

• 临床检验研究论著 •

唾液皮质醇参考区间的建立及其临床意义评价

唐菊英, 郑鹏杰, 黎 锋, 戚以勤, 张少玲[△]

(中山大学孙逸仙纪念医院内分泌科, 广东广州 510120)

摘要:目的 初步建立酶联免疫吸附分析法(ELISA)检测唾液皮质醇(SC)参考区间,并评价其在诊断库欣综合征中的意义。方法 招募健康成人志愿者(NS组)120例,非库欣综合征患者(NCS组)55例和库欣综合征患者(CS组)7例,分别于08:00、16:00及24:00收集唾液,并同步采血,NS组只在08:00采血。用ELISA法测定SC,用化学发光免疫分析法(CLIA)测定血清皮质醇(STC)。结果 健康成人SC在08:00、16:00和24:00参考区间分别为:4.9~24.9 nmol/L,2.2~16.0 nmol/L,0.7~10.1 nmol/L。3组受试者SC在08:00、16:00和24:00结果分别为,NS组:(14.9±5.1)nmol/L、(9.1±3.5)nmol/L、(5.4±2.4)nmol/L;NCS组:(17.6±5.3)nmol/L、(12.1±3.6)nmol/L、(9.7±4.8)nmol/L;CS组:(33.1±8.6)nmol/L、(36.4±14.2)nmol/L、(30.6±10.6)nmol/L。CS组各时间点SC均明显高于NCS组和NS组,NCS组也较NS组高,差异均有统计学意义($P<0.05$)。3组受试者STC在08:00结果分别为:(428±118)nmol/L(NS组)、(509±254)nmol/L(NCS组)、(672±190)nmol/L(CS组);CS组STC在08:00较NS组高($P<0.05$);而与NCS组比,差异无统计学意义($P>0.05$);STC在16:00和24:00结果分别为:NCS组:(295±136)nmol/L、(109±98)nmol/L;CS组:(689±160)nmol/L、(624±131)nmol/L;CS组STC在16:00和24:00明显高于NCS组($P<0.001$)。受试者各时间点SC与STC均呈良好线性相关,相关系数 r 依次为:0.602、0.876、0.859($P<0.01$)。各时间点SC诊断库欣综合征ROC曲线下面积分别为:0.950、0.989、0.995,若分别以SC在08:00、16:00和24:00参考区间上限为切点诊断库欣综合征,敏感性分别为85.7%、85.7%、100%,特异性为93.3%、92.7%和85.0%;若分别以17.4 nmol/L、12.5 nmol/L、16.4 nmol/L为切点,敏感性提高为100%,特异性为70.7%、80.0%、97.6%。结论 SC呈昼夜节律变化,与STC有良好的相关性,是评价肾上腺皮质功能和筛查诊断CS的方便、无创、敏感的检测指标。

关键词:唾液皮质醇; 参考区间; 库欣综合征; 酶联免疫吸附测定

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.20.017

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)20-2678-02

To set up the reference interval of salivary cortisol and evaluate its clinical diagnosis value

Tang Juying, Zheng Pengjie, Li Feng, Qi Yiqin, Zhang Shaoling[△]

(Department of Endocrinology, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong 510120, China)

Abstract: Objective To set up the reference interval of salivary cortisol at different collecting time of 08:00, 16:00 and 24:00; and to evaluate the value of salivary cortisol in the initial diagnosis of Cushing's syndrome. **Methods** A total of 7 patients with clinically confirmed Cushing's syndrome (CS), 55 patients with obesity, essential hypertension, or adrenal adenoma excluding Cushing's syndrome (NCS), and 120 normol subjects (NS) were recruited in the study. Saliva samples were collected at 08:00, 16:00 and 24:00 by commercially available saliva collection devices. Blood samples were collected at the same times, except that in NS group blood samples were collected at 08:00 only. Salivary cortisol were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), while serum total cortisol were assayed by chemiluminescence immunoassay (CLIA). **Results** The reference interval of salivary cortisol at 08:00, 16:00, 24:00 were 4.9-24.9 nmol/L, 2.2-16.0 nmol/L, 0.7-10.1 nmol/L respectively. The results of salivary cortisol in CS group at 08:00, 16:00, 24:00 were (33.1±8.6) nmol/L, (36.4±14.2) nmol/L and (30.6±10.6) nmol/L, higher than NCS group (17.6±5.3) nmol/L, (12.1±3.6) nmol/L, (9.7±4.8) nmol/L ($P<0.05$) and NS group (14.9±5.1) nmol/L, (9.1±3.5) nmol/L, (5.4±2.4) nmol/L ($P<0.05$). Salivary cortisol and serum total cortisol at the same collecting time were in good correlation, with r values were 0.602, 0.876, 0.859 ($P<0.01$). If using the upper limits of the reference interval of salivary cortisol at different time points as the cut-off for the diagnosis of overt Cushing's syndrome, the areas under ROC curve were 0.950, 0.989, 0.995 respectively, with their sensitivity 85.7%, 85.7% and 100%, and their specificity were 93.3%, 92.7% and 85.0% respectively. A threshold of 16.4 nmol/L of midnight salivary cortisol yielded 100% sensitivity and 97.6% specificity in overt Cushing's syndrome. **Conclusion** Salivary cortisol at 08:00, 16:00, 24:00 revealed the circadian rhythms of cortisol production. Measurements of salivary cortisol circadian rhythms, especially the midnight salivary cortisol, is a convenience, non-invasive and reliable screening test for the screening of diagnosis of Cushing's syndrome.

Key words: alivary cortisol; reference interval; Cushing's Syndrome; enzyme-linked immunosorbent assay

唾液皮质醇(salivary cortisol, SC)是来源于血中具有生物活性的游离态皮质醇,经过唾液腺腺泡细胞扩散进入唾液。因游离态皮质醇呈脂溶性,易于扩散,故SC不受唾液流速的影响,并接近血中游离态皮质醇浓度,同样也显示昼夜节律变化^[1]。多项研究显示SC检测便于评价肾上腺皮质功能,尤其是午夜

SC是筛查诊断库欣综合征(Cushing's syndrome)的一个方便、无创、敏感的检测指标^[2-5]。文中研究旨在建立本研究室健康成人SC参考区间,并初步探讨SC在库欣综合征诊断中的价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 招募健康成人志愿者(NS组)120例,男性51

例,女性 69 例;年龄 16~60 岁,肝、肾功能生化检测指标正常,无高血压、糖尿病及肾上腺疾病等明确的急性或慢性疾病史,有规律的作息时间,受试前两周无明显应激情况,近期没有使用外源糖皮质激素或影响皮质激素合成、代谢的相关药物,无口腔疾病,无明确的精神疾病史或在服用镇静药、安眠药,无酗酒等;女性有正常月经周期或绝经妇女,近期未服用避孕药。非库欣综合征患者(NCS组):根据欧洲内分泌学会 2008 年发表的库欣综合征诊治指南^[6]推荐,筛查来自 2012 年 2 月至 12 月内分泌科住院患者中的疑似库欣综合征病例 55 例,男性 28 例,女性 27 例;年龄 13~62 岁。经临床表现和库欣综合征相关检查排除库欣综合征而最终诊断为高血压病 26 例,单纯性肥胖症 9 例,糖尿病合并肥胖 10 例,多囊卵巢综合征 7 例,原发性醛固酮增多症 2 例,肾上腺皮质癌 1 例。库欣综合征患者(CS组):7 例,男性 1 例,女性 6 例;年龄 25~62 岁,为同期经临床表现和库欣综合征相关检查而最终确诊为库欣综合征的内分泌科住院患者(其中垂体促肾上腺皮质激素(ACTH)腺瘤 3 例,肾上腺腺瘤 3 例,异位 ACTH 综合征 1 例)。

1.2 仪器与试剂 唾液皮质醇 ELISA 试剂盒(德国 DRG 公司);MK3 酶标测定仪(芬兰 RMO-BIA 公司);ADVIA Centaur XP 全自动化学发光免疫分析仪及皮质醇配套试剂(德国 SIEMENS 公司)。

1.3 样本采集 健康志愿者采集样本前一晚 22:00 以后禁食,第 2 天早上 08:00 留取唾液,并同步采集静脉血,于当天 16:00、24:00 自行采集唾液;患者在入院后第 2 天做皮质醇节律 08:00、16:00、24:00 测定时同步留取唾液。唾液的采集用商品化的专用管(广州捷倍斯生物科技有限公司)。采集方法^[7-8]:受试者避免应激,采集前 30 min 不刷牙、不饮水、不嚼口香糖,不抽烟,用清水漱口,弃去第一口唾液,将专用棉棒放入口中,含 3~5 min 后,取出棉棒放回专用套管中,拧紧塞子。不混入痰液、血液。3 000 r/min 离心 5 min 分离,分装后的唾液于-80 ℃冰箱保存至检测,血清皮质醇当天或次日检测。留取标本的方法提前一天专人指导并给予书面详细交代。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行统计学分析,计量资料经检验符合正态性分布,用 $\bar{x} \pm s$ 表示,唾液皮质醇参考区间以 $\bar{x} \pm 1.96s$ (95%数据分布范围)来确立;相关性分析采用 Pearson 相关分析,多组间比较采用方差分析,两组间比较采用两独立样本 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 受试者基本特征唾液皮质醇水平 健康成人志愿者 08:00、16:00 及 24:00 唾液皮质醇(SC 08:00、SC 16:00、SC 24:00)呈正态分布,其均值及参考区间分别为:14.9(4.9~24.9) nmol/L,9.1(2.2~16.0) nmol/L,5.4(0.7~10.1) nmol/L,受试者基本特征和唾液皮质醇结果见表 1(见《国际检验医学杂志》网络主页“论文附件”)。

表 2 SC 各时间点诊断库欣综合征的敏感性和特异性

指标	SC 08:00	SC 16:00	SC 24:00
AUC	0.950	0.989	0.995
95%CI	0.875~1.000	0.967~1.000	0.987~1.000
Cut-off(参考上限)	24.9	16.0	10.1
敏感性	85.7%	85.7%	100%
特异性	93.3%	92.7%	85.0%
Cut-off 2	17.4	12.5	16.4
敏感性	100%	100%	100%
特异性	70.7%	80.0%	97.6%

2.2 SC 各时间点诊断库欣综合征的敏感性和特异性 受试

者各时间点 SC 与库欣综合征均呈良好直线相关,相关系数 *r* 依次为:0.602、0.876、0.859($P < 0.01$)。各时间点对库欣综合征诊断的敏感性和特异性见表 2。

3 讨 论

文中 SC 参考区间的建立参照《临床检验质量管理技术基础》^[9],选择 120 例健康志愿者作参考个体,选择 95%分布范围的大小表示参考区间。因 SC 不受年龄、性别和 BMI 影响^[10],故未设置年龄、性别和 BMI 分组,招募对象为成人健康志愿者,未包括 16 岁以下及 65 岁以上的人群。在入选过程中严格按照已设立的健康成人志愿者入选与排除标准。不符合标准个体剔除后,由健康个体候补上。

SC 的合成与分泌受下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴(H-P-A 轴)的调节,呈脉冲式分泌,并具有昼夜节律规律。SC 水平的升高又反过来抑制下丘脑促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)及垂体促肾上腺皮质激素(ACTH)的分泌,进而抑制 SC 的分泌(负反馈调节)。因此,SC 测定是临床评价 H-P-A 轴功能的重要指标之一。文中结果也显示健康成人 SC 分泌同血皮质醇一样呈明显的昼夜节律变化,各时间点 SC 与库欣综合征均呈良好线性相关。各时间点 SC 的参考区间与国内报道中 ELISA 法结果接近^[11],但与该报道中电化学发光免疫分析法结果相差较大,故不同的测定方法需要建立自己的参考区间。

文中的 7 例 CS 患者都较典型的临床特征:紫纹、满月脸、水牛背和高血压等,库欣综合征和 SC 水平都较高,尤其是各时间点 SC 均明显高于 NCS 组和 NS 组;STC 08:00 明显高于 NS 组,较 NCS 组稍高一些,但差异无统计学意义($P > 0.05$),而 STC16:00 和 STC24:00 明显高于 NCS 组患者。NCS 组各时间点 SC 高于 NS 组,差异有统计学意义($P < 0.05$);而 STC 08:00 有所升高,但与 NS 组比较,差异无统计学意义。由此说明 NCS 组患者虽有库欣综合征的某些表现,清晨血清 SC 水平也较高,且以游离态 SC 更为显著,但 H-P-A 轴仍有较好的调节功能,尚能维持皮质醇在一定水平,呈现正常的昼夜节律。各时间点 SC 诊断库欣综合征的 ROC 曲线下面积(AUC 依次为 0.950、0.989 和 0.995)显示其对库欣综合征诊断准确性较高,且以午夜 SC 最为敏感。若分别以 SC 08:00、SC16:00 和 SC24:00 参考区间的上限(24.9 nmol/L、16.0 nmol/L 和 10.1 nmol/L)为切点诊断库欣综合征,敏感性分别为 85.7%、85.7%和 100%,特异性为 93.3%、92.7% 和 85.0%;若以 17.4 nmol/L(SC 08:00)、12.5 nmol/L(SC16:00)为切点,可获得更高的敏感性(均为 100%),而特异性稍低,分别为 70.7%和 80.0%;若将 SC24:00 切点提高至 16.4 nmol/L,其敏感性仍为 100%,特异性则提高至 97.6%。但文中库欣综合征患者病例数较少且病例特征较为典型,有关最佳诊断切点的确立尚需积累更多的资料。

测定 SC 节律及午夜 SC 对库欣综合征诊断的准确性和敏感性均较高,特别适合作为一二线筛查指标。唾液作为生物诊断样本较血清有更多优势:采集方便、无创,不受场地的限制,易为各种人群所接受,尤其能满足多次采集的需求;而且唾液样本在室温下很稳定,方便常规运送^[12],这对患者疾病的诊治、随访及远距离监测提供了便利;尤其是患者无需专门住院检查,可以节约医疗费用^[13-14]。

参考文献

[1] 龙国文. 唾液皮质醇及其检测应用评价[J]. 国外医学临床生物化学与检验分册,1996,17(3):102-106.
 [2] Raff H. Utility of Salivary Cortisol Measurements in Cushing's Syndrome and Adrenal Insufficiency[J]. Clin (下转第 2681 页)

性率积分均明显低于正常对照组 ($P < 0.01$)。ALL, 骨髓增殖性疾病(如慢性中性粒细胞白血病、骨髓纤维化、真性红细胞增多症、原发性血小板增多症), AA, CLL, 类白血病反应患者的 NAP 阳性率积分均明显高于正常对照组 ($P < 0.01$)。却以类白血病反应患者最高。ITP、骨髓增生异常综合征(MDS-RAS), 缺铁性贫血与正常对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 讨 论

各类血液性疾病在临床表现和血液学改变上有许多相似之处, 容易混淆, 疾病初期不易诊断, 极易误诊。NAP 主要存在于中性成熟粒细胞(包括中性杆状核粒细胞和分叶核粒细胞), 故中性成熟粒细胞呈阳性。不同疾病其 NAP 活性有变化, 而且, 有些生理因素可使酶活性发生改变^[3]。NAP 活力可反映成熟粒细胞的成熟程度和功能。当中性粒细胞活化后, NAP 阳性率及积分升高^[4,12]。而本组急性白血病中, AML 患者的 NAP 阳性率积分均明显低于正常对照组 ($P < 0.01$), ALL 患者的 NAP 阳性率积分明显高于正常对照组 ($P < 0.01$), 这可作为急性白血病表型的鉴别^[5]。慢性期患者 NAP 积分减低, 而骨髓增殖性疾病(如慢性中性粒细胞白血病、骨髓纤维化、真性红细胞增多症、原发性血小板增多症), 患者的 NAP 积分增高, 有文献报道细胞特异性激酶 p55c 拟 fgr 可反应中性粒细胞的成熟度^[6,11], 故 NAP 活性可能与之有关。有作者认为, 其机制是慢性粒细胞白血病患者的特异性激酶 p55c 拟 fgr 呈下调状态, 而其他骨髓增殖性疾病患者的特异性激酶 p55c 拟 fgr 上调。另就 CMC 不同各期比较, NAP 积分减低或为零是慢性期的特点。故 NAP 染色有助于二者的鉴别。AA 和骨髓增生异常综合征(MDS-RA)同属于造血干细胞疾病, 但本质和预后却截然不同, AA 是造血功能衰竭的良性疾病, 骨髓增生异常综合征(MDS-RA)则是以骨髓增生异常和向白血病转化为特征的恶性克隆性疾病^[7,10]。所以, 给予这两种疾病正确的诊断, 才有可能对它们做出合理有效的治疗。本组通过对比, AA 的 NAP 积分均明显高于骨髓增生异常综合征(MDS-RA)的 NAP 积分。AA 可因中性粒细胞颗粒增加, 细胞返祖, 常伴有感染及激素治疗等因素的影响使 NAP 活性持续增高。不论是早期 AA 和局灶性非典型 AA, NAP 活性都呈

显著增加, 因此 NAP 积分持续增高, 可视为 AA 的重要早期标准。有研究表明, AA 患者不管早期、晚期、典型、不典型以及治疗前后, 其 NAP 酶活性均处于极高峰点状态的特异性和敏感性表现, 这是其他任何贫血都无法相比的。因此 NAP 可作 AA 重要的特异的敏感的诊断指标^[8-9], 显然, NAP 活性观察对 AA, 骨髓增生异常综合征(MDS-RA)的鉴别有重要的临床意义。而 ITP、骨髓增生异常综合征(MDS-RAS)、缺铁性贫血患者 NAP 活性和正常对照组无明显统计学意义。

参考文献

- [1] 陈方平. 血液学检验[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 48.
- [2] 姚尔固, 林凤茹, 郭晓楠, 等. 恶性血液病的诊断与治疗[M]. 北京: 人民军医出版社, 2004: 1.
- [3] 许文荣, 王建中. 临床血液学与检验[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 77.
- [4] 丛玉隆, 冉宝春, 邓新立, 等. 中性粒碱性磷酸酶在传染性非典型肺炎诊断与鉴别中的价值[J]. 中华检验医学杂志, 2005, 28(1): 34-36.
- [5] 陈文彬. 诊断学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 11.
- [6] 曹鹏飞, 刘友生, 刘永和. 中性粒细胞碱性磷酸酶在骨髓增生性疾病诊断及疗效观察中的价值[J]. 白血病·淋巴瘤, 2006, 15(6): 437.
- [7] 蔡正文, 余永正, 杨日楷, 等. 骨髓增生异常综合征难治性贫血与慢性再生障碍性贫血临床表现和血液学改变的比较研究[J]. 白血病·淋巴瘤, 2001, 10(2): 89-90.
- [8] 王永才. 血液骨髓细胞检验诊断学[M]. 大连: 大连出版社, 1995.
- [9] 王淑娟, 王健中, 吴振茹. 现代血液病细胞图谱[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001.
- [10] 黄湘宁. 中性粒细胞碱性磷酸酶染色在血液病诊断中的应用[J]. 广东医学院学报, 2007, 25(5): 540-541.
- [11] 黄东平. 215 例血液病患者中性粒细胞碱性磷酸酶活性结果分析[J]. 右江民族医学院学报, 2008, 30(6): 1058-1059.
- [12] 杨晓春. 中性粒细胞碱性磷酸酶活性测定在全血细胞减少疾病鉴别诊断中的价值[J]. 淮海医药, 2006, 24(6): 487-488.

(收稿日期: 2013-04-20)

(上接第 2679 页)

Endocrinol Metab, 2009, 94(10): 3647-3655.

- [3] León-Justel A, Mangas MA, Infante Fontán R, et al. Budget impact of using midnight salivary cortisol in the diagnosis of hypercortisolism[J]. Clin Chim Acta, 2011, 412(23/24): 2248-2253.
- [4] Doi M, Sekizawa N, Tani Y, et al. Late-night salivary cortisol as a screening test for the diagnosis of Cushing's Syndrome in Japan [J]. Endocr J, 2008, 55(1): 121-126.
- [5] Sakihara S, Kageyama K, Oki Y, et al. Evaluation of Plasma, Salivary and Urinary Cortisol Levels for Diagnosis of Cushing's Syndrome[J]. Endocr J, 2010, 57(4): 331-337.
- [6] Nieman LK, Biller BM, Findling JW, et al. The diagnosis of Cushing's Syndrome: an endocrine society clinical practice guideline [J]. Clin Endocrinol Metab. 2008, 93(5): 1526-1540.
- [7] 施绍瑞, 干伟, 邹茜婷, 等. 唾液皮质醇对库欣综合征的诊断价值探讨[J]. 四川大学学报: 医学版, 2009, 40(2): 298-301.
- [8] Poll EM, Kreitschmann-Andermahr I, Langejuergen Y, et al. Saliva collection method affects predictability of serum cortisol[J].

Clin Chim Acta, 2007, 382(1/2): 15-19.

- [9] 冯仁丰. 临床检验质量管理技术基础[M]. 2 版. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2007: 212-220.
- [10] 干伟, 张琳, 安振梅. 唾液皮质醇的研究进展[J]. 中国实验诊断学, 2009, 13(9): 1304-1306.
- [11] 安振梅, 干伟, 邹茜婷. 唾液皮质醇正常参考值的初步建立及其临床意义评价[C]. 2008 内分泌代谢性疾病系列研讨会暨中青年英文论坛论文汇编, 2008: 192.
- [12] Hofman LF. Human Saliva as a Diagnostic Specimen[J]. Nutr, 2001, 131(5): 1621S-1625S.
- [13] León-Justel A, Mangas MA, Infante Fontán R, et al. Budget impact of using midnight salivary cortisol in the diagnosis of hypercortisolism[J]. Clin Chim Acta, 2011, 412(23/24): 2248-2253.
- [14] 中华医学会内分泌学分会. 库欣综合征专家共识(2011 年)[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2012, 28(2): 96-102.

(收稿日期: 2013-04-15)