

• 临床研究 •

疑似 D-二聚体引起 12 项细胞因子检测假阳性 3 例 病例报道及文献复习

周 喆, 朱鹏鹏[△], 张 晨, 刘 玺, 杨 岚, 郭 妮, 王 茜

(西安交通大学第二附属医院生物诊断治疗国家地方联合工程研究中心, 陕西 西安 710004)

[摘 要] 2024 年 2—11 月该中心对 3 例细胞因子初检异常升高患者采用二步法进行了复测, 3 例患者初检时细胞因子均异常升高, 复测后细胞因子水平显著降低。分析患者各项检测结果, 发现 3 例患者体内 D-二聚体水平均升高, 疑似 D-二聚体导致细胞因子检测假阳性, 提示二者存在关联。

[关键词] 细胞因子; 流式细胞术; D-二聚体; 病例报告

DOI: 10.3969/j.issn.1009-5519.2025.09.033

中图法分类号: R446.62

文章编号: 1009-5519(2025)09-2173-04

文献标识码: A

Suspected D-dimer caused 12 cytokine detection false positives; three case reports and literature review

ZHOU Zhe, ZHU Pengpeng[△], ZHANG Chen, LIU Xi, YANG Lan, GUO Ni, WANG Qian

(National-Local Joint Engineering Research Center of Biodiagnostics & Biotherapy,

The Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi 710004, China)

[Abstract] From February to November 2024, our center retested three patients with abnormally elevated cytokines by two-step method. Three patients had abnormally elevated cytokines at the initial examination, and the levels of cytokines decreased significantly after retest. By analyzing the test results of the patients, it was found that the level of D-dimer in three patients increased, and the suspected D-dimer led to the false positive of cytokine detection, suggesting that there was a correlation between the two.

[Key words] Cytokines; Flow cytometry; D-dimer; Case report

细胞因子是细胞间信息传递的关键信使, 由多种免疫细胞(单核细胞、巨噬细胞、自然杀伤细胞及 T、B 淋巴细胞等)和非免疫细胞(内皮细胞、表皮细胞、成纤维细胞等)在受到刺激后合成并分泌^[1]。细胞因子依据主要功能分为白细胞介素(IL)、集落刺激因子(CSF)、干扰素(IFN)、肿瘤坏死因子(TNF)、生长因子(GF)、趋化因子等。这些因子通过与相应受体结合, 在免疫系统调节、血细胞生成、细胞生长中起核心作用, 并广泛参与炎症反应、创伤愈合、肿瘤发展等多个生物过程^[2-6]。

细胞因子检测在临床诊疗中具有重要意义, 不仅可帮助医生早期识别感染并预警细胞因子风暴, 还能精准划分机体炎症/免疫状态, 包括全身炎症反应综合征、代偿性抗炎反应综合征和混合性拮抗反应综合征, 为重症患者提供全面的免疫功能监控, 并指导激素与抗炎药物的临床应用。此外, 细胞因子检测还能有效追踪自身免疫性疾病患者病程进展及疗效, 并能准确评估肿瘤患者病情变化、预后、疗效等^[2,7-10]。

目前, 细胞因子检测方法多样, 包括酶联免疫吸

附分析、化学发光免疫分析、电化学发光免疫分析、流式微球分析、全自动微流控免疫分析、单分子免疫分析及邻位延伸分析等^[11]。基于多重微球流式免疫荧光发光法的流式细胞术因其高通量、样本用量少、实验时间短、兼容多种样本类型、可变检测指标组合等优势, 受到了临床医生的广泛认可, 为临床决策提供了可靠的数据支持。

本中心采用多重微球流式免疫荧光发光法, 利用 12 项细胞因子检测试剂盒(包括 IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12P70、IL-17、TNF- α 、IFN- α 、IFN- γ)进行检测。其中 IL-1 β 、IL-2、IL-5、IL-6、IL-8、IL-12P70、IL-17、TNF- α 、IFN- α 、IFN- γ 为促炎因子, IL-4、IL-10 为抗炎因子。2024 年 2—11 月本中心 3 例患者首次检测结果显示细胞因子水平异常升高, 但中性粒细胞比例正常, 提示可能存在干扰因素导致假阳性结果。经二步法复测后, 3 例患者细胞因子检测结果均显著下降, 进一步分析发现 3 例患者 D-二聚体水平明显升高, 推测高 D-二聚体水平可能是导致细胞因子检测假阳性的原因, 现报道如下。

作者简介: 周喆(1987—), 本科, 技师, 主要从事循环肿瘤细胞检测及高通量测序分析工作。 [△] 通信作者, E-mail: zhupengpeng@xjtu.edu.cn。

网络首发 [https://link.cnki.net/urlid/50.1129.R.20250603.1006.002\(2025-06-03\)](https://link.cnki.net/urlid/50.1129.R.20250603.1006.002(2025-06-03))

1 临床资料

3 例患者中男 2 例,女 1 例;年龄 33~71 岁;临床诊断为肝癌、上消化道出血和鞍鼻。检测试剂为 12 项细胞因子检测试剂盒(多重微球流式免疫荧光发光法,青岛瑞斯凯尔生物科技有限公司,批号:20231202、20240702)。检测仪器为 RAISECARE 流式细胞仪。检测方法:(1)校准程序,①基质 B 的准备。将 5.0 mL 实验缓冲液加入冻干粉基质 B 中,静置至少 15 min,待冻干粉溶解,涡旋使其充分混匀。②校准品的制备。缓慢将校准品冻干粉玻璃瓶旋至半开,将 250 μ L 实验缓冲液加入玻璃瓶中,缓慢转动瓶子,使瓶壁附着的冻于粉完全溶解;室温下静置 10 min,待冻干粉溶解充分,涡旋再使其充分混匀,此时复溶后溶液浓度其标记为 C7;准备 6 只空 EP 管,分别标记为 C6~C1;每只 EP 管中加入 75 μ L 实验缓冲液,并进行 4 倍稀释,即取 25 μ L C7 溶液至 C6 中,充分混匀;用同样的方法按 4 倍稀释比例进行稀释,分别得到 C5~C1 校准品。C0 中只加入实验缓冲液。C7~C0 校准品稀释配置见表 1。③加样步骤。标记流式管,并向管中加入 25 μ L 基质 B、25 μ L 校准品(C7~C0)、25 μ L 捕获微球抗体(充分混合均匀)、25 μ L 检测抗体,室温避光震荡孵育 2.0 h(400~500 r/min),然后加入 25 μ L 藻红蛋白标记链霉亲和素(SA-PE),室温避光震荡孵育 0.5 h(400~500 r/min),加入 1 mL 洗涤缓冲液,涡旋 5~10 s,300~500 g 离心 5 min,缓慢倾倒出液体,将管倒扣于吸水纸上,每管加入 150 μ L 洗涤缓冲液,涡旋 10 s 将微球重悬,立即使用流式细胞仪进行检测。④校准曲线。根据流式细胞仪对校准品 C7~C0 的 8 个浓度点的 PE 荧光信号和相应浓度点的赋值浓度进行标曲拟合得到校准曲线,要求拟合相关性 $r\geq 0.990$,即可进行样本检测。(2)样本检测,标记流式管,分别加入 25 μ L 实验缓冲液、25 μ L 样品、25 μ L 捕获微球抗体(充分混合均匀)、25 μ L 检测抗体,室温避光震荡孵育 2.0 h(400~500 r/min),然后加入 25 μ L SA-PE,室温避光震荡孵育 0.5 h(400~500 r/min),加入 1 mL 洗涤缓冲液,涡旋 5~10 s,300~500 g 离心 5min,缓慢倾倒出液体,将管倒扣于吸水纸上,每管加入 150 μ L 洗涤缓冲液,涡旋 10 s 将微球重悬,立即使用流式细胞仪进行检测。(3)样本复测(两步法),标记流式

管,分别加入 25 μ L 实验缓冲液、25 μ L 样品、25 μ L 捕获微球抗体(充分混合均匀),室温避光震荡孵育 1.0 h(400~500 r/min),加入 1 mL 洗涤缓冲液,涡旋 5~10 s,500 g 离心 5 min,弃上清液后补加 50 μ L 实验缓冲液,加入 25 μ L 检测抗体,室温避光震荡孵育 1.0 h(400~500 r/min),加入 1 mL 洗涤缓冲液,涡旋 5~10 s,500 g 离心 5 min,弃上清液后加入 25 μ L SA-PE,室温避光震荡孵育 0.5 h(400~500 r/min),加入 1 mL 洗涤缓冲液,涡旋 5~10 s,500 g 离心 5 min,缓慢倾倒出液体,将管倒扣于吸水纸上,每管加入 150 μ L 洗涤缓冲液,涡旋 10 s 将微球重悬,立即使用流式细胞仪进行检测。利用 FSC-A 和 APC-A 2 个参数的散点图圈门,去除杂质,接着通过 FSC-A、SSC-A 2 个参数筛选出 2 个粒径的微球群,最终使用 APC-H、PE-H 2 个参数检测样本中 12 种微球的平均荧光强度。通过 RAISECARE 软件计算 12 种细胞因子的具体浓度,并导出结果。病例 1 首次检查 12 种细胞因子皆阳性,二步法复测后均为阴性;病例 2 首次检查 12 种细胞因子均阳性,复测后 IL-6 为 5.81 pg/mL,略高于参考值,其余 11 项检测值均在参考范围内;病例 3 首次检查 IL-6 为 541.42 pg/mL,复测后正常为 2.10 pg/mL。见表 2。与首次检查结果比较,复测时病例 1、2 的 12 个微球均向左偏移,病例 3 的 IL-6 微球向左偏移。见图 1~3。病例 1、2、3 中性粒细胞百分比分别为 46.00%、61.20%、64.90%,均在参考值范围(40%~75%)内。病例 1、2、3 D-二聚体分别为 7 540、5 560、2 490 ng/mL,均高于参考值范围(0~1 000 ng/mL)。

表 1 C7~0 校准品稀释配置

校准品编号	稀释倍数	所加实验缓冲液体积	所加校准品体积
C7	—	—	—
C6	4	75 μ L	25 μ L(C7)
C5	16	75 μ L	25 μ L(C6)
C4	64	75 μ L	25 μ L(C5)
C3	256	75 μ L	25 μ L(C4)
C2	1 024	75 μ L	25 μ L(C3)
C1	4 096	75 μ L	25 μ L(C2)
C0	—	75 μ L	—

注:—表示无此项。

表 2 3 例患者 12 项细胞因子检测结果(pg/mL)

项目	病例 1		病例 2		病例 3		参考范围
	首次检测	复查	首次检测	复查	首次检测	复查	
IL-5	368.62	<2.19	270.68	<2.19	<1.34	<1.37	0~5.2
INF- α	44.49	<0.93	74.77	<0.93	<1.23	<1.21	0~8.5
IL-2	167.38	<0.92	96.59	<0.92	1.71	1.80	0~7.5

续表 2 3 例患者 12 项细胞因子检测结果 (pg/mL)

项目	病例 1		病例 2		病例 3		参考范围
	首次检测	复查	首次检测	复查	首次检测	复查	
IL-6	154.96	<0.86	219.50	5.81	541.42	2.10	0~5.4
IL-1β	429.66	<2.10	231.85	<2.10	<0.63	<0.41	0~12.4
IL-10	88.20	<0.91	46.28	<0.91	1.45	1.55	0~12.9
IFN-γ	76.00	<2.40	282.58	<2.40	<1.90	<2.09	0~23.1
IL-8	566.20	<1.57	1305.75	<1.57	<0.82	<0.95	0~20.6
IL-17	196.59	2.89	417.86	1.81	<2.12	<2.08	0~21.4
IL-4	52.36	<0.71	29.61	<0.71	<0.91	<0.91	0~8.6
IL-12P70	7.02	<0.69	157.56	<0.69	0.85	0.77	0~3.4
TNF-α	279.65	<2.07	200.69	<2.07	<1.50	<1.51	0~16.5

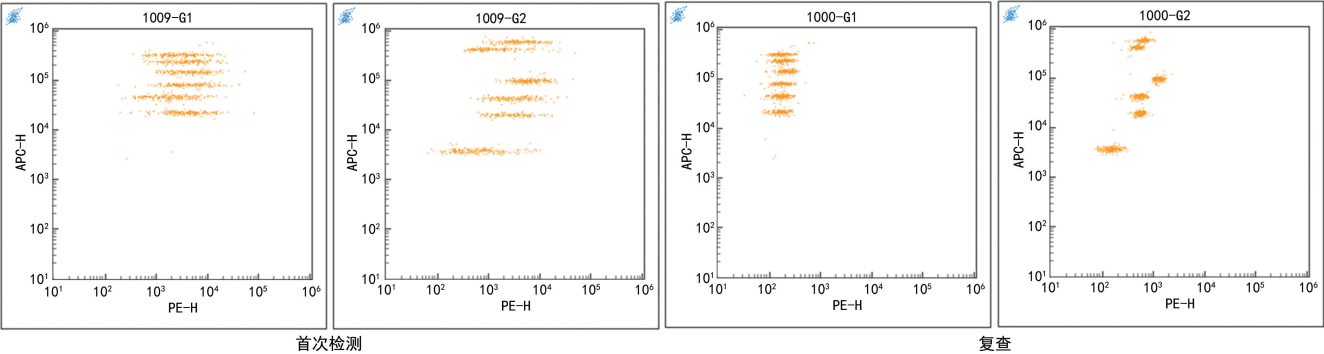


图 1 病例 1 流式上机图

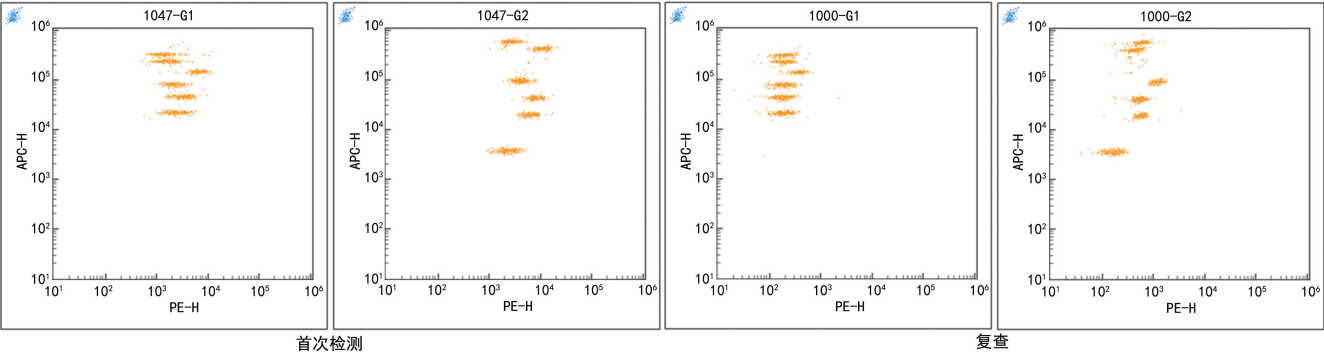


图 2 病例 2 流式上机图

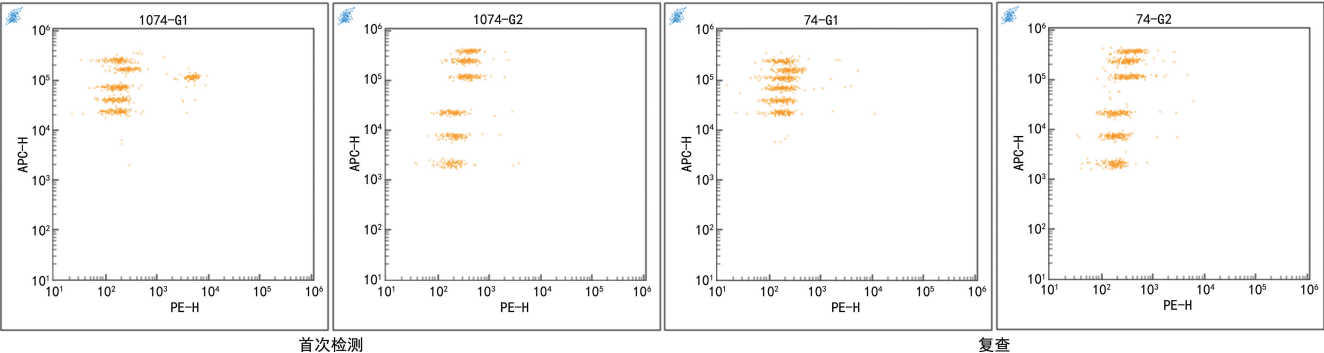


图 3 病例 3 流式上机图

2 讨 论

随着临床需求的增长,精确测量与监测细胞因子水平变得日益重要。本研究采用多重微球流式免疫荧光法检测患者血浆 12 项细胞因子水平,该方法通

过捕获微球偶联的细胞因子抗体与血浆中的细胞因子结合,再加入生物素标记抗体构建“三明治”复合物,接着与 SA-PE 反应,并利用生物素亲和素放大系统将微量细胞因子转化为可检测的荧光信号,最终通过流式细胞仪检测荧光信号,计算细胞因子水平。

IL-6 是细胞因子风暴的核心驱动因子,扮演着促进炎症并桥接机体免疫系统的角色^[12-13]。作为由 184 个氨基酸组成的 25-kDa 分泌型糖肽,IL-6 由多种细胞,如成纤维细胞、单核/巨噬细胞、淋巴细胞、上皮细胞、角质细胞、肿瘤细胞产生^[14]。在细胞因子风暴中,IL-6 升高早于 C 反应蛋白、PCT 等其他指标,且持续时间长,为急性感染的早期诊断提供了重要线索^[15]。此外,IL-6 还能激活中性粒细胞,加剧炎症反应^[16]。因此,IL-6 检测结果的准确性至关重要。本研究 3 例患者血浆 IL-6 等细胞因子水平异常升高,但血常规检查显示中性粒细胞百分比正常,这一矛盾提示可能存在干扰因素,进一步检查发现,3 例患者 D-二聚体水平均明显升高,推测 D-二聚体可能引起细胞因子检测假阳性。

细胞因子检测中样本复杂性可能导致非特异性结合,影响结果准确性。因此,本研究采用两步法复测疑似样本,捕获微球抗体与样本孵育结合目标细胞因子,洗涤去除未结合的抗体和杂质后再加入检测抗体进行孵育,然后通过流式法检测样本中细胞因子水平。两步法通过分阶段孵育和洗涤,优化反应条件,降低背景噪声,提高检测信号的信噪比。复测结果显示,3 例患者细胞因子水平显著下降,推测两步法有效去除了 D-二聚体引起的非特异性结合,排除了假阳性结果。

综上所述,在审核细胞因子检测报告时,需结合患者实验室数据,考虑潜在干扰因素,进行综合分析,排除假阳性,以确保检测结果的准确性和可靠性。尽管本研究样本量较少,但作为个案报道,仍具有独特性和参考价值。今后,作者将通过更大规模的临床试验深入探讨 D-二聚体与细胞因子检测假阳性的关联机制,为细胞因子的检测提供更可靠的参考标准。

参考文献

[1] LIU C, CHU D W, KALANTAR-ZADEH K, et al. Cytokines: from clinical significance to quantification[J]. Adv Sci (Weinh), 2021, 8(15): e2004433.

[2] KARKI R, KANNEGANTI T T S. The 'cytokine storm'; molecular mechanisms and therapeutic prospects [J]. Trends Immunol, 2021, 42(8): 681-705.

[3] YI M, LI T Y, NIU M K, et al. Targeting cytokine and chemokine signaling pathways for cancer therapy[J]. Signal Transduct Target Ther, 2024, 9(1): 176.

[4] 董雨菲, 顾觉彬, 李士军. 细胞因子在自身免疫病中的应用价值[J]. 中华检验医学杂志, 2023, 46(11): 1139-1144.

[5] 张林丽, 王艳, 刘莉. 细胞因子与炎症免疫疾病的研究进展[J]. 药学与临床研究, 2020, 28(3): 202-205.

[6] 何文杰, 任宏轩, 王羽丰. 癌性恶病质与细胞因子相关性的临床研究[J]. 四川医学, 2011, 32(5): 674-676.

[7] JARCAZAK D, NIERHAUS A. Cytokine storm-definition, causes, and implications[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(19): 11740.

[8] MOUDGIL K D, CHOUBEY D. Cytokines in autoimmunity: role in induction, regulation, and treatment[J]. J Interferon Cytokine Res, 2011, 31(10): 695-703.

[9] LEE H M, LEE H J, CHANG J E. Inflammatory cytokine; an attractive target for cancer treatment[J]. Bio-medicines, 2022, 10(9): 2116.

[10] QU R, ZHAO Y, ZHANG Y. The mechanism of cytokine regulation of cancer occurrence and development in the tumor microenvironment and its application in cancer treatment: a narrative review [J]. Transl Cancer Res, 2024, 13(10): 5649-5663.

[11] 吴妮, 孙云娟, 胡建军, 等. 临床试验中细胞因子定量检测的专家共识(2024 版)[J]. 中国临床药理学杂志, 2024, 40(21): 3211-3216.

[12] HIRANO T. IL-6 in inflammation, autoimmunity and cancer [J]. Int Immunol, 2021, 33(3): 127-148.

[13] LACINA L, BRÁBEK J, KRÁL V, et al. Interleukin-6: a molecule with complex biological impact in cancer[J]. Histol Histopathol, 2019, 34(2): 125-136.

[14] ROSSI J F, LU Z Y, JOURDAN M, et al. Interleukin-6 as a therapeutic target[J]. Clin Cancer Res, 2015, 21(6): 1248-1257.

[15] 中国医药教育协会感染疾病专业委员会. 感染相关生物标志物临床意义解读专家共识[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2017, 40(4): 243-257.

[16] 李昕, 刘佳佳. IL-6 对中性粒细胞在炎症中作用的影响 [J]. 国外医学(免疫学分册), 2005, 28(5): 277-280.

(收稿日期: 2024-12-25 修回日期: 2025-03-19)