

反复冻融对血浆抵抗素和内脂素测定水平的影响

张林峰 李 莹 郭 敏 田 野 赵连成

摘 要 **目的** 探讨反复冻融对血浆抵抗素和内脂素测定水平的影响。**方法** 抽取 -70°C 保存的血浆标本 22 份,化冻后用酶联免疫吸附法(ELISA)检测血浆抵抗素和内脂素水平(冻融 1 次标本),同时将每份标本分装 2 管,一管放入 -20°C 冷冻后取出,室温融解,重复 3 次(冻融 4 次标本);另一份按相同方法重复 5 次(冻融 6 次标本),用同一试剂盒、在同一批内检测血浆抵抗素、内脂素水平。比较 3 种冻融方式间的差异。**结果** 标本在冻融 1 次、4 次和 6 次的情况下,抵抗素测定水平分别为 2.24 ± 0.99 、 2.01 ± 1.05 、 $1.89 \pm 1.01\text{ng/ml}$,内脂素测定水平分别为 16.3 ± 7.6 、 13.4 ± 6.3 、 $12.1 \pm 5.6\text{ng/ml}$,后两次检测抵抗素水平较第 1 次分别下降 10.3% ($t = 5.05, P = 0.000$) 和 15.6% ($t = 10.65, P = 0.000$);内脂素水平较第 1 次检测分别下降 17.8% ($t = 5.19, P = 0.000$) 和 25.8% ($t = 6.58, P = 0.000$)。**结论** 反复冻融对血浆标本中抵抗素和内脂素的水平有显著影响,提示在血标本贮存运输、测定和分析中要注意这一现象对研究结果的影响,避免标本的反复冻融。

关键词 冻融 血浆抵抗素 血浆内脂素 酶联免疫吸附法

中图分类号 R3

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.08.006

Effects of Repeated Freeze – thaw Cycles on Plasma Resistin and Visfatin Concentration. Zhang Linfeng, Li Ying, Guo Min, et al. Department of Epidemiology, Fuwai Hospital of the Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, National Center for Cardiovascular Disease, Beijing 100037, China

Abstract **Objective** To assess the effect of repeated freeze – thaw cycles on plasma resistin and visfatin concentration. **Methods** Plasma samples stored at -70°C were obtained from 22 patients and assayed for resistin and visfatin using enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Following baseline measurement, the samples were divided into two groups for each patient and assayed again, one group experienced 3 times of freeze and thaw cycles and the other group experienced 5 times of freeze and thaw cycles. Paired t test was used to test the significance of changes from baseline. **Results** The concentration of resistin for the three tests were $2.24 \pm 0.99\text{ng/ml}$, $2.01 \pm 1.05\text{ng/ml}$ and $1.89 \pm 1.01\text{ng/ml}$, respectively. Compared with baseline, the concentration of the second test decreased 10.3% ($t = 5.05, P = 0.000$) and the concentration of the third test decreased 15.6% ($t = 10.65, P = 0.000$). The concentration of visfatin for the three tests were $16.3 \pm 7.6\text{ng/ml}$, $13.4 \pm 6.3\text{ng/ml}$ and $12.1 \pm 5.6\text{ng/ml}$, respectively. Compared with baseline, the concentration of the second test decreased 17.8% ($t = 5.19, P = 0.000$) and the concentration of the third test decreased 25.8% ($t = 6.58, P = 0.000$). **Conclusion** Freeze – thaw cycle has a significant effect on the plasma resistin and visfatin concentration and could lead to the decrease of the results, which should be taken into account in the process of storage, ship and assaying the blood samples.

Key words Freeze – thaw cycle; Plasma resistin; Plasma visfatin; Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

检测血浆、血清等血液标本中的生物活性分子是医学研究和临床检验中的重要内容之一。有时血浆等血液标本需要保存较长时间方能进行测定,期间经常会因停电等多种原因使血液标本受到多次冻融。关于血标本冻融对生物活性分子检测水平的影响,国内外早有报道。一般认为冻融会造成血液标本中一些生物活性分子检测水平的下降^[1,2]。然而,也有一些研究认为血标本冻融对一些生物活性分子检测水

平的影响有限^[3-7]。笔者于 2011 年观察了多次冻融对血浆标本中抵抗素和内脂素检测水平的影响,结果如下。

材料和方法

1. 血浆标本:从 2010 年北京市石景山区中老年人居民心血管病危险因素调查冷冻保存的 1496 份血浆标本中随机抽取 22 份进行本研究的测定。所有血浆标本均于采集后用 EDTA 抗凝分离血浆置于 -70°C 冰箱保存,期间未经历过化冻。

2. 实验方法:检测采用酶联免疫吸附法(ELISA),试剂为尚柏生物医学技术(北京)有限公司提供的美国 Biosource 公司人抵抗素和人内脂素

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30901237)

作者单位:100037 中国医学科学院/北京协和医学院国家心血管病中心、阜外心血管病医院、心血管病国家重点实验室、社区防治部

ELISA 试剂盒,测定仪器为美国 Thermo 公司 Multi-skan MK3 型全自动多功能酶标仪。抵抗素测定每次的血浆用量为 25 μ l,内脂素测定每次的血浆用量为 20 μ l,按照说明书的方法进行操作。抵抗素和内脂素测定均用同一个试剂盒进行,将定制的 96 孔板分成 32 孔和 64 孔两部分分两批进行测定。将标本从 -70℃ 冰箱中取出,化冻混匀后用酶联免疫吸附法(ELISA)试剂盒检测血浆抵抗素和内脂素的水平(冻融 1 次标本),同时将标本分装两管,一管放入 -20℃ 冷冻后取出,室温完全融解后即再放入 -20℃ 冷冻,反复 3 次(其中两次隔夜冷冻时间在 12h 以上,另一次冷冻时间在 2h 左右,冻融 4 次标本);另一管则反复冻融 5 次(其中两次隔夜冷冻时间在 12h 以上,其余 3 次冷冻时间在 2h 左右,冻融 6 次标本),然后用同一试剂盒、在同一批内检测其血浆抵抗素和内脂素水平。

3. 统计学方法:比较 3 批(冻融 1 次、冻融 4 次和冻融 6 次)标本血浆抵抗素的检测水平,血浆抵抗素的水平以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,配对 t 检验比较检测结果间的差异,用重复测量的方差分析模型分析控制年龄、性别和服药情况后反复冻融对抵抗素和内脂素水平的影响,用 Pearson 相关系数和 Bland Altman 图检验不同检测结果间的相关性和一致性。采用 SAS9.4 软件进行分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

22 份标本中有 2 份为混匀质控血浆,其余 20 份标本中 8 份来自男性,12 份来自女性。20 例调查对象,年龄 52.5 ~ 78.2 岁,平均年龄为 61.9 岁,近 1 个月内服用药物者 10 例(其中服用阿司匹林者 5 例,服用头孢类抗生素者 1 例,服用甲硝唑者 1 例)。22 份标本在冻融 1 次、冻融 4 次、冻融 6 次的情况下,其抵抗素测定水平分别为 2.24 ± 0.99 、 2.01 ± 1.05 、 1.89 ± 1.01 ng/ml,其中后两次检测血浆抵抗素水平较第 1 次检测分别下降 10.3% (0.23 ng/ml, 95% CI: $0.14 \sim 0.34$ ng/ml; $t = 5.05$, $P = 0.000$) 和 15.6% (0.35 ng/ml, 95% CI: $0.29 \sim 0.43$ ng/ml; $t = 10.65$, $P = 0.000$);其内脂素测定水平分别为 16.3 ± 7.6 、 13.4 ± 6.3 、 12.1 ± 5.6 ng/ml,其中后两次检测血浆抵抗素水平较第 1 次检测分别下降 17.8% (2.9 ng/ml, 95% CI: $1.7 \sim 4.1$ ng/ml; $t = 5.19$, $P = 0.000$) 和 25.8% (4.2 ng/ml, 95% CI: $2.9 \sim 5.6$ ng/ml; $t = 6.58$, $P = 0.000$, 表 1)。对 20 份来自个体的标本采

用重复测量的方差分析模型调整年龄、性别和近 1 个月药物服用情况后在冻融 1 次、冻融 4 次、冻融 6 次的情况下,抵抗素测定水平分别为 2.18 ± 0.21 、 1.93 ± 0.22 、 1.82 ± 0.21 ng/ml,趋势检验 $F = 93.35$, $P = 0.000$,其内脂素测定水平分别为 15.8 ± 1.65 、 13.1 ± 1.42 、 11.8 ± 1.26 ng/ml,趋势检验 $F = 33.90$, $P = 0.000$ 。

表 1 血浆冻融次数对抵抗素测定水平的影响 (ng/ml)

标本	冻融次数		
	1 次	4 次	6 次
抵抗素			
n	22	22	22
均值	2.24	2.01	1.89
标准差	0.99	1.05	1.01
最小值	0.73	0.41	0.32
最大值	4.29	3.92	3.71
内脂素			
n	22	22	22
均值	16.3	13.4	12.1
标准差	7.6	6.3	5.6
最小值	5.7	3.8	3.2
最大值	31.1	30.6	27.4

进一步分析发现,尽管反复冻融后抵抗素和内脂素的测定水平有所降低,但不同测定之间抵抗素和内脂素水平存在高度的相关性和一致性(图 1、图 2)。冻融 4 次和冻融 1 次,抵抗素测定水平间的相关系数为 0.98 ($P = 0.000$),冻融 6 次和冻融 1 次,抵抗素测定水平间的相关系数为 0.99 ($P = 0.000$);冻融 4 次和冻融 1 次,内脂素测定水平间的相关系数为 0.95 ($P = 0.000$),冻融 6 次和冻融 1 次,抵抗素测定水平间的相关系数为 0.94 ($P = 0.000$);Bland Altman 图的结果显示,无论是抵抗素还是内脂素,冻融 4 次和冻融 1 次以及冻融 6 次和冻融 1 次间的 Bland Altman 图中绝大多数点都位于一致性界值之间;但对于抵抗素而言,Bland Altman 图中未见差值随浓度的变化趋势,而内脂素则显示出随浓度增高差值呈逐渐扩大的趋势。

讨 论

对血浆、血清等血液标本中生物活性分子的进行检测是医学研究和检验中一项重要内容,如何合理地保存和利用标本,保证检测结果的准确性,是研究者长期以来一直关注的一个问题。冻融是笔者在标本保存和检测过程中经常遇到的问题。研究的结果显示,冻融对不同检测指标的影响存在明显差异,如在杨俊等^[2]研究显示,血浆每冻融 1 次,生物活性肽含

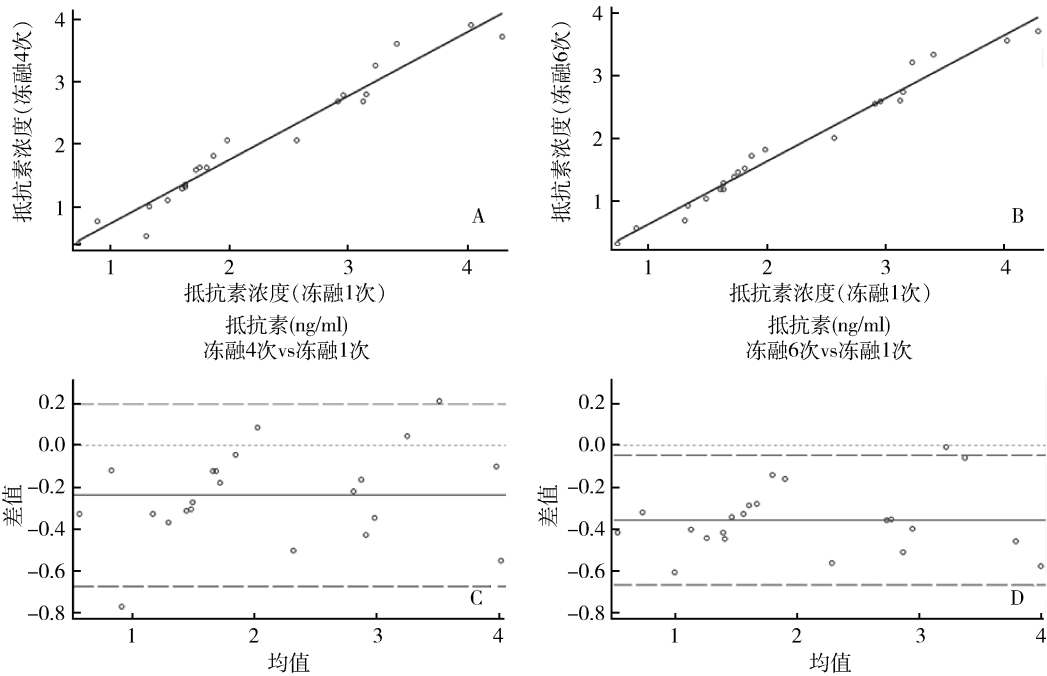


图 1 抗生素不同测定间的散点图和 Bland Altman 图

A 和 B 中实线是根据图中数据拟和的回归线;C 和 D 中实线表示均值的差值的均值,长虚线表示均值的差值 ± 1.96 倍的标准差

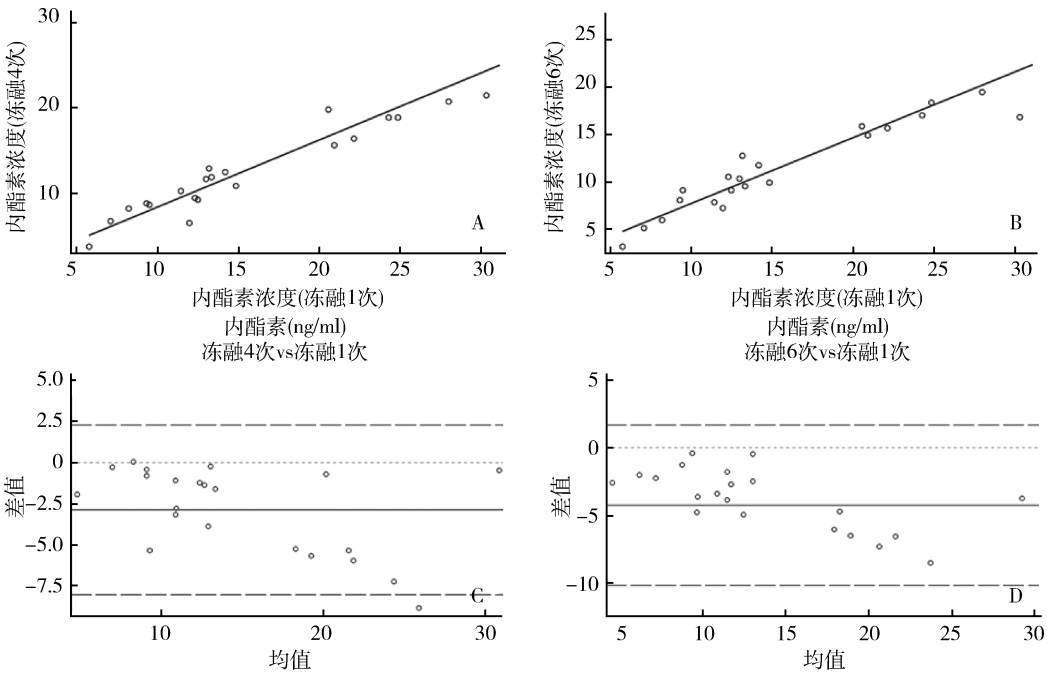


图 2 内脂素不同测定间的散点图和 Bland Altman 图

A 和 B 中实线是根据图中数据拟和的回归线;C 和 D 中实线表示均值的差值的均值,长虚线表示均值的差值 ± 1.96 倍的标准差

量均显著降低;而在高云朝等^[5]的研究则显示血清冻融对一些肿瘤标志物的影响并不明显,Cuhadar等^[7]的研究显示,长时间冻存(3个月)和反复冻融(多达10次)对谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)、肌酸激酶(CK)、 γ -谷氨酰基转移酶(GGT)等指标的影响并不明显,而对血尿素氮(BUN)、尿酸、总蛋白、白蛋白、乳酸脱氢酶等有显著影响。

笔者的观察结果显示,冻融对血浆中抗生素和内脂素的检测水平有显著影响,会造成抗生素检测水平的下降,在控制了年龄、性别和服药情况后结果依然

具有显著性。造成这种现象的原因可能是标本的反复冻融所产生的机械剪切力对标本中的蛋白质分子产生破坏作用,从而引起检测的抵抗素和内脂素水平下降。同时本研究的结果还显示,尽管反复冻融后抵抗素和内脂素的测定水平有所降低,但不同的测定之间抵抗素和内脂素水平存在高度的相关性和一致性,也就是说,尽管反复冻融可以影响抵抗素和内脂素的绝对水平,但对人群中的相对水平可能影响有限。

需要指出的是,本研究中的标本是分两批进行测定,但由于研究中没有质控血清,因而无法对测定可能存在的批内、批间变异对研究结果的影响进行估计。然而,本研究中两批测定用的是同一个试剂盒,冻融4次和冻融6次是在同一批进行测定,其结果也显示冻融对血浆中抵抗素和内脂素的检测水平存在显著影响(两次检测结果的 P 均=0.000)。另外,本研究中是在短时间内对标本进行多次反复冻融以观察冻融对抵抗素和内脂素检测水平的影响,这与实验室的实际情况可能存在差异。

笔者的研究结果再次提示,在血标本贮存、测定和分析中要注意这一现象对抵抗素和内脂素研究结

果的影响,避免标本的反复冻融。

参考文献

- 1 Brey RL, Cote SA, McGlasson DL, *et al.* Effects of repeated freeze - thaw cycles on anticardiolipin antibody immunoreactivity [J]. *Am J Clin Pathol*, 1994, 102(5): 586 - 588
- 2 杨俊, 黄祖汉. 反复冻融对标本生的活性肽含量的影响[J]. 第一军医大学学报, 1993, 13(2): 139 - 140
- 3 张静霞, 周红超, 徐德忠, 等. 血清反复冻融对 HBsAg 和抗 HBs 抗体检测的影响[J]. 第四军医大学学报, 2001, 22: 1084
- 4 董秀华, 李峰. 血清冻融次数对乙型肝炎 OD 值影响的观察[J]. 中国城乡企业卫生, 2008, 3: 40
- 5 高云朝, 顾建英, 陆汉魁, 等. 血清反复冻融对肿瘤标志物浓度的影响[J]. 中国实验诊断学, 2007, 11(1): 119 - 120
- 6 Rastawicki W, Smietańska K, Rokosz N, *et al.* Effect of multiple freeze - thaw cycles on detection of IgA, IgG and IgM antibodies to selected bacterial antigens [J]. *Med Dosw Mikrobiol*, 2012, 64(1): 79 - 85
- 7 Cuhadar S, Koseoglu M, Atay A, *et al.* The effect of storage time and freeze - thaw cycles on the stability of serum samples [J]. *Biochem Med; Zagreb*, 2013, 23(1): 70 - 77

(收稿日期:2016-01-29)

(修回日期:2016-02-05)

植入式胶囊渗透压泵在大鼠脑梗死模型 脑室给药中的应用

包新杰 施 浩 李雪元 左赋兴 关 健 窦万臣 王任直

摘 要 目的 探讨植入式胶囊渗透压泵对大鼠脑梗死模型(middle cerebral artery occlusion, MCAO)进行脑室内给药的可行性。**方法** 18只改良神经损伤严重程度评分(modified neurological severity scores, mNSS)在10~13分的SD雄性大鼠随机分成3组:渗透压泵给药组、常规给药组和对照组,每组各6只大鼠。模型前和模型后24h、3、7和14天分别行mNSS评分;模型后14天处死大鼠行2,3,5-三苯氯化四氮唑(TTC)染色并计算脑梗死体积。**结果** 模型后14天,渗透压泵给药组和常规给药组大鼠神经功能明显改善,mNSS评分均低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);渗透压泵给药组大鼠神经功能的恢复程度优于常规给药组大鼠,差异有统计学意义($P < 0.05$)。渗透压泵给药组大鼠的脑梗死体积为 $28.6\% \pm 5.8\%$,低于常规给药组($35.5\% \pm 7.6\%$)和对照组($38.2\% \pm 6.5\%$),和对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$);常规给药组大鼠的脑梗死体积小于对照组,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 植入式胶囊渗透压泵应用于大鼠脑梗死模型的脑室给药是可行和有效的,这种缓释的给药方式显著优于单次脑室内给药方式。

关键词 脑梗死 渗透压泵 脑室给药

中图分类号 R3 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.08.007

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81200916);国家高技术研究发展计划(“863”计划)项目(2014AA020513,2013AA020106)

作者单位:100730 中国医学科学院/北京协和医学院北京协和医院神经外科

通讯作者:窦万臣,电子信箱:wangrz@126.com