



Natriuretic Peptides and Analytical Barriers

Vlad C. Vasile¹ and Allan S. Jaffe^{1,2*}

译：王楠 校对：奚苏静

利钠肽及其分析性壁垒

利钠肽检测已经被广泛应用于心衰(HF)诊疗。然而由于不同试剂之间所使用的抗体及检测系统不同，导致试剂间差异显著。为了正确使用利钠肽检测试剂，我们需要正确理解利钠肽生理学及其与检测试剂间的复杂关联。

基础生理学

ANP 主要由心房产生并储存于胞内颗粒中，极易被释放。而 BNP 则主要由心室肌合成并被适量储存，因此 BNP 需要更多的时间进行合成和释放。两种多肽均可诱导利尿排钠降低血管阻力及血压。CNP 由中枢神经系统和血管内皮产生，并参与心血管系统旁分泌调节。树眼镜蛇利钠肽(DNP)则属于利钠肽家族的另一个成员，另外尿扩张素是肾分泌的一种 ANP 截断产物。这些利钠肽家族成员均具有一个保守的由 17 个氨基酸组成的环状结构，该结构可能与受体结合有关。利钠肽受体中 A 类和 B 类受体为鸟苷酸环化酶偶联，该类受体结合会使得 cGMPs 升高，从而引起利尿排钠、血管舒张、肾素-血管紧张素-醛固酮系统抑制、增强心肌舒缓、抑制心脏纤维化及肥大、促进细胞存活及抑制炎症效应等下游效应。而 C 类利钠肽受体无鸟苷酸环化酶活性，被认为是一种清除性受体。值得一提的是，目前绝大多数 BNP 试剂所使用的抗体均会有一株的抗原表位位于环状结构。

当心衰或心梗发生时，心脏体积和压力过载会引起心室壁拉伸、体积过载或心肌坏死，此时会导致利钠肽的产生和释放。目前，利钠肽类标志物已经被指南推荐广泛应用于心脏相关疾病的诊疗。同时，重组 ANP 和 BNP 也已经被作为药物用于心衰治疗。然而该类药物由于疗效和安全性等问题，目前受到了临床医师的质疑。相比于 ANP，BNP 在体内更加稳定且诊断价值方面也优于 ANP，因此 BNP 及其相关标志物已经被相关临床指南作为心衰诊断、危险分层及预后的标志物。

利钠肽分子生物学简述

ANP

ANP 由 151 个氨基酸组成的 preproANP 裂解形成。当机体对心房牵张、血管紧张素 II、内皮素、交感神经介导激活产生应答时，preproANP 会被分泌并进一步裂解为 ANP 1-28 和 NT-proANP 1-98。随后 NT-proANP 会进一步裂解为 3 种活性片段，其中 proANP 1-30 具有长效利钠肽活性，proANP 31-67 具有血管舒张作用，proANP 79-98(利钾肽)参与钾代谢。NT-proANP 及其所有截断片段均存在于外周循环中，而另一位 ANP 家族成员尿扩张素则发现于尿液当中。

BNP

BNP 由 134 个氨基酸组成的 preproBNP 通过移除 26 个氨基酸的信号肽进一步裂解而成。在正常人和心梗患者中均可发现 preproBNP 片段，包括 17-26aa 的片段。该片

段已经被提议作为心肌缺血标志物，另外，信号肽 16-25aa 的片段可能也是缺血症状的潜在标志物。

BNP 由早期应答基因编码，这使得转录可以短期内迅速达到最高水平。细胞内存储的 BNP 非常有限，只有当室心肌细胞需要时才会被大量合成。

proBNP 会以 1:1 的比例裂解为生物活性未知的 NT-proBNP 1-76 和有活性的 BNP 77-108。但是由于 NT-proBNP 的半衰期更长，因此血浆中 NT-proBNP 的浓度要高于 BNP。在正常人和 HF 患者血液循环中均可发现完整的 proBNP。心衰患者的 proBNP 的 N 端 (1-76aa) 会发生翻译后修饰，若干个苏氨酸和丝氨酸残基会发生 O-糖基化，而 BNP 则不会发生糖基化。NT-proBNP 仅中间区域 (28-56aa) 会发生糖基化，而 proBNP 在 28-76aa 的区域内均会出现糖基化。糖基化的存在会因为空间位阻的原因阻断抗体的识别，同时也会抑制弗林蛋白酶对 proBNP 76-78aa 酶切位点的活性。另外，proBNP 和 NT-proBNP 的糖基化存在个体差异。

外周循环中 proBNP 相关多肽的多样性可以归因为 proBNP 的部分裂解。其中弗林蛋白酶和丝氨酸蛋白酶被认为是参与 proBNP 代谢的转换酶。体外研究发现，BNP 1-32 由弗林蛋白酶作用生成，而 BNP 4-32 则由丝氨酸蛋白酶作用生成。如前文所述，糖基化会抑制蛋白酶的作用，proBNP 71 位苏氨酸糖基化会抑制弗林蛋白酶和丝氨酸蛋白酶的作用，从而抑制 NT-proBNP 的形成。通过糖基化抑制蛋白酶可能是心衰的一种病理学现象。

外周循环中 BNP 的降解片段

最初，研究普遍认为外周循环中仅存在 BNP 1-32 和 NT-proBNP 1-76。然而最近的研究显示，事实并非如此。质谱分析结果显示完整的 BNP 1-32 在 HF 患者中仅微量存在，除完整的 BNP 1-32 外，外周循环中还存在 BNP 3-32、BNP 4-32、BNP 5-32、BNP 5-31、BNP 1-26 和 BNP 1-25。导致这些碎片的产生可归因为二肽酶 IV (DPP IV)、脑啡肽酶 (NEP)、胰岛素降解酶 (IDE)、丝氨酸蛋白酶和肽基精氨酸乙醛蛋白酶等的作用结果。此外，在动物中还发现穿膜肽酶也可以作用于 BNP，但是人类中尚未发现此类反应。由于 BNP 在 EDTA 血浆中极不稳定（即使低温保存），因此在保存 BNP 样本时经常会使用高浓度的蛋白酶抑制剂。

ProBNP 及交叉反应

正常个体和 HF 患者外周循环中均存在完整的 proBNP。目前使用的 BNP 免疫检测试剂都与 proBNP 存

在一定程度的交叉反应。不同试剂对于 proBNP 的交叉反应存在显著差异，同时不同试剂对于不同种形式 proBNP (糖基化或非糖基化) 的交叉反应也不同。不同形式 BNP 的鸟苷酸环化酶激活效率不同，proBNP 是鸟苷酸环化酶的低效激活物，体外研究也发现 proBNP 和 NT-proBNP 均会降低 cGMP 的活性。目前，一些推测认为 proBNP 是 BNP 在外周循环中的贮存形式。如前文所述，仅有当 proBNP 的 71 位苏氨酸去糖基化，proBNP 才会进一步裂解为 BNP 1-32。

急性和慢性心衰患者外周循环中的 proBNP 存在形式

相比于急性非代偿和非急性非代偿组，慢性心衰患者糖基化 proBNP 的比例最高。而急性心衰患者中弗林蛋白酶的活性 (非浓度) 却高于慢性心衰患者。这可能是由于不同类型疾病中 proBNP 的代谢机制不同所致。在慢性心衰中，由于急性体液过载的情况较少，因此 proBNP 降解将不会发生，这说明血浆 BNP 迅速升高的调控机制可能是由于某些“易代谢”proBNP 的降解所致。

免疫检测系统

目前临床实践中，有多种利钠肽检测平台，但不同平台间的检测结果存在显著差异 (商业化利钠肽试剂的分析性能参考 table 1，不同试剂的抗体的抗原表位如 Fig 1 所示)。我们需要认识这一事实，同时也需要知道心衰也存在多种形式。BNP 和 NT-proBNP 具有相同的肾脏代谢分数，但是 NT-proBNP 也会通过骨骼肌代谢。

Table 1. Analytical characteristics of commercially available MR-proANP, BNP, and NT-proBNP assays per the manufacturer.

	Capture antibody	Detection antibody	Standard material	FDA ^a cleared-yes/no/claim
Assay BNP				
Abbott Architect, AxSYM iSTAT	NH ₂ terminus and part of the ring structure (Scios), murine MAb, aa 5-13	COOH terminus, murine MAb, aa 26-32	Synthetic BNP 32	Assist in diagnosis of HF; assess severity of disease
Alere ^b Triage BNP	NH ₂ terminus and part of the ring structure (Scios), murine MAb, aa 5-13	BNP (Biosite), murine omniclonal AB, epitope not characterized	Recombinant BNP	Aid in diagnosis and severity assessment of HF; risk stratification of patients with ACS and HF; FDA cleared
Beckman Coulter ^b Access, Access 2, Dxl	BNP (Biosite), murine Omniclonal AB, epitope not characterized	NH ₂ terminus and part of the ring structure (Scios), murine MAb, aa 5-13	Recombinant BNP	Diagnosis HF; assess severity HF; risk ACS; risk HF
Siemens (Bayer) ACS 180, Advia Centaur, Advia Centaur CP	COOH terminus (BC-203) (Shionogi), murine MAb, aa 27-32	Ring structure (KY-hBNPII) (Shionogi), murine MAb	Synthetic BNP	Aid in diagnosis and assessment of severity of HF; predict survival and likelihood of future HF in ACS patients
Siemens (Dade Behring) Dimension VISTA, Dimension ExL	Ring structure (KY-hBNPII) murine MAb, aa 14-21	COOH terminus (BC-203), murine MAb, aa 27-32	Synthetic BNP 32	Aid in diagnosis and assessment of severity of HF; predict survival and likelihood of future HF in ACS patients; pending FDA clearance
Shionogi	COOH terminus (BC-203), murine MAb, aa 27-32	Ring structure (KY-hBNPII), murine MAb	Synthetic BNP	Not FDA cleared
Tosoh ST AIA-PACK BNP	COOH terminus (BC-203), murine MAb, aa 27-32	Ring structure (KY-hBNPII), murine MAb	Synthetic BNP	Not FDA cleared
Assay 1-76 NT-proBNP				
Alere Triage NT-proBNP	Murine MAb, aa 27-31	Sheep MAb, aa 42-46	Synthetic NTproBNP 1-76	Aid in diagnosis of HF; risk stratification of patients with ACS and HF; assessment of increased risk of cardiovascular events and mortality in patients at risk for HF who have stable CAD; not currently available in the US
bioMerieux NT-proBNP1 VIDAS	NH ₂ terminus polyclonal sheep AB, aa 1-21	Central molecule, polyclonal sheep AB, aa 39-50	Synthetic NTproBNP 1-76	Diagnosis HF
NT-proBNP2 VIDAS	Murine MAb, aa 27-31	Sheep MAb, aa 42-46	Synthetic NTproBNP 1-76	Not FDA cleared
Mitsubishi Chemical PATHFAST	NH ₂ terminus polyclonal sheep AB, aa 1-21	Central molecule, polyclonal sheep AB, aa 39-50	Synthetic NTproBNP 1-76	Aid diagnosis of CHF; assess severity CHF; risk stratification in ACS and stable CAD

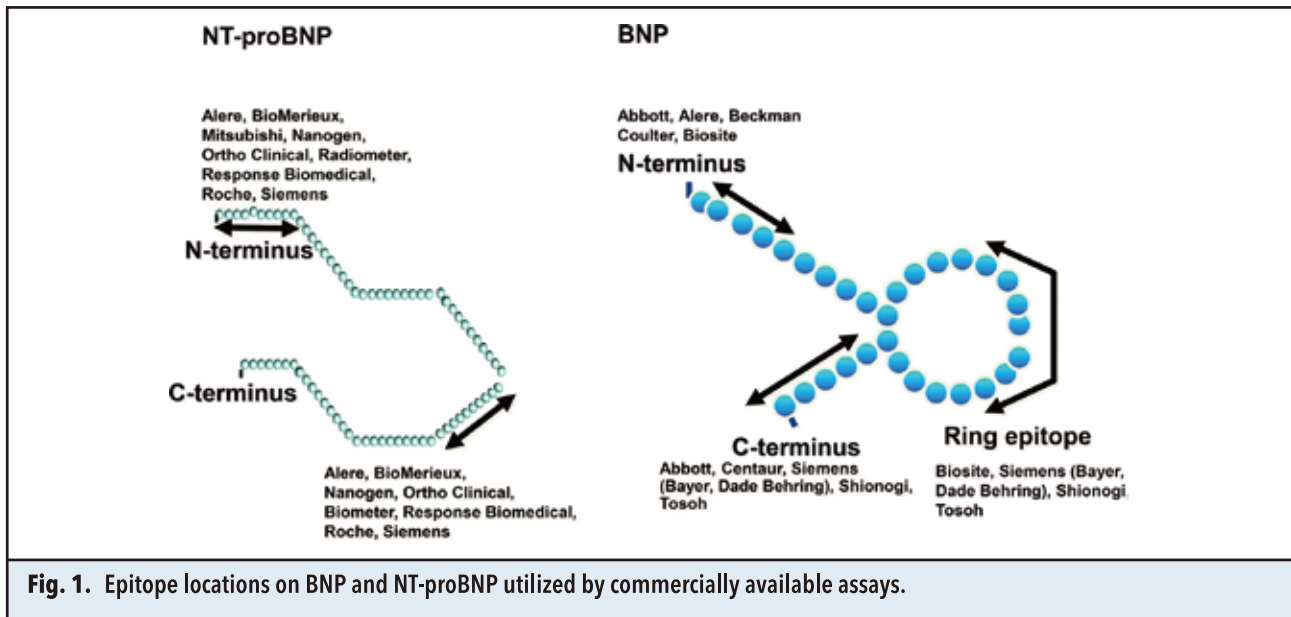
Continued on page 54

Table 1. Analytical characteristics of commercially available MR-proANP, BNP, and NT-proBNP assays per the manufacturer.
(Continued from page 53)

	Capture antibody	Detection antibody	Standard material	FDA ^a cleared-yes/no/claim
Nanogen LifeSign DXpress Reader	Monoclonal (mouse) and polyclonal (goat) Abs	Polyclonal sheep AB	Synthetic NTproBNP 1-76	Diagnosis HF
Ortho Clinical Diagnostics Vitros Eci	NH2 terminus polyclonal sheep AB, aa 1-21	Central molecule, polyclonal sheep AB, aa 39-50	Synthetic NTproBNP 1-76	Aid diagnosis of CHF; risk stratification of ACS and CHF; risk assessment of CV events and mortality in patients at risk for HF with stable CAD; assess severity in HF
Radiometer AQT90 FLEX NT-proBNP	NH2 terminus polyclonal sheep AB, aa 1-21	Central molecule, polyclonal sheep AB, aa 39-50	Synthetic NTproBNP 1-76	Diagnosis HF; risk stratification of patients with ACS and HF; not FDA cleared
Response Biomedical RAMP	Murine MAb, aa 27-31	Central molecule, polyclonal sheep AB, aa 39-50	Synthetic NTproBNP 1-76	Diagnosis HF; assess severity HF
Roche NT-proBNP I Elecsys, E170	NH2 terminus polyclonal sheep AB, aa 1-21	Central molecule, polyclonal sheep AB, aa 39-50	Synthetic NTproBNP 1-76	Diagnosis HF; assess severity HF; risk ACS; risk HF
NT-proBNP II Elecsys, E170	MAb, aa 27-31	Sheep MAb, aa 42-46	Synthetic NTproBNP 1-76	Treatment monitoring in LVD
Siemens (Dade Behring) Dimension RxL, Stratus CS, Dimension VISTA, Dimension EXL with LM	NH2 terminus monoclonal sheep AB, aa 22-28	Central molecule, Sheep MAb, aa 42-46	Synthetic NTproBNP 1-76	Aid in the diagnosis of CHF and assessment of severity; risk stratification of patients with ACS and HF
Siemens (DPC) Immulite 1000, 2000 2500	NH2 terminus polyclonal sheep AB, aa 1-21	Central molecule, polyclonal sheep AB, aa 39-50	Synthetic NTproBNP 1-76	Not FDA cleared
Assay MR-proANP				
Thermo Fisher Scientific KRYPTOR	Polyclonal sheep AB, aa 50-72 of NT-proANP	Monoclonal rat AB, aa 73-90 of NT-proANP	Synthetic NTproANP 50-90	Not FDA cleared

^a FDA, US Food and Drug Administration; CHF, congestive heart failure; ACS, acute coronary syndrome; CV, cardiovascular; CAD, coronary artery disease; LVD, left ventricular dysfunction; aa, amino acid; AB, antibody; MR-proANP, midregional pro-ANP.

^b Both the Alere and Beckman systems use the same 2 antibodies but due to their different assay formats, designation of the monoclonal and omnidonal antibodies as capture and detection antibody is not absolute. (Adapted with permission from IFCC-International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, website <http://www.ifcc.org>.)



a. NT-proBNP试剂

所有NT-proBNP试剂均使用了相同的抗体及校准品，均由罗氏提供。因此，NT-proBNP试剂间的差异小于10%。但是试剂间的一致化仍然不够。NT-proBNP国际联合研究收集了1256例患者并进行了测试，结果建议将125ng/L作为参考值，同时将结果 $\geq 300\text{ng/L}$ 推荐为急性心衰排除最适参考值。该结果的样本群包含了急性心衰和慢性心衰患者，同时参考值因年龄和性别会有差异。

第一代NT-proBNP试剂所使用的抗体为多克隆抗体，位点为1-21和39-50；第二代试剂的抗体为单克隆抗体，位点为22-28和42-46。但是已经有许多研究指出，NT-proBNP中间区域的糖基化会影响抗体的识别。交叉反应分析结果显示，罗氏试剂与非糖基化NT-proBNP高度反应，但是与糖基化proBNP和NT-proBNP几乎无反应，主要原因即为O-糖基化阻断了抗体对于抗原的识别。临床医师应该要意识到，这类试剂的检测结果相比于真实标志物的浓度实际上是显著低估的（一些研究显示，低估程度甚至高达10倍以上）。因此一些研究建议，未来的NT-proBNP检测试剂应加入样本去糖基化处理过程或使用不受糖基化影响的抗体。这种去糖基化处理也可能部分解释肾衰患者NT-proBNP的异常高值。

b. BNP试剂

几乎所有BNP试剂使用的抗体和校准品都不一致，因此BNP检测无标准化，即使抗体相同，不同试剂间的差异仍可高达50%以上。目前最常见的试剂模式为双抗体夹心，其中一株抗体识别环状结构，而另一株抗体识别C末端

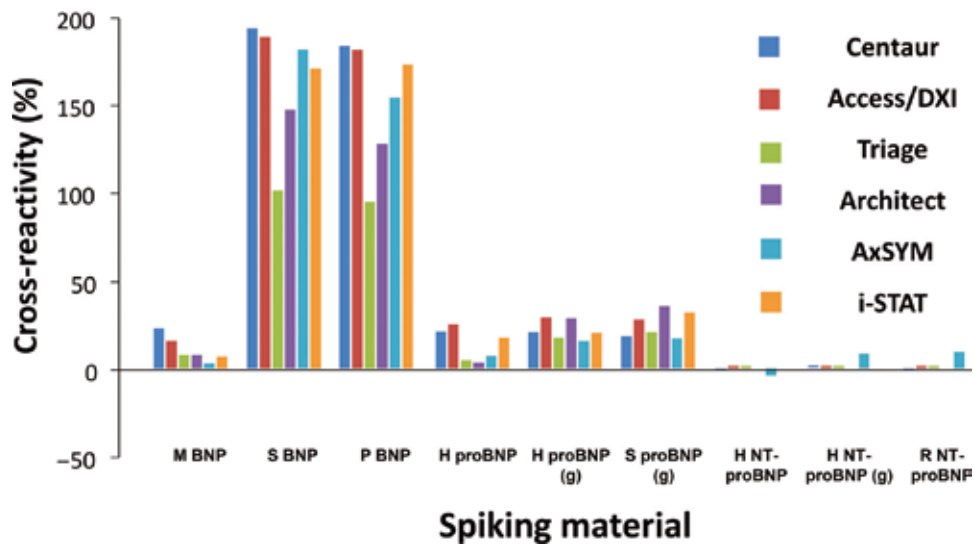
（Abbott AxSYM和Architect及Shionogi IRMA）或N端（Alere Triage和Beckman Access）。由于BNP N端和C端均不稳定易发生水解，因此使用上述两类试剂可能会造成结果的低估。目前ET healthcare使用的由HyTest开发的“单抗原决定簇”法BNP检测系统（SES-BNP™）则不同于前两种反应模式。该模式使用的单抗24C5特异识别BNP环状结构的稳定区域（11-17aa），而另一株抗体Ab-BNP2则仅识别24C5和BNP所形成的免疫复合物。该模式可有效避免N端及C端降解带来的结果低估，从而提高了检测灵敏度；同时也可以识别完整BNP、糖基化proBNP及非糖基化proBNP。

BNP排除急性心衰的参考值为100ng/L，但是由于试剂之间缺乏标准化，不同试剂应该建立自己的参考值。不同BNP试剂间的系统性差异可部分解释为proBNP相关多肽的多样性。BNP试剂目前无国际参考物质，不同试剂所使用的校准品均不同且糖基化程度也不同（Table 2），若存在可用的国际参考物质，一致性将得到显著改善。BNP试剂与proBNP的交叉反应对于检测结果及HF患者均有着十分重要的影响，因为proBNP在HF患者外周循环中普遍存在。不同BNP试剂与proBNP的交叉反应如图2所示，因为proBNP的BNP区域和BNP的结构完全相同，因此所有BNP试剂均与proBNP存在交叉反应。另外由于proBNP是HF患者中BNP的主要免疫活性形式，因此该结果也是与临床相符合的。此外，由于糖基化空间位阻的原因，一些试剂的抗体无法识别糖基化proBNP。因此，可理解为大多数BNP试剂的检测物实际为proBNP及BNP的降解产物。

Table 2. Percentage recoveries and cross-reactivities by BNP and NT-proBNP assays for each peptide [data from Luckenbill et al. (36)].

Assay	S ^a BNP	P BNP	S proBNP	H proBNP	H NT-proBNP	R NT-proBNP
Architect	151 (142-160) ^b	98 (85-110)	38 (37-38)	6 (2-11)	<1 (0-0.8)	4 (4-5)
AxSYM	184 (164-205)	124 (117-130)	34 (28-39)	9 (3-15)	<1 (0-0.5)	4 (3-5)
Centaur	194 (189-199)	137 (133-141)	17 (17-18)	14 (10-17)	<1 (0-0.3)	7 (5-9)
Access	199 (192-205)	130 (129-130)	24 (24-25)	13 (7-19)	<1 (0-0.4)	6 (5-7)
Triage	135 (115-156)	79 (78-80)	19 (18-20)	5 (0-12)	<1 (0-0.2)	3 (2-4)
NT-proBNP						
Dimension	<1 (0-0)	<1 (0-0)	<1 (0-0)	249 (230-267)	243 (235-251)	95 (91-99)
Vitros	<1 (0.6-0.8)	<1 (0.03-0.4)	2 (1.6-2.2)	55 (52-59)	127 (124-130)	71 (68-74)
Elecsys	<1 (0.2-0.8)	<1 (0-0.04)	1 (0.7-2)	29 (28-30)	131 (126-137)	47 (45-49)

^a S, Scios; P, Peptide Institute; H, HyTest; R, Roche.
^b 95% CIs are in parentheses.

**Fig. 2.** Cross-reactivity of NT-proBNP and BNP assays [data from Luckenbill et al. (36)].

M, Mitsubishi; S, Scios; P, Peptide Institute; H, HyTest; R, Roche.

PARADIGM-HF试验【ARNI（血管紧张素受体脑啡肽酶抑制剂）与ACEI（血管紧张素转换酶抑制剂）对于全球心衰致病致死率影响的前瞻性比对研究】显示，LCZ696（脑啡肽酶抑制剂和血管紧张素受体阻断剂，心衰药物）相比ACEI具有更好的预后结局。脑啡肽酶是一种在细胞膜普遍表达的蛋白酶，主要发现于肾脏，作用为清除疏水残基的氨基。人ANP和CNP均是脑啡肽酶的底物，而BNP则不是。在肾细胞膜上，特异性的脑啡肽酶抑制剂并不能抑制BNP降解，提示脑啡肽酶可能不参与BNP调控，进一步说明LCZ696对于ANP的作用更为突出。体外研究发现，ProBNP作为HF患者血液循环中BNP主要的免疫活性形式，也对脑啡肽酶有抑制作用。而且有趣的是，这种抑制并不是通过糖基化实现的。此外，相比于识别14-21aa区域的抗体，使用特异性识别BNP 11-17aa区域的抗体，对于脑啡肽酶更加不敏感。目前，LCZ696对于BNP和NT-proBNP浓度的影响尚无定论。PARADIGM-HF试验的结果显示，使用沙库比曲缬沙坦片治疗后，最初会出现BNP升高，而NT-proBNP则一直处于下降趋势，说明NT-proBNP可能更适合用于沙库比曲缬沙坦片疗效评估。但是，以上结论仍有待进一步验证。外周循环中BNP水平的升高可能会抑制proBNP的生成，因此NT-proBNP的下降可能不一定能反映出心脏功能的改善。此外，有研究表明BNP浓度的升高会抑制脑啡肽酶活性，从而起到调控作用。总之，单独检测BNP或NT-proBNP尚不足以对新药疗效及预后进行评估。

c. proBNP试剂

HyTest设计开发了一种特异性检测proBNP的双抗体夹心反应模型，使用一株识别proBNP 13-20aa区域的抗体和一株识别BNP 26-32aa的抗体。这种高灵敏度的检测系统可有效避免糖基化的影响。Bio-Rad的proBNP试剂使用一株识别proBNP 75-80aa的单抗及一株识别BNP区域的多抗。由于分子71位苏氨酸的O-多糖存在，会影响抗体的识别。因此，可能会造成检测结果的低估。对于急性代偿失调HF患者，proBNP和BNP及NT-proBNP类似不会带来额外附加的诊断价值。

分析前问题

分析前问题也是造成试剂之间显著差异的重要因素。在样本采集后，BNP会迅速发生蛋白水解。当使用玻璃采血管时，激肽释放酶的激活会导致BNP不稳定。因此在采血时，仅推荐使用塑料管。抗凝剂的选择十分重要，EDTA血浆是BNP检测唯一推荐的样本类型。在EDTA中，BNP可在室温下保存24小时，30度可保存12小时，20度下可稳定一个月，即使分子形式会有多种。但是要注意的是，样本的稳定性取决于试剂所使用抗体的特异性位点，即表观稳定

性。此外，添加蛋白酶抑制剂抑肽酶可以进一步提高BNP的稳定性。对于罗氏NT-proBNP，血清是唯一推荐的样本类型。NT-proBNP相对稳定，4度情况下可至少保存72小时，而在-80度条件下可保存1年。此外，无论BNP还是NT-proBNP试剂，对于样本冻融稳定性的研究是必要的。

总结与启示

利钠肽相关标志物已经作为心衰标志物被应用多年。由于不同类型心衰患者外周循环中利钠肽存在形式的多样性，同时伴随利钠肽复杂分子生物学及检测平台的多样化，临床医师进行结果分析无疑是巨大的挑战。同时，心衰新药LCZ696会对利钠肽检测造成影响仍然没有被研究透彻。此外，不同试剂之间缺乏一致性，而且受到糖基化影响程度也有所不同。因此在进行随访分析时，应使用相同试剂。

在开发新一代利钠肽检测试剂时，应充分考虑利钠肽复杂的分子生物学特征。如前文所述，由于HF患者中糖基化NT-proBNP普遍存在，现有罗氏试剂的检测结果相比于真实NT-proBNP是显著低估的，因此在开发新一代试剂时应该进行去糖基化处理，或者使用不受糖基化影响的识别分子两端的抗体。另一方面，由于LCZ696治疗对于BNP的影响仍然没有研究透彻，而11-17aa区域对于脑啡肽酶不敏感，因此在开发新一代BNP试剂时位点的选择同样重要。正如前文所述，HyTest SES-BNP™系统也是未来新一代BNP试剂的开发方向之一。

