

# 粪便钙卫蛋白与炎症性肠病活动性关系的探讨

王志红 郭汉斌 曹建彪 李浩然

(北京军区总医院消化内科,北京 100700)

**摘要** 探讨研究粪便钙卫蛋白与炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)活动性的关系。收集52例北京军区总医院消化内镜中心接受肠镜检查患者的新鲜粪便标本提取钙卫蛋白,其中炎症性肠病患者32例、溃疡性结肠炎24例、克罗恩病8例、正常对照者20例。采用ELISA法定量检测粪便中钙卫蛋白浓度。采用Mayo评分系统判断IBD有否活动,积分 $\geq 3$ 为有活动性。结果20例健康者粪便钙卫蛋白浓度为( $77.15 \pm 160.9$ ) $\mu\text{g/g}$ ,32例IBD患者为( $646.58 \pm 439.44$ ) $\mu\text{g/g}$ 。IBD患者与健康者粪便钙卫蛋白浓度比较有显著差别( $P < 0.001$ )。以450.3 $\mu\text{g/g}$ 为临界值时,粪便钙卫蛋白判断IBD是否活动的灵敏度和特异度分别为75%和90%,活动期IBD患者与静止期IBD患者和健康者粪便钙卫蛋白浓度比较均有显著差别( $P < 0.05$ )。说明粪便钙卫蛋白检测是一种非侵入性观察指标,为判断IBD活动性具有一定的临床意义。

**关键词** 炎症性肠病(IBD) 钙卫蛋白 粪便

**中图法分类号** R572; **文献标志码** B

目前认为,炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)的发生主要是由遗传、环境及肠道菌群等多种病因导致的机体对肠道抗原免疫应答失调所致。

钙卫蛋白(Calprotectin, S100A8/S100A9)是一种肠道炎性标志物,来源于中性粒细胞和巨噬细胞。由于其能与钙离子结合,且在粪便中极稳定。本实验采用ELISA法定量检测IBD患者与健康志愿者粪便钙卫蛋白,以探讨粪便钙卫蛋白浓度与IBD活动性的关系,从而为临床诊治提供有意义的辅助检查指标。

## 1 材料与方法

### 1.1 检测对象

以2007年12月至2008年4月在北京军区总

医院消化内镜中心就诊的52例患者为检测对象。32例IBD患者,男15例,女9例,平均年龄35岁,均符合2007年5月中华医学会消化病学分会的诊断标准<sup>[1]</sup>。根据患者临床表现(如每日水样便或稀便次数、腹痛、一般情况、并发症及肠道出血情况或腹部肿块情况),采用Mayo评分系统进行活动指数评定<sup>[2]</sup>来判断IBD活动性, $\geq 3$ 分为有活动。20例健康者,男8例,女12例,平均年龄46岁,内镜下均未见器质性病变,并排除其他疾病,在检测前均未长期服用质子泵抑制剂、激素、非甾体类消炎药。

### 1.2 标本采集

所有入组病人留取镜检前日粪便(10~20)g(口服清肠药前)。粪便样本在采集后12 h之内送达实验室,密封后4℃冷藏<6 d,6 d内提取钙卫蛋白,提取液-30℃冻存备用。

### 1.3 试剂及仪器

粪便钙卫蛋白检测试剂盒(瑞士Bühlmann公司生产,北京海瑞祥天生物科技有限公司惠赠),全自动多功能酶标仪(芬兰雷勃公司Multiskan MK3)。

2009年11月2日收到

第一作者简介:王志红(1953—),安徽宿州人,主任技师。研究方向:炎症性肠病的基础。

## 1.4 方法

### 1.4.1 粪便钙卫蛋白萃取

按照粪便重量(g):萃取液体积(mL)=1:49的比例加入专用萃取液,充分振荡混匀,取5 mL混悬液, $10\ 000\times g$ 离心5 min,取上清液-30 ℃冻存备用。

### 1.4.2 ELISA 检测

将粪便钙卫蛋白提取液平衡至室温, $10\ 000\times g$ 离心5 min,1:50稀释,各标本均设复孔,按照说明书流程进行操作(双抗体夹心法),于450 nm处比色,分别记录标准品、样品、阳性对照、阴性对照和空白孔的OD值,各取平均值进行结果计算。如1:49体积比稀释的标本超出标准曲线范围时,则增加或降低稀释比例至其OD值在标准曲线范围之内。

## 1.5 结果判断

根据不同浓度标准品OD值(10、30、100、300、400 g/g)绘制标准曲线,标准曲线上各样本OD值对应的浓度,即为各样本的粪便钙卫蛋白浓度。

## 1.6 数据处理

数据采用SPSS 17.0统计软件,中位数、四分位间距、全距,组间比较采用非参数检验Kruskal-Wallis H检验, $P<0.05$ 具有统计学意义。检测指标的灵敏度和特异度,采用受试者工作特征曲线<sup>[3]</sup>(receiver operating characteristic curve, ROC),计算ROC曲线下面积(Area Under Curve AUC):一般情况下,AUC<0.5时,表示该指标无诊断价值; $>0.7$ 时,表示诊断准确性较高,即面积越大,诊断准确性越大。

## 2 结果

### 2.1 IBD患者与健康者粪便钙卫蛋白浓度比较

32例IBD患者粪便样本浓度为( $646.60\pm439.44$ ) μg/g。20例健康者粪便钙卫蛋白浓度为( $77.15\pm160.9$ ) μg/g。经正态性检验,两组粪便钙卫蛋白水平呈非正态分布,故以计算中位数、四分位间距、全距,采用非参数检验进行组间比较。结

果显示:IBD患者粪便钙卫蛋白浓度明显升高,与健康者比较,差别非常显著( $P<0.001$ ,表1)。

表1 IBD患者与健康者粪便钙卫蛋白浓度比较

	$N$	$x \pm s$ (μg/g)	$M$ (μg/g)	$Q_L - Q_U$ (μg/g)	min-max (μg/g)
健康者	20	$77.15 \pm 160.9$	16.75	$11.21 - 39.53$	$1.65 - 645.9$
IBD	32▲	$646.6 \pm 439.44$	971.21	$464.51 - 1\ 373.9$	$42.49 - 1\ 618.2$

注: N 例数;  $x \pm s$  平均值±标准差; M 中位数;  $Q_L - Q_U$  四分位间距-全距; min-max 最小数-最大数; 与健康者比较: ▲  $P<0.001$

### 2.2 静止期IBD患者与活动期IBD和健康者粪便钙卫蛋白浓度比较

12例静止期IBD患者粪便钙卫蛋白浓度为( $337.06 \pm 390.52$ ) μg/g,20例健康者为( $77.15 \pm 160.9$ ) μg/g,二者比较无显著差别( $P>0.05$ );20例活动期IBD患者为( $956.13 \pm 488.36$ ) μg/g,与静止期IBD患者比较有显著差别( $P<0.05$ )(表2)。

表2 活动期和静止期IBD患者的粪便钙卫蛋白浓度比较

	$N$	$x \pm s$ (μg/g)	$M$ (μg/g)	$Q_L - Q_U$ (μg/g)	min-max (μg/g)
健康者	20◆	$77.15 \pm 160.9$	16.75	$11.21 - 39.53$	$1.65 - 645.9$
IBD					
活动期	20◆	$956.13 \pm 488.36$	1 173.3	$640.22 - 1\ 433.4$	$461.14 - 1\ 618.2$
静止期	12	$337.06 \pm 390.52$	72.69	$64.42 - 439.47$	$42.49 - 1\ 006.11$

注:与静止期IBD比较 ◆  $P<0.05$

### 2.3 ROC 曲线分析

绘制受试者工作特征曲线(Receiver Operating Characteristic curve, ROC),计算粪便钙卫蛋白水平用于判断IBD活动性的敏感性和特异性。常规取ROC曲线左上方的最高点为最佳截断点<sup>[3]</sup>,并计算ROC曲线下面积AUC为0.798(AUC>0.7表示该指标诊断准确性较高)(见图1)。

## 3 讨论

IBD是一组病因不十分明确的慢性肠道炎症性疾病,主要包括UC和CD。以往用于诊断IBD及其活动性主要依靠结肠镜、x线钡剂造影、病理活检

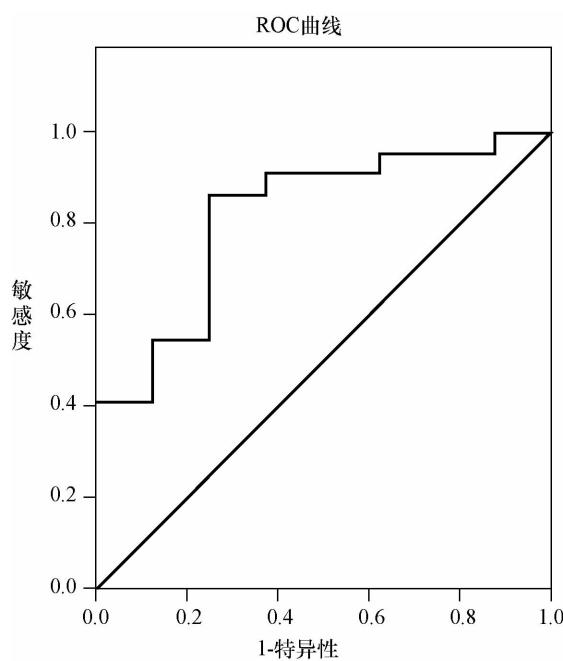


图1 IBD 活动期组和非活动期组粪便钙卫蛋白浓度的 ROC 曲线  $AUC = 0.798, P = 0.006$

等,而这些检查均为有创性的,患者依从性差。

因炎性肠黏膜中含有大量中性粒细胞,故检测中性粒细胞来源的蛋白可能有一定意义。钙卫蛋白是中性粒细胞和单核细胞的主要蛋白质,中性粒细胞钙卫蛋白分布在溶酶体外的细胞液中,其含量约为(5~15) mg/mL,约占细胞总蛋白的5%,亦是中性粒细胞更新的标志物,在许多炎症情况下都可升高<sup>[4]</sup>。钙卫蛋白是由两条14 kD重链和一条8 kD轻链共价相连的钙结合蛋白异三聚体构成,每条链可结合两个钙分子,具有耐热性和水解性,其在常温下保存一周可不被细菌和各类酶降解,具备良好的标志物条件<sup>[4,5]</sup>。

有实验证明,利用放射性标记白细胞技术,可直观、定量观察到肠黏膜组织与粪便中标记物的关系:被标记的自体白细胞注入自体血液后,首先聚集于肠道炎症区域,但并不停留在肠壁内,而是迁移至肠腔,经肠道从粪便中排出。收集粪便中放射性标记物进行测定证实,其与组织炎症程度呈正比。IBD 患者的粪便<sup>111</sup>铟标志白细胞3 d排泄率和24 h 粪便钙卫蛋白排泄率( $r = 0.87$ )、一次取样粪便钙卫蛋白排泄率( $r = 0.80$ )都显示了很好的相关

性。根据这一原理,测定粪便钙卫蛋白水平可直接反映受累组织炎症程度<sup>[6]</sup>。有研究发现,血浆钙卫蛋白含量在健康成人为(0.1~0.6) mg/L,病毒感染者(0.1~11.4) mg/L,细菌感染者(0.6~11.0) mg/L<sup>[7]</sup>。健康成年男性的血浆钙卫蛋白浓度明显高于女性,而粪便钙卫蛋白浓度约是血浆钙卫蛋白的6倍,且无性别差异<sup>[8]</sup>。

我们采用 ELISA 法定量检测 IBD 患者和健康者粪便钙卫蛋白浓度的结果提示,健康者粪便钙卫蛋白浓度较低,与国外学者的报道相符<sup>[9,10]</sup>。IBD 活动期、静止期患者的粪便钙卫蛋白浓度比较有显著差别,提示其可能是区分 IBD 静止期、活动期的指标。与结肠镜检查比较,患者依从性好,可反复多次检测,客观而连续地反映肠道局部炎症变化,有利于实时监测,且粪便钙卫蛋白检测对 UC 活动性的判断可能优于目前临床常用的 CRP 和 ESR 两项指标<sup>[11]</sup>。另外,对于急性发作期的重症患者,结肠镜检查往往被视为禁忌,以免引起肠穿孔,此时粪便钙卫蛋白检测就显得尤为相宜。由于在许多肠道感染情况下,其检测值也会有一定水平的升高,故粪便钙卫蛋白不宜用于诊断 IBD。

本实验结果提示,粪便钙卫蛋白定量检测,作为一种无创性初筛试验,其检测方法便捷、价格低廉,可弥补肠镜、结肠造影等有创检查的痛苦、价格昂贵、不便随时复查等不足,具有较好的灵敏性和特异性,对于监测 IBD 活动性及调整治疗方案具有一定的临床应用价值。

## 参 考 文 献

- 中华医学会消化病学分会炎症性肠病协作组. 中国炎症性肠病诊断治疗规范的共识意见 中华内科杂志, 2008; 47(1):73~79
- Gionchetti D, Arienzo A, Rizzello F, et al. Topical treatment of distal active ulcerative colitis with beclomethasone dipropionate or mesalamine: a single-blind randomized controlled trial. J Clinical Gastroenterology, 2005; 39 (4): 291~297
- 陈卫中,潘晓平,宋兴勃,等. ROC 曲线上最佳工作点的选择. 中国卫生统计, 2006; 23(2): 157~158
- Johne B, Fagerhol M K, Lybrg T, et al. Functional and clinical aspects of the myelomonocyte protein calprotectin. J Clin Path-Mol Path, 1997; 50 (3): 113~123

- 5 Gebhardt C, Nemeth J, Angel P, et al. S100A8 and S100A9 in inflammation and cancer. *Biochemical Pharmacology*, 2006; 72 (11) : 1622—1631
- 6 Roseth A G, Schmidt P N, Fagerhol M K. Correlation between faecal excretion of indium-111-labelled granulocytes and calprotectin, a granulocyte marker protein, in patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol*, 1999; 34(1) : 50—54
- 7 Sander J, Fagerhol M K, Bakken J S, et al. Plasma levels of the leucocyte LI protein in febrile conditions: relation to aetiology, number of leucocytes in blood, blood sedimentation reaction and C-reaction protein. *Scand J Clin Lab Invest*, 1984; 44 (4) : 357—362
- 8 Roseth A G, Fagerhol M K, Aadland E. Assessment of the neutrophil dominating protein calprotectin in feces. a methodologic study. *Scand J Gastroenterol*, 1992; 27(9) : 793—798
- 9 Incà R D, Pont E D, Leo V D, et al. Calprotectin and lactoferrin in the assessment of intestinal inflammation and organic disease. *Int J Colorectal Dis*, 2007; 22(4) : 429—437
- 10 Schoepfer A M, Trummel M, Seeholzer P, et al. Accuracy of four fecal assays in the diagnosis of colitis. *Dis Colon Rectum*, 2007; 50 (10) : 1697—1706
- 11 Angriman I, Scarpa M, D'Incà R, et al. Enzymes in feces: useful markers of chronic inflammatory bowel disease. *Clinica Chimica Acta*, 2007; 381(1) : 63—68

## A Study of Relationship between Fecal Lactoferrin and Inflammatory Bowl Disease

WANG Zhi-hong, GUO Han-bin, CAO Jian-biao, LI Hao-ran

(Department of Gastroenterology, General Hospital of Beijing Military Region, Beijing 100700, P. R. China)

**[Abstract]** To investigate the relationship between levels of fecal calprotection in the inflammatory bowl disease (IBD) of activated and inactivated by ELISA quantitative analysis, a total of 52 fresh fecal samples were collected from the patients with IBD and the healthy volunteers, including 24 cases of UC, 8 cases of CD, and 20 healthy volunteers. EK-CAL was used to quantitatively determine the level of fecal calprotection. Mayo active index adopted to evaluate the activity of IBD. The score equal or higher than 3 considered to be active IBD. The level of fecal calprotection was  $(77.15 \pm 160.9) \mu\text{g/g}$  in healthy volunteers,  $(956.13 \pm 488.36) \mu\text{g/g}$  in active IBD,  $(337.06 \pm 390.52) \mu\text{g/g}$  in inactive IBD, respectively. There was significant difference between the IBD compared with the healthy volunteers ( $P < 0.001$ ). When IBD became active, the level of fecal calprotection increased significantly compared with the inactive IBD and healthy volunteers, respectively ( $P < 0.05$ ). When the upper limit was  $450.3 \mu\text{g/g}$ , the sensitivity and specificity of fecal calprotection in differentiating the active IBD was 75% and 90%, respectively. As a non-invasive method, fecal calprotection is the marker for evaluate IBD activity, it has a clinical significance.

**[Key words]** inflammatory bowl disease      calprotection      feces