

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2022.23.012

血液标本处理方式对 IL-6、IL-10、IFN- γ 和 IL-2 检测结果的影响*

朱钰力¹, 谈运长², 汪红¹, 毛卫未¹, 周会祥¹, 胡志坚¹, 徐炜^{1 Δ}

九江学院附属医院:1. 检验科;2. 胃肠外科, 江西九江 332000

摘要:目的 探讨血液标本不同处理方式对血浆细胞因子检测结果的影响。方法 收集于该院就诊的 30 例志愿者血液标本, 分析不同温度下保存、强力处理后导致轻度溶血及反复冻融对全血或血浆标本细胞因子[白细胞介素(IL)-6、IL-10、干扰素(IFN)- γ 和 IL-2 水平]检测结果的影响。**结果** 全血或血浆在室温(25 °C)下保存 12 h, IL-6、IL-10、IFN- γ 和 IL-2 水平明显下降, 差异均有统计学意义($P < 0.05$); 然而, 全血或血浆在 4 °C 保存时细胞因子有较好的稳定性。强力处理后导致轻度溶血及 3 次冻融对细胞因子水平无明显影响。**结论** 全血采集后应尽快离心成血浆, 并在冷藏下保存, 如果在室温下保存, 血液标本应在抽取后 6 h 内进行处理; 如果在 4 °C 下储存, 血液标本应在抽取后 24 h 内进行处理。

关键词:血液标本; 处理方式; 细胞因子; 白细胞介素; 干扰素

中图分类号:R446.1

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2022)23-3213-04

Effect of blood sample treatment on the results of IL-6, IL-10, IFN- γ and IL-2*

ZHU Yuli¹, TAN Yunchang², WANG Hong¹, MAO Weiwei¹,

ZHOU Huixiang¹, HU Zhijian¹, XU Wei^{1 Δ}

1. Department of Clinical Laboratory; 2. Gastrointestinal Surgery, Affiliated Hospital of Jiujiang University, Jiujiang, Jiangxi 332000, China

Abstract: Objective To investigate the effect of different treatment methods on plasma cytokine detection. **Methods** Blood samples were collected from 30 volunteers in our hospital. The effects of mild hemolysis and repeated freezing and thawing on the levels of cytokines interleukin (IL)-6, IL-10, interferon (IFN) - γ and IL-2 in whole blood or plasma samples were analyzed. **Results** The levels of IL-6, IL-10, IFN- γ and IL-2 in whole blood or plasma were significantly decreased after 12 h storage at room temperature ($P < 0.05$). However, the cytokine stability was better when the whole blood or plasma was stored at 4 °C. Strong treatment resulted in mild hemolysis and three times of freeze-thaw treatments had no significant effect on cytokine levels. **Conclusion** Whole blood should be centrifuged into plasma as soon as possible after collection and stored in cold storage. If stored at room temperature, blood samples should be processed within 6 h after extraction. If stored at 4 °C, blood sample should be processed within 24 h of extraction.

Key words: blood specimen; treatment mode; cytokine; interleukin; interferon

血液中细胞因子是诊断疾病、监测治疗反应和疾病进展的重要生物标志物^[1-4]。然而, 血液中的细胞因子往往呈低水平状态, 标本处理对血浆细胞因子检测结果会产生重大的影响^[5]。有研究显示, 在血浆从全血分离之前, 白细胞可以在体外继续分泌细胞因子并改变其在血浆中的水平^[6]。此外, 血小板活化可能伴有细胞因子的释放, 可能导致血浆中细胞因子水平明显升高^[6]; 细胞因子的稳定性也可能对检测结果产生重大的影响, 如一些细胞因子的半衰期特别短, 温

度不稳定, 容易被蛋白降解^[7]。因此, 探讨合适的血浆细胞因子检测的标本处理方法具有重要的意义。

1 资料与方法

1.1 血液标本的采集 本研究使用的血液标本来自本院就诊的 30 例志愿者, 本研究中的血液离心均为室温下 3 000 r/min 离心 20 min。每位志愿者的全血标本被分装到 1~7 号乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝管中, 其中 1 号试管全血标本被采集后立即 3 000 r/min 离心 20 min, 取血浆 0.5 mL, 并检测血浆中白细胞介

* 基金项目:江西省教育厅科学技术研究项目(GJJ190939)。

作者简介:朱钰力,女,主管技师,主要从事骨髓细胞形态学的研究。 Δ 通信作者, E-mail: xuwei@163.com。

素(IL)-6、IL-10、 γ 干扰素(IFN- γ)和 IL-2 水平,作为对照组,2~6 号试管的血液标本根据实验要求给予不同的处理。所有志愿者签署知情同意书,该研究得到了九江学院附属医院伦理委员会的批准。

1.2 方法

1.2.1 全血在室温(25 °C)或 4 °C 保存下的处理方法 为检测在室温或 4 °C 保存下全血中细胞因子的稳定性,每位志愿者的 2 号试管全血于室温下保存,3 号试管全血于 4 °C 下保存,保存 6、12、24 h 后取出部分全血,离心取血浆,检测血浆中的 IL-6、IL-10、IFN- γ 和 IL-2 水平。

1.2.2 血浆在室温或 4 °C 保存下的处理方法 为检测在室温或 4 °C 保存下血浆中细胞因子的稳定性,每位志愿者的 4、5 号试管全血采集后立即离心收集血浆,血浆分别于室温或 4 °C 保存,保存 6、12、24 h 后取出血浆 0.5 mL,并检测 IL-6、IL-10、IFN- γ 和 IL-2 水平。

1.2.3 强力处理导致轻度溶血的处理方法 为检测强力处理后全血细胞因子的稳定性,每位志愿者的 6 号试管全血在 50 cm 的距离左右反复摇动,导致轻度溶血,然后离心收集血浆,检测细胞因子的水平。

1.2.4 反复冻融的处理方法 为检测冻融对本细胞因子的影响,每位志愿者的 7 号试管全血采集后立即离心收集血浆,然后于-80 °C 冰冻,每 8 小时将血浆在室温下解冻 1 h 后再次冷冻,该过程连续重复 3 次,然后测定血浆中 IL-6、IL-10、IFN- γ 和 IL-2 的

水平。

1.2.5 血浆细胞因子的检测方法 人 Th1/Th2/Th17 亚群检测试剂盒购自江西赛基生物技术有限公司,采用 BD FACSCanto II 流式细胞仪按配套试剂盒标准操作流程检测血浆中的细胞因子(IL-6、IL-10、IFN- γ 和 IL-2)水平。

1.3 统计学处理 采用 GraphPad Prism 7.0 软件对数据进行统计分析,并绘制相应图表,呈非正态分布的计量数据以 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示,采用非参数检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 全血在室温或 4 °C 保存下细胞因子的稳定性 与保存前比较,全血在室温保存下 4 种细胞因子水平均有所下降,特别是保存 12 h 时,差异有统计学意义($P < 0.05$);全血在 4 °C 保存时,4 种细胞因子有较好的稳定性,当保存 6、12 h 时,4 种细胞因子水平均较稳定,与保存前比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);当保存 24 h 时,IL-6、IFN- γ 与保存前比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 血浆在室温或 4 °C 保存下细胞因子的稳定性 血浆在常温下保存 12 h,4 种细胞因子较保存前明显下降,差异有统计学意义($P < 0.05$);血浆在 4 °C 下保存有较好的稳定性,当保存 24 h 时,IFN- γ 、IL-2 水平较保存前下降,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

表 1 全血在室温(25 °C)或 4 °C 保存下细胞因子的稳定性 [$n=30, M(P_{25}, P_{75}), \text{pg/mL}$]

指标	保存前	室温(25 °C)保存		4 °C 保存		
		6 h	12 h	6 h	12 h	24 h
IL-6	8.6(5.0, 22.6)	8.6(5.1, 21.6) ^a	7.7(4.5, 20.3) ^a	8.6(4.8, 22.3)	8.5(4.7, 21.2)	8.2(4.8, 21.9) ^a
IL-10	2.8(2.3, 4.5)	2.7(2.2, 4.2) ^a	2.5(1.9, 4.3) ^a	2.7(2.3, 4.6)	2.6(2.2, 4.7)	2.6(2.1, 4.2)
IL-2	2.4(1.8, 5.8)	2.2(1.8, 5.9)	1.9(1.3, 5.3) ^a	2.2(1.7, 5.6)	2.4(1.8, 5.5)	2.3(1.6, 5.4)
IFN- γ	4.5(3.9, 5.4)	4.5(3.7, 5.4)	4.0(3.2, 5.3) ^a	4.3(3.8, 5.1)	4.5(3.9, 5.4) ^a	4.3(3.5, 5.4) ^a

注:与保存前比较,^a $P < 0.05$ 。

表 2 血浆在室温(25 °C)或 4 °C 保存下细胞因子的稳定性 [$n=30, M(P_{25}, P_{75}), \text{pg/mL}$]

指标	保存前	室温(25 °C)保存		4 °C 保存		
		6 h	12 h	6 h	12 h	24 h
IL-6	8.6(5.0, 22.6)	8.2(4.8, 21.7) ^a	7.7(4.5, 20.3) ^a	8.3(4.8, 21.7)	8.7(4.8, 21.9)	8.4(4.8, 22.3)
IL-10	2.8(2.3, 4.5)	2.6(2.1, 3.6)	2.4(1.8, 3.0) ^a	2.7(2.2, 4.4)	2.5(2.1, 4.2)	2.7(2.1, 4.2)
IL-2	2.4(1.8, 5.8)	2.2(1.6, 4.8)	1.8(1.5, 4.5) ^a	2.4(1.8, 5.6)	2.3(1.8, 5.5)	2.4(1.8, 5.2) ^a
IFN- γ	4.5(3.9, 5.4)	4.5(3.9, 5.4)	4.2(3.5, 5.4) ^a	4.4(3.9, 5.4)	4.5(3.8, 5.4)	4.4(3.7, 5.3) ^a

注:与保存前比较,^a $P < 0.05$ 。

2.3 强力处理或反复冻融后全血细胞因子的稳定性

与保存前比较,强力处理或反复冰融后血浆 4 种细

胞因子 IL-6、IL-10、IFN- γ 和 IL-2 水平差异均无统计学意义($P > 0.05$)。见表 3。

表 3 强力处理或反复冻融后全血细胞因子的稳定性
[$n = 30, M(P_{25}, P_{75}), \text{pg/mL}$]

指标	保存前	强力处理	反复冻融
IL-6	8.6(5.0,22.6)	8.7(4.8,22.3)	8.7(4.8,22.3)
IL-10	2.8(2.3,4.5)	2.8(2.3,4.6)	2.8(2.2,4.9)
IL-2	2.4(1.8,5.4)	2.4(1.8,5.9)	2.4(1.8,5.6)
IFN- γ	4.5(3.9,5.4)	4.4(3.9,5.2)	4.3(3.6,5.4)

3 讨论

细胞因子包括 IL、IFN、生长因子、趋化因子家族、肿瘤坏死因子、集落刺激因子、转化因子家族及其他^[8]。众多细胞因子在体内通过旁分泌、自分泌或内分泌等方式发挥作用,具有高效性、协同性、拮抗性等多种生理特性,形成了十分复杂的细胞因子调节网络,参与人体多种重要的生理功能^[9]。多项研究显示,血液中细胞因子表达水平变化具有重要的生物学意义,使其成为诊断疾病、监测治疗反应和疾病进展的重要生物标志物^[10-13]。

汪廉等^[10]研究显示, Th2 类细胞因子是毛细支气管炎炎严重程度的影响因素, IL-35 及 Th2 类细胞因子可用于辅助判断毛细支气管炎的严重程度。SINGH 等^[11]通过对 PubMed、Medline 和 Google Scholar 数据库进行检索,对 19 篇符合纳入标准的文章进行系统分析,结果显示患者血液中细胞因子水平可能是前列腺癌急性放射治疗诱导毒性的预测生物标志物,以及肿瘤组织中细胞因子的过度表达可能成为前列腺癌患者临床预后的独立预测指标。GUNAWARDENE 等^[12]的一项 Meta 分析也显示,多种细胞因子综合评分有可能成为结直肠癌的预后指标。

一方面,全血含有可以分泌细胞因子的白细胞,这可能导致细胞因子水平升高;另一方面,淋巴细胞来源的可溶性受体结合可能导致细胞因子水平降低^[14]。全血中细胞因子的降解或不稳定也可能导致细胞因子水平下降。在本研究中,全血在室温或 4 $^{\circ}\text{C}$ 下储存 6、12 或 24 h 后,检测其 IL-6、IL-10、IFN- γ 和 IL-2 水平,结果显示,与保存前比较,全血在室温下保存 12 h,4 种细胞因子的水平均显著下降($P < 0.05$);全血在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存时,4 种细胞因子水平相对稳定,当保存 24 h 时,仅有 IL-6、IFN- γ 水平较保存前明显下降($P < 0.05$)。这提示在室温下储存全血可能影响细胞因子的测量结果。

本研究进一步评估了血浆在室温或 4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存

下的细胞因子稳定性。结果显示,血浆 4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存,血浆中 IL-6、IL-10、IFN- γ 和 IL-2 的稳定性较好。因此,为了防止由于标本处理方式而导致的细胞因子测量的变化,全血采集后尽快离心成血浆,并在冷藏下保存。

在临床实验室中,血液标本常常是通过人工或运输系统送到临床实验室。在运输过程中,血液标本受到不同的气压、加速、减速和振动的影响,细胞因子水平可能发生变化。本研究通过左右反复摇摆模拟强力处理导致轻度溶血,然后检测血浆 IL-6、IL-10、IFN 和 IL-2 水平,结果显示,保存前和强力处理或反复冻融后细胞因子水平变化差异无统计学意义($P > 0.05$)。在实际工作中,有些冰冻的标本可能需要再次检测,研究结果显示,当血浆标本经过 3 次冻融后,IL-6、IL-10、IFN- γ 和 IL-2 水平是相对稳定的。

全血采集后应尽快离心成血浆,并在冷藏下保存,如果在室温下保存,血液标本应在抽取后 6 h 内进行处理;如果在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存,血液标本应在抽取后 24 h 内进行处理。

参考文献

- [1] 斯琴,皇甫建,肖瑞. 炎性细胞因子作为早期生物标志物预测糖尿病肾病的研究进展[J]. 世界最新医学信息文摘,2019,19(8):67-69.
- [2] 周盈,曹磊,平芬. 慢性阻塞性肺疾病相关炎性细胞因子的研究进展[J]. 临床荟萃,2020,35(3):273-276.
- [3] 江南静,雷勋明,庞英,等. T 淋巴细胞联合血浆细胞因子诊断儿童 ITP 的研究[J]. 重庆医学,2022,51(3):398-401.
- [4] 刘薇,张梦,徐欣,等. 细胞因子对继发性噬血细胞综合征和重型肝炎合并感染具有早期鉴别意义[J]. 内科急危重症杂志,2022,28(1):24-27.
- [5] LIU C, CHU D, KALANTAR-ZADEH K, et al. Cytokines: from clinical significance to quantification[J]. Adv Sci, 2021, 8(15): e2004433.
- [6] SIMPSON S, KAISLASUO J, GULLER S, et al. Thermal stability of cytokines: a review[J]. Cytokine, 2020, 125: 154829.
- [7] AZIZ N, DETELS R, QUINT J J, et al. Stability of cytokines, chemokines and soluble activation markers in unprocessed blood stored under different conditions[J]. Cytokine, 2016, 84: 17-24.
- [8] CHAUHAN P, NAIR A, PATIDAR A, et al. A primer on cytokines[J]. Cytokine, 2021, 145: 155458.
- [9] STENKEN J A, POSCHENRIEDER A J. Bioanalytical chemistry of cytokines: a review[J]. Analytica Chimica Acta, 2015, 853: 95-115.

有研究认为, JAK2/STAT3 信号通路与肝纤维化密切相关, HSC 的活化是肝纤维化进程关键的关键因素^[2,5-6], HSC 膜上特异性受体亚单位与血小板源生长因子、瘦素、转化生长因子 β 等促肝纤维化细胞因子发生同源或异源寡聚化后, 从而使与受体偶联的 JAKs 被激活, 继而使受体细胞质段的酪氨酸磷酸化为含 SH2 的蛋白停泊位点, 下游信号蛋白分子被激活使靶基因发挥作用, STAT 蛋白末端的酪氨酸残基 (Tyr705)、丝氨酸残基 (Ser727) 同时可被 JAKs 诱导而发生磷酸化, 进而激活 STATs 蛋白, 形成同源或异源 STATs 蛋白二聚体进入细胞核结合相应靶基因的启动子, 从而使靶基因转录活化 HSC, 参与肝纤维化发生、发展^[5,10-11]。本研究结果显示, 肝纤维化模型组肝组织 p-JAK2/JAK2、p-STAT3/STAT3 蛋白较空白对照组明显升高, 提示 DMN 所诱导大鼠肝纤维化过程中大鼠肝组织 JAK2/STAT3 信号通路活化, 参与了肝纤维化的发生、发展过程; TFL 组 p-JAK2/JAK2、p-STAT3/STAT3 较空白对照组降低, 提示 TFL 可抑制 JAK2/STAT3 信号通路。因此, 笔者认为 JAK2/STAT3 至少部分参与了肝纤维化的形成, TFL 可能通过抑制转录因子 JAK2/STAT3 而发挥抗肝纤维化作用。

TFL 对 DMN 诱导的肝纤维化具有较好的治疗作用, 有可能逆转肝纤维化, 其机制可能与抑制 JAK2/STAT3 蛋白的表达, 阻断 JAK2/STAT3 信号通路的信号传导有关, 但肝纤维化的形成机制极其复杂, TFL 抗肝纤维化的作用机制仍需进一步深入研究。

参考文献

[1] EZHILARASAN D. Oxidative stress is bane in chronic liver diseases: clinical and experimental perspective[J]. Arab J Gastroenterol, 2018, 19(2): 56-64.
 [2] OKAZAKI I, WATANABE T, HOZAWA S, et al. Reversibility of hepatic fibrosis: from the first report of col-

lagenase in the liver to the possibility of gene therapy for recovery[J]. Keio J Med, 2001, 50(2): 58-65.

[3] LEE Y A, WALLACE M C, FRIEDMAN S L. Pathobiology of liver fibrosis: a translational success story[J]. Gut, 2015, 64(5): 830-841.
 [4] 罗伟生, 欧士钰, 靳雅玲, 等. 荔枝核总黄酮抗大鼠肝纤维化的作用及其对核转录因子- κ B p65 表达的影响[J]. 广东医学, 2012, 33(21): 3201-3204.
 [5] HUANG W, JI R, GE S, et al. MicroRNA-92b-3p promotes the progression of liver fibrosis by targeting CREB3L2 through the JAK/STAT signaling pathway [J]. Pathol Res Pract, 2021, 219: 153367.
 [6] YANG L, HAN B, ZHANG M, et al. Activation of BK channels prevents hepatic stellate cell activation and liver fibrosis through the suppression of TGF β 1/SMAD3 and JAK/STAT3 profibrotic signaling pathways [J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 165.
 [7] ALA-KOKKO L, PIHLAJANIEMI T, MYERS J C, et al. Gene expression of type I, III and IV collagens in hepatic fibrosis induced by dimethylnitrosamine in the rat [J]. Biochem J, 1987, 244(1): 75-79.
 [8] 吕艳杭, 吴姗姗, 王振常, 等. 肝纤维化动物模型造模方法的研究进展[J]. 广西医学, 2020, 42(7): 875-878.
 [9] 肖绪华, 赵永忠, 曹杰. 荔枝核总黄酮对肝纤维化大鼠转化生长因子及核因子 κ B 表达的影响[J]. 华夏医学, 2019, 32(3): 11-15.
 [10] TANG L Y, HELLER M, MENG Z, et al. Transforming growth factor- β (TGF- β) directly activates the JAK1-STAT3 axis to induce hepatic fibrosis in coordination with the SMAD pathway [J]. J Biol Chem, 2017, 292(10): 4302-4312.
 [11] HUI J, GAO J, WANG Y, et al. Panax notoginseng saponins ameliorates experimental hepatic fibrosis and hepatic stellate cell proliferation by inhibiting the Jak2/Stat3 pathways [J]. J Tradit Chin Med, 2016, 36(2): 217-224.

(收稿日期: 2022-04-06 修回日期: 2022-09-15)

(上接第 3215 页)

[10] 汪廉, 孙明月, 彭万胜. 毛细支气管炎患儿血清 IL-35、Th2 类细胞因子水平变化及其意义[J]. 山东医药, 2022, 62(3): 20-24.
 [11] SINGH J, SOHAL S S, LIM A, et al. Cytokines expression levels from tissue, plasma or serum as promising clinical biomarkers in adenocarcinoma of the prostate: a systematic review of recent [J]. Ann Trans Med, 2019, 7(11): 245.
 [12] GUNAWARDENE A, DENNETT E, LARSEN P. Prognostic value of multiple cytokine analysis in colorectal cancer:

a systematic review [J]. J Gastrointest Oncol, 2019, 10(1): 134-143.

[13] 黄晓东, 蔺际, 杜鹏辉, 等. 高脂血症性急性胰腺炎 T 淋巴细胞亚群和细胞因子的变化及意义[J]. 中华急诊医学杂志, 2022, 31(1): 92-97.
 [14] TURNER M D, NEDJAI B, HURST T, et al. Cytokines and chemokines: at the crossroads of cell signalling and inflammatory disease [J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1843(11): 2563-2582.

(收稿日期: 2022-03-28 修回日期: 2022-09-15)