



CHAPTER ONE

Standardization of BNP and NT-proBNP Immunoassays in Light of the Diverse and Complex Nature of Circulating BNP-Related Peptides

Alexander G. Semenov^{*,1}, Evgeniya E. Feygina[†]

^{*}HyTest Ltd., Turku, Finland

[†]School of Biology, Moscow State University, Moscow, Russia

¹Corresponding author: e-mail address: alexander.semenov@hytest.fi

Advances in Clinical Chemistry, Volume 85
ISSN 0065-2423
<https://doi.org/10.1016/bs.acc.2018.02.001>

© 2018 Elsevier Inc.
All rights reserved.

译：杨晨辰 校对：王楠

外周循环中BNP存在形式的多样性和复杂性，对BNP和NT-proBNP免疫检测进行标准化

目录

1.利钠肽家族的多样性	3
2.NPs的诊断价值	4
3.外周循环中BNP存在形式的多样性	4
4.ProBNP是外周循环中BNP主要的免疫活性形式	5
5.proBNP/NT-proBNP的翻译后修饰与外周循环中NPs的异质性	6
6.BNP试剂的多样性	6
7.NT-proBNP试剂与NT-proBNP/proBNP的糖基化	7
8.ProBNP检测试剂	7
9.BNP与NT-proBNP检测标准化的必要性	8
10.BNP检测与心衰治疗	8
11.BNP检测标准化进展	10
12.NT-proBNP试剂通用标准品的必要性	11

摘要

利钠肽（BNP）和N末端利钠肽前体（NT-proBNP）作为标志物，已广泛应用于心力衰竭（HF）临床实践。BNP自1988年被首次发现以来，研究者在准确检测BNP和NT-proBNP方面投入了大量的工作，以便其更可靠的应用于临床。目前，这些标志物的检测已经在全球范围得到了广泛应用，并应用于急性、慢性心衰的诊断及风险评级和治疗监控。目前市面上有多个检测BNP和NT-proBNP的免疫检测试剂盒。

近期的一些研究显示，不同的BNP和NT-proBNP检测试剂和平台存在着显著差异，它们的检测结果没有足够的可比性。由于不同的免疫检测试剂之间缺乏等价性，使得检测结果的解释变得复杂，医学诊断的cut-off值取决于不同的免疫检测试剂。目前，在对BNP和NT-proBNP试剂校准时使用哪种标准物质或参考测量程序尚未达成一致。本文的目的在于总结相关资料和数据，包括BNP存在形式的复杂性，现有的BNP和NT-proBNP检测试剂的特异性，并讨论BNP和NT-proBNP检测标准化的方法。

1. 利钠肽家族的多样性

利钠肽及其相关多肽（NPs）的历史可追溯至60年前，人们首次在心房的心肌细胞中发现了高密度的颗粒。这些颗粒的形态学类似于内分泌细胞中的分泌颗粒，在骨骼肌或心室心肌细胞中并未发现该颗粒。根据形态学上的相似性，研究者推测这些心房特有的颗粒可能用于在心肌中存储儿茶酚胺，但是后续的研究表明该假设是错误的。

Bold在1978年提出一种定量检测大鼠心房内颗粒的方法，该研究证明了心房内高度颗粒化的发生是由水和钠的缺乏引起的。此后不久，Bold和他的同事还发现，给大鼠静脉注射心房组织提取物时，有显著的利尿排钠作用。这项重要发现证明了哺乳动物心脏的内分泌功能与一种新的激素有关——心房利钠因子（ANF）。

在接下来的几年里，许多研究小组的积极开展研究工作，对ANF分离纯化并进行测序。从心房颗粒中分离出的ANF是一组不同长度的异质多肽，由高分子量和低分子量的片段组成。1983年Flynn从大鼠中分离了ANF，并对由28个氨基酸残基组成的具有生物活性的多肽进行了鉴定，其相对应的是低分子量的ANF片段。随后，该片段被命名为心房肽（ANP），含有一段由17个氨基酸残基组成并由二硫键链接的环状结构。其它研究小组也报道了类似的ANP结构，不同之处是这些结构有些裂解或是N末端延长。这种N末端延长的ANP片段可能是由它的前体结构裂解产生，它对应的是高分子量的ANF相关多肽片段。根据大鼠和人ANP的cDNA克隆和测序结果表明，ANP的前体

proANP由126个氨基酸残基组成。

ANP发现后不久，研究者从猪大脑中提取的另一种多肽有着类似的生物活性，该蛋白被命名为利钠肽（BNP）。与ANP类似，BNP同样含有二硫键链接的环状结构，与ANP序列有很高的同源性。基于ANP是由其前体（126aa多肽）裂解产生的结论，BNP同样可能存在前体蛋白。Minamino用BNP特异性的放射性免疫检测方法验证了猪心房中存在着BNP免疫活性物质。通过免疫分析和凝胶过滤层析，结果显示BNP免疫活性物质由高分子量和低分子量的两个片段组成。通过蛋白测序和水解性质的分析，证实高分子量的片段是由108个氨基酸残基组成的proBNP，它会通过裂解得到具有免疫活性和生物活性的BNP 1-32。尽管BNP的主要来源器官是心室，研究者依然保留了利钠肽（BNP）的命名。

随后的研究发现ANP和BNP从前体蛋白裂解的过程是由独特的内切蛋白水解酶介导的：心脏特异性蛋白酶（Corin蛋白酶）和蛋白转化酶（弗林蛋白酶），分别裂解proANP和proBNP（Fig. 1）。

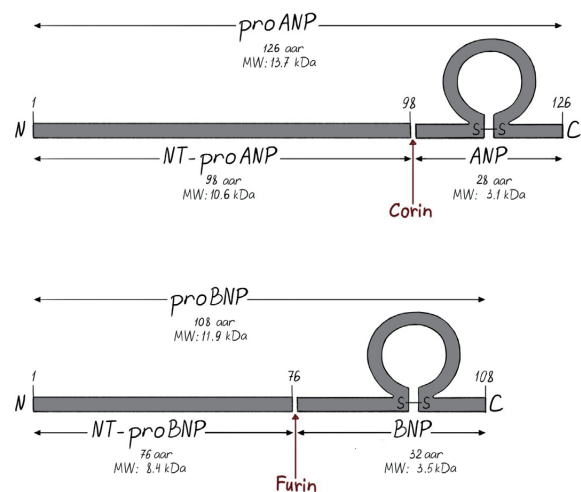


Fig. 1 人proANP、ANP、proBNP 和BNP的蛋白结构及相关蛋白酶的裂解位点。

1990年，Sodoh首次发现了NPs家族的第三个成员：C-型利钠肽（CNP）。这种多肽最早从猪大脑中提取，它主要在大脑中表达，在软骨细胞和内皮细胞中含量丰富。与内分泌激素ANP和BNP不同的是，CNP主要起旁分泌因子的作用。

NPs家族的三个成员都含有两个半胱氨酸残基（通过二硫键桥接）组成的环状结构，有着很高的同源性，并参与维持体内的心肾平衡。

NPs由两种NPs受体（NPRs）调节，分别是NPR-A和NPR-B（鸟苷酰基环化酶结合受体）。NPs与这些受体结合，导致环鸟苷酸含量升高，从而引起生理学变化。另一种NPR是NPR-C，它缺乏鸟苷酰基环化酶结合区域，它的作用是从血液循环中清除NPs。

本文重点是BNP循环形式的多样性以及这种多样性对于检测标准化的影响。

2. NPs的诊断价值

考虑到NPs的生理作用，ANP和BNP的功能可能与心肌损伤和心力衰竭（HF）有关。1986年，Burnett通过放射免疫检测方法分析了正常人（无心血管疾病）和心血管疾病患者的ANP浓度水平。研究发现心脏充盈压力的升高与外周循环中的ANP浓度显著升高有关，而不是预期的降低。

另一项对心衰患者和正常人血液中BNP浓度的研究表明，与ANP的情况相同，心衰患者血液中的BNP浓度升高。严重心衰患者血液中BNP浓度的升高幅度远大于ANP。这项发现表明BNP作为一种心脏标志物在病理生理学方面有着重要的意义。

随后的研究发现，在病理状态下ANP和BNP的表达和分泌显著升高，伴随着心室的伸展，容量负荷过重和缺血性损伤，这些症状通常出现于心衰和心肌梗塞患者身上（Fig. 2）。

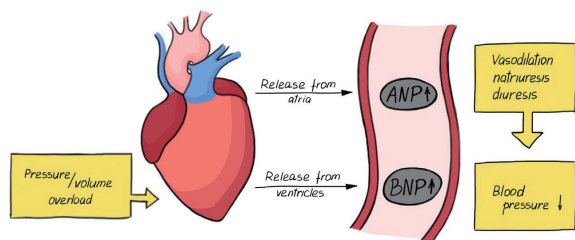


Fig. 2 ANP和BNP从心肌中分泌是通过机械压力刺激或神经激素调节

proANP和proBNP以及它们的N末端裂解产物NT-proANP和NT-proBNP的浓度同样也在心衰患者中升高。NPs浓度升高与心脏压力相关，所以人们将NPs作为心衰的诊断和预后标志物。而CNP作为心血管并发症的标志物并没有太大的价值，它没有被用到常规的临床中。

BNP和NT-proBNP在检验分析和临床应用上优于ANP相关多肽。BNP和NT-proBNP的诊断意义已经被诸多研究证实。截至目前，这两种标志物都被用做诊断心衰、管理和评估风险的金标准。最近，在门急诊病人的心衰诊断中，相关指南均囊括了BNP和NT-proBNP，并建议这两种标志物可用于确定心衰在各种条件下的存在及严重程度（Table 1），它们各自的参考值不能互换使用。

Table 1 心衰诊断中BNP和NT-proBNP检测的使用建议(根据2017年ACC/AHA/HFSA 更新的心力衰竭管理指南)

推荐	推荐等级	证据水平
高危人群中筛查心衰	IIa (中度)	B-R (中等)
在公共场所或急诊室出现呼吸困难的患者中筛查心衰	I (高度)	A (最高)
慢性心衰患者的预后或严重程度的诊断	I (高度)	A (最高)
失代偿性AHF住院患者的预后	I (高度)	A (最高)
为所有住院心衰患者建立出院后的预后	IIa (中度)	B-R (中等)

值得注意的是，外周循环中的多个BNP片段，包括完整的proBNP和NT-proBNP，统称为B型NPs家族。在解释BNP和NT-proBNP的免疫检测结果时，应当统一命名，以避免潜在的误解和错误。

3. 外周循环中BNP存在形式的多样性

在外周循环中存在着的具有生物活性的BNP和生物活性未知的NT-proBNP，两者由它们的前体蛋白proBNP裂解产生。理论上，经过弗林蛋白酶裂解，释放到外周循环中的BNP和NT-proBNP比例是1:1。外周循环中应当只存在两种proBNP裂解碎片，BNP1-32和NT-proBNP1-76。这中过于简单化的外周循环proBNP理论被许多研究挑战，许多研究者证实在外周循环中存在着多种形式的BNP。Hawkrige在2015年的一项研究结果表明，他在晚期心衰患者血浆中无法检测到完整的BNP 1-32。这个意想不到的研究结果引出一个疑问：心衰患者血浆中哪种形式的BNP具有免疫活性？

Niederkofer及同事的一项研究首次发现了BNP1-32和它不同形式的N末端和C末端的片段。该研究通过免疫提取和定量质谱相结合的方法，定量检测了BNP1-32和它的裂解片段，例如BNP 3-32, BNP 4-32, BNP 5-32, BNP 5-31, BNP 1-26和 BNP 1-25。尽管该研究发现在12份心衰

患者血浆样本中，有11份样本中存在完整的BNP1-32，但它在总的BNP相关多肽中占比非常小（浓度范围在25-43 pg/mL）。与血浆中具有免疫活性的BNP总体相比（浓度范围在900-5000 pg/mL），完整的BNP 1-32含量非常小。这就能解释之前Hawkrigde未能在晚期心衰患者血浆中检测到完整的BNP 1-32。

Miller的研究也得到了相同的结论，在慢性心衰患者血浆中具有生物活性的BNP 1-32含量非常少。在这项研究还发现了BNP碎片3-32、4-32、5-32、2-31、3-27、3-39、4-27、4-30、4-31、5-31和6-32。这些研究结果说明，心衰患者外周循环中完整的BNP 1-32仅代表了具有免疫活性的BNP的一小部分。

这些BNP片段的形成，主要归因于患者外周循环中含有一些蛋白酶。二肽基肽酶IV（DPP IV）和中性肽链内切酶（又称脑啡肽酶，NEP）主要裂解BNP的N末端，产生BNP 3-32（通过DPP IV降解）和BNP 5-32（通过NEP降解）。此外，NEP还会裂解BNP环状结构上的位点Arg17-Ile18。胰岛素降解酶（IDE）同样会降解BNP，主要降解位点在C末端：Leu29-Arg30和Arg30-Arg31。BNP 4-32主要由Corin蛋白酶裂解proBNP产生。目前已知的BNP裂解位点在Fig. 3中可见。

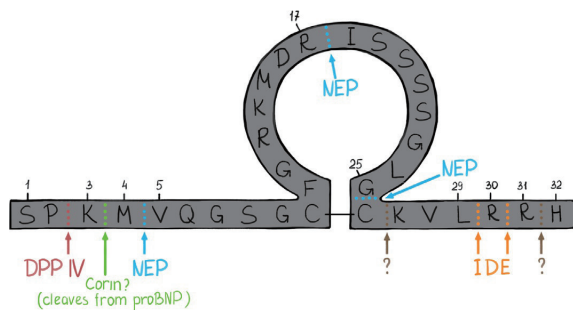


Fig. 3 目前已知的BNP可降解位点及对应的蛋白水解酶

BNP本身不稳定性导致BNP在样本存在着不同形式的片段，血浆样本中的BNP甚至在-80°C条件下也不稳定。在血浆样本中添加高浓度的蛋白酶抑制剂能有效防止BNP降解，例如最高至10mmol/L苯甲胺和5mmol/L的AEBSF。

4. ProBNP是外周循环中BNP主要的免疫活性形式

尽管在心衰诊断中使用BNP和NT-proBNP已超过二十年，研究者仍然不确定人血液中存在以及能被免疫检测试剂检出的是哪种形式的BNP和NT-proBNP。一项凝胶过滤和免疫检测相结合的研究表明，外周循环中的BNP主要由两种形式的免疫活性多肽组成：高分子量的片段（约30-40kDa）和低分子量的片段（约3kDa）。Yandle和Shimizu的研究结果表明，高分子量和低分子量的片段分别对应的是proBNP 1-108和BNP 1-32。这项研究使用竞争法放射免疫试剂检测心衰患者血浆样本。

Seferian的研究了心衰患者血浆样本中proBNP/BNP的比例。他通过凝胶过滤人血浆样本，分析了外周循环中BNP的不同存在形式，并用免疫夹心法检测试剂定量检测样本中proBNP、BNP和NT-proBNP的浓度。结果显示不同个体之间，proBNP/BNP的比例有很大的变化，proBNP/BNP浓度比为1.8-10.8。基于这些研究，人们明确了未裂解的proBNP 1-108是外周循环中具有免疫活性的BNP的主要组成。

另一项研究使用了具有BNP环状结构特异性的免疫检测试剂，等量检测人血浆样本中BNP和proBNP含量，该研究验证了外周循环中proBNP含量高于BNP。proBNP/BNP的比例随着个体的差异存在变化，proBNP浓度比BNP高3.96至16.3倍。

尽管proBNP的含量占主导地位，它却表现了非常低的生理活性，与NPR-C的低亲和力，并且具有较高的抗水解的特性。

这些研究引出了一个重要事实：在大多数情况下，proBNP是心衰患者外周循环中具有免疫活性的BNP的主要组成部分。这个事实对于BNP测定结果的解读至关重要，因为所有商业化的BNP免疫测定试剂对于不同形式的BNP和proBNP表现出了不同的交叉反应性（稍后讨论）。

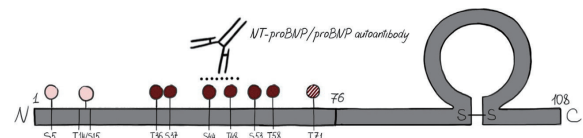


Fig. 4 Halfinger明确的9个内源性proBNP/NT-proBNP的O-糖基化位点。潜在的抗体结合位点已被标出。

5. proBNP/NT-proBNP的翻译后修饰与外周循环中NPs的异质性

与其它分泌蛋白类似，proBNP在形成的过程中会经历翻译后修饰，这项发现让研究者进一步了解外周循环中proBNP相关多肽。

2006年研究者们发现proBNP的O-糖基化主要在氨基酸1-76上形成。Schellenberger首先报道proBNP糖基化的情况：CHO细胞表达的proBNP和从心衰患者中提取的proBNP都存在O-糖基化结构。同时，他还确认了重组proBNP的7个O-糖基化位点：Thr36, Ser37, Ser44, Thr48, Ser53, Thr58和Thr71。后来研究发现心衰患者外周循环中同样存在着糖基化的NT-proBNP，并且具有个体间差异，这些差异主要是寡糖链的位置、结构和长度。

近期Halfinger确认了内源性proBNP和NT-proBNP糖基化位点。他通过串联免疫亲和层析、糖苷酶处理、化学上的 β 消除和米歇尔加成结合高分辨率的质谱分析，确认了心衰后期患者血浆中proBNP/NT-proBNP的9个O-糖基化位点。其中七个O-糖基化位点与之前的研究结论一致，分别是Thr36, Ser37, Ser44, Thr48, Ser53, Thr58和Thr71。还有两个O-糖基化位点，分别是Ser5和Thr14或Ser15（没有明确区分）（Fig. 4）。

值得一提的是，在这些糖基化蛋白之中，也检测到了没有糖基化的蛋白，说明proBNP和NT-proBNP是以糖基化和非糖基化的混合形式存在的。

proBNP糖基化的具体作用机理尚不完全清楚。有研究表明，在proBNP裂解位点附近的糖基基团主要用来调节酶介导的proBNP水解反应。基于细胞和体外的研究证实，如果Thr71被O-糖基化修饰，那么就不会发生弗林蛋白酶和科林蛋白酶介导的proBNP水解，这说明了BNP的O-糖基化具有一定调节作用。

Vodovar研究了不同分类的心衰患者血浆中proBNP Thr71的糖基化程度，这些心衰患者分为急性失代偿心力衰竭（ADHF）、非急性失代偿心力衰竭（non-ADHF）和慢性心力衰竭。在慢性心衰患者中proBNP糖基化程度最高，ADHF和non-ADHF患者中糖基化程度相近。这项发现表明，慢性心衰患者中proBNP的裂解效率可能低于ADHF和non-ADHF患者。

近期，研究者还发现了大型proBNP和NT-proBNP复合物的存在，这些复合物是由proBNP/NT-proBNP和抗proBNP/NT-proBNP自身抗体组成。现有的检测中心位点的NT-proBNP检测试剂无法识别这些巨大的复合物。目前为止，这些复合物的病理生理学意义未知。

6. BNP检测试剂的多样性

最早出现的BNP检测方法是竞争放射免疫法（RIA）。这些检测试剂帮助研究者更加深入地研究BNP及其相关多肽。然而该类检测试剂也存在着诸多缺点，例如试剂有效期较短和处理废弃物的问题，这是放射性标记物本身的缺陷。RIA的这些缺陷影响了其在诊断领域的广泛应用，随后出现的免疫夹心法克服了上述问题。直到现在，免疫夹心法仍是BNP检测最常用的方法。使用两种抗体同时识别待测抗原的不同位点的免疫夹心法，对待测物有着高度的特异性，并广泛运用于免疫检测系统中。目前已知的BNP特异性的免疫夹心检测试剂都采用一株识别BNP环状结构位点的抗体和另一株识别BNP的N末端（例如Alere Triage和Beckman）或C末端（例如Shionogi, Abbot和Siemens）区域的抗体。这种检测系统的主要挑战是BNP易水解的特性：外周循环中的BNP主要以N末端和C末端水解片段的混合形式存在。因此，任何现有的BNP免疫夹心试剂只能检测BNP其中一种形式的水解片段。

外周循环中具有免疫活性的BNP主要以pro-BNP的形式存在，由于它存在O-糖基化结构的，具有糖基化异质性，因此基于不同特异性的抗体开发的BNP免疫检测试剂与proBNP的交叉反应是不同的，这导致不同检测系统之间相对较大的差异。因为proBNP的糖基化程度和附着的糖基基团会产生空间位阻，从而影响免疫检测试剂对proBNP位点的识别。

为了避免上述问题，HyTest公司开发了一种新型BNP免疫检测系统，并已被ET Healthcare公司的平台所应用。这种新型的免疫检测系统，我们称之为单抗原决定簇免疫夹心法（SES-BNP™），该方法使用了两株单克隆抗体：捕获抗体24C5（识别BNP的环状结构上的位点11-17aa）和检测抗体Ab-BNP2（识别抗体24C5和BNP/proBNP所形成的免疫复合物，而不是单独识别抗原）。在该检测系统中，BNP的N末端或是C末端水解并不会影响抗体的识别。此外，与其它BNP免疫检测系统相比，SES-BNP™能同时识别糖基化和非糖基化的proBNP。

现有商业化BNP检测系统如图所示（Fig. 5）。



Fig. 5 不同商业化BNP检测试剂的抗体识别位点及标准物质

7. NT-proBNP检测试剂和NT-proBNP/proBNP的糖基化

与BNP检测试剂不同，现有商业化NT-proBNP检测试剂的设计原理基本相似。因为Roche开发的NT-proBNP检测抗体和校准品最早进入市场，并且是唯一的商业来源并经过美国食品和药物管理局（FDA）批准的NT-proBNP的免疫检测平台。

Roche的NT-proBNP检测试剂使用的抗体识别NT-proBNP分子的中心位置（识别位点是27-31aa和42-46aa）。其中一株识别NT-proBNP 42-46aa，包含了潜在的糖基化位点Ser44。因此Roche的NT-proBNP检测试剂只能检测内源性NT-proBNP（外周循环中的NT-proBNP/proBNP）没有糖基化的部分，并不是NT-proBNP的总量（NT-proBNP+proBNP）。这样的检测试剂可能会低估个体样本中NT-proBNP/proBNP的总量。

尽管该NT-proBNP检测试剂只能检测特定的NT-proBNP/proBNP，它仍有着优异的临床表现，是公认的相对成熟的NT-proBNP检测系统。如果NT-proBNP检测试剂所用抗体对识别NT-proBNP的非糖基化位点，是否会提升NT-proBNP的检测优势（尤其针对特定的心衰患者）？考虑到NT-proBNP/proBNP的糖基化对于NT-proBNP检测系统的潜在负面影响，HyTest公司开发

了一种可选的免疫检测系统（详见Fig. 6）。这种免疫检测系统使用两种单克隆抗体分别识别NT-proBNP分子上的非糖基化位点（13-20aa和63-71aa），它可以检测外周循环中真实的NT-proBNP/proBNP浓度水平。研究数据表明，这种新型的NT-proBNP检测系统与Roche的检测系统对于心衰的诊断有着相同的临床价值。由于这种检测系统能够独立检测糖基化的内源性NT-proBNP/proBNP，因此它可能对某些特定患者的诊断有利，当然这需要在将来的临床研究中验证。

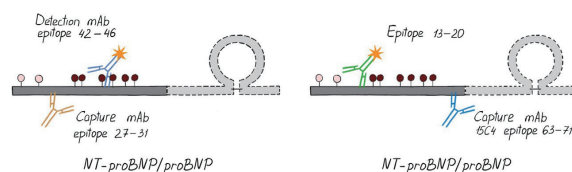


Fig. 6 Roche设计的NT-proBNP检测系统原理图（左侧）和HyTest设计的NT-proBNP检测系统原理图（右侧），NT-proBNP潜在的O-糖基化位点已标出。

8. ProBNP检测试剂

由于proBNP包含了NT-proBNP和BNP片段，所以要设计与BNP没有交叉反应的proBNP检测系统，其使用的抗体其中一株应当识别NT-proBNP区域的N末端，另一株识别BNP区域的C末端。Seferian开发了一种proBNP检测系统，其中捕获抗体识别BNP分子26-32aa区域（proBNP分子102-108aa），检测抗体识别proBNP分子13-20aa区域。该方法不受proBNP分子的糖基化影响，因为它使用的抗体识别位点不存在O-糖基化。

Giuliani开发的proBNP特异性检测系统所用的单克隆抗体识别proBNP分子的铰链区域（75-80aa）。该proBNP检测试剂的全自动化版本是在BioPlex 2200多通道分析系统上运行的（Bio-Rad）。考虑到proBNP的糖基化结构的存在，Thr71的O-糖基化会影响抗体识别proBNP铰链区域，因此该proBNP检测系统可能会低估心衰患者血浆样本中proBNP的含量。

Lam研究的proBNP检测系统特异性识别proBNP 3-108，它使用的多克隆抗体（来自BioSite）识别BNP区域，单克隆抗体识别完整的proBNP 3-108 N末端。

迄今为止，proBNP特异性检测系统的表现与BNP或NT-proBNP的检测系统相同，并无显著优势。

9. BNP和NT-proBNP检测标准化的必要性

心力衰竭影响着大量的患者，随着人们寿命的延长，预计将来心衰患者的数量还会持续增加。人们在临床实践中不断开发和引进新的心衰治疗手段，改善心衰患者病情和预后的情况。因此BNP或NT-proBNP检测试剂的数量会持续上升，以满足日益增长的心衰诊断和监控治疗效果的需求。可靠的诊断数据的对于人们健康至关重要。

许多研究发现不同的BNP和NT-proBNP检测试剂存在着差异，并强调了检测标准化的重要性。研究者在一项心肺筛查的研究中发现，不同检测系统之间存在着巨大差异，BNP检测系统(43.0 CV%)和NT-proBNP检测系统(8.7 CV%)。此外，这项研究还发现应用最广泛的BNP检测试剂之间也有着巨大的系统性差异（TRIAGE Beckman-Coulter检测系统的检测平均值比ADVIA Centaur Siemens检测系统高两倍）。相对的，NT-proBNP检测系统之间的一致性较好。

2012年，用来排除心衰的BNP cut-off值为<100 ng/mL，NT-proBNP cut-off值为<300 ng/L。然而这些cut-off值并没有区分不同的检测试剂，对所有的BNP和NT-proBNP检测试剂推荐相同的cut-off值是不合理的。随着心衰治疗手段的进步，在治疗监控中，BNP和NT-proBNP检测结果的等效性至关重要。

现有的BNP检测试剂缺乏等效性的主要原因是它们使用的抗体之间的差异，不同抗体导致不同的捕获和检测位点，并且缺乏校准BNP检测试剂的通用参考物质。目前每家BNP检测试剂的制造商都有其自制的校准品。

因为大分子物质的复杂特性，蛋白和多肽类物质的国际标准化的过程既困难又费时。上文提到BNP具有较高的生物学和个体变异性，以及结构异质性，人们还未完全了解BNP及其相关多肽。

所有商业化的BNP检测试剂可以同时检测糖基化和非糖基化的proBNP，因为完整的BNP 1-32是proBNP的C末端部分，抗体识别BNP和proBNP的共同表位。由于外周循环中BNP多样化的性质，与全部的具有免疫活性的BNP相关多肽相比，BNP的特殊形式（例如BNP1-32，BNP 3-32或BNP 5-32）可能是更好的标志物。但目前没有实验数据表明针对BNP或proBNP的检测比总BNP更具优势。Lam研发的一种特异性识别BNP 3-32而不识别proBNP的试剂，但实验数据表明在诊断心衰和左心室功能障碍上，该检测试剂并不具优势。

近期研发的一种检测血浆中BNP 1-32的检测试剂，其与proBNP及其它形式的BNP片段没有交叉反应。该检测试剂使用的抗体能够识别完整BNP的N末端和C末端，与现有的BNP检测试剂相比，该检测试剂对于心衰的诊断和预后

的价值暂时未知。

Saenger的一项研究阐明了不同的商业化BNP检测试剂对于不同形式的BNP（BNP 1-32和BNP相关多肽片段）和proBNP（糖基化和非糖基化）表现出了不同的交叉反应性，甚至包括使用同样抗体的BNP检测试剂。这表明，除了抗原决定簇的差异之外，可能还有其它因素导致BNP检测结果的差异。

NT-proBNP检测试剂的情况就没有BNP那么复杂。一般来说，不同的NT-proBNP检测试剂的差异相对较小，因为所有的厂家使用的抗体和校准品都来自同一家供应商（Roche诊断）。由于待检样本类型和平台性的差异，不同的商业化NT-proBNP检测试剂还是存在着少许差异。因为有着共同的抗原表位，这些商业化的检测试剂都与proBNP存在交叉反应。外周循环中proBNP的平均浓度比NT-proBNP小数倍。

由于外周循环中NPs家族的多样性和异质性，使其检测具有挑战性。我们需要丰富NPs相关的知识，并加深了解相应的检测试剂，才能推动BNP和NT-proBNP检测试剂标准化。

10. BNP检测和心衰治疗

常见的心衰治疗手段有：抑制肾素血管紧张素醛固酮系统；或者通过抑制血管紧张素转换酶（血管紧张素转换酶抑制剂，ACEi）；或通过阻断血管紧张素II受体（血管紧张素II受体阻断剂，ARB）。在2014年，随着新药LCZ696（商业名Entresto™）的面世，诺华公司实现了全新的心衰管理方法。Entresto™是血管紧张素II受体抑制剂（缬沙坦）和NEP抑制剂（AHU377/沙库巴曲）的组合，使其成为ARNi（血管紧张素受体-NEP抑制剂）创新药。LCZ696是第一种能够同时靶向肾素血管紧张素醛固酮系统和NPs系统的药物。在PARADIGM-HF试验中，将治疗心衰的ARNi（LCZ696）和ACEi（伊那普利）方法相比较，结果表明ARNi对心衰治疗有优势，显著改善射血分数。与ACEi治疗相比，LCZ696可使心衰患者的心血管死亡或住院率降低20%，全因死亡率降低16%。

脑啡肽酶（NEP）是一种锌依赖的酶，存在于许多组织中，尤其是肾脏。NEP是以膜结合酶的形式存在，并且外周循环中有其活性形式存在。NEP底物的范围非常大，包括利钠肽家族（ANP，BNP和CNP），缓激肽，肾上腺髓质素，脑啡肽，肽物质，催产素和β淀粉酶。与BNP相比，ANP是更好的NEP底物，因此ARNi对ANP的浓度影响更加显著。BNP和NT-proBNP是诊断和管理心衰的关键标志物，任何可能影响该标志物浓度水平和外周循环形式的治疗手段，都需要重点关注。

研究结果表明，NEP可作用于BNP的多个位点。所以接受Entresto™治疗的患者，脑啡肽酶抑制剂会对患者体内具有免疫活性的BNP浓度水平造成影响。这导致使用抗体KY-BNP-II的BNP免疫检测试剂（生产商Siemens和Shionogi），对NEP降解BNP的现象非常敏感。因为NEP其中一个水解的位点是Arg17-Ile18，包含于KY-BNP-II识别表位中。一项PARADIGM-HF试验中，研究者使用Advia Centaur免疫检测试剂进行测定时发现了BNP浓度增加的情况。BNP免疫检测系统生产商Alere和Beckman Coulter使用的多克隆抗体（抗原表位未知），也会受NEP水解作用影响，因为它的水解的位点可能也在多克隆抗体识别表位中。相比之下，上文提到的识别BNP位点11-17aa 的SES-BNP检测系统，NEP水解BNP的现象对检测结果影响较小。

此外，外周循环中具有BNP免疫活性的主要形式是proBNP。与BNP相比，proBNP对脑啡肽酶裂解不敏感，它与脑啡肽酶孵育很长时间后仍能保持完整状态。这说明NEP的抑制对BNP免疫活性没有显著影响，因为所有的商业化的BNP检测系统能同时检测血浆中proBNP分子。与proBNP相似，proANP也同样对受脑啡肽酶裂解不敏感，而ANP对NEP高度敏感。

Entresto™的作用机理及其对ANP/proANP和BNP/proBNP的影响，详见Fig. 7。

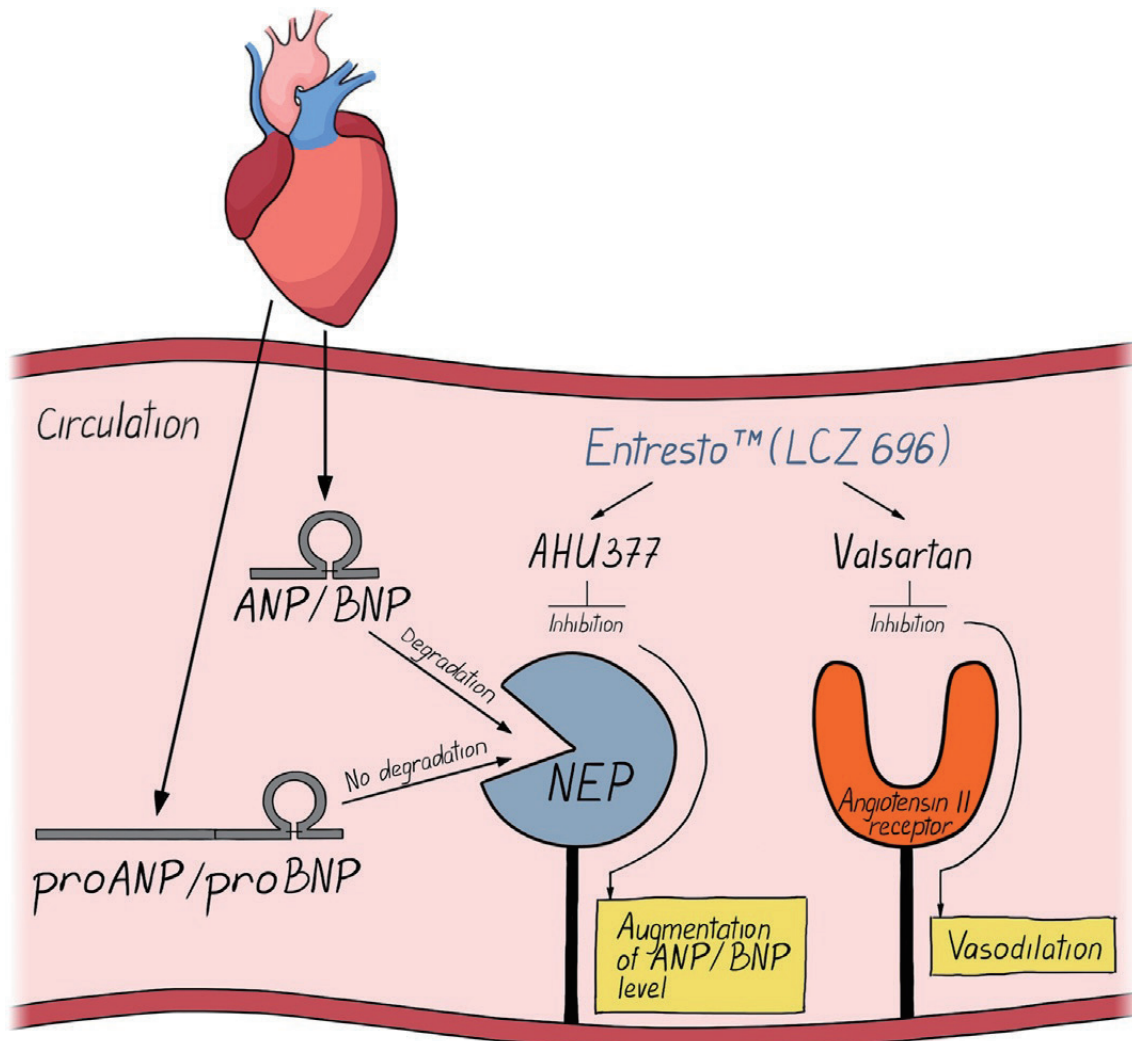


Fig. 7 LCZ696(Entresto™)的作用机理及其对ANP/proANP和BNP/proBNP的影响

关于之前讨论的ARNi治疗对于BNP检测系统的挑战，可能有人会将NT-proBNP或proBNP作为推荐标志物，因为这两者都不受NEP抑制影响。但是，由于NPs系统的极端复杂性，实际情况没有想的那么简单。尽管proBNP本身缺少生物活性，它缺能在外周循环中通过后续的裂解生成具有生物活性的BNP。沙库巴曲或类似的物质可能会影响proBNP的裂解效率，从而影响了proBNP向BNP的转化，改变了外周循环中BNP、proBNP和NT-proBNP的比例。

如今ARNi得到广泛应用，阐明NEP的抑制对于NPs系统和BNP检测的影响，是成功的心衰管理的关键。优化NPs诊断的第一步是了解其免疫检测试剂的特异性和影响检测结果的因素，第二部就是了解该标志物的存在形式。由于ARNi治疗方法的出现，改变了心衰治疗的方法，也改变了人们对相关标志物检测结果的解读，帮助人们进一步理解复杂的NPs系统。

11. BNP检测标准化进展

临床检测标准化的道路是漫长的，需要开发相关参考方法和参考物质。定义不明确的被测物质，是开发参考方法和参考物质主要障碍。BNP有着复杂的特性，人们通过开发参考物质或参考检测方法，尝试推进BNP检测标准化。

近期，Torma通过将液相色谱和质谱分析相结合，开发了一种定量检测人血浆中的BNP的参考方法。这种人血浆中BNP稳定化方法，通过蛋白沉淀、固相提取以及液相色谱质谱相结合实现。在这项研究中，作为校准品的BNP 1-32，通过氨基酸分析和胰蛋白酶消化法，定量到国际单位制(SI)，该方法经过临床BNP检测确认。但是目前该方法只能检测完整的BNP 1-32。在临床上，不同碎片形的BNP和完整的proBNP代表了具有免疫活性的BNP。这种方法具有一定的局限性，但经过调整可检测碎片形式的BNP片段。

另外一种提高BNP检测系统之间可比性的方法是使用通用的校准物质。到目前为止，缺少校准BNP检测系统的通用参考物质。现有的商业化的BNP检测试剂使用重组或合成的BNP作为校准物质，大多数厂家通过将血浆中添加合成的BNP 1-32作为校准物质。但是，在外周循环中BNP是以多种形式存在的，BNP 1-32仅代表了具有免疫活性BNP的其中一部分。由于外周循环中BNP高异质性和多样性，没有办法制备一种与内源性BNP完全相同的校准物质。考虑到糖基化的proBNP被认为是具有免疫活性BNP的主要形式，所以糖基化的proBNP可以被用作BNP检测试剂的通用的校准品。

目前研究者已经评估了将糖基化proBNP作为BNP检测试剂通用校准品的方案。在近期研究中，我们总共评估了六种候选的BNP校准品，以确认它们能否降低不同检测试剂之间的差异。五种商业化的BNP检测系统：Alere Triage, Siemens Centaur XP, Abbott I-STAT, Beckman Access2和ET Healthcare Pylon，所测定的值存在着显著差异。平行比较这些厂家的内部校准品和六种候选的BNP校准品：(a) 合成BNP，(b) 重组BNP（大肠杆菌表达），(c) 重组非糖基化proBNP（大肠杆菌表达），(d) 重组非糖基化proBNP（N末端His-标签，大肠杆菌表达），(e) 重组糖基化proBNP（HEK细胞），(f) 重组糖基化proBNP（CHO细胞），这些作为外部校准品。通过测试这些候选的校准物质，我们观察到将糖基化proBNP（HEK细胞表达）作为所有检测试剂的通用校准品时，能够显著降低不同检测试剂之间的变异（平均CV14.8%），与之相比，使用各自的内部校准品的系统间变异平均值为CV28.9%（详见Fig. 8）。这些结果表明，协调目前的BNP检测试剂在技术上是可行的。

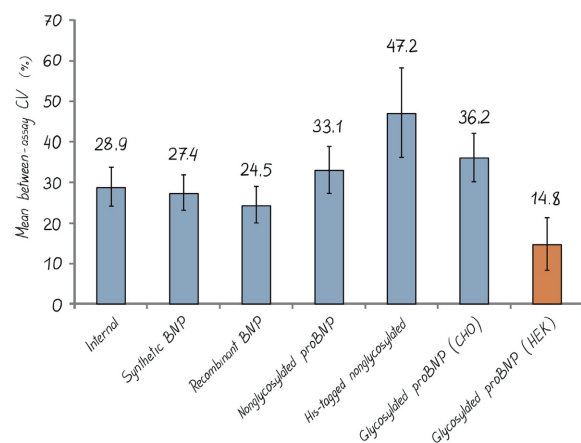


Fig. 8 不同商业化BNP检测试剂(Alere Triage, Siemens Centaur XP, Abbott I-STAT, Beckman Access2和ET Healthcare Pylon BNP)使用内部和外部校准品的等效性评价，结果以试剂间差异均值CV(%)表示。

12. NT-proBNP检测标准化的必要性

目前，由于抗体和校准品的来源是共同的，降低NT-proBNP检测试剂之间的差异性并不简单。但是，由于将来心衰患者数量的增加导致NT-proBNP检测试剂种类的增加，在不久的将来一定会有新型的NT-proBNP检测试剂出现，包括POCT检测试剂。这些增长可能需要我们重新考虑引入通用的NT-proBNP检测试剂的参考物质。如上所述，不同的糖基化水平和占用不同位点的糖基组成混合分子代表了内源性NT-proBNP/proBNP，这种分子的异质性是可变的。考虑到这些因素，任何校准品（重组或合成）都不太可能很好的模拟这种高度异质性的内源性NT-proBNP/proBNP。非糖基化NT-proBNP可以作为以下两种类型的检测系统的校准品：分别是检测NT-proBNP/proBNP非糖基化区域的检测试剂；以及检测NT-proBNP/proBNP潜在的糖基化区域的检测试剂（例如类似Roche的NT-proBNP检测试剂）。非糖基化的NT-proBNP作为校准品，识别NT-proBNP非糖基化区域的检测试剂将会得到真实的结果。然而识别潜在的糖基化区域的检测试剂在使用非糖基化的NT-proBNP作为校准品时，将会得到偏低的结果。类似Roche的检测试剂，识别不同心衰患者的内源性NT-proBNP/proBNP的不同异质性结构的比例不是恒定的。

重组的糖基化NT-proBNP或proBNP作为NT-proBNP检测试剂的校准物质时，不会改善目前的情况。目前商业化的NT-proBNP检测试剂已经被证明几乎不能识别重组的糖基化NT-proBNP和proBNP分子，因为O-多糖的存在阻碍了抗体的识别位点。因此，要协调不同类型的NT-proBNP检测试剂需要进一步研究以及引入新的方法。

13. 总结

自2000年美国FDA首个批准的BNP检测试剂上市以来，许多商业化BNP检测系统已被临床应用。现有的BNP检测试剂使用的抗体和校准物质都来自于不同的供应商。正是这些差异导致不同检测试剂和平台的BNP测定结果有着很差的互换性，并使检测结果的解释更加复杂。在人口流动性和全球化日益增长的情况下，可靠的检测数据对于健康相关的决策至关重要。由于缺乏标准化，导致无法直接比较来自不同实验室的结果，很难定义通用的临床诊断参考区间或cut-off值，使得BNP的诊断作用不能被充分发挥。

NT-proBNP检测相对有可比性，但是新型的使用不同特异性抗体和校准品的NT-proBNP检测试剂的出现，可能会改变当前的情况。

人们可能认为BNP检测标准化相当容易，因为BNP的氨基酸序列相对简单，然而这种观念是错误的，因为它不能反映BNP高度复杂的大分子特性。在外周循环中BNP的主要存在形式包括：不同患者以及疾病的不同阶段糖基化程度不一样的proBNP，与自身抗体结合形成的大型复合物，以及其它的潜在干扰因素。目前BNP仍然没有国际参考物质或参考检测方法。建立一个完整的参考测量系统和标准化检测的流程比我们预期的要长很多。

随着新型心衰治疗方法的出现，例如ARNi(Entresto™)，正确了解哪种形式的BNP相关多肽能被检测试剂检出，并能准确解释检测结果尤为重要。

鉴于循环proBNP的多样性，BNP和NT-proBNP检测标准化无疑是一项艰巨的任务。首先，我们需要了解不同的检测试剂和平台的检测结果出现差异的全部原因。其次，目前对于检测试剂标准化和参考物质的制备还没有统一的概念。

基于一系列深入的生化研究，我们加深了对循环proBNP多样性的认知。尽管取得了这些成就，关于BNP和NT-proBNP检测试剂的标准化，我们仍需加强在不同心衰阶段和特定治疗方法下的循环proBNP的认识，并进一步了解相关的检测试剂。虽然现有的技术手段很难完全表征所有形式的循环BNP，但可以使用上文建议的方法将BNP和proBNP检测试剂之间的差异控制在可接受范围内。

