

# 性激素结合球蛋白测定的方法学评价及相关性研究

张佳婕, 安振梅(成都大学附属医院检验科 610081)

**【摘要】 目的** 对性激素结合球蛋白(SHBG)商品试剂盒进行方法学评价,以确定其分析性能是否符合临床实验室应用的要求;建立 SHBG 的实验室参考范围,并分析其与睾酮、雌二醇的相关性。**方法** 依据美国临床实验室标准化协会颁布的 EP5-A、EP6-P 文件,分别对 SHBG 试剂盒进行批内和日间精密度、线性评价;评价分析方法的最低检测限。通过健康人建立实验室 SHBG 的参考范围,分析睾酮或雌二醇水平与 SHBG 的相关性。**结果** 不同 SHBG 浓度批内精密度变异系数(CV)分别为 2.50%和 2.16%,日间精密度 CV 分别为 4.33%和 2.63%;线性范围为 0.80~183.60 nmol/L 时测定结果为线性;其他指标符合性能评价要求。男、女性 SHBG 呈正态分布,60 岁以下男性 SHBG 参考范围确定为 8.76~61.44 nmol/L,60 岁以上男性 SHBG 参考范围确定为 20.41~97.43 nmol/L;女性 SHBG 参考范围确定为 10.26~129.94 nmol/L。总睾酮或总雌二醇与 SHBG 无相关性。**结论** Roche 公司生产的 SHBG 试剂盒在精密度、线性范围等方面的性能满足实验室要求。总睾酮或总雌二醇与 SHBG 无相关性。

**【关键词】** 性激素结合球蛋白; 诊断试剂盒; 精密度; 参考值; 睾酮; 雌二醇; 评价研究

**DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2011.01.020 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2011)01-0044-03**

**Method evaluation and correlation research of human sex hormone-binding globulin** ZHANG Jia-jie, AN Zhen-mei  
(Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital, Chengdu University, Chengdu 610081, China)

**【Abstract】 Objective** To evaluate the method performance of human sex hormone binding globulin(SHBG), to identify whether it can meet the clinical requirement, to set up the reference range of SHBG and to find out the correlation of SHBG to testosterone or estradiol. **Methods** The commercial SHBG reagent kit was used to assay SHBG in serum and its precision, linearity evaluation and the low limited detection according to the CLSI EP5-A, EP6-P files. To set up the SHBG reference range in lab. To analyze the correlation of testosterone or estradiol to SHBG. **Results** The within-run variation for middle and low values was 2.5% and 2.16%. The between-day variation for middle and low values was 4.33% and 2.63%. Linearity evaluation: 0.80—183.60 nmol/L. The reference range of male under 60-year-old was 8.76—61.44 nmol/L. The reference range of male over 60-year-old was 20.41—97.43 nmol/L, The reference range of female was 10.26—129.94 nmol/L. There was no correlation of the total testosterone or total estradiol to SHBG. **Conclusion** The method performance of SHBG fits the requirement of lab. There is no correlation of total testosterone or total estradiol to SHBG.

**【Key words】** sex hormone binding globulin; reagent kits, diagnostic; precision; reference values; testosterone; estradiol; evaluation studies

性激素结合球蛋白(SHBG)是由肝细胞合成分泌的一种循环固醇类结合糖蛋白<sup>[1]</sup>。SHBG 的主要功能是特异性地结合并转运性激素,主要结合睾酮,其次是雌二醇,其水平是维持雄激素/雌激素相对平衡的间接指标,并与胰岛素抵抗有明显关系<sup>[2-5]</sup>。因此 SHBG 可作为体内睾酮测定的补充,并对内分泌代谢性疾病有重要意义。为评价双抗体夹心法 SHBG 商品试剂盒的性能指标,本研究依据美国临床实验室标准化协会(CLSI)颁布的 EP5-A 和 EP6-P 文件对该试剂盒进行精密度、线性范围等评价,并对华西医院 200 名健康人群进行 SHBG 检测,建立适合该实验室的四川地区的参考范围,分析了 61 例患者睾酮或雌二醇与 SHBG 的相关性。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

**1.1.1 仪器** Roche Modular E170 电化学发光免疫分析仪。

**1.1.2 试剂** Roche 公司生产的 SHBG 检测试剂盒(双抗体夹心法),规格为 M,链霉素包被的微粒(透明瓶)1 瓶,6.5 mL,

链霉素包被的微粒 0.72 mg/mL;防腐剂。R1:生物素化的抗 SHBG 抗体(灰色瓶)1 瓶,10 mL,生物素化的抗 SHBG 单克隆抗体(鼠)1.25 mg/mL;磷酸盐缓冲液 100 mmol/L, pH7.2;防腐剂。R2:钆 Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>3+</sup> 标记的抗 SHBG 抗体(黑色瓶)1 瓶,10 mL,钆复合物标记的抗 SHBG 单克隆抗体(鼠)1.25 mg/mL;磷酸盐缓冲液 100 mmol/L, pH7.2;防腐剂。

**1.1.3 校准品** SHBG 校准品由 Roche 公司提供。

**1.1.4 临床样本** 四川大学华西医院体检中心健康人群,经体检无心、肺、肝、肾等主要脏器疾病,无脑血管病、糖尿病、原发性高血压等代谢性疾病,共 200 名,其中男性 100 名(21~84 岁,平均 46.6 岁),女性 100 名(21~81 岁,平均 40.5 岁)。61 例患者为排除其他疾病的睾酮或雌二醇水平异常者,男 33 例(19~94 岁,中位年龄 39 岁),女 28 例(23~67 岁,中位年龄 36 岁)。

**1.1.5 样本采集** 符合上述标准的人群,用 BD 真空血清采血管,按常规采血步骤采血 4 mL,1 h 内以 3 000 r/min 离心 10

min,血清完全分离后上机检测。

1.2 方法

1.2.1 分析方法 电化学发光免疫法。

1.2.2 评价前准备 分析者对分析方法、仪器和评价方案进行了解熟悉,对仪器进行常规维护,以保证仪器在评价期间处于良好状态。

1.2.3 校准 使用 Roche 公司提供的 SHBG 校准品进行完整校准(Full Calibration)。

1.2.4 精密度试验 选择两份不同 SHBG 浓度的血清标本,按照 CLSI EP5-A 文件要求,分别进行批内和日间重复性试验。批内重复性试验方法为在同 1 天内重复测定待测物 20 次,日间重复性试验方法为连续 20 d 内每日测定待测物 1 次,并分别计算均值( $\bar{x}$ )、标准差( $s$ )及变异系数(CV)。

1.2.5 线性范围试验 患者低(7.26 nmol/L)、中(78.68 nmol/L)、高(183.60 nmol/L)值血清 SHBG 标本分别用 Roche 通用样本稀释液(roche universal diluent)各稀释为 4~5 个不同浓度(最低 0.80 nmol/L;最高 183.6 nmol/L),随机排列,每个浓度测定两次,分段检测线性,当天完成。

1.2.6 最低检测限试验 重复测定 Roche 通用样本稀释液 10 次,按  $XL = +2s$  计算。XL 为方法的最低检测限(low limited detection,LLD)。

1.2.7 参考范围的确定 对 200 份检测结果按男、女分成两组,再以 20 岁起间隔 10 岁分组,男、女各 5 组。

1.2.8 SHBG 与睾酮、雌二醇的相关性分析 对睾酮水平异常( $t < 2.0$  ng/mL)的成年男性标本 33 份、成年女性标本 28 份分别测定其 SHBG 水平,并分析睾酮及雌二醇水平与 SHBG 的相关性。

1.3 统计学方法 用 SPSS 11.5 软件对数据作统计学处理,绘制频数分布图,计算出各组  $\bar{x}$ 、 $s$  并作均数  $t$  检验。

2 结果

2.1 精密度试验结果 两份不同 SHBG 浓度的血清标本批内和日间精密度结果见表 1、2。表 1 显示分析方法的批内精密度均小于 1/4 总允许误差( $TE_A$ ),表 2 显示日间精密度均小于 1/3 $TE_A$ 。

表 1 SHBG 批内精密度分析结果( $n=20$  次)

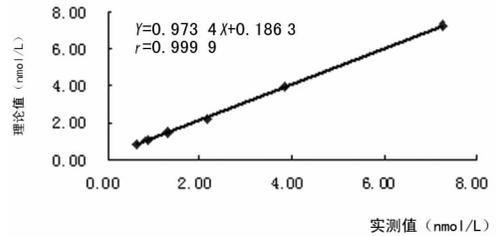
样本	$\bar{x}$ (nmol/L)	$s$ (nmol/L)	CV(%)	1/4 $TE_A$ (%)
血清 1	28.63	0.72	2.5	6.25
血清 2	54.00	1.16	2.16	6.25

2.2 线性范围试验结果 按 CLSI EP6-P 文件进行线性试验,结果见图 1~3。图 1~3 线性范围分析显示低、中、高浓度均成线性,故 SHBG 线性范围为 0.80~183.60 nmol/L。

2.3 最低检测限试验结果  $< 0.49$  nmol/L。

2.4 参考范围确定结果 SPSS 11.5 统计软件分析结果显示,男、女性数据的频数分布呈正态。由于 SHBG 低、高值都有临床价值,故用正态分布法统计 95% 参考值范围。对男、女性相同年龄段数据进行  $t$  检验(表 3),并对男性各年龄段进行方差分析,合并年龄段后再进行方差分析;女性分析方法亦如此。最终计算出 60 岁以下男性与 60 岁以上男性的 SHBG 差异有统计学意义,而女性不同年龄段之间 SHBG 无统计学差异。故 60 岁以下男性 SHBG 参考范围确定为 8.76~61.44

nmol/L(平均 35.10 nmol/L),60 岁以上男性 SHBG 参考范围确定为 20.41~97.43 nmol/L(平均 58.92 nmol/L);女性 SHBG 参考范围确定为 10.26~129.94 nmol/L(平均 70.10 nmol/L)。

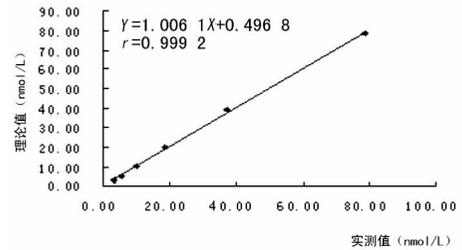


注:线性回归分析, $Y=0.973 4X+0.186 3$ ;  $r=0.999 9$ 。

图 1 低浓度线性范围结果

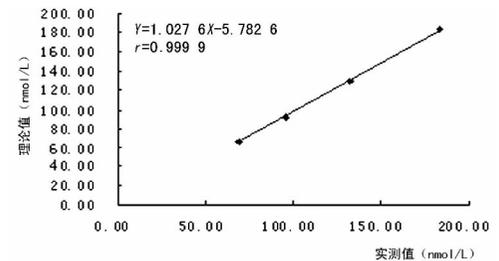
表 2 SHBG 日间精密度分析结果( $n=20$  d)

样本	$\bar{x}$ (nmol/L)	$s$ (nmol/L)	CV(%)	1/4 $TE_A$ (%)
血清 1	28.97	1.26	4.33	8.33
血清 2	56.62	1.49	2.63	8.33



注:线性回归分析, $Y=1.006 1X+0.496 8$ ;  $r=0.999 2$ 。

图 2 中浓度线性范围结果



注:线性回归分析, $Y=1.027 6X-5.782 6$ ;  $r=0.999 9$ 。

图 3 高浓度线性范围结果

表 3 200 名健康成人 SHBG 与年龄、性别的关系

年龄组(岁)	男性		女性		P
	n	$\bar{x} \pm s$	n	$\bar{x} \pm s$	
20~30	20	34.67±15.97	20	63.30±23.69	<0.05
>30~40	20	31.70±11.82	20	67.60±24.64	<0.05
>40~50	20	33.14±8.92	20	70.58±28.87	<0.05
>50~60	20	40.97±16.41	20	72.28±38.98	<0.05
>60	20	58.92±19.65	20	71.86±26.71	<0.05
总计	100	43.30±19.39	100	70.10±30.53	<0.05

2.5 SHBG 与睾酮、雌二醇的相关性 33 例男性患者睾酮水

平与 SHBG 水平未见显著相关,  $r^2 = 0.0114$  (图 4); 28 例女性患者雌二醇水平与 SHBG 也未见显著相关,  $r^2 = 0.0015$  (图 5)。

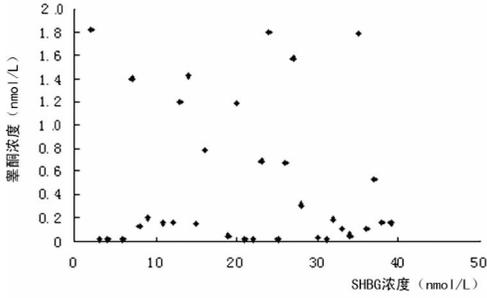


图 4 睾酮与 SHBG 的相关性

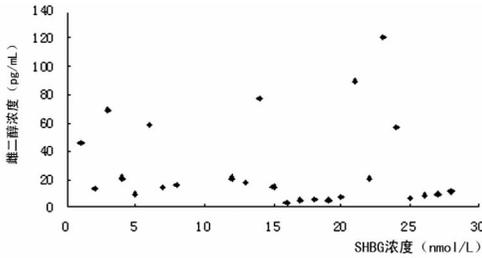


图 5 雌二醇与 SHBG 的相关性

### 3 讨论

传统 SHBG 的测定方法有酶联免疫吸附试验 (ELISA)、放免法等, 但其重复性不高, 操作较繁琐, 且有一定放射性危害。Roche 公司推出了适用于 Roche Modular E170 等分析仪的双抗体夹心法 SHBG 商品试剂盒。其原理是, 样本与生物素化的 SHBG 特异性单克隆抗体、钆标记的 SHBG 特异性单克隆抗体形成夹心复合物。再加入链霉亲和素包被的磁性微粒, 利用生物素和亲和素之间的特异性作用将复合物结合到固相微粒表面。磁性微粒被吸附到电极表面, 加入反应液洗去未结合物质, 同时电极加压, 电化学活性物质产生化学反应并发出光子被光电倍增管接受。

按 CLIA'88 要求, 日内精密度 (CV%) 应小于  $1/4 TE_A$ , 而日间精密度应小于  $1/3 TE_A$ , 该检测系统在不同浓度及不同时间下的精密度均满足要求。但对精密度进行评价时, 除了方法学本身外, 校准品的稳定性也会对结果造成很大影响。因此, 精密度试验时应严格按照说明书规定的校准方法进行校准, 且整个试验应尽量用同一批号试剂和校准品进行。本研究的线性试验采用分段检测法, 目的是为了避开标本过度稀释出现的基质效应。SHBG 的线性试验验证厂家提供的范围是可以达到的。方法的分析范围确定, 其报告范围也随之确定, 对于超过线性范围的样品, 应用适当的稀释液和稀释方法进行稀释后重新分析, 但需注意不可超过最大稀释倍数进行稀释。由于本研究采用电化学发光免疫分析双抗体夹心法检测, 使用了生物素化的单克隆抗体, 若患者接受高剂量生物素治疗或产生高滴度的链霉素抗体等会对测试产生干扰, 故应待患者生物素完全吸收后再采样或将标本稀释后测定。

虽然电化学发光法检测 SHBG 是采用罗氏的封闭检测系统, 所有的试剂和消耗品都来自于罗氏, 但厂家说明书提供的所有参数都是厂家在国外的最佳条件下完成的, 而不同实验室

的外部条件和最佳条件都存在较大的差异, 如水质、电压、实验室温湿度、人员的操作习惯等。因此, 每个实验室最好建立自己的方法学参数<sup>[6]</sup>。

本研究选定体检中心的健康成人标本建立 SHBG 的参考范围。考虑到 SHBG 与性激素有关, 因此本研究分性别、年龄段进行了检测与统计。结果显示, 男、女性两组检测值均呈正态分布, 并且由于 SHBG 高、低值均有临床价值, 故参考区间取双侧正态分布设立。通过相同年龄段不同性别的 SHBG 比较显示, 每个年龄段女性的 SHBG 值均高于男性, 与同性别不同年龄段相比, 女性随着年龄的升高, SHBG 值略有上升, 这可能与绝经前后激素水平的不同有关, 但统计学比较显示女性不同年龄段之间的测定值无统计学差异, 故最终女性参考范围是将所有年龄段测值合并而得到, 为 10.26~129.94 nmol/L。而男性 60 岁以下 SHBG 无明显变化, 60 岁以上的 SHBG 显著升高, 统计学比较显示有统计学差异, 故男性参考区间为 60 岁以下 8.76~61.44 nmol/L, 60 岁以上 20.41~97.43 nmol/L。

SHBG 在血浆中主要与睾酮或雌二醇结合, 但本研究发现血浆总睾酮或总雌二醇水平与血浆 SHBG 水平无相关性。推测 SHBG 与游离雌二醇而非总雌二醇相关, 同样推测 SHBG 与游离睾酮而非总睾酮相关, 故下一步可进行该方面验证。

综上所述, 该 SHBG 试剂盒用 Roche Modular E170 电化学发光免疫分析仪测定特异性好、重复性高、结果准确, 有一定推广价值, 能满足临床检测要求。男女性别之间 SHBG 值有显著差异, 各年龄段也有一定差异, 但由于地区人群差异以及实验室环境差异, 各实验室应建立自己的 SHBG 参考范围。总睾酮或总雌二醇与 SHBG 无相关性, 下一步可进行游离性激素与 SHBG 的相关性验证。

### 参考文献

- [1] Hammond GL, Avvakumov GV, Muller YA. Structure function analyses of human sex hormone-binding globulin; effects of zinc on steroid-binding specificity[J]. Steroid Biochem Mol Biol, 2003, 85(2-5):195-200.
- [2] 王素美, 迟闰珠, 张震宇, 等. 妊娠期糖尿病性激素结合球蛋白与胰岛素抵抗的相关性研究[J]. 中国全科医学, 2007, 10(6):459-460.
- [3] Tok EC, Ertunc D, Evruke C, et al. The androgenic profile of women with non-insulin dependent diabetes mellitus [J]. Reprod Med, 2004, 49(9):746-752.
- [4] Livingstone C, Collison M. Sex steroids and insulin resistance[J]. Clin Sci, 2002, 102(2):151-166.
- [5] Lewis JG, Shand BI, Elder PA, et al. Plasma sex hormone-binding globulin rather than corticosteroid-binding globulin is a marker of insulin resistance in obese adult males[J]. Diabetes Obes Metab, 2004, 6(9):259-263.
- [6] 黄志基, 黄铭颖, 岑屹, 等. 罗氏电化学发光检测系统检测泌乳素的方法学评价及参考范围建立[J]. 检验医学, 2007, 22(6):623-626.