

• 论 著 •

武汉地区人群血清游离脂肪酸参考区间的探索*

周 燕¹, 马 培², 韩 露²

(武汉大学中南医院:1. 消化内科;2. 基因诊断中心, 武汉 430071)

摘 要:目的 初步建立武汉地区人群血清游离脂肪酸(NEFA)酶法参考区间。方法 选择该院健康体检者 1 250 例作为研究对象,采用奥林巴斯 AU5400 生化分析仪及 Sekisui 酶法检测试剂检测血清 NEFA。回归分析 NEFA 的影响因素,正态分布法估计 NEFA 95%参考区间,并验证参考区间。结果 回归分析显示体质量指数(BMI)及年龄对 NEFA 有显著影响($P<0.01$)。NEFA 在大于或等于 60 岁最高,18~<45 岁次之,45~<60 岁最低;NEFA 在 BMI<18.5 kg/m² 组最高。估计武汉地区健康人群 NEFA 95%参考区间为 204.6~975.2 μmol/L。临床验证者的测定范围为 242.0~831.2 μmol/L,符合上述参考区间。结论 初步建立武汉地区健康人群 NEFA 参考区间。

关键词:酶法; 血清游离脂肪酸; 参考区间

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.23.004

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)23-3249-03

Investigation on reference interval of serum non-esterified fatty acid among population in Wuhan area*

ZHOU Yan¹, MA Pei², HAN Lu²

(1. Department of Gastroenterology; 2. Center for Gene Diagnosis, Zhongnan Hospital, Wuhan University, Wuhan, Hubei 430071, China)

Abstract:Objective To preliminarily establish the reference interval of serum non-esterified fatty acids(NEFA)among population in Wuhan area by enzymatic assay. **Methods** NEFA level of serum samples from A total of 1 250 individuals undergoing healthy physical examination in our hospital were selected as the research subjects. The Olympus AU5400 biochemistry analyzer and SEKISUI reagents were adopted to detect serum NEFA level. The regression analysis was adopted to analyze the NEFA influencing factors. The NEFA 95% reference interval was estimated by using the normal distribution method and the reference interval was verified. **Results** The regression analysis showed that the body mass index(BMI)and age had significant effect on NEFA($P<0.01$). NEFA was highest in the group aged ≥ 60 years old, followed by the group of 18~<45 years old, and lowest in the group of 45~60 years old; NEFA was highest in the group of BMI<18.5 kg/m². The 95% reference interval of NEFA for healthy population in Wuhan area was estimated as 204.6~975.2 μmol/L. The detected NEFA level for clinical verifiers was 242.0~831.2 μmol/L, which conformed to the above reference interval. **Conclusion** The serum NEFA reference interval among healthy population in Wuhan area is primarily established.

Key words: enzymatic assay; serum non-esterified fatty acids; reference interval

游离脂肪酸(NEFA)是一类非酯化脂肪酸,主要成分为油酸、亚油酸、软脂酸等。NEFA 不仅是人体包括心、肝、骨骼肌等器官优先选择的能源物质,还是参与氧化应激及胰岛素抵抗的重要物质^[1-3]。在介导血管内皮细胞损伤致动脉粥样硬化及冠心病的发生、发展中起到重要作用。血清 NEFA 水平与脂代谢、糖代谢及内分泌功能等密切相关。研究表明,与血清三酰甘油及胆固醇比较,NEFA 水平更能敏感地反映机体脂代谢的变化^[4]。因此建立 NEFA 参考区间十分必要。本文检测分析武汉市部分健康体检者的 NEFA 水平,旨在初步建立武汉地区健康人群血清 NEFA 参考区间,为心血管疾病等提供诊疗依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择长期居住于武汉地区,于 2013 年 5~9 月在武汉大学中南医院进行体检的健康汉族成年人。所有受试者经武汉大学中南医院伦理委员会审核批准,本人签署知情同意书。

1.2 纳入与排除标准^[5] 所有入选对象经病史询问、常规体

格检查以及实验室检查包括心电图、X 线片、腹部 B 型超声波检查、肝肾功能检测等,各项检测指标均显示正常。排除冠心病、脑卒中、高血压、血脂异常、糖尿病、非酒精性脂肪肝、其他动脉粥样硬化性疾病病史等,排除乙肝病毒携带者及年龄小于 18 岁者。

1.3 方法与试剂 收集清晨空腹全血,经 4 000 r/min 离心 5 min,收集血清,于-80℃冰箱储存。血清标本在检测前复苏至室温并保持 15 min,于武汉大学中南医院检验科进行检测,检测系统为奥林巴斯 AU5400 生化分析仪,检测试剂为 Sekisui NEFA 检测试剂盒,产品批号 803RIJ。校准物质为 Sekisui NEFA,批号 816RKI,具有校准物质溯源性。质控品为 2 个定值质控品,批号分别为 1004231、1103147。以上试剂由积水医疗科技(中国)有限公司生产提供。

1.4 统计学处理 使用 SPSS13.0 统计软件进行分析。各实验室检测指标正态性检验采用 K-S 法,定量数据符合正态分布者用 $\bar{x}\pm s$ 表示或偏态分布者用中位数和四分位数 $[M(P_{25}, P_{75})]$ 表示。正态分布的资料离群值的识别使用 $\bar{x}\pm 3s$ 方法,

* 基金项目:国家重点基础研究发展规划“973”资助项目(2012CB720605)。

作者简介:周燕,女,副主任技师,主要从事消化疾病临床检验研究。△ 通讯作者,E-mail:zy6157@126.com。

测定值高于 $\bar{x}+3s$ 或低于 $\bar{x}-3s$ 考虑为离群值。两组、多组偏态分布计量资料经对数转换后分别使用独立样本 t 检验或 ANOVA 分析。采用对数转换后 $\bar{x}\pm 1.96s$ 计算 NEFA 95% 参考区间。

1.5 参考区间验证 随机从上述参考人群按不同年龄分组共抽取 60 例用于参考区间的验证。若检测结果最少 95% (57 例) 位于新建参考区间内, 不超过 3 例结果未位于该参考区间, 判定参考区间有效。若有 4 例或 4 例以上在该参考区间外, 须另外收集第 2 组参考人群重新检测。第 2 组检测数据不超过 4 例结果落在参考区间外, 则认为验证有效; 若第 2 组数据超过 4 例结果在参考区间外, 首先检查检测系统性能及检测程序是否正确, 再考虑该项目是否具有人群生物特性, 进行下一步的调查, 重新建立生物参考区间^[6]。

2 结 果

2.1 参考人群的选择 参照排除标准后, 收录符合本研究要求的共 1 250 例健康者, 年龄 18~88 岁。其中男 588 例, 平均年龄 (43±19) 岁; 女 662 例, 平均年龄 (40±17) 岁。

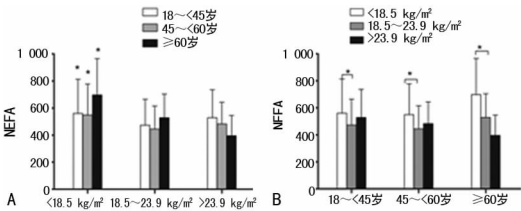
2.2 参与检验中心的标准化 空白及校准物质 OD 值分别为 0.000 005±0.001 与 0.215 7±0.001 176, 校准曲线校准系数为 0.976。高、低浓度质控品均值及标准差分别为 804.47±29.17、340.54±9.40, 均在控, 确认检测系统性能及检测程序正确。

2.3 NEFA 离群值的识别及处理 经对数转换后, 计算两端离群值截点 $\bar{x}+3s$ 及 $\bar{x}-3s$ 再经反对数转换后分别是 1 475.7 及 135.2。发现 2 例数据超出该范围, 分别为标本 BZ022 及 BZ196, NEFA 测定值分别为 131.2、133.9, 核对原始记录, 无录入错误, 剔除该 2 例数据后 NEFA 平均水平无变化, 因此保留该 2 例数据。由此共收录 1 250 例健康体检者。

2.4 1 250 例健康者的 NEFA 水平 经 K-S 法检验, $P<0.01$, NEFA 水平为偏态分布, 经对数转换后 $P=0.2$, 符合正态分布。参考人群分别按性别、年龄及 BMI 分组, 经比较男、女间 NEFA 平均水平差异无统计学意义 ($P=0.125$); 年龄分组差异有统计学意义 ($P=0.001$), ≥ 60 岁组最高, 18~<45 岁组次之, 45~<60 岁组最低, ≥ 60 岁组与 18~<45 岁组及 45~<60 岁组差异均有统计学意义 ($P=0.002$), 18~<45 岁组较 45~<60 岁组高 ($P<0.01$); BMI 分组中, BMI<18.5 kg/m² 组较 18.5~23.9 kg/m² 组高 ($P<0.01$), 但与大于 23.9 kg/m² 组比较差异无统计学意义 ($P=0.263$), 18.5~23.9 kg/m² 组与大于 23.9 kg/m² 组差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 2。

表 2 1 250 例健康者 NEFA 水平[M(P_{25} , P_{75}), $\mu\text{mol/L}$]			
类别		<i>n</i>	NEFA
性别	男	588	498.5(368.7, 655.4)
	女	662	475.1(356.9, 651.3)
年龄	18~<45 岁	722	494.1(364.4, 671.7)
	45~<60 岁	278	427.8(318.5, 557.7)
	≥ 60 岁	250	563.5(423.2, 705.3)
BMI	<18.5 kg/m ²	170	531.5(403.2, 681)
	18.5~23.9 kg/m ²	1 013	436.0(327.6, 574)
	>23.9 kg/m ²	67	484.5(396.5, 598.3)
合计		1 250	489.9(363.1, 655)

2.5 NEFA 水平与临床指标回归分析 经多变量线性逐步回归分析, BMI 及年龄对 NEFA 有显著影响 ($P<0.01$)。图 1A 为不同年龄段各 BMI 亚组的 NEFA 水平比较, 可见各 BMI 组的 NEFA 水平随年龄增加先降低后升高的趋势, 并且不同年龄段 BMI<18.5 kg/m² 组均较 18.5~23.9 kg/m² 组高 ($P=0.02, 0.019, 0.049$), 其他组间差异无统计学意义 ($P>0.05$)。图 1B 为不同 BMI 各年龄组的 NEFA 水平比较, 可见各年龄组的 NEFA 水平随 BMI 增加而先降低后升高的趋势, 同样可见不同年龄组 BMI<18.5 kg/m² 组均较 18.5~23.9 kg/m² 组高, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 其他组间差异无统计学意义 ($P>0.05$)。



注: A 为不同年龄组 BMI 亚组的 NEFA 水平, B 为不同 BMI 组年龄亚组的 NEFA 水平。

图 1 不同年龄及 BMI 组的 NEFA 水平

2.6 估计武汉地区人群 NEFA 95% 参考区间 武汉地区人群 NEFA 95% 参考区间为 204.6~975.2 $\mu\text{mol/L}$ 。不同年龄组 NEFA 区间: 18~<45 岁参考区间为 206.6~1 011.5 $\mu\text{mol/L}$, 45~<60 岁为 198.9~914.6 $\mu\text{mol/L}$, ≥ 60 岁为 250.2~1 051.1 $\mu\text{mol/L}$ 。

2.7 NEFA 95% 参考区间的验证 按年龄分组, 每组共选取参考个体 20 例, 男女均为 10 例。60 例临床验证者 NEFA 检测范围为 242.0~831.2 $\mu\text{mol/L}$, 检测范围未超出估计参考区间 204.6~975.2 $\mu\text{mol/L}$ 。18~<45 岁组 NEFA 检测范围为 242.0~749.8 $\mu\text{mol/L}$, 45~<60 岁组检测范围为 227.5~765.1 $\mu\text{mol/L}$, ≥ 60 岁组的检测范围为 268.6~831.2 $\mu\text{mol/L}$, 均属于各自的参考区间, 因此确认本研究建立的参考区间具有临床适用性。

3 讨 论

本研究使用日本积水医疗株式会社研制的酶法试剂, 该法具有良好精密度、高特异性、可直接用于自动生化分析仪等优点。使用该法检测 1 250 例健康成人血清 NEFA 水平, 初步建立武汉市健康人群 NEFA 酶法参考区间。

采用美国临床实验室标准化协会推荐的 C28-A2 文件中提供的有关临床实验室如何确定和建立生物参考区间的方法^[5]。在选择参考人群方面, 本研究排除可能影响 NEFA 水平的各类疾病, 严格控制入选人群标准。另外, 严格控制血清 NEFA 分析前质量控制, 血清保存于 -80℃ 冰箱中, 检测前平衡至室温并保持 15 min, 3 个月内完成检测。有研究显示存放时间过长, 血浆中 NEFA 水平明显升高。在统计分析数据排除离群值方面, 本研究采用经对数转换后符合正态分布的方法, 超出 $\bar{x}\pm 3s$ 即是离群值, 发现有 2 例超出该范围。根据美国临床实验室标准化协会认为没有一种适当的方法可以判断极限值, 简单的根据数据分布位置而判断极限值并非是一个好方法, 因此推荐采用保守原则, 本文未删除任何数据。

血清 NEFA 与饮食习惯、年龄、性别及种族密切相关, 本研究对象均为黄种人, 饮食习惯未知, 根据性别及年龄进行分组统计分析, 以确定是否需要建立不同组别的参考区间。多元

线性回归分析 BMI 及年龄对 NEFA 水平有显著影响,可根据此两类因素估计独立参考区间,考虑临床方便应用,本研究采用年龄分组估计独立参考区间。BMI 是反映人体质量与身高的关系,是判断人体胖瘦程度的一项重要指标,在筛查肥胖、超重等方面亦得到公认。根据《中华人民共和国卫生行业标准》对中国成人质量判定,将参考人群分为不同 BMI 组,分别为体质量过低组、体质量正常组及体质量超重或肥胖组。本研究发现各个年龄组中随 BMI 增加,NEFA 水平由高降低后轻度升高,体质量正常者水平最低。可见 NEFA 与 BMI 密切相关。据国内外有关 BMI 与心血管疾病的研究发现,BMI 与心血管病病死率负相关^[7]。肥胖也是导致心血管疾病重要危险因素,也是代谢综合征的主要表现及重要致病因素。在低 BMI 亚裔老年人中发现,低 BMI 同样加重了高水平血清脂联素致心血管病病死率,是新理论“脂联素悖论”的新研究结果之一^[8]。本课题研究也发现低 BMI 者 NEFA 水平高。NEFA 在心血管疾病的危险分层中作用尚不明朗,有较多争议,且在急性心肌梗死及急性冠脉综合征致病机理亦未知,但众多科研人员在大宗著名的流行病学调查中发现健康成人随访 22 年后,基础 NEFA 水平高者发生心源性猝死率升高^[9]。诸多证据间接解释了 NEFA 与 BMI 的密切关系,高或低 BMI 及高水平 NEFA 在心血管疾病中均有发病作用,是心血管疾病的危险因素。

经统计分析,年龄分组的 NEFA 水平显著不同,≥60 岁组最高,18~<45 岁组次之,45~<60 岁组最低,年龄为影响 NEFA 水平的因素之一。NEFA 平均水平为(528.8±229.3) μmol/L,与国内某些研究水平不同,李义龙等^[10]评估 296 例健康者水平后设置参考区间 96~740 μmol/L 与本研究相较,低值、高值均较低,范围较窄,本研究与冯明等^[11]研究比较水平类似。分析各类研究水平不同原因,考虑主要原因为个体间生物学变异导致,Widjaja 等^[12]报道血清 NEFA 的个体间生物学变异可达 45%,且分析前变异如样品采集时间、采集部位、空腹时间、饮食运动状态至标本离心、标本保存条件等不同均可影响 NEFA 水平。另外,上述研究例数较少,必要的标本例数决定了参考限的精度,标本例数较少可以导致参考限精度降低,国际临床化学和实验室医学联盟推荐每组 400 例标本^[13],分组越多,需要的标本数量越大。本研究标本量较大,降低了因标本量因素造成的评估偏移。本文检测 60 例健康者血清 NEFA 得出验证范围为 242.0~831.2 μmol/L,落在本研究估计参考区间内,但较估计参考区间“窄”,且较厂家提供的参考区间 129~769 μmol/L 水平略高。是否继续使用厂家提供或本文估计范围,仍需临床科室协助观察,建议半年后再一次进行验证,如验证范围与本次相似或临床发现有不适用的支持信息,实验室须自建 NEFA 生物参考区间^[6]。

美国国家胆固醇教育计划研究表明,基于有高冠心病风险的健康人群建立的血清总胆固醇水平参考区间,可能出现体检者血清胆固醇水平远低于此参考区间上限,但其发展为不成熟冠心病的风险仍比一般人群高。因此,推荐建立血清胆固醇参考区间的人群应该选为冠心病发生率低地区的人群及发生率高的低风险人群。本研究采用的参考人群为武汉地区表面健康人群,心血管疾病发生风险未知,按国际临床化学协会剔除的建立参考区间的方法要求严格、程序复杂,自行制订存在客观难度,NEFA 生物参考区间的建立仍需定期召开评审会议并咨询临床意见,在一定程度上保证 NEFA 参考区间的适用性。

参考文献

- [1] Bauer J, Ripberger A, Frantz S, et al. Pathophysiology of isoprostanes in the cardiovascular system; implications of isoprostane-mediated thromboxane A₂receptor activation [J]. Br J Pharmacol, 2014, 171(13): 3115-3131.
- [2] Wang Q, Imamura F, Lemaitre RN, et al. Plasma phospholipid trans-fatty acids levels, cardiovascular diseases, and total mortality: the cardiovascular health study [J]. J Am Heart Assoc, 2014, 3(4): e000914.
- [3] Bigornia SJ, Lichtenstein AH, Harris WS, et al. Associations of erythrocyte fatty acid patterns with insulin resistance [J]. Am J Clin Nutr, 2016, 103(3): 902-909.
- [4] Rhee Y, Paik MJ, Kim KR, et al. Plasma free fatty acid level patterns according to cardiovascular risk status in postmenopausal women [J]. Clin Chim Acta, 2008, 392(1/2): 11-16.
- [5] National Committee for Clinical Laboratory Standards. C28-A2 How to define and determine reference intervals in the clinical laboratory [S]. Wayne, PA, USA: NCCLS, 2000.
- [6] 陈桂山, 杨有业, 温冬梅, 等. 临床生化检验项目生物参考区间适用性验证探讨 [J]. 中华检验医学杂志, 2008, 31(2): 170-174.
- [7] Sobiczewski W, Wirtwein M, Jarosz D, et al. Superiority of waist circumference and body mass index in cardiovascular risk assessment in hypertensive patients with coronary heart disease [J]. Blood Press, 2015, 24(2): 90-95.
- [8] Choi SH, Ku EJ, Hong ES, et al. High serum adiponectin concentration and low body mass index are significantly associated with increased all-cause and cardiovascular mortality in an elderly cohort, “adiponectin paradox”: The Korean Longitudinal Study on Health and Aging (KLoSHA) [J]. Int J Cardiol, 2015, 183(1): 91-97.
- [9] Huber AH, Kampf JP, Kwan T, et al. Usefulness of serum unbound free fatty acid levels to predict death early in patients with ST-segment elevation myocardial infarction (from the Thrombolysis In Myocardial Infarction [TIMI] II trial) [J]. Am J Cardiol, 2014, 113(2): 279-284.
- [10] 李义龙, 王萌, 唐志毅, 等. 酶法测定血清游离脂肪酸的方法学评价及临床应用 [J]. 中国实验诊断学, 2011, 15(6): 1099-1101.
- [11] 冯明, 邓洪容. 2 型糖尿病患者血清游离脂肪酸与心血管自主神经病变相关性的研究 [J]. 中国糖尿病杂志, 2013, 21(4): 299-301.
- [12] Widjaja A, Morris RJ, Levy JC, et al. Within-and between-subject variation in commonly measured anthropometric and biochemical variables [J]. Clin Chem, 1999, 45(4): 561-566.
- [13] Ichihara K, Boyd JC. An appraisal of statistical procedures used in derivation of reference intervals [J]. Clin Chem Lab Med, 2010, 48(11): 1537-1551.