

血清标本放置时间对细胞因子检测结果的影响^{*}

周盈盈, 王珍妮, 沈 南, 黄新芳[△] (上海交通大学医学院附属仁济医院风湿科, 上海 200001)

【摘要】 目的 探讨风湿病患者血清细胞因子检测的重要性, 了解静脉血血清标本不同的放置时间对风湿性自身免疫疾病相关的细胞因子检测结果的影响。**方法** 采集 26 例风湿病患者静脉血血清, 分别于室温下放置 0、1、4 h 后, 通过液相悬浮芯片技术对其进行一系列细胞因子测定, 并进行统计学分析。**结果** 风湿病患者血清中白细胞介素 (IL)-10、IL-13、干扰素诱导蛋白 10 (IP-10) 和干扰素 γ (IFN- γ) 等细胞因子水平与患者年龄相关 ($P < 0.05$); 血清中 IL-10、IL-12p70、正常 T 细胞激活上调性表达因子 (RANTES)、IP-10 和巨噬细胞炎症蛋白 1 β (MIP-1 β) 等细胞因子水平与患者疾病类型相关 ($P < 0.05$); 血清室温放置 4 h 内各标本中细胞因子水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** 液相悬浮芯片技术可高效分析风湿病患者血清细胞因子谱, 有助于疾病诊断和评估。风湿病患者血清细胞因子检测时限可延长至室温下 4 h, 可以满足临床和基础研究的检测要求。

【关键词】 血清标本; 放置时间; 细胞因子

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2014.21.009 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2014)21-2965-03

Influence of serum sample placing time on cytokine detection results^{*} ZHOU Ying-ying, WANG Zhen-ni, SHEN Nan, HUANG Xin-fang (Department of Rheumatology, Renji Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200001, China)

【Abstract】 Objective To investigate the importance of serum cytokine detection in rheumatic patients and to explore the effect of the different placing time on the detection results of rheumatic autoimmune diseases related cytokines. **Methods** Serum samples of venous blood were collected from 26 rheumatic patients and then placed at room temperature for 0, 1, 4 h. The cytokine concentrations were determined using the Bio-Plex protein array system. The detection results were statistically analyzed. **Results** The levels of IL-10, IL-13, IP-10, IFN- γ were correlated with age ($P < 0.05$); the levels of IL-10, IL-12p70, RANTES, IP-10, MIP-1 β were correlated with disease types; there was no significant differences in cytokine levels when the samples were placed at room temperature within 4 h. **Conclusion** The liquid suspension chip technology can measure serum cytokines spectrum efficiently, which is benefit to the diagnosis and estimation of disease. The detecting time limit of serum cytokines can be delayed to 4h at room temperature, which can satisfy the testing requirements for clinical and basic research.

【Key words】 serum samples; placing time; cytokines

细胞因子是一类小分子可溶性蛋白质, 在机体固有免疫和适应性免疫中起着重要作用, 可以和细胞表面的细胞因子受体作用, 介导体内信号转导^[1]。随着对风湿性自身免疫疾病研究的深入, 细胞因子逐渐成为该类疾病诊断或严重度评估的重要指标。近年来, 随着对疾病生物标志物关注的增加, 推动了多因子检测工具的发展, 进而也推动了对疾病细胞因子谱的研究。液相悬浮芯片技术是依赖于磁珠的多细胞因子检测技术, 可以同时检测上百种细胞因子, 并且大大减少了检测所需样本量^[2]。至今为止, 风湿性自身免疫疾病的发病机制未明, 缺乏特异的实验室诊断方法, 本试验采用液相悬浮芯片技术对风湿病患者进行细胞因子谱分析, 并探讨其与患者临床病理特征的关系, 将有助于该类疾病的诊断。此外, 细胞因子测量的精确度因为缺乏适当的样本处理和储存标准而成为一个难题。众所周知, 细胞因子作为一种胞内介质, 具有体内半衰期短, 体外易降解的特点^[1]。因此, 血清样本体外放置时间对于其检测的准确度而言至关重要。而在一些临床或基础研究中, 特别是在一些大型样本库研究中, 往往需要同时处理一大批血液样本,

无法达到快速冻存的目标。本文拟通过研究血清样本室温放置时间对风湿性自身免疫疾病相关细胞因子浓度的影响, 探讨风湿性疾病血清处理的标准化流程, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 血液标本来源于 2013 年 6 月至 7 月本院门诊 26 例风湿性自身免疫疾病患者 [系统性红斑狼疮 (SLE) 患者 15 例, 多肌炎患者 5 例, 其余风湿病患者 6 例], 其中男 2 例, 女 24 例, 平均年龄 43 岁。

1.2 仪器与试剂 Bio-rad 细胞因子检测仪, Bio-plex 多细胞因子检测试剂盒 (Bio-rad 公司)。

1.3 方法

1.3.1 血清分离 采集患者外周静脉血 3 mL 于 5 mL 促凝管中, 静止摇晃以免溶血。采集的促凝血在室温 25 ℃ 放置 30 min 致其凝血。然后 3 000 r/min 离心 5 min, 将上部血清以每管 200 μ L 转移至可立冻存管。将上述血清样本每份各取 3 管, 分别在室温放置 0、1、4 h 后 -80 ℃ 冻存。

1.3.2 液相悬浮芯片检测血清细胞因子水平 待冻融的血清

^{*} 基金项目: 上海交通大学医学院“985 工程”三期样本库项目。

作者简介: 周盈盈, 女, 硕士研究生, 主要从事系统性红斑狼疮的发病机制研究。 [△] 通讯作者, E-mail: hxf343@126.com。

恢复至室温后,准备好标准品,将含有针对多种细胞因子的微珠与血清混合,反应 30 min。真空抽去液体,用洗涤液 Wash buffer 洗 3 次后加入检测抗体,混合反应 30 min。再用 Wash buffer 洗 3 次,加入亲和素偶联的 PE 荧光(Streptavidin-PE)色素,混合反应 10 min,用 wash buffer 洗 3 次。最后用 125 μ L 试剂稀释液(Assay buffer)重悬微珠,混匀 30 s,上 Bio-rad 仪器检测细胞因子浓度。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19 软件进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,两变量间相关性分析采用 Spearman 法。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 血清细胞因子水平与患者年龄、疾病类型的关系 患者血清中白细胞介素(IL)-10、IL-13、干扰素诱导蛋白 10(IP-10)以及由 TH1 细胞分泌的干扰素 g(IFN-g)水平与患者年龄成正相关($P<0.05$),血清中正常 T 细胞激活上调性表达因子(RANTES)、IL-10、IL-12p70、IP-10、巨噬细胞炎症蛋白 1 β (MIP-1 β)水平与患者风湿性疾病的类型相关,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

表 1 血清细胞因子水平与患者年龄/疾病类型的关系

细胞因子	年龄		疾病类型	
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
RANTES	-0.059	0.774	0.425	0.030
IP-10	0.481	0.013	0.552	0.003
MIP-1 β	0.274	0.175	0.405	0.040
IL-17	-0.297	0.141	-0.020	0.922
IL-13	0.442	0.024	0.151	0.462
IL-12p70	0.181	0.376	0.446	0.022
IL-10	0.481	0.013	0.552	0.003
IL-4	0.102	0.621	0.247	0.224
IL-2	-0.085	0.680	0.205	0.315
TNF- α	-0.060	0.771	0.309	0.125
Eotaxin	-0.089	0.667	0.127	0.527
IFN-g	0.453	0.020	0.241	0.236

2.2 血清标本放置时间对细胞因子检测结果的影响 综合分析室温放置不同时间后风湿性自身免疫疾病患者血清中各类细胞因子水平,证明室温状态下放置 4 h 内,对风湿性自身免疫疾病相关的各类细胞因子的检测结果无明显影响($P>0.05$)。其中,随着放置时间的延长,IL-17、Eotaxin、IFN-g 水平下降,但差异无统计学意义($P>0.05$)。而 RANTES、IP-10、MIP-1 β 、IL-13、IL-12p70、IL-10、TNF- α 等细胞因子水平变化不规律,不同时间测定结果间差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 2。

表 2 血清标本放置不同时间细胞因子检测结果($\bar{x}\pm s$)

细胞因子	细胞因子浓度(pg/mL)		
	0 h	1 h	4 h
RANTES	19 460.0 $\pm$ 4 026.0	18 991.0 $\pm$ 4 026.0	19 231.0 $\pm$ 4 111.0
IP-10	1 092.0 $\pm$ 1 340.0	1 132.0 $\pm$ 1 181.0	1 098.0 $\pm$ 1 230.0
MIP-1 β	498.9 $\pm$ 382.4	499.1 $\pm$ 384.2	467.8 $\pm$ 364.5

续表 2 血清标本放置不同时间细胞因子检测结果($\bar{x}\pm s$)

细胞因子	细胞因子浓度(pg/mL)		
	0 h	1 h	4 h
IL-17	174.8 $\pm$ 64.6	169.4 $\pm$ 58.9	163.6 $\pm$ 61.7
IL-13	22.9 $\pm$ 6.7	24.7 $\pm$ 9.4	22.0 $\pm$ 7.3
IL-12p70	35.9 $\pm$ 14.8	36.0 $\pm$ 16.8	34.3 $\pm$ 14.2
IL-10	31.7 $\pm$ 7.2	33.8 $\pm$ 13.0	33.0 $\pm$ 15.9
IL-4	55.9 $\pm$ 29.7	50.2 $\pm$ 17.0	50.2 $\pm$ 16.8
IL-2	78.5 $\pm$ 19.1	78.7 $\pm$ 23.9	77.9 $\pm$ 23.9
TNF- α	35.5 $\pm$ 7.3	33.6 $\pm$ 5.2	34.1 $\pm$ 6.7
Eotaxin	60.0 $\pm$ 19.3	59.3 $\pm$ 21.3	59.1 $\pm$ 19.5
IFN-g	28.8 $\pm$ 11.4	27.4 $\pm$ 9.2	25.6 $\pm$ 6.9

3 讨 论

风湿性自身免疫性疾病的诊断和治疗随着免疫学尤其是细胞免疫、分子免疫的发展而发展。以 SLE 为例,19 世纪 60 年代前,SLE 被称为血癌,究其原因是当时 SLE 的确诊主要依靠找到外周血涂片或骨髓涂片中的狼疮细胞。而往往只有活动度很高且是晚期的 SLE 才能被确诊,因此当时患者的生存率很低。随后,科学家们发现 SLE 患者的血清中存在一种针对自身细胞核成分的抗体,并逐步鉴定为抗核抗体(anti-ANA 抗体)、抗可提取的核抗原抗体(anti-ENA 抗体)、抗双链 DNA 抗体(anti-dsDNA 抗体)^[3],极大地提高了 SLE 的确诊率。

近年来,随着对疾病生物标志物研究的深入,疾病细胞因子谱的分析日渐受到重视。该方法通过非侵入性的方式监测疾病状态,已证实对一些慢性疾病早期诊断(心脏疾病、糖尿病、癌症)具有重要作用,并且可以提供疾病预示性的信息^[2]。目前,少有关于风湿性疾病细胞因子谱的研究,虽然类风湿性关节炎患者的血清中也发现一系列细胞因子如 IL-17、干扰素 γ (IFN- γ)、RANTES 水平上调,且上升程度与疾病的活动度成正比,在白塞氏病中炎症因子 IL-15 水平明显升高^[4-5],但因为单因子检测的酶联免疫吸附试验(ELISA)的限制,不同实验室研究结果之间存在较大误差,且无法对风湿病患者细胞因子水平进行全面的分析。本研究采用液相悬浮芯片技术,在同一条件下对风湿病患者血清中多种风湿性相关的细胞因子水平进行了检测,结果显示风湿性自身免疫疾病患者血清中含有高水平的 RANTES、MIP-1 β 、IP-10。MIP-1 β 可以趋化 B 淋巴细胞、T 淋巴细胞、巨噬细胞及树突状细胞,显示了患者体内免疫细胞具有高迁移能力^[6],与该类患者异常活跃的自身免疫系统密切相关。IP-10,作为 IFN- α 的应答蛋白之一,和唾液酸结合免疫球蛋白样凝集素(SIGLEC-1)一起被证实与 SLE 的疾病活动度有关,可以作为该疾病的生物标志物之一^[7]。此外发现患者血清中 IL-10、IP-10 浓度与患者年龄与风湿性疾病的类型均相关。其中 IL-10 是一类多效性抗炎性细胞因子,被认为与 TH1 型细胞因子如 IL-1、TNF- α 、IFN- γ 的下调有关。其编码基因位于人类 1 号染色体长臂 32.2 位点,且其单基因多态性被认为是多种自身免疫性疾病、炎症性疾病如 SLE、1 型糖尿病、类风湿性关节炎、溃疡性结肠炎等的危险因素^[8]。而明确细胞因子水平与风湿性疾病类型的特定关系,还有待进一步试验证明。

此外,已有研究显示,静脉血标本室温放置 3 h 即可明显

影响血葡萄糖(Glu)、氯离子(Cl^-)等常规生化检验结果^[9]。而静脉血标本放置 3 h 内对 ACT、5dill AL 全自动血细胞分析仪检测血常规结果则无影响^[10]。从标本采集到检测,检验前阶段的质量控制是整个检验质量控制中一个非常重要而又容易忽视的环节。而标本的放置时间又是检验前的一个重要环节。血液标本放置时间过长或者采血时选择的样本采集管不当均可以导致溶血。研究表明,溶血会影响血标本中糖酵解关键酶-神经元特异性烯醇化酶(NSE)浓度,使其检测结果较未溶血标本偏高^[11]。此外,抗凝剂的使用会影响体外细胞因子的检测。一般抗凝管所含的抗凝物质肝素锂中含有内毒素,而内毒素可以诱导细胞因子的合成,并且这种诱导合成的过程呈时间依赖性^[1]。由于血清样本在收集的过程中会遇到溶血、放置时间过久等问题而可能导致细胞因子的降解,因此临床和基础研究均需要对血清样本的收集、分装、保存、取出及使用提出较高的要求。本试验采用不包含肝素锂的普通促凝管,排除了内毒素对细胞因子检测结果的影响,并且在保存过程中较少有溶血情况发生。另外,相较于传统的 ELISA、放射免疫分析(RIA)、电化学发光等细胞因子检查方法,本试验采用的悬浮液相芯片技术利用针对多种待测细胞因子的微珠和配套的 Bio-rad 检测系统,打破了传统的检测方法在单因子检测和手工操作时间长方面的限制,可以同时大批量的样本进行多种细胞因子水平的检测,不但节约了检测时间,同时缩小了检测误差,因而在一些大型样本库的研究中被广泛采用。

近年来,随着基础和临床研究的规范化、系统化,越来越多人认识到样本库的建立,特别是血液样本库的建立,为疾病实验室诊断的发展,发现新的诊断性生物标记物,常见的复杂疾病的病因学探索,以及基因变异与生活方式之间的关系研究提供了强有力的工具。而标准的多样化,缺乏特定的样本采集和处理的指南是目前大部分样本库的通病,限制了生物样本库功能的发挥。目前国外已有的较具前景的大型样本数据库,例如英国的 Biobank 样本库,挪威的 HUNT 样本库等,都具有标准的操作流程及计算机监控系统,从采血针的选择、使用到样本冻存、处理,都有严格的要求。

目前,尚无相关研究证实血标本放置时间对风湿性自身免疫性疾病相关细胞因子检测结果的影响,本研究通过观察风湿性自身免疫性疾病患者静脉血标本在室温下放置不同时间后血清中细胞因子变化趋势,探索了风湿性自身免疫性疾病血清处理及入库的标准化流程。研究显示,IL-17、Eotaxin 的检测结果显示下降趋势,可能是由于室温放置导致少部分细胞因子降解、蛋白沉淀,或者部分细胞因子聚集形成复合物所致。而对于 RANTES、IL-12p70、IL-13、TNF- α 等细胞因子,随着样本放置时间的延长,其浓度变化不规律,统计结果显示在室温放置 4 h 内,上述差异无统计学意义($P>0.05$)。

当然,本试验也有不足之处。血标本室温放置时间是否会导致细胞因子的生物学结构产生改变尚待进一步试验证实。另外,因为本试验中门诊患者的血样本采集时间不同,血清样本在室温放置不同时间后先冻存于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱,然后进行统一的检测。因此,在对血清样本进行一系列细胞因子测定前,血清样本已经被置于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱进行了不同时间的冻存,需

进一步试验排除冻存时间对细胞因子检测的影响。

综上所述,血清细胞因子检测是一个复杂的过程,其结果的准确性受多种因素的影响。本研究结果表明,风湿病患者血清中多种细胞因子水平与患者年龄、疾病类型相关。对采集的风湿性自身免疫性疾病患者血清在室温下放置 4 h 内进行检测,结果可靠,可以满足临床和基础研究需要。

参考文献

- [1] Panicker G, Meadows KS, Lee DR, et al. Effect of storage temperatures on the stability of cytokines in cervical mucous[J]. Cytokine, 2007, 37(2): 176-179.
- [2] Malekzadeh A, De Groot V, Beckerman H, et al. Challenges in multi-plex and mono-plex platforms for the discovery of inflammatory profiles in neurodegenerative diseases[J]. Methods, 2012, 56(4): 508-513.
- [3] Da Silva AE, Dos Reis-Neto ET, Da Silva NP, et al. The effect of acute physical exercise on cytokine levels in patients with systemic lupus erythematosus[J]. Lupus, 2013, 22(14): 1479-1483.
- [4] Klimiuk PA, Kita J, Chwiecko J, et al. The changes in serum chemokines following leflunomide therapy in patients with rheumatoid arthritis[J]. Clin Rheumatol, 2009, 28(1): 17-21.
- [5] Curnow SJ, Pryce K, Modi N, et al. Serum cytokine profiles in Behçet's disease: is there a role for IL-15 in pathogenesis? [J]. Immunol Lett, 2008, 121(1): 7-12.
- [6] Louboutin JP, Strayer DS. Relationship between the chemokine receptor CCR5 and microglia in neurological disorders: Consequences of targeting CCR5 on neuroinflammation, neuronal death and regeneration in a model of epilepsy[J]. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2013, 12(6): 815-829.
- [7] Rose T, Grützkau A, Hirsland H, et al. IFN α and its response proteins, IP-10 and SIGLEC-1, are biomarkers of disease activity in systemic lupus erythematosus[J]. Ann Rheum Dis, 2013, 72(10): 1639-1645.
- [8] Wu Z, Zheng W, Xu J, et al. IL10 polymorphisms associated with Behçet's disease in Chinese Han[J]. Hum Immunol, 2014, 75(3): 271-276.
- [9] 贾利军. 空腹静脉血标本放置时间对常规生化检验结果的影响[J]. 检验医学与临床, 2011, 8(6): 719-720.
- [10] 杨霞, 潘爱平, 张梅香. 静脉血标本放置时间对血常规检测结果的影响[J]. 检验医学与临床, 2012, 9(8): 980-981.
- [11] 刘为邦, 程冬娥, 申建维, 等. 时间及溶血对全血标本中 NSE 测定的影响[J]. 检验医学与临床, 2009, 6(20): 1735-1736.