦玺, 等. 血浆髓过氧化物酶在急性冠脉综合征中的临床意义[J]. 中南大学学报, 2006, 31(6): 901-905.
- [11] Cavusoglu E, Ruwende C, Eng C, et al. Usefulness of baseline plasma myeloperoxidase levels as an independent predictor of myocardial infarction at two years in patients presenting with acute coronary syndrome[J]. Am J Cardiol, 2007, 99(10): 1364-1368.
- [12] 杨兆颖, 李金梁, 刘文娟, 等. CHD 患者血清可溶性 CD40L 检测的临床意义[J]. 放射免疫学杂志, 2011, 24(2): 163-165.
- [13] Steins MB, Padro T, Li CX, et al. Overexpression of tissue-type plasminogen activator in atherosclerotic human coronary arteries[J]. Atherosclerosis, 1999, 145: 173-180.
- [14] 黄山, 郑金鼎. 流式微球分析技术检测人心肌钙蛋白 T 方法的建立[J]. 中国实验诊断学, 2011, 15(4): 659-661.
- [15] 田禾, 黄山, 许健. 流式微球分析技术检测人心肌钙蛋白 T 的方法学性能评价[J]. 贵州医药, 2010, 34(9): 771-773.

(收稿日期: 2011-10-09 修回日期: 2011-11-18)

(上接第 210 页)

- 例报道[J]. 时珍国医国药, 2001, 12(7): 646-646.
- [2] 张文华. 交泰丸治疗室性早搏 68 例[J]. 广西中医药, 1994, 17(1): 7-9.
- [3] 龚彪, 李长清, 黄剑. SD 大鼠线栓法局灶性脑缺血/再灌注模型的改进[J]. 重庆医学, 2006, 35(4): 313-315.
- [4] 周文泉, 于向东. 关于血管性痴呆研究的思考[J]. 中医杂志, 2002, 43(4): 299-301.
- [5] 蔺心敬, 胡常林, 李正国, 等. 血管性痴呆大鼠模型海马乙酰胆碱和血小板激活因子含量变化的动态观察[J]. 中风与神经疾病杂志, 2002, 19(4): 219-221.
- [6] 许吉生, 李志军, 刘慧英, 等. 盐酸多奈哌齐治疗血管性痴呆的临床疗效观察[J]. 中国老年保健医学, 2008, 6(1): 31-33.
- [7] 张振馨, Zahner GE, Roman GC, 等. 中国北京、西安、上海和成都地区痴呆亚型患病率的研究[J]. 中国现代神经疾病杂志, 2005, 5(3): 156-157.
- [8] 朱江. 尼莫地平结合醒脑胶囊治疗血管性痴呆 54 例临床观察[J]. 广东医学院学报, 2005, 23(2): 152-154.
- [9] 张美增, 谢安木, 章政. 老年神经病学[M]. 北京: 科学技术出版社, 2007: 57-61.

- [10] Schneider LS, Olin JT. Overview of clinical trials of hydroxyzine in dementia[J]. Arch Neurol, 1994, 51: 787-798.
- [11] 谢建平, 吴承龙, 孙新芳. 安理申联合克林澳治疗早期血管性痴呆的临床研究[J]. 重庆医学, 2008, 37(4): 498-500.
- [12] Grantham C, Geerts H. The rationale behind cholinergic drug treatment for dementia related to cerebrovascular disease[J]. Neurol Sci, 2002, 203(1): 131-136.
- [13] Jia JP, Jia JM, Zhou WD, et al. Differential acetyl choline and choline concentrations in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease and vascular dementia [J]. Chin Med J, 2004, 117(8): 1161-1164.
- [14] 贾健民, 贾健平, 申玉, 等. 用 Morris 全自动水迷宫评价 Sprague-Dawley 鼠全脑反复缺血后学习记忆功能研究[J]. 卒中与神经疾病, 2002, 9(1): 21-23.
- [15] 吕佩源, 王天俊, 王贺波, 等. 盐酸多奈哌齐对血管性痴呆小鼠学习和记忆能力的影响[J]. 脑与神经疾病杂志, 2009, 17(5): 335-338.

(收稿日期: 2011-07-23 修回日期: 2011-09-22)