doi:10.11659/jjssx.03E017049

·基础研究·

Luminex 液态芯片技术在克罗恩病诊断与病情监测中的应用

戴观荣[1],周 单[2],丁洪亮[1],杨晓强[1] (1.广州军区总医院普通外科,广东 广州 510010;2.广州市雷德生物科技有限公司,广东 广州 510000)

[摘 要] **目的** 探讨 Luminex 液态芯片技术检测血清中细胞因子的表达在克罗恩病患者中的临床意义。**方法** 选取不同严重程度克罗恩病(CD)患者 76 例作为研究对象,选取同期健康人群 50 例作为对照组。按照 MILLIPLEX MAP Kit 试剂盒的要求,利用 Luminex 技术检测血清中细胞因子白细胞介素 2(IL-2)、γ 干扰素(IFN-γ)、肿瘤坏死因子(TNF-α)、白细胞介素 4(IL-4)、白细胞介素 6(IL-6)、白细胞介素 10(IL-10)以及白细胞介素 17A(IL-17A)的表达水平,采用酶联免疫吸附试验(ELISA)测定血清中抗酿酒酵母抗体(ASCA),分析 CD 组与健康对照组之间的差异。**结果** 细胞因子表达水平除 IL-17A 外,CD 组 IL-2、IFN-γ、TNF-α、IL-4、IL-6、IL-10 水平均高于健康对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);活动期 CD 患者血清 IFN-γ、TNF-α、IL-6 水平明显高于缓解期和健康对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);中、重度活动期 CD 患者血清 TNF-α、IL-6 水平高于轻度活动期 CD 患者,差异有统计学意义($P<0.05$);血清 ASCA 水平在 CD 组与健康对照组比较,差异有统计学意义($P<0.05$),ASCA 阳性患者 TNF-α、IL-6 水平显著高于 ASCA 阴性患者,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** TNF-α、IL-6 在 CD 患者的炎症发生和病情发展中起着重要作用,测定血清 TNF-α、IL-6 的水平可反映克罗恩病的病情程度。细胞因子水平动态变化与 CD 病情进展相关,对 CD 疾病检测和病情监测具有重要意义。

[关键词] Luminex 液态芯片技术;克罗恩病;抗酿酒酵母抗体;细胞因子

[中图分类号] R516.1;R373.2+5 [文献标识码] A [收稿日期] 2017-03-21

Application of Luminex liquid chip technology in diagnosis and monitoring for patients with Crohn's disease

DAI Guan-rong[1], ZHOU Dan[2], DING Hong-liang[1], YANG Xiao-qiang[1] (1. Department of General Surgery, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Command, Guangzhou Guangdong 510010, China; 2. Guangzhou Leide Bio-Technology co., LTD, Guangzhou Guangdong 510000, China)

Abstract: Objective This study aimed to evaluate the clinical significance of detecting cytokine expression with Crohn's disease(CD) by Luminex liquid chip. **Methods** A total of 76 patients with CD and 50 healthy volunteers as healthy control group were recruited in this study. The expression of cytokines IL-2, IFN-γ, TNF-α, IL-4, IL-6, IL-10 and IL-17A were detected by Luminex liquid chip according to the instruction of MILLIPLEX MAP Kit. Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) was used to detect the levels of anti-saccharomyces cerevisiae antibodies(ASCA). Then the relationship and differences among these groups were analyzed. **Results** Except IL-17A, the level of IL-2, IFN-γ, TNF-α, IL-4, IL-6, IL-10 was higher in the CD group than those in control group. The serum levels of IFN-γ, TNF-α and IL-6 in patients with active stage of CD group were significantly higher than those with remission stage and healthy control group. The level of TNF-α and IL-6 in moderate and severe stages were higher than those in slight stage. The serum level of ASCA had significant difference between CD group and control group. Compared with ASCA negative group, the ASCA positive patients have a higher level of IL-6 and TNF-α. **Conclusion** The cytokines like IL-6 and TNF-α is correlated with CD severity, which is important for inflammatory activity and progression of CD. Altogether, these results demonstrated that the dynamic change of cytokines had a clear relativity in stage of CD, which is very imperative for diagnosis and clinical appraisal of CD.

Keywords: Luminex liquid chip technology; Crohn's disease; anti-saccharomyces cerevisiae antibodies; cytokines

克罗恩病(Crohn's disease,CD)又称节段性结肠炎。肉芽肿性回肠炎或回肠结肠炎,与溃疡性结肠炎(ulcerativecolitis,UC)合称为炎症性肠病(inflammatory bowel disease,IBD),是一种病因及发病机制尚不十分清楚的慢性非特异性炎症。我国 CD 发病率虽不及欧美国家高,但近些年有明显上升趋势。该病发病高峰年龄为 17~40 岁,因迁延难愈,并发症较多,治疗上缺乏特异性措施,被 WHO 定为现代难治病,因此,研究其发病机制对治疗 CD 具有重要意义。已有的研究表明该病的发生、发展与细胞因子免疫有密切关系[1-4]。本研究旨在利用 Luminex 液态芯片技术通过检测人血清样本,进一步探讨细胞因子 IL-2、IFN-γ、TNF-α、

[基金项目] 广东省科技计划项目(2014A020212735)

[通信作者] 戴观荣,E-mail:1304738748@qq.com

IL-4、IL-6、IL-10 和 IL-17A 的表达在 CD 病情进展中具有的临床意义。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取 2015 年 3 月至 2016 年 9 月在中山大学附属第六医院、广州军区总医院确诊的门诊及住院部 CD 患者 76 例,其中男 42 例,女 34 例;年龄 20 ~ 62 岁,平均(33.1 ± 11.2)岁。诊断标准:参照《2010 年世界胃肠病学组织关于炎症性肠病诊断和治疗的实践指南》[5],即通过临床表现、影像学检查、肠镜检查、黏膜组织学检查、切除标本和排除其他肠道疾病等要点进行综合诊断。CD 患者根据 Best CDAI 评分标准分为缓解期(CDAI < 150 分)28 例;活动期(CDAI ≥ 150 分)48 例,其中轻度活动期(CDAI 150 ~ 220 分)21 例;中、重度活动期(CDAI > 220 分)27 例。选取同期在广州军区总医院体检的健康人群 50 例作为健康对照组,其中男 30 例,女 20 例;年龄 18 ~ 60 岁,平均(30.6 ± 13.1)岁。CD 组与健康对照组性别与年龄相比,差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。CD 组与对照组均经过详细询问病史、体格检查及相关辅助检查,所有研究对象均签署知情同意书。CD 组与健康对照组均于清晨抽取静脉血 5 mL,3 000 r/min,离心 10 min,分离血清,-80 ℃冻存待测。

1.2 仪器与试剂

美国 Luminex 200 仪器;配套试剂盒 MILLIPLEX MAP Kit,试剂盒主要包含:人 IL-2、IFN-γ、TNF-α、IL-4、IL-6、IL-10 以及 IL-17A 捕获微球,人细胞因子标准品,荧光检测试剂;美国 Molecular Devices 多功能酶标仪 SpectraMax M3;人(human)酿酒酵母抗体(ASCA)ELISA 检测试剂盒购自生工生物科技(深圳)有限公司。

1.3 ELISA 法检测抗酿酒酵母抗体(ASCA)

试剂盒采用双抗一步夹心法酶联免疫吸附试验(ELISA)。梯度稀释标准品,制备标准曲线,每个样本 3 个复孔,往预先包被酿酒酵母抗原的包被微孔中,依次加入样本、标准品、HRP 标记的检测抗原,实验中设置阳性对照孔和阴性对照孔,经过温育并彻底洗涤。用底物 TMB 显色,TMB 在过氧化物酶的催化下转化成蓝色,并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅和样品中酿酒酵母抗体(ASCA)呈正相关。加入终止液后在酶标仪 450 nm 处测定各孔的吸光度(OD 值),根据标准曲线方程计算各样本的浓度值。

1.4 Luminex 液态芯片技术检测血清中细胞因子

按照 MILLIPLEX MAP Kit 试剂盒的说明书:使用前,用 250 μL 去离子水溶解细胞因子标准品,多次翻转瓶子以充分混合,振荡器振荡 10 s,静置 5 ~ 10 min,作为原始标准品;分别标记 7 个 EP 管 1∶4,1∶16,1∶64,1∶256,1∶1 024,1∶409 6,1∶16 384,每管中分别加入 120 μL Assay Buffer,连续稀释,取 40 μL 原始标准品加入 1∶4 管中,充分混合;从 1∶4 管中吸取 40 μL 加入至 1∶16 管中,充分混合;从 1∶16 管中吸取 40 μL 加入至1∶64管中,充分混合,从 1∶64 管中吸取 40 μL 加入至1∶256管中,充分混合;以此类推。在实验滴定板的每一孔中加入 200 μL Assay Buffer 用以预湿,封闭后在室温下置于摇床上震荡 10 min,倒掉,用吸水垫或滤纸吸干板子底部的残留液体;在孔中加入标准品组和质控组,每一个浓度加 25 μL,用 Assay Buffer 作为 0 pg/mL 标准品(背景);样品孔中加入 25 μL Assay Buffer、25 μL 样本(血清)。背景孔、标准品孔、质控组孔中加入配套的血清基质;每个孔中加入 25 μL 预混合微球;用专用塑料膜封闭板子,盖紧盖子,板夹用橡皮圈包裹,在 4 ℃条件下摇床上过夜(18 ~ 20 h);每孔加入 200 μL Wash Buffer 进行清洗,洗涤 2 次;每孔中加入 25 μL 二抗;封闭,室温下(20 ~ 25 ℃)摇床上孵育 2 h。在含二抗的孔中加入 25 μL Streptavidin-Phycoerythrin;封闭,室温下(20 ~ 25 ℃)摇床上孵育 30 min;每孔加入 200 μL Wash Buffer 进行清洗,洗涤 2 次,所有孔中加入 150 μL 鞘液,摇床上震荡 5 min 使微球呈悬浮状态,将板子置入 Luminex 200,保存并分析 MFI 结果,计算样本中的细胞因子浓度。

1.5 统计学分析

血清细胞因子和血清 ASCA 表达水平用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 Graphpad Prism 4.0 软件进行单因素方差分析,组间比较采用 Newman-Keuls 检验,$P < 0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CD 组与健康对照组血清细胞因子水平的比较

细胞因子表达水平除 IL-17A 外,CD 组 IL-2、IFN-γ、TNF-α、IL-4、IL-6、IL-10 水平均高于健康对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。活动期 CD 患者血清 IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IFN-γ、TNF-α 水平明显高于缓解期和健康对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);中、重度活动期 CD 患者血清 IL-6、TNF-α、IFN-γ 水平高于轻度活动期 CD 患者,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

2.2 2组血清ASCA表达水平差异以及与不同细胞因子水平之间的对比

血清ASCA表达水平CD组与健康对照组分别为(60.23±10.15)pg/mL和(5.45±0.47)pg/mL,2组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。ASCA阳性患者中IL-6、TNF-α水平显著高于ASCA阴性患者,差异有统计学意义($P<0.05$);而除IL-17A外,ASCA阳性和阴性患者IL-2、IFN-γ、TNF-α、IL-4、IL-6、IL-10水平均高于健康对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),见表3。

表1 CD组与健康对照组血清细胞因子的表达水平($\bar{x}\pm s$,pg/mL)

组别	n	IL-2	IL-4	IL-6	IL-10	TNF-α	IFN-γ	IL-17A
健康对照组	50	20.43±1.00	19.65±0.67	21.32±5.12	18.96±0.87	21.45±3.47	22.67±0.33	18.93±6.77
CD组	76	27.11±0.40	25.83±0.59	193.32±58.24	20.73±4.32	245.13±111.09	124.02±40.05	19.21±4.57
P		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	>0.05

表2 CD组不同病期血清细胞因子的表达水平与健康对照组比较($\bar{x}\pm s$,pg/mL)

组别	n	IL-2	IL-4	IL-6	IL-10	TNF-α	IFN-γ	IL-17A
健康对照组	50	20.43±1.00	19.65±0.67	21.32±5.12	18.96±0.87	21.45±3.47	22.67±0.33	18.93±6.77
CD缓解期	28	20.96±0.89	21.35±0.78	22.72±6.42	19.16±0.97	21.65±3.71	23.07±0.90	18.87±5.96
CD活动期	48	28.43±1.60*	26.75±0.32*	216.92±12.12*	20.26±1.07*	262.40±13.43*	137.05±8.33*	19.01±5.27
轻度活动期	21	27.43±1.40*	25.61±0.47*	140.81±9.87*	20.07±1.23*	100.67±9.07*	56.56±4.33*	18.53±5.03
中、重度活动期	27	29.43±1.91*	27.56±0.74*	268.02±15.62*#	20.96±0.99*	320.95±16.67*#	201.45±12.33*#	19.49±6.03

*:与健康对照组比较,$P<0.05$;#:与轻度活动期组比较,$P<0.05$

表3 ASCA阴性、阳性组与健康对照组血清细胞因子的表达水平($\bar{x}\pm s$,pg/mL)

组别	n	IL-2	IL-4	IL-6	IL-10	TNF-α	IFN-γ	IL-17A
健康对照组	50	20.43±1.00	19.65±0.67	21.32±5.12	18.96±0.87	21.45±3.47	22.67±0.33	18.93±6.77
ASCA阳性组	41	25.93±3.08*	25.75±2.36*	220.82±14.62*#	20.86±0.99*	280.43±10.56*#	67.89±9.43*	19.23±6.57
ASCA阴性组	35	26.47±2.90*	25.65±2.27*	151.09±9.92*	20.46±0.79*	123.98±9.97*	66.78±9.56*	18.90±6.47

*:与健康对照组比较,$P<0.05$;#:与ASCA阴性组比较,$P<0.05$

3 讨论

细胞因子是由免疫细胞以及非免疫细胞合成、分泌的,是具有生物活性的低分子量蛋白质或多肽。细胞因子的检测在揭示某些疾病的发生发展以及诊断和治疗中具有重要的应用价值。目前的检测方法(如ELISA)每次只能检测单一细胞因子,不能进行多种细胞因子的同时研究且存在相互干扰、灵敏度不高、操作繁琐、费时等问题。Luminex液态芯片技术,又称悬浮阵列、流式荧光技术,是基于多功能流式点阵仪开发的多功能生物芯片平台,是一个多功能、多指标并行分析系统。它有机地整合了编码微球、激光技术、应用流体学、最新的高速数字信号处理器和计算机运算法则,造就了高度的检测特异性和灵敏度,可广泛应用于免疫分析、核酸研究、酶学分析、受体和配体识别分析等研究,也是目前唯一得到权威机构和医学界共同认可用于临床诊断的生物芯片平台。Luminex液态芯片技术具有三大核心优势:高通量,一次操作可以检测100个指标;既能检测蛋白,又能检测核酸;既能用于临床,又能用于科研。此外,该技术还具有需样本量少(检测需样本量仅为25 μL)、高速度(最快可达每小时10 000次测试)、灵敏度高(检测低限为10 pg/mL)、线性范围广(检测范围可达6个数量级)、重复性好、成本低、操作方便、数字信号、客观可靠等优点[6-7]。2003年美国食品与药品管理局(FDA)批准该项技术用于临床检验诊断。

CD属于一种病因复杂的炎症性肠病,细胞因子在其发生、发展过程中具有相当重要的作用。本研究结果显示,细胞因子表达水平除IL-17A外,CD组IL-2、IFN-γ、TNF-α、IL-4、IL-6、IL-10水平均高于健康对照组且结果具有显著性差异,其中TNF-α作为一个重要的早期炎症因子,是炎症反应的起始者,参与固有免疫和适应性免疫反应以及自身免疫性疾病等过程,并能激活其他炎症因子的释放同时能够活化肠黏膜内皮细胞表面整联素的表达,引起细胞损伤。在研究CD患者不同时期时,结果显示活动期CD患者血清IFN-γ、TNF-α和IL-6水平明显高于缓解期和健康对照组;中、重度活动期CD患者血清TNF-α和IL-6水平高于轻度活动期CD患者。其原因可能由于TNF-α协同IFN-γ改变肠上皮细胞的屏障功能以及形态结构,增加肠黏膜与血管壁的通透性,大分子物质的转运增多,从而削弱了肠黏膜的屏障功能,引起溃疡。另一方面,

不同严重程度的 CD 患者血清 TNF-α 和 IL-6 水平明显不一样,并随着病情的好转而下降,说明这些细胞因子参与了 CD 的病理过程且与病情轻重相关。国外有研究报道,CD 患者 IL-6 水平与内镜下炎症分级成正相关、病情越严重 IL-6 水平越高[8-11]。国内也有研究指出在 CD 患者中,随着疾病活动性增加,TNF-α、IL-6 表达水平也逐渐上调[12-16]。ASCA 被认为是与 CD 相关的重要血清学标记物。有研究指出,ASCA 的产生与肠通透性增加相关,CD 患者手术切除病变肠段后 ASCA 水平下降[17-20]。在本研究中,血清 ASCA 水平在 CD 组与健康对照组比较,差异有统计学意义,但 CD 患者不同活动度组别中血清 ASCA 水平无显著性差异,说明血清 ASCA 水平与疾病严重程度无明显相关,这与王志远等[12]的研究结果一致。同时,我们的研究结果显示 ASCA 阳性患者 TNF-α、IL-6 水平显著高于 ASCA 阴性患者,提示 TNF-α、IL-6 与 CD 病情严重程度相关。这些研究结果均表示检测血清细胞因子 TNF-α 和 IL-6 的表达水平对评估 CD 活动度具有重要的临床意义。

综上所述,检测血清中细胞因子的动态变化可了解 CD 的严重程度,细胞因子水平动态变化对于 CD 检测和病情监测具有重要意义。与此同时,Luminex 液态芯片技术检测灵敏度高,可以同时检测多种细胞因子且检测的因子可自由组合,并能大量节约血清用量与实验时间,将在 CD 检测和病情监测中有着广阔的应用前景。

[参考文献]

[1] 罗 瑞,谢 磊,贾 波. 克罗恩病的细胞因子免疫学机制和中医学研究[J]. 中华中医药学刊,2011,29(6):1213 - 1215.

[2] 郭新利,李清文. 1 例结肠克罗恩病误诊分析[J]. 局解手术学杂志,2009,18(2):144 - 145. doi:10.3969/j.issn.1672 - 5042.2009.02.052.

[3] 黎介寿. 认识克罗恩病的特性[J]. 中国实用外科杂志,2013,33(7):535 - 537.

[4] 刘 芳,李靖涛,宋振梅,等. 英夫利昔单抗联合硫唑嘌呤对克罗恩病患者免疫功能和细胞因子的影响[J]. 中华全科医学,2017,15(4):586 - 592.

[5] Bernstein CN,Fried M,Krabshuis JH,et al. World Gastroenterology Organization practice guidelines for the diagnosis and treatment of IBD in 2010[J]. Chin J Gastroenterol,2010,15(9):548 - 558.

[6] 常玉梅. 液态芯片技术为临床医学发展开拓新领域[J]. 当代医学,2009,15(25):16 - 18. doi:10.3969/j.issn.1009 - 4393.2009.25.009.

[7] 张宝强,张 晓. Luminex 液态芯片在临床及科研中的应用[J]. 当代医学,2012,18(4):18 - 20. doi:10.3969/j.issn.1009 - 4393.2012.4.010.

[8] Mudter J,Neurath MF. IL- 6 signaling in inflammatory bowel disease:pathophysiological role and clinical relevance[J]. Inflamm Bowel Dis,2007,13(8):1016 - 1023. doi:10.3969/j.issn.1009 - 4393.2012.4.010.

[9] Nielsen OH,Vainer B,Madsen SM,et al. Established and emerging biological activity markers of inflammatory bowel disease[J]. Am J Gastroenterol,2000,95(2):359 - 367. doi:10.1111/j.1572 - 0241.2000.t01 - 1 - 01790.x.

[10] Reimund JM,Wittersheim C,Dumont S,et al. Mucosal inflammatory cytokine production by intestinal biopsies in patients with ulcerative colitis and Crohn's disease[J]. J Clin Immunol,1996,16(3):144 - 150. doi:10.1007/bf01540912.

[11] Mitsuyama K,Toyonaga A,Sasaki E,et al. Soluble interleukin-6 receptors in inflammatory bowel disease:relation to circulating interleukin-6[J]. Gut,1995,36(1):45 - 49. doi:10.1136/gut.36.1.45.

[12] 王志远,李 可,庞楠楠,等. 白介素-6、核周型抗中性粒细胞胞浆抗体与抗酿酒酵母抗体在克罗恩病中的临床价值[J]. 胃肠病学和肝病学杂志,2016,25(4):452 - 456. doi:10.3969/j.issn.1006 - 5709.2016.04.026.

[13] 戴向东,牛凤丽,郑 萍,等. 克罗恩病患者促炎性细胞因子肿瘤坏死因子-α 和白细胞介素-6 促炎作用的研究[J]. 胃肠病学,2003,8(1):33 - 34. doi:10.3969/j.issn.1006 - 5709.2016.04.026.

[14] 曹辉琼. 克罗恩病患者血清 ghrelin、CRP 和 IL-6 水平与疾病活动性的关系研究[J]. 中国医刊,2016,51(9):41 - 44. doi:10.3969/j.issn.1008 - 1070.2016.09.011.

[15] 孙 文,钱 雷,李 明,等. 克罗恩病患者外周血单核细胞亚群的变化及其意义[J]. 现代医学,2015,43(8):999 - 1004.

[16] 李忆岚. 血清 TNF-α 在克罗恩病中早期诊断的意义[J]. 中国伤残医学,2014,22(1):11 - 12.

[17] Ruemmele FM,Targan SR,Levy G,et al. Diagnostic accuracy of serological assays in pediatric inflammatory bowel disease[J]. Gastroenterology,1998,115(4):822 - 829. doi:10.1016/s0016 - 5085(98)70252 - 5.

[18] 吴小平,莫雅娴. 炎症性肠病非侵入性标志物研究进展[J]. 国际消化病杂志,2009,29(1):61 - 64. doi:10.3969/j.issn.1673 - 534X.2009.01.020.

[19] 王玉萍,王承党. 炎症性肠病患者血清抗体检测的临床意义[J]. 胃肠病学,2015,20(11):687 - 690. doi:10.3969/j.issn.1008 - 7125.2015.11.012.

[20] 刘国瑞,马巧蓉,李玲慧,等. 粪便钙卫蛋白及血清自身抗体联合检测对炎症性肠病的诊断价值[J]. 临床检验杂志,2017,35(1):24 - 27. doi:10.13602/j.cnki.jcls.2017.01.06.

(编辑:周小林)