

血清不同温育条件对高密度脂蛋白胆固醇的稳定性影响研究^{*}

张丽娇¹, 王思明¹, 曾 洁², 杨睿悦¹, 李红霞¹, 王 抒¹, 董 军¹, 陈文祥^{1,2}

(1. 卫生部北京医院/卫生部北京老年医学研究所卫生部老年医学重点实验室, 北京 100730;

2. 卫生部临床检验中心, 北京 100730)

摘要:目的 探讨血清高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)在不同温度、时间下的储存稳定性。方法 2015年5月自卫生部北京医院征集健康志愿者10人(男性4人,女性6人,年龄24~59岁),将收集的血清在4℃温育24 h,25℃温育0,1,8和24 h[分别含和不含卵磷脂胆固醇酰基转移酶(LCAT)抑制剂],HPLC法测定血清总胆固醇(TC),总游离胆固醇(TFC),HDL-C以及HDL游离胆固醇(HDL-FC)。使用微软EXCEL软件进行结果分析。结果 血清在4℃温育24 h,造成HDL-FC和HDL-C变化(平均为-6.91%和-2.17%);25℃温育24 h造成TFC,HDL-FC及HDL-C的变化(平均为-13.70%,-25.88%和-1.53%);25℃下LCAT抑制剂完全抑制TFC的降低、部分抑制HDL-FC的降低,使HDL-C降低幅度更大。结论 血清贮存可造成胆固醇变化,这种变化取决于LCAT,胆固醇酯转移蛋白(CETP)的活性以及FC在脂蛋白之间的转移。因此,为提高血脂测定结果的准确性,应尽量减少不必要的血清贮存。

关键词:高密度脂蛋白;胆固醇;稳定性;高效液相色谱;血清温育

中图分类号:R446.112 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2016)01-021-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2016.01.006

Stability of High-Density Lipoprotein Cholesterol During Serum Incubation

ZHANG Li-jiao¹, WANG Si-ming¹, ZENG Jie², YANG Rui-yue¹, LI Hong-xia¹, WANG Shu¹,

DONG Jun¹, CHEN Wen-xiang^{1,2} (1. the Key Laboratory of Geriatrics,

Beijing Hospital & Beijing Institute of Geriatrics, Beijing 100730, China;

2. National Center for Clinical Laboratories, Beijing 100730, China)

Abstract:Objective To examine the stability of high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) during serum incubation at different temperature and time periods. **Methods** Ten healthy volunteers (4 males and 6 females, aged 24 to 59 years) from Beijing Hospital were recruited in May 2015. Fasting venous blood samples were collected and centrifuged to separate the sera. Serum samples were incubated at 4℃ for 24 h, 25℃ for 0, 1, 8 and 24 h (with or without an LCAT inhibitor). Serum total cholesterol (TC), total free cholesterol (TFC) HDL-C and HDL-FC were measured by the HPLC Method. **Results** HDL-FC and HDL-C changed -6.91% and -2.17% during serum incubation at 4℃ for 24h. TFC, HDL-FC and HDL-C changed significantly (averaged -13.70%, -25.88% and -1.53% respectively) during serum incubation at 25℃ for 24 h, in which the decrease of TFC and HDL-FC were inhibited by the addition of the LCAT inhibitor. The decrease of HDL-C was even higher in the presence of the LCAT inhibitor. **Conclusion** Serum TFC, HDL-C and HDL-FC levels changed during serum incubations, which were caused by the LCAT and CETP activities and the transfer of cholesterol among lipoproteins. For accurate measurement of serum HDL-C, prolonged serum storage should be avoided in clinical laboratories.

Keywords: high-density lipoprotein; cholesterol; stability; high performance liquid chromatography; serum incubation

血脂异常是动脉粥样硬化性心血管病(cardio-vascular diseases, CVD)的重要危险因素,血脂测定结果准确可比是CVD防治的基本要求^[1,2]。影响临床血脂测定准确性的因素除了方法原理、试剂质量、仪器的正确使用及质量控制外,许多分析前因素特别是分析前变异造成的误差可能比分析过程的误差还大。因此,血脂测定需正确认识并有效

控制分析前变异。张江涛等^[3]曾报道全血温育对血清胆固醇(TC),高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)的影响,发现全血贮存中,受血清体积变化、血细胞-脂蛋白间胆固醇交换或转移等许多复杂因素的影响,血清TC和HDL-C水平发生变化。有研究发现血清在不同温度下温育可造成HDL-C变化,并认为卵磷脂胆固醇酰基转移酶(LCAT)和胆固

^{*} 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81472035,81171647)。

作者简介:张丽娇(1987—),女,硕士研究生,研究方向:脂代谢与血脂测定标准化,Tel:18610694050,E-mail:693230455@qq.com。

通讯作者:董 军,研究员,E-mail:jun_dong@263.net。

醇酯(CE)转移蛋白(CETP)与这些变化有关^[4]。我们在标物研制中也发现,血清标物 4℃ 2 个月和 25℃ 1 个月贮存,HDL-C 水平变化显著^[5],在临床实验室常规测定及一分为二的样本比对中,经常会对血清样本进行贮存,一般为室温数小时或 4℃ 2 天。本研究应用本室建立的 HPLC 参考方法^[6],测定新鲜血清样本经不同温度及时间温育后血清 TC,总游离胆固醇(TFC),HDL-C 和高密度脂蛋白-游离胆固醇(HDL-FC)。分析血清贮存对这些指标的影响,并探讨其可能机制。

1 材料与方法

1.1 研究对象 本研究所使用血液样本采集自卫生部北京医院 10 位健康志愿者,其中男性 4 人,女性 6 人,年龄 24~59 岁。取每位志愿者空腹静脉血 20 ml 于干燥试管中,静置 1 h 后离心分离血清,分装于 6 只冻存管中,编号 S1~S6。S1 迅速放入-80℃冰箱;S2~S4 分别在 25℃放置 1,8 及 24 h;S5 中加入终浓度为 1.25 mmol/L 的 LCAT 抑制剂碘代乙酸钠(SIA)后于 25℃放置 24 h;S6 于 4℃放置 24 h;以上样本温育结束后放入-80℃冰箱贮存。本研究通过卫生部北京医院伦理委员会批准,志愿者均签署了知情同意书。

1.2 试剂和仪器 胆固醇参考物质为卫生部北京老年医学研究所研制的国家一级标准物质 GBW09203a;内标豆甾醇、硫酸葡聚糖(Dextralip 50)和 SIA 为美国 Sigma 公司产品;所用有机溶剂无水乙醇、乙腈、异丙醇等为 HPLC 级,购自美国 Fisher Scientific 公司;血清三酰甘油(TG)测定酶试剂为日本积水医疗科技公司产品;其它化学试剂均为北京化学试剂公司的分析纯试剂。仪器:本实验所用仪器主要包括 MicroLab500 稀释器(美国 Hamilton 公司);Agilent1100 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司);Nova-Pak C18 色谱柱(5μm,3.9 mm×150 mm)(美国 Waters 公司);50℃恒温水浴箱;Hitachi 7180 全自动生化分析仪(日本 Hitachi 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 精密配制:浓度为 0.65,1.29,2.58,5.17 和 7.76 mmol/L 的胆固醇乙醇标准溶液和浓度为 5.17 mmol/L 的豆甾醇内标溶液,用于 TC 和 HDL-C 测定;配制浓度为 0.06,0.13,0.26,0.52,1.03 mmol/L 的胆固醇乙醇标准溶液和 0.26 mmol/L 的内标溶液,用于 TFC 和 HDL-FC 测定。

1.3.2 样本准备:每位志愿者的全部样本(S1~S6)在同一次实验中测定完成。分析前取出胆固醇标准溶液和不同条件贮存的冰冻血清样本,混匀器上室温平衡混匀 1 h。自每个样本管中取出 0.4

ml 血清,加入 0.04 ml 硫酸葡聚糖-氯化镁沉淀剂(10 g/L 硫酸葡聚糖和 0.5 mol/L MgCl₂),静置 15 min,沉淀 β-脂蛋白,4℃离心 30 min,制备 HDL,用于 HDL-C 及 HDL-FC 测定;剩余血清用于 TC,TFC 及 TG 测定。

1.3.3 胆固醇测定:应用 HPLC 法^[6]测定 TC,TFC,HDL-C 及 HDL-FC。用稀释器的稀释功能取样,分别取标准、血清和 HDL 样本各 0.05 ml,用 0.5 ml 乙醇冲入 2 ml 试管中,每种标准溶液和血清取样 2 份,HDL 取样 4 份(4 项指标各重复分析 2 份)。向 TC 和 HDL-C 样品管及标准管中加 8.9 mmol/L 氢氧化钾溶液 0.1 ml,混匀,50℃温育 2 h 水解胆固醇酯。向所有试管中加水 0.5 ml,内标 0.05 ml 用 1 ml 正己烷冲入;Vortex 10 min,取正己烷层 0.6 ml,50℃下减压挥发至干;用三氧化铬-硫酸(均 2 mol/L)溶液氧化胆固醇和内标,正己烷抽提,挥干,流动相重组,HPLC 分析;标准曲线内标法定量^[6]。

1.3.4 三酰甘油测定:Hitachi 7180 自动生化分析仪与 TG 测定商品试剂盒组成自动分析系统,按照试剂说明书的要求及参数测定血清中 TG 浓度。

1.4 数据分析 使用微软 Excel 软件进行结果分析。以离心分装后直接放于-80℃冰箱中冻存的血清标本 TC,TFC,HDL-C 及 HDL-FC 值作为初始水平,其它不同温育条件下的测定值与之比较,分析各指标在贮存过程中的稳定性。

2 结果

2.1 各观察对象血脂初始水平 见表 1。10 名健康志愿者血清 TC,TFC,HDL-C,HDL-FC 及 TG 的初始水平,其中 HDL-C 和 TG 的均值(范围)分别为 1.39(0.99~2.05)mmol/L 和 1.28(0.59~3.61)mmol/L。TFC 与 TC 及 HDL-FC 与 HDL-C 高度相关,TFC 和 HDL-FC 分别占 TC 及 HDL-C 的 26.0%和 19.2%。

表 1 健康志愿者血清 TC,TG,TFC,HDL-C,HDL-FC 的初始水平

项 目	均值	范围
HDL-C(mmol/L)	1.39	0.99~2.05
HDL-FC(mmol/L)	0.27	0.18~0.39
TC(mmol/L)	4.68	3.62~5.42
TFC(mmol/L)	1.22	0.95~1.43
HDL-FC/HDL-C(%)	19.18	16.82~22.49
TFC/TC(%)	25.93	24.08~27.66
TG(mmol/L)	1.28	0.59~3.61

2.2 血清在不同条件温育后 TC,HDL-C,HDL-FC 及 TFC 的浓度变化 个体血清在不同条件下温育,HDL-C,HDL-FC 及 TFC 出现不同程度变化,其百分变化见图 1。25℃温育,所有个体血清

TFC 及 HDL-FC 均有下降,且随着温育时间延长,下降幅度明显增加。温育 1,8 和 24 h, HDL-FC 分别下降 4.43%,15.35%和 25.88%,TFC 分别下降 0.90%,6.13%和 13.70%,HDL-C 总体呈下降趋势(−0.89%,−1.81%和 −1.53%),但降低幅度不大。4℃温育 24 h,全部个体血清 HDL-C 及 HDL-FC 均显著降低,百分变化分别为 −2.17%和 −6.91%,TFC 为 0.09%,几乎无变化。所有温育条件下,血清 TC 均无变化。

2.3 血清在不同条件温育后 HDL-C, HDL-FC,

TFC 浓度变化与胆固醇和 TG 初始水平之间的关系 见表 2。25℃和 4℃温育 24 h, HDL-C, HDL-FC, TFC 的所有变化均与血清 TC 和 TFC 水平无关。25℃,24 h TFC 的变化,以及 4℃,24 h HDL-FC 和 HDL-C 的变化与血清 TG 水平显著负相关(分别为 $r = -0.95, P < 0.001$; $r = -0.96, P < 0.001$ 和 $r = -0.74, P < 0.01$)。25℃,24 h, HDL-C, HDL-FC 的变化均与两者的初始水平显著负相关。4℃,24 h, HDL-C, HDL-FC, TFC 的变化均与其初始水平无相关性($P > 0.05$)。

表 2 血清不同条件温育后 HDL-C, HDL-FC, TFC 浓度变化与胆固醇初始水平及 TG 之间的关系									
初始水平	25℃, 24 h			25℃, 24 h+SIA			4℃, 24 h		
	HDL-C	HDL-FC	TFC	HDL-C	HDL-FC	TFC	HDL-C	HDL-FC	TFC
TC	0.11	0.15	−0.29	−0.20	0.04	0.45	−0.42	−0.11	0.43
TFC	0.25	0.25	−0.48	−0.18	0.23	0.44	−0.42	−0.22	0.46
TG	0.45	0.39	−0.95***	−0.55	0.38	0.27	−0.74**	−0.96***	0.44
HDL-C	−0.84**	−0.92***	0.22	−0.24	−0.84**	−0.43	0.02	0.41	−0.39
HDL-FC	−0.76**	−0.93***	0.07	−0.25	0.86***	−0.53	−0.05	0.25	−0.29

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

2.4 LCAT 抑制剂对 HDL-C, HDL-FC 及 TFC 在血清温育过程中的影响 见表 3。25℃温育 24 h,加入 LCAT 抑制剂 SIA 的样本组与对照组(25℃温育 24 h,不加 SIA)比较,TFC 和 HDL-FC

显著升高,其变化分别从 −13.70%和 −25.88%升至 1.09%和 −7.96%,HDL-C 变化从 −1.53%到 −8.94%,降低幅度更大。

3 讨论 卵磷脂胆固醇酰基转移酶(LCAT)和胆

表 3 LCAT 抑制剂(SIA)存在和不存在下血清 25℃温育 24h 后 TC, TFC, HDL-C 和 HDL-FC 水平变化					
项 目	绝对变化均值(mmol/L)		范围(mmol/L)	百分变化均值(%)	范围(%)
HDL-C	SIA(−)	−0.02	0.01~−0.06	−1.53	0.64~−3.31
	SIA(+)	−0.12	−0.08~−0.18	−8.94	−5.96~−13.44
HDL-FC	SIA(−)	−0.07	−0.05~−0.10	−25.88	−22.33~−29.08
	SIA(+)	−0.02	−0.01~−0.03	−7.96	−4.20~−10.77
TFC	SIA(−)	−0.16	−0.14~−0.25	−13.70	−11.28~−17.48
	SIA(+)	0.01	0.02~0.00	1.09	2.05~−0.04
TC	SIA(−)	0.01	0.01~−0.02	−0.28	−0.22~−0.33
	SIA(+)	0.02	0.01~0.04	0.46	0.16~0.76

固醇酯转移蛋白(CETP)是胆固醇逆转运过程中的关键酶^[7]。LCAT 主要与 HDL 结合,转移卵磷脂 sn-2 位的脂肪酰基至胆固醇,生成胆固醇酯(CE)和溶血卵磷脂;CETP 在不同脂蛋白之间转移 CE^[8],一般是将 HDL 上的 CE 转移至 VLDL 和 LDL。LCAT 和 CETP 在体外血液样本中依然发挥作用,是导致 HDL-C 和 LDL-C 分析前变异的主要因素之一。在临床实验室常规测定及一分为二的样本比对中,经常会对分离的血清样本进行低温(4℃)或室温存放。本研究用精密、灵敏的 HPLC 法测定了温育前、后血清和 HDL 中的总胆

固醇和游离胆固醇,研究了血清温育对样本稳定性的影响。

无论 25℃还是 4℃温育均不造成血清 TC 的变化。25℃温育,随着温育时间的延长,TFC 和 HDL-FC 显著降低,说明在 LCAT 作用下,FC 被酯化;但 TFC 的降低幅度(绝对水平)较 HDL-FC 明显,提示 FC 酯化不只发生在 HDL 上,在 LDL 和 VLDL 上可能也有酯化。HDL-C 以降低为主,但降低幅度不大,提示在 CETP 作用下,HDL-CE 被转移到 LDL 和 VLDL, HDL-C 变化是 LCAT 和 CETP 综合作用的结果。25℃下抑制 LCAT 活

性, TFC 的下降被抑制, 但 HDL-FC 仍明显下降—7.96% (−4.20% ~ −10.77%), 提示脂蛋白之间存在着 FC 的交换。

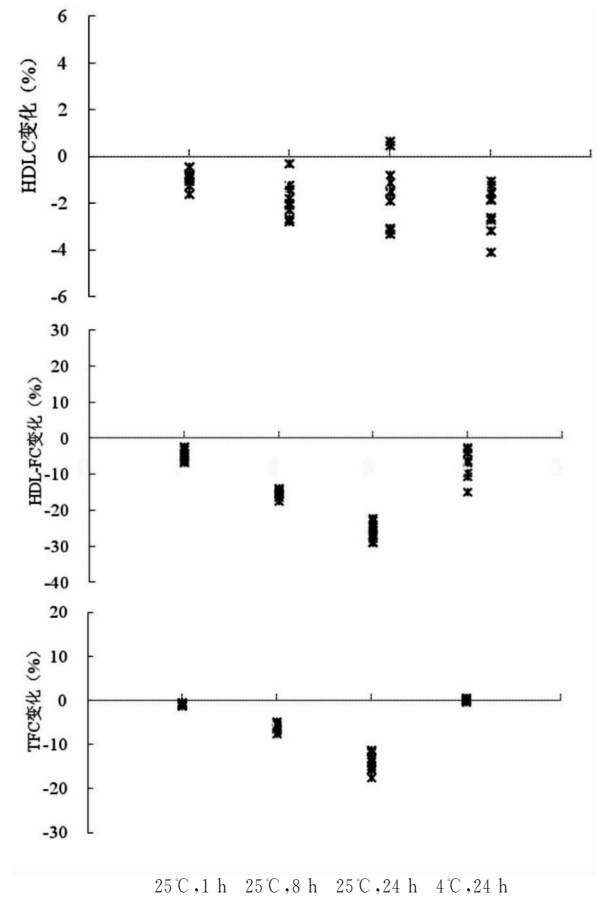


图 1 血清不同条件温育后 HDL-C, HDL-FC 及 TFC 的浓度变化

本试验结果显示 4℃ 下 TFC 无变化, 提示 LCAT 活性被抑制; HDL-C 下降是由 HDL-FC 下降引起(两者下降的绝对值相当); HDL-CE 基本无变化或略微升高, 提示 CETP 可能无活性; HDL-FC 显著降低, 提示在低温下脂蛋白之间的交换依然存在。这种 LCAT 无活性时 FC 由 HDL 向其他脂蛋白“单向”转移的机制尚不清楚, 但与之之前的研究结果^[3,9]一致。

不同条件温育后 HDL-C, HDL-FC, TFC 的浓度变化与其初始血脂水平关系密切。25℃ 下 TFC 的变化与血清 TG 高度负相关, 即 TG 水平越高, 体外 LCAT 活性越高, TFC 降低越明显, 与之前的研究结果一致^[10]。温育造成的 HDL-C 和 HDL-FC 的降低主要与两者的初始浓度有关。与此相反, 4℃ TFC 变化与 TG 无关, HDL-C 和 HDL-FC 的变化与其初始浓度无关, 与 TG 负相关。25℃ 抑制 LCAT 活性, HDL-FC 的变化与 HDL-FC 和 HDL-C 显著负相关, 提示 LCAT 无活性时 FC 由 HDL 向其他脂蛋白的“单向”转移与 HDL-FC 浓

度梯度有关。

综上所述, 由于 LCAT 和 CETP 的作用, 以及 FC 在不同脂蛋白间的转移等许多复杂因素的影响, 血清贮存会造成 HDL-C, HDL-FC 以及 TFC 的变化。因此, 血脂测定标本应尽量减少不必要的贮存。

参考文献:

[1] Lopez-Jimenez F, Simha V, Thomas RJ, et al. A summary and critical assessment of the 2013 ACC/AHA guideline on the treatment of blood cholesterol to reduce atherosclerotic cardiovascular disease risk in adults: filling the gaps[J]. Mayo Clin Proc, 2014, 89 (9):1257-1278.

[2] 陈文祥. 临床检验参考测量系统与临床检验分析质量保证[J]. 中华检验医学杂志, 2007, 30(4):478-480. Chen WX. Clinical laboratory reference measurement system and quality assurance of clinical analysis[J]. Chin J Lab Med, 2007, 30(4):478-480.

[3] 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. Zhang JT, Dong J, Li HX, et al. Stability of serum total and high density lipoprotein cholesterol during whole blood incubation examined by high performance liquid chromatography[J]. Chin J Lab Med, 2005, 28 (4):364-368.

[4] Waymack PP, Ethridge SF, Chen WX, et al. Effect of inhibition of the in vitro activities of lecithin:cholesterol acyltransferase (LCAT) and cholesterol ester transfer protein (CETP) on the stability of HDL cholesterol in fresh sera[J]. Clin Chem, 2002, 48: A110 (abstract).

[5] 李红霞, 国汉邦, 周伟燕, 等. 血清高、低密度脂蛋白胆固醇标准物质的研究[J]. 现代检验医学杂志, 2011, 26(4):10-13. Li HX, Guo HB, Zhou WY, et al. Preparation of serum reference materials for high- and low- density lipoprotein cholesterol[J]. J Mod Lab Med, 2011, 26 (4):10-13.

[6] Dong J, Guo H, Yang R, et al. Serum LDL- and HDL-cholesterol determined by ultracentrifugation and HPLC[J]. J Lipid Res, 2011, 52(2):383-388.

[7] Calabresi L, Franceschini G. Lecithin: cholesterol acyltransferase, high-density lipoproteins, and atheroprotection in humans[J]. Trends Cardiovasc Med, 2010, 20(2):50-53.

[8] Mabuchi H, Nohara A, Inazu A. Cholesteryl ester transfer protein (CETP) deficiency and CETP inhibitors[J]. Mol Cells, 2014, 37(11):777-784.

[9] Dobiasova M, Frohlich J. Understanding the mechanism of LCAT reaction may help to explain the high predictive value of LDL/HDL cholesterol ratio[J]. Physiol Res, 1998, 47(6):387-397.

[10] Dong J, Yu S, Yang R, et al. A simple and precise method for direct measurement of fractional esterification rate of high density lipoprotein cholesterol by high performance liquid chromatography[J]. Clin Chem Lab Med, 2014, 52(4):557-564.