

• 临床检验研究论著 •

# 高血压脑出血患者脑脊液中游离 DNA 动态检测的意义

牛家峰<sup>1</sup>, 贾磊<sup>2</sup>, 李雪<sup>1</sup>, 厉宗祥<sup>2</sup>, 李庆<sup>1</sup>, 周德宝<sup>2</sup>

(山东省淄博市第一医院:1. 检验科;2. 神经外科, 山东淄博 255200)

**摘要:**目的 探讨高血压脑出血患者脑脊液中游离 DNA 的动态变化与组织损伤的关系。方法 54 例脑出血患者按照格拉斯哥昏迷分级(GCS)评分分为轻度 17 例,中度 21 例和重度 16 例,分别采集发病后 1、3、7、15 d 脑脊液 2 mL,提取游离 DNA,采用荧光定量 PCR 技术检测游离 DNA 水平。结果 脑出血组中游离 DNA 水平重度组显著高于轻度组和中度组;颅内压异常组高于正常组;颅内感染组高于非感染组。结论 脑脊液游离 DNA 水平对于诊断脑出血颅脑损伤有一定诊断价值,而且有助于监控术后并发症的发生。

**关键词:**游离 DNA; 脑出血; 脑水肿; 颅内感染

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.20.026

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)20-2779-03

## Significance of dynamic detection of free DNA in hypertensive cerebral hemorrhage

Niu Jiafeng<sup>1</sup>, Jia Lei<sup>2</sup>, Li Xue<sup>1</sup>, Li Zongxiang<sup>1</sup>, Li Qing<sup>1</sup>, Zhou Debao<sup>2</sup>

(1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Neurosurgery, Zibo Municipal

First People's Hospital, Zibo, Shandong 255200, China)

**Abstract: Objective** To study the relationship between the dynamic change of free DNA in cerebrospinal fluid (CSF) and the tissue injury in the patients with hypertensive intracerebral hemorrhage. **Methods** 54 cases of hypertensive intracerebral hemorrhage were divided into 3 groups according to the glasgow coma scale (including 17 mild cases, 21 moderate cases and 16 severe cases). 2 mL of CSF was collected for extracting free DNA on 1, 3, 7, 15 d after stroke onset. The free DNA level was measured by the fluorescent real-time PCR. **Results** The free DNA level in the severe group was significantly higher than that in the mild and moderate groups. The free DNA level in the abnormal intracranial pressure group was higher than that in the normal intracranial pressure group; the intracranial infection group was higher than the non-infection group. **Conclusion** The free DNA level has certain value for diagnosing the craniocerebral injury in hypertensive intracerebral hemorrhage and is conducive to monitor the occurrence of postoperative complications.

**Key words:** cell free DNA; intracerebral hemorrhage; brain edema; intracranial infection

游离 DNA 是细胞代谢、损伤、凋亡过程中释放到外周的细胞外 DNA,在创伤、肿瘤、产前诊断等疾病的诊断和预后判断等方面有重要意义。游离 DNA 水平与创伤或感染的严重程度相关,游离 DNA 是反映细胞病理变化一个敏感而特异的指标<sup>[1-4]</sup>。高血压脑出血是在原发性高血压病情况下发生的脑实质内出血,致死、致残率高,严重危害人类健康的常见病、多发病。急性占位效应和出血本身是对脑组织病理损害的主要因素,引流是行之有效的治疗方式,但术后可能会并发脑水肿或颅内感染,不利于受损组织恢复,甚至加重损伤<sup>[5]</sup>。本研究拟动态检测脑脊液中游离 DNA 水平,探讨脑脊液游离 DNA 与高血压脑出血术后病理变化关系。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 收集 2012 年 5 月至 2014 年 5 月在淄博市第一医院住院的 54 例脑出血患者,诊断条件均符合 1995 年全国第四次脑血管病学术会议通过的高血压脑出血诊断标准,并经 CT 确诊,其中男性 38 例,女性 16 例,年龄 41~75 岁,平均 57.55 岁,均为发病 24 h 内入院者。留取脑积水患者脑脊液标本 9 例,头皮下血肿 8 例,共 17 例作为对照组,其中男性 10 例,女性 7 例,年龄 35~75 岁,平均 51.25 岁。以国家卫生部颁布的《医院感染诊断标准(试行)》为依据,将患者分为颅内感

染组和非感染组。

**1.2 仪器与试剂** 提取脑脊液游离 DNA 的试剂盒由上海浩源生物有限技术公司提供。标准品重组质粒 DNA 由中山大学达安基因股份有限公司合成。MX3000P 荧光定量检测仪器由美国安捷伦公司生产。

**1.3 方法** 采集患者血肿引流术后 1、3、7、15 d 脑脊液各 2 mL,EDTA 抗凝,3 000 r/min 离心 10 min,吸取上清液于 1.5 mL 离心管中,16 000 r/min 离心 10 min,吸取上层无细胞血浆 200 mL,充分混匀后于一 20 ℃ 保存备用。采用磁珠法提取脑脊液游离 DNA,紫外分光光度计检测游离 DNA 的提取效率,选取合适的游离 DNA 浓度(30 ng/μL)进行下一步实验。根据天根公司 SYBR Green Real time PCR 试剂盒的流程进行操作,采用看家基因 β-actin 为目的基因,引物序列 FP:5'-GGA CCT GAC TGA CTA CCT CAT GAA -3';RP:5'-CTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC C-3',由上海生工生物工程公司合成。标准品重组质粒 DNA 的定量浓度(copy/mL)为 10<sup>4</sup>、10<sup>5</sup>、10<sup>6</sup>、10<sup>7</sup>。循环条件为:40 个循环 93 ℃ 预变性 2 min,93 ℃ 变性 30 s,55 ℃ 退火 1 min,72 ℃ 延伸 30 s,40 个循环。MX3000P 进行实时荧光定量检测,并作熔解曲线分析,并以 1 拷贝双链 DNA=3.3×10<sup>-3</sup> ng 计算 DNA 浓度<sup>[4]</sup>。

1.4 统计学处理 应用 SPSS 13.0 统计软件, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用 *t* 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

2.1 脑出血患者脑脊液中 DNA 水平比较 不同程度脑出血患者 24 h 内, 游离 DNA 检测结果显示, 与对照组相比, 轻、中度出血组血浆和脑脊液游离 DNA 水平均未见显著升高, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。重度出血组显著高于中、轻度组以及对照组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 且脑脊液水平高于血浆水平。见表 1。

表 1 脑出血患者脑脊液中 DNA 水平比较 (ng/mL,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	脑脊液游离 DNA	血浆游离 DNA
对照组	22	12.52 ± 0.81	20.31 ± 6.66
轻度组	21	17.33 ± 6.35	26.38 ± 11.87
中度组	17	21.65 ± 11.37	55.48 ± 21.88
重度组	16	297.21 ± 71.11*	189.17 ± 53.67*

\*:  $P < 0.05$ , 与对照组、轻度组、中度组比较。

2.2 脑室引流术后脑水肿期脑脊液游离 DNA 水平比较 5 例重症脑出血患者脑室引流术后效果欠佳者, 颅内压波动明显, 比较水肿高峰期患者脑脊液显示, 游离 DNA 水平高于颅内压正常组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见表 2。

表 2 脑室引流术后脑水肿期脑脊液游离 DNA 水平 (ng/mL,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	颅内压	脑脊液游离 DNA
颅内压正常组	11	< 2 kPa	36.33 ± 21.35
颅内压异常组	5	> 2 kPa	88.65 ± 30.37*

\*:  $P < 0.05$ , 与颅内压正常组比较。

2.3 脑室引流术后并发颅内感染脑脊液游离 DNA 水平 11 例并术后颅内感染患者脑脊液游离 DNA 水平动态变化显示, 术后 5~7 d 并发颅内感染后游离 DNA 水平较术后 24 h 显著提高, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 两周感染控制后, 游离 DNA 水平较感染期显著下降, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见表 3。

表 3 脑室引流术后并发颅内感染脑脊液游离 DNA 水平 (ng/mL,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	1 d	7 d	15 d
非感染组	9	121.76 ± 88.17	23.3 ± 0.8	3.69 ± 2.35
感染组	11	119.85 ± 73.12*	1869.42 ± 511.40 ± 18.15*	

\*:  $P < 0.05$ , 与非感染组比较。

## 3 讨 论

游离 DNA 是一种无细胞状态的细胞外 DNA, 存在于血液、滑膜液等体液中, 主要由单链或双链 DNA 以及二者混合物组成。健康者细胞代谢、外周循环中含有一定水平的游离 DNA。动物实验显示, 中毒、应激、炎症等病理状态下, 细胞因凋亡坏死迅速释放 DNA、酶类等细胞内容物进入血液循环, 游离 DNA 水平的改变是反映细胞病理变化敏感而特异的指标<sup>[3]</sup>。芬兰科研人员对 255 例严重脓毒症或脓毒性休克患者血浆游离 DNA 水平进行分析发现: 脓毒症及危重病患者血浆

游离 DNA 水平增高并与患者的器官功能障碍和疾病严重程度有关, 死亡患者入院时及入院 72 h 后血浆游离 DNA 水平均高于存活者, 入院时血浆游离 DNA 水平可以作为预测重症监护病房患者病死率的独立指标。国内研究表明, 多器官功能障碍综合征患者外周循环中, 游离 DNA 24 h 内迅速升高, 并持续数日, 同时伴有降钙素原、C 反应蛋白、肿瘤坏死因子等炎症因子的升高。这表明, 游离 DNA 可以作为患者多器官系统损伤的监测指标。最近研究发现脑出血患者脑脊液中也出现类似的炎症因子水平变化, 并与病情变化和转归有关<sup>[5-7]</sup>。同时, 还有研究发现颅脑外伤情况下, 外周循环中游离 DNA 在急性期迅速升高并与损伤严重程度密切相关。这提示脑脊液微环境中游离 DNA 水平可能发生变化, 而且这一变化可能反映并参与了脑细胞进一步的病理损伤变化。

脑出血是危害人类健康的常见病、多发病, 以发病率高、致残率高、病死率高而著称, 致残和死亡原因主要为急性颅内血肿的占位效应和出血本身对脑组织及血管引起的一系列病理损害。在脑出血起病急、脱水保守治疗效果欠佳情况下, 引流等手术方式是迅速减少占位和溶血后炎症物质对脑组织损伤的有效方式。尽管影像学检查可评估手术效果, 但却不能反映出出血和手术自身对脑细胞的损伤程度<sup>[2]</sup>。有研究发现, 在手术后 24 h 内, 轻、中度出血患者, 脑脊液游离 DNA 较对照组有所升高, 但两者间差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 这说明血肿被引流后, 降低了出血带来的损伤, 轻、中度患者细胞损伤差异已不明显, 游离 DNA 水平变化可能主要来自手术本身对脑组织的损伤。重症患者游离 DNA 在脑脊液和外周循环中均升高, 且脑脊液内浓度高于外周循环。溶血和组织细胞损伤均可引起游离 DNA 水平升高, 因此检测结果提示重症患者脑组织严重损伤同时伴有微环境中溶血所释放损伤性因子增加, 从而形成恶性循环加重脑组织损伤。脑出血术后脑脊液中游离 DNA 水平显示脑损伤程度, 术后持续升高提示预后不良。血浆中游离 DNA 水平则反映全身损伤程度, 同时监测有利于整体了解多器官病理变化。

脑出血术后常见颅内并发症为脑水肿和颅内感染。脑水肿是导致脑出血术后病情恶化和恶性循环形成的重要因素之一, 脑出血术后一般 3~5 d 达水肿高峰, 约 1 周开始减轻, 持续 2 周甚至更长时间。脑出血手术后, 通过引流及使用脱水剂, 水肿的压迫已经不是引起损伤的主要因素<sup>[8]</sup>。动物实验和临床研究中均发现, 中小量的脑出血本身并不引起颅内压显著升高, 而血肿周围组织水肿后出现的神经元变性坏死、神经髓鞘崩解、血脑屏障破坏等继发性神经元损伤才是引发严重后果的原因之一, 动态监测颅内压发现, 即使相同的格拉斯哥昏迷分级 (GCS) 评分, CT 表现相似患者, ICP 也可以差异很大<sup>[9]</sup>, 临床资料统计也发现如此, 这说明手术后临床表现以及影像学检查不能完全体现病理变化。而本研究发现, 颅内压异常组因干预措施实施使颅内压波动明显, 少数患者颅内压连续超出 2.5 kPa, 取颅内压高点时脑脊液, 检测游离 DNA 水平发现, 与颅内压持续正常组相比, 异常组游离 DNA 水平显著升高, 这说明水肿未有效控制, 神经细胞损伤持续存在。

颅内感染是神经外科术后致死、致残的严重并发症, 多伴有高血压、意识障碍、脑水肿、癫痫等症状, 国外报道颅脑手术后颅内感染的发生率为 1%~10%。术后 3~(下转第 2783 页)

嗜麦芽寡养单胞菌产生的各种酶能破坏目前所有的 β-内酰胺类抗菌药物,对碳青霉烯类抗菌药物达到 100.0% 耐药,并且不能被任何可利用的抑制剂灭活<sup>[11]</sup>。临床应根据药敏试验结果选用抗菌药物;(4)洋葱伯克霍尔德菌是一群天然的多重耐药菌,本组药敏试验证明其对阿米卡星、庆大霉素 100.0% 耐药。它可产生金属 β-内酰胺酶,可水解包括碳青霉烯类在内的一大类 β-内酰胺酶类抗菌药物,对阿米卡星和庆大霉素等氨基糖苷类药物天然耐药<sup>[12]</sup>; (5)脑膜炎败血黄杆菌可产生金属 β-内酰胺酶和超广谱 β-内酰胺酶,有多重耐药性<sup>[13]</sup>,药敏试验表明,除对头孢哌酮/舒巴坦、哌拉西林/他唑巴坦、替卡西林/克拉维酸的耐药率较低外,其余抗菌药物的耐药率均超过 75.0%。相关研究指出,治疗时可首选哌拉西林/他唑巴坦<sup>[14]</sup>。

由于非发酵菌高度耐药性给临床治疗带来了很大的困难,尤其对机体免疫功能低下的恶性肿瘤患者,该类细菌耐药性强,抗菌药物选择范围窄,治疗困难,临床应重视非发酵菌下呼吸道感染和耐药性监测,根据药敏试验结果并结合临床使用抗菌药物。

参考文献

[1] 陈建飞,杨军礼. 恶性肿瘤合并非发酵菌医院获得性感染临床特征及耐药性分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2012, 22(12): 3014-3016.  
 [2] 中华人民共和国卫生部. 医院感染诊断标准(试行)[J]. 现代实用医学, 2003, 81(7): 460-465.  
 [3] 叶应妩,王毓三,申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 3 版. 南京: 东南大学出版社, 2006: 827-836.  
 [4] Clinical Laboratory Standard Institute. M07-A8 methods for dilu-

tion antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically[S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2012.  
 [5] 刘媛,孙明月,王本祥,等. 临床非发酵革兰阴性杆菌感染的分布及耐药性分析[J]. 中华临床感染病杂志, 2012, 5(2): 112-114.  
 [6] 许斌,吴开进,高英,等. 恶性肿瘤患者医院内感染的分析[J]. 右江民族医学院学报, 2008, 30(1): 49-50.  
 [7] 吴庆,陆红,刘媚娜,等. 脑膜炎败血黄杆菌的临床分布及耐药性分析[J]. 实用医学杂志, 2008, 24(10): 1815-1816.  
 [8] 蒋雁,林奇龙,沈忠海,等. 下呼吸道非发酵菌感染的菌种分布及耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2011, 21(6): 1249-1251.  
 [9] 陈民钧,王辉. 中国医院内病原菌耐药监测网. 中国重症监护病房革兰阴性菌耐药性连续 7 年监测研究[J]. 中华医学杂志, 2003, 83(5): 375-381.  
 [10] Ying CM, Ling TK, Lee CC, et al. Characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Shanghai and Hong Kong[J]. J Med Microbiol, 2006, 55(6): 799-802.  
 [11] 彭青,李文芳,卓越,等. 嗜麦芽寡养单胞菌所产 L1 型金属 β 内酰胺酶的序列分析及原核表达[J]. 中国抗感染化疗杂志, 2005, 5(3): 156-159.  
 [12] 马静霞,黄志刚. 洋葱伯克霍尔德菌感染现状及耐药分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2011, 21(6): 1473-1475.  
 [13] 张金锋. 脑膜炎败血黄杆菌感染的危险因素及耐药性分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 20(9): 2218-2219.  
 [14] 石青峰,高玲. ICU 脑膜炎败血黄杆菌所致医院获得性感染的临床特征及耐药性分析[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(1): 27-28.

(收稿日期: 2014-06-18)

(上接第 2780 页)

7 d 是颅内感染的高发时间,手术本身使血脑屏障受到破坏,加上医源性因素使颅内感染的发生率明显升高。诊断金标准为脑脊液培养或涂片检出致病菌,但由于多数致病菌有自溶作用,且大多数患者在发生颅内感染前已预防使用了抗菌药物,致使细菌涂片与培养结果往往呈现阴性,国内统计数据显示阳性检出率不足 10%。临床诊断只能依靠临床表现、细胞计数、生化指标来判断<sup>[10]</sup>。动态监测手术后游离 DNA 变化,非感染组随患者逐渐恢复,脑脊液中游离 DNA 逐渐代谢至正常,而感染组患者感染发生时脑脊液游离 DNA 水平显著升高,随感染控制后,游离 DNA 水平显著降低。

总之,脑脊液是能够直接反映中枢神经系统病理变化的标本,动态监测脑脊液游离 DNA 水平变化,有助于了解神经细胞病理损伤情况,联合其他检测指标,可能成为特异性强、敏感度高的监测组合。

参考文献

[1] Kadam SK, Farmen M, Brandt JT. Quantitative measurement of cell-free plasma DNA and applications for detecting tumor genetic variation and promoter methylation in a clinical setting[J]. J Mol Diagn. 2012, 14(4): 346-356.  
 [2] Hall AL, Drendel HM, Verbrugge JL, et al. Positive cell-free fetal

DNA testing for trisomy 13 reveals confined placental mosaicism [J]. Genet Med. 2013, 15(9): 729-732.  
 [3] 彭亮,娄晓丽,侯彦强. 循环 DNA 的研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(18): 2424-2426.  
 [4] 王宏,潘世扬,徐建,等. 子宫颈疾病患者血浆循环 DNA 含量的研究[J]. 中华妇产科杂志, 2011, 46(7): 501-504.  
 [5] 王小亚,刘建新,杨喜民,等. 高血压脑出血患者血清和脑脊液胱抑素 C 动态监测的意义[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(16): 1895-1896.  
 [6] 付锐,项和平,杨刚琦,等. 降钙素、C 反应蛋白、肿瘤坏死因子、游离 DNA 对多发性患者发生多器官功能障碍综合征的预测价值[J]. 中华急诊医学杂志, 2013, 22(8): 850-853.  
 [7] 李清明,王家泗,舒仁明,等. 脑脊液 Glu、Lac 及 Cystatin C 联合检测在脑血管疾病中的临床价值探讨[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(5): 531-534.  
 [8] Nyquist P. Management of acute intracranial and intraventricular hemorrhage[J]. Crit Care Med. 2010, 38(3): 946-953.  
 [9] 吴雪海,胡锦涛,高亮,等. 重症神经外科患者的颅内压监测指征与规范化治疗[J]. 中华急诊医学杂志, 2013, 22(12): 1321-1323.  
 [10] 崔向丽,林松,隋大立,等. 神经外科术后颅内感染的诊疗进展[J]. 中华神经外科杂志, 2014, 30(3): 312-314.

(收稿日期: 2014-03-15)