

• 综 述 •

液相色谱-串联质谱法检测类固醇激素在 CAH 筛查中的应用进展

金陈飞, 崔梦竹, 梁红艳, 姜晓峰[△]

哈尔滨医科大学附属第四医院检验科, 黑龙江哈尔滨 150028

摘 要:准确测定先天性肾上腺皮质增生症(CAH)患者体内的各激素水平一直是困扰检验工作人员的难题。液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)是目前公认的具有较大应用潜力的检测方法。本文从 CAH 患者的类固醇激素代谢情况, LC-MS/MS 检测类固醇激素的方法学建立要点及 LC-MS/MS 用于 CAH 诊治的研究现状进行综述, 明确了 LC-MS/MS 有避免非特异性物质干扰, 解决免疫分析法的高假阳性, 检测标本多样化及能够快速进行类固醇代谢谱分析的优点, 是一种能够为临床内分泌疾病的诊断与疗效监测提供精准、高效的检测手段。同时本文也对此检测技术的不足进行了阐述。

关键词:液相色谱-串联质谱法; 免疫分析法; 先天性肾上腺皮质增生症; 类固醇激素

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2021.07.027

中图法分类号:R586.9

文章编号:1673-4130(2021)07-0881-06

文献标志码:A

Advances in the application of liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the detection of steroid hormones in CAH screening

JIN Chenfei, CUI Mengzhu, LIANG Hongyan, JIANG Xiaofeng[△]

Department of Clinical Laboratory, the Fourth Affiliated Hospital of Harbin Medical University,
Harbin, Heilongjiang 150028, China

Abstract: Accurate determination of the levels of various hormones in patients with congenital adrenal hyperplasia (CAH) has always been an important issue that plagues laboratory workers. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) is currently recognized as a detection method with great application potential. This article reviews the steroid hormone metabolism of patients with CAH, LC-MS/MS methodological establishment points for steroid hormone detection, and the current research status of LC-MS/MS in the diagnosis and treatment of CAH. It is clear that LC-MS/MS has the advantages of avoiding non-specificity. The advantages of substance interference, resolution of high false positives of immunoassays, diversification of test samples, and rapid analysis of steroid metabolism profiles are a kind of accurate and efficient detection methods that can provide accurate and efficient detection methods for clinical endocrine disease diagnosis and efficacy monitoring. At the same time, this article also elaborated on the shortcomings of this detection technology.

Key words: liquid chromatography-tandem mass spectrometry; immunoassay; congenital adrenal hyperplasia; steroid hormones

先天性肾上腺皮质增生症(CAH)是一组由于类固醇激素合成代谢中某种酶缺乏导致皮质醇合成障碍为主要特征的常染色体隐性遗传病,会导致肾上腺皮质生成类固醇激素的水平发生改变,并且根据疾病分型不同,激素水平变化有明显差异。

类固醇激素又称为甾体激素,是胆固醇经一系列酶催化而来的高效能物质,主要分为肾上腺皮质激素、性激素和维生素 D。各种类固醇激素在体内水平极低,一般检测水平在 nmol/L 或 pmol/L 数量级,因

此寻找一种可靠、特异的分析方法成为临床疾病诊断的首要任务。

目前类固醇激素的检测手段主要包括放射免疫分析技术、化学发光免疫分析技术、酶联免疫吸附测定、气相色谱质谱分析法、液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)等^[1-2]。免疫分析法具备操作简单、快速的优点,然而 RAUH^[3]研究显示,免疫分析法灵敏度较低,易引起交叉反应造成假阳性,无法同时检测同一标本中的多种激素水平,无法实现类固醇代谢谱的高

[△] 通信作者, E-mail: jiangxiaofeng12359@163.com。

效、深入、准确的研究。WILSON 等^[4]研究表明,孕酮测定受不同类固醇(包括 17 α -羟孕酮、11-去氧皮质酮、20-二酮)所引发的高达 10% 的交叉反应影响,导致免疫检测结果偏高。而 LC-MS/MS 凭借高通量、灵敏度高、特异度高、检测标本多样、检测动态范围宽等优势在 CAH 临床诊断中的地位越来越重要^[5]。

1 CAH 类固醇激素代谢通路及主要的 CAH 分类

CAH 是肾上腺皮质功能减退较常见的原因之一。根据酶缺乏将 CAH 分为 7 型,具体各型详见表 1,不同酶缺陷时呈现不同的生化和临床表现。肾上腺皮质类固醇激素合成代谢途径见图 1。

表 1 常见临床 CAH 分型

CAH 分型	占比	基因	分类	升高的激素	降低的激素	临床表现	参考文献
21-羟化酶缺乏症(21-OHD)	近 95%	CYP21A2	失盐型、单纯男性化型、非经典型	17-羟孕酮、孕酮、雄烯二酮、睾酮、脱氢表雄酮	醛固酮、11-脱氧皮质醇、皮质醇	失盐型:新生儿期肾上腺危象,表现为喂养困难、发育不良、呕吐、脱水、高钾血症、低钠血症、代谢性酸中毒 单纯男性化型:女性外生殖器的男性化、假性早熟、身高增加、骨龄超前 非经典型:女性患者在出生时生殖器正常或轻度男性化、男性和女性患者在青春期前晚期出现耻骨和肾上腺早熟	[6]
11 β -羟化酶缺乏症(11 β -OHD)	约 5%~8%	CYP11B1	经典型、非经典型	17-羟孕酮、孕酮、11-脱氧皮质醇、11-去氧皮质酮、雄烯二酮、睾酮、脱氢表雄酮、促肾上腺皮质激素	皮质醇、皮质酮、醛固酮	经典型:女性严重男性化、两性性早熟、生长加速和骨骼成熟、高血压、低钾血症 非经典型:轻度多毛和月经不调	[7]
3 β -羟类固醇脱氢酶 2 型缺乏症(3 β HSD2D)	低于 0.5%	HSD3B2	失盐型、男性不完全男性化型、女性男性化型、非经典型	脱氢表雄酮、促肾上腺皮质激素、肾素、 Δ 5-类固醇与 Δ 4-类固醇的比值、 Δ 5-17-羟基孕烯醇酮	皮质醇、醛固酮、雄烯二酮、17-羟孕酮、孕酮、睾酮	失盐型:低钠血症、高钾血症、代谢性酸中毒和低血糖 男性不完全男性化型:尿道和阴囊唇皱褶的融合、严重的尿道下裂、小阴茎、阴囊裂和隐睾 女性男性化型:阴蒂增大、唇融合不完全、生殖器色素沉着 非经典型:儿童阴毛发育过早、女性多毛及月经不调	[8]
17 α -羟化酶缺乏症(17 α -OHD)	1%	CYP17A1	—	醛固酮、皮质酮、促肾上腺皮质激素	皮质醇、雌二醇、睾酮	高血压、低钾血症、男性假两性畸形和女性性腺发育不良、缺乏青春期	[9]
侧链裂解酶缺乏症(SCC)	—	CYP11A1	经典型、非经典型	肾素	—	经典型:表型女性,新生儿失盐 非经典型:肾上腺功能不全,生殖器和性腺功能变化	[10]
细胞色素 P450 氧化还原酶缺乏症(PORD)	—	POR	—	孕烯醇酮、孕酮、17-羟孕酮、21-脱氧皮质醇、皮质酮、11-去氧皮质酮	睾酮、二氢睾酮	生殖器发育不全、骨骼畸形、少或闭经、不孕、先天性男性化	[11]
先天性脂肪样肾上腺增生症(CLAH)	—	StAR	经典型、非经典型	肾素	—	经典型:表型女性,新生儿失盐 非经典型:肾上腺功能不全,生殖器和性腺功能变化	[10]

注:—为该项无数据。

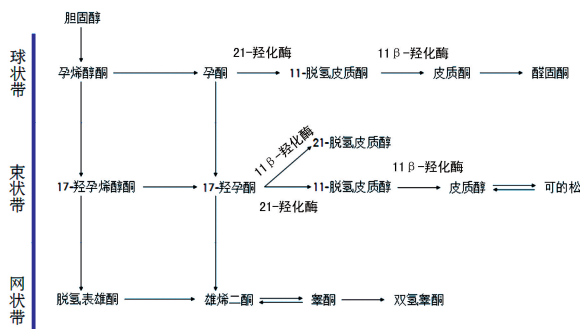


图 1 肾上腺皮质类固醇激素合成代谢途径

21-OHD 是 CAH 中最常见的类型,临床可分为 3 型,分别为失盐型、单纯男性化型及非经典型。在肾上腺皮质类固醇激素合成代谢途径中,21-羟化酶催化 17-羟孕酮转化为 11-脱氧皮质醇和催化孕酮转化为 11-去氧皮质酮,两者分别为皮质醇和醛固酮的前体。因此,CAH 患者类型为 21-OHD 时皮质醇和醛固酮有不同程度的合成不足或完全缺乏,同时上游底物(17-羟孕酮和孕酮)水平因堆积而明显升高,因此,17-羟孕酮水平显著升高成为诊断 21-OHD 最有意义的指标,临床通常根据 17-羟孕酮水平的改变评估治疗效果。因此,17-羟孕酮已被大多数国家纳入新生儿筛查项目,这有助于快速检测出 21-OHD 患儿。然而该项检查受到较多因素干扰造成检测结果假阳性高。由于脐带血中 17-羟孕酮水平很高,所以新生儿在出生 1~2 d 内 17-羟孕酮往往高于临界值,并逐渐下降。此外,早产儿和许多因其他疾病引起生理应激的足月婴儿中,17-羟孕酮水平往往比实际水平高,筛查测试的阳性预测值在早产儿中仅为 0.4%,而在足月儿中为 30.1%^[12-13],因此建议对所有 17-羟孕酮水平升高的新生儿在 1 个月后进行第 2 次 LC-MS/MS 筛查。

11β-OHD 的主要生化异常为低血钾,但是严重度因基因突变类型而异,甚至可出现血钾正常的情况。其他生化指标变化体现在血 17-羟孕酮、雄烯二酮、脱氢表雄酮水平升高,血清皮质醇、醛固酮水平降低,血肾素活性减低。此外,该症的特征性指标是血和

尿 11-脱氧皮质醇和去氧皮质酮水平升高,尿中二者的主要代谢产物四氢 11-脱氧皮质醇及四氢去氧皮质酮水平升高,这是与 21-OHD 进行鉴别的关键指标。

2 LC-MS/MS 法检测类固醇激素方法学的建立

目前检测类固醇激素的生物标本主要有血清、血浆、毛发^[14]、尿液^[15]、唾液^[16]、子宫内膜^[17]等。在方法开发建立的过程中可通过以下几个步骤提高检测性能。(1)标本处理:良好的标本前处理方法可以起到富集目标组分、消除或降低基质干扰、提高灵敏度的作用,反之则会容易引入误差并延长分析时间。目前血液中类固醇激素的前处理方法有蛋白质沉淀、液液萃取和固相萃取,而多种前处理方法相结合具有低基质效应、回收率高、灵敏度高、自动及快速等优点,已逐渐受到临床关注^[18]。(2)检测过程:要针对检测项目的特点选择合适的色谱柱、流动相流速、离子源和质量分析器,类固醇激素检测通常与三重四级杆质量分析器或三重四级杆串联线性离子阱质量分析器串联,采用电喷雾离子源或大气压化学电离源,并利用多反应监测模式对靶向代谢组进行分析,按离子质荷比的大小顺序进行收集和记录,进而得到质谱图用于结果分析。为了避免内源性或外源性基质物质的干扰,降低待测物信号的损失和信号波动,可在同一批分析中的所有标本中加入等体积的内标液,绝大部分待测物的信号波动和量的损失都可以得到校正。内标通常分为 2 型,即结构类似物内标和同位素标记内标,在类固醇激素检测时常常选择同位素标记内标^[19]。新生儿筛查 CAH 时常常检测的激素与相应内标检测信息见表 2。同时为确保准确度及批间或批内精密度,每次测量时均应准备质控品。(3)数据处理:合理的分析方式能为实验研究提供更加精准的结果,保证结果的可靠性。质谱数据处理一般采用质谱仪对应的数据处理软件,用空白提取液配制标准品做标准曲线,有效排除干扰因素,可以保证高通量、高准确性的数据处理。

表 2 新生儿筛查 CAH 时常检测的激素与相应内标

激素/内标名称	分子式	相对分子质量(×10 ³)	离子模式	Q1	Q3	前处理方式	提取试剂	是否衍生化/衍生化试剂	参考文献
孕酮	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	314.46	ESI(+)	315.2	97.1	蛋白质沉淀+液液萃取+衍生化	乙腈+甲基叔丁基醚	是/异烟酸酰氯+二氯甲烷	[20]
孕酮-d9	C ₂₁ D ₃ H ₂₁ O ₂	323.52	ESI(+)	324.1	100.1	蛋白质沉淀+液液萃取+衍生化	乙腈+甲基叔丁基醚	是/异烟酸酰氯+二氯甲烷	[20]
17α-羟孕酮	C ₂₁ H ₃₀ O ₃	330.46	ESI(+)	331.4	97.1	固相萃取	乙腈+水	否	[21]
17α-羟孕酮-d8	C ₂₁ H ₂₂ O ₃ D ₈	338.51	ESI(+)	339.4	100.1	固相萃取	乙腈+水	否	[21]
雌酮	C ₁₈ H ₂₂ O ₂	270.37	ESI(+)	270.4	171.1	液液萃取	1-氯丁烷	否	[22]
雌酮-d4	C ₁₈ D ₄ H ₁₈ O ₂	274.39	ESI(+)	274.4	171.1	液液萃取	1-氯丁烷	否	[22]

续表 2 新生儿筛查 CAH 时常检测的激素与相应内标

激素/内标名称	分子式	相对分子质量($\times 10^3$)	离子模式	Q1	Q3	前处理方式	提取试剂	是否衍生化/衍生化试剂	参考文献
脱氢表雄酮	C ₁₉ H ₂₈ O ₂	288.42	APCI(+)	394.3	124.0	蛋白沉淀+液液萃取+固相萃取	乙腈+甲醇	否	[23]
脱氢表雄酮-d6	C ₁₉ D ₆ H ₂₂ O ₂	294.46	APCI(+)	400.3	124.0	蛋白沉淀+液液萃取+固相萃取	乙腈+甲醇	否	[23]
皮质醇	C ₂₁ H ₃₀ O ₅	362.47	ESI(+)	363.3	121.1	蛋白质沉淀+固相萃取	丙酮+乙腈+甲酸+甲醇	否	[24]
皮质醇-d4	C ₂₁ H ₂₆ D ₄ O ₅	366.48	ESI(+)	365.3	121.1	蛋白质沉淀+固相萃取	丙酮+乙腈+甲酸+甲醇	否	[24]
醛固酮	C ₂₁ H ₂₈ O ₅	360.44	ESI(+)	474.3	415.2	固相支持液液萃取	乙腈+甲酸	否	[25]
醛固酮-d7	C ₂₁ D ₇ H ₂₁ O ₅	367.49	ESI(+)	482.4	423.2	固相支持液液萃取	乙腈+甲酸	否	[25]

注:Q1 为前体离子;Q3 为产物离子。

为了确保检测结果准确可靠,需要对检测方法进行性能评估,主要包括检测下限与定量下限、精准度、线性关系、选择性、稳定性、准确度、表观回收率、基质效应等。TRAVERS 等^[26]建立了 LC-MS/MS 检测血清中 15 种类固醇激素的方法,采用蛋白质沉淀和固相萃取相结合的方法提取血清甾体化合物和氧化内标物,回收率从 21-脱氧皮质醇的 64%到皮质醇的 101%不等,并与免疫分析法比较,2 种方法检测皮质醇,脱氢表雄激素和睾酮的结果较一致,免疫分析法检测醛固酮数值偏低,孕酮水平低于 2 ng/mL 的 17-羟孕酮、雄烯二酮和 11-脱氧皮质醇水平明显偏高。分析这种差异产生的原因:(1)免疫分析法抗体特异性低导致的交叉反应,例如来自胎儿肾上腺区的类固醇单硫酸盐,主要是 17-羟基孕烯醇酮硫酸盐导致免疫测定中 17-羟孕酮水平错误升高^[27];(2)LC-MS/MS 在提取过程中加入了内标液,可以有效提升检测特异性。

3 LC-MS/MS 在 CAH 诊断中的应用现状

新生儿筛查目的在于在症状出现之前尽早发现并准确诊断 CAH 等先天性疾病,而通常所用的免疫分析法(一级筛查)常常出现假阳性,增加了患者的心理负担和经济压力。2018 年由美国内分泌学会专家组发布的 21-OHD 临床实践指南(第二版)与 2010 年发布的第一版指南比较,新增新生儿筛查时推荐一级筛查采用常规方法检测 17-羟孕酮,并推荐了优先采用 LC-MS/MS 进行二级筛查,不推荐其他方法(如基因分型),以此提高 CAH 筛查的阳性预测值^[28-29]。SCHWARZ 等^[30]发现 CAH 患病率和血清 17-羟孕酮水平随着新生儿体质量增加而降低,皮质醇的水平随采样时年龄不同而发生明显变化,未观察到 17-羟孕酮或雄烯二酮与年龄有明显相关性。值得注意的是雄烯二酮是较敏感的雄激素,并且其水平较 17-羟孕酮稳定,且受皮质醇替代治疗时给药间隔时间的影

响较少,也不受性别、疾病类型和抽血时间的影响,与 17-羟孕酮有较好的相关性。在这项研究中作者证实(17-羟孕酮+雄烯二酮)/皮质醇是 CAH 的最佳判别方法,但若二者比值大于 4 时需注意是否在采样之前使用了糖皮质激素类药物,避免假阴性结果的发生。

2010 年欧洲内分泌协会临床指导委员会制订的 21-OHD 临床应用指南^[28]指出经典型 CAH 患者 17-羟孕酮水平通常高于 300 nmol/L,非经典型 CAH 患者 17-羟孕酮水平在 6~300 nmol/L,当 17-OHP<6 nmol/L 时不支持 CAH 诊断。因此根据 17-羟孕酮检测水平对 CAH 疾病准确分型,进而辅助临床精准治疗具有重要意义。AMBROZIAK^[31]等证明了与 LC-MS/MS 比较,免疫分析法检测 17-羟孕酮可能会增加非经典型 CAH 假阳性诊断的风险。由此可见,LC-MS/MS 检测 17-羟孕酮在 CAH 诊断分型中具有重要意义。

目前,临床多将 17-羟孕酮水平是否升高作为新生儿筛查时判断是否患 21-OHD 的首要指标,但表 1 中其他形式的 CAH 也可能导致检测到 17-羟孕酮水平升高^[32]。由图 1 可看出 21-OHD 患者缺乏 21-羟化酶会使 17-羟孕酮的下游产物 11-脱氧皮质醇水平降低,21-脱氧皮质醇水平升高。因此,有研究者提出 21-脱氧皮质醇作为 21-OHD 的另一标志物,那么 21-脱氧皮质醇是否可以在一定程度上取代 17-羟孕酮在 21-OHD 诊断中的地位有待研究。JANZEN 等^[33]建立的 LC-MS/MS 不仅避免了免疫分析法诊断 CAH 时的假阳性高的问题,还发现可以通过计算(17-羟孕酮+21-脱氧皮质醇)/皮质醇的数值进一步提高 LC-MS/MS 的灵敏度,在 242 500 例新生儿中,1 609 例初筛试验阳性,而通过计算确定了其中已确诊的 16 例 21-OHD 患者,没有误报。由此可见,在二级筛查时可更多关注 21-脱氧皮质醇的水平变化,并且选择合适的计算公式来提高检测方法的灵敏度,这也为

CAH 的诊断提供了新思路。

4 结 论

综上所述,类固醇激素水平精准定量检测对于 CAH 的诊断和确切分型具有重要意义。LC-MS/MS 最主要的优势就是高通量、灵敏度高、特异性强、检测标本多样、检测动态范围宽等,目前有望取代免疫分析法。但由于 LC-MS/MS 标本处理操作复杂,自动化程度较低,需要操作人员进行规范化培训才可应用于临床。因此,简化标本处理操作流程、实现全自动化是目前面临的挑战,也是研究的焦点。

参考文献

- [1] RIFFLE B W, HENDERSON W M, LAWS S C. Measurement of steroids in rats after exposure to an endocrine disruptor: mass spectrometry and radioimmunoassay demonstrate similar results [J]. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2013, 68(3): 314-322.
- [2] XIN T B, CHEN H, LIN Z, et al. A secondary antibody format chemiluminescence immunoassay for the determination of estradiol in human serum[J]. *Talanta*, 2010, 82(4): 1472-1477.
- [3] RAUH M. Steroid measurement with LC-MS/MS. Application examples in pediatrics[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2010, 121(3/5): 520-527.
- [4] WILSON D H, GROSCHOPF W, HSU S, et al. Rapid, automated assay for progesterone on the Abbott AxSYM analyzer[J]. *Clin Chem*, 1998, 44(1): 86-91.
- [5] PALMIERI S, MORELLI V, POLLEDRI E, et al. The role of salivary cortisol measured by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the diagnosis of subclinical hypercortisolism[J]. *Eur J Endocrinol*, 2013, 168(3): 289-296.
- [6] HOU L, LIANG L, LIN S, et al. Analysis of phenotypes and genotypes in 84 patients with 21-hydroxylase deficiency in southern China [J]. *Steroids*, 2019, 151(1): 108474.
- [7] GU C, TAN H, YANG J, et al. Congenital adrenal hyperplasia due to 11-hydroxylase deficiency-compound heterozygous mutations of a prevalent and two novel CYP11B1 mutations[J]. *Gene*, 2017(1), 626: 89-94.
- [8] AL-ALAWI A M, NORDENSTROM A, FALHAMMAR H. Clinical perspectives in congenital adrenal hyperplasia due to 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 deficiency [J]. *Endocrine*, 2019, 63(3): 407-421.
- [9] WANG M, WANG H, ZHAO H, et al. Prevalence of CYP17A1 gene mutations in 17 α -hydroxylase deficiency in the Chinese Han population[J]. *Clin Hypertens*, 2019, 25(1): 23.
- [10] TOROK D. Congenital adrenal hyperplasia[J]. *Exp Suppl*, 2019, 111(1): 245-260.
- [11] BAI Y, LI J, WANG X. Cytochrome P450 oxidoreductase deficiency caused by R457H mutation in POR gene in

Chinese; case report and literature review[J]. *J Ovarian Res*, 2017, 10(1): 16.

- [12] COULM B, COSTE J, TARDY V, et al. Efficiency of neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency in children born in mainland France between 1996 and 2003[J]. *Arch Pediatr Adolesc Med*, 2012, 166(2): 113-120.
- [13] KAMRATH C, HARTMANN M F, Boettcher C, et al. Diagnosis of 21-hydroxylase deficiency by urinary metabolite ratios using gas chromatography-mass spectrometry analysis; reference values for neonates and infants[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2016, 156(1): 10-16.
- [14] GAUDL A, KRATZSCH J, BAE Y J, et al. Liquid chromatography quadrupole linear ion trap mass spectrometry for quantitative steroid hormone analysis in plasma, urine, saliva and hair[J]. *J Chromatogr A*, 2016, 1464(1): 64-71.
- [15] DE-VRIES L V, DE-JONG W H A, TOUW D J, et al. Twenty-four hour urinary cortisol excretion and the metabolic syndrome in prednisolone-treated renal transplant recipients[J]. *Steroids*, 2017, 127(1): 31-39.
- [16] LI X S, LI S, KELLERMANN G. Simultaneous determination of three estrogens in human saliva without derivatization or liquid-liquid extraction for routine testing via miniaturized solid phase extraction with LC-MS/MS detection[J]. *Talanta*, 2018, 178(1): 464-472.
- [17] HAKKINEN M R, HEINOSALO T, SAARINEN N, et al. Analysis by LC-MS/MS of endogenous steroids from human serum, plasma, endometrium and endometriotic tissue[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2018, 152(1): 165-172.
- [18] DUAN X, ABUQAYYAS L, DAI L, et al. High-throughput method development for sensitive, accurate, and reproducible quantification of therapeutic monoclonal antibodies in tissues using orthogonal array optimization and nano liquid chromatography/selected reaction monitoring mass spectrometry [J]. *Anal Chem*, 2012, 84(10): 4373-4382.
- [19] VASICEK L A, SPELLMANN D S, HSIEH S, et al. Quantitation of a therapeutic antibody in serum using intact sequential affinity capture, trypsin digestion, and LC-MS/MS[J]. *Anal Chem*, 2018, 90(1): 866-871.
- [20] YUAN T F, LE J, WANG S T, et al. An LC/MS/MS method for analyzing the steroid metabolome with high accuracy and from small serum samples[J]. *J Lipid Res*, 2020, 61(4): 580-586.
- [21] BOELEN A, RUITER A F, CLAAHSEN-VAN L, et al. Determination of a steroid profile in heel prick blood using LC-MS/MS[J]. *Bioanalysis*, 2016, 8(5): 375-384.
- [22] KE Y, BERTIN J, GONTHIER R, et al. A sensitive, simple and robust LC-MS/MS method for the simultaneous quantification of seven androgen- and estrogen-related steroids in postmenopausal serum[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2014, 144(1): 523-534. (下转第 894 页)

els and elevated frequency of hyperlipidemia, chronic renal failure and heart failure[J]. *Mol Genet Metab*, 2020, 129 (2):137-138.

[9] GUAN Y, HE Y X. Effect of advanced care on psychological condition in patients with chronic renal failure undergoing hemodialysis: a protocol of a systematic review[J]. *Med*, 2019, 98(10):e14738.

[10] SCHARDONG J, BRITO V B, DIPP T, et al. Intradialytic neuromuscular electrical stimulation reduces DNA damage in chronic kidney failure patients: a randomized controlled trial[J]. *Biomarkers*, 2018, 23(8):495-501.

[11] 张洪源, 林小堃. 高通量血液透析联合尿毒清对老年终末期肾病患者细胞免疫的影响[J]. *实用医学杂志*, 2018, 34 (2):273-276.

[12] 薛云丽. 糖尿病肾病维持性血液透析患者营养状况分析及饮食护理效果评价[J]. *护士进修杂志*, 2014, 29 (8): 760-761.

[13] 钊丽波, 王丹, 樊楚明, 等. 前列地尔对老年脓毒症急性肾损伤患者尿 NGAL、L-FABP、KIM-1 水平的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2019, 39(6):1389-1391.

[14] 张立波, 范红兵, 栾琳, 等. 老年慢性肾衰竭发病机制及防治研究进展[J]. *人民军医*, 2018, 61(8):752-755.

[15] 邱建华. 高通量血液透析与低通量血液透析对慢性肾衰竭尿毒症患者透析效果的临床比较[J]. *临床医药实践*, 2016, 25(6):470-472.

[16] 顾荣君. 前列地尔治疗慢性肾衰竭的作用机制及疗效分析[J]. *淮海医药*, 2018, 36(6):88-89.

[17] BAGAVANT H, DESHMUKH U S, WANG H, et al. Role for nephritogenic T cells in lupus glomerulonephritis: progression to renal failure is accompanied by T Cell activation and expansion in regional lymph nodes[J]. *J Immunol*, 2006, 177(11):8258-8265.

[18] MORENO J A, IZQUIERDO M C, SANCHEZ-NINO M D, et al. The inflammatory cytokines TWEAK and TNF α reduce renal klotho expression through NF κ B[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2011, 22(7):1315-1325.

[19] SARAH F, ELI C L, LEONID R. Cisplatin-Induced acute renal failure is associated with an increase in the cytokines interleukin (IL)-1 β , IL-18, IL-6, and neutrophil infiltration in the kidney[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2007, 322(1):8-15.

[20] 顾晶, 张辉. 高通量血液透析联合前列地尔治疗慢性肾衰竭的临床效果[J]. *实用临床医药杂志*, 2019, 23(1):91-94.

[21] 郑鑫, 陈熠, 邓跃毅. 慢性肾衰竭 CKD 3~4 期患者与体内免疫细胞的关系[J]. *国际泌尿系统杂志*, 2019, 39(5):885-888.

[22] 董海芸, 杨艳燕, 韩芳, 等. 百令胶囊联合前列地尔对老年糖尿病肾病病人免疫指标及临床疗效的影响[J]. *实用老年医学*, 2019, 33(3):285-287.

(收稿日期:2020-08-10 修回日期:2020-12-17)

(上接第 885 页)

[23] SØEBORG T, FREDERIKSEN H, FRUEKILDE P, et al. Serum concentrations of DHEA, DHEAS, 17 α -hydroxyprogesterone, Δ 4-androstenedione and testosterone in children determined by TurboFlow-LC-MS/MS[J]. *Clin Chim Acta*, 2013, 419(1):95-101.

[24] JANZEN N, SANDER S, TERHARDT M, et al. Fast and direct quantification of adrenal steroids by tandem mass spectrometry in serum and dried blood spots[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2008, 861(1):117-122.

[25] FONG B M, SIU T S, TAM S. Measurement of serum aldosterone in picomolar level by LC-MS/MS using charge-tagged technique[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2015, 407(25):7765-7774.

[26] TRAVERS S, MARTINERIE L, BOUVATTIER C, et al. Multiplexed steroid profiling of gluco- and mineralocorticoids pathways using a liquid chromatography tandem mass spectrometry method[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2017, 165(Pt B):202-211.

[27] RAUH M, GRÖSCHL M, RASCHER W, et al. Automated, fast and sensitive quantification of 17 α -hydroxyprogesterone, androstenedione and testosterone by tandem mass spectrometry with on-line extraction[J]. *Steroids*, 2006, 71(6):450-458.

[28] SPEISER P W, AZZIZ R, BASKIN L S, et al. Congenital adrenal hyperplasia due to steroid 21-hydroxylase deficiency: an endocrine society clinical practice guideline[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2010, 95(9):4133-4160.

[29] SPEISER P W, ARLT W, AUCHUS R J, et al. Congenital adrenal hyperplasia due to steroid 21-hydroxylase deficiency: an endocrine society clinical practice guideline[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2018, 103(11):4043-4088.

[30] SCHWARZ E, LIU A, RANDALL H, et al. Use of steroid profiling by UPLC-MS/MS as a second tier test in newborn screening for congenital adrenal hyperplasia: the utah experience[J]. *Pediatr Res*, 2009, 66(2):230-235.

[31] AMBROZIAK U, KEP CZYNSKA-NYK A, KURYLOWICZ A, et al. The diagnosis of nonclassic congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency, based on serum basal or post-ACTH stimulation 17-hydroxyprogesterone, can lead to false-positive diagnosis[J]. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2016, 84(1):23-29.

[32] MILLER W L. Congenital adrenal hyperplasia: time to replace 17OHP with 21-deoxycortisol[J]. *Horm Res Paediatr*, 2019, 91(6):416-420.

[33] JANZEN N, PETER M, SANDER S, et al. Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia: additional steroid profile using liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007, 92(7):2581-2589.

(收稿日期:2020-08-12 修回日期:2020-12-27)