

• 短篇论著 •

血清 HCO_3^- 酶法检测试剂改良路径的比较研究^{*}黄洁¹, 崔婷², 张炳峰², 张洁心^{2△}

1. 芜湖市中医医院检验科, 安徽芜湖 241000; 2. 南京医科大学第一附属医院检验学部, 江苏南京 210029

摘要: 目的 比较用于检测血清碳酸氢盐(HCO_3^-)浓度的生化试剂的开瓶稳定性和试剂组分有效性, 评估改良酶法试剂质量, 探讨其临床应用前景。方法 每天固定时间测量两种酶法试剂的空白吸光度值, 连续 20 d, 分别计算当天与第 1 天空白吸光度值的检测偏倚(B_A); 同时, 用不同底物浓度的改良酶法试剂测量同一份定值质控品, 连续 20 d, 分别计算检测值的前 n 天变异系数(CV)。结果 磷酸烯醇式丙酮酸羟化酶法(PEPC 法)试剂开瓶 20 d 内空白吸光度值 B_A 为 $-19.03\% \pm 6.01\%$, 最大可达 -28.35% 。方法学改良后的循环酶法(CEM 法)试剂的空白吸光度值 B_A 为 $-1.47\% \pm 3.19\%$, 最大 B_A 为 -11.3% 。使用 PEPC 法试剂检测低值和高值血清 HCO_3^- 质控品, 所得检测值前 n 天 CV 分别为 $6.50\% \pm 2.90\%$ 和 $6.34\% \pm 3.60\%$, 最大分别为 11.43% 和 13.64% 。使用 CEM 法试剂检测值 CV 分别为 $3.71\% \pm 1.19\%$ 和 $3.47\% \pm 2.22\%$, 最大分别为 6.05% 和 7.48% 。当加大 CEM 法试剂的底物还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸浓度, 检测值 CV 进一步分别降低至 $3.62\% \pm 1.18\%$ 和 $2.35\% \pm 1.27\%$, 最大分别为 4.92% 和 3.72% 。结论 CEM 法试剂开瓶稳定性高于 PEPC 法试剂, 反映出改良后检测方法学的优势。与此同时, 加大底物浓度可长期维持试剂组分有效性, 保证酶促反应稳定进行, 进一步提高检测结果准确性, 具有广泛的临床应用价值。

关键词: 血清碳酸氢盐检测; 生化试剂; 循环酶法; 还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2023.13.020

文章编号: 1673-4130(2023)13-1635-03

中图法分类号: R446.11

文献标志码: A

血液中二氧化碳(CO_2)主要以碳酸氢盐(HCO_3^-)形式存在。由 HCO_3^- 和碳酸(H_2CO_3)组成的缓冲液体系维持机体酸碱平衡和血液 pH 值。任何导致 pH 值超出范围的病理生理状态都属于酸碱平衡紊乱^[1]。流行病学研究发现, 血清 HCO_3^- 浓度与高血压、急性肾损伤进展、恶性肿瘤相关死亡率、心力衰竭有关^[2-6]。它还与糖耐量受损、糖尿病相关高风险因子之间存在相关性, 并可能成为糖尿病预防相关研究的新靶点^[7-8]。因此, 及时准确地获得血清 HCO_3^- 浓度对于动态观察机体酸碱平衡状态以及疾病鉴别诊断和预后判断尤为重要。

血清 HCO_3^- 浓度可通过血气分析仪或者生化分析仪进行检测。为了获得更加准确的结果, 临床医生多数选择留取静脉血进行生化检测。磷酸烯醇式丙酮酸羟化酶法(PEPC 法)是目前临床生化实验室应用最为广泛的检测血清 HCO_3^- 浓度的方法。循环酶法(CEM 法)是近几年新兴的改良酶法。本课题组前期报道了检测前环境因素可干扰血清 CO_2 浓度检测^[9]。考虑到生化试剂本身性能也会对标本检测结果产生重要影响, 本研究通过比较两种方法学试剂的开瓶稳定性和试剂组分有效性这两个方面, 进一步评估改良酶法试剂质量, 探讨未来临床应用价值。

1 材料与方法

1.1 仪器及试剂 Beckman Coulter 公司 AU5800

型全自动生化分析仪。CEM 法试剂 1(贝克曼库尔特公司, 以下称“C1 试剂”), CEM 法试剂 2(澳林生物科技有限公司, 以下称“C2 试剂”), PEPC 法试剂(迈克生物股份有限公司, 以下称“P 试剂”)。CEM 法试剂所含供氢体为乙酰基-还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(AcNADH), PEPC 法试剂所含供氢体为还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH), 其余试剂成分同。C1 试剂含 AcNADH 为 1.6 mmol/L , C2 试剂含 Ac-NADH 为 0.5 mmol/L , P 试剂含 NADH 为 0.5 mmol/L 。反应体系按照试剂盒说明书设置。质控品为美国伯乐公司的生化低值质控品(批号: 26461)和高值质控品(批号: 26462)。

1.2 方法

1.2.1 试剂开瓶稳定性 参考美国临床实验室标准化协会 EP25-A 文件^[10]结合本实验室每个月标本量和试剂使用量实际情况制定。C1 试剂和 P 试剂敞口置于生化分析仪内 4°C 保存。每天早上 8:30 检测试剂空白, 连续检测 20 d, 计算各试剂当天空白吸光度值与第一天空白吸光度值的检测偏倚(B_A)。

1.2.2 试剂组分有效性 参考美国临床实验室标准化协会 EP5-A3 文件^[11]结合本实验室每个月标本量和试剂使用量实际情况制定。将低值、高值质控品复溶, 各分装 20 份, 置于 4°C 密封保存。每天各取 1 份, 使用 C1 试剂、C2 试剂和 P 试剂分别进行检测, 连

* 基金项目: 江苏省“六大人才高峰”高层次人才项目(WSW-004)。

△ 通信作者, E-mail: jieixinzhang@njmu.edu.cn。

续检测 20 d, 计算检测值的前 n 天变异系数(CV)。

1.3 统计学处理 使用 SPSS26.0 统计软件进行计算、统计和绘图。计量资料的统计描述采用 $\bar{x} \pm s$ 。

2 结 果

C1 试剂和 P 试剂开瓶后 20 d 内空白吸光度值 B_A 均呈现下降趋势。其中, C1 试剂空白吸光度值 B_A 为 $-1.47\% \pm 3.19\%$, 最大变化 -11.3% ; 而 P 试剂空白吸光度值 B_A 为 $-19.03\% \pm 6.01\%$, 最大可达 -28.35% 。见图 1。

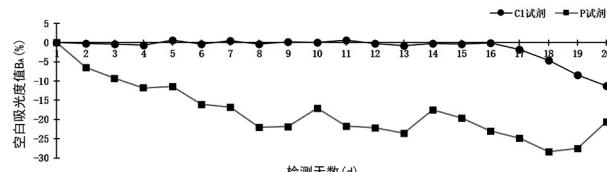
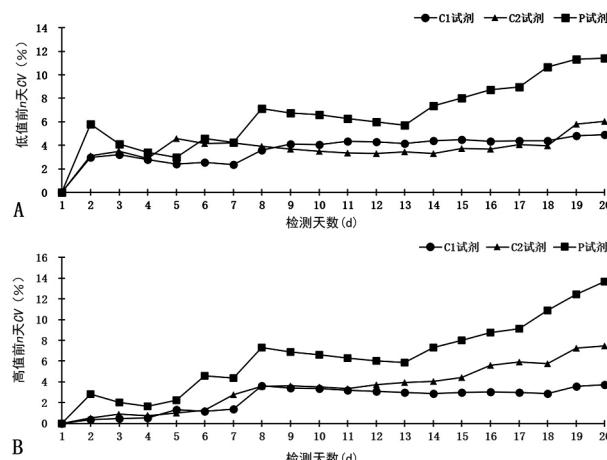


图 1 两种酶法试剂空白吸光度值 B_A 比较

使用 C1 试剂、C2 试剂和 P 试剂连续检测低值、高值质控品 20 d。3 个试剂的检测值前 n 天 CV 均呈增高趋势。将最大 CV 按从大到小排列依次为 P 试剂(11.43% 和 13.64%)、C2 试剂(6.05% 和 7.48%)和 C1 试剂(4.92% 和 3.72%)。P 试剂的低值质控品检测值前 n 天 CV 为 $6.50\% \pm 2.90\%$, 高值质控品检测值前 n 天 CV 为 $6.34\% \pm 3.60\%$; C2 试剂的低值质控品检测 CV 为 $3.71\% \pm 1.19\%$, 高值质控品检测 CV 为 $3.47\% \pm 2.22\%$ 。加大了底物 AcNADH 浓度的 C1 试剂, 其低值质控品检测 CV 为 $3.62\% \pm 1.18\%$, 高值质控品检测 CV 为 $2.35\% \pm 1.27\%$ 。见图 2。



注: A 为检测低值质控品; B 为检测高值质控品。

图 2 3 个试剂检测低值和高值质控品结果的前 n 天 CV 变化趋势

3 讨 论

NADH 是检测血清 HCO_3^- 浓度的生化试剂中的重要供氢体, 其在特定波长处有吸收峰。当 NADH 被中间产物氧化为无吸收峰的 NAD^+ , 反应液吸光度值的降低与血清中 HCO_3^- 的浓度成正比^[12]。由于试剂敞口存放在生化分析仪的试剂托盘上, 空气中的 CO_2 也可缓慢与试剂中 NADH 成分发生非特异

性反应, 导致试剂空白吸光度值随着试剂敞口时间延长而发生下降^[13-14]。CEM 法将 NADH 修饰成 Ac-NADH, 并增加一个独立的 AcNADH 循环再生酶促反应体系, 即添加葡萄糖组分作为供氢体, 在葡萄糖脱氢酶的催化下将氧化型 AcNAD 再次还原成 Ac-NADH, 从而形成闭环。理论上, 基于改良方法学的生化试剂能克服环境因素影响, 确保开瓶稳定性^[15]。本研究数据证实 CEM 法试剂的开瓶稳定性较 PEPC 法试剂有显著提升。

生化酶法检测血清 HCO_3^- 通常采用两点速率法, 即通过测定单位时间内吸光度的降低值来算得血清 HCO_3^- 浓度。此法一定程度上能抵消空白吸光度值波动所致的不良影响^[16-17]。底物浓度是决定反应速度最重要因素之一。只有当底物浓度足够大时, 酶促反应速度才能保持恒定, 使反应处于零级反应期, 此时酶促反应速度和酶浓度存在线性关系。随着反应时间增加, 底物浓度快速降低, 酶促反应速度逐渐减慢, 反应达到非线性期^[18]。两点速率法的吸光度读点区设定在线性期。若底物浓度不足, 零级反应期变短, 读点区在零级反应期之外, 检测线性范围将变小, 检测精密度变差^[19-22]。本研究结果表明, 当提高改良酶法试剂中 AcNADH 浓度至三倍, 可更加延长维持试剂成分有效性, 全面提高批间精密度。因此, 在采用 CEM 法的基础上进一步加大底物 AcNADH 浓度可保证改良酶法试剂质量, 提高实验室检验水平, 具有广阔的临床推广和应用前景。

参 考 文 献

- [1] 尹一兵, 倪培华. 临床生物化学检验技术 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2015.
- [2] FORMAN J P, RIFAS-SHIMAN S L, TAYLOR E N, et al. Association between the serum anion gap and blood pressure among patients at Harvard Vanguard Medical Associates [J]. J Hum Hypertens, 2008, 22(2): 122-125.
- [3] KENDRICK J, CHONCHOL M, YOU Z, et al. Lower serum bicarbonate is associated with an increased risk of acute kidney injury [J]. J Nephrol, 2021, 34(2): 433-439.
- [4] AL-KINDI SG, SARODE A, ZULLO M, et al. Serum bicarbonate concentration and cause-specific mortality: the national health and nutrition examination survey 1999-2010 [J]. Mayo Clin Proc, 2020, 95(1): 113-123.
- [5] LI Y, GAO R, ZHAO B, et al. Low serum bicarbonate levels increase the risk of all-cause, cardiovascular disease, and cancer mortality in type 2 diabetes [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2022, 107(11): 3055-3065.
- [6] KENDRICK J B, ZELNICK L, CHONCHOL M B, et al. Serum bicarbonate is associated with heart failure in the multi-ethnic study of atherosclerosis [J]. Am J Nephrol, 2017, 45(2): 118-126.
- [7] LI S, WANG Y Y, CUI J, et al. Are low levels of serum bicarbonate associated with risk of progressing to impaired fasting glucose/diabetes: a single-centre prospective study [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2022, 107(11): 3055-3065.

- tive cohort study in Beijing, China[J]. BMJ Open, 2018, 8(7):e019145.
- [8] ZHANG Y C, XIONG F R, WANG Y Y, et al. High bicarbonate concentration increases glucose-induced insulin secretion in pancreatic β -cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2022, 589: 165-172.
- [9] 苏看看, 陈欢欢, 张炳峰, 等. 检验前环境因素对 2 种酶法检测血清 CO₂ 影响的比较[J]. 临床检验杂志, 2021, 39(11): 868-870.
- [10] Clinical and Laboratory Standards Institute. Evaluation of stability of in vitro diagnostic reagents: EP25-A [S]. Wayne, PA: CLSI, 2009.
- [11] Clinical and Laboratory Standards Institute. Evaluation of precision of quantitative measurement procedures: EP5-A3[S]. Wayne, PA: CLSI, 2014.
- [12] 尚红, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程[S]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2015.
- [13] 杨文杰, 柯振符, 何寿国, 等. 酶法测定血清二氧化碳中试剂稳定性的研究[J]. 广东医学院学报, 2007, 25(1): 43-45.
- [14] 陈洁, 顾国宝, 华俊, 等. 液体单试剂酶法测定血清碳酸氢根[J]. 检验医学, 2006, 21(1): 52-54.
- 短篇论著 •
- [15] 朱红玉, 谢雄娥, 蒋琳. 循环酶法二氧化碳液体单试剂浓缩型的方法学评价[J]. 数理医药学杂志, 2014, 27(4): 385-387.
- [16] 陈桂明, 陶晓军, 赵芳. 速率法与终点法检测血清总二氧化碳的方法学评价[J]. 华北煤炭医学院学报, 2008, 10(1): 59-60.
- [17] 尚文章, 罗云杰, 郭斌, 等. 利用酶学速率法检测血清总二氧化碳[J]. 医学研究通讯, 2003, 32(11): 43-44.
- [18] 周毅. 浅谈酶促反应方法与影响酶促反应速度的因素[J]. 中国卫生标准管理, 2014, 5(23): 71-72.
- [19] 刘成, 刘爱华. 生化分析仪检测酶活性过程中底物耗尽的监测和处理[J]. 检验医学与临床, 2011, 8(4): 484-485.
- [20] 岳展伊, 唐古生, 杜大海, 等. 全自动生化分析仪检测酶活性过程中底物耗尽的监测和处理[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(4): 414-415.
- [21] 石应元, 董明国. 酶学测定两点法与速率法的探讨[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(9): 1056.
- [22] 穆润清, 王银铃, 颜青. AST 试剂中 NADH 含量变化对线性范围影响的研究[J]. 现代检验医学杂志, 2016, 29(1): 121-124.

(收稿日期: 2022-11-25 修回日期: 2023-03-26)

术前血清 MIC-1、DPYSL3、ITG β 6 水平与胃癌患者临床病理特征及预后的关系^{*}

高 瑞, 杨艳婷[△], 宋汉歌

空军军医大学第一附属医院消化内科, 陕西西安 710032

摘要: 目的 探讨巨噬细胞抑制因子-1(MIC-1)、二氢嘧啶样酶 3(DPYSL3)、整合素 β 6(ITG β 6) 血清水平与胃癌患者病理特征及预后的关系。方法 将 2017 年 1 月至 2018 年 12 月该院收治的胃癌患者 150 例纳入研究作为胃癌组, 另选择同期于该院体检的健康者 100 例作为对照组。检测并比较两组血清 MIC-1、DPYSL3、ITG β 6 水平, 分析 MIC-1、DPYSL3、ITG β 6 血清水平与 TNM 分期等病理特征的关系。术后对胃癌患者随访 3 年, 将患者分为死亡组和生存组。采用 ROC 曲线分析 MIC-1、DPYSL3、ITG β 6 对患者不良预后的预测价值。结果 胃癌组血清 MIC-1、DPYSL3、ITG β 6 水平分别与对照组比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。血清 MIC-1、DPYSL3、ITG β 6 水平与患者 TNM 分期、组织分化程度及淋巴结转移有关($P < 0.05$)。死亡组血清 MIC-1、DPYSL3、ITG β 6 水平均高于生存组($P < 0.05$)。多因素分析结果显示, TNM 分期为Ⅲ期、低分化、淋巴结转移及血清 MIC-1、DPYSL3、ITG β 6 升高是胃癌患者死亡的危险因素($P < 0.05$)。ROC 曲线显示, 血清 MIC-1、DPYSL3、ITG β 6 预测胃癌患者死亡的 AUC 分别为 0.796、0.785、0.812, 敏感度分别为 0.778、0.810、0.714, 特异度分别为 0.667、0.630、0.705。结论 胃癌患者的血清 MIC-1、DPYSL3、ITG β 6 水平显著上升, 并与肿瘤组织分化、TNM 分期、淋巴结转移有关, 3 项联合检测对评估患者预后的临床价值更高。

关键词: 巨噬细胞抑制因子-1; 二氢嘧啶样酶 3; 整合素 β 6; 胃癌

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2023.13.021

文章编号: 1673-4130(2023)13-1637-05

中图法分类号: R446.11

文献标志码: A

胃癌已成为消化系统最常见的一种肿瘤类型, 我国是胃癌的高发地区, 每年的死亡病例数约占世界总数的 45%, 每年新增病例超过 100 万, 死亡人数约 35

万^[1]。近年来, 由于新医疗技术的采用, 化疗药物及靶向药物的进步, 胃癌患者的预后得到显著改善, 但局部或远处转移患者的生存率仍较低。因此, 尽早了

* 基金项目: 陕西省科技计划项目(2017K26-06-18)。

[△] 通信作者, E-mail: 345562711@qq.com。