

## 第 1 部分 免疫球蛋白游离轻链及其检测



第 1 章 简介

第 2 章 Dr Bence Jones 和 FLC 的历史

第 3 章 免疫球蛋白 FLC 的生物学特性

第 4 章 FLC 的检测方法

第 5 章 FLC 正常范围及参考区间

第 6 章 FLC 临床检测的比较

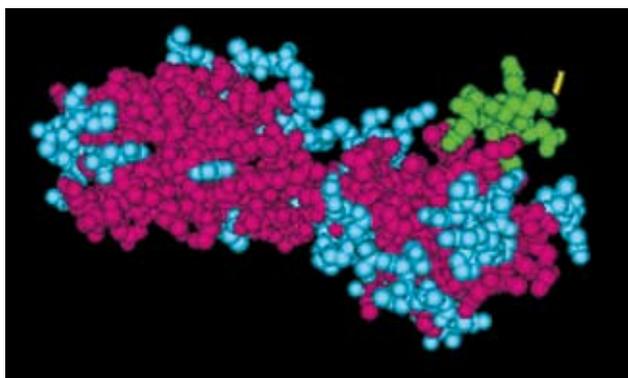


图 1.0 κ 型轻链分子的三维结构

第

1

章

第 1 部分 免疫球蛋白游离轻链及其检测

简介

多发性骨髓瘤 (multiple myeloma, MM) 多见于老年人, 年轻人也可发病, 临床表现多种多样, 以骨痛和骨折为主要临床特征, 也可表现为软组织浆细胞瘤, 患者可在几周内死亡, 也可较长时间稳定在冒烟期。患者可出现肾衰竭、急慢性感染或淀粉样变, 许多患者治疗上需要造血干细胞移植、大剂量化疗等。因此, 许多专家, 如血液学家、肾病学家、免疫学家、整形外科医师及病理学家等均开始研究此疾病的诊治问题。此外, 近年来多发性骨髓瘤的发病率缓慢增长, 同时生存期逐渐延长 (Katzel、Kumar<sup>[3]</sup>)。

尽管本病比较复杂, 但有一个特征像迷雾中的灯塔一样, 指引了多发性骨髓瘤的诊断和发病机制, 即单克隆免疫球蛋白的表达。150 年前, Henry Bence Jones 首次将这种过表达且具有千变万化的形状、大小的分子与多发性骨髓瘤联系在一起。作为肿瘤标志物, 虽然血清游离轻链 (free light chain, FLC) 检测已有一段历史, 但一直是有所缺陷的, 并且始终落后于其他领域的研究。

许多肿瘤的血清学试验是在已有的免疫检测和自动化的基础上完成的(表 1.1 为常见血清标志物的选择)。与之相比,多发性骨髓瘤和淀粉样变的试验是基于旧式的电泳技术。该技术敏感性低,试验者必须经验丰富,且劳动强度大。具有讽刺意味的是,第一个被发现的肿瘤标志物却是最后一个从现代技术中获益的。

表 1.1 一些常见的肿瘤标志物及其临床应用

肿瘤类型	肿瘤死亡率 (%)	肿瘤标志物	特异性	敏感性	肿瘤的查出	临床用途
肺 + 支气管癌	28	NSE	差	差	晚	差
结直肠癌	9	CEA	差	中等	晚	中等
乳腺癌	7	CA 15-3; CEA	差	中等	晚	中等
胰腺癌	6	CA 19-9; CEA	差	差	晚	差
前列腺癌	5	PSA	好	好	好	好
胃癌	2	CEA; CA 19-9	中等	中等	晚	差
卵巢癌	2.5	CA 125; PLAP	中等	中等	中等	好
肝癌	3	Alpha feto-protein ( $\alpha$ FP)	好	好	中等	好
骨髓癌	1.9	单克隆蛋白 /FLC	好	好	早	非常好
AL 型淀粉样变性	0.3	单克隆蛋白 /FLC	好	好	早	非常好
生殖细胞癌	~0.1	$\alpha$ FP; 绒毛膜促性腺激素	好	好	早	非常好
绒毛膜癌	< 0.1	绒毛膜促性腺激素	好	好	早	非常好
神经内分泌肿瘤	< 0.1	嗜铬素 A, 促胃液素	中等	好	早	非常好

注:除了单克隆蛋白外,所有的标志物均采用高度敏感的免疫检测方法。FLC = 游离轻链。

也许,应用上述技术检测 FLC 产生误差是不足为奇的。为什么要检测尿液中的 FLC 呢?很难想象尿液能作为检测 FLC 的理想标本。肾会阻止 FLC 和其他小分子蛋白质进入尿液,而且尿量多,获取和运送均不方便,且需要浓缩后分析。

一个可选择的策略是检测血清中的 FLC,1981 年的研究显示,当本周蛋白尿产生时(第 2 章),血清 FLC 浓度上升,并且在肾衰竭患者中,血清中的游离轻链检测要比尿中检测诊断更准确(Sölling<sup>[4]</sup>、Sinclair<sup>[1]</sup>)。那么为什么之前不开展血清 FLC 免疫检测呢?

主要问题在于难以克服交叉反应而找不到令人满意的抗体。最理想的检测血清 FLC 的方法不仅要有敏感性,即很低浓度也能测出,还要有特异性。血清 FLC 的浓度比结合在完整免疫球蛋白上的血清轻链的浓度要低,即使极少的抗体交叉反应也会产生不可接受的后果(Bradwell<sup>[2]</sup>、Katzmann<sup>[6]</sup>)。

直到现在才发现只针对 FLC 的隐藏位点的比较合适的抗体(第 4 章),这些抗体使得血清 FLC 的检测是特异的、敏感的和定量的。

## 血清 FLC 免疫检测的优点

- (1) 比目前的电泳分析技术更具有敏感性和准确性。
- (2) 疾病的监测可量化。
- (3) 血清样本方便取样。
- (4) 可鉴别传统试验无法鉴别出的 AL 型淀粉样变和非分泌型多发性骨髓瘤。
- (5) 对判定疾病完全缓解是更精确的指标。
- (6) 半衰期短，迅速评定疗效。
- (7) 可以作为意义未明和其他单克隆丙种球蛋白病患者的疾病进展的指标。
- (8) 能更好地筛查有症状患者。
- (9) 识别并监测骨髓瘤患者的肾疾病。

肿瘤标志物的临床应用已被规范化 (Chan)，以下是对于血清 FLC 临床应用的系统阐述 (Chan)。

**1. 有症状患者的鉴别诊断** 血清 FLC 有助于对有临床症状，如骨痛、骨折，有无法解释的肾功能损伤的患者进行鉴别诊断 (第 2 部分和第 4 部分)。

**2. 疾病的临床分期** 血清 FLC 浓度与单克隆疾病的进展有关，有助于评定治疗后的残留病灶 (第 10 章和第 12 章)。

**3. 评定肿瘤负荷** 在疾病诊断时，血清 FLC 浓度与肿瘤负荷相关性不大，但在治疗过程中，血清 FLC 浓度变化与肿瘤负荷变化是高度相关的 (第 2 部分)。

**4. 疾病的预后指标** 有证据表明，检测血清 FLC 对判断预后意义重大。已缓解无其他异常但 FLC 浓度高的患者有早期复发的风险。还可以作为判断意义未明的单克隆免疫球蛋白病 (monoclonal gammopathy of undetermined significance, MGUS) 预后的指标，最近的研究表明，单克隆 FLC 的升高是评定浆细胞疾病预后的敏感因素 (第 2 部分)。

**5. 评价疗效** FLC 检测对于 AL 型淀粉样变性、轻链型多发性骨髓瘤及非分泌型多发性骨髓瘤的疗效评价尤其有意义。同时研究表明，由于 FLC 半衰期短，可用于评价几乎全部单克隆球蛋白病患者的早期疗效，目前许多研究还在进行中 (第 2 部分)。

**6. 监测肿瘤复发** 血清 FLC 检测可用于监测疾病复发，尤其对 AL 型淀粉样变性、轻链型多发性骨髓瘤及非分泌型多发性骨髓瘤的患者较其他技术更加敏感，也适用于一部分分泌完整免疫球蛋白的多发性骨髓瘤患者和一些其他单克隆丙种球蛋白病的患者 (第 2 部分)。

**7. 筛查有症状的患者** 起初，有多发性骨髓瘤或相关疾病症状的患者通过血、尿电泳测出单克隆免疫球蛋白而被筛查出来，目前研究显示，血清 FLC 检测联合血清蛋白电泳和 (或) 血清免疫固定电泳，可以筛查出更多的患者，甚至可以取代尿 FLC 检测 (第 23 章和第 24 章)。

**8. 筛查一般人群** 证据表明，FLC 检测筛查出许多新的 MGUS 患者，这些患者既往被认为是健康人 (第 19 章)。事实上，轻链疾病和非分泌型多发性骨髓瘤患者可以通过血

清 FLC 的检测异常来判断疾病进展。成功的筛查试验的标准之一就是使被筛查出的人群受益。在这种情况下, FLC 检测是否成为成功的筛查试验还需要很多年后才会有答案。

另外, 鉴于血清 FLC 检测的敏感性、特异性, 许多诊断和监测多发性骨髓瘤、AL 型淀粉样变性及其他产生过多 FLC 的疾病的新的指南中加入血清 FLC 这一指标 (第 25 章)。

以后的章节中描述了本周蛋白的发现、FLC 的结构和合成以及血清 FLC 的定量检测。同时讲述了血清 FLC 检测在临床和实验室研究中的应用, 最后附注了临床及实验室应用指南。此外, 第 32 章附着了重链 / 轻链对的分析方法介绍 (Hevylite™)。这些新的免疫测定法能够测定每一类免疫球蛋白中不同类型轻链的浓度, 并提供一个可能有助于多发性骨髓瘤和其他浆细胞疾病诊断、分期和监测治疗反应的各种轻链的比例。



## 第2章

### 第1部分 免疫球蛋白游离轻链及其检测

## Dr Bence Jones 和 FLC 的历史

尽管本周 (Bence Jones) 蛋白已经是 FLC 的同义词，历史还是不会忘记参与这个发现的其他人 (Clamp、Rosenfeld、Kyle<sup>[3,4]</sup>、Hajdu)。

1845年10月30日，53岁的内科医师 William MacIntyre 去看望45岁的食品杂货商 Thomas Alexander McBean 先生，他患有严重的骨痛和骨折，之前他已由 Thomas Watson 医师照顾了数月。检查完后，William MacIntyre 注意到患者存在水肿，考虑到其可能患有肾病，因此检测了尿蛋白。让他惊讶的是，加热尿液时出现了蛋白质沉淀，而加热至75℃时沉淀即溶解。

William MacIntyre 和 Thomas Watson 医师都将尿样送往 St.Georges 医院分析，Thomas Watson 医师还附带以下描述：

亲爱的 Bence Jones：

这个试管中是很特殊的尿液，将它加热时会变混浊，加入硝酸后它开始沸腾，呈现淡红色，并转为澄清。但在冷环境下没有这种变化。加热能够改变它，它是什么？

以后的2个月里，这个患者病情恶化，变得消瘦、虚弱，疼痛加重并最终死于1846年1月1日。William MacIntyre 医师后来于1850年将患者尿液的研究分析结果发表，不幸的是，Henry Bence Jones (图2.1) 已经先他一步将患者的尿液结果分析发表至2份文献上，其中1份于1847年出版，他将此蛋白归于白蛋白变性。



A

B

图 2.1 Henry Bence Jones

Bence Jones 的地位确定了，而他同伴们的贡献却成为历史的附注。

对于 William MacIntyre 明显不公平的是，Henry Bence Jones 在职业生涯中获得了更多其他的益处，他发表了 40 多篇论文，变得富有、出名，并在他 33 岁的时候当选为皇家学会的研究员。弗洛伦斯·南丁格尔曾将 Bence Jones 描述为伦敦最好的医师。令人惊奇的是，在他的讣告中没有提及本周蛋白，并且一直到死后才应用他的名字命名该蛋白 (Rosenfeld)。

至 1909 年，共报道了 40 多例本周蛋白尿病例 (Weber FP)，1875 年 Waldeyer 首次认为，这种蛋白起源于骨髓浆细胞。1922 年 Bayne Jones 和 Wolson 通过向患者尿液中加入抗血清并观察沉淀物的反应，分析出了 2 种类型的本周蛋白，即 I 型和 II 型蛋白。然而直到 1956 年，Korngold 和 Lapiri 通过使用二维双向扩散技术显示出抗血清同时和骨髓瘤蛋白有反应，这 2 种类型的本周蛋白被称为  $\kappa$  和  $\lambda$ 。1962 年 Edelman 和 Gally 发现结合到单克隆免疫球蛋白 IgG 的轻链与本周蛋白相同。综上所述，从最初发现本周蛋白的功能到最终本周蛋白的确定一共花费了 117 年的时间。值得注意的是，关于尿液的研究在这一时期内一直没有变化。

以下描述来自 Levinson 和 MacFate 1946 年出版的教科书《临床实验诊断学》。

#### 本周 (Bence Jones) 蛋白试验

**原理：**室温和体温下本周蛋白在尿液中是可溶的，当尿液加热至 40℃ 时出现白色雾状物，加热至 60℃ 时出现沉淀，此沉淀在煮沸时消失，温度下降时又出现。加入醋酸或盐会使沉淀溶解。

**试剂：**10% 乙酸水溶液。

**步骤：**将尿液加入 6 英寸 (15cm 左右) 长的试管中至 2/3 处，再放入水箱中缓慢加热，注意不要让试管底部接触烧杯底部，在水箱中悬浮一个温度计，每隔几分钟观察温度计及尿液变化情况，尤其当温度处于 40~60℃ 时。若尿液加热至沸点 100℃ 时出现少量的雾状物，加入少量乙酸溶解分离出的磷酸盐。若沸点时出现沉淀物，此沉淀物即为蛋白质。加入少量乙酸煮至沸腾，迅速过滤。在冷的尿液中重复此试验。

**解释：**多发性骨髓瘤、骨肉瘤、软骨瘤及癌症患者的尿液中可发现本周蛋白。

在对于本周蛋白的临床和科学观察中，电泳技术已被用来在临床试验中分离蛋白质。Longsworth 等 1939 年在多发性骨髓瘤患者的电泳凝胶中看见一尖峰。20 世纪五六十年代，电泳从以纸膜为基质发展为纤维醋酸膜为基质。最终，IFE 法于 20 世纪 80 年代被最终建立 (Whicher)。

应用特异性抗体可以将  $\kappa$  和  $\lambda$  分子清楚地区分，最初使用免疫扩散法 (Ouchterlony)，1953 年开始使用免疫蛋白电泳法 (Graber)，后来应用放射免疫弥散法、比浊法等。然而本周蛋白的血清检测 (血清 FLC) 仍不能实现，因为所有抗体均不能区分游离轻链和结合在免疫球蛋白上的结合轻链。

最初成功的检测血清 FLC 是在 1975 年，采用色谱技术 (Sölling<sup>[1, 2]</sup>、Cole)，按分子

质量大小分离血清后，再检测 FLC，尽管该法具有较高的敏感性和准确性，但是在临床工作中难以开展常规检测。后来的分析集中在开发能够发现 FLC 分子隐藏位点的抗体。这些隐藏位点位于完整的免疫球蛋白重链和轻链的接触面上，当 FLC 被释放时可测出。20 世纪 80 年代开始为提高特异性采用单克隆抗体检测 FLC，但是检测试剂难以满足临床需要，而且单克隆抗体检测只限于放射免疫法和酶免疫法。20 世纪 90 年代中期开始采用免疫比浊法，使用多克隆抗体检测血清 FLC，可以应用多克隆 FLC 抗血清进行放射性免疫检测法来分析尿液样本，但对于血清样本，其特异性仍不够 (Robinson、Brouwer)，同时由于 FLC 易形成多聚体而导致检测结果不准确 (Sölling<sup>[4]</sup>、Heino)。

单克隆抗体的应用很大程度增加了其特异性，但很难找到令人满意的试剂 (Ling、Axiac、Nelson 和 Abe)，同时在其应用到放射免疫及酶联免疫检测中也受到限制，应用多克隆抗体来开发比浊法及乳胶增强比浊法检测已经做了很多尝试 (Hemmingsen<sup>[1]</sup>、Tillyer)，但它们无法检测到正常血清水平的 FLC，由于其与完整免疫球蛋白发生交叉反应，因此，也无法应用。在 2001 年，以多克隆抗体为基础的免疫检测法最终发展成可以检测正常血清水平的 FLC (Bradwell<sup>[2]</sup>)。这些方法被应用后，在许多曾被归为非分泌型多发性骨髓瘤 (non secretory multiple myeloma, NSMM) 的患者血清中检测到了单克隆的 FLC (Drayson<sup>[2]</sup>)。此外，《柳叶刀》杂志曾提到过所有伴有本周蛋白尿的轻链型多发性骨髓瘤 (light chain multiple myeloma, LCMM) 患者其血清 FLC 也是升高的 (Bradwell<sup>[1]</sup>)。血清 FLC 检测在监测微小残留病灶方面优于尿 FLC 检测。进一步的研究表明，血清 FLC 检测可以用来筛查有症状的患者 (第 23 章)，比 FLC 检测更敏感 (第 24 章) 并且是 MGUS 的预后指标 (第 19 章)。

随着血清 FLC 免疫检测的广泛应用，标志着本周蛋白和本周蛋白尿的故事在发现后的 165 年落下帷幕。

### 问题

1. 谁是第一个发现本周蛋白尿的人?
2.  $\kappa$ 和 $\lambda$ 是如何命名的?

### 答案

1. William MacIntyre 医师在 1845 年发现。

2. 是用 Komgold 和 Lapiti 的首字母命名的，他俩于 1956 年指出轻链位于免疫球蛋白分子上。



## 第1部分 免疫球蛋白游离轻链及其检测

## 第3章

## 免疫球蛋白 FLC 的生物学特性

## 3.1 结构

## 3.3 产生

## 3.2 合成

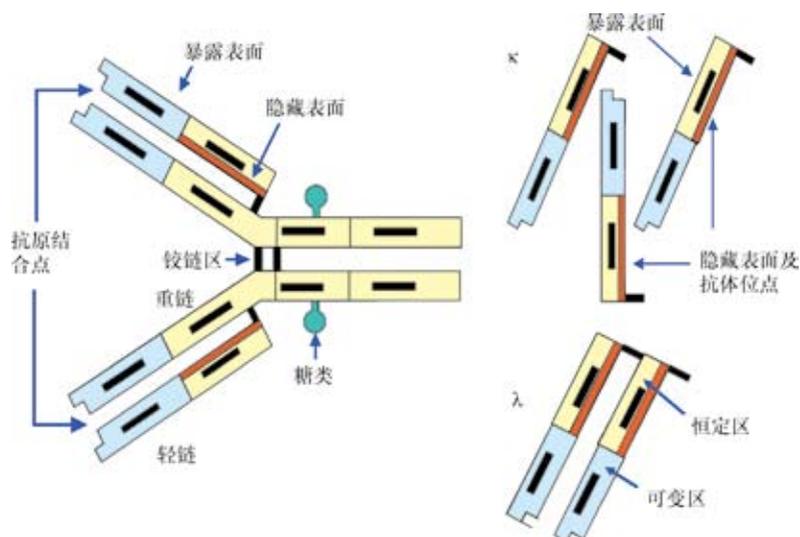
## 3.4 清除和代谢

## 概要：血清 FLC

1. 由浆细胞产生。
2. 由于很快被肾清除，故半衰期仅为数小时。
3. 在远端肾小管中与 T-H 蛋白结合，可能影响尿液排出。
4. 由于肾代谢因素，其在血清中比尿液中更常出现浓度不正常。
5. 包括隐藏在完整免疫球蛋白中的恒定区抗原决定簇。

## 3.1 结构

抗体分子左右对称，由两条完全相同的重链和两条完全相同的轻链组成，每条重链和轻链都含有可变区和恒定区，重链和轻链的可变区共同形成抗原决定簇，所以抗体的特异性由重链和轻链共同决定。轻链有2种类型： $\kappa$ 和 $\lambda$ 。每种抗体只能有一种类型的轻链，不能同时拥有2种。人体中产生的 $\kappa$ 链大约是 $\lambda$ 链的2倍，但在其他哺乳动物中这个比例有所不同。每条轻链的单个多肽链上含有220个氨基酸，折叠形成恒定区和可变区（图3.1和图3.2）。

图3.1 抗体分子的重链和轻链结构以及游离 $\kappa$ 和 $\lambda$ 链

结构域由两个  $\beta$  片层组成,  $\beta$  片层由几股多肽链 ( $\beta$  链) 折叠一起而形成, 是蛋白质结构的基本组成成分。片层间由二硫键连接, 共同形成桶样结构, 称为“ $\beta$  桶状”(图 3.2)。

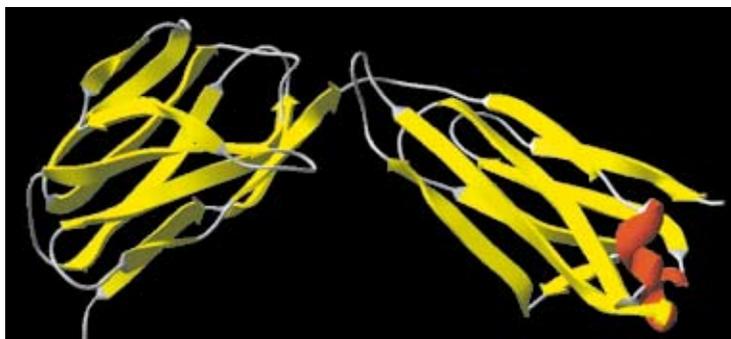


图 3.2 左边是  $\kappa$  FLC 分子的恒定区, 右边是可变区以及它的  $\alpha$  螺旋结构 (红色部分)  
(J Hobbs 授权)

每个游离轻链由一个包含可变区 (VL) 的 N 端结构域和一个包含恒定区 (CL) 的 C 端结构域组成。这些结构域通过 J 基因片段相连接。大多数的变异发生在 V 区域的高变区 (CDR)。编码抗体的基因在 B 淋巴细胞中通过与生殖细胞和其他类型的体细胞相距甚远的 DNA 片段连接完成组装。基因组中的每个 V 和 J 区域基因与一个单独的 C 基因结合。因此, 免疫球蛋白基因的不同取决于用了哪个 V 区域和哪个 J 区域 (Singer)。

除了  $\kappa$  型轻链的 3 种 Km 同种异型 (表 3.1) 和  $\lambda$  型轻链的 Mcg, Oz 和 Kern 同种型存在氨基酸替换外, 轻链恒定区的变化很小。而可变区有很大的结构差异, 是抗原特异性结合的部位。第一个可变区的前 23 个氨基酸具有一定的差异, 根据此差异将之分为不同的亚群。使用单克隆抗体可以检测出 4 个  $\kappa$  型 ( $V_{\kappa_1} - V_{\kappa_4}$ ) 和 6 个  $\lambda$  型 ( $V_{\lambda_1} - V_{\lambda_6}$ ) 的亚型 (Solomon<sup>[1]</sup>)。特定亚型的结构可影响 FLC 的多聚化能力, 例如 AL 型淀粉样变性与  $V_{\lambda_6}$  有关, LCDD 与  $V_{\kappa_1}$  和  $V_{\kappa_4}$  有关。

表 3.1 氨基酸在  $\kappa$  恒定区的替换

同种异型	氨基酸	
KM1	Val (153)	Leu (191)
KM1,2	Ala (153)	Leu (191)
KM3	Ala (153)	Val (191)

### 3.2 合成

$\kappa$  型 FLC 分子 (2 号染色体) 是由 40 个功能性  $V_{\kappa}$  基因片段、5 个  $J_{\kappa}$  基因片段和 1 个  $C_{\kappa}$  基因片段构成,  $\lambda$  型 FLC 分子 (22 号染色体) 由大约 30 个  $V_{\lambda}$  基因片段、4 对功能性  $J_{\lambda}$  基因片段和 1 个  $C_{\lambda}$  基因构成 (图 3.3)。

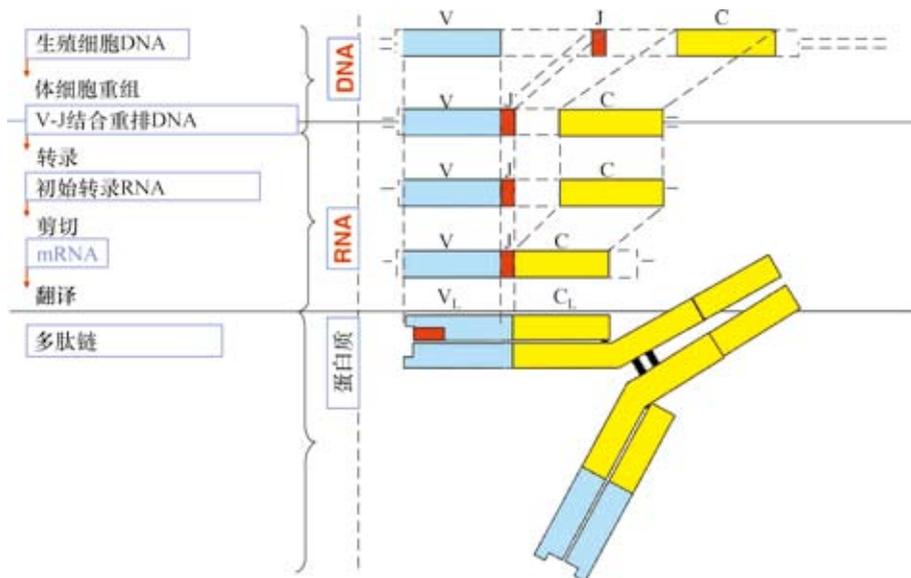


图 3.3 轻链的结构

FLC 在 B 淋巴细胞发育过程中整合入免疫球蛋白分子, 并且初期表达在未成熟 B 细胞表面。FLC 的产生贯穿于 B 细胞发育后期, 在浆细胞中分泌达到高峰。与 B 细胞不同成熟阶段有关的肿瘤将分泌单克隆 FLC 到血清中, 它们可以被 FLC 免疫检测法检测出来 (图 3.4 和第 18 章)。

### 3.3 产生

正常个体的骨髓和淋巴细胞每天约产生 500mg FLC (Solomon<sup>[1]</sup>, Waldman)。FLC 进入血液后迅速分布到血管内和血管外间隙中。正常浆细胞在骨髓中的含量约为 1%, 而多发性骨髓瘤患者的骨髓中浆细胞可升高至 90% 以上, 慢性感染和自身免疫病患者的骨髓可含有 5%~10% 的浆细胞, 这与高丙种球蛋白血症有关, 且血清多克隆 FLC 的浓度也相应增加。在诊断多发性骨髓瘤中, 通过骨髓组织学检查找到单克隆浆细胞是必要的, 通常基于直接免疫荧光技术检测细胞内  $\kappa$  链和  $\lambda$  链 (图 3.5)。

每个浆细胞产生 5 种重链中的 1 种以及  $\kappa$  或  $\lambda$  型轻链, 组成完整免疫球蛋白分子后大约有 40% 轻链剩余。上面已经提到  $\kappa$  链的产生约是  $\lambda$  链的 2 倍, 并且  $\kappa$  型 FLC 常为正常单体, 而  $\lambda$  型 FLC 易形成二聚体, 两种轻链均可形成多聚体 (图 3.6)。

### 3.4 清除和代谢

在正常个体中, 血清 FLC 可被肾迅速清除和代谢。单体 FLC, 即典型的  $\kappa$  链, 2~4 小时内以 40% 的肾小球滤过率被清除。二聚体 FLC, 即典型的  $\lambda$  链, 以 20% 的肾小球滤过率在 3~6 小时内被清除, 多聚体则清除较缓慢。在伴有肾衰竭的多发性骨髓瘤患者中, FLC 的清除会延长至 2~3 天 (第 13 章) (Solomon<sup>[1]</sup>、Waldman 和 Miettinen)。与之相对

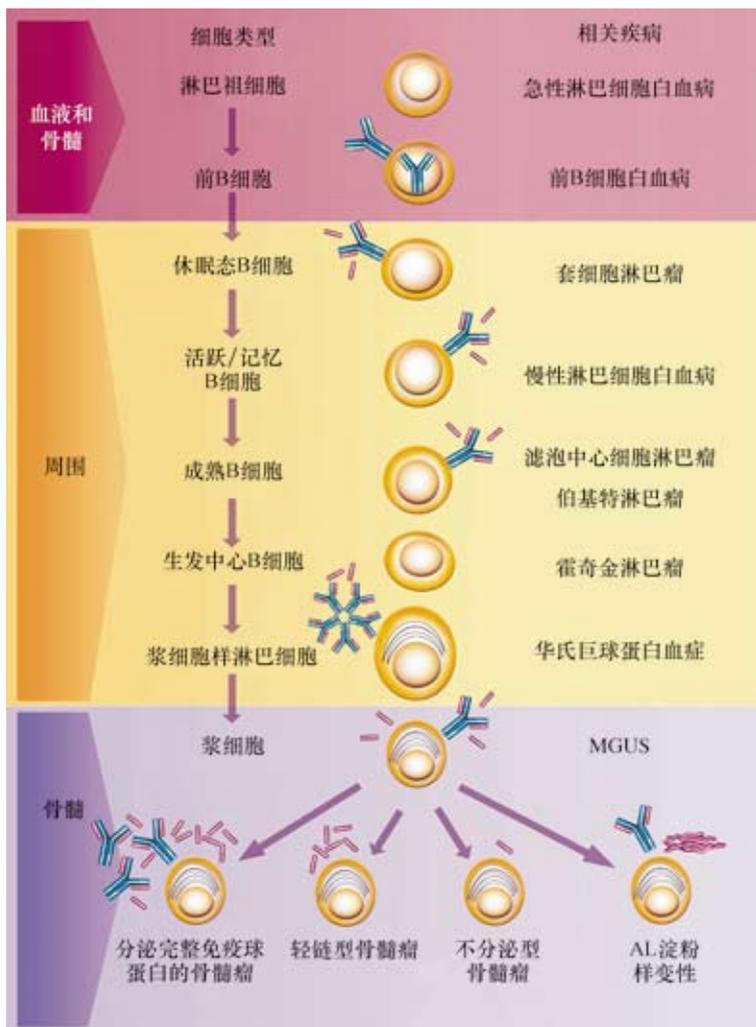


图 3.4 B 细胞系的演变发展及其相关疾病

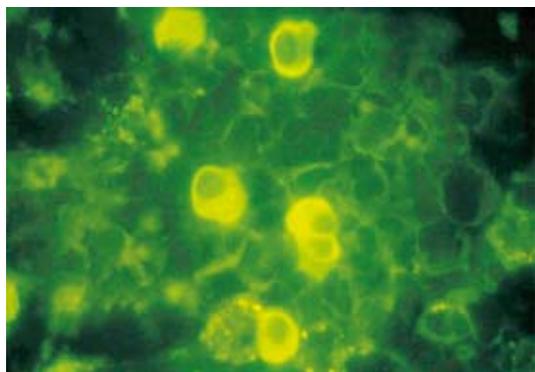


图 3.5 利用荧光素和抗  $\kappa$  血清对 1 例 MM 患者的骨髓浆细胞产生的  $\kappa$  链进行免疫化学染色，可见到 5 个浆细胞

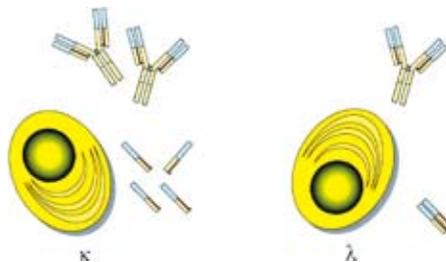


图 3.6 浆细胞产生完整免疫球蛋白和 FLC 分子的示意图

的是, IgG 的肾清除率最低, 其半衰期长达 21 天 (第 10 章)。

图 3.7 显示的是 1 个肾单位, 每个肾中约含有 50 万个肾单位。每个肾单位包含 1 个肾小球, 其基底膜允许血清中的分子滤入近端肾小管中。基底膜孔的大小不同, 其限制通过的分子相对分子质量大小从 20 000~40 000, 最大不超过 60 000。通过肾小球基底膜孔的蛋白质分子或以原型被吸收 (如清蛋白), 或是在近端肾小管中降解, 然后以碎片的形式被吸收或排泄 (Russo)。这种吸收途径很重要并且可以阻止大量蛋白质和肽在尿液中丢失。它是非常高效的, 每天能够处理 10~30g 小分子蛋白质, 所以正常情况下, 近端肾小管以外不会有蛋白质出现 (Abraham GN、Wochner 和 Maack)。

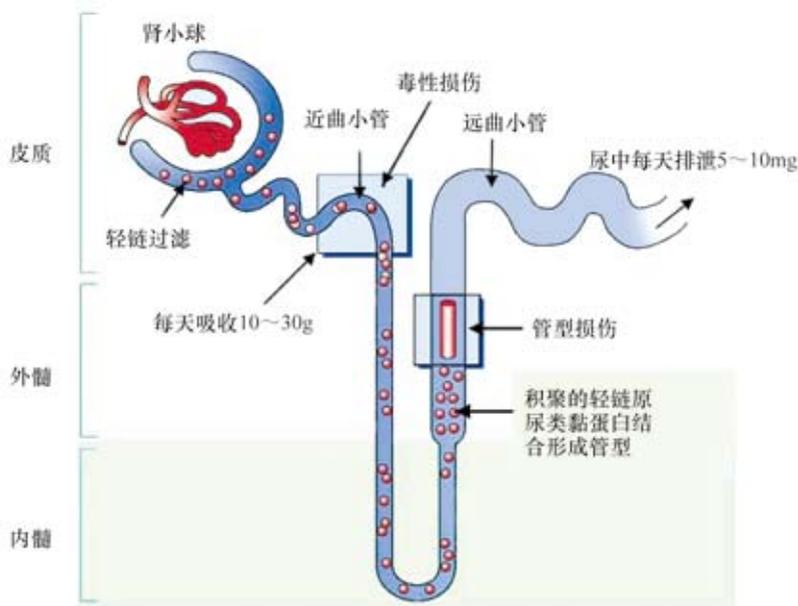


图 3.7 肾单位如何滤过、代谢和排泄 FLC

远端肾小管分泌大量尿类黏蛋白 (Tamm-Horsfall protein, T-H 蛋白)。它是正常尿液中的重要蛋白质, 对防止尿路感染有重要作用。小的糖蛋白聚集形成 20~30 个分子的聚合物。有趣的是, 它包括一个与 FLC 特异性结合的短肽链位点 (Ying)。它们在一起形成蜡状管型, 而蜡状管型可以特异性存在于轻链型多发性骨髓瘤合并肾衰竭的患者中 (图 3.8、图 3.9 和第 13 章) (Sanders<sup>[1,2]</sup>)。

在正常个体中, 尿液每天排泄 1~10mg 的 FLC。准确的来源不确定, 但可能是通过远端肾单位和尿道的黏膜表面随分泌的 IgA 一起混入尿液。这是一种防止感染物质进入人体的黏膜防御机制。正常淋巴系统每天产生约 500mg FLC, 通过肾小球并完全由近端肾小管处理 (Russo)。

如果肾单位的近端肾小管被损坏或压力增大, 滤过的 FLC 将不能完全代谢 (例如, 剧烈活动), 其中少量进入尿液。尽管作为肾功能和肾小球滤过功能的重要指标, 血肌酐和半胱氨酸抑制酶 C 也不能测出这种微弱的肾功能损伤。



图 3.8 显示的是一个多发性骨髓瘤患者尿中的蜡状管型

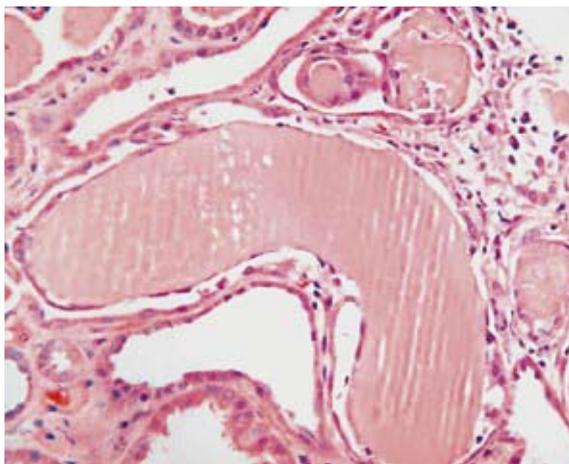


图 3.9 显示的是骨髓瘤患者肾的远端肾小管中用抗  $\kappa$  抗体免疫过氧化物酶染色的单克隆 FLC

$\kappa$  型 FLC 单体由于较小，其清除速度比二聚体  $\lambda$  分子快 3 倍，尽管生成  $\kappa$  型 FLC 的速度是  $\lambda$  型 FLC 的 2 倍，但由于它清除速度更快，实际上其在血清中的浓度约比  $\lambda$  型 FLC 低 50% (第 5 章和第 20 章)。

由于近端肾小管强大的重吸收功能，即使 FLC 的生成有一定程度的增加，如果肾功能正常，尿中也不会出现 FLC。尿中 FLC 的含量更依赖于肾功能。血清和尿中 FLC 浓度变化在 LCMM 进展过程中是不同步的。图 3.10 为一名假设的患者，红线显示 LCMM 患者在最初 12 个月中，血清 FLC 浓度随着疾病进展而稳定升高。疾病初，FLC 每天合成超过 10~30g 时，会出现溢出性蛋白尿，大量 FLC 进入尿中。

当 FLC 产生过多，近端肾小管无法全部处理时，即进入远端肾小管导致炎症或产生沉淀，从而阻碍尿液排出，导致多个肾单位衰竭 (图 3.8、图 3.9 和第 13 章、第 20 章)，血清 FLC 浓度逐渐升高，并通过剩下尚未受损的肾单位滤过，导致了加速肾损害的恶性循环，从而产生更多的 FLC。

这个过程延长了血清中 FLC 的半衰期，所以相应增加了 FLC 的浓度，与此相对的是，当患者发展为终末期肾衰竭时，尿中 FLC 浓度下降，并且进入无尿期后，FLC 浓度会下降为零 (图 3.10)。因此，血清和尿液中的 FLC 浓度在疾病晚期是分离的。当血清中 FLC 浓度增加时提示疾病进展，尿中 FLC 浓度降低会让人错误地认为疾病稳定或改善。因此，Nowrousian 等认为，存在严重肾损伤时尿中 FLC 分泌降低而血清 FLC 浓度增高。相反，肿瘤治疗有效时可降低管型尿，增加肾流量，同时尿中 FLC 浓度会增高。

了解 FLC 的肾毒性以及 FLC 在血清和尿液的浓度变化是很重要的。从生理学和病理学角度可以得出的结论是，对于有单克隆 FLC 疾病的患者，检测血清 FLC 比尿液更可取。

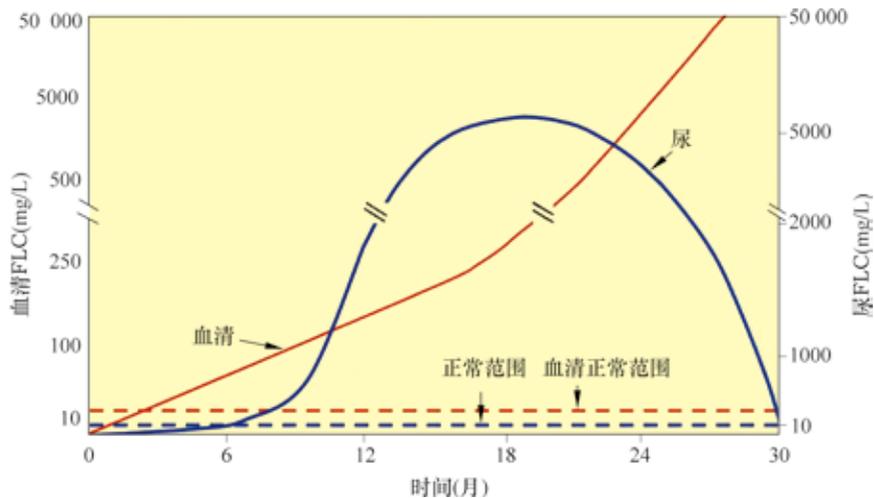


图 3.10 一名 LCMM 患者的疾病发展过程中血清和尿液中 FLC 浓度的变化

**问题**

1. 本周蛋白尿是溢出的、肾小球性还是肾小管性的?
2. 血清IgG和血清FLC的正常半衰期是多少?
3. 肾病综合征伴大量蛋白尿的患者血清白蛋白浓度会下降,那么在这种情形下血清FLC浓度也降低吗?
4. 哪种蛋白质在远端肾小管中与FLC结合?
5. 血清FLC浓度增加时,尿中FLC浓度也相应增加吗?

**答案**

1. 是溢出的蛋白尿。
2. IgG是21天,血清FLC是2~6小时。
3. 不降低。任何原因导致的肾损伤时,由于肾小球滤过率降低,血清FLC浓度将增高。
4. 尿类黏蛋白或T-H蛋白。
5. 不会。如果有明显的肾损伤,尿中FLC分泌量下降。



# 第4章

## 第1部分 免疫球蛋白游离轻链及其检测

### FLC 的检测方法

- 4.1 引言
- 4.2 FLC 的免疫检测
- 4.3 应用不同仪器进行检测的比较
- 4.4 不同血清 FLC 免疫检测方法之间的比较
- 4.5 抗 FLC 血清及试剂盒的质量控制
- 4.6 增加抗血清的制备

#### 概要：FLC 免疫检测的特征

1. 对血清和尿 FLC 检测高度特异。
2. 敏感性是血清蛋白电泳的 1000 倍。
3. 比蛋白电泳检测更精确。
4. 提供定量检测结果。
5. 常规的实验设备即可检测。

#### 4.1 引言

检测尿中单克隆 FLC 的方法有很多（表 4.1），例如，蛋白沉淀法是一种简单的检测方法，但其敏感性和特异性均差，而其他方法像免疫固定电泳（immunofixation electrophoresis, IFE）敏感性虽强，但操作烦琐且检测结果难以判读。

#### 理想的 FLC 检测方法应具备以下特点：

- 能够敏感地鉴定出所有产生单克隆 FLC 的患者。
- 能够对 FLC 和  $\kappa/\lambda$  值进行定量，用以监测患者病情。
- 高度敏感，不受完整免疫球蛋白的干扰。
- 价格便宜，结果易于判读。
- 检测血清中的 FLC（第 3 章）。
- 能在多种实验室仪器上进行（27 章）。

表 4.1 列出一些符合以上要求的常用检查方法。每种检测方法在一定程度上均有令人满意的优点，但所有方法都检测不到在正常范围内（3~25mg/L），甚至高于正常浓度范围数倍的血清 FLC。纤维素试纸法以染料的吸取为基础，不能用于检测含有阳离子的蛋白，如 FLC。

表 4.1 不同 FLC 检测方法的比较

方 法	优 点	缺 点
尿蛋白总量检测	简单、便宜、应用广	检测 FLC 敏感度差
尿纤维素试纸法	简单、便宜、应用广	检测 FLC 敏感度差
血清蛋白电泳 (serum protein electrophoresis, SPE)	简单、方法成熟、便宜, 可见单克隆带, 可扫描定量	不敏感 (<500~2000mg/L) FLC 浓度低时检测不到, 结果有主观性
尿蛋白电泳 (urinary protein electrophoresis, UPE)	方法成熟、简单, 手动或半自动操作、便宜, 可见单克隆带、浓缩尿敏感 (<10mg/L)、可扫描定量	主观性分析, 需要浓缩尿液, 可能有蛋白丢失, 出现假阳性带, 尿蛋白浓度过高时会影响结果, 需 24 小时留尿
血清和尿的 IFE	方法成熟、血清敏感度好, 对浓缩尿尤佳 (5~30mg/L)	不能定量, 血清敏感度差 (~150mg/L), 手动或半自动技术, 抗体昂贵
毛细管区带电泳	自动技术、可定量	敏感度 (~400mg/L) 弱于 IFE
血清总 $\kappa/\lambda$ 值检测	自动免疫检测	对于 LCMM 特异性差

参考文献: 1 (Fine), 2(Penders), 3(Ala-Houhala), 4(Lindstedt), 5(Bailey), 6(Harrison), 7(Hess), 8(MacNamara), 9(Brigden<sup>[1]</sup>), 10-12(Bossuyt<sup>[1-3]</sup>), 13(Katzmann<sup>[5]</sup>), 14(Boege).

针对以上检测方法的特异性和敏感性不强的问题, 以应用抗体为基础的免疫检测方法成为一种现代的解决方案。下面将叙述血清 FLC 免疫检测方法的发展及不同的检测仪器对此检测方法的验证。

## 4.2 FLC 的免疫检测

### A. 多克隆抗血清和单克隆抗体

FLC 抗体的高度特异性和高亲合力是很重要的。早期的 FLC 免疫检测方法 (第 5 章) 应用的是多克隆抗血清, 很难达到很好的特异性。单克隆抗体 (Mabs) 显然可以解决这个问题, 然而, 我的同事在伯明翰大学免疫学实验室经过努力, 还是很难识别所有单克隆 FLC 的抗体, 其他报道的 Mabs 也因为同样的原因而无法很好地应用于临床。此外, Mabs 不能应用比浊法检测, 因为它们不能形成免疫沉淀, 所以需要酶联免疫检测 (或类似的类型)。这些三步检测法需要较高的血清稀释并且需要很长时间来操作。因此, 与免疫球蛋白检测相比, 它们不作为临床检测的常规项目。

在实际工作中, 我们更重视多克隆 FLC 抗血清的优化, 以下是成功制备多克隆 FLC 抗血清步骤的流程。很多具体的步骤由于专利权无法提供, 但可以总结如下: 用从含本周蛋白的尿液中纯化的  $\kappa$  或  $\lambda$  分子给绵羊接种, 用 IgG、IgA、IgM 单克隆蛋白吸附接种后产生的抗血清, 然后利用固定于琼脂糖凝胶上的 FLC 混合物进行亲和纯化。通过以下检测判定抗血清是否需要进一步吸附, 不断进行吸附和检测, 直至结果令人满意为止。

### B. 抗血清的特异性

特异性是免疫检测最重要的特点, 可用以下方法评价。

1. 免疫电泳 抗体不断地被纯化直至应用免疫电泳方法检测与另一种 FLC 和完整的免疫球蛋白分子之间无交叉反应为止 (图 4.1)。

2. **Western blot 分析** 这种敏感的方法被用来评价抗血清与免疫球蛋白片段及

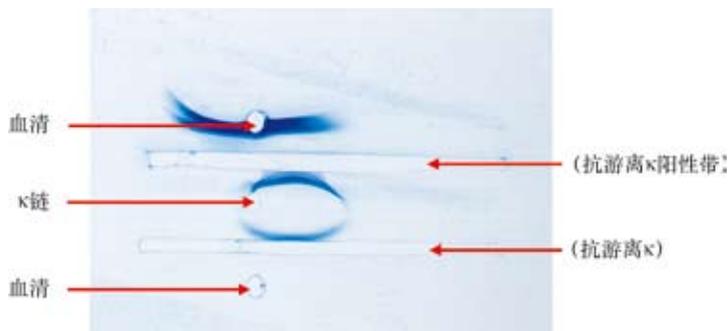


图 4.1 免疫电泳检测  $\kappa$ FLC 血清的特异性

FLC 多聚体的反应能力。结果显示， $\kappa$  和  $\lambda$  型 FLC 抗血清均能与在相对分子质量 25 000~30 000 的两条接近的移动条带发生强烈的反应，而与其他大或小分子片段却反应很弱。采用单克隆抗体可得到类似结果。抗 FLC 血清可被用来检测  $\kappa$  和  $\lambda$  型 FLC 的单体和二聚体（图 4.2）。

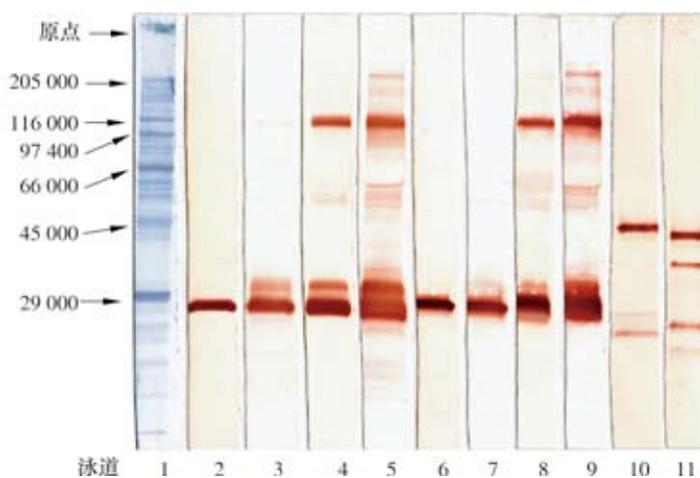


图 4.2 Western blots 比较分析：多克隆抗 FLC 血清、单克隆抗体对（非还原）SDS-PAGE 分离出的 FLC 单体和二聚物反应的特异性

1: 相对分子质量标记; 2,3: 含  $\kappa$  FLC 的尿液; 4,5: 正常标本, 均与单克隆或多克隆抗  $\kappa$  抗体反应; 6,7: 含  $\lambda$  FLC 的尿液; 8, 9: 正常标本, 均与单克隆或多克隆抗  $\lambda$  抗体反应; 10,11: 多克隆抗 FLC 血清与  $\kappa$  和  $\lambda$  型单体和二聚体反应

3. **血细胞凝集作用检测** 这些检测方法比 IFE 更加敏感、特异。用不同的 FLC 纯化的 IgG、IgA 和 IgM 将羊红细胞致敏，检测抗 FLC 血清。结果显示， $\kappa$  和  $\lambda$  型 FLC 抗体与标记好的细胞反应滴度大于 1 : 16 000，而对表达另一种 FLC 或完整免疫球蛋白的细胞反应滴度小于 1 : 2（图 4.3）。

4. **比浊法** 应用比浊法检测与乳胶耦合的 FLC 抗血清的特异性。将潜在干扰物质加入已知 FLC 浓度的血清中，检测浓度的变化以示干扰物质对本分析的影响（图 4.4）。

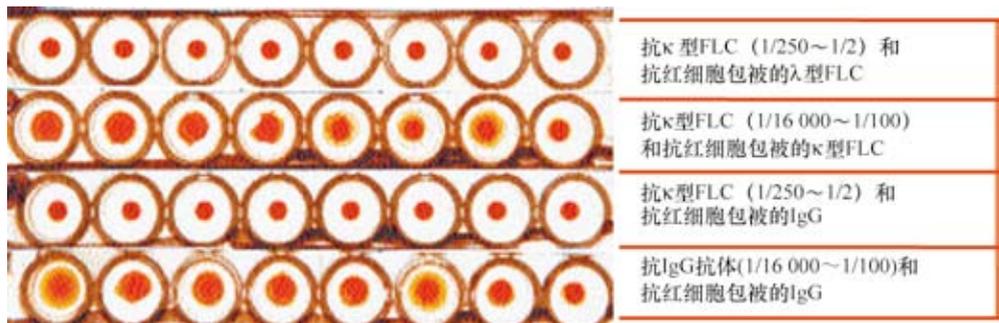


图 4.3 血细胞凝集反应分析法显示, 抗  $\kappa$  型 FLC 血清与包被纯化的 FLC 和 IgG 的 RBC 反应的特异性

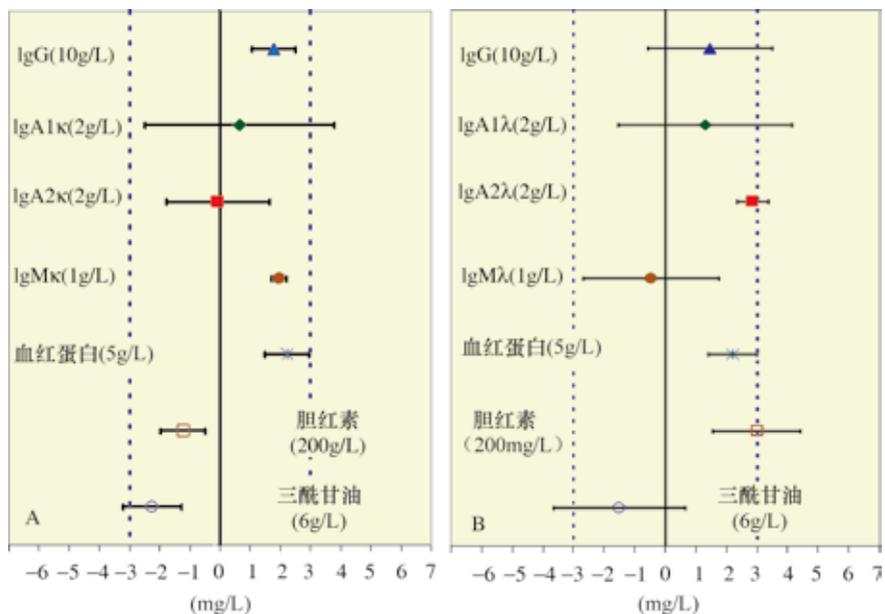


图 4.4 应用比浊法分析加入不同物质后抗  $\kappa$  型和  $\lambda$  型 FLC 血清的特异性  
图中列有加入不同物质后所得结果的平均值和 95% 可信区间

总体来说, 其特异性的结果显示, FLC 抗血清与完整 Ig 上的轻链和其他潜在干扰物质的反应很微弱 (0.01%~0.2%)。而且这些值均在 FLC 被一些检测到的干扰物质污染的纯化特异性范围内。

并没有独立的特异的比浊法可用于检测与乳胶耦合的抗 FLC 血清。Nakano<sup>[3]</sup> 等人报道了有价值的, 但是尚有一定错误的结果, 仅能检测由 IFE 产生的 FLC 抗血清, 因为其对特异性的要求较低 (Robson<sup>[1]</sup>)。

### C. 准确性和标准化

准确性指获得结果与真实值的接近程度。不幸的是目前国际上尚无评价 FLC 检测准确性的标准, 所以想要评价结果的准确性也无从下手。另外, 每一种单克隆轻链都有其独一无二的抗原决定簇, 故很难准确检测。然而, 轻链恒定区的结构几乎不变, 故可作为抗

体的靶向部位。

为确保 FLC 免疫检测的准确性，需要有一个标准化及校正的基础。为了使独特的单克隆蛋白应用产生的问题最小化，我们建议应用多克隆 FLC，步骤如下：

- (1) 制备和准确定量纯化的多克隆的 FLC 基准试剂。
- (2) 制备次级标准和“工作”参考物质，与基准相比较。
- (3) 制备用于 FLC 检测的校正物质，与“工作”标准相比较。
- (4) 用比浊法检测一系列正常的和不正常的样本。
- (5) 比较应用其他仪器检测所得的结果。

利用已建立的技术体系进行各种物质的制备和纯化。利用银染色的 SDS-PAGE 检测基准 FLC 制备的纯度超过 99%，而利用血细胞凝集阻滞分析和斑点杂交分析方法未能检测到另一种 FLC。为了准确评估蛋白质的组成，对每种基准试剂的氨基酸组成进行进一步分析。

次级参考物由不同单克隆  $\kappa$  和  $\lambda$  蛋白混合制备而成。它们不是工作校正所需的理想物质，因此，利用多克隆 FLC 含量增高的血清制备参考物质（图 4.5）。

用纯化的 FLC 将  $\kappa$  和  $\lambda$  浓度赋值给次级参考物质。接着，利用比浊法将  $\kappa$  和  $\lambda$  值赋给血清混合物。每阶段浓度值的转换均经 3 种不同浓度稀释，并各重复检测 3 次而获得。所有制备的蛋白质均在  $-80^{\circ}\text{C}$  下稳定保存，直至需要时。最终 FLC “工作”参考值分别为  $\kappa$  46mg/L、 $\lambda$  71.4mg/L。以上校正值用于以后实验室和临床研究。

#### D. 检测的敏感性（也可参见第 6 章）

检测的敏感性（即检测抗原的最低值）取决于所检测的样本类型。FLC 检测可以检测未稀释尿和脑脊液中浓度小于 0.1mg/L 的  $\kappa$  型和  $\lambda$  型 FLC。由于血清中脂类和散光颗粒的干扰（表 4.2），对血清 FLC 检测的敏感性较上述标本要弱 5 倍。因为浓度为 1~2mg/L 低于正常值，所以 FLC 免疫检测分析可以相当精确地检测极端的  $\kappa/\lambda$  浓度比值。这点对正在治疗中的患者进行疾病监测有重要意义，因为其 FLC 浓度可能是低于正常的。通过精确地调整反应物浓度可进一步提高对尿液和脑脊液（cerebrospinal fluid, CSF）检测的敏感性（第 22 章）。

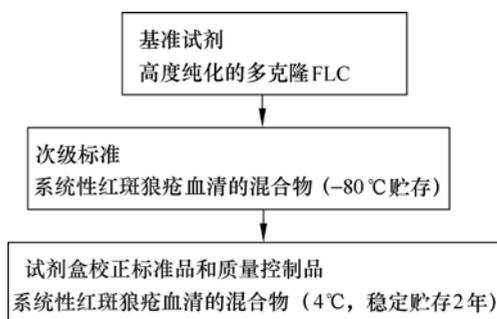


图 4.5 血清 FLC 免疫检测标准品制备的流程图

表 4.2 常用的 FLC 检测方法的敏感度水平

检测物	$\kappa$ 型 FLC (mg/L)	$\lambda$ 型 FLC(mg/L)	诊断标准
SPE	500~2000	500~2000	单克隆条带
IFE	150~500	150~500	单克隆条带
FLC	1.5	3.0	异常 $\kappa/\lambda$ 值

### E. 检测范围

FLC 检测范围取决于两个因素：校正曲线的倾斜度和所分析的成分（图 4.6 和图 4.7）。对于第二个影响因素，在最初样本稀释时，应尽量能检测至正常或异常临床样本的最大值。通常的检测范围为  $\kappa$  3~150mg/L,  $\lambda$  5~200mg/L。若样本浓度更高则需要进一步稀释。

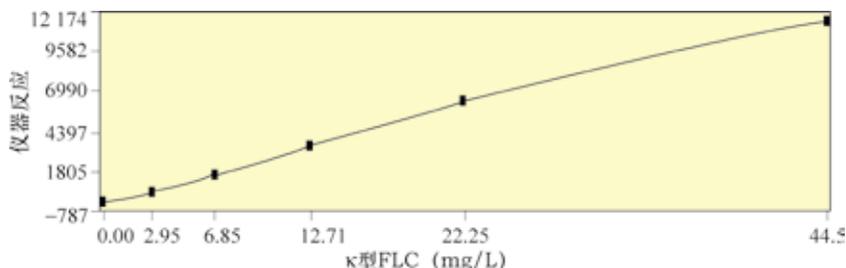


图 4.6 应用 Roche Modular P 法绘制的  $\kappa$  型 FLC 校正曲线

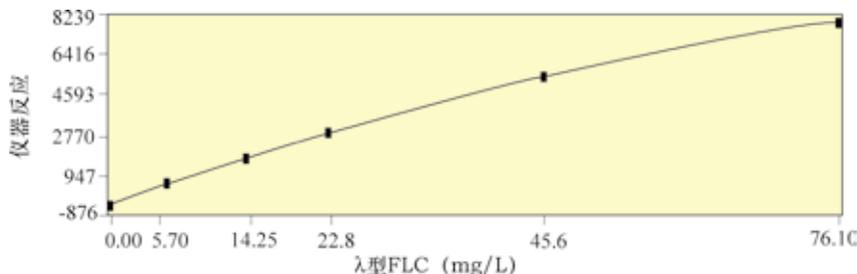


图 4.7 应用 Roche Modular P 法绘制的  $\lambda$  型 FLC 校正曲线

骨髓受抑制的患者的 FLC 浓度可能很低，故校正曲线的准确度相对差，所以应注意包括低 FLC 浓度在内的  $\kappa/\lambda$  值的准确性。

### F. 抗原过剩

过多的抗原会造成免疫检测低估了原本含量很高的抗原浓度（图 4.8）。有一些仪器能够辨认抗原过量并提示稀释样本。在 FLC 检测中，样本浓度波动于 1~100 000mg/L，此检测范围超过几乎所有其他血清蛋白的检测范围。故经常有一些仪器因为抗原过量而低估了抗原浓度。过去还有观点认为，这种过量会导致 FLC 检测无效（Gratziani）。

抗原过剩是很重要的事情。在 FLC 检测分析发展的过程中，对单克隆 FLC 进行检测可以满意地检测到浓度高于 200mg/L 的  $\kappa$  型和  $\lambda$  型 FLC（图 4.9）。此后，柏林 BNII 实验结果显示，对 304 例患者的单克隆 FLC 进行检测，当 1:20 稀释血清时，6 个极高浓度样本被误测为轻微升高，2 个被误测为正常；当 1:100 稀释时，8 个被误测的样本均准确测得抗原极度升高。此后，血清分析的起始稀释浓度被设定为 1:100（Carr-Smith<sup>[5]</sup>）。

BNII 所进行的更大样本量的研究能更准确地反映样本抗原过量的发生率。Clark 等人在梅奥医学中心对 4 个月内 7538 例样本分别进行 1:100 及 1:400 的稀释。结果显示，其中 9 例样本有  $\kappa$  抗原过剩，而无 1 例样本检出  $\lambda$  抗原过剩，抗原过剩的发生率为 1/840 (0.12%)。重要的是在稀释浓度为 1:100 时，所有的  $\kappa$  和  $\lambda$  型的样本可检出浓度升高或