

•文献综述•

[文章编号] 1007-3949(2001)-04-0366-03

血浆总同型半胱氨酸与血管性疾病

周剑涛, 潘秋香¹

(湖北省黄冈卫生学校附属医院, 1. 湖北省黄冈市妇幼保健院, 湖北省黄冈市 438000)

[主题词] 同型半胱氨酸; 血管疾病

[摘要] 同型半胱氨酸是体内甲硫氨酸去甲基化的代谢产物。血浆中同型半胱氨酸以4种形式存在, 统称为总同型半胱氨酸。目前已确认高总同型半胱氨酸是动脉粥样硬化等心血管疾病发病的一个独立危险因素。本文简述血浆总同型半胱氨酸最新的测定方法、分析致血浆总同型半胱氨酸升高的因素以及高总同型半胱氨酸与血管性疾病的关系。

[中图分类号] R543

[文献标识码] A

同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)近年来成为血管性疾病的研究热点之一, 测定血浆(或血清)总同型半胱氨酸(total homocysteine, tHcy)的浓度对于心血管疾病、钴胺素与叶酸缺乏病、同型半胱氨酸尿症的诊断和防治具有重要意义^[1]。

1 同型半胱氨酸代谢概况^[2]

同型半胱氨酸是体内甲硫氨酸(Met)去甲基化的代谢产物, 在体内主要通过2种途径代谢。

1.1 重新甲基化(Remethylation)

甜菜碱-同型半胱氨酸甲基转移酶(betaine-homocysteine methyltransferase, BHMT EC2.1.1.5)或甲硫氨酸合酶(methionine synthase, MS EC2.1.1.13)催化Hcy甲基化形成Met。BHMT酶促反应主要在肝内进行, 利用甜菜碱作为甲基供体。维生素B12依赖性MS则广泛存在于所有组织中, 使用叶酸衍化生成的N⁵-甲基四氢叶酸作为甲基供体。由于N⁵、N¹⁰亚甲基四氢叶酸还原酶(N⁵、N¹⁰-Methylenetetrahydrofolate reductase, MTHFR EC1.5.1.20)催化生成N⁵-甲基四氢叶酸, 所以, MTHFR的活性也与血浆Hcy浓度有关。还应指出, MS还原酶(MS reductase, MSR)通过钴(Ⅱ)胺素使MS还原甲基化恢复其活性^[3]。

同型半胱氨酸 + 甜菜碱 $\xrightarrow{\text{BHMT}}$ 甲硫氨酸 + 二甲甘氨酸

同型半胱氨酸 + N⁵-甲基四氢叶酸 $\xrightarrow{\text{MS}}$ 甲硫氨酸 + 四氢叶酸

1.2 转硫作用(Transsulfuration)

Hcy与丝氨酸(Ser)由胱硫醚-β-合酶(cystathionine-β-synthase, CBS EC4.2.1.22)催化缩合形成胱硫醚, γ-胱硫醚酶(EC4.4.1.1)催化胱硫醚裂解成Cys和α-酮丁酸。CBS是体内重新甲基化途径饱和, 或需要半胱氨酸(Cys)时, 转硫作

用的关键酶。CBS和γ-胱硫醚酶都含有辅助因子磷酸吡哆醛(PLP)。

同型半胱氨酸 + 丝氨酸 $\xrightarrow{\text{CBS}}$ 胱硫醚
 $\xrightarrow{\gamma\text{-胱硫醚酶}}$ 半胱氨酸 + α-酮丁酸

2 血浆总同型半胱氨酸

同型半胱氨酸是巯基(-SH)氨基酸。血浆Hcy至少有4种存在形式^[4]: 70%~80% Hcy与血浆蛋白, 主要是白蛋白以二硫键形成复合物; 20%~30% Hcy彼此之间形成二聚Hcy, 或其它硫醇化合物如Cys形成Hcy-Cys混合二硫化物; 约1% Hcy为游离硫醇; 最近Tsikas等^[4]报道体内游离Hcy通过S-转亚硝基反应(S-transnitrosylation)形成S-亚硝基同型半胱氨酸(S-nitrosohomocysteine, SNHC), 是一种极弱的NO供体。血浆(或血清)中这几种形式之和称为tHcy。

血浆tHcy可以在空腹或非空腹状态测定。Hankey等^[5]主张至少空腹12h再测定tHcy, 以避免因进食可能引起tHcy波动性升高的影响^[6]。健康人群空腹tHcy天对天变异性小(CV为7%)^[7]。正常人空腹血浆tHcy浓度为5~15 μmol/L, 男性比女性约高1 μmol/L, 随年龄增加tHcy略微升高。血浆tHcy超过15 μmol/L称为高tHcy血症(hyperhomocysteinaemia)。根据tHcy升高程度人为划分成轻度(16~30 μmol/L)、中度(31~100 μmol/L)和重度(>100 μmol/L)高tHcy血症^[4]。

总同型半胱氨酸也可以在Met负荷后(Post-methionine load, PML)测定^[8]。PML tHcy测定过程首先是测定基础tHcy, 再摄入标准口服剂量Met(0.1 g/kg体重, 或者3.8或4.0 g/m²体表面积), 之后2、4、6、8h定时测定tHcy。测定PML tHcy有利于了解Hcy代谢途径, 对于转硫途径中微弱障碍比空腹tHcy更加敏感^[4]。然而, 临床测定PML tHcy不太方便, 临床化学分析以测定空腹tHcy为主。

3 血浆总同型半胱氨酸测定

测定tHcy的标本以血浆为宜。采集血样应立即离心分

[作者简介] 周剑涛, 男, 1954年出生, 湖北新洲人, 化学学士, 副主任技师, 现从事生物化学与临床生物化学检验技术教学和方法学研究, 已发表论文40余篇, 参编学术专著3本, 享受市政府津贴。

离,否则会导致血细胞中 Hcy 依时间和依温度释放入血浆^[9]。倘若不能立即分离,全血样本应直接放置冷藏箱。血浆 tHcy 稳定,在 -70℃能保存几年。

测定血浆 tHcy 一般是先使用还原剂转化蛋白-Hcy、Hcy-Hcy、Hcy-Cys 等二硫化物为还原型 Hcy,之后采用定量方法如 HPLC 或 GC-MS 测定 tHcy。目前认为 HPLC 或 GC-MS 是测定 tHcy 的标准方法,但是,原 HPLC 或 GC-MS 法操作复杂繁琐不适合临床化学常规分析。现在已有适合临床分析的 Hcy 快速检测仪系统,如 DS30 Hcy 检测仪,DS30 采用快速液相微柱层析法分离 Hcy 与内标准及 Cys 等生物活性物质,进而以荧光染料标记,并通过检测荧光强度测定 Hcy 浓度。

最近 Frantzen 等^[1]建立了酶转化免疫测定(enzyme conversion immunoassay) tHcy 的方法。其原理是:首先在血浆/血清中加入二硫苏糖醇(L-dithiothreitol),使 Hcy 的二硫化物状态转化为游离的还原型 Hcy。使用 SAH 水解酶(SAH hydrolase, SAHase EC 3.3.1.1)和过量腺苷(Ado)转化还原型 Hcy 为 S-腺苷-L-同型半胱氨酸(S-adenosyl-L-homocysteine, SAH)。

同型半胱氨酸 + 腺苷 $\xrightarrow{\text{SAHase}}$ 腺苷-L-同型半胱氨酸 + H₂O

通过 SAH 与单克隆抗-SA-H 抗体竞争性免疫反应测定出血样 tHcy。该法批内 CV < 6%,批间 CV 为 8%,与 HPLC 法具有良好的相关性($r = 0.986$)。tHcy EIA 微反应板测定适合临床常规分析与研究。

4 致血浆总同型半胱氨酸水平升高的因素

4.1 遗传缺陷

血浆 tHcy 水平受多基因调节^[10]。已证实与 Hcy 代谢有关的遗传缺陷酶有 CBS、MTHFR、MS 和 MSR。这 4 种酶任一种严重缺陷均导致血浆和尿液 Hcy 水平升高。4 种基因都已被克隆,并证明了部分基因突变型与高 tHcy 的关系。如 MTHFR 基因编码区点突变(C677T),其表达产物对热不稳定,催化活性仅为正常酶的一半,临床表现为轻度高 tHcy 血症。

4.2 微量营养素(Micronutrients)缺乏

同型半胱氨酸代谢酶反应的辅助因子,如叶酸、维生素 B12 或 B6 缺乏都可引起血浆 tHcy 升高。大约 2/3 的高 tHcy 是由于血液中一种或数种维生素辅因子不足而引起。

4.3 其它因素^[4]

4.3.1 年龄与性别 tHcy 水平依年龄而增加,男性比女性约高 10%。目前认为老年人 CBS 活性降低,肾功能减退,微量营养素如叶酸、维生素 B6 吸收或生物利用率减小等而导致 tHcy 水平升高。性别差异则被认为与性激素有关,妇女绝经后 tHcy 水平迅速升高,而经雌激素替代治疗后 tHcy 降低。

4.3.2 药物与吸烟 各种影响叶酸、维生素 B12 和 B6 代谢的药物能增加血浆 tHcy 水平,如叶酸拮抗剂和维生素 B6 拮抗剂。吸烟者引起 tHcy 水平升高,其机理尚不清楚。

4.3.3 疾病 许多疾病状态如肾功能不全、甲状腺机能

低下、急性淋巴白血病、乳腺癌、卵巢癌、胰腺癌等与高 tHcy 血症有关。其中,肾功能是决定空腹和 PML tHcy 水平的重要因素,晚期肾病患者 tHcy 显著升高。血浆 tHcy 浓度与肾功能负相关。

5 高总同型半胱氨酸与血管疾病^[4,10]

30 年前,Mc Cully 首先观察到患有遗传性高 Hcy 尿的病人同时伴有亚临床期心血管病。1976 年 Wilcken 兄弟通过流行病学调查最先提出 Hcy 是心血管病的一个独立危险因素。其后二十年间,Hcy 与心血管病之间的临床研究和血浆 Hcy 测定方法的改进促进了 Hcy 作为心血管疾病危险因素的研究。许多流行病学研究证实外周血管、脑血管和冠状血管疾病的患者 tHcy 水平显著高于正常人群,是血管疾病的独立危险性指标。

Meta 分析表明,Hcy 升高 5 $\mu\text{mol/L}$ 引起的心血管疾病危险性升高程度与胆固醇升高 0.5 mmol/L 相当。空腹 tHcy 或 PML tHcy 每升高 5 $\mu\text{mol/L}$,男性的冠心病发病的相对风险约升高 1.6 倍,女性约升高 1.8 倍(95%置信区间);而脑血管疾病的相对风险升高 1.5 倍;周围血管疾病也显示了很高的相关性。血浆 tHcy 水平也是冠心病死亡率的一种指标。Kulley 等指出 tHcy 水平升高,通过增加炎症反应和增加血栓形成的危险而提高了冠心病患者的死亡率。

许多早期人体和实验动物研究指出,Hcy 抑制前列环素合成、血栓调节素表达和蛋白 C 活化。体外研究也表明 Hcy 可以促进血小板聚集,内皮细胞受损和低密度脂蛋白的氧化。这些研究的共同问题是实验用 Hcy 浓度太高(110 mmol/L),为生理性 Hcy 浓度的数百倍之多。况且,游离态还原型 Hcy 水平远高于体内生理状态。

之后,采用低浓度 Hcy 进行体外实验证实,轻度升高 Hcy 与内皮细胞损伤有关。Upchurch 等实验结果表明,Hcy 能增强 H₂O₂ 生成,并损伤细胞内谷胱甘肽过氧化酶同工酶活性而降低细胞对 H₂O₂ 解毒的能力。实验动物模型和人体研究也证实 Hcy 诱导血管损伤。例如,Tawakol 等证实具有轻度升高 tHcy(19.2 $\mu\text{mol/L}$)的患者与正常 tHcy 者(8.2 $\mu\text{mol/L}$)相比,前者有血管舒张作用受损,并指出其原因可能是 NO 生物利用性降低所致。

参考文献

- [1] Frantzen F, Faaren AL, Alfheim I, et al. Enzyme conversion immunoassay for determining total homocysteine in plasma or serum [J]. *Clin Chem*, 1998, **44**(2): 311-316
- [2] Finkelstein JD. The metabolism of homocystein: pathways and regulation [J]. *Eur J Pediatr*, 1998, **157**(suppl 2): S40-S44
- [3] Ludwig ML, Matthews RG. Structure-based perspectives on B12-dependent enzymes [J]. *Ann Rev Biochem*, 1997, **66**: 269-313
- [4] Tsikas D, Sandmann J, Rossa S, et al. Investigations of S-transnitrosylation reactions between low- and high-molecular-weight S-nitroso compounds and their thiols by high-performance liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Anal Biochem*, 1999, **270**: 231-241

- [5] Hankey GJ, Eikelboom JW. Homocystein and vascular disease [J]. *Lancet*, 1999, **354**: 407- 413
- [6] Guttormsen AB, Scheede J, Fiskerstrand T, et al. Plasma concentrations of homocystein and other aminothiol compounds are related to food intake in the healthy human subjects [J]. *J Nutr*, 1994, **124**: 1934- 941
- [7] Garg UC, Zheng ZJ, Folsom AR, et al. Short-term and long-term variability of plasma homocysteine measurement [J]. *Clin Chem*, 1997, **43**: 141- 145
- [8] Fowler B, Sardharwalla IB, Robins AJ. The detection of heterozygotes for homocystinuria by oral loading with L-methionine [J]. *Biochem J*, 1971, **122**: 23- 24
- [9] Refsum H, Fiskerstrand T, Guttormsen AB, et al. Assessment of homocysteine status [J]. *J Inher Metab Dis*, 1997, **20**: 286- 294
- [10] Tsai MY. Moderate hyperhomocysteinemia and cardiovascular disease [J]. *J Lab Clin Med*, 2000, **135** (1): 16- 25
- (此文 2000- 11- 13 收到, 2001- 07- 05 修回)
(此文编辑 朱雯霞)

•会议消息•

第二次全国动脉硬化性疾病学术会议通知 (第一轮)

由中国病理生理学会动脉粥样硬化专业委员会和中国动脉硬化杂志编辑部联合主办的“第二次全国动脉硬化性疾病学术会议”将于 2002 年夏秋之交召开, 具体时间地点待定, 现将有关事项通知如下:

1、会议主题及征文内容:

- | | |
|-----------------|----------------|
| ①高脂蛋白血症; | ⑧冠心病性心力衰竭; |
| ④动脉粥样硬化; | ⑦高血压; |
| ⑨急性冠状动脉综合征; | ⑥颈动脉硬化; |
| ②冠心病的病理生理与药物治疗; | ⑤脑动脉硬化; |
| ③冠心病的介入治疗; | ④1 其它缺血性脑血管疾病; |
| ③冠心病的外科手术治疗; | ④2 肢体动脉硬化性疾病; |

凡与上述主题有关的流行病学研究、基础理论研究、临床基础和临床研究论文、诊治经验、个案报道、病例讨论和文献综述等都属本次会议征文内容。

2、征文要求与用途:

征文撰写要求请参照《中国动脉硬化杂志》。④研究论文应一式两份(全文), 其他文章一份即可。所有文章都应附有一份 500 字左右的摘要。④所投论文必须是未公开发表的, 都应有单位介绍信或在文首页加盖单位公章。所投文稿最好为打印稿, 若为手写稿, 务请用方格稿纸单面正楷书写; 作者姓名和作者单位(邮政编码)请写于文题下。每篇论文需交审稿费 50 元。所征论文经评审合格者, 除参加会议外, 全文将分期刊载于《中国动脉硬化杂志》, 全部摘要刊于专辑中。具体刊出卷期以录用通知(开会通知)为准。

3、本次学术会议将邀请全国知名专家作专题讲座。

4、会议期间, 将召开《中国动脉硬化杂志》第三届编委会全体会议。

5、欲参加会议者, 填写会议回执后请寄: 湖南省衡阳市南华大学内, 中国动脉硬化杂志编辑部, 邮政编码: 421001。若为稿件, 请在信封上注明“会议征文”。

6、会议联系人: 中国动脉硬化杂志编辑部 胡必利,

联系电话: (0734) 8281289;

E-mail: dmzzbib@163.net

第二次全国动脉硬化性疾病学术
会议筹备委员会
2001- 09- 20