

人血清肌红蛋白的放射免疫测定

——急性心肌梗死早期诊断指标

宋兰芝 严敏官 侯桂珍 李振甲

(中国科学院生物物理研究所) (解放军总医院)

王仁芝 韩春生 王玉有

(军事医学科学院) (原子能研究所)

肌红蛋白(Myoglobin, 简称 Mb) 是横纹肌细胞中一种含亚铁血红素的蛋白质, 分子量为 16000—17500。与血红蛋白很相似, 能与氧可逆结合。其功能主要是贮存氧气。

Mb 在临床上引起注意, 是因为当心肌坏死时, 它进入血循环中, 在血清中出现。由于分子量较小, 能透滤过肾小球, 也出现于尿中, 故可以把血清和尿中 Mb 增加做为急性心肌梗死的诊断指标之一。

目前建立的几种测定肌红蛋白的免疫学方法^[1], 都不能检出血清肌红蛋白轻、中度增高。1975 年后建立的肌红蛋白放射免疫测定法^[2,3], 既特异, 又灵敏, 最低检出值为 0.3—0.5 毫微克(3—10 毫微克/毫升血清), 需抗血清量少, 步骤简单, 经适当改进, 可在几小时以内, 得出结果, 适合急性心肌梗死早期诊断的要求。

方法与结果

一、人 Mb 的提纯^[4,5]与鉴定

1. Mb 的提纯 将死后几小时正常人骨骼肌立即浸入液氮中。提取在 4℃ 下进行。剔去脂肪和筋膜, 剪碎, 用冷生理盐水洗两次。以每克肌肉加 2 毫升冷蒸馏水匀浆, 用 2N NH₄OH 调 pH 至 7.5。放置过夜后离心匀浆液(4500 转/分) 60 分钟, 弃去沉淀, 过滤上清液(除去脂肪), 加硫酸铵使达 70% 饱和度, 调 pH 至 7.5, 11,000 转/分, 离心 30 分钟, 弃去沉淀, 再加硫酸铵, 使达 100% 饱和度, 调 pH 至 7.0。放置过夜后, 11000 转/

分, 离心 30 分钟, 弃去上清液。用适量冷蒸馏水将沉淀溶解并转移到透析袋内。透析时, 往流动的蒸馏水中加入少量的铁氰化钾溶液, 使转变成正铁型, 再用 0.02M pH 8.4 的 Tris-HCl 缓冲液透析。经 DEAE-纤维素(Whatman DE-32) 离子交换柱层析(柱床 4 × 10.5 厘米)进一步分离纯化, 用 0.02M pH 8.4 的 Tris-HCl 缓冲液洗脱。根据分光光度计测得的 409 毫微米和 280 毫微米 OD 值的比值, 合并所需的洗脱液。对蒸馏水透析后, 冰冻干燥, 得到棕褐色正铁型肌红蛋白的粉末。

2. Mb 的纯度鉴定 用吸收光谱扫描, 结果见图 1。

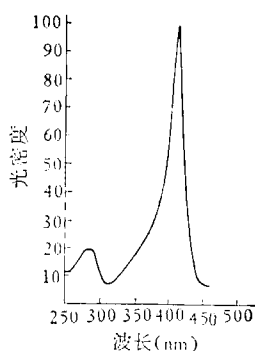


图 1 人肌红蛋白吸收光谱扫描图

根据文献[5,6] 正铁型 Mb 在 409 毫微米和 280 毫微米光密度的比值应大于 4.9。我们测得的比值是 5.2。

聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳, 显示一染色很深的条带, (其下方还有一很浅的模糊条带)。

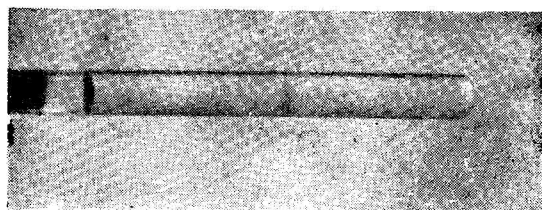


图2 人肌红蛋白聚丙烯酰胺凝胶电泳

见图2。

红光谱测定法,用氰化的人的Mb克分子消光系数(CN-Mb分子量取17500、pH7.2,280毫微米, $\epsilon = 3.07 \times 10^4$)计算及Folin-Phenol定蛋白法,测定纯化人Mb标准物的浓度。

根据典型的标准抑制曲线,交叉反应曲线,高Mb血症病人血清连续稀释所得的抑制曲线及实验的初步结果,可以认为抗原纯度符合使用要求,可用于免疫动物,制备 ^{125}I 标记抗原和作为放射免疫测定的标准物。

二、抗体的产生及鉴定

1. 抗体的产生

用人Mb免疫雄性家兔8只多点皮下注射。首次免疫前每只动物先注射百日咳-白喉二联疫苗0.5毫升,以刺激其免疫功能,再注射Mb1.0毫克(福氏完全佐剂)。第一次加强免疫相隔两周,抗原量为0.3毫克,以后加强相隔四周, Mb0.3毫克,用不完全佐剂。每次加强后检查抗血清的结合滴度,需要时并做标准抑制曲线,判断抗体的免疫活度。动物颈动脉放血,分离出抗血清,冰冻干燥保存。

2. 抗体的效价和特异性 动物免疫后27天开始产生抗体,以后抗体滴度继续升高。图3表明不同稀释度的抗血清与 ^{125}I -Mb的结合率。根据图6的标准抑制曲线说明抗体的免疫活度和滴度已符合放射免疫测定的要求。使用抗体的稀释度为1:800至1:2000(最终稀释度为1:5200至1:13000)。8只动物都产生了可用的抗体。

用浓度为1毫克/毫升的人血红蛋白(Hb),人肌酸激酶(CK)和人血清白蛋白(HSA)与抗血清做交叉反应实验,表明抗体与上述三种蛋白质在浓度为Mb浓度(360毫微克/毫升)的2000多倍时尚无交叉反应,说明抗体是特异

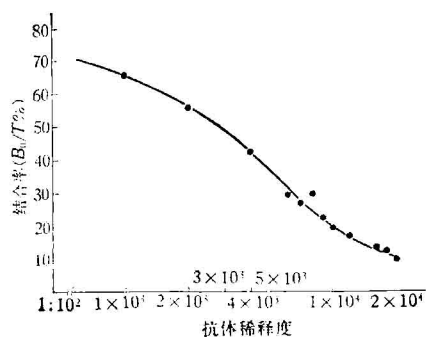


图3 抗血清滴度曲线

的(图4)。

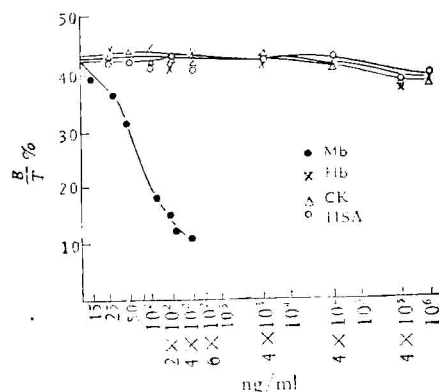


图4 抗血清同三种蛋白质的交叉反应实验

三、人Mb的放射性碘化

据报道,用常规的氯胺-T法难以直接碘化人的Mb,这是建立人Mb放射免疫测定的障碍。我们亦曾试验过,也未成功。遂参照Bolten-Hunter的“联接碘化法”^[1],其原理如图5所示^[8]。首先合成了Bolten-Hunter试剂,即3-4-羟基苯丙酸N-羧琥珀酰亚胺酯简写HPNS。先用氯胺-T法制备 ^{125}I -HPNS,再与Mb联接起来,经过Sephadex G-50柱分离,制成 ^{125}I -Mb。洗脱曲线如图6所

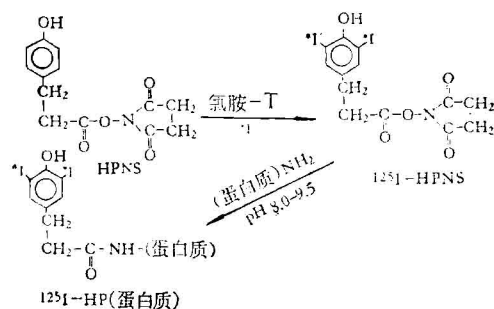


图5 “联接碘化法”示意图

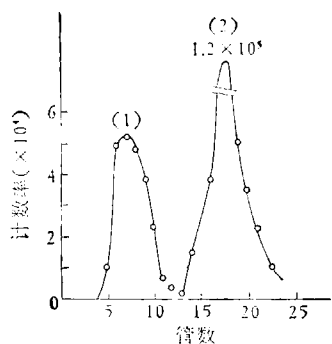


图6 ^{125}I -人肌红蛋白 Sephadex G-50 洗脱曲线

(1) ^{125}I -Mb (2) ^{125}I -HPNS

示。 ^{125}I -Mb 的放射性比度为 20—30 微居里/微克, 与抗人 Mb 的抗体能产生特异的免疫结合反应。

四、Mb 的放射免疫测定法及标准抑制曲线

1. Mb 的放射免疫测定法(简写 Mb-RIA)
磷酸缓冲液(PBS)含有磷酸盐 0.1M (pH7.5) 0.1% 牛血清白蛋白(BSA). NaCl 0.1M, NaN_3 1 克/升。4℃ 保存,用以稀释 Mb 标准物、抗血清及 ^{125}I -Mb。标准工作液稀释成 10、25、50、75、100、200、300、400、600 毫微克/毫升, 4℃ 保存至少 1—2 个月以上都是稳定的。

放射免疫测定步骤详见表 1。各步骤均在带盖塑料管中进行。用硫酸铵沉淀法分离 B. F。据计算加入一定体积的饱和硫酸铵,使其最终浓度为 45%。加硫酸铵后要立即混匀,以免局部浓度过高,产生局部沉淀反应,影响结果的准确性。

每次测定都要有非特异结合管和样品非特异结合管。每个标准管和样品管的计数率都要减去相应的非特异结合管的计数率,得到结合计数率。

$$\frac{B}{T} \% = \left\{ \frac{[\text{标准或样品计数率} - \text{相应的非特异结合计数率}]}{[\text{总计数率}]} \right\} \times 100 \%$$

2. 人 Mb 的标准抑制曲线 如图 7,其灵敏的区域在 Mb 为 0—240 毫微克/毫升之间。240 毫微克/毫升以上,曲线较平直,灵敏度减低。这说明 Mb 含量高的样品须经过稀释才能得出

表 1 人血清肌红蛋白放射免疫测定步骤

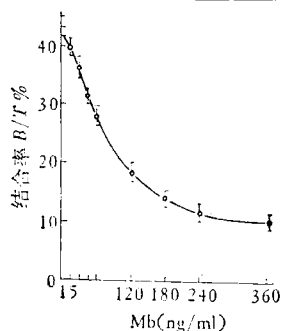
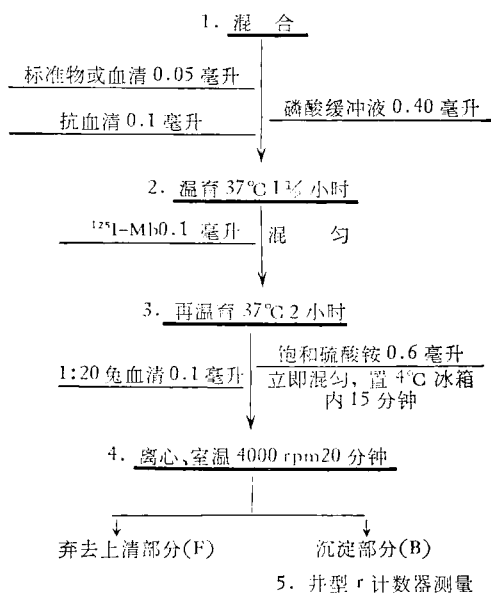


图 7 标准抑制曲线(n=5)

准确的数值。

为提高标准曲线的灵敏度,采用非平衡竞争结合测定法^[8]。先将非标记抗原与抗体温育一段时间,然后再加 ^{125}I -Mb,再温育。非平衡法的标准曲线的斜率略大于平衡法(即抗原与标记抗原同时温育)。

五、人 Mb 的正常值 用本方法测定 94 名正常人血清 Mb 的浓度,平均值为 37.61 ± 16.71 毫微克/毫升($\bar{x} \pm S.D.$);实测范围为 2—78 毫微克/毫升。另测定一份正常人的混合血清, Mb 平均值为 41.9 毫微克/毫升也落在上述正常值范围内。与文献记载的正常值比较(表 2),初步确定本法的正常值上限为 85 毫微克/毫升。

六、心肌梗死病人血清 Mb 的数值 测

表 2 人血清肌红蛋白正常值

正常人例数	血清 Mb 值 (ng/ml)		参考文献
	$\bar{x} \pm SD$	范 围	
92	28.9 ± 17.3	6—85	[2]
男 17 男 26 女 32 女 25	37 ± 13 39 ± 16 21 ± 10 25 ± 7	10—68	[3]
男 52 女 68	12.8 ± 5.2 13.4 ± 6.9	3—23 1—28	[1]
13	25 ± 23	3—75	[6]

定临床确诊为急性心肌梗死患者 40 例的血清,自发病 24 小时以内的血清 Mb,均值为 443.8 ± 568.8 毫微克/毫升,实测范围为 94—3500 毫微克/毫升。发病后 Mb 立即升高;12 小时内明显升高;24 小时以后大幅度下降;48 小时以后开始恢复正常。

图 8 列出一组急性心肌梗死患者发病过程中血清 Mb 的变化情况。其中一例 72 小时后 Mb 再次升高(箭头所示),心电图亦反映出又发生了一次新的梗死。

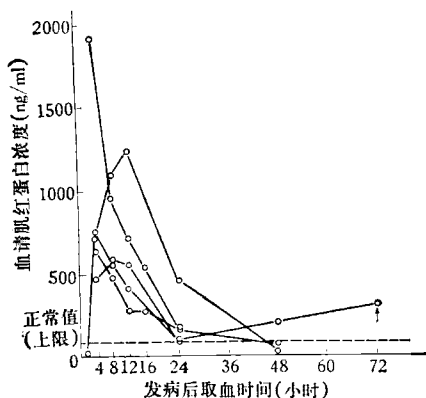


图 8 心肌梗死患者血清 Mb 变化情况

七、方法的准确度、重复性和灵敏度

用回收检查、血清稀释试验,检验方法的准确度。

往已知 Mb 浓度的血清中加入不同浓度的 Mb 标准物,测得回收率为 94.50%—106.70%,平均回收率为 99.94%。

将一例高 Mb 血症病人血清用缓冲液做不同倍数的稀释,测定 Mb 的浓度,在 0—400 毫微克/毫升之间,测定值呈直线关系(图 8)。

把上述病人的血清连续稀释(从 1:2—1:32)所得到的抑制曲线与加 Mb 标准物的抑制曲线互相平行,也呈典型标准抑制曲线形状(图 9)。这有力地说明高 Mb 血症病人血清中的 Mb 与所提纯的 Mb 免疫性质相同。

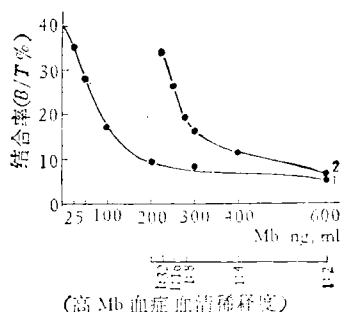


图 9 健全性试验

- (1) Mb 标准抑制曲线
- (2) 高 Mb 血症病人血清抑制曲线

同一次测定 9 个相同的混合血清样品,平均值为 $41.89 \pm 1.05 (\bar{x} \pm SD)$,变异系数为 2.5%,同一样品半月内 5 次测定,变异系数为 3.7%。

从 5 次平均的标准抑制曲线来看(图 6),最低检出值为 15 毫微克/毫升(0.75 毫微克/管)。

讨 论

一、急性心肌梗死死亡率高,极需早期诊断方法

已有的化验指标有肌酸激酶和乳酸脱氢酶,但急性发病时二者在血清中开始升高的时间都较 Mb 晚。而血清 Mb 几乎马上升高,在 6—12 小时即可达高峰。但其下降速度也快,自血清中消失的半减期为 6.7 ± 3.2 小时,在发病后 3—4 天内(甚至在 24 小时以内)就恢复正常值^[1]。因此要求方法既要灵敏准确,又要迅速简单,最好能在几小时内得出结果。目前只有放射免疫法能满足这些要求。

本文报告的 Mb-RIA 方法,除灵敏、精确、特异重复性符合要求,注意了减少测定所需的时间。我们将温育时间 3.5 小时缩短为 2 小时,结

表 3 影响¹²⁵I-Mb 非特异结合的因素

	同 位 素 ⁽¹⁾		缓 冲 液 中 的 保 护 蛋 白 ⁽³⁾				沉 淀 剂 ⁽²⁾	
	冻 融 后	4℃ 保 存	明 胶 ₍₁₎	明 胶 ₍₂₎	0.1% 牛血清白蛋白	1% 正常兔血清	聚乙二醇	硫 酸 铵
非特异结合 %	28.50	20.23	26.97	20.23	12.16	19.94	14.18	27.45

说明: <1> 用明胶₍₂₎和硫酸铵
 <2> 用明胶₍₁₎
 <3> 用硫酸铵

果二者的标准抑制曲线很接近。故在 3—4 小时内得出化验结果是完全可能的。

二、关于非特异结合 用盐类和有机溶剂沉淀抗原-抗体复合物,以分离 B 和 F,将产生非特异性结合(亦称空白结合),若结合过高就会影响结果。我们的实验结果说明,非特异性结合受多种因素的影响:

1. 沉淀剂用硫酸铵,其最终浓度在一定范围内并不影响非特异结合的多少,但却明显影响 Mb 的 B、F 分离效果。根据实验结果图 10,选用硫酸铵的最终饱和度为 45%。若沉淀剂用聚乙二醇(PEG)其非特异结合就较低,但要求条件较严格。

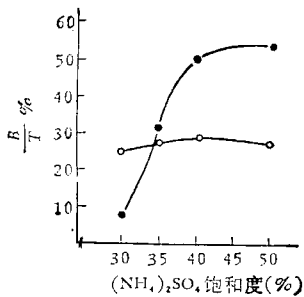


图 10 硫酸铵的盐析曲线

● 特异结合 ○ 非特异结合

2. 保护蛋白 用 0.1% 牛血清白蛋白(BSA)与硫酸铵合用,其非特异结合亦较低。明胶的质量不同影响也较大,如优质明胶(明胶2)其非特异结合就较低。因此,为经济和易于推

广应选用合适的保护蛋白与硫酸铵合用可以把非特异结合降低到 10% 以下。

3. 标记物质量: ¹²⁵I-Mb 的质量直接影响非特异结合,如结合过高,大多是碘化过程有问题。

4. 血清样品的非特异结合常与缓冲液的非特异结合有些差别。这与血清样品及缓冲液保护蛋白的种类、浓度有关。理想的方法是选用合适的保护蛋白,使二者一致,但这不易做到,这就需增测血清样品非特异结合管。

三、放射免疫法测定血清 Mb 是早期诊断心肌梗死灵敏的方法 我们观察到几例心肌梗死病例,在心电图未能确诊前, Mb 即明显升高。因此测定血清 Mb 方法对心肌梗死早期诊断和鉴别诊断很有价值,对了解病变的程度和愈后也有参考意义。缩短测定时间,简化步骤,便于临床推广,可采用固相免疫方法。现在定型的 Mb-RIA 药箱即将投产,可供使用。

参 考 文 献

- [1] Kazuo Mivosh.: *J. Lab. Clin. Med.*, **93**, 341, 1978.
- [2] Stone, M. J.: *J. Clin. Invest.*, **58**, 1334, 1975.
- [3] Rosano, T. G.: *Clin. Chem.*, **23**, 69, 1977.
- [4] Yamazaki, I.: *JBC*, **239**, 4145, 1964.
- [5] Brown, WD.: *JBC*, **236**, 2238, 1961.
- [6] Reichlin, M.: *Circulation*, **57**, 52, 1978.
- [7] Bolten, A. E.: *Biochem. J.*, **133**, 529, 1973.
- [8] Parker, C. M.: *Radiimmunoassay of Biologically active Compounds*, pp. 94, 130, 141; 1976.

[本文于 1979 年 9 月 20 日收到]