

· 论 著 ·

BHMT 用于检测急性中毒性肝损伤的价值

宁 静¹, 马怀雷²

(1. 武警北京总队医院检验科 100021; 2. 北京蛋白质组研究中心 102206)

摘 要:目的 分析甜菜碱高半胱氨酸甲基转移酶(BHMT)用于检测急性中毒性肝损伤的临床价值。方法 采用 ELISA 法检测血清样本中的 BHMT,检测样本为健康体检者血清和急性中毒患者血清。结果 ELISA 法检测健康体检者血清样本 300 例,300 例健康体检血清中 BHMT 的平均水平为 9.02 ng/mL(6.19~12.84 ng/mL)。健康人群血清中 BHMT 水平的 95%医学参考值范围为 0.00~28.01 ng/mL;ELISA 法检测 43 例急性中毒患者的血清样本,经 Spearman 秩相关分析,提示 BHMT 和丙氨酸氨基转移酶(ALT)之间有良好的正相关关系($r_s=0.757\ 62, P<0.001$);ELISA 法检测 20 例肾损伤病例和 20 例健康体检者血清中的 BHMT 水平,提示肾损伤患者与健康体检者血清中 BHMT 水平的差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 健康人群血清中 BHMT 水平的医学参考值范围为 0.00~28.01 ng/mL;急性中毒患者血清中的 BHMT 与其对应的 ALT 之间有很好的正相关关系;BHMT 水平的变化可能与肾损伤无关,其反映肝损伤的特异性较好,因此推测 BHMT 可能是更好的急性肝损伤的血清学标志物。

关键词:甜菜碱高半胱氨酸甲基转移酶; 中毒; 肝损伤

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.01.016

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)01-0041-03

Preliminary clinical study of BHMT as a novel serum marker for acute poisoning liver injury

NING Jing¹, MA Huailei²

(1. Department of Clinical Laboratory, Beijing Armed Police Corps Hospital, Beijing 100021, China;

2. Beijing Proteome Research Center, Beijing 102206, China)

Abstract:Objective To analyze the value of the serum BHMT for diagnosis of hepatic injury in patients with acute poisoning. **Methods** ELISA method was used to detect BHMT in serum samples, and the samples were detected in the sera of normal persons and patients with acute poisoning. **Results** 300 samples were detected in the sera of normal persons by ELISA method. The average level of human serum BHMT content in 300 samples was 9.02 ng/mL(6.19—12.84 ng/mL), and the 95% medical reference value of BHMT content in healthy people ranges from 0.00 to 28.01 ng/mL. BHMT and ALT were detected in 43 samples from acute liver injury, the Spearman analysis indicating a good positive correlation between BHMT and ALT($r_s=0.757\ 62, P<0.001$). The comparison of the content of BHMT was made between the serum samples from 20 renal damage patient and 20 normal human serum, there was no significant difference in the BHMT content between the serum of patients with renal injury and the normal human serum($P>0.05$). **Conclusion** The medical reference value range for of serum BHMT content in healthy population ranges from 0 to 28.01 ng/mL. There was a good positive correlation between BHMT and ALT. BHMT might not be closely related to kidney injury, while be more specific to liver injury. BHMT could be a better marker of acute poisoning liver injury.

Key words: betaine homocysteine S-methyltransferase; poisoning; liver injury

急性肝损伤是目前临床上导致死亡的重要原因之一,也是药物开发的主要障碍之一。检测肝损伤的指标有很多报道^[1-3],目前临床常用的还是传统的丙氨酸氨基转移酶(ALT),天门冬氨酸氨基转移酶(AST),碱性磷酸酶(ALP), γ -谷氨酰转肽酶(GGT)及胆红素(BIL)。实际上,由于肝脏功能的复杂性和急性肝损伤因素的多样性,这些实验指标都不能全面、准确地反映急性肝损伤的本质,迄今尚未找到一种对急性肝损伤的诊断敏感性和特异性均令人满意的血清标志物^[4-5]。本研究在前期研究的基础上,从 20 种肝特异性基因的蛋白产物中选择了甜菜碱高半胱氨酸甲基转移酶(BHMT)作为研究对象,初步分析其诊断急性肝损伤的临床价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择于 2015 年 6 月 15 日至 2015 年 8 月 20 日来本院体检的健康体检者 300 例为研究对象,其中男 136

例,女 164 例,年龄 18~65 岁,平均(29.35±8.76)岁。另选择 2015 年 6 月至 2016 年 2 月的住院患者(既往无基础疾病)中 ALT>40 U/L 的可疑急性肝损伤患者 43 例,其中男 22 例,女 21 例,年龄 15~69 岁,平均(32.54±12.13)岁。其中百草枯中毒 21 例,有机磷中毒 7 例(含敌敌畏中毒 4 例),药物中毒 5 例,毒蕈中毒 6 例,其他中毒 4 例。

1.2 仪器与试剂 主要试剂包括小鼠抗重组人 BHMT 单克隆抗体 4D1,兔抗重组人 BHMT 多克隆抗体 2-4-2 为本实验室制备并纯化;纯化的 293T 细胞表达的重组人 BHMT 蛋白为本实验室成果;辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔 IgG 为 Jackson 公司产品;碳酸盐包被缓冲液为 Pierce 公司产品;脱脂奶粉为雀巢公司产品;TMB 为天根生化科技(北京)有限公司产品;酶标板为 COSTAR 半定量酶标板。主要仪器为酶标仪 Bio-RAD Model 680,电泳仪 Bio-RAD Mini-PROTEAN

Tetra System, 日立 7600 全自动生化分析仪。

1.3 方法 ELISA 法检测 300 例健康体检人群血清中的 BHMT 水平,基本步骤参照《医学免疫学实验技术》(武汉大学出版社)完成。因 BHMT 为偏态分布资料,故采用百分位数法表示 BHMT 的水平分布,进而建立 300 例健康体检人群血清中 BHMT 的 95%医学参考值范围。蛋白印迹(WB)实验,基本步骤参照《医学免疫学实验技术》(武汉大学出版社)完成。

1.4 统计学处理 采用 SAS9.2 软件,BHMT 和 ALT 的相关性采用 Spearman 秩相关分析,两组间 BHMT 水平的差异采用 Wilcoxon 秩和检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 建立人血清中 BHMT 的 95%医学参考值范围 ELISA 法检测 300 份健康体检人群血清中的 BHMT 水平,因 BHMT 为偏态分布资料,故采用百分位数法表示 BHMT 的水平分布。300 例健康体检人群血清中 BHMT 的水平为 9.02 ng/mL (6.19~12.84 ng/mL),累计百分位数为 95%时,BHMT 的水平为 28.01 ng/mL。据此,建立人血清中 BHMT 水平的 95%医学参考值范围为 0.00~28.01 ng/mL。

2.2 BHMT 和 ALT 的相关性分析 分析 43 例可疑急性肝损伤病例的 BHMT 和 ALT 的相关性,ELISA 法检测 43 例可疑急性肝损伤病例血清样本中的 BHMT 水平,以 BHMT 的浓度值和对应的 ALT 值绘制 BHMT 和 ALT 的散点图(图 1)。如图 1 所示,散点基本分布于一个较窄的条带内,提示 BHMT 和 ALT 可能具有较好的正相关性。经 Spearman 秩相关分析,得出 $r_s=0.757\ 62$, $P<0.001$,提示 BHMT 和 ALT 之间有良好的正相关关系。

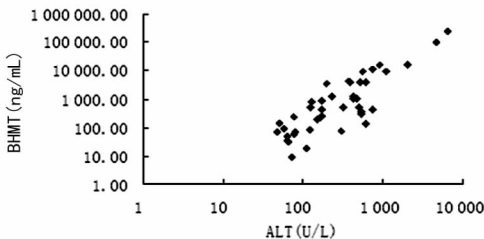


图 1 BHMT 水平和 ALT 的散点图

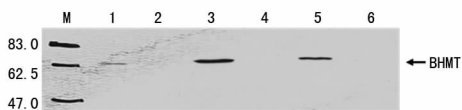
2.3 WB 辅助验证病例血清中 BHMT 和 ALT 的相关性分析 不同 ALT 水平的 3 例急性肝损伤病例和 3 例健康体检人血清中的 BHMT 和 ALT 水平(表 2)。WB 的鉴定结果,如图 2 所示,3 例健康体检人血清样本中均未见特异条带出现,可能是其 BHMT 的水平太低造成;3 例病例血清样本中均有特异条带出现,且其条带的宽窄和灰度与对应的 ALT 值的高低存在明显的相关性,即 BHMT 与 ALT 之间有良好的正相关性。

表 2 WB 样本的 BHMT 和 ALT 水平比较

检测指标	WB 上样号(样本编号)					
	1(15-1)	2(C1)	3(19-1)	4(C2)	5(46-1)	6(C3)
BHMT(ng/mL)	2 123.54	4.09	5 003.64	8.78	3 265.21	6.09
ALT(U/L)	589	8	1 231	19	709	28

2.4 BHMT 在反映急性肝损伤方面的特异性 2 组样本(20 例肾损伤患者和 20 例健康体检人群)的 BHMT 水平做成组设计定量资料的 Wilcoxon 秩和检验, $Z=-1.623\ 6$, $P=$

0.103 2,提示肾损伤患者与健康体检人群血清中 BHMT 水平的差异无统计学意义($P>0.05$),因而推测 BHMT 水平的变化可能与肾损伤无关,其反映肝损伤的特异性可能更好。



注:M 为蛋白电泳标记,1、3、5 号为 3 例急性肝损伤病例血清样本,2、4、6 号为健康体检人血清样本。

图 2 3 例急性肝损伤病例和 3 例健康人血清 BHMT 的 WB 鉴定

3 讨 论

由于目前临床常用的传统肝功指标的敏感性及肝特异性差强人意,至今仍对高度敏感、特异的诊疗新指标有实际需求。因此,寻找更早期、更具肝特异性、更高灵敏性的急性肝损伤指标是临床肝病检测的研究目标,也是本研究的重点方向。

BHMT 是一种含 Zn^{2+} 的甲基转移酶,由 406 AA 组成,相对分子质量为 44.998×10^3 ,参与 S-腺苷高半胱氨酸(SAH)及高半胱氨酸的代谢调节,其酶促作用的最佳条件为 $pH=7.5$, $37\ ^\circ C$ [6]。BHMT 的细胞定位在细胞浆中,组织定位在肝、肾中有表达 [7]。近年来,探讨 BHMT 与肝脏相关性的研究报道不多。有研究报道,抑制肝细胞内 BHMT 的活性,可引起高半胱氨酸血症 [8];BHMT 参与肝纤维化的过程 [9];BHMT 在肝硬化中也发挥作用 [10],BHMT 的上调可能与阻塞性淤胆有关 [11];肝硬化和肝细胞癌的癌组织中,BHMT 的 mRNA 水平明显减少 [12-13];后来也有类似研究表明,在与 HBV 相关的肝细胞癌的癌组织中,BHMT 的水平有所下调 [14]。但至今尚未阐明 BHMT 在肝脏损伤中的作用。

通过该 ELISA 法检测 300 例健康体检人群血清中的 BHMT 水平,建立了人血清 BHMT 的 95%医学参考值范围为 0.00~28.01 ng/mL。但由于标本量还不够大,需日后扩大样本量,并分析性别,年龄等因素的影响,建立更准确的医学参考值范围。

ELISA 法检测 43 例可疑急性肝损伤病例血清样本中的 BHMT 水平,以 BHMT 的浓度值和对应的 ALT 值绘制 BHMT 和 ALT 的散点图,显示出散点基本分布于一个较窄的条带内,提示 BHMT 和 ALT 可能具有较好的正相关性。经 Spearman 秩相关分析,提示 BHMT 和 ALT 之间有良好的正相关关系。也得到了 WB 的验证。但由于收集大样本量的中毒性肝损伤病例存在一定困难,加之本研究的采样时间和采样范围的限制,要得出确定的结论仍需扩大样本量,继续深入的研究。

此外,BHMT 符合肝特异性基因的标准,且 BHMT 在大多数物种的肝脏中都有大量表达,约占肝脏可溶性总蛋白的 0.6%~1.6% [15-17]。因此,本研究还发现 BHMT 对于急性中毒性肝损伤的诊断特异性。通过 Wilcoxon 秩和检验分析得到,肾损伤病例与健康体检人群血清中 BHMT 的水平差异无统计学意义($P>0.05$),提示虽然 BHMT 也分布于肾脏,但其变化可能与肾损伤无关,因而推测 BHMT 在反映肝损伤方面可能具有更好的特异性。这一特征相较于传统的肝功指标而言,具有重要意义。如 ALT 在反映肝损伤方面虽有相对较好的灵敏度,但其特异性并不高,某些无肝脏疾病,而有肌肉疾

病,或腹腔疾病的病例,其 ALT 值也会升高。但是,受到样本量小的限制,只能作为一个初步的推测,下一步研究应收集更多的肾损伤样本来深入的验证这个问题,如果该推测被证实,将是一个在肝损伤血清标志物方面的重要突破。

综上所述,本研究结果显示对于急性中毒性肝损伤,BH-MT 有着与 ALT 相近的灵敏性,同时还可能具有更好的肝特异性,因而值得临床研究者进行更加深入的研究探讨,以确定其是否可以作为更好的肝损伤血清学标志物。

参考文献

[1] 张红阳,李雪漪,姚雪莲,等.肝损伤的分子机制及其中药药理研究进展[J]. 中药新药与临床药理,2016,27(3):448-455.

[2] 贺蕾艳,郭瑶雪,李春,等.药物性肝损伤生物标志物研究进展[J]. 药学学报,2015,50(8):959-965.

[3] 张玲莉,彭燕.急性肝损伤模型建立与血清生化指标相关性研究[J]. 中国药师,2015,18(9):1460-1463.

[4] Ranjan P,Gupta A,Kumar S,et al. Detection of new amino acid markers of liver trauma by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy[J]. Liver Int,2006,26(6):703-707.

[5] Holly MK, Dear JW, Hu X, et al. Biomarker and drug-target discovery using proteomics in a new rat model of sepsis-induced acute renal failure[J]. Kidney Int, 2006, 70(3):496-506.

[6] Mercer CA, Kaliappan A, Dennis PB. Macroautophagy-dependent, intralysosomal cleavage of a betaine homocysteine methyltransferase fusion protein requires stable multimerization[J]. Autophagy,2008,4(2):185-194.

[7] Pezzini A, Del Zotto E, Archetti S, et al. Plasma homocysteine concentration, C677T MTHFR genotype, and 844ins68bp CBS genotype in young adults with spontaneous cervical artery dissection and atherothrombotic stroke [J]. Stroke,2002,33(3):664-669.

[8] Collinsova M, Strakova J, Jiracek J, et al. Inhibition of betaine-homocysteine S-methyltransferase causes hyperhomocysteinemia in mice[J]. J Nutr, 2006, 136(6):1493-

1497.

[9] Zou CG, Gao SY, Zhao YS, et al. Homocysteine enhances cell proliferation in hepatic myofibroblastic stellate cells [J]. J Mol Med(Berl),2009,87(1):75-84.

[10] Biagini MR, Tozzi A, Marcucci R, et al. Hyperhomocysteinemia and hypercoagulability in primary biliary cirrhosis[J]. World J Gastroenterol,2006,12(10):1607-1612.

[11] Ebrahimkhani MR, Sadeghipour H, Dehghani M, et al. Homocysteine alterations in experimental cholestasis and its subsequent cirrhosis[J]. Life Sci,2005,76(21):2497-2512.

[12] Chen YM, Shiu JY, Tzeng SJ, et al. Characterization of glycine-N-methyltransferase-gene expression in human hepatocellular carcinoma[J]. Int J Cancer,1998,75(5):787-793.

[13] Avila MA, Berasain C, Torres L, et al. Reduced mRNA abundance of the main enzymes involved in methionine metabolism in human liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma[J]. J Hepatol,2000,33(6):907-914.

[14] Sun W, Xing B, Sun Y, et al. Proteome analysis of hepatocellular carcinoma by two-dimensional difference gel electrophoresis: novel protein markers in hepatocellular carcinoma tissues[J]. Mol Cell Proteomics,2007,6(10):1798-1808.

[15] Garrow, Purification TA, Properties K. Purification, kinetic properties, and cDNA cloning of mammalian betaine-homocysteine methyltransferase [J]. J Biol Chem, 1996,271(37):22831-22838.

[16] McKeever MP, Weir DG, Molloy A, et al. Betaine-homocysteine methyltransferase: organ distribution in man, pig and rat and subcellular distribution in the rat[J]. Clin Sci (Lond),1991,81(4):551-556.

[17] Suzuki T, Hashimoto S, Toyoda N, et al. Comprehensive gene expression profile of LPS-stimulated human monocytes by SAGE[J]. Blood,2000,96(7):2584-2591.

(收稿日期:2016-08-12 修回日期:2016-11-01)

(上接第 40 页)

临床特点及影响因素分析[J]. 中国输血杂志,2015,28(3):291-294.

[4] 高峰. 临床输血与检验[M]. 北京:人民卫生出版社,2007.

[5] 杨芳年,郭玉嵩,林天平,等. 113 例输血不良反应情况分析[J]. 中国输血杂志,2013,26(9):915-916.

[6] 孟庆艳,李聚林,陈贤华,等. 15 002 例受血者中输血反应情况分析[J]. 中国输血杂志,2013,26(6):572-573.

[7] 黄慧萍. 某院输血不良反应的回顾分析[J]. 国际检验医学杂志,2013,34(11):1455-1457.

[8] Khalid S, Usman M, Khurshid M. Acute transfusion reac-

tions encountered in patients at a tertiary care center[J]. J Pak Med Assoc,2010,60(10):832-836.

[9] Cohn CS, Stubbs J, Schwartz J, et al. A comparison of adverse reaction rates for PASC versus plasma platelet units [J]. Transfusion,2014,54(8):1927-1934.

[10] 周敏,方军,金晟炯,等. 成分输血在儿童血液疾病治疗中的应用分析[J]. 中国输血杂志,2013,26(6):557-558.

[11] Monchamont P, Meyer F. Allergic adverse transfusion reactions in paediatrics, a 3-year study[J]. Transfus Clin Biol,2013,20(5/6):455-457.

(收稿日期:2016-07-15 修回日期:2016-09-22)