

酶联免疫吸附检测鼻咽癌方法的建立^①

张昌卿¹ 肖锡宾¹ 李经略¹ 黄宝珍² 孙 韵¹ 冯凯涛¹ 叶永照¹

(中山医科大学 1 肿瘤医院 2 肿瘤研究所; 广州, 510060)

摘要 目的: 探讨检测鼻咽癌的酶联免疫吸附(ELISA)方法。方法: 以正丁酸和巴豆油诱导 Raji 细胞表达的 EB 病毒早期蛋白为抗原, 用 ELISA 方法检测血清中抗 EB 病毒相关早期蛋白的 IgG 抗体水平(吸光度 A_{490})。其中鼻咽癌 454 例, 肝癌 40 例, 肺癌 23 例, 肠癌 20 例, 乳腺癌 23 例, 卵巢癌 16 例, 头颈肿瘤 15 例和健康人 524 例。结果: 在所有被检血清中鼻咽癌血清 A 值最高(0.333 ± 0.100), ($P < 0.001$)。以正常人 95% 特异性 $A_{490} < 0.18$ 为界, ELISA 方法诊断鼻咽癌的敏感性为 89% (405/454) 特异性为 94% (493/524)。结论: 用来自 Raji 细胞内的 EB 病毒早期蛋白为抗原建立的 ELISA 方法可以应用于鼻咽癌的血清学诊断。

关键词 鼻咽肿瘤/诊断; 酶联免疫吸附测定/方法; 抗原, 病毒, 肿瘤/诊断应用; 疱疹病毒 4 型, 人

中图分类号 R 739.6 373

THE ESTABLISHMENT OF ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY(ELISA) FOR THE DETECTION OF NASOPHARYNGEAL CARCINOMA(NPC)

Zhang Changqing¹ Xiao Xibin¹ Li Jinglue¹ Huang Baozhen²
Sun Yun¹ Fong Kaitao¹ Ye Yongzhao¹

(Sun Yat-sen University of Medical Sciences 1 Cancer Hospital 2 Cancer Institute, Guangzhou, 510060)

Abstract Objective: To establish ELISA for the detection of NPC. **Methods:** With EB virus early proteins antigen expressed in Raji cells induced by croton oil and n-butyric acid as test antigen (Raji EA⁺) in ELISA, sera collected from NPC (454 cases), liver cancer (40 cases), lung cancer (23 cases) colorectal cancer (20 cases), breast cancer (23 cases) ovarian cancer (16 cases), carcinomas of the head and neck (15 cases) and healthy individuals (524 cases) were tested for the levels (A_{490}) of IgG antibody to Raji EA⁺ antigen by ELISA. **Results:** The level (A_{490}) of IgG antibody to Raji EA⁺ antigen in NPC sera group was 0.333 ± 0.100 ($\bar{x} \pm s$), the highest one above the 8 sera groups tested ($P < 0.001$). Using $A_{490} \geq 0.18$ as NPC positive threshold, the diagnostic specificity and sensitivity to NPC were 94% (493/524) and 89% (405/454). **Conclusion:** The EB virus early protein antigens from induced Raji cells could be used in ELISA for the detection of NPC serologically.

Subject headings nasopharyngeal neoplasms/diagnosis; enzyme-linked immunosorbent assay/methods; antigens, viral, tumor/diagnostic use, herpes virus 4, human

酶联免疫吸附方法(ELISA)是一种广泛用于临床血清学检测的常规方法, 它除了具有快速, 灵敏、数据重复性好等优点外, 还可在电脑控制下使操作/数据处理自动化。鼻咽癌(NPC)患者血清内含有抗 EB 病毒(EBV)相关抗原的抗体, 长期以

来, 测定这些抗体的方法是免疫酶/免疫荧光染色法和利用同位素的酶中和率法^[1]。1991 年 Edward 等曾以基因工程制备的 EB 病毒基因编码蛋白(膜蛋白 gp 340/220, 胸腺激酶 TK 和 DNA 酶)为抗原, 建立了测定鼻咽癌的 ELISA 方法^[2],

该方法至今未能应用于临床。最近有报道采用重组抗原的方法检测 NPC 血清中的 EBV 特异 TK^[3], DNA 酶抗体^[4], 也只限于实验室 Western blot 检测, 而未能应用于 ELISA 中。其主要原因是抗原制备提纯复杂, 获取量微, 难于达到 ELISA 测定的需要。因此, 探讨从其它途径获取 EBV 抗原, 建立适于临床应用的 ELISA 方法有着相当的现实意义。我们利用诱导 Raji 细胞后所产生的 EB 病毒早期复合抗原建立了检测鼻咽癌的 ELISA 方法, 结果满意, 现报道如下。

1 材料和方法

1.1 检测 EB 病毒早期抗原(EA) IgG 抗体的 ELISA 方法

根据黄迪等报道的方法^[5], 用巴豆油和正丁酸盐联合诱导 EB 病毒基因组阳性的 Raji 细胞, 使其表达 EA。将诱导后细胞 $10^{10}/L$ 悬浮在 PBS 中, 超声粉碎, $10\ 000G$ 离心, 取上清, 测蛋白含量即为 Raji EA 阳性(EA⁺)抗原。同法制备未经诱导的 Raji EA 阴性(EA⁻)抗原作为对照。用间接 ELISA 测定抗体的方法^[6], 进行被测血清稀释度和最适抗原浓度的方阵滴定: 将对倍稀释的 EA⁺ 抗原 $50\ \mu L$ /孔包被酶标反应软板(天津有机玻璃厂生产) $4\ ^\circ C$ 过夜, 10% 小牛血清 PBS 封闭反应孔后, 用 $1:5$ 开始对倍稀释的鼻咽癌混合血清(EBV-IgA/EA 滴度 $\geq 1:160$ 10 例, 本实验室提供)和健康人混合血清(10 例健康人), $50\ \mu L$ /孔为一抗; $1:1\ 000$ 稀释 $50\ \mu L$ /孔的辣根过氧化物酶标记羊抗人 IgG 为二抗。(购自 Dako 公司) H_2O_2 一邻苯二胺显色后, $0.2\ mmol/L$ 硫酸终止反应。用酶标仪在 $490/630\ nm$ 波长下扫描。以每 3 个复孔的平均吸光度 A 值作为血清所含抗 EA IgG 抗体(IgG/EA)的相对水平。以最高 P/N(病人 A 值/健康人 A 值)比确定血清样本与抗原的最佳反应浓度。

1.2 ELISA 方法检测鼻咽癌的临床考核

收集 454 份 EBV-IgA/VCA 抗体滴度为 $1:20 \sim 1:1\ 280$ 的鼻咽癌血清, 524 份 30~60 岁健康人体检血清作为临床考核用的血清组。置 $-20\ ^\circ C$ 冻存以备 ELISA 检测。根据健康人单测 95% 特异性 K 值求出 A 值上限作为血清阳性标准, 判定该法在临床血清组中的特异性和敏感性。

1.3 ELISA 方法检测常见肿瘤血清对 EA⁺ 抗原的反应

收集临床常见肿瘤血清, 肝癌 40 例、肺癌 23 例、肠癌 20 例、乳腺癌 23 例、卵巢癌 16 例、头颈肿瘤 15 例与上述的鼻咽癌血清和健康人血清, 分别与 EA⁺ 抗原进行 ELISA 反应, 比较各肿瘤血清 A 值, 与鼻咽癌血清 A 值间的差异, 以及各肿瘤血清 A 均值与健康人血清 A 均值之比(\bar{x}_P/\bar{x}_N)。

1.4 统计学处理

ELISA 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以 *t* 检验比较数据间差异。

2 结果

2.1 EA⁺ 抗原与血清的最适 ELISA 反应浓度

在二抗浓度为 $1:1\ 000$ 的条件下, 经方阵测定, 将肉眼所见阳性(病人)、阴性(健康者)对比最明显的孔所对应的 A 值列出。获得病人(P)血清和健康人(N)血清的 A 比值(P/N), 本实验以 $3.5(0.353/0.102)$ 为最高, 其相应的 EA⁺ 抗原浓度为 $90\ ng/L$, 血清稀释度为 $1:10$ 。

2.2 血清组对 EA⁺ 抗原的 ELISA 反应

鼻咽癌血清对诱导前后的 Raji 细胞抗原反应性有显著差异($P < 0.001$), 健康人血清则无此差异($P > 0.05$), 见表 1。

表 1 血清组对 Raji 细胞 EA 抗原的 ELISA 反应

Table 1 The reaction of the serum panel to Raji EA antigen by ELISA

Sera	(n)	$A_{490nm}(\bar{x} \pm s)$		t	P
		Raji EA ⁺	Raji EA ⁻		
NPC	454	0.333 ± 0.100	0.126 ± 0.035	41.6	< 0.001
healthy individuals	524	0.104 ± 0.044	0.108 ± 0.060	1.23	> 0.05
\bar{x}_P/\bar{x}_N		3.2	1.2		

Raji EA: EB-Virus associated early antigen expressed in Raji cells.
NPC: nasopharyngeal carcinoma, \bar{x}_P : average A_{490} value of sera from NPC, \bar{x}_N : average A_{490} value of sera from healthy individuals

2.3 ELISA 方法检测鼻咽癌的临床考核

根据表 1 中健康人血清对 EA⁺ 抗原反应的 A 值, 求得健康人单测 95% 特异性 K 值的 A 上限为 $A=0.18$, 以此为标准, 该 ELISA 系统对临床血清组诊断的敏感性为 89%(405/454), 特异性为 94%(493/524), 临床符合率 92%(898/978), 见表 2。

表2 ELISA方法检测鼻咽癌的结果
Table 2 The results of ELISA for detection of NPC n (%)

Sera		$A_{490\text{nm}} \geq 0.18$		Sensitivity	Specificity
		+	-		
NPC	454	405	49	405/454(89)	—
healthy individuals	524	31	493	—	493/524(94)

2.4 常见肿瘤患者血清对EA⁺抗原的ELISA反应
各常见肿瘤血清ELISA反应的A值均低于鼻咽癌血清($P < 0.001$), 它们的A均值与健康人血

清A均值之比(\bar{x}_P / \bar{x}_N)在0.75~1.40范围, 低于2.1, 见表3。

表3 常见肿瘤血清对EA⁺抗原的ELISA反应
Table 3 Reaction of the sera collected from some common tumors to EA⁺ antigen by ELISA

Sera	Case (n)	$A_{490\text{nm}}$ ($\bar{x} \pm s$)	\bar{x}_P / \bar{x}_N	t	P
NPC	454	0.333 ± 0.100	3.2	—	—
Liver cancer	40	0.119 ± 0.047	1.14	13.39	< 0.001
Lung cancer	23	0.110 ± 0.039	1.05	10.65	< 0.001
Colorectal cancer	20	0.078 ± 0.027	0.75	11.38	< 0.001
Breast cancer	23	0.125 ± 0.051	1.20	9.90	< 0.001
Ovarian cancer	16	0.146 ± 0.042	1.40	7.45	< 0.001
Carcinomas of head and neck	15	0.114 ± 0.065	1.096	8.42	< 0.001
healthy individuals	524	0.104 ± 0.044	—	41.6	< 0.01

\bar{x}_P : average $A_{490\text{nm}}$ value of sera from tumor patients; \bar{x}_N : average $A_{490\text{nm}}$ value of sera from healthy individuals; t : the comparison of $A_{490\text{nm}}$ value between NPC sera and other sera

3 讨论

以基因工程制备EB病毒编码蛋白作为ELISA抗原的工作涉及分子生物学、细胞学和免疫学技术, 而用Raji细胞诱导产物制备的EB病毒EA⁺抗原不涉及分子生物学技术, 相比之下后者更为简便和经济。

利用Raji细胞诱导后的产物先后建立了检测血清IgA/EA的免疫酶染色方法^[7]和检测EBV特异DNA酶抗体的酶中和率法。我们将Raji EA⁺和EA⁻抗原应用于ELISA方法检测临床血清组, 发现鼻咽癌患者血清对EA⁺抗原的A值显著高于EA⁻抗原($P < 0.001$), 而健康人血清没有这种差异($P > 0.05$), 说明鼻咽癌患者血清与EA抗原的反应在ELISA方法上也可以重复(见表1)。以吸光度 $A \geq 0.18$ 为阳性标准, 用血清组评价以EA⁺抗原建立的ELISA系统发现, 该系统诊断鼻咽癌

的敏感性为89%, 特异性为94%, 临床符合率为92%, 达到了目前检测鼻咽癌的常规方法EBV-IgA/VCA抗体测定的敏感性(81.5%)和特异性(94%)水平^[8]。用该ELISA系统测定其它肿瘤患者血清, 它们的A值显著低于鼻咽癌血清的A值($P < 0.001$)(表3)。以常规ELISA检测所惯用的P/N值 ≥ 2.1 为诊断标准, 在众多肿瘤中只有鼻咽癌血清与正常人血清的P/N值达到诊断水平($\bar{x}_P / \bar{x}_N = 3.2$)(表3), 提示该ELISA方法只对诊断鼻咽癌才有应用价值。

Raji细胞是一种永生化的带EB病毒基因组的肿瘤细胞株, 在重组EB病毒蛋白尚未能商品化普及前, 凡具有细胞培养条件的实验室都可以建立这一简单而有效的诊断鼻咽癌的ELISA方法。最近我们利用该方法完成了6千多人的鼻咽癌血清筛查工作, 取得了很好的效果。该方法的建立也为今后鼻咽癌血清学检测操作及数据分析的自动化创造了条件。

参 考 文 献

- 1 陈海峰, 黄 迪. 鼻咽癌患者血清中 Epstein-Barr 病毒特异性 DNA 酶抗体检测方法的探讨. 生物化学杂志, 1989, 5(2): 131
- 2 Edward L, Sally A B, Zeng Y L, *et al*. Diagnosis of nasopharyngeal carcinoma by means of recombinant Epstein-Barr virus Proteins. *Lancet*, 1991, 337: 685
- 3 陈尚武, 黄 迪, 马润泉. 应用重组抗原检测鼻咽癌血清 EBV-TK 抗体. 中山医科大学学报, 1997, 18(3): 237
- 4 朱振宇, 黄 迪, 陈瑞君, 等. 重组 EB 病毒 DNA 酶的生

物学特性及其应用的初步研究. 中山医科大学学报, 1997, 18(3): 171

- 5 黄 迪, 郑美连, 罗慧玲, 等. 巴豆油正丁酸对 Raji 细胞的联合诱导作用. 生物化学杂志, 1986, 2(3): 21
- 6 郑怀竟, 韩 松. 临床检验 ELISA 指南. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1994, 15~17
- 7 刘育希, 曾 毅, 董温平, 等. 应用免疫酶法检测鼻咽癌病人免疫球蛋白 A 和抗体 A. 中华肿瘤杂志, 1979, 1(2): 8
- 8 曾 毅. EB 病毒与鼻咽癌. 见区宝祥, 曾 毅主编. 鼻咽癌病因和发病学的研究. 北京: 人民卫生出版社, 1985. 14~15

(1997-10-05 收稿 1998-05-11 修回)

(上接第 192 页)

未能激活机体产生类似风湿热的自身免疫反应^[7]; 而急性肾炎主要与链球菌 M 蛋白有关^[8]。ASP 不参与其发病。故 ASP 不升高。这与 Appleton 等^[5] 观察结果一致。说明 ASP 并非在所有链球菌感染均升高, 而只在风湿性心瓣膜炎患者才升高。

我们将 ASP 与 ASO 进行了比较, 发现 ASP 的阳性率明显高于 ASO, 在 ASO 正常的患者 ASP 亦有增高, 说明 ASP 较 ASO 能更敏感地反映链球菌感染后的免疫反应。ASP 的特异度为 84%, 敏感度为 87%。表明 ASP 对风湿性心瓣膜炎具有一定的特异性意义。

参 考 文 献

- 1 Committee report. Guidelines for the diagnosis of rheumatic fever, Jones Criteria, 1992 update. *JAMA*, 1992, 268(15): 2069
- 2 彭朝权, 余步云, 陈国庆, 等. A 群溶血性链球菌壁多糖抗体的检测方法. 中华微生物学和免疫学杂志, 1996, 16(5): 339
- 3 Loizou S, Mccrea J D, Rudge A C, *et al*. Measurement of anti-cardiolipin antibodies by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): standardization and

quantitation of results. *Clin Exp Immunol*, 1985, 62(6): 738

- 4 Goldstein I, Halpern B, Robert L. Immunological relationship between streptococcus A polysaccharide and the structural glycoproteins of heart valve. *Nature*, 1967, 1(7): 44
- 5 Appleton R S, Victorica B E, Tamer D, *et al*. Specificity of persistence of antibody to the streptococcal group A carbohydrate in rheumatic valvular heart disease. *J Lab Clin Med*, 1985, 105(1): 114
- 6 Benslimane A, Veyseyre C, Rotta J, *et al*. Streptococcal group A polysaccharide antibodies in rabbit hyperimmune sera; normal levels in man and comparison with levels in patients with rheumatic fever and with poststreptococcal glomerulonephritis. *Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg*, 1986, 262(3): 385
- 7 Senitzer D, Freimer E H. Autoimmune mechanisms in the pathogenesis of rheumatic fever. *Rev Infect Dis*, 1984, 6(6): 832
- 8 Denny F W. The mystery of acute rheumatic fever and poststreptococcal glomerulonephritis. *J Lab Clin Med*, 1986, 108(6): 523

(1997-04-24 收稿 1997-11-05 修回)