

1407-1413.
[32] Gabriely G, Yi M. Human glioma growth is controlled by microRNA-10b[J]. Cancer Res, 2011, 71(10):3563-3572.
[33] Chai G, Liu N, Ma J, et al. MicroRNA-10b regulates tumorigenesis in neurofibromatosis type 1[J]. Cancer Sci, 2010, 101(9):1997-2004.

[34] Garzon R, Garofalo M. Distinctive microRNA signature of acute-myeloid leukemia bearing cytoplasmic mutated nucleophosmin [J]. Proc Nat Acad Sci USA, 2008, 105(10):3945-3950.

(收稿日期:2012-04-18)

• 综 述 •

维生素 D 实验室检测方法研究进展

姜 丽, 李 波 综述, 李 洋, 邹家荏 审校
(重庆三峡中心医院御安分院检验科, 重庆 404000)

关键词: 维生素 D 缺乏; 维生素 D₃; 25-羟维生素 D₂; 串联质谱法; 化学发光测定法; 色谱法, 高压液相
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.17.032 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2012)17-2116-02

维生素 D(VD)是人体必需的营养素,人体自身不能合成,需通过日光照射或食物摄入获得。VD 为脂溶性维生素,固醇类衍生物,共 5 种,其中 VD₂、VD₃ 与健康关系密切,且均为 VD 原经紫外线照射后的衍生物^[1]。这两种形式的 VD 均无生物活性,必须在体内经过两次羟化后方能发挥生物效应。VD 在肝脏 25-羟化酶作用下转化为 25 羟基维生素 D[25-(OH)D],再经过肾脏中线粒体细胞色素 P450 氧化酶(1 α 羟化酶)的催化转化为有生物活性的 1,25-二羟基维生素 D[1,25-(OH)₂D]^[2]。VD 在血液中主要以 25-(OH)D 的形式运输,其浓度最高,最稳定,半衰期最长(2 周左右),故血清 25-(OH)D 浓度是评价体内 VD 营养状况最为有效的指标^[3]。通常将 25-(OH)D $\geq$ 30 ng/mL、20~<30 ng/mL、<20 ng/mL 分别定义为 VD 充足、不足和缺乏^[4]。

VD 能与甲状旁腺激素共同作用,维持血钙水平的稳定,促进钙在肠内的吸收。体内 VD 不足也会限制钙的吸收,对骨健康产生消极影响。Pieper 等^[5]调查了 1 174 例患者血清 25-(OH)D 浓度分布及其与髌骨骨折的联系,发现 VD 缺乏在髌部骨折的老年人群当中十分普遍,VD 在多变量控制的模型中与血清钙相关,但单靠血清钙一个指标无法确切证实。亦有研究显示,人体 VD 缺乏可导致肌肉无力,提高 VD 水平可使肌肉反应速度和强度均大幅度提高^[6]。

大量研究证实 1,25-(OH)₂D₃ 不仅可以维持钙磷及骨代谢平衡,还可参与多种病理过程,发挥对慢性肾脏疾病的肾保护作用^[7]。有研究证实 1,25-(OH)₂D₃ 不足是慢性肾脏疾病患者的明显危险因素,且二者互为因果,形成恶性循环^[8]。VD 还能通过与蛋白激酶 C、促丝裂原活化蛋白激酶、蛋白激酶 A、磷脂酰肌醇、Ca²⁺ 依赖性电压门控通道或 Ca²⁺ 非依赖性电压门控通道相互作用介导第二信使旁路的激活,影响细胞内信号转导通路,改变细胞内钙浓度,激活或抑制 Bcl-2、c-jun,最终影响细胞增殖、分化和凋亡^[9]。体内外实验研究均已证明 1,25-(OH)₂D₃ 对乳腺、前列腺、结肠、胆囊、甲状腺、垂体肿瘤以及白血病和淋巴瘤均具有生长抑制和促进肿瘤细胞分化的作用^[10-11]。

有报道指出,VD 是生理条件下葡萄糖刺激胰岛素分泌以及维持正常糖耐量的必须物质^[12]。Holick^[13]的研究证实,补充了活性 VD 类似物的大鼠与对照组相比,其血清 L-12、NF-7 显著减少,糖尿病(DM)发生率明显降低。Hypponen 等^[14]经过长期随访证实,儿童期补充 VD 可使 DM 患病风险降低

80%,而缺乏 VD 的儿童,其患 DM 的风险增加 200%。活性 VD 及其类似物能够调节 T 细胞介导的疾病状态。这种作用在多种自身免疫性疾病的动物模型中已得到证实,如 1 型 DM、多发性硬化症、类风湿关节炎、系统性红斑狼疮、自身免疫性甲状腺炎等^[15]。

VD 缺乏可使患高血压、冠心病的危险性大大增加^[16]。Teng 等^[17]对 51 037 例血液透析患者连续观察 2 年,发现注射 VD 可使治疗组心血管病死亡率大大降低。

VD 不仅是保证人体正常生长发育、维护骨骼和肌肉系统正常功能的重要物质,还与肿瘤、自身免疫性疾病、感染性疾病和心血管疾病有关^[18],也被称为“疾病预防的明日之星”^[19]。但长期或大剂量过多使用的 VD 亦可发生中毒,表现为血清 25-(OH)D 水平明显增加和高钙血症,临床上还可出现各种毒性症状^[20]。

目前检测 VD 的方法主要有:放射免疫法(RIA),灵敏度高,特异性强,精密度好,仪器设备条件要求不高,是基层单位对超微量物质测定的主要手段,但存在放射污染的潜在风险;ELISA 法,设备和操作简单,无污染但敏感性和特异性较差。化学发光免疫测定(CLIA),操作简单、快速,无同位素污染等优点,容易自动化,现已有多家厂商开发出相关自动免疫分析仪;高效液相色谱法(HPLC),灵敏度、特异性、准确性都较高,但设备较贵,标本前处理过程复杂;液相色谱-质谱联用法(LC-MS/MS),灵敏度、特异性、准确性都高,但操作程序较复杂,需要更昂贵的特殊仪器。

一个采用液-液萃取反相 LC-MS/MS 法检测血清 25-(OH)D₃ 和 25-(OH)D₂ 的参考测量程序已被审慎评估。Tai 等^[21]通过该法检测已知浓度的 25-(OH)D 标本。25-(OH)D₃ 和 25-(OH)D₂ 的回收率为 99.0%~101.0%,绝对回收率分别为 97%和 92%。同时也获得了出色的精度,25-(OH)D $>$ 1 ng/g 时不精密度(CV)为 0.2%~0.6%,25-(OH)D $<$ 1 ng/g 时 CV $<$ 2%。该方法能够将 25-(OH)D₃ 和 25-(OH)D₂ 同其各自的同分异构体分离开。在信噪比约为 3 时检测限约为 0.15 ng/g。此方法检测血清 25-(OH)D₃ 和 25-(OH)D₂ 具有良好的准确度和精密度,可以用来与临床其他检测 VD 的方法作比较,亦能够溯源到一个更高要求的标准。

Lensmeyer 等^[22]对 HPLC 法测 VD 与 LC-MS/MS 法、竞争蛋白结合法原理的 Nichols Advantage 平台、Diasorin(意大利索灵集团)的 RIA 法做了比较。HPLC 法测 25-(OH)D₃ 批

间 CV 为 2.6%~4.9%, 25-(OH)D₂ 批间 CV 为 3.2%~13%, 回收率均为 95%~102%, 线性范围均是 5~200 μg/L。HPLC 与其他三种方法检测结果的相关性均较好, 由此可见 HPLC 是一种比较可靠、稳定的方法。Van den Ouweland 等^[23] 比较了 LC-MS/MS 检测法、Diasorin 的 RIA 法、罗氏最近重新标准化的全自动电化学发光免疫(ECLIA), 同时也分析比较了其他使用 LC-MS/MS 方法的实验室检测结果, 检测来自国际 VD 室间质评计划(DEQAS)的室间质控标本。25-(OH)D₃ 和 25-(OH)D₂ 的线性范围是 5~550 nmol/L, 日内和日间 CV≤6%。25-(OH)D₃ 的回收率为 94.9%~106.9%, 25-(OH)D₂ 的回收率为 82.7%~100.3%。Diasorin 的 RIA 与 LC-MS/MS 法结果相符合, 罗氏 ECLIA 法不符合。

Farrell 等^[24] 对 170 例随机选取的患者标本分别采用 LC-MS/MS 法和 RIA 检测。连续 5 d 取 2 份血清 5 次重复测量以评估批内及批外分析精度。结果 LC-MS/MS 法的一致相关性(CCC)为 0.99, 偏差为 1.4 nmol/L。RIA 法与 LC-MS/MS 法相当, 其 CCC 为 0.97, 平均偏差为 2.7 nmol/L。

Leino 等^[25] 分析比较了罗氏 E170 电化学发光免疫分析仪与 RIA、HPLC、LC-MS/MS 检测 25-(OH)D₃ 结果的符合性, 发现 ECLIA 法与 LC-MS/MS、RIA 检测结果一致性较好, 但同时观察到在个别患者中。血浆 25-(OH)D₃ 浓度显著高于血清标本。

Newman 等^[26] 比较了来自健康志愿者的手指末梢血和静脉血标本。将打孔干血片与氘标记的 25-(OH)D₃ 内标液进行超声裂解混匀。再加入甲醇沉淀蛋白质后由正己烷萃取。将萃取物干燥并复溶于 50:50 的甲醇:水中, 注入 Varian 320-MS TQ 质谱仪。结果血斑法的精密度表现良好, 线性范围为 3.5~75 ng/mL($r>0.99$)。血斑法和血清法检测结果的相关性很高。用血斑法检测 25-(OH)D₂ 和 25-(OH)D₃ 相比于血清法方便、经济、有效, 并可以自动化。对于大规模筛选 1 型 DM、心血管代谢危险及监测 VD 有意义。

由于现在对 VD 检测的需求越来越大, 大多实验室趋向于选择全自动化学发光仪, 其准确性和重复性较好, 能够满足临床需要。各个实验室可根据自身的实际情况选择试验方法。

参考文献

- [1] Holick MF. Resurrection of vitamin D deficiency and rickets[J]. J Clin Invest, 2006, 116(18):2062-2072.
- [2] Zittermann A. Vitamin D in preventive medicine: are we ignoring the evidence [J]. Br J Nutr, 2007, 89(5):552-572.
- [3] Holick MF. The use and interpretation of assays for vitamin D and its metabolites[J]. J Nutr, 1990, 120(Suppl 11):1464-1469.
- [4] Holick MF. Vitamin D deficiency[J]. N Engl J Med, 2007, 357(3):266-281.
- [5] Pieper CF, Colon-Emeric C, Caminis J, et al. Distribution and correlates of Serum 25-hydroxyvitamin D levels in a sample of patients with hip fracture[J]. Am J Geriatr Pharmacother, 2007, 5(4):335-340.
- [6] Ward KA, Das G, Berry JL, et al. Vitamin D status and muscle function in post-menarchal adolescent girls[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2009, 94(2):559-563.
- [7] Weir MR. Is Activated Vitamin D Supplementation Renoprotective? [J]. Hypertension, 2008, 52(2):211-212.
- [8] Wood C, Gonzalez EA, Martin KJ. Challenges in the therapy of secondary hyperparathyroidism[J]. Ther Apher Dial, 2005, 9(1):4-8.

- [9] Beer TM, Myrthue A. Calcitriol in cancer treatment: from the lab to the clinic[J]. Mol Cancer Ther, 2004, 3(3):373-381.
- [10] Spina CS, Tangpricha V, Uskokovic M, et al. Vitamin D and cancer[J]. Anticancer Res, 2006, 26(4A):2515-2524.
- [11] Agoston ES, Hasher MA, Kensler TW, et al. Vitamin D analogs as anticarcinogenic agents[J]. Anticancer Agents Med Chem, 2006, 6(1):53-71.
- [12] Palomer X, Gonzale CM, Blanco VF, et al. Role of vitamin D in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus[J]. Diabetes Obes Metab, 2008, 10(3):185-197.
- [13] Holick MF. Vitamin D deficiency[J]. N Engl J Med, 2007, 357(19):266-281.
- [14] Hypponen E, Laara E, Reunanen A, et al. Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes: a birth cohort study[J]. Lancet, 2001, 358(9292):1500-1503.
- [15] Mathieu C, Adorini L. The coming of age of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ analogs as immunomodulatory agents[J]. Trends Mol Med, 2002, 8(4):174-179.
- [16] Holick MF. Vitamin D: important of prevention of osteoporosis, cardiovascular heart disease, type 1 diabetes, autoimmune disease, and some cancers[J]. South Med J, 2005, 98(10):1024-1027.
- [17] Teng M, Wolf M, Ofsthil MN, et al. Activated injectable vitamin D and hemodialysis survival: a historical cohort study[J]. J Am Soc Nephrol, 2005, 16(4):115-125.
- [18] Adams JS, Hewison M. Update in vitamin D[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2010, 95(2):471-478.
- [19] Autier P, Gandini S. Vitamin D supplementation and total mortality: a meta-analysis of randomized controlled trials[J]. Arch Intern Med, 2007, 167(16):1730-1732.
- [20] Hathcock JN, Shao A, Vieth R, et al. Risk assessment for vitamin D[J]. Am J Clin Nutr, 2007, 85(1):6-18.
- [21] Tai SS, Bedner M, Phinney KW. Development of a candidate reference measurement procedure for the determination of 25-hydroxyvitamin D₃ and 25-hydroxyvitamin D₂ in human serum using isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Anal Chem, 2010, 82(5):1942-1948.
- [22] Lensmeyer GL, Wiebe DA, Binkley N, et al. HPLC method for 25-hydroxyvitamin D measurement: comparison with contemporary assays[J]. Clin Chem, 2006, 52(6):1120-1126.
- [23] Van den Ouweland JM, Beijers AM, Demacker PN. Measurement of 25-OH-vitamin D in human serum using liquid chromatography tandem-mass spectrometry with comparison to radioimmunoassay and automated immunoassay[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2010, 878(15/16):1163-1168.
- [24] Farrell CJ, Martin S, McWhinney B. State-of-the-Art vitamin D assays: a comparison of automated immunoassays with liquid chromatography-tandem mass spectrometry methods[J]. Clin Chem, 2012, 58(3):531-542.
- [25] Leino A, Turpeinen U, Koskinen P. Automated measurement of 25-OH vitamin D₃ on the Roche Modular E170 analyzer[J]. Clin Chem, 2008, 54(12):2059-2062.
- [26] Newman MS, Brandon TR, Groves MN, et al. A liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for determination of 25-hydroxy vitamin D₂ and 25-hydroxy vitamin D₃ in dried blood spots: a potential adjunct to diabetes and cardiometabolic risk screening[J]. J Diabetes Sci Technol, 2009, 3(1):156-162.