

• 论 著 •

胰岛素放射免疫检测技术外部影响因素分析*

张巧娣^{1,3}, 谢而付^{1,3△}, 付 煜², 颜承靖^{1,3}

(南京医科大学第一附属医院: 1. 检验学部; 2. 核医学科, 南京 210029;

3. 江苏省实验诊断学重点实验室, 南京 210029)

摘要:目的 调查影响胰岛素放射免疫分析检测结果的外部因素。方法 确立反应剂量、温浴时间、分离时间、离心速度、操作技能、标本性质、标本保存条件、反复冻融、曲线调用和曲线模型 10 种影响因素, 通过检测标本中胰岛素含量, 分析以上因素对胰岛素检测结果的影响。结果 (1)操作因素中除操作技能外($P < 0.05$), 其他因素对检测结果的影响差异无统计学意义($P > 0.05$); (2)血浆标本、标本长时间常温保存以及反复冻融可以使检测结果明显下降, 差异有统计学意义($P < 0.05$); (3)直接曲线调用也可以对检测结果产生明显升高或降低($P < 0.05$), 通过质控品调用曲线可以在一定程度上消除这种差异, 曲线模型的选择对胰岛素检测结果的影响差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 为了消除外部因素对胰岛素检测结果的影响, 要选择合适的标本, 注意标本的保存条件, 避免标本的多次冻融, 不能进行曲线调用, 同时要加强对操作手法练习并严格按照标准操作规程进行操作。

关键词: 胰岛素; 放射免疫分析; 外部影响因素

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2016.16.008 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2016)16-2256-03

Analysis of exterior influential factors of radioimmunoassay on insulin measurement*

ZHANG Qiaodi^{1,3}, XIE Erfu^{1,3△}, FU Yu², YAN Chengjing^{1,3}

(1. Department of Laboratory Medicine; 2. Department of Nuclear Medicine, First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China; 3. Key Laboratory of Laboratory Diagnosis of Jiangsu Province, Nanjing, Jiangsu 210029, China)

Abstract: **Objective** To investigate the exterior influential factors of radioimmunoassay (RIA) on insulin measurement. **Methods** Ten exterior influential factors were established which were emerged frequently in daily work, including reaction dose, temperature bath time, centrifuge time, centrifugal speed, skills, properties of samples, storage condition, repeated freezing and thawing, calling curve and curve model. So the factors were detected to study whether they influenced the levels of insulin with the method of RIA. **Results** (1) Among all the factors, only technical skills had obvious influence on the insulin measurement ($P < 0.05$). (2) Together with plasma sample, long-term preservation with room temperature and repeated freezing and thawing could make the insulin levels decrease significantly ($P < 0.05$). (3) Recalling the standard curve directly had obvious influence on the level of insulin too ($P < 0.05$), which can be removed or decreased through quality control curve in some extent. In addition, different curve models had no significant influence on the insulin measurement ($P > 0.05$). **Conclusion** In order to remove exterior influential factors on insulin measurement, firstly, the standard operation procedure of the experiment should be kept and the operation method should be strengthen, and then, suitable sample should be chosen and standard curve should be recalled cautiously, repeated freezing and thawing should be avoided in our daily work.

Key words: insulin; radioimmunoassay; exterior influential factor

胰岛素(INS)放射免疫检测对于临床糖尿病分型及治疗具有重要意义^[1]。但是, 其检测结果除了会受到试剂盒本身内部因素的影响外, 还会受到一些外部因素的影响。根据在 INS 放射免疫检测中经常遇到的情况, 本文确立并分析了反应剂量、温浴时间、分离时间、离心速度、操作技能、标本性质、标本保存条件、冻融、曲线调用和曲线模型等十大外部影响因素, 研究结果如下。

1 材料与方法

1.1 材料来源 血清标本共 80 份, 随机分为 4 组, 每组 20 份, 用于如下的研究: (1)操作因素及拟合函数; (2)标本性质; (3)标本保存条件和冻融试验; (4)曲线调用。

1.2 仪器及试剂 仪器为合肥众成机电技术开发有限公司生产的 DFM96 型 γ 计数器, 试剂为北京北方生物技术研究所生产的 INS 放射免疫试剂盒, 批号为 140520。所有试剂均在有效期内。

1.3 方法 所有标本严格按照试验设计的要求由专人进行操作。INS 检测标准操作规程为: 首先分别向反应管加入血清、I125-INS 标记抗原和特异性抗体各 100 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 温浴反应 2 h, 接着加入 0.5 mL 驴抗兔分离剂并室温放置 15 min, 然后 3 500 r/min 离心 15 min 并分离上清液, 最后在 γ 计数器上进行结果检测。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件包进行分析, 各组

* 基金项目: 江苏省实验诊断学重点实验室基金(XK201114); 江苏高校优势学科建设工程资助项目(基金编号 JX10231802)。

作者简介: 张巧娣, 女, 副主任技师, 主要从事临床免疫检验研究。△ 通讯作者, E-mail: xieerfu791010@163.com。

数据先进行正态性检验以及方差齐性检验, 偏态分布数据转化为正态分布, 对方差不齐的数据校正后再进行单因素方差分析, 进一步比较采用 SNK 检验, 组与组之间的相关性采用 Pearson 相关性分析。以 $P<0.05$ 为有统计学意义的判断标准。

2 结 果

2.1 操作因素对检测结果的影响 结果显示, 除操作技能组生手两亚组检测结果明显低于标准操作组外 ($P<0.05$), 其余组均未见明显差异, 且整体相关性较好, 见表 1。

表 1 操作因素对检测结果的影响($\bar{x}\pm s$)					
组别	<i>n</i>	亚组	INS 浓度(μ IU/mL)	r^2	<i>P</i>
标准操作	20	—	30.7 $\pm$ 16.3	—	—
反应剂量	20	90 μ L	29.5 $\pm$ 14.5	0.958	0.285
	20	70 μ L	23.9 $\pm$ 9.4	0.899	
	20	50 μ L	25.3 $\pm$ 9.4	0.917	
温浴时间	20	0.5 h	29.1 $\pm$ 10.2	0.930	0.670
	20	1 h	26.9 $\pm$ 10.5	0.915	
	20	3 h	26.4 $\pm$ 12.1	0.950	
分离时间	20	10 min	32.0 $\pm$ 13.5	0.947	0.944
	20	5 min	29.9 $\pm$ 15.6	0.968	
	20	25 min	29.3 $\pm$ 12.6	0.939	
离心速度	20	2 500 r/min	30.0 $\pm$ 13.2	0.981	0.550
	20	1 500 r/min	35.1 $\pm$ 16.2	0.961	
	20	4 500 r/min	35.5 $\pm$ 15.5	0.926	
操作技能	20	生手 1	28.8 $\pm$ 18.6	0.815	0.067
	20	生手 2	19.2 $\pm$ 13.9▲	0.864	

注: 与标准操作组比较, ▲ $P<0.05$ 。

2.2 标本因素对检测结果的影响 结果显示, 与血清标本相比, 血浆 INS 检测结果明显降低 ($P<0.05$); 与 $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存 7 d 相比, 室温保存 7 d 检测结果明显降低 ($P<0.05$), 但 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存 7 d 对结果影响不大; 随着反复冻融次数的增加, INS 检测结果呈下降趋势, 当反复冻融达 5 次后差异有统计学意义 ($P<0.05$)。相关性方面: 血清和血浆检测数据相关性较高, 保存条件和冻融均可以使相关性明显下降, 见表 2。

表 2 标本因素对检测结果的影响($\bar{x}\pm s$)				
组别	<i>n</i>	亚组	INS 浓度(μ IU/mL)	r^2
标本性质	20	血清	16.8 $\pm$ 27.5	
	20	血浆	9.1 $\pm$ 19.3*	0.916
保存条件	20	$-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 7 d	11.2 $\pm$ 3.4	0.000
	20	$4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 7 d	10.1 $\pm$ 3.0	0.656
	20	室温 7 d	7.0 $\pm$ 3.1 $\neq$	0.616
冻融次数	20	1 次	11.2 $\pm$ 3.4	0.001
	20	3 次	10.2 $\pm$ 1.9	0.529
	20	5 次	9.3 $\pm$ 2.8▲	0.615
	20	7 次	7.9 $\pm$ 2.4▲▲	0.633

注: 与血清亚组比较, * $P<0.05$; 与 $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存 7 d 亚组比较, $\neq P<0.01$; 与冻融 1 次亚组比较, ▲ $P<0.05$, ▲▲ $P<0.01$ 。

2.3 曲线因素对检测结果的影响 结果显示, 直接调用标准曲线可能会使检测结果明显升高或降低 ($P<0.05$), 通过质控品对调用的标准曲线进行调整可以消除这种差异或使差异变小。另外, 曲线模型的选择没有对 INS 检测结果产生明显的影响。相关性方面: 除了直接调用曲线相关性较差外, 其余组相关性均较高, 见表 3。

表 3 曲线因素对检测结果的影响($\bar{x}\pm s$)					
组别	<i>n</i>	亚组	INS 浓度(μ IU/mL)	r^2	<i>P</i>
曲线调用 (无质控调整)	20	参照	9.4 $\pm$ 3.4	0.000	
	20	调用 1	19.9 $\pm$ 3.8▲▲	0.434	
	20	调用 2	9.8 $\pm$ 2.9	0.952	
	20	调用 3	9.2 $\pm$ 3.3	0.952	
	20	调用 4	5.7 $\pm$ 3.7▲	0.848	
曲线调用 (经质控调整)	20	调用 1'	7.0 $\pm$ 3.8▲	0.933	0.155
	20	调用 2'	9.3 $\pm$ 2.4	0.959	
	20	调用 3'	8.1 $\pm$ 3.3	0.947	
	20	调用 4'	8.1 $\pm$ 3.7	0.945	
曲线模型	20	Logistic 四参数拟合	30.7 $\pm$ 16.3		0.483
	20	3/2 次方程	33.2 $\pm$ 16.6	0.999	
	20	线性样条函数插值	24.1 $\pm$ 15.3	0.998	
	20	线性方程	29.5 $\pm$ 13.7	1.000	
	20	二次方程	31.6 $\pm$ 14.9	0.999	
	20	单位点质量作用模型	32.5 $\pm$ 15.0	1.000	

注: 与参照亚组比较, ▲ $P<0.05$, ▲▲ $P<0.01$ 。

3 讨 论

放射免疫分析是由 Yalow 和 Berson 在 1959 年建立的一种标记免疫检测技术, 并首次测量了血清中 INS 的浓度^[2]。随后, 放射免疫分析以其高灵敏度和特异度广泛应用于医学和生物学领域, 从而为人们进一步揭开生命奥秘开辟了一条新的道路。放射免疫分析是一种优点和缺点并存的标记免疫分析技术, 优点是灵敏度和特异度都很高, 其检测成本远低于其他标记免疫分析技术, 缺点是存在放射性核素的污染和危害以及影响因素较多, 难以实现自动化操作。所以, 在临床检测中往往以化学发光为主, 而在科研领域则多选择放射免疫分析^[3]。

放射免疫分析影响因素很多, 实验条件对检测结果有很大的影响^[4]。在放射免疫日常检测中, 有时会遇到以下情况: 没有完全按照标准操作规程(SOP)进行操作, 接受的标本未充分凝固即进行测量, 标本保存条件不符合要求甚至标本经过反复冻融, 以及因种种原因调用标准曲线等。这些影响因素常常被放射免疫检测技术人员在工作中忽略, 同时也缺乏对它们在 INS 结果检测中影响程度的了解。本文结果显示: 操作因素中, 除操作技能组生手两亚组检测结果明显低于标准操作组差异有统计学意义外, 其余组均未见明显差异, 说明目前放射免疫试剂盒比较成熟稳定, 抗原抗体反应可以较快地达到动态平衡, 加入分离剂后也可以很快地形成沉淀, (下转第 2260 页)

可能是导致 BPH 发生发展的重要原因之一。

综上所述,排除肥胖相关代谢性疾病等影响因素后,肥胖与 BPH 的发病、发展密切相关,炎性细胞因子 IL-6 可能在 BPH 的病理生理过程中起重要作用。建议可以将减轻体质量作为预防和治疗 BPH 的手段之一。

参考文献

[1] Priest R, Garzotto M, Kaufman J. Benign prostatic hyperplasia; a brief overview of pathogenesis, diagnosis, and therapy[J]. Tech Vasc Interv Radiol, 2012, 15 (4): 261-264.

[2] Wang W, Guo Y, Zhang D, et al. The prevalence of benign prostatic hyperplasia in mainland China: evidence from epidemiological surveys[J]. Sci Rep, 2015, 5: 13546.

[3] Irwin DE, Kopp ZS, Agatep B, et al. Worldwide prevalence estimates of lower urinary tract symptoms, overactive bladder, urinary incontinence and bladder outlet obstruction[J]. BJU Int, 2011, 108(7): 1132-1138.

[4] Nandeesha H. Benign prostatic hyperplasia: dietary and metabolic risk factors[J]. Int Urol Nephrol, 2008, 40(3): 649-656.

[5] Parsons JK, Carter HB, Partin AW, et al. Metabolic factors associated with benign prostatic hyperplasia[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2006, 91(25): 2562-2568.

[6] 孙超, 薛向东, 汪柏林, 等. 良性前列腺增生与代谢综合征的相关性研究[J]. 中国医科大学学报, 2015, 44(1): 15-19.

[7] Parsons JK, Sarma AV, McVary K, et al. Obesity and benign prostatic hyperplasia: clinical connections, emerging

etiological paradigms and future directions[J]. J Urol, 2013, 189((6 Suppl): S27-31.

[8] Kim JM, Song PH, Kim HT, et al. Effect of obesity on prostate-specific antigen, prostate volume, and international prostate symptom score inpatients with benign prostatic hyperplasia[J]. Korean J Urol, 2011, 52 (6): 401-405.

[9] Yin Z, Yang JR, Rao JM, et al. Association between benign prostatic hyperplasia, body mass index, and metabolic syndrome in Chinese men[J]. Asian J Androl, 2015, 17 (5): 826-830.

[10] Russo GI, Cimino S, Morgia G. Benign prostatic hyperplasia and metabolic syndrome: the expanding evidences of a new disease of aging male[J]. Aging Male, 2015, 18(3): 133-134.

[11] Di Silverio F, Gentile V, De Matteis A, et al. Distribution of inflammation, premalignant lesions, incidental carcinoma in histologically confirmed benign prostatic hyperplasia: a retrospective analysis[J]. Eur Urol, 2003, 43 (2): 164-175.

[12] St Sauver JL, Jacobson DJ, Mc Gree ME, et al. Protective association between nonsteroidal antiinflammatory drug use and measures of benign prostatic hyperplasia[J]. Am J Epidemiol, 2006, 164(8): 760-768.

[13] McDowell KL, Begley LA, Mor-Vaknin N, et al. Leukocytic promotion of prostate cellular proliferation[J]. Prostate, 2010, 70(4): 377-389.

(收稿日期: 2016-02-02 修回日期: 2016-04-11)

(上接第 2257 页)

保证一定的离心力即可有效地把标记的抗原抗体复合物和游离的标记抗原分离开来,但是,为了更好地保证检测质量,研究者还是应该严格按照标准操作要求 SOP 进行操作;另外,与血清标本相比,血浆标本可以使血清 INS 结果明显降低($P<0.05$);室温保存 7 d 也可以使检测结果明显降低($P<0.05$),但 4℃保存 7 d 对结果影响不大;反复冻融可以使 INS 检测结果呈下降趋势,当反复冻融达 5 次便可以发生明显统计学差异($P<0.05$);直接调用标准曲线可能会使检测结果明显升高或降低($P<0.05$),通过质控品对调用的标准曲线进行调整可以消除这种差异或使差异变小。产生上述差异的原因,多是由于操作手法的不熟练,血浆中的凝血因子等成分,以及标本保存不当或放射性核素的衰变等造成的。所以,在 INS 的放射免疫检测中,为了消除外部因素对 INS 检测的影响,要使标本血清充分形成再行检测,长时间存放最好冷冻,不超过 7 d 可以选择冷藏,避免标本的多次冻融,慎重进行曲线调用,同时要加强操作手法的练习。

由于放射免疫分析以手工操作为主,同位素的衰变会影响

试剂盒的稳定性,所以影响因素很多,除了上面提到的十大影响因素,还有其他影响因素存在。不管怎样,只有充分地认识了这些影响因素对检测结果的影响,才有可能采取措施避免人为的原因造成的检测误差或错误,才能更好地保证检测质量。

参考文献

[1] 黄冉. 放射免疫分析测定胰岛素及 C-肽在 2 型糖尿病诊断中的应用[J]. 中国医药指南, 2011, 9(2): 112-113.

[2] Berson SA, Yalow RS. Quantitative aspects of the reaction between insulin and insulin-binding antibody[J]. J Clin Invest, 1959, 38(11): 1996-2016.

[3] 鲁彦, 岳建云, 苑芳, 等. 化学发光法和放射免疫法检测胰岛素[J]. 医学研究杂志, 2012, 41(1): 40-41.

[4] 应希堂, 李振甲. 应重视放射免疫分析总体质量的提高[J]. 放射免疫学杂志, 2006, 19(3): 161-162.

(收稿日期: 2016-02-06 修回日期: 2016-04-15)