

· 论 著 ·

标本类型和储存条件对促肾上腺皮质激素检测结果稳定性的影响

董敏雅^{1,2}, 杨东蕾^{1,2}, 姚一帆^{1,2}

(1. 浙江大学医学院附属第一医院检验科, 浙江杭州 310003; 2. 浙江省临床体外诊断技术研究重点实验室, 浙江杭州 310003)

摘要:目的 探讨标本类型和储存条件对促肾上腺皮质激素(ACTH)检测结果稳定性的影响。方法 将标本分成血浆组和血清组, 每组各 57 例, 并在抽血后 1 h 内检测 ACTH 浓度。在血浆组中选取 30 例血浆量充足的标本分成室温组、冷藏组和冷冻组, 每组各 30 例, 其中室温组和冷藏组在 2、24、121 h 时检测 ACTH 浓度, 冷冻组在 24、121 h 时检测 ACTH 浓度。检测结果与设定的标准值进行比较分析。结果 血清组 ACTH 水平明显低于血浆组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。室温组在 2、24、121 h 时的检测结果与标准值比较差异有统计学意义($P < 0.05$); 冷藏组在 2、24 h 时的检测结果与标准值比较差异无统计学意义($P > 0.05$), 而在 121 h 时的检测结果与标准值比较差异有统计学意义($P < 0.05$); 冷冻组在 24、121 h 时的检测结果与标准值比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 采用乙二胺四乙酸二钾抗凝标本检测 ACTH 时, 在低温下应于 1 h 内完成检测; 若 24 h 内不能完成检测时, 应将分离的血浆冷冻储存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, 其在 121 h 内检测结果变化相对稳定。

关键词:促肾上腺皮质激素; 稳定性; 冷藏; 冷冻

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2017.21.015

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2017)21-2982-03

Effect of sample type and storage conditions on stability of adrenocorticotrophic hormone detection results

DONG Minya^{1,2}, YANG Donglei^{1,2}, YAO Yifan^{1,2}

(1. Department of Clinical Laboratory, First Affiliated Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310003, China; 2. Key Laboratory of Clinical In Vitro Diagnostic Techniques of Zhejiang Province, Hangzhou, Zhejiang 310003, China)

Abstract: **Objective** To study the influence of sample type and storage conditions on the stability of adrenocorticotrophic hormone(ACTH) detection results. **Methods** The samples were divided into the plasma and serum groups, 57 cases in each group. The ACTH concentration was detected within 1 h after blood collection; 30 samples of sufficient plasma amount were extracted from the plasma group and re-divided into the room temperature, refrigeration and frozen groups, 30 cases in each group. The ACTH concentration in the room temperature and refrigeration groups were detected at the time points of 2, 24, 121 h, while which in the frozen group was detected at 24, 121 h. Then the detection results were compared with the setting standard values. **Results** The ACTH level in the serum group was obviously lower than that in the plasma group, the results showed statistically significant difference between the two groups($P < 0.05$). The detection results at 2, 24, 121 h had statistical difference between the room temperature group and the standard value($P < 0.05$); the detection results at 2, 24 h had no statistical difference between the refrigeration group and standard value($P > 0.05$), while which at 121 h had statistical difference between the refrigeration group and standard value($P < 0.05$); the detection results at 24, 121 h had no statistical difference between the frozen group and standard value($P > 0.05$). **Conclusion** Adopting EDTA-K₂ anticoagulation samples for detecting ACTH level should complete the detection within 1 h under low temperature; if the detection can not be completed within 24 h, the separated plasma should be stored by freezing at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, the detection results change is relatively stable within 121 h.

Key words: adrenocorticotrophic hormone; stability; refrigeration; frozen

促肾上腺皮质激素(ACTH)是诊断下丘脑-垂体-肾上腺轴失调的重要依据, 在库欣综合征和肾上腺功能不全的诊断中具有重要作用; 然而, ACTH 非常不稳定, 容易被蛋白水解酶降解, 其检测准确性被降低^[1-2]。有研究发现储存时间的延长和不适当的储存方法会影响 ACTH 结果的准确性^[1-2]。因此提高分析前标本保存的稳定条件和明确标本的稳定时限, 是保证 ACTH 检测结果准确性的关键。为此, 本研究通过化学发光法检测 ACTH 水平, 分析标本类型和储存条件对 ACTH 稳定性的影响, 旨在为 ACTH 检测流程的规范化提供依据, 提高检测结果的可靠性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 随机选取本院门诊患者 57 例, 均于下午 4 点抽取肘静脉血, 每例患者抽取两管, 每管血量均不少于 3 mL, 分别注入乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K₂)抗凝管(血浆组)和分离胶促凝管(血清组)。同时, 在血浆组中选取 30 例血浆量充足标本分 3 组保存, 标记为室温组($25\text{ }^{\circ}\text{C}$)、冷藏组($4\text{ }^{\circ}\text{C}$)和冷冻组($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$)。由于文献[3]表明溶血和脂浊会影响 ACTH 检测结果, 故本研究排除溶血和脂浊患者标本。所有患者均知情同意并签署知情同意书。

1.2 仪器与试剂 采血管采用美国 BD 公司生产的塑胶真空

管,包括 EDTA-K₂ 抗凝管和分离胶促凝管;低温离心机采用美国 Thermo Fisher Scientific 高速冷冻离心机(型号: Sorvall ST 16R);检测仪器采用西门子全自动免疫化学分析仪 IMMULITE 2000;试剂采用西门子公司原装配套试剂。试验在仪器正常、校准通过、质控在控的情况下进行。

1.3 方法 将 EDTA-K₂ 抗凝管置于低温离心机,3 500 r/min 离心 10 min,分离出血浆后上机检测;分离胶促凝管在室温放置 30 min,血液凝固后再置于低温离心机,3 500 r/min 离心 10 min,分离出血清后上机检测^[4]。所有检测项目均在标本采集 1 h 内完成。室温组和冷藏组在 2、24、121 h 时检测 ACTH 浓度,结果分别表示为 A2、A24、A121 和 B2、B24、B121;冷冻组在 24、121 h 时检测 ACTH 浓度,结果表示为 C24、C121。将室温组即刻检测所得 ACTH 结果设定为标准值。将不同温度、不同时间点检测的结果分别与标准值比较,分析不同储存条件对 ACTH 稳定性的影响。

1.4 统计学处理 原始数据记录于 Excel 中,各组数据用 Shapiro-Wilk 检验进行正态性检验,均为非正态分布,试验结果采用 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示。采用 SPSS16.0 软件进行统计学处理。在标本类型分组中,采用 Mann-Whitney U 检验比较不同标本类型间 ACTH 水平的差异;在储存条件分组中,采用 Wilcoxon 秩和检验比较不同时间、不同温度下 ACTH 水平的差异。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 血浆组与血清组 ACTH 检测结果比较 血浆组与血清组 ACTH 水平分别为 [22.30(17.30, 29.20)]、[16.90(13.00, 21.40)] pg/mL,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

2.2 不同储存条件分组 ACTH 检测结果比较 A2、A24、A121、B121 与标准值比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 不同储存条件分组 ACTH 检测结果比较
比较 [$M(P_{25}, P_{75})$, pg/mL]

存储时间(h)	室温组	冷藏组	冷冻组
0	18.85(14.10, 28.03)	—	—
2	17.80(13.65, 26.13)*	18.65(13.75, 27.50)	—
24	17.90(13.58, 24.90)*	19.45(14.35, 27.38)	18.00(14.13, 27.53)
121	16.90(12.45, 23.55)*	18.25(12.70, 24.08)*	18.50(13.55, 27.38)

注:“—”表示未测;与标准值比较, * $P < 0.05$ 。

3 讨 论

ACTH 是一种产生于垂体的多肽激素,能够刺激肾上腺皮质生成类固醇,其检测在鉴别诊断肾上腺功能减退和分泌亢进中具有很大价值。在原发性肾上腺功能不全中,ACTH 水平升高为典型临床表现,而在垂体功能障碍继发的肾上腺功能不全中往往表现为低水平。ACTH 的检测还能辅助鉴别库欣综合征中皮质醇增多的原因。若皮质醇增多是由于肾上腺皮质病变或增生引起,则 ACTH 水平降低;若是由于垂体异位生成 ACTH 或 ACTH 分泌过多引起,则 ACTH 水平升高^[5]。因此定量检测 ACTH 水平在临床应用中显得尤为重要。但 ACTH 在人体中以低水平循环,且易被蛋白水解酶降解^[6-8],在体外保存极不稳定。为了获得较准确的检测结果,分析前标

本的保存显得至关重要。

本研究结果显示,相同条件下的血浆组 ACTH 水平普遍高于血清组,其原因可能是促凝的血清标本中有活性的肽酶能使得 ACTH 水平值偏低^[9];因此,在临床试验中检测 ACTH 时建议使用 EDTA-K₂ 抗凝的血浆标本,这与相关文献的结论一致^[10]。本研究中,不同储存条件分组试验结果显示:与取样后即刻检测所得的标准值相比,室温组储存 2 h 及以上的 ACTH 水平下降明显;冷藏组储存 24 h 以内的 ACTH 水平变化不大,但超过 121 h 后有显著差异;而冷冻组至少可储存 121 h,且 ACTH 水平变化不明显。这表明随着时间的推移,化学发光法测得的 ACTH 水平有所下降,且储存标本的温度越高,ACTH 水平下降愈快。因此,本研究建议在 ACTH 的临床检测中,尽可能地缩短采样到检测之间的时间,并尽量在低温环境中操作,尤其是需要长途运输或长期储存的标本,更要冷冻储存以维持其稳定性。如标本不能在采集后 1 h 内完成分析,就应即刻离心冷藏,储存期限为 24 h;如需外送检测的标本应分离出血浆置于 -20 °C,至少可储存 121 h。

国内外学者开展了很多关于 ACTH 稳定性的研究,其研究方向和结论不尽相同,如:抗凝剂或酶抑制剂对 ACTH 稳定性的影响^[10],离心前放置时间的长短对 ACTH 稳定性的影响^[2],全血、血浆和血清中 ACTH 的稳定性^[6-7,11]等。关于 ACTH 分析前处理流程一直未能规范化,本研究为临床实验室检测 ACTH 的储存条件和时间限制提供了参考依据。与其他相关研究相比,本研究的标本量占有优势,且将涉及的时间延长到 121 h,更有力地证明了冷冻储存对 ACTH 稳定性的影响最小。本研究选择立即离心分离出的血浆是为了排除从采血到离心间隔时间的长短对 ACTH 水平的影响,因为有研究表明未分离的 EDTA-K₂ 全血比已分离的血浆对 ACTH 水平影响更大,其原因可能是在 EDTA-K₂ 中酶的降解没有被充分抑制^[2]。而且,本研究以新鲜血浆测得的 ACTH 水平作为标准值,排除了其他不利因素的影响。此外,本研究亦有不足之处,不同储存条件下应选取更多的时间点,以便更好地观察 ACTH 的降解过程,为临床提供更准确的参考依据。

参考文献

[1] Tekkesin N. The effect of temperature and aprotinin on the preanalytical stability of adrenocorticotrophic hormone[J]. Turk J Biochem, 2015, 40(2): 169-174.

[2] Reisch N, Reincke M, Bidlingmaier M. Preanalytical stability of adrenocorticotrophic hormone depends on time to centrifugation rather than temperature[J]. Clin Chem, 2007, 53(2): 358-359.

[3] Livesey JH, Dolamore B. Stability of plasma adrenocorticotrophic hormone (ACTH): influence of hemolysis, rapid chilling, time, and the addition of a maleimide[J]. Clin Biochem, 2010, 43(18): 1478-1480.

[4] Colak A, Toprak B, Dogan N, et al. Effect of sample type, centrifugation and storage conditions on vitamin D concentration[J]. Biochemia Med, 2013, 23(3): 321-325.

[5] 程实, 安成, 刘志远, 等. 肾上腺功能实验室检测的临床应用[J/CD]. 中华临床医师杂志(电子版), 2012, 6(17): 5195-5198.

综上所述,颅脑外伤患者中血清 CNP、IGF-Ⅱ水平的减低和血清 ET、NSE、S100B 水平的升高对病变进展有明显促进和恶化作用。血清 CNP、IGF-Ⅱ、ET、NSE 和 S100B 与颅脑外伤病变严重程度相关,可作为颅脑外伤患者病情严重程度及预后判断的实验室指标,对颅脑外伤病情判断、预后评估具有较高的临床应用价值。

参考文献

- [1] He X, Wang W, Ma J, et al. Craniocerebral injury promotes sciatic nerve regeneration[J]. J Clin Reha Tis Eng Res, 2016, 19(27): 4061-4067.
 - [2] Cao Y, Qiu J, Wang B, et al. The analysis on risk factors and clinical treatment of craniocerebral injury concurrent with acute kidney injury[J]. Cell Biochem Biophys, 2015, 71(1): 199-204.
 - [3] Finnie JW. Neuroinflammation: beneficial and detrimental effects after traumatic brain injury[J]. Inflammopharmacology, 2013, 21(4): 309-320.
 - [4] Waters RJ, Murray GD, Teasdale GM, et al. Cytokine gene polymorphisms and outcome after traumatic brain injury[J]. J Neurotrauma, 2013, 30(20): 1710-1716.
 - [5] Wu X, Sha H, Sun Y, et al. N-terminal pro-B-type natriuretic peptide in patients with isolated traumatic brain injury: a prospective cohort study[J]. J Trauma Acute Care Surg, 2011, 71(4): 820-825.
 - [6] Zetterberg H, Smith DH, Blennow K. Biomarkers of mild traumatic brain injury in cerebrospinal fluid and blood[J]. Nat Rev Neurol, 2013, 9(4): 201-210.
 - [7] Jung CS, Lange B, Zimmermann M, et al. CSF and serum biomarkers focusing on cerebral vasospasm and ischemia after subarachnoid hemorrhage[J]. Stroke Res Treat, 2013, 2013(13): 305.
 - [8] Sharma R, Laskowitz DT. Biomarkers in traumatic brain injury[J]. Curr Neurol Neurosci Rep, 2012, 12(5): 560-569.
 - [9] 中国医师协会神经外科医师分会. 中国颅脑创伤外科手术指南[J]. 中华神经外科杂志, 2009, 25(2): 100-101.
 - [10] Potter LR. Natriuretic peptide metabolism, clearance and degradation[J]. FEBS J, 2011, 278(11): 1808-1817.
 - [11] Calderon LM, Guyette FX, Doshi AA, et al. Combining NSE and S100B with clinical examination findings to predict survival after resuscitation from cardiac arrest[J]. Resuscitation, 2014, 85(8): 1025-1029.
 - [12] Chen J, Qian X, Liang W, et al. Changes of serum neuron specificity enolase and S100B protein in newborn with hyperbilirubinaemia[J]. Chin J Birth Health Hered, 2012, 59(6): 34.
 - [13] 陈波. 急性颅脑外伤患者血清 NSE 及血浆 ET、IGF-Ⅱ、CNP 水平分析[J]. 放射免疫学杂志, 2010, 23(5): 488-491.
 - [14] 徐继来, 潘利平, 张宝明. 急性颅脑损伤患者血清 NSE、IL-8 和 CNP 水平的变化及临床意义[J]. 放射免疫学杂志, 2012, 25(5): 506-508.
 - [15] 王安帮, 宋波. 颅脑外伤患者 APACHEII 评分与血清中 ET、IGF-Ⅱ、CNP 水平及患者预后的关系[J]. 河北医学, 2017, 23(1): 32-35.
 - [16] Meng XB. Clinical significance of measurement of serum NPY, IGF-Ⅱ and CNP levels in pediatric patients with hand-foot-mouth disease complicated with brain stem encephalitis[J]. J Huaihai Med, 2012, 29(4): 10.
 - [17] Calderon LM, Guyette FX, Doshi AA, et al. Combining NSE and S100B with clinical examination findings to predict survival after resuscitation from cardiac arrest[J]. Resuscitation, 2014, 85(8): 1025-1029.
 - [18] 王寿先, 王成东, 武丽丽, 等. 脑损害标志物动态检测在颅脑损伤病人预后判断中的价值[J]. 潍坊医学院学报, 2006, 28(1): 9-11.
 - [19] Li Y, Yu ZX, Ji MS, et al. A pilot study of the use of dexmedetomidine for the control of delirium by reducing the serum concentrations of brain-derived neurotrophic factor, neuron-specific enolase, and S100B in polytrauma patients[J]. J Intensive Care Med, 2017, 41(3): 34.
 - [20] Wei SP, Si DW, Sheng XV. Progesterone promotion on the improvement of neurological function after traumatic brain injury: experimental study[J]. Practical J Med Pharm, 2014, 23(19): 298-310.
- (收稿日期: 2017-02-16 修回日期: 2017-05-07)
-
- (上接第 2983 页)
- [6] Hillebrand JJ, Heijboer AC, Endert E. Effects of repeated freeze-thaw cycles on endocrine parameters in plasma and serum[J]. Ann Clin Biochem, 2016, 54(2): 289-292.
 - [7] Prutton JS, Kass PH, Watson JL, et al. Pre-analytical stability of adrenocorticotrophic hormone from healthy horses in whole blood, plasma and frozen plasma samples[J]. Vet J, 2015, 204(1): 123-124.
 - [8] Christensen M, Madsen RF, Møller LR, et al. Whole blood samples for adrenocorticotrophic hormone measurement can be stored at room temperature for 4 hours[J]. Scand J Clin Lab Invest, 2016, 76(8): 653-656.
 - [9] 冯新. 促凝血清标本与 EDTA 抗凝血浆标本在检测 ACTH 浓度时的差异[J]. 吉林医学, 2010, 31(13): 1888.
 - [10] Casati M, Cappellani A, Perlangeli V, et al. Adrenocorticotrophic hormone stability in preanalytical phase depends on temperature and proteolytic enzyme inhibitor[J]. Clin Chem Lab Med, 2013, 51(4): 45-47.
 - [11] Oddezo C, Lombard E, Portugal H. Stability study of 81 analytes in human whole blood, in serum and in plasma[J]. Clin Biochem, 2012, 45(6): 464-469.
- (收稿日期: 2017-03-20 修回日期: 2017-06-26)