

文章编号 1006-8147(2021)01-0083-05

论著

多重荧光定量 PCR 检测婴幼儿腹泻病毒感染及其临床应用

张蝶^{1,2}, 卢晋英², 唐雪峰², 刘树业², 李会强¹

(1. 天津医科大学医学检验学院, 天津 300203; 2. 天津市第三中心医院检验科, 天津 300170)

摘要 目的: 建立一种能同时检测婴幼儿腹泻粪便中常见病毒的多重荧光定量 PCR 技术。方法: 根据 GenBank 上几种病毒基因组保守序列设计引物序列, 建立多重荧光定量 PCR 方法, 对所建立的多重荧光定量 PCR 方法的特异性、灵敏性及重复性进行验证; 并以所建立的方法对 150 例婴幼儿病毒性腹泻患者粪便标本进行检测。结果: 所建立的多重荧光定量 PCR 检测方法具有很好的特异性, 灵敏性检测可达 10^2 拷贝/mL, 检测不同病毒核酸浓度各自的检测 Ct 值标准差均较小, 变异系数均低于 1.0%, 具有较好的重复性; 检测 150 份粪便标本, 多重荧光定量 PCR 的检出率为 36%, 胶体金方法检出率为 38.67%, 两者比较差别无统计学意义($\chi^2=6.91, P>0.05$)。多重荧光定量 PCR 方法中轮状病毒、腺病毒、诺如病毒、星状病毒的检出率分别为 12.67%、6.00%、13.33% 和 4.00%, 测序结果与已知病毒株基因都具有高度同源性。结论: 所建立的多重荧光定量 PCR 方法快速、特异、灵敏, 可以作为临床病原诊断的一个重要工具且适用于流行病学调查研究。

关键词 腹泻; 病毒; 轮状病毒; 腺病毒; 诺如病毒; 星状病毒; 多重荧光定量 PCR

中图分类号 R446.9

文献标志码 A

The detection of viral infection in infants with diarrhea with multiplex fluorescent quantitative PCR and its clinical application

ZHANG Die^{1,2}, LU Jin-ying², TANG Xue-feng², LIU Shu-ye², LI Hui-qiang¹

(1. School of Medical Laboratory, Tianjin Medical University, Tianjin 300203, China; 2. Clinical Laboratory, Tianjin Third Central Hospital, Tianjin 300170, China)

Abstract Objective: To develop and evaluate a multiplex fluorescence quantitative PCR assay for the simultaneous detection of common virus of faeces in infants with diarrhea. **Methods:** Genbank sequences of Rotavirus, Adenovirus, Norovirus and Astrovirus were included as reference sequences. A multiplex fluorescence quantitative PCR assay was developed and the primers and probes were designed based on the reference sequences, and the specificity, sensitivity and reproducibility of the assay were evaluated. Fecal samples from 150 patients with viral diarrhea were detected and verified by gene sequencing. **Results:** There were high specificity of the multiplex real-time PCR assay for detecting Rotavirus, Adenovirus, Norovirus and Astrovirus. The sensitivity of the method was 10^2 copies/mL. The standard deviations of CT values of different viral nucleic acid concentrations were small, and the coefficient of variation was less than 1.0%, which showed good repeatability. The detection rate of multiplex quantitative PCR was 36.00% in the 150 stool samples of infants with diarrhea, and that of colloidal gold method was 38.67%. There was no significant difference between the two methods. The detection rates of Rotavirus, Adenovirus, Norovirus and Astrovirus were 12.67%, 6.00%, 13.33% and 4.00%, respectively with multiplex fluorescent quantitative PCR. The sequencing results were highly homologous with the genes of known virus strains. **Conclusion:** Rotavirus, Adenovirus, Norovirus and Astrovirus can be detected and identified rapidly by the multiplex fluorescence quantitative PCR assay with high specificity and sensitivity. The assay developed in this study can be applied to the clinical diagnosis and epidemiological investigation.

Key words diarrhea; virus; rotavirus; adenovirus; norovirus; astrovirus; multiplex fluorescent quantitative PCR

婴幼儿腹泻病是儿科常见病、多发病, 是 5 岁以下婴幼儿死亡的第二大病因^[1]。引起腹泻的病原主要包括细菌、病毒和寄生虫等。对病毒、细菌和寄生虫病原体进行有效的实验室检测有助于改善急性腹泻的管理, 并监测和控制这些感染的传播^[2]。由于抗生素的应用, 细菌和寄生虫的感染已经得到明

显地控制, 而对于病毒引起的感染作用甚微, 尤其是婴幼儿病毒性腹泻目前尚无特异、有效的治疗药物。婴幼儿病毒性腹泻后果尤为严重, 据报道每年大 30 亿~50 亿人次的 5 岁以下婴幼儿患腹泻, 导致将近两百万患儿死亡, 其中病毒感染占 85%~90%, 每年仅由轮状病毒(Rotavirus, RV)即可造成发展中国家超过 60 万以上 5 岁以下儿童死亡, 所以病毒性腹泻越来越受到重视^[3]。婴幼儿腹泻病毒性病原主

作者简介 张蝶(1988-), 女, 主管技师, 硕士在读, 研究方向: 临床检验诊断学; 通信作者: 李会强, E-mail: lihuiqiang1965@163.com。

要包括 RV、腺病毒 (Adenovirus, AdV)、诺如病毒 (Norovirus, NV)、星状病毒 (Astrovirus, AstV) 等, 病毒具有感染力强、传播快、潜伏期短、发病急、病后免疫力不能持久等特点, 极易造成疾病的大流行^[4-5]。因此, 能够及时准确地检出腹泻病毒, 对于早期发现传染源、控制疾病流行都具有非常重要的意义。本文采用多重荧光定量 PCR 技术, 实现了多种病毒的同时同步检测, 旨在建立一种临床上快速、灵敏、特异的检测方法, 为疾病预防控制和临床快速诊断提供一种新的技术手段。

1 材料与方法

1.1 病毒及标本来源 腹泻病毒性病原主要包括 RV、AdV、NV、AstV, 由天津市 CDC 提供。临床标本收集 2016 年 9 月—2017 年 9 月就诊于天津市第三中心医院肠道科 150 份婴幼儿腹泻患者粪便标本, 加 500 μL (pH = 7.4) PBS 悬浮后, 5 000 r/min 离心 5 min, 取 100 μL 上清液, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2 主要试剂及仪器 Taq DNA 聚合酶、dNTPs、T4 DNA 连接酶、*EcoR* I、Pgm-T Easy Vector 和 DNA Marker 为 Promega 公司产品, TRIzol、M-MLV 逆转录酶、RNA 酶抑制剂、病毒核酸提取试剂盒均为 Invitrogen 公司产品, 实时荧光定量 PCR 仪为 Roche 公司 Roche-Light Cycler-480 荧光定量 PCR 仪。

1.3 方法

1.3.1 病毒核酸的提取 取上清液按病毒核酸提取试剂盒说明书提取样本核酸, 将提取好的核酸进行分装, 冻存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.3.2 多重荧光定量 PCR 引物、探针的设计 从 GenBank 上分别查找 RV、AdV、NV、AstV 的基因保守序列, 利用生物软件 Beacon designer 7.0 分别设计特异性引物、探针, 并通过 NCBI 数据库进行了

表 1 多重荧光定量 PCR 引物和荧光探针核酸序列

Tab 1 Multiplex fluorescence quantitative PCR primers and nucleic acid sequence of florescent probe

病毒类型	引物和荧光探针	序列	PCR 产物(bp)
RV	上游引物	5'-ACCTCCAGTACACGTTGTA-3'	156
	上游引物	5'-CAAGTTCCGAACACATTTTCG-3'	
	荧光探针	5'-FAM-ATCACTCAATGTCGACAA-BHQ1-3'	
AdV	上游引物	5'-GCATCAACATGATCGGTCA-3'	133
	上游引物	5'-CACGTAGATGCACTGTCTT-3'	
	荧光探针	5'-CY5-CACTCATCAGTGCACCTC-BHQ2-3'	
NV	上游引物	5'-CGCATACGAGATTCAATGA-3'	189
	上游引物	5'-ATGCGTCACTCGAGGCCAC-3'	
	荧光探针	5'-HEX-CAAGCCATGGAGCGATGC-BHQ1-3'	
AstV	上游引物	5'-ACCATCTGCTGAAGTCACC-3'	171
	上游引物	5'-CGCTGTGCAACTGACCATG-3'	
	荧光探针	5'-ROX-CTCTGCAGTACAACAACG-BHQ2-3'	

注: RV: 轮状病毒; AdV: 腺病毒; NV: 诺如病毒; AstV: 星状病毒

Blast 同源性比对。引物、探针由 Invitrogen 上海英骏生物技术公司负责合成 (表 1)。

1.3.3 多重荧光定量 PCR 扩增体系及反应条件优化 为使 PCR 达到最高的扩增效率和检测灵敏度, 分别对反应体系中引物、探针、扩增模板、离子浓度以及反应条件进行优化。采用 25 μL PCR 反应扩增体系: PCR 反应缓冲液 12.5 μL , 引物探针混合液 (包含 4 种病毒的特异性引物和相应荧光探针, 引物探针的比例为 1:1) 5 μL , TaqHS0.5 μL , RT Enzyme Mix 0.5 μL , 模板 5 μL , DEPC 水补足至 25 μL 。优化后的反应循环条件: $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 min, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 3 min; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 s, $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, 40 个循环。

1.3.4 多重荧光定量 PCR 特异性检测 分别以 RV、AdV、NV、AstV 以及柯萨奇病毒 B1 型、柯萨奇病毒 B2 型、呼吸道合胞病毒、博卡病毒的核酸为模板, 同时以 DEPC 水为阴性对照进行检测, 以验证本实验方法的特异性。

1.3.5 多重荧光定量 PCR 灵敏度检测 分别将 RV、AdV、NV、AstV 的标准品按 10 倍梯度稀释成 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、 10^1 、 10^0 拷贝/ μL , 进行多重荧光定量 PCR 检测, 重复 3 次, 评价本实验方法的灵敏度。

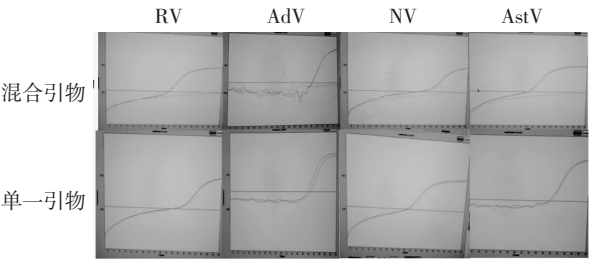
1.3.6 多重荧光定量 PCR 重复性评价 分别将 RV、AdV、NV、AstV 的标准品按 10 倍梯度稀释成 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、 10^1 拷贝/ μL , 对每一个浓度的样本作 6 次重复检测, 分别计算 CT 平均值、标准差及变异系数, 观察本方法的重复性。

1.3.7 临床样品的检测 利用所建立的实验方法和胶体金法对所提取的 150 份临床标本进行平行检测, 比较两种检测方法的检出率, 同时随机选取 20 份病毒阳性标本进行测序检测。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计学软件进行数据分析,计数资料率的比较采用四格表资料的 χ^2 检验,相应病毒检测结果的 Ct 值之间的比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 方法特异性 RV、AdV、NV、AstV 4 种病毒分别在单一引物或者 4 种混合引物的条件下都出现特异的扩增曲线,而其他病毒以及阴性对照均未检测到荧光信号,说明所建立的多重荧光定量 PCR 方法具有高度的特异性(图 1)。



注:RV:轮状病毒;AdV:腺病毒;NV:诺如病毒;AstV:星状病毒

图 1 多重荧光定量 PCR 扩增曲线

Fig 1 Multiplex fluorescence quantitative PCR amplification curve

表 2 病毒不同浓度多重荧光 PCR 检测结果

Tab 2 Detection results of multiplex fluorescence quantitative PCR with different concentrations of virus

模板拷贝	RV			AdV			NV			AstV		
	CT 均数	标准差	CV(%)	CT 均数	标准差	CV(%)	CT 均数	标准差	CV(%)	CT 均数	标准差	CV(%)
10 ⁶	20.456	0.112	0.55	20.355	0.146	0.72	20.116	0.112	0.56	20.733	0.103	0.49
10 ⁵	23.735	0.222	0.93	23.487	0.151	0.64	23.365	0.125	0.53	23.456	0.131	0.56
10 ⁴	26.861	0.136	0.51	26.893	0.211	0.78	26.875	0.204	0.76	26.385	0.196	0.74
10 ³	29.845	0.163	0.55	30.229	0.212	0.70	29.566	0.187	0.63	30.475	0.247	0.81
10 ²	32.796	0.271	0.82	33.584	0.301	0.89	32.336	0.245	0.76	33.961	0.127	0.37
10 ¹	35.762	0.237	0.66	36.512	0.205	0.56	35.174	0.235	0.67	36.451	0.324	0.89

注:RV:轮状病毒;AdV:腺病毒;NV:诺如病毒;AstV:星状病毒

2.4 临床标本检测 对采集 150 例粪便标本提取核酸,采用多重荧光定量 PCR 进行检测,共检测到肠道病毒 54 例,检出的阳性率为 36.00%。其中, RV 19 例,阳性率为 12.67%;AdV 9 例,阳性率为 6.00%; NV 20 例,阳性率为 13.33%;AstV 6 例,阳性率为 4.00%; 胶体金法共检测到肠道病毒 58 例,检出的阳性率为 38.67%。其中, RV 23 例,阳性率为 15.33%;AdV 9 例, 阳性率为 6.00%; NV 21 例,阳性率为 14.00%;AstV 6 例,阳性率为 4.00%,均未发现有两种或多种病毒感染的情况。两种检测方法比较差异无统计学意义 ($\chi^2=6.91, P>0.05$)。对扩增后的目的条带进行测序, 并进行 BLAST 比对,肠道 RV、AdV、NV、AstV 与已知的病毒株基因都具有高度同源性(表 3)。

2.2 方法灵敏度 将不同稀释度的 RV、AdV、NV、 AstV 按上述方法进行检测,结果 4 种病毒在(1~6) 10⁷、10⁶、10⁵、10⁴、10³、10² 拷贝/μL 均可出现荧光增幅,而在 10¹、10⁰ 拷贝/μL 没有检测到荧光增幅,因此,本研究所建立的荧光定量 PCR 能检测的下限可达到 10² 拷贝/μL(图 2)。

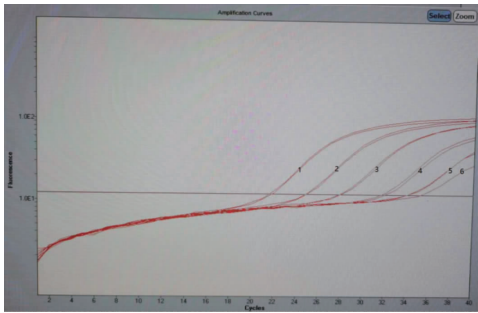


图 2 多重荧光定量 PCR 灵敏度结果

Fig 2 Sensitivity results of multiplex fluorescent quantitative PCR

2.3 方法重复性 病毒不同浓度多重荧光 PCR 检测结果可见,不同病毒核酸浓度各自的检测 Ct 值标准差均较小,变异系数均低于 1.0%,表明检测体系具有较好的重复性(表 2)。

表 3 急性腹泻患儿致病病毒的发生率[n(%)]

Tab 3 Incidence of causative viruses among infants with acute diarrhea[n(%)]

病毒	多重荧光定量 PCR	胶体金
未检测的病毒	96(64.00)	92(61.33)
检出的病毒	54(36.00)	58(38.67)
RV	19(12.66)	22(14.67)
AdV	9(6.00)	9(6.00)
NV	20(13.33)	21(14.00)
AstV	6(4.00)	6(4.00)

注:RV:轮状病毒;AdV:腺病毒;NV:诺如病毒;AstV:星状病毒; $\chi^2=6.91, P > 0.05$

3 讨论

病毒性腹泻是儿科的常见病、多发病,其发病

率仅次于儿童呼吸道感染,若不及时救治,极易引起机体的水与电解质代谢紊乱,严重者甚至可以导致死亡。RV、AdV、NV 和 AstV 是引起病毒性腹泻的最主要致病因子,它们主要通过粪-口途径引起机体感染,常见的传播途径为食用被污染的食品、水及生活接触,从而导致更多人感染以及疾病的爆发流行^[6-7]。为防止病原更大规模扩散,在短时间内采用快速简便的检测方法做出病原学准确诊断,从而阻断病原传播对婴幼儿腹泻的治疗方案及治疗药物的选择都具有非常重要意义。目前诊断腹泻病毒的方法主要有电镜直接观察形态、病毒细胞内培养、核酸分子杂交、酶联免疫检测以及胶体金技术检测,但这些检测方法的各自检测缺陷限制了它们在临床上的广泛应用。例如:电镜法对检测仪器和实验技术条件要求较高;病毒分离培养法操作繁琐、周期长;核酸杂交法和酶联免疫法灵敏度较低;而胶体金技术由于抗原抗体的非特异性结合容易出现假阳性^[8]。荧光定量 RT-PCR 技术是采用荧光信号探针与实时定量检测相结合的一种高灵敏度、高特异性的核酸检测新技术,且操作简单,检测时间短,反应产物无需处理,避免了产物交叉污染的可能^[9-10]。多重荧光定量 PCR 同时使用多条引物在一个反应管中进行多种核酸的扩增,从而实现多重病原体的同步检测,因此更具有应用价值^[11-12]。目前多重荧光定量 PCR 已被广泛运用于临床诊断、基础科研、疾病研究及药物开发等领域,该技术是目前分子诊断领域发展最快、应用最多的分子诊断技术,由于其检测的高特异性使得该技术在病原学检测方面更是发挥了不可替代的重要作用^[13-17]。

本文所建立的多重荧光定量 PCR 技术,经过对反应体系优化,其检测灵敏度可达到 10^2 拷贝/ μ L,检测灵敏度较高;同一稀释度重复 6 次 CT 值的标准差和变异系数都较小,表明所建立的反应体系具有很好的重复性,可以进行可靠、稳定的检测。通过对 RV、AdV、NV、AstV 以及柯萨奇病毒 B1 型、柯萨奇病毒 B2 型、呼吸道合胞病毒、博卡病毒等多种病毒的检测,只有 RV、AdV、NV、AstV 分别呈现特异的扩增曲线,其他病毒均无扩增曲线,也无交叉反应,特异性达到 100%。本研究中,多重荧光定量 PCR 技术检测出肠道病毒 54 例,检出率为 36.00%,在 31.5%~59% 的范围内,与相关研究大致相似^[18-19],传统的胶体金方法检出 58 例,检出率为 38.67%,两种方法比较差别无统计学意义。RV、AdV、NV、AstV 的检出率分别为 12.67%、6.00%、13.33% 和 4.00%,与相关文献报道基本一致^[20-23]。

本研究所建立的多重荧光定量 PCR 所设计探针的荧光基团分别选用了 FAM、CY5、HEX 及 ROX,这 4 种荧光基团的峰值在光谱上相隔较远,重叠较少,可以更加有效的避免各种荧光探针之间的互相干扰,有利于荧光定量 PCR 仪对荧光信号进行识别和区分,并对荧光信号进行准确分析,确保能检测到独立的信号。猝灭基团选取 BHQ 系列,由于它们本身不发射荧光而且吸收光谱范围广,所以可以有效地降低荧光本底,进一步提高检测方法灵敏度。随机选取的 RV、AdV、NV、AstV 病毒检测阳性样本的测序结果与荧光定量 PCR 方法完全一致,进一步验证了所建立的多重荧光定量 PCR 的准确性。

本研究所建立的多重荧光定量 PCR 方法快速、特异、灵敏,可以作为临床病原诊断的一个重要工具且适用于流行病学调查研究。

参考文献:

- [1] Liu L, Johnson H L, Cousens S, et al. Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000[J]. *Lancet*, 2012, 379(9832): 2151
- [2] Mladenova Z, Steyer A, Steyer A F, et al. Aetiology of acute paediatric gastroenteritis in Bulgaria during summer months: prevalence of viral infections[J]. *J Med Microbiol*, 2015, 64(3): 272
- [3] Parashar U D, Hummelman E G, Bresee J S, et al. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children[J]. *Emerg Infect Dis*, 2003, 9(5): 565
- [4] 刘志华, 龚四堂, 钟家禹, 等. 婴幼儿病毒性腹泻 985 例粪便标本分析研究[J]. *中国实用儿科杂志*, 2010, 25(8): 618
- [5] 金玉. 儿童病毒性腹泻临床特点及变化趋势[J]. *中国实用儿科杂志*, 2012, 27(8): 578
- [6] Van M N, Wessels E, De Brouwer C S, et al. Diagnosis of viral gastroenteritis by simultaneous detection of Adenovirus group F, Astrovirus, Rotavirus group A, Norovirus genogroups I and II, and Sapovirus in two internally controlled multiplex real-time PCR assays[J]. *J Clin Virol*, 2010, 9(3): 205
- [7] Thornton A C, Jennings-Conklin K S, McCormick M I. Noroviruses: agents in outbreaks of acute gastroenteritis[J]. *Disaster Manag Response*, 2004, 2(1): 4
- [8] 韩悦, 安淑一, 王作龑, 等. 腹泻病毒检测方法的研究进展[J]. *中国卫生检验杂志*, 2007, 17(7): 1323
- [9] Kageyama T, Kojima S, Shinohara M, et al. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR[J]. *J Clin Microbiol*, 2003, 41(4): 1548
- [10] Bennett S, Gunson R N. The development of a multiplex real-time RT-PCR for the detection of adenovirus, astrovirus, rotavirus and sapovirus from stool samples[J]. *J Virol Methods*, 2017, 242(242): 30
- [11] Osterback R, Tevaluoto T, Ylinen T, et al. Simultaneous detection and differentiation of human rhino- and enteroviruses in clinical specimens by real-time PCR with locked nucleic Acid probes[J]. *J Clin Microbiol*, 2013, 51(12): 3960

- [12] Abbasian F,Tabatabaie H,Sarijloo M,et al. A comparative analysis of routine techniques:reverse transcriptase polymerase chain reaction(RT-PCR) and five cell lines for detection of enteroviruses in stool specimens[J]. Iran J Microbiol,2011,3(2):75
- [13] Zhou G,Chiu D,Qin D,et al. The establishment of the duplex real-time RT-PCR assay for the detection of CD44v6 in pancreatic cancer patients and clinical application[J]. Biotechnol Appl Biochem,2012,59(1):55
- [14] Sun Y,Liang M,Qu J,et al. Early diagnosis of novel SFTS bun-yavirus infection by quantitative real-time RT-PCR assay[J]. J Clin Virol,2012,53(1):48
- [15] Rönkkö E,Ikonen N,Kontio M,et al. Validation and diagnostic application of NS and HA gene-specific real-time reverse transcription-PCR assays for detection of 2009 pandemic influenza A(H1N1) viruses in clinical specimens[J]. J Clin Microbiol,2011,49(5):2009
- [16] Yan J,Yuan F,Long G,et al. Selection of reference genes for quantitative real-time RT-PCR analysis in citrus[J]. Mol Biol Rep,2012,39(2):1831
- [17] Gimeno J,Eattock N, Van Deynze A,et al. Selection and validation of reference genes for gene expression analysis in switchgrass (*Panicum virgatum*) using quantitative real-time RT-PCR[J]. PLoS One,2014,9(3):e91474
- [18] Amaral MS,Estevam GK,Penatti M,et al. The prevalence of norovirus, astrovirus and adenovirus infections among hospitalised children with acute gastroenteritis in Porto Velho, state of Rondônia, western Brazilian Amazon[J]. Mem Inst Oswaldo Cruz,2015,110(2):215
- [19] Seo S Y, In A J, Ji H K, et al. Prevalence of viruses with diarrhea among hospitalized children West gyeonggi province[J]. Korean J Pediatr Inf Dis,2012,19(1):28
- [20] 吉彦莉,王永全,杨青俊,等. 北京地区婴幼儿急性腹泻病例5种腹泻相关病毒感染状况[J]. 公共卫生与预防医学,2017,28(5):42
- [21] 焦洋,高艳,齐啸,等. 2017年北京市朝阳区婴幼儿腹泻病毒多病原监测结果分析[J]. 国际检验医学杂志,2018,39(18):2283
- [22] Jin H I, Lee Y M, Choi Y J, et al. Recent viral pathogen in acute gastroenteritis: a retrospective study at a tertiary hospital for 1 year[J]. Korean J Pediatr,2016,59(3):120
- [23] Fa Q E, De Hoog M L, Schuurman R, et al. Community burden and transmission of acute gastroenteritis caused by norovirus and rotavirus in the Netherlands (RotaFam): a prospective household-based cohort study[J]. Lancet Infect Dis,2020,20(5):598

(2020-07-16 收稿)

·网上快讯·

1.N-末端脑钠肽前体与糖尿病及糖尿病相关并发症呈负相关

循环N-末端脑钠肽前体(NT-proBNP)是心肌细胞应对容量和压力负荷、促进血管舒张及尿钠排泄而释放的脑利钠肽无活性的氨基末端片段,是经典的急性心力衰竭及左心室功能紊乱的标志物。女性NT-proBNP水平高于男性。欧洲癌症与营养前瞻性调查(EPIC)-波茨坦队列研究旨在探讨饮食与肿瘤及其他慢性疾病的关系,共包括健康受试者27548名(16644名女性,10904名男性)。研究者在EPIC-波茨坦队列研究中进行了一个分支研究,探讨初始健康者在发生糖尿病后NT-proBNP水平与糖尿病微血管及大血管并发症之间的关系,包括一个随机亚组队列($n=1294$ 名)、649例2型糖尿病患者及478例心血管疾病患者。对545例2型糖尿病患者进行随访,发生微血管疾病者133例、大血管疾病者50例。检测所有初始健康者基线血浆NT-proBNP水平。结果发现,年龄大、女性、体重指数及每日饮酒量较低的受试者NT-proBNP水平较高。在多变量模型中,NT-proBNP水平与2型糖尿病的发生呈线性负相关($HR=0.91,95\%CI:0.86\sim0.98$),NT-proBNP水平每增加两倍,糖尿病风险降低9%,且这种相关性只在女性患者中存在。但是NT-proBNP水平与心血管疾病、心肌梗死或卒中的发生风险没有显著的相关性。在糖尿病患者,NT-proBNP与糖尿病并发症($HR=1.31,95\%CI:1.13\sim1.53$)、糖尿病微血管并发症($HR=1.20,95\%CI:1.01\sim1.43$)、糖尿病大血管并发症($HR=1.37,95\%CI:1.03\sim1.83$)均呈正相关。研究者得出结论,NT-proBNP水平与糖尿病风险呈负相关,且在女性中更明显。但是NT-proBNP与随访时发生2型糖尿病患者将来发生血管并发症的风险呈正相关,且独立于年龄、性别、体重指数、生活方式、炎症、心血管代谢生物标志物、性激素。因此,NT-proBNP可能用于监测糖尿病相关微血管并发症、大血管并发症的发生风险,但还需进一步前瞻性研究加以验证。[Birukov A, Eichelmann F, Kuxhaus O, et al. Opposing associations of NT-proBNP with risks of diabetes and diabetes-related complications diabetes care. 2020,43(12):2930-2937.]

本刊编辑部