

◇经验与体会◇

危重症患者血浆 DNA 水平及其对疾病严重程度和预后的预测价值

蔡晓培¹ 张 泓¹,罗庆礼²

摘要 采用实时荧光定量 PCR 技术对 132 例急诊重症监护室(EICU)患者血浆 DNA 水平进行定量检测。根据预后将患者分为存活组(95 例)、死亡组(37 例),分别检测患者入 EICU 后即刻、24 h、48 h 及 1 周血浆 DNA 的量;另选 30 例健康体检者为健康对照组。与健康对照组相比,EICU 患者血浆 DNA 水平明显升高,各时相点血浆 DNA 水平升高差异均有统计学意义($P < 0.05$)。EICU 患者死亡组血浆 DNA 水平高于存活组,其中 24 h、48 h 时相点血浆 DNA 水平升高差异有统计学意义($P < 0.05$)。血浆 DNA 的受试者工作特征曲线(ROC)曲线下面积(AUC)较乳酸及 APACHE II 评分的 AUC 大,其中 48 h 血浆 DNA 的 AUC 最大为 0.847(95% CI 0.648~1.000)。

关键词 外周血血浆 DNA;危重症;预后

中图分类号 R 342.3;R 449

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)09-1339-04

在急危重症的整体救治中,病情评估不仅有助于制定正确的医疗干预方案,而且有助于评价疗效,适时调整治疗方案,故有效的病情评估之于危重症

2014-05-29 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:1208085MH150)

作者单位:¹安徽医科大学第一附属医院急诊科,合肥 230022

²安徽病原生物学省级实验室和人兽共患病安徽省重点实验室,合肥 230032

作者简介:蔡晓培,女,硕士研究生;

张 泓,女,副教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:zhanghong20070703@163.com

管理十分重要,研究评估指标或工具有临床指导意义。近年来,血浆 DNA 水平的定量检测和临床疾病之间关系的研究越来越受到关注。1977 年 Leon et al^[1]首先发现肿瘤患者血液循环中 DNA 水平显著高于健康对照组。血浆 DNA 在一些急性病症如创伤^[2]、心搏骤停^[3]以及急性胰腺炎^[4]中均有所升高,并且经过有效的治疗后血浆 DNA 的水平有所下降,推测定量检测血浆 DNA 的水平或可成为评价疾病严重程度及治疗反映性的新生物标志物。因此,笔者拟进一步研究作为一种微创、快速检测指标,血浆 DNA 能否敏感及特异地反映疾病的危重状态;血浆 DNA 与 ICU 患者死亡率的时效、量效关系;血浆 DNA 是否有助于提高临床对危重症患者病情严重程度的预测能力。

1 材料与方法

1.1 病例资料 收集 2012 年 6 月~2013 年 3 月安徽医科大学第一附属医院急诊重症监护室(emergency intensive care unit, EICU)收住的危重症患者,研究组共入选 132 例患者,其中男 75 例,女 57 例,年龄 18~94 (59 ± 20) 岁,全部病例 24 h APACHE II 评分为 (20 ± 8) 分,平均 EICU 滞留时间为 8.6 d。健康对照组 30 例来自本院体检中心,年龄、性别与研究组匹配。收集临床资料包括:年龄、性别、EICU 滞留时间(d)、原发感染、继发感染、是否行血液净

and spatial resolution of Linac-integrated kV-cone beam CT image with choosing different scanning preset parameters, and analyzed the image variations changed with the tube voltage, tube current, collimator type, gantry scanning range and reconstruction precision. The results showed that improving X-ray tube voltage and current, expending the scanning gantry rotation range and reducing collimator size, increasing reconstruction precision and other imaging parameters were conducive to high quality cone beam CT images. As a result, patients suffered more additional X-ray radiation and X-ray tube and detector components loss increased, simultaneously. Imaging scanning preset parameters should be reasonably chosen according to the patient's anatomy, which can guarantee the image quality and minimize patient radiation dose.

Key words kV cone beam computed tomography; X-ray volume imaging; uniformity; noise; low contrast visibility; spatial resolution

化治疗、是否行机械通气支持、第一天应用血管活性药物情况以及入室后 24 h、48 h、1 周的 APACHE II 评分。收集的实验室检查相关指标包括:第一个 24 h 内最高乳酸(lactate, LAC)值以及降钙素原(procalcitonin, PCT)、白介素-6(interleukin-6, IL-6)最高值和 C-反应蛋白(C-reactive protein, CRP)最高值。并根据患者住院期间的预后不同,将研究组患者分为存活组和死亡组,其中存活组 95 例,死亡组 37 例。本研究获安徽医科大学第一附属医院伦理委员会批准,并与患者或家属签署知情同意书。

1.2 主要试剂与仪器 QIAamp DNA Blood Mini Kit 试剂盒(德国 Qiagen 公司);SYBR[®] Premix Ex TaqTM II 试剂盒(日本 TaKaRa 公司);引物合成由上海生工生物工程(上海)股份有限公司;标准品 Human Genomic DNA(瑞士 Roche 公司);Real-Time quantitative PCR 仪(Corbett Rotor-Gene 3000A)、Rotter 特定的反应板(澳大利亚 Corbett Research 公司);PCR 结果分析软件:Rotor-Gene 6.0.14 Software。

1.3 实验方法

1.3.1 标本采集 依次抽取 132 例 EICU 患者入室即刻($T_{0\text{h}}$)、入室后 24 h($T_{24\text{h}}$)、入室后 48 h($T_{48\text{h}}$)和入室后 1 周($T_{1周}$)的外周静脉血约 5 ml,置于 EDTA 抗凝管中,于 4 ℃ 超高速离心机以 16 000 r/min 离心 10 min,小心转移上清液并分装置于 EP 管中,每管 200 μl 置于 -80 ℃ 冰箱备用。同样的方法采集 30 例健康对照组的外周血浆。

1.3.2 DNA 的提取 按照 QIAamp DNA Blood Mini Kit 试剂盒说明书“blood and body fluid protocol”提取全部 EICU 患者和健康对照组患者血浆 DNA,最后 EP 管中所得的液体即为血浆 DNA,贮存于 -20 ℃ 冰箱备用。所保存的血浆标本均统一集中进行检测,并采用同一批号的试剂盒提取 DNA,以避免批号间误差。

1.3.3 标准曲线的制备 对人类基因组 DNA 进行 10 倍梯度稀释法稀释,稀释后的浓度分别为:1 × 10⁷、1 × 10⁶、1 × 10⁵、1 × 10⁴、1 × 10³ pg/ml,进行标准曲线的制备。

1.3.4 Real-Time Quantitative PCR 技术检测血浆 DNA 以 β-globin 为目的基因,上游引物序列为:5'-GCA CCT GAC TCC TGA GGA GAA-3',下游引物序列为:5'-CAC CAA CTT CAT CCA CGT TCA-3'。依据 SYBR[®] Premix Ex TaqTM II 试剂盒说明书进行反应。所有检测均做复孔,取平均值。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,计量资料以中位数(四分位间距)表示,计数资料以百分比表示,计量资料两组数据间比较采用 Mann-Whitney U 检验,3 组数据间比较采用方差分析,计数资料比较采用 χ^2 检验。受试者工作特征曲线(receiver operator characteristic curve, ROC 曲线)及曲线下面积(area under the curve, AUC)用于评价血浆 DNA 水平作为生物学指标的可行性。

2 结果

2.1 健康对照组和研究组血浆 DNA 水平 研究中 EICU 患者各时相点血浆 DNA 的水平分别是: $T_{0\text{h}}$ 489 009 (54 740, 4 401 779) pg/ml、 $T_{24\text{h}}$ 332 917 (45 468, 3 408 516) pg/ml、 $T_{48\text{h}}$ 147 182 (29 461, 1 543 887) pg/ml、 $T_{1周}$ 68 889 (10 164, 1 069 670) pg/ml 和健康对照组血浆 DNA 水平 9 094 (726, 5 301 940) pg/ml 相比均明显升高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

2.2 EICU 患者存活组和死亡组之间各临床基本参数的分析 EICU 患者存活组和死亡组之间机械通气率(55% vs 86%, $P < 0.01$),血管活性药物使用率(33% vs 62%, $P < 0.01$),入室后 24 h APACHE II 评分(18.69 ± 7.44 vs 24.46 ± 8.01)及 48 h APACHE II 评分(14.35 ± 7.05 vs 22.81 ± 7.61)比较,差异有统计学意义($P < 0.01$)。两组间性别、年龄、EICU 滞留时间、原发感染及继发感染率、血液透析率、C-CRP、IL-6、PCT 之间未见明显差异。见表 1。

2.3 EICU 患者存活组和死亡组间血浆 DNA 水平的比较 EICU 死亡组各时相点血浆 DNA 的水平均高于存活组,并且在入室 $T_{24\text{h}}$ 、 $T_{48\text{h}}$ 两个时相点差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

2.4 血浆 DNA 对患者预后的判断能力 以死亡为状态变量,作各项指标 ROC 曲线,见图 1。结果显示: $T_{0\text{h}}$ 血浆 DNA 水平 AUC(0.694)、 $T_{24\text{h}}$ 血浆 DNA 水平 AUC(0.812)、 $T_{48\text{h}}$ 血浆 DNA 水平 AUC(0.847),均显著高于 24 h APACHE II 评分 AUC(0.529)、48 h APACHE II 评分 AUC(0.565)、1 周 APACHE II 评分 AUC(0.518),及第一个 24 h 乳酸值的 AUC(0.671)。其中 $T_{48\text{h}}$ 血浆 DNA 水平 AUC(0.847)最大,以血浆 DNA 水平 $\geq 41 106$ pg/ml 作为临界值,其检测敏感度为 100%,特异性为 70.6%,诊断效果最好。根据约登指数最大法选取最佳截断值及 95% 置信区间。见表 3。

表1 EICU 患者的临床基线表

项目	存活组(n=95)	死亡组(n=37)	P 值
人口统计学特征			
年龄(岁) $\bar{x} \pm s$	57.81 ± 19.79	61.97 ± 21.56	0.292
性别(男/女)	54/41(57%/43%)	21/16(57%/43%)	0.993
EICU 滞留时间(d) $\bar{x} \pm s$	9.06 ± 11.04	7.30 ± 7.56	0.373
原发感染			
是/否	72/23(76%/24%)	26/11(70%/30%)	0.515
继发感染			
是/否	33/62(35%/65%)	14/23(38%/62%)	0.769
血液透析			
是/否	11/84(12%/88%)	10/27(27%/73%)	0.029
机械通气治疗			
是/否	52/43(55%/45%)	32/5(86%/14%)	<0.010
第1天是否使用血管活性药物			
是/否	31/64(33%/67%)	23/14(62%/38%)	0.002
APACHE II 评分($\bar{x} \pm s$)			
入室 24 h	18.69 ± 7.44	24.46 ± 8.01	<0.010
入室 48 h	14.35 ± 7.05	22.81 ± 7.61	<0.010
入室 1 周	13.61 ± 8.03	18.25 ± 6.55	0.075
外周血生物标志物($\bar{x} \pm s$)			
LAC (mmol/L)	5.04 ± 22.02	5.53 ± 4.53	0.901
PCT (ng/ml)	13.09 ± 26.57	13.13 ± 27.46	0.995
IL-6 (pg/ml)	426.90 ± 1087.37	480.29 ± 871.72	0.823
CRP (mg/L)	122.94 ± 107.28	98.85 ± 84.54	0.243

表2 健康对照组和 EICU 患者血浆 DNA 的水平(pg/ml)

时相点	存活组(n=95)	死亡组(n=37)	P 值
T _{0 h}	435 585 (31 666, 3 948 814)	7 880 605 (259 946, 5 770 794)	0.264
T _{24 h}	202 238 (31 027, 2 143 826)	5 983 334 (90 728, 9 028 945)	0.020
T _{48 h}	72 362 (26 232, 862 152)	8 853 396 (120 465, 9 187 479)	0.013
T _{1周}	68 889 (10 164, 1 069 670)	90 171 (20 245, 497 260)	0.957

表3 评价 EICU 患者死亡趋势各项指标的 AUC 及 95% CI

检验变量	AUC	最佳截断值	95% CI
24 h APACHE II 评分	0.529	30	0.155 ~ 0.786
48 h APACHE II 评分	0.565	12	0.292 ~ 0.838
1 周 APACHE II 评分	0.518	11	0.278 ~ 0.757
第一个 24 h LAC (mmol/L)	0.671	2	0.329 ~ 1.000
T _{0 h} 血浆 DNA (pg/ml)	0.694	198 721	0.440 ~ 0.948
T _{24 h} 血浆 DNA (pg/ml)	0.812	72 892	0.603 ~ 1.000
T _{48 h} 血浆 DNA (pg/ml)	0.847	41 106	0.648 ~ 1.000
T _{1周} 血浆 DNA (pg/ml)	0.600	1 350 266	0.280 ~ 0.920

3 讨论

有文献^[5]报道,危重症患者血浆 DNA 水平较健康对照组明显升高。本研究中 EICU 患者不同时相点的血浆 DNA 水平和健康对照组相比均显著升高,且差异有统计学意义。观察血浆 DNA 水平的动态变化趋势发现,存活组的血浆 DNA 水平随病程呈下降趋势,于 T_{1周} 达最低;而死亡组血浆 DNA 水平呈

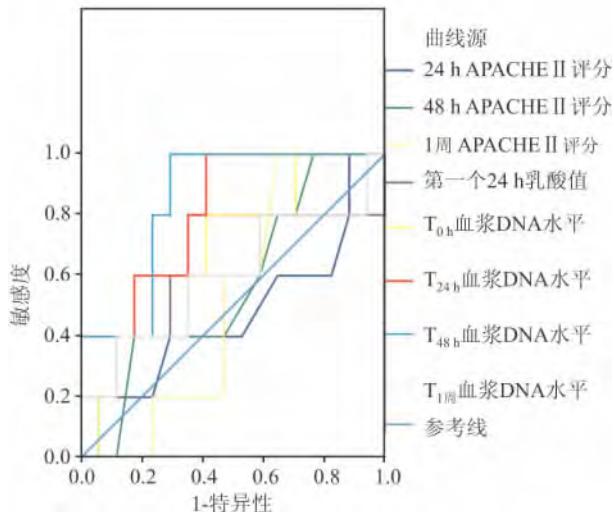


图1 评价 EICU 患者死亡趋势的各项指标的 ROC 曲线

波动变化,并于 T_{48 h} 达最高。表明血浆 DNA 水平在一定程度上反映了重症患者对治疗的反应,在治疗有效的情况下逐渐下降,疗效不佳时波动变化,也同时说明血浆 DNA 水平升高是危重症患者预后不佳的一个预测因子。

本研究对不同时相点血浆 DNA 水平研究发现,死亡组各时相点的血浆 DNA 水平均高于存活组,且 T_{24 h}、T_{48 h} 两时相点的差异有统计学意义,表明血浆 DNA 水平的定量检测能够成为预测 EICU 患者死亡率的一个独立影响因子。在这两个前瞻性试验^[5-6]中,T_{0 h} 血浆 DNA 水平死亡组明显高于存活组,而本研究中两组间无明显差异,原因可能有:首先,EICU 收治患者的病种多,病因复杂,在入住 EICU 之前两组患者治疗侧重和强度不同,会对血浆 DNA 水平产生影响。其次,两组患者入室后治疗的强度不同,两组患者间机械通气、血管活性药物的使用率有明显差别,且患者对治疗效果的反应会直接影响患者的预后。有相关实验^[7-8]表明,机械通气患者血浆 DNA 水平明显高于非机械通气患者,休克患者血浆 DNA 水平明显高于非休克患者。

本研究中 CRP、IL-6、PCT 这三种 ICU 常用于评价机体炎症反应的生物标志物和血浆 DNA 水平之间未见显著相关性,可能说明血浆 DNA 和这三种生物标志物的产生机制不同。凋亡和坏死、缺血再灌注、补体相关通路、溶血、氧自由基损伤等机制均可影响血浆 DNA 的产生。在凋亡机制中,Zeerleider et al^[9]已经证明核小体相关 DNA 与 IL-6、IL-8,弹性蛋白酶、 α_1 -抗胰蛋白酶的复合物和纤溶酶原激活物抑制剂-1 显著相关。

以死亡为状态变量的各项指标 ROC 曲线可见，血浆 DNA 水平的 AUC 大于 APACHE II 评分及乳酸值的 AUC，说明血浆 DNA 水平对患者死亡率预测的能力高于 APACHE II 评分和乳酸。其中以 $T_{48\text{h}}$ 血浆 DNA 水平的预测性最佳，其 AUC 为 0.847 敏感性为 100%，特异性为 70.6%。本研究针对血浆 DNA 对疾病死亡率预测能力时效性的研究表明，早期血浆 DNA 水平的动态变化是预测疾病危险性的一个重要生物标志物，且血浆 DNA 在 1 周内均具有较好的敏感性及特异性。

参考文献

- [1] Leon S A ,Shapiro B ,Sklaroff D M ,et al. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy[J]. *Cancer Res* ,1977 ,37(3) :646 - 50.
- [2] Ren B ,Liu F ,Xu F ,et al. Is plasma cell-free DNA really a useful marker for diagnosis and treatment of trauma patients? [J]. *Clin Chim Acta* ,2013 ,424:109 - 13.
- [3] Arnalich F ,Menéndez M ,Lagos V ,et al. Prognostic value of cell-free plasma DNA in patients with cardiac arrest outside the hospital: an observational cohort study [J]. *Crit Care* ,2010 ,14 (2) :R47.
- [4] Gornik I ,Wagner J ,Gasparović V ,et al. Free serum DNA is an early predictor of severity in acute pancreatitis[J]. *Clin Biochem* ,2009 ,42(1 - 2) :38 - 43.
- [5] Rhodes A ,Wort S J ,Thomas H ,et al. Plasma DNA concentration as a predictor of mortality and sepsis in critically ill patients[J]. *Crit Care* ,2006 ,10(2) :R60.
- [6] Saukkonen K ,Lakkisto P ,Varpula M ,et al. Association of cell-free plasma DNA with hospital mortality and organ dysfunction in intensive care unit patients [J]. *Intensive Care Med* ,2007 ,33 (9) :1624 - 7.
- [7] Okkonen M ,Lakkisto P ,Korhonen A M ,et al. Plasma cell-free DNA in patients needing mechanical ventilation [J]. *Crit Care* ,2011 ,15(4) :R196.
- [8] Yamanouchi S ,Kudo D ,Yamada M ,et al. Plasma mitochondrial DNA levels in patients with trauma and severe sepsis: time course and the association with clinical status[J]. *J Crit Care* ,2013 ,28 (6) :1027 - 31.
- [9] Zeerleder S ,Zwart B ,Wuillemin W A ,et al. Elevated nucleosome levels in systemic inflammation and sepsis [J]. *Crit Care Med* ,2003 ,31(7) :1947 - 51.

Association of cell-free plasma DNA with mortality and severity of disease in ICU patients

Cai Xiaopei¹ Zhang Hong¹ Luo Qingli²

(¹*Dept of Emergency ,The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University Hefei 230022;*

²*Provincial Laboratory of Microbiology and Parasitology Anhui Dept of Microbiology and Parasitology ,Anhui Medical University Hefei 230032)*

Abstract The cell-free plasma DNA of the 132 critically ill patients admitted to the emergency intensive care unit (EICU) was measured by real-time quantitative polymerase chain reaction assay for the human β -globin gene. According to the prognosis, the patients were divided into survival group (95 cases) and death group (37 cases). Blood samples were collected after EICU admission, 24 hours after admission, 48 hours after admission, and 1 week after admission. 30 age-matched controls were collected from healthy volunteers healthy care centre. Compared with control group, at each time point, cell-free plasma DNA concentration was significantly higher in EICU patients ($P < 0.05$). Cell-free plasma DNA concentrations were higher in hospital non-survivors than in survivors, of which plasma DNA concentration of 24 hours after admission and 48 hours after admission was statistically significant ($P < 0.05$). The area under the ROC curves (AUC) for plasma DNA was bigger than the lactate and APACHE II score, the maximum of AUC was 0.847 (95% CI 0.648 ~ 1.000) at the point of 48 hours after admission.

Key words cell-free plasma DNA ; critical care illness ; prognosis