

DOI:10.13602/j.cnki.jcls.2021.01.01

· 质量管理研究 ·

液相色谱串联质谱技术在载脂蛋白 E 室间质量评价中的应用

李卿, 居漪, 虞啸炫, 孙贺伟, 虞科颖(上海市临床检验中心参考测量实验室, 上海 200126)

摘要: **目的** 探讨液相色谱串联质谱技术(LC-MS/MS)在载脂蛋白 E(apoE)室间质量评价中的应用。**方法** 分别将 5 份混合人血清样品冷链运送到 76 家实验室,用免疫比浊法(ITA)进行单次检测。以同位素标记精氨酸的肽段为内标,对标本进行变性、烷基化和胰蛋白酶酶解处理,液相色谱部分采用 SB-C18 色谱柱分离,质谱部分采用正离子模式和多反应监测定量。JMP 13.0 软件分析不同方法分组所对应的相对偏倚。**结果** 对于所有样品,ITA 检测 apoE 的方法组内不精密度在 1.7%至 20.4%之间。总不精密度在 8%左右(sB~sE 样品)。5 个样品相对偏倚的均值分别是(按照样品浓度由低到高排列):-34.2%、-9.4%、-9.8%、-2.7%和-2.1%。高浓度样品比低浓度样品更接近 LC-MS 检测结果。**结论** LC-MS 检测 apoE 可评价免疫法的准确性,为临床应用提供帮助。

关键词: 载脂蛋白 E;液相色谱串联质谱;室间质量评价;免疫比浊

中图分类号:R446

文献标志码:A

Performance of apolipoprotein E measurement in EQA program with targets by LC-MS

Li Qing, Ju Yi, Yu Xiaoxuan, Sun Hewei, Yu Keying. Department of Reference Measurement Laboratory, Shanghai Center for Clinical Laboratory, Shanghai 200126, China)

Abstract: Objectives To investigate the application of liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) on target value establishment of apolipoprotein E (apoE) external quality assessment scheme. **Methods** 5 pooled human samples were distributed by cold-chain to 76 clinical laboratories and measured once with immunoturbidimetric methods (ITA). Samples underwent denaturing, alkylation and trypsin digestion with addition of internal standards as isotope labelling arginine. SB-C18 column was used for the liquid chromatographic separation and mass spectrometry positive ion mode and multiple reaction monitoring were employed for quantification and phenotyping. JMP 13.0 software was used for relative bias analysis among assay groups. **Results** For all samples, the within assay impression apoE levels by ITA varied among assay manufacturers, ranging from 1.7% to 20.4%. Between assay CVs were around 8% (sB-sE). The mean relative bias of 5 samples between participants' ITA results and LC-MS results were -34.2%, -9.4%, -9.8%, -2.7% and -2.1% in the order of low to high samples' levels. Samples with high concentrations were closer to target values than samples with low concentrations. **Conclusion** LC-MS has the potential on assessing the accuracy of ITA, which may promote its clinical application.

Key words: Apolipoprotein E; liquid chromatography-tandem mass spectrometry; external quality assessment; immunoturbidimetry

载脂蛋白 E (apolipoprotein E, apoE) 作为脂质转运蛋白和低密度脂蛋白受体的主要配体,在胆固醇代谢和心血管疾病中发挥重要作用^[1-2]。APOE ε4 等位基因是阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 的主要危险因素^[3-5]。血清 apoE 增高与心血管疾病死亡率增加有关,而降低则与 AD 相关死亡率增加有关^[3,6-7]。这些研究发现是基于免疫法,大多数是常规检测中的免疫透射比浊法 (immunoturbidimetry assay, ITA)。然而,基于免疫法的 apoE 的研究数据差异较大^[8-10],而基于液相色谱串联质谱法 (liquid chromatography mass spectrometry, LC-MS/

MS) 的研究数据一致程度较高^[11-14],LC-MS 在定义被分析物和抗干扰方面具有优势,且在血清载脂蛋白的绝对定量上已有较为成熟的应用^[15],但未见其用于 apoE 室间质量评价 (质评) 中的报道。本研究首次使用已建立的血清 apoE LC-MS 定量方法^[16],为室间质评样品赋值,探讨其在室间质评中的应用潜力。

1 材料和方法

1.1 血清样品 本中心 2019 年度 EQA 样品,混合人血清,编号分别为 sA、sB、sC、sD 和 sE。EQA 样

作者简介: 李卿, 1981 年生, 男, 副主任技师, 硕士, 主要从事临床检验参考测量研究。

通信作者: 居漪, 主任技师, E-mail: juyi@ scll.org.cn。

品由冷链物流运输,参加者使用日常检测系统检测 1 次。校准品为人血清制品, apoE 含量为 12.8 ~ 54 mg/L,由荷兰莱顿大学医学中心惠赠。

1.2 主要仪器与试剂 分析系统包括 Agilent 1290 Infinity 超高效液相系统(美国 Agilent 公司)和 AB5500 QTRAP 三重串联四级杆质谱仪(美国 AB Sciex 公司)。使用正离子模式和多反应监测(MRM)方法。Zorbax eclipse SB-C18 色谱柱(2.1 mm×150 mm,1.8 μm,美国 Agilent 公司)。

二硫键还原剂三(2-甲酰乙基)膦盐酸盐(TCEP)购自美国 Thermo Fisher 公司,碘乙酰胺(IAA)、脱氧胆酸钠(DOC)、Tris 缓冲液购自美国

Sigma-Aldrich 公司。甲醇、甲酸为 LC-MS 级,分别购自法国 Biosolve 公司和美国 Sigma-Aldrich 公司。胰蛋白酶为测序级,购自美国 Promega 公司。实验用水为 Millipore 超纯水机所制(电阻率 18.2 MΩ)。同位素标记多肽由国平药业公司合成,纯度>98%,标记位点为精氨酸的 C 和 N。

1.3 方法

1.3.1 定量和定性肽段的选择 根据本实验室前期研究结果^[20],使用序列为 SELEEQLTPVAEETR 肽段作为定量肽段, LGPLVEQGR 肽段为定性肽段,具体信息见表 1。

表 1 所用肽段信息及部分质谱参数

肽段序列	用途	位置 ^a	离子对 (m/z ^b)	CE ^c
定量肽段				
SELEEQLTPVAEETR	天然肽段	94~108	866.4/902.5	38
SELEEQLTPVAEETR *	同位素标记多肽	—	871.1/912.5	38
定性肽段				
LGPLVEQGR	天然肽段	181~189	588.3/701.4	22

注:a,肽段在天然蛋白质中的位置;b,质荷比;c,碰撞能量;* ,同位素标记 R(精氨酸)。

1.3.2 胰蛋白酶酶解及质谱分析 样品 20 倍稀释后,依次加入 0.523% DOC、2.3 mmol/L TCEP 和 14.3%同位素标记多肽于 100 mmol/L Tris 溶液中, 56 ℃ 变性 30 min。冷却后,每支样品加入 4.6 mmol/L IAA 20 μL,室温避光放置 30 min。加入胰蛋白酶 24 μL,37 ℃ 酶解;加入终止液(4.7%甲醇和 0.6%甲酸的水溶液)终止。LC-MS 的 LC 部分:流动相 A 为 5%甲醇和 0.05%甲酸水溶液,流动相 B 为 95%甲醇和 0.05%甲酸水溶液;流速为 0.2 mL/min;进样 5 μL。洗脱梯度:流动相 B,0.0~6.0 min 15%~85%;6.0~8.0 min 85%;8.0~8.1 min 85%~100%;8.1~10.0 min 100%;10.1~15.0 min 100%~

15%。LC-MS 的 MS 部分:离子对的选择见表 1。每个样品检测 2 次,取均值。

1.4 统计学分析 采用统计软件 JMP 13.0 绘制不同方法分组所对应的相对偏倚图。相对偏倚=(参加者结果-LC-MS 结果)/LC-MS 结果×100%。对 EQA 结果计算不同方法组的均值和 CV。

2 结果

2.1 EQA 结果 见表 2。76 家实验室用 ITA 检测 sA、sB、sC、sD、sE 样品 apoE 结果分别为:15.7~20.8 mg/L、41.7~47.6 mg/L、63.9~69.7 mg/L、83.1~94.4 mg/L和 112.9~129.7 mg/L。

表 2 EQA 结果

ITA	n ^a	sA (27.5 mg/L)		sB (49.0 mg/L)		sC (74.5 mg/L)		sD (90.6 mg/L)		sE (122.8 mg/L)		偏倚 ^a (%)
		均值(mg/L)	CV(%)	均值(mg/L)	CV(%)	均值(mg/L)	CV(%)	均值(mg/L)	CV(%)	均值(mg/L)	CV(%)	
积水	22	19.2	12.6	47.6	4.6	68.9	7.0	89.2	8.1	120.7	8.8	8.7
美康	6	17.2	9.7	43.0	4.8	65.3	4.0	88.8	2.7	121.6	3.0	13.0
瑞源	6	20.2	16.2	43.9	12.7	66.7	12.0	86.0	10.7	120.1	12.3	10.9
普瑞柏	8	19.1	8.5	44.9	4.8	63.9	6.0	83.1	7.2	112.9	6.6	13.9
华臣	4	20.8	8.3	46.4	4.5	67.6	4.1	85.4	4.2	117.3	1.7	9.8
蓝怡	6	16.1	20.4	41.7	7.1	69.7	7.7	94.4	7.4	129.7	5.2	14.6
申能	13	18.4	6.3	46.1	6.8	66.9	5.6	89.1	8.5	120.0	8.4	10.6
执诚	5	16.2	19.5	42.4	5.3	69.7	5.9	92.3	6.0	126.8	5.8	13.2
中元	6	15.7	16.6	43.4	8.1	66.0	2.7	85.2	4.2	113.1	5.9	15.9
所有方法	76	18.1	14.5	44.4	7.6	67.2	6.9	88.2	7.9	120.3	8.2	11.6

注:n,参加者数目;a,相对偏倚绝对值的均值。

2.2 不精密度和相对偏倚 sB~sE 样品,除瑞源外($CV>10\%$),其他方法组内的不精密度为 $1.7\%\sim 8.8\%$ 。sB~sE 样品的总 CV 在 8% 左右。sA 样品的组内不精密度>其他样品,总 CV 为 14.5% 。积水的相对偏倚绝对值的均值最小,为 8.7% ,而蓝怡最大 14.6% ,见表 2。每种 ITA 的偏倚和 CV 均不相同,见图 1。高浓度样品(sD 和 sE)比低浓度样品(sA、sB 和 sC)更接近 LC-MS 结果。

2.3 EQA 结果评价 以靶值 $\pm 15\%$ 为判断标准,不同品牌的合格率见表 3。除积水外,其他品牌检测 sA 样品的合格率均为 0。随着 EQA 样品浓度的增高,多个品牌的合格率有逐步增高趋势。

表 3 不同品牌 EQA 结果评价合格率(%)

ITA	sA	sB	sC	sD	sE
积水	4.5	100.0	77.3	90.9	86.4
美康	0.0	100.0	66.7	100.0	100.0
瑞源	0.0	66.7	50.0	83.3	83.3
普瑞柏	0.0	100.0	62.5	75.0	87.5
华臣	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0
蓝怡	0.0	66.7	83.3	100.0	100.0
申能	0.0	92.3	84.6	92.3	92.3
执诚	0.0	40.0	80.0	100.0	100.0
中元	0.0	83.3	100.0	100.0	83.3

3 讨论

本实验室前期研究发现 LC-MS 法与免疫法具有较好的相关性($r=0.97$);LC-MS 法的不精密度 5.2% ,与靶值的相对偏差在 $3.6\%\sim 7.6\%$ ^[16]。本研究发现,除 sA 样品外,sB~sE 的 ITA 结果整体上比 LC-MS 结果低约 6% 。可能是由于 apoE 的基因型以及两种方法的特异性不同而造成。首先,血清 apoE 含量在 3 种等位基因型之间($\epsilon 2,\epsilon 3$ 和 $\epsilon 4$),区别较大。基因型变化从 $\epsilon 22,\epsilon 32,\epsilon 42,\epsilon 33,\epsilon 43$ 至 $\epsilon 44$,apoE 含量逐渐降低,可降低约 65% (即 55 mg/L)。然而这些发现使用的是抗人 apoE 多克隆抗体,尚不清楚具体针对的是哪一亚型。

简单地说,绝对定量方法使用合成的同位素标记肽作为内标物,检测样品中天然肽的浓度。本研究使用了 SELEEQLTPVAEETR 作为定量肽段。实验表明,3 h 的酶解可实现该肽段的完全释放。更重要的是,该肽段位于 apoE2、apoE3 和 apoE4 的共同区域,定量结果就是总 apoE 的水平。因此,相对于质谱法明确清晰的分析目标而言,免疫法可能会低估总 apoE 的含量。

血清 apoE 降低 10 mg/L 带来的 AD 相关死亡率的风险比为 1.7 ^[6]。对于样品 sA、sB、sC、sD 和

sE,反馈结果相对于 LC-MS 结果降低 10 mg/L 以上的分别占 $27.6\%、5.3\%、28.9\%、17.1\%$ 和 21.1% ,表明使用这些实验室出具的报告,患者可能被错误分类为 AD 相关死亡风险增加。

当血清 apoE 在 45 mg/L 以上时,全因死亡率随着 apoE 含量的增加而上升。sB 样品 apoE 为 49 mg/L ,接近于 45 mg/L ,以靶值 $\pm 15\%$ 为判断标准(参照美国 CAP 的载脂蛋白 A 和 B 的正确度验证计划的判断标准), 86.8% 的实验室在此范围内。

本研究使用的 EQA 样品为混合人血清样品,可能包括不同的 $\epsilon 2/\epsilon 3/\epsilon 4$ 基因型,不能显示 ITA 方法的特异性,对于结果在 ITA 和 LC-MS 之间的偏倚无法深入分析,采用单一来源人血清样品可能会提供更多有价值的信息。

4 参考文献

[1] Mahley RW. Apolipoprotein E: from cardiovascular disease to neurodegenerative disorders[J]. J Mol Med (Berl), 2016, 94(7): 739-746.

[2] 马旭,张琳,沈笑然,等. 心血管疾病患者载脂蛋白 E 基因型分布及血脂水平初步分析[J]. 临床检验杂志, 2019, 37(7): 528-530.

[3] Rasmussen KL, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG, et al. Plasma apolipoprotein E levels and risk of dementia: a Mendelian randomization study of 106, 562 individuals[J]. Alzheimers Dement, 2018, 14(1): 71-80.

[4] Arold S, Sullivan P, Bilousova T, et al. Apolipoprotein E level and cholesterol are associated with reduced synaptic amyloid beta in Alzheimer's disease and apoE TR mouse cortex[J]. Acta Neuropathol, 2012, 123(1): 39-52.

[5] Dittrich J, Beutner F, Teren A, et al. Plasma levels of apolipoproteins C-III, A-IV, and E are independently associated with stable atherosclerotic cardiovascular disease[J]. Atherosclerosis, 2019, 281: 17-24.

[6] Rasmussen KL, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG, et al. Plasma levels of apolipoprotein E and risk of ischemic heart disease in the general population[J]. Atherosclerosis, 2016, 246: 63-70.

[7] Rasmussen KL, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG, et al. Plasma levels of apolipoprotein E, APOE genotype, and all-cause and cause-specific mortality in 105 949 individuals from a white general population cohort[J]. Eur Heart J, 2019, 40(33): 2813-2824.

[8] Hesse C, Larsson H, Fredman P, et al. Measurement of apolipoprotein E (apoE) in cerebrospinal fluid[J]. Neurochem Res, 2000, 25(4): 511-517.

[9] Lehtimäki T, Pirttilä T, Mehta PD, et al. Apolipoprotein E (apoE) polymorphism and its influence on ApoE concentrations in the cerebrospinal fluid in Finnish patients with Alzheimer's disease[J]. Hum Genet, 1995, 95(1): 39-42.

[10] Lefranc D, Vermersch P, Dallongeville J, et al. Relevance of the

- quantification of apolipoprotein E in the cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease[J]. *Neurosci Lett*, 1996, 212(2): 91-94.
- [11] Martínez-Morillo E, Hansson O, Atagi Y, *et al.* Total apolipoprotein E levels and specific isoform composition in cerebrospinal fluid and plasma from Alzheimer's disease patients and controls[J]. *Acta Neuropathol*, 2014, 127(5): 633-643.
- [12] Baker-Nigh AT, Mawuenyega KG, Bollinger JG, *et al.* Human central nervous system (CNS) ApoE isoforms are increased by age, differentially altered by amyloidosis, and relative amounts reversed in the CNS compared with plasma[J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(53): 27204-27218.
- [13] Simon R, Girod M, Fonbonne C, *et al.* Total ApoE and ApoE4 isoform assays in an Alzheimer's disease case-control study by targeted mass spectrometry ($n = 669$): a pilot assay for methionine-containing proteotypic peptides[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2012, 11(11): 1389-1403.
- [14] Wildsmith KR, Han B, Bateman RJ. Method for the simultaneous quantitation of apolipoprotein E isoforms using tandem mass spectrometry[J]. *Anal Biochem*, 2009, 395(1): 116-118.
- [15] van den Broek I, Romijn FP, Nouta J, *et al.* Automated multiplex LC-MS/MS assay for quantifying serum apolipoproteins A- I , B , C- I , C- II , C- III , and E with qualitative apolipoprotein E phenotyping[J]. *Clin Chem*, 2016, 62(1): 188-197.
- [16] 李卿, 居漪, 孙贺伟, 等. 同位素稀释液相色谱串联质谱定量检测血清载脂蛋白 E 及其表型分型的方法学建立[J]. *中华检验医学杂志*, 2019, 42(8): 629-633.

(收稿日期:2020-10-14)

(本文编辑:王海燕)