

GGT 主要存在肝细胞膜和微粒体上,参与谷胱甘肽的代谢。肾脏、肝脏和胰腺中浓度较高,但血清中 GGT 主要来自于肝胆系统。GGT 的升高一般预示着肝脏的损伤,且其升高幅度与肝脏的损伤程度密切相关^[10]。本研究数据表明,肝癌、肝硬化、肝炎患者较健康体检者血清中的 GGT 水平均有不同程度的上升,肝癌组上升程度高于肝硬化组,且高于肝炎组。GGT 的升高提示存在肝内胆淤积,说明肝细胞和肝内毛细胆管的上皮也被破坏,肝硬化 GGT 升高严重,可能合并胆石症,需要进一步检测证实^[11]。

综上所述,在肝脏疾病中,随着肝组织损伤程度的不同,其合成的蛋白及酶在血清中的浓度都会发生不同程度的改变,检测血清中的 AFP、AFU、RBP、GGT 及 PA 在肝病的诊断中具有较高的应用价值。

参考文献

[1] 陈悦,龚作炯. 肝脏疾病诊疗进展[M]. 湖北:湖北科学技术出版社,2008.
 [2] 朱玉,王启之,燕善军. 肝硬化患者联合检测血清视黄醇结合球蛋白、前清蛋白、胆碱酯酶的临床意义[J]. 蚌埠医学院学报,2013,38(12):1561-1563.
 [3] 戴震. 血清前清蛋白、视黄醇结合球蛋白和总胆汁酸对肝硬化诊断的临床价值[J]. 中国老年学杂志,2012,32(13):2847-2848.

[4] 姚碧婉. 血清视黄醇结合球蛋白、前清蛋白、总胆汁酸、胆碱酯酶检测在肝脏疾病中的临床意义[J]. 中国临床新医学,2014,7(7):621-624.
 [5] 聂荣慧,刘元元. 肿瘤标志物 AFP、CA125、CA199 和 CEA 检测在肝炎、肝硬化患者诊断和治疗中的应用[J]. 吉林大学学报:医学版,2012,38(1):119-122.
 [6] 石亮,伍丽丽,林向阳. 慢性肝病患者血清中的诊断指标临床意义探讨[J]. 中华医院感染学杂志,2011,1(24):73-74.
 [7] 梁伟,陈洁. 血清 GGT、AFU、ALP 及 AFP 检测对肝癌的临床价值[J]. 中国医药导报,2010,13(7):24-26.
 [8] Giardina MG, Matarazaa M, Varriale A, et al. Serum alpha-L-fucosidase: a useful marker in the diagnosis of hepatocellular carcinoma[J]. Cancer, 1992, 70(5):1044-1048.
 [9] 蒙雨明. AFP、AFU、ALP、GGT 对肝病诊断的价值[J]. 黑龙江医学,2005,11(29):813-814.
 [10] 陈素珍. 原发性肝癌患者血清 HBV 标志物和 HBV-DNA 与其 AFP 水平的相关性分析[J]. 临床医药实践,2012,38(1):209-210.
 [11] 宴红. 血清 TBA 及 GGT 在肝病患者检测中的评价[J]. 实用医技杂志,2008,15(19):2486-2487.

(收稿日期:2015-10-28)

• 临床研究 •

类风湿因子对酶联免疫吸附试验和电化学发光免疫分析检测甲型肝炎 IgM 的影响探讨

胡慧琼¹, 刘 斌², 王 红¹, 吴增辉¹

(1. 湖北中医药高等专科学校, 湖北荆州 434020; 2. 湖北荆州市中心医院检验科, 湖北荆州 434020)

摘要:目的 探讨高浓度类风湿因子(RF)对酶联免疫吸附试验(ELISA)和电化学发光免疫分析(ECLIA)检测甲型肝炎病毒 IgM 抗体(Anti-HAV IgM)的影响,为临床明确诊断甲型肝炎提供依据。**方法** 60 例类风湿关节炎(RA)患者采用免疫比浊法检测 RF,用 ELISA 和 ECLIA 分别检测 Anti-HAV IgM,并比较 RF 吸附前后 ELISA 检测 Anti-HAV IgM 的吸光度(OD)值的差异。**结果** 60 例 RA 患者血清中,2 例确诊甲型肝炎患者采用 ELISA 和 ECLIA 法均检测出 Anti-HAV IgM 阳性,另 58 例 ELISA 法检出 Anti-HAV IgM 阳性 11 例,阳性率 18.96%(11/58);ECLIA 检出 Anti-HAV IgM 阳性 1 例,阳性率 1.72%(1/58),明显低于 ELISA 法,差异有统计学意义($P < 0.05$)。将 58 例 RA 患者血清用纯化的入 IgG 胶乳颗粒试剂吸附后重新进行 ELISA 检测,仅有 2 例阳性,吸附后的 OD 值较吸附前明显降低($P < 0.05$)。**结论** 血清中高浓度 RF 会引起 ELISA 检测 Anti-HAV IgM 的假阳性,而对 ECLIA 法检测结果干扰较小。

关键词: 类风湿因子; 假阳性; 酶联免疫吸附试验; 甲型肝炎病毒 IgM 抗体; 电化学发光免疫分析

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.03.040

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)03-0380-03

甲型肝炎病毒(HAV)是广泛传播的肝炎致病因子,它主要通过粪-口消化道途径引起人类感染。血清 HAV IgM 抗体(Anti-HAV IgM)是确定急性 HAV 感染的可靠指标^[1],患者于发病后 1~4 周血清中即可检出 Anti-HAV IgM,3 个月后滴度下降,6~8 个月后不易查出。故凡 Anti-HAV IgM 阳性,特别是滴度较高时,常提示为急性 HAV 感染或复发,目前临床上检测 Anti-HAV IgM 的常用方法是酶联免疫吸附试验(ELISA)^[2-3]。但在日常工作中发现,部分类风湿因子(RF)阳性,尤其是浓度较高的患者,用此方法检测 Anti-HAV IgM 时有假阳性出现。本研究通过对 60 例 RF 阳性患者分别用 ELISA 和电化学发光免疫分析(ECLIA)检测 Anti-HAV IgM,以进一步探讨 RF 对 Anti-HAV IgM 检测的影响,为临床明确诊断提供客观依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 荆州市中心医院住院和门诊收治的 60 例类

风湿关节炎(RA)患者,RF 处于高浓度状态,120~460 IU/mL,排除乙型肝炎、丙型肝炎,肝功能异常的患者,其中男 27 例,女 33 例,年龄 18~75 岁。所有患者均于清晨空腹抽取静脉血 2.0 mL,3 500 r/min 离心,分离出血清后于 -20 °C 保存至同批检测。

1.2 仪器与试剂 RF 检测仪器为罗氏 E601,RF 罗氏原装配套试剂盒;ELISA 法检出 Anti-HAV IgM,酶标仪为 Thermo 热电 Multiskan MK3,试剂盒由山东潍坊 3V 生物工程有限公司提供;ECLIA 法检出 Anti-HAV IgM,仪器为罗氏 E601,试剂为罗氏诊断甲型肝炎原装配套试剂盒。

1.3 检测方法 RF 采用免疫比浊法定量检测;Anti-HAV IgM 分别采用 ELISA 和 ECLIA 法检出。用纯化的入 IgG 胶乳颗粒试剂 50 μL 吸附 50 μL RF 血清后混合,在 37 °C 水浴反应 30 min 后,10 000 r/min 离心 15 min 取上清,进行 ELISA 检测 Anti-HAV IgM。以上检测均按试剂盒说明严格操作。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计学软件进行数据处理及统计学分析。计数资料用例数或百分率表示,组间比较采用配对 χ^2 检验。RF 吸附前后 ELISA 检测 Anti-HAV IgM 的结果采用配对 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 RF 吸附前 60 例高浓度 (120~460 IU/mL) RA 患者中, 2 例患者 ELISA 和 ECLIA 试验均检测出 Anti-HAV IgM 阳性, 确诊为甲型肝炎患者。另 58 例高浓度 RA 患者, ELISA 检出血清中 Anti-HAV IgM 阳性 11 例 (OD ≥ 0.15 为阳性), 阴性 47 例, Anti-HAV IgM 的阳性率为 18.96% (11/58); ECLIA 检测出 Anti-HAV IgM 阳性 1 例 (标本的 Cut-off 值大于或等于 1 为阳性), 阴性 57 例, Anti-HAV IgM 的阳性率为 1.72% (1/58)。在高浓度 RF 血清中, ECLIA 检测 Anti-HAV IgM 的阳性率明显低于 ELISA 法, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 1。

表 1 ELISA 和 ECLIA 检测 Anti-HAV IgM 的比较

检测方法	阳性(n)	阴性(n)	阳性率(%)	阴性率(%)
ELISA	11	47	18.96*	81.04
ECLIA	1	57	1.72	98.28

*: $P < 0.05$, 与 ECLIA 法比较。

2.2 RF 吸附后 60 例高浓度 RA 患者中, 除 2 例已经确诊甲型肝炎外, 将其余 58 例高浓度 RA 患者的血清标本用纯化的人 IgG 胶乳颗粒试剂按 1:1 的比例混合吸附后, 用 ELISA 法检测 Anti-HAV IgM, RF 吸附前 ELISA 法检测的 11 例阳性, 其中有 9 例转化为阴性, 只有 2 例阳性, 吸光度 (OD) 值分别为 0.183、0.256, 见表 2。其中 OD 值为 0.183 的血清吸附 RF 前后 ECLIA 检测都为阴性; OD 值为 0.256 的血清吸附 RF 前后 ECLIA 检测都为阳性。因此 ELISA 检测高 RF 水平血清, 假阳性率为 15.51%, 明显高于 ECLIA 法 0%。比较 58 例人 IgG 胶乳颗粒试剂吸附 RF 前后 ELISA 法检测的 OD 值, 吸附后的 OD 值明显低于吸附前的 OD 值 ($t = 3.716, P < 0.05$)。

表 2 11 例 RF 吸附前后 ELISA 检测的 OD 值

标本编号	吸附前 OD 值	吸附后 OD 值	RF(IU/mL)
0007	0.571	0.031	303.7
0017	0.462	0.011	254.8
0020	0.856	0.183	397.2
0021	0.681	0.021	279.3
0027	0.345	0.017	351.9
0030	0.229	0.034	243.3
0034	0.181	0.026	131.9
0036	0.462	0.015	299.1
0045	0.715	0.082	388.5
0052	0.354	0.018	267.7
0053	1.031	0.256	451.6

3 讨 论

RA 是一种病因未明的慢性、以炎性滑膜炎为主的系统性疾病。在临床上 RF 主要用于诊断 RA, 其检出率可达 80%~90%。RA 患者血清中 RF 呈持续阳性者和 RF 滴度呈高水平者, 预后往往较差^[4]。RF 是针对 IgG Fc 片段上抗原表位的一类自身抗体, 可分为 IgM、IgA、IgG、IgD、IgE 五型, 其中 IgM 型占 60%~78%, 是临床检验中常规方法所检出的主要类型。至今为止, 世界范围内的 HAV 毒株被分为 6 个基因型 I~IV, 但只有 I~III 型能感染人类^[5]。据文献报道 RF 阳性对于

ELISA 法检测甲型肝炎与丙型肝炎 IgM 抗体均有干扰^[6]。虽然由非特异性抗体引起的分析干扰的发生率近年来已经明显下降, 但是所有的免疫检出仍然存在假阳性和假阴性的可能性^[7-8]。在日常工作中发现, 部分 RF 阳性, 尤其是浓度较高的患者, ELISA 方法检测 Anti-HAV IgM 时有假阳性出现。在本研究中, RF 吸附前, 58 例 RF 高浓度患者中, ELISA 检出 Anti-HAV IgM 阳性 11 例, 阳性率为 18.96% (11/58); 11 例高浓度 RF 血清标本用纯化的人 IgG 胶乳颗粒试剂吸附后 (按 1:1 的比例混合), 其中有 9 例转化为阴性, 只有 2 例为阳性, OD 值分别为 0.183、0.256。说明在 RF 吸附前此 9 份标本 ELISA 检出的 Anti-HAV IgM 阳性是由 RF 干扰所致, 假阳性率为 15.51%。用 ECLIA 检测 58 例 RF 阳性的血清, 阳性 1 例, 其阳性率为 1.72% (1/58), 并且该阳性 RF 血清经吸附后 ELISA 和 ECLIA 检出的 Anti-HAV IgM 均为阳性, 假阳性率 (0%) 明显低于 ELISA 的 15.51%。这说明高浓度 RF 对 ELISA 检测 Anti-HAV IgM 有一定的影响, 会出现假阳性, 而对 ECLIA 检测干扰较小。其原因推测为 ELISA 检测 Anti-HAV IgM 时, 血清中抗 HAV 特异性抗体与 RF 同时结合固相抗人 μ 链抗体载体, 再加入特异抗原, 随后与加入的酶标抗体 (动物 IgG) 反应, 该抗体可分为两个片段, Fab 段和 Fc 段, RF 可与抗体的 Fc 段结合。当 RF 抗原的决定簇与 IgG 分子上段的空间结构有互补性时才有可能结合, 即只有标本中血清存有能与 IgG 结合的 RF 时, 并且 RF 必须达到一定的浓度, 才能够有效地与标本中的病毒肝炎 IgM 抗体竞争, 和抗 μ 链结合产生较高的非特异性结合, 已结合于固相载体上的 RF 会结合酶标记物, 进而与显色剂反应造成假阳性。ECLIA 法采用双抗体夹心法^[9], 标本中的 IgM 与 HAV 抗原和标记的 Anti-HAV 形成双抗体夹心复合物, 通过链霉亲和素与生物素的特异性结合使复合物结合到固相载体顺磁性微粒上, 大大提高了检测的灵敏度, RF 浓度低于 3 200 U/mL 没有任何干扰。该方法不受黄疸 (胆红素小于 50 mg/dL), 溶血 (血红蛋白小于 1.75 g/dL) 和血脂等干扰, 且 Anti-HAV IgM 高剂量钩状效应不会导致假阴性结果。

据文献报道, 使用 TaqMan Rt-PCR 方法可以检测 HAV 核酸 RNA^[10], 但因成本相对较高还未普及。因此在对高浓度 RF 血清标本进行 Anti-HAV IgM 检测时, 最好是对 RF 先中和, 然后再进行 ELISA 检测, 阳性者可以使用 ECLIA 法进行复检。有条件者还可以使用 TaqMan Rt-PCR 方法检测 HAV 核酸 RNA, 通过结合临床病史和其他检查结果进行综合判断, 排除干扰, 以此来提高检测结果的准确性与可靠性。

参考文献

[1] Chakvetadze C, Mallet V, Gaussec L, et al. Acute hepatitis A virus infection without IgM antibodies to hepatitis A virus[J]. Ann Intern Med, 2011, 154(7):507-508.

[2] 郭爱群, 唐荣德, 刘社炎, 等. 甲、丙、丁、戊型四型肝炎病毒抗体检测结果分析[J]. 海南医学, 2005, 16(8):142-143.

[3] 李建国, 吕民, 冯福, 等. 海口市儿童甲型肝炎抗体监测及免疫效果分析[J]. 中华流行病学杂志, 2002, 23(3):238.

[4] 王惠敏, 王金明. 类风湿关节炎患者 IgA IgM 类风湿因子的检测及临床意义[J]. 医学信息: 下旬刊, 2010, 23(12):4601-4602.

[5] Belalov IS, Isaeva OV, Lukashev AN. Recombination in hepatitis A virus: evidence for reproductive isolation of genotypes[J]. J Gen Virol, 2011, 92(Pt 4):860-872.

[6] 景红丽. 类风湿因子 (RF) 对 HAV-IgM、HCV-IgM 抗体检测的影响[J]. 大家健康: 中旬版, 2013, 7(1):35-36.

[7] Kricka LJ. Interferences in immunoassay-stin a threat[J]. Clin

Chem, 2000, 46(8):1037-1038.

[8] Eriksson S, Halenius H, Pulkki K, et al. Negative interference in cardiac troponin I immunoassays by circulating troponin autoantibodies[J]. Clin Chem, 2005, 51(5):839-847.

[9] 李红. 电化学发光免疫法检出抗 HAV-IgM[J]. 世界最新医学信

息文摘, 2013, 13(13):234-235.

[10] 徐德顺, 卢亦愚, 严菊英, 等. 甲肝病毒 TaqMan PCR 检测方法的建立[J]. 中国预防医学杂志, 2007, 8(3):229-232.

(收稿日期:2015-10-28)

• 临床研究 •

慢性粒细胞白血病患者外周血 Bmi1 mRNA 的表达水平

葛 熙, 赵 桦, 周 峰, 胡忠圣

(南通大学第二附属医院检验科, 江苏南通 226001)

摘要:目的 采用实时荧光定量 PCR(Rt-PCR)检测 Bmi1 基因表达的方法, 了解慢性粒细胞白血病(CML)患者外周血 Bmi1 基因的表达水平。方法 采用 Rt-PCR 方法检测 CML 患者 41 例和 10 例健康人外周血中 Bmi1 基因的表达水平。结果 Rt-PCR 的结果显示, 基因 Bmi1 在健康人、CML 患者慢性期、加速期及急变期中的表达相对值分别为 0.544 ± 0.233 、 1.624 ± 0.632 、 3.021 ± 0.923 及 3.561 ± 1.005 。CML 患者中 Bmi1 的表达水平明显高于健康人($P < 0.05$), 加速期及急变期中 Bmi1 的表达水平明显高于慢性期, 急变期 Bmi1 的表达水平明显高于加速期, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论 Bmi1 基因在 CML 外周血中有高水平的表达, 是监测 CML 患者病情进展及判断预后有价值的分子标记物。

关键词:白血病; Bmi1; 实时荧光定量聚合酶链反应

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.03.041

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)03-0382-02

慢性粒细胞白血病(CML)是血液系统恶性肿瘤之一, 起源于造血干细胞。临床上一般分为三期:慢性期、加速期和急变期。CML 是临床治疗过程中引起死亡的主要原因。关于 CML 急变的机制仍不明确。Bmi1 基因是干细胞自我更新的关键调控因子, 在血液肿瘤发病机制和治疗等方面具有较高的潜在价值, Bmi1 基因表达增高的病例更易转变为急性白血病^[1]。如何准确测定外周血 Bmi1 基因的表达水平以指导临床治疗, 是许多临床工作者关注的问题, 因此, 我们采用实时荧光定量 PCR(Rt-PCR)技术检测了 CML 患者外周血 Bmi1 基因的表达水平, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2010 年 1 月至 2014 年 12 月在南通大学第二附属医院就诊的门诊和住院部 CML 患者 41 例纳入研究组, 其中男 29 例, 女 12 例, 年龄 42~79 岁。所有患者均经临床、血象、骨髓象及组织化学染色检查, 符合 1981 年 FAB 协作组提出的分类诊断标准。其中急性变 9 例, 加速期 6 例, 慢性期 26 例。同期本院体检健康志愿者 10 例纳入对照组, 其中男 7 例, 女 3 例, 年龄 48~70 岁。

1.2 方法

1.2.1 RNA 的提取及 cDNA 合成 采集 2 mL 静脉血, 乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝, 加于等量的人淋巴细胞分离液上, 以 2 000 r/min 离心 15 min, 分离单个核细胞, 用吸管吸取, 提取外周血总 RNA(提取总 RNA 试剂盒为美国 Invitrogen 公司提供), 测 A260、A280 吸光度值, 计算出 RNA 水平, 使用 Promega 逆转录试剂盒, 按说明将 RNA 逆转录为 cDNA, -20 °C 冻存储备用。

1.2.2 Bmi1 基因表达的检测 Rt-PCR 1 μL 稀释的模板, 2 μL 引物对(5 μM), 7 μL 无菌去离子水, 反应混合溶液共 10 μL。每种引物, 每种模板, 都做 3 个平行管反应。引物设计 Bmi1 引物对为 5'-ATT CTA CCA GTC CCG AGG TTT G-3', 5'-GGT TCA ACT GCT CAT CAT AGC G-3'; 内参基因 GAPDH 引物对为, 5'-CAT CCA TGA CAA CTT TGG TAT C-3', 5'-CCA TCA CGC CAC AGT TTC-3'。Rt-PCR 反应程

序:95 °C 10 min, 95 °C 15 s, 60 °C 1 min。循环 40 次。取 3 个平行孔 Ct 比值的平均数, 计算同一个样品 Bmi1 的 Ct 值与 GAPDH 的 Ct 值比值, 作图时将正常对照的 Ct 比值平均数设为 1.0, 计算出所有样品的相对值后制图。仪器为 Applied Biosystems, ABI7500 型 Rt-PCR 仪。

1.3 统计学处理 采 SPSS19.0 软件进行数据处理及统计学分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两样本间的比较采用两独立样本 *t* 检验, 多组间比较用方差分析, 组间两两比较用 *q* 检验(LSD 法), 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

41 例 CML 患者 Bmi1 基因的表达水平显示, Bmi1 基因表达水平在急变期时高于加速期, 慢性期时表达水平最低, 3 组间的表达水平比较, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 41 例 CML 患者 Bmi1 基因的表达水平

组别	Bmi1 mRNA Ct 比值
对照组	0.544 ± 0.233
研究组	
慢性期	$1.624 \pm 0.632^*$
加速期	$3.021 \pm 0.923^{* \#}$
急变期	$3.561 \pm 1.005^{* \# \Delta}$

*: $P < 0.05$, 与对照组比较; #: $P < 0.05$, 与研究组慢性期比较; Δ: $P < 0.05$, 与研究组加速期比较。

3 讨 论

1991 年荷兰癌症中心的学者们在对小鼠淋巴瘤进行研究时, 发现了癌基因——Bmi1 基因, 开始被认为是癌基因 C-myc 的协同基因, 把它归属于多梳基因 PcG 家族; 进一步研究发现人类的 Bmi1 基因定位于 10 号染色体的短臂 1 区 3 带(10p13), 该区域与恶性淋巴瘤和儿童白血病的染色体移位有关, 研究还发现 Bmi1 基因与干细胞成长调控, 细胞分化及恶性病变密切相关^[2-7]。此外, Bmi1 基因在细胞周期的调节、细胞的永生化和衰老方面也发挥着重要作用^[8-9]。Bmi1 基因还