

标本处理方法对 ECP 水平的影响

赵俊芳 王学谦 李桂珍 李会强

作者单位:300120 天津市,天津市长征医院(赵俊芳 李桂珍)

300211 天津市,天津市天津医院(王学谦)

300070 天津市,天津医科大学(李会强)

【摘要】 目的 研究血液样品采集过程中温度、抗凝剂和溶血对嗜酸性粒细胞阳离子蛋白(eosinophilia cationic protein, ECP)水平的影响。**方法** 收集 20 例荨麻疹患者(荨麻疹组)及 20 例健康志愿者(对照组)静脉血标本,在 6 种不同条件(0℃,室温,37℃,溶血,肝素钠,EDTA)下处理后,用 ELISA 试剂盒检测 ECP 水平,探讨上述因素对 ECP 测定结果的影响。**结果** 对照组,0℃和室温条件下血清 ECP 检测水平经比较,差异无统计学意义($P>0.05$);37℃条件时,血清 ECP 检测水平明显高于 0℃和室温条件下的检测水平,差异均具有统计学意义(P 均 <0.01)。荨麻疹组,0℃和室温条件下血清 ECP 检测水平经比较,差异无统计学意义($P>0.05$);37℃条件时,血清 ECP 检测水平为明显高于 0℃和室温条件时,差异均具有统计学意义(P 均 <0.01)。对照组、荨麻疹组在不同温度条件下,无抗凝剂以及加肝素钠或 EDTA 抗凝的血清与血浆 ECP 检测水平差异均无统计学意义(P 均 >0.05)。两组溶血标本与不溶血标本 ECP 检测水平经比较,差异均有统计学意义(P 均 <0.01)。**结论** 温度、溶血对 ECP 检测水平有不同程度的影响;抗凝剂对 ECP 检测水平影响不显著。

【关键词】 嗜酸性粒细胞阳离子蛋白;血样采集;酶联免疫吸附测定

Influences of the blood specimen collection treatment on the ECP level determination

ZHAO Jun-fang¹, WANG Xue-qian², LI Gui-zhen¹, et al. ¹The Tianjin Changzheng Hospital, Tianjin 300120, China ²The Tianjin Hospital, Tianjin 300211, China

【Abstract】 Objective To study on the influences of the treatments including temperature hemolysis and anti-coagulation agent during the blood sample collection on the eosinophilia cationic protein (ECP) level. **Methods** Blood samples were collected from 20 urticaria patients (urticaria group) and 20 healthy volunteers (control group) and treated under 6 different conditions (0℃, room temperature, 37℃, hemolysis, sodium heparin, EDTA). ECP levels were detected by ELISA test kit. The influences of the treatments on ECP determination were discussed. **Results** There were no statistical difference between the two conditions of 0℃ and room temperature of the ECP level in the control group ($P>0.05$). The ECP level in 37℃ was significantly higher than the 0℃ and room temperature conditions, and the difference had statistical significance (P all <0.01). There was no statistical difference between 0℃ and room temperature conditions in the level of ECP in urticaria group ($P>0.05$). The ECP level of urticaria group in 37℃ was significantly higher than 0℃ and room temperature, and the difference had statistical significance (P all <0.01). There was no statistical difference between the serum which were treated by sodium heparin and EDTA and which were not treated by anticoagulants in different temperature in the two groups (P all <0.01). There were statistical difference between hemolysis and non-hemolysis conditions in the level of ECP in the two groups (P all <0.01). **Conclusion** Temperature and hemolysis affect the ECP level in different degrees. But there is no significant influence of anti-coagulation agent on ECP level.

【Key words】 Eosinophil cationic protein; Blood specimen collection; Enzyme-linked immunosorbent assay

嗜酸性粒细胞阳离子蛋白(eosinophilia cationic protein, ECP)是一种相对分子质量为 21×10^3 的碱性蛋白,存在于嗜酸性粒细胞(eosinophil, EOS)颗粒的基质部分,占颗粒的 30%,具有较强的杀灭寄生虫和细菌功能,同时它又是 EOS 活化的重要标志^[1]。近

年来很多研究结果表明,血 ECP 水平与过敏性疾病的发生发展密切相关,被认为是疾病诊断、病情监测的较好指标。据报道,血样采集处理过程中的许多因素可影响血中 ECP 浓度^[2],严格控制血样处理过程、选择最适条件是非常重要的。本实验着重探讨血样

采集处理过程中温度、抗凝剂和溶血等因素对 ECP 检测水平的影响。

1 资料与方法

1.1 样本来源及采集方法 选择我院门诊确诊荨麻疹患者 20 例,男 12 例,女 8 例,年龄在 11~42 岁之间,健康志愿者 20 例,男 9 例,女 11 例,年龄在 25~50 岁之间,均无过敏史。抽取静脉血 8 ml,均分为 8 份,编为 1~8 号。1~4 号血清不加抗凝剂,1 号置于冰水浴(0℃),2 号置于室温(22℃),3 号置于 37℃水浴,4 号以外力破坏红细胞后置于室温,5~6 号用肝素抗凝,5 号置于冰水浴,6 号置室温(22℃),7~8 号为 EDTA 抗凝,7 号置于冰水浴,8 号置于室温。所有血样静置 1 h 后,离心半径 40 cm,1 500 r/min 离心 15 min,立即分离上清,-20℃保存。

1.2 ECP 水平测定 采用天津沃克生物科技公司的 ECP 双抗夹心 ELISA 检测试剂盒测定。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 10.0 统计软件,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,并运用单因素方差分析进行多组间比较,两组间比较用 t 检验。

2 结果

2.1 不同温度对血清标本的影响 由表 1 可见,对照组、荨麻疹组在室温及 0℃环境凝结收集的血清 ECP 检测水平差异无统计学意义($P > 0.05$),37℃条件下凝结获得的 ECP 检测水平显著高于 0℃和室温时,且差异均具有统计学意义(P 均 < 0.01)。不同温度下,荨麻疹组 ECP 检测水平要高于正常对照组,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 对照组及荨麻疹组不同温度下 ECP 水平($\bar{x} \pm s$, ng/ml)

组别	例数	0℃	室温	37℃
对照组(1)	20	5.58±1.13	5.75±1.15	24.44±5.78
荨麻疹组(2)	20	20.72±8.00	20.73±7.80	70.02±25.94

注:1.各组不同温度的比较:对照组 $F=97.62, P<0.05$,荨麻疹组 $F=42.31, P<0.05$ 。2. 每组不同温度间的两两比较:0℃与室温比较 $q_1=3.022, q_2=0.063, P$ 均 > 0.05 。0℃与 37℃比较, $q_1=-11.7, q_2=-8.397, P$ 均 < 0.01 。室温与 37℃比较, $q_1=-11.4, q_2=-8.338, P$ 均 < 0.01 。

2.2 不同抗凝剂对 ECP 检测水平的影响 结果见表 2,各组不同温度下,无抗凝剂、EDTA、肝素对于

ECP 的检测水平无显著影响,差异均无统计学意义(P 均 > 0.05)。

2.3 标本溶血对 ECP 水平的影响 两组溶血标本与不溶血标本 ECP 检测水平比较,差异均有统计学意义(P 均 < 0.01),结果见表 3。

表 3 标本溶血对 ECP 水平的影响($\bar{x} \pm s$, ng/ml)

组别	例数	不溶血标本	溶血标本
对照组	20	5.75±1.15 [*]	30.97±5.99 [*]
荨麻疹组	20	20.73±7.80 [△]	74.58±24.33 [△]

注:^{*} 对照组 $t=13.06$,[△]荨麻疹组 $t=6.64$

3 讨论

ECP 作为 EOS 活性标记,对变态反应疾病的诊断、治疗和疗效判定具有重要意义。很多研究表明 ECP 作为反映 EOS 活化程度的指标,可用于哮喘气道炎症的辅助诊断^[3]。目前 ECP 的检测方法包括放射免疫分析、化学发光免疫分析和 ELISA 等。据报道^[4],ECP 在样品处理过程中会自主释放,在 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 等二价阳离子存在时,ECP 释放量与离心获得血清前全血放置的时间、温度有关,而且处理标本的容器对其释放也有影响。Korzeniewska 等^[5]也有类似报道。由于 EOS 在体外有 ECP 释放,从而不能真实反映体内 ECP 水平,而血标本收集过程中的多种因素都对 ECP 体外释放程度造成影响,因此,对于 ECP 水平的测定,无论采用何种方法,都要注意血标本收集过程中各种因素的影响。本文研究结果表明:(1)0℃和室温条件下,各组 ECP 释放水平差异无统计学意义($P > 0.05$),0℃与 37℃和室温与 37℃条件下,各组 ECP 释放水平差异均有统计学意义(P 均 < 0.01),提示 ECP 的体外释放在 0℃和室温时不明显,37℃时则有明显释放。与文献^[2,6]报道的室温条件 ECP 水平已明显高于 0℃时,37℃条件下 ECP 水平升高更加显著结果不同,这种差异的产生可能归咎于检测方法之间灵敏度的差异。且由表 1 可知,荨麻疹组 ECP 检测水平升高程度要高于对照组,这可能与荨麻疹患者的发病机制造成 ECP 检测水平明显升高有关。(2)由表 2 可知,在不同温度下抗凝剂对 ECP 的体外检测水平无明显影响,与 Rubira 等^[2]的报道相一致。而与国内温怀凯等^[7]报道 EDTA 抗凝

表 2 不同抗凝剂对 ECP 检测水平的影响($\bar{x} \pm s$, ng/ml)

组别	无抗凝剂		EDTA		肝素	
	室温	0℃	室温	0℃	室温	0℃
荨麻疹组	20.73±7.80	20.72±8.00	21.67±8.56	22.32±7.76	23.34±9.23	21.88±9.43
对照组	5.75±1.15	5.58±1.13	5.75±0.89	5.48±0.97	5.78±0.93	5.57±1.12

注:荨麻疹组,室温: $F=0.139(P>0.05)$,0℃: $F=0.142(P>0.05)$;对照组,室温: $F=0.130(P>0.05)$,0℃: $F=0.129(P>0.05)$

血 ECP 检测水平低于血清,认为抗凝剂 EDTA 对体外 ECP 的释放可能有抑制作用不一致,因此,ECP 的体外释放机制还需进一步探讨。(3)在溶血与不溶血条件下,各组 ECP 检测水平差异均有统计学意义(P 均 <0.01),提示溶血标本在凝结过程中有大量的 ECP 释放,可能是由于 EOS 于溶血过程中破裂后,包括 ECP 在内的颗粒蛋白外溢造成的。

综上所述,标本收集过程中温度、溶血对 ECP 的检测有不同程度的影响。因此,在体外检测 ECP 水平时,应选择适宜的样本收集条件。总的来说,样本应根据实验要求选择血清或血浆,其中血清应在 0℃或室温条件下凝结获得,避免溶血,并及时分离血细胞和血清/血浆。

4 参考文献

- 1 Nikolovski Z, Buzón V, Ribó M, et al. Thermal unfolding of eosinophil cationic protein/ ribonuclease 3: a nonreversible process. *Protein Sci*, 2006,5;2816-2827.
- 2 Rubira N, Rodrigo MJ, Pena M, et al. Blood sample processing effect on eosinophil cationic protein concentration. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 1997,78;394-398.
- 3 Dente FL, Carnevali S, Bartoli ML, et al. Profiles of proinflammatory cytokines in sputum from different groups of severe asthmatic patients. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2006,97;312-320.
- 4 Koh GC, Shek LP, Kee J, et al. Saliva and serum eosinophil cationic protein in asthmatic children and adolescents with and without allergic sensitization. *J Asthma*, 2010,47;61-65.
- 5 Korzeniewska A, Sotoniewicz A, Stelmach P, et al. Serum and sputum eosinophil cationic protein levels and clinical status in cystic fibrosis patients. *Pneumonol Alergol Pol*, 2006,74;372-376.
- 6 Pronk-Admiraal CJ, Bartels PC. Effect of clotting temperature and eosinophil concentration on the eosinophil cationic protein concentration in serum. *Scand J Clin Lab Invest*, 1994,54;185-188.
- 7 温怀凯,叶松道,阮逸群.不同温度测定血 ECP 水平对支气管哮喘的结果评价. *医学研究杂志*, 2006,35;45-46.

(收稿日期:2010-05-26)

(本文编辑:陈淑莲)

第二届中国大连国际 DNA 和基因组活动周

2011 年 4 月 25-29 日,第二届中国大连国际 DNA 和基因组活动周将在大连世界博览广场举行。本届活动周由国家外国专家局国外人才信息研究中心主办,由大连百奥泰生物技术有限公司承办,本届大会的主题是绿色经济时代重启生物之门,计划邀请国内外基因领域的著名专家、10 位诺贝尔奖得主、世界各国科学院院士、世界 500 强企业高管、世界各国对基因组计划有突出贡献的人士参会,设置诺贝尔论坛、生物经济论坛、投融资论坛以及 400 多场生物技术论坛,由 1993 年诺贝尔医学奖得主、断裂基因发现者之一的 Richard Roberts 博士担任本次盛会的国际主席。预计参会规模 5000 人,预邀报告人 2000 位,精英荟萃,规模空前,将是一次生物技术领域有巨大影响力的盛会。

同期将召开第四届工业生物技术大会、第二届工业酶与生物催化大会、第一届生物能源大会、第一届海洋生物技术大会、第二届石油微生物大会等六会联动,第二届国际生物技术产品和仪器设备博览会也将同期开展。本次活动将成为国际上最有影响力的盛会之一。

为促进我国 DNA 和基因组研究的发展与交流,大会为国内的专家及企业设置了中文演讲的专场,在与国外的专家交流之后,再次探讨我国的 DNA 和基因组的发展现状,所以

我们诚挚邀请您出席大会并在会议上做报告,使您的研究成果在世界各地的专家面前得以展示,并引领我国生物技术领域的科学发展。

中文演讲的议题如下:

- 专题一:DNA 和基因发现对生命科学发展的影响
- 专题二:基因研究的政策、法规和伦理
- 专题三:基因组研究的前沿技术
- 专题四:基因芯片及应用
- 专题五:蛋白质组学技术新进展
- 专题六:代谢组学分析技术和数据处理的新进展
- 专题七:宏基因组学的最新技术
- 专题八:营养学和基因组健康
- 专题九:质谱新方法、新技术及其应用的最新进展
- 专题十:色谱技术在生命科学中的应用
- 专题十一:我国基因治疗的现状 & 前景
- 专题十二:我国基因检测技术和市场
- 专题十三:技术转让和项目合作

第二届国际 DNA 和基因组活动周会务组

联系人:李梦思;电话:0411-84799609-826

传真:0411-84796897;Email:limengsi@bitconferences.com