

青霉胺激发试验应用于肝豆状核变性早期诊断的研究进展

饶 烧 程 楠 叶群荣 韩咏竹

[关键词] 青霉胺激发试验;肝豆状核变性;早期诊断;尿铜
doi:10.3969/j.issn.1000-0399.2011.05.048

肝豆状核变性 (hepatolenticular degeneration, HLD), 又称 Wilson 病 (Wilson's disease, WD), 是一种常染色体隐性遗传铜代谢障碍性疾病, 患者以肝硬化、神经/精神症状、角膜 K-F 环等为主要表现, 严重者可危及生命^[1]。国外研究资料认为, 不同人群 WD 的发病率为 15~30/100 万, 患病率为 1/3 万, 携带者频率约 1/90^[2]。但近年来多个应用高通量、高灵敏度筛选技术的大样本人群研究结果表明, 本病的发病率远被低估^[3]。虽然目前国内尚无 WD 的流行病学研究资料, 但本单位刚完成的首个大样本 (15 万余人) 安徽省 WD 的流行病学研究结果表明, 中国人 WD 的发病率约 1/4 万, 患病率约 1/2 万 (研究结果待发表), 因此本病在国内并不少见。随着诊断技术的不断提高, 越来越多的患者被确诊, 本病受到了临床医师尤其是神经科医师的广泛重视^[4]。

WD 是少数可以治疗的神经遗传病之一, 患者如果能在发病早期或症状前期被确诊并得到及时治疗, 大多预后良好, 反之病情逐渐加重甚至危及生命^[5]。由于铜在不同脏器中沉积的速度和程度不同, 许多患者发病早期症状复杂多样, 极易被误诊为其他疾病^[6]。血清 CP 水平减低是 WD 患者的特征性生化改变, 但许多研究资料显示, 约有 10% 的 WD 患者血清 CP 水平在正常范围, 而在有先证者的家系成员中约有 10% 的杂合子却可出现血清 CP 水平减低^[7]。肝穿刺活检或 ATP7B 基因突变分析虽可对 WD 疑似患者进行早期诊断, 但由于对技术和人员要求高而难以在临床推广。因此, 长期以来, 众多学者尝试建立可用于临床的、快速简便的 WD 早期诊断方法的努力一直没有停止, 其中青霉胺激发试验 (penicillamine challenge test, PCT) 作为一种灵敏度较高的无创性检测方法^[8], 在 WD 的早期诊断中备受关注。

青霉胺 (penicillamine, PCA) 化学名为 β, β -二甲半胱氨酸 (β, β -dimethyl cysteine), 是青霉素的水解产物。因其含有巯基, 可以与铜、铁等重金属离子结合, 形成低毒或无毒的可溶性结合物排出体外, 为临床常用的重金属螯合剂, 已被广泛用于 WD 的治疗^[9]。口服 PCA 后正常人和未经治疗的患者 24 h 尿铜均可以增高, 但由于 WD 患者肝脏等脏器中存在铜的大量沉积, 其 24 h 尿铜增高较正常人更为显著, 因此对 WD 疑似患者具有较高的诊断价值^[9]。文献^[10-12]对于 PCT 的诊断评价不一, 本文将近年来 PCT 应用于 WD 早期诊断的研究综述如下。

1 常用的 PCT 方法

已有文献^[13-15]中各家采用的 PCT 方法和判断标准不尽相同。有学者报道采用以下方法: 在试验当天让被试者口服 PCA 1 g (儿童按 $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 计算), 留取当天 24 h 尿铜并检测尿铜含量, 如尿排铜 $> 1\,000 \mu\text{g} \cdot 24 \text{ h}^{-1}$, 则支持 WD 的诊断^[16,17]。杨任民等^[9]则建议采用以下方法: 未经任何驱铜治疗的 WD 疑似患者, 在试验前先测定其 24 h 尿排铜量, 然后口服 PCA $1 \text{ g} \cdot \text{d}^{-1}$, 连续 4 d, 第 5 d 再测定 24 h 尿排铜量, 若大于 $1\,000 \mu\text{g} \cdot 24 \text{ h}^{-1}$, 则支持 WD 的诊断。美国肝病学会 (American Association for the Study of Liver Diseases, AASLD) 2008 年发表的肝豆状核变性最新诊断和治疗指南 (Diagnosis and Treatment of Wilson Disease; An Update) 推荐的 PCT 方法为: 口服 PCA 500 mg q 12 h (药物剂量与体质量无关), 第 1 次服 PCA 12 h 后开始收集 24 h 尿液, 尿铜 $> 1\,600 \mu\text{g} \cdot 24 \text{ h}^{-1}$ ($25 \mu\text{mol} \cdot 24 \text{ h}^{-1}$) 则支持 WD 的诊断^[18]。2008 年中华医学会神经病学分会帕金森病及运动障碍学组亦推荐该实验方法^[19]。目前, 该方法已渐被大家接受, 国内外文献多以该方法用作 PCT 的标准方案。

2 PCT 在 WD 早期诊断中的价值

自 1956 年由 Walshe^[20]首次应用 PCA 治疗 WD 患者以来, 将 PCT 用于 WD 的诊断最早见于 1976 年 Tu 等^[21]的报道, 在分析 10 例杂合子、10 例 WD 患者和 26 例非 WD 肝病对照组服用 1 g 青霉胺后留取 24 h 尿铜的结果, 指出如 WD 疑似患者在行 PCT 后其尿铜大于 $1\,600 \mu\text{g} \cdot 24 \text{ h}^{-1}$, 则对于原发性硬化性胆管炎、自身免疫性肝病及爆发性肝衰竭有较明确的鉴别诊断价值。1980 年, Gibbs 等^[22]对 18 例脑型 WD 患者及 9 例症状前期 WD 患者口服 64 Cu 后行 PCT, 结果脑型患者的尿放射性铜排泄量超过症状前期患者 2 倍以上, 但该研究未提供正常人和其他肝病患者的数据。

1992 年, Martins 等^[23]研究了 17 例 WD 儿童患者, PCT 特异性为 98.2%, 敏感性为 88.2%, 并认为尿铜 $> 1\,600 \mu\text{g} \cdot 24 \text{ h}^{-1}$ ($25 \text{ mmol} \cdot 24 \text{ h}^{-1}$) 有肯定的诊断价值。1997 年, Giachino 等^[24]对儿童 WD 患者的研究则发现, PCT 在以急性肝损害为主要临床表现的 WD 患者中敏感性为 92%。

2005 年, Dhawan 等^[11]研究了 142 例以肝症状为主症的

基金项目: 安徽省卫生厅基金资助项目 (09A004)

作者单位: 230061 合肥 安徽中医学院神经病学研究所附属医院

通信作者: 韩咏竹, hyz89722@sina.com

WD 儿童患者,并以自身免疫性肝炎(24例)、硬化性胆管炎(7例)和非甲非戊型肝炎(12例)等肝病者为对照,WD组平均尿铜为 $6.3 \text{ mmol} \cdot 24 \text{ h}^{-1}$ (PCT前)和 $32.7 \text{ mmol} \cdot 24 \text{ h}^{-1}$ (PCT后),均较对照组明显增高。2007年,Muller等^[12]以38例WD确诊患者为研究对象(男性19例,女性19例,发病年龄5~16岁,平均10.3岁),并以60例其他肝脏疾病的患者为对照,其结果与Anil等的研究结果一致,并认为对以肝症状起病的早期WD患者而言,其灵敏度和特异性不亚于肝穿刺活检和基因检测等方法。

杨永范等^[17]对44例WD患者及其亲属行PCT,27例未经治疗的WD患者的尿铜明显高于杂合子和正常对照者,而杂合子与正常对照者之间无显著差异,并认为PCT可作为WD诊断的一个重要依据。

3 PCT应用于WD早期诊断的局限性

由于不同的研究采用的PCT方法和判断标准不同,且不同的患者在不同的发病时期体内铜的蓄积存在明显差异,许多学者认为PCT作为单独的诊断依据存在一定的局限性^[10]。

1976年,Larusso等^[25]的研究发现在慢性非WD肝病患者中有超过半数存在肝铜蓄积及24h尿铜量增高,因此认为PCT对WD患者的早期并无多大意义。

1997年,Giacchino等^[24]的研究发现PCT对以急性肝损害起病的儿童WD患者有较高诊断价值。Petra等^[13]的研究则认为,在肝病患者中PCT只能证明PCA能促使坏死的肝细胞释放出更多的铜,但无最终确诊WD的价值。

Muller等^[12]虽然发现38例WD确诊患者在行PCT前后的尿铜均显著高于对照组,但在6个月后重复行PCT结果显示,25例以急性肝症状起病的WD患者中有23例仍呈阳性结果,9例症状前期的同胞患者中有7例则为阴性结果。ROC曲线分析显示,以 $25 \mu\text{mol} \cdot 24 \text{ h}^{-1}$ 为诊断阈值,以急性肝症状起病的WD患者的敏感性为76%,特异性为93%。如将诊断阈值设定在 $16 \sim 25 \mu\text{mol} \cdot 24 \text{ h}^{-1}$ 之间,则其敏感性提高20%,而特异性则减少16%。症状前期的同胞患者敏感性只有46%。该研究认为PCT对以肝症状起病的早期WD患者有肯定的诊断价值,但对症状前期的同胞患者其可靠性值得怀疑。

2010年,Emanuele等^[26]以40例WD儿童患者为研究对象,并以58例年龄性别相仿的其他肝病患者为对照组,在25例接受PCT的WD患者中仅有3例(12%)尿铜 $>1575 \mu\text{g} \cdot 24 \text{ h}^{-1}$,并且这3位患者均PCT前尿铜 $>100 \mu\text{g} \cdot 24 \text{ h}^{-1}$ 且存在肝脏纤维化。在58例对照组中也有3例(5.2%) $>1575 \mu\text{g} \cdot 24 \text{ h}^{-1}$,其表现为结节性肝硬化或自身免疫性肝病。两组之间无明显差异,ROC曲线的敏感性为12%。

胡学强等^[16]对29例WD纯合子及25例WD杂合子行PCT,结果发现29例纯合子的尿铜均显著高于正常对照者,而25例杂合子中有14例的尿铜高也于对照者。因此,该研究提示PCT虽然对WD纯合子有诊断价值,但难以排除杂合子诊断。

4 结论

综上所述,PCT虽然存在一定的局限性,且因PCA作为重金属螯合剂具有潜在的皮肤损害、免疫系统损害甚至骨髓抑制等严重毒副作用^[9],有人对PCT过程中患者应用PCA的安全性、依从性以及尿液收集过程中的准确性提出质疑,但作为一种无创性检查方法,且具有操作简便、灵敏度高、易于在临床推广应用等优点,PCT在WD患者(尤其是儿童WD患者)诊断中的价值已被肯定和广泛接受,被AASLD和中华医学会推荐为儿童WD患者早期诊断的重要依据,并被认为是与血清CP水平检测、24h尿铜测定等常规铜代谢检查指标有同等的诊断价值(均为I级B证据)。尽管近年来随着基因芯片和液相-串联质谱分析等高通量、高灵敏度的微量分析技术的出现,使得WD早期诊断的水平获得明显提高^[27],但在临床实践中,尤其在广大的基层医院中,PCT的诊断价值仍不可替代。

参考文献

- [1] Ala A, Walker AP, Ashkan K, et al. Wilson's disease. *Lancet*, 2007, 369 (3): 397 - 408.
- [2] Scheinberg IH, Sternlieb I. Wilson's disease. *Major Probl Intern Med*, 1984, 23: 1 - 24.
- [3] Mak CM, Lam CW. Diagnosis of Wilson's disease: a comprehensive review. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2008, 45 (3): 263 - 290.
- [4] 蒋雨平. 要提高我国肝豆状核变性病的诊断水平. *中华医学杂志*, 2001, 81 (11): 641 - 642.
- [5] Czlonkowska A, Tarnacka B, Litwin T, et al. Wilson's disease - cause of mortality in 164 patients during 1992 - 2003 observation period. *J Neurol*, 2005, 252 (6): 698 - 703.
- [6] 胡纪源, 吕达平, 王共强, 等. 肝豆状核变性的临床误诊研究. *中华医学杂志*, 2001, 81 (11): 642 - 643.
- [7] Lorincz MT. Neurologic Wilson's disease. *Ann NY Acad Sci*, 2010, 1184: 173 - 187.
- [8] Medici V, Rossaro L, Sturmiolo GC. Wilson disease - A practical approach to diagnosis, treatment and follow - up. *Dig Liver Dis*, 2007, 39 (7): 601 - 609.
- [9] 杨任民. 肝豆状核变性. 合肥: 安徽科学技术出版社, 1995: 173.
- [10] Huster D. Wilson's disease. *Best Prac Res Clin Gastroenterol*, 2010, (24): 531 - 539.
- [11] Koppikar S, Dhawan A. Evaluation of the scoring system for the diagnosis of Wilson's disease in children. *Liver Int*, 2005, 25 (5): 680 - 681.
- [12] Muller T, Koppikar S, Taylor RM, et al. Re - evaluation of the penicillamine challenge test in the diagnosis of Wilson's disease in children. *J Hepatol*, 2007, 47 (2): 270 - 276.
- [13] Steindl P, Ferenci P, Dienes HP, et al. Wilson's disease in patients presenting with liver disease: a diagnostic challenge.

新型氨基糖苷类修饰酶基因 $aac(6')-Ib-cr$ 的研究进展

许伟伟 熊自忠

[关键词] $aac(6')-Ib-cr$; 喹诺酮类

doi:10.3969/j.issn.1000-0399.2011.05.049

随着喹诺酮类药物在临床的广泛应用,喹诺酮类的耐药问题也受到了广泛的关注,细菌对喹诺酮类药物的耐药机制在20世纪90年代以前认为均是由染色体介导,如靶位改变、流出泵等。1998年,Martinez等^[1]最先报道临床分离菌株肺炎克雷伯菌中携带的质粒pM6252能介导细菌对喹诺酮类耐药,使人们对喹诺酮类耐药机制有了新的认识。首个质粒介导的喹诺酮类耐药基因是Martinez Martinez等^[1]发现并命名为qnr(现命名为qnrA1),随后2005年日本学者^[2]在弗氏志贺菌中发现了qnrS1基因。2006年美国学者Jacoby等^[3]发现的qnrB是一种全新的基因型,与qnrA1编码氨基酸的同源性为39.5%,与qnrS1编码氨基酸的同源性为37.4%。同年Robicsek等^[4]发现了同时对氨基糖苷类和喹诺酮类耐药基因 $aac(6')-Ib$ 的变异

型 $aac(6')-Ib-cr$ 。Yamane等^[5]于2007年发现质粒介导的外排泵基因qepA,2009年Cavaco等^[6]发现了qnrD基因,其氨基酸与qnrA1有41%的同源性,与qnrS1存在39%的同源性。2009年中国学者Wang等^[7]发现了qnrC基因,qnrC与qnrA1、qnrB1、qnrS1、qnrD编码的氨基酸分别存在64%、42%、59%和43%的同源性。而 $aac(6')-Ib-cr$ 是其中较为特殊的一个基因,它编码一个对喹诺酮类和氨基糖苷类两种不同抗菌药均有修饰作用的修饰酶。

1 $aac(6')-Ib-cr$ 的研究背景

2003年Wang等^[8]对收集的E.coli J53进行qnrA研究时发现,来自不同菌株的两接合子(分别包含质粒pHSH10-2、

基金项目:教育部重点科研项目(209059)、安徽省卫生厅人才基金
作者单位:230022 合肥 安徽医科大学第一附属医院感染病科
通信作者:熊自忠,xiongzhong@126.com

- Gastroenterology, 1997, 113 (1): 212-218.
- [14] 叶群荣,程楠,胡纪源,等. 肝豆状核变性早期诊断的研究进展. 安徽医学,2010, 31(8): 1000-1003.
- [15] Frommer DJ. Urinary copper excretion and hepatic copper concentrations in liver disease. Digestion, 1981, 21(4): 169-178.
- [16] 胡学强,梁秀龄,刘悼霖,等. 肝豆状核变性纯合子及杂合子的临床生化研究. 中国神经精神疾病杂志, 1986, 4(12): 210-213.
- [17] 杨永范,许由恩,刘道宽,等. 44例肝豆状核变性患者及其亲属的铜代谢生化分析. 上海第一医学院学报, 1983, 10(6): 436-442.
- [18] Aggarwal A, Aggarwal N, Nagral A, et al. A novel global assessment scale for Wilson's Disease. Mov Disord, 2008, 4(24): 509-518.
- [19] 中华医学会神经病学分会帕金森病及运动障碍学组. 肝豆状核变性的诊断与治疗指南. 中华神经科杂志, 2008, 41(8): 566-569.
- [20] Walshe JM. Penicillamine, a new oral therapy for Wilson's disease. Am J Med, 1956, 21(4): 487-495.
- [21] Tu JB, Blackwell RQ. Studies on levels of penicillamine-induced cupriuresis in heterozygotes of Wilson's disease. Metabolism, 1967, 16(6): 507-513.
- [22] Gibbs K, Walshe JM. Biliary excretion of copper in Wilson's disease. Lancet, 1980, 6(2): 538.
- [23] Martins D, Costa C, Baldwin D, et al. Value of urinary copper excretion after penicillamine challenge in the of Wilson's disease. Hepatology, 1992, 15(4): 609-615.
- [24] Giacchino R, Marazzi MG, Barabino A, et al. Syndromic variability of Wilson's disease in children. Clinical study of 44 cases. Ital J Gastroenterol Hepatol, 1997, 29(2): 155-161.
- [25] Larusso NF, Summerskill WH, McCall JT. Abnormalities of chemical test for copper metabolism in chronic active liver disease: Differentiation from Wilson's disease. Gastroenterology, 1976, 70(5): 653-655.
- [26] Nicastro E, Ranucci G, Vajro P, et al. Re-evaluation of the diagnostic criteria for wilson disease in children with mild liver disease. Hepatology, 2010, 52(6): 1948-1956.
- [27] Wilde A, Sadilkova K, Martin S, et al. Tryptic peptide analysis of ceruloplasmin in dried blood spots using liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Application to newborn screening. Clin Chem, 2008, 54(12): 1961-1968.

(2010-12-20 收稿 2011-02-20 修回)