

• 论 著 •

过氧化物酶法检测小而密低密度脂蛋白胆固醇的分析性能评价

刘晓丽, 顾向明, 黄阶胜

(广州中医药大学附属中山中医院检验科, 广东中山 528400)

摘要:目的 评价小而密低密度脂蛋白胆固醇(sdLDL-C)过氧化物酶法检测试剂盒的分析性能。方法 参照美国临床实验室标准协会 EP 文件要求评估过氧化物酶法检测 sdLDL-C 液态双试剂检测试剂盒的精密度、线性范围、参考区间、回收试验、抗干扰能力。结果 过氧化物酶法低值总变异系数(CV)为 3.14%, 高值总 CV 为 2.80%; 线性良好 $R^2=0.9813$, 相关方程为 $Y=1.07X-0.24$; sdLDL-C 水平存在明显的性别差异, 参考区间男青中年组为 (0.66 ± 0.36) mmol/L、老年组为 (0.86 ± 0.51) mmol/L, 女中青年组为 (0.58 ± 0.27) mmol/L、老年组为 (0.89 ± 0.55) mmol/L; 平均回收率为 99.54%; 可抵抗临床常见的干扰。结论 sdLDL-C 过氧化物酶法检测试剂盒干扰因素少、重复性好、线性范围较宽且操作简单, 符合实验室常规检测的需要。

关键词:小而密低密度脂蛋白胆固醇; 过氧化物酶法; 性能评价

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2017.20.016 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2017)20-3018-03

Analytical performance evaluation of peroxidase method for measurement of small dense LDL cholesterol

LIU Xiaoli, GU Xiangming, HUANG Jiesheng

(Department of Clinical Laboratory, Affiliated Zhongshan Hospital, Guangzhou University of Chinese Medicine, Zhongshan, Guangdong 528400, China)

Abstract: **Objective** To evaluate the performance of the peroxidase method reagent kit for small and dense low density lipoprotein cholesterol(sdLDL-C). **Methods** Based on the requirements of Clinical and Laboratory Standards Institute EP documents, the precision, linearity range, reference interval, recovery test and anti-interference ability of the peroxidase method reagent kit for detecting sdLDL-C were evaluated. **Results** The total coefficient of variation(CV) of low value in the peroxidase method was 3.14%, which of high value was 2.80%; the linearity was good, $R^2=0.9813$, the related equation was $Y=1.07X-0.24$; the sdLDL-C level had significant sexual difference, the young and middle-aged group reference intervals were (0.66 ± 0.36) mmol/L and older age-group were (0.86 ± 0.51) mmol/L for male, and young and middle-aged group (0.58 ± 0.27) mmol/L and older age-group were (0.89 ± 0.55) mmol/L for female; the average recovery rate was 99.54%; which could be resistant to clinical common interference. **Conclusion** The peroxidase method reagent kit of sdLDL-C has less interfere factors, good reproducibility, wider linear range and is simple to operate, which is suitable for the requirements of clinical laboratory routine detection.

Key words: small dense low density lipoprotein cholesterol; peroxidase method; performance evaluation

小而密低密度脂蛋白胆固醇(sdLDL-C)是低密度脂蛋白胆固醇中密度大而颗粒半径小的一种分型, 临床试验研究表明其是致动脉粥样硬化的主要亚型^[1]。sdLDL-C 与动脉粥样硬化类疾病发生心脑血管事件有良好的相关性^[2-5], 可用于临床患者的风险评估, 作为新的评估心脑血管疾病的脂类指标^[6]。检测 sdLDL-C 的方法较多, 目前得到认可的包括梯度凝胶电泳法、密度梯度超速离心法、核磁共振光谱法及肝素-镁沉淀法等^[7], 上述方法有各自的局限性在临床实验室无法推广。北京九强生物公司研发的过氧化物酶法检测 sdLDL-C 试剂盒, 可直接利用全自动生化仪定量检测血清 sdLDL-C 水平, 提供了临床常规检测 sdLDL-C 的可能, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 从本院健康体检人群中选择, 严格按照要求排除各器质性疾疾病, 共选择参考个体 120 例, 其中男 55 例、女 65 例, 分为中青年组、老年组。中青年组男 20~<44 岁, 平均 (33.3 ± 9.1) 岁; 女 20~<54 岁, 平均 (38.7 ± 11.9) 岁。老年组男 44~79 岁, 平均 (57.0 ± 10.2) 岁; 女 54~79 岁, 平均

(60.9 ± 5.7) 岁。

1.2 仪器与试剂 sdLDL-C 过氧化物酶法检测试剂盒, 配套脂质校准品, 配套质控品 1 和 2(16-0622), 均由北京九强生物试剂公司提供。日本 Hitachi 7600 全自动生化分析仪。

1.3 方法 采用过氧化物酶法测定 sdLDL-C。试剂盒采用两步法分析, 利用特异表面活性剂使试剂中的酶可以和特定的脂蛋白发生特异的反应, sdLDL-C 被释放出来参与显色反应进而检测其水平。主要参数设置: 测定温度 37℃, 主波长 600 nm, 副波长 700 nm, 反应时间 10 min, 校准方式为两点线性校准模式。

1.3.1 标本收集 收集研究对象静脉血 3~5 mL 于黄头管(分离胶管)中, 于 30 min 内尽快分离血清(3 000 r/min 离心 5 min), -20℃以下保存, 标本收集完成后集中测定, 均无溶血、黄疸、脂浊。

1.3.2 精密度与灵敏度检测 依据美国临床实验室标准协会(CLSI)临床化学设备操作精密度评价核准指南, 选取低值混合血清(0.50 mmol/L)、高值混合血清(2.20 mmol/L)为试验

标本,对该标本重复测定 20 次,计算均值($\bar{x}$)、标准差(s)和变异系数(CV),得到批内精密度相关数据。再将此标本每天测定 2 次(要求时间间隔 >2 h),每次测定均做 2 份,共测定 20 d,计算出 $\bar{x}$ 、 s 和 CV ,得到批间精密度。检测灵敏度:以去离子水作为空白标本,混合低值标本稀释成不同水平的测试标本,各重复测定 10 次,计算 $\bar{x}$ 、 s ,当某水平标本的 $\bar{x}-3s$ 大于空白标本的 $\bar{x}+3s$ 时则该水平值为得到的检测灵敏度。

1.3.3 线性范围 参照 CLSI 定量分析方法的线性核准指南,选取低值质控血清(0.35 mmol/L)为 L 号标本,高值质控血清(3.80 mmol/L)为 H 号标本,两者按照 5/5L、4/5L+1/5H、3/5L+5/5H、2/5L+3/5H、1/5L+4/5H、5/5H 的比例稀释成一系列水平的标本。每例标本进行 4 次重复测定,计算 $\bar{x}$ 。以预期值为横坐标,实测 $\bar{x}$ 为纵坐标,计算回归方程和相关系数,观察线性范围。

1.3.4 回收试验 取混合血清标本(0.50 mmol/L),分为 6 份,每份 200 μ L,其中 1 份加入 200 μ L 的蒸馏水,另外 5 份分别加入 0.26、0.53、0.79、1.06、1.32 mmol/L 的 sdLDL 高值质控血清 200 μ L。每份标本均进行 3 次测定,计算回收率。

1.3.5 抗干扰试验 参照 CLSI 临床化学干扰试验核准指南,取健康人群 EDTA-K₂ 抗凝的全血样品离心去除血浆,用 0.9%NaCl 洗涤红细胞 4~5 次,加入去离子水,经低温冰箱反复冻融,配制成高水平(50 g/L)的溶血样品备用。选取黄疸和脂浊的患者标本作为干扰物质。将混合血清分成 2 份,1 份加入干扰物,另 1 份加入等量的去离子水,按比例混合成不同的水平梯度,重复测定 3 次,然后计算分析干扰。干扰程度在 10%以内则认为无干扰影响。

2 结 果

2.1 sdLDL-C 精密度结果比较 低值(0.50 mmol/L)总精密度为 0.05 ± 0.02 ,总 CV 为 3.14%;高值(2.2 mmol/L)总精密度为 2.18 ± 0.06 ,总 CV 为 2.80%,与试剂厂商说明书提供的数据符合。检测灵敏度:稀释后的标本 0.03 mmol/L 均值范围下限大于空白标本的均值上限,该试剂盒的检测灵敏度为 0.03 mmol/L。

2.2 sdLDL-C 线性范围 通过一系列比例的 sdLDL-C 稀释线性得出预期值与实测均值的相关性良好($R^2=0.9813$)。线性范围 0.35~3.80 mmol/L,直线呈正相关,表明在测定范围内呈线性。见图 1。

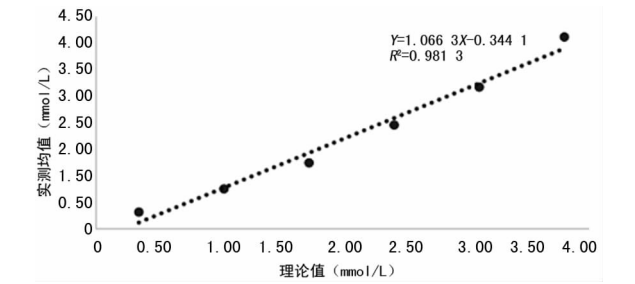


图 1 sdLDL-C 的线性分析

2.3 sdLDL-C 血清水平男女参考区间比较 统计分析,数据呈正态分布, t 检验分析显示血清 sdLDL-C 水平性别,差异有统计学意义($P=0.0013<0.05$),见图 2;年龄差异有统计学意义(男性: $P=0.0032$,女性: $P=0.0021$)。参考区间:男中

青年组(0.66 ± 0.36) mmol/L,老年组(0.86 ± 0.51) mmol/L;女中青年组(0.45 ± 0.28) mmol/L,老年组(0.89 ± 0.55) mmol/L。试验所得数据在试剂盒给出的参考区间之内。

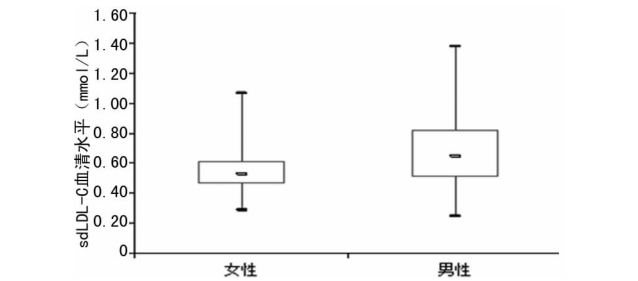


图 2 sdLDL-C 血清水平在男女性别差异比较

2.4 过氧化物酶法测定 sdLDL-C 的回收试验结果 见表 1,其平均回收率为 99.54%。

表 1 过氧化物酶法测定 sdLDL-C 的回收试验结果			
测定值(mmol/L)	回收量(mmol/L)	加入量(mmol/L)	回收率(%)
0.18	—	—	—
0.32	0.14	0.132	106.0
0.42	0.24	0.264	90.9
0.60	0.42	0.396	106.1
0.68	0.50	0.528	94.7
0.84	0.660	0.66	100.0

注:—表示无数据

2.5 抗干扰试验 血红蛋白的干扰水平为 5 g/L,胆红素的干扰水平为 598.5 μ mol/L,乳糜微粒的干扰水平为 67.7 mmol/L,结果符合试剂厂商说明书提供数据,可以抵抗临床中常见的干扰现象。

3 讨 论

心血管疾病患病率和病死率随着社会发展不断上升,已位居于我国居民死因首位^[8]。缺血性心血管病即冠心病及缺血性脑卒中发病年龄日益年轻化,心源性猝死人数明显增加,严重危及患者生命,患者的生活质量严重下降,故预防和控制已引起社会普遍关注。动脉粥样硬化的发生是多种危险因素共同作用的结果,目前得到学者一致公认的有肥胖、糖尿病、高血压、血脂异常、吸烟及缺乏运动^[9-10]。三酰甘油、总胆固醇及高、低密度脂蛋白胆固醇作为检测的血脂类指标,应用于临床常规检测;但近年来发现的 sdLDL-C,可作为新的脂类危险因素,用于缺血性心血管病患者的风险预测及评估^[11],有良好的应用前景。

过氧化物酶法 sdLDL-C 试剂盒的检测原理源于 Hirano 等^[12]提出利用特殊表面活性剂与脂蛋白的特异性反应从而检测 sdLDL-C 水平的理论。即选用聚氧乙烯苄基苯基醚衍生物作为表面活性剂选择性地地解离出非 LDL-C 脂蛋白成分,胆固醇酯被胆固醇酯酶和胆固醇氧化酶分解掉,大而轻低密度脂蛋白被磷脂酶水解,从而只有剩余的 sdLDL-C 参与显色反应。本实验室参照 CLSI EP 文件分析了过氧化物酶法 sdLDL-C 试剂盒的精密度、线性范围、参考区间、回收试验、干扰试验,结果检测的低值总不精密度为 3.14%,高低值均远远小于试剂盒说明书中 $CV<10\%$ 的要求。笔者检测的线性范围为 0.35~3.80

mmol/L,较试剂盒说明书的 0.11~2.59 mmol/L 的高、低界值均要高,线性范围的高界值更高具一定的临床价值,因此可准确检测到更高的临床结果,对临床的疾病判断更为有利;低界值未达到说明书要求,原因不明,但由于检测结果在参考区间的低参考值以下无临床诊疗意义,故在临床应用上的价值没有高值线性提高的大。本试验所得的女性老年组参考区间较试剂说明书所给的参考区间高,可能与统计的年龄分布以及女性的激素分泌水平有关,且 sdLDL-C 水平受年龄的影响。

总之,本次检测的 sdLDL-C 各项评估指标与厂家提供的说明书参数相符,能满足临床的常规检测要求,适用于临床实验室全自动生化仪上检测,可在临床上广泛推广运用。

参考文献

- [1] King RL, Florkowski CM, Yeo J, et al. What is the best predictor of the atherogenic LDL subclass phenotype 'pattern B' in patients with type 2 diabetes mellitus? [J]. *Ann Clin Biochem*, 2011, 48(Pt 2):166-169.
- [2] Maeda S, Nakanishi S, Yoneda M, et al. Associations between small dense LDL, HDL subfractions (HDL2, HDL3) and the risk of atherosclerosis in Japanese-Americans[J]. *J Atheroscler Thromb*, 2012, 19(5):444-452.
- [3] Diffenderfer MR, Schaefer EJ. The composition and metabolism of large and small LDL[J]. *Curr Opin Lipidol*, 2014, 25(3):221-226.
- [4] Zhang Y, Xu RX, Li S, et al. Association of plasma small dense LDL cholesterol with PCSK9 levels in patients with angiographically proven coronary artery disease[J]. *Nutr*

Metab Cardiovasc Dis, 2015, 25(4):426-433.

- [5] Toth PP. Insulin resistance, small LDL particles, and risk for atherosclerotic disease [J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2014, 12(4):653-657.
- [6] 陈力平, 林杰, 孔维菊, 等. 不同血脂人群小而密 LDL 胆固醇分布及其与血脂组分的相关性[J]. *中华检验医学杂志*, 2012, 35(4):354-358.
- [7] 于群, 王惠民, 季秋燕, 等. 化学沉淀法检测小而密低密度脂蛋白方法的建立[J]. *检验医学*, 2014, 29(2):148-152.
- [8] 陈伟伟, 高润霖, 刘力生, 等. 中国心血管病报告 2013 概要[J]. *中国循环杂志*, 2014, 29(7):487-491.
- [9] 郭东梅. 冠心病新的危险因素研究进展[J]. *重庆医学*, 2011, 40(24):2462-2465.
- [10] Kang MY, Hong YC. Inter-correlation between working hours, sleep duration, obesity, and 10-year risk for CHD [J]. *Am J Ind Med*, 2016, 59(4):338-339.
- [11] Hoogeveen RC, Gaubatz JW, Sun W, et al. Small dense LDL cholesterol concentrations predict risk for coronary heart disease: the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014, 34(5):1069-1077.
- [12] Hirano T, Ito Y, Yoshino G. Measurement of small dense low-density lipoprotein particles[J]. *J Atheroscler Thromb*, 2005, 12(2):67-72.

(收稿日期:2017-04-09 修回日期:2017-06-27)

(上接第 3017 页)

- phagy mediated HMGB1 release promotes gastric cancer cell survival via RAGE activation of extracellular signal-regulated kinases 1/2[J]. *Oncol Rep*, 2015, 33(4):1630-1638.
- [6] 王瀚锋, 徐晓东. 高迁移率族蛋白 B1 肿瘤免疫调节作用及其机制[J]. *第二军医大学学报*, 2010, 31(12):1359-1362.
- [7] He W, Tang B, Yang D, et al. Double-positive expression of high-mobility group box 1 and vascular endothelial growth factor C indicates a poorer prognosis in gastric cancer patients[J]. *World J Surg Oncol*, 2013, 18(11):161-163.
- [8] Ohmori H, Luo Y, Kuniyasu H. Non-histone nuclear factor HMGB1 as a therapeutic target in colorectal cancer [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2011, 15(2):183-193.
- [9] Gong W, Wang ZY, Chen GX, et al. Invasion potential of H22 hepatocarcinoma cells is increased by HMGB1-induced tumor NF- κ B signaling via initiation of HSP70[J]. *Oncol Rep*, 2013, 30(3):1249-1256.
- [10] 王占银. 血清 Corin 水平对非 ST 段抬高急性冠脉综合征预后的意义[J]. *转化医学电子杂志*, 2015, 2(7):93-96.

- [11] Nikolaou K, Sarris M, Talianidis I. Molecular pathways: the complex roles of inflammation pathways in the development and treatment of liver cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(11):2810-2816.
- [12] Lee H, Park M, Shin N, et al. High mobility group box-1 is phosphorylated by protein kinase C zeta and secreted in colon cancer cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 424(2):321-326.
- [13] Wang JL, Wu DW, Cheng ZZ, et al. Expression of high mobility group box-B1 (HMGB-1) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in non-small cell lung cancer (NSCLC) [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(12):4865-4869.
- [14] Bao G, Qiao Q, Zhao H, et al. Prognostic value of HMGB1 overexpression in resectable gastric adenocarcinomas [J]. *World J Surg Oncol*, 2010, 8(1):1-7.
- [15] Cheng P, Dai W, Wang F, et al. Ethyl pyruvate inhibits proliferation and induces apoptosis of hepatocellular carcinoma via regulation of the HMGB1-RAGE and AKT pathways [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 443(4):1162-1168.

(收稿日期:2017-02-10 修回日期:2017-04-18)