

检测新生儿溶血标本 NSE 校正公式的建立^{*}

常珊碧 张保荣 沈洁 蒋曼丽 王跃帮

(宿迁市第一人民医院医学检验科, 江苏 宿迁 223800)

【摘要】 目的 分析溶血对新生儿神经元特异性烯醇化酶 (NSE) 的影响, 建立新生儿溶血 NSE 校正公式。方法 选取 50 份出生 <24 h 的新生儿样本, 离心分离上层血清, 添加反复冻融红细胞悬液, 罗氏 E602 电化学发光检测血清中 NSE 浓度, 应用仪器法和氰化高铁法 (HiCN) 分别检测血清中血红蛋白 (Hb) 结果, 分别建立 NSE 校正公式。分析仪器法和 HiCN 法 NSE 的浓度变化 (Δ NSE) 的相关性, 评价仪器法 NSE 校正公式的可行性。结果 50 份溶血样本 Δ NSE 为 $(35.62 \pm 2.17) \mu\text{g/g Hb}$ 。以 Δ NSE 为 Y 轴、 Δ Hb_{HiCN}} 为 X 轴, 血清 NSE 浓度变化与 Hb 浓度变化之间的相关方程 $Y_{\Delta\text{NSE}} = 32.90 \times \text{Hb 全血浓度} + 1.58 (r^2 = 0.991, P < 0.001)$, $Y_{\Delta\text{NSE}} = 30.97 \times \text{HbHiCN} + 1.11 (r^2 = 0.981, P < 0.001)$ 。仪器法和 HiCN 法得出 NSE 结果呈较高相关性 ($r^2 = 0.933, P < 0.01$) 且两者之间差异无统计学意义 ($P = 0.413$)。结论 溶血样本严重影响新生儿 NSE 检测结果。校正后的 NSE 结果, 可以为临床诊断提供参考价值。

【关键词】 新生儿; 溶血样本; 校正公式; 仪器法; 氰化高铁血红蛋白测定法; 神经元特异性烯醇化酶

【中图分类号】 R772.1 **【文献标志码】** A **DOI:** 10.3969/j.issn.1672-3511.2023.09.029

Establishment of NSE correction formula for detecting hemolytic samples of Neonate

CHANG Shanbi, ZHANG Baorong, SHEN Jie, JIANG Manli, WANG Yuebang

(Department of Medical Laboratory, Suqian First Hospital, Suqian 223800, Jiangsu, China)

【Abstract】 Objective To analyze the effect of hemolysis on neonatal neuron specific enolase (NSE) and establish the correction formula of NSE. **Methods** 50 samples of newborn babies less than 24h old were selected. The upper serum was separated by centrifugation, and repeated freeze-thaw red cell suspension was added. The concentration of NSE in serum was detected by Roche E602 electrochemiluminescence. The serum hemoglobin (Hb) was detected by instrument method and high ferric cyanide method (HiCN). The NSE correction formula was established respectively. The correlation of NSE concentration changes (Δ NSE) between the instrumental method and HiCN method was analyzed, and the feasibility of the NSE correction formula of the instrumental method was evaluated. **Results** Δ NSE of 50 hemolytic samples was $(35.62 \pm 2.17) \mu\text{g/g Hb}$. The correlation equation between the change of serum NSE concentration and the change of Hb concentration is Y-axis with Δ NSE as the Y-axis and Δ HbHiCN as the x-axis Δ NSE = $32.90 * \text{Hb whole blood concentration} + 1.58 (r^2 = 0.991, P < 0.001)$, $Y_{\Delta\text{NSE}} = 30.97 * \text{HbHiCN} + 1.11 (r^2 = 0.981, P < 0.001)$. There was a high correlation between NSE results obtained by instrumental method and HiCN method ($r^2 = 0.933, P < 0.01$), and there was no significant difference between them ($P = 0.413$). **Conclusion** Hemolytic samples seriously affect the detection results of neonatal NSE. The corrected NSE results can provide reference value for clinical diagnosis.

【Key words】 Neonate; Hemolytic sample; Instrumental method; HiCN; Correction formula; Neuron specific enolase

新生儿缺氧缺血性脑病 (Hypoxic ischemic en-

cephalopathy, HIE) 是指围生期各种原因导致的脑组织部分或完全缺氧、脑血流供应降低导致的新生儿大脑损伤。研究显示, 尽管围生期诊疗技术明显提高, HIE 仍是全球新生儿发病和死亡的重要原因之一^[1-2]。神经元特异性烯醇化酶 (Neuron-specific enolase, NSE) 是 HIE 的敏感标志物, 是一种酸性蛋白酶,

基金项目: 宿迁市临床医学检验实验室 (M201902)

通讯作者: 王跃帮, 硕士, 副主任技师, E-mail: 330667489@qq.com

引用本文: 常珊碧, 张保荣, 沈洁, 等. 检测新生儿溶血标本 NSE 校正公式的建立[J]. 西部医学, 2023, 35(9): 1396-1399. DOI: 10.3969/j.issn.1672-3511.2023.09.029

也是糖酵解作用的关键胞内酶,炎症损伤细胞和肿瘤细胞由于增值周期加快,糖酵解作用增强,导致 NSE 大量释放入血液,使血清中此酶含量增高^[3-6]。NSE 特异性存在于神经元、神经组织来源的肿瘤组织以及神经内分泌细胞中^[7-8],血清中 NSE 的浓度对新生儿缺氧缺血性脑病、嗜铬细胞瘤、神经母细胞瘤以及小细胞肺和急性淋巴细胞白血病等疾病的鉴别诊断、疗效评估和预后等方面具有重要意义^[9-11]。在血小板和红细胞中有 γ 亚基的 NSE 同工酶,因此当标本溶血时,NSE 同工酶释放到胞外与血清 NSE 出现部分交叉免疫反应,使检测结果偏高,影响报告的真实性和可靠性^[12-13]。临床上新生儿采血极其困难,血清标本经常有不同程度的溶血,故本研究通过建立新生儿溶血校正公式,以探讨其诊断新生儿疾病的可行性。

1 材料与方法

1.1 研究对象 选取 2021 年 1—5 月本院新生儿科出生的新生儿血清样本 50 例,其中男性 28 例、女性 22 例,时间 < 24 h。同时回顾性分析 2021 年 1—5 月出生的 237 例新生儿黄疸指数(Icterus)以及溶血指数(Haemolysis),患儿家属均同意并签署同意书,本研究经医院伦理委员会批准。

1.2 仪器与试剂 佑科 752N 紫外可见分光光度计购自上海佑科仪器仪表有限公司;ROCHE E602 全自动化学发光免疫分析仪及 NSE 配套原装试剂(批号:52370301)购自瑞士罗氏公司;Sysmex XN-9000 全自动血液分析仪及配套试剂、SLS 溶血剂(批号:A1004)购自日本 Sysmex 公司,T5D 低温水平离心机购自上海卢湘仪公司;氰化高铁血红蛋白(cyanmethemoglobin, HiCN)标准液和文齐氏液均购自上海信帆生物科技有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 标准曲线的建立 采用佑科 752N 紫外可见分光光度计分别测定 50、100、150、200、250 g/L Hb 标准液在 540 nm 处的吸光度值(用 A 表示),以吸光度为横坐标,Hb 浓度为纵坐标,制作标准曲线。将 5 份新鲜的全血样本加到干燥洁净的试管内,轻轻摇匀后,用 Eppendorf 微量移液器吸取 20 μ L 混合全血加到含有 5 mL 文齐氏液的试管中,轻轻摇匀,5 min 后测定 OD 值,通过标准可得到血红蛋白浓度。用 0.9%生理盐水将混合全血分别稀释成 Hb 浓度为 20、10、5、2.5、1.25、0.625 g/L 的样本。分别吸取 100 μ L 上述样本加入到含有 2.5 mL 文齐氏液的试管中并摇匀,5 min 测定 540 nm 处的吸光度值(A),以吸光度值为横坐标,Hb 浓度为纵坐标,绘制血清 Hb 标准曲线。

1.3.2 血清 NSE 结果检测 选取当日检测的新生儿全血新鲜样本,3500 rpm 离心 10 min,分离血清,用移液器吸取下层红细胞 300 μ L 于冷冻管内,将冷冻管在 -80 $^{\circ}$ C 冰箱内,放置 20 min,取出室温平衡 30 min 至完全溶解,重复上述步骤 5 次。选取当日检测的含有分离胶的血样,用 Eppendorf 移液器吸取血清 200 μ L 加入到干净的试管内,加入 5 μ L 上述红细胞,充分混匀后 3500 rpm 离心 10 min,分离血清,用于检测 NSE 浓度。

1.3.3 血清 Hb 浓度测定 用 Eppendorf 移液器分别吸取上述血清 100 μ L 和文齐氏液 2.5 mL 至一洁净的试管内,轻轻摇匀,5 min 内测定 540 nm 处的吸光度(A)值,根据血清 Hb 标准曲线计算出 Hb 浓度。

1.3.4 NSE 检测方法的相关性 按照美国临床实验室标准化协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)的文件 EP9-A2 要求,对采用 HiCN 法和 XN-9000 全自动血液分析仪(仪器法)建立的校正公式,评价两者之间的相关性。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析,计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示。NSE 的差值 Δ NSE (ng/mL)与血红蛋白 Hb 浓度的关系进行 Pearson 相关性分析,仪器法和 HiCN 法 Δ NSE 的比较应用 Mann-Whitney *U* 秩和检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般结果 < 24 h 出生的新生儿血清 TB 浓度为 $(137.00 \pm 56.84) \mu\text{mol/L}$,25.3% (60/237) 血液样本均存在不同程度的溶血,溶血程度 +/+ +/+ +/+ +/+ +/+ 分别占 6.75/8.02/8.44/2.11%,其中血清中 Hb > 2 g/L 占 9.28% (22/237)。

2.2 Hb 标准曲线的建立 全血样本 Hb 浓度的标准曲线为 $\text{Hb}_{\text{全}} = 328.73 \times A_{540\text{nm}} + 1.67 (r^2 = 0.996)$,血清样本 Hb 浓度的标准曲线为 $\text{Hb}_{\text{血清}} = 35.56 \times A_{540\text{nm}} + 0.14 (r^2 = 0.998)$ 。见图 1。

2.3 Hb 与 NSE 的相关性 分别检测 50 份新生儿样本,测定其血清中 NSE 浓度,添加反复冻融红细胞后,离心分离血清后继续检测其浓度,通过计算两者血清 NSE 浓度变化与 Hb 浓度变化的比值,得出的 NSE/Hb 为 $(35.62 \pm 2.17) \mu\text{g/g}$ 即血红蛋白每增加 1 g/L,NSE 增加 $(35.62 \pm 2.17) \text{ng/mL}$ 。以 $\text{NSE}_{\text{血清}}$ 为 Y 轴,Hb 为 X 轴, $\text{NSE}_{\text{血清}}$ 结果与 Hb 变化高度相关,其回归方程分别为 $Y_{\Delta\text{NSE}} = 32.90 \times \text{Hb}_{\text{全血浓度}} + 1.58 (r^2 = 0.991, P < 0.001)$, $Y_{\Delta\text{NSE}} = 30.97 \times \text{Hb}_{\text{HiCN}} + 1.11 (r^2 = 0.981, P < 0.001)$,见图 2。且两者方法 NSE 之间高度相关 ($r^2 = 0.933, P < 0.01$)。见图 3。

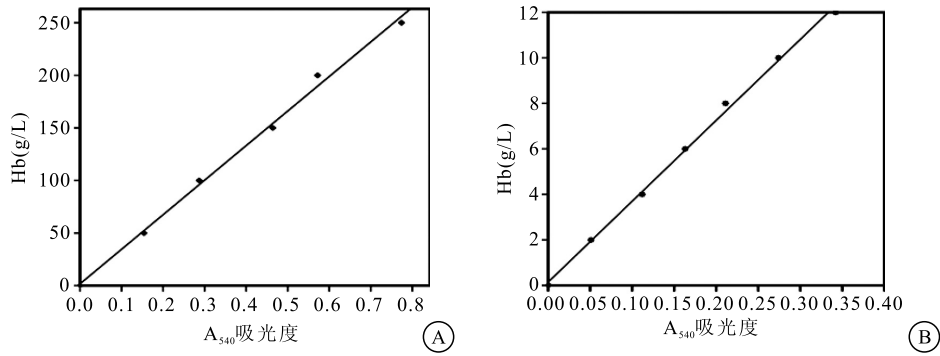


图 1 血红蛋白标准曲线

Figure 1 Hemoglobin standard curve

注: A. 全血样本 Hb 的标准曲线; B. 血清样本 Hb 的标准曲线。

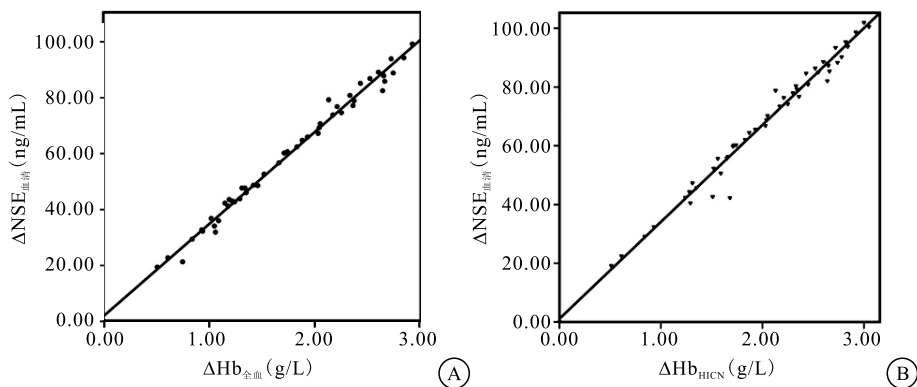


图 2 血清 NSE 与血红蛋白浓度变化相关性

Figure 2 Serum NSE is associated with changes in hemoglobin concentration

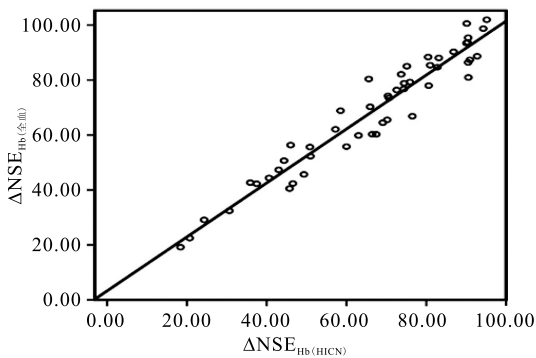


图 3 血红蛋白仪器法和 HICN 法 NSE 相关性

Figure 3 Hemoglobin instrumentation and HICN method NSE correlation

2.4 两种校正公式与溶血前血清 NSE 比较 采用单因素方差分析对溶血前与校正后 3 组数据进行分析, 差异无统计学意义 ($F=0.136, P=0.873$), 见表 1。50 份样本加入反复冻融的红细胞后, NSE 检测结果 (71.65 ± 21.77) ng/mL, 全部超过临床参考区间, $NSE_{校正} = NSE_{溶血} - \Delta NSE$, 经上述两种公式校正后, 超过临床参考区间的样本分别为 8 份 (16%) 和 7 份 (14%)。

2.5 校正公式的建立 根据 $\Delta Hb_{血清}$ 与 ΔNSE 的相关性, 得出校正公式分别为: $NSE_{校正} = NSE_{测定} - 32.90 \times Hb_{全血浓度} - 1.58$; $NSE_{校正} = \Delta NSE_{测定} - 30.97$

表 1 NSE 校正公式相关性分析 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Correlation analysis of NSE correction formula			
	NSE (ng/mL)	t/F	P
溶血前	8.02 ± 3.10	0.136	0.873
Hb 仪器法校正	8.19 ± 3.14		
Hb _{HICN} 校正	7.84 ± 2.98		
溶血后	71.65 ± 21.77	—	—

$\times Hb_{HICN} - 1.11$ 。

3 讨论

NSE 在新生儿缺氧缺血性脑病、神经母细胞瘤、嗜铬细胞瘤及小细胞肺癌等疾病中均有表达, 在小细胞肺癌诊断和鉴别诊断中应用广泛, 具有较高敏感性和特异性^[14-18]。同时 NSE 对脑细胞及血管损伤程度判断有重要临床价值, 是脑损伤的特异性标志物^[19-20]。溶血性标本中的血红蛋白 (Hb) 浓度各不相同, 血红蛋白浓度越高对 NSE 的检测结果影响越大, 样本在室温放置时间的过久以及储存温度变化会导致样本溶血从而使血清中 NSE 水平增高^[21], 王强等^[22]研究发现血清中血红蛋白每增加 1 g/L, NSE 检测结果平均增加 (23.70 ± 3.62) ng/mL。

本实验通过血清中加入不同浓度的 Hb 全血样本, 模拟溶血环境, 通过检测溶血后的 NSE 浓度, 以评

价不同浓度的 Hb 对 NSE 结果的影响。实验结果显示正常血清 NSE 浓度为 (8.21 ± 2.47) ng/mL, 随着溶血程度的增加, 血清中 Hb 浓度也逐渐增高, 导致血清中 NSE 的浓度也越来越高, Δ NSE 值也越来越大。当标本发生轻微时 Hb 浓度为 0.625 g/L, NSE 的结果可增加 16.54 ng/mL。当标本严重溶血时, 如 Hb 浓度为 10 g/L, NSE 值增加的量高达 325.49 ng/mL, 明显高于溶血前。经 SPSS 统计软件分析, 每克 Hb 含 NSE 的量呈正态分布 ($P=0.2634$), 每释放 1 g/L 浓度的血红蛋白, NSE 浓度增加 35.62 ± 2.17 (ng/mL), 这与 Mastroianni 等^[23] 的研究结果一致。 Δ NSE 与 Δ Hb 的直线回归方程显示, NSE 与 Hb 呈良好相关性 ($r^2=0.998, r^2=0.996$, 且 $P<0.001$)。本实验结果显示, 新生儿血清 NSE 检测结果在未校正的情况下, 大约有 80% 的新生儿结果可能被误判, 误导新生儿治疗。50 份新生儿血清经两种方法校正后, 超过正常参考区间的样本比例分别 16% 和 14%, 两者与溶血前检测结果差异无统计学意义 ($F=0.136, P=0.873$), 仪器法和 HICN 法高度相关 ($r^2=0.933, P<0.001$), 本实验得出的两种 NSE 校正公式相关程度较高, 但仪器法应用更加简单方便。由于本实验应用人工方法模拟溶血环境, 得出的结果与血清中实际结果可能不一致。因此, 对于新生儿样本, 无论应用哪一种校正公式, 均需要在报告中标注提示临床医生, 此结果仅作为参考, 不是实测结果。

4 结论

新生儿样本 NSE 检测应当避免溶血, 由于新生儿血管纤细, 采血技术要求较高, 容易导致新生儿样本溶血, 因此应用 NSE 校正公式能够帮助临床辅助诊断相关疾病, 具有一定临床价值。

【参考文献】

[1] LIU G, LI Z G, GAO J S. Hypothermia in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE)[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21(4):50-53.

[2] 孙伟璠, 蔡成. 新生儿缺氧缺血性脑病治疗研究进展[J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2021, 36(8):631-634.

[3] WANG M, RONG Y, LUO L. Neuroprotective effects of icariin in neonatal hypoxia-ischemic brain damage via its anti-apoptotic property[J]. *Childs Nerv Syst*, 2021, 37(1):39-46.

[4] VRBA J, JANCA R, BLAHA M, *et al.* Modeling of Brain Tissue Heating Caused by Direct Cortical Stimulation for Assessing the Risk of Thermal Damage[J]. *IEEE Transactions on Neural Systems and Rehabilitation Engineering*, 2019, 27(3):440-449.

[5] KRITHIKA A, GAYATHRI K V, KUMAR D T, *et al.* Mixed azo dyes degradation by an intracellular azoreductase enzyme from alkaliphilic *Bacillus subtilis*: a molecular docking study[J]. *Arch Microbiol*, 2021, 203(6):3033-3044.

[6] OSADA-OKA M, GODA N, SAIGA H, *et al.* Metabolic adaptation to glycolysis is a basic defense mechanism of macrophages for *Mycobacterium tuberculosis* infection [J]. *Int Immunol*, 2019, 31(12):781-793.

[7] 胡文清, 潘家华, 余必信. 亚低温联合胞磷胆碱对新生儿窒息合并缺氧缺血性脑病的功能恢复及血浆神经元特异性烯醇化酶的影响[J]. *临床和实验医学杂志*, 2022, 21(5):532-536.

[8] 崔秀秀, 马少林. 不同采血管以及标本存放时间对神经元特异性烯醇化酶(NSE)检测结果的影响[J]. *现代肿瘤医学*, 2021, 29(4):649-652.

[9] 陈小冰, 张雪梅, 陈求凝, 等. 血清 S-100B 蛋白联合 NSE 水平对新生儿缺氧缺血性脑病的预后评估价值[J]. *国际检验医学杂志*, 2020, 41(10):1175-1178.

[10] GENET SAAM, VISSER E, VAN DEN BORNE BEEM, *et al.* Correction of the NSE concentration in hemolyzed serum samples improves its diagnostic accuracy in small-cell lung cancer[J]. *Oncotarget*, 2020, 11(27):2660-2668.

[11] 刘一岚, 苏毅, 易海, 等. 神经元特异性烯醇化酶和 25 羟维生素 D 在 ALL 患儿血清的水平及临床意义[J]. *西部医学*, 2017, 29(10):1380-1384.

[12] 谢春霞, 田可港, 徐淑华, 等. 血清 uMtCK、NSE、CYFRA21-1、Pro-GRP 及 LD 检测在肺癌诊断中的应用及其与临床病理分期的关系[J]. *国际检验医学杂志*, 2021, 42(4):461-464.

[13] 郑丹. 血清肌酸激酶同工酶质量与活性检测在急性心肌梗死诊断中的应用价值[J]. *中国卫生工程学*, 2020, 19(4):533-535.

[14] 阳华妹, 邓毅, 王丽, 等. 高胆红素血症足月新生儿血清 NSE、脐血红蛋白水平对脑损伤的预测价值[J]. *海南医学院学报*, 2020, 26(19):1480-1484.

[15] 杜诗蓓, 金倩涯, 马潇, 等. 循环肿瘤细胞对神经母细胞瘤转移的诊断价值及疾病进展的预测价值[J]. *中国小儿血液与肿瘤杂志*, 2019, 24(5):258-262.

[16] 王艳海, 赵娜, 杨树帆. 4 项肿瘤标志物在肺癌诊断中的应用价值[J]. *检验医学与临床*, 2020, 17(9):34-36, 39.

[17] SHIN DONG HOON, JOJEONG YEON, KIM SUN H A, *et al.* Midkine Is a Potential Therapeutic Target of Tumorigenesis, Angiogenesis, and Metastasis in Non-Small Cell Lung Cancer [J]. *Cancers*, 2020, 12(9):2402.

[18] MORENO M M, BARRELL W B, GODWIN A, *et al.* Anaplastic lymphoma kinase (alk), a neuroblastoma associated gene, is expressed in neural crest domains during embryonic development of *Xenopus*[J]. *Gene Expression Patterns*, 2021, 40(13):119183.

[19] 吴日暖, 吴用, 杨丽霞, 等. 血清 Copeptin、ficolin-3 及 NSE 水平评估儿童创伤性脑损伤伤情严重程度的价值[J]. *创伤外科杂志*, 2020, 22(9):684-688.

[20] 王莉, 张国军. 血清神经元特异性烯醇化酶与外伤性脑损伤患者及临床特征的关系[J]. *首都医科大学学报*, 2021, 42(5):715-720.

[21] 刘小晓, 张晓英. 血清 NSE 及 aEEG 动态变化早期预测窒息新生儿脑损伤的意义[J]. *江苏大学学报(医学版)*, 2020, 30(2):154-159, 164.

[22] 王强, 卢小岚, 汪光蓉, 等. 新生儿血液样本溶血对血清 NSE 检测结果的影响及其校正公式的建立[J]. *检验医学*, 2019, 34(1):50-54.

[23] MASTROIANNI A, PANELLA R, MORELLI D. Invisible hemolysis in serum samples interferes in NSE measurement [J]. *Tumori*, 2020, 106(1):79-81.

(收稿日期:2022-04-29;修回日期:2022-09-01;编辑:张翰林)