

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.10.014

非酒精性脂肪性肝病患者血清维生素与抗氧化指标检测分析*

余利,冉莉,喻瑾,汪小兰,郎和东,周敏,王斌,易龙[△],糜漫天
(陆军军医大学营养与食品安全研究中心/重庆市医学营养研究中心/重庆市
营养与食品安全重点实验室,重庆400038)

[摘要] **目的** 探讨血清维生素、抗氧化指标与非酒精性脂肪肝(NAFLD)的相关性,并分析不同检测方法对同一指标检测结果的影响。**方法** 选择经超声确诊的NAFLD患者80例,检测血清维生素指标:视黄醇结合蛋白(RBP)、维生素A(VA)、维生素D(VD,ELISA法和酶供体竞争法)、维生素E(VE)和维生素B₁₂(VB₁₂);抗氧化指标:丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD,邻苯三酚底物法和WST-1法)和还原型谷胱甘肽(GSH)。**结果** 与正常参考值比较,NAFLD患者血清RBP、VA、VD、VE和SOD缺乏率分别为11.6%、38.4%、7.9%、86.0%和27.9%;NAFLD患者血清GSH水平低于健康体检者($P<0.01$)。不同检测方法分别检测血清VD和SOD发现,不同检测方法差异有统计学意义($P<0.01$)。**结论** NAFLD患者血清维生素指标VA、VE、GSH和SOD水平显著降低,以上检测指标对NAFLD的临床诊断具有重要意义。

[关键词] 肝疾病;脂肪类;非酒精性脂肪肝;临床诊断;维生素;抗氧化
[中图法分类号] R151.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2018)10-1347-04

Analysis on detection of serum vitamins and antioxidative indexes in patients with non-alcoholic fatty liver disease*
YU Li,RAN Li,YU Jin,WANG Xiaolan,LANG Hedong,ZHOU Min,WANG Bin,YI Long[△],MI Mantian
(Research Center of Nutrition and Food Safety,Army Military Medical University/Chongqing
Medical Nutrition Research Center/ Chongqing Municipal
Key Laboratory of Nutrition and Food Safety,Chongqing 400038,China)

[Abstract] **Objective** To investigate the serum levels of vitamins and antioxidative indexes as well as their correlations with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD),and to analyze the influence of different detection methods on same index detection result. **Methods** Eighty NAFLD patients diagnosed by ultrasound were chosen for detecting the indexes,including the levels of serum RBP,vitamin A (VA),vitamin D (VD,ELISA and enzyme donor competition method),vitamin E (VE),vitamin B₁₂ (VB₁₂),and antioxidative indexes,including malondialdehyde (MDA),superoxide dismutase (SOD,pyrogallol substrate method and WST-1 method) and reduced glutathione (GSH). **Results** Compared with the normal reference values,the deficiency rate of serum RBP,VA,VD,VE and SOD in NAFLD patients were 11.6%,38.4%,7.9%,86.0% and 27.9% respectively. The serum GSH level in the NAFLD group was lower than that in the healthy control group ($P<0.01$). Detecting serum VD and SOD by different detection method found that the difference among different detection methods had statistical significance ($P<0.01$). **Conclusion** The levels of serum VA,VE,GSH and SOD in NAFLD patients are significantly reduced. These detection indicators have the important significance for clinical diagnosis of NAFLD.

[Key words] liver disease;fats;nonalcoholic fatty liver disease;clinical diagnosis;vitamin;anti-oxidant

随着国民生活水平提高,生活方式和饮食结构改变,非酒精性脂肪肝(NAFLD)的发病率呈显著上升趋势,发病年龄日趋年轻化。NAFLD是以肝细胞脂肪变性和脂质蓄积为特征的临床病理综合征,后期可导致肝纤维化、肝硬化及肝功能衰竭等系列肝脏损害,并且与糖尿病、动脉粥样硬化性心血管疾病等发

生密切相关^[1]。目前,国内外NAFLD的临床诊断主要依据病理学和影像学检测,但影像学检测价格较高,病理学活检风险较大,因此,寻找敏感的血清学检测指标对于快速诊断NAFLD十分必要。NAFLD的发病机制复杂,研究表明代谢失衡、氧化应激、炎症反应等均参与NAFLD疾病病程。本研究旨在通过人

* 基金项目:国家高技术研究发展计划(863计划)课题(2014AA022301,2014AA022302)。 作者简介:余利(1986—),实验师,硕士,主要从事人群营养方面研究。 △ 通信作者,E-mail:longgyin8341@hotmail.com。

群研究,检测血清中与 NAFLD 发生密切相关的多个维生素和抗氧化指标的水平及检测指标间的相关性,同时考察不同检测方法对部分检测指标的影响,筛选发现可能作为 NAFLD 诊断的敏感血清学指标,为 NAFLD 的诊断、预防和治疗提供新的依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2014 年 9—12 月于本院体检中心体检的患者共 806 例。NAFLD 纳入标准:符合中华医学会肝病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组制订的 NAFLD 诊断标准(2010 年修订版)^[2]。排除标准:过量饮酒或肝炎病毒感染;胃肠道疾病,各种严重的慢性疾病或肝肾功能不全,恶性肿瘤;近 1 个月内曾患有急慢性感染性疾病、创伤或手术;妊娠或哺乳期妇女。最终纳入 80 例 NAFLD 患者为 NAFLD 组,其中男 60 例,女 20 例,年龄 28~68 岁,平均(46.89±9.35)岁。选取同时期体检的,与 NAFLD 患者年龄、性别相匹配的健康人群为健康对照组,均无代谢综合征表现,肝脏超声和肝功能均正常。健康对照组最终入选 80 例,其中男 62 例,女 18 例,年龄 23~68 岁,平均(45.35±11.87)岁。本研究获陆军军医大学伦理委员会批准,所有研究对象均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 检测指标及方法 采集人群血样。清晨采集受试者空腹静脉血 5~10 mL,静置 1 h,经 3 000 r/min 离心 10 min,分离取血清待测。NAFLD 患者血清维生素检测指标包括:维生素 A(vitamin A,VA,酶联免疫吸附法)、维生素 D(vitamin D,VD,分别采用酶联免疫吸附法和酶供体竞争法)、维生素 E(vitamin E,VE,比色法)和维生素 B₁₂(vitamin B₁₂,VB₁₂,酶联免疫吸附法)、血清视黄醇结合蛋白(retinol binding protein,RBP,胶乳免疫比浊法)。血清抗氧化指标包括:丙二醛(malonaldehyde,MDA,硫代巴比妥酸法)、超氧化物歧化物(superoxide dismutase,SOD,分别采用邻苯三酚底物法和 WST-1 法)、还原型谷胱甘肽(reduced glutathione,GSH,微量酶标法)。所有指标试验操作按说明书步骤进行,吸光度的测定均采用酶标仪进行检测。健康对照组检测指标为血清 MDA 和 GSH。

1.2.2 仪器与主要试剂 吸光度检测采用 Spectra-Max® M2 多功能酶标仪(Molecular Devices)进行。RBP 试剂盒购于中生北控生物科技有限公司;ELISA 试剂盒购自上海通蔚生物科技有限公司;VE、MDA、

SOD(WST-1 法)和 GSH 检测试剂盒均购自南京建成生物工程有限公司;VD(酶供体竞争法)和 SOD(邻苯三酚低物法)试剂盒购自九强生物技术有限公司。
1.3 各指标正常参考值 RBP:25~70 mg/L^[3],VA:大于 1.05 μmol/L^[4],VD(酶供体竞争法):8~60 ng/mL^[5],VE:5~20 μg/mL^[6],VB₁₂:88.8~133.2 ng/L^[7],SOD(邻苯三酚底物法):129~216 U/mL^[8]。样本值小于正常参考值则为缺乏,所占百分率为缺乏率。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行统计分析。计量资料正态分布用 $\bar{x} \pm s$ 表示,偏态分布用 $M(P_{25},P_{75})$,组间两两比较采用 SNK- q 检验;计数资料用率表示;选择组内相关系数(intra-class correlation coefficients,ICC)评价对不同检测方法进行一致性分析,检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 NAFLD 患者血清维生素与抗氧化指标检测结果 因人群血清样本采集量有限,同一血清样本不能完成所有指标的检测,因此各检测指标的实际样本数有所差异。检测结果发现:与正常参考值比较,NAFLD 患者 RBP 缺乏率为 11.6%;VA 缺乏率(缺乏+边缘缺乏)为 38.4%;VD(酶供体竞争法)缺乏率为 7.9%;VE 缺乏率高达 86.0%;SOD 缺乏率为 27.9%,VB₁₂无缺乏。NAFLD 组与健康对照组血清 MDA 水平比较差异无统计学意义($Z=0.617,P=0.539$),但 NAFLD 组血清 GSH 水平明显低于健康对照组($t=-4.681,P=0.001$),见表 1、2。

表 1 NAFLD 组血清维生素与抗氧化指标检测结果

项目	<i>n</i>	检测水平	缺乏率(%)
RBP($\bar{x} \pm s$,mg/L)	43	49.82±22.92	11.6
VD ^a ($\bar{x} \pm s$,ng/mL)	63	62.66±32.05	7.9
SOD ^b ($\bar{x} \pm s$,U/mL)	68	138.61±23.53	27.9
SOD ^c ($\bar{x} \pm s$,U/mL)	67	58.01±12.99	—
VA [$M(P_{25},P_{75})$,μmol/L]	60	1.12(0.94,1.51)	38.4
VD ^d [$M(P_{25},P_{75})$,ng/mL]	55	616.70(370.3,1 067.0)	—
VE [$M(P_{25},P_{75})$,μg/mL]	50	1.96(0.52,4.08)	86.0
VB ₁₂ [$M(P_{25},P_{75})$,ng/L]	49	502.50(458.3,696.1)	—

^a:酶供体竞争法;^b:邻苯三酚底物法;^c:WST-1 法;^d:酶联免疫吸附法;—:无数据

表 2 NAFLD 患者组与健康对照组血清抗氧化指标检测结果

项目	<i>n</i>	NAFLD 组	健康对照组	<i>t/Z</i>	<i>P</i>
MDA ($\bar{x} \pm s$,nmol/mL)	36	3.17±1.19	3.02±1.11	0.617	0.539
GSH[$M(P_{25},P_{75})$,μmol/L]	67	11.83(9.02,17.44)	19.58(13.96,31.49)	-4.681	0.001

2.2 NAFLD 患者血清学指标的不同测定方法一致性分析 采用酶联免疫法和酶供体竞争法两种方法检测血清 VD 的水平,检测值分别为 616.7(370.3, 1 067.0)ng/mL 和(62.66±32.05)ng/mL,两组检测值比较差异有统计学意义($Z=-9.341, P=0.001$),且一致性检验结果显示两种方法之间无相关性($ICC=0.000, P=0.501$)。

采用邻苯三酚底物法和 WST-1 两种方法检测血清 SOD 水平,检测值分别为(138.61±23.53)U/mL 和(58.01±12.99)U/mL,两组检测值比较差异有统计学意义($F=10.495, P=0.002$),且一致性检验结果显示两种方法之间无相关性($ICC=-0.777, P=0.987$)。

3 讨 论

目前国内外公认的 NAFLD 诊断标准主要包括 3 个方面:(1)组织学或影像学检测出肝脏脂肪变性;(2)无饮酒史或饮酒量在标准之内(每周饮酒量男性小于 140 g,女性小于 70 g);(3)排除导致脂肪肝的慢性肝病因素,如病毒性肝炎、自身免疫性肝脏疾病及代谢性或遗传性肝病等。然而,临床上对 NAFLD 患者最常见的诊断方法还是超声检测,同时结合血清生化指标(血糖、血脂和转氨酶等),但是超声检测价格较高,而单一的血清学指标并不敏感和准确。近年对 NAFLD 发病机制的研究发现,营养代谢失衡、氧化应激和炎症反应等参与 NAFLD 发生、发展,因此,是否能够将多个血清学指标特别是营养素、抗氧化指标等作为常规检测指标纳入 NAFLD 的诊断标准,以提供 NAFLD 的诊断准确率,值得研究。本研究提示,血清维生素 VA 和 VE 及抗氧化指标 SOD、GSH 在 NAFLD 患病人群中的血清水平明显降低,提示以上指标对 NAFLD 的临床诊断具有重要意义。

3.1 NAFLD 患者血清维生素指标 目前国内有关成人 VA 营养状况研究很少,有限的研究多集中于城市居民,且结果差异较大。本研究中血清 VA 水平普遍低于同类研究^[9],提示 NAFLD 患者血清 VA 较低,在其早期筛查诊断时可考虑纳入该指标。

血清 VD 水平是判断人体 VD 状态的主要依据,全球人口 VD 水平平均为 20.8 ng/mL^[10],VD 缺乏或不足在中国普通人群很常见^[11]。近年研究发现,VD 的抗炎、抗氧化及抗纤维化效应可能参与了 NAFLD 的发病及发展^[12]。但有关 VD 与 NAFLD 发生、发展的临床研究资料较少且研究结果尚存分歧,尽管存在争议,最近的一篇 Meta 分析仍显示,VD 缺乏可能在 NAFLD 的发生和进展中起一定的作用^[13]。因此,关注 NAFLD 危险人群的 VD 水平,对 NAFLD 早期预防有重要意义。

在 NAFLD 的发生过程中,肝细胞变性坏死,激

活吞噬细胞和炎症反应,引起呼吸爆发和细胞崩解而产生大量超氧阴离子自由基、羟自由基等,机体为清除过量的自由基,消耗大量 VE 等抗氧化剂,导致其水平显著降低^[14]。本研究中 NAFLD 患者血清 VE 水平低于杨燕^[15]、张岱^[16]的研究,且仅 14% 的 NAFLD 患者 VE 水平处于正常范围值。即不同程度的肝细胞病变状态下,血清 VE 水平低于健康人群。

3.2 NAFLD 患者血清抗氧化指标 本研究中 NAFLD 患者的 GSH 水平较健康对照组明显降低。GSH 是内源性抗氧化剂,是衡量机体抗氧化能力的重要因素,研究显示,在 NAFLD 患者中,反映氧化应激、脂质过氧化程度的指标 GSH、GSH/GSSG 明显降低,GSSG、MDA 明显升高,提示 NAFLD 患者存在脂质过氧化和氧化应激状态^[17]。NAFLD 患者的血清 MDA 可一定程度上反映脂质过氧化和氧化应激状态,SOD 活性作为反映抗氧化能力指标之一^[18],NAFLD 患者的 MDA 和 SOD 水平及活性状态应该纳入 NAFLD 危险人群体检的早期指标体系中。

3.3 不同检测方法的一致性 本研究采用组内相关系数(评价一致性的理想指标,它对系统误差和随机误差均敏感^[19])对两种检测方法的结果进行一致性分析。血清 VD 采用 ELISA 法和酶供体竞争法测定,组内相关系数未显示出相关性,且 ELISA 方法检测的 VD 水平远超出正常值,而酶供体竞争法检测的 VD 水平与王天宝等^[20]2013 年研究结果相比,水平基本在正常范围内;贾新转^[21]研究显示,中国北方健康人群血清总 25 羟维生素(25OHD)水平为 1.67~44.80 ng/mL,均值为(18.80±6.65)ng/mL。因此酶供体竞争法能较好地反映人体血清 VD 的水平。

经北京地区 120 例健康人群样本验证,采用邻苯三酚底物法测定 SOD 的正常参考值范围为 110~215 U/mL,本研究结果基本在正常值范围内。而采用 WST-1 法测定的 SOD 值不在该参考范围内,一致性分析显示,两种方法无相关性。因此,邻苯三酚底物法能更好地反映血清 SOD 的水平,且邻苯三酚底物法试剂盒是用于自动生化分析仪检测的,能更好地避免人工加样产生的误差,更适用于大样本的人群血清 SOD 水平检测分析。

综上,NAFLD 患者血清维生素指标 VA、VE、GSH 和 SOD 水平的改变,表明其抗氧化能力降低,可能导致肝细胞的进一步损伤。因此,由这些指标构成的指标体系可能进一步丰富 NAFLD 临床诊断标准,对 NAFLD 的临床诊断具有重要意义,同时应当选择合适的检测方法。

参考文献

[1] 李静,周利霞,王俊明,等.石家庄地区体检人群非酒精性脂肪性肝病患病情况及危险因素分析[J].第二军医大学

- 学报,2012,33(8):879-884.
- [2] 范建高. 非酒精性脂肪性肝病诊疗指南(2010 年修订版)[J]. 现代医药卫生,2011,19(5):641-644.
 - [3] 邹燕,郑春苏,罗慧屏,等. 免疫透射比浊法测定成人血清视黄醇结合蛋白的参考值建立[J]. 中国医学装备,2012,9(7):10-13.
 - [4] CASTEJON H V,ORTEGA P,AMAYA D,et al. Co-existence of anemia,vitamin A deficiency and growth retardation among children 24-84 months old in Maracaibo,Venezuela[J]. Nutr Neurosci,2004,7(2):113-119.
 - [5] STROUD M L,STILGOE S,STOTT V E,et al. Vitamin D;a review[J]. Aust Fam Physician,2008,37(12):1002.
 - [6] Institute of Medicine (US) Panel on Dietary Antioxidants and Related Compounds. Dietary reference intakes for vitamin c,vitamin e,selenium, and carotenoids[M]. Washington(DC):National Academies Press,2000:106-109.
 - [7] CHATTHANAWAREE W. Biomarkers of cobalamin (vitamin B₁₂) deficiency and its application[J]. J Nutr Health Aging,2011,15(3):227-231.
 - [8] 严海燕,劳伟思,钟日辉,等. 邻苯三酚法检测血清超氧化物歧化酶参考值范围的验证和建立[J]. 实用医技杂志,2010,17(12):1144-1145.
 - [9] 孙炜,朱晖,刁娟娟,等. 乌鲁木齐市不同性别成年人血清中维生素 A、E 测定与分析[J]. 中国初级卫生保健,2012(6):44-46.
 - [10] HAGENAU T,VEST R,GISSEL T N,et al. Global vitamin D levels in relation to age,gender,skin pigmentation and latitude;an ecologic meta-regression analysis[J]. Osteoporos Int,2009,20(1):133-140.
 - [11] LU L,YU Z,PAN A,et al. Plasma 25-hydroxyvitamin D concentration and metabolic syndrome among middle-aged and elderly Chinese individuals[J]. Diabetes Care,2009,32(7):1278-1283.
 - [12] KITSON M T,ROBERTS S K. D-livering the message: the importance of vitamin D status in chronic liver disease[J]. J Hepatol,2012,57(4):897-909.
 - [13] ELIADES M,SPYROU E,AGRAWAL N,et al. Meta-analysis: vitamin D and non-alcoholic fatty liver disease[J]. Aliment Pharmacol Ther,2013,38(3):246-254.
 - [14] 张志成,张文武,冯婉玉. HPLC 法比较非酒精性脂肪性肝病患者和正常人血浆中维生素 E 水平[J]. 沈阳药科大学学报,2009(B07):23-25.
 - [15] 杨燕. 肝病患者血清维生素 E 水平检测及临床意义[J]. 现代医药卫生,2003,19(6):684-685.
 - [16] 张岱. 肝硬化患者血清维生素 E 水平与肝纤维化及肝功能指标的对比分析[D]. 沈阳:中国医科大学,2010.
 - [17] 韩昕晶,沈薇. 非酒精性脂肪肝患者血清脂联素水平及其与氧化应激的相关性研究[J]. 现代医药卫生,2008,24(14):2069-2070.
 - [18] 蒋兴亮,张均,刘素兰,等. 非酒精性脂肪肝患者氧化应激和抗氧化酶状态[J]. 四川医学,2009,30(12):1958-1960.
 - [19] 李镒冲,李晓松. 两种测量方法定量测量结果的一致性评价[J]. 现代预防医学,2007,34(17):3263-3266.
 - [20] 王天宝,嵇兴梅,都健,等. 健康体检人群血清 25-羟基维生素 D 水平与非酒精性脂肪肝的相关性[J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志,2013,6(2):121-125.
 - [21] 贾新转,魏兰. 血清 25OHD 水平与精液参数的关系[J]. 天津医药,2015,43(7):762-765.

(收稿日期:2017-09-24 修回日期:2017-12-22)

(上接第 1346 页)

- 健康儿童 TPMT 基因多态性检测分析[J]. 中华医学遗传学杂志,2009,26(4):457-460.
- [15] CHIUSOLO P,GIAMMARCO S,BELLESÌ S A,et al. The role of MTHFR and RFC1 polymorphisms on toxicity and outcome of adult patients with hematological malignancies treated with high-dose methotrexate followed by leucovorin rescue[J]. Cancer Chem Pharmacol,2012,69(3):691-696.
 - [16] LIU S G,LI Z G,CUI L,et al. Effects of methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms on toxicities during consolidation therapy in pediatric acute lymphoblastic leukemia in a Chinese population[J]. Leuk Lymphoma,2011,52(6):1030-1040.
 - [17] TANTAWY A A,EL-BOSTANY E A,ADLY A A,et al. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism in Egyptian children with acute lymphoblastic leukemia[J]. Blood Coag Fibr,2010,21(1):28-34.
 - [18] 廖清船,李晓蕾,刘思婷,等. MTHFR 基因多态性及单体型与大剂量甲氨蝶呤化疗毒性反应的相关性研究[J]. 中华流行病学杂志,2012,33(7):735-739.
 - [19] KANTAR M,KOSOVA B,CETINGUL N,et al. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C gene polymorphisms and therapy-related toxicity in children treated for acute lymphoblastic leukemia and non-Hodgkin lymphoma[J]. Leuk Lymphoma,2009,50(6):912-917.
 - [20] ERÖLÜ N,KOTNIK B F,DEBELJAK M,et al. Influence of folate pathway polymorphisms on high-dose methotrexate-related toxicity and survival in childhood acute lymphoblastic leukemia[J]. Leuk Lymphoma,2012,53(6):1096-1104.

(收稿日期:2017-09-21 修回日期:2017-12-19)