

## 高灵敏血清 HER2 蛋白检测方法的建立及临床应用

龚欢秀<sup>1,2</sup>, 沈奥林<sup>3</sup>, 夏东<sup>4</sup>, 蔡莉<sup>5</sup>, 程联胜<sup>6</sup>, 刘兢<sup>6</sup>, 程民<sup>1,2</sup>, 徐婷娟<sup>1,2</sup>, 胡世莲<sup>1,2</sup>, 沈国栋<sup>1,2</sup>

**摘要** 本研究采用双抗体夹心 ELISA 法, 以前期研制的抗人表皮生长因子受体 2 (HER2) 单克隆抗体 HuA21 与生物素标记 HerA 分别为包被抗体与检测抗体, 培养 CHO 细胞进行转染 HER2 胞外区 (HER2-ECD) 基因的表达载体, 选择抗性克隆进行培养, 并分离、纯化抗原作为标准抗原, 建立可定量检测人血清中 HER2 含量的技术, 为肿瘤患者的治疗及预后评估提供参考。建立的 ELISA 法检测灵敏度为 7.8 pg/ml, 检测范围为 0 ~ 500 pg/ml, 其批内变异系数为 0.2% ~ 10.9%, 批间变异系数为 1.4% ~ 12.4%, 在人血清中的抗原回收率为 86.84% ~ 116.40%。使用本方法检测临床标本, 结果显示 HER2 阳性的转移性乳腺癌患者血清 HER2 含量明显高于早期乳腺癌患者及健康人的平均水平 ( $P < 0.05$ )。因此本研究成功建立了双抗体夹心 ELISA 法检测人血清 HER2 技术, 其检测结果特异、稳定、可靠, 可定量检测肿瘤患者血清 HER2 水平。

**关键词** 肿瘤; ELISA 实验; 人表皮生长因子受体 2; 乳腺癌中图分类号 R 737.9

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)11-1731-05  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.11.033

近年来对乳腺癌的诊断与治疗的认识水平越来越高, 但其发生率与死亡率并没有获得较大的改观, 因此如何提高乳腺癌早期诊断与预后评估成为临床上亟待解决的问题<sup>[1-2]</sup>。人表皮生长因子受体 2 (human epidermal growth factor receptor 2, HER2) 激活时能够影响肿瘤细胞的增殖和存活, 其过表达成为乳腺癌与胃癌等肿瘤的一个独立的预后危险因素<sup>[3-4]</sup>。目前临床上以 HER2 为靶点的治疗药物已

有曲妥珠单抗、拉帕替尼等数种抗体与小分子药物上市<sup>[5-6]</sup>。与传统的肿瘤组织化学染色结果相比, 检测血清中可溶性 HER2 胞外区蛋白含量能准确反映肿瘤患者预后不良<sup>[7]</sup>, 目前由美国食品药品监督管理局 (FDA) 批准的 Nuclea Diagnostic Laboratories 等公司生产的 ELISA 法检测血清 HER2 含量的试剂盒已用于临床, 但我国无同类产品上市。该项目组前期研制了 A21 等多种抗 HER2 单克隆抗体<sup>[8-9]</sup>, 因此该研究探索建立一种高灵敏的人血清 HER2 检测方法, 并进行临床标本检测, 为研制新的检测试剂盒奠定基础。

### 1 材料与方法

**1.1 标本、设备及试剂** 收集安徽医科大学附属省立医院 2015 年 7 月 ~ 2016 年 12 月病理科存档的乳腺癌大标本蜡块 10 例, 收集安徽医科大学附属省立医院及安徽医科大学附属第一医院、安徽医科大学附属第二附院健康体检人群临床血清标本 100 例、乳腺癌患者临床血清标本 200 例。37 °C 生化培养箱购自上海跃进医疗器械有限公司; 酶标仪购自美国伯腾仪器有限公司; 恒温振荡仪购自常州国宇仪器制造有限公司; CHO 细胞、人乳腺癌细胞株 BT-474 与 MCF-7、卵巢癌细胞株 SKOV-3 与 HO-8910 等购自中国科学院上海细胞库; 抗 HER2 单克隆抗体 HuA21 与 HerA 购自合肥瀚科迈博生物技术有限公司; 生物素标记的 HerA 由安徽医科大学附属省立医院肿瘤免疫与营养治疗实验室制备; 辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG、山羊抗人 IgG 二抗购自美国 Jackson Immuno Research 公司; 四甲基联苯胺与 TMB 显色液、DAB 显色底物及 BCA 法蛋白定量试剂盒购自美国 Thermo Fisher 公司; HER-2/neu ELISA 测定试剂盒购自美国 Nuclea Diagnostic Laboratories 公司。

**1.2 HER2 抗原标准品的制备** 在 6 cm 细胞培养皿中接种 CHO 细胞, 待细胞长至 90% 满度转染含 HER2-ECD 基因的表达载体, 培养 24 h 后, 胰酶消化传代至 96 孔板, 加入含有 0.3 mg/ml Zeocin 的选择性培养基筛选抗性克隆。待细胞克隆长出后, 根

2017-05-24 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金面上项目 (编号: 1408085MH167); 安徽省科技攻关项目 (编号: 1301042094)

作者单位: 安徽医科大学附属省立医院<sup>1</sup> 老年医学科、<sup>2</sup> 肿瘤免疫与营养治疗安徽省重点实验室, 合肥 230001  
安徽医科大学第二附属医院<sup>3</sup> 普外科、<sup>4</sup> 检验科, 合肥 230601

<sup>5</sup> 安徽医科大学第一附属医院病理科, 合肥 230022

<sup>6</sup> 合肥瀚科迈博生物技术有限公司, 合肥 230088

作者简介: 龚欢秀, 女, 硕士研究生;

沈国栋, 男, 博士, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: gdshen@ustc.edu.cn

据不同上清液中 HER2-ECD 的含量选出高表达的克隆。将高表达的克隆逐级扩大培养,将获得的上清 8 000 r/min 离心 15 min,过 0.22 μm 滤膜。取 5 ml Mabselect Sure 胶于 PBS 平衡后,A 液(20 mmol/L 磷酸钠,500 mmol/L NaCl,pH 5.0)预洗脱 5 个柱体积,B 液(20 mmol/L 醋酸钠,150 mmol/L NaCl,pH 3.5)洗脱 5 个柱体积,紫外检测仪监测洗脱峰,预先加入 100 μl 2 mol/L Tris 中和液,收集纯化的 HER2 胞外区标准抗原,采用 BCA 法蛋白定量试剂盒进行定量,并与美国批准临床使用的血清 HER-2/neu ELISA 测定试剂盒检测结果进行比对。

**1.3 抗体亲和力的比较** 将制备的标准抗原采用直接 ELISA 法测定 A18、A21、ChA21、ScA21、HuA21 和 HerA 候选抗体的相对亲和力,从而筛选出自制试剂盒的最佳配对抗体。

**1.4 测定抗体的特异性** 分别培养乳腺癌细胞 BT-474 及 MCF-7、卵巢癌细胞 SKOV-3 及 HO-8910,用筛选到的配对抗体分别与单细胞悬液孵育,结合 FITC 标记的二抗后采用流式细胞仪测定细胞水平抗体的特异性。使用免疫组化 SP 法,将 HuA21 和 HerA 两种抗体标记上生物素,与 HER2 阳性乳腺癌组织及癌旁正常组织进行抗原抗体结合反应,反应完成后用辣根过氧化物酶标记亲和素以及 DAB 显色底物染色,显微镜下观察结果。

**1.5 测定抗体的稳定性** 进行 45 °C 加速稳定性实验,将稀释不同的抗原浓度直接 ELISA 法测定不同保温时间下的抗体活性。

**1.6 抗体配对浓度的确定** 以 HuA21 为包被抗体和 HerA 为检测抗体,分别使用 0.5、1、2 μg/ml 三种浓度的捕获抗体和 0.25、0.5、1 μg/ml 三种浓度的检测抗体进行配对检测实验,从而确定配对抗体最佳反应浓度。

**1.7 自制试剂盒样品稀释度、灵敏度与检测范围的确定** 通过优化试剂配比及不同血清稀释度的对比实验,确定并制作标准曲线的线性范围和灵敏度。

**1.8 血清样品中标准抗原的回收率** 回收率实验是根据血清的检测范围确定加标准抗原的浓度,检测血清对 HER2-ECD 水平的影响,回收率(%) = [新样品测定值 - 原样品测定值] / 已知加标量 × 100%。

**1.9 血清 HER2 含量重复性检测** 用同一批次配对抗体检测 6 份乳腺癌血清样品,每份血清样品检测 3 次,每个样品设 2 个复孔,计算批内 HER2 水平差异;之后用 3 批不同检测试剂分别检测同一血清

样品 HER2 水平,每个样品设 2 个复孔,计算批间检测 HER2 水平差异。

**1.10 采用自制试剂盒检测临床血清标本** 用自制试剂盒检测 10 例健康人、44 例早期 HER2 阳性乳腺癌和 40 例转移性 HER2 阳性乳腺癌患者的血清 HER2 水平。

**1.11 统计学处理** 采用 SPSS 16.0 软件进行分析,计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,检测方法间数据比较用双尾异方差 *t* 检验和直线回归分析,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 HER2-ECD 抗原标准品的制备** 将分离、纯化获得的样品编号为 1、2、3,经 10% 分离胶的 SDS-PAGE 电泳,检测结果见图 1。同时采用 HER-2/neu ELISA 测定试剂盒对上述制备的标准抗原进行定量检测,结果表明 BCA 法定量的抗原浓度与 HER-2/neu ELISA 测定试剂盒测定的浓度完全一致,且在制备的标准抗原中加入 0.1% BSA 稀释液后,其在 -80 °C 保存 1 年经冻融后检测结果无明显变化。HER2 标准抗原检测的标准曲线的线性关系较好,见图 2。

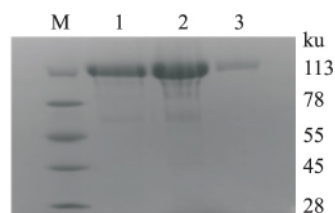


图1 HER2 胞外区标准抗原电泳结果  
M: 分子量标准品; 1~3: 样品 1~3

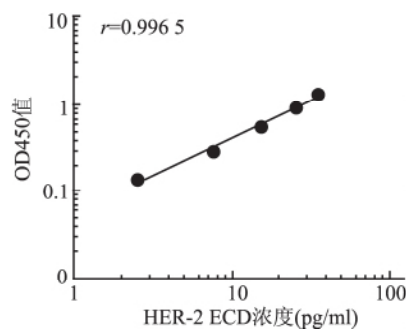


图2 HER2 抗原测定的标准曲线

**2.2 抗体亲和力的比较** 实验结果表明 HuA21 和 HerA 抗体的相对亲和力均高于其他对照抗体(由于 ScA21 与 HuA21 表位相同,不能作为夹心法 ELISA

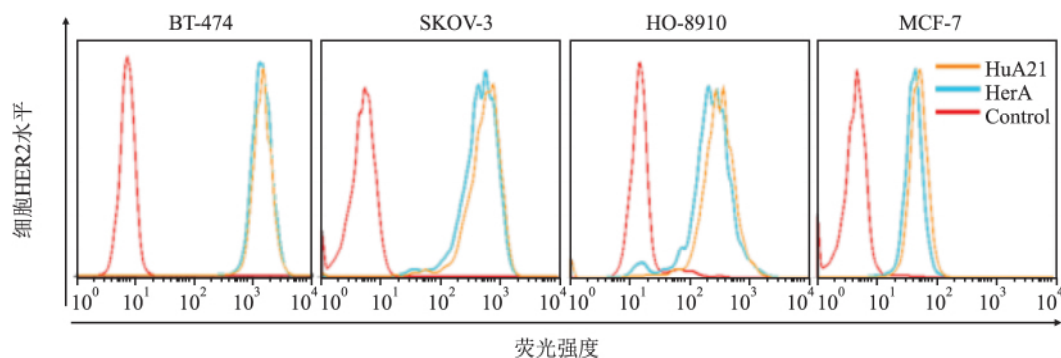


图3 采用流式细胞仪检测抗体识别细胞膜表面HER2受体特异性

实验的配对抗体) ,其中 HuA21 相对亲和力更高 ,效价可达到 106 ,因而确定作为捕获抗体 ,见表 1。

表1 抗体相对亲和力的比较

抗原	抗体					
	A18	A21	ChA21	ScA21	HuA21	HerA
A	0.767	0.633	0.674	2.724	3.176	2.121
B	0.224	0.182	0.162	1.528	2.308	1.437
C	0.075	0.064	0.062	0.318	0.612	0.364
D	0.059	0.051	0.051	0.079	0.114	0.086
E	0.046	0.048	0.051	0.047	0.048	0.049

A ~ D: 10 倍连续稀释的标准抗原; E: 空白对照

**2.3 抗体的特异性测定** 为了从细胞水平检测抗体的特异性 ,采用流式细胞术进行检测 ,HuA21 和 HerA 对 HER2 高表达的乳腺癌细胞 BT-474、HER2 中等表达的卵巢癌细胞 SKOV-3、HER2 低表达的卵巢癌细胞 HO-8910 及乳腺癌细胞 MCF-7 的反应强度与细胞 HER2 的表达水平呈正相关性 ,证明这些抗体具有很好的细胞水平结合特异性 ,见图 3。同时从组织水平检测抗体的特异性 ,实验结果表明 HuA21 和 HerA 均能对 HER2 高表达组织进行特异性染色 ,而癌旁正常组织则无染色 ,显微镜下观察结果见图 4。证明两种抗体均有良好的组织水平的抗原识别特异性。

**2.4 抗体的稳定性检测** 进行 45 °C 加速稳定性实验来测定抗体的稳定性 ,实验结果表明将不同的抗原浓度采用直接 ELISA 法测定不同保温时间下的抗体活性 ,结果显示抗体活性均未下降 ,说明抗体具有较好的稳定性。

**2.5 抗体配对浓度的确定** 以 HuA21 为包被抗体 ,HerA 为检测抗体 ,分别使用 0.5、1、2  $\mu\text{g/ml}$  三种浓度的捕获抗体和 0.25、0.5、1  $\mu\text{g/ml}$  三种浓度的检测抗体。比较结果表明 HuA21 2  $\mu\text{g/ml}$  搭配

0.25  $\mu\text{g/ml}$  的 HerA 能够得到信噪比较好的标准曲线 ,以标准抗原(250 ng/ml)的光密度(optical density, OD) 值在 1.9 左右为最适条件 ,确定自制血清 HER2 试剂盒的最佳 HuA21 浓度为 2  $\mu\text{g/ml}$  ,检测抗体 HerA 的最佳浓度为 0.25  $\mu\text{g/ml}$  ,包被量为 100  $\mu\text{l/孔}$ 。

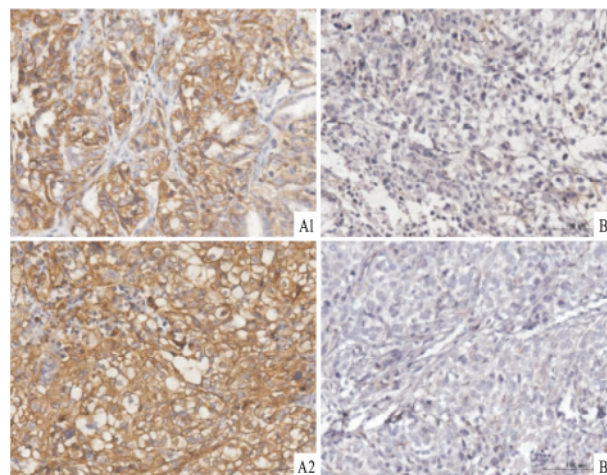


图4 检测抗体识别HER2阳性乳腺癌组织的特异性 SP×200

A: HER2 高表达乳腺癌组织; B: 乳腺癌癌旁组织; 1: 使用 HuA21 抗体染色; 2: 使用 HerA 抗体染色

**2.6 自制试剂盒的样品稀释度、灵敏度与检测范围的确定** 通过优化试剂配比及不同血清稀释度的对比试验 ,分别以 2  $\mu\text{g/ml}$  HuA21 为包被抗体和 0.25  $\mu\text{g/ml}$  HerA 为检测抗体 ,测定 HER2-ECD 抗原标准品 ,实验结果如表 2 所示 ,以测定 HER2-ECD 抗原标准品的浓度为横坐标 ,测定的 OD 值为纵坐标 ,绘制标准曲线 ,其线性相关系数  $r = 0.9996$  ,见图 5。确定血清最佳稀释 200 倍 ,其标准曲线线性范围为 0 ~ 500  $\text{pg/ml}$  ,检测灵敏度为 7.8  $\text{pg/ml}$ 。

表2 标准抗原回收率检测结果

抗原	抗原浓度 (pg/ml)	OD490	检测浓度 (pg/ml)	回收率 (%)
S1	500.0	2.172	492.5	98
S2	250.0	1.473	260.8	104
S3	125.0	0.849	120.7	97
S4	62.5	0.497	61.9	99
S5	31.3	0.285	32.4	104
S6	15.6	0.145	15.3	98
S7	7.8	0.079	7.8	100
0	0.0	0.017	1.4	100

2.7 血清样品中标准抗原的回收率 使用健康人血清,每毫升血清分别加入 62.5、125.0、250.0 pg/ml HER2 ECD 标准抗原,采用自制试剂盒分别检测其回收率,结果在 86.84% ~ 116.40%,提示人血清成分对 HER2-ECD 含量的测定影响不大。

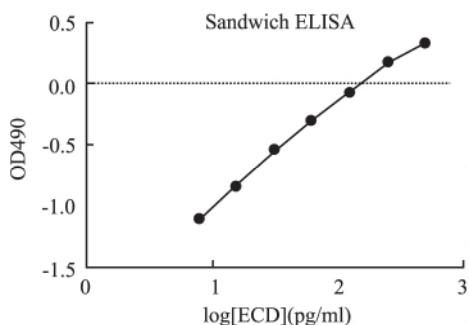


图5 血清稀释度 200 倍的抗原检测标准曲线

2.8 检测血清 HER2 的重复性 使用同一批次的配对抗体,分别对 15.60、31.25、62.50、125.00、250.00 pg/ml HER2-ECD 标准抗原进行批内及批间测定,批内批间各重复 10 次实验,分别计算其批内批间变异系数,批内变异系数 CV 为 0.2% ~ 10.9%,批间变异系数为 1.4% ~ 12.4%。根据 Nuclea 试剂盒的判断标准变异系数 ≤ 15% 为合格,实验表明建立的检测 HER2 试剂盒具有较好的重复性。

2.9 运用自制试剂盒检测临床标本结果 采用自制 ELISA 试剂盒检测 10 例健康人、44 例早期 HER2 阳性乳腺癌和 40 例转移性 HER2 阳性乳腺癌患者的血清 HER2 含量范围以及阳性率分别为 3.0 ~ 10.2 (5.9 ± 3.8) ng/ml、0.65 ~ 16.3 (9.1 ± 5.7) ng/ml、4.5%, 12.3 ~ 350.0 (38.6 ± 33.4) ng/ml、37.5%。健康人与早期乳腺癌患者血清中 HER2 含量之间的差异无统计学意义,但与转移性乳腺癌患者的血清 HER2 含量相比,差异有统计学意义(P <

0.05)。

### 3 讨论

HER2 是一个与乳腺癌、胃癌与肺癌等多种肿瘤发生发展密切相关的癌基因,其表达水平直接影响到肿瘤患者的化疗效果及生存时间<sup>[10]</sup>。传统的 HER2 检测主要通过创伤性的肿瘤组织活检,使用免疫组化和荧光原位杂交等方法<sup>[11-12]</sup>,但是这些方法不能检测手术治疗后患者或复发及转移性肿瘤患者体内的 HER2 水平。研究<sup>[13-14]</sup>显示约有 32% 的转移性乳腺癌患者血清中存在 HER2 水平异常升高现象,这部分患者预后大多很差,提示 HER2 血清水平及其变化趋势可用作肿瘤治疗效果评价与预后评估的指标。目前已有美国 Nuclea Diagnostic Laboratories 和德国 Bayer 公司生产的 ELISA 法实验试剂盒及上海西门子的化学发光法 HER2/neu 蛋白测定试剂盒用于临床,国内虽然批准进口西门子试剂盒,但由于缺少中国人群参考值与其价格昂贵等因素,临床接受率不高。另一方面,近年来血清 HER2 标志物检测用于肿瘤临床诊断和治疗的研究结果经常出现不一致的现象,其中一个重要原因就是血清成分个体化差异引起的血清基质干扰现象,导致 HER2 血清水平定量的不准确性,甚至出现假阳性和假阴性结果<sup>[15]</sup>。

本研究建立的检测血清 HER2 的 ELISA 试剂盒所使用的试剂在 1 年内保持稳定,检测灵敏度达到 7.8 pg/ml,需要使用的血清标本仅为 2 μl,优于美国 Nuclea Diagnostic Laboratories 公司的 ELISA 试剂盒(灵敏度:1 500 pg/ml,标本量:10 μl),其批内变异系数为 0.2% ~ 10.9%,批间变异系数为 1.4% ~ 12.4%,表明该方法具有较好的重复性;在人血清中的抗原回收率在 86.84% ~ 116.40%,表明人血清中的干扰成分对本试剂盒检测结果影响不大。通过使用自制 ELISA 试剂盒检测临床标本,结果显示 HER2 阳性的转移性乳腺癌患者血清 HER2 含量明显高于早期乳腺癌患者及健康人的平均水平,在转移性乳腺癌患者中的阳性率为 37.5%,这与国外报道<sup>[16]</sup>的结果基本一致。

综上所述,本研究建立了一种高灵敏的血清 HER2 含量测定的 ELISA 方法,结果初步表明血清 HER2 水平检测对于 HER2 表达阳性肿瘤患者的治疗效果与预后的评估具有较高的参考价值。

### 参考文献

[1] Triulzi T, Bianchi G V, Tagliabue E. Predictive biomarkers in the

- treatment of HER2-positive breast cancer: an ongoing challenge [J]. *Future Oncol* ,2016 ,12( 11) : 1413 -28.
- [2] 杨 玲,李连弟,陈育德,等. 中国乳腺癌发病死亡趋势的估计与预测[J]. *中华肿瘤杂志* ,2006 ,28( 6) : 438 -40.
- [3] Singh J C ,Jhaveri K ,Esteva F J. HER2-positive advanced breast cancer: optimizing patient outcomes and opportunities for drug development [J]. *Br J Cancer* 2014 ,111( 10) : 1888 -98.
- [4] 沈国栋,王 弦,吴 强,等. 染料木素抑制 HER2 阳性人乳腺癌与卵巢癌细胞增殖作用的研究[J]. *中国临床保健杂志* ,2012 ,15( 5) : 517 -20.
- [5] 张金凤,胡夕春. 激素受体阳性转移性乳腺癌的内分泌治疗 [J]. *中华肿瘤杂志* 2015 ,37( 12) : 881 -4.
- [6] Krishnamurti U ,Silverman J F. HER2 in breast cancer: a review and update [J]. *Adv Anat Pathol* ,2014 ,21( 2) : 100 -7.
- [7] Barić M ,Kulić A ,Sirotković-Skerlev M ,et al. Circulating Her-2/ neu extracellular domain in breast cancer patients-correlation with prognosis and clinicopathological parameters including steroid receptor , Her-2/ neu receptor coexpression [J]. *Pathol Oncol Res* , 2015 ,21( 3) : 589 -95.
- [8] Li P ,Li Y ,Li J Y , et al. Characterization and utilization of two novel anti-erbB-2 monoclonal antibodies in detection of soluble ErbB-2 for breast cancer prognosis [J]. *Cancer Lett* ,2003 ,193 ( 2) : 139 -48.
- [9] Shen G ,Huang H ,Zhang A , et al. *In vivo* activity of novel anti-erbB2 antibody chA21 alone , and with Paclitaxel or Trastuzumab in breast and ovarian cancer xenograft models [J]. *Cancer Immunol Immunother* ,2011 ,60( 3) : 339 -48.
- [10] Li R ,Hu S ,Chang Y , et al. Development and characterization of a humanized Anti-HER2 antibody HuA21 with potent anti-tumor properties in breast cancer [J]. *Int J Mol Sci* 2016 ,17( 4) : 563.
- [11] Laidi F ,Bouziane A ,Errachid A , et al. Usefulness of salivary and serum auto-antibodies against tumor biomarkers HER2 and MUC1 in breast cancer screening [J]. *Asian Pac J Cancer Prev* , 2016 ,17( 1) : 335 -9.
- [12] Engvall E. The ELISA , enzyme-linked immunosorbent assay [J]. *Clin Chem* ,2010 ,56( 2) : 319 -20.
- [13] Farzadnia M ,Meibodi N T ,Shandiz F H , et al. Evaluation of HER2/ neu oncoprotein in serum and tissue samples of women with breast cancer: correlation with clinicopathological parameters [J]. *Breast* ,2010 ,19( 6) : 489 -92.
- [14] Park Y H ,Shin H T ,Jung H H , et al. Role of HER2 mutations in refractory metastatic breast cancers: targeted sequencing results in patients with refractory breast cancer [J]. *Oncotarget* ,2015 ,6 ( 31) : 32027 -38.
- [15] Carney W P ,Leitzel K ,Ali S , et al. HER-2/ neu diagnostics in breast cancer [J]. *Breast Cancer Res* ,2007 ,9( 3) : 207.
- [16] Lam L ,Czerniecki B J ,Fitzpatrick E , et al. Interference-Free HER2 ECD as a serum biomarker in breast cancer [J]. *J Mol Biomark Diagn* ,2014 ,4( 3) : 151.

## Establishment and clinical application of a highly sensitive method to detect HER2 protein in human serum

Gong Huanxiu<sup>1,2</sup> , Shen Aolin<sup>3</sup> , Xia Dong<sup>4</sup> , et al

(<sup>1</sup>*Dept of Geriatrics* ,<sup>2</sup>*Anhui Provincial Key Laboratory of Tumor Immunotherapy and Nutrition Therapy* ,  
*The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University , Hefei 230001*; <sup>3</sup>*Dept of General Surgery* ,  
<sup>4</sup>*Dept of Clinical Laboratories ,The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University , Hefei 230601*)

**Abstract** In this study using double antibody sandwich ELISA technology , the anti-human epidermal growth factor 2 ( HER2) monoclonal antibody HuA21 and biotin-labeled HerA antibody were used as the capture antibody and detection antibody , respectively. HER2 extracellular domain( HER2-ECD) was transfected into CHO cell line and the resistant clones were selected to produce the antigen protein , which was isolated and purified as standard antigens in order to establish a technique for quantitatively detecting HER2 in human serum , and could provide reference for the treatment and prognosis evaluation of cancer patients. The sensitivity of the method was 7.8 pg/ml , and the detection limit was from 0 to 500 pg/ml. The intra-assay coefficient of variation was 0.2% ~ 10.9% , and the coefficient of variation was 1.4% ~ 12.4%. The recovery rate of the antigen in human serum was 86.84% to 116.40%. Our method was used to determine the selected clinical samples that the serum levels of HER2 in patients with HER2-positive metastatic breast cancer was significantly higher than those in patients with early-stage breast cancer and healthy subjects (  $P < 0.05$  ). So a double-anti-sandwich ELISA method of human serum HER2 detection is established , and the determination result is specific , stable and reliable and can be used to quantitatively detect the serum HER2 levels for the cancer patients.

**Key words** tumor; enzyme-linked immunosorbent assay; HER2; breast cancer