

胃液分泌型 IgA 的 ELISA 检测及其与 pH 关系和在胃癌诊断中的价值探讨

微生物学研究生 马力*

指导教师 卢玉颀副教授

内容提要

本文通过对各种影响因素特别是胃液中的非特异性吸附、水质、 N_2N_3 的处理,选择了各种适宜条件建立了 ELISA 双抗体夹心法,对 pH4.0 以上胃癌病例阳性率可提高到 94.4%。

通过对 1064 例 SIgA 检出的 pH 分析和实验证明,明确了 SIgA 检出受 pH 及胃蛋白酶影响的规律,探讨了胃内调正低 pH 标本的方法,提高了诊断阳性率。SIgA 可以用来筛选病例和作为胃癌的辅助诊断指标,同时可用于发现监视“危险易感人群”探讨阻断方法,及时发现癌变,作为参考指标对提高早癌诊断率可能有一定意义。

肿瘤的局部免疫与全身免疫是不平衡的,局部抗体的增加有可能对癌变产生早期反应指标。Levy 在 1975 年作了初步报道后,1979~1980 年我们又作了 631 例的报告阳性率 68.1%,1980 年 9 月又用这一方法参加全国胃癌协作组岱山现场的普查,和其他六项生化免疫指标对照考察,结果本方法阳性 69.1%,认为可能是一值得进一步探讨的苗头^[1-3],但实验敏感性必须提高,对 pH 的影响予以澄清,十分必要

ELISA 法(酶联免疫吸附法)自 1971 年 Enhvall 及 Weeman 和 Schuurs 创建以来^[4-5],是与放射免疫敏感性相当而又无害的新检测技术,迅速广泛地应用于各个领域^[6],在 Ig 抗原测定方面已成功地应用于 IgG、IgE、IgD 等^[7-8],并已用血清特异性 IgA 诊断鼻咽癌^[9]。但对 SIgA 的检测尚未见报道,故我们进行了 ELISA 检测胃液 SIgA 并试图应用于对胃癌的辅助诊断的尝试。pH 对 SIgA 检测的影响 1975 年 Levy 认为无关^[1],同年 Lindh 在 pH4.0 条件下证明了 STgA 具有一定抗胃蛋白酶消化的能力^[10],经过普查

我们对 Levy 的结论产生置疑,并查阅到赤保内提出 pH3.0 以下胃液中基本无蛋白成分可检出^[11],所以进一步澄清这一影响的规律对提高本实验在胃癌诊断中的价值十分重要。

一、ELISA 双抗体夹心法

(一)方法的建立:本实验采用双抗体夹心法^[12]。[注一]具体步骤按双抗体夹心法常规操作^[12]。

各种条件的选择:

1. 抗体包被量的选择:用浓度分别为 40、20、10、5r/mL 纯化的马抗人 SIgA 包被血凝板,用血清标本检测显色差异不大故本文选 10r/mL 浓度。

2. 标本稀释度选择:在包被抗体、结合物浓度固定条件下,将标本作 50 倍-400 倍稀释,如常规操作后以 50 倍时 OD 在 0-1.0 之间肉眼观察较分明,故确定标本用稀释液稀释 50 倍为宜。

3. 酶标记结合物的浓度选择:即在包被抗体及标本稀释度固定条件下,将结合物

[注一]用戊二醛二步法过碘酸钠法联合标记羊抗人 SIgA(13),采用上海医化所成套改良底物试剂(11)*

* 宁夏医学院 79 级毕业研究生。

作一系列稀释按结果空白对照本底最浅阳性结果显色最好的浓度为最适稀释度。

4. 特异性分析：用3例阳性标本作吸收抑制试验，用抗 SIgA、抗 IgG、抗 IgM 抗血清吸收，37℃ 过夜，加抗 SIgA 者阳性被抑制而其他则未被抑制，说明对 SIgA 特异性好。

5. 稀释液的选择：影响特异性的因素，胃液中杂蛋白成分复杂易导致非特异性吸附的增加，本实验通过对三种不同稀释液的比较包括 pH7.4PBS-T、pH7.4PBS-T.10% 马血清、pH7.4PBS-T.0.5%BSA^[注二]，最后选择 pH7.4PBS-T0.5% BSA 为稀释液使阴性标本 OD 等于 0 或接近于 0，达到理想要求。

水质往往是影响实验的重要因素应予重视，对水质和 N₂N₃ 影响进行了比较观察，结果去离子双蒸水和不加 N₂N₃ 组呈色最稳定，故稀释液中去 N₂N₃ 新鲜配制即可。

6. 重复性试验：每次每份标本重复 3

孔结果良好，隔日或一月后各观察 15 份标本的结果均较稳定。

(二) 临床应用结果：

1. 275 例标本 E LISA 和 SRID 配对检测结果用配对资料四格表法分析 $\chi^2 = 12 > 10.828(\chi^2(1)0.001) p < 0.001$

表一、275例胃液SIgAELISA和SRID配对检测结果

方 法	ELISA		合 计	
	+	-		
S R I D	+	92	4	96
	-	23	156	179
合 计		115	160	275

两法比较有非常显著性差异。

2. 258 例病例 pH4.0 以上 113 例结果：

[注二] PBS磷酸缓冲液 T 吐温 2 BSA 中血清白蛋白 4,

表二、258例病例 pH4.0 以上113例SIgA检测结果

病 名	例 数	ELISA			SRID		
		阳性数	阳性率 (%)	$\bar{x} \pm SD$	阳性数	阳性率 %	$\bar{x} \pm SD$
胃 癌	72	68	94.4	0.437 ± 0.259	59	82.0	12.07 ± 10.14
萎缩性胃炎	35	19	54.3	0.18 ± 0.19	15	42.8	6.67 ± 9.07
其他胃病	6	0	0	0	1		1.67 ± 3.72
合 计	113	87			75		

表二为临床资料完整的 258 例两法结果，145 例 pH4.0 以下病例 ELISA 和 SRID 均阴性，故只比较 pH4.0 以上病例，胃癌组 72 例 ELISA 阳性率为 94.4%，SRID 为 82.0%，ELISA 组高于 SRID 组 ($p < 0.01$)。其中早癌 3 例、准早期癌⁽¹⁾ 4 例 ELISA 全部阴性。萎缩性胃炎和其他胃病组^[注三] 共 41 例 ELISA 阳性 46.3%，SRID 阳性 39%，两者

无显著性差异 ($p > 0.05$)。

二、SIgA 与 pH 及胃蛋白酶的关系和胃内调正 pH 初步观察

(一) 1064 例 SIgA 检测结果的 pH 分布 本组胃癌标本 150 例，pH.40 以下 35 例占 23.33% SIgA 均阴性，pH4.0 以上 115 例占 76.67%，SIgA ≥ 6mg/dl 100 例阳性率 87%。

其他良性及正常人 pH < 4.0684 例全部阴性，pH ≥ 4.0 共 230 例 SIgA 阳性 52 例，阳性率为 pH4.0 以上的 22.6%，仅为全部非

[注三] 本文所有病例均为胃癌及活检病理诊断，胃癌以术后病理分期。以 OD 值 ≥ 0.1 SRID 含量 ≥ 6mg/dl 以上为阳性，系 SIgA 已出值之百分位数理论值。

表 三、1064例胃液SIgA检测结果pH分布

病 例	例数	pH < 4.0	pH ≥ 4.0	
			例数	检出数(检出率%) 阳性数(阳性率%)
胃 癌	150	115	107 (93.0)	100 (87.0)
萎缩性胃炎	305	119	56 (47.0)	13 (36.0)
残 胃 炎	16	11	6 (51.5)	4 (36.4)
其他胃病*	426	83	6 (6.9)	5 (5.7)
其他肿瘤	12	0	0	0
止 常 人	65	12	0	0
合 计	1064	345		152 (44.1)

(*其他胃病包括浅表性胃炎及部分溃疡, 阳性3例为浅表性胃炎假肠化)

癌及正常组914例的5.6%。

(二)胃蛋白酶对 SIgA作用的实验:为了证实pH及其胃蛋白酶对 SIgA 的影响设计以下试验方法及结果(见表四)测定方法为参考尿胃蛋白酶比色法^[17]改进后直接测定胃液中胃蛋白酶的活性国际单位, 避免了麦氏及布氏法^[16]目测及主观因素影响误差。

其胃蛋白酶液及正常胃液中 pH1.2、2.2、~5.0时胃蛋白酶活性为50、40、30、13、0、pH5.0以上均^[19]为0与以前文献一致^[19]pH5.0以上活性即降至0, 再调回pH活性并不恢复。IgA在pH3.0以下胃蛋白酶活性 30μ 以上即完全被消化, pH4.0时胃蛋白酶活性降至 13μ 左右, sIgA 可逐渐被消化, pH5.0以上

表 四、不同pH不同时间胃蛋白酶对SIgA降解消化试验

实验分组	pH 分组								备 注
	1.5	2.2	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	
胃蛋白酶液 + SIgA	-	-	-	+	+	+	+	+	37℃ 1小时
正常胃液 + SIgA	-	-	-	+	+	+	+	+	
胃癌胃液 + SIgA	-	-	-	+	+	+	+	+	
胃蛋白酶 + SIgA	-	-	-	±	+	+	+	+	37℃ 24小时 37℃
正常胃液 + SIgA	-	-	-	-	+	+	+	+	
胃癌胃液 + SIgA	-	+	+	-	-	+	+	+	
缓冲液 + SIgA	-	-	-	+	-	+	+	+	1小时 37℃ 2小时
缓冲液 + IgA	-	-	±	+	+	+	+	+	
缓冲液 + SIgA	-	-	+	+	+	+	+	+	
缓冲液 + IgA	-	±	±	±	±	±	±	±	
胃蛋白酶活性	50	40	30	13	0	0	0	0	1.0

注1. 表中胃蛋白酶液为按500/mL配制之溶液, 胃癌胃液系原 pH3.0SIgA(一)标本, 正常胃液系原 pH2.0SIg(一)标本

2. SIgA系初乳(含SIgA40mg/dl)IgA系标准血清; 缓冲液对照为磷酸柠檬酸缓冲液

3. (+)为测定SIgA定性阳性(-)为测定定性阴性。

4. 胃蛋白酶活性用改良之尿胃蛋白酶比色测定法测定。

胃蛋白酶失活 SIgA 含量稳定。缓冲液中无胃蛋白酶作为对照结果 pH3.0 以下也可降解 SIgA, 只不过比有胃蛋白酶存在时要缓慢。胃癌胃液(原 pH3.07 与上基本一致, 唯 pH4.0 时部分病例 SIgA 较稳定存在较长时间可能与其酶原缺乏有关。

(三)胃内 pH 调正观察: 根据以上结果有必要对低 pH 病例胃液 pH 进行胃内调整, 方法有口服法, 即按常量给低 pH 病例者口服碳酸氢钠和苜蓿片, 二日后抽取胃液再检, 按原 6mg 标准判别结果; 注入法即初抽胃液 pH5.0 以下时推入 10% 碳酸氢钠 10~20ml, 30'~1 小时后抽出胃液再检, 检出者即按阳性对待。观察 64 例其中口服法 54 例, 推注法 10 例, 调正后 11 例胃癌除 1 例胃潴留未调成外, 另 10 例调 pH 至 5.0 以上 SIgA 全部阳性。非癌 53 例其中萎缩性胃炎 26 例, 调后 12 例阳性; 其他胃病 27 例, 仅 2 例阳性。非癌病例中 19 例未调至 pH5.0 以上者系胃内酸度较高未予再调。

讨 论

一、本文初步探讨了用 ELISA 检测胃液 SIgA 诊断胃癌的双抗体夹心法比 SRID 法敏感性高 ($p < 0.001$)。在对胃癌的诊断中, 本方法阳性率 (pH4.0 以上 72 例) 为 94.4%。 (pH4.0 以下病例亦可通过调正出现阳性) 胃癌组较非癌组 OD 值高, 具有显著性差异 ($p < 0.01$)。275 例标本配对检测中尚有 4 例 SRID 法阳性而 ELISA 法阴性, 而延长反应时间可逐渐显色可能由于标本中存在酶抑制因素, 稀释未能除去, 但由于这 4 例均为非癌标本似对降低假阳性起了一定作用, 但例数尚少待进一步证实。

胃液中的杂蛋白可引起非特异性吸附的增加, 用含 0.5% BSA 的 pH7.4 PBS-T 作稀释液, 以阴性标本 OD 等于 0 或接近于 0 为理想解决了这一问题。N₂N₃ 和不良水质往往协同抑制酶的活性, 在选用适合的水质后稀

释液新鲜配制不加 N₂N₃ 可防止以上影响。ELISA 的阳性判断指标每个实验室应根据标准化后的条件和程序分别确定, 如果血凝板之间吸收值差异较大应同时设阳性对照, 对其阳性标本的 OD 按校正公式予以校正取校正值为准^[22]。

通过以上实验证明 ELISA 法除了敏感性高, 对 SIgA 特异性好之外, 同时具有报告迅速, 可以目测、重复性稳定, 适于大面积筛选的特点, 并由于直接可用分光光度计读取 OD 值, 避免了对直径和峰高目测的误差和主观因素影响, 便于实现标准化自动化。但 SRID 和火箭电泳法影响因素少仍不失为实验室方便的方法。

二、Levy 在其 29 例 SIgA 的 pH 结果分析后认为 SIgA 检测与 pH 无关^[1], 根据本文 1064 例和普查 556 例^[3] SRID 法 SIgA 与 pH 结果说明, SIgA 的检测与 pH 关系十分密切, 受 pH 的制约。pH4.0 以下所有标本均不能检出, pH4.0 时胃癌标本可有检出, pH5.0 以上所有标本 SIgA 活量才稳定。

根据 150 例胃癌标本 SIgA 检出的 pH 分布, pH4.0 以上 115 例系低酸和无酸占全部胃癌病例的 76.67%。pH 测定方法简便易行, 且对高 pH 时酸度变化反映更灵敏, 仍不失为常用方法。本文这一比例与 HurSt 早年的数据和近年来国内 1007 例胃癌标本测定结果, 低酸和无酸占 75.2% (约 3/4) 的比例基本一致^[23, 24]。SIgA 仅在 pH4.0 以上胃癌可以检出, 所以不调正 pH SIgA 的阳性率就受到限制, 应对于低 pH 标本胃内调正后检测, 以进一步提高阳性率,

胃液酸硷度对胃癌诊断中的价值已多报道^[25], 作为 pH 指标同样具重要的价值^[26], 但 pH 只能帮助进行粗略的筛选, 如同时测定 SIgA (包括调正 pH 后的检测), 则 SIgA 阳性者系高度可疑病例, 应建议及时作 x 线及胃镜检查, 此种筛选在基层更为适用。

三、为了进一步明确 SIgA 抗胃蛋白酶

消化和酸降解的能力是有一定限度的，本文通过实验观察证实了临床实际检测结果，证明 SIgA 在 pH3.0 以下的正常胃液中可以被胃蛋白酶所消化和酸所降解，pH1.2~3.0 时胃蛋白酶活性 50~30μ 左右；pH5.0 以上胃蛋白酶活性降到 0，SIgA 可以稳定存在；pH4.0 时胃蛋白酶呈低活性(13μ 左右)，SIgA 可暂时存在，但仍然可逐渐被消化，仅胃癌病例可由于胃蛋白酶原缺乏 pH4.0 时可以测出 SIgA，因此 pH4.0 时检出 SIgA 无论其含量高低即应视为阳性对待，其他非癌和正常人均无检出。在缓冲液中对照可说明即使无胃蛋白酶 pH3.0 以下时 SIgA 也可以缓慢地被酸降解。这与日人赤保内良和报道在正常胃液中 pH3.0 以下加入精制的初乳 SIgA、CEA 等抗原物质即迅速被破坏相一致^[11]。因此胃液内检测蛋白或酶必须充分重视其 pH 的影响。

为了发现低 pH 时的胃癌病例(约占 1/4) 必须进行胃内 pH 调正至 5.0 以上。本文设计的胃内调正方法对 pH4.0 以下 64 份标本调正结果，胃癌标本调 pH5.0 以上 10 例，其 SIgA 检测全部阳性，这一现象有一定理论与实际意义。乳酸脱氢酶，B 蛋白等胃内调正 pH 的重复性也是稳定的^[32-33]，乳酸脱氢酶的 pH 有效范围是 6.0 以上，本方法是 5.0 以上，这二法可以互补以提高诊断效率。

四、SIgA 检测的临床意义：

(一)在对胃癌诊断中的价值：由于本方法经胃内调正后可以防止低 pH 胃癌病例的漏诊，总阳性率也提高到 94.4% 以上，作为筛选指标要求假阴性应尽量少来说是一较有效的筛选指标。也可以与其他方法协同作为胃癌的辅助诊断的方法，早期胃癌本文 SRID 法 6 例阳性 5/6，ELLSA 3 例全部阳性；准早期癌(中期或 p⁰ 癌)11 例 SRID 法阳性 10 例，ELLSA 4 例全部阳性。普查中 1 例早癌唯本法阳性。许多作者认为 SIgA 可能可用于诊断早期癌^[10,31,33]，经过本次证明似为

一可喜苗头。

(二)非癌病例中 SIgA 对癌前病变组包括中重度萎缩性胃炎(半肠化检出率为 74.2%，异型上皮灶增生阳性 4%，肠化与癌变关系密切，早癌合并肠化在 84.2% 以上^[31]，异型上皮灶是最重要的癌前期病变。国司研公等也已证明胃粘液中 Ig 含量在萎缩性胃炎，肠化、异型上皮灶增生、癌变中含量逐渐增高^[29-30]，本文测定胃液中 SIgA 的含量变化与其一致，所以 SIgA 的动态变化观察可能可以作为发现和监视“危险易感人群”，研究阻断措施，及时发现癌变的参考指标，这对于提高早癌诊断率也许具有重要的意义。

其次在非癌标本中萎缩性胃炎及残胃炎^[20] pH4.0 以上标本胃液 SIgA 阳性者 36.0% - 36.4% 由于壁细胞抗体(PCA)与高 pH 的相关性^[27]，铃木隆也证明 IgA 型 PCA 阳性组比阴性组胃液中 SIgA 含量高^[28]，故其 SIgA 本身部分可能就属于 IgA 型 PCA，对萎缩性胃炎发病机理的探讨和分型等也有一定参考意义。由于萎缩性胃炎的含量与胃癌有小部分交叉，SIgA 的特异性问题及其产生机制应进一步探讨，这部分病例的鉴别诊断应深入探索。

参 考 文 献

1. Mitchell Levy et al: Response of gastric IgA in patients with gastric Cancer, Cancer 39: 1991, 1975.
2. 卢玉韵、徐元仁、刘菊平、马力、相宝珍(等): 胃液 SIgA 检测在胃癌诊断中的实际意义 I. 631 例胃液标本检测结果报道同下胃癌资料: 41, 1981.
3. 马力、徐元仁: 胃液 SIgA 在胃癌诊断中的实际意义 II. 在一次普查中的应用. 参加第二次全国胃癌学术讨论会论文集 胃癌资料: 52, 1981.
4. Engvall Eet al: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Quantitative assay of immunoglobulin G. Immunochimistry, 8: 271-274, 1971.
5. Van Weerman B K and Schuur's A H W M: Immunoassay using hapten-enzyme conjugates.

FEBS Lettrs 24 : 77-81, 1972

6. Voller A et al: 酶联免疫吸附试验《医学情报资料》西安医研所情报室4-5: 23, 1979
7. Fngvall E et al: ELISA II quantitati ve assay of protein antigen IgG by means of enzymelabelled and antibodycoated tubes. Bichem. Biphys. 251: 427-434, 1971.
8. Hoffman D R: Estimation of serum IgE by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). J. Allergy. Clin. Immunol. 51: 303-307, 1973.
9. 刘育希 管毅等: 应用免疫酶法测定鼻咽癌病人的免疫球蛋白A抗体 中华肿瘤杂志1(1): 31, 1979
10. Lindh E: Increased resistance of immunoglobulin a dimers to proteolytic degradation after binding of secretory component J. Immunol. 114: 284, 1975.
11. 赤保内良和等: IgA-とくしこ分泌型IgAの定量と疾患臨床免疫10(7): 691-699, 1978.
12. 马力 郭春祥等: ELISA双抗体夹心法检测胃液SIgA诊断胃癌的初步探讨 待发表
13. 郭春祥等: 过氧化物酶标记羊抗人IgG抗体方法探讨 临床免疫与实验免疫 1(1): 39, 1980.
14. 陶义训等: 酶联免疫吸附测定的研究 中华检验杂志 3: 4, 1980.
15. 马恒之、王温: 《ELISA测定技术》p.37 洗涤液 1980.1.
16. 夕晨: 早期胃癌研究的新进展 北方医学3: 15, 1980.
17. 上海医化所: 尿胃蛋白酶的比色测定法 临床生化检验: 372, 1980.
18. 大连第一人民医院: 胃蛋白酶和凝乳酶试验 临床检验讲义: 278, 1973.
19. M Laskowski: Papsin. Biochemists 'Hand book (Edited by Cyrillong)p.298, 1961.
20. 包头市胃癌协作组: 良性胃病胃大部分切除后五年以上残胃状况, 随访研究. 包头医药4: 24, 1979.
21. vollrell A, Bidwell D H et al: Enzym. immunoassay in diagnostic medicine. Bull. W. H. O. 53(1-6): 55, 1976.
22. 吴灿理: 免疫酶测定法及其影响因素 医学情报资料 4-5: 81, 1978.
23. Lanren V et al: Stomach, gastric analysis. p. 447, 1971.
24. 实用肿瘤学编辑委员会: 胃癌诊断1007例胃癌病人胃液分析结果 实用肿瘤学第二册p.23, 1979.
25. 浙江医大第一附院: 胃酸测定对胃癌诊断的价值 全国胃癌协作组第一次会议论文集 15-19, 1978.
26. 福建胃癌普查队生化免疫组: 在胃癌普查中应用化学生免疫试验的初步评价 福建医药杂志95(2): 31, 1980
27. 北京三院消化研究室等: 北京地区慢性萎缩性胃炎免疫分型探讨 中华消化杂志1(1): 7-9, 1981.
28. 赤保内良和铃木隆等: 胃液内分泌型IgA的抗体活性关する研究日本: 消化器病学会杂志76(3): 772, 1979.
29. 国司研公有马晖聘, 等: 胃粘膜中のSecretory Componentよ免疫フロソの分布 日本消化器病学会杂志77(认): 706, 1980.
30. 酒井秀郎他等: Immunofluoresne sttudies in gastric mucosa-IgA and secretetory Component 日本消化器病学会杂志76(9): 1762, 1979.
31. 张荫昌等: 应用免疫学方法诊断肠化的研究 中华肿瘤杂志3(2): 81, 1981
32. 江苏肿瘤研究所: 胃液乳酸脱氢酶测定的临床应用 肿瘤防治15(1): 23, 1981.
33. 孔良曼等: 胃液中B球蛋白抗原的测定 临床免疫与实验免疫1(1): 43, 1980.
34. Thomas B: Secretory immunoglobulins. New. Eng. J. Med. 287(10): 500-506, 1972.
35. 谷内 昭: 胃癌よての关连病变にける局所免疫机构CEAの动向 日本消化器学会杂志76(3): 768, 1979.

A STUDY ON ELISA FOR DETECTING GASTRIC IgA IN THE DIAGNOSIS OF STOMACH CANCER-----Clinical Evaluation And pH Effect

Ma Li

(*Postgraduate of Microbiology*)

Sandwich technique was used and the positive rate for stomach cancer was 94.4% when patient's gastric juice was above pH 4. Experiments on the influence of pH on SIgA were done and the limitation of the resistance of SIgA against gastric acidity and pepsin was understood. Methods for the correction of pH in the stomach were presented. This method might be valuable for the diagnosis and early detection of stomach cancer most probably from the high risk group such as patients with atrophic gastritis accompanied by intestinal metaplasia, atypical hyperplasia, adenomatous polyps etc.