

• 综 述 •

氨基末端 B 型利钠肽前体的检测方法及其临床意义*

王苏梦¹, 季 苕²综述; 汪俊军^{1△} 审核

(南京军区南京总医院临床检验科, 江苏南京 210002)

关键词: 利钠肽; 心力衰竭; 检测方法

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.10.031

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)10-1305-03

氨基末端 B 型利钠肽前体 (N-terminal pro-B-type natriuretic peptide, NT-proBNP) 是由心室肌细胞分泌的一种多肽, 由 proBNP 分解而来, 其生物功能尚未完全阐明。心室细胞受到牵张刺激后首先分泌含有 108 个氨基酸的 proBNP, proBNP 通过内切酶的作用被切割为含有 76 个氨基酸的 NT-proBNP 和含有 32 个氨基酸的 BNP, 并释放入血循环。当心室负荷及室壁张力增加时, NT-proBNP 分泌增多, 是公认的反映心室功能的敏感指标, 其在心力衰竭的诊断、预后评估和个体化治疗监测方面具有重要的临床价值^[1]。近年的研究发现, NT-proBNP 与心、脑血管疾病, 呼吸系统疾病及肾脏疾病等均有密切联系。

1 NT-proBNP 的功能及检测意义

BNP 于 1988 年被学者首次从猪脑中分离, 其作用主要包括抑制促肾上腺皮质激素和交感神经递质的释放, 扩张血管、利钠、利尿、扩张血管、参与调节血压及盐平衡等。NT-proBNP 为 proBNP 分解而来的无生物学活性的多肽^[2], 其浓度与心室功能密切相关。当心室细胞受到刺激或容量、压力负荷增加时, 心肌分泌的 BNP 和 NT-proBNP 明显增多。BNP 和 NT-proBNP 虽然均来自 proBNP, 但二者生物学效应和临床意义却并不完全相同。BNP 主要通过与其受体结合被清除, 半衰期较短 (22 min), 体外稳定性较差; 而 NT-proBNP 的相对分子质量较大, 主要通过肾脏清除, 半衰期较长 (120 min), 体外稳定性强, 所以在心力衰竭患者血清中, proBNP 的浓度高于 BNP。相较于 BNP, NT-proBNP 可能更早、更敏感地反映心室功能的变化, 实验室操作也更方便^[3], 因此, 近年来 NT-proBNP 被更多地应用于临床检验。

2 NT-proBNP 的临床检测方法

目前临床上主要用于检测 NT-proBNP 的是酶联免疫吸附测定 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 和电化学发光免疫分析法 (electrochemiluminescence immunoassay, ELICA)。

2.1 竞争性 ELISA 竞争性 ELISA 采用特异性多克隆羊抗 NT-proBNP 抗体 (包含 8~29 个氨基酸) 或纯化的人抗 NT-proBNP 抗体, 用其包被微孔板表面, 制成固相抗体, 将待测血清或血浆样本加至微孔板中, 再与辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记的抗 NT-proBNP 抗体结合, 形成抗体-抗原-酶标抗体复合物, 经过一系列显色反应后, 用酶标仪测定光密度 (optical density, OD) 值, 通过标准曲线计算样品中 NT-proBNP 浓度。

2.2 ELICA 近几年德国罗氏诊断有限公司推出了新的

ELICA 用于检测 NT-proBNP。其基本原理为双抗体夹心法, 将待测样本首先与生物素化的单克隆 NT-proBNP 特异性抗体 (1~21 个氨基酸) 和钆 (Ru) 复合物标记的抗单克隆 NT-proBNP 特异性抗体 (39~50 个氨基酸) 共同孵育, 形成抗原-抗体夹心复合物, 接着加入链霉亲和素包被的磁性微粒后, 通过生物素和链霉亲和素之间的相互作用, 配合物结合成固相。反应混合物被吸入测量池, 磁性微粒被吸附在电极表面, 未结合的物质被清洗液吸取, 电极加电压后产生电化学发光, 光信号被光电倍增管测量。结果通过定标曲线而确定。

2.3 方法学评价 近年来, ELICA 已经越来越多地应用于临床检测 NT-proBNP。与传统 ELISA 相比, ELICA 具有检测速度快、敏感性和精确性高、特异性强等特点。Mueller 等^[4] 将受试人群根据年龄、性别、心力衰竭分级等因素分组, 分别选用 ELISA 试剂盒 (Biomedica 公司) 和电化学发光仪 (德国罗氏诊断有限公司) 检测该人群血清 NT-proBNP 浓度, 结果显示, 检测低浓度 NT-proBNP 时, ELISA 法的批内及日间变异系数 (coefficient of variation, CV) 分别为 9.9% 和 11.1%, ELICA 法为 4.6% 和 5.5%; 检测高浓度 NT-proBNP 时, ELISA 法的批内及日间 CV 为 11.0% 和 13.0%, ELICA 法为 1.9% 和 2.6%, 计算临界 (cut off, CO) 值结果显示, ELICA 的诊断准确性明显高于 ELISA。Hammerer-Lercher 等^[5] 将健康组和心力衰竭组受检者根据年龄、性别、心功能分级分组, 同时用 2 种方法检测 NT-proBNP 水平, 发现 2 种方法存在差异, ELICA 检测结果显示 NT-proBNP 浓度与年龄有相关性, 但 ELISA 检测结果却并未显示不同年龄者 NT-proBNP 浓度的差异。通过绘制受试者工作特征 (receiver operator characteristic, ROC) 曲线并计算曲线下面积 (area under the curve, AUC), 研究人员发现 ELICA 敏感性、特异性、准确性、阳性预测值、阴性预测值、AUC 均高于 ELISA。ELISA 和 ELICA 在检测原理、速度、结果、敏感性和特异性方面均存在着差异。ELICA 具有更高的敏感性和特异性, 检测速度也较快, 日益成为临床检测 NT-proBNP 的重要方法。

3 研究现状

3.1 NT-proBNP 与心血管疾病 NT-proBNP 与心力衰竭的相关性一直是研究热点之一, NT-proBNP 在人体内的浓度可较好地反映心功能状态, 它已被欧洲心脏协会推荐为诊断心力衰竭的重要指标之一。研究证实, 心力衰竭患者由于左心室末舒张压和左心室收缩末压升高, 诱导心室肌细胞 BNP 的合成与分泌^[6-7], 导致血浆中 NT-proBNP 的水平明显上升, 其浓度与心力衰竭严重程度和纽约心脏协会 (New York heart

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81271904); 南京军区南京总医院青年基金资助项目 (2012049)。 作者简介: 王苏梦, 女, 硕士, 主要从事临床生化检验的研究工作。 △ 通讯作者, E-mail: jjwang9202@gmail.com。

association, NYHA) 心功能分级相关^[8]。另外, 由于 NT-proBNP 具有较高的阴性预测值, 可作为排除心力衰竭的标准之一^[9]。临床研究显示, 心力衰竭患者服用利尿剂、血管紧张素转换酶抑制剂 (angiotensin converting enzyme inhibitors, ACEI)、血管紧张素受体拮抗剂 (angiotensin receptor blocker, ARB)、 β 受体阻滞剂、螺内酯等药物后, NT-proBNP 水平下降, 提示 NT-proBNP 可指导临床对心力衰竭进行更合理治疗^[10-11], Januzzi 等^[12]发现, NT-proBNP 指导心力衰竭治疗的效果优于已有的治疗监护标准。对心力衰竭患者进行随访并监测 NT-proBNP, 发现 NT-proBNP 浓度与患者一年内病死率明显相关, NT-proBNP 可对心力衰竭预后进行评估^[13]。

NT-proBNP 在其他心血管事件中也具有重要的诊断和预后价值^[14-16]。Hong 等^[17]发现 NT-proBNP 水平较高的急性冠状动脉综合征患者粥样硬化斑块的组成更不稳定, 容易发生破裂。此外, Patton 等^[18]发现, 在早期心房颤动患者中 NT-proBNP 浓度明显增加, 可与心电图共同作为早期心房颤动的诊断指标。

Komoda 等^[19]检测了 72 名心脏移植手术患者体内 NT-proBNP 水平, 发现 NT-proBNP 浓度与移植后 30 d 病死率呈正相关。Patel 等^[20]发现, 心脏手术患者术前血清 BNP 水平与术后急性肾损伤风险相当, 术前 BNP 水平是轻、重度急性肾损伤的一个重要独立预测因子。

3.2 NT-proBNP 与慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) Medina 等^[21]对 192 例处于急性恶化期且无心力衰竭病史的 COPD 患者进行了 NT-proBNP 检测, 结果发现 NT-proBNP 水平与 1 年后患者病死率呈明显正相关, 可以作为 COPD 独立预后指标。近年来研究显示, NT-proBNP 有助于鉴别心源性和肺源性呼吸困难, 心源性呼吸困难患者的平均 NT-proBNP 浓度明显高于肺源性呼吸困难者。

3.3 其他 体内的 NT-proBNP 主要由肾脏清除, 肾小球滤过率 (glomerular filtration rate, GFR) 与 NT-proBNP 呈负相关, 当肾功能发生障碍时可导致 GFR 下降, NT-proBNP 在体内蓄积。临床研究证实, 在慢性肾炎、急性肾功能衰竭及糖尿病肾病等肾功能不全患者中, 均可观察到 NT-proBNP 水平明显增加^[22]。

国内有学者研究发现, 脑出血、脑梗死、蛛网膜下腔出血患者中 NT-proBNP 浓度明显升高, NT-proBNP 对于急性脑血管病患者的病情评估具有一定的临床价值。

NT-proBNP 与多种心、脑血管及肾脏疾病具有明显的相关性, 不仅对于心力衰竭的诊断、预后及治疗具有重要意义, 对心房颤动、急性心肌梗死以及心脏手术预后也具有一定的诊断和预后价值。

4 影响 NT-proBNP 诊断价值的因素

4.1 年龄与性别 年龄与性别是影响 NT-proBNP 参考值界定的最主要因素。NT-proBNP 在健康人群及心力衰竭患者中的浓度均随年龄的增大而升高, 同龄女性高于男性。其原因可能是随着年龄的增长, 心室舒张能力及肾功能减弱, 使 proBNP 的合成增加而清除率减少^[23]。性别造成 NT-proBNP 浓度差异的具体机制目前尚不清楚, 一般认为可能是由于雌激素诱导 BNP 的表达, 但 Saenger 等^[24]发现, 男性睾酮浓度与 NT-proBNP 浓度呈明显负相关, 而 NT-proBNP 与雌激素的相关性却并不大, 结果提示雄激素可能也参与了对 NT-proBNP 水平的调节。

美国食品和药物管理局和 Roche 公司根据年龄建议 NT-proBNP 参考值, <75 岁者: <125 pg/mL; >75 岁: <450 pg/mL。欧洲则对不同年龄及性别人群建议 NT-proBNP 参考值, <50 岁, 男性: <84 pg/mL, 女性: <155 pg/mL; >50 岁, 男性: <194 pg/mL, 女性: <222 pg/mL。

4.2 其他 研究显示, 低血红蛋白和贫血可导致体内 NT-proBNP 水平升高, 可能是由于贫血引起心脏内血流动力学变化而导致心肌细胞合成和分泌 proBNP 增多引起。肥胖也是影响 NT-proBNP 的原因之一, 有研究发现, 急性心肌梗死患者中, 肥胖者 NT-proBNP 水平低于非肥胖者, 即 NT-proBNP 水平与身体质量指数呈明显负相关, 其具体机制尚不明确, 推测是由于肥胖者心肌激素释放或合成减少造成的^[25]。

参与调节 NT-proBNP 浓度的因素较多, 影响其临床诊断特异性。在利用 NT-proBNP 浓度对心力衰竭进行诊断、预后及评估治疗时, 需考虑这些因素的影响以建立合理的临床参考值。

5 小 结

NT-proBNP 是近年来提出的反映心功能的新指标之一, 其对于心力衰竭的临床诊断、治疗及预后都有重要意义。随着检测方法的不断改进, 其灵敏度、准确度、检测速度等都得到明显提高, 加之临床应用的广泛开展, 大量研究证明 NT-proBNP 水平与众多心、脑血管疾病, 肾脏疾病等密切相关, 未来其可能成为重要的分子生物学标志物。因此, 了解其功能、检测方法、临床意义及影响因素有助于动态评价其临床参考值, 帮助其更好应用于临床诊断、治疗及预后。

参考文献

- [1] Hammerer-Lercher A, Puschendorf B, Mair J. Cardiac natriuretic peptides: new laboratory parameters in heart failure patients[J]. Clin Lab, 2001, 47(5/6): 265-277.
- [2] Raymond I, Groenning BA, Hildebrandt PR, et al. The influence of age, sex and other variables on the plasma level of N-terminal pro brain natriuretic peptide in a large sample of the general population[J]. Heart, 2003, 89(7): 745-751.
- [3] Steiner J, Guglin M. BNP or NTproBNP? A clinician's perspective[J]. Int J Cardiol, 2008, 129(1): 5-14.
- [4] Mueller T, Gegenhuber A, Poelz W, et al. Comparison of the biomedica NT-proBNP enzyme immunoassay and the roche NT-proBNP chemiluminescence immunoassay: implications for the prediction of symptomatic and asymptomatic structural heart disease[J]. Clin Chem, 2003, 49(6 Pt 1): 976-979.
- [5] Hammerer-Lercher A, Griesmacher A, Pözl G, et al. Clinical value of a competitive NT-proBNP enzyme immunoassay compared to the Roche NT-proBNP platform[J]. Clin Chem Lab Med, 2009, 47(10): 1305-1308.
- [6] Mizia-Stec K, Adamczyk T, Mizia M, et al. Low-flow severe aortic stenosis with preserved ejection fraction, N-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-proBNP) and cardiovascular remodeling[J]. J Heart Valve Dis, 2011, 20(3): 301-310.
- [7] Thireau J, Karam S, Fauconnier J, et al. Functional evidence for an active role of B-type natriuretic peptide in cardiac remodelling and pro-arrhythmogenicity[J]. Cardiovasc Res, 2012, 95(1): 59-68.
- [8] Palazzuoli A, Gallotta M, Quatrini I, et al. Natriuretic peptides (BNP and NT-proBNP): measurement and relevance in heart failure[J]. Vasc Health Risk Manag, 2010, 6: 411-418.
- [9] Haaf P, Balmelli C, Reichlin T, et al. N-terminal Pro B-type Natri-

- uretic Peptide in the Early Evaluation of Suspected Acute Myocardial Infarction[J]. Am J Med, 2011, 124(8): 731-739.
- [10] Cai B, Wang L, Liu J, et al. N-terminal pro-Brain natriuretic peptide as a useful biomarker for monitoring prognosis in patients with cardiac valve replacement[J]. J Clin Lab Anal, 2011, 25(3): 149-155.
- [11] Chandrakala AN, Sukul D, Selvarajan K, et al. Induction of brain natriuretic peptide and monocyte chemotactic protein-1 gene expression by oxidized low-density lipoprotein; relevance to ischemic heart failure[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2012, 302(1): C165-C177.
- [12] Januzzi JL Jr, Rehman SU, Mohammed AA, et al. Use of amino-terminal pro-B-type natriuretic peptide to guide outpatient therapy of patients with chronic left ventricular systolic dysfunction[J]. J Am Coll Cardiol, 2011, 58(18): 1881-1889.
- [13] Andersson SE, Edvinsson ML, Björk J, et al. High NT-proBNP is a strong predictor of outcome in elderly heart failure patients[J]. Am J Geriatr Cardiol, 2008, 17(1): 13-20.
- [14] Asanin M, Stankovic S, Mrdovic I, et al. B-type natriuretic peptide predicts new-onset atrial fibrillation in patients with ST-segment elevation myocardial infarction treated by primary percutaneous coronary intervention[J]. Peptides, 2012, 35(1): 74-77.
- [15] van Diepen S, Roe MT, Lopes RD, et al. Baseline NT-proBNP and biomarkers of inflammation and necrosis in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: insights from the APEX-AMI trial[J]. J Thromb Thrombolysis, 2012, 34(1): 106-113.
- [16] Leistner DM, Klotzsche J, Pieper L, et al. Prognostic value of NT-pro-BNP and hs-CRP for risk stratification in primary care: results from the population-based DETECT study[J]. Clin Res Cardiol, 2013, 102(4): 259-268.
- [17] Hong YJ, Ahn Y, Sim DS, et al. Relation between N-terminal pro-B-type natriuretic peptide and coronary plaque components in patients with acute coronary syndrome: virtual histology-intravascular ultrasound analysis[J]. Coron Artery Dis, 2009, 20(8): 518-524.
- [18] Patton KK, Ellinor PT, Heckbert SR, et al. N-terminal pro-B-type natriuretic peptide is a major predictor of the development of atrial fibrillation; the Cardiovascular Health Study[J]. Circulation, 2009, 120(18): 1768-1774.
- [19] Komoda T, Hetzer R, Knosalla C, et al. Increase in N-terminal fragment of the prohormone brain-type natriuretic peptide as a measure for predicting outcome after urgent heart transplantation[J]. Eur J Cardiothorac Surg, 2010, 37(4): 864-869.
- [20] Patel UD, Garg AX, Krumholz HM, et al. Preoperative serum brain natriuretic peptide and risk of acute kidney injury after cardiac surgery[J]. Circulation, 2012, 125(11): 1347-1355.
- [21] Medina AM, Marteles MS, Sáiz EB, et al. Prognostic utility of NT-proBNP in acute exacerbations of chronic pulmonary diseases[J]. Eur J Intern Med, 2011, 22(2): 167-171.
- [22] Lajer M, Tarnow L, Jorsal A, et al. Polymorphisms in the B-type natriuretic peptide (BNP) gene are associated with NT-proBNP levels but not with diabetic nephropathy or mortality in type 1 diabetic patients[J]. Nephrol Dial Transplant, 2007, 22(11): 3235-3239.
- [23] Tarnow L, Hildebrandt P, Hansen BV, et al. Plasma N-terminal pro-brain natriuretic peptide as an Independent predictor of mortality in diabetic nephropathy[J]. Diabetologia, 2005, 48(1): 149-155.
- [24] Saenger AK, Dalenberg DA, Bryant SC, et al. Pediatric brain natriuretic peptide concentrations vary with age and sex and appear to be modulated by testosterone[J]. Clin Chem, 2009, 55(10): 1869-1875.
- [25] Lorgis L, Cottin Y, Danchin N, et al. Impact of obesity on the prognostic value of the N-terminal pro-B-type natriuretic peptide (NT-proBNP) in patients with acute myocardial infarction[J]. Heart, 2011, 97(7): 551-556.

(收稿日期: 2013-12-10)

• 综 述 •

杜氏肌营养不良分子诊断技术的研究进展*

王 晶 综述, 贺 勇[△] 审校

(重庆医科大学附属永川医院检验科, 重庆 402160)

关键词: 肌营养不良, 杜氏; 突变; 原位杂交, 荧光; 原位标记; 基因, dystrophin

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2014. 10. 032

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)10-1307-03

杜氏肌营养不良(Duchenne muscular dystrophy, DMD)是一种 X 连锁隐性遗传致死性神经肌肉系统疾病, 发病率高, 占男性活婴的 1/3 500。临床表现为全身骨骼肌萎缩, 进行性无力和小腿腓肠肌假性肥大, 走路呈鸭形步态, 30% 患儿有不同程度的智力障碍。一般 3~5 岁隐袭发病, 9~12 岁丧失站立和行走能力, 多于 20 岁左右因心、肺功能衰竭而死亡^[1]。现阶段对 DMD 尚无有效的治疗方法, 控制 DMD 的发生主要在于防止患儿的出生, 阻断缺陷基因的传递。因此, 产前诊断及母体携带者筛查是预防 DMD 发生的有效手段^[2]。目前, DMD

的分子诊断方法多样且各有优、缺点, 本文就 DMD 分子诊断技术的研究进展做一综述。

1 DMD 基因突变和抗肌萎缩蛋白

抗肌萎缩蛋白即 Dystrophin 蛋白, 为 DMD 致病基因, 位于染色体 Xq21. 2 上, 是目前已知的人类最大基因, 长达 2 400 kb, 由 79 个外显子和 78 个内含子构成。1987 年 Ahn 等^[3]测定全序列后, 确定了抗肌萎缩蛋白由 3 685 个氨基酸组成, 相对分子质量为 427 000。该蛋白广泛分布于肌肉组织和神经组织中, 在结构上可分为氨基端区、中央区、半胱氨酸富含

* 基金项目: 重庆市教委科研课题资助项目(KJ100314); 重庆医科大学附属永川医院科研课题资助项目(YJYB2011011)。 作者简介: 王晶, 女, 在读硕士研究生, 主要从事遗传性疾病的分子生物学诊断研究。 [△] 通讯作者, E-mail: yonghe1968@sina. com。