

[2] Folkman J. Tumor angiogenesis; therapeutic implications [J]. *N Engl J Med*, 1971, 285(21): 1182-1186.

[3] Cao Y. Endogenous angiogenesis inhibitors and their therapeutic implications [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2001, 33(4): 357-369.

[4] Gupta MK, Qin RY. Mechanism and its regulation of tumor-induced angiogenesis [J]. *World J Gastroenterol*, 2003, 9(6): 1144-1155.

[5] Liekens S, De Clercq E, Neyts J. Angiogenesis; regulators and clinical applications [J]. *Biochem Pharmacol*, 2001, 61(3): 253-270.

[6] Tandle A, Blazer DG, Libutti SK. Antiangiogenic gene therapy of cancer; recent developments [J]. *J Transl Med*, 2004, 2(1): 22-42.

[7] Marneros AG, Olsen BR. The role of collagen-derived proteolytic fragments in angiogenesis [J]. *Matrix Biol*, 2001, 20(5-6): 337-345.

[8] Sottile J. Regulation of angiogenesis by extracellular matrix [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1654(1): 13-22.

[9] O'Reilly MS, Hahngren L, Shing Y, et al. Angiostatin; a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma [J]. *Cell*, 1994, 79(2): 315-328.

[10] Moser TL, Kenan DJ, Ashley TA, et al. Endothelial cell surface F1-FO ATP synthase is active in ATP synthesis and is inhibited by angiostatin [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(12): 6656-6661.

[11] Chen YH, Wu HL, Chen CK, et al. Angiostatin antagonizes the action of VEGF-A in human endothelial cells via two distinct pathways [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 310(3): 804-810.

[12] Volpert OV, Zaichuk T, Zhou W, et al. Inducer-stimulated Fas targets activated endothelium for destruction by anti-angiogenic thrombospondin and pigment epithelium-derived factor [J]. *Nat Med*, 2002, 8(4): 349-357.

[13] Panka DJ, Mier JW. Canstatin inhibits Akt activation and induces Fas-dependent apoptosis in endothelial cells [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(39): 37632-37636.

[14] Cao Y. Endogenous angiogenesis inhibitors and their therapeutic implications [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2001, 33(4): 357-369.

[15] O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, et al. Endostatin; an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth [J]. *Cell*, 1997, 88(2): 277-285.

[16] Sudhakar A, Sugimoto H, Yang C, et al. Human tumstatin and human endostatin exhibit distinct antiangiogenic activities mediated by alpha v beta 3 and alpha 5 beta 1 integrins [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(8): 4766-4771.

[17] Urbich C, Reissner A, Chavakis E, et al. Dephosphorylation of endothelial nitric oxide synthase contributes to the anti-angiogenic effects of endostatin [J]. *FASEB J*, 2002, 16(7): 706-708.

[18] Kim YM, Jang JW, Lee OH, et al. Endostatin inhibits endothelial and tumor cellular invasion by blocking the activation and catalytic activity of matrix metalloproteinase [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(19): 5410-5413.

[19] Dhanabal M, Ramehndran R, Waterman MJ, et al. Endostatin induces endothelial cell apoptosis [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(17): 11721-11726.

[20] Dixelius J, Larsson H, Sasaki T, et al. Endostatin-induced tyrosine kinase signaling through the Shb adaptor protein regulates endothelial cell apoptosis [J]. *Blood*, 2000, 95(11): 3403-3411.

[21] Abdollahi A, Hahnfeldt P, Maercker C, et al. Endostatin's antiangiogenic signaling network [J]. *Mol Cell*, 2004, 13(5): 649-663.

[22] Cavazzana-Calvo M, Thrasher A, Mavilio F. The future of gene therapy [J]. *Nature*, 2004, 427(6977): 779-781.

(收稿日期: 2011-05-30)

同型半胱氨酸检测在临床上的应用

史亚红 综述, 徐翠杰 审校(甘肃省定西市医院检验中心 743000)

【关键词】 同型半胱氨酸; 高同型半胱氨酸血症; 临床应用

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2012. 01. 032 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2012)01-0058-03

同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)又称高半胱氨酸,是一种与半胱氨酸同系的含硫非必需氨基酸,是蛋氨酸循环的正常代谢产物,人类不能从食物中直接获得,只有蛋氨酸在体内代谢后形成。健康成人血浆 Hcy 浓度为 5~15 μmol/L,儿童明显低于成人。随着年龄的增长,血浆 Hcy 浓度逐渐增加^[1]。由于高 Hcy 血症在动脉粥样硬化和血栓栓塞性疾病的发生中起重要作用,一直以来被认为是心血管疾病的独立危险因素之一^[2]。近年来通过大量的研究表明,高 Hcy 还与肿瘤、老年性痴呆等其他疾病相关,从而使 Hcy 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 Hcy 及其影响因素

1.1 Hcy 是人体必需氨基酸——蛋氨酸的中间代谢产物,在体内主要以还原型,胱氨酸(氧化型),高半胱氨酸-高半胱氨酸及高半胱氨酸-胱氨酸二硫化物混合氧化型等形式存在,在血浆中约 70%与清蛋白结合成为结合型 Hcy,通常所指的是总的 Hcy 浓度。

正常情况下 Hcy 的代谢途径有 3 条^[3]: (1)再甲基化途径。以维生素 B₁₂为辅助因子,在蛋氨酸合成酶作用下,由亚甲基四氢叶酸为甲基供体,再甲基化形成蛋氨酸,这一过程在任

何组织中均可发生。其替代途径局限于肝细胞内,以甜菜碱为甲基供体,在甜菜碱 Hcy 转换酶催化作用下完成蛋氨酸合成。(2)转硫化途径。以维生素 B₆ 为辅助因子,由胱硫醚 B 合成酶催化和丝氨酸缩合形成胱硫醚。(3)直接释放到细胞外基质。Hcy 释放到细胞外基质是处理细胞内 Hcy 的途径之一,与细胞内蛋氨酸途径密切相关,细胞外 Hcy 的增加反映了其生成和代谢的紊乱。

1.2 血浆 Hcy 的影响因素

1.2.1 遗传因素 影响血浆 Hcy 的遗传因素主要包括 3 种:

(1)亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)基因多态性,MTHFR 基因突变已发现有十多种,最常见的是 C667T 点突变。有文献报道,C667T 点突变可引起 Hcy 升高,有促进血管损害的作用^[3]。(2)蛋氨酸合成酶基因多态性,Tsai 等发现 A2756G 突变纯合子个体空腹的 Hcy 水平较低。(3)CBS 基因多态性,有研究表明,CBS 基因先天性缺陷可引起严重的 Hcy 血症,而且合并高 Hcy 尿症,其发病率约 1/20 万^[4]。

1.2.2 营养因素 (1)维生素 B₁₂、B₆ 及叶酸作为辅酶参与 Hcy 的代谢,他们的水平与 Hcy 水平呈负相关,但这 3 种物质缺乏时,可引起高 Hcy 血症。(2)长期大量饮酒可引起肝细胞蛋氨酸合成酶活性下降,从而造成高 Hcy 血症,而且酒量与 Hcy 水平呈负相关。(3)其他因素,如饮食中摄入过多的蛋氨酸、吸烟、饮用高咖啡饮品等,均可导致血浆 Hcy 浓度升高,而几种因素联合作用对血浆 Hcy 的影响明显大于各因素的单独作用。

1.2.3 性别、年龄与种族 Hcy 有随年龄增长而升高的趋势,并且男性大于女性,而女性 Hcy 含量在绝经前的水平较绝经后低,可能与雌激素具有降低 Hcy 水平的作用有关^[5]。相同生活条件下黑人与白种人空腹 Hcy 水平无明显差异^[4],但黑种人蛋氨酸负荷后的 Hcy 水平升高低于白种人,补充复合维生素后白种人蛋氨酸负荷后的 Hcy 升高水平下降,而黑种人无明显改变。

1.2.4 药物的影响 能引起 Hcy 增高的药物有一氧化氮、避孕药、抗癫痫药、茶碱及烟酸等,其机制主要是通过干扰叶酸和含硫氨基酸代谢导致 Hcy 一过性增高;青霉胺可引起血浆 Hcy 浓度降低。

2 Hcy 的检测

2.1 标本 由于血液离体后,红细胞仍可不断释放 Hcy 到细胞外液中,因此一般研究均以测定血浆标本为主。

2.2 方法 最早测定 Hcy 采用的是氨基酸分析法,目前 Hcy 检测的常规方法是高效液相色谱技术(HPLC)和荧光偏振免疫检测(FPLA)^[6]。HPLC 试剂稳定性较差,操作复杂且需要专业技术人员,而 FPLA 虽然灵敏度高,检测速度快,但试剂价格昂贵,分析成本高,临床推广难度大。近年来由于全自动生化分析仪的大量普及,适用于生化分析仪的循环酶法 Hcy 测定试剂盒也陆续推出,这有利于 Hcy 的常规检测。有研究表明,循环酶法和 FPLA 的检测结果是一致的^[7]。

3 高 Hcy 血症与疾病的关系

3.1 高 Hcy 血症与心血管病的关系 1969 年 McCully 和 Wilson 在尸检时发现,血浆中 Hcy 浓度超过健康人几十倍的患者在儿童时期就发生包括动脉粥样硬化在内的致命性心血管系统病变。多年来的动物试验及临床研究不断证实,Hcy 是心血管疾病死亡的独立危险因素之一。研究显示,血浆 Hcy 每增加 5 μmol/L,相当于胆固醇增加 0.5 mol/L 造成的危害。血浆总 Hcy 水平每增加 5 μmol/L,则冠心病危险性男性增加

60%,女性增加 80%,相对危险性男性 1.6,女性 1.8,外周血管疾病危险性增加 6.8 倍^[1]。金军英等^[8]报道,冠心病合并高血压组、单纯性冠心病组、单纯性高血压组中 Hcy 浓度均显著高于健康对照组,其中冠心病合并高血压组最高,其次是单纯性冠心病组,单纯性高血压组最低。

3.2 Hcy 与青年脑梗死的关系 青年脑梗死指 45 岁以下的青年人出现的缺血性脑血管病,多为脑血栓形成或脑栓塞。亚洲人群平均发病率约为 3%~5%,国内报道为 4.4%~15.9%^[9]。早在 1969 年 McCully 即推断高 Hcy 血症是导致动脉硬化和血栓性疾病的原因^[10]。李保华等^[11]研究表明血浆 Hcy 水平越高,颈动脉粥样硬化,狭窄程度越重,当 Hcy 浓度大于 15 μmol/L 时,发生脑梗死的危险性为健康人的 5.909 倍,当 Hcy 浓度大于 20 μmol/L 时,发生脑梗死的危险性为健康人的 10.545 倍。高 Hcy 血症致脑梗死的确切机制尚不十分清楚,可能是高 Hcy 可促使氧自由基生成,引起血管内皮细胞损伤和毒性作用,自由基氧化物阴离子产生使一氧化氮失活,内皮生成的主要血管舒张因子的失活导致血管收缩,血小板聚集以及单核细胞黏附,这些因素的升高可能是易患脑血管病的机制之一。氧化也可以产生自由基和过氧化氢,加速低密度脂蛋白的氧化,增加泡沫细胞形成,促进动脉平滑肌细胞的增生,促使血管内皮增厚,导致闭塞性脑血管疾病的发生,促使血栓的形成。另外 Hcy 水平增高可能参与了高血压的发生与发展,并可能与脂蛋白 Lp(a)之间存在一定相关性,使患者极易发生脑梗死^[12]。

3.3 高 Hcy 血症与老年痴呆的关系 庄爱霞等^[13]研究显示,血管性痴呆组 Hcy 水平显著高于非痴呆梗死组,同时不同程度血管性痴呆组之间 Hcy 水平差异亦有统计学意义,说明高 Hcy 血症与血管性痴呆的发生和发展有关。高 Hcy 血症可能通过对脑血管的损害及对神经细胞的毒性两方面作用引起血管性痴呆。

3.4 Hcy 水平与其他疾病的关系 近年来发现 Hcy 水平也与肾功能损害、甲状腺功能低下、糖尿病、免疫性疾病、肿瘤等疾病有一定的关系,但这方面的研究还有待进一步深入^[14]。

4 关于高 Hcy 血症的控制措施

治疗高 Hcy 血症应考虑 3 方面的问题:(1)抑制 Hcy 的生成。(2)促进 Hcy 的代谢。(3)对抗 Hcy 的作用。很多研究表明,合理补充叶酸、维生素 B₆、B₁₂ 可有效降低 Hcy 水平。原因可能在于叶酸、维生素 B₁₂ 联合应用能使 Hcy 沿更多途径进行代谢,从而使浓度降低。但在补充的同时需注意以下几点:(1)长期服用大剂量叶酸会干扰铊的代谢。(2)长期应用叶酸治疗的老年患者需检测维生素 B₁₂ 水平。(3)肾病晚期,即使增量服用叶酸,仍不可能使 Hcy 水平降至正常。(4)同时服用拮抗叶酸药物的患者,其叶酸剂量亦需相应增加。

综上所述,由于高 Hcy 血症与多种疾病有密切的关系,因此临床更应尽早开展 Hcy 的常规检查,及早发现高 Hcy 血症,并予以治疗,从而减少脑梗死、老年性痴呆等疾病的发生。

参考文献

- [1] 石蕴琦,张静生,李彤.同型半胱氨酸的致动脉粥样硬化作用[J].中国医学工程,2008,16(1):63-66.
- [2] 王立新,何青芳,俞敏.同型半胱氨酸与高血压的相关性研究[J].中国预防医学杂志,2008,9(5):416-417.
- [3] 荆炳霞,马云宝.Hcy 的基础及临床研究进展[J].放射免疫学杂志,2008,21(2):163-166.

[4] 郭玲, 王丽华. 同型半胱氨酸与原发性高血压相关性研究[J]. 社区医学杂志, 2008, 6(9): 32-34.

[5] 汤群, 陆国平, 吴春芳, 等. 同型半胱氨酸与叶酸、维生素 B₁₂ 及维生素 B₆ 的关系[J]. 中华心血管病杂志, 2004, 32(9): 812-815.

[6] 王宇. 血浆同型半胱氨酸临床常用检测方法 & 影响因素[J]. 检验医学与临床, 2010, 7(24): 2808-2810.

[7] 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): 199-202.

[8] 金军英, 杨晓伟, 王树清. 高血压、冠心病患者同型半胱氨酸的测定分析[J]. 中国实用医药, 2008, 3(6): 67-68.

[9] 周麦菊, 张健莉. 158 例青年人脑梗死临床分析[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2005, 3(3): 273-274.

[10] 尤克, 陈哲萌, 杨柳, 等. 青年高血压合并脑梗死与高同型

半胱氨酸血症关系的探讨[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2008, 11(1): 67-68.

[11] 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, 9(1): 8-10.

[12] 赵建荣, 黄宇玮, 茆亦一, 等. 高血压病患者血浆同型半胱氨酸与血脂关系研究[J]. 大家健康, 2007, 5(1): 5-6.

[13] 庄爱霞, 刘华, 葛中林. 高同型半胱氨酸血症与血管性痴呆相关性研究[J]. 脑与神经疾病杂志, 2008, 16(3): 200-201.

[14] 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(14): 1151-1152.

(收稿日期: 2011-05-18)

原发性肝癌的分子诊断

董良仓¹ 综述, 柴 丽[△] 审校 (1. 河北省三河市燕达国际医院检验科 065201; 2. 河南省通许县人民医院检验科 475400)

【关键词】 肝癌; 诊断; 分子

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2012. 01. 033 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2012)01-0060-03

全世界每年新发现的恶性肿瘤患者约 635 万例, 肝癌 26 万例, 其中 42.5% 发生在中国。肝脏原发肿瘤中 90% 以上为恶性肿瘤, 而原发性肝癌的发病率居肝脏恶性肿瘤之首, 是我国常见的恶性肿瘤之一, 其死亡率在消化道肿瘤中占第 3 位, 仅次于胃癌与食管癌。近年来, 随着分子生物学、细胞生物学和人类基因组学、蛋白质组学等基础学科向癌症研究领域的延伸, 肝癌分子诊断的研究取得了长足的进展, 下面简单介绍一下肝癌相关的分子诊断方法和分子诊断要点。

1 基因相关检测

1.1 癌症相关基因的检测 癌症相关基因传统上分为癌基因、抑癌基因、肿瘤转移基因、肿瘤转移抑制基因。在这些基因中有代表性的基因如 P21、P53、表皮生长因子受体、nm23、热休克蛋白 70 等, 这些基因有的直接介导癌症的发生、发展^[1], 有的可以分泌蛋白, 作为癌症的促进或抑制因子, 有的是作为“伴侣蛋白”介导癌蛋白构象成熟, 影响信号转导, 参与肝细胞的恶性转化。目前对这类基因的分子诊断方法很多, 可采用单链构象多态性分析 (PCR-SSCP)、核酸杂交技术、DNA 测序、等位基因特异性寡核苷酸 (PCR-ASO) 等方法进行, 也可采用各种印记方法进行相关检测^[2]。

1.2 基因甲基化的检测 DNA 甲基化能引起染色质结构、DNA 构象、DNA 稳定性及 DNA 与蛋白质相互作用方式的改变, 从而控制基因表达。DNA 的甲基化对维持染色体的结构、染色体的失活、基因印记和肿瘤的发生、发展都起着重要的作用。DNA 甲基化是一种表观遗传修饰, 它是由 DNA 甲基转移酶催化 S-腺苷甲硫氨酸作为甲基供体, 将胞嘧啶转变为 5-甲基胞嘧啶的一种反应, 在真核生物 DNA 中, 5-甲基胞嘧啶是唯一存在的化学性修饰碱基。CG 二核苷酸是最主要的甲基化位点, 它在基因组中呈不均匀分布, 存在高甲基化、低甲基化和非甲基化的区域, 在哺乳动物中 5-甲基胞嘧啶约占 C 总量

的 2%~7%^[3]。

检测基因甲基化的技术主要有 Sss I 甲基转移酶转移分析法, 免疫抗体分析技术, 甲基化敏感随机扩增 PCR 技术 (MSP), 高效液相层析, 探针杂交法, DNA 微阵列法等。

有学者采用 MSP 研究肝癌患者 92 个基因的甲基化谱, 发现 32 个基因甲基化频率发生了改变。其中肝癌早期相关基因有硫酸软骨素蛋白多糖 (CSPG) 2、OXCT、周期蛋白 (cyclin) A1、Ras 相关区域家族 1A (RASSF1A) 等 14 个, 肝癌晚期相关基因有 DBCCR1、PENK、IRF7、GSPT1 等 9 个。部分甲基化基因可能成为肝细胞癌诊断的潜在分子^[4]。

1.3 相关病毒的基因检测 大量研究发现, 肝癌的发生与乙型肝炎病毒 (HBV)、丙型肝炎病毒 (HCV) 等病毒的感染息息相关, 相当一部分的肝癌都是由这些病毒感染发展而来, 利用分子诊断的方法如核酸杂交、PCR、基因芯片等技术检测这些肿瘤相关病毒的基因, 也可以为肿瘤的诊断提供参考依据。HBV 的分子诊断方法目前主要是以 PCR 为主, 可采用普通 PCR、套式 PCR、荧光定量 PCR、竞争性 PCR、免疫杂交 PCR 等进行 HBV DNA 检测。HCV 一般是以检测 HCV RNA 为主。

2 肝癌相关标志物的检测

肿瘤相关标志物可分为两大类, 即血清肿瘤标志物和细胞肿瘤标志物, 血清标志物包括癌胚抗原类、酶类、激素类、糖蛋白类, 常见的肝癌的血清标志物有甲胎蛋白 (AFP)、γ-谷氨酰基转移酶 (GGT)、糖链抗原 125 (CA125) 等。细胞肿瘤标志物主要包括癌基因类和细胞表面抗原类两大类。这类物质在正常组织和良性疾病时几乎不产生或产量甚微, 它反映了肿瘤的发生、发展过程及肿瘤相关基因的激活或失活程度, 可在肿瘤患者组织、体液、排泄物中检测出来。此外, 在肿瘤的发生、发展过程中, 某些因子特异性低, 但是与肿瘤的发展相关, 也可用

[△] 通讯作者, E-mail: dongliangcang5856@163.com.