血清1,25(OH)₂D测定及女性正常值的建立

徐培康 朱国英 徐爱红 王洪复

摘要 目的 研究建立血清1,25(OH)₂D含量的检测方法及女性正常值。**方法** 用特定的试剂和分离柱分离纯化样品后,放免分析法测定,并观察不同年龄段女性人群的血清1,25(OH)₂D含量变化规律。**结果** 女性健康人群的血清1,25(OH)₂D正常值范围是5.5~60.8 pg/ml,均值是27.7±11.0 pg/ml,且血清1,25(OH)₂D含量随着年龄的增加逐渐下降($P<0.01$),两者呈中度相关($r=-0.473, P<0.01$)。**结论** 血清1,25(OH)₂D含量的正常值范围应按不同性别、不同年龄段设置和建立。

关键词 1,25(OH)₂D 血清 测定 正常值

Measurement of serum 1,25(OH)₂D and establishment of its normal value in females

Xu Peikang, Zhu Guoying, Xu Aihong, et al.

Research Center of Geriatric Medicine, Shanghai Medical University, Shanghai 200032, China

Abstract Objective To establish the method for measurement of serum 1,25(OH)₂D and determination of its normal value in females. **Methods** Serum samples were treated by a series of extraction process to separate 1,25(OH)₂D from other vitamin-D metabolites. Then the samples were analyzed by RIA. Meanwhile, the changes in the level of 1,25(OH)₂D with age were observed. **Results** The normal range of serum 1,25(OH)₂D in healthy women is 5.5-60.8 pg/ml (27.7±11.0 pg/ml), and the amount of 1,25(OH)₂D declines with increasing age. There is a high correlation between serum 1,25(OH)₂D level and age ($r=-0.473, P<0.01$). **Conclusion** The normal range for 1,25(OH)₂D in serum should be established according to different ages and sexes.

Key words 1,25-Dihydroxyvitamin D Serum Measurement Normal value

1,25(OH)₂D是维生素D的活性形式,其主要生理作用是促进肠钙吸收和肾小管对钙的重吸收,并对成骨细胞和破骨细胞有调节作用。目前,有关1,25(OH)₂D与骨质疏松等代谢性骨病的关系已引起人们的广泛关注。但由于1,25(OH)₂D的测定技术难度较大,费用昂贵,目前国内尚未建立测试方法及正常参考值。本文报道血清1,25(OH)₂D含量女性正常值的建立。

1 材料和方法

1.1 检测对象:社区健康女性共137例(年龄27~75岁,见表1),经问诊和体检除外可能影响骨代谢的主要疾病,如慢性肝肾疾病、甲状(旁)腺功能亢进或减退、糖尿病等内分泌疾病,取样前6个月内未使用可影响骨代谢的药物。

1.2 采血与保存:取空腹血清,至-18℃保存至测定。

1.3 主要试剂与仪器:异丙醚、甲醇等试剂均采用分析纯。提取用的分离柱(Cartridge)、提取剂等均由试剂盒厂商提供。

1.4 原理与方法:美国Biosource公司生产的

本文为上海市科委重点资助项目(项目编号:984419064)

作者单位:200032 上海,上海医科大学老年医学研究中

1,25(OH)₂D 放免试剂盒,是将样品用试剂提取后,置于分离柱上,将1,25(OH)₂D 从其它维生素 D 代谢物中分离出来,再经挥发和重组,将样品置于包被管中孵育过夜,在 γ 计数仪中计数测量。

1.5 操作步骤:取 0.5 ml 样品或质控并加入提取剂,振荡 1 小时以充分提取;离心后取上清液置于相应的分离柱中以进一步分离,并以淋洗剂淋洗二次,二氯甲烷和蒸馏水清洗一次,将 1,25(OH)₂D 从其它维生素 D 代谢物中充分分离。分离完成后,每个分离柱中加入洗提液以提取 1,25(OH)₂D 并收集在相应试管中。最后,取样品至包被管中,加入示踪剂,使 ¹²⁵I 标记的 1,25(OH)₂D 与包被管内壁的特异性抗体竞争结合,室温孵育过夜后,清洗以终止竞争结合反应,将各管至 γ 计数仪中计数。最终测定结果以 pg/ml 单位表示。

1.6 统计学处理:原始数据用 SPSS 软件进行统计分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析和直线相关分析。

2 结果

2.1 检测对象年龄分布

将检测对象按年龄分成四组,各组的人数及年龄分布范围见表 1 所示:

表 1 检测对象年龄(岁)分布情况

年龄组(岁)	例数	$\bar{x} \pm s$	范围
<40	22	37.7±4.0	27~39
40~	20	43.2±2.0	40~49
50~	46	54.9±3.1	50~59
≥60	49	65.4±3.9	60~75

2.2 血清 1,25(OH)₂D 含量

对 137 例健康女性志愿者进行了血清 1,25(OH)₂D 含量的测定,结果发现,女性健康入群的血清 1,25(OH)₂D 含量均值是 27.7±11.0 pg/ml,范围是 5.5~60.8 pg/ml,该值可作为血清 1,25(OH)₂D 含量的正常参考值。

表 2 上海地区女性血清 1,25(OH)₂D 水平的正常参考值(pg/ml)

年龄(岁)	例数	$\bar{x} \pm s$	范围	95%可信限
<40	22	36.1±9.5	20.3~54.6	31.9~40.3
40~	20	36.5±11.5	19.0~60.8	31.1~41.9
50~	46	24.2±10.3	5.5~53.9	21.1~27.3
≥60	49	23.7±7.8	7.2~37.9	21.5~26.0
合计	137	27.7±11.0	5.5~60.8	25.9~29.6

注: $F=16.187, P<0.001$

进一步的研究发现,血清 1,25(OH)₂D 在 <50 岁人群中含量较高,明显高于老年妇女(见表 3, $P<0.001$),即随着年龄的增加,血清 1,25(OH)₂D 含量是逐渐降低的。

表 3 女性血清 1,25(OH)₂D 含量(pg/ml)的年龄比较

年龄(岁)	例数	$\bar{x} \pm s$	范围	95%可信限
<50	42	36.3±10.3	19.0~60.8	33.0~39.5
≥50	95	24.0±9.1*	5.5~53.9	22.1~25.8
合计	137	27.7±11.0	5.5~60.8	25.9~29.6

注: * 与 <50 岁组比较, $t=49.181, P<0.001$

对血清 1,25(OH)₂D 与年龄进行的相关回归分析结果也表明,两者呈中度相关($r=-0.473, P<0.01$),其回归方程是: $D=51.770-0.447 \times \text{年龄}$,且该方程有统计意义($F=6.246, P<0.01$)。

3 讨论

1,25(OH)₂D 是维生素 D 的活性形式。维生素 D 在体内,先在肝脏经 25-羟化酶作用,产生专性的中间产物 25(OH)D,此后,须在肾脏经 1 α -羟化酶作用,生成 1,25(OH)₂D 发挥其活性作用。1,25(OH)₂D 的测定可用于一些影响钙代谢的疾病。一系列研究均发现,血清 1,25(OH)₂D 水平与钙吸收高度相关^[1-3],轻微的血清 1,25(OH)₂D 水平下降,即可明显降低肠道钙的吸收,随增龄而发生的肠钙吸收降低,是骨质疏松症发生的病理机制之一。如对绝经后妇女补充雌激素,其血清 1,25(OH)₂D 水平明显增高^[2-4]。此外,血清 1,25(OH)₂D 水平低于 23 pg/ml,骨折发生的危险性增加 2 倍^[3]。因

此,血清 $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 水平可能与老年人骨质疏松症,尤其是绝经后骨质疏松症的发生有一定的关系。此外,由于肾 1α -羟化酶活性与 $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 的活性密切相关,因而在慢性肾病时血 $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 水平可明显降低。因此,开展血清 $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 水平的检测分析,对探讨骨质疏松症和肾性骨病的发病机理,并为临床提供用药指南有重要意义。

由于血清或血浆中的 $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 比 $25(\text{OH})\text{D}$ 水平低 $100\sim 1000$ 倍,且存在许多类似代谢物,故 $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 的测定须先经提取和分离,测定方法繁索,费用昂贵,目前国内尚未建立此项指标的测定分析及正常值。

本文采用美国 Biosource 公司生产的放免试剂盒,对血清 $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 含量进行测定。测定方法包括分离提取和测定两个步骤。血清中 $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 的分离提取一般采用 HPLC 法或柱层析法。由于 HPLC 法须经特殊的真空装置,操作繁琐,而柱层析法较简便易行,且随后的包被管方法结果稳定,故本文采用柱层析法。测定步骤可用放射受体或用放射免疫分析方法(RIA)。由于放射受体方法计数时间长,且需用活性炭分离而存在废物处置问题。而一般的 RIA 法由于缺乏特异性抗血清而准确度差,且这二种方法的正常值波动范围也比较大。

美国 Biosource 公司提供的 $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 放免试剂盒,利用高特异性多克隆抗体的包被管分析方法,故方法更快速和方便。该方法的体外和体内精度(CV%)分别为 $7.8\sim 12.4\%$ 和 $10.0\sim 12.1\%$,提供的正常参考值为 $33.2\pm 14.5\text{ pg/ml}$ 。国外其它实验室报导的正常参考值范围是 $33.6\text{ pg/ml}\sim 84.0\text{ pg/ml}$ ^[6]、 $20.16\text{ pg/ml}\sim 65.10\text{ pg/ml}$ ($\bar{X}=36.96\text{ pg/ml}$)^[7-8]。目前,我们实验室用该方法,对137例康女性血清 $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 含量测定的正常参考值范围为 $5.5\text{ pg/ml}\sim 60.8\text{ pg/ml}$,均值是 $27.7\pm 11.0\text{ pg/ml}$ 。此结果与文献正常值近似,可以作为国人血清 $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 含量的正常参考值。

本次研究还发现,血清 $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 的含量在不同年龄组人群中的差异较大,年轻女性中的血清 $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 含量明显高于中老年女性(见表3),且回归分析结果也表明,血清 $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 含量与年龄存在较好的负相关。因此,建议对血清 $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 含量正常值范围应按年龄段设定,有必要进行进一步研究,以建立我国不同性别、不同年龄段的血清 $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 含量的正常值范围。

参 考 文 献

- 1 Kinyamu HK, Gallagher JC, Prahil JM, et al. Association between intestinal vitamin D receptor, calcium absorption, and serum $1,25$ -dihydroxyvitamin D in normal young and elderly women. *J Bone Miner Res*, 1997, 12(6):922-928.
- 2 Gallagher JC, Riggs BL, DeLuca HF. Effect of estrogen on calcium absorption and serum vitamin D metabolites in postmenopausal osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab*, 1980, 51(6):1359-1364.
- 3 Bikle DD. Role of vitamin D, its metabolites and analogs in the management of osteoporosis. *Rheum Dis Clin North Am*, 1994, 20(3):759-775.
- 4 Heikkinen A, Parviainen MT, Tuppurainen MT, et al. Effects of postmenopausal hormone replacement therapy with and without vitamin D3 on circulating levels of 25 -hydroxyvitamin D and $1,25$ -dihydroxyvitamin D. *Calcif Tissue Int*, 1998, 62(1):26-30.
- 5 Cummings SR, Browner WS, Bauer D, et al. Endogenous hormones and the risk of hip and vertebral fractures among older women. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *N Engl J Med*, 1998, 339(11):733-738.
- 6 Van-Hoof HJ, Swinkels LM, Van-Stevenhagen JJ, et al. Advantages of paper chromatography as a preparative step in the assay of $1,25$ -dihydroxyvitamin D. *J Chromatogr*, 1993, 621(1):33-39.
- 7 Falkenbach A, Sedlmeyer A, Unkelbach U. *J Clin Endocrinol metab*, 1997, 82(1):209-212.
- 8 Fraser WD, Durham BH, Berry JL, et al. Measurement of plasma $1,25$ -dihydroxyvitamin D using a novel immunoextraction technique and immunoassay with iodine labelled vitamin D tracer. *Ann Clin Biochem*, 1997, 34(Pt 6):632-637.