

• 论 著 • DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2022.12.024

磁微粒化学发光法测定人尿液/血浆中儿茶酚胺类物质

庄路阳, 许君艳, 刘 念, 王 丹, 牛自飞

郑州安图生物工程股份有限公司, 河南郑州 450000

摘要:目的 建立血浆和尿液中游离儿茶酚胺类物质的化学发光免疫检测方法。方法 将血浆或尿液标本进行提取、酰化、释放、甲基化处理, 处理后的待测物分别与固相化的特异性抗体反应, 再加入亲和素标记的辣根过氧化物酶(HRP), 与待测抗原上的生物素结合, 可以形成固相化的抗体-抗原-HRP 免疫反应复合物, HRP 催化底物发光。结果 建立的肾上腺素(E)检测试剂的灵敏度为 6.2 pg/mL, 去甲肾上腺素(NE)检测试剂的灵敏度为 11.9 pg/mL, 多巴胺(DA)检测试剂的灵敏度为 4.2 pg/mL, 且与多种结构类似物均无明显的交叉反应; E、NE、DA 检测试剂的变异系数分别为 1.12%~1.77%、1.45%~3.65%、1.30%~1.96%; 3 种检测试剂的稳定性较好。结论 本研究成功建立了检测尿液和血浆中游离 E、NE、DA 的化学发光免疫检测方法。

关键词: 儿茶酚胺; 肾上腺素; 去甲肾上腺素; 多巴胺; 化学发光免疫检测

中图分类号: R446.1

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2022)12-1675-04

Determination of catecholamines in human urine/plasma by magnetic particle chemiluminescence method

ZHUANG Luyang, XU Junyan, LIU Nian, WANG Dan, NIU Zifei

Zhengzhou Antu Biological Engineering Co., Ltd., Zhengzhou, Henan 450000, China

Abstract: **Objective** To establish a chemiluminescence immunoassay method for free catecholamines in plasma and urine. **Methods** The plasma or urine samples were extracted, acylated, released and methylated. The processed analytes were treated with solid-phased norepinephrine (NE), adrenaline (E), dopamine (DA) specific antibody reaction, and then added avidin-labeled horseradish peroxidase (HRP), combined with the biotin on the antigen to be tested, could form a solid-phased antibody-antigen-HRP immune reaction complex, HRP catalyzed the substrate to emit light. **Results** The sensitivity of the established E, NE, DA detection reagent was 6.2, 11.9, 4.2 pg/mL, respectively, and there was no obvious crossover with many structural analogs; the coefficient of variation of E, NE, and DA detection reagents were 1.12%—1.77%, 1.45%—3.65%, 1.30%—1.96%, respectively; the stability of the three detection reagents was good. **Conclusion** This study successfully established a chemiluminescence immunoassay method for detecting free E, NE, and DA in urine and plasma.

Key words: catecholamines; epinephrine; norepinephrine; dopamine; chemiluminescence immunoassay

嗜铬细胞瘤/副神经节瘤(PHEO/PGL)是一种少见的导致内源性儿茶酚胺过量的神经内分泌肿瘤, 位于肾上腺的为 PHEO, 位于肾上腺外的为 PGL^[1-2]。除 PHEO/PGL 外, 压力、长期使用安非他命等药物均可导致体内儿茶酚胺类物质水平过高^[1,3-4]。儿茶酚胺类物质主要包括肾上腺素(E)、去甲肾上腺素(NE)和多巴胺(DA)等, 过量儿茶酚胺可引起头痛、大汗、心悸、胸痛等症状, 还可导致严重的心血管疾病^[5-8]。由于 PHEO/PGL 的临床症状及体征不典型, 极易导致误诊或漏诊, 更多的 PHEO 通过偶然的影像学检查被发现^[9]。目前常用的儿茶酚胺检测方法有放射酶学法、化学发光法、荧光法、高效液相色谱法(HPLC)等。放射酶学法技术难度高, 检测速度慢且容易造成污染; 荧光法灵敏度不够; HPLC 存在检测

时间长、不能批量操作等问题^[10-13]。而《嗜铬细胞瘤和副神经节瘤诊断治疗的专家共识》建议使用 HPLC 测定儿茶酚胺类物质^[14]。基于此研究现状, 本研究通过对含儿茶酚胺的尿液/血浆标本进行前处理, 再利用磁微粒化学发光法对其进行检测, 提高其检测灵敏度以及实现检测批量化、自动化, 以满足临床检验的需求。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 全自动化学发光仪(Autolumo A2000 Plus), 安图生物工程股份有限公司; 微孔板快速振荡器, 海门市其林贝尔仪器制造有限公司; 移液器, 赛默飞世尔(上海)仪器有限公司; 电子分析天平, 梅特勒托利多仪器有限公司; 隔水式电热恒温培养箱, 上海跃进医疗器械厂; 79-1 磁力加热搅拌器, 江苏

科析仪器有限公司。E 纯品购自上海阿达玛试剂有限公司;NE、DA、3-甲氧酪胺(3-MT)、L-左旋多巴纯品(L-Dopa)纯品购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;甲氧基肾上腺素(MN)、甲氧基去甲肾上腺素(NMN)纯品购自上海柯维化学技术有限公司;E、NE、DA 单克隆抗体、亲和素标记的辣根过氧化物酶(HRP)、甲基转移酶(COMT)均购自郑州伊美诺生物技术有限公司;表面包裹有羧基功能基团的磁微粒购自德国 Merk 公司;二甲基亚砜(DMSO)购自北京益利精细化学品有限公司;硼酸亲和凝胶、(5'-腺苷)-L-甲硫氨酸对甲苯磺酸盐购自西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司;Succinimidyl N-[6-(Biotinamido)hexanoyl]-6-amino hexanoate 购自北京百灵威科技有限公司;24 孔细胞培养板购自美国康宁公司。

1.2 方法

1.2.1 试剂配制 (1)校准品:校准品稀释液为 pH=4 的柠檬酸缓冲液(保护剂:0.2%的乙酰半胱氨酸),加入不同水平的 E、NE、DA 纯品,制备出一组 E 水平为 0、2、6、18、54、162 ng/mL,NE 水平为 0、10、30、90、270、810 ng/mL,DA 水平为 0、100、300、900、2 700、8 100 ng/mL 的校准品。(2)抗体固相化:将选用的磁性微球原液经过 10 倍原液体积的磷酸缓冲液冲洗 2~5 遍后使用 N-羟基琥珀酰亚胺(EDC)、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(NHS)或戊二醛进行活化,分别与水平为 0.3 μ g/T 的抗体通过化学连接进行包被,包被后的磁性微球经封保液封闭后,定容并分装,2~8 $^{\circ}$ C 环境保存备用。(3)亲和素标记的 HRP 溶液:首先按照配方三(羟甲基)氨基甲烷-氯化钠(Tris-NaCl)0.05 M、牛血清清蛋白(BSA)2%、氨基比林(ADP)1%、碘丙炔正丁基甲酸酯(IP-BC-II)1%、聚乙二醇-4000(PEG-4000)1%配制稀释液,再按照 1:5 000 加入亲和素标记的 HRP,得到亲和素-HRP 溶液,混合均匀后 2~8 $^{\circ}$ C 保存待用。(4)提取板:称取一定质量的顺式二醇特异性亲和介质于 250 mL 烧杯中,加入适量纯化水,振荡混匀,取一定体积,通过物理吸附使其均匀分布,氮吹或 37 $^{\circ}$ C 烘干。(5)酰化剂:量取一定体积的 DMSO,称取适量酰化剂,使其完全溶解,2~8 $^{\circ}$ C 保存待用。(6)甲基化酶溶液:分别取儿茶酚胺 COMT 冻干粉,加入 3.75 mL 的 COMT 缓冲液(1 M Tris-HCl、临用现配)。

1.2.2 标本的前处理 (1)提取:吸取 1 mL 提取缓冲液(0.1 M Tris-NaCl, pH=9.18)于提取板中,再加入 20 μ L 校准品或标本(尿液标本 20 μ L、血浆标本 500 μ L),室温振荡反应 30 min,甩干后用 2 mL 纯化水洗两遍,在吸水纸上拍干提取板;(2)酰化:取 150 μ L 的提取缓冲液于提取板中,再加入 50 μ L 酰化剂,振荡反应 20 min,甩干,纯化水洗两遍,在吸水纸上拍干提取板;(3)释放:加入 300 μ L 释放缓冲液(0.1 M 柠檬酸缓冲, pH=3)振荡反应 30 min;(4)甲基化:将

上述 300 μ L 液体转移至空白板,每孔分别加入 300 μ L 的 COMT 溶液,振荡反应 30 min,得到待检测抗原。

1.2.3 标本检测 将处理好的校准品及标本转移至反应杯中,配套使用 AutoLumo A2000 Plus 全自动检测分析仪进行检测,得到抗体-抗原-HRP 复合物,该复合物催化发光底物发出光子进行检测。用 E、NE、DA 的检测试剂分别检测处理好的系列校准品,并按照四参数拟合方式进行校准曲线的拟合,计算标本水平,其中尿液标本水平=计算水平,血浆标本水平=计算水平/25。

1.2.4 校准曲线的拟合 采用 E、NE、DA 的检测试剂分别检测处理好的系列校准品,横坐标为校准品对应水平值,纵坐标为信号值取 log,按照四参数法拟合剂量反应曲线,根据检测标本信号值回算其水平值。

1.2.5 评估 (1)灵敏度:重复检测 0 水平的校准品 20 次,计算反应信号值的均值($\bar{x}$)与标准差(s),将 $\bar{x} \pm 2s$ 代入校准曲线计算。(2)特异度:将儿茶酚胺类物质代谢过程中的结构类似物作为交叉品,如 DA、E、NE、L-Dopa、3-MT、MN、NMN,将交叉品添加到校准品稀释液中,按照上述的标本处理方式处理后进行检测。交叉率=添加标本的检测结果/交叉品添加水平 $\times 100\%$ 。(3)重复性:将 E、NE、DA 纯品使用校准品稀释液配制出高、中、低三个水平,其中至少一个低于医学决定水平或参考范围下限,每个水平标本进行 20 次重复检测。计算 20 次检测水平的 $\bar{x}$ 与 s ,根据公式变异系数(CV)= $s/\bar{x} \times 100\%$,得出重复性。(4)稳定性:将 E、NE、DA 检测试剂的组分(E、NE、DA 抗体包被的磁微粒混悬液、亲和素标记的 HRP 溶液、样品稀释液和校准品)各一套放置于 37 $^{\circ}$ C 温箱中,10 d 后取出,作为考核组。分别将 37 $^{\circ}$ C 组和对照组试剂(4 $^{\circ}$ C 放置的试剂组分)拟合校准曲线后,同步检测同一套系列水平梯度的标本(由 E、NE、DA 纯品添加到校准品稀释液中配制而成),计算检测水平并比较两组试剂检测水平之间的偏差。(5)稀释线性:将 E、NE、DA 纯品添加到校准品稀释液中,制备出混合高水平溶液,使 E 的水平约为 162 ng/mL,NE 的水平约为 810 ng/mL,DA 的水平约为 8 100 ng/mL;使用校准品稀释液与此高水平溶液按照一定比例混合,制备出系列标本,水平涵盖整个校准区间。将系列标本的实测水平作为横坐标,理论水平作为纵坐标,作图进行相关性分析。

2 结果

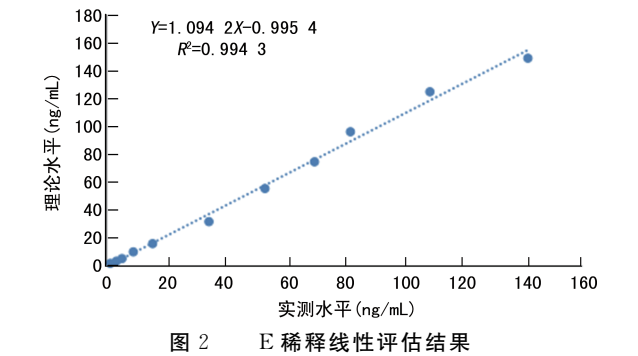
2.1 灵敏度及特异度 重复检测 0 水平的校准品 20 次,可得出 E 检测试剂的灵敏度为 6.2 pg/mL,NE 检测试剂的灵敏度为 11.9 pg/mL,DA 检测试剂的灵敏度为 4.2 pg/mL。E、NE、DA 之间相互交叉率均小于 0.5%,与其他结构类似物(L-Dopa、3-MT、MN、NMN)交叉率均小于 0.1%,见表 1。

表 1 检测试剂的特异性				
交叉品类型	添加水平 (ng/mL)	DA 抗体 交叉率(%)	NE 抗体 交叉率(%)	E 抗体 交叉率(%)
L-Dopa	30 000	0.01	0.03	0.04
	300	0.02	0.01	0.01
3-MT	30 000	0.03	0.02	0.05
	300	0.01	0.01	0.02
MN	20 000	0.00	0.02	0.09
	200	0.02	0.01	0.05
NMN	30 000	0.01	0.03	0.01
	300	0.04	0.01	0.02
DA	30 000	100.00	0.23	0.07
	300	100.00	0.18	0.10
NE	1 000	0.14	100.00	0.07
	100	0.12	100.00	0.05
E	500	0.08	0.07	100.00
	50	0.05	0.05	100.00

2.2 重复性 DA 检测试剂的 CV 为 1.30%~1.96%,NE 检测试剂的 CV 为 1.45%~3.65%,E 检测试剂的 CV 为 1.12%~1.77%,可以满足临床使用的一般要求(CV<10%),见表 2。

表 2 不同水平标本的重复性									
水平	DA			NE			E		
	$\bar{x}$ (ng/mL)	s(ng/mL)	CV(%)	$\bar{x}$ (ng/mL)	s(ng/mL)	CV(%)	$\bar{x}$ (ng/mL)	s(ng/mL)	CV(%)
低	62.15	1.22	1.96	22.72	0.83	3.65	9.62	0.17	1.77
中	572.30	7.54	1.32	65.32	1.68	2.57	20.12	0.25	1.24
高	3 125.66	40.72	1.30	267.39	3.89	1.45	99.07	1.11	1.12

表 3 检测方法的稳定性									
标本	DA			NE			E		
	对照组 (ng/mL)	37℃组 (ng/mL)	偏差(%)	对照组 (ng/mL)	37℃组 (ng/mL)	偏差(%)	对照组 (ng/mL)	37℃组 (ng/mL)	偏差(%)
水平 1	54.22	52.33	-3.49	5.23	4.91	-6.12	1.20	1.12	-6.67
水平 2	102.78	99.27	-3.42	10.04	9.62	-4.18	4.30	4.11	-4.42
水平 3	304.92	295.25	-3.17	28.99	27.45	-5.31	18.76	18.21	-2.93
水平 4	691.46	672.31	-2.77	86.32	80.23	-7.06	30.56	29.36	-3.93
水平 5	1 674.39	1 593.85	-4.81	279.51	268.33	-4.00	55.21	53.12	-3.79
水平 6	5 023.16	4 937.22	-1.71	695.12	668.24	-3.87	152.47	146.12	-4.16



2.3 稳定性 建立的 E 检测方法的偏差为 -6.67%~-2.93%,建立的 NE 检测方法的偏差为 -7.06%~-3.87%,建立的 DA 检测方法的偏差为 -4.81%~-1.71%,偏差符合一般体外诊断试剂的标准要求,说明检测方法的稳定性较好,见表 3。

2.4 稀释线性 DA 的检测水平与理论水平相关曲线为 $Y=1.093\ 8X-129.17$, R^2 为 0.993 6;E 的检测水平与理论水平相关曲线为 $Y=1.094\ 2X-0.995\ 4$, R^2 为 0.994 3;NE 的检测水平与理论水平相关曲线为 $Y=0.967\ 1X+4.735\ 9$, R^2 为 0.997。3 项 R^2 均>0.99,具有较好的稀释线性。见图 1~3。

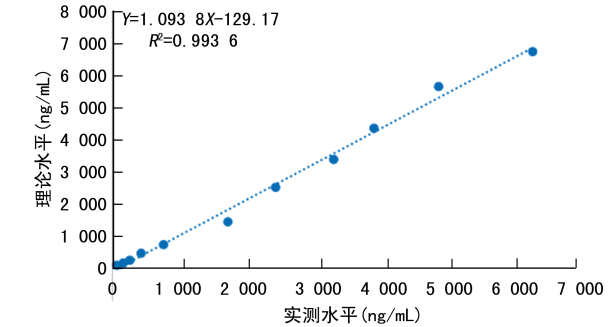


图 1 DA 稀释线性评估结果

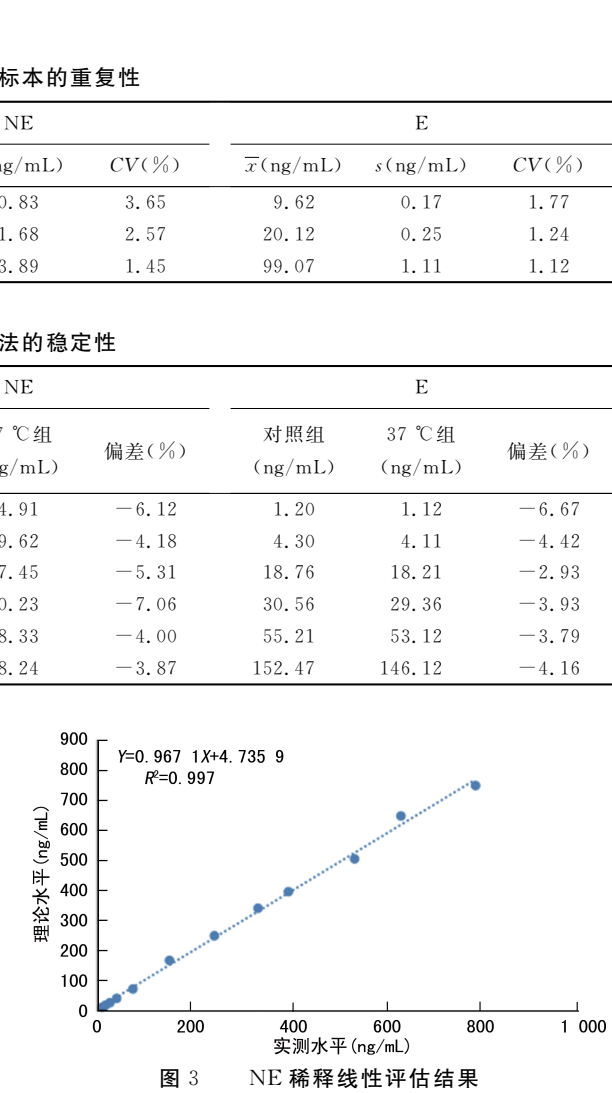


图 3 NE 稀释线性评估结果

3 讨 论

研究表明, PHEO/PGL 可以导致严重的并发症, 涉及心、脑、肾血管系统等, 引起持续性或阵发性高血压, 危及患者生命, 但如能及时、早期获得诊断和治疗, 90% 的患者可以治愈。因此, 检测血浆及尿液儿茶酚胺对临床诊断 PHEO/PGL 具有重要意义^[15]。《嗜铬细胞瘤与副神经节瘤诊断治疗专家共识》推荐诊断 PHEO/PGL 首选血浆(游离)或尿液(游离与结合态) MN 水平, 可同时检测血浆或尿液 E、NE、DA 等代谢物水平以帮助诊断^[16]。

儿茶酚胺类物质检测方法从最初的放射酶学法、荧光法发展到现在的串联质谱法(LC-MS/MS), LC-MS/MS 因其高灵敏度、高特异度被广泛应用, 但不同实验室的检测结果差异较大^[17], 此外, 由于儿茶酚胺类物质的半衰期极短, 稳定性较差, 因此各实验室间检测结果的一致性较差。

为了验证本次建立的检测方法的准确性, 对检测试剂的灵敏度、特异度、重复性、稳定性及稀释线性进行了评估。本研究建立的化学发光免疫法检测试剂对待测物具有较高的特异度(与其结构类似物交叉率均 $\leq 0.5\%$), 可以实现待测物的准确检测; E 检测试剂的灵敏度为 6.2 pg/mL , NE 检测试剂的灵敏度为 11.9 pg/mL , DA 检测试剂的灵敏度为 4.2 pg/mL , 远低于健康人血浆和尿液中的水平, 可以满足 3 项指标检测需求; 且 E、NE、DA 低、中、高三种水平的重复性 CV 均 $\leq 5\%$, 确认了该检测系统具有较好的重复性; 稀释线性评估的目的是为了检验检测试剂在一定量值区间内的检测准确度, 结果显示, $E < 162 \text{ ng/mL}$ 、 $NE < 810 \text{ ng/mL}$ 、 $DA < 8100 \text{ ng/mL}$ 时, 3 项的 R^2 均 > 0.99 , 具有较好的稀释线性; 稳定性评估结果显示, 建立的 DA 检测方法的偏差为 $-4.81\% \sim -1.71\%$, NE 为 $-7.06\% \sim -3.87\%$, E 为 $-6.67\% \sim -2.93\%$, 偏差符合行业标准要求, 3 项指标检测方法具有较好的稳定性。本文建立的利用安图全自动化学发光仪的检测方法可实现血浆及尿液中 E、NE、DA 的特异性检测, 可以通过进一步的研究, 实现该试剂各项性能指标的优化, 助力 PHEO/PGL 的诊断。

参考文献

- [1] 赵磊, 梁朝朝. 嗜铬细胞瘤的诊断及治疗进展[J]. 现代泌尿生殖肿瘤杂志, 2019, 11(3): 181-183.
- [2] LENDERS J W, DUH Q Y, EISENHOFER G, et al. Pheochromocytoma and paraganglioma: an endocrine society clinical practice guideline [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2014, 99(6): 1915-1942.
- [3] BATISSELIENIER M, PEREIRA B, MOTREFF P, et al. Acute and chronic pheochromocytoma induced cardiomyopathies: different prognoses? a systematic analytical

- review[J]. Medicine, 2015, 94(50): e2198.
- [4] GAGNON N, MANSOUR S, BITTON Y, et al. Takotsubo-like cardiomyopathy in a large cohort of patients with pheochromocytoma and paraganglioma [J]. Endocrine Practice, 2017, 23(10): 1178-1192.
- [5] MANGER W M. The protean manifestations of pheochromocytoma [J]. Horm Metab Res, 2009, 41(9): 658-663.
- [6] PREJBISZ A, LENDERS J W, EISENHOFER G, et al. Cardiovascular manifestations of pheochromocytoma [J]. J Hypertens, 2011, 29(11): 2049-2460.
- [7] AUGUST C, AUGUST K, SCHROEDER S, et al. CGH and CD 44/MIB-1 immunohistochemistry are helpful to distinguish metastasized from nonmetastasized sporadic pheochromocytomas [J]. Mod Pathol, 2004, 17(9): 1119-1128.
- [8] EISENHOFER G, KOPIN I J, GOLDSTEIN D S. Catecholamine metabolism: a contemporary view with implications for physiology and medicine [J]. Pharmacol Rev, 2004, 56(3): 331-349.
- [9] 徐千越. 嗜铬细胞瘤及副神经节瘤的临床及病理研究 [D]. 南京: 南京大学, 2016.
- [10] 成利娟, 黄燕, 许杜娟. 高效液相荧光法测定人尿液中儿茶酚胺含量度 [J]. 安徽医药, 2015, 19(2): 259-263.
- [11] DE JONG W H, DE VRIES E G, WOLFFENBUTTEL B H, et al. Automated mass spectrometric analysis of urinary free catecholamines using on-line solid phase extraction [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2010, 878(19): 1506-1512.
- [12] PEITZSCH M, PELZEL D, GLÖCKNER S, et al. Simultaneous liquid chromatography tandem mass spectrometric determination of urinary free metanephrines and catecholamines, with comparisons of free and deconjugated metabolites [J]. Clin Chim Acta, 2013, 418: 50-58.
- [13] CLARK Z D, FRANK E L. Urinary metanephrines by liquid chromatography tandem mass spectrometry: using multiple quantification methods to minimize interferences in a high throughput method [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2011, 879(31): 3673-3680.
- [14] 中华医学会内分泌学分会肾上腺学组. 嗜铬细胞瘤和副神经节瘤诊断治疗的专家共识 [J]. 中华内分泌代谢杂志, 2016, 32(3): 181-187.
- [15] 遗传性嗜铬细胞瘤家系血浆儿茶酚胺及其代谢物的含量测定 [J]. 中国医药导报, 2019, 16(6): 113-116.
- [16] 中华内分泌代谢杂志. 嗜铬细胞瘤和副神经节瘤诊断治疗专家共识 [J]. 中华内分泌代谢杂志, 2020, 36(9): 737-750.
- [17] 刘庆香, 周伟燕, 张传宝. 儿茶酚胺及其代谢物的检测现状及标准化期望 [J]. 中华检验医学杂志, 2020, 43(3): 322-327.