

血清总胆酸酶法分析及其应用

魏有仁 孙先高

(中日友好医院检验科, 北京 100029)

关键词 胆汁酸, 酶法分析, 3α -羟甾醇脱氢酶 (3α -HSD)

总胆汁酸 (TBA) 是胆甾醇在肝内分解以及在肠-肝循环中胆甾酸代谢产物的总称。又分为初级胆汁酸 (胆酸、鹅脱氧胆酸) 和二级胆汁酸 (脱氧胆酸、石胆酸、熊脱氧胆酸)。血清胆汁酸水平反映肝实质性损伤, 尤其在急性肝炎, 慢性活动性肝炎、酒精肝损伤和肝硬化时有较灵敏的改变, 是肝病实验诊断的一项重要指征。过去主要因检测方法复杂而受到限制, 未能列入常规检验项目。其测定方法可归纳为: (1) 色谱、质谱法, 如高效液相色谱、气相-质谱联用; (2) 特异标记分析法, 如放射免疫、酶免疫法; (3) 酶法测定, 用 3α -羟甾醇脱氢酶 (3α -HSD) 作效应酶。按指示系统不同又分为紫外法、荧光法和比色法。

胆汁酸属 24 碳甾族化合物, 其结构特征是 C_{17} 侧链上有 5 个碳原子, C_5 上羟基立体化学构型属 α 位, 分子中无双键, A/B 环顺式 (*cis*) 耦合。酶法测定原理即利用 3α -HSD 的特异性在 C_3 -OH 位脱氢, 再连接到 NAD-NBT 指示反应。

1974 年挪威学者 SKALHEGG 应用重复等电聚焦技术从假单胞菌属 *Pseudomonas testosteroni* 提取高纯度 3α -HSD 成功^[1], 使此工具酶得以商品化, 这是胆汁酸测定开始进入医学检验领域的一个重要起点, 此酶特异作用于 18、21、24 碳 3α -羟甾族化合物, 使之转化为酮甾醇 (ketosteroid), 还原 NAD 为 NADH, 可用紫外法测定, Mashige 等在此基础上连接 NAD-NBT 指示反应, 实现了酶法测定的比色反应^[2]。近年又有改进, 偶联第二工具酶 3-氧-5 β -甾醇 Δ^4 脱氢酶 (Δ^4 DH), 提高了反应产物甲臌浓度, 消光系数提高^[3]。

日本第一化学制药株式会社和挪威的 NYCOMED AS 合作, 引进工具酶制成总胆汁酸测定试剂盒 (商品名 ENZABILE), 操作简便快速, 也能用于生化自动分析仪。我们用此试剂作了方法学评价, 调查了一批健康人空腹血清 TBA 值, 并已正式用于临床检验。此法线性可达 $180\mu\text{mol/L}$, 反应进程在 10min 后接近平台 (图 1)。干扰试验表明血红蛋白浓度达 440mg/dL 时对 TBA 值 $35.9\mu\text{mol/L}$ 的血清样本有 $-5.1\mu\text{mol/L}$

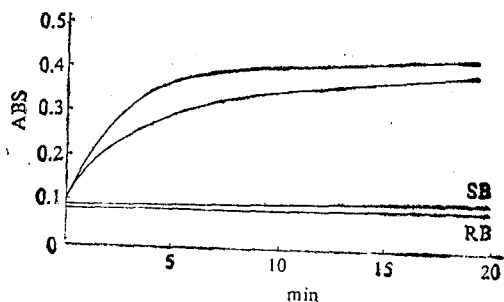


图 1 总胆汁酸经时曲线

的误差, 故应避免用溶血样品。重复性回收率都较好。正常人群测值分布呈正偏态。

我们用这一方法测定了一批肝病患者的血清 TBA 水平 (包括各型肝炎、肝硬化等 150 例)。38 例肝硬化病例中 30 例 GPT, GOT 不高而有 TBA 的升高或明显升高, 提示了 TBA 特有的诊断价值, 据文献报告, 原发性胆汁性肝硬化在早期即有血清 TBA 的升高^[4]。TBA 也有助于估计预后和提示病情的活动性。据 21 例急性肝炎随访调查, 凡 TBA 在 $10\mu\text{mol/L}$ 以下的患者中一年后未发现慢性转归病例, 而 GPT 恢复正常但 TBA 持续异常者 5 例中 4 例转为慢性^[5]。

血清 TBA 对酒精中毒性肝炎, 肝硬化也有其诊断价值^[6]。Joelsson 报告用血清 TBA 和 β -己糖苷酶 (β -HXA) 观察 35 例酒精性肝硬化和 45 例接受门脉分流术的该症患者, 并与传统肝功能指征 (GPT, GOT, γ -GT 等) 进行比较, 结果表明 β -HXA 和 TBA 的阳性率分别为 94% 和 100%, 远高于其他指征, 而且 TBA 水平还有助于鉴别酒精性肝炎与肝硬化^[7]。

国内有相当数量的慢性肝炎, 包括酒精中毒性肝炎患者。其中有的可疑接近肝硬化早期, 但此阶段缺乏比较灵敏的生化诊断指征。如能解决 TBA 酶法试剂在国内市场的供应, 将其列入肝功能检验项目, 会对我国肝病防治工作有很大帮助。

(下转第 476 页)

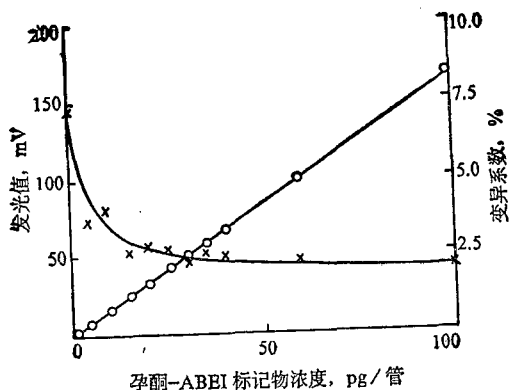


图1 发光测定的线性图(O—O)及其相应的变异系数曲线(X—X)

图中各点均为20个平行管统计结果

线的最高剂量管的发光值不应低于10mV,这样才能保证整条标准曲线的发光测定误差不超过5%。

7. 发光免疫分析的结果变异 除了第6条中的发光测定变异外,还有许多因素影响发光免疫分析的结果。

(1) 血清抽提: 选用不同极性的有机溶剂抽提血清,因抽提出的组分不同,对发光测定将产生不同程度的干扰。如采用无水乙醚抽提血清孕酮时,干扰大,结果很难与放免测定结果对比;而改用正己烷抽提时,干扰小,结果与放免对比良好。

(2) 抗原抗体的结合时间: 用分步竞争法测定孕酮,有些文献[1]报道将孕酮标准品或标本与抗血清在37℃结合15min,再在4℃放置15min,然后加入发光标记物竞争反应。我们的实验表明,这种方法虽然快,但结果的变异偏高,不易控制。原因是孕酮标准品或标本与抗血清未达到饱和结合,管与管间,批与批间容易产生不同的抗原抗体结合率,导致结果变异增大。若将标准品或标本与抗血清的结合时间适当延长,以达到饱和结合,或者先过夜孵育,再进行竞争反应,则

结果的变异减小。

(3) 活性炭吸附时间: 加入活性炭分离游离的标记物,活性炭作用时间愈长,对标记物的吸附越多,甚至竞争已和抗体结合的标记物。为减小批内变异,必须严格控制其作用时间的一致性。通常要求在能准确加样的条件下,以最快的速度,如每min70管,加完活性炭。如果加样时间太长,将导致活性炭作用时间差别太大,增加结果的变异。

(4) 被测液的取样方法: 经活性炭分离后,吸取上清液作发光测定,可用微量加样器定量吸取或采用倾倒法将上清液倒入另一管中。经测定,倾倒法的变异系数比定量吸取法增加约1%。因此,在大批量临床标本的测定时,可采用倾倒法,而进行实验研究时可定量吸取。

(5) 加热的影响: 在进行发光测定前,经固相法分离的被测液中加入氢氧化钠后,于60℃加热一定时间,以促使标记物释放,提高发光强度。在本文的方法中,加热也使所有测定管的发光强度增加至原来的1.2—1.5倍,但同时也使非特异结合管的信号提高到原来的3.5—4倍;另外,加热并不能减小平行管的变异值;因此,发光测定前加热并非必要。

(6) 抗血清的性能: 具有桥效应^[2]的抗血清将导致测定的标准曲线最高剂量管的B/B₀值上升,使标准曲线变得平坦,从而增加测定结果的变异。若能使使用单克隆抗体或者采用不具有桥效应的多克隆抗体,则结果的变异将会降低。

参 考 文 献

- 1 Pazzagli M, Kim J B, Messeri G *et al.* *Clin Chim Acta*, 1981; 115: 287
 - 2 Corrie J E T. In: Hunter W M and Corrie J E T ed. *Immunoassay for Clinical Chemistry*. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1983: 353
- [本文于1990年8月13日收到,11月20日修回]

(上接第479页)

参 考 文 献

- 1 SKálhegg B A. *Eur J Biochem*, 1974; 12: 1075
- 2 Mashige F *et al.* *Clin Chem*, 1981; 27: 1352.
- 3 兒玉隆成 他. 臨床検査機器・試薬, 1987; 10: 335

- 4 田中直見 他. 肝臓, 1981; 22: 785
- 5 五味邦英. 新潟県臨床衛生検査技師會誌, 1986; 26(2): 32
- 6 Mendenhall. *Clin Gastroenterol*. 1981; 10: 417
- 7 Joelsson B *et al.* *Clin Chim Acta*, 1984; 136: 203