

- [J]. Talanta, 2013, 109(12): 209-215.
- [15] Uludag Y, Tothil I E. Cancer biomarker detection in serum samples using surface plasmon resonance and quartz crystal microbalance sensors with nanoparticle signal amplification [J]. Anal Chem, 2012, 84(14): 5898-5904.
- [16] Uchida K, Otsuka H, Kaneko M, et al. A reactive poly(ethylene glycol) layer to achieve specific surface plasmon resonance sensing with a high S/N ratio; the substantial role of a short underbrushed PEG layer in minimizing nonspecific adsorption[J]. Anal Chem, 2005, 77(4): 1075-1080.
- [17] 杨彦, 戴宗, 邹小勇. 可移除保护膜抑制蛋白质非特异性吸附的表面等离子体共振研究[J]. 分析化学, 2009, 37(13): 392.
- [18] Liang RP, Yao GH, Fan LX, et al. Magnetic Fe₃O₄ Au composite-enhanced surface plasmon resonance for ultrasensitive detection of magnetic nanoparticle-enriched α -fetoprotein[J]. Anal Chim Acta, 2012, 737(21): 22-28.
- [19] Mani V, Wasalathanthri DP, Joshi AA, et al. Highly efficient binding of paramagnetic beads bioconjugated with 100 000 or more antibodies to protein-coated surfaces[J]. Anal Chem, 2012, 84(23): 10485-10491.
- [20] Wang J, Song DQ, Wang LY, et al. Design and performances of immunoassay based on SPR biosensor with Au/Ag alloy nanocomposites[J]. Sens Actuator B Chem, 2011, 157(32): 547-553.
- [21] Teramura Y, Arima Y, Iwata H, et al. Surface plasmon resonance-based highly sensitive immunosensing for brain natriuretic peptide using nanobeads for signal amplification[J]. Anal Biochem, 2006, 357(2): 208-215.
- [22] Soelberg SD, Stevens RC, Limaye AP, et al. Surface plasmon resonance detection using antibody-linked magnetic nanoparticles for analyte capture, purification, concentration, and signal amplification[J]. Anal Chem, 2009, 81(6): 2357-2363.
- [23] 徐霞, 叶尊忠, 吴坚, 等. 表面等离子体共振免疫传感器在蛋白质检测中的应用及其研究进展[J]. 分析化学评述与进展, 2010, 38(7): 1052-1059.
- [24] 马国欣, 邱胜宝, 向鹏, 等. 表面等离子体共振技术在生化检测中的研究进展[J]. 真空电子技术, 2010, (3): 28-33.
- [25] 洪昕, 杜丹丹, 裴祖荣, 等. 半壳结构金纳米膜的局域表面等离子体共振效应[J]. 物理学报, 2007, 56(12): 7219-7223.

(收稿日期: 2014-10-16)

• 综 述 •

和肽素的实验室检测及其在心力衰竭中的临床应用前景*

李晶晶 综述, 王伟佳, 孙各琴, 张秀明[△] 审校

(中山大学附属中山医院检验医学中心, 广东中山 528403)

关键词: 和肽素; 精氨酸加压素; 心力衰竭

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2015.05.042

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2015)05-0673-03

心力衰竭(HF)是各种病因所致心脏病发展到终末阶段的临床综合征,严重影响患者的生活质量及生存指数^[1]。HF的病理生理变化及临床表现具有多样性和复杂性, NHYA 分级将 HF 分为 I、II、III、IV 四级。因此,对 HF 做出及早诊断并分级,实现 HF 的个体化治疗非常重要。近年来,精氨酸加压素(AVP)在 HF 发病中的病理生理过程引起了广泛关注。AVP 在颈动脉压力感受器感受血容量过低时分泌增加,具有收缩周围血管的生理作用^[2]。和肽素(CT-proAVP)作为抗利尿激素原的分解产物羧基端肽段具有与抗利尿激素原(proAVP)同样稳定的性质,最近已报道有一种成熟的方法用来检测 CT-proAVP^[3]。AVP 受体拮抗剂^[4]在 HF 中具有很好的治疗前景,大量临床资料显示,AVP 受体拮抗剂有望成为治疗 HF 的新药物。CT-proAVP 对预测 HF 的预后及 AVP 受体拮抗剂的疗效至关重要,本文就 CT-proAVP 的实验室检测方法以及其对 HF 的预后和治疗前景进行综述。

1 和肽素的生理与生化功能

Copeptin 是精氨酸加压素原的羧基肽,位于羟基末端,在血浆中的浓度及变化趋势和 AVP 一致。Copeptin 和 AVP 都是从精氨酸加压素原肽链上剪切下来的多肽,它们的摩尔浓度一致。Copeptin 结构非常稳定,在体内几乎不降解,没有酶切位点和受体,通过肾脏排泄。1972 年 Holwerda 发现了 Copeptin^[5],证实 CT-proAVP 是由神经垂体分泌的循环型糖基化多

肽片段,相对分子质量为 5 000 u,含有 39 个氨基酸。目前 CT-proAVP 的生理功能尚不清楚,但因加压素原是由 CT-proAVP、神经垂体后叶素运载蛋白 II、AVP 和信号肽共同组成的含有 164 个氨基酸的前体物质^[6],所以有人推测 CT-proAVP 在抗利尿激素原的形成中起重要作用,且参与其结构的校正,Copeptin 缺乏可能引起加压素原折叠不良出现中枢性尿崩症。AVP 含 9 个氨基酸,由下丘脑神经元合成后,储存于神经垂体,在某些刺激条件下,如低氧、酸中毒、低血压、感染、高渗等刺激下释放入血。AVP 的主要生理作用是收缩血管、维持血流动力学稳定、抗利尿、调节血浆渗透压、参与应激反应、调控内分泌系统和中枢神经系统、调节心血管稳态,但半衰期特别短,在体外测定很受限制,所以在临床上的应用也受到限制。而 CT-proAVP 因其所具有的生理特性且反映的病理生理信息与 AVP 相同,因此可以作为代替 AVP 的生物标志物用于临床研究。

2 和肽素的测定方法

AVP 释放入血后大部分附着于血小板且以相当快的速度被清除,直接导致检测结果偏低^[7-8]。而从血液标本中完全去除血小板会引起 AVP 假性升高或对 AVP 水平有不同程度的影响,这些分析前因素都会引起 AVP 测量结果的偏差。目前实验室对于检测血清 AVP 浓度方法的可靠性非常关注,由于 AVP 半衰期短^[9],体外极不稳定,相对分子质量小等特性使其

* 基金项目:中山市科技计划项目(20132A091)。 作者简介:李晶晶,女,在读研究生,主要从事临床生物化学检验与工作研究。 [△] 通讯作者, E-mail: zxm0760@163.com。

不能用免疫夹心法检测,而只适用于敏感性较低的竞争性免疫测定法。和肽素又被称为 AVP 相关联糖肽,富含亮氨酸核心。目前 Copeptin 的测定常使用双抗体免疫夹心法^[9],用两个多克隆抗体结合到加压素前体物质的 C 末端区域 132~164 号氨基酸序列。将其中一种抗体先包被于聚苯乙烯管中和另一种被标记有吖啶酯的物质进行化学发光反应,此方法精密度极高,能准确测量其浓度,该方法现已被广泛的应用于和肽素的检测。

Copeptin 作为非功能的激素原片段被释放出来,可以用来评估成熟 AVP 的释放量反映其化学计量结果。在此方法的前提下,似乎 AVP 前体的其他组成物质都可以用来代替 AVP 的测量,但事实上是行不通的。其中神经垂体后叶素运载蛋白 II 结构复杂^[10],含有 7 分子二硫键且具有结合到 AVP 的发展趋势,另外一些连接 AVP 前体各组成部分之间的肽序列过于短小而不能应用于此项目。而 CT-proAVP 完全没有这些限制,是理想的反应 AVP 浓度的物质。此外 Copeptin 的测定还可以采用免疫放射法^[11],总之由于 Copeptin 具有稳定的生理特性及其生化作用,保证了其检测结果的可靠、准确。

3 标本类型及存放时间和对肽素测定的影响

与成熟 AVP 相比,CT-proAVP 在血浆或血清渗透压无论高低的情况下,都能测定出其浓度^[12]。而 AVP 在渗透压偏高或偏低的情况下常常不能被检测出来,且检测时间一般 12~24 h。而 Copeptin 的测定只需 50 μ L 的血清或血浆且灵敏度高^[9,13],可以检测出 1.7 pmol/L 的浓度,3 h 出结果且具有良好的总精密度,实验室时间变异小于 20%。也有研究表明,在迅速清除像 AVP 这种肽激素的情况下,可以提高与其具有同源前体且稳定、无功能的 CT-proAVP 的测定^[10,14],这已被成功的应用于 A 型利钠肽与 B 型利钠肽的测定和来自于胰岛素前体的 C 肽的测定。

CT-proAVP 与成熟 AVP 测定的最大区别可能是由于在离体状态下 Copeptin 比成熟 AVP 稳定的多。有研究显示,Copeptin 在室温下至少可以保存 7 d,4 $^{\circ}$ C 下可以保存 14 d^[15]。另一实验表明室温下存放几天的血浆样本中 Copeptin 的水平,和深低温冰箱保存的血浆样本无任何差别^[16]。因此,样本处理和长期保存对 Copeptin 检测的影响很小。Riphagen 等^[17]认为 Copeptin 测定浓度在健康男性和女性之间差异有统计学意义($P<0.01$),结果显示这两组数据具有可比性。但在不同年龄段的分组中与其他生物标记物相比 Copeptin 的浓度差异无统计学意义($P>0.05$)。总之,用于检测 Copeptin 浓度的标本既便于运输和处理,又受外界影响因素小。

4 和肽素与心力衰竭的关系及其对心力衰竭的临床应用

近年来,研究发现 AVP 水平与 NYHA 心功能分级呈正相关^[18],与充血性心力衰竭指数呈负相关,舒张末容量指数和心搏量指数随血浆 AVP 水平升高而增加,因而确定血浆 AVP 水平可作为预测充血性心力衰竭发生和严重程度判断的指标。但 AVP 呈脉冲式分泌、结构不稳定且半衰期短,难以在外周血中检测到。因此与 AVP 有着相同来源且结构稳定的 Copeptin 逐渐受到人们的关注。美国国家临床生物化学学院已将 Copeptin 列为诊断心脏功能的有效标志物之一^[19],人们已经发现 Copeptin 水平在急性心肌梗死、心力衰竭患者中明显升高,且与 AVP 的分泌特点极为相似^[20],但目前临床上对 Copeptin 的应用还没有广泛化。而事实上 Copeptin 在疾病的早期诊断和预后评价方面已经显示出其一定的临床价值,因此,Copeptin 极有可能成为新的生物标志物被广泛的应用。

AVP 血浆浓度的升高与慢性心力衰竭患者的预后不良有密切的关系,因此 Copeptin 的测定可能对这些患者的预后有一个更好的评估。据报道,CT-proAVP 升高可提示心力衰竭患者 90 d 病死率升高,对于再住院和急诊鉴别也有预测价值,其准确性较 BNP 和 NT-proBNP 更高,是所有心力衰竭患者中特别是急性失代偿性心力衰竭患者短期病死率最强的预测因子^[21-22]。临床实践证明^[23],Copeptin 联合检测血浆 BNP 可以提高对心力衰竭患者预后的预测。HF 患者的体钠平衡紊乱的病因很难判断,可能是保水过量即血容量过多低钠血症,也可能是利尿剂使用过多即血容量减少低钠血症。理论上,肽素可区别血容量过多低钠血症,这些患者使用 AVP 受体拮抗剂治疗非常有益。根据联合检测的结果,可以将心力衰竭患者分为高、中、低危人群,这对于制订不同患者的治疗方案起到很大的帮助作用,届时将有可能实现个体化治疗。

已知 AVP 有 3 种受体^[24],V2 受体介导抗利尿作用,其主要分布在腺垂体、胰岛和集合管等部位。此外,AVP 还与体内许多生理功能关系密切。AVP 受体拮抗剂已经在实验性充血性心脏衰竭中得到成功应用^[25-27],血浆 Copeptin 的浓度对引进这种新疗法的评估非常重要,因为任何干预 AVP 及其受体的相互作用的治疗都将引起 AVP 分泌的变化。加压素系统是否被激活与 AVP 受体拮抗剂的治疗将是未来的研究方向,此时,Copeptin 的测定将确定 AVP 受体拮抗剂治疗是否有效。

5 展 望

Copeptin 作为 pro-AVP 的稳定片段,其测定结果似乎是评估血浆 AVP 浓度的可靠方法,但这在临床实践中还没有完全的被接受^[26]。Copeptin 有助于提供一些重要疾病的发病机制,帮助人们早发现、早治疗,并对疾病进行风险评估及分级。对心力衰竭治疗方案的选择及其病情的发展与疗效有一定的检测作用。Copeptin 完全符合人们对理想的生物标志物的要求,大量研究也显示 Copeptin 具有临床应用的前景,但作为生物标志物应用于临床实践,Copeptin 还存在许多不足之处^[27]。比如,肾功能不全的患者体内 Copeptin 水平会有所增高,且 Copeptin 水平与肾小球率过滤下降呈负相关,与尿蛋白排泄率呈正相关。另外,Copeptin 也不具有特异性,且不能单独用于疾病的风险评估,其生理作用、在 H-P-A 轴中的作用以及在疾病发病中的具体机制都有待进一步研究。

参考文献

- [1] Riley J. Practical issues in acute heart failure management[J]. Bri J Car Nurs, 2014, 9(1): 18-23.
- [2] Ellison DH. Hyponatremia; SIADH[M]. Endocrine Emergencies, Springer, 2014; 115-126.
- [3] Riphagen IJ, Boertien WE, Alkhalaf A, et al. Copeptin, a surrogate marker for arginine vasopressin, is associated with cardiovascular and All-cause mortality in patients with type 2 diabetes (ZODIAC-31)[J]. Diabetes care, 2013, 36(10): 3201-3207.
- [4] Maisel A, Mueller C, Neath S, et al. Copeptin helps in the early detection of patients with acute myocardial infarction primary results of the CHOPIN trial(copeptin helps in the early detection of patients with acute myocardial infarction)[J]. J Am Coll Cardiol, 2013, 62(2): 150-160.
- [5] Yalta K, Yalta T, Sivri N, et al. Copeptin and cardiovascular disease; A review of a novel neurohormone[J]. Int J Cardiol, 2013, 167(5): 1750-1759.
- [6] Shapiro M, Weiss JP. Diabetes insipidus; a review[J]. J Diabetes

- Metab S, 2012, 8(2): 111-118.
- [7] Karber B, Ozbek M, Karakose M, et al. Copeptin, a surrogate marker for arginine vasopressin, is associated with cardiovascular risk in patients with polycystic ovary syndrome[J]. J Ovarian Res, 2014, 7(1): 31-39.
 - [8] Aborehab NM, Salman TM, Mohamed OS, et al. The clinical value of copeptin in acute coronary syndrome[J]. J Clin Exp Cardiol, 2013, 4(10): 278-280.
 - [9] Giannopoulos G, Deftereos S, Panagopoulou V, et al. Copeptin as a biomarker in cardiac disease[J]. Current topics in med chemistry, 2013, 13(2): 231-240.
 - [10] Elshafei A, Abdalla G, El-Motaal OA, et al. Copeptin: A neuroendocrine biomarker in acute myocardial infarction[J]. Annual Review Res Biol, 2013, 3(4): 1040-1054.
 - [11] Lipinski MJ, Escárcega RO, D'Ascenzo F, et al. A systematic review and collaborative meta-analysis to determine the incremental value of copeptin for rapid rule-out of acute myocardial infarction [J]. Am J Cardiol, 2014, 1(23): 436-446.
 - [12] Xue Y, Iqbal MN, Chan J, et al. Heart failure, biomarkers[M]. Encycl Int Care Med, Springer, 2012: 1024-1029.
 - [13] Miller WL, Grill DE, Struck J, et al. Association of hyponatremia and elevated copeptin with death and need for transplantation in ambulatory patients with chronic heart failure[J]. Am J cardiol, 2013, 111(6): 880-885.
 - [14] Morgenthaler NG. Copeptin-The steady and reliable copilot of vasopressin[J]. Regulatory Peptides, 2012, 177(12): 11-12.
 - [15] Goode KM, Nicholls R, Pellicori P, et al. The in vitro stability of novel cardiovascular and sepsis biomarkers at ambient temperature[J]. Clin Chem Lab Med, 2014, 11(12): 1-8.
 - [16] Toutouzias K, Synetos A, Drakopoulou M, et al. Cardiac Biomarkers in Acute Coronary Syndromes[J]. Biomarkers in Cardiovascular Diseases, 2013, 9(22): 87-100.
 - [17] Riphagen IJ, Boertien WE, Alkhalaf A, et al. Copeptin, a surrogate marker for arginine vasopressin, is associated with cardiovascular and All-cause mortality in patients with type 2 diabetes (ZODIAC-31)[J]. Diabetes care, 2013, 36(10): 3201-3207.
 - [18] Liquori ME, Christenson RH, Collinson PO, et al. Cardiac biomarkers in heart failure[J]. Clin Biochemistry, 2014, 22(11): 132-139.
 - [19] Chenevier GC, Freund Y, Claessens Y, et al. Copeptin for rapid rule out of acute myocardial infarction in emergency department [J]. Int J Cardiol, 2013, 166(1): 198-204.
 - [20] Aldous SJ. Cardiac biomarkers in acute myocardial infarction[J]. Int J Cardiol, 2013, 164(3): 282-294.
 - [21] Givertz MM, Teerlink JR, Albert NM, et al. Acute decompensated heart failure: update on new and emerging evidence and directions for future research[J]. J Cardiac Failure, 2013, 19(6): 371-389.
 - [22] Maisel A, Xue Y, Shah K, et al. Increased 90-day mortality in patients with acute heart failure with elevated copeptin secondary results from the biomarkers in acute heart failure (BACH) study [J]. Circulation: Heart Failure, 2011, 4(5): 613-620.
 - [23] Iqbal N, Alim KS, Aramin H, et al. Novel biomarkers for heart failure[J]. Expert Rev Cardiovasc Ther, 2013, 11(9): 1155-1169.
 - [24] Jagadeesh JS, Muthiah NS, Muniappan M. Vasopressin receptors and drugs: a brief perspective[J]. Global J Pharmacol, 2014, 8(1): 80-83.
 - [25] Hagiwara Y, Ohno K, Kamohara M, et al. Molecular modeling of vasopressin receptor and in silico screening of V1b receptor antagonists[J]. Expert Opin Drug Discov, 2013, 8(8): 951-964.
 - [26] Spasovski G, Vanholder R, Allolio B, et al. Clinical practice guideline on diagnosis and treatment of hyponatraemia[J]. Eur J Endocrinol, 2014, 170(3): 1-47.
 - [27] van Kimmenade RR, Januzzi JL. Emerging biomarkers in heart failure[J]. Clin Chem, 2012, 58(1): 127-138.

(收稿日期: 2014-11-02)

• 综 述 •

肠杆菌科碳青霉烯类耐药机制及检测方法学概述

罗晓慧 综述, 金凤玲[△] 审核

(兰州大学第一医院检验科, 甘肃兰州 730000)

关键词: 肠杆菌科耐药性进化; 碳青霉烯类耐药肠杆菌科; 耐药机制; 检测方法

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2015. 05. 043

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2015)05-0675-03

自 1941 年世界上第一种抗菌药物青霉素在临床感染治疗中被广泛应用后, 第 2 年便检出了青霉素耐药菌株。虽然以后一直有研究学者不断研制出各种类型的抗菌药物, 至今为止, 用于治疗细菌感染的抗菌药物已有几百余种, 但这些药物应用于临床后, 不管是革兰阳性菌还是革兰阴性菌都陆续多少出现了耐药机制更为复杂的耐药菌株^[1]。肠杆菌科细菌虽多是机会致病菌, 然而自从发现对碳青霉烯类耐药的肠杆菌科细菌 (CRE) 以来, 其耐药性也已成为全球医学界广泛关注研究的问题, 但这些耐药菌因检出发现的时期和区域不同, 其对抗菌药物的耐药机制也有明显差异。因此针对肠杆菌科对碳青霉烯类耐药机制而快速有效的检出该菌, 并能准确指导临床用药, 也是当今临床方法学研究的一个首要任务。

1 肠杆菌科碳青霉烯类耐药性研究进展

1.1 碳青霉烯类抗菌药物的广泛使用 在临床抗感染药物治疗中, 如若出现产头孢菌素酶 (AmpC) 或超广谱 β -内酰胺酶 (ESBLs) 的细菌, 一般都会使用碳青霉烯类抗菌药物来控制其严重感染。因 β -内酰胺酶由染色体或质粒介导, 碳青霉烯类抗菌药物对其绝大多数都有很好的稳定性^[2], 且可与青霉素结合蛋白 (PBPs) 强有力的结合, 使抗菌药物作用于细菌时间延长, 并能使细胞溶解, 还能通过外膜有效渗透进入细胞间质, 发挥抗菌药物后效应。这些抗菌机制使碳青霉烯类抗菌药物具有了抗菌效力强、灭菌速度快、抗菌谱广泛的特点^[3]。在临床上常被广泛应用, 但对其耐药的菌株逐年检出率也日益增多。尤其是常见的肠杆菌科细菌^[4] (如大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、阴