循环酶法检测血清同型半胱氨酸的分析性能评价

李莹莹, 顾向明(广州中医药大学附属中山市中医院检验科, 广东中山 528400)

【摘要】 目的 评价循环酶法检测血清同型半胱氨酸(Hcy)的分析性能,以建立适合本实验室的相关标准。

方法 依据美国临床和实验室标准化协会(CLSI)颁布的系列 EP 文件,分别对北京九强公司生产的循环酶法 Hcy 检测试剂盒进行精密度评价、线性评价、参考区间分析、抗干扰实验分析和回收实验分析。**结果** 批内变异系数为 2.28%,批间变异系数为 1.62%,日间变异系数为 1.28%,总变异系数为 3.04%;线性范围为 3~52 μmol/L;健康者参考区间(95%置信区间)为 5.4~16.5 μmol/L;血清标本总胆红素浓度不超过 296.67 μmol/L、三酰甘油浓度不超过 4.74 mmol/L、血红蛋白浓度不超过 6.00 g/L 时,对 Hcy 检测结果的干扰偏差不得超过 10%;平均回收率为 94.72%。**结论** 循环酶法检测 Hcy 精密度好、线性范围宽、抗干扰能力强、回收率较高,是目前临床实验室值得推广应用的常规检测方法。

【关键词】 同型半胱氨酸; 循环酶法; 分析性能

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2014.04.034 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2014)04-0512-02

同型半胱氨酸(Hcy)是一种反应活性很高的含硫氨基酸,是甲硫氨酸代谢循环的重要中间产物。虽然 Hcy 是一种正常的代谢中间产物,但是大量流行病学研究显示,外周血 Hcy 水平升高是冠心病^[1-2]和脑血管疾病^[3]的独立危险因素。目前,可用于血清 Hcy 水平检测的方法很多,包括高压液相色谱法(HPLC)、酶联免疫吸附法(ELISA)、放射免疫分析法、荧光偏振免疫分析法等。然而,上述检测方法所使用的仪器或试剂较为昂贵,或操作步骤繁杂,无法在临床实验室中广泛应用。循环酶法是利用酶的底物特性,以放大靶物质的检测方法,具有快速、简便、灵敏度高、易于自动化等特点。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂 日本日立公司 7600-120 DPP 模块式全自动生化分析仪。循环酶法 Hcy 检测试剂及低值和高值 Hcy 检测质控品、校准品均购自北京九强生物技术股份有限公司,包括 R1、R2 试剂,其中 R1 试剂含有 S-腺苷甲硫氨酸 0.1 mmol、还原型辅酶(还原型烟碱腺嘌呤二核苷酸, NAD)0.2 mmol、三(2-羧乙基)磷氯化氢 0.5 mmol、α-酮戊二酸 5.0 mmol, R2 试剂含有 Hcy 甲基转移酶 5.0 kU/L、谷氨酸脱氢酶 10 kU/L、S-腺苷同型半胱氨酸水解酶 3.0 kU/L、水解酶 3.0 kU/L、腺苷脱氢酶 5.0 kU/L。校准品可溯源至国际参考物质 NIST SRM1955。循环酶法检测 Hcy 的主要分析参数包括采用终点法及多点校准模式,标本用量 13 μL, R1 试剂用量 240 μL, R2 试剂用量 65 μL,温度条件 37 ℃,反应时间 10 min,主波长 340 nm,副波长 405 nm。循环酶法 Hcy 检测原理:采用基于小分子捕获技术的 S-腺苷同型半胱氨酸水解酶检测法。标本中的 Hcy 被转化为游离型后,与共价底物反应,经循环反应进行信号放大,同时产生腺苷;腺苷立即水解为次黄嘌呤和氨,氨在谷氨酸脱氢酶的作用下,使还原型辅酶转化为携带正电荷的 NAD⁺,且标本中 Hcy 的浓度与 NAD 转化速率呈正比。

1.2 方 法

1.2.1 标本采集与处理 本研究采用血清标本进行检测。首先采集符合纳入要求的患者或健康者外周血标本,30 min 内 3 000 r/min 离心 5 min 后分离血清标本,-20 ℃以下保存,待血清标本收集完成后集中检测。采集外周血标本前,嘱咐患者及健康者尽量避免摄入高蛋白饮食,以避免食物因素导致的外周血 Hcy 水平升高。

1.2.2 精密度评价 依照 CLSI EP5-A 文件的要求,对循环酶法 Hcy 检测试剂盒进行精密度评价。选择稳定的 Hcy 低值质控品,每天进行 2 批次检测,批间间隔时间不少于 2 h,每批做双份检测,连续进行 20 d 试验,分别计算批内、批间、日间及总不精密度,以变异系数(CV)表示,即 CV_{批内}、CV_{批间}、CV_{日间} 和 CV_总。

1.2.3 线性评价 依照 CLSI EP6-A 文件的要求,采用 Hcy 高值校准品作为高值(H)标本,健康者的混合血清作为低值(L)标本(要求 Hcy 浓度接近检测范围的下限)。按 5L+0H、4L+1H、3L+2H、2L+3H、1L+4H、0L+5H 的体积比例配制 H 和 L 标本的混合液,组成系列评价标本,每例标本重复检测 4 次,且在标本配制当日完成检测,记录检测结果。对实验数据进行多项式回归分析,计算获得最适多项式,并根据最适多项式计算相应的线性范围。根据美国病理学家协会(CAP)的要求,非线性差异应不超过 2.5%^[4]。

1.2.4 参考区间分析 选择 2011 年 4 月至 2012 年 3 月于广州中医药大学附属中山市中医院体检健康者 151 例,男 78 例、女 73 例,年龄 20~80 岁,获得血清标本后采用循环酶法进行血清 Hcy 浓度检测,计算 151 例健康者血清 Hcy 浓度的均值、标准差和参考区间(95%置信区间),再对不同性别、年龄健康者的检测结果进行统计学分析,以了解性别、年龄对参考区间的影响。

1.2.5 干扰试验分析 依照 CLSI EP7-A 文件的要求,选择临床混合血清标本 1 份,分成 2 份,1 份加入干扰物(干扰物的浓度为临床标本中可能出现的最高浓度),另一份不加干扰物,按比例混合,配制具有 6 个不同干扰物浓度的标本,每份标本重复检测 3 次,计算均值及干扰偏差,干扰偏差=(加入干扰物的标本检测结果-未加入干扰物的标本检测结果)/未加入干扰物的标本检测结果×100%,当干扰偏差超过±10%时,判为存在干扰。不同干扰物的加入浓度见表 1。

表 1 干扰物及其加入浓度

干扰物质	干扰物加入浓度							
总胆红素(μmol/L)	0.00	49.69	97.79	195.69	296.67	346.09	393.68	
三酰甘油(mmol/L)	0.00	2.51	4.74	9.52	13.96	15.96	18.29	
血红蛋白(g/L)	0.00	1.00	2.00	4.00	6.00	7.00	8.00	

1.2.5 回收试验 以健康体检者混合血清标本作为低值标本,对高值混合标本进行不同比例的稀释,低值标本分别占 100%、80%、60%、40%、20%,共 5 份稀释标本。对 5 份稀释标本分别进行 3 次重复检测,计算均值、加入量、回收率和平均回收率。

1.3 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,组间比较采用 *t* 检验或方差分析;线性分析采用相关回归分析;检验水准 $\alpha = 0.05, P < 0.05$ 为统计量具有统计学意义。

2 结果

2.1 精密度试验 精密度试验结果见表 2。

表 2 精密度试验结果

精密度	Hcy 检测结果($\bar{x} \pm s, \mu\text{mol/L}$)	CV(%)
批内精密度	13.75 ± 0.31	2.28
批间精密度	13.75 ± 0.22	1.62
天间精密度	13.75 ± 0.18	1.28
总不精密度	13.75 ± 0.42	3.04

注:低值质控品 Hcy 浓度为 13.5 $\mu\text{mol/L}$ 。

2.2 线性试验 以 Hcy 理论值为 X, Hcy 实测值为 Y, 线性回归方程为 $Y = 0.998X + 0.0433, R^2 = 0.996$, 其中 $b = 0.998, a = 0.0433, b$ 接近 1, a 接近 0。标本中 Hcy 浓度为 3~52 $\mu\text{mol/L}$ 时,检测结果线性良好,见表 3、表 4。

表 3 线性试验结果($\mu\text{mol/L}$)

浓度	5L+0H	4L+1H	3L+2H	2L+3H	1L+4H	0L+5H
实测均值	3.28	15.56	24.77	35.28	44.63	52.64
理论值	3.20	13.23	23.26	33.29	43.32	53.35

表 4 多项式回归结果

次数	b0	b1	b2	b3	回归自由度
1 次	-1.532	1.015	—	—	10
2 次	0.448	0.796	0.004	—	9
3 次	0.339	0.822	0.003	1.438	8

注:—表示无数据。

2.3 参考区间 健康者血清 Hcy 浓度的参考区间(95%置信区间)为 5.4~16.5 $\mu\text{mol/L}$,男性参考区间(95%置信区间)为 5.7~16.9 $\mu\text{mol/L}$,女性的参考区间(95%置信区间)为 4.9~13.6 $\mu\text{mol/L}$;采用 *t* 检验比较不同性别组 Hcy 浓度,结果显示比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。按年龄将健康者分为 3 组,即 20~40 岁组、(>40~60)岁组和(>60~80)岁组,方差分析显示,20~40 岁组、(>40~60)岁组与(>60~80)岁组之间 Hcy 浓度比较差异具有统计学意义($P < 0.05$),而 20~40 岁组与(>40~60)岁组之间 Hcy 浓度比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。因此,对于 60 岁以上的老年人应建立独立的参考区间。60 岁以上人群的参考区间(95%置信区间)为 6.4~17.0 $\mu\text{mol/L}$,60 岁及其以下人群的参考区间(95%置信区间)为 5.2~16.3 $\mu\text{mol/L}$ 。

2.4 干扰试验 总胆红素浓度小于 296.67 $\mu\text{mol/L}$ 、三酰甘油浓度小于 4.74 mmol/L、血红蛋白浓度小于 6 g/L 时,对 Hcy 检测结果无明显影响,干扰偏差小于 10%。

2.5 回收试验 回收试验结果见表 5,计算获得 Hcy 的平均回

收率为 94.72%。

表 5 回收试验结果

标本编号	加入量($\mu\text{mol/L}$)	回收量($\mu\text{mol/L}$)	检测值($\mu\text{mol/L}$)	回收率(%)
0	—	—	9.80	—
1	5.20	4.78	14.58	92.00
2	10.40	9.80	19.60	94.20
3	15.60	14.59	24.39	93.50
4	20.80	18.91	28.71	90.90
5	26.00	26.78	36.58	103.00

注:—表示无数据。

3 讨论

Hcy 参与甲硫氨酸的代谢过程,是甲硫氨酸和半胱氨酸代谢过程中的重要中间产物。B 族维生素包括叶酸、维生素 B₆ 和维生素 B₁₂,均为 Hcy 代谢过程中的必需辅助因子。近年来,越来越多的研究表明,Hcy 已成为动脉粥样硬化、心脑血管疾病的独立危险因素。

本研究结果显示,日立 7600-120 DPP 模块式全自动生化分析仪检测血清 Hcy 的 CV 总为 3.04%。与陈继中等^[5]采用同样方法学在日立 7170 全自动生化分析仪上得出 CV 总为 4.9%相比,7600-120 DPP 模块式全自动生化分析仪检测 Hcy 的精密度优于日立 7170 全自动生化分析仪。

本研究检测了 151 例健康者血清 Hcy 水平,结果显示男性血清 Hcy 水平高于女性,考虑可能与男、女性体内雌激素水平存在差异有关。就年龄方面而言,不同年龄人群具有不同的机体代谢水平,因此,年龄对 Hcy 参考区间有一定的影响。有研究表明,血浆 Hcy 水平随着受试者年龄的增大而升高^[6]。因此,制订参考区间时,应充分考虑性别和年龄的影响。由此可见,每个实验室应根据所采用的试验方法和分析仪器,建立符合实验室实际情况的参考区间。

干扰试验结果显示,当总胆红素浓度小于 296.67 $\mu\text{mol/L}$ 、三酰甘油浓度小于 4.74 mmol/L、血红蛋白小于 6 g/L 时,对 Hcy 检测结果无明显影响,当超过上述限值时,对检测结果产生不同程度的正偏差影响。因此,在进行 Hcy 检测时,应尽量避免使用脂血、溶血、黄疸标本。此外,有研究表明,大多数内源性物质对 Hcy 检测无明显干扰,但高浓度血氨和 S-腺苷甲硫氨酸可对检测结果产生负偏差影响,高浓度谷胱甘肽、L-半胱氨酸及胱硫醚则对检测结果产生较大的正偏差影响^[7]。因此,当标本中含有较高浓度的上述内源性物质时,应对检测结果进行校正。另需注意的是,部分临床常用治疗药物,如甲氨蝶呤、卡马西平、苯妥英钠和 6-氮尿嘧啶苷,可导致患者外周血 Hcy 检测结果的升高。

回收试验结果显示,Hcy 的平均回收率为 94.72%,与理想状态下的回收率为 100%相比,存在 5.28%的比例误差,考虑可能与标准品和患者标本间存在不同的基质效应有关。在条件许可的情况下,采用以血清为基质的校准品替代以水为基质的标准品,可使临床标本的检测结果更为可靠。

可用于 Hcy 检测的方法较多,但很多方法存在着一定程度的局限性。HPLC 检测 Hcy 虽然灵敏度高,并可有效分离和分析血液中存在的多种含硫氨基酸,但 HPLC 检测对设备及操作人员技术水平的要求较高,且不同分析系统在样品处理、层析条件等诸多方面存在差异,使其难以(下转第 515 页)

临床中的常见急危重症,也是导致肝病死亡的重要原因之一^[3]。引起上消化道出血的原因包括胃癌、消化性溃疡、急性胃黏膜病变、肝硬化门静脉高压症等,其中较为常见也是最易导致患者死亡的因素为肝硬化门静脉高压症导致的食管、胃底静脉曲张破裂^[4]。肝硬化门静脉高压症并发上消化道出血的发病机制为:发生肝硬化时,肝小叶的肝细胞和纤维组织均因再生而形成肝细胞结节,过度挤压中央静脉而使血流受阻,出现血流淤滞,导致门静脉高压的形成^[5];门静脉压力越高,胃上部侧支血液循环所需血流量越大,使食管、胃底静脉逐渐受损,管壁越来越薄,最终因外力作用而出现血管破裂,导致出血^[6-7]。

静脉断流术可有效地阻断奇静脉和门静脉间的交通支,继而将胃底和食管异常曲张的血管阻断,以达到止血的目的^[8]。静脉断流术可保留迷走神经主干,并将贲门处反折的腹膜切开,可有效降低再出血的发生率^[9-10]。但在实施静脉断流术的过程中,不可将冠状静脉异位高位食管和高位食管的支静脉漏扎,若上述两条血管的位置较深、较高,不易暴露,且容易在食管周围组织中粘连增厚,如果漏扎,术后血液可反流至上述两条血管,使血流量和血管内压力急剧升高,易出现血管破裂和出血。

综上所述,静脉断流术治疗肝硬化门静脉高压症并发上消化道出血,具有止血率高、创伤相对较小、术中无需开放消化道、消化道瘘和腹腔感染发生率较低、术后患者病死率较低等优势,在治疗效果方面也明显优于保守治疗。但在选择静脉断流手术时机时需注意:若患者就诊时已出现大量、反复出血,且已有明确的诊断,应立即行急诊手术;若患者就诊时已出现腹腔积液、病程长、多次出血、组织粘连较重等情况,有可能给手术治疗带来一定的困难,此时需先采用保守治疗进行止血,待有效止血且患者肝功能得以恢复后,再择期实施手术。

(上接第 513 页)

标准化^[8-10]。ELISA 检测多采用手工操作,检测耗时长,且结果准确性相对较差。放射免疫分析法有可能存在放射性污染,临床目前使用较少。荧光偏振免疫分析法需要专用的荧光偏振仪,检测成本昂贵,不适合在临床实验室中推广应用。与 HPLC 和荧光偏振免疫分析法相比,循环酶法适用于多种自动化分析仪,不需要特殊的检测设备,省却了检测前的荧光衍生处理,消除了由于衍生造成的误差,影响因素少,操作简便,精密度高,抗干扰能力强,能够满足大批量标本的自动化检测。目前全自动生化分析仪在国内大多数医院中已经得以普及,因此,循环酶法检测血清 Hcy 值得在临床中推广应用。

参考文献

[1] Genser D, Prachar H, Hauer R, et al. Homocysteine, folate and vitamin B12 in patients with coronary heart disease[J]. *Ann Nutr Metab*, 2006, 50(5): 413-419.

[2] Kullo IJ, Li G, Bielak LF, et al. Association of plasma homocysteine with coronary artery calcification in different categories of coronary heart disease risk [J]. *Mayo Clin Proc*, 2006, 81(2): 177-182.

[3] Wald DS, Law M, Morris JK. Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analy-

参考文献

[1] 张莹. 肝硬化门脉高压合并上消化道出血的临床疗效观察[J]. *中国医疗前沿*, 2011, 6(10): 38.

[2] 李华, 刘红凌. 经颈静脉肝内门体分流术治疗肝硬化门脉高压并上消化道出血 40 例[J]. *现代中西医结合杂志*, 2012, 21(19): 2126-2127.

[3] 高崑. 中西医结合治疗肝硬化门脉高压上消化道出血患者效果观察[J]. *当代医学*, 2012, 18(33): 158.

[4] 廖锡意. 中药配合西药治疗肝硬化门脉高压上消化道出血患者的临床效果[J]. *中国医药导报*, 2012, 9(14): 125-126.

[5] 黄锐. 肝硬化门脉高压并上消化道出血治疗方法探讨[J]. *临床合理用药*, 2012, 5(11A): 28-29.

[6] 王惠方, 尚万兵. 72 例肝硬化门脉高压所致上消化道大出血的介入治疗研究[J]. *中国现代药物应用*, 2010, 4(15): 88-89.

[7] 王少文. 肝硬化门脉高压症并上消化道出血的手术治疗分析[J]. *中国当代医药*, 2011, 18(29): 178-179.

[8] 杨向东. 两种门奇静脉断流术治疗门静脉高压症的临床疗效[J]. *中国临床保健杂志*, 2011, 14(5): 524-525.

[9] 卢凯平, 叶再元, 邵钦树, 等. 吻合器联合断流术治疗肝硬化门脉高压症的疗效研究[J]. *医学研究杂志*, 2011, 40(7): 128-130.

[10] 冯伟, 林斌, 赵东波, 等. 肝癌合并门静脉高压症联合手术治疗效果观察[J]. *中国综合临床*, 2011, 27(9): 981-983.

(收稿日期: 2013-09-25 修回日期: 2013-11-15)

sis[J]. *BMJ*, 2002, 325(7374): 1202-1207.

[4] 冯仁丰, 张军, 沈茜, 等. 临床检验质量管理技术基础[M]. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2007: 171.

[5] 陈继中, 唐吉斌, 姜开明. 循环酶法测定血浆同型半胱氨酸的方法学评价[J]. *实用医技杂志*, 2007, 33(14): 4545-4546.

[6] Panagiotakos DB, Pitsavos C, Zeimbekis A, et al. The association between life-style-related factors and plasma homocysteine levels in healthy individuals from the ATTICA Study[J]. *Int J Cardiol*, 2005, 98(3): 471-477.

[7] 张晓坤, 黎文成, 杨晓仪, 等. 酶转换法检测血清同型半胱氨酸在常规生化检验的评价[J]. *中国医药指南*, 2011, 19(9): 5-6.

[8] 吴晓华. 同型半胱氨酸的检测[J]. *上海医学检验杂志*, 2001, 16(4): 199-201.

[9] 封丽彬. HPLC 指纹图谱对珍黄胶囊质量评价研究[J]. *中国中医药信息杂志*, 2013, 20(9): 66-68.

[10] 寇光, 刘玲, 陶松, 等. HPLC 测定桉叶止咳糖浆中盐酸麻黄碱的不确定度评价[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(17): 41-44.

(收稿日期: 2013-05-20 修回日期: 2013-09-22)