

¹³C呼气试验——诊断和流行病学研究的工具

Klein PD

摘要: 本文简述了¹³C和¹⁴C呼气试验的原理、用途、优点及发展过程。¹³C-尿素呼气试验可以快速无损伤地检测受试者胃及十二指肠是否存在与其炎症、溃疡发病密切相关的幽门弯曲菌感染。因此它可用于抗溃疡病药物疗效的评估,并可在胃部炎症、溃疡及恶性肿瘤的流行病学研究中广泛应用。

首先讲什么是碳同位素呼气试验。这种试验的原理是用¹³C或¹⁴C标记低分子量功能团,这个功能团通过可被酶作用的靶键接在分子上,当这个键被打开时,就会释放出功能团且可在呼气CO₂中检测到标记原子。酶作用于靶键后,标记原子出现于呼气CO₂的速率和量可用来评定酶的功能。同位素呼气试验有两种类型。一种可反映机体本身的分解代谢及体内酶的活性。另一种可反映细菌的酶的存在及非机体固有的分解代谢。

早期用¹⁴C示踪的放射性呼气试验需要密封和使用振荡静电计,做起来既笨重又不方便。当时人们用这种装置来测定脂肪吸收及相关的功能不全。直到¹⁴C的测定用液闪法以后,¹⁴C呼气试验才推广起来。最先进行的是Wagner博士的研究组用三软脂酸甘油酯测定脂肪吸收不良,以后一些日本科学家又用¹⁴C-乳糖来测定乳糖酶的缺乏。常用的甘油三酯标记物有三油酸甘油酯、三软脂酸甘油酯、三硬脂酸甘油酯等。标记的碳原子位于羧基上,当羧基被胰脂酶脂解下来时,即转化为CO₂。在乳糖呼气试验中,二糖键被肠粘膜上的乳糖酶切断,使1位上的碳转化成CO₂。

1971到1973年间,呼气试验的著名论文有,用¹⁴C-甘氨酸测定细菌的过度生长及用¹⁴C-氨基比林测定肝氧化酶的含量等。甘氨酸分子中的肽键可被细菌甘氨酸水解酶水解。如果细菌过度生长,羧基上标记的甘

氨酸就会被水解、氧化生成CO₂。氨基比林分子亚胺母核上连着两个标记的甲基。在酶的作用下,脱下的甲基可快速转变成CO₂。这一过程,可反映肝微粒体酶的功能。

这些年来¹³C、¹⁴C呼气试验的主要进展有3、4个方面。首先,在1976年,我们实验室的研究人员测定了各种情况下的¹³C本底并指出了饮食对¹³C本底的影响。来自不同植物的食物,其所含¹³C的天然丰度不尽相同,这点对于食入¹³C标记底物,而后进行的呼气试验来说很重要。另一个非常重要的进展是实验所使用的真空容器更先进了。它可贮存呼气试验的样品,使气体样品的贮存保质保量并便于运送。必要时,呼气样品可以这种方式保存数周或数月,还可在不同国家的实验室、研究者之间转送。此外,最重要的进展是还可将它们送入自动系统进行CO₂的纯化并测定同位素丰度。这使得我们可以在24小时内测定75~80个样品,而手工操作每小时只能测定1个样品。

¹³C和¹⁴C呼气试验的优点是它们对机体无损伤并广为病人所接受。由于试验简单易行,病人不需住院即可接受这种检查。更重要的是它可提供动力学参数值,据此可以对不同的病情进行解释。¹³C呼气试验还具有一个特殊的优点,就是它可用于任何受试者,包括婴儿、儿童和妇女。它可用来进行正常人的流行病学研究,还可以对同一受试者进行一系列重复测定。由于没有放射性,没有

废物处理的问题， ^{13}C 标记物制成的测试盒可以进口和向国外出口。此外，所有的 ^{14}C 呼气试验都可以用同一类型的 ^{13}C 呼气试验取代。

今天，我还要向诸位介绍一下用于检测幽门弯曲菌的 ^{13}C -尿素呼气试验。它可用于胃及十二指肠炎症、溃疡的诊断、流行病学研究和对治疗效果进行评估。

1979年澳大利亚科学家首先通过CLO试验（一种在活检时进行的快速尿素酶试验——译者注）发现了幽门弯曲菌，并报告了它们的临床特征。1982年Marshall首先成功地从溃疡病人的胃活检样品中分离出幽门弯曲菌，进而通过培养和接种证实这种细菌可以引起胃炎，是存在于胃中的感染源。许多报告表明，这种菌与胃炎、十二指肠溃疡、胃溃疡和一些非溃疡性消化不良密切相关。其革兰氏染色呈阴性且具有很强的氧化酶和尿素酶活性。在抗胃粘液活检银染色时，通过高分辨电镜可见弯曲菌侵入粘液下的粘膜，并且可以看到它们进入胃粘膜绒毛的穿入途径。甚至在没有出现症状的情况下，这种弯曲菌也会出现在发炎的胃粘膜。鉴于幽门弯曲菌可产生哺乳动物和人类细胞不能产生的尿素酶使尿素分解产生氨和 CO_2 ，我的同事Graham博士在此基础上进行了尿素呼气试验。

在进行 ^{13}C -尿素呼气试验时还需抑制胃的排空，准备好250mg尿素以及带口管的呼气试验集气袋。如研究涉及国际间的协作时，还应准备塑料邮筒并将所需物品及程序单固定在箱中。这些物品可寄到离我们很远的地方，如巴林、秘鲁和日本等地并可及时寄回来。

当我们刚开始进行这一试验时，我们在口服示踪物10分钟后开始收集呼气样品。而现在我们发现仅收集实验开始后最初15分钟内的样品即可证实我们的病人是否感染了这一细菌。在对没有幽门弯曲菌感染的病人进

行试验时，试验开始后120分钟内无 $^{13}\text{CO}_2$ 释放出来。我们相信这对大量试验来说是一个标准。当然体内其它有尿素酶的地方也是存在的（如口腔中某些细菌就可生产尿素酶，在试验中需注意避免污染——译者注）。另一方面，阳性个体在试验开始后即开始有 $^{13}\text{CO}_2$ 呼出，而且在整个试验过程中其累积百分回收率稳定上升。呼气中 ^{13}C 的丰度由质谱测定。在阴性个体也可有少量的 $^{13}\text{CO}_2$ 呼出。

我们发现有的个体，每分钟尿素酶可分解0.6mmol尿素或者更多，而且通常与试验中的幽门弯曲菌培养阳性相对应。显然对呼气试验来说，每分钟2.5mmol的水平即已是相当强的阳性了。因此，区分正常人与病人之间的 $^{13}\text{CO}_2$ 释放水平毫无困难，甚至在弯曲菌阳性个体处于轻微阳性时也是一样。

由于各种因素的影响，胃溃疡病人的检出阳性率在70~80%之间。另一方面，十二指肠溃疡也同样与高水平、高百分比的幽门弯曲菌阳性密切相关，而且呼气试验阳性率约达97%。在接受高度选择性迷走神经切断术的病人，甚至溃疡已治愈的11个病人中，有8个人其幽门弯曲菌试验仍然阳性。另外三个阳性病人分别在12、9和3年前进行了高选择性迷走神经切断术。这证明，幽门弯曲菌不是这些病人患溃疡病的唯一因素。

关于幽门弯曲菌的流行病学意义，流行病学家早就注意到了胃炎的发病率随年龄的增长而升高。而胃炎可进一步发展成为萎缩性胃炎进而导致胃癌。通常从胃炎发展到萎缩性胃炎最终引起胃癌需要15~20年的时间。这意味着，在美国约有50%的50岁的人患有胃炎。萎缩性胃炎和胃癌不只是老年人得的疾病，在胃癌高发国家，约50%的30岁的人患有胃的萎缩。因此萎缩性胃炎的发病率与年龄相关很可能与其幽门感染密切相关。我们已测定了350例无症状的受试者，并发现阳性率通常随年龄的增长每年递增1%。这就是说到50岁时将有50%的人感染

这种细菌。感染率随年龄增加而升高,在我们遇到的受试者中,到80岁时其幽门弯曲菌感染的阳性率已达到非常高的水平了。

黑人的幽门弯曲菌感染率明显比白人高。年龄较小时,黑人、白人的感染率相似,但到15~20岁时,已有30%的黑人感染上幽门弯曲菌。目前我们还不知道感染的原因。

在秘鲁的利马,我们也进行了此项研究,这是由于利马的胃癌发病率非常高。通过 ^{13}C 呼气试验的应用,我们甚至对1岁或更小的婴儿进行了测定。在穷孩子中,就连这么小的婴儿的阳性率也几乎达到50%,并从1岁开始持续上升。另一方面,我们的研究表明,富裕儿童的感染率达到30%的年龄要更晚一些。有意思的是我们发现那些由保姆照看的孩子的阳性率普遍比在最初的几个月中由母亲照料的孩子为高。相反,尽管日本每年胃癌的发病率更高,但在日本的青年中,18~24岁年龄组阳性率并不比休士顿相应年龄组的高,而大致相同。这说明在日本人口中另有胃癌的易感因素。

下面谈一下关于用尿素呼气试验检测幽门弯曲菌在寻找对此菌有效疗法方面的应用。到目前为止,免疫学、Elisa(酶联免疫吸附实验)及其它任何一种胃的检测方法,都不能对感染水平的变化作出快速反应。不幸的是对幽门弯曲菌很难根除而且感染又容易复发。受试者在服用抗溃疡药物后,其尿素酶活性均较服药前有所变化。实际上用著名的抗溃疡药甲腈咪呱后,甚至可使尿素酶活性增加。至今发现的唯一有效的抗溃疡药是硝酸氧铋或其它铋剂。用铋剂治疗后也会出现复发现象,这用尿素呼气试验可以反映出来。一个病人在治疗前尿素酶活性为每分钟 2.05mmol ,服铋剂2片、四次/天,一天

后尿素酶活性就已消失。治疗10天后酶活性仍然很低,呼气试验阴性。在铋剂治疗终止14天后,幽门弯曲菌又重新在胃粘膜生长,并且酶活性又达治疗前同样水平。还有一些病人,我们没有给他们非标记的尿素以观察他们幽门弯曲菌感染是否已根治,也不知道他们治疗前的情况。但在用铋剂治疗3天和其中一个病人治疗6周后,他们的呼气试验结果均低于阳性。然后我们开始以每天3次、一次5mg的剂量给病人非标记尿素,发现在开始给尿素2天内,尿素呼气试验的尿素酶水平再次出现强阳性。我们认为这个实验的主要作用是可以检验一个药物事实上是否已根治了感染。

最后我讲几句关于 ^{13}C 同位素的丰度测量问题。因为 ^{13}C 没有放射性,所以只能通过测定它超过天然丰度的值来使用这种示踪剂。目前至少有3、4种不同的测定方法。一类是非医用的设备,地球化学和环境科学实验室经常测定 $^{13}\text{CO}_2$,所花费用相当高,但是,通过协作可以花很少的钱就做到这一点。另一类更贵的方法是用GC/MS系统测定。这涉及到大量的资金花费及一个样品5美元的制备过程。最后还可将 CO_2 转化成其它形式用激光、红外等方法测定。这些方法目前还都未普遍使用的原因可能是所需仪器的资金多在3~9万美元之间。我希望将来 $^{13}\text{CO}_2$ 的测试将变得更便宜一些。

^{13}C 呼气试验安全、特异,它们对酶的变化敏感,在治疗过程中它们可反映对弯曲菌治疗的效果。呼气试验样品便于运送,可在很多不同的国家之间使用。呼气试验的结果反映着疾病的过程。最后我希望大家同意它们是非常有用的方法。

[ISNM'88 Beijing 胡蓓根据论文摘要及录音整理 吴宏 王世真审校]