

能利用 TNF- α 产品的抗肿瘤活性,同时避免其副作用,可以期待其对于血液病诊疗方面的巨大潜力。

参考文献

- [1] 秦卫松. 肿瘤坏死因子 α 拮抗剂的研究进展[J]. 国外医学:免疫学分册, 2005, 28(1): 24-27.
- [2] Yu M, Zhou X, Niu L, et al. Targeting transmembrane TNF- α suppresses breast Cancer growth[J]. Cancer Res, 2013, 73(13): 4061-4074.
- [3] 梁炳照, 方明. 恶性血液病患者血清 TNF α 的测定及其意义[J]. 广东医学, 2001, 22(12): 1165-1166.
- [4] Tsimberidou AM, Giles FJ. TNF-alpha targeted therapeutic approaches in patients with hematologic malignancies[J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2002, 2(3): 277-286.
- [5] 崔中光, 赵洪国, 汪洪毅, 等. 急性白血病患者血清 TNF- α 和 sIL-2R 的测定[J]. 齐鲁医学杂志, 2001, 16(2): 85-86.
- [6] Singer MK, Assem M, Abdel Ghaffar AB, et al. Role of TNF-alpha as a survival prognostic marker in chronic lymphocytic leukemia patients[J]. Egypt J Immunol, 2011, 18(1): 51-60.
- [7] Moon DO, Kim MO, Lee JD, et al. Rosmarinic acid sensitizes cell death through suppression of TNF-alpha-induced NF-kappaB activation and ROS Generation in human leukemia U937 cells[J]. Cancer Lett, 2010, 288(2): 183-191.
- [8] Ferrajoli A, Keating MJ, Manshouri T, et al. The clinical significance of tumor necrosis factor-alpha plasma level in patients having chronic lymphocytic leukemia[J]. Blood, 2002, 100(4): 1215-1219.
- [9] 李红, 王晓梅, 王巍. 多发性骨髓瘤患者血清 IL-6、TNF- α 的水平变化和临床意义[J]. 中国医药指南, 2013, 11(14): 252.
- [10] Jourdan M, Tarte K, Legouffe E, et al. Tumor necrosis factor is a survival and proliferation factor for human myeloma cells[J]. Eur Cytokine Netw, 1999, 10(1): 65-70.
- [11] Tsubaki M, Komai M, Itoh T, et al. Inhibition of the tumour necrosis factor-alpha autocrine loop enhances the sensitivity of multiple myeloma cells to anticancer drugs[J]. Eur J Cancer, 2013, 49(17): 3708-3717.
- [12] Maiga S, Gomez-Bougie P, Bonnaud S, et al. Paradoxical effect of lenalidomide on cytokine/growth factor profiles in multiple myeloma[J]. Br J Cancer, 2013, 108(9): 1801-1806.
- [13] Lee C, Oh JI, Park J, et al. TNF α mediated IL-6 secretion is regulated by JAK/STAT pathway but not by MEK phosphorylation

and AKT phosphorylation in U266 multiple myeloma cells[J]. Biomed Res Int, 2013(3): 580135.

- [14] 哈力达·亚森, 郭新红, 阿丽亚·热哈提, 等. 淋巴瘤患者血浆 TNF- α 和 TNF- β 水平及其临床意义[J]. 中华血液学杂志, 2011, 32(10): 695-697.
- [15] Lech-Maranda E, Bienvenu J, Broussais-Guillaumot F, et al. Plasma TNF-alpha and IL-10 level-based prognostic model predicts outcome of patients with diffuse large B-Cell lymphoma in different risk groups defined by the International Prognostic Index[J]. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2010, 58(2): 131-141.
- [16] Purdue MP, Lan Q, Bagni R, et al. Prediagnostic serum levels of cytokines and other immune markers and risk of non-hodgkin lymphoma[J]. Cancer Res, 2011, 71(14): 4898-4907.
- [17] Pallavicini FB, Caporali R, Sarzi-Puttini P, et al. Tumour necrosis factor antagonist therapy and Cancer development: analysis of the LORHEN registry[J]. Autoimmun Rev, 2010, 9(3): 175-180.
- [18] Deepak P, Sifuentes H, Sherid M, et al. T-cell non-Hodgkin's lymphomas reported to the FDA AERS with tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) inhibitors: results of the REFURBISH study [J]. Am J Gastroenterol, 2013, 108(1): 99-105.
- [19] 高海丽, 孙爱宁, 韩悦, 等. 异基因造血干细胞移植早期 TNF- α 、IL-1 β 、IFN- γ 改变的临床意义[J]. 中国实验血液学杂志, 2009, 17(5): 1321-1325.
- [20] Remberger M, Sundberg B. Cytokine production during myeloablative and reduced intensity therapy before allogeneic stem cell transplantation[J]. Haematologica, 2004, 89(6): 710-716.
- [21] Levine JE. Implications of TNF- α in the pathogenesis and management of GVHD[J]. Int J Hematol, 2011, 93(5): 571-577.
- [22] Levine JE, Paczesny S, Mineishi S, et al. Etanercept plus methylprednisolone as initial therapy for acute graft-versus-host disease [J]. Blood, 2008, 111(4): 2470-2475.
- [23] Couriel DR, Saliba R, de Lima M, et al. A phase III study of infliximab and corticosteroids for the initial treatment of acute graft-versus-host disease[J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2009, 15(12): 1555-1562.
- [24] Ferrara JL. Advances in the clinical management of GVHD[J]. Best Pract Res Clin Haematol, 2008, 21(4): 677-682.
- [25] Bayry J. New horizons in natural TNF- α antagonist research[J]. Trends Mol Med, 2011, 17(10): 538-540.

(收稿日期: 2014-04-08)

• 综 述 •

乙型病毒肝炎实验室诊断的分析和研究进展

邵 君 综述, 王伟佳 Δ 审校

(中山市人民医院检验医学中心, 广东中山 528400)

关键词: 肝炎; 乙肝病毒; 抗原抗体; 基因突变; 耐药

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2014. 20. 036

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)20-2801-04

乙型病毒性肝炎是由乙肝病毒(HBV)感染人体后引起的以肝脏慢性炎症性病变为主要改变的传染性疾病。目前正严重威胁着人类的健康,全球感染超过 3 亿人,中国也是乙型肝炎的高发区。HBV 是一个引起重症肝炎和肝癌的常见诱因。

HBV 的实验室诊断领域近年来也取得了很快的发展,各种新技术新项目的开展和应用为乙型病毒性肝炎的诊断提供了确切的依据。除了传统的血清学标志物(HBV-M)、前 S1 抗原(PreS1-Ag)、前 S2 抗原(PreS2-Ag)的检测还有核酸标志物

HBV DNA, 共价闭合环状 DNA (即 cccDNA) 以及 HBV 基因的分型和突变耐药的诊断。现如今越来越多的研究表明 HBV 的 X 基因的产物 X 蛋白 HBxAg 在肝癌 (HCC) 的风险预测中也起着重要的作用。各项指标相互结合在临床上对乙型肝炎的诊断及治疗预后的检测具有重大的意义。

1 血清学抗原抗体标志物

HBV 的 HBV-M 包括表面抗原 (HBsAg)、表面抗体 (HBsAb)、e 抗原 (HBeAg)、e 抗体 (HBeAb)、核心抗原 (HBcAg)、核心抗体 (HBcAb) 以及 PreS1-Ag 的检测。目前乙肝两对半定性定量均有检测, 定量检测能更好地说明病毒的感染性和复制程度, 对疾病的诊断和控制更有意义。

1.1 HBsAg 和 HBsAb HBsAg 是 HBV 感染的标志。刘小壮等^[1]对乙肝 HBsAg 大蛋白质和 HBV DNA 的相关性做了 200 份样本的回顾性分析, 结果表明乙肝 HBsAg 大蛋白质与 HBV DNA 具有良好的相关性。但也有学者表示相关性相对较弱, 只能作为乙肝的诊断指标, 不能说明病毒的复制过程及感染强度。对于目前的结论还未得到明确的说法, 还缺乏更多的前瞻性研究和随访的调查。俞秀丽等^[2]研究表明 HBsAg 定量与 HBV DNA 之间的相关性是显著的, HBsAg 的对数也是对肝脏纤维化有显著影响的变量。对于 HBsAg 的检测方法目前主要以酶联免疫吸附法 (ELISA) 定性试验为主。国内也有很多文献研究分析 ELISA 和电化学发光免疫法 (ECLIA) 在检测乙肝 HBsAg 的结果及临床应用价值上的比较。ECLIA 法比 ELISA 法灵敏度更高, 临床上具有更重要的应用价值^[3]。

HBsAb 是乙肝患者在急性感染恢复期或直接注射乙肝疫苗所产生的具有保护型的中和抗体。急性感染恢复期患者一般是从 HBsAg 转阴后 HBsAb 开始出现阳性。当血中 HBsAb 水平大于 10IU/L 时对同型病毒的再感染具有保护性, 一般可持续数年。HBsAb 阳性也是疫苗接种成功的标志。

1.2 HBeAg 和 HBeAb HBeAg 生物学功能尚未完全确定, 可能主要发挥的是免疫调节作用, 诱导免疫耐受^[4]。HBeAg 的定量检测准确性高于 HBV DNA, 若在治疗期间定期进行 HBeAg 的定量检测可以及时预测疗效以及优化治疗方案。Fried 等^[5]对 800 例慢性乙型肝炎的 HBeAg 阳性患者进行研究, 发现无论治疗前、治疗 12 周或 24 周 HBeAg 定量检测值较低组的血清学转换应答率均高于 HBeAg 定量检测值较低组。也有文章显示, HBeAg 与 HBV 复制有一定的相关性, 但不能只根据 HBeAg 的检测结果来指导临床治疗。邓乐等^[6]研究发现, HBeAg、PreS1-Ag、PreS2-Ag 的联合检测能更好地判断 HBV 的感染和复制情况。三项联合相关性高于任意两项联合高于单项检测。HBeAb 不属于保护性抗体, 出现标志着治疗有效, 病毒复制处于被压抑阶段, 感染性下降, 疾病处于恢复期。但也有 HBeAb 阳性病毒仍然处于复制活跃期, 因考虑病毒突变的可能。

1.3 HBcAg 和 HBcAb HBcAg 存在于 Dane 颗粒的核心, 血清中水平很少难以检测。HBcAg 具有较强的免疫原性, 刺激机体产生大量的 HBcAb, 一般可以检出。故一般的乙肝两对半检测以 HBcAb 来说明 HBcAg。有研究显示, 在慢性病毒性肝炎患者肝组织发生的损伤性免疫应答中, HBcAg 的表达与病毒的复制有关, 可能 HBcAg 是肝脏免疫损伤中的靶抗原^[7]。同时检测肝组织中的 HBcAg 和 HBV DNA 有较好的临床指导意义。有报道显示, Kimura 等^[8]建立了特异度检测 HBcAg 的化学发光试剂, 检测下限达 4pg/ml, 但由于使用的

捕获性抗体可同时识别 HBeAg 和 HBcAg, 故 Suzuki 等^[9]认为血清 HBcrAg (HBV 核心相关抗原, 是 HBeAg 和 HBcAg 两者的合称) 可用于监测肝内 HBV 的状态^[10]。HBcAb 在血液中的出现早于 HBsAb, 早期的 HBcAb 以免疫球蛋白 M (IgM) 为主。在急性病毒性肝炎 HBsAg 转阴和慢性病毒性肝炎的治疗期间, 从 HBsAg 的消失到 HBsAb 出现期间有一段间隔期, HBcAb IgM 则作为感染的唯一标识。随后产生免疫球蛋白 G (IgG) 类抗体, 不属于保护性抗体, 只要感染过 HBV 此抗体均为阳性, 无论病毒是否被清除, 可持续存在数年。两对半检测中 HBcAb 单项阳性可能有胎盘垂直传播引起。

1.4 PreS1-Ag PreS1-Ag 是主要存在于 Dane 颗粒和管型颗粒上的又 108 或 119 个氨基酸残基组成的肽段, 具有高度的免疫原性, 可与肝细胞膜上的 HBV PreS1-Ag 受体结合而导致感染。其第 21~47 位氨基酸为肝细胞膜的受体, HBV 可通过这一受体黏附到肝细胞膜上从而进入肝细胞, 即使是变异病毒, 只要这一区完好就具有传染性^[11]。PreS1-Ag 常在 HBV 感染早期出现, 1 个月左右消失, 若持续存在表示转为慢性。因此 PreS1-Ag 在 HBV 的感染、复制、刺激机体产生免疫反应方面有重要的意义, 也是血清传染性的又一重要指标^[12]。PreS1-Ag 阳性提示 HBV 复制活跃, 传染性较强, PreS1-Ag 阴性可作为 HBV 被清除和感染趋于恢复, 病情趋向好转的标志。不过也有文章报道, 要注意 PreS1-Ag 的突变对结果带来的影响。

1.5 PreS2-Ag PreS2-Ag 是 HBV 基因 S 区的前 S2 基因编码蛋白质。和 PreS1-Ag 一样主要存在于 Dane 颗粒和管型颗粒上。PreS2-Ag 外膜蛋白上存在多聚人血清清蛋白结合位点, 具有吸附于肝细胞受体的决定簇^[13]。PreS2-Ag 的抗原性比 HBsAg 的抗原性更强, 作为反映 HBV 具有传染性和复制的标志物具有很高的特异度。有文章表示, PreS2-Ag 对 HBV 复制和感染的灵敏度优于 HBeAg^[14], 和 PreS1-Ag 的连续监测对 HBV 感染和复制的判断以及抗病毒疗效和病情预后的动态观察有重要的意义^[15]。

2 乙型肝炎病毒 X 抗原 (HBxAg)

HBV 有 4 个开放性读码框架, 其中最小的读码框架编码 HBV X 蛋白 (HBx)。大量研究表明 HBxAg 的表达主要与 HCC 具有良好的相关性, 与慢性 HBV 感染的发生发展也有密切的关系, 故在此提及。HBx 具有反式作用, 通过与宿主相互作用从而影响病毒的转录与复制、信号传导以及细胞凋亡等^[16]。由于 HBxAg 具有反式激活功能, 同时还可与抑癌基因产物 P53 蛋白相互作用, 故可能具有抑制 HBV 复制的功能, 与慢性感染疾病的发生发展到肝细胞癌的形成有关^[17]。也可作为慢性感染发展到肿瘤的癌前诊断依据。

3 核酸标志物

3.1 HBV DNA HBV 基因组是不完全闭合环状双链 DNA。血清中的 HBV DNA 检测是诊断病毒性肝炎的金标准。对于急性乙肝来说 HBV-M 变化典型, HBV DNA 检测意义不大, 对于慢性感染的病毒性肝炎来说 HBV-M 变化不敏感, HBV DNA 的检测成为了有确诊价值的实验室指标, 也是诊断最直接的依据。有报道显示, 国内外均有人使用金纳米颗粒 HBV DNA 探针在检测 HBV DNA 的 PCR 产物, 不需要特殊仪器, 结果易于观察, 国内通过透射电镜直接检测乙肝患者血清中的 HBV DNA, 灵敏度可达 10^3 copy/mL^[18]。目前, HBV DNA 的检测主要用于慢性病毒性感染的确定性诊断, 是实验室乙型肝炎病毒各项标志物相关性的研究以及判断干扰素、核酸类药物对病毒性肝炎治疗的指导和疗效的重要指标。当由基因突变

导致的 HBsAg 阴性感染以及 HBeAg 转阴的免疫逃逸体内病毒感染和复制的程度无法确定时,HBV DNA 的检测就成了实验室诊断的唯一标准。

3.2 cccDNA 目前认为 HBV cccDNA 是 HBV 复制水平最特异的指标,但通过肝活检来监测患者肝组织中的 HBV cccDNA 水平在临床应用上有一定的难度。朱锦宏等^[19]对血清中 cccDNA 水平检测的临床意义展开了探讨,研究显示可以直接测定血清中 cccDNA 的水平,结果能反映肝组织中 cccDNA 水平,与血清中复制指标 HBV DNA 显著相关。临床上有病例经过治疗后血清中 HBV DNA 检测水平降低,可病毒仍处于复制阶段,研究显示是由于体内 cccDNA 未被全部清除的原因。对于慢性病毒性肝炎的治疗,只有彻底清除了 cccDNA 才算彻底消除了 HBV。也有文章表示慢性感染者肝组织内 HBV cccDNA 成稳定的中等水平复制,血清中 HBV DNA 的载量不能直接代表肝组织 cccDNA 的水平^[20]。故在经过治疗后的病毒复制情况检查不仅仅只依靠 HBV DNA 水平来指导,还应严格监控病情发展,充分考虑病毒变异等情况,给予相应的治疗。当患者发生血清病毒学应答后,肝组织 cccDNA 水平随继续治疗时间延长而降低,继续治疗 35 个月以上且血清抗-HBe 持续(+)30 个月以上时,有 2/3 的患者肝组织 cccDNA 水平低于检测限^[21]。同时有文章显示 cccDNA 不仅存在于肝细胞组织和血清中,在体内其他器官中也有被发现有 cccDNA 的存在,如肾脏、骨髓、血小板以及血液中单个核细胞^[22]。

3.3 HBV 的基因分型 根据 HBV 全基因序列差异大于或等于 8% 或 S 区基因序列差异大于或等于 4%,将 HBV 分为 A~I 9 个基因型^[23]。HBV 基因型的分布存在地理和种族差异,且与肝脏病变程度及药物治疗效果存在一定的相关性。中国以 B、C 型为主,C 型基因容易产生耐药,有少量的 D 型^[23]。HBV 的基因型还可能与感染的慢性化及感染后病情的转归有一定的关系,不同基因型对干扰素的治疗应答率也不同,A 型高于 D 型,B 型高于 C 型,A 型和 D 型又高于 B 型和 C 型^[24]。大量研究表明 HBV 的基因分型和耐药性突变的频率差异以及耐药动态监控检测对乙肝抗病毒治疗药物疗效评价具有重要的意义。

3.4 HBV 基因突变及耐药 HBV 复制通过 RNA 中间体整合到宿主基因组。其反转录的过程是利用病毒自身的 DNA 聚合酶进行而形成负链,故较其他 DNA 病毒易变异。S 基因的变异可导致隐匿性感染,表现为 HBsAg 结果为阴性,体内 HBV DNA 却处于复制阶段。在常规的乙肝两对半检测中也会检出一些 HBsAg 与 HBsAb 同时存在的结果,可能是 S 区基因突变导致之前产生的 HBsAb 与现阶段阳性的 HBsAg 属不同变异株所致。PreC 区蛋白翻译的终止导致 HBeAg 无法合成,但它并不影响病毒的复制,临床上表现为 HBeAg 阴性 HBV DNA 阳性的结果。慢性乙肝治疗过程中,HBeAg 的减少也可能是病毒变异的累积结果。从而使病毒逃避了免疫清除,导致了肝炎重症化或爆发性肝炎,解释了 HBsAg(+),抗-HBe(+),抗-HBc(+)病例复制活跃病程发展迅速的原因。在常规的乙肝两对半检测中,常常出现一些少见的组合结果,其中往往表现了 HBV 复杂的复制或者突变过程,在指导临床治疗时应仔细分析合理判断。P 基因是最长的开放读框,与 C、S 与 X 基因重叠。许多报道显示 P 基因的突变与核苷(酸)类药物的耐药有显著的相关性。在拉米夫定治疗乙型肝炎过程中,会出现拉米夫定的耐药现象,现已证实多为 HBV P 基

因发生变异所致,从而限制了拉米夫定的治疗效果。常见的是酪氨酸-甲硫氨酸-天冬氨酸变异。变异后影响了反转录酶的编码,故变异株的复制能力较差。除了拉米夫定,其他核苷(酸)药物对 HBV 的基因也有各自特定的耐药位点。多项研究显示,拉米夫定耐药突变位点以 204V、204I 为主,阿德福韦耐药以 181V、236T 为主,替比夫定和恩替卡韦以 204I 为主。俞杨等^[25]研究表明 HBV 耐药突变可导致 HBsAg 多个氨基酸位点的改变。检测 HBV 耐药突变型是评价慢性乙肝临床治疗疗效的重要指标,对指导临床用药和后续治疗有重要的意义。

4 讨论

乙型病毒性肝炎实验室诊断技术近年来发展飞速。从 HBV-M 发展到核酸标志物,从定性检测发展到定量检测。血清学抗原抗体标志物检测已经普及,成为 HBV 携带者的筛查和急性乙肝的诊断实验依据。慢性乙肝的确诊实验可以是检测乙肝核酸标志物,但仍需更加特异、伤害小的指标来代替肝活检。cccDNA 的检测方法和血清中存在的定量与病毒复制程度的相关性仍是需要研究的课题。对于 HBV 变异和耐药的检测仍需要大量的实验和研究,应仔细分析两对半检测少见模式的原因,给出正确的检验结果。乙型肝炎病毒 X 抗原在肝癌领域的机制研究已逐渐清晰,应用逐渐拓展,对于肝癌前、发生、发展和诊断具有重要的意义,为临床治疗工作提供依据。

参考文献

- [1] 刘小壮,刘庆丰.乙肝表面抗原大蛋白与 HBV DNA 相关性分析[J].中国社区医师:医学专业,2013,15(4):262.
- [2] 俞秀丽,过建春,荀运浩,等.乙型肝炎表面抗原定量与肝组织病理关系的临床研究[J].中华实验和临床病毒学杂志,2013,27(1):44-46.
- [3] 王力达,马悦,刘牟林.不同方法检测乙肝表面抗原的结果分析[J].临床输血与检验,2013,15(1):42-44.
- [4] 魏来,杨瑞峰.乙型肝炎病毒 e 抗原定量检测的发展和意义[J].中华肝病杂志,2011,19(11):806-808.
- [5] Fried MW, Piratvisuth T, Lau GK, et al. HBeAg and hepatitis B virus DNA as outcome predictors during therapy with peginterferon alfa-2a for HBeAg-positive chronic hepatitis B[J]. Hepatology, 2008,47(2):428-434.
- [6] 邓乐,温志立,何金秋,等.乙型肝炎患者联合检测血清前 S1、前 S2 抗原、E 抗原的临床意义[J].中华临床医师杂志:电子版,2012,6(1):183-186.
- [7] 王功遂,王曼曼,谢秋里,等. HBsAg、HBcAg 在慢性乙型肝炎肝细胞内的表达及临床意义[J].中华肝病杂志,2004,12(5):287-289.
- [8] Kimura T, Rokuhara A, Sakamoto Y, et al. Sensitive enzyme immunoassay for hepatitis B virus core-related antigens and their correlation to virus load[J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(2): 439-445.
- [9] Suzuki F, Miyakoshi H, Kobayashi M, et al. Correlation between serum hepatitis B virus core-related antigen and intrahepatic covalently closed circular DNA in chronic hepatitis B patients[J]. J Med Virol, 2009, 81(1): 27-33.
- [10] 郭雷,孔维,于湘晖,等. HBcrAg 的研究进展[J].实用预防医学,2010,17(1):186-188.
- [11] 窦亚玲,李永哲,刘志肖,等.乙型肝炎病毒前 S1 抗原检测的临床价值[J].中华检验医学杂志,2006,29(8):714-716.

[12] 闵福援,王健. 前 S1 抗原在诊断乙肝病毒复制时的临床价值[J]. 中华检验医学杂志, 2005, 28(6): 584-586.

[13] 敖必蓉,卢元全. 血清 HBV 标志物、前 S2 抗原与 HBV DNA 检测结果的相关性[J]. 临床输血与检验, 2009, 11(1): 38-40.

[14] 蔡常辉,陈桂山,梁锦胜. 乙肝病毒前 S2 抗原的临床应用[J]. 实用预防医学, 2006, 13(4): 864-865.

[15] 乐爱平,万腊根,郭萌萌,等. 乙型肝炎病毒前 S2 抗原抗体系统检测的临床意义[J]. 江西医学检验, 2003, 21(5): 323-326.

[16] 李程,王永康,王昌源,等. 乙型肝炎病毒 X 抗原表达与肝细胞凋亡的相关性[J]. 中华肝脏病杂志, 2013, 21(4): 252-256.

[17] 诸亚君,李学汤,李文广,等. HBxAg 在肝癌高发人群的表达[J]. 肿瘤防治研究, 2000, 27(3): 163.

[18] 薛亮. 纳米技术在肝脏疾病诊疗中的应用[J]. 临床肝胆病杂志, 2013, 29(7): 558-560.

[19] 朱锦宏,吴晓蔓. 乙肝患者血清 HBV cccDNA 的临床意义[J]. 实用医学杂志, 2013, 29(3): 395-397.

[20] 陈嵬,吴峰,窦晓光,等. 慢性 HBV 感染者肝脏 HBV cccDNA 含量相关因素分析[J]. 临床肝胆病杂志, 2013, 29(6): 434-437.

[21] 李菲菲,任万华,丁贵航,等. 肝组织 cccDNA 水平与血清病毒学应答后治疗时间的关系[J]. 中华肝脏病杂志, 2009, 17(3): 167-170.

[22] 任伟宏,赵素玲,李延卿,等. 乙型肝炎患者血清中 HBV cccDNA 与 HBV DNA、HBsAg 和 HBeAg 定量关系的分析[J]. 检验医学, 2010, 25(6): 438-441.

[23] 朱中梁,汪宏良,马娟. 乙型肝炎病毒基因分型及耐药突变基因检测研究[J]. 中国基层医药, 2013, 20(8): 1203-1205.

[24] 许金金. 乙型肝炎病毒标志物临床应用价值探讨[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(19): 2354-2356.

[25] 俞杨,邹兰,焦杰,等. 乙型肝炎病毒耐药突变对病毒表面抗原编码区的影响[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(12): 1518-1520.

(收稿日期:2014-05-15)

• 综 述 •

急性心肌梗死的新型标志物循环 microRNAs 的研究

杨立顺 综述,沈兴娅 审校

(天津中医药大学附属北辰中医院,天津 300400)

关键词:急性心肌梗死; 循环 microRNAs; 标志物

DOI:10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2014. 20. 037

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)20-2804-04

冠状动脉疾病(CAD)无论在发达国家还是在发展中国家都是一个很常见的健康问题。急性心肌梗死(AMI)是全球死亡的主要原因之一,在美国高居第一位^[1]。快速、准确的诊断 AMI 对它的治疗和预后起着重要作用。在过去 20 年中,AMI 的生物标志物的发展在诊断、治疗及预后方面已取得了巨大的进步。目前,心肌肌钙蛋白是临床实践中最常用的诊断 AMI 的生物标志物。近年又发现了一种新的生物标志物 MicroRNAs(miRNAs)能够在入院时就能可靠地排除或诊断 AMI 患者^[2]。在过去的几年发现组织中 miRNAs 表达水平与心脏病有关,miRNAs 在血清、血浆、尿液以稳定的形式存在,不受 RNase 的干扰。在 AMI、急性冠状动脉综合征(ACS)、稳定的冠状动脉疾病、心脏衰竭、冠状动脉粥样硬化、心律失常、心肌肥厚和心肌病患者中已发现了循环的 miRNAs 的浓度变化^[3-6]。

1 miRNAs 的特点

miRNAs 是内源性非编码单链的小分子 RNA,平均长约 22 个核苷酸,具有高度的保守性、时序性和组织特异性。它被认为是基因表达的负面调节器,通过与其目标 mRNA 分子的 3'端非编码区互补匹配导致该 mRNA 分子的翻译转录抑制。目前大约有三分之一的基因受 mRNA 的调控。miRNA 在心血管高度表达,在调控心血管的发育和疾病方面具有重要意义,这给心血管疾病的治疗带来了希望。miRNAs 参与多种生物学过程,如细胞增殖、迁移、分化、分泌、激发、传导,细胞周期和细胞凋亡、老化,通过改变靶基因来表达^[7]。

在血清或血浆中检测到 miRNAs,被称为循环 miRNAs。尽管大量的研究认为循环 miRNAs 起源是未知的,但一些研究报告表明,miRNAs 在微泡或其他不同类型的细胞中主动分

泌。大约 121 个 miRNAs 被确定来源于肥大细胞^[8],神经酰胺生物合成途径中的限速酶鞘磷脂酶 2,控制外来体分泌到细胞外基质^[9]。此外,微泡或外来体,微粒和脂蛋白复合物(高密度脂蛋白复合物)可能是其他循环 miRNAs 的来源。微粒大于外来体,包含 miRNAs,并积极控制细胞的通信过程。高密度脂蛋白(HDL)运输 miRNAs 并将其传递到受体细胞的功能定位,运送细胞内胆固醇。人类的 HDL 不仅运输内源性 miRNAs,还可以显示不同的功能,在基因调控和细胞间通讯方面存在潜在介质。血浆和血清循环 miRNAs 的检测表明,miRNAs 可能发挥细胞外的生物学功能,可以作为疾病的潜在生物标志物。来自健康受试者被确认的人类基因组的估计编码多达 1 000 个 miRNAs,在血清中有 100 个 miRNAs。

2 循环 miRNAs 的性质

从血浆中分离的 miRNAs 高度稳定抗高温耐强酸和强碱。血浆中的浓度稳定,长时间室温放置和多次反复冻融均无影响。据报道,内源性 miRNAs 是以抵抗 RNase 活性形式存在^[10]。相对于内源性 miRNAs 而言,人血浆合成 miRNAs 在几分钟内被快速降解。失活的 RNase 加入之前,外源性 miRNAs 逃脱降解。因此,外源性 miRNAs 在血浆中是不稳定的,容易迅速降解,而内源 miRNAs 是稳定和耐 RNase 活性。循环 miRNAs 对抗 RNase 的降解是多方面的。例如,循环 miRNAs 在血中不是游离的,它通常被包在微泡或外来体里。此外,循环 miRNAs 可以用一些特殊的蛋白质(如核仁 RNA 结合蛋白,核磷蛋白 1)形成 miRNAs 的配合物来抵抗降解^[11]。

虽然循环 microRNAs 是稳定的,但高纯度的 miRNAs 分离技术存在挑战。首先,血浆或血清中含有极少量的 RNA,从血浆或血清(通常小于 1mL)中用常规的方法严格的质量控制