

微透析技术在生化物质监测中的应用

周静超 刘春生 刘德鼎 王 英 张睢扬 王 丹

摘 要 微透析技术(microdialysis)是一种微创并可连续在线动态监测活体内完整细胞间液物质如生化物质的方法,可从分子水平研究疾病靶组织内有关物质的变化。应用微透析研究不同疾病下生化物质的规律性变化,为疾病的预防、诊断、治疗及预后提供大量重要信息。近年来,微透析技术越来越多应用于各类疾病的监测,为临床提供了一种全新的监测和治疗手段。本文就微透析技术监测不同生化物质在疾病治疗方面的应用做一综述。

关键词 微透析技术 临床监测 生化物质 治疗及预后

中图分类号 R575

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.04.043

患者病情的变化导致其靶组织及血液中能量代谢产物、兴奋性氨基酸等生化物质发生着瞬时变化,远早于临床症状的出现,因此,其信息对临床治疗有重要的价值,但临床监测存在难度。为解决这一问题,近10年来微透析技术被引入,可提供连续动态的大量数据,尤其适于深部组织和重要器官的活体生化研究,为临床提供了一种全新的监测手段^[1]。

一、能量代谢产物

能量代谢产物包括乳酸、丙酮酸、葡萄糖及乳酸/丙酮酸,是脑、肝、肾等器官缺血缺氧损伤的重要指标,微透析监测肝肾移植及脑部疾病中能量代谢产物的微观动态变化,指导医师做出及时的判断,在症状出现前采取紧急预防措施。

Kannerup等^[2]用微透析监测猪肝脏在缺血预适应后局部热缺血-再灌注过程中的代谢变化,结果表明局部缺血时乳酸/丙酮酸和葡萄糖显著升高,再灌注开始时下降;局部缺血期间乳酸水平显著升高,并在再灌注期间剧烈下降。卢剑等^[3]采用微透析研究16只白兔缺血再灌注损伤时肾皮质乳酸浓度变化的规律,结果显示缺血期和再灌注期分别较自身正常灌注期平均升高241.8%和131.4%。实验组内正常灌注期与缺血期肾皮质乳酸浓度差异有统计学意义($P < 0.001$)。因此,在肝、肾移植中,可通过乳酸及乳酸/丙酮酸比值判断肝局部缺血程度及再灌注效果,

确定缺血缺氧是否被有效纠正及复苏时组织器官的灌注是否充分,从而合理地控制再灌注时间和灌注量。

Fonouni等^[4]应用微透析对肾移植期间肾的代谢产物进行早期监测,结果显示肾在6h的冷缺血时间段后,葡萄糖水平显著降低,乳酸水平在冷缺血时降至最低值($0.35 \pm 0.08 \text{ mmol/L}$),再灌注后,乳酸值显著升高,而在热缺血期间,丙酮酸浓度增加,一直持续到热缺血结束。在肾移植期间可通过保证葡萄糖、乳酸、丙酮酸浓度保持在正常水平来确定合适的储存时间。

张小梅等^[5]利用9只家犬制作轻度和重度脑损伤模型进行微透析监测。结果显示犬脑损伤后葡萄糖含量降低,伤后5.5、6h变化最显著($P < 0.01$),之后缓慢上升;乳酸含量在伤后出现与葡萄糖相反的变化,伤后5.5h上升至最高值($P < 0.05$);重度组尤为甚。因此,可应用微透析监测脑损伤后ECF中葡萄糖和乳酸含量的变化,可作为判断伤情和预后的重要生化指标。

二、神经递质

1. 氨基酸类神经递质:氨基酸是一种重要的神经递质,可反映脑组织损伤及其他组织缺血缺氧情况。微透析动态监测靶组织氨基酸的变化,可对病情进行及时有效的诊断及预后。Mellergard等^[6]采用微透析在69例严重外伤性脑损伤(TBI)患者中研究表明,最年老组(≥ 65 岁)透析液中谷氨酸浓度显著高于较年轻组(25~44岁),谷氨酸浓度从 15.8 mmol/L 增加到 92.2 mmol/L ($P = 0.000$)。谷氨酸浓度增长在一定程度上说明年长患者脑损伤更广泛,因此对年长患者需要更加谨慎地治疗。Silva等^[7]用微透析监测缺

基金项目:国家自然科学基金(青年科学基金)资助项目(81301662);中国博士后科学基金会基金资助项目(2013M532151)

作者单位:100088 北京,中国人民解放军第二炮兵总医院(周静超、刘春生、王英、张睢扬、王丹);450000 郑州,中国人民解放军第153中心医院(刘德鼎)

通讯作者:王丹,电子信箱:wdyy_618@sina.com

血-再灌注对移植肝功能的影响,结果显示,术后丙氨酸、谷氨酸、 γ -氨基丁酸、牛磺酸的浓度迅速下降至基线水平,精氨酸浓度在刚灌注时较低,之后升高,19h 之后达到较高水平。在临床可通过微透析监测氨基酸的变化进行肝移植预后。Sun 等^[8]采用微透析在帕金森大鼠模型中探究行为改善时纹状体损伤侧物质变化。研究显示靶组织谷氨酸和乙酰胆碱水平降低,因此谷氨酸和乙酰胆碱异常升高可能是帕金森病产生的一个因素,并且帕金森病患者在发生记忆工作期间右丘脑下核的 GABA 和谷氨酸的百分浓度有显著地下降,与预期的神经节功能异常一致^[9]。因此通过微透析监测神经递质的变化可预测帕金森病发展情况、异常程度及治疗效果。

2. 一氧化氮:一氧化氮(NO)是一种重要的神经递质及自由基,NO 生成增加会产生神经损害,并具有扩血管作用,颅脑损伤区域 NO 水平与病情程度有一定的相关性。陈炼等^[10]应用微透析研究颅脑损伤患者脑细胞间质液中 NO 的变化,结果显示患者病灶半暗带区 NO 浓度明显高于正常脑组织和腹部皮下组织($P < 0.01$)。患者脑组织间质液中的 NO 的含量变化可能与其预后密切相关。肝硬化时机体和内脏血管 NO 产量增加。NO 的增加不仅直接参与肝硬化外周动脉扩张,而且介导外周血管对缩血管物质的低反应性。国内外应用微透析探究 NO 动态变化的研究很少,因此有待于进一步研究推广。

3. 其他类神经递质:刘轶君等^[11]利用微透析监测 12 只椎基底动脉缺血纯白红目豚鼠模型前庭神经内侧核 5-羟色胺(5-HT)的变化,结果表明豚鼠椎基底动脉缺血前庭内侧核 5-HT 基础水平为(22.5 ± 1.6)fmol/10 μ l,椎基底动脉缺血显著地引起前庭内侧核 5-HT 水平的升高,在 10min 后升到最高,达到基础值的 $195\% \pm 19\%$ 后略有下降,在 30min 5-HT 水平降至基础值的 $155\% \pm 24\%$,缺血后 30min 内各测试点与缺血前比较差异有统计学意义($P < 0.05$),因此,前庭神经内侧核 5-HT 的显著性升高可能与椎基底动脉短暂缺血性眩晕的产生有关。Kanamori 等^[12]应用微透析监测电刺激诱导大鼠海马区产生的癫痫发作,微透析对靶组织取样 5h 后,检测到谷氨酰胺降至初始浓度的 $62.0\% \pm 4.4\%$ ($n = 6$),这些变化与癫痫发作活动的频率和强度有关,癫痫发作不能减少谷氨酰胺外流到细胞外液,但是减少了神经元的摄取,维持了增强的谷氨酸引起的癫痫样活动,因此,谷氨酰胺可能是抗癫痫治疗的一个新的靶点。

三、细胞膜降解指标

甘油是细胞膜磷脂降解的终末产物,当组织发生缺血缺氧等损伤时,细胞膜崩解或细胞自溶,使膜屏障和转运功能丧失,产生损害,如脑水肿等。而膜磷脂降解产物甘油可经受损的血脑屏障漏出,在细胞间液中的浓度增加。因此,可通过微透析监测损伤靶组织甘油的变化反映损伤的严重程度及治疗效果。

李爱林等^[13]采用微透析连续监测 53 例重型颅脑损伤患者近损伤区脑细胞间液甘油浓度,结果显示:(1)与中残或重残组比较,植物生存或死亡组患者甘油显著增高($P < 0.05$);与恢复良好组比较,中残或重残甘油显著增高($P < 0.01$)。(2)弥漫性轴索损伤甘油浓度最高,比硬膜外血肿及硬膜下血肿显著增高($P < 0.05$),但与脑挫裂伤患者差异无统计学意义。因此,甘油浓度可以反映原发和继发性脑损伤的严重程度,是细胞膜降解和脑缺血的可靠指标。并且脑损伤中甘油浓度增长具有年龄依赖性,可通过微透析监测损伤区甘油水平来确定重症监护时间^[7]。

Ungerstedt 等^[14]采用肝微透析监测到闭合肝动脉时甘油在 2h 的脉管闭合期间显著升高,并在 3h 的再灌注过程中回到基线水平,因此在肝移植等肝病治疗过程中可应用微透析测定甘油水平监测肝缺血损伤程度或再灌注效果。单可记等^[15]对 12 例患者移植肝术后早期代谢及并发症进行实时连续监测,结果显示,有 5 例术后早期出现移植肝孤立性甘油水平升高,并且移植肝甘油水平与肝酶学(丙氨酸转氨酶、天冬氨酸转氨酶)存在一定相关性。术后早期甘油升高预示移植肝肝细胞受损,而术后早期移植肝出现孤立性甘油升高,预示移植肝早期的排斥反应并发症。

Liu 等^[16]利用 24 个 Fischer344 大鼠建立心肌缺血模型,微透析监测表明甘油在心肌缺血发生时保持高水平($61.89 \pm 46.13 \sim 15.84 \pm 0.85 \mu\text{mol/L}$, $P > 0.05$),而对照组为($12.33 \pm 3.36 \sim 5.52 \pm 0.25 \mu\text{mol/L}$, $P > 0.05$),因此甘油可作为心肌缺血的一个早期预报因子。Keller 等^[17]应用微透析监测肾脏移植前不同贮藏方式:冷藏(4°C)和保温贮藏(37°C)下肾脏甘油的变化,结果表明温暖贮藏组甘油显著增长,达到一个高度稳定的水平。肾冷贮存 80min 后甘油保持低水平,但是在 100min 后出现增长($P = 0.000$),在第 1 个 24h 达到非稳态的最大水平,因此研究表明肾脏对冷缺血比热缺血更耐受,但是需尽量减少冷缺血时间,在冷缺血贮藏及长时间热缺血死亡捐赠的移植肾中,可通过微透析监测来确定

移植的最佳时间。同样微透析对移植 26h 冷缺血肾的 16 只猪监测甘油的浓度变化可为移植延迟及肾脏移植后的血栓形成进行早期预报,为临床医师争取更多的救治时间^[18]。

四、细胞因子

细胞因子与炎症反应有关,组织器官损伤后机体的生理病理变化非常复杂且个体差异大,靶组织中的细胞因子与损伤预后可能存在一定关系。因此,采用微透析测定损伤靶组织中细胞因子的动态变化,在一定程度上能预测患者病情的严重程度,并给予适当的治疗。

Waelgaard 等^[19]利用微透析对肝移植后肝动脉血栓形成和排异进行检测,微透析对 14 个肝移植病人肝瓣中细胞因子[白细胞介素(IL)-6、IL-8,单核细胞趋化因子-1,诱导蛋白(IP)-10]和激活补体(C5a)研究表明,两个发生排异的患者显示 IL-8 和 C5a 选择性的增长,在丙氨酸转氨酶增长前 2~4 天,比起基线水平增长了 10~50 倍,在抗排异治疗开始后快速下降。临床肝移植及术后,可采用微透析监测 IL-8 和 C5a 判断术后排异的发生及评价抗排异治疗效果。

孙强等^[20]利用微透析监测 32 例颅脑损伤患者损伤靶组织的 IL-6 和 IL-8 变化,结果显示重度组患者手术当日和术后第 1 天微透析液 IL-6 和 IL-8 水平与中度组患者比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。重度组和中度组患者 IL-6 水平和 GOS 得分呈正相关($P < 0.05$),而 IL-8 水平和 GOS 得分呈负相关($P < 0.05$),因此,可通过微透析监测颅脑损伤患者 IL-6 和 IL-8 水平进行预后。

五、自由基

自由基是机体氧化反应中产生的有害化合物,可损害机体的组织和细胞,次黄嘌呤、尿酸盐、尿囊素和乙二酰脲能反映脑缺血时的自由基活动。次黄嘌呤作为能量代谢产物,同时又可能是氧自由基产生的重要底物。尤其在缺血再灌注后,会产生大量自由基。Salci 等^[21]在大鼠外伤性脑损伤模型中将微透析探针置入损伤骨周围,探究脑损伤引起的代谢物质变化,研究表明伴随着其他代谢物质的变化,次黄嘌呤在损伤脑区域细胞外液的浓度显著上涨,因此可进一步探究次黄嘌呤与脑损伤及脑缺血的关联性,增强临床评价的准确性。

六、其他-骨桥蛋白、 β 淀粉样蛋白、抗坏血酸

此外,微透析还可用于其他多种物质的监测。

Xu 等^[22]应用微透析联用蛋白组学鉴别乳房肿瘤间隙液中的蛋白质-骨桥蛋白(OPN)。体外测定显示乳房成纤维细胞能分泌 OPN,OPN 过分表达刺激 PyVmT 乳腺癌细胞增殖和分化。研究表明,微透析对乳腺肿瘤微环境中 OPN 进行监测,可在乳腺癌无法确诊时做出可靠的判断,再采取有效的治疗进行干预,增强治疗效果,减少恶化风险。

A β 在 AD 的发病机制中起主要作用,AD 的发病被认为是 A β 由正常的可溶性肽变成不溶性的有害斑块,这个过程可于 AD 发病前 10~20 年即开始^[23]。相应地,发生 A β 病变的大脑区域如皮质和海马区也是认知损害的受损区,认知障碍在 AD 中最易出现。外伤性脑损伤是发展成阿尔茨海默病(AD)的潜在环境因素。微透析监测到损伤后脑损伤间隙牛磺酸和 β 淀粉样蛋白呈现高浓度,预示轴突损伤的存在,有可能引起阿尔茨海默病的发生,因此,应用微透析监测外伤性脑损伤患者损伤靶组织的牛磺酸和 β 淀粉样蛋白质,有助于及早发现诱发阿尔茨海默病的因素,进行必要的干预治疗。

侯小飞等应用微透析研究肾缺血再灌注损伤的兔皮质内抗坏血酸的变化。结果表明缺血期较自身正常灌注期平均升高 31.2%,再灌注期较自身正常灌注期平均升高 23.3%。实验组内缺血期肾皮质抗坏血酸浓度较自身正常灌注期差异有统计学意义($P < 0.05$)。因此,抗坏血酸是反映肾缺血再灌注损伤的一个敏感指标,微透析动态监测抗坏血酸水平可以实时反映肾皮质缺血状态,能进行早期肾皮质缺血预警,提高肾移植的成功率。

微透析技术可深入靶组织,对多种生化物质进行实时、动态监测,联合先进的检测技术为临床提供大量有效的生理病理学信息,从分子水平上反映疾病发展情况,可高效地进行诊断及判定预后。由此可见,微透析作为一种“活体、微创、动态、定量”的取样技术,不仅可以对大多数小分子物质取样,同时通过不断的技术改进,微透析技术还可针对某些大分子物质如蛋白质等取样,可使临床获得最真实准确的靶组织分子学信息,用于指导临床。

参考文献

- 1 谢波,凌家俊,吴秀君,等.微透析技术用于化疗药物吉西他滨体内药动学的初步研究[J].中国临床药理学与治疗学,2010,15(9):1035-1039
- 2 Kannerup AS, Gronbak H, Funch-Jensen P, et al. The influence of preconditioning on metabolic changes in the pig liver before, during, and after warm liver ischemia measured by microdialysis[J]. Hepatology, 2009, 3(1):310-315

- 3 卢剑,林雨青,阎龙涛,等.微透析-电化学法检测缺血再灌注损伤对兔肾皮质乳酸代谢的影响[J].临床泌尿外科杂志,2008,23(11):871-875
- 4 Fonouni H, Esmailzadeh M, Jarahian P, *et al.* Early detection of metabolic changes using microdialysis during and after experimental kidney transplantation in a porcine model[J]. Surg Innov, 2011, 18(4):321-328
- 5 张小梅,衡新华,宋晓斌,等.犬颅脑创伤后局部脑代谢的微透析监测[J].昆明医学院学报,2011,9:7-11
- 6 Mellergard P, Sjogren F, Hillman J. The cerebral extracellular release of glycerol, glutamate, and FGF2 is increased in older patients following severe traumatic brain injury[J]. J Neurotrauma, 2012, 29(1):112-128
- 7 Sliva MA, Richards DA, Bramhall SR, *et al.* A study of the metabolites of ischemia-reperfusion injury and selected amino acids in the liver using microdialysis during transplantation[J]. Transplantation, 2005, 78:828-835
- 8 Sun Z, Jia J, Gong X, *et al.* Inhibition of glutamate and acetylcholine release in behavioral improvement induced by electroacupuncture in parkinsonian rats[J]. Neurosci Lett, 2012, 520(1):32-37
- 9 Buchanan RJ, Darrow DP, Meier KT, *et al.* Changes in GABA and glutamate concentrations during memory tasks in patients with Parkinson's disease undergoing DBS surgery[J]. Front Hum Neurosci, 2014, 8:81
- 10 陈炼,但建新,秦龙,等.颅脑损伤患者脑细胞间液代谢物含量的变化及其临床意义[J].中国临床神经外科杂志,2008,13(3):155-157
- 11 刘轶君,刘妮妮,刘俊秀,等.后循环缺血时前庭神经内侧核 5-羟色胺的变化[J].中国误诊学杂志,2008,8(10):2277-2278
- 12 Kanamori K, Ross BD. Electrographic seizures are significantly reduced by in vivo inhibition of neuronal uptake of extracellular glutamine in rat hippocampus[J]. Epilepsy Res, 2013, 107(1-2):20-36
- 13 李爱林,只达石,黄慧玲,等.重型脑创伤患者脑细胞间液甘油浓

- 度研究[J].中华神经医学杂志,2006,5(1):55-57
- 14 Ungerstedt J, Navak G, Ungerstedt U, *et al.* Microdialysis monitoring of porcine liver metabolism during warm ischemia with arterial and portal clamping[J]. Liver Transpl, 2009, 15(3):280-286
- 15 单可记,许丽君,钱传云,等.肝移植术后早期急性排斥反应的微透析监测[J].昆明医学院学报,2010,6:84-88
- 16 Liu Z, Vuohelainen V, Tarkka M, *et al.* Glutamate release predicts ongoing myocardial ischemia of rat hearts[J]. Scand J Clin Lab Invest, 2010, 70(3):217-224
- 17 Keller AK, Kierulf-Lassen C, Møldrup U, *et al.* Messengers of renal graft quality during warm and cold ischemia: a porcine microdialysis study[J]. Transplant Proc, 2013, 45(3):1172-1177
- 18 Keller AK, Jørgensen TM, Vittrup DM, *et al.* Fast detection of renal ischemia in transplanted kidneys with delayed graft function-an experimental study[J]. Transplantation, 2013, 95(2):275-279
- 19 Waelgaard L, Thorgersen EB, Line PD, *et al.* Microdialysis monitoring of liver grafts by metabolic parameters, cytokine production, and complement activation[J]. Transplantation, 2008, 86(8):1096-1103
- 20 孙强,宋伟健,林文娟,等.微透析技术监测颅脑损伤患者脑白介素 6 和白介素 8 水平对预后的评价意义[J].Chinese General Practice, 2011, 14(2C):616-618
- 21 Salci K, Enblad P, Gojny M, *et al.* Metabolic effects of a late hypotensive insult combined with reduced intracranial compliance following traumatic brain injury in the rat[J]. Ups J Med Sci, 2010, 115(4):221-231
- 22 Xu BJ, Yan WW, Jovanovic BJ, *et al.* Moses. Microdialysis combined with proteomics for protein identification in breast tumor microenvironment in vivo[J]. Cancer Microenvironment, 2011, 4:61-71
- 23 Holtzman DM, Morris JC, Goate AM. Alzheimer's disease: the challenge of the second century[J]. Sci Transl Med, 2011, 3(77):77
(收稿日期:2014-07-21)
(修回日期:2014-08-27)

(上接第 145 页)

参考文献

- 1 Oakes K. Hepatitis B: prevalence and pathophysiology[J]. Nurs Times, 2014, 110(7):12-16
- 2 Blumberg BS, Alter HJ, Visnich S. A "New" Antigen in leukemia sera[J]. JAMA, 1965, 191:541-546
- 3 European Association For The Study Of The Liver. EASL clinical practice guidelines: management of chronic hepatitis B virus infection[J]. J Hepatol, 2012, 57(1):167-185
- 4 科技部“十二五”重大专项联合课题组专家.乙型肝炎病毒相关肝硬化的临床诊断、评估和抗病毒治疗的综合管理[J].临床肝胆病杂志,2014,30(2):99-108
- 5 Trepo C, Chan HL, Lok A. Hepatitis B virus infection[J]. Lancet, 2014, 384(9959):2053-2063
- 6 Liaw YF. Clinical utility of hepatitis B surface antigen quantitation in patients with chronic hepatitis B: a review[J]. Hepatology, 2011, 54(2):E1-9
- 7 Tseng TC, Liu CJ, Yang HC, *et al.* Serum hepatitis B surface antigen levels help predict disease progression in patients with low hepatitis B virus loads[J]. Hepatology, 2013, 57(2):441-450
- 8 Thompson AJ, Nguyen T, Iser D, *et al.* Serum hepatitis B surface an-

- tigen and hepatitis B e antigen titers: disease phase influences correlation with viral load and intrahepatic hepatitis B virus markers[J]. Hepatology, 2010, 51(6):1933-1944
- 9 Jaroszewicz J, Calle Serrano B, Wursthorn K, *et al.* Hepatitis B surface antigen (HBsAg) levels in the natural history of hepatitis B virus (HBV)-infection: a European perspective[J]. J Hepatol, 2010, 52(4):514-522
- 10 Ganji A, Esmailzadeh A, Ghafarzadegan K, *et al.* Correlation between HBsAg quantitative assay results and HBV DNA levels in chronic HBV[J]. Hepat Mon, 2011, 11(5):342-345
- 11 Brunetto MR, Oliveri F, Colombatto P, *et al.* Hepatitis B surface antigen serum levels help to distinguish active from inactive hepatitis B virus genotype D carriers[J]. Gastroenterology, 2010, 139(2):483-490
- 12 Kim YJ, Cho HC, Choi MS, *et al.* The change of the quantitative HBsAg level during the natural course of chronic hepatitis B[J]. Liver Int, 2011, 31(6):817-823
- 13 Tan Z, Li M, Kuang X, *et al.* Clinical implications of hepatitis B surface antigen quantitation in the natural history of chronic hepatitis B virus infection[J]. J Clin Virol, 2014, 59(4):228-234
(收稿日期:2014-08-15)
(修回日期:2014-09-24)