

• 临床检验研究论著 •

54 例轻链型单克隆免疫球蛋白血症的蛋白水平分析

颜绵生, 王松子, 廖慧芳

(中山大学附属第一医院检验科, 广东广州 510080)

摘要:目的 研究分析 54 例轻链型单克隆免疫球蛋白血症的体液蛋白特征。方法 利用免疫固定技术从 2 765 例单克隆免疫球蛋白血症中筛查出 275 例轻链型患者, 对其中 54 例患者进行血清蛋白电泳、尿液本-周蛋白、尿液蛋白定性、尿液蛋白定量以及尿液中轻链含量等检测。结果 54 例轻链型单克隆免疫球蛋白血症中, 属 κ 轻链型的有 24 例, 占 44%, 尿液中 κ 轻链含量为 (1.86 ± 1.77) g/L, κ/λ 值为 (277.22 ± 253.56) ; 属 λ 轻链型的有 30 例, 占 56%, 尿液中 λ 轻链含量为 (0.70 ± 0.58) g/L, κ/λ 值为 (0.03 ± 0.02) ; 54 例患者血清蛋白电泳中仅有 12 例在 $\alpha 2 \sim \gamma$ 区间有淡染的 M 带出现; 患者的尿液均呈本-周蛋白阳性, 其中 30 例尿蛋白定性呈阴性或弱阳性, 其余 24 例尿蛋白定性呈 $++ \sim 2+$, 尿蛋白定量为 $0.2 \sim 8.6$ g/L 之间。结论 轻链型单克隆免疫球蛋白血症患者血清蛋白电泳结果的 M 蛋白检出率低, 尿液中蛋白多为低浓度, 因此利用高灵敏度的免疫固定技术检测患者的血清及尿液中的游离轻链, 能够提高该病患者 M 蛋白的检出率。

关键词: 单克隆免疫球蛋白血症; 血蛋白质类; 免疫学技术

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.13.008

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)13-1649-02

Analysis of protein level in 54 patients with light chain type of monoclonal gammopathy

Yan Miansheng, Wang Songzi, Liao Hui Fang

(Department of Clinical Laboratory, the First Hospital Affiliated the Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong 510080, China)

Abstract: **Objective** To study and analyze body fluid protein characteristics of 54 patients with light chain type of monoclonal gammopathy. **Methods** Serum protein electrophoresis (SPE), qualitative and quantitative tests of urine protein were performed, urine bence jones protein (BJP) and light chain type of protein and so on, were determined in 54 cases from 75 cases of light chain type, which were screened out from 2 765 cases of monoclonal gammopathy patients with immunofixation electrophoresis (IFE). **Results** In 54 patients with light chain type of monoclonal gammopathy, there were 24 cases of κ light chain type, accounting for 44%, in which protein of κ light chain type was (1.86 ± 1.77) g/L, κ/λ value was (277.22 ± 253.56) in urine; 24 cases of λ light chain type, accounting for 56%, in which protein of λ light chain type was (0.70 ± 0.58) g/L, κ/λ value was (0.03 ± 0.02) in urine. In 54 patients with light chain type of monoclonal gammopathy, light M-band appeared in $\alpha 2 \sim \gamma$ regions in 12 cases with Serum protein electrophoresis. All urine samples were found BJP positive, of which 30 were found negative or weakly positive, and 24 positive $++ \sim 2+$ with urine qualitative test. Results of urine quantitative test were $0.2 \sim 8.6$ g/L. **Conclusion** The SPE detection rate of M protein is low in patients with light chain type of monoclonal gammopathy, which the urine protein content is mostly low concentration. Therefore, the M protein detection rate can be improved by detect free light chain in patients' serum and urine with highly sensitive IFE.

Key words: monoclonal gammopathy; blood proteins; immunologic techniques

单克隆免疫球蛋白血症(M 蛋白血症)是指血清中出现单克隆免疫球蛋白, 无论其是完整的免疫球蛋白或者游离的轻链, 甚至出现罕见的单克隆重链。M 蛋白血症常见于多发性骨髓瘤、原发性巨球蛋白血症、原发性淀粉样变性以及意义不明的单克隆丙种球蛋白血症等淋巴瘤细胞浆细胞克隆增殖性疾病。本文研究分析轻链型 M 蛋白血症的蛋白电泳特征及浓度水平, 以提高临床对于 M 蛋白血症的诊断水平。

1 材料与方法

1.1 一般材料 从 2 765 例单克隆免疫球蛋白血症中筛查出 275 例轻链型患者, 留取其中 54 例患者的血清和晨尿。患者均来自 2010 年 8 月至 2012 年 1 月中山大学附属第一医院的住院患者, 男 31 例, 女 23 例; 年龄 $34 \sim 78$ 岁, 平均年龄 55 岁。

1.2 仪器与试剂 血清蛋白电泳和免疫固定电泳(含本-周蛋白检测)所用的样本稀释试剂, 缓冲液及抗体, 包括抗 IgG、抗 IgA、抗 IgM 抗体, 抗 κ 、抗 λ 。Sebia Hydrasys 电泳仪均购自法

国 Sebia 公司; 轻链测定采用西门子 BNProSper 的化学发光分析仪(配套试剂); 尿蛋白定性检测采用日本 ARKRAY 公司的 AX-4280 尿液分析仪(配套试剂); 尿蛋白定量测定采用强生公司的 Vitros 5.1 FS 干式生化分析仪, 试剂用 DiaSys 德赛公司邻苯三酚红和钼酸盐法。

1.3 方法

1.3.1 血清蛋白电泳 取患者血清 $10 \mu\text{L}$ 按要求点于配套加样梳上, 经琼脂凝胶电泳后, 烘干、氨基黑染液染色、0.1% 冰醋酸褪色、烘干, 再褪色、烘干。

1.3.2 血清和尿液本-周蛋白电泳 患者血清用稀释液进行 4 倍稀释后(尿液不用稀释), 取 $10 \mu\text{L}$ 稀释血清按要求点于配套加样梳上, 经琼脂糖凝胶电泳后, 在每份标本的 6 条区带依次加固定液、抗 IgGAM、抗 κ 、抗 λ 、抗游离 κ 、抗游离 λ 试剂各 $12 \mu\text{L}$, 孵育 5 min(尿液 10 min)以固定并沉淀蛋白, 烘干、紫酸染液染色、烘干, 再褪色、烘干, 完毕后观察结果, 如果抗 IgGAM

阴性,抗 κ 或抗 λ 区带阳性,且在同一位置抗游离 κ 或抗游离 λ 区带阳性,则判断本-周蛋白电泳阳性。

1.3.3 按所用仪器和试剂要求分别测定 54 例患者尿液的 κ 和 λ 轻链含量、蛋白定量及蛋白定性,并计算出患者相对应的 κ/λ 值。

2 结 果

2.1 血清蛋白电泳 54 例患者血清蛋白电泳中仅有 12 例在 $\alpha 2\sim\gamma$ 区间有淡染的 M 带出现,如图 1 中的第 2、4、6、13 号等位置所示,其余各例的结果均没明显 M 带出现,如图 1 中的第 1、3、5、7……等号位置所示。

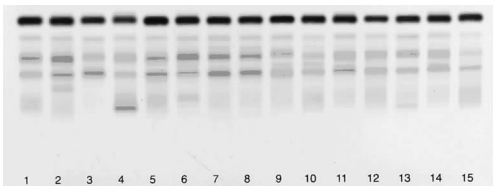
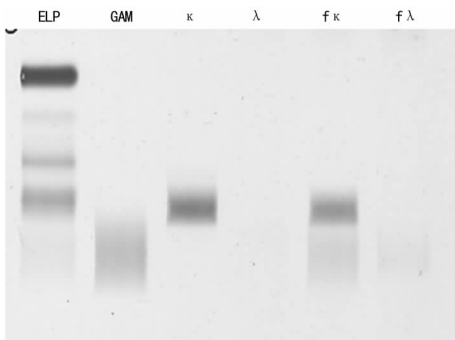


图 1 15 例轻链型单克隆免疫球蛋白血症的血清蛋白电泳图

2.2 血清和尿液本-周蛋白电泳 血清本-周蛋白电泳结果属 κ 轻链型(如图 2)的有 24 例,占 44%,属 λ 轻链型的有 30 例,占 56%;尿液本-周蛋白电泳结果全部呈阳性,见表 1。



ELP:加固定剂的区带;GAM:加抗 IgG、抗 IgA、抗 IgM 混合抗体的区带; κ :加抗 κ 轻链(包括结合型和游离型)抗体的区带; λ :加抗 λ 轻链(包括结合型和游离型)抗体的区带;f κ :加抗 κ 轻链(游离型)抗体的区带;f λ :加抗 λ 轻链(游离型)抗体的区带。

图 2 血清本-周蛋白电泳图(κ 型游离轻链阳性)

表 1 54 例轻链型单克隆免疫球蛋白血症患者的分型和蛋白分布

特征	n	百分比(%)
免疫固定后轻链分型:		
κ	24	44.0
λ	30	56.0
血清蛋白电泳可见 M 带:	12	22.2
尿液出现本-周蛋白:	54	100
尿液中蛋白定性分布:		
—~±	30	55.6
1+~2+	24	44.4
尿液中蛋白定量分布(克):		
0.2~1.0	28	51.9
1.1~3.0	22	40.7
3.1~8.6	4	7.4

2.3 各种蛋白的浓度与分布水平 24 例 κ 轻链型的患者尿

液中 κ 轻链含量为 $(1.86\pm 1.79)\text{g/L}$, λ 轻链含量为 $(0.006\pm 0.003)\text{g/L}$, κ/λ 值为 277.22 ± 253.56 ;30 例 λ 轻链型的患者尿液中 λ 轻链含量为 $(0.70\pm 0.58)\text{g/L}$, κ 轻链含量为 $(0.017\pm 0.016)\text{g/L}$, κ/λ 值为 0.03 ± 0.02 ;54 例患者血清蛋白电泳中仅有 12 例在 $\alpha 2\sim\gamma$ 区间有淡染的 M 带出现;患者的尿液均呈本-周蛋白阳性,其中 30 例尿蛋白定性呈阴性或弱阳性,其余 24 例尿蛋白定性呈 $+\sim 2+$,尿蛋白定量为 $0.2\sim 8.6\text{g/L}$,见表 1。

3 讨 论

B 淋巴细胞在成熟过程中,由于其特殊的 DNA 修饰可以造成双链 DNA 断裂点错误致染色体易位,导致多个基因的异常改变^[1],带有这些异常基因的浆细胞分泌产生异常的、无生理活性的单克隆免疫球蛋白(M 蛋白)或轻链、重链片段,这种蛋白进入血液即为 M 蛋白血症。根据重链和链链不同可将 M 蛋白分为 IgG、IgA、IgM、IgD 和 IgE 五类以及 κ 和 λ 两型。实验利用免疫固定技术从 2 765 例单克隆免疫球蛋白血症中筛查出 275 例轻链型患者,约占 10%,与国内报道^[2]的轻链型 M 蛋白血症约占 11%相当。54 例轻链型 M 蛋白血症见于多发性骨髓瘤、淋巴瘤及淀粉样变疾病,其中男性占 31 例,女性占 23 例;且 λ 型患者占 56%, κ 型患者占 44%。

目前,M 蛋白的检测方法主要是血清蛋白电泳和免疫固定电泳^[3],免疫固定电泳敏感度高,特异性好,是 M 蛋白定性的参考方法,广泛用于多发性骨髓瘤的分型诊断^[4]。但血清蛋白电泳对于 M 蛋白的筛查由于其敏感度不高而容易漏诊^[5],特别是对于血清中低含量的游离轻链型 M 蛋白,从研究的 54 例患者血清蛋白电泳图谱中仅 12 例在 $\beta\sim\gamma$ 区出现淡染的 M 带,实验中发现,有些轻链型的 M 蛋白其在血清蛋白电泳区带中出现的 M 带容易被 $\alpha 2$ 、 β 区带的其它蛋白所掩盖,给结果的判断带来一定的困难,因此其不能作为 M 蛋白的筛查方法。

尽管免疫固定电泳能作为 M 蛋白检测的首选方法,但对于加上轻链型抗血清的泳道出现 M 带,还不能对患者作出准确的分型,因为其有可能是游离轻链型的 M 蛋白,也不能排除是结合在 IgD 或 IgE 型 M 蛋白的轻链。本实验就是利用游离轻链抗血清对免疫固定电泳中仅在加上轻链型抗血清的泳道出现 M 带的患者,进行血清和尿液本-周蛋白电泳,结果显示 54 例患者血清和尿液本-周蛋白均呈阳性,但实验发现有 3 例患者血清本-周蛋白呈极弱阳性,而尿液中本-周蛋白则明显阳性,也就是说,对于轻链型单克隆免疫球蛋白血症的患者,检测其尿液中本-周蛋白显得尤为重要。而尿蛋白定性结果大多数呈 $\pm\sim 2+$ 之间,甚至有患者呈阴性,主要是干化学方法检测尿蛋白定性原理中,其对清蛋白敏感。而 93% 的患者尿蛋白定量介于 $0.2\sim 3.0\text{g/L}$ 之间,从尿液的本-周蛋白电泳图谱中可以结合各区带蛋白的染色深浅程度,大概判断各蛋白成分的存在是否及其浓度。轻链型单克隆免疫球蛋白血症的患者尿液中蛋白多数以本-周蛋白为主伴随一定量的清蛋白。

据文献报道,尿液中 κ/λ 值在 $0.75\sim 3.00$ 之间可排除单克隆轻链增多,当 $\kappa/\lambda<0.5$ 或 $\kappa/\lambda>5$ 时可以肯定尿中单克隆轻链增多,因此测定 κ 与 λ 的浓度并计算 κ/λ 的比值在 MM 的诊断上有重大意义^[6-7]。本研究中 54 例轻链型 M 蛋白血症中,属 κ 轻链型患者尿液 κ/λ 值为 277.22 ± 253.56 ,属 λ 轻链型患者尿液 κ/λ 值为 0.03 ± 0.02 ,结果显示 κ/λ 值远远偏离 $0.75\sim 3.00$ 范围。尿蛋白异常的患者包括肾病患者、结缔组织病患者、淋巴瘤患者等,尿液中 κ 与 λ 的浓度会增高,但一般不会超过 100mg/L ,而且是按一定比例增高(下转第 1655 页)

gistic 回归分析中的 *OR* 值为 4.172, 仅次于 SNP43, 提示其是 T2DM 发生的重要危险因素。一般认为, 随着年龄的增加, 肌肉组织含量逐渐减少, 脂肪组织含量逐渐增多, 摄取、储存和利用葡萄糖的能力均下降, β 细胞对内源性胰岛素刺激因子(如胰高血糖素、抑胃肽)的反应性降低、胰岛素抵抗激素的分泌增加; 这一定程度上提示年龄越大, 发生 T2DM 可能性越高。本结果显示年龄在单因素统计分析及多因素 Logistic 回归分析中均有统计学意义, 证实了上述观点。已有的研究提示, 受教育程度是糖尿病的保护因素^[25], 这可能与文化程度较高的人群, 掌握更多的预防保健知识, 更注重自我保健有关。本研究的 Logistic 回归分析结果未显示受教育程度与 T2DM 发病的相关性($P=0.053$, $OR=0.536$), 这可能与本次调查对象均为在医院就诊或进行健康体检的人群对糖尿病的知晓度较好有关, 下一步可扩大范围做进一步研究分析。

参考文献

- [1] WHO. Diabetes program. <http://www.who.int/diabetes/en>.
- [2] 刘杨, 刘英. 2 型糖尿病候选基因单核苷酸多态性的研究进展[J]. 中国医学科学院学报, 2006, 28(2): 294-297.
- [3] 中华医学会糖尿病学分会代谢综合征研究协作组. 中华医学会糖尿病学分会关于代谢综合征的建议[J]. 中华糖尿病杂志, 2004, 12(3): 156-161.
- [4] Gustincich S, Manfioletti G, Delsal G, et al. A fast method for high-quality genomic DNA extraction from whole human blood [J]. Biotechniques, 1991, 11(3): 298-302.
- [5] 纪立农, 陈陵霞, 韩学尧, 等. Calpain 10 基因多态性与中国人 2 型糖尿病遗传易感性的相关性研究[J]. 中国糖尿病杂志, 2002, 10(1): 7-10.
- [6] 邓梅香, 陈军建, 俞力, 等. 钙蛋白酶 10 基因 Indel-19 与 2 型糖尿病及胰岛素抵抗的关系[J]. 四川医学, 2008, 29(7): 832-834.
- [7] 褚志华, 张君, 袁红玲, 等. Calpain 10 基因与新疆维吾尔族 2 型糖尿病遗传易感性研究[J]. 石河子大学学报, 2009, 27(3): 312-316.
- [8] Horikawa Y, Oda N, Cox NJ, et al. Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus[J]. Nat Genet, 2000, 26(2): 163-175.
- [9] Saido TC, Sorimachi H, Suzuki K. Calpain: new perspectives in molecular diversity and physiological-pathological involvement [J]. FASEB J, 1994, 8(11): 814-822.
- [10] Sorimachi H, Ishiura S, Suzuki K. Structure and physiological

function of calpains[J]. Biochem J, 1997, 328(Pt 3): 721-732.

- [11] Carafoli E, Molinari M. Calpain: a protease in search of a function [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1998, 247(2): 193-203.
- [12] 李云春, 霍正浩, 赵巍, 等. Calpain-10 基因多态性与 2 型糖尿病遗传易感性的关联性研究[J]. 临床荟萃, 2005, 20(1): 12-15.
- [13] Hanis CL, Boerwinkle E, Chakraborty R, et al. A genome-wide search for human non-insulin-dependent (type 2) diabetes genes reveals a major susceptibility locus on chromosome 2 [J]. Nat Genet, 1996, 13(2): 161-166.
- [14] Seshiah V, Balaji V, Balaji MS, et al. Gestational diabetes mellitus manifests in all trimesters of pregnancy [J]. Diabetes Res Clin Pract, 2007, 77(3): 482-484.
- [15] Cox NJ, Frigge M, Nicolae DL, et al. Loci on chromosome 2 (NIDDM1) and 15 interact to increase susceptibility to diabetes in Mexican Americans [J]. Nat Genet, 1999, 21(2): 213-215.
- [16] Suzuki K, Hata S, Kawabata Y, et al. Structure, Activation, and Biology of Calpain [J]. Diabetes, 2004, 53(Suppl 1): S12-18.
- [17] Tsai HJ, Sun G, Weeks DE, et al. Type 2 diabetes and three calpain-10 gene polymorphisms in Samoans: no evidence of association [J]. Am J Hum Genet, 2001, 69(6): 1236-1244.
- [18] 王丹, 苏本利, 李昌臣, 等. Calpain-10 基因 43 位点单核苷酸多态性与 2 型糖尿病及胰岛素抵抗相关性的研究[J]. 中华糖尿病杂志, 2005, 13(3): 190-191.
- [19] 陈小盼, 宋钦华, 陈志斌, 等. 海南黎族 2 型糖尿病患者 Calpain-10 基因多态性的实验研究[J]. 临床荟萃, 2006, 21(14): 1000-1002.
- [20] 鲍丽雅, 谢渊, 单可人, 等. 钙蛋白酶 10 基因多态性与贵阳地区人群 2 型糖尿病的相关性研究[J]. 检验医学与临床, 2010, 7(16): 1691-1692.
- [21] American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes [J]. Diabetes Care, 2011, 34(Suppl 1): S11-61.
- [22] 孟雪晖, 余天强, 张小方. 2 型糖尿病危险因素病例对照研究 [J]. 疾病控制杂志, 2010, 14(7): 600-602.
- [23] 龙理良, 谭聪, 李风华, 等. 2 型糖尿病危险因素病例对照研究 [J]. 南华大学学报: 医学版, 2010, 38(2): 194-196.
- [24] 姜能俊, 杜书玉, 辛颖, 等. 糖尿病家族史对糖尿病发病及相关危险因素的影响 [J]. 山东大学学报: 医学版, 2010, 48(2): 4-6.
- [25] 邹宇华, 张弛, 张冬梅, 等. 2 型糖尿病危险因素的非条件 Logistic 回归分析 [J]. 中国慢性病预防与控制, 2004, 12(1): 12-14.

(收稿日期: 2012-12-28)

(上接第 1650 页)

的, 其比率维持正常。因此, 尿液 κ/λ 值的异常可预示尿液中单克隆轻链增多, 本实验 54 例患者尿液中本周蛋白全部呈阳性, 但 κ/λ 值的异常并不能用来准确判断患者尿液中是否出现本周蛋白, 因为有些患者尿液中并不出现单克隆游离轻链, 其 κ 或 (和) λ 浓度增高有可能是结合在单克隆免疫球蛋白重链上的轻链增高所致。因此, 研究认为, 血清蛋白电泳不能作为轻链型单克隆免疫球蛋白血症患者 M 蛋白的筛查实验, 只有利用免疫固定电泳技术检测血清和尿液本周蛋白, 才能对轻链型 M 蛋白作出准确的判断。

参考文献

- [1] 武淑兰, 孙士斌. 浆细胞病: 基础与临床 [M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2003: 130-133.

- [2] 侯健, 孔宪涛, 刘焱, 等. 337 例蛋白血症的血清免疫学特征 [J]. 中华检验医学杂志, 1997, 20: 102-104.
- [3] Dvid FK. Protein electrophoresis in clinical diagnosis [J]. London: Arnold, 2003.
- [4] 杨璐, 徐俊荣, 顾兵, 等. 免疫固定电泳技术对多发性骨髓瘤的分型诊断及预后判断价值 [J]. 检验医学与临床杂志, 2011, 8: 1975-1976.
- [5] 杨志钊, 杨山虹, 郭子文, 等. 本周氏蛋白电泳在 M 蛋白检测中价值的探讨 [J]. 中国热带医学, 2006, 6: 2180-2181.
- [6] Jon R, Jan O. The usefulness of quantifying kappa and lambda light chain [J]. Chin Chem, 1996, 32(5): 899.
- [7] 翟玉华, 张惠玲, 宿莉, 等. 血清免疫球蛋白轻链含量检测对 M 蛋白血症的论断意义 [J]. 临床血液学杂志, 2000, 13(4): 177-178.

(收稿日期: 2012-12-08)