

• 论 著 •

血清三酰甘油自主研发生化诊断试剂的临床研究*

贾雄飞¹, 王惠莹^{1△}, 唐建国², 李雪梅¹, 滕毅¹, 佘文婕¹, 夏正武¹

(1. 中国人民解放军昆明总医院检验科, 昆明 650032; 2. 中生北控生物技术有限公司, 北京 102200)

摘要:目的 进行自主研发的血清三酰甘油(TG)生化诊断试剂的临床研究。方法 自主研发血清 TG 生化诊断试剂自身的性能评价试验包括空白吸光度、重复性和线性检测。与进口优质 TG 生化诊断试剂进行对比和偏倚评估。结果 自主研发血清 TG 生化诊断试剂空白吸光度、重复性和线性检测符合要求;与进口生化诊断试剂具有良好的相关性。结论 自主研发的 TG 生化诊断试剂自身性能良好,安全性和有效性符合临床应用要求。

关键词:血清; 甘油三酰类; 指示剂和试剂; 生物医学研究

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.03.007

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)03-0301-02

Clinical research of serum triglyceride biochemistry diagnosis reagent of independent research and development*

Jia Xiongfei¹, Wang Huixuan^{1△}, Tang Jianguo², Li Xuemei¹, Teng Yi¹, She Wenjie¹, Xia Zhengwu¹

(1. Kunming General Hospital, Kunming 650032, China; 2. Biosino Bio-Technology and Science Inc., Beijing 102200, China)

Abstract: Objective To evaluate the performance of independent research and development serum triglyceride(TG) biochemistry diagnosis reagent. Methods Evaluate the performance of independent research and development serum triglyceride biochemistry diagnosis reagent; measures blank absorbance, repeatability and linearity. To evaluate contrast and bias of two reagents in accordance with EP9-A2. Results Blank absorbance, repeatability and linearity of independent research and development serum TG the biochemistry diagnosis reagent are up to the mustard. Conclusion The independent research and development TG biochemistry diagnosis reagent is security, effective and meets the clinical practice requirement.

Key words: serum; triglycerides; indicators and reagents; biomedical research

中国是人口大国, 医疗市场需求也是巨大的, 生物化学试剂的国产化, 将结束国外企业对中国体外诊断试剂市场的垄断, 而国产试剂的广泛使用也会进一步降低医疗成本, 为人民群众提供更加优质的医疗服务。本研究采用进口生化诊断试剂和自主研发的 TG 生化诊断试剂, 对临床血清 TG 的检测结果进行分析和比对研究, 并对自主研发生化诊断试剂的性能进行了研究, 现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 标本 收集本院日常进行血清三酰甘油(triglyceride, TG)检测的新鲜、无溶血、无黄疸患者血清标本, 剔除测定值在定量范围 1.13~11.29 mmol/L 之外的标本。在小于或等于 1.71 mmol/L 范围内选择 54 例标本, 大于 1.71 mmol/L 范围内选择 46 例标本, 其中男性 53 例, 女性 47 例, 年龄 1~89 岁。

1.2 仪器及试剂 采用日本 Olympus AU5421 自动生化分析仪检测血清 TG。对照试剂(X)为 Olympus TG 生化诊断试剂(批号 LOT 7880), 酶法配套校准品(批号 LOT 0113), 配套质控品水平 1(批号 LOT 50025 2010-06-01), 水平 2(批号 LOT 0026 2010-06-01)。受试试剂(Y)为中生 TG 生化诊断试剂(批号 LOT 090091), 酶法配套校准品(批号 LOT 08011), 配套质控品水平 1 与水平 2 批号均为 LOT 090081 201008)。

1.3 方法 由专业技术人员严格按照本室的标准操作规程进行试验^[1-3]。每天选取高、中、低值临床血清标本各 10 例, 分别用 2 种诊断试剂以 1~10、10~1 号的顺序进行血清 TG 测定, 检测在 2 h 内完成, 重复 10 d, 共检测 100 例标本。

1.4 统计学处理 受试试剂(Y)自身性能研究数据应用统计学软件 SPSS13.0 进行分析, 2 种诊断试剂对血清 TG 测定结果的统计分析在 Excel 2003 上进行。

2 结果

2.1 受试试剂(Y)自身性能评价结果 以纯水为样本, 在波长 505 nm(光径 1 cm)处检测受试试剂(Y)的空白吸光度, 2 次检测结果分别是 0.051 4、0.053 5, 均小于 0.100, 符合诊断试剂的设计要求。用受试试剂(Y)重复测定 2 个浓度水平的血清样品各 20 次, 重复测定结果的变异系数(CV)均小于或等于 4%, 表明受试试剂(Y)的重复性符合设计要求。受试试剂(Y)的定量范围为 1.13~11.29 mmol/L, 用生理盐水将接近定量范围上限的高浓度人血清样品, 按比例稀释成 7 个浓度, 分别测定每个浓度样品, 重复测定 3 次, 对测定数据进行多项式拟合, 结果为一级曲线, 说明此试剂的线性呈一阶线性。

2.2 2 种试剂临床比对和偏倚评估结果

2.2.1 2 种试剂测定均值 2 种试剂对血清 TG 测定结果的均值均为 2.70 mmol/L, 无统计学意义差异($P > 0.05$)。

2.2.2 方法内重复性检查 对照试剂(X)2 次测定值的标准化值的均值为 0.006 1, 受试试剂(Y)2 次测定值的标准化值的均值为 0.010 2, 说明 2 种试剂检测结果的重复性好, 符合相关性试验要求。

2.2.3 离群点检查 进行了 2 种方法之间的绝对偏差、相对偏差, 2 种方法之间绝对偏差的平均值、相对偏差的平均值计算, 结果显示无离群点存在。

* 基金项目: 国家高技术研究发展计划(863 计划)重点课题(2006AA020901)。△ 通讯作者, E-mail: dywang43@163.com。

2.2.4 线性回归及偏倚分析结果 Excel 2003 线性回归显示, $r=0.999\ 5$, 满足 EP9-A2 文件 $r \geq 0.975$ (或 $r^2 \geq 0.95$) 的要求。继而和数据进行分组分析和趋势线分析, 结果见图 1~4。图 1 显示受试试剂(Y)平均值与对照试剂(X)平均值线性关系良好; 图 2 显示受试试剂(Y)的单个观测值与对照试剂(X)平均值线性关系良好; 图 3 显示 2 种方法对同一例血清 TG 的测定均值差值较小, 分布较合理; 图 4 显示受试试剂(Y)测定单个值与对照试剂(X)平均值相比偏差较小, 分布较合理。

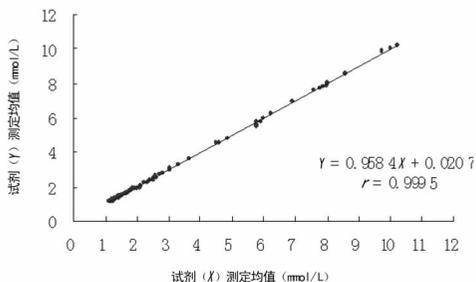


图 1 受试试剂(Y)平均值与对照试剂(X)平均值线性关系

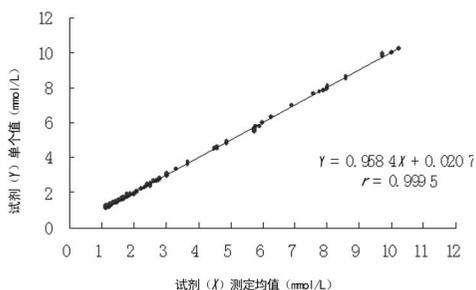


图 2 受试试剂(Y)单个观测值与对照试剂(X)平均值线性关系图

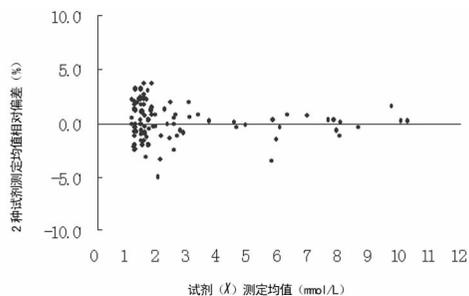


图 3 2 种试剂均值相对偏差的偏置曲线图

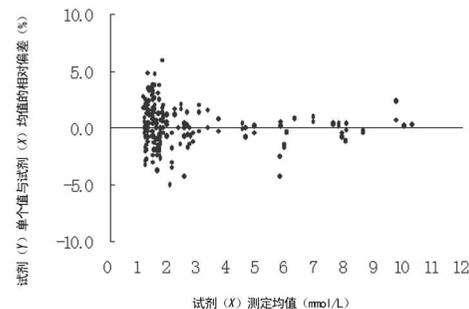


图 4 受试试剂(Y)单个值与对照试剂(X)均值相对偏差的偏置曲线图

2.2.5 系统误差的估计值及其置信区间 根据美国 CLIA'88

允许变异, 受试试剂(Y)与对照试剂(X)的偏倚要求小于 1/2 CLIA'88 允许差, 因此将 TG 的医学决定水平定为 1.81 mmol/L, 计算 2 种试剂之间的系统误差的估计值为 0.814 1, 医学决定水平下的系统误差的 95% 可信区间为 (-0.09, -0.01), 系统误差符合临床要求。

3 讨 论

TG 是机体贮存能量的形式之一, 肝、脂肪组织及小肠是合成 TG 的主要场所, 以肝合成能力最强。健康人空腹时 TG 仅占总脂的 1/4, 主要存在于前 β -脂蛋白和乳糜颗粒中, 直接参与胆固醇的合成。TG 与血栓形成密切相关, 对动脉硬化和冠心病等心血管阻塞性疾病有一定的影响^[4-6]。约有 80% 的心肌梗死患者的 TG 水平增高。另外, TG 水平升高还可见于高脂血症、动脉硬化、肥胖症、阻塞性黄疸、糖尿病、严重贫血、肾病综合征、甲状腺功能减退、胆道梗塞、糖原累积症、妊娠、口服避孕药、急性胰腺炎、长期饥饿、高脂饮食等, 大量饮酒后也可使 TG 假性升高^[9]。血清 TG 是 1 项重要的临床血脂常规测定指标, 主要用于了解机体内 TG 代谢状况、高三酰甘油血症诊断和评价冠心病危险、代谢综合征的诊断及计算 LDL-C 水平等^[10]。

医学实验室目前使用的诊断试剂还严重依赖进口, 为了加大体外诊断试剂的自主研发和创新, 强化产学研相结合的技术创新体系建设, 大幅度提升中国体外诊断试剂的国产能力和国际竞争能力, 本研究进行了自主研发试剂的临床试验评价。自主研发的中生 TG 生化诊断试剂利用脂蛋白酶使 TG 水解成甘油与脂肪酸, 将生成的甘油用甘油激酶及三磷酸腺苷磷酸化, 以磷酸甘油氧化酶氧化甘油-3-磷酸, 产生磷酸二羟丙酮和 H_2O_2 , H_2O_2 再经过氧化物酶、4-氨基安替吡啉与 4-氯酚反应, 生成红色醌亚胺色素, 醌亚胺在 500 nm 左右有最大吸收, 且吸光度与标本中 TG 含量呈正比, 通过在自动生化分析仪上检测试剂 505 nm 处吸光度, 即可测定标本中 TG 浓度^[11-12]。本品为液体双试剂, 开瓶即用, 可应用于全自动生化分析仪, 适用于用健康人和适量病理值血清样本, 能够在检验室进行血清 TG 的体外定量分析。本研究根据《体外诊断试剂临床研究技术指导原则》的要求, 验证了自主研发的血清 TG 生化诊断试剂在临床应用上的适用性和准确性。将自主研发的血清 TG 生化诊断试剂与对照试剂作比较, 采用对照试剂和受试试剂对同一批血清样本进行检测, 比较检测结果, 来验证受试试剂与对照试剂是否实质性等效, 以及是否对临床检测具有同样的安全性和有效性。结果显示受试试剂与对照试剂在临床应用方面具有相同的价值, 且自身性能良好, 安全性和有效性符合临床应用要求。

参考文献

[1] National Committee for Clinical Laboratory Standards. EP9-A2 Method comparison and bias estimation using patient samples [S]. Wayne, PA: NCCLS, 2002, 22(19): 21-22.
 [2] 刘斌剑, 郑淑辉, 胡俊, 等. 不同检测系统生化指标测定结果的偏倚评估与可比性研究[J]. 中华医学杂志, 2007, 31(1): 13-16.
 [3] 沈广虎, 于娜, 王丽娜, 等. 两种三酰甘油测定法的对比研究及偏倚评估[J]. 检验医学, 2007, 22(2): 221-222.
 [4] 顾佳. 空腹甘油三酯及非空腹甘油三酯与妇女心血管事件发生风险之间的关系[J]. 中华医学杂志, 2007, 87(34): 2411.
 [5] 王建国. 非空腹甘油三酯对冠心病的预测价值大(下转第 304 页)

Permeabilization,同时分别加入 10 μL 抗-IFN-γ-PE 及抗-IL-4-PE,室温避光孵育 15 min;同时,设同型抗体对照组,即加入等量 PE 标记的鼠抗人 IgG1 抗体,以去除非特异性染色,并设定检测界限。FACS Calibur 流式细胞仪检测、分析分泌细胞因子 IFN-γ 的 Th1 型细胞和分泌细胞因子 IL-4 的 Th2 型细胞所占的百分比。

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。计量资料比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 2 组外周血 Th1、Th2 型细胞百分比比较 EM 组 Th2 型细胞百分比为 $(0.72 \pm 0.15)\%$,显著高于对照组 $(0.15 \pm 0.07)\%$,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$);EM 组 Th1 型细胞百分比为 $(4.56 \pm 2.01)\%$,显著低于对照组 $(8.74 \pm 1.70)\%$,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.2 EM 组外周血 Th1、Th2 型细胞百分比与临床分期关系比较 EM 组 III ~ IV 期患者外周血中 Th2 型细胞百分比为 $(0.85 \pm 0.17)\%$,明显高于 I ~ II 期 EM 患者 $(0.59 \pm 0.12)\%$,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$);EM 组 III ~ IV 期患者外周血中 Th1 型细胞百分比为 $(4.73 \pm 1.91)\%$,与 I ~ II 期患者 $(4.39 \pm 2.23)\%$ 比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 讨 论

近年来研究表明,机体免疫系统的作用是识别和清除外来和自身衰老物质。机体允许异位的内膜组织在腹腔内种植,表明机体的免疫系统功能异常。因此,EM 免疫学方面的研究已成为近年来的研究热点之一^[4,6]。

在人类细胞免疫系统中,原始 Th 细胞通过克隆,增殖和分化成为效应性亚细胞群,依据其不同的细胞因子分泌谱,Th 细胞可以分为 Th1 和 Th2 型细胞,其中 Th1 型细胞分泌 IFN-γ、IL-2 及 TNF-α 等,参与细胞免疫和迟发型超敏反应,协助 B 细胞产生抗体,在抗细胞内感染和细胞免疫所引起的炎症反应中发挥作用;Th2 型细胞分泌 IL-4、IL-5、IL-10 及 IL-13 等,能协助和促进 B 细胞的增殖和分化,促进抗体的产生,主要参与体液免疫。Th1、Th2 型细胞和细胞因子之间相互作用、相互调节、又相互抑制,它们之间的平衡决定着机体的免疫状态,以维持机体正常的细胞免疫和体液免疫功能,这种平衡一旦被打破,将导致相关疾病的发生^[3]。

本研究通过分析 EM 患者外周血中 Th1、Th2 型细胞百分比来探讨 EM 中 Th 亚群功能变化。结果显示,EM 组外周血中 Th2 型细胞显著高于对照组,而 Th1 型细胞显著低于对照组,并且与疾病的临床分期密切相关,即 EM 组 III ~ IV 期外周血中 Th2 型细胞明显高于 I ~ II 期,但 Th1 型细胞在不同分期 EM 患者中无明显差异。研究结果提示,EM 患者体内存在 Th1 型细胞向 Th2 型细胞漂移的现象,即 EM 患者 Th1 型细胞免疫反应下调而 Th2 型细胞免疫反应相对增强,机体处于 Th2 免疫反应倾向,而且随着疾病的临床分期增高,此漂移现象越明显。Th2 型细胞的相对优势降低了 Th1 型细胞对异物的清除作用,机体允许异位的内膜组织在腹腔内种植。腹腔内种植的内膜组织反过来可以直接或间接方式对 Th1 型细胞产生破坏作用,致使 Th1 型细胞的数量及其细胞因子分泌水平降低,进一步加大 Th1、Th2 型细胞亚群间的功能失衡,加重 EM 的临床症状。

因此,Th1、Th2 型细胞的平衡失调以及它们之间相互作用所致的免疫病理损伤,可能是 EM 发病的重要因素。

参考文献

- [1] 王秀霞,张合龙. 子宫内膜异位症的免疫学发病机制及防治[J]. 中国实用妇科与产科杂志,2007,23(12):906-908.
- [2] 史常旭. 子宫内膜异位症的临床研究现状与展望[J]. 重庆医学,2010,39(2):129-132.
- [3] Wan YY,Flavell RA. How diverse-CD4 effector T cells and their functions[J]. J Mol Cell Biol,2009,1(1):20-36.
- [4] Siedentopf F, Tariverdian N, Rucke M, et al. Immune status, psychosocial distress and reduced quality of life in infertile patients with endometriosis[J]. Am J Reprod Immunol,2008,60(5):449-461.
- [5] Binningham A. The American fertility society revised American fertility society classification of endometriosis[J]. Fertil Steril,1985,43:351-354.
- [6] Podgaec S, Abrao MS, Dias JA, et al. Endometriosis: an inflammatory disease with a Th2 immune response component [J]. Hum Reprod,2007,22(1):1373-1379.

(收稿日期:2010-05-28)

(上接第 302 页)

- 于空腹甘油三酯[J]. 新医学,2003,34(10):652-652.
- [6] 江滨,方向华,刘运海,等. 总胆固醇及甘油三酯与卒中亚型关系的前瞻性研究[J]. 中华心血管病杂志,2010,38(3):268-271.
- [7] 张月红,刘英华,王颀,等. 中长链脂肪酸食用油降低超重甘油三酯患者血脂和低密度脂蛋白胆固醇水平的研究[J]. 中国食品学报,2010,10(2):20-27.
- [8] 王南,董慧,陆付耳,等. 不同体质指数的 2 型糖尿病患者肝脏甘油三酯含量分析[J]. 中国糖尿病杂志,2010,18(2):106-108.
- [9] 贾雄飞,王惠萱,陈忠明,等. 2 种生化试剂测定 ALP 的方法对比

- 及偏差评估[J]. 国际检验医学杂志,2010,31(9):1045-1046.
- [10] 丛玉隆,冯仁丰,陈晓东. 临床实验室管理学[M]. 北京:中国医药科技出版社,2004:111-123.
- [11] 陈文祥. 血清甘油三酯测定的方法学沿革和标准化[J]. 中华检验医学杂志,2008,31(4):476-480.
- [12] 刘浩,刘志高,杨健,等. 高甘油三酯患者凝血纤溶活性的变化及血脂康对其的影响[J]. 中国中西医结合杂志,2008,28(1):35.

(收稿日期:2011-01-06)