

肪酶作用下水解释放出 NEFA 和三酰甘油。释放的 NEFA 可以作为许多组织的能量来源,包括骨骼肌和肝细胞。在肝细胞中,NEFA 的命运取决于能量需要、激素平衡等,例如,NEFA 可以进入线粒体,通过 β 氧化产生乙酰辅酶 A,进入三羧酸循环产生能量,也可以重新生成三酰甘油并作为低密度脂蛋白(VLDL)运输出去或储存于肝细胞^[3]。

血清中的 NEFA 主要受脂肪代谢影响,同时也受糖代谢和内分泌影响。游离脂肪酸水平升高可见于一些病理状态如胰岛素抵抗/2 型糖尿病、肥胖、恶性疾病和代谢综合征,并会引发心血管疾病^[4-9]。另外,有报道称肾脏病患者的 NEFA 的水平也有显著上升^[10]。因此,NEFA 检测可以作为临床医学上内分泌疾病,肝脏疾病以及糖尿病等疾病的辅助诊断。

精确地测定血清中的 NEFA 具有重要意义,本文利用酶法对血清中的 NEFA 测定进行了尝试,发现该试剂在 NEFA 浓度为 0~2.4 mmol/L 的范围内具有良好线性关系,且该试剂具有较好的精密度,批内 CV 仅 0.49%,试剂的稳定性也较高,抗干扰能力强,可以快速、高效的测定血清中的 NEFA 含量,适合于医院等部门的批量检测操作。但同时也应该注意,由于脂质易降解成游离脂肪酸,因此要求血液采集后及时分离血清并立即检测,如不能立即检测须将样本放于-20℃保存。

参考文献

[1] 周新,梁纯子,宁乐平. 游离脂肪酸与疾病的相关性研究进展[C]. 北京:中华医学会第八次全国检验医学学术会议暨中华医学会检验分会成立 30 周年庆典大会资料汇编,2009.

[2] 郑振佳,赵先恩,迟炳海,等. 花生油中游离脂肪酸的 HPLC-FLD 分析[J]. 分析试验室,2011,30(3):23-27.

[3] Smith SR,Wilson PWF. Free fatty acids and atherosclerosis-guilty or innocent? [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2006, 91(7): 2506-2508.

[4] Pilz S,Scharnagl H,Tiran B,et al. Free fatty acids are independently associated with all-cause and cardiovascular mortality in subjects with coronary artery disease[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2006,91(7):2542-2547.

[5] Hufnagel B,Dworak M,Soufi M,et al. Unsaturated fatty acids isolated from human lipoproteins activate protein phosphatase type 2C β and induce apoptosis in endothelial cells[J]. Atherosclerosis, 2005,180(2):245-254.

[6] 柯柳,余叶蓉,张玄娥,等. 高游离脂肪酸血症对心肌结构与功能的影响及其机制[J]. 四川大学学报:医学版,2009,40(1):24-28.

[7] 文重远,李庚山,刘永明,等. 游离脂肪酸对 2 型糖尿病心肌能量底物代谢及心功能的影响[J]. 临床心血管病杂志,2005,21(7):393-395.

[8] 陈华佳,胡婷. 单纯性肥胖儿童胰岛素抵抗与游离脂肪酸的关系[J]. 新乡医学院学报,2008,25(3):250-252.

[9] 倪世宁,刘倩琦,朱子阳,等. 儿童单纯性肥胖与胰岛素抵抗综合征危险因素的关系[J]. 实用儿科临床杂志,2009,24(7):503-504.

[10] 饶绍琴,邓君,杜琼,等. 肾脏病患者的非酯化脂肪酸的研究[J]. 中国实验诊断学,2001,5(6):297-298.

(收稿日期:2013-06-10)

• 质控与标规 •

胆红素对胆固醇检测的干扰^{*}

王 忠,郭鸿雁,王 颖,孔繁军,王 蕊
(首都医科大学附属北京佑安医院临检中心,北京 100069)

摘 要:目的 评价高浓度胆红素(TBIL)对检测总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)是否有干扰作用。**方法** 根据 CLSI EP7-A2 文件,利用胆红素标准品对 TC、HDL-C 和 LDL-C 进行干扰评价试验。**结果** 配对差异实验结果显示浓度 1 000 μ mmol/L 的 TBIL 对 HDL-C 检测无干扰;对 TC 和 LDL-C 检测有负干扰。5 个浓度系列的剂量效应实验结果显示 TBIL 对 TC 和 LDL-C 检测可产生线性负干扰。**结论** 高浓度 TBIL 对 TC 和 LDL-C 检测有干扰作用,可能会干扰临床对肝病和冠心病的预后判断。

关键词:胆固醇; 总胆固醇; 度脂蛋白胆固醇; 低密度脂蛋白胆固醇; 胆红素; 干扰
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.22.052 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2013)22-3052-03

总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)是判断肝脏损害程度和预后的重要指标,同时也是对冠心病、动脉粥样硬化危险因素评价的重要指标^[1-4]。高胆红素血症是肝病患者的常见症状,而高胆红素(TBIL)对生化分析仪检测的某些项目易产生明显的干扰。本文旨在研究当患者出现高 TBIL 血症时,是否会干扰 TC、HDL-C、LDL-C 的检测,从而影响肝病、冠心病等的临床诊断。本研究通过严格应用美国临床实验室标准化委员会(CLSI)制定的评价方案 EP7-A2 文件中“干扰筛选”的实验方案进行干扰评价试验^[5],对高 TBIL 血症时干扰血清中 TC、HDL-C、LDL-C 检测的情况作出分析与评价。

1 资料与方法

1.1 仪器及试剂 Olympus AU5400 全自动生化分析仪。试剂:Bilirubin 标准物质,纯度 99%;TC 试剂盒(氧化酶法);HDL-C 试剂盒(消除法);LDL-C 试剂盒(消除法);胆红素试剂盒(重氮盐法)。

1.2 方法 TC、HDL-C、LDL-C 和胆红素在生化仪上的测定方法均为终点法。

1.2.2 黄疸干扰物的制备(胆红素储存液) 精称胆红素 60 mg,加入试管中,加入 4% NaOH 5 mL,不断混匀,当胆红素粉末即将完全溶解时,逐滴加入 4% NaOH 至完全溶解,制成胆红素饱和溶液。-20℃冷冻,待用。通过计算本实验用胆红

* 基金项目:佑安肝病艾滋病基金资助项目(BJYAH-2011-042)。

素浓度预计为 13 650 $\mu\text{mol/L}$ 左右。因称量误差及胆红素在光线下降解等原因,在实验前以仪器实测值为准,连续检测 10 次,取平均值确定浓度。

1.2.3 制备基础样本^[4-5] 待测的标本浓度应涵盖该项目的高、低浓度及医学决定水平。选取实验当日本院健康体检者的无溶血、无黄疸、无脂浊的新鲜混合血清。因胆红素为内生代谢产物,为避免对照组胆红素浓度过高影响实验可信性,故选择的基础样本血清的胆红素浓度都小于 10 $\mu\text{mol/L}$;混合血清通过仪器检测确定其最终浓度。取高、低值血清适量配比,制成 TC 的浓度为 3.97、6.50 mmol/L 的混合血清;同理,制成 HDL-C 浓度为 0.94、1.92 mmol/L;LDL-C 浓度为 2.30、3.92 mmol/L 的混合血清。

1.2.4 对照样本和干扰样本的制备 本院连续 3 年检测的临床患者胆红素结果中的高浓度为 1 000 $\mu\text{mol/L}$ 左右,故设定待测标本的胆红素浓度为 1 000 $\mu\text{mol/L}$ 。EP-A2 要求尽量减少对样品的稀释,最好不要超出 5%,即干扰物制备的浓度最好是待测浓度的 20 倍以上。但因胆红素储存液的最高浓度(饱和)只有 13 650 $\mu\text{mol/L}$ 左右,达不到待测浓度的 20 倍,即 20 000 $\mu\text{mol/L}$ 以上。故在干扰样本制备时,干扰原液的体积设为总体积的 1/13。对样品浓度的稀释程度约为 1/7.7%。黄疸干扰样本(T)为 1 200 μL 基础样本+100 μL 胆红素储存液,其干扰物浓度为 1 000 $\mu\text{mol/L}$ 左右的胆红素;对照样本(C)为 1 200 μL 基础样本+100 μL 4% NaOH。

1.2.5 重测次数的确定 首先计算最大允许干扰值(d_{max})/批内标准差(s)比值,然后查 d_{max}/s 与重测次数对应表^[5],可得出 2 个浓度水平重复测定次数。批内标准差(s)通常由基础样本重复测定 20 次,计算可得; d_{max} 为各项目临床意义差别的标准。本研究参照根据生物学变异确定的最大允许误差,TC、HDL-C 和 LDL-C 的总误差(TE)分别为 9.0%、11.1% 和 13.6%^[4],设定各个项目的 d_{max} =基础样本均值 \times 最大允许误差(%)。

1.2.6 样品检测 在测试时,将测试混合液(T)和控制混合液(C) n 等分,以交替的顺序分析测试混合液(T)和控制混合液(C),为避免系统受携带影响,加入附加样本(去离子水)来保护控制样本受测试样本携带的影响,如: $C_1T_1C_xC_xC_2T_2C_xC_xC_3T_3\cdots\cdots C_xC_xC_nT_n$,这里附加控制样本(C_x)结果丢弃。在检测 TC、HDL-C、LDL-C 的时候同时检测

胆红素。

1.2.7 干扰效应分析 将所得数据进行干扰效应的“点”估计,即 d_{obs} (测试样本均值和对照样本均值之间差值的绝对值)与临界值($\text{Cut-off}, d_c$)比较,如果点估计 $d_{\text{obs}} > d_c$,说明存在干扰。其中 $d_{\text{obs}} = X_{\text{test}} - X_{\text{control}}$; $d_c = (d_{\text{null}} + sZ_{1-\alpha/2})/\sqrt{n}$; s :批内标准差; n :重测次数; d_{null} :无效假设规定的值,通常为 0; $Z_{1-\alpha/2}$:正态分布双侧检验 100(1- α)% 的百分位值,对于单侧检验,用 $Z_{1-\alpha}$ 取代 $Z_{1-\alpha/2}$ 。

1.2.8 干扰效应的 95% 可信区间(CL) $CL = (\bar{x}_{\text{test}} - \bar{x}_{\text{control}}) \pm t_{0.975, n-1} \sqrt{\frac{2s^2}{n}}$,其中 s 为批内标准差; n 为重测次数; $Z_{1-\alpha/2}$ 为正态分布双侧检验 100(1- α)% 的百分位值;对于单侧检验,用 $Z_{1-\alpha}$ 取代 $Z_{1-\alpha/2}$ 。 $t_{0.975, n-1}$ 来源于 t 检验数值表中 97.5% 和 $n-1$ 自由度的值。

1.3 “剂量-效应”样本的配制

1.3.1 EP7-A2 文件要求制备一系列不同浓度的干扰测试样本,通常 5 个浓度,以确定一个线性的剂量效应关系。把 1.2 制备的对照样本(C)定为低值样本(L),黄疸干扰样本(T)定为高值样本(H),按不同配比配制成 5 个浓度,见表 1。

表 1 剂量-效应样本的配制

编号	配制方法	设计胆红素浓度 ($\mu\text{mol/L}$)
1 号(L)	低值样本 1 300 μL	<10
2 号(3L+1H)	低值样本 300 μL +高值样本 100 μL	250
3 号(2L+2H)	低值样本 200 μL +高值样本 200 μL	500
4 号(1L+3H)	低值样本 100 μL +高值样本 300 μL	750
5 号(H)	高值样本 1 300 μL	1 000

1.3.2 在同一分析批之内检测 5 个样本的浓度,第 1 组按照升序测定各样本,第 2 组按降序测定,第 3 组按照升序,平均系统漂移影响。在检测 TC、HDL-C、LDL-C 的时候同时检测胆红素。

1.4 使用 Excel 2003 和 SPSS16.0 软件进行数据统计和图形制作。

2 结 果

2.1 高浓度胆红素对 TC、HDL-C、LDL-C 的干扰判断结果,见表 2。

表 2 胆红素对 TC、HDL-C、LDL-C 的干扰判断结果

项目	基础样品浓度 (mmol/L)	TE(%)	d_{max} (mmol/L)	批内 s (mmol/L)	d_{max}/s	检测 次数	对照样本均值 (mmol/L)	测试样本均值 (mmol/L)	d_{obs} (mmol/L)	d_c (mmol/L)	干扰 判断
CHOL	3.97	9.00	0.357	0.037	9.65	3	3.7	3.48	-0.22	0.09	是
	6.5	9.00	0.585	0.059	9.92	3	6.04	5.71	-0.33	0.15	是
HDL-C	0.94	11.10	0.104	0.010	10.40	3	0.89	0.88	-0.01	0.02	否
	1.92	11.10	0.213	0.013	16.38	3	1.81	1.84	0.03	0.03	否
LDL-C	2.3	13.60	0.313	0.014	22.36	3	2.11	1.51	-0.6	0.03	是
	3.92	13.60	0.533	0.015	35.53	3	3.65	2.72	-0.93	0.04	是

2.2 高浓度胆红素干扰效应产生的误差,见表 3。

2.3 胆红素干扰 TC 和 LDL-C 的“剂量效应”图,见图 1~4 (见《国际检验医学杂志》网站“论文附件”)。通过线性回归方程,干扰物不同浓度的干扰误差可被估计,即各干扰物浓度引起的干扰效应为各分析物测定值(X 为干扰物浓度时, Y 值的大小)减去低浓度样本测定值(X 为 0 时, Y 值的大小)。

表 4 干扰效应误差和根据生物学变异确定的不精密度、偏倚、总误差

项目	对照样本均值 (mmol/L)	测试样本均值 (mmol/L)	干扰效应 误差(%)	不精密度 (%)	偏倚 (%)	总误差 (%)
TC	3.7	3.48	-5.9	3	4.10	9
	6.04	5.71	-5.5			

续表 4 干扰效应误差和根据生物学变异确定的不精密度、偏倚、总误差

项目	对照样本均值 (mmol/L)	测试样本均值 (mmol/L)	干扰效应 误差(%)	不精密度 (%)	偏倚 (%)	总误差 (%)
HDL-C	0.89	0.88	-1.1	3.60	5.20	11.10
	1.81	1.84	1.6			
LDL-C	2.11	1.51	-28.4	4.20	6.80	13.60
	3.65	2.72	-25.5			

3 讨 论

EP7-A2 是标准干扰评价方安,该评价方案可广泛适用于临床实验室的检测方法、仪器以及各种类型标本,对临床很多可疑干扰物进行分析。本研究利用“配对-差异”实验在较高浓度下对可能的干扰物-胆红素作初步筛选,在确定其为干扰物质后,进一步利用“剂量-效应”试验评估干扰物浓度与干扰程度的关系。从而对临床常见标本干扰因素胆红素对 TC、HDL-C、LDL-C 测定的干扰进行了客观的评价。

本方案由于是人为加入干扰物,存在一些局限性:(1)添加到血清中的化合物的特性可能不同于那些在体内自然循环状态下的化合物;(2)试验样本基质并不代表典型的有问题的临床样本;(3)样本中真实的干扰物可能不是原来的药物,而是代谢产物;4)试验浓度水平可能选择太低或太高以至不真实。

通过表 4 可看出,高浓度胆红素对 TC 的负干扰大于 5.5%;加上不精密度和偏倚的叠加,极易超出总允许误差 9.00%;高浓度胆红素对 LDL-C 的负干扰大于 25.00%,已经超出总允许误差 13.60%。通过“剂量-效应”图及回归公式计

算,可得知胆红素浓度在 750~1 000 μmmol/L 之间对 TC 和 LDL-C 的干扰程度是很接近的。

很多文献中将诊断界限划定,如,TC/HDL-C 比值大于 4.5 冠心病危险性明显增高^[1],MELD 评分大于或等于 25 分同时血清 CHOL≤1.65 mmol/L 可提高对重型肝炎预后预测的准确性^[6]。TC 的理想范围是低于 5.2 mmol/L,LDL-C 的理想范围是低于 3.12 mmol/L 等^[4]。所以,当诊疗肝病、冠心病等时,若以 TC 和 LDL-C 为指标,如果未考虑检测时胆红素的干扰因素,可能会误导判断评价病情。以上结果提示临床医生,当患者出现高胆红素血症时,如果无法确认 TBIL 的干扰程度,应慎用 TC 和 LDL-C 作为诊断依据。

参考文献

[1] 黄飞雄,吴晓峰.总胆固醇/高密度脂蛋白胆固醇比值预测冠心病危险程度的评价[J].临床荟萃,2010,25(19):1692-1693.

[2] 李玉中,胡宏,陈艳君,等.肝病患者血脂变化的临床价值[J].大连医科大学学报,2002,24(4):285-286.

[3] 陈宇锋,曾再祥,李耀才,等.肝胆疾病中血脂水平检测的临床研究[J].河北医药,2005,27(6):411-412.

[4] 叶应妩,王毓三,申子瑜.全国临床检验操作规程[M].3 版.南京:东南大学出版社,2006:80-490.

[5] CLSI. EP7-A2 Interference testing in clinical chemistry[S]. 2nd ed. Wayne,PA:CLSI,2005.

[6] 郑中伟,童学成.MELD 评分联合血清胆固醇检测对评估重型肝炎患者预后的价值[J].江苏医药,2010,36(23):2783-2785.

(收稿日期:2013-05-08)

(上接第 3045 页)

[37] Bischoff-Ferrari HA, Kiel DP, Dawson-Hughes B, et al. Dietary Calcium and serum 25-hydroxyvitamin D status in relation to BMD among U. S. adults[J]. J Bone Miner Res, 2009, 24(5): 935-942.

[38] 张萌萌,李强,宋玉庭,等.长春市 35~79 岁人群骨代谢指标与骨密度相关性研究[J].中国骨质疏松杂志,2010,16(4):248-250,281.

[39] 高志立,杜晓红,朱再胜.老年人维生素 D 水平与骨密度的相关性研究[J].中华老年医学杂志,2012,31(6):513-515.

[40] Akhter N, Sinnott B, Mahmood K, et al. Effects of vitamin D insufficiency on bone mineral density in African American men[J]. Osteoporos Int, 2009, 20(5): 745-750.

[41] Chandran M, Hoeck HC, Wong HC, et al. Vitamin D status and its relationship with bone mineral density and parathyroid hormone in Southeast Asian adults with low bone density[J]. Endocr Pract, 2011, 17(2): 226-234.

[42] 周波,王晓红,郭连莹,等.中国北方地区老年人冬季维生素 D 缺乏与骨量丢失[J].中国组织工程研究与临床康复,2011,15(26):4907-4910.

[43] 黄耀明.雌激素与 I 型骨质疏松症[J].江西医学院学报,2005,45(3):181-182.

[44] 丁桂芝,周勇.原发性骨质疏松症发病机理的研究[J].中国骨质疏松杂志,1998,4(1):32-37.

[45] 王鸿艳,尹国武.雌激素抗骨质疏松机制研究进展[J].医学信息,2002,15(10):609-609,614.

[46] Ali Af, Fateen B, Ezzet A, et al. A new ratio: urinary etiocholenolone androsterone as an indication of sexual interest in postmenopausal women[J]. Obstet Gynecol, 2000, 95(Suppl 1): S16.

[47] 杨黎娟,张秀珍.雌激素抗骨质疏松的研究进展[J].国外医学:内科学分册,2004,31(2):84-87.

[48] 权金星,李茂欣.绝经后骨质疏松的分子机理研究进展[J].中华妇产科杂志,2000,35(12):754-756.

[49] Lean JM, Davies JT, Fuller K, et al. A crucial role for thiol antioxidants in estrogen-deficiency bone loss[J]. J Clin Invest, 2003, 112(6): 915-923.

[50] 李丹,钟良军.雌激素与牙周炎和绝经后骨质疏松的研究进展[J].牙体牙髓牙周病学杂志,2008,18(4):237-240.

[51] 高秀辉,薛延,颜卉君,等.小剂量 17β-雌二醇对预防卵巢切除大鼠骨丢失的研究[J].卫生研究,1999,28(4):227-229.

[52] 孟增东,裴福兴,向明,等.17β-雌二醇对体外培养破骨细胞凋亡及其骨吸收调节作用[J].中国骨质疏松杂志,2006,12(1):29-32,65.

[53] 陈正林,潘继承,刘俊恒.女性围绝经期骨密度和 E2、PTH、CT 相关性分析[J].实用老年医学,2009,23(6):470-471.

[54] 孙静,庞小芬,巩云霞,等.血清性激素水平与老年男性骨代谢指标及骨密度的关系[J].内科理论与实践,2008,3(4):272-275.

[55] 王星.36 例老年女性骨质疏松患者血清 IL-8 及 E2 水平变化研究[J].中国医药导报,2010,7(12):245-245.

[56] Goemaere S, Van Pottelbergh I, Zmierzczak H, et al. Inverse association between bone turnover rate and bone mineral density in community-dwelling men >70 years of age: no major role of sex steroid status[J]. Bone, 2001, 29(3): 286-291.

[57] Gennari L, Bilezikian JP. Osteoporosis in men[J]. Endocrinol Metab Clin North Am, 2007, 36(2): 399-419.

[58] Alexandre C. Androgens and bone metabolism[J]. Joint Bone Sprine, 2005, 72(3): 202-206.

[59] McKeever C, McIlwain H, Greenwald M, et al. An estradiol matrix transdermal system for the prevention of postmenopausal bone loss[J]. Clin Ther, 2000, 22(7): 845-857.

(收稿日期:2013-04-28)