

C-反应蛋白检测在临床上的应用

高 敏 综述, 郑 勇 审校(湖北省宜昌市中医院 443003)

【关键词】 C-反应蛋白; 临床应用; 实验室检验

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2010.20.067

中图分类号:R446.61

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2010)20-2285-03

C-反应蛋白(CRP)是一种急性时相反应蛋白。所谓急性时相反应是指机体在受到强烈刺激后的一种应激反应。CRP除了可用于作为组织损伤、炎性反应的相关检测指标外,还可应用于小儿感染、妇科疾病、内分泌疾病、肝炎、心血管疾病、器官移植等方面^[1]。实验室把 CRP 作为炎症疾病的指标,同时对于一些疾病的诊断、鉴别及预后推断都有重大的意义。CRP 的检测在 20 世纪 80 年代以前作为炎症反应和组织损伤的非特异性标志物大量应用于临床。但由于过去 CRP 的检测方法较为落后,假阳性和假阴性很高,影响了它在临床上的价值,而逐渐被临床所忽视。近年来,由于检测技术的更新,测定 CRP 的快速、简便和可靠的方法已迅速建立^[2],使 CRP 在临床应用领域大大增加,其在医学上的价值正得到广泛验证和承认。现将其临床应用综述如下。

1 临床意义

1.1 生物学特性 CRP 是一种 γ 球蛋白,相对分子质量为 105×10^3 ,主要的生物学特性有^[3]:(1)通过经典途径激活补体,消耗补体,释放炎症反应介质,促进黏附和吞噬细胞反应,使细胞溶解。(2)作用于淋巴细胞和单核细胞的受体,导致淋巴细胞活化、增生,促进淋巴因子生长,并促进抑制性 T 淋巴细胞增生,也增强了吞噬细胞的吞噬作用。(3)抑制血小板的聚集和释放反应,还能妨碍血小板引起血块收缩。在炎症反应、感染、组织损伤时,由于细胞因子如白细胞介素(IL)、肿瘤坏死因子(TNF)等的刺激,CRP 主要由肝脏生成,其血中半衰期稳定在 19 h,其浓度依赖于肝脏的生成量。(4)最近证实它还可以激活 $M\phi$ 产生 IL-1、TNF、超氧化阴离子和过氧化氢消灭细菌和肿瘤。

1.2 临床价值 CRP 水平是判断组织损伤的敏感指标,在损伤的 6~8 h 内,血清 CRP 量迅速升高,并在 48~72 h 达高峰。血浆中 CRP 浓度在急性心肌梗死、创伤、感染、炎症反应、外科手术、肿瘤浸润时迅速显著地增高,可达正常水平的 2 000 倍^[4],因此 CRP 是更敏感、更实用的损伤或炎症反应指标。

2 临床应用

2.1 在感染性疾病中的应用 在炎症反应进程开始 4~7 h 就开始升高,且升高的幅度与细菌感染的严重程度相一致;病毒感染时 CRP 不增高,CRP 是感染的急性期反应物^[5]。组织炎症反应时,由巨噬细胞释放 IL 等刺激肝细胞合成 CRP 参与机体反应,尤其是细菌感染其阳性率可高达 96%,CRP 与其他炎症反应因子如白细胞总数、红细胞沉降率和多形核白细胞等具有密切相关性。CRP 与 WBC 呈正相关,在炎症反应中起着积极作用,使人体具有非特异性抵抗力^[6]。在患者疾病发作时,CRP 可早于 WBC 而上升,回复正常也很快,一天内可降 50%,故具有极高的敏感性。它不受其他因素的影响,即使是反应低下、血常规 WBC 检查正常的患者,CRP 亦可呈阳性,并随着感染的加重而升高。所以能很好地用于判断抗生素治疗的效果,

出现 CRP 浓度下降,即说明治疗有效,如降到参考值范围内,通常即可停药,有效地防止了抗生素的滥用。这些感染临床上常见于肺炎、支气管炎、咽喉炎、细菌性脑膜炎、伤寒、化脓性关节炎、尿路感染、盆腔炎、阑尾炎等等。因为 CRP 通常在细菌感染后增高,而病毒感染时不增高,升高的幅度与细菌感染程度相符合,所以可用于鉴别细菌或病毒感染的一个首要指标。对病毒感染病例,CRP 正常或呈现低值,腺病毒及某些疱疹病毒可造成较大的组织损伤使得 CRP 轻度增高。同时肿瘤患者治疗过程中常有感染发生,CRP 可作为监测指标,恶性肿瘤患者 CRP 大都升高。如 CRP 与 AFP 的联合检测,可用于肝癌与肝脏良性疾病的鉴别诊断。CRP 测定用于肿瘤的治疗和预后有积极意义。手术前 CRP 上升,手术后则下降,且其反应不受放疗、化疗和皮质激素治疗的影响,有助于估价肿瘤的进程。

2.2 在外科手术的应用 外科切除炎症反应器官或不良的组织所引起的创伤,导致机体免疫功能的损伤,使患者易患继发性感染。近年来发现,急性期蛋白包括 CRP 可用于早期诊断外科严重感染、术后并发症的早期监测及判断疾病预后。进行 CRP 动态测定,可以指导创伤及外科手术抗感染的合理用药,在受到物理性伤害时,如外科手术 4~6 h CRP 开始升高,24~72 h 达高峰,第 3~4 天后未出现下降趋势,且在 5~7 d 内未降至正常范围内或接近正常上限,这时临床上往往能找到某种并发症的证据。严重感染患者手术后 6 h CRP 显著上升。随着感染治愈,CRP 降至 10 mg/L,如仍升高者表明感染持续存在。检测 CRP 对于手术前后早期发现并发症及判断预后有很大的实用价值,是手术患者监护中具有意义的早期指标^[7]。用抗生素治疗细菌感染时,动态检测 CRP 是必要的,它比临床体征更早作出并发症警报和治疗效果的判定,在粒细胞缺乏症或机体免疫状态抑制时更有临床意义。少数患者对手术创伤后急性表现不明显,对这些患者也许更要注意他们的动态观察,防止因 CRP 水平不高造成肯定不会有术后感染的误诊,而出现术后感染延误治疗,需对术后感染病例作动态对比分析,相信可使 CRP 在临床应用中更具有价值。

2.3 在心血管疾病中的应用 CRP 在心血管疾病方面的研究报道比较多^[8],其另一非常重要的临床应用意义就是对冠心病高危人群的筛查和风险预测,急性心肌梗死(AMI)时 CRP 升高,在无溶栓治疗时与梗死范围呈正相关,与梗死有关的冠状动脉完全堵塞时 CRP 升高。研究发现,血清 CRP 水平与冠心病的发生、发展及预后有直接联系。高水平的 CRP 使心肌梗死的危险性增加 3 倍;CRP 水平较高的妇女与 CRP 水平较低者相比,发生心血管疾病的危险性增加 5 倍,发生 AMI 的危险性增加 7 倍。CRP 浓度的上升与心肌、肌钙蛋白 I 的浓度升高同样,可使 AMI 后患者或不稳定性心绞痛(UA)患者发生心血管意外的短期危险性增加。上述较易测定之指标可成为冠

状动脉疾病患者长期的心血管意外危险性预测因子,特别是血 CRP 浓度可成为制订心血管疾病长期预后的指标。已知发生心肌梗死时血中 CRP 升高,这一现象提示对已有冠状动脉疾病的患者,其发生心血管意外的危险性增加,在分析 CRP 浓度 cut off 值的基础上,已成为判断有无 AMI 的非常重要的因素。CRP 增高是心血管疾病危险性增高的强有力的决定因素,将其作为判断预后乃至治疗效果的指标是十分有用的。CRP 是急性冠状动脉综合征(CAD)的重要危险因素,在动脉粥样硬化斑块组织中能见到单核细胞、巨噬细胞和 T 淋巴细胞的浸润,在不稳定性 UA 患者的斑块中此病变比稳定性 UA 更明显,破裂处特别是肩角区吞噬细胞更多。吞噬细胞能产生金属蛋白酶,分解粥样硬化斑块纤维帽中的成分,使纤维帽变薄变弱,易引起斑块破裂,检查血清中 CRP 含量作为冠心病患者早期感染指标,有助于早期查出冠状动脉疾病的病变发展,以便采取积极的治疗措施。AMI 患者由于心肌缺氧,造成心肌损伤和炎性反应性细胞浸润,刺激机体产生 CRP。有文献报道采用免疫比浊法对 AMI 患者血清 CRP 进行动态观察,AMI 患者在发病 2~4 h 血清 CRP 水平即可升高,其升高程度与梗死面积大小呈正相关,并且随着病情的好转逐渐降至正常水平^[9]。因此 CRP 检测可为 AMI 患者的诊断、治疗观察和判断预后提供证据。其水平对 CAD 患者的生存有独立预测价值。最近研究显示,在动脉硬化病变进展过程中,CRP 可能是反映疾病演进的一个标志。动脉粥样硬化(AS)的发病和进展中有许多炎性细胞的参与。炎性反应标志物 CRP 能激活补体,引发脂质沉积,此为 AS 的始动因素之一^[10]。CRP 可与脂蛋白结合,由经典途径激活补体系统,造成血管内膜受损。内皮损伤导致的炎性物质释放促进了内皮细胞与循环血白细胞的相互作用,而与 AS 的发生、发展有关。研究人员在检测了 CRP 在冠状动脉内皮细胞黏附分子表达方面的作用后提出,CRP 可能在 AS 的炎性反应过程中起了促进作用,其浓度与冠状动脉粥样硬化的严重程度呈正相关^[11]。更有相关报道指出,因各种原因增高的 CRP 可直接促进粥样血栓的形成。

2.4 在妇科疾病中的应用 CRP 对于如子宫附件炎等妇科感染性疾病的诊断有重要参考价值^[12]。其中炎性反应类疾病 CRP 远远高于正常值上限,而非炎性反应性疾病 CRP 基本正常。在急、慢性盆腔炎中,急性 CRP 升高较明显。在妇科疾病诊断中,主要以检查白细胞数为依据。但由于白细胞的参考值范围较宽,个体差异较大,在炎性反应中不同的个体可能有不同的表现,有时甚至仍然在正常范围,而此时 CRP 已明显增高。在盆腔炎患者中 CRP 的敏感性明显高于白细胞计数的敏感性;盆腔炎患者治疗前后 CRP 和白细胞的比较,CRP 变化较白细胞变化更符合临床治疗效果。而在妇科非炎性反应组特别是异位妊娠和子宫肌瘤病例中阳性率低,且明显低于炎性反应组。这在临床工作中对于盆腔炎的鉴别诊断有重要参考价值,也有助于异位妊娠的诊断。因此 CRP 的检测有助于妇科炎性反应性疾病与非炎性反应性疾病的鉴别诊断,动态检测其变化对疗效判定有很大的意义^[13]。另外,CRP 不仅与生理性相关,而且也与绒毛膜羊膜炎的临床诊断有关。因此,CRP 的测定对于妇科疾病的诊断不失为一项良好的临床指标。

2.5 在儿科感染性疾病的应用 血清 CRP 的检测广泛应用于儿科临床感染性疾病的辅助诊断,血清 CRP 水平随病情的恢复而明显降低,作为高敏急性时相蛋白,血清 CRP 的定量测定对小儿感染性疾病的诊断和鉴别诊断以及疗效的观察有重要参考价值^[14]。但也有一些患儿属于低体质量儿,反应较差,虽有严重感染,但血清中 CRP 水平不升高,这可能表示预后不

佳^[15]。有关研究表明,患儿细菌性感染组 CRP 明显升高,而病毒感染组及对照组 CRP 水平无明显升高,两者比较差异有统计学意义,对 CRP 明显升高的患儿应用抗生素治疗后,症状均明显改善,故可以认为 CRP 是区别细菌性感染和病毒性感染的有用指标。CRP 为 8 mg/L 通常可认为是两者的分界点,细菌性感染者 CRP > 8 mg/L,病毒性感染者则很少超过 8 mg/L。

2.6 在器官移植中的应用 Richard 等认为术前 CRP 水平是惟一能预测移植肾发生排斥的独立危险因素,用于监测排斥反应,CRP 有重要价值。亦有报道肾移植 CRP 于术后第 2 天迅速上升达峰值,然后迅速下降,并始终维持低值者多不发生急性排斥。CRP 始终处于较低水平,表明免疫抑制剂治疗方案正确。若 CRP 浓度无明显下降或下降后再度升高,则多会发生急性排斥反应,发生排异反应时血清 CRP 水平持续升高^[16]。但感染也可发生 CRP 升高,要注意两者鉴别。

2.7 CRP 的检测方法及影响因素 CRP 的检测方法有单向免疫扩散法、胶乳凝集法、酶联免疫吸附法、速率散射比浊法等,其原理都是利用特异抗-CRP 抗体与检样中 CRP 反应,根据形成的沉淀环直径、沉淀峰高度、凝集程度或呈色程度,判定检样中 CRP 含量,定量标准多认为应小于 10 mg/L。血清 CRP 主要受炎性反应影响,其在血液中浓度一般相对稳定,不受放疗、化疗、皮质激素治疗影响。用 CRP 诊断感染时,应注意其局限性:(1)CRP 为一种非特异蛋白,有很多因素(如损伤出血)使其升高;(2)CRP 由肝脏产生,当肝脏严重损害时其增高可不明显;(3)可有假阳性;(4)病毒感染时 CRP 可不升高。目前,由于 WHO 的国际标准的建立,血清 CRP 测定已成为一种高精度、高灵敏度、易实行的检测方法。近年发现,检测血清 CRP 水平对 UA 的发病及预后判断是一种既灵敏又具有高特异性的实验室检测指标。

参考文献

- [1] 李庆,苏宝鑫,李淑翠.特定蛋白的临床应用及进展[J].齐鲁医学检验,2002,13(1):1-3.
- [2] Roberts WL, Sedrick R, Moulton L, et al. Evaluation of four automated high-sensitivity C-reactive protein methods: implications for clinical and epidemiological applications[J]. Clin Chem, 2000, 46(4): 461-468.
- [3] 宋丽萍. C-反应蛋白的生物学特征[J]. 中国实验临床免疫学杂志, 1999, 8(6): 43-46.
- [4] 康格非. 临床生物化学和生物化学检验[M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1998: 15-16.
- [5] 黄小兵, 冯丽春, 覃志坚, 等. 血清 CRP 作为感染性标志物的临床应用研究[J]. 右江民族医学院学报, 2002, 24(2): 271-272.
- [6] 巫向前. 临床检验结果评价[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1999: 450-451.
- [7] 杨卫东. 外科手术中 CRP 检测应用的探讨[J]. 赣南医学院学报, 2001, 21(1): 52-53.
- [8] Rohde LE, Hennekens CH, Ridker PM. Survey of C-reactive protein and Cardiovascular risk factors in apparently healthy men[J]. Am J Cardiol, 1999, 84(9): 1018-1022.
- [9] 宋长广. 急性心梗患者检测 CRP 的临床意义[J]. 现代检验医学进展, 2000, 11(4): 34-35.
- [10] Yu H, Rifai N. High-sensitivity C-reactive protein: a novel and promising marker of coronary heart disease[J].

- Clin Chem, 2001, 47: 403-411.
- [11] 杨俊娟, 祖凌云, 孟磊, 等. C 反应蛋白与冠心病危险因素及冠状动脉病变的相关分析[J]. 中国介入心脏病学杂志, 2002, 10(4): 25-27.
- [12] 陆青, 杨海敏. 全血 CRP 测定仪及试剂评估[J]. 上海医学检验杂志, 1999, 14(5): 268-269.
- [13] 洪蕾. 妇科感染中血清 CRP 测定的研究[J]. 江苏医学, 1995, 21(1): 22-24.
- [14] Jaye DL, Waites KB. Clinical applications of C-creative Protein in pediatrics pediater[J]. Infect Dis J, 1997, 16(8): 735.
- [15] 魏书珍. 儿科疾病的临床检验[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1995: 679-681.
- [16] 田军, 刘德琮. 肾移植患者血清中多项免疫参考的动态观察[J]. 上海免疫学杂志, 1994, 10(6), 346-348.

(收稿日期: 2010-03-25)

基因诊断技术进展

巫晓芳 综述, 刘 充 审校(凉山彝族自治州第一人民医院急诊内科, 四川 西昌 615000)

【关键词】 基因诊断; 临床应用; 新进展

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2010. 20. 068

中图分类号: R446. 61

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2010)20-2287-02

基因诊断又称 DNA 诊断或分子诊断, 由于基因的功能与人类疾病密切相关, 通过分子生物学和分子遗传学技术, 直接检测分子结构水平或表达水平是否异常, 从而对疾病做出判断。基因诊断是继形态学、生物化学和免疫学诊断之后的第 4 代诊断技术, 它的诞生与发展得益于分子生物学理论和技术的迅速发展, 更多先进、简便的基因诊断方法也不断涌现。现将基因诊断中常用的分子生物学技术新进展综述如下。

1 基因诊断技术的应用

1.1 分子杂交技术^[1] 分子杂交技术包含核酸的分离与纯化、探针的制备和分子杂交 3 个步骤。分子杂交包括 Southern 杂交、Northern 杂交、Dot 杂交和 Western 杂交, 分别用于检测特定的 DNA、RNA 和蛋白质。Southern 杂交、Northern 杂交和 Dot 杂交也称核酸的分子杂交, 其基本原理是具有一定同源性的两条核酸单链在适宜的温度和离子强度下, 根据碱基互补的原则退火形成稳定的异源双链。杂交的过程是高度特异性的, 已知核酸片段作为探针并加以标记, 用于检测。Western 杂交又称免疫学测定, 它与核酸分子杂交的区别关键在于探针的性质, 用于 Western 杂交的探针多为单克隆或多克隆抗体, 是通过抗原抗体反应进行检测的。分子杂交技术可应用于基因克隆的筛选和酶切图谱的制作、基因组中特定序列的定量和定性检测、基因突变分析等方面。

1.2 PCR 技术 聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 又称体外基因扩增技术。PCR 的基本原理是人工合成一对 20~30 个核苷酸的寡聚引物。通过和靶 DNA 的变性处理, 在 DNA 聚合酶的作用下, 以靶 DNA 为模板, 合成引物之间的 DNA 片段。这个过程是由温度控制的, 所以 PCR 是一个在引物介导下反复进行热变性、退火、引物延伸 3 个步骤而扩增 DNA 的循环过程。而近些年来, PCR 技术不断发展, 各种方法层出不穷。例如强化 PCR、膜结合 PCR、锚定 PCR、错配 PCR、原位 PCR、彩色 PCR、反向 PCR、不对称 PCR、增效 PCR、定量 PCR 和重组 PCR 等^[1]。而 PCR 与其他技术相结合形成的新方法使 PCR 技术的实用性得到了延伸、补充和发展^[2]。

1.2.1 PCR 产物的限制性片段长度多态性分析 (PCR-RFLPs) 用 PCR 方法将包含待测多态性位点的 DNA 片段扩增出来, 然后用识别该位点的限制酶来酶解, 根据限制酶片段长度多态性分析作出诊断。

1.2.2 PCR 结合特异性寡核苷酸探针斑点杂交 (ASO) 根

据常见的突变体类型, 合成一系列具有正常序列和突变序列的等位基因特异性寡核苷酸和相应的引物, PCR 产物能与正常和突变探针均杂交者为杂合子, 仅与突变探针杂交者为纯合子, 健康人只与正常探针杂交。

1.2.3 PCR 结合单链 DNA 构象多态性 (SSCP) 在适当条件下, 单链 DNA 的电泳迁移率不仅与 DNA 的相对分子质量大小有关, 而且与其构象有关, 而单链 DNA 的构象又是由其碱基序列所决定的。双链 DNA 经变性成为单链 DNA, 在非变性聚丙烯酰胺凝胶中电泳, 由于碱基序列发生变化 (至少一个碱基的变化) 就可导致构型的改变, 使泳动速率发生改变, 从而将变异的 DNA 与正常 DNA 区分开来。

1.2.4 PCR 结合异源双链分析法 (HA) PCR 扩增产物经加热变性, 形成的 4 条单链 DNA 分子, 在低温下重新形成双链 DNA 分子时, 除原有 2 条同源 DNA 双链外, 还可因正常单链和异常单链序列基本相配而产生 2 条新的异源双链 DNA 分子。异源双链含有不配对区域, 二级结构与同源双链不同, 具有异常泳动特性, 在非变性凝胶上表现为与正常条带位置不同的异常带。

1.2.5 PCR 结合变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 当双链 DNA 在梯度变性的聚丙烯酰胺凝胶中进行到与 DNA 变性温度 (熔点) 一致的凝胶变性浓度位置时, DNA 发生解旋变性, 此时电泳速度迅速降低。而当解旋的 DNA 链中有一个碱基突变时, 将会影响其电泳速度变化的程度。用 DGGE 分析目的基因的 PCR 产物几乎可以检出所有突变。PCR 技术不仅可用于基因分离、合成、克隆和核酸序列分析, 还可用于突变体和重组体的构建、基因表达调控的研究, 在临床上广泛用于遗传病基因诊断、产前诊断、病原体的检测、肿瘤发病机制的探讨和法医鉴定等各个方面。

1.3 DNA 测序技术^[3] DNA 测序技术主要包括 Sanger 双脱氧链中止法和 Maxam-Gilbert 化学裂解法, 尤以前种方法常用。Sanger 双脱氧链中止法是用放射性同位素标记引物, 用双脱氧核苷酸终止 DNA 链的延伸, 产生长度不等的 DNA 片段, 再由高分辨力的聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 放射至显影读取结果。在各种筛选方法的敏感性和特异性受限时, DNA 测序无疑是突变分析的最重要方法。现在的直接测序方法用四色荧光标记代替了放射性同位素标记, 测序自动化程度大为提高, 操作简便, 但费用高昂。