

• 检验技术与方法 •

两种方法学同型半胱氨酸水平正常值的临床验证及分析*

梁红梅, 黄 华, 罗奇智, 陈 群, 罗文沈, 吴愿如, 鲍红霞, 王小敏, 万蕴华

(广东省深圳市龙岗区第二人民医院, 广东深圳 518112)

摘 要:目的 验证荧光法及循环酶法临床测定同型半胱氨酸(Hcy)水平正常值的差异。方法 根据 CLSI 标准化文件 EP9-A2 要求,在该院体检高峰期每天取健康人员无溶血、黄疸、脂浊等的临床标本 8 份,分别用荧光法和循环酶法进行双份测定,共测定 12 d,计算测定值的中位数和平均值、方差及两种方法学的相关系数,并绘制散点图,按 95%置信区间,确定出荧光法和循环酶法测定 Hcy 水平正常值范围,并将该数值与生产商给定的正常水平值进行验证与分析。结果 荧光法的 Hcy 正常水平小于 15 $\mu\text{mol/L}$,循环酶法的 Hcy 正常水平为 4.0~24.1 $\mu\text{mol/L}$ 。两种方法学测定结果相关系数为 0.988。结论 两种方法学测定的结果存在相关性。荧光法测定 Hcy 正常水平值与生产商给出的正常水平值范围一致,值得信赖。而循环酶法测定的 Hcy 正常水平值与生产商给出的正常水平值偏差较大。因此,实验室在选用 Hcy 检测方法时,应尽可能对生产商给出的 Hcy 水平正常值进行复核,以确保检测结果对临床的指导作用。

关键词:半胱氨酸; 荧光免疫测定法; 临床酶试验; 参考值

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.22.026

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)22-2747-02

研究表明同型半胱氨酸(Hcy)是一种被认为与冠状动脉疾病、脑血管及外周血管疾病的独立危险因素^[1-5]。甚至认为与传统的指标相比,Hcy 具有更高的临床应用价值。但临床医师对目前血浆 Hcy 的检测及界定值的认识还缺乏统一认识^[6]。一般认为,血浆同型半胱氨酸(tHcy)正常值参考范围为小于 15 $\mu\text{mol/L}$ (高效液相色谱法),当 tHcy ≥ 15 $\mu\text{mol/L}$ 时,即为高 Hcy 血症(HHcy)。也有学者认为健康人血浆 tHcy 应小于 12 $\mu\text{mol/L}$ ^[7]。各生产商也根据所采用的检测方法 & 试剂本身,确定有各自的血浆 tHcy 正常值参考范围。因此,确定临床实验室所用试剂的健康人 tHcy 水平值范围尤为重要。本文借用 CLSI 标准化文件指导思想,对实验室在用的两种方法学(荧光法和循环酶法)检测 Hcy 水平正常值进行了验证和分析。

1 资料与方法

1.1 一般资料 来自深圳市龙岗区第二人民医院,在医院体检高峰期每天取健康人员临床标本 8 份,无溶血、黄疸、脂浊,连续 12 d。

1.2 仪器与试剂 美国贝克曼 LX20 全自动生化分析仪、美国专利产品 OP-162 微量荧光分析仪。国内某生物科技公司经药监局注册生产的适用于贝克曼生化分析仪的循环酶法 tHcy 检测试剂盒、济南杏恩生物科技有限公司经药监局注册生产的适用于 OP-162 微量荧光分析仪的 tHcy 荧光定量试剂盒。

1.3 方法

1.3.1 测定方法 循环酶法在贝克曼 LX20 仪器上测定;荧光法在 OP-162 微量荧光分析仪上测定。

1.3.2 方法学实验 每天取健康人员临床标本 8 份,现对本标本进行随机排序,按 1~8 编号,每份标本分别用荧光法和循环酶法进行双份测定,先按 1~8 的顺序测定第 1 次,再按 8~1 的顺序测定第 2 次,共测定 12 d 记录数据。计算测定值的中位数、平均值及两种方法学的相关系数,并绘制散点图,按 95%可信区间,确定出荧光法和循环酶法测定 Hcy 水平正常

值范围,并将该数值与生产商给定的正常水平值进行验证与分析。

1.4 统计学处理 应用 SPSS19.0 对荧光法和循环酶法进行相关性分析。

2 结 果

2.1 离群点的检查 计算每个样本重复测定的比值(荧光法为 BY_i 、循环酶法为 BX_i),比值超过 2 的将视为离群点,检验结果无效。经检查,无离群点出现。

2.2 方法对比的散点图 计算每个样本测定结果的均值(荧光法为 Y_i 、循环酶法为 X_i)并应用 SPSS19.0 绘制 Y_i 对 X_i 的散点图,见图 1。

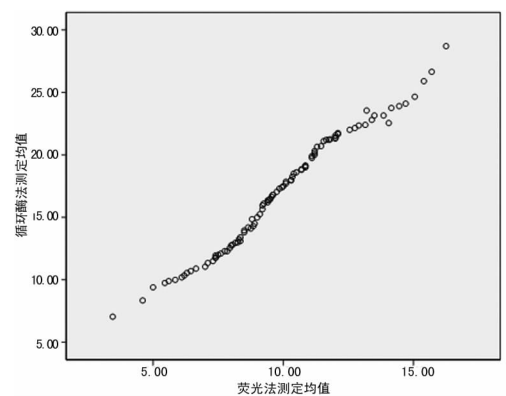


图 1 Y_i 对 X_i 的散点图

2.3 方法学相关性分析 结果在显著性水准为 0.01 水平(双侧)上显著相关, $r=0.988$ 。

2.4 两种方法的比较 计算两种方法学测定结果的极大值、极小值、中位数、平均值、标准差,并对两种方法学测定的样本结果进行排序,按 95%可信区间,确定出各自 Hcy 水平正常值范围,见表 1。很显然,循环酶法试剂盒说明书所宣称的按 95%分布区间 Hcy 水平正常值范围为 4.0~15.4 $\mu\text{mol/L}$ 与实验本身得出的 39.6%的分布比例是有巨大差距的。而荧光

* 基金项目:国家高技术研究发展“863”计划子课题(2011AA02A111)。

法试剂盒说明书宣称的按 95％分布区间 Hcy 水平正常值范围为小于 15 $\mu\text{mol/L}$ 与实验本身得出的 95.8％的分布比例是严格相符的。

表 1 两种方法的方法学比较

项目	酶循环法	荧光法
极小值($\mu\text{mol/L}$)	7.05	3.45
极大值($\mu\text{mol/L}$)	28.70	16.25
均值($\mu\text{mol/L}$)	16.968 2	9.902 6
标准差($\mu\text{mol/L}$)	4.745 2	2.6381 0
中位数($\mu\text{mol/L}$)	16.925	9.675
说明书宣称的 Hcy 水平正常值($\mu\text{mol/L}$)	4.0~15.4	<15
按说明书宣称的正常值在实验结果中的样本数	38	92
按说明书宣称的正常值占实验结果样本数的比例	39.60	95.80
按 95％分布 Hcy 水平正常值($\mu\text{mol/L}$)	4.0~24.1	<15

3 讨 论

tHcy 在体内主要以还原型、胱氨酸(氧化型)、同型半胱氨酸-半胱氨酸及同型半胱氨酸-胱氨酸二硫化物混合氧化型等形式存在,在血浆中有游离和蛋白结合体两种,前者占 20％,后者与清蛋白结合,占 70％~80％,统称为 tHcy^[8]。有人发现不同情况下游离形式和蛋白结合体可重新分布,较高的温度或储存时间较长,则 tHcy 迅速与蛋白结合,而游离体含量很少。血液离体后红细胞仍可不断地释放 Hcy 到细胞外液中,因此一般研究均以测定血浆标本为主,并且采血后应及时分离测定或冰冻。Hcy 测定过去曾用氨基酸分析仪测定,比较复杂且不稳定,20 世纪 80 年代开始应用高压液相色谱技术(HPLC)检测,质控稳定,应用广泛。Hcy 的正常参考值随测定方法和种族人群的不同而有所不同,一般正常空腹血浆 tHcy 水平为小于 15 $\mu\text{mol/L}$ 。

目前 tHcy 的测定方法主要有以下五种:同位素法、HPLC、荧光定量法、酶联免疫测定法、循环酶法。在临床实验室应用较为广泛的常规方法是高效液相色谱法和循环酶法。

本文所用的荧光法的检测原理是:检测时,首先将氧化态的同型半胱氨酸先用二硫苏糖醇还原,再用基因重组酶将同型半胱氨酸分解,所形成的产物再与适当显色剂反应形成可测量的荧光化合物,通过测定荧光的量值来确定 tHcy 的含量。整个过程中不需要抗体试剂加入反应。该方法具有灵敏度高、检测速度快的特点。

循环酶法的检验原理为:利用小分子捕获技术的 S-腺苷 Hcy(SAH)水解酶的方法,在三-乙-羧乙基膦作用下,氧化型 Hcy 被转化为游离型 Hcy,后者通过与共价底物 S-腺苷甲硫氨酸反应,生成蛋氨酸和 SAH。SAH 被 SAH 水解酶水解成腺苷和 Hcy,Hcy 经循环反应放大信号,同时产生腺苷,腺苷立即水解成氨和次黄嘌呤,氨在谷氨酸脱氢酶的作用下,使 NADH 转化为 NAD⁺,样本中的 Hcy 含量与 NADH 转化速率呈正比^[9]。循环酶法试剂可以在全自动生化分析仪上直接

操作,具有简便易操作的特点。

从实验的结果看,荧光法测定的结果稳定,与生产商提供的正常值完全一致,吻合度高,值得信赖。分析其实验过程可以看到,该方法是通过特定的微量荧光分析仪进行检测分析的,而荧光检测仪是高压液相色谱仪中最常用的一种检测器。因而,从某种角度上来说,该方法属于高效液相色谱法(检测 tHcy 的金标准)下的一个子方法,故而其结果稳定,数据可靠也就在预料之中。

而循环酶法采用的是小分子捕获技术及酶循环放大信号,在方法学上,有以下两个难点:其一,容易误将相对分子质量大小相差不大的半胱氨酸等一并捕获,而导致检测结果偏高;其二,通过酶循环放大信号,这对酶的纯度和稳定性都要求很高。否则多次放大后,小小的偏差或不稳定,都将导致较大的结果偏差,这与临床实际检测结果所反映的情况是一致的。

综上所述,荧光法由于方法学本身的优势,试剂质量稳定可靠,tHcy 水平正常值符合试剂盒本身所确定的和公认的小于 15 $\mu\text{mol/L}$,适合临床推广使用。若选用循环酶法试剂,应尽可能选用市场信誉度高的知名厂家,并进行必要的试用,确保质量稳定可靠,以正确指导临床应用。

参考文献

[1] Herrmann W. Significance of hyperhomocysteinemia[J]. Clin Lab,2006,52(7/8):367-374.

[2] Wald DS, Law M, Morris JK. Homocysteine and cardiovascular disease:evidence on causality from a meta-analysis[J]. BMJ, 2002,325(7374):1202.

[3] Wang X, Qin X, Demirtas H, et al. Efficacy of folic acid supplementation in stroke prevention;a meta-analysis[J]. Lancet,2007, 369(9576):1876-1882.

[4] Saposnik G, Ray JG, Sheridan P, et al. Homocysteine-lowering therapy and stroke risk,severity,and disability;additional findings from the HOPE 2 trial[J]. Stroke,2009,40(4):1365-1372.

[5] 王拥军,刘力生,饶克勤,等.我国脑卒中预防策略思考:同时控制高血压和高同型半胱氨酸水平[J].中华医学杂志,2008,88(47): 3316-3318.

[6] Castanon MM, Lauricella AM, Kordich L, et al. Plasma homocysteine cutoff values for venous thrombosis[J]. Clin Chem Lab Med,2007,45(2):232-236.

[7] Boushey CJ, Beresford SA, Omenn GS, et al. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes[J]. JAMA, 1995,274(13):1049-1057.

[8] Ueland PM, Refsum H, Stabler SP, et al. Total homocysteine in plasma or serum: methods and clinical applications[J]. Clin Chem,1993,39(9):1764-1779.

[9] 张传宝,赵海舰,谢结红,等.对循环酶法同型半胱氨酸测定试剂盒的评价[J].中华检验医学杂志,2006,29(3):270-272.

(收稿日期:2012-06-30)