

溶血对时间分辨免疫荧光分析法测定胰岛素的影响

谢伟贤¹, 黄泽棋¹, 王晓娟², 韩慧明² (1. 广东省佛山市第二人民医院检验科 528000;
2. 佛山科学技术学院检药系, 广东佛山 528000)

【摘要】 目的 探讨溶血对时间分辨免疫荧光分析法测定胰岛素的影响。**方法** 收集 30 例未发生溶血的血清标本, 利用低渗溶血法分别制备轻度溶血、中度溶血、重度溶血标本各 10 例; 采用时间分辨免疫荧光分析法分别测定各组标本溶血前(0 h)和溶血后 0.5、2、18 h 的胰岛素浓度; 通过配对 *t* 检验、重复测量数据的方差分析对溶血程度和时间对胰岛素浓度检测结果的影响进行分析。**结果** 轻度溶血、中度溶血、重度溶血标本之间胰岛素浓度检测结果比较差异无统计学意义($P>0.05$); 随着溶血时间的延长, 胰岛素浓度呈明显下降趋势, 0.5、2、18 h 检测结果与 0 h 检测结果相比, 比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 溶血程度对时间分辨免疫荧光分析法测定胰岛素浓度的影响不明显, 但溶血时间则对测定结果具有较为明显的影响; 标本溶血和溶血时间均为影响胰岛素浓度检测结果的重要因素。

【关键词】 溶血; 胰岛素; 时间分辨免疫荧光分析法

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2014.04.005 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2014)04-0443-02

Influence of hemolysis on concentrations of insulin measured by time-resolution fluoroimmunoassay analysis XIE Wei-xian¹, HUANG Ze-qi¹, WANG Xiao-juan², HAN Hui-ming² (1. Clinical Laboratory, the Second People's Hospital of Foshan City, Foshan, Guangdong 528000, China; 2. Department of Laboratory Science and Pharmacy, Foshan University, Foshan, Guangdong 528000, China)

【Abstract】 Objective To investigate the influence of hemolysis on concentrations of insulin measured by time-resolution immunofluorescence analysis (TRFIA). **Methods** A total of 30 serum samples without hemolysis were selected, and mild hemolysis, moderate hemolysis, severe hemolysis samples, 10 cases for each, were prepared by using hypotonic hemolysis method. TRFIA was performed to measured insulin concentrations before hemolysis (0 h) and 0.5, 2, 18 h after hemolysis. Variance analysis of repeated measurement data and paired *t* test were used to analyze the influence of hemolysis and time on insulin concentration. **Results** Insulin concentration in mild hemolysis, moderate hemolysis and severe hemolysis samples were without significant difference ($P>0.05$). With the prolong of hemolysis time, the concentration of insulin was significantly decreased, compared between 0.5, 2, 18 and 0 h, the differences were significant ($P<0.05$). **Conclusion** Effects of hemolysis on insulin concentration detected by TRFIA might not be obvious, but the influence of hemolysis time could be significant. Hemolysis and hemolysis time might both be important factors, affecting the determination of insulin concentration.

【Key words】 hemolysis; insulin; time-resolution immunofluorescence analysis

体外溶血主要由部分物理性因素所致, 包括抽血时负压过大及标本处理过程中涉及的冰冻、水浴箱温度过高、机械震荡等。人体内的胰岛素来自于胰岛 β 细胞, 外周血胰岛素水平可反映胰岛素的分泌及代谢速率。外周血胰岛素水平检测对糖尿病的分型及疗效评价具有重要作用^[1]。红细胞内含有胰岛素降解酶(IDE), 溶血可使其从红细胞内释放入血清中, 降解胰岛素, 从而影响胰岛素水平的检测^[2-3]。本研究选择不同溶血程度标本, 并在溶血后的不同时间段, 采用时间分辨免疫荧光分析法进行血清胰岛素水平检测, 旨在了解溶血程度和溶血时间对血清胰岛素检测结果影响, 以期为指导临床工作及正确理解溶血对免疫学方法检测指标的检测结果的影响奠定基础^[4-6]。

1 材料与方法

1.1 标本来源

本研究涉及的外周血标本采集自佛山市第二

人民医院收治的具有不同胰岛素水平的患者 30 例, 包括处于正常参考区间者 10 例、低于正常参考区间下限者 10 例、高于正常参考区间上限者 10 例。所有标本无溶血、黄疸及脂血, 并于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下保存。

1.2 试剂与仪器 XE-5000 全自动血细胞分析仪(日本 Sysmex 公司), Anytest 时间分辨荧光免疫分析仪及配套的胰岛素检测试剂盒(苏州新波生物技术有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 标本处理 从冰箱中取出标本, 室温中复温、混匀后 $3\text{ }200\text{ r/min}$ 离心 5 min , 分离血清标本。

1.3.2 血红蛋白(Hb)标准浓度液的配制 取 $1\text{ }000\text{ }\mu\text{L}$ Hb 浓度为 154 g/L 的乙二胺四乙酸二钾抗凝全血, 与 $500\text{ }\mu\text{L}$ 蒸馏水混匀, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下保存 24 h , 即可获得 Hb 浓度为 100 g/L 的标准浓度液。

1.3.3 不同程度溶血标本的制备 根据美国临床和实验室标准化协会(CLSI)的文件,将溶血程度分为轻度溶血(血清 Hb 浓度 0~1 g/L)、中度溶血(血清 Hb 浓度为 1~5 g/L)、重度溶血(血清 Hb 浓度为大于 5 g/L)。将分离获得的血清标本分成 990、980、950 μL 共 3 管,分别加入 10、20、50 μL Hb 标准浓度液,即可获得血清 Hb 浓度分别为 1、2、5 g/L 的溶血标本。

1.3.4 胰岛素水平检测 室温环境下,于溶血标本配制后 0、0.5、2、18 h 分别进行非溶血标本和溶血标本胰岛素水平检测。操作严格按照仪器和试剂盒说明书进行。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行数据处理和统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用配对 t 检验,多组间比较采用方差分析或重复测量数据的方差分析,并绘制相应的曲线; $P < 0.05$ 为比较差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 溶血程度对血清胰岛素检测结果的影响 未溶血组、轻度溶血组、中度溶血组、重度溶血组血清标本胰岛素检测结果分别为 (28.3 ± 37.76) 、 (21.23 ± 26.56) 、 (17.65 ± 22.65) 、 $(12.26 \pm 15.34) \mu\text{IU/mL}$,轻度溶血组、中度溶血组、重度溶血组的检测结果均低于未溶血组,与未溶血组比较,配对 t 检验 P 值均小于 0.05;轻度溶血组检测结果高于中度溶血组、重度溶血组,但配对 t 检验显示比较差异均无统计学意义($P > 0.05$);中度溶血组检测结果高于重度溶血组,但配对 t 检验显示比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 溶血时间对血清胰岛素检测结果的影响 仅考虑溶血时间对胰岛素检测结果的影响时,0、0.5、2、18 h 检测结果分别为 (28.3 ± 37.76) 、 (23.22 ± 29.63) 、 (18.1 ± 23.57) 、 $(9.81 \pm 11.34) \mu\text{IU/mL}$,其中 0.5、2、18 h 胰岛素检测结果均低于 0 h 检测结果,配对 t 检验显示比较差异均有统计学意义($P < 0.05$);0.5 h 胰岛素检测结果高于 2 h 检测结果,但二者比较差异无统计学意义($P > 0.05$);0.5 h 胰岛素检测结果高于 18 h 检测结果,且二者比较差异有统计学意义($P < 0.05$);2 h 胰岛素检测结果高于 18 h 检测结果,且二者比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。溶血标本不同时间点胰岛素检测结果呈下降趋势(见图 1),且溶血标本不同时间点胰岛素检测结果比较差异有统计学意义($F = 18.424, P < 0.05$),溶血时间越长,胰岛素水平下降越明显。

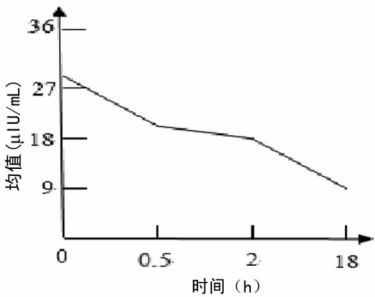


图 1 胰岛素水平随溶血时间变化的曲线图

2.3 溶血程度和溶血时间对胰岛素检测结果的综合影响 当考虑溶血程度和溶血时间对血清胰岛素检测结果的综合影响时,检测结果数据分析见表 1 及图 2。在不同溶血程度组中,不同时间点胰岛素结果分析显示,轻度溶血组、中度溶血组、重度溶血组的溶血时间为 0.5 h 时的胰岛素检测结果与溶血时

间为 2 h 的检测结果相比,比较差异均无统计学意义, P 值均大于 0.05,但 2 h 与 18 h 检测结果相比,比较差异均有统计学意义($P < 0.05$);0.5 h 与 18 h 检测结果相比,比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。重复测量设计的方差分析显示,不同溶血程度标本与溶血时间对胰岛素检测结果的影响比较差异有统计学意义($F = 3.269, P < 0.05$),说明在不同溶血标本组内,胰岛素检测结果随时间变化的趋势不同;胰岛素检测结果在 3 个时间段内随时间变化呈线性变化($F = 19.942, P < 0.05$);不同溶血程度组间胰岛素检测结果相比,比较差异均无统计学意义($F = 1.122, P > 0.05$)。

表 1 溶血程度和溶血时间对血清胰岛素的影响

溶血程度	比较时间点	均值($\mu\text{IU/mL}$)	P
轻度溶血组	0.5 h vs. 2 h	2.546	0.292
	2 h vs. 18 h	5.914	0.019
	0.5 h vs. 18 h	8.460	0.001
中度溶血组	0.5 h vs. 2 h	4.399	0.267
	2 h vs. 18 h	9.470	0.021
	0.5 h vs. 18 h	13.869	0.001
重度溶血组	0.5 h vs. 2 h	8.427	0.077
	2 h vs. 18 h	9.478	0.048
	0.5 h vs. 18 h	17.905	0.001

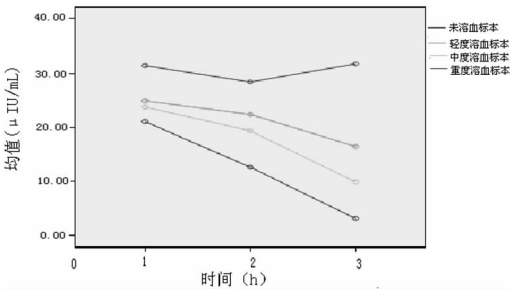


图 2 胰岛素检测结果随溶血程度和时间变化的趋势

3 讨 论

时间分辨免疫荧光分析法是测定胰岛素水平的常用方法之一,具有检测成本低、灵敏度高等优点。在临床检验工作中,标本溶血的现象并不少见。随着红细胞破裂,IDE 释放进入血清中,导致溶血标本血清胰岛素浓度下降。本研究结果也显示,不同溶血程度标本胰岛素检测结果与未溶血标本检测结果比较差异具有统计学意义($P < 0.05$),但 Hb 浓度对胰岛素检测结果影响的差异并无统计学意义($P > 0.05$),与溶血时间却有一定的相关性($P < 0.05$)。随着溶血时间的延长,胰岛素浓度也会下降。因此,对于存在溶血现象的标本,应尽量选择重新采集标本,否则应尽快检测,并在结果报告单中标明“标本溶血”等字样。

出现本研究结果的原因可能有三方面因素:(1)本研究中溶血标本的制备使用的是来源于健康者的 Hb。有研究证实,2 型糖尿病患者红细胞内的 IDE 活性显著高于健康者,即健康者的红细胞 IDE 活性较低,轻度溶血的情况下就能达到饱和状态,且在很长的一段时间内都保持相同的降(下转第 447 页)

胞株 HEC-1A 增殖、侵袭及分泌基质金属蛋白酶的功能,还可以促进子宫内膜癌细胞株 RL-952 分泌尿激酶型纤溶酶原活化剂(uPA)分泌,提示 LPA 可能是子宫内膜癌细胞生长和侵袭的潜在调控因子^[10-11]。本研究结果表明,LPA 单项检测诊断子宫内膜癌的灵敏度为 65.52%,优于 HE4 的诊断灵敏度,但其诊断特异度低于 HE4。

本研究同时分析了 HE4、LPA 联合检测对子宫内膜癌的诊断性能,结果显示,在诊断特异度为 87.23%的情况下,诊断灵敏度提高至 95.00%,明显高于二者单项检测,且诊断准确度也有所增加,说明 HE4 和 LPA 检测在子宫内膜癌诊断方面具有显著的互补性。因此,HE4、LPA 联合检测对提高子宫内膜癌的早期诊断率及改善患者预后具有重要临床意义。

参考文献

- [1] Sorosky JL. Endometrial cancer[J]. Obstet Gynecol,2008, 111(1):186-187.
- [2] Drapkin R,von Horsten HH,Lin Y,et al. Human epididymis protein4 (HE4) is a secreted glycoprotein that is overexpressed by serous and dometrioid ovarian carcinomas[J]. Cancer Res,2005,65(6):2162-2169.
- [3] Panupinthu N, Lee HY, Mills GB. Lysophosphatidic acid production and action;critical new players in breast cancer initiation and progression[J]. Br J Cancer,2010,102(6): 941-946.
- [4] Bese T,Barbaros M,Baykara E,et al. Comparison of total plasma lysophosphatidic acid and serum CA125 as a tumor marker in the diagnosis and follow-up of patients

with epithelial ovarian cancer[J]. Gynecol Oncol,2010,21 (4):248-254.

- [5] Andersen MR,Goff BA,Lowe KA,et al. Use of a Symptom Index,CA125,and HE4 to predict ovarian cancer[J]. Gynecol Oncol,2010,116(3):378-383.
- [6] Hellstrm I, Raycraft J, Hayden-Ledbetter M, et al. The HE4(WFDC2) protein is a biomarker for ovarian carcinoma[J]. Cancer Res,2003,63(13):3695-3700.
- [7] Powell JL, Hill KA, Shiro BC, et al. Preoperative serum CA-125 levels in treating endometrial cancer[J]. J Reprod Med,2005,50(8):585-590.
- [8] 吴飞,周慧芹,崔满华. 联合检测 CA125 与 HE4 在子宫内膜癌诊断中的价值[J]. 中国妇幼保健,2011,26(10): 1559-1561.
- [9] Moore RG,Brown AK,Miller MC,et al. Utility of a novel serum tumor biomarker HE4 in patients with endometrioid adenocarcinoma of the uterus [J]. Gynecol Oncol, 2008,110(2):196-201.
- [10] Wang FQ, Ariztia EV, Boyd LR, et al. Lysophosphatidic acid(LPA) effects on endometrial carcinoma in vitro proliferation, invasion, and matrix metalloproteinase activity [J]. Gynecol Oncol,2010,117(1):88-95.
- [11] 周敬伟,张果,赵丽君,等. 溶血磷脂酸对子宫内膜癌 RL-952 细胞尿激酶型纤溶酶原激活剂分泌的影响[J]. 中国妇产科临床杂志,2012,13(4):291-293.

(收稿日期:2013-09-12 修回日期:2013-11-16)

(上接第 444 页)

解速度,导致 2 h 内检测结果无明显差异^[3]。这与其他研究报道的胰岛素浓度下降程度与溶血程度呈正相关,即溶血程度越高,其浓度下降越明显有所不同^[7]。(2)可能是由于标本量较少,导致部分数据间无明显差异。本研究仅使用了 30 例标本,或许未能充分反映溶血程度导致的检测结果之间的差异性。(3)时间分辨免疫荧光分析法定量检测胰岛素对实验结果存在一定的影响。采用时间分辨免疫荧光分析法进行检测时,手工操作步骤相对较多,所需时间较长,影响结果的因素也相应较多。因此,在临床检测工作中,应特别注意以下事项:专人操作以保证操作手法的一致性;将实验温度控制在恒定状态(最好为 25℃);保证实验环境、仪器的清洁;不同批号的试剂、校准品不能混用;钕标记物稀释后应在 1 h 内使用,加样时保持吸头的均匀通畅,微孔板的震荡时间必须保证至少 5 min;洗液必须临用前配制^[8]。只有控制好实验操作中的各个步骤和环节,尽可能克服上述各种因素的影响,才能获得满意的实验结果,为临床医师的提供尽可能准确、客观的辅助诊断数据。

本研究初步探讨了溶血对时间分辨免疫荧光分析法定量检测胰岛素的影响,在以后的研究中可增加相应的纠正措施,并通过二元一次方程确定溶血程度、胰岛素检测结果和标本真实值三者的关系,并用回归方程纠正其影响^[9-10]。

参考文献

- [1] Sapin R. Insulin assays:previously known and new analyt-

ical features[J]. Clin Lab,2003,49(3/4):113-121.

- [2] 张凤杰. 化学发光法测 C 肽、胰岛素对糖尿病的诊断价值[J]. 中国误诊学杂志,2011,34(11):8362-8363.
- [3] 徐颖,石建华,项平. 胰岛素降解酶基因与 2 型糖尿病的关系研究进展[J]. 蚌埠医学院学报,2010,35(4):426-429.
- [4] 王月影,郭欣,文成伟,等. 溶血对电化学发光法测定胰岛素的影响[J]. 江苏医药,2008,34(6):639-640.
- [5] 韩凤琴. 标本溶血对临床检验结果的影响[J]. 中国社区医师,2010,12(23):248-249.
- [6] 肖宝敏. 标本溶血对临床检验结果的影响[J]. 中国社区医师,2011,13(35):223-224.
- [7] 张慧涨,方强. 标本的不同处理对胰岛素检测结果的影响[J]. 中国临床医学,2010,17(6):901-902.
- [8] 马强,李来庆,贺安,等. C 肽与胰岛素双标记时间分辨免疫荧光分析法的建立即初步临床应用[J]. 生物化学与生物物理进展,2011,38(7):670-676.
- [9] 刘云峰,邓清华,杜利容,等. 时间分辨免疫荧光分析法影响因素初探[J]. 泸州医学院学报,2007,30(2):124-125.
- [10] 谢圣高,解茂阳,水小川,等. 溶血对氧化酶法测定葡萄糖的影响与纠正[J]. 湖北中医药大学学报,2012,14(1):66-67.

(收稿日期:2013-09-03 修回日期:2013-11-25)