

括高血压、糖尿病、肾小球肾炎、尿酸等,需要更深入地研究去证实运动 BPV 对早期肾功能的影响^[12]。

血压变异为什么会引起靶器官的损害呢?一些动物实验中发现,BPV 增大可能导致的靶器官损害的机制可能对我们有帮助:①BPV 增高的直接损伤作用,表现为对组织的灌注时高时低,并造成血管内皮细胞的损伤;②体液系统被激活,其中肾素血管紧张素系统(RAS)最为重要;③心肌细胞凋亡增加;④炎症反应。以上机制需在人的研究中进一步证实。

本实验中高血压组与对照组舒张压无明显变化且两组间无显著差异,因为运动时交感神经兴奋,心肌收缩力增强,心率增快,全身血液重新分布,导致收缩压升高,舒张压不变或稍下降。由于实验者运动量基本相同,且有活动平板试验为基础,故运动血压变异性测量值准确且不易变动,而 24h 动态血压变异性受活动量、情绪、睡眠等诸多因素影响,变动较大,故运动血压变异性可能是反应早期动脉硬化及靶器官损害的一个比较可靠的指标。

参考文献

- 1 Otsuka K, Cornelissen G, Halberg F, *et al.* Excessive circadian amplitude of blood pressure increases risk of ischaemic stroke and nephropathy[J]. *J Med Eng Technol*, 1997, 21:23 - 30
- 2 Veerman DP, De Blok K, van Montfrans A. Relationship of steady state and ambulatory blood pressure variability to left ventricular mass and urinary albumin excretion in essential hypertension[J]. *Am J Hypertens*, 1996, 9:455 - 460
- 3 Uusitalo AL, Laitinen T, Väisänen SB. Physical training and heart

- rate and blood pressure variability: a 5 - yr randomized trial[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004, 286(5):H1821 - 1826
- 4 谭静,华琦,闻静,等. 高血压患者脉搏波速与心血管疾病危险因素[J]. *中华高血压杂志*, 2007, 15(10):807 - 811
- 5 Asmar R, Rudnichi A, Blacher J, *et al.* Pulse pressure and aortic pulse wave are markers of cardiovascular risk in hypertensive populations[J]. *Am J Hypertens*, 2001, 14(3):91 - 97
- 6 Diedrich A, Jordon J, Tank J, *et al.* The sympathetic nervous system in hypertension: assessment by blood pressure variability and ganglionic blockade[J]. *Hypertens*, 2003 Sep, 21(9):1677 - 1686
- 7 Julien C. Baroreflex control of sympathetic nerve activity and blood pressure variability[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2008, 35(4):512 - 515
- 8 Erdogan D, Caliskan M, Yildirim I, *et al.* Effects of normol blood pressure, prehypertension and hypertension on left ventricular diastolic function and aortic elastic properties[J]. *Blood Press*, 2007, 16(2):114 - 121
- 9 Mancica G, Parati G, Henning M, *et al.* Relation between blood pressure variability and carotid artery damage in hypertension: baseline data from the European Lacidipine Study on Atherosclerosis (EISA) [J]. *J Hypertens*, 2001, 19(11):1981 - 1989
- 10 Tabas I, Williams KJ, Boren J. Subendothelial lipoproteins retention as the initiating process in atherosclerosis: update therapeutic implications[J]. *Circulation*, 2007, 116(16):1832 - 1844
- 11 沈丹,哈戴文,孔萍. 原发性高血压患者血尿 β_2 - MG、IgG、尿白蛋白的变化[J]. *高血压杂志*, 2002, 10(4):59 - 61
- 12 何森,陈晓平,蒋凌云,等. 中老年人血尿酸水平和早期肾功能损害的关系[J]. *中华医学杂志*, 2010, 90(17):658 - 661

(收稿:2011 - 06 - 26)

(修回:2011 - 07 - 27)

CMIA、FPIA 及 MS 在全血环孢霉素 A 浓度监测中的对比分析

谢服役 王 峰 吴巧萍

摘 要 目的 通过荧光偏振免疫法(FPIA)、化学发光微粒子法(CMIA)和质谱法(MS)对全血环孢霉素 A(CsA)谷浓度测定结果的比较,了解 3 种方法检测结果的差异,以便更加合理地选择 CsA 浓度监测方式。**方法** 采集分离 100 例肾移植术后患者稳态浓度的血浆样品,以 CMIA、FPIA 以及 MS 法测定 CsA 浓度,并对 3 种方法测定结果进行统计分析。**结果** FPIA 的线性范围在 0 ~ 800ng/ml,最低检测浓度为 43.0ng/ml,而 CMIA 法测定的线性范围在 0 ~ 1500ng/ml,最低检测浓度为 24.1ng/ml;3 种方法中,FPIA 法和 CMIA 法的检测结果与和 MS 的相关系数 r 分别为 0.96 和 0.97;FPIA 和 CMIA 法的检测结果均高于 MS($P < 0.01$),但相比 FPIA 法,CMIA 的测定值明显更低,两组数据差异具有统计学意义($P < 0.01$);Bland - Alman 一致性分析显示,CMIA 法的测定结果较 FPIA 法普遍偏低,平均偏差为 -76.5ng/ml。**结论** CMIA 相比 FPIA 法,灵敏度和特异度更高,是更为客观和理想的 CsA 血药浓度的检测方法,建议可推广入临床常规监测。

关键词 环孢霉素 A 荧光偏振免疫法(FPIA) 化学发光微粒子法(CMIA) 质谱法(MS)

Comparison of FPIA, CMIA or MS for Monitoring Concentration of CsA in Human Whole Blood. Xie Fuyi, Wang Feng, Wu Qiaoping.

Department of Laboratory Medicine, Lihuili Hospital, Zhejiang 351041, China

Abstract Objective To compare fluorescence polarization immunoassay (FPIA), chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA) or mass spectrometry (MS) for detecting concentration of CsA in whole blood in order to choose a more rational way for clinical drug monitoring. **Methods** We collected 100 cases of steady-state plasma samples and tested concentration of CsA by FPIA, CMIA or MS, then processed the obtained data by statistical analysis. **Results** Linear detection range of FPIA was 0–800 ng/ml and the minimum detectable concentration was 43.0 ng/ml, and the linear range of CMIA method was 0–1500 ng/ml, with minimum detectable concentration at 24.1 ng/ml. Correlation coefficient between FPIA or CMIA and MS was 0.96 and 0.97, respectively. One-way ANOVA analysis showed results obtained from FPIA and CMIA were higher than those from MS, while there was still significant difference between FPIA and CMIA ($P < 0.01$). Bland-Alman consistency analysis manifested CsA concentration tested by CMIA was generally lower, with an mean deviation of -76.5 ng/ml. **Conclusion** Compared to FPIA, CMIA is more sensitive and specific, therefore is a more objective and desirable method for clinical drug monitoring of CsA.

Key words Cyclosporin A; Fluorescence polarization immunoassay (FPIA); Chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA); Mass spectrometry (MS)

环孢霉素 A (CsA) 是从真菌 *Tolypocladium inflatum* 中提取, 由 11 个氨基酸组成的环状多肽, 是临床上使用最早最多的一种免疫抑制药。自 1972 年发现以来, 被广泛应用于肾移植、肝移植和骨髓移植术后免疫排斥反应^[1]。近年来 CsA 又被逐步推广应用到自身免疫疾病以及作为哮喘的预防治疗, 成为器官移植和免疫性疾病防治的里程碑式药物。但是由于 CsA 治疗窗狭窄, 生物利用度个体差异大, 其血药浓度与疗效及不良反应密切相关^[2,3]。为尽可能减少不良反应, 提供及时、准确、可靠的血药浓度检测结果, 指导临床 CsA 安全和有效用药, 不同试剂厂家推出了不同的方法来监测 CsA 浓度值。其中美国雅培制药公司先后推出基于 FPIA (荧光偏振免疫法) 的代表仪器 TDXFLEX 和 AxSYM; 以及最新推出的应用 CMIA (化学发光微粒子法) 原理的代表仪器 Architect 系列 I1000 和 I2000。本研究对 100 例服用环孢霉素 A 的肾移植术后患者静脉全血标本同时采用 AxSYM 和 Architect 以及 MS 质谱分析法进行检测, 并对结果作了统计和回归分析, 现报告如下。

材料与方法

1. 仪器: 荧光偏振免疫仪 AxSYM (美国雅培公司); 化学发光微粒子分析仪 Architect I1000 SRXSYM (美国雅培公司); 0412-1 型台式离心机 (上海手术器械厂); 旋涡混合器 (上海医科大学仪器厂); XH-1 型恒温水浴锅 (金坛市江南仪器厂); HS2060 型超声波清洗器; DGG-9123A 型电热恒温鼓风干燥箱 (上海森信实验仪器有限公司); 华凌 BCD-210@HC 冰箱。质谱分析由浙江大学农学院检测中心完成 (质谱型号: Agilent 1100 Series LC/MSD SL)。

2. 试剂盒: AxSYM 环孢霉素全血试剂盒; Architect 单克隆抗体全血环孢霉素试剂盒, 两种试剂盒均由美国雅培制药有

限公司 (Abbott) 提供。

3. 样本采集: 肾移植术后患者 100 例 (男性 62 例, 女性 38 例), 年龄 11~71 岁, 平均年龄 51.5 岁, 肾移植术后 1 周~6 年; 早上 8:00~9:00 抽取静脉血 2 ml, EDTA 抗凝, 1h 后进行全血 CsA 谷值检测。

4. 方法: (1) FPIA 检测: 1) 检测原理: FPIA 根据竞争结合法的原理, 即利用被测物质中被测对象所有的偏振光性进行荧光免疫分析的方法。荧光素 (FITC) 标记的低分子抗原和待测标本中 CsA 与体系中的 CsA 抗体发生竞争性结合反应, 样本中的抗原 CsA 越多, 与抗体结合的标记抗原就越少, 从而激发的荧光偏振光度也就越少, 从而可以预测样本中 CsA 的浓度。2) 标准曲线和 FPIA 法检测: 按照 Abbot 公司提供的 AxSYM 环孢霉素全血试剂盒说明, 进行血药 CsA 浓度测定, 具体为: 吸取被检全血标本 150 μ l, 放入离心管中, 加入 50 μ l 细胞溶解剂, 再加入 300 μ l CsA 蛋白沉淀剂, 充分振荡后, 10000g 离心 5 min, 取上清液用于检测。根据试剂盒说明, 在 AxSYM 仪器内进行测定。每次测定样品同时测定 CsA 质控。标准曲线: 分别吸取浓度为 0、40、100、200、400、800 ng/ml 的 CsA 标准品溶液各 2 份, 按说明操作制备标准曲线, 偏差值和均方根误差在可接受范围内时, 保存标准曲线。(2) CMIA 检测: 1) 检测原理: CMIA 采用两步双抗原夹心法, 以顺磁性微珠作为包被载体包被鼠 CsA 单克隆抗体后, 与标本中的 CsA 抗原结合, 加入吖啶酯标记的 CsA 抗原后, 在特定的磁场区发生沉积, 经反复洗涤使游离抗原或抗体与抗原抗体复合物分离, 加入预激发液 (H_2O_2) 与激发液 (NaOH) 后, 测定其激发光强度即可判别标本中的 CsA 浓度。2) 标准曲线和 CMIA 法检测: 制作标准曲线试剂盒中 A、B、C、D、E、F 6 个校准点, 当测定结果偏差值在可接受范围内时, 保存标准曲线。取被检全血标本 200 μ l, 放入离心管中, 加入 100 μ l 细胞溶解剂, 再加入 400 μ l CsA 蛋白沉淀剂, 充分振荡后, 10000g 离心 5 min, 取上清液用于测定。根据试剂盒说明, 测试在 Architect I1000SR 分析仪内进行。(3) MS 分析: 同上述方法, 取血清标本 1 份进

行 MS 分析,该部分实验委托浙江大学农学院检测中心进行。

5. 统计学方法:各组资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,并对 FPIA、CMIA 及 MS 法的检测结果间进行 *Passing - Bablock* 相关分析、*One - way ANOVA* 统计处理和 *Bland - Alman* 一致性分析, $P < 0.05$ 或 $P < 0.05$, 则认为有显著性差异; $P < 0.01$ 或 $P < 0.01$, 认为具有高度显著性差异。

结 果

1. FPIA 和 CMIA 法标准曲线:以 0、40、100、200、400、800ng/ml 的 CsA 标准品 (x) 对应的吸光值 (y) 做线性回归,采用 Spline 法拟合,当偏差值在可接受范围内时,保存标准曲线;高中低值质控液均由 Abbott 公司提供。FPIA 法测定的线性范围在 0 ~ 800ng/ml,最低检测浓度为 43ng/ml。同理制作 CMIA 法标准曲线,其测定的线性范围在 0 ~ 1500ng/ml,最低检测浓度为 24.1ng/ml;说明 CMIA 法的线性范围更广,测量灵敏度更高。

3. FPIA 及 CMIA 法与 MS 法测定结果的相关分析:分别记录 FPIA 及 CMIA 法与 MS 3 种方法检测的 CsA 浓度数据,以 MS 测得的结果为 y , FPIA 或 CMIA 的检测结果为 x ,进行 *Passing - Bablock* 线性回归,发现 FPIA 法所得的数据与 MS 结果间相关系数 $r = 0.96$;CMIA 法所得的数据与 MS 结果间相关系数 $r = 0.97$ (图 1);说明 3 种方法检测结果高度相关。

4. *One - way ANOVA* 比较 MS、CMIA 和 FPIA 法的测定结果:检测 100 例肾移植患者术后的血浆 CsA 浓度,并对 FPIA、CMIA 和 MS 法的检测结果进行 *one - way ANOVA* 统计分析,发现 FPIA 和 CMIA 法的检测结果均显著高于 MS,数据之间差异具有统计学意义 (图 1, $P < 0.01$);但较之 FPIA 法,CMIA 的测量值明显更低 (577.9 ± 32.6 vs 501.5 ± 35.8),提示 CMIA 法可能是更为客观的血药 CsA 浓度的评价方法。

5. FPIA 法与 CMIA 法检测结果的一致性分析:进一步对 FPIA 及 CMIA 法的检测结果进行 *Bland - Altman* 一致性分析,以两种方法测量的 CsA 浓度均值做横坐标,差值为纵坐标绘图。从图 2 中我们看到,95% 可信区间内,CMIA 相对 FPIA 的测量值偏差范围在 $-162.1 \sim 9.1$ ng/ml,平均偏差 -76.5 ng/ml。

讨 论

环孢霉素 A 开辟了器官移植和免疫性疾病治疗的崭新天地,其主要作用机制是通过抑制 IL-2 释放及 T 细胞增殖而直接抑制细胞介导的免疫应答^[4]。自 20 世纪 80 年代问世以来,虽然有众多药厂推出不同替代药,但 CsA 依旧是目前公认的抗器官移植排

斥反应最为有效的主要一线药物。

由于 CsA 有效治疗窗窄,加之个体生物利用度和药代动力学差异大,CsA 用量不足引起的移植后器官功能减退,或 CsA 过量使用导致的肝肾毒性、痢疾、高血压、高血脂和糖耐量异常等并发症,成为影响 CsA 疗效的重要因素。而不良反应的发生与 CsA 的血药浓度密切相关,其中,由于检测方法不同导致的 CsA 高估或者低测对药用剂量参考也有一定影响^[5,6]。本研究结果可见,FPIA 方法相比 MS,全血 CsA 浓度测量值明显偏高 ($P < 0.01$),这主要是由于 FPIA 法特异性不够高,无法排除代谢产物对其干扰,检测的 CsA 浓度包括原型药物、体内代谢产物甚至其他药物如红霉素、地尔硫卓等交叉反应,同时其线性范围浓度也只好 800ng/ml,最低检测浓度为 43ng/ml,应慎用于临床检测。理论上质谱仪方法是干扰最小、准确率最高的方法,但是不同的质谱测量,依旧会有差异,而且对于操作人员的要求较高,所花时间和成本不菲,对于临床使用来讲还有不少距离。

基于化学发光微粒子原理的 CMIA 法则是很大程度进步,通过两步免疫反应:顺磁珠微粒作为载体包被 CsA 抗体后与全血中的 CsA 结合,再与环孢霉素化学发光检测吖啶脂标记的偶联物反应,以发光粒子从激发态回到基态的激发强度作为 CsA 浓度的检测指标,灵敏度高,可检测到 < 25 ng/ml 的血药浓度;线性范围可达 1500ng/ml,对于部分术后 CsA 浓度可高到 2000ng/ml 病人,CMIA 法检测无疑优于 FPIA 法。与 MS 法检测结果相关系数为 0.97,表明两测量结果高度相关。但是由于 CMIA 法也有一步是基于抗体-抗原反应,除了采用单克隆抗体改善检测结果特异性外,与 FPIA 法相似,CMIA 法也可能存在部分交叉反应导致结果正偏高(与 MS 法相比, $P < 0.01$)。但是,对 FPIA 和 CMIA 法的检测结果进行统计分析,发现较之 FPIA 法,CMIA 的测量值明显更低 (577.9 ± 32.6 vs 501.5 ± 35.8),两组数据之间差异具有统计学意义 (图 1, $P < 0.01$)。进一步对两种方法的检测结果进行 *Bland - Altman* 一致性分析显示,95% 置信区间内,CMIA 相对 FPIA 的测量值平均偏差为 -76.5 ng/ml,而 CMIA 和 FPIA 法与 MS 的测量平均偏差值分别为 $+173.6$ ng/ml 和 $+250.1$ ng/ml,说明 CMIA 法的检测结果较 FPIA 法特异性更高,能更好地排除代谢产物或其他物质对检测的干扰使结果更接近真实值,因此,是更为合适的临床 CsA 浓度监测方法。

(下转第 165 页)

表 3 COX-2、VEGF 及 TGF-β₁ 在甲状腺癌中表达的相关性

VEGF	COX-2		合计	TGF-β ₁		合计
	+	-		+	-	
+	50	4	54	49	5	54
-	6	15	21	2	19	21
合计	56	19	75	51	24	75

表达,而在甲状腺癌组织中表达显著调高,阳性率为 74.67%,在有转移的病变组织中的表达显著高于无转移的组织,在病理分期 T₁、T₂、T₃、T₄ 期的阳性率分别 63.33%、80.77%、91.67%、100%,随肿瘤的进展而增强呈正相关,且在分析了 COX-2 与 VEGF 的表达后发现两者呈正相关。提示 COX-2 在甲状腺癌组织中过表达,对肿瘤的生长、血管生成、转移起到促进的作用,其表达的阳性率随肿瘤的侵袭和转移密切相关,可以成为甲状腺癌预防和治疗的靶点。

TGF-β₁ 是一种对细胞增殖和分化具有双向调节作用的转化生长因子,对正常细胞具有普遍的抑制生长效应,而肿瘤细胞分泌的 TGF-β₁ 则有助于肿瘤逃避机体的免疫监视,抑制免疫系统对肿瘤的作用^[5]。体外细胞培养实验中低浓度的 TGF-β₁ 对肿瘤细胞具有抑制作用,而在 100ng/ml 浓度时其抑制作用则未发挥。因而可以认为 TGF-β₁ 在不同浓度下对肿瘤细胞的调节作用有显著差异。在 TGF-β₁ 阳性表达的肿瘤组织中微血管的值显著高于阴性表达的组织,提示 TGF-β₁ 可能参与肿瘤的血管生成。本研究显示,在甲状腺癌组织中 TGF-β₁ 表达显著增强,且随病理分期及淋巴结转移而增加,与病理分

期呈正相关。说明 TGF-β₁ 在甲状腺癌组织中的起正向调节作用,促进肿瘤组织的生长和演进。通过分析 TGF-β₁ 和 VEGF 的表达之间的关系,发现两者的表达呈正相关,提示 TGF-β₁ 可能通过促使 VEGF 表达增强参与肿瘤微血管生成。

本研究中 COX-2、VEGF 及 TGF-β₁ 在乳头状甲状腺癌和滤泡状甲状腺癌的阳性率无显著差异,提示 COX-2、VEGF 及 TGF-β₁ 表达与病理类型无相关性。COX-2、VEGF 及 TGF-β₁ 在甲状腺癌中过表达均与肿瘤转移和侵袭密切相关,三者表达之间呈正相关。COX-2 与 TGF-β₁ 可能都对 VEGF 有正向调节作用,从而进一步增加肿瘤血管生成促进肿瘤生长和转移,其机制尚待深入研究。

参考文献

1 Joao-Bugalho M, Madureira D, Espadinha C, *et al.* Serum vascular endothelial growth factor levels in patients with medullary thyroid carcinoma[J]. *European journal of endocrinology*, 2008, 159(2): 167-169

2 Choi H, Kim S, Kim HJ, *et al.* Sphingosylphosphorylcholine down-regulates filaggrin gene transcription through NOX5-based NADPH oxidase and cyclooxygenase-2 in human keratinocytes[J]. *Biochemical Pharmacology*, 2010, 80(1): 95-103

3 Kuriyan AE, Phipps RP. Improvement of thyroid eye disease following treatment with the cyclooxygenase-2 selective inhibitor celecoxib[J]. *Thyroid*, 2008, 18(8): 911-914

4 纪柏,王广义,张平,等. 甲状腺癌 COX-2 和 VEGF 的表达与血管生成及临床病理的关系[J]. *吉林大学学报:医学版*, 2006, 32(06): 1077-1080

5 伍石华. 甲状腺癌 TGF-β₁、Smad4 表达及其临床病理意义[J]. *陕西医学杂志*, 2008, 37(12): 1675-1677 (收稿:2011-08-10)

(修回:2011-08-30)

(上接第 120 页)

综上所述,CMIA 法灵敏度高、特异性较强、线性范围宽、操作简便、不需要十分昂贵的仪器设备等特点,是目前检测 CsA 血药浓度比较理想的方法。但是,由于 CMIA 也是部分基于免疫法原理,当 CsA 代谢受阻如胆汁淤积是测量结果会受到干扰,因此,临床医生在分析 CsA 的血药浓度时应该结合多项检测结果以及患者症状等因素进行综合考量,更加合理评估 CsA 用药剂量,以期提高疗效,降低免疫排斥和毒性反应的发生。

参考文献

1 Kaabak MM, Babenko NN, Molchanova EA, *et al.* Efficacy and safety of cyclosporin A withdrawal in children long after kidney transplantation[J]. *Ter Arkh*, 2009, 81(8): 62-64

2 Fukaya H, Iimura A, Hoshiko K, *et al.* A cyclosporin A/maltosyl-alpha-cyclodextrin complex for inhalation therapy of asthma[J]. *Eur*

Respir J, 2003, 22(2): 213-219

3 Wang SM, Lai MK, Chueh SC, *et al.* Optimal C2 concentration of cyclosporin corrected with good efficacy and safety in Asian kidney transplant recipients[J]. *Transplant Proc*, 2008, 40(7): 2243-2244

4 Nishiyama S, Manabe N, Kubota Y, *et al.* Cyclosporin A inhibits the early phase of NF-kappaB/RelA activation induced by CD28 costimulatory signaling to reduce the IL-2 expression in human peripheral T cells[J]. *Int Immunopharmacol*, 2005, 5(4): 699-710

5 Maza A, Montaudie H, Sbidian E, *et al.* Oral cyclosporin in psoriasis: a systematic review on treatment modalities, risk of kidney toxicity and evidence for use in non-plaque psoriasis[J]. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2011; 25 Suppl 2: 19-27

6 Schenk LK, Rinschen MM, Klokke J, *et al.* Cyclosporin-A induced toxicity in rat renal collecting duct cells; interference with enhanced hypertonicity induced apoptosis[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2010, 26(6): 887-900

(收稿:2011-07-06)

(修回:2011-07-27)