

血清糖缺失转铁蛋白的检测及其在酒精性肝病诊断中的意义

肖扬 陈成伟

自1976年 Stibler 和 Kjellin 首次报道以来,血清糖缺失转铁蛋白(carbohydrate-deficient transferrin, CDT)被广泛用于酒精性肝病的实验诊断。至今,检测该项目仍是目前唯一较特异的实验诊断指标。在不同的检测设备、检测方法和不同的人群,CDT 值有所不同,其特异性、敏感性也有差别。检测结果差异还与转铁蛋白(transferrin, Tf)、CDT 异构体结构多样性相关,部分学者认为 CDT 定义不确定也是导致检测结果和意义判断分歧的因素。

一、Tf 与 CDT 的理化特征

Tf 作为最重要的转铁蛋白,主要在肝脏合成,相对分子质量为 76.9×10^3 ,半衰期约 7d,共由 3 个结构域组成:1 个多肽链,2 个铁离子结合点(N 末端和 C 末端)和 2 个 N-交链的复合糖链。Tf 不是一个同源分子,有微小异质性即有结构相似的异构体,是分析 CDT 的基础。

(一)Tf 的微小异质性^[1]

1. 不同 Fe 离子负载 每个 Tf 分子最多结合两分子 Fe,主要是 Fe^{3+} 。Tf 分子可无 Fe、带一分子 Fe 或带两分子 Fe(简写成: Fe_0 -Tf、 Fe_1 -Tf、 Fe_2 -Tf)。每结合 1 个 Fe^{3+} ,Tf 的等电点(pI)上升 0.2pH。

2. 不同 N-糖链 Tf 的 2 个 N-糖链分支有不同,分别有 2 支、3 支、4 支分支情况。每个分支末端带 1 个呈负电荷的唾液酸(SA)。N-糖链每结合一个 SA,Tf 的 pI 值下降 0.1pH。

3. 多肽链的修饰(Tf 的遗传变异) Tf 的遗传变异使其形成不同的多肽链,已知有 38 种,其中 Tf-C 是最重要的类型。Tf-B 和 Tf-D 会干扰 CDT 检测,出现假阳性或假阴性结果。

Fe 离子负载、SA 含量和多肽的修饰共同影响 Tf 的 pI 值。因此,不同数量的 Fe^{3+} 、SA 可有相同的 pI 值,例如:2SA- Fe_2 -Tf (主要的 CDT 异构体)和 4SA- Fe_1 -Tf(主要的非 CDT 异构体)pI 值相同。等电聚焦电泳(IEF)最多可检测出人血清 36 种同源性或 72 种异源性 Tf。仅 3 种同源性或 6 种异源性 Tf 为 CDT。同时,9 种同源性或 18 种异源性 Tf(非 CDT)与 CDT 异构体的 pI 值相近。因此,CDT 检测需要用可靠的分离手段将 CDT 异构体从非 CDT 中分离出来。

(二)CDT 定义

Stibler 和 Kjellin 首次报道,长期酗酒者脑脊液和血清中 Tf 异构体 pI 值 >5.7 。后来有大量报道,该 Tf 异构体在长期酗酒血清中出现频率高,禁酒后消失,半衰期约 14d。这些异构体后来公认是 0SA- Fe_2 -Tf、1SA- Fe_2 -Tf 和 2SA- Fe_2 -Tf。对酒精是否引起 3SA- Fe_2 -Tf 升高或者 CDT 诊断是否

含有该异构体, Dibbelt 用高效液相(HPLC)在病理和非病理 CDT 浓度血清测出 3SA- Fe_2 -Tf 浓度相同^[2],表明 CDT 异构体浓度升高与 3SA- Fe_2 -Tf 升高无关,认为 3SA- Fe_2 -Tf 明显不具有诊断价值,不应包括在 CDT 内。免疫浊度法(% CDT TIA 或 % CDTri-TIA, Axis 公司)测出 CDT 含有约 50%的 3SA- Fe_2 -Tf;用放射免疫法和相对较新的免疫浊度法(ChronAlcol. D. 法, Sangui 公司)检测,则排除了该异构体并得到公认。

(三)CDT 化学结构 长期酗酒者血清 SA 量减少,用神经氨酸酶治疗,Tf 异构体恢复如常(恢复 Tf 的 N-糖链 SA),因此认为酗酒者血清 Tf 缺少糖结构,尤其是 SA 缺失。进一步研究表明,CDT 不仅缺失 SA 残基,还缺失 N-糖链(半乳糖、甘露糖和 N-乙酰葡萄糖胺)和序列糖链(甘露糖、甘露糖、N-乙酰葡萄糖胺和 N-乙酰葡萄糖胺),后者直接连于多肽链。CDT 异构体(2SA- Fe_2 -Tf、0SA- Fe_2 -Tf)可缺失 1 个或 2 个糖链。研究 Tf 异构体对进一步揭示乙醇使 CDT 升高的病理机制有意义。有人认为,CDT 最可能缺失的不仅是 N-糖链(主要是 2SA- Fe_2 -Tf 和 0SA- Fe_2 -Tf),还缺失 N-糖链的部分结构。若真如此,制备直接用于 CDT 检测的特异 CDT 抗体变得更复杂。

二、酒精诱导 CDT 升高的病理机制

长期酗酒者 CDT 升高的病理机制目前还不完全清楚。可能是乙醇及其代谢生成的乙醛影响 N-糖链在高尔基体的合成。

酗酒者半乳糖苷转移酶和 N-乙酰半乳糖胺转移酶活性降低,乙醛可使该酶活性进一步降低。戒酒硫可阻断乙醛脱氢酶,使乙醛在体内积聚,但不影响血清 CDT 水平。用 3H 标记亮氨酸和 N-乙酰-D-甘露糖胺,发现乙醇灌注鼠 Tf 合成降低, $\alpha 2,6$ -SA 转移酶 mRNA 减少,从而 $\alpha 2,6$ -SA 转移酶合成及其活性降低,Tf 的唾液酸化因此亦减少。将乙醛作用于正常鼠的高尔基体,同样可见到 SA 转移酶、半乳糖苷转移酶和 N-乙酰半乳糖胺转移酶减少。

Fast 等^[3]研究 SA 转移酶的作用时,发现 N-糖苷酶部分降解 N-糖苷后,活性降低;甲醇、乙醇可完全去糖基化,认为该酶失去催化活性与去糖基化升高有关,并推测 SA 转移酶(包括半乳糖苷转移酶和 N-乙酰半乳糖胺转移酶)活性降低,使 Tf 不完全糖基化,即乙醇及其代谢产物主要影响有关 Tf 糖链合成的糖基转移酶的糖基化。

三、血清 CDT 检测

血清 CDT 检测方法应该具有高选择性、高特异性和高敏感性,因为①血清 Tf 有微小异质性;②CDT 和非 CDT 异构体非常相似;③存在低浓度的 CDT 异构体(健康人 $<2.5\% \sim 2.7\%$,酗酒者 $<20\%$)。目前尚无 CDT 特异反应或 CDT 抗

作者单位:325000 浙江省温州市解放军第一一八医院传染科(肖扬);南京军区上海肝病临床研究中心(陈成伟)

体,常规实验室检测需分离出 CDT,利用 CDT 和非 CDT 的电荷、pI 值差异进行层析或电泳。

(一)电泳法

1. 等电聚焦电泳法 IEF 因为选择性高,使其成为检测血清 Tf 异构体的参考方法。根据 Tf 异构体 pI 值特点,电泳时形成一个 pH 梯度。简单步骤为先用 Fe^{3+} 饱和 Tf,接着电泳,免疫固定,再加 CDT-抗-Tf 复合物,染色后可见 Tf 异构体条带,最后用密度仪测 Tf 条带可以定量。

2. 毛细管电泳法 毛细管电泳和毛细管盘状电泳可用于 Tf 异构体检测,但毛细管表面易吸附蛋白,其缓冲液需要透过紫外线。增加分析柱的长度,运行缓冲液加入二氨基丁烷的毛细管盘状电泳可使其敏感度和分离能力增强。然而其选择性、敏感性仍低于 IEF。

(二)层析法 与 IEF 比较,层析法检测 CDT 的敏感性、选择性仍低(样品体积需要 100~500 μ l),因此不能用于检测 Tf 的遗传变异体,只能用于商业化检测 CDT。HPLC 能检测出 Tf 的遗传变异体,但敏感性仍低于 IEF。离子交换层析/免疫法检测的 CDT 值不能解释时,可用 HPLC 检测。HPLC 的样品分析时间约 20min,但其柱子的再生时间长,限制了大量的 CDT 系列分析。

近年来, Yoshikawa 等^[4]用植物凝集素亲和层析法检测 CDT,诊断效率高于免疫浊度法(Axis 公司)

(三)CDT 的商业化检测 目前所有商业化检测 CDT 都是根据 CDT 常用定义及其理化性质,在离子交换层析基础上进行的。1993 年,Pharmacia & Upjohn 公司推出第一个商业化的 CDT 检测方法即放射免疫法(CDTect-RIA),接着是免疫浊度法(Axis 公司)、改良免疫浊度法(%CDT TIA 或 %CDTri-TIA, Axis 公司)、酶免疫法(CDT-EIA, Pharmacia & Upjohn 公司)、免疫浊度法(Tinaquant-%CDT TIA 法, Roche 公司)、HPLC 法及相对较新的免疫浊度法(ChronAlcol. D. 法, Sangui 公司)。

(四)CDT 检测的标准化问题 尽管绝大多数学者认为, CDT 是目前诊断长期酗酒最特异的实验诊断指标,但却没有实用的、标准的检测方法用于常规诊断。另外, CDT 定义日益模糊,何种 Tf 异构体是 CDT 异构体? 不同的临床设备、人群和检测分析方法会得到不同的 Tf 异构体,其特异性、敏感性和 CDT 值均不同,造成与 CDT 诊断价值不相符合。是坚持用 Stibler 介绍的 CDT 常用定义,还是有必要进行再定义? 2000 年 5 月在德国柏林召开了有关 CDT 分析标准化的国际会议,结论是要发展高度敏感的 HPLC 作为标准方法检测 CDT。目前,实验室报告 CDT 值时,还应该提供临界值和检测分析方法。否则,不同的检测可使 CDT 值剧增或剧减,以至错误分析患者病情。

四、血清 CDT 的临床意义

在国外, CDT 被广泛用于酒精性肝病的实验诊断,是目前唯一较特异的实验诊断指标。它也可用于戒酒治疗期间随访监测指标。如与其他生化指标结合分析,意义更大。

(一)CDT 与 GGT 与 CDT 相反,GGT 的检测已高度标准化、自动化且费用低廉,因而是酒精性肝病最常用的诊断指

标。有人研究了 CDT 与 GGT 的相关性、诊断敏感性、特异性及其诊断可靠性,认为两者没有直接关系, CDT 特异性更强, GGT 则对女性更敏感。GGT 是否与性别相关或女性肝脏对酒精性损害更易感,还不清楚。GGT 诊断酒精性肝病假阳性明显高于 CDT,因为 GGT 受其他疾病(如阻塞性肝病、肝细胞癌等)和药物(如巴比妥等)影响大。

(二)CDT 诊断特异性 CDT 检测时假阳性因素较少,一些因素也容易辨别。已报道过的几种酒精性肝病常用的诊断指标中, CDT 仍是最特异的实验诊断指标。男性酒精性肝病 CDT 诊断特异性约为 83.6%,男性酗酒为 94.2%;女性则分别为 91.9%和 96.9%(对 GGT 而言,男性分别为 36.1%和 24%;女性分别为 50%和 36.6%)。CDT 诊断酒精性肝病出现假阳性的临床情况主要有: CDG 综合征(先天糖化障碍)、Tf-D 遗传变异、原发性胆汁性肝硬化、慢性活动性肝炎、肝细胞癌、缺铁性贫血、血色病、肾脏联合移植、高血压和囊性纤维化等。

(三)CDT 诊断敏感性 关于 CDT 作为酒精性肝病诊断指标的一个重要问题,就是其敏感性相对较低。大量报道的 CDT 敏感值与期望相差甚远^[5]。CDT 诊断敏感值女性为 30%~50%,男性为 50%~70%。

影响 CDT 诊断敏感性的主要因素为:①年龄 超过 50 岁老年女性较年轻女性影响小,33~55 岁不受影响,超过 40 岁男性敏感性增加;②饮酒型式 日饮酒量影响较大,长期少量饮酒影响大,短期不影响;戒酒时影响大,与无酒精中毒者相比,酒精依赖者敏感度高;③体重 CDT 浓度与葡萄糖处理能力呈正相关,相同饮酒量高体重患者的 CDT 浓度较低,但近两年体重改变与 CDT 浓度无关;④吸烟 吸烟者敏感性增加,与 CDT 浓度呈正相关,可能与饮酒有相互作用;⑤性别 女性 CDT 敏感性明显较低。

目前 CDT 定义及检测标准化尚存在一些问题,从而用不同检测、分析方法,降低了 CDT 值的可比性及诊断可靠性。但至今 CDT 仍是酒精性肝病最特异的实验室诊断指标。诊断酒精性肝病还需根据饮酒史、临床表现、GGT 结合其他检查(如 B 超、肝活检等)综合作出。

参 考 文 献

- 1 Arndt T. Carbohydrate-deficient transferrin as a marker of chronic alcohol abuse: a critical review of preanalysis, analysis, and interpretation. *Clin Chem*, 2001, 47:13-27.
- 2 Dibbelt L. Does trisialo-transferrin provide valuable information for the laboratory diagnosis of chronically increased alcohol consumption by determination of carbohydrate-deficient transferrin? *Clin Chem*, 1998, 44:1209-1215.
- 3 Fast DG, Jamieson JC, McCaffrey G. The role of carbohydrate chains of Gal β 1,4-GlcNAc α 2,6 sialyltransferase for enzyme activity. *Biochim Biophys Acta*, 1993, 1202:325-330.
- 4 Yoshikawa K, Umetsu K, Shinzawa H, et al. Determination of carbohydrate deficient transferrin separated by lectin affinity chromatography for detecting chronic alcohol abuse. *FESB Lett*, 1999, 458:112-116.
- 5 Salaspuro M. Carbohydrate-deficient transferrin as compared on other markers of alcoholism: a systematic review. *Alcohol*, 1999, 19:261-271.

(收稿日期:2002-03-10)