

测定糖尿病患者血清 LDL-C 水平的方法学比较 *

魏红霞 张 葵[△] 李 雷 朱 宏 顾光煜 王 丽

(南京大学医学院附属鼓楼医院检验科 江苏 南京 210008)

摘要 目的:比较不同方法检测糖尿病患者血清 LDL-C 水平,为临床诊疗提供准确可行的检验方法。方法:采用沉淀法、匀相法、电泳法及超速离心法对 233 例糖尿病患者和 102 例健康人群的血清 LDL-C 水平进行测定,比较各方法之间的相关性,同时分析导致结果差异的因素。结果:四种方法检测健康人群 LDL-C 水平,结果间无统计学差异($P>0.05$)。糖尿病组,当 $TG \leq 2.26\text{mmol/L}$ 时,四种方法检测 LDL-C 结果间相关性良好。高胆红素、血红蛋白、高 TG 及乳糜等干扰因素存在时,与其他方法相比,电泳法和超速离心法检测血清 LDL-C 结果受影响较小($P>0.05$)。结论:超速离心法虽耗时、价格贵,但仍为检测 LDL-C 的经典方法,电泳法受高胆红素、血红蛋白、高三酰甘油等干扰因素的影响相对较小,适用于糖尿病合并高血脂患者血清 LDL-C 水平检测。

关键词 LDL-C 糖尿病 超速离心法 匀相法 电泳法 沉淀法

中图分类号:R446.1 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2011)09-1767-04

Comparison of Methods in Determining Serum LDL-C in Diabetic Patients*

WEI Hong-xia, ZHANG Kui[△], LI Lei, ZHU Hong, GU Guang-yu, WANG Li

(The Department of Medical Laboratory, Drum Tower Hospital Affiliated to Medical School of Nanjing University, Nanjing China 210008)

ABSTRACT Objective: To compare different methods of detection of serum LDL-C in diabetic patients, provide accurate and feasible test methods for clinical diagnosis and treatment. **Methods:** The serum lipid of 233 patients with diabetes mellitus and 102 normal healthy population were measured by precipitation, homogeneous, electrophoresis and ultracentrifugation methods, comparing the correlation among the methods, and analyzing possible factors effecting results difference. **Results:** Results of serum LDL-C of healthy population by four methods showed no significant difference($P>0.05$); In the group of diabetic patients, $TG \leq 2.26\text{mmol/L}$, the results of LDL-C were no significant difference among four methods($P<0.05$). When existing some interference factors such as high bilirubin, hemoglobin and high triglyceride in serum, the results of LDL-C by electrophoresis and ultracentrifugation showed no changes comparing other methods ($P>0.05$). **Conclusion:** Although ultracentrifugation methods needs more and high price, it is still classic methods for LDL-C testing, electrophoresis were more suitable for lipids detection of diabetic patients with coronary heart disease because of relatively small effect of high bilirubin, hemoglobin and high triglyceride.

Key words: LDL-C; diabetes mellitus; ultracentrifugation methods; homogeneous methods; electrophoresis methods

Chinese Library Classification: R446.1 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)09-1767-04

前言

脂质代谢紊乱是糖尿病患者常见的代谢紊乱,主要代表是甘油三酯(TG)升高、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)降低、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)升高。众多流行病学、遗传学与临床研究证实,LDL-C 水平与动脉粥样硬化的发生密切相关,其与高血压、胰岛素抵抗、吸烟、肥胖等危险因素共同作用,增加糖尿病患者并发心血管疾病的风险。因此,准确测定血清 LDL-C 值为临床血脂代谢紊乱等疾病的风险评估做出正确的判断^[1-2]。本研究应用沉淀法、匀相法、电泳法和超速离心法检测糖尿病患者和健康人群的血清 LDL-C 水平,比较不同方法检测结果的

差异,分析不同方法间的相关性及导致结果差异的因素。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 研究对象 选择南京鼓楼医院 2009 年 12 月至 2010 年 4 月内分泌科收治的 2 型糖尿病(T2DM)患者 233 例,其中男 140 例,女 93 例,年龄(58.7 ± 15.6)岁,均符合 WHO 的糖尿病诊断标准^[3]。健康体检人群 102 例,男 58 例,女 44 例,年龄(57.7 ± 13.8)岁。

1.1.2 标本收集 所有研究对象空腹 12h,采静脉血 5ml,2h 内分离血清,3000 g 离心 10 min,标本分装 -20℃ 保存待用。

* 基金项目 南京市医学科技发展项目(YKK08053)

作者简介 魏红霞,女,硕士,主要研究方向:血脂与心血管疾病的关系,Email: xiaoxia66260@163.com 电话:15951946345

[△]通讯作者 张葵,教授,研究生导师,主要研究方向:脂质代谢与心血管疾病的关系,Email: zhangkui@yahoo.com.cn

(收稿日期:2011-02-05 接受日期:2011-02-28)

1.1.3 试剂和器材 聚乙烯硫酸沉淀法(PVS 法)检测 LDL-C ,试剂由中生北控生物科技股份有限公司提供 ,REP 全自动快速电泳仪检测 LDL-C ,试剂盒购自美国 Helena 公司 ,匀相法检测采用 HITACHI7600-020E 全自动生化分析仪 ,试剂由日本协和株式会社提供 ,超速离心法分离血清 LDL-C ,超速离心机 L-90K、type 90Ti 角度转头、6.2ml 适配器和 5ml 离心管由 Beckman 公司提供 ;液体密度仪 DMA35 由奥地利 Anton Paar 公司提供 ;其他试剂为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 沉淀法 参照说明书。上清液胆固醇浓度 =A 样品 /A 校准× 校准浓度× 1.5 ,按照公式 LDL-C 浓度 = 总胆固醇 - 上清液胆固醇计算。

1.2.2 电泳法 1μl 血清经琼脂糖凝胶电泳(400 V ,15 min)后 ,空气干燥 4 min ,仪器自动将酶染色试剂均匀涂铺在凝胶表面 ,30 ℃ 孵育 15 min 后取出凝胶片。孵育期间各脂蛋白胆固醇酯被胆固醇酯酶水解成胆固醇 ,经胆固醇脱氢酶作用脱氢生成胆甾烯酮并使 NAD⁺ 还原为 NADH ,后者与 NBT 经黄递酶作用再脱氢 ,产生蓝紫色物质甲月替 ,在 570 nm 处吸光度与胆固醇含量成正比。凝胶片置 10 %冰醋酸溶液固定 5 min ,再用水轻轻振荡洗涤 5 min ,置于仪器上 54 ℃ 5min 烘干。EDC 光密度扫描仪 570 nm 自动扫描 ,确定各区带的百分含量。同时将血清 TC 值输入 ,则可求得 LDL-C 值。电泳质控血清由 Helena 公司提供。

1.2.3 匀相法 用匀相测定法在日立 7600-020E 型全自动生化分析仪上采用两点速率连续检测法检测血清 LDL-C ,单位以

mmol/L 计。

1.2.4 超速离心法 参照文献^[4]的方法配置 5 种 NaBr 溶液(密度范围从 1.006 到 1.346g/ml)。

用 1.346g/mlNaBr 将 1ml 血清密度调成 1.1g/ml 加到离心管底部 ,依次加入 1.063、1.044、1.019、1.006g/ml 密度液 ,勿使界面混扰。平衡后加盖封闭 ,小心放入 90Ti 角度转头 ,置入 Beckman L-90K 型超速离心机中 ,选用慢加速工作程序 ,加速和减速时间均控制在 20 min ,18 ℃ ,48000rpm/min ,离心 7h。离心结束后 ,取出离心管 ,见血清脂蛋白已分层。

将超速离心分离各组分进行聚丙烯酰胺梯度电泳 ,凝胶浓度为 4~20% ,脂蛋白用苏丹黑 10 B 预染电泳后再以考马斯亮蓝 R-250 染蛋白质。0.01MPBS 纯化分离到的 LDL。

1.2.5 统计学分析 用 SPSS 13.0 软件进行分析 ,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示 ,两组间均数比较采用 t 检验 ,两组以上均数间比较采用 q 检验 ,采用 pearson 相关性分析 , $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 不同方法测定糖尿病组和健康组 LDL-C 结果的比较

健康人群中四种方法检测血清 LDL-C 结果间无统计学差异($P > 0.05$) ;当 $TG \leq 2.26\text{mmol/L}$ 时 ,采用沉淀法和匀相法检测 T2DM 患者血清 LDL-C 结果差异较小($P > 0.05$) ,电泳法检测结果偏高 ,与沉淀法、电泳法间有统计学差异 ($P < 0.05$)。 $1\text{mg/dl} = 0.026\text{ mmol/L}$ 。

见表 1。

表 1 T2DM 组和健康组 LDL-C 结果的比较($\bar{x} \pm s$)
Table1 Comparison of LDL-C betweenT2 DM group and control

	Number of cases	Precipitation (mmol/L)	Electrophoresis (mmol/L)	homogeneous (mmol/L)	Ultracentrifugation (mg/dl)
Control	102	2.33± 1.08	2.21± 0.98	2.26± 0.92	109.81± 39.01
T2DM	233	2.01± 0.91	3.49± 1.08*	2.25± 0.79	146.33± 37.54

注 : * 与匀相法比较 , $P < 0.05$
Noting: * Comparison with homogeneous methods, $P > 0.05$

2.2 不同方法测定 T2DM 患者不同浓度 TG 和 TC 的 LDL-C 结果比较

当 TG 浓度 $\leq 2.26\text{ mmol/L}$,四种方法检测结果差异较小 ,无统计学意义($P > 0.05$) ,且各种方法检测结果相关性较好 ;甘油三酯浓度在 $> 2.26\text{mmol/L}$ 时 ,沉淀法和匀相法检测 LDL-C

结果之间无统计学差异($P > 0.05$) ,电泳法与前两种方法间有统计学差异($P < 0.05$) ,且相关系数随 TG 值升高而逐渐降低 ,与超速离心法比较无差异($P > 0.05$)。当 $TC > 6.20\text{mmol/L}$ 时 ,电泳法与前两种方法间存在统计学差异 ,差异性较 $TC < 6.20\text{mmol/L}$ 大。见表 2 ,表 3。

表 2 T2DM 组当 TG 浓度不同时的 LDL-C 结果比较($\bar{x} \pm s$)
Table 2 Comparison of LDL-C in different concentrations of TG in diabetic group

	Number of cases	Precipitation (mmol/L)	Electrophoresis (mmol/L)	homogeneous (mmol/L)	Ultracentrifugation (mg/dl)
TG<2.26	107	2.27± 0.97#	2.29± 1.05	2.23± 0.89	109.81± 39.01
2.26≤ TG≤ 4.52	82	2.47± 1.31#	3.42± 1.28*	2.82± 0.80	136.25± 38.44*
TG>4.52	44	2.59± 1.38#	4.12± 1.49*	3.09± 1.28	156.72± 42.92*

注 : # 与匀相法比较 , $P > 0.05$; * 与匀相法比较 , $P < 0.05$
Noting: # Comparison with homogeneous methods, $P > 0.05$; * comparison with homogeneous methods, $P < 0.05$

2.3 干扰试验

取 T2DM 组血清标本一份(LDL-C 浓度为 2.55mmol/L 其余指标均正常),分别加入不同浓度的胆红素和血红蛋白,用沉淀法、电泳法、匀相法、超速离心法分别测定。结果显示,电泳法测定时胆红素<550μmol/L,血红蛋白<5.5 g/L 时,对结果影响较小;匀相法测定时当胆红素<342μmol/L 受其影响较小,血红蛋白>2 g/L 时干扰比较明显;沉淀法则较易受到两者的影

响。

2.4 回收试验

向低胆固醇血清中分别加入用超速离心法定值浓度 LDL-C 纯品(1.019g/ml),分别用三种方法作回收分析,结果显示沉淀法的平均回收率为 91.21 %,电泳法为 97.52 %,匀相法为 93.33 %,三种方法的回收率均较为理想。

表 3 糖尿病组不同浓度 TC 的 LDL-C 结果比较($\bar{x} \pm s$)
Table3 Comparison of LDL-C in different concentrations of TC in diabetic group

	Number of cases	Precipitation (mmol/L)	Electrophoresis (mmol/L)	homogeneous (mmol/L)
TC<5.18	98	2.05± 0.81#	2.11± 0.73	1.99± 0.57*
5.18≤ TC≤ 6.22	85	3.45± 1.08#	4.47± 1.22	2.98± 0.47*
TC>6.22	40	3.71± 1.28#	6.27± 1.22	4.79± 1.85*

注 # 与匀相法比较 P>0.05,* 与匀相法比较 P<0.05
Noting: # Comparison with homogeneous methods, P>0.05;* Comparison with homogeneous methods, P<0.05

3 讨论

T2DM 占糖尿病总人数的 90%,危险因素包括年龄、饮食、肥胖等,尤其是腹型肥胖与 T2DM 密切相关^[5]。但遗传因素可能决定高三酰甘油血症(HTG)的易感性^[5-7]。常规血 LDL-C 的检测方法目前主要有沉淀法、电泳法、匀相法、超速离心法、Friedewald 公式法等^[8-10]。沉淀法因不适合自动分析、耗时长、沉淀物可能出现复溶现象等,难以满足临床实验室大规模测定标本的要求。目前常规血脂分析中的 LDL-C 测定采用直接测定法。但当患者为高血脂、溶血、高胆红素血症时,检测结果不尽如人意,直接影响临床诊治方案的正确制定。我们采用直接测定法、沉淀法、电泳法、超速离心法 4 种方法分别测定患者血清 LDL-C,观察不同影响因素对 LDL-C 测定的影响,旨在为实验室正确选择 LDL-C 的测定方法提供参考。

在本研究中,健康人群采用四种方法检测血清 LDL-C 结果间无统计学差异(P>0.05)。在 T2DM 组,当 TG<2.26mmol/L 时,四种方法检测糖尿病患者血清 LDL-C 结果差异较小(P>0.05),且检测结果具有良好相关性;TG 浓度在≥2.26mmol/L 时,沉淀法和匀相法检测 LDL-C 结果间无统计学差异(P>0.05),超速离心法、电泳法与另两种方法之间有统计学差异(P<0.05),且相关系数随 TG 值升高而降低;当 TC<5.18mmol/L 时,各种方法相关性良好,TC≥5.18mmol/L 时,电泳法与沉淀法、直接法间存在统计学差异(P<0.05)。原因因为:不同浓度 TG 和 TC 的 LDL-C 结果比较试验中,匀相法与沉淀法一样,较易受高 TG 及高 TC 的干扰,同时高浓度胆红素和血红蛋白加深背景,使结果检测偏低^[11-13]。干扰实验中,当胆红素<550μmol/L,血红蛋白<5.5g/L 时,电泳法检测 LDL-C 不受影响。匀相法虽操作简便、自动化程度高,但易受干扰因素的影响,检测结果准确度相对较差;沉淀法为半自动操作,受多种因

素影响,精密度难以控制,不利于标准化^[14-15]。超速离心技术发展至今,因其与电泳法一样在检测高血脂、溶血、乳糜等标本时,不受其影响,可以准确分析糖尿病患者血脂水平的变化,仍为检测 LDL-C 经典方法。

经长期临床实验研究表明,不同方法在检测正常标本时具有良好相关性,异常标本则有显著差异,易导致治疗措施的混乱。因此,选择合适的方法对异常标本进行 LDL-C 的检测,对临床医生及时诊治疾病显得十分重要。

参考文献(References)

[1] 鄢盛恺. 关于临床血脂测定的建议 [J]. 中华检验医学杂志,2003,26 (3):182-184
Yan SK. Recommendations on the clinical determination of blood lipids [J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine,2003,26 (3): 182-184
[2] 徐成斌. 对《中国成人血脂异常防治指南》的浅释[J].中华老年医学杂志,2006,25(12):935-937
Xu CB. The Simple Explanation on"China adult dyslipidemia Prevention Guide" [J]. Chinese Journal of Geriatrics, 2006,25(12):935-937
[3] The Expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults: executive summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel) [J]. JAMA, 2001,285: 2486-2497
[4] Tsai LY, Tsai SM, Lee SC,et al. Falsely low LDL-cholesterol concentrations and artifactual undetectable HDL-cholesterol measured by direct methods in a patient with monoclonal paraprotein [J]. Clin Chim Acta, 2005, 358(1-2):192-195
[5] Pang RW and Tam SC. Novel use of the Friedewald formula to tackle anomalous HDL-C results in two cases of paraproteinaemia [J]. Clin Biochem, 2004,37(3):238- 240

- [6] Yamashita S, Kawase R, Nakaoka H et al. Differential reactivities of four homogeneous assays for LDL-cholesterol in serum to intermediate-density lipoproteins and small dense LDL: Comparisons with the Friedewald equation[J]. Clin Chim Acta, 2009, 410(1-2):31-38
- [7] Dé cary S, Dumont G, Lamarche B, et al. Assessment of the validity of the frequently used lipid indices for predicting LDL peak particle diameter in a large cohort of 1955 normal and dyslipidemic subjects [J]. Clin Biochem, 2010,43(4-5):401-406
- [8] Tada H, Kawashiri M, Noguchi T, et al. A novel method for determining functional LDL receptor activity in familial hypercholesterolemia: Application of the CD3/CD28 assay in lymphocytes [J]. Clin Chim Acta, 2009, 400(1-2):42-47
- [9] Esteban-Salan M, Aguilar-Doreste JA, Arranz-Pena ML, et al. Multi-centric evaluation of the homogeneous LDL-cholesterol Plus assay: Comparison with beta-quantification and Friedewald formula[J]. Clin Biochem, 2008, 41(16-17): 1402-1409
- [10] Wägner AM, Zapico E, Bonet, R, et al. The effect of VLDL particles on the accuracy of a direct LDL-cholesterol method in type 2 diabetic patients[J]. Clin Biochem, 2003,36(3): 177-183
- [11] Can M, Acikgoz S, Mungan G, et al. Is direct method of low density lipoprotein cholesterol measurement appropriate for targeting lipid lowering therapy?[J] Inter J Cardi, 2010, 142(1):105-107
- [12] Rizzo M and Berneis K. Should we measure routinely the LDL peak particle size?[J] Inter J Cardi, 2006,107(2):166-170
- [13] Okazaki M, Usui S, Nakamura M, et al. Evaluation of an HPLC method for LDL-cholesterol determination in patients with various lipoprotein abnormalities in comparison with beta-quantification [J]. Clin Chim Acta, 2008, 395(1-2):62-67
- [14] Tighe DA, Ockene IS, Reed G, et al. Calculated low density lipoprotein cholesterol levels frequently underestimate directly measured low density lipoprotein cholesterol determinations in patients with serum triglyceride levels ≤ 4.52 mmol/l: An analysis comparing the LipiDirect? magnetic LDL assay with the Friedewald calculation [J]. Clin Chim Acta, 2006, 365(1-2):236-242
- [15] Solà R, Bruckert E, Valls RM, et al. Soluble fibre (Plantago ovata husk) reduces plasma low-density lipoprotein (LDL) cholesterol, triglycerides, insulin, oxidised LDL and systolic blood pressure in hypercholesterolaemic patients: A randomised trial [J]. Atherosclerosis, 2010, 211(2):630-637