

# 流式细胞仪检测结缔组织生长因子的方法学评价\*

陈洁<sup>1</sup>, 黄山<sup>1\*\*</sup>, 左丽<sup>2</sup>

(1. 贵州医科大学附属人民医院, 贵州 贵阳 550002; 2. 贵州医科大学 基础医学院, 贵州 贵阳 550004)

**[摘要]** 目的: 评价 FACSArray 流式细胞仪检测血清结缔组织生长因子(CTGF)的方法学性能。方法: 用流式细胞仪测定血清高低浓度 CTGF, 计算两种浓度的批内变异系数、批间变异系数及相对偏差评价仪器的精密性、准确度及分析灵敏度, 采用美国临床和实验室标准协会(CLSL)的有关要求进行评价; 计算在校准品中加入聚苯乙烯微球、高浓度的甘油三酯(17 mmol/L)、血红蛋白(12 g/L)、胆红素(170 μmol/L)或低浓度的甘油三酯(0.76 mmol/L)、血红蛋白(0.5 g/L)和胆红素(1.7 μmol/L)干扰物对 CTGF 测定时的干扰率, 对仪器分析性能进行验证和评价。结果: CTGF 的高低两个浓度的批内变异系数分别为 2.96% 和 3.75%, 高低两个浓度的批间变异系数分别为 9.02% 和 8.78%, CTGF 的高低两个浓度的相对偏差分别为 2.23% 和 1.85%, 检测灵敏度为 14.91 ng/L, 均达到 CLSL 的有关要求; 聚苯乙烯微球, 高浓度的甘油三酯、血红蛋白及胆红素干扰物对 CTGF 测定时的干扰率分别为 3.98%、12.76%、11.35% 及 11.14%, 对检测有一定的干扰; 低浓度的甘油三酯、血红蛋白及胆红素干扰物对 CTGF 测定时的干扰率分别为 4.45%、3.49% 和 2.94%, 对检测干扰相对于高值干扰物较小。结论: FACSArray 流式细胞仪检测系统检测血清 CTGF 的性能指标可满足实验室认可的需求; 高浓度的甘油三酯、血红蛋白和胆红素对 CTGF 的测定有一定干扰作用。

**[关键词]** 流式细胞术; 结缔组织生长因子; 干扰实验; 方法学评价

**[中图分类号]** R318.0 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2017)07-0790-04

**DOI:** 10.19367/j.cnki.1000-2707.2017.07.011

## Methodology Evaluation on Flow Cytometry Test on CTGF

CHEN Jie<sup>1</sup>, HUANG Shan<sup>1</sup>, ZUO Li<sup>2</sup>

(1. Affiliated People's Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550002, Guizhou, China;

2. School of Basic Medicine, Guizhou Medical University, Guiyang 550002, Guizhou, China)

**[Abstract]** **Objective:** To evaluate methodology function of FACSArray flow cytometry test on the performance of connective tissue growth factor (CTGF). **Methods:** FACSArray flow cytometry system was used to detect the serum high and low concentration CTGF, calculate both concentration within assay variation, between assay variation, as well as precision, accuracy, analysis sensitivity of relative deviation evaluation equipment; adopting relevant requirements of CLSL for evaluation; after adding interference test to calibrator: polystyrene microspheres, high concentration triglyceride(17 mmol/L), hemoglobin(12 g/L), bilirubin(170 μmol/L), or low concentration triglyceride(0.76 mmol/L), hemoglobin(0.5 g/L) and bilirubin(1.7 μmol/L), calculating disruption rate on CTGF detection and evaluating on the equipment analyzing performance. **Results:** The within assay variations of CTGF in both high and low concentration were 2.96% and 3.75% respectively. High and low concentrations between assay variations of CTGF were 9.02% and 8.78% respectively. The relative deviations of the high and low concentrations of CTGF were 2.23% and 1.85% respectively. The detection sensitivity

\*[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资助项目(gzkwj2012-1-129); 贵州省卫生厅立项资助项目(gzkwj2012-1-062)

\*\*通信作者 E-mail: huangshan263@sina.com

网络出版时间: 2017-07-13 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20170713.2305.024.html>

of CTGF was 14.91 ng/L; all met the requirement of CLSL. Rate of interference in determination of CTGF of polystyrene microspheres, the high concentration of triglyceride, hemoglobin and bilirubin disrupters were 3.98% , 12.76% , 11.35% , and 11.14% respectively, which showed certain interference on detection. Rate of interference in determination of CTGF of low concentration of triglyceride hemoglobin and bilirubin disrupters were 4.45% , 3.49% and 2.94% respectively, which showed relatively minor interference on detection than high value disrupters. **Conclusion:** Performance index from FACSArray flow cytometry detecting serum CTGF could meet the requirements of laboratory. High concentration of triglyceride, hemoglobin and bilirubin had certain interference effect on the determination of CTGF.

[ **Key words** ] flow cytometry; connective tissue growth factor; interference experiment; methodology evaluation

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精密度、准确度、分析灵敏度和干扰实验等主要分析性能进行验证,而检验仪器的检测性能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<sup>[1]</sup>。FACSArray 流式细胞仪是近年来广泛使用的检测仪器,它可以快速测定并记录悬浮在液体中分散细胞的一系列重要的生物物理、生物化学方面的特征参量,本研究对 FACSArray 流式细胞仪检测系统测定羊抗人结缔组织生长因子(CTGF)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。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器、试剂和校准品

FACSArray 流式细胞仪(美国 BD 公司),羧基化微球(Bio-Rad 公司),生物素标记的 CTGF 单克隆抗体(美国 R&D 公司),PE 标记的亲合素(eBioscience 公司),CTGF 校准品(美国 BD 公司)

### 1.2 方法

将 FACSArray 流式细胞仪校准后,应用美国临床和实验室标准协会(CLSL)的有关规则对流式细胞仪检测 CTGF 的精密度、准确度、灵敏度、干扰实验等分析性能进行系统性评价<sup>[2]</sup>。

**1.2.1 校准** 按照 BDTM CBA 操作说明书,配制校准微球,对 FACSArray 流式细胞仪进行仪器调试和校准。

**1.2.2 精密度实验** 分别选择高低两个浓度的 CTGF 的校准品进行精密度试验,批内精密度为对

同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。

**1.2.3 准确度实验** 选择高、低两个浓度的 CTGF 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对比,计算验证值与靶值的相对偏倚(%)。

**1.2.4 分析灵敏度(LLD)实验** 分别选择 CTGF 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,2011)推荐方法经过计算 LLD。

**1.2.5 血清中其他物资对 CTGF 测定的干扰** 临床医生在采集患者血样本时会出现溶血,或血样本为脂血,或为黄疸病人,因此,干扰试验是在校准品中分别加入聚苯乙烯微球、高低两个浓度水平的血红蛋白(12.0 和 0.5 g/L)、甘油三酯(17.0 和 0.76 mmol/L)和胆红素(170 和 1.7 μmol/L);模拟病人血样因轻度和重度溶血、脂血或黄疸造成的对该项目检测结果的影响。

### 1.3 统计学处理

数据用 SPSS 11.5 软件进行统计学分析,所有资料进行正态性(偏度与峰度)和方差齐性 Levene 检验,计量变量符合正态分布以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,非正态计量变量以中位数(P25,P75)表示,分类或计数变量以百分数(%)表示;依据检验结果分别适用单因素方差分析、*t* 检验、Kruskal-Wallis 秩和检验,正态方差齐变量两两比较采用最小显著差异检验法(SNK 检验),方差不齐变量两两比较采用 DunettT 法分析,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

对高低两个浓度的 CTGF 校准品进行精密度试验,其批内精密度结果和批间精密度试验结果均达到 CLSL 规定( $cv < 10\%$  和  $< 15\%$ )。见表 1。

表 1 CTGF 批内和批间精密度验证试验结果

Tab. 1 Precision detection evaluation results between CTGF within assay and between assay

类别	CTGF(ng/L)	检测范围	$\bar{x} \pm s$	cv(%)	CLSL cv 标准(%)
批内	70.25	65.51 ~ 77.25	69.84 ± 4.20	3.75	< 10
	521.45	499.79 ~ 527.25	511.78 ± 7.50	2.96	< 10
批间	70.25	60.51 ~ 81.25	68.24 ± 6.20	8.78	< 15
	521.45	491.79 ~ 532.25	501.78 ± 9.13	9.02	< 15

表 2 CTGF 准确度验证试验结果

Tab. 2 Experiment results of CTGF accuracy test

CTGF 预期靶值(ng/L)	CTGF 验证值(ng/L)	绝对偏差	相对偏差(%)	CLSL 标准(%)
70.25	71.55	1.30	1.85	< 20
521.45	509.78	11.67	2.23	< 20

2.3 灵敏度验证试验

CTGF 的空白和低浓度样本的中位荧光强度(MFI)的均值分别为 17.44 和 43.67,标准差分别为 2.54 和 2.78。按照 99.70% 的可信度,空白样本 3 倍标准差为  $2.54 \times 3 = 7.62$ ,低浓度样品 MFI43.67 扣除空白值 17.44 后为 26.23;因此 MFI 为 7.62 时,CTGF 检测灵敏度为  $7.62/26.23 \times 51.33 = 14.91$ (ng/L)。见表 3。

表 3 CTGF 灵敏度验证试验结果

Tab. 3 Experiment result of CTGF sensitivity

CTGF(ng/L)	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
0.00	17.44	2.54		14.91
51.33	43.67	2.78	8.46	

2.4 干扰试验

干扰试验结果显示,在聚苯乙烯微球、高浓度的甘油三酯、血红蛋白及胆红素对 CTGF 测定时的干扰率分别为 3.980%、12.76%、11.35% 和 11.14%,对检测有一定的干扰;低浓度的甘油三

2.2 准确度验证试验

按程序检测 CTGF 两个浓度的校准品,预期靶值为校准品的实际浓度,验证值为实际检测值,比对预期靶值和验证值,计算其相对偏差(%),CTGF 准确度验证结果亦达到达到 CLSL 标准(相对偏差  $< 20\%$ ),见表 2。

酯、血红蛋白和胆红素对 CTGF 测定时的干扰率分别为 4.45%、3.49% 和 2.94%,对检测干扰相对于高值干扰物较小。

3 讨论

CTGF 属一类新的富含半胱氨酸生长因子家族,位于 6q23.1。成纤维细胞的有丝分裂作用依赖于 CTGF,另外 CTGF 还有促使细胞增殖、分化和迁移的作用<sup>[3]</sup>。CTGF 促使由肝星状细胞活化增殖、合成及分泌活性物质,改变胶原构成比例,所以 CTGF 对纤维化进程具有重要意义。TGF- $\beta$  诱导的 CTGF 过程影响因素众多,如 cAMP 水平、TNF $\alpha$ 、前列腺素 E2、白介素-4、过氧化物酶体增殖物激活受体等。其中 cAMP 激活蛋白激酶使转录因子磷酸化,抑制 TGF- $\beta$  诱导 CTGF 表达,抑制胶原合成,但对 CTGF 促细胞增殖的作用和基础表达的 CTGF 没有影响<sup>[4]</sup>;TNF $\alpha$  抑制 TGF- $\beta$  诱导的 CTGF 表达,但对硬皮病患者 CTGF 的基础表达不存在抑制作用,有研究表明<sup>[5]</sup> TNFa 通过 p38 激酶和 ras/MEK/ERK 途径对 CTGF 表达进行抑制,此作用能够被核因子 B 抑制剂阻断;前列腺素 E2 能够抑制 TGF- $\beta$  刺激诱导表达 CTGF<sup>[6]</sup>;白介素-4 对 TGF- $\beta$  介导的 CTGF 表达能够起到抑制作用,但不影响 TGF- $\beta$  诱导表达<sup>[7]</sup>;过氧化物酶体增殖物激活受体可抑制 TGF- $\beta$  促使的 CTGF 表达,这种抑制可被过量表达的 Smad3 逆转<sup>[8]</sup>。

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 CTGF 行了方法学评价。其验证的性能指标主要包括精密度、准确度、灵敏度和干扰试验等,验证其结果是否满足预期的质量要求。

流式细胞仪检测系统检测血浆 CTGF 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实验,检测系统精密度评价中,根据 CLIS EP5-A2<sup>[9]</sup> 计算的批内和批间变异系数均在试剂说明书范围内,也未超过 CLSI 要求一般免疫试验 20% 的水平<sup>[10]</sup>,达到了公认的质量要求。在准确度实验中,CTGF 两个浓度的相对偏倚采用 CLSI EP9-A3<sup>[11]</sup> 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实验中 CTGF 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、血红蛋白和甘油三酯对实验结果影响较大,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、血红蛋白和甘油三酯对实验结果干扰则相对较小。

目前,常用于检测血清中 CTGF 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<sup>[12]</sup>,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<sup>[13]</sup>,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<sup>[14]</sup>,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<sup>[15]</sup>,在临床上运用广泛,但是仍有一些缺点,如用 ELISA 法检测患者 CTGF,通常会造成“HOOK”效应<sup>[16]</sup>,血清中 CTGF 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<sup>[17]</sup>(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,实验时间比单次 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甘油三酯、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。

综上所述,FACSArray 流式细胞仪检测系统检测血清 CTGF 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。

## 4 参考文献

[1] Dokyun K, Hwachoon S, Byungkwan K, et al. Evaluation of i-STAT CHEM8 + Point-of-Care Chemistry Analyzer [J]. Laboratory Medicine Online, 2015(2):57-62.

[2] Lin L, Dai YH, Liu DD, et al. Comparison and bias estimation of three methods in determination of glycated hemoglobin A1c[J], 2016(8):650-654.

[3] 刘彩云,郭影. 结缔组织生长因子与骨形成蛋白-9 在骨代谢中的研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2015(4):1148-1149.

[4] Li G, Tang L, Jia P, et al. Elevated plasma connective tissue growth factor levels in children with pulmonary arterial hypertension associated with congenital heart disease[J]. Pediatr Cardiol, 2015(5):2345-2349.

[5] Konstantinos PL, Michael E, Nikolaos P, et al. Catheter ablation of persistent atrial fibrillation: the importance of substrate modification[J]. World J Cardiol, 2015(3):111-118.

[6] Nagai N, Klimava A, Lee WH, et al. CTGF is increased in basal deposits and regulates matrix production through the ERK (p42/p44mapk) MAPK and the p38 MAPK signaling pathways[J]. Investigative Ophthalmology and Visual Science, 2009(4):1903-1910.

[7] Jeona KI, Richard P. Phippsabc, et al. Inhibitory effects of PPAR $\gamma$  ligands on TGF- $\beta$ 1-induced CTGF expression in cat corneal fibroblasts[J]. Exp Eye Res, 2015(4):52-58.

[8] Chen C, Wei L, Chen WJ, et al. Serum TGF- $\beta$ 1 and SMAD3 levels are closely associated with coronary artery disease[J]. BMC Cardiovascular Disorders, 2014(3):18-25.

[9] Anne-Sophie DK, Koen DD, Jan VB, et al. Analytical performance evaluation of four cartridge-type blood gas analyzers. [J]. Clinical Chemistry & Laboratory Medicine, 2012(6):1083-1091.

(下转第 798 页)

- intake, psychological status, and performance status in lung cancer patients[J]. *Curr Oncol*, 2015(4):e254 - e258.
- [3] 魏寇准, 陈晓鹏. 血小板与恶性肿瘤的关系[J]. 沈阳医学院学报, 2014(1):16.
- [4] Laublin, Borsing L. Selections promote tumor metastasis [J]. *Semin Cancer Biol*, 2010(3):169 - 177.
- [5] Li-Saw-Hee FL, Blann AD, Lip Gr. A cross-sectional and diurnal study of thrombogenesis among patients with chronic atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol*, 2000(7):1926 - 1931.
- [6] 王安, 夏奎, 丁毅鹏. 肺癌患者血小板活化的临床意义[J]. 山东医药, 2011(21):52 - 53.
- [7] Kupatawintu P, Nathalang O, O-Charoen R, et al. Gene frequencies of the HpA-1 to 6 and Gov human platelet antigens in Thai blood donors [J]. *Immunohematology*, 2005(1):5 - 9.
- [8] Cunyun Carter G, Barrett AM, Kaye JA, et al. A comprehensive review of nongenetic prognostic and predictive factors influencing the heterogeneity of outcomes in advanced non-small-cell lung cancer[J]. *Cancer Manag Res*, 2014(6):437 - 449.
- [9] 石远凯, 孙燕, 于金明, 等. 中国晚期原发性肺癌诊治专家共识(2016 年版)[J]. 中国肺癌杂志, 2016(1):1 - 14.
- [10] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013[J]. *CA Cancer J Clin*, 2013, 63(1):11 - 30.
- [11] Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, et al. The 2015 World Health Organization classification of lung tumors: impact of genetic, clinical and radiologic advances since the 2004 Classification[J]. *J Thorac Oncol*, 2015(9):1243 - 1260.
- [12] 符小玲, 陈纯静, 陈恩, 等. MICA 基因多态性与肺癌的相关性研究[J]. 国际免疫学杂志, 2015(3):234 - 237.
- [13] Improtta G, Sgambato A, Bianchino G, et al. polymorphisms of the DNA repair genes XRCC1 and XRCC3 and risk of lung and colorectal cancer: a case control study in a Southern Italian population[J]. *Anticancer Res*, 2008(5):2941 - 2946.
- [14] 庄琰, 张中冕, 程留奇, 等. APE1 和 ERCC1 基因多态性和肺腺癌易感性关系研究[J]. 医药论坛杂志, 2014(1):4 - 6.
- (2017-02-23 收稿, 2017-06-07 修回)  
中文编辑: 刘平; 英文编辑: 赵毅
- 
- (上接第 793 页)
- [10] Watanabe N, Nagatomo R, Okubo S, et al. The performance of the automated immune chemiluminescent system "IMMULITE 2000XPi for the measurement of serum soluble IL-2 receptor in clinical samples"[J]. *Rinsho Byori the Japanese Journal of Clinical Pathology*, 2012(5):422 - 428.
- [11] 徐建华, 刘冬冬, 戴永辉, 等. CLSIEP9-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(5):346 - 348.
- [12] 谭欣, 刘爱胜. 国产乙肝金标法和 ELISA 法检测血清 HBcAb 结果比较[J]. 临床输血与检验, 2015(2):108 - 110.
- [13] 饶柳丽, 丰妹, 魏彬, 等. 高敏发光技术定量检测乙型肝炎病毒表面抗原的临床应用[J]. 中华检验医学杂志, 2015(8):537 - 542.
- [14] 孙利谦, 金春林, 张志杰, 等. 免疫比浊法和高效液相色谱法测定糖化血红蛋白一致性的 Meta 分析[J]. 中华糖尿病杂志, 2016(10):885 - 891.
- [15] 邵继平, 张彩云, 胡不为, 等. ELISA 法检测食蟹猴血浆中 rhCNB 多肽的方法学评价[J]. 中国免疫学杂志, 2016(4):528 - 531.
- [16] 邱娜. 血站 HBsAg 酶联免疫检测的 HOOK 效应与对策[J]. 临床血液学杂志:输血与检验, 2015(4):726 - 727.
- [17] 马锡慧, MAXi-Hui. 流式微珠阵列术在医学中的研究进展[J]. 生物技术通讯, 2016(1):138 - 141.
- (2017-03-21 收稿, 2017-06-20 修回)  
中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 赵毅