

## · 综 述 ·

血脂检测方法评价及影响因素研究<sup>\*</sup>

胡俊萍 综述, 毛美娇, 梁 燕, 刘 萍<sup>△</sup> 审校  
(上海中医药大学附属龙华医院 200032)

关键词: 血脂; 检测方法; 影响因素

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.05.024

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)05-0585-03

血清总胆固醇(total cholesterol, TC)、三酰甘油(triglyceride, TG)和低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein-cholesterol, LDL-C)水平增高及高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein-cholesterol, HDL-C)水平降低是动脉粥样硬化发生、发展的主要脂类危险因素, 又是诱发冠心病的危险因素。临床流行病学研究表明, 载脂蛋白(apolipoprotein, Apo)同样是研究动脉粥样硬化的重要指标。临床常规的血脂检测包括: TC、TG、LDL-C、HDL-C、载脂蛋白 A1(ApoA1)、载脂蛋白 B(ApoB)及脂蛋白(a)[lipoprotein(2), Lp(a)]。

### 1 TC 和 TG 的测定

检测 TC 和 TG 的方法有很多, 包括酶法、化学法和以高效液相色谱分析及液/气相色谱分析法为基础的方法。化学法可上机操作, 相对于酶法, 其敏感性较差、反应时间较长; 色谱法费用昂贵, 样品处理复杂, 难以推广。酶法简单易行, 快速准确, 易于自动化分析, 许多厂家都能提供所需要的成套试剂盒, 易于普及。目前临床实验室基本上都用酶法检测血清 TG、TC。近年来已有学者探讨用酶标仪比色法测定血清 TC、TG, 将该法与生化法进行比较发现, 酶标仪比色法消耗的试剂成本很低, 操作方法简便, 测定的结果准确, 不需要昂贵的仪器支撑<sup>[1]</sup>。

### 2 HDL-C 的测定

HDL-C 没有决定性的检测方法, 沉淀法、直接法、超速离心法、匀相法、电泳法、色谱法等都可用于 HDL-C 的检测, 其中以超速离心法为参考方法。液相色谱法因稳定性差而受限于临床, 而超速离心法被认为是不实用的常规分析检测方法<sup>[2]</sup>。临床常规分析中应用较多的是沉淀法、直接法和匀相法。化学沉淀法是 HDL-C 的第一代检测方法, 根据所用的化学物质的不同, 可分为多种, 其中以肝素/锰法和镁/磷钨酸法最为常用。肝素/锰沉淀法是“脂质调查临床流行病学计划研究”所采用的方法, 并为“临床生化国际联合会”所推荐的方法, 同时采用这种方法所获得的结果与超速离心法所获得的结果很接近, 但是易受 TG 水平的影响, 血浆中 TG 浓度过高时, 该方法的步骤就显得繁琐。镁/磷钨酸测定法的优点是方法较为简便, 无机试剂易于获得且易保存, 很少因富含 TG 脂蛋白的浓度过高而影响结果, 同时对采用酶法测定 TC 也无影响。沉淀法的主要缺点是标本需要预处理, 不能直接上机测定, 且高 TG 标本由于极低密度脂蛋白(very low density lipoprotein, VLDL)沉淀不完全而影响测定结果。与传统的沉淀法相比, 匀相法样本用量少, 操作简单, 可直接上机测定, 测得结果符合国家胆固醇教育计划(The National Cholesterol Education Pro-

gram, NCEP)规定的精密度、准确性和总误差, 在自动分析仪普及的基础上, 很快被临床实验接受。但是由于各种匀相试剂的不同, 导致测定的准确度和特异性存在较大差异<sup>[3]</sup>。直接法因准确、精密、简便、快速的特点, 已在临床中得到普及<sup>[4]</sup>, 由于不同厂家生产的试剂盒不同, 检测的结果存在偏差<sup>[5]</sup>。

HDL-C 的代谢是一个复杂的过程, 不同亚分类在脂质代谢中的作用不同, HDL3 升高可增加冠心病(coronary heart disease, CHD)的发生, HDL2 升高则可降低患 CHD 的风险<sup>[6]</sup>; 低 HDL-C 不一定会发生 CDH<sup>[7]</sup>, 有文章指出, 非高密度脂蛋白和 HDL-C/TC 比率在预测心血管病发生方面与载脂蛋白相比较, 有着相同甚至更好的效果<sup>[8]</sup>。所以用 HDL-C 预测动脉粥样硬化存在一定的局限性<sup>[9]</sup>。因此临床实验中如何准确的检测 HDL-C 显得异常重要。

### 3 LDL-C 的测定

LDL-C 含量的方法, 国内外进行了广泛的研究, 大体上可分为等密度超速离心法、色谱法、电泳法、直接法、Friedewald 公式计算法等。超速离心法由于步骤繁琐费时, 技术要求高, 在超速离心过程中不稳定脂蛋白的改变, 各实验室设备不一致, 以及交叉污染等原因, 在常规实验室检测中几乎不用。电泳法可对主要的脂蛋白进行量化, 并且具有可视性, 被认为是检测Ⅲ型高脂血症的确定方法<sup>[10]</sup>。然而, 与酶和免疫化学实验中使用的高度自动化的工具相比, 电泳法对手工操作的技术要求比较高, 不适合大批量的常规实验。Friedewald 公式计算法简便, 成本低, 可用于大批体检粗筛者, 但是该公式的使用受条件限制, 当血清中存在乳糜微粒、血清 TG 水平高于 4.52 mmol/L(400 mg/dL), 及血清中存在异常脂蛋白(Ⅲ型高脂血症)时, 不应采用公式计算, 同时计算结果受到 TC、HDL-C 测定准确性的影响。化学沉淀法是第一代直接法, 与 Friedewald 公式法一样易受血清 TG 水平的影响; 第二代直接法简化了程序, 提高了样品的处理, 但是检测时仍需大量样本和专用设备; 第三代直接法-匀相法最大的优点是全自动化, 提高了精确度, 能准确地控制实验的时间和温度, 同时免去了标本的预处理。实践探索中发现, 在低浓度 TG 时, 聚乙烯硫酸沉淀法和 Friedewald 公式计算法结果基本一致; 高 TG (TG > 4.52 mmol/L) 时两法差异较大, Friedewald 公式计算结果偏低<sup>[11]</sup>。Mora 等<sup>[12]</sup>采用 Friedewald 公式法和直接法检测 27 331 例健康女性的 LDL-C, 根据检测结果对她们患心血管疾病的风险进行分类, 结果显示, 直接法所得结果比 Friedewald 公式法低 0.13~0.26 mmol/L, 这样的差距很可能在预测患心血管疾病的风险中出现错误。Miller 等<sup>[13]</sup>用 4 种匀相法检测 100 例人

\* 基金项目: 国家“十一五”支撑计划子课题(2007BAI20B078); 国家自然科学基金(30873340); 上海市卫生局课题(2010214)。△通讯作者, E-mail: liuping23@sina.com。

血清的 LDL-C, 结果显示 4 种方法的总误差符合 NCEP 的要求。

#### 4 血清 Lp(a) 的测定

血清 Lp(a) 浓度主要由基因调控, 不受性别、年龄、体质、适度体育锻炼和降胆固醇药物的影响。目前多用免疫方法进行测定, 首选免疫浊度测定法, 这类方法可以全自动分析大批量样本, 精密度较好, 但是, Lp(a) 分子大小的高度不一致性、Lp(a) 中蛋白的不同、Lp(a) 与纤溶酶原氨基酸序列的同源性及应用校准物的不同等影响着免疫浊度测定法的结果。有文献报道, 通过测定 Lp(a)-胆固醇 [Lp(a)-C] 来表示 Lp(a) 含量可避免免疫浊度测定法的缺点<sup>[14]</sup>。植物凝集素法、超速离心法和/或琼脂糖凝胶电泳法都可用于 Lp(a)-C。但是, 植物凝集素法第 1 步需手工操作, 操作繁琐, 技术要求高; 超速离心过程费时、成本高; 电泳分离脂蛋白的精密度差。所以, 通过测定 Lp(a)-C 来表示 Lp(a) 含量的方法在常规实验室检测中存在一定的普及困难。

#### 5 ApoA1 和 ApoB 的测定

各种免疫学方法都可作为 ApoA1 和 ApoB 的常规测定。主要有辐射免疫扩散法 (radial immunodiffusion, RID)、单向免疫电泳测定法又称火箭电泳法、ELISA 法、荧光免疫法 (fluorescence immunoassay, FIA)、放射免疫法 (radio immunoassay, RIA)<sup>[15]</sup> 和免疫比浊法等。RID 操作复杂, 线性范围小, 需对样品进行稀释, 而且耗时长; 火箭电泳法较前法耗时短, 灵敏度高, 但是标准曲线浓度范围小, 属多克隆测定法; RIA 敏感性好, 准确度高, 但是标记物半衰期短, 存在放射性污染, 因此要作为商品化的试剂盒技术不易被广泛接受和使用。FIA 在试剂的稳定性、分析特异性和敏感性方面与 ELISA 法和 RIA 比较, FIA 无放射性污染, 操作相对简便, 但由于存在测定本底较高等问题, 使其存在一定的困难。目前临床常规实验室检测运用较多的是免疫比浊法, 首选免疫透射比浊法。该法操作过程简单, 线性范围比较宽, 对人体不存在危险性, 但受血清中大分子物质、抗原抗体比例和曲线方程的影响。所以, 应用免疫透射比浊法测定 ApoA1 和 ApoB 时, 抗血清的纯度和效价至关重要, 抗原抗体的比例要合适, 抗原位点要充分暴露 (最简单的方法是在反应体系中加入表面活性剂), 同时, 标准血清定值的可靠性是 ApoA1 和 ApoB 准确测定的基本保证。

### 6 影响血脂检测的因素

#### 6.1 样本的采集与处理

**6.1.1 受检者的准备** 受检者应保持平常的生活和饮食习惯, 在空腹状态下采取血液样本; 同时, 要注意受试者是否服用影响血脂的药物, 是否为妊娠期, 饮酒、吸烟、紧张、血液浓缩等也可影响 TC、TG、LDL-C、HDL-C 的水平; 还应注意采血的季节, 为了前后比较, 应在每年统一季节检查。

**6.1.2 体位及静脉采血** 体位可以影响水分在血管内外的分布, 例如站立 5 min 可使血脂浓度提高 5%, 15 min 提高 16%, 所以, 除非是卧床的患者, 一般采血取坐位, 采血前至少应静坐 5 min。采血时一般用肘静脉血, 也可用其他臂静脉。止血带的使用不可超过 1 min, 穿刺成功后应立即松开止血带。静脉阻滞 5 min 可使 TC 增高 10%~15%。

**6.1.3 抗凝剂** 留取血清样本时, 应将空腹静脉血置入不含抗凝剂的试管中; 而留取血浆样本时则应将全血置入含 EDTA-Na<sub>2</sub> 的试管内 (1 mg/mL 血)。EDTA 抗凝血浆中的 TC 和 TG 水平比血清中约低 3%。EDTA 浓度越高, 血浆中 TC 和 TG 偏低越明显。中国多用血清作血脂分析。

**6.1.4 标本处理** 血液标本应尽快送往实验室, 室温下放置 30~45 min 后离心, 分离血清。放置的时间不应超过 3 h。血清分离后必须吸出, 转移至带小盖的试管中, 防止水分挥发。如不能当天测定, 可暂存在 4 ℃ 冰箱中, 至少可稳定 4 d。如需长期保存, 用作 TC 测定者 -20 ℃ 已足够; 用作 TG 和 Apo、Lp(a) 测定者, 最好保存在 -70 ℃, 不要反复冻融。

Shih 等<sup>[6]</sup> 将在 -70 ℃ 储存长达 7 年之久的安慰剂组人血清 TC、TG 和 HDL-C 进行检测发现, 在 -70 ℃ 条件下, 储存时间的长短对 TC、TG 和 HDL-C 的影响无统计学意义。张江涛等<sup>[7]</sup> 将全血在 25 ℃ 下温育 1、4、8 和 24 h, 4 ℃ 下温育 5 d, 然后分离血清, 迅速在 -70 ℃ 下冰冻, 用高效液相色谱法测定 TC、总游离胆固醇、HDL-C、高密度脂蛋白游离胆固醇, 发现不同个体全血在各种条件下温育, 血清 TC、总游离胆固醇、HDL-C、高密度脂蛋白游离胆固醇多出现不同程度的变化。

**6.2 检测方法、仪器、试剂和校准物对结果的影响** Miller 等<sup>[5]</sup> 以超速离心法为参考方法, 采用 7 种直接法检测健康者和患者 (主要为高脂血症和心血管疾病) 的 HDL-C 和 LDL-C, 在确保其他条件一致的情况下对 2 组参与者的血清进行检测比较, 8 种方法中, 对于健康者, HDL-C 有 6 种监测方法的总误差小于或等于 13%; LDL-C 有 5 种检测方法的总误差小于或等于 12%, 两者均在 NCEP 规定的总误差范围内, 而对于患者, 所有的直接法都无法达到 NCEP 规定的总误差范围内<sup>[9]</sup>。用不同的方法测定 LDL-C, 当 TG < 4.52 mmol/L 时, 不同的方法检测同一样本含量, 其差异无统计学意义; 当 TG > 4.52 mmol/L 时, 差异则存在统计学意义。不同的检测方法、仪器检测同一样本血清 HDL-C, 其差异无统计学意义; 不同的试剂、校准物检测同一样本 HDL-C, 其差异有统计学意义<sup>[18]</sup>。不同的检测系统检测 Apo 具有可比性<sup>[19]</sup>。校准物的不同可影响血清 Lp(a) 的测定结果<sup>[19]</sup>。

**6.3 显色条件的不同可影响测定结果** 不同的 pH、温度、反应时间下, TC 的测定结果可出现偏差。在 pH 为 7.0, 温度在 37 ℃ 反应 10 min 的条件下检测 TC 较好<sup>[20]</sup>; 而对于超高度的 TG 用酶法检测时则出现结果偏低<sup>[21]</sup>。在 -20 ℃ 低温保存 7 d 后, 除 LDL-C 外, TC、TG、HDL-C 的检测结果与即刻测定值之间差异有统计学意义<sup>[20]</sup>。

**6.4 血脂水平的波动对结果的影响** 分析结果时, 应考虑脂质和脂蛋白水平本身存在较大的生物学波动, 可以是季节变化、月经周期、体育锻炼、年龄及伴发疾病等原因所致。大多数时间内, 血浆 TC 水平波动于绝对平均值的 10% 可变范围内, TG 水平的波动范围可能稍大一些, 可达 20% 左右。

### 7 小结

血脂检测是临幊上多种疾病诊断的重要指标, 也是评价药物疗效的 1 个指南, 在临幊检测时, 各种因素的干扰都可能影响检测结果, 影响治疗方案的确定和实施。因此, 准确检测血脂显得异常重要。

### 参考文献

- [1] 李勇. 酶标仪比色法测定血清三酰甘油、总胆固醇方法探讨 [J]. 检验医学与临幊, 2010, 7(8): 1748-1750.
- [2] Warnick GR, Nauck M, Rifai N. Evolution of methods for measurement of HDL-C cholesterol: from ultracentrifugation to homogeneous assays [J]. Clin Chem, 2001, 47(9): 1579-1596.
- [3] 张海舰, 国汉邦, 张传宝, 等. 高密度脂蛋白胆固醇测定匀相法试剂评价 [J]. 中华检验医学杂志, 2009, 32(5): 521-525.

- [4] 杜晓云, 谢松业, 丁星. 2 种不同方法测定血清高密度脂蛋白胆固醇的性能分析和评价[J]. 现代中西医结合杂志, 2005, 14(21): 2852-2853.
- [5] Miller WG, Myers GL, Sakurabayashi I, et al. Seven direct methods for measuring HDL and LDL cholesterol compared with ultracentrifugation reference measurement procedures [J]. Clin Chem, 2010, 56(6): 97.
- [6] Singh U, Otvos J, Dasgupta A, et al. High-dose  $\alpha$ -tocopherol therapy does not affect HDL subfractions in patients with coronary artery disease on statin therapy [J]. Clin Chem, 2007, 53(3): 525-528.
- [7] Movva R, Rader DJ. Laboratory assessment of HDL heterogeneity and function [J]. Clin Chem, 2008, 54(5): 788-800.
- [8] Ridker PM, Rifai N, Cook NR, et al. Non-HDL cholesterol, apolipoproteins A-I and B<sub>100</sub>, standard lipid measures, lipid ratios, and CRP as risk factors for cardiovascular disease in women [J]. JAMA, 2005, 294(3): 326-333.
- [9] 郑慧斐, 丛辉, 王惠明, 等. 高密度脂蛋白亚类的检测方法 [J]. 临床检验杂志, 2009, 27(6): 477-479.
- [10] Nauck M, Warnick GR, Rifai N. Methods for measurement of LDL-cholesterol: a critical assessment of direct measurement by homogeneous assays versus calculation [J]. Clin Chem, 2002, 48(2): 236-254.
- [11] 王晓玲. 低密度脂蛋白测定方法的选择 [J]. 中国医药指南, 2009, 7(17): 89-90.
- [12] Mora S, Rifai N, Buring JE, et al. Comparison of LDL cholesterol concentrations by Friedewald calculation and direct measurement
- 综述 •

in relation to cardiovascular events in 27 331 women [J]. Clin Chem, 2009, 55(5): 888-894.

- [13] Miller WG, Waymack PP, Anderson FP, et al. Performance of four homogeneous direct methods for LDL-cholesterol [J]. Clin Chem, 2002, 48(3): 489-498.
- [14] 董军, 陈文祥. 血浆脂蛋白(a)检测的研究进展 [J]. 中华检验医学杂志, 2006, 29(11): 1035-1037.
- [15] 康熙雄, 陈燕, 王亚杰, 等. 载脂蛋白 A 和 B 的结构功能与测定方法及其标准化 [J]. 中华检验医学杂志, 2008, 31(8): 956.
- [16] Shih WJ, Bachorik PS, Haga JA, et al. Estimating the long-term effects of storage at -70 °C on cholesterol, triglyceride, and HDL cholesterol measurements in stored sera [J]. Clin Chem, 2000, 46(3): 351-364.
- [17] 张江涛, 董军, 李红霞, 等. 高效液相色谱检测全血贮存对血清总胆固醇和高密度脂蛋白胆固醇的影响 [J]. 中华检验医学杂志, 2005, 28(4): 364-368.
- [18] 易尚辉, 易银沙, 王治国, 等. 不同实验条件对高密度脂蛋白测定的偏倚分析 [J]. 实用预防医学, 2008, 15(2): 298-300.
- [19] 曹永坚, 黄宪章, 孙蕾, 等. 不同检测系统测定载脂蛋白结果的可比性研究 [J]. 国际检验医学杂志, 2006, 27(1): 15-17.
- [20] 吴甲文. 标本放置时间与温度对血脂测试的影响 [J]. 检验医学与临床, 2009, 6(19): 1617-1618.
- [21] 汪旭强, 宋保利, 李丽萍. 酶法测超高浓度三酰甘油标本时结果偏低的原因分析 [J]. 现代检验医学杂志, 2008, 23(1): 7-8.

(收稿日期: 2010-07-10)

## 调节性 T 细胞在乙型肝炎中免疫作用的研究现状

孔元梅 综述, 许红梅 审校

(重庆医科大学儿童医院 400014)

关键词: 调节性 T 细胞; 乙型肝炎; 免疫调节; FoxP3

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.05.025

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)05-0587-03

乙型肝炎是由乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 引起的流行性、进展性传染病。目前全球有 1/3 人口为 HBV 感染者, 约 3.6 亿人为无症状 HBV 携带者, 每年因感染 HBV 死亡的人数约 50~120 万, 乙型肝炎相关的肝硬化和肝癌死亡率逐年增加, 严重威胁人类的健康。乙型肝炎发病机制较为复杂, 机体感染 HBV 后引起细胞免疫和体液免疫应答, 并激发自身免疫反应及免疫调节功能紊乱, 导致机体特异性免疫功能损伤, 如: Th1/Th2 失衡, 调节性 T 细胞 (regulatory T cell, Treg) 增加等。Treg 细胞是体内具有免疫抑制功能的异质性细胞群, 在乙型肝炎病毒感染者中由于抑制了 CD8<sup>+</sup> T 细胞介导的特异性抗病毒免疫应答, 而使 HBV 感染慢性持续性存在, 现就 Treg 细胞在乙型肝炎中的免疫作用作一综述。

### 1 Treg 细胞分类、分子表达与鉴定

机体中 Treg 细胞包括 CD4<sup>+</sup> 调节性 T 细胞、Th3 细胞、Tr1 细胞和 CD8<sup>+</sup> 调节性 T 细胞。自然生成的 Treg 细胞主要在胸腺中发育, 并经自身抗原刺激后在胸腺内被阳性选择。自然形成的 Treg 细胞占 CD4<sup>+</sup> 群体的 5%~10%, 最早可见于 T 细胞发育的第 1 阶段, 使 T 细胞向 Treg 细胞发育的信号是通过胸腺内 CD4<sup>+</sup> T 细胞的 T 细胞受体与胸腺内皮细胞递呈的

MHC-II 类分子结合, CD4<sup>+</sup> T 细胞被“部分活化”, 从而表达 CD25 分子 (IL-2 受体的  $\alpha$  链), 同时 FoxP3 (forkhead box P3) 也呈阳性, 发育成具有免疫抑制功能的 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg 细胞, 而对自身 MHC-II 类分子亲和力过低的胸腺细胞则不能被选择。另外一类分化途径与自然形成的 Treg 细胞的不同, 其是由外周 T 细胞发育而来, 包括 Tr1 和 Th3 Treg 细胞。Tr1 细胞 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> FoxP3<sup>-</sup>, 通过分泌 IL-10 来发挥调节免疫功能的作用; Th3 前体细胞与 Tr1 细胞相同, 体外用 TGF- $\beta$  刺激 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> FoxP3<sup>-</sup> 细胞可使其转化为 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> 细胞, 即 Th3 细胞<sup>[1]</sup>。目前对 CD8<sup>+</sup> Treg 细胞的研究较少, 有报道称其在体外可抑制 CD4<sup>+</sup> T 细胞的功能<sup>[2]</sup>。

Treg 细胞表面稳定表达 CD25 被认为是 Treg 细胞的显著特征, 细胞调节功能集中体现在强表达 CD25 的 CD4<sup>+</sup> T 细胞上, 实验显示, 敲除 IL-2 受体 (CD25 或 CD122) 或它的配体 IL-2 都可导致 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> 细胞数量降低, 证明了 CD25 在 Treg 细胞发育过程中的重要作用<sup>[3]</sup>; Treg 细胞在细胞表面及胞浆内表达抑制性共刺激分子 CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4) (CD152), 它是细胞免疫的负反馈调节因子, 抗 CTLA-4 单抗可阻断 Treg 细胞的免疫抑制作用<sup>[4]</sup>; 肿瘤