

标本放置温度及时间对酶联化学发光法检测血清胸苷激酶 1 结果的影响

刘晓雷¹, 裴维维¹, 乔琳² (1. 河北医科大学第二医院检验科, 石家庄 050000; 2. 南京诺尔曼生物技术有限公司, 南京 210031)

【摘要】 目的 观察标本放置不同时间及温度对血清胸苷激酶 1(STK1)结果的影响。**方法** 采集 42 例血液标本, 分别在室温[(23±2)℃]、4℃及-20℃放置不同时间后再测定 STK1 浓度, 与即刻测定结果进行对比分析。**结果** 标本放置室温 2 h 及 4℃24 h 后测定的 STK1 结果与即刻测定结果比较差异有统计学意义($P<0.05$), -20℃放置 28 d 测定结果与即刻测定结果比较差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 温度与放置时间对标本 STK1 浓度有影响。室温环境下应在采血后 2 h 内完成加样, 标本于 4℃冷藏最多放置 24 h, 若置于-20℃可较长期保存。

【关键词】 胸苷激酶 1; 放置时间; 温度

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2015.22.020 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2015)22-3346-02

Influence of blood samples storage temperature and time on STK1 results detected by enzyme-linked chemiluminescence method LIU Xiao-lei¹, QIU Wei-wei¹, QIAO Lin² (1. Department of Clinical Laboratory, Second Affiliated Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei 050000, China; 2. Norman Biological Technology Co., Ltd., Nanjing, Jiangsu 210031, China)

【Abstract】 Objective To observe the influence of blood samples storage time and temperature on the results of serum thymidine kinase 1(STK1) detection. **Methods** 42 blood samples were collected and stored at the room temperature(23±2)℃, 4℃ and -20℃ for different time. Then the STK1 detection was performed. The detection results were compared with those by instant detection. **Results** The STK1 detection results had statistically significant difference between the detection after sample storage at the room temperature for 2 h and the detection after storage at 4℃ for 24 h($P<0.05$), while the detection results had no statistical difference between the detection after storage at -20℃ for 28 d and the instant detection($P>0.05$). **Conclusion** Temperature and storage time have certain influence on the STK1 detection results of sample. The sample adding should be completed within 2 h after blood collection at the room temperature environment, the sample was refrigerated up to 24 h at 4℃, but which could be stored for a long time at -20℃.

【Key words】 serum thymidine kinase 1; storage time; temperature

血清胸苷激酶 1(STK1)是一种与细胞周期密切相关的酶, 主要分布在细胞质中, 其水平具有细胞周期依赖性, 在正常组织中的水平甚低, 当出现肿瘤病变或其他增殖性变化时其水平明显上升^[1-2]。近年相关研究表明 STK1 水平与肿瘤增长速度、恶性分级、转移程度及预后判断都有着重要的联系^[3], 这使得其成为一种非组织器官特异性、高敏感性、普筛型及全新的重要标志物^[4-5]。自 2014 年河北医科大学第二医院检验科特检室开展 STK1 相关检测与研究以来, 接收了大量该院、临近医院、第三方实验室及体检中心的标本申请, 涉及检验前质量控制的影响因素较多, 如对标本运输所耗时间及实验环境温度等可能会造成 STK1 结果的差异。为保证 STK1 检测的有效性, 提高分析前质量控制水平, 作者设计了常见的几种放置时间和温度, 对标本进行处理及对比分析, 以明确 STK1 检测干扰因素、发现标本处理中的最优方案并提出预防策略。

1 资料与方法

1.1 一般资料 从 2014 年 12 月来河北医科大学第二医院体检人员中随机选取 42 例, 其中男 27 例, 女 15 例, 平均(36.2±4.5)岁。

1.2 仪器与试剂 采血管为山东奥赛特生产的无任何填充的

真空采血管(生产批号 20140401)。检测仪器为华瑞同康(深圳)有限公司的 CIS-2 化学发光数字成像仪, 试剂盒同为该公司提供, 生产批号 NT1140901A(24 份)。冰箱为合肥美的荣事达电冰箱有限公司生产, 型号 BCD-301WMA, 温度校准日期 2014 年 3 月 17 日。移液器为美国热电 Thermo 及德国 Eppendorf 移液器。

1.3 方法 所有研究对象于清晨空腹分别抽取 6 mL 静脉血于无填充剂真空采血管中, 所有标本排除黄疸、脂血和溶血等现象。以 3 000 r/min 离心 10 min 后分离血清并用 10 支 EP 管分别保存, 除 1 支 EP 管进行 STK1 即刻检测外, 其余 9 支分 3 组分别置于室温[(23±2)℃]、4℃及-20℃保存一定时间, 在不同时间点(室温放置 2~8 h、4℃放置 4~48 h 及-20℃放置 7~28 d)分别进行 STK1 水平测定。检测原理是待检标本中的 STK1 酶抗原与抗人 STK1-IgY 抗体反应产生抗原-抗体复合物, 再与相对应的生物素化抗 IgY 二抗、SA-HRP(亲和素化辣根过氧化物酶)结合, 最后形成“STK1-抗 STK1-IgY-生物素化抗 IgY 二抗-SA-HRP”复合物, 通过专用化学发光数字成像仪检测 HRP 与发光剂反应发出信号的强弱, 计算出血清中 STK1 的浓度。

1.4 统计学处理 使用 SPSS15.0 软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 在室温中,标本放置 2 h 与即刻检测的 STK1 水平差异无统计学意义($P > 0.05$);超过 2 h 后,与即刻检测的结果比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。当标本于 4 ℃ 中,放置 4、24 h 内与即刻检测的 STK1 水平差异无统计学意义($P > 0.05$),但是超过 24 h 后,与即刻检测结果的差异有统计学意义($P < 0.05$)。在-20 ℃ 冷冻 7、14、28 d 的检测结果与即刻检测结果相比差异均无统计学意义($P > 0.05$),STK1 测定结果未出现明显变化。见表 1。

2.2 随着时间的变化,STK1 测定结果存在降低的趋势,室温 8 h 时测定浓度下降达 32.71%。

表 1 标本放置不同温度与时间 STK1 测定结果与对照组比较 ($n=42, \bar{x} \pm s$)

标本放置时间与温度	STK1 测定结果(pmol/L)	<i>t</i>	<i>P</i>
室温即刻检测	1.07±0.75	—	—
室温 2 h 检测	1.05±0.76 *	0.142	>0.05
室温 4 h 检测	0.97±0.74 *	0.631	<0.05
室温 8 h 检测	0.72±0.66 *	2.271	<0.05
4 ℃ 4 h 检测	1.06±0.97 *	0.094	>0.05
4 ℃ 24 h 检测	1.00±0.76 *	0.425	>0.05
4 ℃ 48 h 检测	0.80±0.65 *	1.749	<0.05
-20 ℃ 7 d 检测	1.06±0.74 *	0.081	>0.05
-20 ℃ 14 d 检测	1.03±0.69 *	0.286	>0.05
-20 ℃ 28 d 检测	1.00±0.71 *	0.427	>0.05

注:*t*、*P* 为与室温即刻检测比较的统计值;—表示无数据。

3 讨 论

临床实验室的检验质量与结果可信度主要取决于分析前、分析中及分析后等质量控制环节^[6],目前多数实验室已经实现和建立了较为完善的分析中与分析后的质量控制管理制度,但对于分析前阶段,即从临床医务人员选择检验项目、提出实验申请、检验标本采集到运送至实验室,存在着实验室诸多难以直接掌控的影响因素,使该阶段成为检验科质量控制体系中最薄弱的一环、最容易忽视的一环及对结果影响最大的一环^[7-9]。

STK1 是一种参与组织细胞增殖密切相关的酶,在 Mg^{2+} 参与下能够以三磷酸腺苷(ATP)为底物,将胸腺嘧啶核苷合成转化,生成单磷酸胸腺嘧啶^[10]。通常情况下,体内正常组织细胞多在 G₁ 期死亡,因此 STK1 水平极低,但肿瘤组织细胞凋亡机制被破坏,无法正常消亡而出现显著增加,直到细胞的有丝分裂期才逐渐消失^[11]。因此 STK1 在非增殖阶段组织细胞中的浓度很低,但在出现增殖情况如炎症、增生及肿瘤细胞中其表达水平明显上升^[12]。STK1 活性已被用来监测肿瘤转移的程度,并判断急、慢性白血病,食管癌、肺癌、肝癌、乳腺癌和宫颈癌等疾病的预后^[13-15]。

理想情况下标本采集后为避免环境与自身降解的影响,应即刻进行检测,其结果最为准确,但实际工作很难实现。近年来大多数医疗机构将住院患者血液检查标本采集时间安排在早上 6:00~6:30,由夜班护士一次集中完成,7:30 以后标本被分批送到实验室。对于临近医疗机构的标本,由于路况及采集时间无法确认,实验室接收时间甚至更晚。而门诊及体检标本则间隔 1.0~1.5 h 集中送检。因此本试验结合实际工作,以即刻分离的血清测定 STK1 作为对照组,通过设定不同温度及

时间进行对比,分析表明采用酶联免疫化学发光法检测 STK1 时环境温度与时间对检测结果的确实存在影响。在室温[(23±2)℃]环境下,离心标本放置 2 h 内与即刻检测的 STK1 检测水平差异无统计学意义($P > 0.05$);但超过 2 h 后,STK1 测定结果出现减小趋势,与即刻检测的结果相比差异有统计学意义($P < 0.05$),且 8 h 较 4 h 降幅更加明显。在 4 ℃ 冰箱冷藏环境下,标本放置 4~24 h 内与即刻检测的 STK1 水平相比差异无统计学意义($P > 0.05$);当超过 24 h 后,STK1 测定结果开始降低,与即刻检测的结果相比差异有统计学意义($P < 0.05$)。在-20 ℃ 冷冻环境中,标本在 7、14、28 d 时间点与即刻检测的 STK1 水平相比差异无统计学意义($P > 0.05$),STK1 测定结果均未出现明显变化,以上分析与试剂厂家提供的说明文件相符。

综上所述,本试验提示检测 STK1 项目时,室温下采集标本应该在 2 h 内及时分离血清,若无法送达可先置 4 ℃ 冷藏,但时间不宜超过 24 h,或分离血清后在-20 ℃ 可 28 d 长期保存,所需设备基本符合目前医疗临床与实验室实际工作。本文明确了分析前阶段标本保存温度与时间对 STK1 结果的影响趋势与程度,为实验室进行区域性、大范围及连续性肿瘤普筛提供准确、可靠的检测数据提供了借鉴。

参考文献

[1] Chen ZH, Huang SQ, Wang Y, et al. Serological thymidine kinase 1 is a biomarker for early detection of tumours-a health screening study on 35, 365 people, using a sensitive chemiluminescent dot blot assay[J]. Sensors(Basel), 2011,11(12):11064-11080.

[2] 张兴华,杨金荣,付筱英,等.血清胸苷激酶 1 对癌前疾病的癌变风险筛查的意义[J].中华健康管理学杂志,2010,4(1):35-38.

[3] 郭丽香,刘树业.胸苷激酶 1-新型的细胞增殖动力学标志[J].哈尔滨医药,2014,34(5):316-317.

[4] 刘鹏飞,姬舒荣.血清胸苷激酶 1 在恶性肿瘤筛查和复发转移监测中的研究进展[J].中华临床医师杂志,2013,7(23):10858-10860.

[5] 周菊英,姚怡敏,俞志英,等.血清胸苷激酶 1 在恶性肿瘤诊断和疗效评估中的意义[J].江苏医药,2012,38(9):1055-1058.

[6] 吕钰.浅谈医学检验分析前质量保证[J].临床检验杂志,2007,25(6):468.

[7] 丛玉隆.临床实验室分析前质量管理及对策[J].中华检验医学杂志,2004,27(8):483-487.

[8] 曾胜娟.检验前的质量控制分析[J].实用医技杂志,2011,18(2):196.

[9] 樊鹏威.加强分析前质量控制保证检验质量[J].国际检验医学杂志,2014,35(5):650-652.

[10] 张兴华,杨金荣,付筱英,等.血清胸苷激酶 1 对癌前疾病的癌变风险筛查的意义[J].中华健康管理学杂志,2010,4(1):35-38.

[11] He E, Xu XH, Guan H, et al. Thymidine kinase 1 is a potential marker for prognosis and monitoring the response to treatment of patients with breast, lung, and esophageal cancer and non Hodgkins lymphoma[J]. Nucleosides Nucleic Acids, 2010,29(4/6):352-358. (下转第 3350 页)

发现 HBsAb(+) 的 NHL 患者无一例发生 HBV 再激活,可能与 HBsAb 通过体液免疫方式减少 HBV 感染机会从而减少 NHL 发生有关^[10]。本研究中 NHL 患者的 HBsAb 阳性率为 45.3%,明显低于肺癌患者和健康体检者,而其中 T 细胞型明显高于 B 细胞型(58.2% vs. 38.8%),提示 HBV 阳性的患者可能因为缺乏 HBsAb 的保护而免疫力减弱,以致于更容易罹患 NHL。

“大三阳”[HBsAg(+), HBeAg(+), 及 HBeAb(+)]和“小三阳”[HBsAg(+), HBeAb(+), 及 HBeAb(+)]通常提示 HBV 的慢性感染,而 HBsAg(-) 伴 HBeAb(+) 则提示了 HBV 的隐匿性感染。若患者病毒滴度较低或是急性感染窗口期时,HBsAg 可能检测不出,但可以检测出 HBeAb,其是 HBV 感染后血清中最早出现的标志抗体,且持续时间较长。HBsAg(-) 伴 HBeAb(+) 的 HBV 隐匿性感染在 NHL 患者中发生率较高^[11],本研究中隐匿性感染[HBsAg(-) HBeAb(+)]发生率约为 12.4%,高于健康体检者。HBV DNA 载量主要反映了 HBV 复制的活跃程度,Chen 等^[12]发现隐匿性感染的 NHL 患者 HBV DNA 阳性率为 6.0%,明显高于其他肿瘤患者和健康人群(分别为 0.0% 和 0.9%)。本研究 25 例隐匿性感染的 NHL 患者中 HBV DNA 阳性率为 4.0%,因此 NHL 患者中 HBV 隐匿性感染的现状应引起足够重视。

NHL 患者多存在细胞免疫功能抑制,以联合化疗或免疫化疗为主的治疗方案会进一步抑制免疫功能,因此 NHL 合并 HBV 的患者在化疗后容易发生强烈的免疫功能抑制,引起 HBV 再燃从而造成肝功能的严重损害,甚至导致暴发性肝炎而死亡^[13]。因此建议在免疫化疗之前常规检测 HBV DNA,及时发现 HBV 感染者和携带者,早期应用抗 HBV 治疗更有效,治疗期间应严密监测病毒复制及肝功能变化情况,将更有利于降低 NHL 治疗过程中 HBV 再燃的风险。

综上所述,本研究反映了 NHL 与 HBV 存在一定相关性,但不能反映 NHL 和 HBV 之间的因果关系。HBV 是 NHL 致病因素之一还是因为 NHL 患者免疫力低下易感染 HBV,两者之间的因果关系尚需要进一步研究。本研究因样本量较少,可能存在资料偏倚、未能反映 HBeAg 差异等不足,后续研究将进一步探究 HBV 感染在 NHL 发生、发展过程中所起的作用。

参考文献

[1] 周乙华,吴超,庄辉,等. 接种乙肝疫苗:中国的经验[J]. 中华医学杂志:英文版,2009,122(1):98-102.
[2] Marcucci F, Mele A, Spada E, et al. High prevalence of hepatitis B virus infection in B-cell non-Hodgkin's lym-

phoma[J]. Haematologica,2006,91(4):554-557.
[3] 黄燕华,杨晟,石远凯,等. 感染 HBV 的弥漫大 B 细胞淋巴瘤患者临床特征与预后分析[J]. 癌症进展,2012,10(3):289-295.
[4] Goldman L, Ezzat S, Mokhtar N, et al. Viral and non-viral risk factors for non-Hodgkin's lymphoma in Egypt: heterogeneity by histological and immunological subtypes[J]. Cancer Causes Control,2009,20(6):981-987.
[5] Anderson LA, Pfeiffer R, Warren JL, et al. Hematopoietic malignancies associated with viral and alcoholic hepatitis [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2008, 17(11): 3069-3075.
[6] Wang F, Xu RH, Han B, et al. High incidence of hepatitis B virus infection in B-cell subtype non-Hodgkin lymphoma compared with other cancers [J]. Cancer, 2007, 109(7):1360-1364.
[7] 秦鑫添,吕跃,陈晓勤,等. HBV 感染与非霍奇金淋巴瘤的关系[J]. 癌症,2007,26(3):294-297.
[8] Wang F, Xu RH, Luo HY, et al. Clinical and prognostic analysis of hepatitis B virus infection in diffuse large B-cell lymphoma[J]. BMC Cancer,2008,8:115-118.
[9] Park SC, Jeong H, Kim J, et al. High Prevalence of hepatitis B virus infection in patients with B-cell non-Hodgkin's lymphoma in Korea [J]. J Med Virol, 2008, 80(6): 960-966.
[10] 赵莹,王巍,林秀强,等. HBsAg(-) 伴 HBeAb(+) 淋巴瘤患者免疫化疗后肝炎病毒再激活临床观察[J]. 中国癌症杂志,2012,22(4):312-313.
[11] 林雯,林英城,王鸿彪,等. 乙型肝炎病毒感染与 B 细胞型非霍奇金淋巴瘤的关系[J]. 肿瘤研究与临床,2012,24(1):28-30.
[12] Chen MH, Hsiao LT, Chiou TJ, et al. High prevalence of occult hepatitis B virus infection in patients with B cell non-Hodgkin's lymphoma [J]. Ann Hematol, 2008, 87(6):475-480.
[13] Mimura N, Kojima H, Tsujimura H, et al. Prevention of hepatitis B virus reactivation in B-cell lymphoma patients receiving chemotherapy with rituximab [J]. Rinsho Ketsueki,2010,51(3):213-215.

(收稿日期:2015-04-16 修回日期:2015-09-02)

(上接第 3347 页)

[12] 郭丽香,刘树业. 胸苷激酶 1-新型的细胞增殖动力学标志 [J]. 哈尔滨医药,2014,34(5):316-317.
[13] 刘鹏飞,姬舒荣. 血清胸苷激酶 1 在恶性肿瘤筛查和复发转移监测中的研究进展[J]. 中华临床医师杂志,2013,7(23):10858-10860.
[14] Holdenrieder S, von Pawel J, Duell T, et al. Clinical relevance of thymidine kinase for the diagnosis, therapy moni-

toring and prognosis of non-operable lung cancer[J]. Anticancer Res,2010,30(5):1855-1862.
[15] Topolcan O, Holubec L Jr. The role of Thymidine kinase in cancer disease[J]. Expert Opin Eed Diagn,2008,2(2): 129-141.

(收稿日期:2015-03-12 修回日期:2015-09-12)