

100~300 bp 的片段,之后用电泳及高分辨率溶解曲线(HRM)的方法成功检测 SNP 位点,并通过盲法试验,证明 TSP 技术基因分型具有高度准确性。

#### 4 小 结

SNP 研究是人类基因组研究的热点,在相关遗传性疾病,新药研发,个体化治疗,法医学,临床检验及分子诊断等方面有重要的应用价值。检测 SNP 需要高通量、简便、高准确度的方法。基于传统方法原理,与生物化学、工程学、分析软件的新发现、新进展相结合改进、研发新方法,实现更快,更准,更简的 SNP 检测是未来的发展方向。

#### 参考文献

- [1] Kim S, Misra A. SNP genotyping: technologies and biomedical applications[J]. Annu Rev Biomed Eng, 2007, 9: 289-320.
- [2] Myers RM, Maniatis T, Lerman LS. Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis[J]. Methods Enzymol, 1987, 155: 501-527.
- [3] Gaudet M, Fara AG, Beritognolo I, et al. Allele-specific PCR in SNP genotyping[J]. Methods Mol Biol, 2009, 578: 415-424.
- [4] 马芬, 吴凤霞, 李宁, 等. 应用 Affymetrix 全基因组芯片检测染色体 7q36 区域的 DNA 拷贝数突变[J]. 中华医学遗传学杂志, 2009, 26(3): 336-339.
- [5] Gunderson KL. Whole-genome genotyping on bead arrays[J]. Methods Mol Biol, 2009, 529: 197-213.
- [6] Schinke-Braun M, Couget JA. Expression profiling using affymetrix genechip probe arrays[J]. Methods Mol Biol, 2007, 366: 13-40.
- [7] Gunderson KL, Steemers FJ, Lee G, et al. A genome-wide scalable SNP genotyping assay using microarray technology[J]. Nat Genet, 2005, 37(5): 549-554.
- [8] 施锦绣, 王莹, 黄薇. 基因组分型技术的发展和应[J]. 中国科学: C 辑, 2008, 38(10): 900-906.
- [9] Ding C, Jin S. High-throughput methods for SNP genotyping[J]. Methods Mol Biol, 2009, 578: 245-254.
- [10] Shen GQ, Abdullah KG, Wang QK. The TaqMan method for SNP genotyping[J]. Methods Mol Biol, 2009, 578: 293-306.

• 综 述 •

## 高敏心肌肌钙蛋白的临床研究进展

李萌辉<sup>1</sup>综述, 胡志东<sup>2</sup>审校

(1. 天津医科大学附属肿瘤医院预防医学中心, 天津 300060; 2. 天津医科大学总医院检验科, 天津 300052)

**关键词:** 高敏心肌肌钙蛋白; 心肌肌钙蛋白 T; 心肌肌钙蛋白 I; 心血管事件

**DOI:** 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2013. 12. 032

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1673-4130(2013)12-1561-02

急性冠状动脉综合征(ACS)包括 ST 段抬高心肌梗死(STEMI)、非 ST 段抬高心肌梗死(NSTEMI)和不稳定型心绞痛(UA)<sup>[1]</sup>。临床心肌坏死标志物的应用经历了从天冬氨酸氨基转移酶(AST)到乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶(CK)、心肌肌酸激酶同工酶(CK-MB)、直到心肌肌钙蛋白(cTn)的发展过程。但由于临床常规使用的 cTn 检测方法的分析性能大多未能达到 AMI 诊断指南中对方法学的要求,目前还不能满足临床诊断的需要<sup>[2]</sup>。随着商品化高敏心肌肌钙蛋白(hs-cTn)检测方法使得心肌损伤早期诊断的特异度和灵敏度进一步提高<sup>[3-4]</sup>。目前,国内外针对 hs-cTn 的临床研究已不少见,本文

- [11] Bell PA, Chaturvedi S, Gelfand CA, et al. SNPstream UHT; ultra-high throughput SNP genotyping for pharmacogenomics and drug discovery[J]. Biotechniques, 2002(Suppl): S70-72.
- [12] Luo C, Deng L, Zeng C. High throughput SNP genotyping with two mini-sequencing assays [J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2004, 36(6): 379-384.
- [13] 费丽娟, 季林丹, 张莉娜, 等. SNPstream 基因分型技术在医学遗传学研究中的应用[J]. 中华医学遗传学杂志, 2012, 29(1): 9-12.
- [14] Oeth P, del Mistro G, Marnellos G, et al. Qualitative and quantitative genotyping using single base primer extension coupled with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MassARRAY) [J]. Methods Mol Biol, 2009, 578: 307-343.
- [15] Gabriel S, Ziaugra L, Tabbaa D. SNP genotyping using the Sequenom MassARRAY iPLEX platform [J]. Curr Protoc Hum Genet, 2009, 2(2): 2-12.
- [16] Hardenbol P, Banér J, Jain M, et al. Multiplexed genotyping with sequence-tagged molecular inversion probes[J]. Nat Biotechnol, 2003, 21(6): 673-678.
- [17] Hardenbol P, Yu F, Belmont J, et al. Highly multiplexed molecular inversion probe genotyping; over 10 000 targeted SNPs genotyped in a single tube assay[J]. Genome Res, 2005, 15(2): 269-275.
- [18] Ji H, Welch K. Molecular inversion probe assay for allelic quantitation[J]. Methods Mol Biol, 2009, 556: 67-87.
- [19] Royo JL, Hidalgo M, Ruiz A. Pyrosequencing protocol using a universal biotinylated primer for mutation detection and SNP genotyping[J]. Nat Protoc, 2007, 2(7): 1734-1739.
- [20] Wang J, Chuang K, Ahluwalia M, et al. High-throughput SNP genotyping by single-tube PCR with Tm-shift primers[J]. Biotechniques, 2005, 39(6): 885-893.
- [21] Tabone T, Mather DE, Hayden MJ. Temperature switch PCR (TSP): Robust assay design for reliable amplification and genotyping of SNPs[J]. BMC Genomics, 2009, 10(1): 580.

(收稿日期: 2013-01-01)

对其进行总结报道。

#### 1 hs-cTn 的临床研究背景

2012 年最新的欧洲心脏病协会(ESC)专家共识重点描述 cTn 在 AMI 诊断中的价值;不但将 cTn 检测值高于健康人群第 99 百分位值并要求检测方法不精密度(CV)≤10%作为 AMI 诊断指标之一,同时还将在基线基础上升高 20%作为诊断 AMI 的另一个指标,并将其与患者临床表现、心电图变化及心肌显像等指标联合,在 AMI 诊断中发挥重要作用<sup>[5-6]</sup>。最新一代的 hs-cTn 检测方法满足了早期诊断 AMI 的临床需要,可为患者及时提供有效的治疗、改善预后、降低病死率和病

残率,在临床研究中受到广泛关注。

## 2 hs-cTn 的生物学特性

cTn 因灵敏度高、特异度强、发病后出现较早且持续时间较长等特点成为诊断心肌损伤尤其是 AMI 的重要生物标志物<sup>[7-8]</sup>。hs-cTn 不是一个新的心肌损伤标志物,仅仅是传统 cTn 在检测方法和性能上的改进<sup>[9]</sup>。TnC 是  $\text{Ca}^{2+}$  的结合亚基,骨骼肌和心肌中的 TnC 相同,而心肌亚型 TnI 和 TnT (cTnI 和 cTnT) 与骨骼肌中的异质体分别由不同基因编码,具有不同的氨基酸顺序和抗原性,故两者的特异度更高,且明显优于 CK-MB<sup>[10]</sup>。cTnI 与骨骼肌型的氨基酸序列存在 40% 的差异,cTnT 与骨骼肌型的氨基酸序列存在 6%~11% 的差异,故一般认为 cTnI 较 cTnT 具有更强的心肌特异度<sup>[11-12]</sup>。

## 3 hs-cTn 检测的实验室技术

**3.1 hs-cTnI 的检测方法** 目前商品化的 hs-cTnI 由于不同产品采用的单克隆抗体(或多抗)针对的表位和株数不同、标记抗体针对的表位不同、示踪技术不同、校准物各异、抗凝剂不同等因素,检测结果之间可能相差 20~40 倍,甚至 100 倍,很难做到结果的可比性<sup>[10]</sup>。

**3.2 hs-cTnT 的检测方法** hs-cTnT 沿用世界公认的化学发光免疫测定法进行检测,以全自动检测设备取代手工操作,使用人 IgGCl 区域取代鼠单克隆抗体 Fab 片段的连续 C1 区域形成人鼠嵌合型检测抗体,使检测的重复性和准确度大幅度提高,通过增加样本体积、降低背景信号提高分析的灵敏度,检测时间大大缩短<sup>[10,12-13]</sup>;同时独家拥有检测试剂、配套质控物及校准物,使不同实验室测定结果具有较好的一致性。

**3.3 hs-cTn 医学参考范围的界定** 商业化的 hs-cTnT 诊断试剂只有罗氏公司,故不存在标准化的问题。然而,hs-cTnI 诊断试剂却因厂家的不同,至今无法形成 hs-cTnI 诊断试剂的标准。各个临床实验室由于试剂不同,健康人群资源不足,很难建立实验室的参考范围和检测不精密度。因而,hs-cTn 医学参考范围的确定面临着众多问题。为解决这一问题,研究者提出,根据检测方法在第 99 百分位值的 CV 分为:指南可接受( $\text{CV} \leq 10\%$ )、临床可接受( $10\% < \text{CV} \leq 20\%$ )和不可接受( $\text{CV} > 20\%$ )。同时根据检测方法在健康人群中检出第 99 百分位值以下 cTn 的比例,分为四个水平:检出率低于 50% 为水平 1,即传统方法;检出率 50%~75% 为水平 2,即第一代高敏方法;检出率大于 75%~95% 为水平 3,即第二代高敏方法;检出率大于 95% 为水平 4,即第三代高敏方法<sup>[14-15]</sup>。此分类方法已经得到认可,hs-cTnT 检测方法可检出的最低阈值为 0.003  $\mu\text{g/L}$ ,已完全符合 ESC 对心肌梗死标志物标准的要求。但由于健康人群范围的确定仍存在差异,hs-cTn 医学参考范围确定还需要进行多中心的临床实验。

**3.4 hs-cTn 检测的干扰因素** 首先就标本采集而言,标本的来源是影响标本检测结果的最主要因素,其中除了性别、年龄等影响心肌代谢的因素外,一些疾病均可导致血中 hs-cTnI 或者 hs-cTnT 升高,造成假阳性结果<sup>[10,16]</sup>。由于 hs-cTn 灵敏度过高所致的假阳性,大多数研究都提出动态检测 hs-cTn 变化来判断心肌损伤程度及确诊 ACS、AMI 等,通常采用两点差值大于 20% 为标准,此方案已被最新的 AMI 诊断专家共识认同<sup>[4,17]</sup>。其次,检测标本的运输保存温度、标本种类(全血、血清或血浆)、检测时间、抗凝剂选择也是影响 hs-cTn 检测的重要因素。

## 4 hs-cTn 的临床应用

hs-cTn 的临床应用主要围绕 AMI 诊断标准的研究。Reichlin 等的研究将 hs-cTn 检测基准值和第 1 小时的绝对变

化作为纳入和除外 AMI 诊断的标准<sup>[18]</sup>。Haaf 等<sup>[19]</sup>的研究也认为 hs-cTn 在 1 h 内的变化可以作为 AMI 与心脏非冠状动脉疾病鉴别诊断的依据。研究显示在周围血管病变的患者中,hs-cTnT 水平的升高仍可作为评判心肌损伤的指标<sup>[20]</sup>。此外,hs-cTn 还用于包括心肌炎、高血压、心功能衰竭、药物毒性、运动等所致的心肌损伤的检测<sup>[10,21]</sup>。在轻链淀粉样变性疾病的进程中心功能障碍、心肌损伤的发生不可避免。有研究对 171 例淀粉样变性患者治疗前后进行研究,结果显示 NT-proBNP、hs-cTnT 和 cTnI 均可作为评价预后的指标,不仅指出 hs-cTnT 是判断预后最佳的指标,并得出预后判定值为 0.077  $\mu\text{g/L}$ <sup>[22]</sup>。Okura 等<sup>[23]</sup>的研究同样证实在心功能不全进展中,hs-cTnT 水平与 NT-proBNP 同向变化,并符合美国心脏协会疾病的分层标准,可作为充血性心衰的诊断指标。此外,研究还将 ACS 发生时的重要炎症反应指标 C 反应蛋白和高敏 C 反应蛋白与 hs-cTn 联合,作为疾病诊断和预后评价的指标<sup>[24-25]</sup>。hs-cTn 与冠状动脉 CT、心脏超声等影像学检查相结合,也是未来临床研究的重点。

## 5 小结

hs-cTn 作为诊断心肌损伤特异度和灵敏度最高的标志物,为 ACS 尤其是 AMI 的早期诊断和鉴别诊断中提供有力证据,对无症状且无典型心电图表现的 AMI 尤为重要。联合 NT-proBNP、高敏 C 反应蛋白等指标可在疾病危险分层和评价预后中发挥重要作用。

## 参考文献

- [1] Thygesen K, Alpert JS, White HD, et al. Universal definition of myocardial infarction[J]. Circulation, 2007, 116(22): 2634-2653.
- [2] 宋凌燕, 吴炯, 宋斌斌, 等. 高敏感方法检测心肌肌钙蛋白 T 的分析性能评价[J]. 中华检验医学杂志, 2010, 33(9): 814-818.
- [3] 文业华. cTnT 及 hs-cTnT 检测在急性心肌梗死早期诊断中的临床价值评价[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(6): 700-701.
- [4] Kavsak PA, MacRae AR, Yerna MJ, et al. Analytic and clinical utility of a next-generation, highly sensitive cardiac troponin I assay for early detection of myocardial injury[J]. Clin Chem, 2009, 55(3): 573-577.
- [5] Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, et al. Third universal definition of myocardial infarction[J]. J Am Coll Cardiol, 2012, 60(16): 1581-1598.
- [6] Mueller M, Celik S, Biener M, et al. Diagnostic and prognostic performance of a novel high-sensitivity cardiac troponin T assay compared to a contemporary sensitive cardiac troponin I assay in patients with acute coronary syndrome[J]. Clin Res Cardiol, 2012, 101(10): 837-845.
- [7] Twerenbold R, Jaffe A, Reichlin T, et al. High-sensitive troponin T measurements: what do we gain and what are the challenges[J]. Eur Heart J, 2012, 33(5): 579-586.
- [8] Sato Y, Fujiwara H, Takatsu Y. Cardiac troponin and heart failure in the era of high-sensitivity assays[J]. J Cardiol, 2012, 60(3): 160-167.
- [9] Thygesen K, Mair J, Giannitsis E, et al. How to use high-sensitivity cardiac troponins in acute cardiac care[J]. Eur Heart J, 2012, 33(18): 2252-2257.
- [10] 鄢盛恺. 高敏感心肌肌钙蛋白检测的临床应用[J]. 中华检验医学杂志, 2010, 33(9): 809-813.
- [11] 张凯民. 心肌肌钙蛋白在诊断急性心肌梗死中的应用和进展[J]. 实用心脑血管病杂志, 2012, 20(2): 376-379.
- [12] 左玫, 王勇. 超敏心肌肌钙蛋白在心血管病诊断和预后评估中的应用进展[J]. 上海医学, 2010, 33(9): 869-872. (下转第 1577 页)

定度分量的贡献难以定义,导致其数学模型不完善、不稳定,不适宜对其进行评估。而对于分析后的不确定度评估,Linko 等<sup>[5]</sup>认为其对检验结果影响较小,其不确定分量可以忽略。分析中的影响因素也不少,实时荧光定量 PCR 法测 HCV-RNA 分析中测量不确定度主要来源有内源性 & 外源性 RNA 酶干扰、加样枪准确性、核酸提取效率、扩增反应体系及数据分析等,但影响因素较为稳定,可预知可控,可将多因素合并成总的不确定度进行评估。Magnusson 等<sup>[6]</sup>建议在临床实验室里,可用常规室内质控及室间质评数据评估测量不确定度。

在医学检验领域,是对测量程序还是对测量结果进行测量不确定度的评估存在争议<sup>[7-8]</sup>,评估方法也各异<sup>[9]</sup>。其评估方式主要有《测量不确定度表示指南》自下而上的 GUM 模式和 Nordtest 准则的自上而下两种方式为主。Nordtest 准则主要用总不精密度及系统偏倚来评估检测项目的测量不确定度。本研究结果显示,同一天内对 HCV-RNA 室内质控进行 12 次检测得出批内变异系数为 2.55%,对室内质控 155 d 检测结果计算出批间变异系数为 5.80%,可反映检测项目的总不精密度,无须对各不确定分量一一建立数学模型,大大简化了分析步骤;室间质评数据则主要反映较准物及系统偏倚的情况,计算其变异系数为 5.04%,但在 30 个检测数据里有 8 个检测结果为零,为零的数据表示的是 HCV-RNA 含量低于试剂盒定量检测线性范围下限,经对数转换后变为零,该份标本浓度处于方法检测下限,但各实验室所用方法的检测范围为 12~1 000 IU/mL<sup>[10]</sup>,这些检测结果虽然与预期结果相符,实际检测结果各个实验室可能有极大差别,即数据的可靠性存疑,不应该将这类数据纳入不确定度的评估。最终计算出荧光定量 PCR 法 HCV-RNA 扩展不确定度为±16.18%,剔除 8 个检测结果为零的数据后 HCV-RNA 扩展不确定度为±17.16%,可以看出,对不合格检验数据的纳入会人为减小测量不确定度,所以检测数据的纳入时应考虑检测方法的特殊性。

从本文数据获得过程看,评估方式简单,数据获取容易,无须额外进行检测,成本较低。一般三级甲等医院开展的检测项目

旨在 400~1 000 项不等,若按 GUM 模式进行检测项目的测量不确定度评价,步骤繁琐,工作量相当大,只存在理论上完成的可能,各实验室应在 ISO15189 框架下积极探索适合自己实验室的测量不确定度评估方式。

# 参考文献

- [1] 中国合格评定国家认可委员. CNAS-CL07 测量不确定度要求[S]. 2 版,北京:中国计量出版社,2011.
- [2] 中国合格评定国家认可委员. CNAS-GL05 测量不确定度要求的实施指南[S]. 北京:中国计量出版社,2011.
- [3] Bertil M, Havard H, Mikael K, et al. Nordtest handbook for calculation of measurement uncertainty based on quality control and method validation[M]. Espoo, Finland: Nordtest, 2003.
- [4] 王治国. 临床检验质量控制技术[M]. 2 版. 北京:人民卫生出版社,2008:432-435.
- [5] Linko S, Ornamark U, Kessel R, et al. Evaluation of uncertainty of measurement in routine clinical chemistry-applications to determination of the substance concentration of calcium and glucose in serum[J]. Clin Chem Lab Med, 2002, 40(4):391-398.
- [6] Magnusson B, Ossowicki H, Rienitz O, et al. Routine internal and external-quality control data in clinical laboratories for estimating measurement and diagnostic uncertainty using GUM principles[J]. Scand J Clin Lab Invest, 2012, 72(3):212-220.
- [7] 王惠民, 季伙燕. 医学检验中应该评定“测量程序”还是“测量结果”的不确定度[J]. 临床检验杂志, 2011, 29(5):324-326.
- [8] 黄永富, 许文荣, 曹兴建. 全自动生化分析仪检测系统过程能力与不确定度的研究[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(7):650-652.
- [9] 朱红梅, 吴美辉, 罗丹, 等. 临床生化检验测量不确定度的评估[J]. 检验医学与临床, 2012, 9(8):922-923.
- [10] 杨瑞峰, 魏来. 丙型肝炎病毒感染的检测[J]. 临床肝胆杂志, 2011, 27(1):1-7.

(收稿日期:2012-11-08)

(上接第 1562 页)

- [13] Giannitsis E, Kurz K, Hallermayer K, et al. Analytical validation of a high-sensitivity cardiac troponin T assay[J]. Clin Chem, 2010, 56(2):254-261.
- [14] Apple FS. A new season for cardiac troponin assays: it's time to keep a scorecard[J]. Clin Chem, 2009, 55(7):1303-1306.
- [15] 潘柏申. 迎接高敏感方法检测心肌肌钙蛋白时代的到来[J]. 中华检验医学杂志, 2010, 33(9):805-808.
- [16] Hamm CW, Bassand JP, Agewall S, et al. ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute coronary syndromes (ACS) in patients presenting without persistent ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC)[J]. Eur Heart J, 2011, 32(23):2999-3054.
- [17] 吴炯, 宋凌燕, 张春燕, 等. 高敏感心肌肌钙蛋白 T 检测方法在诊断急性心肌梗死中的价值[J]. 中华检验医学杂志, 2010, 33(9):825-830.
- [18] Reichlin T, Schindler C, Drexler B, et al. One-hour rule-out and rule-in of acute myocardial infarction using high-sensitivity cardiac troponin T[J]. Arch Intern Med, 2012, 172(16):1211-1218.
- [19] Haaf P, Drexler B, Reichlin T, et al. High-sensitivity cardiac troponin in the distinction of acute myocardial infarction from acute cardiac noncoronary artery disease[J]. Circulation, 2012, 126(1):31-40.

- [20] Falkensammer J, Gasteiger S, Stojakovic T, et al. Elevated baseline hs-cTnT levels predict exercise-induced myocardial ischemia in patients with peripheral arterial disease[J]. Clin Chim Acta, 2012, 413(19/20):1678-1682.
- [21] Mingels A, Jacobs L, Michielsen E, et al. Reference population and marathon runner sera assessed by highly sensitive cardiac troponin T and commercial cardiac troponin T and I assays[J]. Clin Chem, 2009, 55(1):101-108.
- [22] Palladini G, Barassi A, Klersy C, et al. The combination of high-sensitivity cardiac troponin T (hs-cTnT) at presentation and changes in N-terminal natriuretic peptide type B (NT-proBNP) after chemotherapy best predicts survival in AL amyloidosis[J]. Blood, 2010, 116(18):3426-3430.
- [23] Okura H, Suzuki R, Sugibayashi S, et al. Performance and clinical utility of a high-sensitivity troponin T assay[J]. Rinsho Byori, 2012, 60(5):407-413.
- [24] 邓永超, 莫丽亚, 唐喜春, 等. 血清心肌肌钙蛋白 I 与超敏 C 反应蛋白检测在婴幼儿重症肺炎中的诊断价值[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(3):288-289.
- [25] Tousoulis D, Kampoli AM, Stefanadi E, et al. New biochemical markers in acute coronary syndromes[J]. Curr Med Chem, 2008, 15(13):1288-1296.

(收稿日期:2013-01-12)