

NP, a powerful combination of biomarkers for predicting cardiovascular mortality in elderly patients with heart failure: results from a 10-year study in primary care[J]. Eur J Heart Fail, 2009, 11(4):354-360.

[7] Melanson SE, Lewandrowski EL. Laboratory testing for B-type natriuretic peptides(BNP and NT-proBNP): clinical usefulness, utilization, and impact on hospital operations[J]. Am J Clin Pathol, 2005, 124(Suppl):122-128.

[8] 王兰兰, 蔡蓓, 刘兴斌, 等. N 末端脑型钠尿酸定量检测在心力衰

竭诊断中的价值[J]. 中华检验医学杂志, 2006, 29(1):35-38.

[9] 裴宇容, 杨春莉, 魏东, 等. 血清 NT-proBNP 水平检测在心血管疾病中的诊断价值[J]. 广东医学, 2009, 30(5):773-775.

[10] 潘文志, 巩雪, 周京敏, 等. 心房颤动对不同心功能分级的患者血浆脑钠肽水平的影响[J]. 中华心律失常学杂志, 2009, 13(3):213-216.

(收稿日期:2010-11-20)

• 检验技术与方法 •

尿微量清蛋白时间分辨荧光免疫检测法的建立

李跃松, 黄 颺[△], 朱 岚, 陈永伟, 马智鸿

(江苏省原子医学研究所附属江原医院检验科, 无锡 214063)

摘要:目的 建立尿微量清蛋白(UmALB)的时间分辨荧光免疫分析法(TRFIA)。方法 以羊抗兔 IgG 包被板条, 双功能整合剂异氰酸苄基-二乙三胺四乙酸络合 Eu³⁺ 及标记清蛋白(ALB), 采用竞争法建立 UmALB-TRFIA 检测方法。发光增强系统为以 β-二酮体为主的增强液, 数据采用双对数法数据处理程序。结果 此法的批内和日间 CV 分别为 4.8% 和 5.4%, 平均回收率为 100.93%, 灵敏度为 0.34 μg/mL, 线性范围为 0.34~135 μg/mL。本方法与 β₂-微球蛋白无交叉反应, 血红蛋白浓度小于 4 g/L 时对本方法无干扰, 同放免法比较, 结果相关性好。结论 尿微量清蛋白的时间分辨荧光免疫分析法的敏感度、特异性、准确度等指标符合临床诊断要求。

关键词: 白蛋白类; 荧光免疫测定; 尿

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.12.039

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)12-1348-03

尿微量清蛋白(urinary microalbumin, UmALB)检测是诊断和监测肾脏损伤、糖尿病肾病、心血管疾病和自身免疫性疾病等的主要检测项目^[1-2]。其测定方法较多, 如放射免疫法(radioimmunoassay, RIA)、免疫比浊法(immunoturbidimetry, ITM)、酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)等, 但 RIA 有可能导致环境污染, 且试剂有效期较短; ITM 和 ELISA 线性范围窄、灵敏度不高、受标本基质干扰大。笔者对如何应用时间分辨荧光免疫分析法(time-resolved fluoroimmunoassay, TRFIA)检测 UmALB 进行了分析, 结果报道如下。

1 材料与与方法

1.1 主要试剂、仪器与材料 (1)主要试剂:兔抗人清蛋白抗体(兔抗)和清蛋白(Albumin, ALB)(Biodesign, 美国)、羊抗兔 IgG(华美生物工程公司, 中国)、RIA 试剂盒(中国原子能科学院同位素研究所)、β₂-微球蛋白(β₂-microglobulin, β₂-m)标准品(PekinElmer, 美国)、三价铕(Eu³⁺)标记盒(PekinElmer, 美国)、琼脂糖 CL-6B(Pharmacia, 美国)。(2)主要仪器:AutoDELFLIA-1235 型全自动时间分辨荧光检测仪(PekinElmer, 美国)、FT-630G 型放射免疫分析仪(北京核仪器厂, 中国)、SPINCHRON R CENTRIFUGE 型离心机(Beckman-Coulter, 美国)。(3)标本:60 例本院体检健康者(对照组)和 39 例确诊糖尿病患者晨尿标本(患者组)。

1.2 方法

1.2.1 放射标记 ALB 的制备 参照 Eu³⁺ 标记盒说明书操作。在冻干粉小瓶中按质量比 1:1 加入 ALB 和 EU³⁺-N₂-[P-异氰酸-苄基]二乙三胺四乙酸{Eu³⁺-N₂-[P-fulminic acid-benzyl group] diethylene triamine tetraacetic acid, EU³⁺-DTTA}, 25 °C 磁力搅拌 20 h 后用琼脂糖 CL-6B(1×40 cm)层

析, 280 nm 条件下收集蛋白峰即为 Eu³⁺-ALB, 稀释后分装冻干保存。

1.2.2 增强液的制备 以 β-二酮体(β-Naphthoyltrifluoroacetone, β-NTA)及三辛基氧化膦(trioctylphosphine oxide, TOPO)为主要原料制备增强液, 具体方法见参考文献[3]。

1.2.3 固相抗体的制备 将羊抗兔 IgG 用 50 mmol/L Na₂CO₃-NaHCO₃(pH9.6)缓冲液稀释至 10 mg/L; 按 200 微升/孔加入 96 孔板中, 4 °C 放置过夜; 弃去包被液洗涤 3 次后按 200 微升/孔加入含 3 g/L 牛血清清蛋白的封闭缓冲液, 4 °C 放置过夜; 弃去封闭液真空抽干后-20 °C 保存。

1.2.4 兔抗稀释度选择 将兔抗倍比稀释至 1:100 到 1:3 200, 分别吸取 100 μL 加入含 100 μL 一定浓度 Eu³⁺-ALB 的包被板中, 经温育、洗涤、加增强液振荡反应后荧光检测, 计算抗体-抗原结合率。以兔抗稀释度为横坐标, 结合率为纵坐标, 绘制曲线后确定结合率为 50% 的兔抗稀释度。

1.2.5 测定方法 采用竞争法。在包被微孔板孔中依次加入 25 μL ALB 标准品、β₂-m 标准品或待测标本, 100 μL 已稀释的兔抗及 100 μL 1:60 稀释的 Eu³⁺-ALB, 25 °C 振荡孵育 1.5 h 后用洗涤液洗涤 4 次; 每孔加增强液 200 μL, 振荡反应 5 min 后在 AutoDELFLIA-1235 分析仪上检测各孔荧光强度。

1.2.6 方法学评价试验 (1)精密度:取 ALB 浓度分别为 9.0 和 70.0 μg/mL 的尿液标本, 每份标本平行测定 10 孔或每份标本每 d 测定 1 次, 连续测定 10 d(双孔测定取均值), 计算批内和日间变异系数(coefficient of differentiation, CV)平均值。

(2)特异性:以 β₂-m 标准品配制 0.5~16.0 mg/L 不同浓度系列稀释液, 记录检测结果。(3)回收率:在 3 份 100 μL 新鲜尿标本中分别加入 5 μL 浓度为 100、50、25 μg/mL 的标准液, 检测并计算回收率。(4)干扰试验:取肝素抗凝全血标本以 6.4

[△] 通讯作者, E-mail:jswxhb@163.com.

cm 为离心半径, 3 000 r/min 离心 5 min, 弃去血浆, 剩余红细胞用生理盐水洗涤 5 次后加入蒸馏水制成血红蛋白液, 配制血红蛋白浓度分别为 4.00、2.00、1.00、0.50、0.25 g/L 的血红蛋白溶液, 分别与 ALB 测定值为 25.6 μg/mL 的新鲜尿标本等体积混合后检测 ALB 浓度。(5) 不同方法检测 UmALB 结果比较: 以 RIA 和 TRFIA 同时对对照组和患者组尿标本进行测定, 比较测定结果。

1.3 统计学处理 UmALB-TRFIA 标准曲线由 Auto DELFIA-1235 分析仪自带的双对数函数程序进行分析; 计量资料的比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 时差异有统计学意义。

2 结果

2.1 收集 Eu³⁺-ALB 经琼脂糖 CL-6B 层析后第 1 洗脱峰, 以 PekinElmer 公司提供的 Eu³⁺ 标准为参考, 第 1 洗脱峰 Eu³⁺ 浓度为 0.048 μmol/L, Eu³⁺-ALB 浓度为 0.015 μmol/L, 即平均每个 ALB 分子上可连接 3.2 个 Eu³⁺。ALB 参考标准高点 (100 μg/mL) 与零标准点的取代比为 107.2 (取代比为零标准点与标准高点发光计数值之比, 反映标记抗原和未标记抗原于抗体竞争结合情况), 零点和 100 μg/mL 点的结合率分别为 38.2% 和 0.4%, 说明 Eu³⁺-ALB 免疫反应性基本无损失, 定量分辨率较好。

2.2 UmALB-TRFIA 标准曲线 以参考标准点浓度为横坐标, 对应的发光计数值为纵坐标, 经双对数法处理得到的 UmALB-TRFIA 标准曲线见图 1。

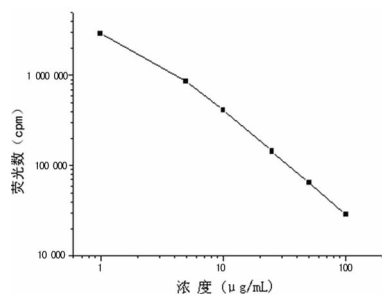


图 1 UmALB-TRFIA 法的测定标准曲线

2.3 灵敏度、线性范围和稳定性 以零标准点 10 次重复测定荧光强度均值 3 058 970 cpm 减 2s (其值为 9 560) 后的荧光强度在标准曲线上得到的相应值为 0.34 μg/mL, 即灵敏度为 0.34 μg/mL。对不同浓度 ALB 溶液进行检测, 测定值和理论值在小于 135 μg/mL 时线性较好, 所以线性范围为 0.34~135 μg/mL。8 条不同时间 (天) 进行测定的 UmALB-TRFIA 标准曲线在结合率为 20%、50%、80% 时所对应的 ALB 浓度均值 ED₂₀、ED₅₀、ED₈₀, 分别为 (12.43 ± 1.21)、(5.075 ± 0.35)、(2.072 ± 0.12) μg/mL。试剂 -20 °C 保存 5 个月 after 测定标本, 其零点发光计数下降小于 15%, CV_{批内} < 10%, 与保存前无明显变化, 说明标记物稳定。

2.4 精密度 UmALB-TRFIA 检测不同浓度尿标本, CV_{批内} 和 CV_{天间} 平均值分别为 4.8%、5.4%。

2.5 特异性 UmALB-TRFIA 检测不同浓度 β₂-m 稀释液, 所测结果均小于 0.34 μg/mL。

2.6 回收率 新鲜尿标本加入浓度为 100、50、25 μg/mL 标准液, 检测并计算回收率分别为 102.76%、101.17%、98.87%, 平均回收率为 100.93%。

2.7 干扰试验 新鲜尿液标本与不同浓度血红蛋白液等体积混合后测定结果见表 1。混合前后测定结果差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 血红蛋白干扰试验

UmALB 基础浓度 (μg/mL)	血红蛋白液浓度 (g/L)	加入干扰物后 UmALB 浓度 (μg/mL)
12.8	0.25	12.10*
12.8	0.50	12.60*
12.8	1.00	12.40*
12.8	2.00	13.30*
12.8	4.00	13.15*

*: $P > 0.05$, 与对应基础浓度比较。

2.8 RIA 与 TRFIA 检测结果比较 以 RIA 和 TRFIA 检测对照组和患者组每位受试对象的同 1 份尿标本, 当 UmALB < 70 μg/mL 时, 两种方法检测结果相关系数为 0.862 ($P < 0.05$); 当 UmALB ≥ 70 μg/mL 时, 相关系数为 0.626 ($P < 0.05$)。

3 讨论

UmALB 在糖尿病肾病、高血压患者肾损伤及其他肾病早期诊断和疗效监测方面具有重要临床价值, 准确、灵敏测定 UmALB 具有重要的临床意义^[4-5]。TRFIA 利用稀土离子荧光半衰期长, 及激发光和发射光之间有一个较大的斯托克斯位移的特点, 能有效提高检测特异性和灵敏度^[6-7]。

TRFIA 检测 UmALB 的 CV_{批内}、CV_{天间} 和平均回收率与文献报道的化学发光免疫分析法 (chemiluminescent immunoassay, CLIA) 相似, 但 TRFIA 的线性范围更宽、灵敏度更高^[8]。干扰试验表明, 血红蛋白浓度不超过 4 g/L 时不会对 TRFIA 检测结果有干扰, 优于 ITM^[9]。不同方法检测结果比较显示, 在一定浓度范围内 TRFIA 与 RIA 结果相关性较好; 与此同时, TRFIA 具有无放射性污染、试剂有效期较长、操作方便、人为误差较少等特点, 且 TRFIA 分析系统采用了波长分辨、时间分辨及 1 000 次均值等方法, 减少了系统随机误差, 有效提高了系统精度, 优于 RIA^[10]。本研究发现 RIA 线性范围较窄, 当 UmALB ≥ 70 μg/mL 时, 为保证检测结果准确性, RIA 需检测稀释标本, 而 TRFIA 检测标本无需稀释, 操作更为简便。综上所述, TRFIA 检测 UmALB 具有灵敏度高、特异性强、线性范围宽、试剂稳定性强等特点, 适合临床实验室应用。

笔者在研究中发现, 尿标本于 -20 °C 保存 4 周后 UmALB 浓度有可能降低, 建议标本采集后及时检测, 以保证结果准确性。

参考文献

- [1] 潘柏申. 重视尿白蛋白检测的临床应用[J]. 中华检验医学杂志, 2009, 32(10): 1085-1087.
- [2] 鲍杰, 张宗彬. 尿微量白蛋白检测及其相关性疾病的研究进展[J]. 医学检验与临床, 2009, 20(4): 74.
- [3] 胡名扬, 梁高林, 虞燕华, 等. 时间分辨荧光免疫分析中 β-NTA 及其增强液的制备[J]. 中华核医学杂志, 2001, 21(3): 244-245.
- [4] 谭琳琳, 任君, 陈修祝, 等. 尿微量白蛋白检测在糖尿病肾病早期诊断的意义[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(10): 1012.
- [5] 潘静, 魏明亮. 尿液微量白蛋白的研究近况[J]. 临床检验杂志, 2003, 21(5): 316-317.
- [6] 周伟玲, 赵启仁. 时间分辨荧光分析技术的研究进展及应用[J]. 国际放射医学核医学杂志, 2006, 30(2): 103-106.
- [7] 乐爱平. 时间分辨免疫荧光技术在检验医学中的发展现状[J]. 江西医学检验, 2003, 21(3): 191-193.

[8] 孙琦,杨国华,王姬. 两种尿微量白蛋白测定方法的临床评价[J]. 标记免疫分析与临床, 2004, 11(4): 235-236.
 [9] 顾晓琼,张小玲,徐家瑜,等. 免疫比浊法测定尿微量白蛋白的探讨[J]. 现代检验医学杂志, 2004, 19(2): 36-37.

[10] 秦卫仕,田蓉,匡安仁. 时间分辨荧光免疫分析和放射免疫分析测量精度的比较[J]. 同位素, 2002, 15(2): 115-117.

(收稿日期:2010-11-26)

• 检验技术与方法 •

冠心病患者通心络胶囊治疗后血栓调节蛋白、血管性血友病因子的变化观察

柳爱英¹, 宋长广^{2△}, 张立明³, 孔令廷⁴

(1. 山东省高唐县妇幼保健院检验科 252800; 山东省高唐县人民医院:

2. 检验科; 3 中医内科; 4. 药剂科 252800)

摘要:目的 探讨通心络胶囊对冠心病患者血管内皮功能的调节效果。方法 以血栓调节蛋白(TM)、血管性血友病因子(vWF)作为评价血管内皮功能的指标,测定冠心病心绞痛患者应用通心络胶囊治疗前后血清 TM、vWF 含量。结果 治疗前后,患者血清 TM、vWF 水平比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 通心络胶囊可以改善冠心病患者的血管内皮功能。

关键词:冠心病; 血栓调节蛋白; 血管性血友病因子; 调节效果; 通心络胶囊

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.12.040

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)12-1350-02

冠心病预防和治疗的关键是改善血管内皮功能和稳定易损斑块。通心络胶囊是运用中医络病理论研发的治疗心脑血管病的代表药物,不仅可显著改善血管内皮功能和稳定易损斑块,还可多途径、多靶点地对心血管病变的多个病理环节进行有效干预。笔者对 128 例服用通心络胶囊的冠心病心绞痛患者治疗前后血清血栓调节蛋白(thrombomodulin, TM)、血管性血友病因子(von Willebrand factor, vWF)水平进行了检测,以观察通心络胶囊对冠心病患者血管内皮功能的调节作用及效果。

1 资料与方法

1.1 一般资料 根据通心络胶囊的治疗功能,选择 128 例心绞痛证属心气虚乏、血瘀络阻的患者,其中男 81 例、女 47 例,年龄 42~78 岁,平均 58 岁。

1.2 主要试剂与仪器 TM 测定采用酶联免疫吸附法,使用北京北方伟业发展有限公司提供的试剂盒与全自动酶免仪; vWF 测定采用酶联免疫吸附法,使用上海继锦化学科技有限公司提供的人血管性血友病因子抗原(vWF: Ag)试剂盒与全自动酶免仪。

1.3 方法 根据患者病情,嘱患者口服通心络胶囊,2~4 粒/次,3 次/日,4 周为 1 疗程。其他药物治疗和患者的饮食、生活方式相对稳定。以不含抗凝剂真空采血管分别于治疗前后采集患者静脉血 2~4 mL(治疗后采血时间以患者症状明显减轻或消失、心电图明显改善或正常为参考),室温放置 2 h,以 30 cm 为离心半径、3 000 r/min 离心 20 min,分离血清-20 °C 或 -80 °C 保存待检(所有标本收集后一次性成批检测,避免反复冻融及其他因素造成的误差)。

1.4 统计学处理 应用 SPSS10.0 软件进行数据统计处理。计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,均数间差异比较采用 u 检验, $P < 0.05$ 时比较差异有统计学意义。

2 结果

冠心病心绞痛患者使用通心络胶囊治疗前后 TM、vWF 测定结果见表 1。

表 1 血清 TM、vWF 测定结果($\bar{x} \pm s$)

组别	TM($\mu\text{g/L}$)	vWF($\mu\text{g/L}$)
治疗前	68.4 ± 25.2*	207.0 ± 74.0*
治疗后	21.6 ± 8.7	83.0 ± 19.0

*: $P < 0.05$, 与治疗前比较。

3 讨论

TM 是由 554 个氨基酸残基组成的单链糖蛋白,相对分子质量为 75×10^3 。TM 作为血管内皮细胞膜的主要抗血栓活性物质,与凝血酶以 1:1 的比例结合成复合物,在钙离子作用下与蛋白 C 结合而使蛋白 C 活化,活化后的蛋白 C 将具有凝血作用的酶转变成具有抗凝作用的酶,特异性地作用于血小板、纤维蛋白原、第 V 因子、第 VIII 因子,发挥抗凝作用。当血管内皮细胞受损时, TM 被释放而使血清 TM 含量增高。研究证实,血清 TM 增高程度与内皮细胞损伤成正比,已被用作微血管损伤的独立标记物^[1-3]。vWF 是由内皮细胞和巨噬细胞合成的一种多聚糖蛋白,作为凝血因子 VIII 的载体,具有血小板糖蛋白 I b、II b/III a,以及肝素和胶原的结合位点,可促进血小板黏附于血管壁。当血管内皮细胞受损时, vWF 大量释放入血,其浓度升高被认为是血管内皮损伤的标志,也是血小板粘附于破损内皮,引起微血栓形成的重要指标^[4-5]。不稳定型冠心病及心肌梗死等冠心病患者发病早期,血液 TM、vWF 含量即增加,以发挥其在动脉内皮受损过程中的作用,而治疗后显著降低^[6]。因此,作为无创性诊断与监测疾病进展变化的血液标记物,血液 TM、vWF 水平升高被认为是动脉内皮受损和功能不良的重要标志^[7]。

血管内皮功能障碍是心血管病发生的中心环节和始动因素^[8]。在血管损伤、动脉粥样硬化启动、血管痉挛、血栓形成等过程中起着关键作用。改善血管内皮功能,对延缓或阻止动脉粥样硬化的进展和心血管事件的发生起着重要作用^[9-10]。因此,改善血管内皮功能是预防和治疗心血管病重要措施。中医认为,冠心病心绞痛是脉络之病变,与运血不畅有关,心气虚

△ 通讯作者, E-mail: gthosp@163.com.