

ation of tyrosine 707[J]. Mol Cell Biol, 2003, 23(13): 4598-4610.

[9] Bermudez Y, Yang H, Cheng JQ, et al. Pyk2/ERK 1/2 mediate Spl- and c-Myc-dependent induction of telomerase activity by epidermal growth factor[J]. Growth Factors, 2008, 26(1): 1-11.

[10] Wiener HG, Mian C, Haitel A, et al. Can urine bound diagnostic tests replace Cytoscopy in the management of bladder cancer[J]. Urol, 1997, 159(6): 1876-1880.

[11] Fujisawa M, Yoshida S, Matsumoto O, et al. Deoxyribonucleic acid polmerase activity in the testes of infertile men with varicocele[J]. Fertil Steril, 1988, 50(5): 795-

800.

[12] Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer[J]. Eur J Cancer, 1997, 33(5): 787-791.

[13] Hiyama E, Gollahon L, Kataoka T, et al. Telomerase activity in human breast tumors[J]. Natl Cancer Inst, 1996, 88(2): 116-122.

[14] 叶哲伟, 陈晓春, 范民, 等. 男性不育症患者睾丸组织中端粒酶 RNA 表达状况的研究[J]. 华中科技大学学报(医学版), 2003, 32(1): 58-61.

(收稿日期: 2016-02-18 修回日期: 2016-06-13)

• 综 述 •

中药过敏反应中细胞因子的表达

顾 敏^{1,2}综述, 谢雁鸣^{1△}审校

(1. 中国中医科学院中医临床基础研究所, 北京 100700; 2. 河北省石家庄市中医院 050000)

关键词: 人类 T 辅助细胞 1/人类 T 辅助细胞 2; 白细胞介素-4; 中药注射剂; 过敏反应
DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2016.19.033 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-4130(2016)19-2740-03

人类 T 辅助细胞(Th)亚群的特征是其产生的细胞因子种类不同^[1]。其中以分泌白细胞介素-2(IL-2)和干扰素-γ(IFN-γ)为主的称为 Th1, 主要介导细胞免疫等; 分泌 IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-13 等称为 Th2, 主要介导体液免疫和过敏反应^[2]。Th1 和 Th2 分别介导 2 类应答不仅在宿主防御机制中发挥不同作用, 也参与不同免疫病理过程。持续 Th1 细胞强烈应答可能与自身免疫病等有关。过度 Th2 细胞应答, 则可能在遗传易感的个体引发过敏特异性。

传统认为过敏反应的主要机制是 Th1/Th2 免疫功能失衡所致气道炎性变化、多种细胞浸润、气道组织结构改变^[3]。上市后中药注射剂作为注入性(可溶性)抗原, 引起的过敏反应属于 I 型超敏反应(I 型变态反应), 故 I 型超敏反应是上市后中药注射剂免疫毒性监测的重点内容。多种原因导致的 Th1/Th2 偏移贯穿于过敏反应各个阶段^[4]。

1 上市后中药注射剂过敏反应监测背景

全世界每年约有千种以上的新化合物作为商品进入人类的环境, 在现有上市药用化合物中, 有相当数量未进行免疫毒理学评价。中药注射剂作为我国特有的中药创新型剂, 与传统中药剂型相比有生物利用度高、起效迅速、作用可靠等优点, 主要应用在心脑血管疾病、肿瘤、感染性疾病、呼吸系统疾病, 以及一些危急重症的抢救和治疗中。中药注射剂发挥临床疗效的同时其安全性也被广泛关注, 并成为制约其进一步现代化和国际化的瓶颈之一。国际组织免疫毒性研究指南提示体液免疫超敏反应、免疫刺激的关键指标为研究上市后中药注射剂免疫毒理学作用监测提供了一定的依据。

上市后中药注射剂多成分复杂且有效成分尚不完全清楚, 研究表明, 与中药注射剂有关的药品不良反应(ADR)中, 92% 属于变态反应(AR), 解决中药注射剂引起的变态反应是中药

注射剂研制的一项重要工作^[5]。

2 上市后中药注射剂过敏反应的监测依据

美国国立变态反应和感染性疾病研究所(NIAID)与食物过敏及急性全身过敏反应联盟(FAAN)制订的急性全身过敏反应的诊断标准包括: 皮肤过敏反应、呼吸道过敏反应、消化道过敏反应等^[6]。可对 95% 的患者作出急性全身过敏反应的诊断。

上市后中药注射剂相关 ADR 主要是速发型, 其中发生率最高的是以 I 型变态反应为主的急性变态反应, 一般认为与遗传、免疫及对生理、药理介质反应异常有关^[7]。有统计显示, 374 例中药注射剂 ADR 的发生时间, 在用药后数秒至 60 min 之内者 256 例, 占 70%^[5]。

3 Th1/Th2 监测

3.1 Th1/Th2 监测对过敏反应特异性诊断的意义 有研究发现, T 淋巴细胞的免疫调节作用失常(CD4⁺ Th1 细胞功能不足, CD4⁺ Th2 细胞功能亢进, Th1/Th2 比值低于正常), 与 I 型过敏反应发生密切相关。Th1/Th2 失衡是哮喘发病的关键机制^[8]。IL-4、IL-2、IFN-γ 的相互作用是维持 Th1/Th2 平衡的关键。Th1/Th2 失衡尤其是 Th2 应答增强并分泌 IL-5 等诱导嗜酸性粒细胞浸润是哮喘发病的重要因素。

3.2 Th1/Th2 的监测方法 (1)酶联免疫吸附法测定可溶性细胞因子反映总细胞因子分泌量, 但不能确定分泌特定细胞因子的细胞亚群。(2)流式细胞术能实现单细胞水平的细胞因子检测, 逐渐成为鉴别 Th1 和 Th2 细胞亚群的重要手段。一般认为, Th1 的表型为 CD4⁺ IFN-γ⁺, 而 Th2 的表型为 CD4⁺ IL-4⁺ ^[9]。

4 Th1/Th2 型相关细胞因子作为过敏反应特异性诊断

4.1 IL-4 免疫球蛋白 E(IgE)抗体在速发型过敏反应机制

△ 通讯作者, E-mail: drzhyubin@sina.com; E-mail: ktzu2014@163.com。

中的作用已确定,而 IL-4 是促进 IgE 合成的最主要细胞因子,过敏原进入机体后引起 IL-4 和 IgE 升高并可保持较长时间,使机体始终处于一个超敏状态。有研究结果提示,血清 IL-4 水平可望成为早期检测药物引起过敏反应的灵敏指标,避免常规方法存在的缺陷^[10]。IL-4 是 Th2 淋巴细胞的特征性细胞因子,也是诱导 Th2 淋巴细胞分化的关键细胞因子,其在诱导 B 细胞产生特异性 IgE 过程中至关重要。IL-4 可促进 Th0 细胞分化为 Th2 细胞,并抑制 Th1 细胞效应,通过抑制 IL-12 分泌而诱导上调其表达^[11]。IL-4 和 IFN- γ 常处于一种对抗状态,IL-4 和 INF- γ 相互制约的平衡调节是 IgE 合成的决定因素^[12-13]。IL-4 还可使哮喘患者对皮质激素的敏感性降低,从而导致哮喘加重。国外学者发现 IL-4 基因中存在一系列的多态性,与哮喘的多种表型相关联^[14]。

4.2 IL-12 可增强 Th1 类细胞、抑制 Th2 类细胞的免疫应答,刺激 IFN- γ ,促进 Th1 细胞分化。小鼠哮喘模型试验表明,IL-12 是阻止 Th2 细胞和促进 Th1 细胞的必须因子并可促进 Th0 细胞向 Th1 细胞漂移,抑制 IL-4 诱导 IgE。临床研究发现,对哮喘有确定疗效的药物和疗法均可引起 IL-12 变化^[15]。IL-12 可通过诱导 IFN- γ 影响 IL-4 活性。试验研究表明,类风湿关节炎患者血清 IL-12 水平显著降低^[16]。

4.3 IFN- γ 能抑制 Th2 类细胞因子 IL-4、IL-5、IL-13 等产生,是 IL-4 的拮抗子,抑制 IL-4 mRNA 转录^[17]。IFN- γ 是 Th1 细胞因子的典型代表,可下调 EOS 趋化因子受体表达,抑制 EOS 趋化因子依赖 EOS 浸润的作用,同时可抑制 IgE,促进 IgG。IFN- γ 减少是变应性疾病的危险因素^[18]。

4.4 ST2 上世纪末首先在小鼠中发现的 Th2 细胞稳定标志物,不表达于 Th1 细胞^[19-20]。只在 Th2 细胞表达而不表达于 Th1 细胞,不依赖 IL-4、IL-5、IL-10,但与 Th2 细胞功能密切相关,因此有可能把 ST2 作为区分 Th1/Th2 细胞的稳定标志物^[21]。

5 特异性转录因子协助过敏反应特异性诊断

转录因子 T-bet 和 GATA-3 通过特异性调控 Th0 细胞分化,称为 Th1/Th2 细胞转换致调控作用的关键因子。

5.1 T-bet 调控 Th1 反应的特异性转录因子,T-bet 具有抑制 GATA-3 表达,阻断其作用,并诱导已分化成熟的 Th2 向 Th1 逆向转化。

5.2 GATA-3 具有促进 Th0 向 Th2 细胞因子分化的作用,成为 Th2 细胞定向分化的正反馈途径,同时抑制 Th1 极化。哮喘患者 BALF、支气管黏膜活检组织中 GATA-3 基因表达明显增高,中药治哮喘名方麻杏石甘汤对 GATA-3 等 Th2 转录因子表现出较强的抑制作用^[22]。

6 Th1/Th2 失衡及相关细胞因子、转录因子水平表达与中医证本质的关系及其意义

多数学者认为,过敏反应发生是遗传和环境因素共同作用导致的非特异炎性。有研究发现儿童早期的交叉感染有保护作用,原因是内毒素可刺激 Th1/Th2 平衡向 Th1 偏移。有学者研究表明,Th1/Th2 失衡水平与中医证本质有一定的相关性,反映细胞和体液免疫的相对亢进。虚证时主要表现为细胞免疫相对更低一些;实证时细胞免疫相对占优势;衰老时呈气虚状态,Th1 型细胞因子减少,Th2 型细胞因子增多,补中益气汤即通过削减 Th2 优势干预 Th1/Th2 平衡治疗气虚证^[23]。麻杏石甘汤也通过抑制 IL-4 为代表的 Th2 细胞因子动态改变

Th1/Th2 平衡,并通过 GATA-3、STAT-6、T-bet 等转录因子的表达阐释该机制。本研究结果表明,总体过敏组患者 IL-4、IL-12、IL-10 表达水平明显增高,IFN- γ 等表达明显减低,过敏反应患者和匹配者比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。过敏患者发病年龄呈偏高趋势,年龄均 60 岁左右,与相关文献报道一致。过敏患者除年龄偏高外,显示女性偏多,男女性比例为 1:1.8,提示男性具有较强的免疫力,即中医理论“正气存内,邪不可干”。3 例 40 岁过敏患者 IL-10、IL-12 明显升高,临床表现仅为注射部位瘙痒,IL-4 及 IgE 无升高,同样提示青壮年患者的免疫功能完善,具有较好的抗过敏能力。有试验报道,IL-4 和 IL-13 SNPs 与其他多个哮喘易感基因交互作用共同影响哮喘的发病危险度和表型,多基因联合研究对哮喘遗传机制的揭示会更有意义。目前对 IL-4 基因多态性与哮喘的研究结果不尽相同,可能与环境、种族和基因间的相互作用有关。

参考文献

- [1] 姚新生. Th1 与 Th2 研究概况及进展[J]. 国外医学免疫学分册,2002,25(6):290-293.
- [2] 郭敏. 支气管哮喘患儿治疗前后外周血 Th1/Th2 相关细胞因子的临床分析[J]. 放射免疫学杂志,2013,26(6):810-812.
- [3] 张琳,梁庆红,王烨. CD4+T 细胞亚群在支气管哮喘病理机制中作用的新认识[J]. 中国微生态学杂志,2013,25(1):100-103.
- [4] 李晓狄,张建华,朱雪明. 哮喘小鼠 Th1/Th2 细胞偏移及卡介苗干预的影响[J]. 苏州大学学报(医学版),2008,28(5):743-748.
- [5] 王永炎,杜晓曦,谢雁鸣. 中药注射剂临床安全评价指南[M]. 北京:人民卫生出版社,2013:11-13.
- [6] 谢雁鸣. 中医药临床评价方法研究与实践[M]. 北京:人民卫生出版社,2014:34.
- [7] 郅艾芹. 588 例变态反应疾病患者过敏原体外检测及分析[J]. 疾病监测与控制,2012,6(3):174-175.
- [8] 龚臣,邓静敏. Th17/Treg 在支气管哮喘发病机制中的作用及研究进展[J/CD]. 中华哮喘杂志(电子版),2013,7(3):201-205.
- [9] 严茹红,张萍,朱雪明. CD4 单抗选择对于流式细胞术分析 Th1/Th2 极化的有效性评价[J]. 免疫学杂志,2011,19(7):368-372.
- [10] 肖贵南,盛英美,陈浩桢,等. 白细胞介素-4 和免疫球蛋白 E 含量指标在快速检测药物引起过敏反应中的作用研究[J]. 中国药房,2010,21(21):1946-1948.
- [11] Kasaian MT, Marquette K, Fish S, et al. An IL-4/IL-13 dual antagonist reduces lung inflammation, airway hyper-responsiveness, and IgE production in mice[J]. Am J Respir Cell Mol Biol,2013,49(1):37-46.
- [12] 成争艳,陈庄. Th1/Th2 平衡调节与哮喘的免疫治疗[J]. 现代预防医学,2008,35(19):3888-3890.
- [13] 曹银利,崔勤涛,唐成和,等. IL-4 及其受体和 IL-13 基因多态性与儿童哮喘的相关性研究[J]. 中国现代医学杂志,2012,22(24):31-35.
- [14] 冯益真,李舒,崔爱华. 哮喘患儿血清 Th1/Th2 类细胞因

子水平及其临床意义的研究[J]. 山东医药, 2002, 42(5): 21-22.

[15] Liang C, Jiang T. Acupoint autohemotherapy for allergic rhinitis and its effect on serum IL-12 and IFN-gamma [J]. Zhongguo Zhen Jiu, 2012, 32(12): 1077-1080.

[16] 尹德锋, 熊瑛. IL-4、IFN- γ 和 TGF- β 1 在支气管哮喘发病过程中的作用[J]. 临床合理用药, 2014, 7(6B): 161-163.

[17] Lhning M, Stroehmann A, Coyle AJ, et al. T1/ST2 is preferentially expressed on murine Th2 cells, independent of interleukin 4, interleukin 5, and interleukin 10, and important for Th2 effector function[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(12): 6930-6935.

[18] Xu D, Chan LW, Leuing PB, et al. Selective expression of a stable cell surface molecule on type 2 but not type 1 helper T cells[J]. J Exp Med, 1998, 187(27): 787-789.

[19] 巩芷娟, 李伟毅, 陈广洁, 等. ST2 作为 Th2 细胞亚群标志以及其与支气管哮喘的关系的研究[J]. 上海免疫学杂志, 2002, 22(2): 82-85.

[20] 黄丰, 童晓云, 张荣华. 麻杏石甘汤调节哮喘模型小鼠 Th1/Th2 反应的机制初探[J]. 中药材, 1994, 31(10): 51-52.

[21] 吴婷婷, 汪悦. Th1/Th2 平衡紊乱与中医证本质之关系[J]. 现代中西医结合杂志, 2006, 15(6): 827-828.

[22] 王阿芳, 钱粉红, 周林福. IL-4、IL-13 单核苷酸多态性与中国东南方汉族人群哮喘关系的研究[J]. 中华哮喘杂志, 2012, 6(6): 420-424.

[23] 颜婷. IL-4 与儿童呼吸系统炎症性疾病的关系[J]. 南昌大学学报(医学版), 2012, 52(2): 83-84.

(收稿日期: 2016-02-17 修回日期: 2016-06-12)

• 综 述 •

同型半胱氨酸检测技术的研究进展

陈尚武 综述, 李青华 审校

(广西壮族自治区梧州市藤县人民医院检验科 543300)

关键词: 同型半胱氨酸; 色谱技术; 酶法分析技术; 荧光偏振免疫分析法; 荧光探针检测技术
DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2016. 19. 034 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-4130(2016)19-2742-03

同型半胱氨酸(Hcy)是蛋氨酸去甲基后形成的一种含硫氨基酸,属于蛋氨酸循环的中间产物^[1]。血浆 Hcy 是一个总称,包括还原型 Hcy,双硫 Hcy,混合双硫半胱氨酸-Hcy 和混合双硫蛋白质-Hcy,正常情况下游离 Hcy 较少,主要以蛋白质形式存在^[2]。

Mccully^[3]描述 Hcy 尿毒症患者的血管病变特征,患者的代谢障碍在任何阶段,Hcy 是引起临床表现的原因,由此提出 Hcy 可能与动脉粥样硬化有关。Lcken 首次报道冠心病患者存在 Hcy 代谢障碍。Kang 等发现 MTHFR 与 Hcy 代谢有关。相关临床资料显示 Hcy 是冠心病的一个新的独立危险因素,可作为心脑血管病、肾脏病、老年痴呆与帕金森症、妊娠合并症、先兆子痫与不良事件的预测指标,是近年来医学研究的新热点。Hcy 的检测方法也不断更新,现就 Hcy 的检测技术综述如下。

1 Hcy 概述

Hcy 于 1932 年由 Vincent Du Vigheaud 发现,分子式为 C₄H₉NO₅S,来源于蛋氨酸,由甲硫氨酸转甲基后生成。合成途径为蛋氨酸在 ATP 参与下,由蛋氨酸腺苷转移酶(MAT)催化,生成 S-腺苷蛋氨酸(SAM),SAM 又经 Hcy 甲基转移酶(HMTase)催化,去甲基生成 S-腺苷同型半胱氨酸(SAH),接着由 SAH 水解酶催化生成 Hcy。

Hcy 在体内的代谢:(1)Hcy 在胱硫醚缩合酶(CBS)的催化下与丝氨酸缩合成胱硫醚,胱硫醚又由胱硫醚酶催化生成半胱氨酸和 α 酮丁酸,代谢产物进入三羧酸循环或由尿液排出,2 步转化均需维生素 B₆ 参与或经氧化结合生成高胱氨酸。(2)Hcy 可在叶酸和维生素 B₁₂ 的辅助下甲基化重新合成甲硫氨酸,此过程需要甲硫氨酸合成酶(MS)催化,且须有 N5-甲基四

氢叶酸(THF)作为甲基供体。(3)释放到细胞外液。凡是涉及 Hcy 代谢的各种酶和辅助因子异常均可导致血液中总同型半胱氨酸的增加而形成高同型半胱氨酸血症。高同型半胱氨酸与老年性痴呆、肾病、糖尿病、妊娠相关病(如子痫、先天缺陷、死胎、流产)等相关。因此,检测 Hcy 具有重要的临床意义。

2 Hcy 检测技术

2.1 色谱技术 1901 年俄国植物学家 Tswett 在进行植物色素的分离试验发明,“色谱法”一词最早正式出现在《叶绿素的物理化学研究》和《吸附分析与色谱法》这 2 篇论文中^[4]。色谱法根据分离原理的不同分为吸附色谱、分配色谱、离子交换色谱、排阻色谱;根据固定相的不同可分为柱色谱、薄层色谱、纸色谱;根据流动相物态的不同分为气相色谱和液相色谱。应用色谱法检测 Hcy 主要有纸色谱法、薄层色谱法、气相色谱法(GC)、高效液相色谱法(HPLC),由于质谱(MS)技术的不断成熟,Hcy 由单一的色谱法发展到色谱与质谱的连用检测。

2.1.1 薄层色谱法 1962 年 Carson 等^[5]对患者的尿液进行化学分析,经纸色谱进一步分析确定为 Hcy。国内利用薄层色谱技术检测 Hcy 的报道在上世纪 80~90 年代较多,且大多数方法为吴有光等和闫英地等^[6-10]的双向薄层色谱法分析氨基酸,如利用微型双向薄层色谱法检测氨基酸代谢病,利用双向展开剂,第 1 向展开剂为异丙醇-乙酸乙酯-丙酮-甲醇-仲戊醇-氨水-水(9:3:3:1:1:3:3),第 2 向展开剂为正丁醇-丙酮-异丙醇-甲酸-水(9:4:4:1.5:3),以镉-茚三酮酸化丙酮溶液为显色剂,通过与标准图谱比对,定性检测 1 例 Hcy 尿毒症患者,虽然薄层扫描法可用于 Hcy 的定量检测,但因该方法灵敏性低、重复性差、标本前处理操作繁琐等原因,临床未能得