

医学生化

全自动生化分析仪测定血清 AST 同工酶

李国君 田亚平 董振南

(解放军总医院生化科, 北京 100853)

摘要 应用天冬氨酸氨基转移酶抑制剂“AMANO-3”水解样品中的线粒体型天冬氨酸氨基转移酶同工酶(m-AST), 测定血清中剩余的胞浆型AST同工酶(c-AST)活性, 进而与总AST活性相比较并计算出受抑制剂水解的m-AST同工酶活性。由于此方法采用蛋白水解反应破坏m-AST, 因此测定方法可直接应用于生化自动分析仪。亦建立了一个适于日立7150分析仪的AST同工酶联合测定方法。其测定和计算出的m-AST同工酶批内CV为3.5%~7.9%; 其结果(y)与AST同工酶电泳迁移率(x)相关。 $y=1.019x-0.489$, $r=0.996$ ($n=30$)。测定了113名健康人m-AST和c-AST, 其m-AST参考值范围1.64~9.64 U/L, $\bar{x}\pm s=(5.641\pm 2.013)$ U/L; c-AST参考值范围5.69~16.81 U/L, $\bar{x}\pm s=(5.641\pm 2.013)$ U/L。

关键词 m-AST同工酶, c-AST同工酶, AST抑制剂“AMANO-3”, 全自动生化分析仪

AST活性测定在临床上主要用于心肌损伤及肝损伤疾病的辅助诊断和观察^[1], 血清中的AST活性包括两类同工酶, 即来源于胞浆的c-AST和来源于线粒体的m-AST^[2]。正常生理条件下, 他们在血清中的活性均很低, 主要来自体内死亡细胞的释放; 在病理情况下, 细胞轻度损伤时表现为血清c-AST增高。但当细胞严重受损时, 线粒体破坏后, 大量的AST释放入体液, 致使血清中m-AST大量增加。也有学者提出了m-AST对酒精性肝损伤有重要的鉴别诊断价值。近年来国外实验室报道了很多有关m-AST的试验方法, 如采用 α -糜蛋白酶, 蛋白酶401等作为c-AST的抑制剂来测定血清m-AST^[1~4]。我们使用日本天野制药株式会社研制的AST同工酶抑制剂作为m-AST水解酶, 将其直接应用于日立7150分析仪上, 操作简便, 结果准确, 适于日常临床生化检验。

1 材料和方法

1.1 试剂

AST试剂盒(购自北京中生公司); AST

同工酶电泳试剂(参考相关方法配制); AST抑制剂“AMANO-3”, 24.3 kU/L(日本天野制药株式会社惠赠); AST定值血清及混合血清。

1.2 仪器

六一牌电泳仪(购自北京中生公司), 贝克曼电泳仪及光密度计, 意大利BT-224半自动分析仪, 日立7150自动生化分析仪。

1.3 方法

1.3.1 AST同工酶电泳方法: 样品6 μ l, 加入AST抑制剂“AMANO-3”(R1) 30 μ l (1 g/L, pH 8 Tris缓冲液)于37℃水浴5 min, 取出后在AST同工酶琼脂糖板上点样, 电流30 mA, 电泳时间12 min, 经活性染色后用贝克曼电泳光密度计扫描。

1.3.2 全自动生化分析仪方法: 用日立7150分析仪操作, 参数为样品12 μ l, AST抑制剂(R1) 80 μ l (1 g/L, pH 8.0 Tris缓冲液), R2为AST试剂230 μ l(按试剂说明配制), 延迟时间60 s, 线性时间3 min, 实验温度37℃, 波长

405 nm/340 nm. 测定结果为 c-AST 活性, m-AST 酶活性按如下公式计算: 酶活性 (m-AST) = 酶活性 (T-AST) - 酶活性 (c-AST).

2 结果和讨论

2.1 AST 抑制剂水解 m-AST 效价观察

配制浓度 0.0 g/L、0.2 g/L、0.4 g/L、0.6 g/L、1.0 g/L 和 2.0 g/L 的 AST 抑制剂, 取混和血清与不同浓度的 AST 抑制剂, 按上述同工酶电泳及日立 7150 自动分析方法操作. 结果见图 1, 2, 3.

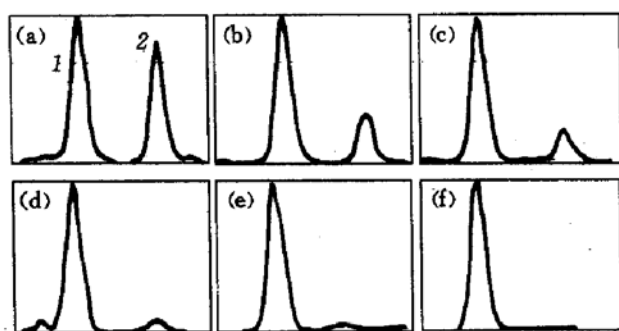


图 1 用同工酶电泳方法测定的血清 AST 同工酶活性

1: c-AST, 2: m-AST. (a) ~ (f): AST 同工酶抑制剂浓度为 0.0、0.2、0.4、0.6、1.0、2.0 g/L.

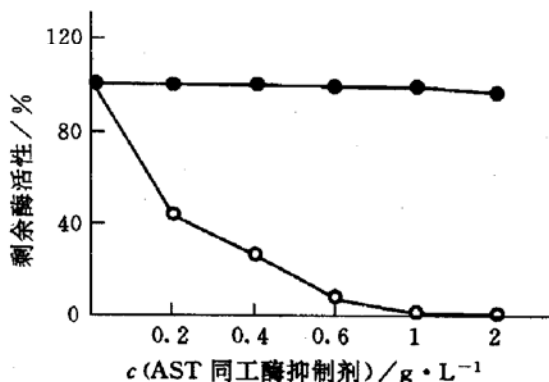


图 2 不同浓度的 AST 同工酶抑制剂对 m-AST 活性的影响

●—●: c-AST; ○—○: m-AST.

从图 1 可见当 AST 抑制剂浓度在 1.0 g/L 时, m-AST 活性被完全抑制, 而 c-AST 则不受影响. 图 2 是通过 AST 同工酶电泳与自动生化分析仪测定的结果计算出的剩余酶活力, 可见

随着抑制剂浓度的增加 m-AST 活性逐渐降低, 至抑制剂浓度达 1.0 g/L 以上时, 只存在 c-AST 活性. 图 3 显示自动生化分析仪的测定结果, 可见 AST 活性逐渐减少至抑制剂 1 g/L 以上时其活性趋于稳定, 表明存在的酶活性不再受影响.

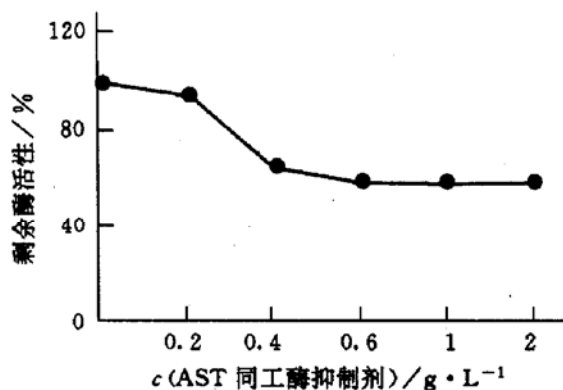


图 3 用日立 7150 分析仪测定的 c-AST 酶活性

●—●: c-AST.

2.2 m-AST 同工酶的抑制曲线

图 2 所取样品 AST 总活性 5660 U/L, 通过 AST 同工酶电泳及生化分析仪测定, 计算出可抑制 m-AST 同工酶活性为 2394.2 U/L.

2.3 抑制反应时间对测定 c-AST 的影响

取混合血清与抑制剂分别放在 37℃ 水浴 2.5、5.0、7.5、10.0 min, 取出按本文提供的参数在 BT-224 半自动分析仪上测定 c-AST 活性, 结果表明在 37℃ 水浴 5 min 时, 测定结果趋于稳定, 延长至 10 min 对结果无影响.

2.4 试剂稳定性观察

配制的 AST 抑制剂置 2~8℃ 保存, 取定值血清每日测定 c-AST 活性, 图 4 为连续 5 d 测定所得数据, 它表明 AST 抑制剂在 2~8℃ 可稳定 48 h 对结果无影响.

2.5 精密度分析

取低值及高值 m-AST 样品两份, 在日立 7150 上做重复实验 ($n=20$), 结果表明低值样品批内 $CV=7.9\%$ ($\bar{x}=7.7$ U/L), 高值样品批内 $CV=3.5\%$ ($\bar{x}=290$ U/L).

2.6 方法间比较

选取不同样品 30 份, 分别进行 AST 同工

酶电泳及在自动分析仪上测定. 结果表明本方法 (y) 与 AST 电泳方法 (x) 相关良好, $y = 1.019x - 0.489$, $r = 0.996$.

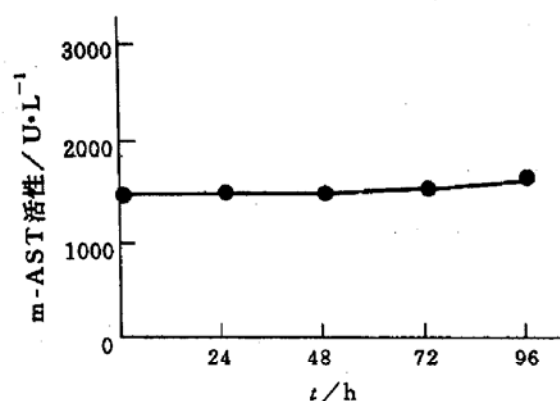


图4 AST同工酶抑制剂稳定性观察

●—●: m-AST.

2.7 正常参考值

取健康人血清样品 113 份 (男 68, 女 45, 年龄 18~79 岁). m-AST 正常参考值范围为 1.64 ~ 9.64 U/L, $\bar{x} \pm s = (5.641 \pm 2.013)$ U/L. c-AST 正常参考范围 5.69 ~ 16.81 U/L, $\bar{x} \pm s = (11.251 \pm 2.779)$ U/L.

2.8 临床应用

留取临床确诊的心肌梗塞, 肝细胞癌, 肝硬化及慢性肝炎病人样品共 72 例, 分别测定 AST、m-AST、GPT、TBA、CK 和 LD, 结果可见心梗病人除 CK、LD 普遍增高外, m-AST 较之总 AST 增高明显 (m-AST 测定结果平均

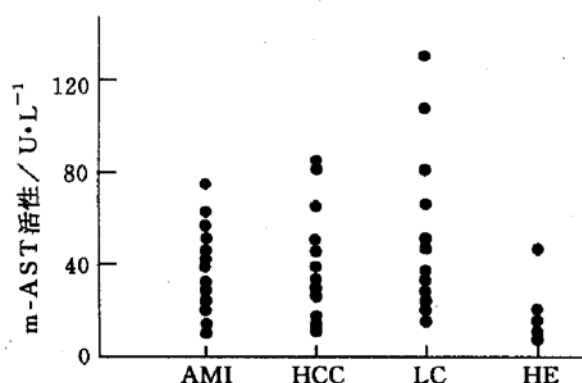


图5 检测不同疾病时 m-AST 同工酶水平

AMI: 急性心梗, HCC: 肝细胞癌, LC: 肝硬化, HE: 慢性肝炎.

30.3 U/L); 肝硬化病人总胆汁酸 (TBA) 含量明显增高, 同时 m-AST 的增高也很明显; 肝细胞癌病人 m-AST 亦有增高; 而慢性迁延性肝炎病人 m-AST 增加多为不明显 (图 5).

2.9 结论

本文所报道的联合测定方法采用蛋白水解酶水解待测样品中来自线粒体的 AST, 使其失活, 但不影响待测酶的活性. 可直接用于自动分析仪测定, 无需像有关报道的方法那样先分离复合物^[5,6]. 方法同时应用现在市售的 AST 试剂盒, 可同时测得 T-AST、c-AST、m-AST 活性. 它对临床心脏、肝脏疾病的辅助诊断及病情观察具有重要价值. 由于采用了自动化分析, 测定简便快速, 方法亦适合于多种半自动及全自动生化分析仪.

致谢 日本天野制药株式会社惠赠“AMANO-3”AST 同工酶抑制剂, 特此致谢.

参 考 文 献

- 1 Watazu Y, Okabe H, Sugiuchi H *et al.* Clin Biochem, 1990; 23: 127
- 2 Watazu Y, Uji Y, Sugiuchi H *et al.* Clin Chem, 1990; 36: 687
- 3 Shirahase Y, Watazu Y, Kaneda N *et al.* Clin Chem, 1992; 38: 2193
- 4 Teranishi H, Morino Y, Nishino T *et al.* Clin Biochem, 1988; 21: 347
- 5 Watazu Y, Okabe H, Sugiuchi H *et al.* Clin Biochem, 1990; 23: 12
- 6 Iriarte A, Hubert E, Kraft K *et al.* J Biol Chem, 1984; 259: 723

Studies on the Measurement of AST Isoenzyme Activities by Using Automatic Analyzer. Li Guojun, Tian Yaping, Dong Zhennan (Department of Clinical Biochemistry, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China).

(下转第 93 页, Continued on page 93)

新型脂质体铁磁流体复合体

徐小妹 许孙曲

(南方冶金学院, 赣州 341000)

磁流体和脂质体都是近期发展起来的新型液态功能材料, 都可以悬浊液使用. 磁流体具有奇异的特性和用途, 脂质体则在生物医学上逐渐崭露头角. 把两种材料的制作技术结合起来, 可以合成更具功能特性的易于控制的新型磁性脂质体 (magnetoliposomes). 如果采用的是铁磁流体, 则称为脂质体铁磁流体复合体 (ferrofluid composites with liposomes, FCL). 它是含有磁性颗粒 (如 Fe_3O_4) 的脂质体囊泡的悬浊液, 既有铁磁流体性能, 又有脂质体功能.

近年来, 国外对 FCL 的研究有了新的进展, 比利时、日本等国家都开展了 FCL 的研究, 制备了多种 FCL, 用于应用研究. 例如, 比利时用两性离子二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱制成磷脂双层包裹的纳米级磁性颗粒, 进而制成 FCL,

并发现膜状 FCL 可能用在磁性控制的生物反应器上. 日本也研究制成了磁性荧光免疫分析用的 FCL. 前苏联等许多国家也进行了许多这方面的研究.

FCL 可像脂质体那样用于免疫学中, 作靶向载体, 使药物能选择性治疗各种疾病; 作佐剂增强免疫作用; 提高体外抗原抗体反应敏感性; 与 c-反应性相互结合可激活补体. 在基因工程中, 可作为携带核酸物质进入细胞的载体, 运载 RNA 和 DNA 到动物细胞. FCL 也可用于临床. 总之, FCL 除了具有脂质体原有的性能和用途, 还具有其特殊的磁性可控制性, 从而强化了脂质体原来的使用性能.

收稿日期: 1995-11-20

(上接第 91 页, Continued from page 91)

Abstract A very simple method to determine the activity of AST isoenzymes by using the AST inhibitor AMANO-3 has been developed. This inhibitor is a protease which selectively proteolyzes m-AST in the sample and no influence to the activity of c-AST. The coefficient of variation of the proteolytic method is among 3.5%~7.9%. Results obtained by the present method correlated with those by the electrophoresis method. In

the present assay system, reference values for mitochondrial AST activity in healthy people ranges from 1.64~9.64 U/L and the reference values for cytosolic AST activity in healthy people range from 5.55~16.85 U/L. The study showed that the selective measurement of AST isoenzyme method is a rapid and accurate method. It has great clinical significance.

Key words mitochondrial AST, cytosolic AST, AST inhibitor, automatic analyzer