

· 论 著 ·

不同保存处理对尿标本 AD7C-NTP 检测结果的影响研究*

许程洁, 王智斌, 张杰, 唐义斌, 谭泰昌[△]

(四川省医学科学院/四川省人民医院检验科, 四川成都 610072)

摘要:目的 探讨不同保存条件和保存时间对尿液标本阿尔茨海默病(AD)相关神经丝蛋白(AD7C-NTP)检测结果的影响。**方法**于 2015 年 10 月至 2016 年 1 月,选取 AD 确诊患者 50 例,留取尿液标本,按不同保存条件分为室温保存组、4 ℃ 保存组、-20 ℃ 保存组,分别于不同时间检测 AD7C-NTP 水平;同时在 4 ℃ 保存组和 -20 ℃ 保存组分别加入防腐剂,在不同时间检测 AD7C-NTP 水平。**结果**室温保存组和 4 ℃ 保存组标本保存 3 d 内,检测结果与初始检测值比较差异无统计学意义($P > 0.05$);7 d 后,4 ℃ 保存组检测结果与初始检测值比较差异无统计学意义($P > 0.05$);-20 ℃ 保存组保存 1 d 后,检测结果与初始检测值比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。加入防腐剂后,4 ℃ 保存组检测结果稳定性不及未加防腐剂组,-20 ℃ 保存组检测结果稳定性增加,但检测偏差仍超过可接受范围。**结论**4 ℃ 不加防腐剂是用于检测 AD7C-NTP 水平的尿标本最理想保存条件。

关键词:神经丝蛋白; 阿尔茨海默; 保存; 尿**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2017.11.003**文献标识码:**A**文章编号:**1673-4130(2017)11-1447-03

Influence of different storage ways on the testing results of AD7C-NTP in urine specimen*

XU Chengjie, WANG Zhibin, ZHANG Jie, TANG Yibin, TAN Taichang[△]

(Department of Clinic Laboratory, Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu, Sichuan 610072, China)

Abstract: Objective To explore the influence of different preservation conditions and time period on the testing results of Alzheimer's disease(AD) associated neuronal thread protein(AD7C-NTP) in urine specimen. **Methods** From Oct. 2015 to Jan. 2016, urine specimen were collected from 50 AD patients, and divided into three groups, according to the different storage temperature, including room temperature group, 4 ℃ group and -20 ℃ group. Preservatives were added into specimen of 4 ℃ preservation group and -20 ℃ preservation group. AD7C-NTP level was detected at different preservation time of all specimen. **Results** The testing results of AD7C-NTP in specimen of room temperature group and 4 ℃ groups, detected within three days, were not significantly different with initial detection value($P > 0.05$). After seven days, the testing results in specimen of 4 ℃ group were not significantly different with initial detection value($P > 0.05$). However, after one day, the testing results in specimen of -20 ℃ group were significantly different with initial detection value($P < 0.05$). Contrast with 4 ℃ without preservative group, the adding of preservative could not increase the stability of AD7C-NTP. The adding of preservative in specimen of -20 ℃ could obviously increase stability, but the deviation of testing results was beyond acceptable limits. **Conclusion** 4 ℃ without preservatives could be the optimal storage condition for detection of AD7C-NTP in the urine.

Key words:neuronal thread protein; Alzheimer's disease; storage; urine

阿尔茨海默病(AD)是以认知功能和记忆功能损伤为主要特征的慢性进行性中枢神经系统变性疾病,患者确诊时往往已存在明显的神经元损伤,因此应在临床前期,即出现明确的病理学改变前,尽早实施预防性治疗,从而提高疗效和改善患者预后。目前,常用的 AD 诊断指标包括载脂蛋白 E(APOE) $\epsilon 4$ 等位基因、总 tau 蛋白、磷酸化 tau 蛋白等,但上述指标在 AD 和非 AD 患者之间存在明显的重叠现象,对 AD 的诊断灵敏性和特异性不是特别理想^[1]。阿尔茨海默病相关神经丝蛋白(AD7C-NTP)属神经丝蛋白(NTP)家族,用于 AD 诊断可显著提高诊断准确性^[2-4]。此外,AD 早期患者脑组织、脑脊液和尿液 AD7C-NTP 水平明显升高,并且其浓度水平与患者病情严重程度密切相关。因此,AD7C-NTP 也可用于 AD 早期诊断和患者病情评价^[5]。但关于标本储存条件对 AD7C-NTP 检测结果的影响研究鲜有报道。本研究旨在通过分析不同因素对 AD7C-NTP 检测结果的影响,确定适宜的标本保存方法,保证检测结果的准确性。现将研究结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2015 年 10 月至 2016 年 1 月本院收治的 AD 或疑似 AD 患者 50 例,男 35 例、女 15 例,平均年龄(62.0±2.5)岁。

1.2 仪器与试剂 美国赛默飞世尔公司 Multiskan Ascent 型酶标仪;深圳市安群生物工程有限公司双抗体夹心酶联免疫吸附法 AD7C-NTP 检测试剂盒。

1.3 方法

1.3.1 标本采集 采集所有受试对象晨尿中段尿标本,要求标本清亮,并经尿常规检测排除蛋白尿、血尿、菌尿,以及尿比重、pH 值异常标本。合格标本 3 000 r/min 离心 15 min,留取上清液标本。

1.3.2 标本处理及检测 (1)保存温度及时间的影响:在上清液标本留取后 20 min 进行 AD7C-NTP 检测,检测结果作为初始检测值。随后在 -20 ℃、4 ℃ 和常温条件下保存标本 7 d,每天对标本进行检测,记录检测结果。(2)防腐剂的影响:向留取

* 基金项目:四川省科技厅科技计划项目(30504010207)。

作者简介:许程洁,女,检验技师,主要从事临床免疫学研究。 △ 通信作者, E-mail:ttc7500@163.com。

的上清液标本中加入硼酸(终浓度为 0.01 g/mL)， 4°C 保存14 d；相同温度条件下保存未加入硼酸的上清液标本；每天对标本进行检测。向留取的上清液标本中加入甘油(终浓度50%)， -20°C 保存21 d；相同温度条件下保存未加入甘油的上清液标本；每天对标本进行检测。标本检测方法严格参照试剂盒及仪器说明书。计算不同保存条件下AD7C-NTP检测结果与初始检测值的偏差，检测偏差=（|不同保存条件下检测结果—初始检测值|）/初始检测值×100%。检测偏差大于15%判为偏差超过可接受范围。

1.4 统计学处理 采用SPSS19.0软件进行数据处理和统计学分析。计量资料组间比较采用t检验。 $P<0.05$ 为比较差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 不同温度储存条件对AD7C-NTP检测结果的影响 常温和 4°C 储存3 d内，AD7C-NTP检测结果与初始检测值比较差异无统计学意义($P>0.05$)；常温储存7 d后，检测结果与初始检测值比较差异有统计学意义($P<0.05$)， 4°C 储存7 d后，检测结果与初始检测值比较差异无统计学意义($P>0.05$)。 -20°C 储存1 d，检测结果与初始检测值比较差异有统计学意义($P<0.05$)。不同温度储存条件下检测偏差变化趋势见图1。

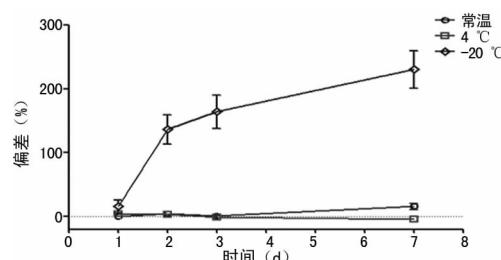


图1 不同温度储存条件下AD7C-NTP检测偏差变化趋势

2.2 防腐剂对检测结果的影响 加入硼酸后3 d内，检测结果与初始检测值比较差异无统计学意义($P>0.05$)，检测偏差在可接受范围内(检测偏差小于15%)，7、14 d检测结果与初始检测值比较差异有统计学意义($P<0.05$)，检测偏差超过可接受范围(检测偏差大于15%)。未加入硼酸的标本，14 d内检测结果与初始检测值比较差异无统计学意义($P>0.05$)，检测偏差在可接受范围内(检测偏差小于15%)。加入硼酸后检测偏差变化趋势见图2。加入甘油后21 d内，检测结果较为稳定，但检测偏差超过可接受范围(检测偏差大于15%)。未加入甘油的标本，21 d内检测结果与初始检测值比较差异有统计学意义($P<0.05$)，检测偏差超过可接受范围(检测偏差大于15%)。加入甘油后检测偏差变化趋势见图3。

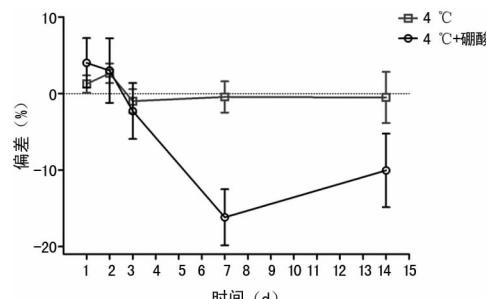


图2 加入硼酸后AD7C-NTP检测偏差变化趋势

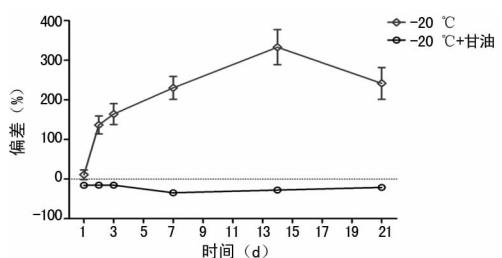


图3 加入甘油后AD7C-NTP检测偏差变化趋势

3 讨 论

全球60岁以上老年人AD发病率约为13%，85岁以上人群AD患病率高达45%，随着人口老龄化的加速，预计到2050年，全球将有8 000万AD患者^[6]。在老年人群中，AD的危害性也仅次于脑血管病^[7]。NTP是脑组织中的一类磷蛋白，在AD病变过程中，AD7C-NTP表达增加是神经元退行性变的早期事件，在神经纤维缠结形成之前即可出现。因此，AD7C-NTP检测可用于AD早期诊断^[8-9]。有研究证明，AD7C-NTP对AD具有较高的诊断灵敏度和特异度^[10-11]。对于临床实验室检测项目而言，影响检测结果较多的因素较多，包括检测前因素，直接影响最终的检测结果。因此，重视检测前质量控制，做好标本检测前处理，对保证检验结果准确性十分重要^[12]。

本研究结果显示，尿标本常温和 4°C 储存3 d内，检测结果与初始检测结果比较差异无统计学意义($P>0.05$)；常温保存标本3 d后检测结果开始出现明显变化， 4°C 条件保存7 d后，检测结果出现明显变化，可能是由于常温条件下，随着保存时间延长，细菌等微生物逐渐生长，也有可能是因为标本中蛋白质的降解影响了检测结果。 -20°C 保存标本对检测结果影响较大，可能是由于AD7C-NTP某些分子结构在低温条件下的稳定性降低，或是由于标本冻融导致某些大分子蛋白降解，形成的降解片段与AD7C-NTP检测试剂存在交叉反应，从而导致检测结果出现明显变化。本研究在 4°C 和 -20°C 两种保存温度条件下，分别加入 0.01 g/mL 硼酸和50%甘油作为防腐剂，结果显示， 4°C 条件下加入硼酸，保存3 d内的检测结果比较理想，但随着保存时间延长，其检测结果稳定性发生较为明显的变化，可能是因为硼酸不仅影响了微生物的生长，同时也改变了标本的酸碱性，从而导致AD7C-NTP降解加速； -20°C 保存条件下加入50%甘油后，AD7C-NTP检测结果与初始检测结果的偏差超过可接受范围。然而，不同保存时间标本检测结果比较显示，加入甘油有助于提高检测结果的稳定性，3周后的检测结果变化程度仍较小。因此，可以考虑在标准品配制过程中加入甘油。本研究局限性在于因标本量有限，仅分析了保存3周内检测结果的变化趋势，无法对3周后检测结果的变化进行分析。因此， -20°C 条件下的标本保存期限及检测结果变化趋势有待进一步研究。

综上所述，尿标本常温和 4°C 保存3 d，对AD7C-NTP检测结果没有明显影响。若标本需要保存2周， 4°C 不加防腐剂为最佳保存方案。无论短期或长期保存标本，建议不要采用 -20°C 冷冻保存的方法。向尿标本中加入50%甘油或 0.01 g/mL 硼酸作为防腐剂，对维持AD7C-NTP检测结果稳定性并无特别价值。

参考文献

- [1] Munzar M, Levy S, Rush R, et al. Clinical study of a urinary competitive ELISA for neural thread protein(下转第1451页)

($P<0.05$), 其中凝血酶处理组表达 3 种受体的细胞百分率最高; 随着 TanⅡA 浓度升高, 表达 ADP 受体、 α_2A -肾上腺素能受体及 TXA2 受体的细胞百分率逐渐降低。由此可见, TanⅡA 对血小板活化过程中的聚集及促凝功能等均有影响, 血小板活化过程中 G 蛋白及相关的 PARs、P2Y1 和 P2Y12 受体、 α_2A -肾上腺素能受体及 TXA2 受体的基因转录和蛋白表达均可被 TanⅡA 抑制。

综上所述, G 蛋白及相关信号分子参与了 TanⅡA 抗血小板作用, 从基因和蛋白水平为采用 TanⅡA 防治血栓性疾病提供了一定的理论依据。

参考文献

- [1] Stakos A, Tziakas N, Stellos K. Mechanisms of platelet activation in acute coronary syndromes [J]. Curr Vasc Pharmacol, 2012, 10(5): 578-588.
- [2] 赵战芝, 何钒, 唐雅玲, 等. 血小板因子 4 经 Toll 样受体 4 上调巨噬细胞基质金属蛋白酶 9 表达 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2014, 22(8): 769-773.
- [3] 徐筱跃. 丹参酮ⅡA 对免疫性血管炎、血小板及凝血活性的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2013, 33(17): 4201-4203.
- [4] 周丽美, 金烈, 朱潮涌, 等. 丹参酮ⅡA 磺酸钠对血液透析患者血小板聚集率及微炎症状态的影响 [J]. 浙江实用医学, 2016, 21(2): 98-99, 108.
- [5] 张铤. 血小板反应性与血栓出血事件的关系 [J]. 中国实用内科杂志, 2015, 35(1): 31-35.
- [6] 朱晋坤, 毛华, 尹扬光, 等. 阿司匹林和氯吡格雷对体外血小板黏附内皮细胞基质活性的影响及其机制研究 [J]. 中国全科医学, 2015, 18(3): 283-287.
- [7] 郑晓娜. 全身炎症反应综合征患者凝血功能变化研究 [J]. 中外医学研究, 2016, 14(10): 21-22.
- [8] 傅毅, 孙家兰, 赵静, 等. 血栓素 A2 受体 rs768963 基因多态性与血小板聚集功能的关系 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2011, 19(6): 525-528.
- [9] 郭三喜. 血小板活化因子在下肢深静脉血栓形成中的临床意义 [J]. 实用医技杂志, 2012, 19(12): 1301-1302.
- [10] Varenhorst C, James S. Which antiplatelet agent for whom? Which patient populations benefit most from novel antiplatelet agents (ticagrelor, prasugrel) [J]. Curr Cardiol Rep, 2012, 14(4): 486-492.
- [11] Wu Y, Wang P. Pharmacological actions and therapeutic applications of Salvia miltiorrhiza depside salt and its active components [J]. Acta Pharmacol Sin, 2012, 33(9): 1119-1130.
- [12] Xu SW, Liu PQ. Tanshinone II-A: new perspectives for old remedies [J]. Expert Opin Ther Pat, 2013, 23(2): 149-153.
- [13] 陈赟. 血小板膜糖蛋白与血栓性疾病 [J]. 新乡医学院学报, 2012, 29(3): 221-223.
- [14] 王华斌, 陈莉, 任宇, 等. 基于分子对接技术的血小板 P2Y12 受体拮抗剂研究现状 [J]. 药学进展, 2013, 37(3): 104-111.
- [15] 张茜, 程欣茹, 盛光耀. 血小板活化因子与新生儿疾病 [J]. 实用儿科临床杂志, 2011, 26(24): 1893-1895.
- [16] 张金洪, 孙永安. 血栓弹力图评价缺血性心脑血管病患者抗血小板药物疗效及影响因素 [J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2016, 18(6): 623-627.
- [17] 李殊, 贺彧, 冯媛媛. 丹参酮ⅡA 磺酸钠对冠心病患者血小板功能的影响 [J]. 临床医药实践, 2016, 25(3): 230-232.
- [18] 许建国. 前列地尔联合丹参酮ⅡA 治疗肾功能不全疗效观察 [J]. 中国现代医药杂志, 2013, 15(11): 49-50.
- [19] 杨涓, 董江川, 李大主, 等. 丹参酮ⅡA 磺酸钠对冠心病患者血小板功能的影响 [J]. 中医杂志, 2013, 54(15): 1294-1296.
- [20] 朱海兵, 刘琳, 冯李长, 等. G 蛋白信号转导调节 5 和血小板衍生因子受体 β 在慢性脑白质损伤后的表达 [J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2015, 17(6): 642-644.

(收稿日期: 2017-01-12 修回日期: 2017-03-18)

(上接第 1448 页)

- in Alzheimer disease [J]. Neurol Clin Neurophysiol, 2002, 16(1): 2-8.
- [2] Fitzpatrick J, Munzar M, Focht M, et al. 7C Gold urinary assay of neural thread protein in Alzheimer's disease [J]. Alz Rep, 2000, 3(3): 155-159.
- [3] Levy S, McConville M, Lazaro GA. Competitive ELISA studies of neural thread protein in urine in Alzheimer's disease [J]. J Clin Lab Anal, 2007, 21(1): 24-33.
- [4] 王蓉, 姬志娟, 盛树力, 等. 阿尔茨海默病尿神经丝蛋白方法的建立及其临床意义 [J]. 中华检验医学杂志, 2010, 33(1): 46-50.
- [5] 陈英道, 石胜良, 张健, 等. AD7C-NTP 对阿尔茨海默病轻度认知功能损害患者诊断的临床价值 [J]. 中华医学杂志, 2014, 94(21): 1613-1617.
- [6] Humpel C. Identifying and validating biomarkers for Alzheimer's disease [J]. Trends Biotechnol, 2011, 29(1): 26-32.

- [7] 江开达. 精神病学高级教程 [M]. 北京: 人民军医出版社, 2009: 58.
- [8] Neugroschl J, Davis KL. Biological markers in Alzheimer disease [J]. Am J Geriatr Psychiatry, 2002, 10(6): 660-677.
- [9] Forlenza OV, Diniz BS, Gattaz WF. Diagnosis and biomarkers of predementia in Alzheimer's disease [J]. BMC Med, 2010, 16(1): 81-89.
- [10] Zhang JJ, Shi SS. A literature review of AD7c-ntp as a biomarker for Alzheimer's disease [J]. Ann Indian Acad Neurol, 2013, 16(3): 307-309.
- [11] 孙宏侠, 白春艳. AD7C-NTP 在 AD 诊断中的研究进展 [J]. 中风与神经疾病杂志, 2007, 23(3): 374-375.
- [12] 何丽杰. 影响医学检验分析前质量的因素 [J]. 临床和实验医学杂志, 2012, 11(21): 1748-1749.

(收稿日期: 2016-11-12 修回日期: 2017-02-18)