

同型半胱氨酸检测新进展与其临床价值

练小芬 综述, 欧国生, 李小玲 审校 (广东省云浮市新兴县人民医院检验科 527400)

【关键词】 同型半胱氨酸; 心脑血管疾病; 循环酶法

DIO:10.3969/j.issn.1672-9455.2010.16.064

中图分类号: R446.112; R543

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2010)16-1767-02

同型半胱氨酸(Hcy)又称高半胱氨酸(HHcy),是一种含硫氨基酸,它不属于组成蛋白质的 20 种氨基酸,本身不参与蛋白质的合成,也没有特异的 3 个 DNA 碱基对其进行编码,在体内不能合成,它是由蛋氨酸和半胱氨酸代谢过程中产生的重要的中间产物,只能来源于蛋氨酸的分解代谢。Hcy 于 1931 年由 Vincent du Vigneaud 首次从膀胱结石中分离出来,它是一种含硫的氨基酸。1969 年, Kilcken McCully 第一次指出 Hcy 患者的血管病变是由于高水平的 Hcy 引起,从此 Hcy 备受关注。大量研究证明, Hcy 是心脑血管病的独立危险因素,危险度随 Hcy 浓度的升高而增加^[1-3]。但到目前为止, Hcy 的检测只局限于研究性质的科研单位和大型医院实验室,而基层医院的医务工作者对心脑血管危险因子的认识还停留在早已家喻户晓的血脂上。因此,宣传 Hcy 的临床价值和在基层医院实验室开展 Hcy 的检测成为当务之需。为此,作以下综述。

1 Hcy 升高原因

大多数学者认为,高 Hcy 原因主要有以下几方面:(1)不健康生活方式、营养不良、B 族维生素(Vit)缺乏。饮食中高动物蛋白摄入过多,使蛋氨酸含量过高;长期酗酒,引起肝细胞蛋氨酸合成酶活性下降; VitB₆、VitB₁₂ 和叶酸摄入不足,使其作为代谢辅酶活性下降。(2)遗传因素主要是 C667T 点突变、CBS 基因多态性和蛋氨酸合成酶基因多态性。(3)肾小管内皮细胞的胱硫醚 B-合成酶对 Hcy 起转化作用,因此,肾功能不全可使 Hcy 水平升高。(4)其他因素,如药物(一氧化氮、氨甲蝶呤、避孕药、抗癫痫药等)、年龄、性别等。

2 Hcy 检测方法

2.1 高效液相色谱法(HPLC)^[4] 是目前公认的参考方法,基本分析原理:先使用还原剂使血样中所有形式的 Hcy 转变成还原形式,然后与荧光试剂进行衍生生成 Hcy-荧光物质复合物,将衍生后的样品进行色谱分析。因色谱固定相对不同物质的吸附力不同,因此流动相将其洗脱下来的次序也不同,根据这一原理将样品中的不同物质分开,以荧光检测器检测洗脱下 Hcy-荧光物质复合物的荧光强度,将其与标准品/内标的比值进行比较和计算,就可以测定血中 Hcy 的水平。此方法灵敏度高,准确度和精密度好,但由于其操作繁琐复杂,耗时耗费,不适用于临床应用,主要用于实验研究。

2.2 毛细管电泳法^[5] 基本分析原理:先使用还原剂使血样中所有形式的 Hcy 转变成还原形式,然后与荧光试剂进行衍生生成 Hcy-荧光物质复合物,将衍生后的样品进行毛细电泳分析。将样品放置于 10 千伏左右的高压电场中,因为各种物质所带电荷不同,其等电点也不相同,因此其在电场中的迁移速度也就不同。根据这一原理可将 Hcy 与样品中的其他物质分开,再以荧光检测器检测 Hcy-荧光物质复合物的荧光强度,将其与标准品/内标的比值进行比较和计算工作。主要用于实

验研究,有在临床使用的报道。其特点与色谱方法相似,但其有操作比较复杂、试验耗时较长和试验数据变异比较大等缺点。

2.3 酶联免疫分析吸附试验(ELISA)^[6] 基本分析原理:先使用酶将血样中所有形式的 Hcy 转变成 S-腺苷-L-Hcy,然后加入酶标的抗 S-腺苷-L-Hcy 的单克隆或多克隆抗体,采用竞争结合的原理,将不同水平的标准品与酶标抗体竞争结合,然后以显色试剂和终止试剂分别进行显色和终止,制作出 Hcy 浓度与发色强度的标准曲线。样品也按相同步骤处理,在标准曲线上就可以查出其 Hcy 的浓度。是临床上测定 Hcy 水平的常用方法,其特点是操作比较方便、快捷,重复性好,方法稳定、可靠。缺点是大部分操作还是手工操作,比较耗时等。

2.4 荧光偏振免疫法(FPIA)^[7] 基本分析原理:样品中游离 Hcy 和抗单克隆抗体相结合的 Hcy 的荧光偏振强度不同,将样品、标准品与标抗体竞争结合,采用竞争结合的原理制作出 Hcy 浓度与荧光偏振强度的标准曲线,在标准曲线上就可以查出其 Hcy 的浓度,是临床上测定 Hcy 水平的比较好的方法。该方法完全自动化仪器分析,具有快速、准确、方便的优点,受到临床医师们的欢迎,但需专门仪器,且试剂昂贵。

2.5 循环酶法^[8] 是近几年出现的新方法,其原理是利用小分子捕获技术(SMT)的 S-腺苷 Hcy(SAH)水解酶的方法。在三-乙-羧乙基膦(TCEP)作用下,氧化型 Hcy 被转化为游离型 Hcy,后者通过与其共价底物 S-腺苷甲硫氨酸反应,生成蛋氨酸和 SAH。SAH 被 SAH 水解酶水解成腺苷和 Hcy, Hcy 经循环反应放大信号,同时产生腺苷,腺苷立即水解成氨和次黄嘌呤,氨在谷氨酸脱氢酶的作用下,使 NADH 转化为 NAD⁺,样本中的 Hcy 含量与 NADH 转化速率呈正比。循环酶法可用自动生化分析仪分析,具有快速、准确、方便的优点,经实验证实其测定结果与 HPLC 方法比较,结果一致性良好,是基层医院实验室检测血 Hcy 比较好的方法^[9-11]。由于可利用现有设备检测,且试剂较为经济,是推广 Hcy 的最佳检测方法。

3 Hcy 的临床意义

3.1 Hcy 与心血管系统疾病的关系 高 Hcy 血症导致动脉粥样硬化的机制涉及到血管壁、血小板和凝血因子 3 个方面。血管壁的内皮细胞是保护血管平滑肌的屏障, Hcy 水平升高,其产生超氧化物及过氧化物,直接损伤血管内皮细胞,破坏血管壁弹力层和胶原纤维,刺激血管平滑肌的增生,参与动脉粥样硬化的形成。高 Hcy 时,一方面 NO 生物利用下降,导致纤溶酶原激活物的表达和血小板的聚集;另一方面强凝血因子 VII 和 V 的活性抑制蛋白 C 的活性,阻止组织纤溶酶原激活物(tPA)结合到内皮细胞,从而促进血栓形成。Boushey 等的研究结果显示,血中 Hcy 水平每升高 5 μmol/L,相当于胆固醇升高 500 μmol/L。有研究指出, Hcy 升高 5% 时有 3 倍发生心肌

梗死的危险性,尤其是中青年。而且冠心病病变程度与 Hcy 浓度呈正相关。安徽医科大学安徽省生物医学研究所与北京大学第一医院合作,在中国人群中进行的一项巢式病例对照研究,对近 4 万人组成的研究队列进行了平均 6 年以上的前瞻性追踪,以探讨中国人群中 Hcy 升高与心脑血管事件的关系,以及 Hcy 升高和高血压对心脑血管疾病的相互影响^[12]。研究表明,有高血压或 Hcy 升高的患者出现脑卒中的风险分别为血压和 Hcy 水平均正常者的 3.6 倍和 8.2 倍,而血压与 Hcy 同时升高的患者心脑血管事件的风险显著增加至 12.1 倍。该结果在中国人群中得到再次证实,当高血压合并 Hcy 升高时,卒中中发生危险增加更为明显,即高血压与 Hcy 升高对心脑血管事件的发生危险具有明显的协同作用。

3.2 Hcy 与神经系统疾病的关系 李保华等^[12]的研究发现,脑梗死患者 Hcy 水平明显高于正常对照组($P < 0.01$),并且脑梗死与 Hcy 水平之间存在危险性的水平梯度,随着 Hcy 水平的增加,条件 Logistic 回归模型检验发现 Hcy 为脑梗死的独立致病因素。Brattstrom 等^[13]对 142 例存活的脑卒中患者和 66 例对照者的研究发现,40% 的脑卒中患者有高 Hcy 血症,而对照组只有 6% 稍高于正常范围。北京大学第一医院霍勇教授的研究资料显示,我国原发性高血压患者中约 75% (约占人口数的 2%) 伴有 Hcy 增高,而两种因素同时存在时可使脑卒中发生风险增加 12 倍以上。血清 Hcy $5 \mu\text{mol/L}$ 可导致缺血性心脏病($OR = 1.42, 95\% CI 1.11 \sim 1.89$)和卒中($OR = 1.59, 95\% CI 1.2 \sim 1.96$)风险增高。而且 Hcy 浓度每降低 $3 \mu\text{mol/L}$,缺血性冠状动脉疾病的风险则降低 16%,卒中风险降低 24%^[14]。

3.3 Hcy 与其他疾病的关系 肾小管内皮细胞的胱硫醚- β -合成酶对 Hcy 的脱硫作用被认为是血液中非蛋白结合型 Hcy 重要的代谢途径。由于肾病使 Hcy 的排泄障碍而导致血中 Hcy 升高,更易并发心脑血管疾病,使病死率增高。胰岛素对 Hcy 代谢具有重要的调节作用,它可通过调节肝转硫基酶活性调节血 Hcy 浓度。有关研究显示 2 型糖尿病患者血 Hcy 浓度高于正常对照,且与空腹血糖、HbA1c 和糖尿病病程显著相关。此外,Hcy 还与老年性痴呆、妊娠期相关疾病(如胎儿畸形、死胎、流产等)有关。

大量临床研究结果已证明,Hcy 是心脑血管疾病的一个非常重要的独立危险因素^[15]。2001 年美国心脏病医生协会正式把 Hcy 检测向临床推荐,因此英国亦已广泛开展。在我国,到目前为止 Hcy 的检测尚未普及,希望在自动生化分析仪基本普及和循环酶法已证实可用于临床的今天,能将检测血 Hcy 推广,以便可以为心脑血管疾病的预防、诊断、治疗、疗效观察提供又一科学实验依据。

参考文献

[1] Sacco RL, Roberts JK, Jacobs BS. Homocysteine as a risk factor for ischemic stroke: an epidemiological story in evolution[J]. Neuroepidemiology, 1998, 17(4): 167-173.

[2] 朱志刚, 张颖冬. 同型半胱氨酸与血管性疾病[J]. 脑与神经疾病杂志, 2000, 8(5): 320-324.

[3] Hnkey G, Elkeboom JN. Homocysteine and vascular disease[J]. Lancet, 1999, 354 (9176): 407-413

[4] Pastore A, Massoud R, Motti C, et al. Fully automated assay for total homocysteine, cysteine, cysteinylglycine, glutathione, and 2-mercaptopyruvate in plasma and urine[J]. Clin Chem, 1998, 44(4): 825-832.

[5] Ueland PM, Refsum H, Stabler SP, et al. Total homocysteine in plasma or serum: methods and clinical applications[J]. Clin Chem, 1993, 39(9): 1764-1779.

[6] Frantzen F, Faaren AL, Alfheim I, et al. Enzyme conversion immunoassay for determining total homocysteine in plasma or serum[J]. Clin Chem, 1998, 44(2): 311-316.

[7] Pfeiffer CM, Twite D, Shih J, et al. Method comparison for total plasma homocysteine between the Abbott IMx analyzer and an HPLC assay with internal standardization[J]. Clin Chem, 1999, 45(1): 152-153.

[8] Roberts RF, Roberts WL. Performance characteristics of a recombinant enzymatic cycling assay for quantification of total homocysteine in serum or plasma[J]. Clin Chim Acta, 2004, 344(1-2): 95-99.

[9] 马韬, 熊大迁, 蔡红蓉, 等. 血液同型半胱氨酸测定结果在相关疾病中的应用[J]. 检验医学与临床, 2009, 6(7): 1151-1152.

[10] 庞国菊, 王剑. 双试剂酶速率法测定血清同型半胱氨酸及临床应用[J]. 中国实验诊断学, 2009, 13(6): 812-813.

[11] 高静, 董振南, 田亚平. 循环酶法测定血清同型半胱氨酸的临床应用研究[J]. 中华检验医学杂志, 2006, 29(3): 199-200.

[12] 李保华, 毛利忠, 王克义, 等. 脑梗死与高同型半胱氨酸血症的相关性研究[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2006, 1(9): 8-10.

[13] Brattstrom L, Lindgren A, Israelsson B, et al. Hyperhomocysteinemia in stroke: prevalence, cause, and relationships to type of stroke and stroke risk factors[J]. Eur Clin Invest, 1992, 22(3): 214-221.

[14] Kronenberg F, Kronenberg MF, Kiechl S, et al. Role of lipoprotein (a) and apolipoprotein (a) phenotype in atherogenesis: prospective results from the Bruneck study[J]. Circulation, 1999, 100(1): 1154-1160.

[15] Wald DS, Law M, Morris JK. Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis[J]. BMJ, 2002, 325(7374): 1202.

(收稿日期: 2010-03-10)