

电化学及光电化学传感器检测胱抑素C的研究进展

夏梦诗, 王晓龙*

重庆医科大学附属第二医院, 重庆

收稿日期: 2021年9月11日; 录用日期: 2021年9月25日; 发布日期: 2021年10月9日

摘要

胱抑素C是一种由有核细胞合成的碱性低分子量蛋白, 相比肌酐而言, 胱抑素C能够更加敏感地反映肾脏受损情况, 尤其在CKDI、II时期。现存的胱抑素C临床检测方法, 因价格昂贵、操作复杂、灵敏度低等原因在临床受限。但近几年兴起的电化学、光电化学传感器体系检测胱抑素C, 有效地弥补了以往的检测缺陷, 且能达到床旁快速检测的目标, 本文就电化学、光电化学传感器体系检测胱抑素C的研究进行综述。

关键词

胱抑素C, 电化学, 光电化学, 快速检测

Research Progress on Detection of Cystatin C by Electrochemical and Photochemical Sensors

Mengshi Xia, Xiaolong Wang*

The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing

Received: Sep. 11th, 2021; accepted: Sep. 25th, 2021; published: Oct. 9th, 2021

Abstract

Cystatin C is an alkaline low-molecular-weight protein synthesized by nucleated cells. Compared with creatinine, cystatin C is more sensitive to renal damage, especially in CKD stages I and II. Ex-

*通讯作者。

isting cystatin C clinical detection methods are limited due to high cost, complex operation and low sensitivity. However, in recent years, the emergence of electrochemical and photoelectric sensor systems to detect cystatin C has effectively made up for the defects of the previous detection, and can achieve the goal of rapid detection near the bed. This paper reviews the research on the detection of cystatin C by electrochemical and photoelectric sensor systems.

Keywords

Cystatin C, Electrochemistry, Photochemistry, Rapid Test

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

胱抑素 C (cystatin C) 是一种分子量为 13 kDa 的非糖基化小分子蛋白[1]。有核细胞均能产生, 无组织特异性。相比肌酐而言, 胱抑素 C 能更加敏感地反映肾脏受损情况, 尤其在 CKDI、II 时期。因此实现胱抑素 C 的快速床旁检测有重大临床意义。电化学及光电化学传感器体系具有操作简单、快速、灵敏等优点, 刚好弥补传统胱抑素检测方法的缺点。本文就电化学、光电化学传感器体系检测胱抑素 C 的研究进行综述。

2. 胱抑素的临床意义

胱抑素 C 完全被肾小管上皮细胞重吸收并在细胞内降解, 不再进入血液循环; 同时, 肾小管上皮细胞也不主动分泌胱抑素 C [2]。因此, 肾脏成了胱抑素 C 的唯一清除器官。通常情况下, 胱抑素 C 血清浓度主要由肾小球滤过率(glomerular filtration rate, GFR)决定。现临床通常通过测定肌酐来计算 GFR, 该方法除受近曲小管分泌肌酐的干扰外, 还会受年龄、性别、体重和身高等因素的影响, 计算出的 GFR 与真实值存在较大偏差[3]。重要的是肌酐对于早期肾功能损害的敏感度较低[4], 无法及时在 CKDI、II 期被检测到。然而, 胱抑素 C 却可以。

胱抑素 C 是一种理想的反映 GFR 变化的内源性标志物[5]。有研究表明, 在出生 12 个月后胱抑素 C 便不受性别、年龄、体重甚至炎症等因素的影响[6]。即使曾有研究表明胱抑素 C 水平可能受到非肾脏疾病的影响, 如皮质类固醇、甲状腺功能障碍、肥胖、糖尿病等即便如此, 但它仍比肌酐作为反映肾小球滤过率的指标更准确[7]。

此外, 老年骨折住院患者的骨骼肌质量下降非常快, 肌酐作为肌肉代谢的分解产物, 会随着肌肉质量的减少而降低[8]。因此, 住院期间老年患者的肌酐水平不能很好反映这部分患者的肾功能。与此相反的是, 在已经被验证了的基于胱抑素 C 来估计 GFR 的公式[9], 能反映住院老年患者的 GFR。Nakhjavan-Shahraki [10]等也证实在预测儿童急性肾损伤方面胱抑素 C 比肌酐具有更敏感的价值。

3. 胱抑素 C 的常见检测方法

目前临床上常用的胱抑素 C 检测方法大致分为均相、非均相检测两大类[11], 具体见表 1。

从表 1 中可以看出, 放射性免疫测定法、EIA 等虽操作简便, 但灵敏度、下限较差, 且检测时间长, 故不适用于临床推广。颗粒增强透射免疫比浊法及颗粒增强散射免疫比浊法灵敏度稍好, 出结果时间短,

能全自动化, 但下限及灵敏度仍有待改进, 且价格昂贵。临床急需一种集快速、简便、灵敏度高、成本低等优点于一身的检测方法。

Table 1. Existing common cystatin C detection methods

表 1. 现有的常见胱抑素 C 检测方法

检测方法名称	优点	缺点
单项免疫扩散法	精准性好, 能准确、定量的测定胱抑素 C 的含量	灵敏度欠佳, 检测仪器昂贵, 操作及检测耗时较多, 不适用于临床检测
放射免疫测定法	灵敏度高、特异性强、操作简单	检测时间较长, 需有一定的设备, 试剂具有半衰期同时又放射性污染, 故试剂的保存时间较短
酶联免疫测定法	实际成本较低, 不需要昂贵的仪器, 检测速度较快	操作步骤复杂, 影响反应因素较多, 不同厂家试剂盒质量参差不齐, 严重影响检测结果, 使其在临床上的推广大打折扣
荧光免疫测定法	灵敏度好、结果准确、测定快速、检测限低等优点	但检测仪器昂贵, 测定成本过高, 不适合于临床广泛应用
溶胶粒子免疫分析	此检测方法灵敏、准确、稳定, 能够实现全自动化, 并与各种商用分析仪兼容。	但此操作方法, 测定时间较长, 操作复杂, 需专业人士, 达到快速床旁检测有困难
乳胶凝集颗粒法	操作简便, 无需昂贵仪器, 无需培训专业人士, 检测时间短	但检测的结果是通过的人眼来判断的, 误差性大, 且检测下限过高, 限制了在临床上的推广
颗粒增强透射免疫比浊法	样本采集方便、检测稳定、准确、快速	灵敏度差, 价格昂贵, 不能大范围推广
颗粒增强散射免疫比浊法	操作简单、快速, 可靠性和可重复性好, 可在自动化平台上轻松被测定	灵敏度差, 价格昂贵, 不能大范围推广

4. 电化学方法

电化学分析法是利用物质的电学、电化学性质及其变化而建立起来的分析方法, 是研究电能和化学能相互转换的科学[12]。在此基础上形成的电化学生物传感器是将待测物通过其特有的反应转换为电信号的传感器[13]。电化学生物传感器有不同的分类, 其中免疫传感器是检测蛋白质最常用的种类, 原理为以抗原抗体免疫反应为基础, 电化学检测系统作为换能器, 从而实现目标物的检测[14]。电化学法检测快速、便捷、价格亲民, 完美符合临床床旁检测要求。

近年来, 已有报道用电化学传感器法检测胱抑素 C。Erika K.G 等在 2019 年建立了一种由氧化石墨烯-二茂铁纳米膜为介导从而产生电流相应的传感器, 将抗胱抑素 C 抗体的 Fc 部分固定在滴注的聚乙烯亚胺膜上, 以提高检测的灵敏度和重复性[15]。氧化还原是电化学检测中必不可少的一部分, 传统的方法是将氧化还原物质添加到电解质液中, 但这样的缺点是在清洗电极等过程中检测信号会延迟[16]。作为稳定性好的氧化还原活性分子, 二茂铁可以附着在传感器表面, 成为电化学活性的中心, 免去了传统免疫传感器中使用的, 外部氧化还原探针[17]。氧化石墨烯是一种导电性好、比表面积的纳米材料, 易生产, 能与蛋白质的某些基团反应[18]。Erika K.G 利用氨基二茂铁活化氧化石墨烯构建了一种不使用氧化还原探针的传感器, 用该传感器实现胱抑素 C 的快速检测。该传感器平台对 CysC 的响应范围为 0.1~1000 ng/mL, 检测下限(0.03 ng/mL)较传统检测方法, 如酶联免疫、荧光免疫测定法等有很大的提升, 传感器的准确、特异性也较好, 为未来现场检测提供了一个有前途的候选方案。但传感器体系较简单, 无放大催化效应。

2020 年 K. S. Shalini Devi 团队, 利用氧化石墨烯-壳聚糖(GO-Chit)纳米复合材料的分散性对碳工作电极进行修饰, 使 CysC 抗体具有较高的偶联率, 传感器体系更为稳定、灵敏, 且弥补了 Erika K.G 构建

的传感器干扰信号大这一缺点。传感器的检测范围: 1~10 mg/L, 检出限: 0.0078 mg/L [19], 能灵敏、特异性的检测出胱抑素 C。

5. 光导电化学发光法

光电化学生物传感是一种在生物医学和环境监测等领域具有实际应用潜力的新兴传感技术。该传感技术是基于光响应材料受光照激发后产生的光生电荷与待测物质直接或间接发生氧化还原反应引起电化学信号的变化实现对待测物的定性或定量分析[20]。与电化学生物传感器相比, 光电化学生物传感器不仅有经济、灵敏、便携等优点, 而且由于分析过程中将激发信号与检测信号完全分开, 即以“光激发-电检测”的模式工作, 显著降低了背景噪音, 与单独电化学方法相比具有更高的检测灵敏度以及更低的检出限的特点[21]。

2016年Li Mi创建了一种基于TiO₂纳米管阵列的简单灵敏的光电化学免疫传感器用来检测胱抑素C。制备的TiO₂纳米管阵列在光照下表现出高而稳定的光电流响应。将胱抑素C特异性纳米抗体与TiO₂纳米管阵列偶联后, 用于跟踪胱抑素C与特异性纳米抗体之间的免疫反应引起的光电流变化, 从而定性、定量地检测胱抑素C含量[22]。此传感器可在0.72 pM至7.19 nM的校准范围内测定CysC, 在0.72 pM~3.6 nM范围内光电流变化与CysC浓度的对数呈线性关系, 检测下限为0.14 pM, 远远低于2019年Anne-Sophie Bargnoux通过增强散射免疫比浊法检测胱抑素C时的检测下限(0.043 mg/L) [23]。显示出该免疫传感器令人满意的检测内、检测间准确性, 还具有高选择性、稳定性。该体系的纳米抗体也不失为一大亮点, 相比于常规抗体, 纳米抗体是最小的抗原结合片段, 甚至能穿透血脑屏障, 稳定性较好。最重要的是, 纳米抗体的C末端可用于高亲和力和特异性共价和定向结合抗原[24], 从而使检测信号变得稳定、灵敏。同时该策略为推广CysC的诊断提供新的思路。

6. 总结

胱抑素C是较好评价肾功能的临床指标, 对于老年、儿童等特殊年龄患者, 胱抑素在评估肾功能时, 明显优于肌酐。以往常用的胱抑素C检测方法, 存在价格昂贵、需专业技术人员、灵敏度低等缺点。电化学及光电化学传感器检测方法简单且易上手、价格低下, 且能实现随时、随地检测, 非常适用于快速床旁检测。但目前报道较少, 传感器体系建立也较少, 未来应继续在已有的基础上探索, 建立信号稳定且灵敏度高的传感器。

参考文献

- [1] Noraddin, F.H., Flodin, M., Fredricsson, A., Sohrabian, A. and Larsson, A. (2012) Measurement of Urinary Cystatin C with a Particle-Enhanced Turbidimetric Immunoassay on Architect Ci8200. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, **26**, 358-364. <https://doi.org/10.1002/jcla.21531>
- [2] 康娟. 以半胱氨酸蛋白酶抑制剂C为例介绍蛋白质质量值传递标准化方法[J]. *检验医学*, 2016, 31(12): 1081-1086.
- [3] 王丽华, 张颖, 江浩, 徐晓东. 血清胱抑素C水平与冠心病病变程度及预后的相关性研究[J]. *中国医学前沿杂志(电子版)*, 2018, 10(8): 38-42.
- [4] 吴惠兰, 毛春芬, 陈晓君. 联合检测血清降钙素原、血清前白蛋白和视黄醇结合蛋白对脓毒症早期诊断的价值[J]. *中国医师进修杂志*, 2019, 42(12): 1093-1096.
- [5] 周恩武, 李明, 刘跃平, 江志红. 血清胱抑素C测定的临床意义及方法学研究进展[J]. *现代中西医结合杂志*, 2014, 23(12): 1367-1368.
- [6] Mathews, P.M. and Levy, E. (2016) Cystatin C in Aging and in Alzheimer's Disease. *Ageing Research Reviews*, **32**, 38-50. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2016.06.003>
- [7] Dharnidharka, V.R., Kwon, C. and Stevens, G. (2002) Serum Cystatin C Is Superior to Serum Creatinine as a Marker of Kidney Function: A Meta-Analysis. *American Journal of Kidney Diseases*, **40**, 221-226. <https://doi.org/10.1053/ajkd.2002.34487>

- [8] Martone, A.M., Bianchi, L., Abete, P., Bellelli, G., Bo, M., Cherubini, A., *et al.* (2017) The Incidence of Sarcopenia among Hospitalized Older Patients: Results from the Glisten Study. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, **8**, 907-914. <https://doi.org/10.1002/jcsm.12224>
- [9] Iacomelli, I., Giordano, A., Rivasi, G., Rafanelli, M., Tortù, V., Cartei, A., *et al.* (2021) Low Creatinine Potentially Overestimates Glomerular Filtration Rate in Older Fracture Patients: A Plea for an Extensive Use of Cystatin C? *European Journal of Internal Medicine*, **84**, 74-79. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2020.06.016>
- [10] Nakhjavan-Shahraki, B., Yousefifard, M., Ataei, N., Baikpour, M., Ataei, F., Bazargani, B., *et al.* (2017) Accuracy of Cystatin C in Prediction of Acute Kidney Injury in Children; Serum or Urine Levels: Which One Works Better? A Systematic Review and Meta-Analysis. *BMC Nephrology*, **18**, Article No. 120. <https://doi.org/10.1186/s12882-017-0539-0>
- [11] Grasselli, C., Barbati, A., Cesarini, L., Pellegrino, R. and Di Renzo, G.C. (2021) The Validation of Immunoblot SDS-PAGE as a Qualitative and Quantitative Method for the Determination of Urinary Cystatin C in Neonates. *Clinical Biochemistry*, **87**, 52-59. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2020.10.005>
- [12] 刘明帅. 利用光电化学传感器检测糖类及其与蛋白的相互作用[D]: [硕士学位论文]. 青岛: 青岛科技大学, 2014.
- [13] 曹卓松, 孙飞龙, 李辰宇, 杨晓波, 王尚, 薛斌, 等. 电化学生物传感器及其检测大肠杆菌的研究[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(10): 193-197.
- [14] 王纯. 电化学生物传感器在细菌病原体检测中的应用及发展趋势[J]. 卫生研究, 2021, 50(1): 168-172.
- [15] Trindade, E.K.G., Silva, B.V.M. and Dutra, R.F. (2019) A Probeless and Label-Free Electrochemical Immunosensor for Cystatin C Detection Based on Ferrocene Functionalized-Graphene Platform. *Biosensors and Bioelectronics*, **138**, Article ID: 111311. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.05.016>
- [16] Cho, I.H., Lee, J., Kim, J., Kang, M.-S., Paik, J.K., Ku, S., *et al.* (2018) Current Technologies of Electrochemical Immunosensors: Perspective on Signal Amplification. *Sensors*, **18**, Article No. 207. <https://doi.org/10.3390/s18010207>
- [17] Yamanaka, K., Vestergaard, M.C. and Tamiya, E. (2016) Printable Electrochemical Biosensors: A Focus on Screen-Printed Electrodes and Their Application. *Sensors*, **16**, Article No. 1761. <https://doi.org/10.3390/s16101761>
- [18] 史艳梅, 张茜, 张俊霞, 李秀敏, 苗明三. 基于石墨烯-金纳米粒子复合材料的黄芩苷电化学传感器的构建及应用[J]. 分析科学学报, 2021, 37(3): 312-326.
- [19] Devi, K.S.S. and Krishnan, U.M. (2020) Microfluidic Electrochemical Immunosensor for the Determination of Cystatin C in Human Serum. *Microchimica Acta*, **187**, Article No. 585. <https://doi.org/10.1007/s00604-020-04503-4>
- [20] 王丹丹. 半导体纳米线阵列三相界面构建及光电化学生物传感研究[D]: [博士学位论文]. 苏州: 苏州大学, 2020.
- [21] Zhao, W.-W., Xu, J.-J. and Chen, H.-Y. (2015) Photoelectrochemical Bioanalysis: The State of the Art. *Chemical Society Reviews*, **44**, 729-741. <https://doi.org/10.1039/C4CS00228H>
- [22] Mi, L., Wang, P., Yan, J., Qian, J., Lu, J., Yu, J., *et al.* (2016) A Novel Photoelectrochemical Immunosensor by Integration of Nanobody and TiO₂ Nanotubes for Sensitive Detection of Serum Cystatin C. *Analytica Chimica Acta*, **902**, 107-114. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.11.007>
- [23] Bargnoux, A.S., Azoury, V., Badiou, S., Klouche, K., Plaweczki, M., Kuster, N., *et al.* (2019) Analytical Performances of PENIA and PETIA Urinary Cystatin C Determination Allow Tubular Injury Investigation. *Annals of Clinical Biochemistry*, **56**, 228-231. <https://doi.org/10.1177/0004563218816341>
- [24] Sukhanova, A., Even-Desrumeaux, K., Kisserli, A., Tabary, T., Reveil, B., Millot, J.-M., *et al.* (2012) Oriented Conjugates of Single-Domain Antibodies and Quantum Dots: Toward a New Generation of Ultrasmall Diagnostic Nanoprobes. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, **8**, 516-525. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2011.07.007>