

流式细胞仪检测 P-selectin 和 t-PA 的方法学评价及临床应用*

陈洁¹, 黄山¹, 左丽^{2△}

(1. 贵州医科大学附属省人民医院检验中心, 贵阳 550002; 2. 贵州医科大学基础医学院, 贵阳 550001)

[摘要] **目的** 对 FACSArray 流式细胞仪检测 P 选择素(P-selectin)、组织型纤溶酶原激活物(t-PA)进行方法学性能评价,并观察其与冠心病各亚组的相关性。**方法** 用 FACSArray 流式细胞仪检测系统测定 P-selectin、t-PA 的精密度、准确度,对灵敏度、干扰试验等分析性能进行验证和评价。同时,对患有冠心病的患者血清 P-selectin、t-PA 浓度进行检测,观察其血清含量与冠心病的相关性。**结果** P-selectin、t-PA 的批内和批间变异系数分别为 4.23%~9.00%、4.63%~11.00%和 2.20%~2.90%、6.30%~12.20%;P-selectin、t-PA 的相对偏倚分别为 2.71%~5.28%和 1.23%~4.16%,检测灵敏度为 16.20 ng/L 和 1.21 ng/mL。高浓度的三酰甘油、血红蛋白和胆红素对 P-selectin 测定时的干扰率分别为 14.65%、13.89%和 10.94%,对 t-PA 测定时的干扰率分别为 15.65%、13.23%和 12.94%;各冠心病亚组 P-selectin 的浓度范围为(54 020.1±3 390.1)~(83 189.8±7 226.3)ng/L,t-PA 的浓度范围为(9.59±2.13)~(28.72±2.15)ng/mL,与对照组相比,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** FACSArray 流式细胞仪检测系统检测血清 P-selectin、t-PA 的分析性能符合规定的性能指标,能够满足实验室认可的需要。

[关键词] 流式细胞仪;方法学评价;冠心病;P 选择素;组织型纤溶酶原激活物**[中图分类号]** R331.1**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)34-4826-04**Methodology evaluation and clinical application of P-selectin and t-PA by flow cytometry***Chen Jie¹, Huang Shan¹, Zuo Li^{2△}

(1. Department of Inspection Center, The Affiliated People's Hospital of Guizhou Medical University, Guizhou, Guiyang 550002, China; 2. Basic Medical College of Guizhou Medical University, Guizhou, Guiyang 550001, China)

[Abstract] **Objective** P-selectin and t-PA were detected by FACSArray flow cytometry, and the correlation between different subgroups of coronary heart disease and coronary heart disease was observed. **Methods** The precision, accuracy, analytical sensitivity and interference test of P-selectin and t-PA were tested and evaluated by FACSArray flow cytometry. Detection of serum P-selectin and t-PA levels in patients with coronary heart disease and the correlation between serum levels of coronary heart disease and coronary heart disease. **Results** The intra and inter batch variation coefficients of P-selectin and t-PA were 4.23%–9%, 4.63%–11%, 2.20%–2.90%, 6.30%–12.20%, respectively; The relative bias of t-PA and P-selectin was 4.16%–5.28% and 1.23%–2.71%, respectively. Detection sensitivity is 16.20 ng/L and 1.21ng/mL. The interference rate of high concentration of triglycerides, hemoglobin and bilirubin on P-selectin was 14.65%, 13.89% and 10.94%, respectively, The interference rate of high concentration of triglycerides, hemoglobin and bilirubin on t-PA was 15.65%, 13.23% and 12.94%, respectively; The concentration range of P-selectin in each group of coronary heart disease was (54 020.1±3 390.1)ng/L–(83 189.8±7 226.3)ng/L, the concentration range of t-PA was (9.59±2.13)ng/mL–(28.72±2.15)ng/mL, compared with the control group ($P<0.05$). **Conclusion** The performance index of FACSArray flow cytometry can meet the needs of laboratory accreditation.

[Key words] flow cytometry; method evaluation; coronary heart disease; P-selectin; tissue plasminogen activator

近年来,许多新的心脏标志物伴随着医学技术的发展而在临床应用中不断发挥着重要的作用,已经为心脏疾病的诊断、疗效观察、危险性评估和预后估计等方面做出了重要的贡献^[1]。许多研究表明,在纤溶和血栓形成标志物,如 P-选择素(P-selectin)、组织型血浆纤溶酶原激活物(t-PA)参与了动脉粥样硬化的形成^[2]。临床实验室对这两种标志物的检测方法有很多,但是在方法学上存在线性较窄、可比性差、干扰因素多等缺点。为了保证患者检验结果的可靠性,满足实验室认可对方法学性能验证的要求^[3],本文利用美国临床和实验室标准协会(CLSL)的有关要求,对 FACSArray 流式细胞仪检测 P-se-

lectin、t-PA 行了方法学评价,现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 自 2014 年 9 月至 2015 年 3 月贵州医科大学附属人民医院内科住院患者和健康体检者,冠心病患者经冠状动脉造影术检查确诊,分为对照组和冠心病组。冠心病组中分为稳定性心绞痛(SAP)75 例,不稳定型心绞痛(UAP)75 例,急性心肌梗死(AMI)75 例。对照组为各体检指标合格的健康人群,共 75 例。冠心病组排除入院前行经静脉溶栓或经皮冠状动脉介入术(PCI)的患者^[4]。UAP 组和 SAP 组病例符合美国心脏病学会/美国心脏协会诊断标准。AMI 组所有病例均

* 基金项目:贵州省省长资金临床应用课题专项研究项目[黔省专合字(2012)117 号];贵州省卫生厅科学技术基金项目(gzkwj2012-1-129);贵州省卫生厅立项资助项目(gzkwj2012-1-062)。 作者简介:陈洁(1980-),主管检验师,硕士,主要从事免疫学的研究。 △ 通讯作者, E-mail: zuoliqymc@163.com。

表 1 P-selectin 和 t-PA 批内精密度验证试验结果

项目	浓度	检测范围	$\bar{x} \pm s$	CV(%)	CV(%)要求
P-selectin(ng/L)	39.06	33.35~47.25	38.89±3.50	9.00	<10
	10 000	9 885.54~10 710.41	10 013.17±423.20	4.23	<10
t-PA(ng/mL)	1.37	0.54~2.71	1.21±0.48	2.20	<10
	37.04	33.54~41.71	36.84±1.42	2.90	<10

表 2 P-selectin 和 t-PA 批间精密度验证试验结果

项目	浓度	检测范围	$\bar{x} \pm s$	CV(%)	CV(%)要求
P-selectin(ng/L)	39.06	31.36~49.23	38.07±4.23	11.00	<15
	10 000	9 874.12~10 780.34	10 001.38±463.21	4.63	<15
t-PA(ng/mL)	1.37	0.64~2.86	1.32±0.28	6.30	<15
	37.04	33.54~41.71	37.44±1.24	12.20	<15

符合中华医学会心血管病分会的诊断标准中关于 AMI 诊断标准。所有入选对象凡有下列情况者予以排除^[5-10]:血小板计数过低($<50 \times 10^9/L$)及服用血小板功能抑制剂者、严重的肾功能不全、糖尿病、急性感染期、高热、恶性肿瘤放/化疗、风湿活动期等。

1.2 方法

1.2.1 标本制备 在当天清晨冠状动脉造影检查术前,进行空腹无菌采集肘静脉血,分离血清冻存在-80℃医用冰箱内;以备同时检测 P-selectin 和 t-PA。

1.2.2 系统性评价 将 FACSArray 流式细胞仪校准后,应用 CLSI 的有关规则对流式细胞仪检测 P-selectin 和 t-PA 的精密度、准确度、灵敏度、干扰试验等分析性能进行系统性评价^[11];并检测冠心病各亚组血清中 P-selectin 和 t-PA 的浓度,并分析其浓度与冠心病各亚组的相关性。

1.2.2.1 精密度试验 分别选择高低两个浓度的 P-selectin 和 t-PA 的校准品进行精密度试验,批内精密度为对一样品同时重复检测 20 次计算均值、标准差和变异系数。批间精密度为对每个样品每天检测一次,连续 20 d,计算均值、标准差和变异系数。

1.2.2.2 准确度试验 选择一高一低两个浓度的 P-selectin 和 t-PA 校准品进行检测,以校准品的浓度为预期靶值,实际检测值为验证值,将验证值与预期靶值进行比对,计算验证值与靶值的相对偏倚(%)。

1.2.2.3 分析灵敏度(LLD)试验 分别选择 P-selectin 和 t-PA 的低值校准品进行灵敏度试验,以稀释液为空白样品,分别对空白样品和低值校准品进行 10 次检测,记录每次检测的荧光强度值,按照《实用临床实验室管理学》(丛玉隆主编,2011 年版)推荐方法经过计算即得 LLD。

1.3 仪器 FACSArray 流式细胞仪(美国 BD 公司)

1.4 试剂和标准品 生物素标记的羊抗人 P-selectin 单克隆抗体(批号 51-9006168,美国 BD 公司),P-selectin 校准品(批号 560426,美国 BD 公司);生物素标记的羊抗人 t-PA 单克隆抗体(BAM217,美国 R&D 公司);人 t-PA 校准品(10157-H01H1,北京义翘神州生物技术有限公司)。

1.5 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行统计学数据分析, $\bar{x} \pm s$ 表示计量资料,采用配对资料 *t* 检验进行组间比较,采用 χ^2 检验进行计数资料比较。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学

意义。

2 结 果

2.1 精密度验证试验结果 对高低两个稀释浓度的 P-selectin、t-PA 标准品进行精密度试验,其批内精密度结果见表 1;批间精密度试验结果见表 2。

2.2 准确度验证试验结果 P-selectin 和 t-PA 相对偏差要求均小于 20%,见表 3。P-selectin 的空白和低浓度样品的 MFI 的均值分别为 47.90 和 88.90,标准差分别为 2.76 和 4.04。按照 99.70%的可信度,空白样本 3 倍标准差为 $2.76 \times 3 = 8.28$,低浓度样品 MFI 88.90 扣除空白值 47.9 后为 41.00,因此, MFI 为 8.28 时相当于 P-selectin 检测灵敏度为: $8.28/41.00 \times 78.12 = 15.78(ng/L)$ 。t-PA 浓度的空白样本和低浓度样品的 MFI 均值分别为 0.3 和 8.5,标准差分别为 2.414 和 2.651,按照 99.70%的可信度,低浓度样品 MFI 8.5 扣除空白值 0.3 后为 8.2,空白样本 3 倍标准差为 $2.414 \times 3 = 7.242$,MFI 为 7.242 时,t-PA 检测灵敏度为: $7.242/8.2 \times 1.37 = 1.21(ng/mL)$ 。见表 4。

表 3 P-selectin 和 t-PA 准确度验证试验结果

项目	预期靶值	验证值	绝对偏差	相对偏差 (%)	相对偏差要求 (%)
P-selectin(ng/L)	39.06	40.12	1.06	2.71	<20
	10 000	10528.26	528.26	5.28	<20
t-PA(ng/mL)	1.37	1.74	0.37	1.23	<20
	37.04	38.65	1.61	4.16	<20

2.3 干扰试验 取患者血浆,加入聚苯乙烯微球、高低两个浓度水平的血红蛋白、三酰甘油和胆红素作干扰试验;聚苯乙烯微球、高浓度的三酰甘油(17 mmol/L)、血红蛋白(12 g/L)和胆红素(170 $\mu mol/L$)对 P-selectin 测定时的干扰率分别为 4.10%、14.65%、13.89%和 10.94%;对 t-PA 测定时的干扰率分别为 2.90%、15.65%、13.23%和 12.94%,对检测有一定的干扰。聚苯乙烯微球、低浓度的三酰甘油(0.76 mmol/L)、血红蛋白(0.5 g/L)和胆红素(1.7 $\mu mol/L$)对 P-selectin 测定时的干扰率分别为 2.10%、4.12%、3.98%和 2.43%;对 t-PA 测定时的干扰率分别为 1.95%、3.65%、3.76%和 2.94%,对检测干扰相对高浓度干扰物影响较小。

表 4 P-selectin 和 t-PA 灵敏度验证试验结果

项目	浓度	10 次检测 MFI 均值	标准差	低浓度标本扣 除空白后 MFI	分析灵敏度 (ng/L)	ELISA 法灵敏度 (ng/L)
P-selectin (ng/L)	0	47.90	2.76	—	15.78	34.00
	78.12	88.90	4.04	41.0		
t-PA (ng/mL)	0	0.30	2.414	—	1.21	0.20
	1.37	8.50	2.651	8.2		

—:表示没有意义,所以未计算。

2.4 对照组及冠心病组血清 P-selectin 和 t-PA 水平比较 对照组 P-selectin 和 t-PA 显著低于冠心病组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见表 5。

表 5 对照组与冠心病组血清 P-selectin 和 t-PA 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	P-selectin(ng/L)	t-PA(ng/mL)
对照组	4 512.20 ± 284.60	7.91 ± 3.40
SAP	54 020.10 ± 3 390.10 ^a	9.59 ± 2.13 ^a
UAP	70 979.80 ± 2 818.60 ^{ab}	18.72 ± 2.15 ^{ab}
AMI	83 189.80 ± 7 226.30 ^{ab}	28.72 ± 2.15 ^{ab}
<i>t</i>	22.67	34.12
<i>P</i>	0.003	0.001

^a: $P < 0.05$,与对照组比较;^b: $P < 0.05$,与 SAP 组比较。

3 讨 论

根据 ISO15189 医学实验室检验质量标准化的认证标准和美国《临床实验室改进法修正案》(CLIA88)的规定,实验仪器在用于临床之前必须对其不精密度、不准确度、分析灵敏度和干扰试验等主要分析性能进行验证。检验仪器的检测性能是否能够满足是否能够满足相关要求是医学实验室认可和“检验结果互认”的根本保证。本研究对 FACSArray 检测系统测定 P-selectin 和 t-PA 的分析性能进行验证,旨在验证流式细胞仪的方法学和仪器性能是否能满足实验室认可的需要,并且通过检测对照组和冠心病组血清 P-selectin、t-PA 的浓度差异,为冠心病的诊断提供一定的临床参考依据。

流式细胞仪检测系统检测血浆 P-selectin、t-PA 的方法学评价包括检测系统的精密度、准确度、灵敏度的评价以及干扰试验,检测系统精密度评价中,根据 CLIS EP5-A2 文件计算的批内和批间变异系数均在试剂说明书范围内^[12],也未超过 CLSI 要求一般免疫试验 20%的水平^[13],达到了公认的质量要求。在准确度试验中,P-selectin 和 t-PA 两个浓度的相对偏倚采用 CLSI EP9-A2 文件进行准确度验证和偏倚评估,远远小于 CLSI 要求 20%的允许误差范围内,达到公认的质量要求。流式细胞仪灵敏度检测试验中 P-selectin 和 t-PA 检测下限虽然与 ELISA 法相当,均能满足 CLSI 的相关要求,但两者的灵敏度均远远高于临床诊断所需要的检测灵敏度,能较好满足临床诊断的需要。另外通过干扰试验证实高浓度的胆红素、血红蛋白和三酰甘油对试验结果影响较大,应在标本准备时引起重视,聚苯乙烯微球以及低浓度的胆红素、血红蛋白和三酰甘油对试验结果干扰则相对较小。运用 FACSArray 流式细胞仪检

测系统测定了共计 225 例冠心病和 75 例对照组的 P-selectin 或 t-PA 的浓度值,两者的浓度在各冠心病亚组(SAP、UAP 和 AMI 组)中随着病情加重情况逐渐增加,结果有统计学意义。证明检测血清 P-selectin 和 t-PA 的浓度变化对冠心病的诊断和分层具有一定的临床应用价值。

目前,常用的免疫学检测方法主要有:(1)免疫金标法,能快速定性或半定量,该法标本用量少,但灵敏度低,易受主观因素影响。(2)电化学发光法,灵敏度和精密度均较高,但费用昂贵。(3)免疫比浊法,方便、快速、成本低,但误差较大,影响因素多,不利于方法比对。(4)ELISA 法,价格适中,灵敏度、准确度和精密度尚可,在临床上运用广泛,但是仍有一些缺点,如用 ELISA 法检测患者 P-selectin,通常会造造成“HOOK”效应(“HD-HOOK”),血清中 P-selectin 的浓度如果不在适当的范围内,会造成大量的假阴性结果。(5)微量样本多指标流式蛋白定量技术(cytometric bead array,CBA)是基于包被抗体的微球并利用流式细胞仪同时对多种蛋白质进行定量分析的创新性技术。每种微球具有特定的荧光强度,可以在一个试管中混合同时进行检测。这些临床常见的检测方法均存在标准化的问题,探索一种精密度、准确度和灵敏度好、快速、价廉的方法是临床急需解决的问题。

本研究采用流式细胞仪运用 CBA 技术对患者样本进行检测,相对于传统的 ELISA 方法来说,该方法需要的样本量小,检测速度更快,试验时间比单次 ELISA 大大缩短,一次检测就能提供需要做多次 ELISA 才能得到结果。研究者可自由组合检测指标,精密度、准确度均优于一般免疫学方法,灵敏度足够满足临床需要,但是仍需注意高浓度的三酰甘油、血红蛋白和胆红素对检测的影响,在样本的预处理中需要引起重视。

通过流式细胞术检测血清 P-selectin、t-PA 的浓度值,在对照组和冠心病各亚组(SAP、UAP 和 AMI 组)中浓度值呈递增趋势,与对照组相比差异具有统计学意义,对冠心病的诊断和分层具有一定临床应用价值。

综上所述,FACSArray 流式细胞仪检测系统检测血清 P-selectin、t-PA 的分析性能符合规定的性能指标,能够满足实验室认可的需要。比传统的免疫学方法具有更大优势,对冠心病患者血清 P-selectin、t-PA 的检测对冠心病及其亚组的诊断分层、治疗,危险度评估都有着重要的作用。

参考文献

- [1] 王传新,邹雄.科学合理应用心脏诊断标志物[J].中华检验医学杂志,2013,36(6):481-484.

- [2] 黄山,刘志琴,樊学军. 心脏标志物临床与检验[M]. 北京:人民卫生出版社,2012:23-45.
- [3] Hofman V, Ilie M, Washetine K. Accreditation of the activity of molecular pathology according to ISO 15189; key steps to follow and the main potential pitfalls[J]. *Annales De Pathologie*, 2013, 33(1):12-23.
- [4] 于佳新,刘晓坤. 经皮冠状动脉介入术和药物保守治疗单纯左前降支近端中度狭窄冠心病的临床疗效比较[J]. *中国老年学杂志*, 2015, 23(10):2677-2679.
- [5] 张艳,李惠萍,张庆娜,等. 冠心病患者出院后一年抗血小板药物治疗依从行为及其影响因素分析[J]. *中国实用护理杂志*, 2015, 31(9):647-650.
- [6] 陈楠楠,陈德,王加红,等. 心肌梗死患者感染的临床分析及干预措施[J]. *中华医院感染学杂志*, 2014, 24(4):882-884.
- [7] Idilman IS, Akata D, Hazirolan T, et al. Nonalcoholic fatty liver disease is associated with significant coronary artery disease in type 2 diabetic patients: a computed tomography angiography study 2[J]. *J Diabetes*, 2015, 7(2):279-286.
- [8] 叶显华,周亮,杨建敏,等. 冠心病患者感染性相关指标变化的临床研究[J]. *中华医院感染学杂志*, 2014(9):2197-2199.
- [9] 杜向慧,王升晔. 恶性肿瘤患者放化疗相关的心脏毒性损伤[J]. *中华心血管病杂志*, 2012, 40(11):982-984.
- [10] 周宇子,闫丽荣,张倩,等. 冠心病合并类风湿性关节炎患者发生心肌梗死的影响因素研究[J]. *中国全科医学*, 2015(13):1534-1536,1544.
- [11] 徐建华,刘冬冬,戴永辉,等. CLSI EP9-A3 在临床生化方法学比对中的应用[J]. *中华检验医学杂志*, 2015, 38(5):346-348.
- [12] Bousac A, Rutherford AW, Sugiura M. Electron transfer pathways from the S2-states to the S3-states either after a Ca²⁺/Sr²⁺ or a Cl⁻/I⁻ exchange in Photosystem II from *Thermosynechococcus elongatus* [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1847(6/7):576-586.
- [13] 刘锡娟,丁慧荣,张宏. 用 DAPI 和 Hoechst33342 染色法检测 DNA 的流式细胞方法探讨[J]. *北京大学学报(医学版)*, 2010, 42(4):480-484.

(收稿日期:2016-06-20 修回日期:2016-08-08)

(上接第 4825 页)

- [20] Ferrannini E, Berk A, Hantel S, et al. Long-term safety and efficacy of empagliflozin, sitagliptin, and metformin: an active-controlled, parallel-group, randomized, 78-week open-label extension study in patients with type 2 diabetes[J]. *Diabetes Care*, 2013, 36(12):4015-4021.
- [21] Ferrannini E, Muscelli E, Frascerra S, et al. Metabolic response to sodium-glucose cotransporter 2 inhibition in type 2 diabetic patients[J]. *J Clin Invest*, 2014, 124(2):499-508.
- [22] Hansen HH, Jelsing J, Hansen CF, et al. The Sodium glucose cotransporter type 2 inhibitor empagliflozin preserves β -cell mass and restores glucose homeostasis in the male zucker diabetic fatty rat[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2014, 350(3):657-664.
- [23] Eckel RH, Kahn SE, Ferrannini E, et al. Endocrine society; American diabetes association; European association for the study of diabetes, obesity and type 2 diabetes: what can be unified and what needs to be individualized? [J]. *Diabetes Care*, 2011, 34(6):1424-1430.
- [24] Bolinder J, Ljunggren Ö, Kullberg J, et al. Effects of dapagliflozin on body weight, total fat mass, and regional adipose tissue distribution in patients with type 2 diabetes mellitus with inadequate glycemic control on metformin[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2012, 97(3):1020-1031.
- [25] Toubro S, Cefalu WT, Xie J, et al. Canagliflozin, a Sodium glucose co-transporter 2 inhibitor, reduces body weight mainly through loss of fat mass in subjects with type 2 diabetes[J]. *Diabetologia*, 2012, 55(1):313-314.
- [26] Chilton R, Tikkanen I, Cannon CP, et al. Effects of empagliflozin on blood pressure and markers of arterial stiffness and vascular resistance in patients with type 2 diabetes[J]. *Diabetes Obes Metab*, 2015, 17(12):1180-1193.
- [27] List JF, Whaley JM. Glucose dynamics and mechanistic implications of SGLT2 inhibitors in animals and humans [J]. *Kidney Int*, 2011(120 Suppl):S20-27.
- [28] Oelze M, Kröller-Schön S, Welschof P, et al. The sodium-glucose co-transporter 2 inhibitor empagliflozin improves diabetes-induced vascular dysfunction in the streptozotocin diabetes rat model by interfering with oxidative stress and glucotoxicity[J]. *PLoS One*, 2014, 9(11):e112394.
- [29] Barnett AH, Mithal A, Manassie J, et al. Efficacy and safety of empagliflozin added to existing antidiabetes treatment in patients with type 2 diabetes and chronic kidney disease: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial[J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2014, 2(5):369-384.
- [30] Zinman B, Wanner C, Lachin JM, et al. Empagliflozin, cardiovascular outcomes, and mortality in type 2 diabetes [J]. *N Engl J Med*, 2015, 373(22):2117-2128.

(收稿日期:2016-05-18 修回日期:2016-08-06)