

人血浆 LCAT 活力测定方法的探讨——自身底物法

彭 腾 刘秉文

(华西医科大学生物化学教研室, 成都)

提 要

本文介绍了一种简单快速的人血浆 LCAT 活力测定方法。本方法以血浆本身为底物, 用酶法测定游离胆固醇的降低来反映 LCAT 活力大小。在 37°C 反应 60 分钟, LCAT 活性可达 100nmole/ml/hr 左右。方法测定的灵敏度较高, 重复性好。

卵磷脂胆固醇脂酰转移酶(简称 LCAT)能催化血浆卵磷脂 β 位的不饱和脂酰基转移至游离胆固醇, 生成胆固醇酯和溶血卵磷脂。LCAT 在脂蛋白(简称 HDL)的代谢及胆固醇逆向转运中起重要作用^[1,2]。LCAT 由肝实质细胞制造并分泌入血中发挥作用。测定血浆 LCAT 活力对探讨脂蛋白代谢, 以及与脂蛋白代谢障碍有关的疾病有一定参考意义。

材 料 和 方 法

1. 材料 人血浆, 胆固醇氧化酶 (Boehringer), 辣根过氧化物酶 (Sigma), 胆固醇 (Serva), ApoA₁ 本室制备。

2. Nagasaki 显色剂 由 0.27% 4-氨基氨基替比林-0.4% Triton X-100:0.68% 苯酚: 胆固醇氧化酶: 辣根过氧化物酶按 30ml:30ml:

薄薄地贴了一层。

下面是 $n_k = 64$ 时, 处理前后的二幅图象见封 2 图 3。

4. 一个图象分析的实例

分析的对象是: 在一个细胞分裂为两部分相对应的部位上, 取同样大小的面积。对该面积上蛋白颗粒的计数, 以确定这两部分的蛋白颗粒的分布密度比。

处理和步骤为: 增强反差、锐化、二值化。对补洞后的二值图象计算其欧拉数^[3,4]。用 8 点邻域来补洞。分析结果: 图 4A 有蛋白颗粒数 187 个, 对应的图 4B 有 781 个。两者蛋白颗粒数的比为 $P = \frac{781}{187} = 4.2$ 。这一分析结果给有关研究者提供了定量分析细胞结构的依据。

三、讨 论

用这种被称为启发式的方法来处理和析超微结构的图象具有一定的灵活性。可以在逐步处理和析的过程中得到较为满意的结果。但是, 受人因素为影响。有待简化人机对话

的过程以提高处理速度。

以上处理和析的结果均为室内自然光象输入。光线的不均匀将影响图象的清晰度, 以致有损于处理和析的结果。但是, 对同等条件下处理和析一对进行比较的图象来说, 仍不失其可靠性。

在图象分析实例中, 有众多的蛋白颗粒堆积在一起时, 现在还无法将其分开。本文只将其算作一个颗粒。为了精确起见, 仍可用常规的统计方法, 以蛋白颗粒的平均面积去除堆积在一起的面积就得到了它的颗粒数。或者干脆将它剔除掉, 再进行计数。

参 考 文 献

- [1] Rosenfeld, A. et al.: 《数字图象处理》, (余英林等译), 人民邮电出版社, 北京, 1982 年。
- [2] Gonzalez, R. C. et al.: 《数字图象处理》, (李淑梁等译), 科学出版社, 北京, 1982 年。
- [3] Serra, J.: *Image Analysis And Mathematical Morphology*, London, Academic Press, 1982.
- [4] Duda R. O. et al.: *Pattern Classification and Scene Analysis*, Wiley, New York, 1973.

[本文于 1987 年 5 月 15 日收到]

15u:100u 配制成。

3. 方法 以人血浆作自身底物测定 LCAT 活力。静脉取血, EDTANa₂ 抗凝, 离心分离血浆。血浆分为两份, 一份置于冰浴中 60 分钟作总胆固醇测定用, 另一份置于 37°C 保温 60 分钟作游离胆固醇测定用。然后从上述两份血浆中各取 50 μl, 分别加入 1.0ml 显色剂, 再在 37°C 保温 15 分钟。完毕, 立即取出, 在 500nm 处比色测定游离胆固醇的含量。同时以胆固醇应用液 (1290 μmol/L) 作标准。

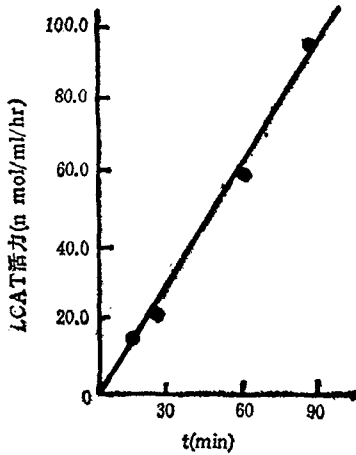


图 1 保温时间对 LCAT 活力的影响

$$\text{LCAT 活力} = \frac{\text{总胆固醇 O.D.} - \text{游离胆固醇 O.D.}}{\text{标准管 O.D.}}$$

$$\times \frac{\text{胆固醇标准浓度}}{\text{标准浓度}} \times \frac{\text{总反应液体积}}{\text{血浆体积} \times \text{保温时间}}$$

单位: nmole/ml/hr。

结 果

1. 保温时间对 LCAT 活力的影响 从图 1 可见随着保温时间的延长, 在 90 分钟内, 酶活力呈直线增高。我们选用 37°C 保温 60 分钟作 LCAT 活力测定的反应条件。

2. 不同稀释度血浆对 LCAT 活力的影响 从图 2 可见, 血浆稀释度加大, LCAT 活力呈直线下降。我们选用原血浆作 LCAT 活力测定。

3. ApoA₁ 对血浆 LCAT 活力的影响 许多研究证明载脂蛋白 A₁ (简称 (ApoA₁) 在

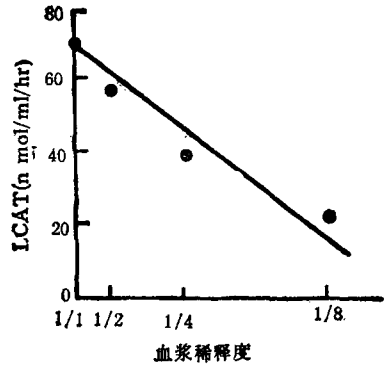


图 2 不同稀释度血浆对 LCAT 活力的影响

体外可激活 LCAT^[3]。从图 3 也可见, 加 ApoA₁ (125 μg/50 μl) 的血浆, 比相应未加 ApoA₁ 的血浆其 LCAT 活性明显增高, 约增高 1—8 倍。说明在体外 ApoA₁ 对 LCAT 活性有明显激活作用。同时亦说明本法测定的酶活性确为 LCAT 的活性。加有 ApoA₁ 的曲线表示当保温时间延至 1.5 小时, LCAT 活力大大下降。这可能是随着保温时间的延长, 底物消耗增加, 而在 ApoA₁ 的激活下 LCAT 活性又很高以至于底物不够所致。

4. 血浆放置时间对 LCAT 活性的影响

我们测定并比较了新鲜血浆、4°C 放置 4 小时

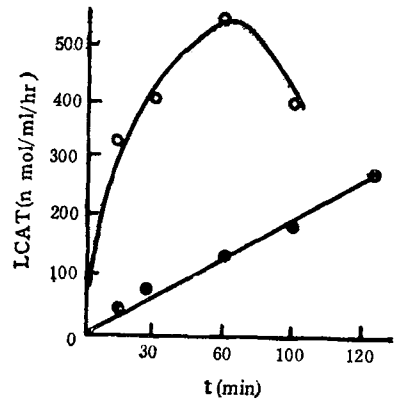


图 3 ApoA₁ 对血浆 LCAT 活力的影响

○—○ 加 ApoA₁ ◻—◻ 未加 ApoA₁

和 24 小时血浆 LCAT 活力, 结果为新鲜血浆比 4°C 放置 4 小时血浆 LCAT 活性高 31.1% (37°C 保温 60 分钟), 而比 4°C 放置 24 小时血浆 LCAT 活性高 145.1% (37°C 保温 60 分

钟)。由于 LCAT 对温度、pH 均很敏感。温度高于 60℃、pH 低于 6.0, LCAT 即失活。特别是它为一种巯基酶,对氧化剂极为敏感。所以其活性极不稳定。本实验也说明血浆放置过久, LCAT 活性下降。所以应采用新鲜血浆作 LCAT 活力分析。

5. 重复性 同一血浆样品平行测定 4 次,其重复性为 $240.7 \pm 19.3 \text{ nmole/ml/hr}$ (平均值 \pm 标准差),变异系数(简称 C.V.)为 8.0%。另一血浆样品平行测定 5 次,其重复性为 $203.4 \pm 20.0 \text{ nmole/ml/hr}$, C.V. 为 9.9%。由此可见,本法测定的重复性已达到一般酶法要求。(注:作重复性观察所用血浆为饱食者血浆。)

6. 正常人血浆 LCAT 活性 对 8 例年龄为 22—27 岁的健康男女的血浆 LCAT 活力进行了测定,其平均值及标准差为 $108.99 \pm 29.46 \text{ nmole/ml/hr}$,比 Nagasaki 用外加二棕榈酰卵磷脂作底物所测得的正常值 $89.2 \pm 17.3 \text{ nmole/ml/hr}$ 略高。这可能是测试对象的年龄差异所致。

讨 论

迄今为止,已建立了多种 LCAT 活力测定方法。常用的有通用底物法^[4]、外加底物法^[5]和双抗体放免测定法^[7]等。通用底物法是以同位素标记的游离胆固醇为底物。由于外加标记的游离胆固醇很难完全与血浆脂蛋白中胆固醇平衡,所以影响测定的准确性。外加底物法是加双棕榈酰卵磷脂至血浆中作为底物。该底物必须乳化,但每次乳化不易一致,所以影响测定的准确性。作者也用该法观察了不同保温时间

对 LCAT 活力的影响,其曲线的线性关系很差。双抗体放免法是直接测定酶蛋白量,虽敏感、准确,特异性强,但其操作复杂,耗时长,需纯化 LCAT 并制备单价抗血清。我们曾采用自身底物法测定血浆 37℃ 保温 6 小时时游离胆固醇的下降或酯化胆固醇的增加的百分数,以此作为 LCAT 的相对活性指标^[6]。胆固醇含量用化学方法进行测定。此法操作较繁琐、耗时,特别是保温过程中,反应液易挥发,影响测定的准确性。本文所用的自身底物法是以血浆本身为底物,用胆固醇氧化酶和辣根过氧化物酶在苯酚和 4-氨基氨基替比林存在下,将游离胆固醇氧化成红色的醌类化合物,以 500nm 处比色测定游离胆固醇的降低来反映 LCAT 活力大小。在 37℃ 保温 60 分钟, LCAT 活性可达 100 nmole/ml/hr 左右。所以测定的灵敏度较高而且操作简单,方法重复性好。

承上海市第三人民医院心血管研究室陈铭生同志提供胆固醇氧化酶,本教研室刘婉珍同志参加部分工作,谨此致谢。

参 考 文 献

- [1] Glomet, J. A. et al.: *Adv. Lipid Res.*, 1973, 11, 1.
- [2] Nelson, G. J. et al.: *Blood Lipids and Lipoproteins*, 1972, 745, 825.
- [3] Fielding, C. J. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1972, 46, 1493.
- [4] Stokke, T. C. et al.: *J. Clin. Lab. Invest.*, 1971, 27, 21.
- [5] Nagasaki, T. et al.: *Clin. Chem. Acta*, 1977, 75, 371.
- [6] Liu Bin-wen et al.: *Chinese Med. J.*, 1979, 92, 822.
- [7] Albers, J. J. et al.: *J. Clin. Invest.*, 1981, 67, 141.

[本文于 1987 年 4 月 8 日收到]