

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- $\gamma$  和 TGF- $\beta$ 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, Leung 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<sup>[1]</sup>。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<sup>[2]</sup>。

Mccully<sup>[3]</sup>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 C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>5</sub>S,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  $\alpha$  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 B<sub>6</sub> 参与或经氧化结合生成高胱氨酸。(2)Hcy 可在叶酸和维生素 B<sub>12</sub> 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<sup>[4]</sup>。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<sup>[5]</sup>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<sup>[6-10]</sup>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

到普及<sup>[11]</sup>。

**2.1.2 气相色谱法** 1987 年 Stabler 等<sup>[12]</sup>首先报道 GC-MS 用于血浆 Hcy 检测,该法首先在标本中加入内标物,沉淀蛋白后上清液用离子交换柱色谱进行预处理,使用水复溶,衍生处理后进样经 GC-MS 分析,以保留时间和质谱进行定性和定量。Myung 等<sup>[13]</sup>应用固相微萃取技术处理标本,采用 GC-MS 同时检测样品中的 Hcy、半胱氨酸和蛋氨酸含量。有研究报道,将 GC 法联合电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)检测血清总的 Hcy、半胱氨酸和蛋氨酸,该法往样品中加入硼氢化钠打开二硫键,最终衍生成 N-三氟乙酰-O-异丙酯衍生物进行测定<sup>[14]</sup>。虽然这些方法具有高度的精密性、灵敏性和专一性,但操作复杂,化学试剂毒性大,耗时长,难以适合常规临床化学实验室的使用,无法普及。

**2.1.3 液相色谱法** 根据检测方法的不同又可分为紫外法(HPLC-UV)、荧光法(HPLC-FD)、示差折光法(HPLC-RID)、电化学法(HPLC-ED)等。HPLC-FD 方法主要采用柱前或柱后衍生技术,然后通过 HPLC 将衍生物分离,并由荧光检测器进行检测。相关研究报道使用了这种方法<sup>[15-17]</sup>。HPLC-ED 具有标本处理简单,无需衍生化等特点,又具较高的灵敏性、专一性、稳定性,应用比较广泛,文献报道也比较多<sup>[18-19]</sup>。

近几年研究表明较多的是 HPLC-MS 联用方法, Espina 等<sup>[20]</sup>建立高效液相色谱联合电感耦合等离子体质谱和电喷雾电离串联质谱(HPLC-ICP-MS-ESI-MS)法测定血清中游离 Hcy;国内还采用超高效液相色谱-质谱法(UPLC-MS/MS)联合检测血清中叶酸代谢物<sup>[21]</sup>,该法采用 BEH C18 色谱柱(2.1 mm×50 mm, 1.7 μm),以甲酸-乙腈为流动相,流速为 0.4 mL/min,进样体积 5 μL,梯度洗脱,电喷雾正离子模式下以多反应检测(MRM)方式,6 种叶酸代谢产物[叶酸、5-甲基四氢叶酸(5-MeTHF)、5-甲酰四氢叶酸(5-FoTHF)、Hcy、SAM、SAH]分别在一定范围内呈线性相关,加样回收率及日内与日间精密密度良好。

HPLC 法是目前公认的高精密度的浓度检测方法,具有特异性高、灵敏度高、重复性好的优点,色谱条件确定后一般均可获得稳定的结果。

**2.2 酶法分析技术** 酶法分析技术是以酶为试剂测定酶促反应的底物、辅酶、辅基、激活剂、抑制剂及酶偶联法测定酶活性等方法。由于酶作用的特异性高,成分复杂的血清等液体标本不需进行预处理就能检测,极大简化了实验操作程序,试剂酶的本质大多是蛋白质,酶促反应的条件温和,无毒性,具有良好的应用前景。

**2.2.1 酶循环法** 罗氏公司采用酶比色法测定血清 Hcy,其原理为氧化型 Hcy 首先被还原为游离 Hcy,然后在 Hcy S-甲基转移酶催化下,再与 S-腺苷甲硫氨酸反应形成甲硫氨酸(Met)和 SAH。SAH 的评估是通过一种偶联的酶反应,其中 SAH 经 SAH 水解酶催化形成腺苷(Ado)和 Hcy,而 Hcy 又循环进入 Hcy 转化反应中,形成的循环反应扩大了检测信号从而被检测。

**2.2.2 酶转换法** 原理为氧化型 Hcy 首先被还原剂还原为还原型 Hcy,还原型 Hcy 随后被分解,分解产物在氧化剂(如 FeCl<sub>3</sub>)存在下与呈色剂二乙基对苯二胺硫酸盐反应形成甲基蓝色化物,甲基蓝色化物与标本 Hcy 的浓度呈正比,通过测定

吸光度的变化值,即可检测标本的 Hcy 总浓度。

众多报道显示酶法分析技术与荧光偏振免疫法(FPIA)及高效液相色谱法(HPLC)进行对比,各项指标均无明显差异,酶法检测血清 Hcy 具有操作简单、精密密度良好,线性范围宽等诸多优点,且结果准确,值得推广<sup>[22-24]</sup>。

**2.3 FPIA 法** 是一种定量免疫分析技术,其基本原理是荧光物质经单一平面的蓝偏振光(485 nm)照射后,吸收光能跃入激发态,随后回复至基态,并发出单一平面的偏振荧光(525 nm)。偏振荧光的强弱程度与荧光分子的大小呈正相关,与其(受激发时)转动的速度呈反相关。FPIA 最适宜检测小至中等分子物质,常用于药物、激素的检测。采用竞争反应原理,在缺乏未标记分析物(通常是待测样品)时荧光信号最强;加入未标记分析物后,在已标记和未标记标本之间的竞争将减弱荧光信号。荧光信号强度与游离的分析物浓度呈正比,与待测标本中未标记分析物的浓度呈反比。

FPIA 法的优点是灵敏度高,如检测 Digoxin 的灵敏度可达 0.2 ng/mL,精密密度高、速度快、操作简便,标本用量少,仪器不需每日校准。缺点是试剂盒专属性强,仪器设备昂贵。

**2.4 荧光探针检测技术** 荧光探针一般由荧光基团和识别基团通过连接基团连接而成。荧光基团具有大 π 键共轭体系,属刚性平面结构,是发射荧光并通过仪器输出电信号的信号基团。识别基团是通过络合或(和)化学反应与被分析物发生作用的部分。当识别基团选择性地与被分析物结合或反应时,引起探针的化学环境发生改变,一般表现为荧光基团荧光信号的增强或减弱。

Hcy、半胱氨酸和还原型谷胱甘肽(GSH)等是生物体中主要的小分子生物硫醇化合物,在维持生物的正常生理活动中起重要作用。根据探针与生物硫醇化合物的反应机制,可把探针分为 2 大类<sup>[25]</sup>。第 1 类主要是利用生物硫醇分子中巯基的亲核性、还原性和金属离子络合能力与探针分子发生反应。第 2 类荧光探针设计主要是利用荧光探针与生物醇中巯基和氨基官能团发生协同反应。

探针检测技术目前临床应用的报道非常少,但研究性文献较多。Yang 等<sup>[26]</sup>研究报道利用醛基探针检测小分子生物硫醇化合物,该探针可选择性地与硫醇化合物中的 Hcy 和半胱氨酸发生反应,且成功应用到生物成像中检测低毒性的活细胞内半胱氨酸和 Hcy。不同物质设计的荧光基团,与探针的反应机制与也不相同,如以黄酮类、香豆素类、吡啶啉类物质等。Xie 等<sup>[27]</sup>研发设计的荧光探针基于醛基的环合反应,通过抑制 C=N 键诱导分子内氢键作用引起荧光淬灭而使吸收峰出现蓝移(107 nm),该机制已通过 H1NMR 谱和 MS 谱的分析验证。Zhang 等<sup>[28]</sup>基于黄酮类物质设计的荧光探针针对半胱氨酸和 Hcy 的灵敏度高。Dai 等<sup>[29]</sup>采用醛基香豆素氯化物研发荧光探针,GSH、Hcy、半胱氨酸的检测限分别是 0.08、0.09、0.18 μmol/L。

荧光探针技术具有体积小、合成简单、灵敏度高、选择性好、可直接观察等优点。缺点:(1)一些荧光探针溶解在考察体系后,难以提取分离,不具备多次重复使用。(2)因一些小分子荧光探针的非水溶性与不良反应,使其临床应用受到限制。(3)小分子荧光探针难以制作成光学器械与光学仪器结合,无法实现自动化检测。由于荧光探针的普适性不强,因此应用受

到较大限制。

### 3 小 结

综上所述,血浆或血清 Hcy 检测可给临床诊断或观察提供必要的科学依据,检测方法较多且各具特点,目前临床主要以酶法分析技术为主,标本不需进行预处理,极大地简化实验操作程序,适应临床医学实验室的要求,值得临床推广应用。

### 参考文献

- [1] 崔秀玉,曹美芳,孙华,等. 同型半胱氨酸的代谢及其临床应用[J]. 医学检验与临床,2008,19(5):71-72.
- [2] 李俊玲,于天仪. 血浆同型半胱氨酸检测方法及其临床应用进展[J]. 医学检验与临床,2009,20(4):78-79.
- [3] McCully KS. Vascular pathology of homocysteinemia; implications for the pathogenesis of arteriosclerosis[J]. Am J Pathol,1969,56(1):111-128.
- [4] 张清建. 苜蓿特色谱技术缘何被埋没一段时间[J]. 化学通报,2001,64(12):802-804.
- [5] Carson NA,Neill DW. Metabolic abnormalities detected in a survey of mentally backward individuals in Northern Ireland[J]. Arch Dis Child,1962,37(16):505-513.
- [6] 吴有光. 微型双向色谱检测诊断同型胱氨酸尿症[J]. 江西医学院学报,1989,29(3):79-81.
- [7] 吴有光,匡渤海,汪安安,等. 氨基酸、有机酸、碱基核苷类化合物的双向色谱多相同步分析[J]. 江西医学院学报,1994,34(4):1-5.
- [8] 闫英地,陈进生. 应用微型双向薄层色谱技术检测氨基酸代谢病[J]. 中国计划生育学杂志,1996,17(6):330-332.
- [9] 吴有光,匡渤海. 弱智学校学生先天性氨基酸代谢病的双向色谱法检测调查[J]. 中华医学遗传学杂志,1994,11(6):369-371.
- [10] 吴有光,汪安安,龚十妹. 微型双向薄层色谱分析干滤纸血斑-快速诊断先天性氨基酸代谢病[J]. 中华医学检验杂志,1989,12(6):137-138.
- [11] 吴有光,熊丽萍,南国华. 外标原位扫描定量双向薄层色谱测定氨基酸[J]. 色谱,1987,9(4):256-259.
- [12] Stabler SP,Marcell PD,Podell ER,et al. Quantitation of total homocysteine, total cysteine, and methionine in normal serum and urine using capillary gas chromatography-mass spectrometry[J]. Anal Biochem,1987,162(1):185-196.
- [13] Myung SW, Kim M, Min HK, et al. Determination of homocysteine and its related compounds by solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry[J]. J Chromatogr B Biomed Sci Appl,1999,727(1/2):1-8.
- [14] De Laflor SR, Montes-Bayón M, Sanz-Medel A. Determination of total homocysteine in human serum by capillary gas chromatography with sulfur-specific detection by double focusing ICP-MS[J]. Anal Bioanal Chem,2003,377(2):299-305.
- [15] 郭健,肖飞,唐志毅. 高效液相色谱法测定血浆同型半胱氨酸[J]. 中华检验医学杂志,2000,23(4):217.
- [16] 姚勤,张峻,何瑾,等. 高效液相色谱法测定人血浆中同型半胱氨酸浓度[J]. 华西医学,2012,27(6):809-811.
- [17] 唐秀芳,甄乾娜,樊子勉,等. 柱前衍生高效液相色谱-荧光检测法测定血浆中同型半胱氨酸[J]. 色谱,2012,30(6):613-617.
- [18] 王旗,宋洋,李潭. 高效液相色谱电化学检测法测定血浆中同型半胱氨酸[J]. 中华预防医学杂志,2004,38(3):204-207.
- [19] 潘峰,孙玮,张青,等. 高效液相色谱法测定血浆中同型半胱氨酸[J]. 氨基酸和生物资源,2010,32(4):55-57.
- [20] Espina JG, Montes-Bayón M, Blanco-González E, et al. Determination of reduced homocysteine in human serum by elemental labelling and liquid chromatography with ICP-MS and ESI-MS detection[J]. Anal Bioanal Chem,2015,407(26):7899-7906.
- [21] 丁晓琛,王秀伟,董艳婷,等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定血清中叶酸代谢物[J]. 分析试验室,2015,34(9):993-997.
- [22] 符俊超,邸玉玮,郑卫东,等. 循环酶法检测同型半胱氨酸的性能验证分析[J]. 中国卫生检验杂志,2014,24(13):1913-1915.
- [23] 梁释予,扈剑飞. 酶转换法检测血清同型半胱氨酸在常规生化检验中的应用评价[J]. 当代医学,2014,20(19):154-155.
- [24] 张晓坤,黎文成,古雅珏,等. 酶转换法检测血清同型半胱氨酸在常规生化检验中的评价[J]. 中国医药指南,2011,9(19):5-7.
- [25] 王胜清,申世立,张延如,等. 小分子生物硫醇荧光探针研究进展[J]. 有机化学,2014,34(9):1717-1729.
- [26] Yang C, Wang X, Shen L, et al. An aldehyde group-based P-acid probe for selective fluorescence turn-on sensing of cysteine and homocysteine[J]. Biosens Bioelectron,2016,80(10):17-23.
- [27] Xie P, Gao G, Liu J, et al. A new turn on fluorescent probe for selective detection of cysteine/homocysteine[J]. J Fluoresc,2015,25(5):1315-1321.
- [28] Zhang J, Lv Y, Zhang W, et al. A flavone-based turn-on fluorescent probe for intracellular cysteine/homocysteine sensing with high selectivity[J]. Talanta,2016,146(25):41-48.
- [29] Dai X, Wang ZY, Du ZF, et al. A colorimetric, ratiometric and water-soluble fluorescent probe for simultaneously sensing glutathione and cysteine/homocysteine[J]. Anal Chim Acta,2015,900(67):103-110.