

• 综 述 •

α1 抗胰蛋白酶缺乏症的研究进展*

秦 莉 综述, 罗光华[△] 审校

(常州市第一人民医院综合实验室/常州市个性化诊疗高新技术研究重点实验室, 江苏常州 213003)

关键词: α1 抗胰蛋白酶缺乏症; α1 抗胰蛋白酶; 基因型; 肝硬化; 肺气肿

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2013. 09. 024

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)09-1111-04

α1 抗胰蛋白酶缺乏症 (α1-antitrypsin deficiency, AATD) 是一种严重的基因紊乱性疾病, 主要是由于编码 α1 抗胰蛋白酶 (α1-antitrypsin, AAT) 的基因突变引起血浆中蛋白酶抑制剂 AAT 的缺乏, 从而使中性粒细胞弹性蛋白酶与蛋白酶抑制剂之间的平衡遭到破坏, 中性粒细胞释放的弹性蛋白酶、组蛋白酶不断积累并降解肺组织的弹性蛋白, 损伤肺泡的弹性纤维, 破坏肺泡间隔, 从而导致肺气肿^[1]。该疾病的临床表现多样, 其中主要引起肺气肿、肝硬化, 极少引起致死性脂膜炎和继发性脉管炎。1963 年 Carl-Bertil Laurell 与 Sten Eriksson 首次报道了 AATD, 他们认为血清 AAT 水平低下与肺气肿的发生有很大关系^[2]。此后, AATD 的发病机制和基因异常得到进一步研究。AATD 主要是由于编码 AAT 蛋白的基因突变引起 AAT 的含量降低。它是一种常染色体共显性遗传, 符合孟德尔遗传定律^[3]。该疾病的主要突变类型是 PIZ 和 PIS 型, 其中 PIZ 型为 342 位谷氨酸 (GAG) 突变为赖氨酸 (AAG), PIS 型为 264 位的谷氨酸 (GAA) 突变为缬氨酸 (GTA)^[4]。PIZZ 型纯合突变体可引起严重的疾病, 这种突变型是引起呼吸道症状的一个危险因素^[2]。另外, 环境因素如吸烟、粉尘等能加重疾病的进程。PIZZ 型也可以导致儿童期和成年期的急性慢性肝损伤^[2-3]。另外, 有研究显示 AATD 可以增加肝癌、膀胱癌、结直肠癌、胆囊腺癌和恶性淋巴瘤等肿瘤的发病风险。虽然 AATD 在肺癌发展中的确切作用未知, 但已证明携带 AATD 等位基因的患者可增加肺癌的发病风险^[5]。

1 AAT 的分子、蛋白特性

AAT 是体内一种重要的丝氨酸蛋白酶抑制剂, 主要由肝细胞合成的相对分子质量为 52 000 的蛋白, 但是也可由单核细胞、巨噬细胞、肺泡细胞、肠上皮细胞和角膜上皮细胞合成^[2,4,6]。它主要在肺脏中发挥生理功能, 保护肺弹性组织免受中性粒细胞弹性蛋白酶的降解。该蛋白由位于 14 号染色体 q31-32.3 的蛋白酶抑制剂基因编码, 即 *SERPINA1* 基因, 该基因长 12.2 kb, 包括 4 个编码外显子, 3 个非编码的外显子和 6 个内含子^[7]。肝细胞和单核细胞都有编码该基因的启动子, 分别通过不同的机制介导。AAT 的半衰期为 5 d, 其蛋白组成包括 394 个氨基酸和 3 个与天冬氨酸相偶联的糖基化侧链, 这些侧链对延长 AAT 分子的半衰期有很重要的作用^[2,8]。AAT 是一种急性时相反应蛋白, 在炎症、感染期患者的血浆中, AAT 含量会增加 3~4 倍。在口服避孕药治疗和妊娠期间, 其含量也会增加^[6]。大量实验证实, AAT 参与炎症反应的调节^[9]。另外, AAT 的主要功能是抑制胰蛋白酶, 可抑制中性粒细胞弹性蛋白酶的活性。AAT 也可以抑制或减慢细菌、病毒

的复制和传染, 包括人类免疫缺陷病毒^[3]。

2 AATD 的相关特性

2.1 病理生理学特性 AAT 的基因突变类型很多, 大约有 100 多种已经被鉴定。其中, 最常见的突变类型 PIZ 和 PIS 型。不同的突变类型与肺气肿的患病风险有很大关联, PIZZ 型和无效基因型的个体患病风险最高, 95% 的临床相关缺陷的患者是 PIZZ 基因型; PISZ 的个体有中等强度的患病风险。血浆 AAT 的相对检测阈值是 11 μmol/L^[10], 如果低于该值应怀疑其有相关突变并需要做进一步的检查。Z 型突变是 342 位的谷氨酸被赖氨酸取代, S 型突变是 264 位的谷氨酸被缬氨酸取代。还有一些罕见突变, 如 Mmalton 型突变是 52 位的苯丙氨酸缺失或 51 位的苯丙氨酸缺失, Siyama 型突变是 53 位的丝氨酸被苯丙氨酸取代, Mheerlen 型突变是 369 位的脯氨酸被亮氨酸取代, Mprociada 型突变是 41 位的亮氨酸被脯氨酸取代等^[11]。其中, PIMM 型占 85% 以上, 存在于正常人群中。其他 PIMS、PISS、PIMZ、PISZ 和 PIZZ 大约占 15%^[8]。

PIZ 突变体与肝脏疾病有很大关联, 通常在 PIZZ 纯合个体和少量的杂合个体中发现肝脏疾病。在 Z 突变蛋白合成过程中, Z 基因被转录翻译, Z 突变蛋白聚集形成大量的多聚物, 多聚物的形成在疾病的病理生理过程起关键性作用^[12]。但这种误折叠和聚合作用的分子机制还不清楚。有研究认为, AAT 分子三聚体的这种结构揭露了多聚物连接时是通过羧基末端 34 位残基的功能切换区介导的^[13]。AAT 分子结合中性粒细胞弹性蛋白酶的活化位点与蛋白的构象变化有关^[7]。多聚物在肝脏中聚集是导致肝病的主要因素, 在肺脏中是否会有多聚物的形成和累积还需要进一步研究。

S 突变是与临床疾病相关的第二大突变。S 蛋白在胞内单独存在, 不形成多聚物。而 PISZ 杂合子会在肝脏中形成杂合多聚体, 当然也会导致肝脏疾病的发生, 发病情况仅次于 PIZZ 纯合子^[12]。

2.2 流行病学特性 AATD 有 2 个主要的流行病学特征: (1) 它是一种常见的疾病; (2) 它没有引起临床医生的重视, 但能引起严重的不良反应^[11]。尽管 AATD 是常见的遗传性疾病, 但 AATD 的流行在不同国家之间有很大差异。不同的变异类型, 其相关疾病的发展也不相同。其中, 最常见的突变类型 PIS、PIZ 与肺气肿和肝硬化有很大关联。AATD 在不同人群中都有报道, 包括非洲黑人、阿拉伯人、中东地区的犹太人、澳大利亚人、欧洲和北美地区的白人、中亚人、东亚亚洲人和东南亚人^[14]。该疾病主要见于欧洲, 是白种人常见的基因遗传病, 各个国家之间仍有差异。有学者对 21 个欧洲国家其基因

* 基金项目: 江苏省常州市科学技术局资助项目 (CM20113007)。
[△] 通讯作者, E-mail: shineroar@163.com。

作者简介: 秦莉 (1986~), 女, 在读硕士研究生, 主要从事疾病分子诊断

突变频率进行调查和统计分析显示^[15], Z 型突变主要在南部的斯堪的纳维亚和北欧沿海地区, 往南、往东地区的基因频率逐渐减少。相反, S 等位基因的突变引起血浆 AAT 中等程度的缺乏, 其中, 在南欧较为常见, 往东北逐渐减少。美国 Z 突变基因频率比欧洲低, 而其 S 突变比北欧高^[7, 15-16]。

有学者对 20 个亚洲国家的 PIS、PIZ 型突变频率进行流行病学调查后发现, 这 2 种突变类型在这些国家的不同地区也有差别。其中, PIZZ 型最高的在阿富汗、巴基斯坦、沙特阿拉伯和泰国^[17]。然而, 中国对该疾病的研究调查较少, 临床对 AAT 的检查也没有普及, 因此, 有许多患者没有被检测出来。因 AATD 与肺气肿和肝硬化有很大关联, 对这些患者应进行常规 AAT 含量或基因型的检测, 防止漏诊。

3 与 AATD 有关的疾病类型

3.1 肝脏疾病 与 AATD 有关的肝脏疾病是一种与遗传和环境都相关的疾病, 导致肝脏疾病的主要突变类型是 PIZZ 型, 也包括 PIZ 杂合子^[2, 18]。PIZZ 突变体可以导致儿童期和成年期的急、慢性肝损伤。主要的临床体征是新生儿出生后黄疸延长, 伴结合胆红素过高和转氨酶异常^[2]。最近国内报道了 1 例肝功能异常的儿童患者, 其最终确诊为 AATD^[19]。与 Z 型突变相关的婴儿肝脏疾病主要表现为新生儿胆汁淤积性黄疸, 数月后自然消退^[6]。那些在儿童期没有肝脏疾病的患者, 成年后肝硬化和肝细胞癌的风险增加, 肝硬化发生在 50 岁左右^[6]。Z 型突变蛋白在肝内质网的慢性聚合作用是肝硬化和肝纤维化形成的主要原因。该折叠蛋白的异常堆积极大地增加了肝脏疾病的风险, 其堆积形成的胞内包涵体使肝脏受损^[6-7, 20]。聚合作用是该疾病的病理生理过程的一个重要步骤, AAT 分子结合中性粒细胞弹性蛋白酶的反应位点与该蛋白的构象变化有关。Z 蛋白突变体通过替代位于反应位点的单一氨基酸, 改变该分子的构象灵活性, 从而导致突变蛋白的聚集^[12]。目前尚没有针对与 AATD 相关的肝脏疾病的有效治疗方案, 只能采用一些措施来预防并发症(如出血、腹水、瘙痒、营养不良、脂溶性维生素缺乏、感染和恶性肿瘤等)的发生。

3.2 肺部疾病 AAT 的主要生理功能是保护下呼吸道组织免受中性粒细胞弹性蛋白酶的降解^[21]。在正常生理状态下, 蛋白酶-抗蛋白酶保持平衡状态, 这是防止肺气肿发生的重要因素。由基因突变引起的 AAT 缺乏导致肺泡组织受损, 最终导致慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary diseases, COPD)、肺气肿的形成^[4, 20-21]。众多实验结果显示, AAT 相对缺乏引起的蛋白酶-抗蛋白酶系统失衡是国人肺气肿致病的真正原因, 但也有学者认为此类患者血清 AAT 数量并未减少, 而是表现为功能不足^[22]。肺气肿是与 AATD 相关的最常见的疾病, 一般在早期(40~50 岁)发病, 主要影响肺底部全小叶, 出现不对称的病理变化^[7]。研究发现一秒用力呼气容积(forced expiratory volume in one second, FEV1)是评估患者生存率和肺气肿发生的主要指标, PIZZ 型低 FEV1 比高 FEV1 的患者发生肺气肿的概率更大。发展为肺气肿有 3 个危险因素——气道高反应性、反复感染和家族遗传因素^[3]。AAT 多聚体的形成在肺气肿的进展中发挥重要作用, 它可以加速肺部的炎症反应。多聚体主要在较低的 pH 环境下形成, 而吸烟可造成轻度酸性环境, 加速多聚体的形成, 造成肺组织的损伤^[23]。研究结果显示, AATD 也与肺癌的患病风险有很大关系, 大多肺癌患者体内存在 AAT 变异蛋白和中性粒细胞弹性蛋白酶启动子区域的多态性(-903 T 和 -741 G 等位基因)^[5, 24]。吸烟可以增加患病的风险, 通过诱导肺组织的炎症

反应和氧化应激, 促进肺组织的炎症细胞释放蛋白水解酶, 使蛋白水解酶与抗蛋白水解酶失衡, 引起肺组织的损伤^[7, 25]。

3.3 坏死性脂膜炎 1972 年 Warter 等人首次发现 AAT 与坏死性脂膜炎相关^[11], 主要表现为自发性皮肤坏死、化脓, 主要发生在臀部和躯干^[2]。少数病例报道, 注射纯化的人 AAT 制剂可以使脂膜炎的临床症状快速消退^[6]。然而, 脂膜炎的发生比较罕见, AATD 患者的发生率大约为 1%^[7]。该疾病可能伴有的基因型为 ZZ、SZ 及 SS^[11]。

3.4 系统性脉管炎 该疾病在 AATD 中的发生频率不高, 有病例显示 AAT 异常的患者与抗蛋白酶 3 抗体[如抗中性粒细胞胞质抗体(antineutrophil cytoplasmic antibody, ANCA)]阳性的脉管炎有一定的关联^[7, 11]。目前提出 3 种可能导致与 AATD 相关脉管炎发生的机制:(1)蛋白酶 3 是 AAT 的主要作用物, AAT 缺乏可增强机体对蛋白酶 3 的自身免疫性反应;(2)连锁不平衡性可能会引起自身免疫性基因伴随异常的 AATD 表型遗传;(3)Z 突变体的聚合作用也会促使自身免疫性脉管炎的发生^[11]。对抗蛋白酶 3 抗体(如 ANCA)阳性的脉管炎要加以重视, 并进行相关检查^[11]。目前为止, 还有证据显示 AATD 可增加肿瘤(如淋巴瘤、膀胱癌、胆囊癌和肺癌)的发病风险, 并促进疾病的进展^[3]。

4 实验室诊断与筛查

在欧洲, 此类疾病很常见。临床上某些患者若疑诊为该遗传病, 需要做相关检查, 其中包括吸烟或不吸烟的伴有呼吸困难、COPD 或肺气肿症状的年轻人^[3]; 久治不愈的哮喘患者、不明原因的支气管扩张患者^[26]; 先证者的有相关症状的同胞^[27]; 有出血障碍的新生儿、黄疸延长和一些不明原因的肝硬化患者^[2-3]。2003 年美国胸科学会和欧洲呼吸协会已对 AATD 的诊断方针做了相关的概述。AATD 的诊断包括定量试验(血浆 AAT 水平的测定)及定性试验(AAT 突变基因的测定)。

4.1 血浆 AAT 水平检测 一般用火箭免疫电泳、放射免疫扩散和免疫比浊法来检测血浆 AAT 水平。这些检测方法简便、低廉, 但敏感性和特异性不高^[4, 10]。该蛋白是急性时相反应蛋白, 炎症会使其含量增加, 此时血浆含量就不能反映其真实水平^[3]。AAT 水平的阈值为 11 $\mu\text{mol/L}$, 低于此值时, 肺气肿的患病风险大大增加。AAT 含量测定只能作为初步筛查实验, 并不能确定是哪种类型的突变, 所以要想检测突变类型还需要做表现型和基因型测定。

4.2 表型测定 对定量检测 AAT 水平异常的患者可进行表型检测, 根据各种突变蛋白的等电点不同, 用等电聚焦法检测。根据各种突变蛋白在 pH 梯度下的电泳迁移率不同, 将它们分成不同的类型。起初 F 表示快迁移, S 表示慢迁移, M 表示居中, 随着新突变的发现, 人们按阿拉伯字母顺序进行编码^[3]。由于 AAT 分子的微观多态性和突变类型的多样性, 这种技术的实施需要特定的专家来进行^[28]。此外, 由于患者体内 AAT 含量比较低, 其表型可能不被测定出来, 结果还需要用特异性等位基因杂交技术检测^[29]。比如, 无效突变血中没有 AAT, 所以不能用等电聚焦法检测表型, 只能分析基因序列来确定。尽管该技术有一定的缺陷, 但它仍然为筛查和诊断提供了有用的信息。

4.3 基因型测定 基因分子水平的检测是从全血细胞中提取 DNA, 用实时定量 PCR 技术的等位基因特异性扩增来分析已知突变类型^[4]。一般利用熔解曲线来检测突变基因。有研究者用双探针法来检测正常和突变基因^[30]。最常检测的基因类

型是 MM、MZ、SS、SZ 和 ZZ 型,不能检测无效突变类型。如果其他未知的突变类型需要鉴定,可以采用直接测序法^[31]或变性梯度凝胶电泳法^[21]。

因该疾病的临床症状不典型,常存在并发疾病,许多医院并未常规开设 AAT 含量测定,这导致漏诊而延误治疗。对无症状患者的早期诊断可以帮助患者改善生活习惯来减少肺气肿的发生,特别是对于儿童,该疾病的预防很重要。因此,加强对该疾病的诊断力度,增强对该疾病的防范,以遏制其进一步发展和恶化。

5 相关治疗

伴有 COPD 的 AATD 患者应接受常规支持治疗,包括支气管扩张剂、注射皮质类固醇激素和肺部的康复治疗。一般这些患者有正常的免疫反应,建议注射抗流感和肺炎双球菌疫苗,增强抵抗力^[26]。细菌感染会导致疾病的加重,建议使用抗菌药治疗,防止病情的进一步恶化。研究者还在进一步研究新的治疗方案和新的药物,然而任何新药的应用都需要大量的实验证实才可以用于临床。随机、双盲和安慰剂的临床试验是评估某种治疗药物是否有效的金标准^[32]。对 AATD 的特异性治疗一般采用 AAT 支持疗法,其中,有 4 种可能的治疗方法:(1)静脉注射纯化人血浆蛋白的治疗;(2)AAT 吸入剂的应用;(3)重组 AAT 治疗和人工合成弹性蛋白酶抑制剂的治疗;(4)肺的减容修复手术^[7]。近来,还有些研究以慢病毒为载体,通过组建人 AAT 表达载体,分析其表达和可能的治疗作用^[33]。这些研究为基因治疗提供了一些的实验依据。其他的抗感染治疗还在进一步的研究中。

6 小 结

吸烟是该疾病最重要的危险因素^[20],其他影响疾病进程的危险因素包括:被动吸烟,职业性暴露于呼吸道刺激物、特殊环境(如煤、油燃烧和农业劳作等)^[34]。预防该疾病发作的有效措施包括:戒烟^[7]、减少空气污染、抗流感和肺炎感染的免疫治疗以及有炎症患者的早期抗菌药治疗等。目前一般医院没有开设 AAT 含量测定项目,国内对该疾病的相对诊断率比较低,对该疾病的报道也较少。然而,医务工作者应对一些可疑病例进行筛查,包括早期肺气肿患者,不明原因的肝硬化、新生儿胆汁淤积以及一些已知患者的家族成员等。通过检测血浆 AAT 水平,测定表型和基因型来确诊该疾病。有效预防该疾病可减少并发症的发生,减轻患者的痛苦,甚至可延长患者的生命。因此,开发一套完善、快速、简便、廉价的诊断方法是今后研究的重点。

参考文献

- [1] Sun Z, Yang P. Role of imbalance between neutrophil elastase and alpha 1-antitrypsin in cancer development and progression[J]. *Lancet Oncol*, 2004, 5(3): 182-190.
- [2] Fregonese L, Stolk J. Hereditary alpha-1-antitrypsin deficiency and its clinical consequences[J]. *Orphanet J Rare Dis*, 2008, 3: 16.
- [3] Vidal R, Blanco I, Casas F, et al. Guidelines for the diagnosis and management of alpha-1 antitrypsin deficiency[J]. *Arch Bronconeumol*, 2006, 42(12): 645-659.
- [4] Zaric B, Stojcevic J, Andrijevic L, et al. Relation of functional characteristics and serum alpha-1-antitrypsin (AAT) concentration in patients with PiMM phenotype and chronic obstructive pulmonary disease (COPD)[J]. *Eur J Intern Med*, 2011, 22(6): 603-606.
- [5] Topic AS, Jelic-Ivanovic ZD, Spasojevic-Kalimanovska VV, et al.

Association of moderate alpha-1 antitrypsin deficiency with lung cancer in the Serbian population[J]. *Arch Med Res*, 2006, 37(7): 866-870.

- [6] Janciauskiene SM, Bals R, Koczulla R, et al. The discovery of α 1-antitrypsin and its role in health and disease[J]. *Respir Med*, 2011, 105(8): 1129-1139.
- [7] Kelly E, Catherine MG, Carroll TP, et al. Alpha-1 antitrypsin deficiency[J]. *Respir Med*, 2011, 4(1): 1-8.
- [8] Miravittles M. Alpha-1-antitrypsin and other proteinase inhibitors[J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2012, 12(3): 309-314.
- [9] Heutink KM, ten Berge IJ, Hack CE, et al. Serine proteases of the human immune system in health and disease[J]. *Mol Immunol*, 2010, 47(11/12): 1943-1955.
- [10] Rachelefsky G, Hogarth DK. Issues in the diagnosis of alpha 1-antitrypsin deficiency[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2008, 121(4): 833-838.
- [11] Stoller JK, Aboussouan LS. Alpha1-antitrypsin deficiency[J]. *Lancet*, 2005, 365(9478): 2225-2236.
- [12] Bals R. Alpha-1-antitrypsin deficiency[J]. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2010, 24(5): 629-633.
- [13] Yamasaki M, Sendall TJ, Pearce MC, et al. Molecular basis of α 1-antitrypsin deficiency revealed by the structure of a domain-swapped trimer[J]. *EMBO Rep*, 2011, 12(10): 1011-1017.
- [14] de Serres FJ. Worldwide racial and ethnic distribution of alpha1-antitrypsin deficiency: summary of an analysis of published genetic epidemiologic surveys[J]. *Chest*, 2002, 122(5): 1818-1829.
- [15] Blanco I, de Serres FJ, Fernandez-Bustillo E, et al. Estimated numbers and prevalence of Pi * S and Pi * Z alleles of alpha1-antitrypsin deficiency in European countries[J]. *Eur Respir J*, 2006, 27(1): 77-84.
- [16] Lomas DA. The selective advantage of alpha1-antitrypsin deficiency[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2006, 173(10): 1072-1077.
- [17] de Serres FJ, Blanco I, Fernández-Bustillo E. Estimated numbers and prevalence of Pi * S and Pi * Z deficiency alleles of alpha1-antitrypsin deficiency in Asia[J]. *Eur Respir J*, 2006, 28(6): 1091-1099.
- [18] Fischer HP, Ortiz-Pallardó ME, Ko Y, et al. Chronic liver disease in heterozygous alpha1-antitrypsin deficiency PiZ[J]. *J Hepatol*, 2000, 33(6): 883-892.
- [19] 卢华君, 赵忠艳. 儿童 α 1-抗胰蛋白酶缺乏症 1 例[J]. *中国当代儿童杂志*, 2011, 13(4): 354-355.
- [20] Ko DH, Chang HE, Song SH, et al. Identification of compound heterozygous mutation in a Korean patient with alpha 1-antitrypsin deficiency[J]. *Korean J Lab Med*, 2011, 31(4): 294-297.
- [21] Ljubic M, Nikolic A, Divac A, et al. Screening of alpha-1-antitrypsin gene by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)[J]. *J Biochem Biophys Methods*, 2006, 68(3): 167-173.
- [22] 李萌博. α 1-抗胰蛋白酶缺乏与肺气肿关系的研究进展[J]. *山西医药杂志*, 2010, 39(8): 735-736.
- [23] Lisowska-Myjak B. AAT as a diagnostic tool[J]. *Clin Chim Acta*, 2005, 352(1/2): 1-13.
- [24] Topic A, Ljubic M, Nikolic A, et al. Alpha-1-antitrypsin phenotypes and neutrophil elastase gene promoter polymorphisms in lung cancer[J]. *Pathol Oncol Res*, 2011, 17(1): 75-80.
- [25] 王嘉, 孙武装, 于卫芳, 等. 慢性阻塞性肺疾病血清中性粒细胞弹性蛋白酶和 α 1-抗胰蛋白酶的检测及其意义[J]. *国际呼吸杂志*, 2011, 31(17): 1285-1289.
- [26] Perlmutter DH. Alpha-1-antitrypsin deficiency: diagnosis and

treatment[J]. Clin Liver Dis, 2004, 8(4): 839-859.

[27] Aboussouan LS, Stoller JK. Detection of alpha-1 antitrypsin deficiency: a review[J]. Respir Med, 2009, 103(3): 335-341.

[28] Brantly M. Efficient and accurate approaches to the laboratory diagnosis of alpha1-antitrypsin deficiency: The promise of early diagnosis and intervention[J]. Clin Chem, 2006, 52(12): 2180-2181.

[29] Rodríguez-Frías F, Vila-Auli B, Homs-Riba M, et al. Diagnosis of alpha-1 antitrypsin deficiency: limitations of rapid diagnostic laboratory tests[J]. Arch Bronconeumol, 2011, 47(8): 415-417.

[30] Greene DN, Procter M, Grenache DG, et al. Misclassification of an apparent alpha 1-antitrypsin “Z” deficiency variant by melting analysis[J]. Clin Chim Acta, 2011, 412(15/16): 1454-1456.

[31] Ferrarotti I, Scabini R, Campo I, et al. Laboratory diagnosis of al-

pha1-antitrypsin deficiency[J]. Transl Res, 2007, 150(5): 267-274.

[32] Luisetti M, Balfour-Lynn IM, Johnson SR, et al. Perspectives for improving the evaluation and access of therapies for rare lung diseases in Europe[J]. Respir Med, 2012, 106(6): 759-768.

[33] 欧海龙, 雷霆雯, 李红梅, 等. 慢病毒介导的重组人 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶在小鼠体内的表达[J]. 世界华人消化杂志, 2012, 20(19): 1720-1725.

[34] Senn O, Russi EW, Imboden M, et al. Alpha1-Antitrypsin deficiency and lung disease: risk modification by occupational and environmental inhalants[J]. Eur Respir J, 2005, 26(5): 909-917.

(收稿日期: 2012-10-17)

• 综 述 •

实时荧光定量 PCR 法检测儿童常见病原菌的研究进展

闫超综述, 孙红妹[△]审校
(首都儿科研究所细菌研究室, 北京 100020)

关键词: 聚合酶链反应; 病原; 细菌; 儿童
DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2013. 09. 025 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-4130(2013)09-1114-03

实时荧光定量聚合酶链反应(real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction, Real-time PCR)是根据荧光共振能量转移原理,设计相应的荧光标记核酸探针,通过 PCR 反应对靶 DNA 进行定性、定量测定的技术^[1],可根据样品的循环阈值,参照标准曲线准确计算出样本内核酸的起始浓度,实现 PCR 从定性到定量的飞跃。在 PCR 扩增的早期即可监测其反应动力学,既保持了 PCR 技术快速和灵敏的优点,又克服了传统 PCR 技术中存在的假阳性污染和不能进行准确定量的缺点。与现有基因检测方法相比较,该方法具有多病原同时检测、操作简便、仪器设备要求不高、经济等优势,可迅速应用于临床。

1 Real-time PCR 的原理

Real-time PCR 是在常规 PCR 基础上添加了荧光染料或荧光探针,利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程,最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析,见图 1。其基本原理在于 PCR 反应体系中加入荧光化学物质,PCR 产物随着 PCR 反应的进行不断积累,荧光强度与 PCR 产物的数量呈对应关系,实时检测荧光信号强度,进而确定扩增产物的数量,即检测每个循环结束后的产物量,从而实现 PCR 扩增的动力学监测,扩增曲线为 S 型。

在 Real-time PCR 技术中 2 个重要的概念:荧光阈值和 CT 值。荧光阈值是在荧光扩增曲线上人为设定的一个值,一般设置为扩增过程 3~15 个循环的荧光信号的标准差的 10 倍。当荧光值超过阈值时的循环数被称为 CT 值。CT 值与该模板的起始拷贝数的对数存在线性关系,起始拷贝数越多,CT 值越小。利用已知起始拷贝数的标准品可作出标准曲线,以 CT 值为横坐标,以一系列标准 DNA 分子的起始拷贝数的以 10 为底的对数为纵坐标,因此,只要获得未知样品的 CT 值,即可从标准曲线上计算出该样品的起始拷贝数^[2]。

2 Real-time PCR 的类型及特点

Real-time PCR 技术可以分为非特异性的 DNA 结合染料法和特异性探针法,后者由于增加了探针的识别步骤,特异性更高,但前者则简便易行。

2.1 非特异性的 DNA 结合染料法(非探针类) 荧光染料可以非特异性结合双链 DNA 的小沟,嵌合进 DNA 双链,但是不与单链结合。反应起始时,只产生很少的荧光,但随着反应进行,扩增产物的增加,即双链 DNA 的增加,荧光强度也随之增强。当 DNA 变性时则荧光信号降低。因此,通过每个循环结束时荧光强度的变化可估计 DNA 增加的量。此方法的优点是不需设计探针,简便,同时降低了检测成本,但其特异性较差,染料可以和任意双链 DNA 结合。目前常用的 DNA 结合染料为 SYBR Green I^[3]。

2.2 特异性荧光定量 PCR 方法(探针类) 此方法是根据荧光共振能量转移原理,当荧光基团与一个荧光淬灭基团(可以淬灭前者的发射光谱)的距离接近至一定范围(7~10 nm)时,会发生荧光能量转移,淬灭基团会吸收荧光基团在激发光作用下激发的荧光,从而使其不发光,一旦二者分开,淬灭作用即消失。根据荧光探针类型,目前常用的有 TaqMan 探针、双杂交探针、分子信标、蝎形探针等相关技术。以 TaqMan 探针为例说明其工作原理,探针完整时,报告基团发射的荧光信号被淬灭基团吸收;PCR 扩增时, Taq 酶的 5'~3'外切酶活性将探针酶切降解,使报告荧光基团和淬灭荧光基团分离,从而荧光监测系统可接收到荧光信号。

3 Real-time PCR 对于儿童常见病原菌的检测

国内系统性的关于儿童常见病原菌种类的报道较少,但总体上从城市儿科医院收集的标本测定结果看,儿童常见致病菌与成人有不少相似之处,少数存在特异性^[3]。其中,革兰阴性菌的比例约占 60%,超过革兰阳性菌。革兰阴性菌中肠杆菌