

血清铜生化对肝豆状核变性的诊断意义

吴君霞, 杨 茜, 薛明月, 刘庆云, 胡纪源

(安徽中医学院神经病学研究所附属医院检验科, 安徽 合肥 230031)

摘要:目的 总结肝豆状核变性(HLD)患者的血清铜生化[血清铜离子(Cu^{2+})、铜氧化酶(SCO)和铜蓝蛋白(CP)]水平,分析其对诊断HLD的价值。**方法** 采用原子吸收光谱法、盐酸对苯二胺比色法和免疫透射比浊法分别测定288例HLD患者和90名正常对照者血清 Cu^{2+} 、SCO和CP水平;对285例血清铜生化水平降低的患者按临床分型(假性硬化型42例、脑内脏混合型49例、肝型138例、Wilson型59例)和年龄(0~10岁、11~20岁、21~30岁和 ≥ 31 岁)分组后对其铜生化结果进行比较。**结果** 288例HLD患者中有3例血清铜生化水平正常,铜生化异常率为98.96%。285例血清铜生化结果降低的HLD患者的血清 Cu^{2+} 、SCO、CP水平分别为(2.46 ± 1.73) $\mu\text{mol/L}$ 、0.027(0.005~0.248)U/L、(55.07 ± 31.87)mg/L,均低于正常对照组[(15.09 ± 2.42) $\mu\text{mol/L}$ 、0.492(0.269~0.798)U/L、(306.37 ± 46.84)mg/L]($P < 0.01$)。HLD患者临床分型中Wilson型的SCO水平明显低于肝型及假性硬化型($P < 0.01$),CP水平明显低于肝型及脑内脏混合型($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$);假性硬化型的血清 Cu^{2+} 高于其他临床型($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$)。0~10岁组的血清 Cu^{2+} 最低, ≥ 31 岁组血清铜生化结果高于其他年龄组。血清 Cu^{2+} 、SCO和CP的受试者工作特征(ROC)曲线下面积(AUC)分别为0.995、0.994和0.996;最佳诊断界值分别是6.34 $\mu\text{mol/L}$ 、0.121 U/L和123.1 mg/L;灵敏度、特异性和误判率均相同,分别为95%、100%和0%。**结论** 血清铜生化检测是诊断HLD最高效、便捷的筛查项目。HLD患者血清铜生化的最佳诊断界值是 $\text{Cu}^{2+} \leq 6.34 \mu\text{mol/L}$ 、 $\text{SCO} \leq 0.121 \text{ U/L}$ 和 $\text{CP} \leq 123.1 \text{ mg/L}$ 。

关键词:铜;铜蓝蛋白;铜氧化酶;肝豆状核变性

Diagnosis significance of serum copper biochemical examination in patients with hepato-lenticular degeneration WU Junxia, YANG Qian, XUE Mingyue, LIU Qingyun, HU Jiyuan. (Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of Institute of Neurology, Anhui College of Traditional Chinese Medicine, Anhui Hefei 230031, China)

Abstract: Objective To investigate the levels of serum copper biochemical examination [copper ion (Cu^{2+}), copper oxidase (SCO) and ceruloplasmin (CP)] in patients with hepato-lenticular degeneration (HLD) and their significance for the diagnosis of HLD. **Methods** By atomic absorption spectrophotometry, hydrochloric acid-p-phenylenediamine colorimetric method and immune turbidimetric method, 288 patients with HLD and 90 healthy controls were measured for serum Cu^{2+} , SCO and CP levels. The 285 patients with decreasing serum copper biochemical examination levels were classified according to clinical types (42 cases of pseudo-sclerosis type, 49 cases of brain-visceral hybrid type, 138 cases of liver type and 59 cases of Wilson type) and the age (under 10 years old group, 11 to 20 years old group, 21 to 30 years old group and ≥ 31 years old group), and the results of serum copper biochemical examination were compared. **Results** In the 288 HLD patients, the results of serum copper biochemical examination of 3 cases were normal, and the abnormality rate was 98.96%. In 285 HLD patients with decreasing levels of serum copper biochemical examination, the serum level of Cu^{2+} was (2.46 ± 1.73) $\mu\text{mol/L}$, the serum level of SCO was 0.027 (0.005-0.248) U/L, and the level of CP was (55.07 ± 31.87)mg/L, which were significantly lower than those in controls [(15.09 ± 2.42) $\mu\text{mol/L}$, 0.492 (0.269-0.798) U/L and (306.37 ± 46.84)mg/L] ($P < 0.01$). The SCO level in Wilson type group was significantly lower than those in the liver type and pseudo-sclerosis type groups ($P < 0.01$), and the CP level was significantly lower than those in the liver type and brain-visceral hybrid type groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The serum Cu^{2+} level in pseudo-sclerosis type group was higher than those in the other clinical type groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The serum Cu^{2+} level was the lowest in under 10 years old group, and the results of serum copper biochemical examination in ≥ 31 years old group were higher than those in the other age groups. The areas under the receiver operating characteristic (ROC) curve (AUC) were 0.995, 0.994 and 0.996, respectively. The optimal cut-off values were 6.34 $\mu\text{mol/L}$, 0.121 U/L and 123.1 mg/L, respectively. The sensitivity, specificity and false identification rate were 95%, 100% and 0%. **Conclusions** Serum copper biochemical examination is the most

convenient screening program for diagnosing HLD. For patients with HLD, the best diagnostic cut-off values are as follows: $\text{Cu}^{2+} \leq 6.34 \mu\text{mol/L}$, $\text{SCO} \leq 0.121 \text{ U/L}$ and $\text{CP} \leq 123.1 \text{ mg/L}$.

Key words: Copper; Ceruloplasmin; Copper oxidase; Hepato-lenticular degeneration

肝豆状核变性(HLD)是一种原发性铜代谢障碍的常染色体隐性遗传性疾病,临床表现差异较大,误诊率较高。HLD 基因突变类型超过 515 种,至少 379 种可能为致病突变^[1]。如此多的突变类型使 HLD 基因诊断较难普遍开展。目前诊断 HLD 主要依靠患者的临床表现和各种辅助检查。辅助检查中肝铜测定是诊断 HLD 的金标准,但其属创伤性检查手段,难以作为常规检查方法^[2];角膜 K-F 环在 HLD 早期阳性率很低;24 h 尿铜检查留取较为不便。为此,我们对 HLD 患者的铜生化[血清铜离子(Cu^{2+})、铜氧化酶(SCO)和铜兰蛋白(CP)]进行分析,以探讨其对 HLD 的诊断意义。

材料和方法

一、对象

选取安徽中医学院神经病学研究所附属医院 2010 年住院的 288 例 HLD 患者,其中男 175 例、女 113 例,年龄 4~56 岁。采用 HLD 分型标准^[3]将 288 例 HLD 分为假性硬化型 42 例、脑内脏混合型 49 例、肝型 138 例、Wilson 型 59 例。选择同期安徽中医学院神经病学研究所附属医院体检健康者 90 名作为正常对照组,其中男 59 名,女 31 名,年龄 3~79 岁,体检时无炎症和病毒感染,血清甲型肝炎抗体、乙型肝炎 7 项、丙型肝炎抗体均阴性。

二、诊断标准

排除其他肝胆疾病,至少符合下述表现中的 3 项:(1)肝病表现;(2)神经系统表现;(3)角膜 K-F 环阳性;(4)排除其他原因的血清 Cu^{2+} 、CP 水平和 SCO 活力低下;(5)驱铜治疗前 24 h 尿 $\text{Cu}^{2+} > 100 \mu\text{g}$ 和(或)青霉胺驱铜试验阳性。

三、样本采集

HLD 组与正常对照组均早晨空腹采集静脉血 5 mL,1 h 内分离血清,当日检测血清 Cu^{2+} 、SCO 和 CP。

四、方法

血清 Cu^{2+} 测定采用原子吸收光谱法,仪器为北京海光仪器公司生产的 GGX-800 型原子吸收分光光度计;血清 CP 测定采用免疫透射比浊法,试剂由浙江伊利康公司生产,仪器为日立 7020 全自动生化分析仪;SCO 采用盐酸对苯二胺比色法^[3],试剂自行配制。

五、统计学方法

采用 SPSS 13.0 软件进行数据分析。 Cu^{2+} 、CP 数据为正态分布,采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,运用 ANOVA 单因素方差分析;SCO 为偏态分布,采用中位数(范围)表示,运用非参数检验的多个独立样本检验进行分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

结 果

一、血清 Cu^{2+} 、SCO 和 CP 之间的相关性分析

3 个项目之间均呈正相关。 Cu^{2+} 与 SCO 的相关系数(r)=0.57($P < 0.01$),与 CP 的 r =0.556($P < 0.01$);SCO 与 CP 的 r =0.81($P < 0.01$)。

二、HLD 组和正常对照组血清铜生化结果比较

HLD 组及正常对照组男、女之间血清铜生化结果差异无统计学意义($P > 0.05$)。

288 例 HLD 患者中有 3 例(2 例为肝型、1 例为 Wilson 型)血清铜生化结果正常;其余 285 例患者血清铜生化结果均降低,异常率为 98.96%。285 例血清铜生化降低的 HLD 患者血清 Cu^{2+} 、SCO 和 CP 水平均明显低于正常对照组($P < 0.01$)。见表 1。

三、285 例血清铜生化降低的 HLD 患者各临床分型的血清铜生化结果

假性硬化型 HLD 患者的血清 Cu^{2+} 水平明显高于脑内脏混合型、肝型和 Wilson 型($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$);Wilson 型 HLD 患者血清 SCO 水平明显低于肝型及假性硬化型($P < 0.01$),CP 水平明显低于肝型及脑内脏混合型($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$)。见表 2。

表 1 285 例血清铜生化降低的 HLD 患者及正常对照组铜生化结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	Cu^{2+} ($\mu\text{mol/L}$)	SCO(U/L)	CP(mg/L)
HLD 组	285	$2.46 \pm 1.73^*$	0.027(0.005 ~ 0.248)	$55.07 \pm 31.87^*$
正常对照组	90	15.09 ± 2.42	0.492(0.269 ~ 0.798)	306.37 ± 46.84

注:与正常对照组比较,* $P < 0.01$

表 2 285 例血清铜生化降低的 HLD 患者各临床分型血清铜生化结果比较

临床分型	例数	Cu($\mu\text{mol/L}$)	SCO(U/L)	CP(mg/L)
肝型	136	2.11 $\pm$ 1.54 * *	0.028(0.010 ~ 0.165) ^{##}	59.95 $\pm$ 29.37 ^{##}
Wilson 型	58	2.58 $\pm$ 1.61 *	0.022(0.005 ~ 0.102)	43.30 $\pm$ 22.14
脑内脏混合型	49	2.45 $\pm$ 1.36 * *	0.027(0.006 ~ 0.209)	56.55 $\pm$ 32.34 [#]
假性硬化型	42	3.42 $\pm$ 2.40	0.028(0.011 ~ 0.248) ^{##}	53.81 $\pm$ 44.85

注:与假性硬化型比较,* $P<0.05$ 、* * $P<0.01$;与 Wilson 型比较,[#] $P<0.05$ 、^{##} $P<0.01$

四、285 例血清铜生化降低的 HLD 患者按年龄分组后血清铜生化结果比较

0~10 岁组血清 Cu^{2+} 水平明显低于 11~20 岁组、21~30 岁组和 ≥ 31 岁组 ($P<0.05$ 、 $P<0.01$);11~20 岁组血清 Cu^{2+} 水平明显低于 21~

30 岁组和 ≥ 31 岁组 ($P<0.01$),而 21~30 岁与 ≥ 31 岁组之间差异无统计学意义 ($P>0.05$)。 ≥ 31 岁组 SCO 和 CP 水平明显高于其他年龄组 ($P<0.05$ 、 $P<0.01$),而其他各年龄组之间差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 3。

表 3 285 例血清铜生化异常 HLD 患者不同年龄分组铜生化结果的比较 ($\bar{x} \pm s$)

年龄(岁)	例数	Cu($\mu\text{mol/L}$)	SCO(U/L)	CP(mg/L)
0~10	29	1.50 $\pm$ 0.73	0.027(0.01 ~ 0.098)	53.83 $\pm$ 22.24
11~20	112	2.19 $\pm$ 1.73 *	0.023(0.006 ~ 0.248)	51.23 $\pm$ 29.47
21~30	107	2.79 $\pm$ 1.83 * **	0.027(0.005 ~ 0.209)	53.34 $\pm$ 32.79
≥ 31	37	3.05 $\pm$ 1.58 * **	0.039(0.009 ~ 0.165) ^{*#Δ}	72.67 $\pm$ 37.56 ^{*#Δ}

注:与 0~10 岁组比较,* $P<0.05$ 、* * $P<0.01$;与 11~20 岁组比较,[#] $P<0.01$;与 ≥ 21 ~30 岁组比较, $\Delta P<0.01$

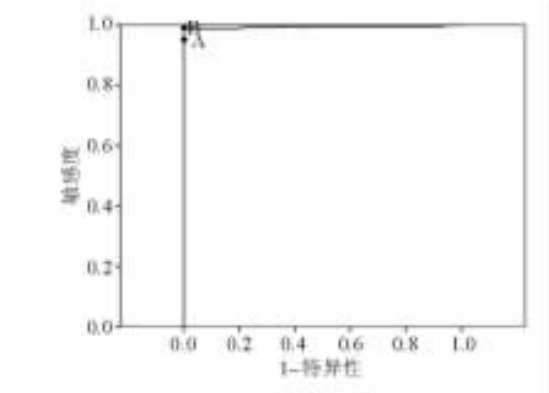
五、血清铜生化诊断 HLD 的受试者工作特征 (ROC) 曲线分析

血清 Cu^{2+} 、SCO 和 CP 诊断 HLD 的 ROC 曲线下面积 (AUC) 分别为 0.995、0.994 和 0.996;最佳诊断界值分别为 6.34 $\mu\text{mol/L}$ 、0.121 U/L 和 123.1 mg/L;灵敏度、特异性和误判率均相同,分别为 95%、100% 和 0%。见表 4、图 1~3。

表 4 血清铜生化诊断 HLD 的 ROC 分析

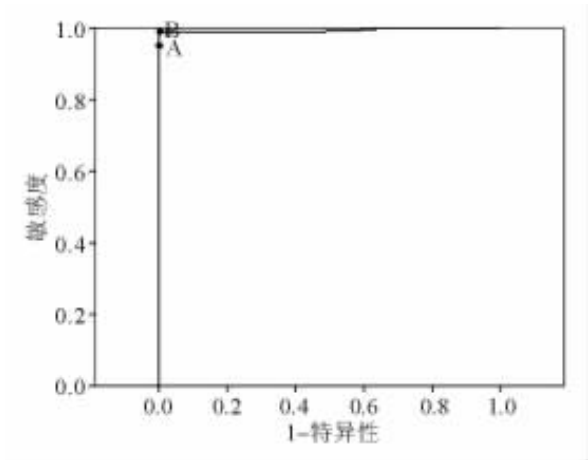
项目	界值 1 (0.99,0)	最佳诊断界值 (0.95,0)	AUC
Cu($\mu\text{mol/L}$)	9.98	6.34	0.995
SCO(U/L)	0.258	0.121	0.994
CP(mg/L)	209.0	123.1	0.996

注:0.99、0.95 为纵坐标,即灵敏度;0 为横坐标,即误判率



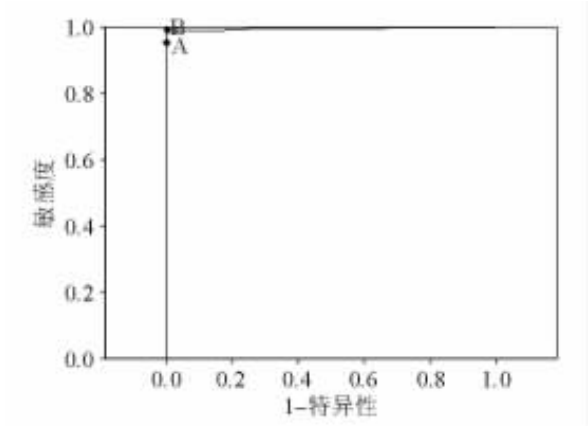
注:◆A 为最佳诊断界值;◆B 为界值 1

图 1 血清 Cu^{2+} 的 ROC 曲线
万方数据



注:◆A 为最佳诊断界值;◆B 为界值 1

图 2 SCO 的 ROC 曲线



注:◆A 为最佳诊断界值;◆B 为界值 1

图 3 CP 的 ROC 曲线

讨 论

HLD 是目前少数可以治疗的几种遗传病之一,其致病机制是 ATP7B 酶的功能缺陷,使饮食吸收的铜不能经胆道正常排出,导致铜在肝脏、中枢神经系统及肾脏等脏器的大量沉积造成多脏器功能损害。CP 降低是诊断 HLD 最早和最常用的指标。CP 的前体在肝脏合成后,必须在 ATP7B 酶的作用下与 Cu^{2+} 结合形成全 CP 才能完成其功能。每个全 CP 分子与 6 个 Cu^{2+} 结合,然后释放入血液,其含铜量占血浆总铜量的 90% ~ 95%,是血浆中 Cu^{2+} 的主要结合形式。

CP 具有氧化酶活性又称 SCO^[4]。本研究中西 SCO 测定即检测 CP 酶的活性,CP 测定即测定 CP 的含量。国外报道^[5]有 10% 的 HLD 患者 CP 正常,但本研究 288 例确诊病例中只有 3 例正常,可能与目前诊断 HLD 比较依赖铜生化指标有关,使一些铜生化正常的 HLD 患者被漏诊。CP 正常的 HLD 患者可能是该蛋白功能异常^[6]。

本研究显示铜生化结果异常的 HLD 组血清 Cu^{2+} 、CP 和 SCO 显著低于正常对照组;不同临床型 HLD 患者铜生化结果显示 Wilson 型的 CP 和 SCO 低于其他临床型,假性硬化型的血清 Cu^{2+} 高于其他临床型。HLD 患者不同年龄分组中 0 ~ 10 岁组的血清 Cu^{2+} 最低,≥31 岁组铜生化结果高于其他年龄组,这可能与其基因突变类型有关,具体机制有待于进一步研究。

本研究中血清 Cu^{2+} 、CP 和 SCO 的 AUC 分别为 0.995、0.994 和 0.996,表明铜生化检测项目对 HLD 的诊断效果很高。有研究报道认为 CP < 80 mg/L 可作为诊断 HLD 的诊断指标^[7]。CP 是急性时相反应蛋白,在肝功能异常、肝硬化、肝炎和肾病综合症等时亦可降低,是一种非特异性的降低,在治疗后有升高和恢复的趋势,而 HLD 患者 CP 水平在治疗前后变化不大^[8]。因此,为避免误诊,将铜生化诊断 HLD 的最佳诊断界限定为

$\text{Cu}^{2+} \leq 6.34 \mu\text{mol/L}$ 、 $\text{SCO} \leq 0.121 \text{ U/L}$ 和 $\text{CP} \leq 123.1 \text{ mg/L}$,3 个项目的灵敏度和特异性均相同,分别为 95% 和 100%。

HLD 好发于儿童和青少年,我国发病率高于西方国家,临床表现多样,早期确诊至关重要,可以降低其致残率和死亡率。本研究显示血清铜生化指标 3 项结果呈正相关,对 HLD 诊断的效率高。联合检查 3 项指标可以避免因单独检测 CP 可能出现误差而导致的误诊和漏诊,使 HLD 患者早诊断、早治疗。

参 考 文 献

- [1] 杨华荣,宋 治,邓 昊. 肝豆状核变性的遗传学研究进展[J]. 国际遗传学杂志,2009,32(6):444-448.
- [2] Roberts EA, Schilsky ML, American Association for Study of Liver Diseases (AASLD). Diagnosis and treatment of Wilson disease: an update [J]. Hepatology, 2008, 47(6):2089-2111.
- [3] 杨任民. 肝豆状核变性[M]. 合肥:安徽科技出版社,1995:77-205.
- [4] 郭云良,郭宗君,郑建忠,等. 神经病学实验技术[M]. 西安:第四军医大学出版社,2005:78.
- [5] Brewer GJ. Recognition, diagnosis, and management of Wilson's Disease [J]. Proc Soc Exp Biol Med, 2000, 223(1):39-46.
- [6] Forbes JR, Cox DW. Copper-dependent trafficking of Wilson disease mutant ATP7B proteins [J]. Hum Mol Genet, 2000, 9(13):1927-1935.
- [7] 黄 丽,李洵桦,梁秀龄,等. 各种辅助检查对肝豆状核变性的诊断价值[J]. 临床神经病学杂志, 2006, 19(1):8-11.
- [8] 陈 珏,冯子敬,薛启缙,等. 血清铜蓝蛋白氧化酶活性检测及其结果分析[J]. 中国临床神经科学, 2006, 14(6):625-628.

(收稿日期:2012-02-06)

(本文编辑:龚晓霖)