



液相层析串联质谱法检测脑脊液食欲素 诊断 1 型发作性睡病的初步探索

赵显超¹, 任佳封¹, 程金湘¹, 吴境宇², 王荔月², 张潇羽², 郑威³, 李华³,
刘爽², 汪宇佳², 程凯汀^{2,4}, 汤媛媛², 宿长军¹

摘要: 目的 1 型发作性睡病(NT1)伴有脑脊液食欲素(Hcrt-1)的降低。目前国内检测 Hcrt-1 的方法多是利用进口试剂进行的放射免疫法测定(RIA),但此方法只能在有限的放射性同位素安全认证的实验室开展,而且受限于试剂中同位素的衰减、抗体依赖的方法学、缓慢与繁琐的步骤和较长的反应时间。本研究的目的在于探索出一种非放射性且非抗体依赖的脑脊液食欲素快速检测方法。方法 利用液相层析串联质谱法(LC-MS/MS)技术对临床确诊的 14 例 NT1 患者和 10 例非发作性睡病患者的脑脊液进行了反复测试,包括基本的方法学建立和优化。主要步骤是将加入非放射性同位素内标的脑脊液经过固相萃取后进行质谱信号捕获和定量分析,并与相应的 RIA 结果进行比较。结果 LC-MS/MS 方法简单快速,且在 5~2 500 pg/ml 范围内显示良好的线性关系和重复性。虽然这种绝对定量的检测方法显示与 RIA 结果有数值方面的差异和不一致性,但它足以区分 NT1 和非发作性睡病对照组且不存在灰区。结论 LC-MS/MS 是一种更便利、快速、安全、可靠的可用于 NT1 诊断的检测方法。

关键词: 发作性睡病; 脑脊液食欲素; 液相层析串联质谱法; 放射免疫法

中图分类号: R338.63; R741.04

文献标识码: A

Detection of CSF hypocretin-1 on the narcolepsy type 1 patients by LC-MS/MS: A primary observation
ZHAO Xianchao, REN Jiafeng, CHENG Jinxiang, et al. (Department of Neurology, Tangdu Hospital of Air Force Military Medical University, Xi'an 710038, China)

Abstract: **Objective** Narcolepsy type 1(NT1) is known to be associated with low levels of hypocretin-1(Hcrt-1) in cerebrospinal fluid(CSF). The standard method for Hcrt-1 measurement is radioimmunoassay(RIA) with imported reagents, but this antibody-dependent method is limited to radiation safety-certified lab, gradual radioactivity degradation, and slow turn-around time. The purpose of this study is to explore a non-radioactive, faster, and antibody independent domestic method in China for Hcrt-1 detection. **Methods** Repeated testing of cerebrospinal fluid from 14 clinically diagnosed NT1 patients and 10 non-narcolepsy patients was performed using liquid chromatography-tandem mass spectrometry(LC-MS/MS) technology, including the establishment and optimization of fundamental methodological procedures. The main steps involved the addition of non-radioactive isotope-labeled internal standards to the cerebrospinal fluid, followed by solid-phase extraction, mass spectrometry signal acquisition, and quantitative analysis. The results were then compared with the corresponding radioimmunoassay(RIA) findings. **Results** The LC-MS/MS method showed faster speed, and good linearity across a wider range of synthesized standard(5~2 500 pg/ml), and good repeatability. Although this absolute-quantitation-based LC-MS/MS method and RIA method have different reading values in Hcrt-1 quantitation, they both can segregate NT1 group from non-NT1 group well. **Conclusion** Although larger cohorts are needed to set up a standard method in China, LC-MS/MS method is proved to be an easier, safer, faster, and possibly more accurate method for Hcrt-1 quantitation and detection for NT1 diagnosis.

Key words: Narcolepsy; Hypocretin-1; Liquid chromatography tandem mass spectrometry; Radioimmunoassay

发作性睡病(narcolepsy)是一种以不可抗拒的日间过度思睡、猝倒、睡眠幻觉、睡眠瘫痪和夜间睡眠紊乱等为主要临床特点的中枢性睡眠障碍^[1]。目前认为发作性睡病的主要病理生理机制是由于下丘脑分泌食欲素(hypocretin-1, Hcrt-1)的细胞由于自身免疫反应导致的凋亡造成的脑脊液(cerebrospinal fluid, CSF)中的 Hcrt-1 减少甚至消失。根据国际睡眠障碍分类-第三版-修订版(International Classification of Sleep Disorders, Third Edition Text Revision, ICSD-3-TR),按照 CSF 放射免疫测定法(radioimmunoassay, RIA)Hcrt-1 水平是否 ≤ 110 pg/ml 或低于正常值的 1/3,分为 1 型发作性睡病(narcolepsy type 1, NT1)

和 2 型发作性睡病(narcolepsy type 2, NT2)^[1,2]。目前国际认可的 CSF 食欲素检测方法为 RIA,且绝大多数推荐运用 ¹²⁵I 放射免疫分析试剂盒测定(美国 Phoenix Pharmaceuticals 公司)。由于该方法只能在有限的放

收稿日期:2024-12-30;修订日期:2025-02-17

基金项目:陕西省重点产业创新链项目(2022ZDLSF03-07);广州市 2023 年度市校(院)企联合资助专题(2023A03J0558)

作者单位:(1. 空军军医大学唐都医院神经内科,陕西 西安 710038; 2. 广州金城医学检验中心有限公司,广东 广州 510145; 3. 上海百趣代谢组学技术研究中心,上海 201815; 4. 广州医科大学金城检验学院,广东 广州 510145)

通信作者:汤媛媛, E-mail: zb-tangyuanyuan@kingmed. com. cn; 宿长军, E-mail: changjunsu@163. com

射性同位素安全认证的实验室开展,而且受限于试剂中同位素的衰减(^{125}I 半衰期约60 d)、国外试剂进口、物流特殊要求以及试剂盒中要求的抗原抗体反应的缓慢与繁琐的步骤(整个检测时间约48 h)等^[3],所以此方法存在一定的局限性。此外,有研究使用酶联免疫吸附测定法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)测定CSF中食欲素水平,结果缺乏可靠性^[3]。由于RIA和ELISA上述两种方法的试剂批次差异,以及以抗体为基础方法的非特异性结合等问题,寻找更精确检测CSF中食欲素和替代非放射性的方法是当前需要解决的问题。

近年来以基于质谱技术为主的蛋白组学检测方法有了长足的发展,尤其是液相层析串联质谱法(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)。在多个医疗检测领域都有广泛的应用^[4]。国外利用质谱法检测Hcrt-1也陆续有报道^[5-7],但国内尚未见报道。Hcrt-1是一个含有2个二硫键的约3 600道尔顿小蛋白,极易带电荷,不管是在NT1或非NT1的CSF中均能看到^[5-7],但文献中显示与大家熟知的RIA相比LC-MS/MS检测的结果不同实验室内存在差别,特别是读值方面与RIA结果存在数倍到十几倍的差异,通常LC-MS/MS的读值普遍低于RIA^[5-7]。LC-MS/MS在目前的报道中显示在检测CFS中的Hcrt-1水平以诊断NT1方面有强大的优势,包括不依赖抗体、无放射性、可绝对定量、检测用时短、可以本土开展等。因此,本研究旨在基于国内人群应用LC-MS/MS探索出检测CFS中Hcrt-1水平的本土方法。

1 资料与方法

1.1 样本与患者信息

选取14例符合国际睡眠障碍分类第三版(International Classification of Sleep Disorders, 3rd Edition, ICSD-3)诊断标准的1型发作性睡病(NT1)患者且均经过广州金域医学检验中心使用RIA测定CSF中的Hcrt-1水平(Hcrt-1/Orexin A RIA试剂盒, Phoenix Pharmaceuticals)(见表1)。本研究选取10例可疑中枢神经系统感染患者作为对照组,且均完成腰椎穿刺。这些对照组均无日间过度思睡或猝倒发作(见表2)。

1.2 试剂与Hcrt-1测试方法

1.2.1 标准品及内标准备 合成的Hcrt-1(强耀生物,中国)稀释至50 ng/ml储备溶液,溶剂为25%乙腈(ACN)和0.1%甲酸(FA),并用作标准品。用于优化质谱的Hcrt-1浓度为100 ng/ml,溶剂为25%ACN和0.1%FA。内部标准(内标)采用 ^{13}C 和 ^{15}N 稳定同位素标记的Hcrt-1,在2个亮氨酸(Leu)残基上含有稳定的非放射性同位素(强耀生物,中国)。该内标与Hcrt-1化学性质相似,包括二硫键和其他修饰,但质量偏移为14 Da。内标储备溶液通过在同样的溶剂(25% ACN, 1% FA)中溶解并分装,并储存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。工作溶液由25%ACN,0.1% FA稀释,使最终

表1 NT1患者CSF样本临床信息汇总

项目	NT1组(n=14)
男性(n)	9.00
BMI[$M(P_{25}, P_{75})$, kg/m ²]	29.22(25.90, 30.99)
就诊年龄[$M(P_{25}, P_{75})$, 岁]	20(15, 30.25)
病程[$M(P_{25}, P_{75})$, 年]	3(1, 12)
症状(n)	
日间过度思睡	14.00
猝倒发作	13.00
睡眠瘫痪	5.00
睡眠幻觉	5.00
Epworth嗜睡量表($\bar{x}\pm s$)	12.77 $\pm$ 4.46
多导睡眠监测	
总睡眠时间($\bar{x}\pm s$, min)	423.86 $\pm$ 146.33
睡眠效率[$M(P_{25}, P_{75})$, %]	94.50(84.50, 95.25)
入睡后清醒时间[$M(P_{25}, P_{75})$, min]	19.50(15.00, 36.25)
REM潜伏期[$M(P_{25}, P_{75})$, min]	3.00(1.00, 77.00)
nSOREMP(n)	7.00
REM期百分比[$M(P_{25}, P_{75})$, %]	20.50(17.50, 26.00)
N1期百分比($\bar{x}\pm s$, %)	21.29 $\pm$ 7.96
N2期百分比($\bar{x}\pm s$, %)	43.57 $\pm$ 16.52
N3期百分比($\bar{x}\pm s$, %)	13.36 $\pm$ 10.26
觉醒指数($\bar{x}\pm s$, 次数/h)	10.00 $\pm$ 3.76
阻塞性睡眠呼吸暂停低通气指数($\bar{x}\pm s$, 次数/h)	5.93 $\pm$ 6.72
最低血氧饱和度($\bar{x}\pm s$, %)	82.79 $\pm$ 24.33
睡眠中周期性肢体运动指数($\bar{x}\pm s$, 次数/h)	1.92 $\pm$ 1.83
多次潜伏期小睡试验($\bar{x}\pm s$)	
平均睡眠潜伏期(min)	2.03 $\pm$ 1.68
SOREMP(n)	4.36 $\pm$ 1.01

注: BMI, body mass index, 身体质量指数; nSOREMP, nocturnal sleep onset REM period, 夜间出现的睡眠起始快速眼动期; N1, non-rapid eye movement stage 1, 非快速眼动睡眠1期; N2, non-rapid eye movement stage 2, 非快速眼动睡眠2期; N3, on-rapid eye movement stage 3, 非快速眼动睡眠3期; REM, rapid eye movement, 快速眼动睡眠; SOREMP, sleep onset REM period, 睡眠起始快速眼动期。

表2 对照组信息

序号	疑似诊断	性别	年龄
C01	中枢神经系统感染	男	2岁
C02	中枢神经系统感染	男	1月
C03	中枢神经系统感染	男	58岁
C04	中枢神经系统感染	男	10岁
C05	中枢神经系统感染	女	12岁
C06	中枢神经系统感染	男	36岁
C07	中枢神经系统感染	男	49岁
C08	中枢神经系统感染	男	9岁
C09	中枢神经系统感染	男	3岁
C10	中枢神经系统感染	男	7岁
平均值	-	-	(18.61 $\pm$ 21.04)岁

浓度约为10 ng/ml,因此如果在500 μl 样本中加入50 μl 内标,其最终浓度即为909 pg/ml。

1.2.2 质谱样品前处理 Hcrt-1 通过固相萃取 (solid-phase extraction, SPE) 从 CSF 中提取, 采用 30 μm Oasis 萃取板 (96 孔板格式, waters)。以 500 μl 甲醇 (MeOH) 和 500 μl 水预先润洗, 然后加入 550 μl 样本 (500 μl CSF 样本和 50 μl 内标工作液的混合液), 以 200 μl MeOH/水/甲酸 (80/10/10, v/v) 洗脱食欲素, 收集至 96 孔蛋白低吸附进样板 (waters), 在 40 $^{\circ}\text{C}$ 下用真空离心浓缩至干, 最后用 100 μl HPLC 流动相 (ACN/水/FA:25/74.9/0.1, v/v/v) 重新溶解。

1.2.3 LC-MS/MS 分析 样品分析仪器为 AB Sciex 液相色谱仪 (AB Sciex, Citrine, USA), 配备电喷雾离子源 (electrospray ionization, ESI) 完成。具体步骤如下: 采用 2.1 mm 内径 $\times$ 50 mm 长 Kinetex C18 的反相色谱柱 (2.6 μm 颗粒, 100 $\text{\AA}$ 孔径, Phenomenex)。流动相 A 为 0.1% FA, 流动相 B 为乙腈 (ACN)/0.1% FA, 利用梯度洗脱法将 Hcrt-1 洗脱并检测: 0 min, 20% B $\rightarrow$ 1.3 min, 95% B $\rightarrow$ 2.3 min, 95% B $\rightarrow$ 2.4 min, 20% B $\rightarrow$ 3.0 min, 20% ACN)。液相流速为 400 $\mu\text{l}/\text{min}$; 柱温保持 40 $^{\circ}\text{C}$; 样品盘温度为 8 $^{\circ}\text{C}$, 正电荷电喷雾离子化碰撞能量为 20 eV, 目标离子为 Hcrt-1 $[M+5H]^{5+}$ (质荷比 m/z 713.1), 主要碎片离子: m/z 858.6 和 854.1; 内标质荷比 m/z 715.9 (目标离子) $\rightarrow$ 862.2 (碎片离子) $^{[5-7]}$ 。

1.2.4 RIA 分析 严格采用标准 RIA 试剂盒及说明书 $^{[8]}$ 进行检测 CSF 中 Hcrt-1 水平的操作, 并参照梅奥诊所的诊断建议将 110 pg/ml 作为 NT1 的阈 (cutoff) 值, 将 111~200 pg/ml 设为中间 (intermediate) 值, 200 pg/ml 以上为正常 (normal) $^{[9,10]}$ 。

1.3 统计学分析

采用 Excel (版本: 16.94) 进行数据统计分析。数据采集软件 Analyst 1.6.3, 数据处理软件 Multi-Quant MD 3.0.3 和 SPSS 25.0。以 $(\bar{x} \pm s)$ 描述符合正态分布的定量资料, 中位数 (四分位数间距) $[M(P_{25}, P_{75})]$ 描述不符合正态分布的定量资料, 频数和百分比 (%) 描述定性资料。

2 结果

2.1 LC-MS/MS 检测 Hcrt-1 有更宽的定量范围和良好的重复性和回收率

为了确认文献中质谱法检测 Hcrt-1 是否可行, 本研究先就质谱检测的条件进行了探索和优化, 包括萃取和高压液相分离的条件和 Hcrt-1 离子化及质谱检测相关的指标等。因为无论是 NT1 还是非 NT1 的 CSF 都含有一定量的食欲素, 本研究首先实施了无基质影响下的 Hcrt-1 质谱检测, 将含有非放射性同位素的 Hcrt-1 内标作为绝对定量的标准与没有同位素标记的 Hcrt-1 标准品混合在一起并用流动相 A (0.1% FA) 稀释成不同的浓度进行固相萃取和质谱检测。实验结果发现质谱方法比放免法有更宽的检测和定量范围, 在 5~2 500 pg/ml 的范围内有良好的线性关系 ($R^2=0.9978$), 而放免法的检测范围据报道是在 10~1 280 pg/ml $^{[3,8]}$ (见表 3、图 1)。为了体现检测体系运转的稳定性, 将一定量的内标 (100 ng/ml) 和标准品 (10 ng/ml) 混在一起共进行 6 次重复性实验, 最终证实此方法也具有良好重复性 (CV<

10%)。此外, 本研究还发现标准品与内标比的信号强度比例 (理论上应该是 0.1) 与试剂供应商提供浓度差不同 (实际上平均是 0.05) (见表 4)。

表 3 食欲素线性范围内校正后检测数值

分析物 (标准品) 浓度 (pg/ml)	分析物与内标比值
5	0.103 125 456
25	0.734 971 711
100	2.251 830 757
250	6.039 603 96
1 000	23.084 677 42
2 500	51.603 618 42

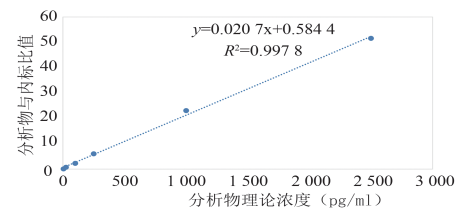


图 1 食欲素线性范围检测

为了检测基质条件下 (接近临床 CSF 样本检测条件) 质谱法检测 Hcrt-1 的表现及重复性, 本研究将 12 例 NT1 患者作为基质 (CSF-01-CSF-12 没有选择健康人的 CSF, 因为内含 Hcrt-1 背景会更高), 加入内标和标准品 (183.84 pg/ml 和 1 083.84 pg/ml 两种浓度) 进行重复性检测和加标回收实验, 3 次重复检测发现在此近乎真实场景检测的条件下, 质谱检测法也具有良好的重复性 (CV4%~14%) 和回收率 (113%~118%), 而且 CSF 基质条件下质谱法有稳定的 Hcrt-1 被检出 (浓度为 88.25 pg/ml) (见表 5)。

2.2 质谱法可有效区分 NT1 和非发作性睡眠患者

在上面基本方法学建立和优化的基础上, 本研究又对 14 例 NT1 患者的 CSF (上面提及的 12 例 NT1 患者样本的基础上又追加了 2 例 NT1 患者的 CSF) 进行了 LC-MS/MS 盲测 Hcrt-1 水平。对 10 例非 NT1 患者的 CSF 中 Hcrt-1 也进行了 LC-MS/MS 检测。结果显示 LC-MS/MS 很容易区分 NT1 组 [Hcrt-1 (17.80 $\pm$ 20.64) pg/ml] 和非 NT1 组 [Hcrt-1 (493.6 $\pm$ 296.42) pg/ml], 而且两组样本不像 RIA 那样存在或考虑灰区 $^{[9-10]}$ 。与国外报道类似, LC-MS/MS 检测的平均读值也低于放免法 $^{[5-7]}$ (平均低 1.896 倍), 两组结果 (NT1 患者的 RIA 与 LC-MS/MS 检测) 统计学分析无读值相关性 (见表 6)。

表 4 食欲素标准品及内标 6 次重复性检测结果

标准品峰面积	CV	内标峰面积	CV	面积比率	CV
1.11E+05	3%	2.11E+06	5%	0.05	8%
1.12E+05		2.14E+06		0.05	
1.16E+05		2.17E+06		0.05	
1.08E+05		2.08E+06		0.05	
1.15E+05		2.26E+06		0.05	
1.13E+05		1.94E+06		0.06	

表5 食欲素加标回收率及基质条件下的重复性检测

样本	检测浓度(pg/ml)	均值(pg/ml)	CV 值	理论值	回收率(%)
CSF 本底-1	93.00	88.25(CSF 基质)	14%	NA	NA
CSF 本底-2	97.66				
CSF 本底-3	74.08				
CSF+低标样-1	225.39	196.38*	13%	183.84	113%
CSF+低标样-2	181.76				
CSF+低标样-3	182.00				
CSF+高标样-1	1 274.24	1 260.15*	4%	1 083.84	118%
CSF+高标样-2	1 208.93				
CSF+高标样-3	1 297.27				

注:基质效应已去除。

表6 临床CSF中Hcrt-1的LC-MS/MS与RIA检测结果分析比较

样本 编号	组别	分析物响应	内标响应	保留时间	ratio	质谱浓度 (pg/ml)	质谱浓度 AVE	r 值*	放免浓度 (pg/ml)	放免浓度 AVE
CSF-01	NT1 组	10 990	12 870	1.28	0.85	88.16	17.80±20.64	0.9993	12.45	33.74±27.54
CSF-02		3 572	15 490	1.28	0.23	20.22			19.87	
CSF-03		2 272	10 860	1.28	0.21	17.87			18.94	
CSF-05		1 777	12 460	1.29	0.14	10.62			39.47	
CSF-06		1 718	12 910	1.28	0.13	9.58			17.16	
CSF-07		2 039	12 260	1.28	0.17	13.2			63.89	
CSF-08		992.2	9 580	1.28	0.1	6.36			15.44	
CSF-09		2 074	11 350	1.28	0.18	14.98			28.54	
CSF-10		1 487	11 380	1.28	0.13	9.32			21.44	
CSF-11		1 986	14 040	1.28	0.14	10.49			43.86	
CSF-12		2 616	13 750	1.29	0.19	15.8			115.39 [#]	
CSF-15		2 080	12 990	1.28	0.16	12.52			11.59	
CSF-16		2 229	13 180	1.28	0.17	13.51			32.31	
CSF-18		1 809	17 230	1.29	0.1	6.51			31.98	
CSF-541	非 NT1 组	6.19E+03	1.03E+04	1.28	0.6	303.75	493.60 ±296.42			
CSF-544		2.19E+03	7.89E+03	1.28	0.28	126.73				
CSF-432		5.69E+04	7.61E+03	1.27	7.47	809.58				
CSF-433		4.38E+04	7.75E+03	1.28	5.66	611.69				
CSF-468		5.38E+04	7.79E+03	1.27	6.9	747.24				
CSF-439		4.56E+04	5.70E+03	1.27	8	963.85				
CSF-460		3.33E+04	6.11E+03	1.27	5.45	654.17				
CSF-462		2.55E+04	1.17E+04	1.27	2.18	256.41				
CSF-471		2.60E+04	1.47E+04	1.26	1.77	206.42				
CSF-542		3.18E+04	1.46E+04	1.27	2.18	256.13				

注:*r 值,用分析物浓度除以内标浓度作为 x,理论浓度作为 y,做线性相关曲线,表示检测的稳定性和准确度。#,根据梅奥诊所的标准及文献 9、10,此病例 RIA 检测接近灰区低值,临床诊断仍考虑 NT1;ratio,与内标的比值;AVE,浓度平均值。

3 讨 论

本研究初步证实了利用液相层析串联质谱法(即 LC-MS/MS)测定 CSF 中 Hcrt-1 水平是一个可行的方法,特别是使用合成的含有非放射性同位素的稳定内标,可以达到绝对定量,比放免法等依赖抗体的检测方法在定量检测上具有绝对优势。此外,

本研究偶然发现同一厂家的内标和标准品定量有不一致的现象,可能与 2 种试剂合成的不同步骤和工艺有关,即其中一个要用带非放射性同位素(如 ¹³C 而不是 ¹²C)的氨基酸合成内标,而合成标准品用正常的氨基酸即可。就 Hcrt-1 而言,它本身是一个约 3 600 道尔顿的小蛋白,体外直接合成要比

用动物或细胞生产并筛选出它相应的抗体工艺上会更加容易,可以无限量生产和分装保存,质量控制理论上更加简单,使用起来也更安全。不同于目前常用的RIA试剂(美国Phoenix Pharmaceuticals公司生产的¹²⁵I标记的Hcrt-1抗体及相关试剂)需要考虑同位素的半衰期和同位素放射性的安全防护问题。

利用LC-MS/MS检测到的CSF中的Hcrt-1水平的范围平均比RIA的范围要低,而且2种方法读值间没有相关性,究其原因可能与两种方法本质上有较大区别,以及RIA检测的繁琐步骤有关,与文献报道^[5-7]基本一致。RIA检测步骤多,流程长,反应时间长(抗原抗体要过夜孵育结合,整个检测需要大约48 h)^[8],难免有一些非特异性的结合,可能会给出一些非特异性或背景读值,特别是NT1患者的CSF中Hcrt-1水平较低,受背景的影响会相对更大。而LC-MS/MS检测步骤相对简单,CSF样本加入内标后固相萃取物直接测定Hcrt-1,检测的信号是与内标并行的待测样本中质谱图的峰值或面积,是绝对定量,不存在背景值的问题,使得检测更容易和准确。当然,文献中及本研究是不同的实验室使用的不同供应商提供的不同的LC-MS/MS检测试剂,难免有生产工艺等一些不一样的地方。与文献中的报道类似,本研究中也发现使用LC-MS/MS检测的CSF中的Hcrt-1读值与RIA结果的读值比例不一样,尽管是两种不同的检测方法,但这也提示各实验室使用标准化的试剂和方法的重要性。此外本研究发现LC-MS/MS有更宽的定量范围,体现出此方法更能耐受临床样本的不同状态,有更大的实用性。

NT1的诊断需依靠CSF中的Hcrt-1水平下降辅助诊断,考虑到腰穿的有创性,有学者曾试图利用血液检测Hcrt-1水平用于疾病诊断,最终发现血液中的Hcrt-1与NT1并没有关系^[11,12]。主要是由于CSF中的Hcrt-1很难通过血脑屏障,且CSF中的Hcrt-1与外周血中Hcrt-1可能来自身体不同的部位^[13,14],所以检测与NT1相关的Hcrt-1目前还要利用CSF。本研究与既往文献报道类似(研究者使用了NT1患者样本9~20例不等)^[5-7],利用LC-MS/MS检测了14例NT1患者Hcrt-1水平,并与10例非NT1患者的CSF的Hcrt-1的水平进行了LC-MS/MS检测比较(均为疑似神经感染病例,因为临床不怀疑NT1所以没有做相应的RIA检测),虽然检测样本量不大,但此研究已足以看出LC-MS/MS检测Hcrt-1的优势,特别是绝对定量和本土化开展。此外,本研究中纳入了1例Hcrt-1(CSF-12)RIA检测在灰区低值的NT1组样本(RIA读值为115.39 pg/ml),质谱检测Hcrt-1却很低,且低于平均均值水平,尽管仅此1例,它提示在RIA读值在灰区时诊断NT1需要综合考虑。有学者也提议同时提高RIA的阈值^[15]。

综上所述,使用LC-MS/MS能够较好地地区分NT1和非发作性睡患者群且不存在灰区,用于疾病辅助诊断。未来的研究目标是多中心联合并扩大样本量,建立健康人群CSF中Hcrt-1的标准范围和NT1患者CSF中Hcrt-1的诊断阈值。

伦理学声明: 本研究方案经空军军医大学唐都医院伦理委员会审批(批号:K202204-10),患者均签署知情同意书。

利益冲突声明: 所有作者均声明不存在利益冲突。

作者贡献声明: 赵显超、程凯汀负责论文设计;吴境宇、郑威负责实验操作;任佳封、程金湘、汤媛媛、刘爽负责数据收集;郑威、汤媛媛、吴境宇、刘爽、李华负责绘制图表、统计学分析;赵显超、程凯汀、王荔月、张潇羽、汪宇佳负责撰写论文;宿长军负责指导撰写论文并最后定稿。

[参考文献]

- [1] 中华医学会神经病学分会睡眠障碍学组. 中国发作性睡病诊断与治疗指南(2022版)[J]. 中华神经科杂志, 2022, 55(5): 406-420.
- [2] Krahn LE, Zee PC, Thorpy MJ. Current understanding of narcolepsy 1 and its comorbidities: what clinicians need to know[J]. Adv Ther, 2022, 39(1): 221-243.
- [3] Zhan Q, Deng L, Ding Y, et al. The value of using ELISA to detect orexin-a in cerebrospinal fluid in the diagnosis of narcolepsy[J]. Medicine, 2024, 103(24): e38539.
- [4] Birhanu AG. Mass spectrometry-based proteomics as an emerging tool in clinical laboratories[J]. Clin Proteomics, 2023, 20(1): 32.
- [5] Hirtz C, Vialaret J, Gabelle A, et al. From radioimmunoassay to mass spectrometry: a new method to quantify orexin-A (hypocretin-1) in cerebrospinal fluid[J]. Sci Rep, 2016, 6: 25162.
- [6] Bårdsen K, Gjerstad MD, Partinen M, et al. Considerably lower levels of hypocretin-1 in cerebrospinal fluid is revealed by a novel mass spectrometry method compared with standard radioimmunoassay[J]. Anal Chem, 2019, 91(14): 9323-9329.
- [7] Lindström M, Schinkelshoek M, Tienari PJ, et al. Orexin-a measurement in narcolepsy: a stability study and a comparison of LC-MS/MS and immunoassays[J]. Clin Biochem, 2021, 90: 34-39.
- [8] Phoenix Pharmaceuticals[EB/OL]. (2023-01-01) (2025-03-01) http://www.phoenixbiotech.net/catalog/repository/QCdata_RIK/RK-003-30.pdf.
- [9] Orexin-A/Hypocretin-1, Spinal Fluid: (2023-01-01) (2025-03-01) <https://test.mayocliniclabs.com/test-catalog/overview/604230>.
- [10] Mignot E, Lammers GJ, Ripley B, et al. The role of cerebrospinal fluid hypocretin measurement in the diagnosis of narcolepsy and other hypersomnias[J]. Arch Neurol, 2002, 59(10): 1553-1562.
- [11] Mäkelä KA, Karhu T, Jurado Acosta A, et al. Plasma orexin-a levels do not undergo circadian rhythm in young healthy male subjects[J]. Front Endocrinol, 2018, 9: 710.
- [12] Aegidius HM, Kruse L, Christensen GL, et al. Pre-treatment of blood samples reveal normal blood hypocretin/orexin signal in narcolepsy type 1[J]. Brain Commun, 2021, 3(2): fcab050.
- [13] Mignot EJM. History of narcolepsy at stanford university[J]. Immunol Res, 2014, 58(2-3): 315-339.
- [14] Choi MR, Cho H, Chun JW, et al. Increase of orexin A in the peripheral blood of adolescents with internet gaming disorder[J]. J Behav Addict, 2020, 9(1): 93-104.
- [15] van der Hoeven AE, Fronczek R, Schinkelshoek MS, et al. Intermediate hypocretin-1 cerebrospinal fluid levels and typical cataplexy: their significance in the diagnosis of narcolepsy type 1[J]. Sleep, 2022, 45(5): zsac052.

引证本文:赵显超,任佳封,程金湘,等. 液相层析串联质谱法检测脑脊液食欲素诊断1型发作性睡病的初步探索[J]. 中风与神经疾病杂志, 2025,42(3):195-199.