

## 保存温度及时间对化学发光法测定直接肾素浓度的影响

邓玲艳, 王旭, 李辉军<sup>△</sup>

(华中科技大学同济医学院附属同济医院检验科, 湖北武汉 430030)

**摘要:**目的 研究样本保存温度及时间对血浆直接肾素浓度(DRC)的影响。方法 采集乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K<sub>2</sub>)抗凝血并分离血浆,于室温和冷藏均分别放置 2、4、6、8 h;冷冻 4、8、12 周;冷冻冻融 1~3 次后采用化学发光法测定 DRC,与即刻值比较,差异率超过总变化极限值认为不可接受。结果 室温放置 2、4、6、8 h 的 DRC 均低于即刻值( $P < 0.05$ ),差异率超过 17% 的样本比例分别为 0、0、1/20、4/20;冷藏 2、4、6、8 h 的 DRC 均高于即刻值( $P < 0.05$ ),差异率超过 17% 的样本比例分别为 0、2/20、4/20、11/20;冷冻 12 周内所有样本差异率均  $< 17%$ ;冻融 2 次时有 1 个样本降低超过 17%。结论 温度影响 DRC 稳定性,建议样本采集后室温 6 h 内检测,否则应分离血浆冻存于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  可稳定 12 周,避免反复冻融。

**关键词:**直接肾素浓度; 保存条件; 样本稳定性

**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2019.09.013

**中图法分类号:**R446.1

**文章编号:**1673-4130(2019)09-1073-04

**文献标识码:**A

**Effect of preservation temperature and time on chemiluminescence determination of direct renin concentration**

DENG Lingyan, WANG Xu, LI Huijun<sup>△</sup>

(Department of Clinical Laboratory, Tongji Hospital Affiliated to Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430030, China)

**Abstract: Objective** To study the effects of sample storage temperature and time on plasma direct renin concentration (DRC). **Methods** Potassium ethylenediaminetetraacetate (EDTA-K<sub>2</sub>) anticoagulant blood was collected and plasma was separated. The plasma was stored at room temperature and refrigerated for 2, 4, 6 and 8 h, and frozen for 4, 8 and 12 weeks. After freezing and thawing for 1 to 3 times, the chemiluminescence method was used to determine DRC. Compared with the instant value, the difference rate exceeding the total change limit was considered unacceptable. **Results** DRC values of 2, 4, 6 and 8 h at room temperature were lower than immediate values ( $P < 0.05$ ). The proportion of samples with difference rate over 17% was 0, 0, 1/20, 4/20, respectively. DRC values of 2, 4, 6 and 8 h of refrigeration were higher than immediate value ( $P < 0.05$ ). The difference rate of all samples within 12 weeks of freezing was less than 17%. One sample decreased by more than 17% after freezing and thawing twice. **Conclusion** Temperature affects the stability of DRC. It is suggested that the samples should be detected within 6 hours after collection. Otherwise, the plasma should be frozen and stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 12 weeks to avoid repeated freezing and thawing.

**Key words:** plasma direct renin concentration; storage condition; sample stability

原发性醛固酮增多症(PA),简称原醛症,是指肾上腺皮质病变分泌过多的醛固酮,导致体内潴钠排钾,血容量增多,以及肾素-血管紧张素系统受抑制,以血浆高醛固酮和低肾素水平为主要特征,临床症状表现为高血压伴有(或不伴有)低血钾的综合征<sup>[1]</sup>,是继发性高血压的主要病因之一,约占难治性高血压的 10%左右<sup>[2]</sup>。研究表明,高血压人群中采用血浆醛固酮与肾素比值(ARR)筛查后,原醛症检出率提高了 10 倍左右<sup>[3]</sup>。美国《原发性醛固酮增多症患者诊

断治疗指南》<sup>[1]</sup>和中国《原发性醛固酮增多症诊治专家共识》<sup>[4]</sup>均推荐 ARR 作为原醛症的首选筛查指标。

由于原醛症患者肾素水平低,且肾素是 ARR 的分母,故肾素测定的准确性在很大程度上决定了 ARR 结果的准确性。肾素测定的传统方法是放射免疫法,其原理是根据肾素可将血管紧张素原转化成血管紧张素 I,通过测定血管紧张素 I 的生成速率来间接反映血浆肾素活性(PRA)。近年来,全自动化学发光法测定血浆直接肾素浓度(DRC),由于其操作相对

**作者简介:**邓玲艳,女,主管技师,主要从事临床检验诊断方面的研究。 <sup>△</sup> **通信作者,**E-mail:tjhsnes@126.com。

**本文引用格式:**邓玲艳,王旭,李辉军. 保存温度及时间对化学发光法测定直接肾素浓度的影响[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(9): 1073-1076.

放射免疫法测定 PRA 受影响因素更少、操作更简易、更易于标准化且无放射性污染,逐渐应用于临床<sup>[5-6]</sup>。

样本稳定性是影响检测结果准确性的一个重要因素。研究表明温度不仅影响 PRA<sup>[7]</sup>,也会影响 DRC<sup>[8-11]</sup>。因为不同实验室 DRC 稳定性结果并不完全相同<sup>[8-11]</sup>,所以本研究的目的是调查本实验室血浆中 DRC 在不同存储温度下的稳定性,为日常工作提供参考。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 随机选择健康体检者 65 例,男 35 例,女 30 例,年龄 22~56 岁,肝肾功能正常,影像学检查显示心脏、肺、肝、脾、肾及肾上腺、子宫及附件、前列腺等重要脏器未见明显异常,未服用任何影响肾素-醛固酮系统的药物<sup>[1]</sup>。

**1.2 仪器与试剂** 血浆直接肾素浓度在意大利索灵化学发光免疫分析系统(仪器型号:LIAISON XL)上进行检测,严格按试剂说明书进行操作。

**1.3 方法** 采用伯乐内分泌质控品进行严格的质量控制,批号 40311,累积均值 73.9  $\mu$ IU/mL, CV 为 3.65%;批号 40313,累积均值 107.3  $\mu$ IU/mL, CV 4.19%,均值累积时间超过 3 个月。自制混合血浆,按 CLSI 文件 EP5-A2 验证精密度,浓度 14.4  $\mu$ IU/mL 批内不精密度 CV 1.0%,总不精密度 3.3%;浓度 42.2  $\mu$ IU/mL 批内不精密度 CV 2.2%,总不精密度 3.0%。

采用乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K<sub>2</sub>)抗凝真空采血管(BD,美国)于上午 7:30-8:30 采集空腹静脉血 6 mL(立位),上下颠倒混匀,室温离心(3 000  $\times$  g, 10 min)分离血浆并分装(30 min 内完成),排除严重脂血、溶血、黄疸以及血样体积不足的样本。新鲜样本立即上机检测作为即刻值(基线水平),其他样本按以下方案储存。

室温稳定性:20 支样本,每支分成 5 等份,分别在室温(25  $^{\circ}$ C)放置 0、2、4、6、8 h 后检测;冷藏稳定性:20 支样本,每支分成 5 等份,分别冷藏(4  $^{\circ}$ C)0、2、4、6、8 h 后检测;冷冻稳定性:20 支样本(由于操作失误,最终只有 17 支样本检测值纳入计算)每支分成 4

等份,除新鲜样本外,分别保存在-20  $^{\circ}$ C 条件下 4、8、12 周后在 37  $^{\circ}$ C 水浴中快速解冻,并立即检测;冻融稳定性:5 支样本,每支分成 4 等份,新鲜样本立即检测作为基线值,其他 3 组样本立即冻存于-20  $^{\circ}$ C。第 2 天,第 4 组样本在 37  $^{\circ}$ C 水浴中快速解冻,随后再冻存于-20  $^{\circ}$ C(解冻-冻存在 5 min 内完成);第 3 天同一时间,第 3 组、第 4 组样本重复相同操作;第 4 天同一时间,3 组样本在 37  $^{\circ}$ C 水浴中快速解冻,并立即上机检测。这样,第 2 组、第 3 组、第 4 组样本分别冻融 1 次、2 次、3 次。

**1.4 统计学处理** 本研究中 DRC 呈正态分布,故以  $\bar{x} \pm s$  分别表示数据的集中趋势和离散趋势,正态性检验采用 Kurtosis 检验,组间均值比较采用 *t* 检验或配对样本的 *t* 检验,以  $P < 0.05$  认为差异有统计学意义;统计采用 SPSS16.0 软件。此外,将两个时间点 DRC 差异率与总变化极限值(TCL)进行比较,进一步判断差异的可接受性<sup>[12-13]</sup>。

差异率分析:同一温度条件下,存放不同时间的样本,其 DRC 与即刻值的差异率若大于稳定性判断标准(TCL),认为差异显著<sup>[13]</sup>。差异率 =  $(T_x - T_0) / T_0 \times 100$ ,其中  $T_x$  为放置 *X* 时间的检测值, $T_0$  为即刻值。根据国外研究,用于监测由于分析物不稳定引起的变化时,对同一个体的相同样本,TCL 来源于分析变异( $CV_a$ )和个体内生物学变异( $CV_b$ ),计算公式为: $TCL = \sqrt{(2.77CV_a)^2 + (0.5CV_b)^2}$ <sup>[13]</sup>。

## 2 结果

**2.1 受试者的一般资料比较** 本研究一共选择 65 例受试者,按照其血压,分成理想血压组(收缩压:90~120 mm Hg、舒张压:60~80 mm Hg)42 例;以及正常血压高值组(收缩压: $>120$  mm Hg~ $<140$  mm Hg、舒张压: $>80$  mm Hg~ $<90$  mm Hg)23 例。正常血压高值组与理想血压组在收缩压、舒张压、体质量指数(BMI)、血清钠离子浓度、血清肌酐、肾小球滤过率(eGFR)的差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),而 DRC、年龄、血清  $K^+$  浓度在这两组的差异无统计学意义(见表 1)。

表 1 受试者一般资料( $\bar{x} \pm s$ )

项目	总人数( $n=65$ )	理想血压组( $n=42$ )	血压正常高值组( $n=23$ )	<i>P</i> 值
DRC( $\mu$ IU/mL)	48.5 $\pm$ 43.2	49.1 $\pm$ 45.4	47.8 $\pm$ 23.6	0.446
年龄(岁)	39.0 $\pm$ 15.0	37.0 $\pm$ 8.0	41.0 $\pm$ 8.0	0.223
收缩压(mm Hg)	114.0 $\pm$ 9.0	110.0 $\pm$ 6.0	124.0 $\pm$ 4.0	$<0.001$
舒张压(mm Hg)	72.0 $\pm$ 7.0	69.0 $\pm$ 5.0	78.0 $\pm$ 5.0	$<0.001$
身体质量指数(kg/m <sup>2</sup> )	23.3 $\pm$ 6.5	21.5 $\pm$ 2.5	25.4 $\pm$ 2.6	$<0.001$
血清 Na <sup>+</sup> (mmol/L)	140.0 $\pm$ 1.6	139.6 $\pm$ 1.2	141.0 $\pm$ 1.5	$<0.001$
血清 K <sup>+</sup> (mmol/L)	4.2 $\pm$ 0.4	4.2 $\pm$ 0.3	4.3 $\pm$ 0.3	0.051
血清肌酐(mol/L)	70.7 $\pm$ 15.4	68.3 $\pm$ 15.6	73.8 $\pm$ 13.3	$<0.001$
eGFR(mL <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> ·1.73 m <sup>-2</sup> )	106.0 $\pm$ 15.0	110.0 $\pm$ 14.0	107.0 $\pm$ 12.0	$<0.001$

**2.2 计算 DRC 差异率可接受标准** 查阅文献, DRC 在健康人中  $CV_b$  为 30.1%<sup>[14]</sup>。  $CV_a$  来源于本实验室质控累积不精密度和验证不精密度: 3.3%、3.0%、3.65%、4.19%, 计算 TCL 分别为 17.6%、17.2%、18.1%、19.0%。 本实验以 17% 作为肾素浓度差异率可接受标准。

**2.3 DRC 在室温条件下的稳定性** 在室温条件下, DRC 随放置时间的延长有降低趋势, 详见表 2。 尽管从放置在室温 2 h 起, DRC 检测值与即刻值相比, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 但是放置 2 h 和放置 4 h 所有样本 DRC 的差异率均在 17% 以内。 当室温放置 6 h, 20 例样本中仅有 1 例 DRC 测定值从 3.63  $\mu\text{IU/mL}$  降至 2.79  $\mu\text{IU/mL}$ , 差异率为 -23.2%。 故样本采集后, 室温放置 6 h 内检测, 绝大多数 DRC 降低幅度临床可接受。

表 2 室温条件下血浆直接肾素稳定性

25 °C	浓度 ( $\mu\text{IU/mL}$ , $\bar{x} \pm s$ )	P 值	差异率 (%, $\bar{x} \pm s$ )	差异率 > 17% 比例 (n/n)
即刻值	53.4 ± 45.0	—	—	—
2 h	51.7 ± 44.2	0.002	-2.8 ± 3.7	0/20
4 h	50.5 ± 43.1	<0.001	-5.6 ± 3.2	0/20
6 h	49.0 ± 42.3	<0.001	-9.9 ± 4.3	1/20
8 h	46.3 ± 40.0	<0.001	-15.0 ± 6.5	4/20

注: 差异率 > 17% 认为差异临床不可接受; — 表示无数据

**2.4 DRC 在冷藏条件下的稳定性** 冷藏条件下, DRC 随放置时间延长有升高趋势, 见表 3。 研究发现, 从冷藏 2 h 开始, DRC 检测值与即刻值相比, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 而直到冷藏 4 h 开始, 有 2 个样本的差异率超过了 TCL (分别为 2.48  $\mu\text{IU/mL}$  升高至 2.94  $\mu\text{IU/mL}$ , 差异率 18.6%, 19.02  $\mu\text{IU/mL}$  升高至 25.14  $\mu\text{IU/mL}$ , 差异率 32.2%), 并且随冷藏时间延长, 差异率超过 TCL 的比例逐渐增多。

表 3 冷藏条件下血浆直接肾素稳定性

4 °C	浓度 ( $\mu\text{IU/mL}$ , $\bar{x} \pm s$ )	P 值	差异率 (%, $\bar{x} \pm s$ )	差异率 > 17% 比例 (n/n)
即刻值	47.4 ± 44.7	—	—	—
2 h	48.9 ± 43.7	0.003	3.9 ± 4.5	0/20
4 h	50.3 ± 45.2	0.001	7.7 ± 8.0	2/20
6 h	51.5 ± 45.4	<0.001	11.9 ± 11.5	4/20
8 h	55.5 ± 48.0	<0.001	22.7 ± 20.4	11/20

注: 差异率 > 17% 认为差异临床不可接受; — 表示无数据

**2.5 DRC 在冷冻条件下的稳定性** 研究 DRC 在冷冻条件下的稳定性之前, 先观察 DRC 的冻融稳定性。 冻融可使 DRC 降低, 并且随着冻融次数增加, DRC 检测值逐渐降低, 见表 4。 当分离后的血浆样本保存在 -20 °C 条件下 12 周时, DRC 的降低幅度临床可接受, 见表 5。

表 4 血浆直接肾素冻融稳定性

样本编号	即刻值 ( $\mu\text{IU/mL}$ )	差异率 (%)		
		冻融 1 次	冻融 2 次	冻融 3 次
1	14.0	-5.0	-17.6	-19.9
2	21.3	-5.9	-12.9	-16.5
3	42.1	-5.4	-8.3	-13.2
4	58.2	-3.4	-6.2	-8.6
5	97.3	-4.2	-6.3	-11.5

表 5 冷冻条件下血浆直接肾素稳定性

-20 °C	浓度 ( $\mu\text{IU/mL}$ , $\bar{x} \pm s$ )	P 值	差异率 (%, $\bar{x} \pm s$ )	差异率 > 17% 比例 (n/n)
即刻值	45.0 ± 28.2	—	—	—
4 周	45.1 ± 28.2	0.905	-0.2 ± 4.7	0/17
8 周	43.0 ± 26.7	<0.001	-4.2 ± 2.7	0/17
12 周	43.9 ± 27.2	0.006	-2.0 ± 2.5	0/17

注: 差异率 > 17% 认为差异临床不可接受; — 表示无数据

### 3 讨 论

肾素由肾小球旁细胞合成, 或由肾素原在一定条件下转化生成<sup>[15]</sup>。 肾素原是肾素的前体, 在血浆中以两种构象存在, 一种是无活性形式, 其活性位点被它 N 段的一个多肽片段封闭, 大概占总量的 98%; 另一种是活性形式, 虽然也含有 prosegment, 但活性位点未被封闭, 这种有活性的含量非常少, 不到 2%, 故健康者外周血中, 肾素原的活性非常低。 但在低温 (-5 °C ~ 4 °C) 条件下, 无活性肾素原的 prosegment 可以打开, 变成有活性的形式, 这一过程被称为肾素原的冷激活<sup>[15]</sup>。 由于血浆中的肾素原浓度约为肾素的 10 倍, 在肾素分泌受抑制的患者 (如原醛症患者) 体内, 肾素原的浓度可较肾素浓度高 100 倍<sup>[15]</sup>, 所以少量肾素原激活都会使肾素浓度检测产生较大影响。

基于肾素原上述特性, 当血液样本置于低温环境时, 肾素原被冷激活转换为活性肾素, 从而影响肾素测定值的准确性。 然而, 若样本放置在室温时间过长, 肾素也可能由于氧化、变性和构象变化等原因导致浓度降低。 相关指南和共识<sup>[1,4]</sup> 建议, 用于肾素检测的样本, 从采集、转运到分离血浆的时间不宜超过 30 min, 这在日常工作中往往难以做到, 尤其当需要将样本转运至第三方机构检测时。 本研究表明, 肾素不稳定, 直接肾素离体后, 不管是保存在室温还是冷藏条件下, 短时间 (2 h) 内的变化差异有统计学意义。 进一步分析表明, 血浆放置在室温 6 h 及冷藏 2 h 时, DRC 变化幅度可接受。 由于样本冷藏运输较常温运输繁琐, 因此样本宜保存在室温并在采集后的 6 h 内送到实验室。 当分离出的血浆样本冷冻 (-20 °C) 12 周时, 直接肾素的变化幅度可接受, 这与李溪月等<sup>[11]</sup> 的建议一致。 此外, 本实验首次研究直接肾素的冻融稳定性, 发现冻融会使 DRC 降低, 仅能冻融一次。

查阅文献, 在相同的检测系统, GRUSON 等<sup>[8]</sup> 发现 DRC 放置在室温有下降趋势, 6 h 差异开始有统计

学意义,他们建议样本采集后 6 h 内送检,与本文的建议相同;GLINICKI 等<sup>[9]</sup>研究表明在样本采集后 20~30 min 内,DRC 在室温条件下变化不显著;LOCSEI 等<sup>[10]</sup>发现当样本放置在室温 2 h 时,DRC 显著降低,但在 0℃~5℃条件下 2 h,DRC 变化不显著。李溪月等<sup>[11]</sup>发现室温放置 6 h,冷藏 3 h,DRC 的差异均有统计学意义。本研究结果显示,在冷冻或冷藏 2 h 后,与基线值比,DRC 的均值差异均有统计学意义。几个实验室对均值统计的结果的不一样,可能与种族不同,实验室环境不同等因素有关。但是,上述其他国内外的研究在数据分析时,仅对血浆 DRC 的均值做了  $\chi^2$  分析或 *t* 检验,都未将检测系统的分析变异和个体内生物学变异考虑在内,这可能是导致本次研究结果和其他研究结果不完全相同的主要原因。

在临床上,由于血浆肾素与醛固酮一起,主要用于原醛症的筛查及原发性高血压的病因分析,而正常血压高值往往认为是原发性高血压的前期。因此,在本研究中,笔者对纳入的健康人群进行了理想血压和正常血压高值的分组,发现 DRC 在两组中差异无统计学意义。然而,血浆中 DRC 被抑制是原醛症的特征之一,不同贮存条件是否会影响原醛症的筛查效率,有待进一步的研究。此外,本研究验证另外一个有趣的现象,即在健康体检者中,DRC 明显异于说明书推荐的参考区间(立位:4.4~46.1 mIU/L),可能与种族不同有关<sup>[16]</sup>。

#### 4 结 论

本实验研究显示,外周血中肾素浓度不稳定。在室温条件下,随保存时间延长降低;在冷藏条件下,随保存时间延长升高;本实验首次研究 DRC 冻融稳定性,DRC 随冻融次数增加而降低。因此,样本采集后应在 6 h 内送检并检测,若来不及检测,可冻存于-20℃至少 12 周,应避免反复冻融。

#### 参考文献

[1] FUNDER J W, CAREY R M, MANTERO F, et al. The management of primary aldosteronism: case detection, diagnosis, and treatment: an endocrine society clinical practice guideline[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2016, 101(5): 1889-1916.

[2] SANG X J, JIANG Y R, WANG W Q, et al. Prevalence of and risk factors for primary aldosteronism among patients with resistant hypertension in China [J]. *J Hypertens*, 2013, 31(7): 1465-1471.

[3] MULATERO P, STOWASSER M, LOH K C, et al. Increased diagnosis of primary aldosteronism, including surgically correctable forms, in centers from five continents [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004, 89(3): 1045-1050.

[4] 中华医学会内分泌学分会肾上腺学组. 原发性醛固酮增多症诊断治疗的专家共识[J]. *中华内分泌代谢杂志*,

2016, 32(3): 188-195.

[5] BURRELLO J, MONTICONE S, BUFFOLO F, et al. Diagnostic accuracy of aldosterone and renin measurement by chemiluminescent immunoassay and radioimmunoassay in primary aldosteronism [J]. *J Hypertens*, 2016, 34(5): 920-927.

[6] LONATI C, BASSANI N, GRITTI A, et al. Measurement of plasma renin concentration instead of plasma renin activity decreases the positive aldosterone-to-renin ratio tests in treated patients with essential hypertension [J]. *J Hypertens*, 2014, 32(3): 627-634.

[7] 姚一帆. 温度对血管紧张素 II 及肾素活性结果影响的研究 [J]. *实验与检验医学*, 2013, 6: 549-551.

[8] GRUSON D, MAISIN D, LISON P, et al. Two-site automated chemiluminescent assay for measurement of immunoreactive renin [J]. *Biomarkers*, 2011, 16(7): 605-609.

[9] GLINICKI P, JESKE W, GIETKA-CZERNEK M, et al. The effect of blood collection procedure on plasma renin activity (PRA) and concentrations of direct renin (DRC) and aldosterone [J]. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 2015, 16(2): 339-343.

[10] LOCSEI Z, RACZ K, PATOCS A, et al. Influence of sampling and storage conditions on plasma renin activity and plasma renin concentration [J]. *Clin Chim Acta*, 2009, 402(1/2): 203-205.

[11] 李溪月, RICH A G, 胡金波等. 不同贮存条件对肾素和醛固酮浓度测定的影响 [J]. *重庆医科大学学报*, 2016, 11(11): 1101-1104.

[12] BUORO S, MECCA T, SEGHEZZI M, et al. Assessment of blood sample stability for complete blood count using the Sysmex XN-9000 and Mindray BC-6800 analyzers [J]. *Rev Bras Hematol Hemoter*, 2016, 38(3): 225-239.

[13] ODDOZE 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.

[14] MEIJERS W C, VAN DER VELDE A R, MULLER KOBOLD A C, et al. Variability of biomarkers in patients with chronic heart failure and healthy controls [J]. *Eur J Heart Fail*, 2017, 19(3): 357-365.

[15] CAMPBELL D J, NUSSBERGER J, STOWASSER M, et al. Activity assays and immunoassays for plasma Renin and prorenin: information provided and precautions necessary for accurate measurement [J]. *Clin Chem*, 2009, 55(5): 867-877.

[16] DENG L, XIONG Z, LI H, et al. Analytical validation and investigation on reference intervals of aldosterone and renin in Chinese Han population by using fully automated chemiluminescence immunoassays [J]. *Clin Biochem*, 2018; 56: 89-94.