

用 Phast System 自动电泳仪快速测定血清 CK-MM 亚型及初步临床应用

唐志毅 杨振华

(北京医院,北京 100730)

提 要

本文介绍了在 Phast System 全自动电泳仪上用等电聚焦法对血清 CK-MM 亚型的快速测定。灵敏度高,分辨率好,用 1 小时即可完成测定,特别适合临床需要。30 例正常人血中 CK-MM₁ 含量为 44.3%, CK-MM₂ 为 38.9%, CK-MM₃ 含量最低为 16.7%, MM₃/MM₁ 比值小于 1。而 12 例患者血中 CK-MM 亚型有明显变化,初步证实本法对早期诊断急性心肌梗塞 (AMI) 和溶栓治疗后判断是否出现再灌注有较高的临床价值。

关键词 等电聚焦, CK-MM 亚型, 急性心肌梗塞, 溶栓疗法

随着肌型肌酸激酶 (CK-MM) 亚型基础研究的不断深入, 在临床上有了更加广泛的应用, 不仅用于急性心肌梗塞 (AMI) 的早期诊断, 而且有助于溶栓治疗中及时判断是否出现再灌注。临床对于 CK-MM 亚型测定的方法学也提出了更高的要求, 不仅要有足够的灵敏度, 而且需在最短时间内得出结果。目前常用方法^[1-3] 都很难满足这些要求。最近我们采用等电聚焦方法, 在 Phast System 全自动电泳仪上对血清 CK-MM 亚型进行分离和定量分析, 并已初步用于临床。

电泳结束后进行同工酶染色。在聚焦好的凝胶板上均匀涂铺 0.1mlCK 基质溶液, 在 45℃ 孵育 20min, 用蒸馏水冲去多余的基质溶液, 加 0.1mlCK 同工酶显色剂, 待区带呈色后, 用 5% 冰醋酸固定, 在光密度计上扫描。

表 1 血清 CK-MM 亚型的快速等电聚焦电泳条件

步骤	电压 (V)	电流 (mA)	功率 (W)	温度 (°C)	持续时间 (Vh)
1.1	2000	2.0	3.5	10	75
1.2	200	2.0	3.5	10	15
1.3	2000	5.0	3.5	10	510

材 料 与 方 法

瑞典 Pharmacia 公司生产的 Phast System 全自动多功能快速水平电泳仪及 Phast Gel 5—8 聚丙烯酰胺薄层凝胶板。

CK 基质液为瑞士罗氏公司的产品, CK 同工酶显色剂为 0.03% NBT 与 0.01% PMS, 临用前按 20:1 混合。

方法: 取 Phast Gel 聚丙烯酰胺薄层凝胶板 (pH5—8) 一块, 阳极侧加血清 1μl, 照表 1 的条件进行等电聚焦。

实 验 结 果

1. 线性

取 CK 总酶活性为 1600U/L 的血清, 分别稀释为 50U/L、100U/L、200U/L、400U/L、800U/L 及 1600U/L, 加样 4μl, 在同一块凝胶板上快速等电聚焦后, 观察不同浓度标本对测定结果的影响。结果见表 2。

结果提示, 血清 CK 总酶 50U/L—1600U/L 之间用本法测定 MM 亚型所得结果近似, 具有较好的线性, 灵敏度和准确度都能满足临床

表2 血清 CK-MM 亚型测定的线性范围

CK(U/L)	CK-MM ₁ (%)	CK-MM ₂ (%)	CK-MM ₃ (%)
50	48.3	35.1	16.6
100	45.5	33.9	20.2
200	44.7	35.3	19.9
400	41.2	36.4	22.3
800	43.8	37.4	18.7
1600	44.0	35.8	20.2
平均值	44.6	35.7	19.7
标准差	2.3	1.2	1.9

要求。国外文献报道的相同方法的线性范围只在 302U/L—1210U/L 之间^[4]。

2. 重复性实验

在 pH5—8 聚丙烯酰胺凝胶板上点血清样 1 μ l, 快速等电聚焦后进行同工酶染色并扫描。CK-MM 亚型测定结果的重现性见表 3。和国外报道^[4] CK-MM₁, CK-MM₂ 及 CK-MM₃ 批内变异系数分别为 14.1%, 7.05%, 14.4% 相比, 本文结果明显好, 这可能与本文严格控制实验条件以及仪器重复性好有关。

表3 重现性实验结果

	n	平均值	变异系数
CK-MM ₁	16	22.9 \pm 1.3	5.7
CK-MM ₂	16	44.1 \pm 2.0	4.6
CK-MM ₃	16	32.9 \pm 1.7	5.1

3. 正常人血中 CK-MM 亚型的测定

取经我院体检健康人血清 4 μ l, 按前述方法进行 CK-MM 亚型的测定。结果与国外报道的数值相近^[5](见表 4)。

表4 健康人血中 CK-MM 亚型的测定结果

n = 30	CK 总酶 (U/L)	CK-MM ₁ (%)	CK-MM ₂ (%)	CK-MM ₃ (%)
平均值	78.8	44.3	38.9	16.6
标准差	20.0	8.8	6.3	5.4

讨 论

1. 快速等电聚焦的条件选择

CK-MM 亚型经电泳分离后主要有 3 条区带, 称为 CK-MM₁, CK-MM₂ 和 CK-MM₃,

等电点分别为 6.36, 6.32 和 6.90^[6]。因此用等电聚焦法测定 CK-MM 亚型, pH5-8 的聚丙烯酰胺凝胶分离效果最好。另外应在阳极侧加样, 使 CK-MM 亚型的泳动方向与血清蛋白泳动方向相反, 避免其干扰, 得到较好的分离效果。

由于 Phast Gel 厚度只有 0.35mm, 加样最多为 4 μ l, 对 CK 总酶活性很低的血清标本很难检出, 为此可采取以下两个办法:

(1) 在电泳结束后, 对 CK 总酶小于 200 U/L 的血清标本适当延长加入 CK 基质后孵育时间, 即在第 1 次孵育 20min 后, 再加一次基质液继续孵育 20min。同时延长加入同工酶显色剂的显色时间直到显色清晰为止。

(2) 去除非特异性显色^[7]

对于低活性标本由于孵育时间长, 加入同工酶显色剂后往往出现底色, 干扰定量, 这可能与 CK 基质中还原剂 N-乙酰半胱氨酸有关, 当加入四唑蓝显色剂时产生非特异显色。为此, 可将孵育好的凝胶板均匀涂铺 0.5ml 0.5% N-乙酰马来亚酰胺溶液, 放置 10min 后用蒸馏水冲洗, 再加 NBT 溶液显色。由于 N-乙酰马来酰胺有较强的抑制非特异性显色作用, 使显色后的凝胶板背景清亮, 虽然 CK-MM 活力很低, 显色很淡, 仍可以看到分离清晰的 3 条区带, 并可进行定量扫描。图 2 为 CK 总酶活性只有 33U/L 的血清标本扫描图。

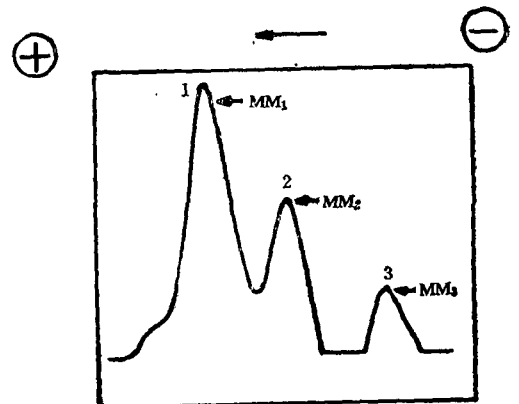


图1 CK 活性为 33U/L 血清标本的等电聚焦扫描图
1. CK-MM₁ 2. CK-MM₂ 3. CK-MM₃

2. 本法与其它电泳法的比较

CK-MM 亚型测定最常用的为电泳法,包括等电聚焦法,但至少需要 3h 才能发报告,远远不能满足临床要求。最近报道的快速琼脂糖电泳法^[2],虽在 1h 就能报告结果,但灵敏度和分辨率尚不能令人十分满意。相比之下,Phast System 电泳仪不仅灵敏度高,分辨率好,而且具有快速的特点。表 5 为本法与快速琼脂糖电泳法的比较。

表 5 血清 CK-MM 亚型测定的方法比较

	快速琼脂糖电泳法	本法
点样量	20 μ l	1—4 μ l
点样位置	阴极	阳极
电泳时间	25min	20min
分辨率	低浓度标本分离不好	3 条区带分离清晰
最低检出限	50U/L	30U/L
操作方法	手动	自动

图 2 为同一血清标本分别用两种方法进行 CK-MM 亚型测定的区带扫描图的比较。

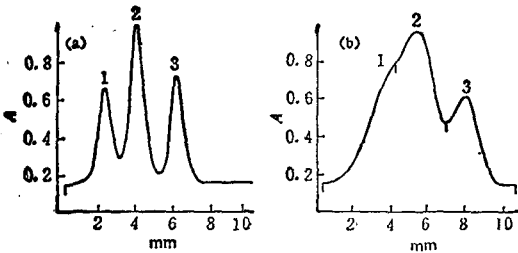


图 2 同一血清标本用不同方法测定的扫描图比较
(a) 本法 (b) 快速琼脂糖电泳法

从图 2 中可以看出,CK-MM 亚型在 Phast System 电泳仪上经等电聚焦法分离,3 条亚型区带完全分开并可进行定量扫描,而在普通电泳仪上的快速琼脂糖电泳则分离不佳,无法进行准确的定量。

3. 初步临床应用

(1) 在急性心肌梗塞 (AMI) 早期诊断中的应用

AMI 发病 4—6h 内,有相当一部分患者虽然已经表现出 AMI 症状,但心电图检查和血中 CK 总活性,CK-MB 及 LDH 同工酶等都没有异常变化。而 CK-MM 亚型的异常变化在 AMI 患者血中出现最早^[3],发病 2—4h 内 CK-MM₃ 含量急剧增加,CK-MM₃/CK-MM₁ 比值由正常值小于 1 转变为大于 1,对 AMI 具有极好的特异性和诊断价值。

我们对 12 例临床怀疑有 AMI 的患者利用本法进行了血清 CK-MM 亚型的测定。其中 8 例最后确诊为 AMI,另 4 例排除 AMI 诊断。为了观察其早期诊断意义,我们只分析了发病不超过 6h 的患者血清测定结果(见表 6)。

从表 6 可以看出,此两组中 CK 总活性确诊组高于除外组,但统计学没有显著差异,确诊组中有两例 CK 总活性分别为 105U/L 和 81U/L,低于正常值,除外 AMI 组中有两例 CK 总活性分别为 162U/L 和 214U/L,高于正常值。说明在 AMI 早期 CK 总活性的诊断价值有限。另外,我们对此 12 例还进行了 CK-MB 的电泳测定,除 AMI 组中 1 例 CK-MB 为 6.7% 外,其余都小于 5%,可见 CK-MB 测定对于早期 AMI 诊断灵敏度不高。但 CK-MM 亚型的分析表明两组间有极其显著差异。其中 CK-MM₁、CK-MM₃ 以及 MM₃/MM₁ 比值经统计学处理 P 值均小于 0.01。在确诊组中 CK-MM 亚型的谱形全是 MM₃ > MM₂ > MM₁,除外 AMI 组中 CK-MM 亚型的谱形都为 MM₃ < MM₂ < MM₁。特别是如果将 MM₃/MM₁ 比值大于 1 或小于 1 做为 AMI 确诊或

表 6 CK-MM 亚型临床测定结果

组别	总 CK(U/L)	MM ₁	MM ₂	MM ₃	MM ₃ /MM ₁
确诊 AMI 组 (n = 8)	429.6 \pm 373.0	8.1 \pm 3.0	29.6 \pm 10.5	62.2 \pm 11.5	9.0 \pm 5.0
除外 AMI 组 (n = 4)	139.3 \pm 61.3	52.3 \pm 5.0 ¹⁾	34.4 \pm 3.9	12.3 \pm 7.3 ¹⁾	0.2 \pm 0.1 ¹⁾

1) P < 0.01

表7 溶栓治疗成功的某 AMI 患者血中总 CK、CK-MB 及 CK-MM 亚型的变化

发病后时间 (h)	总 CK (U/L)	CK-MB (%)	CK-MM ₁ (%)	CK-MM ₂ (%)	CK-MM ₃ (%)	MM ₃ /MM ₁
3	220	4.7	2.3	27.3	70.2	30.5
4	1160	5.1	1.0	7.5	92.5	92.5
6	2196	5.7	1.0	26.5	73.4	73.4
8	3583	7.0	5.6	30.7	63.6	11.4
10	3302	6.5	10.4	38.0	51.6	5.0
14	2474	3.3	27.6	44.7	27.5	1.0
20	1737	2.4	49.2	37.6	13.2	0.3
26	1066	—	54.7	33.9	11.4	0.2

除外的分界值, 那么本实验结果可以把确诊的 8 例和除外 4 例完全分开(见图 3)。

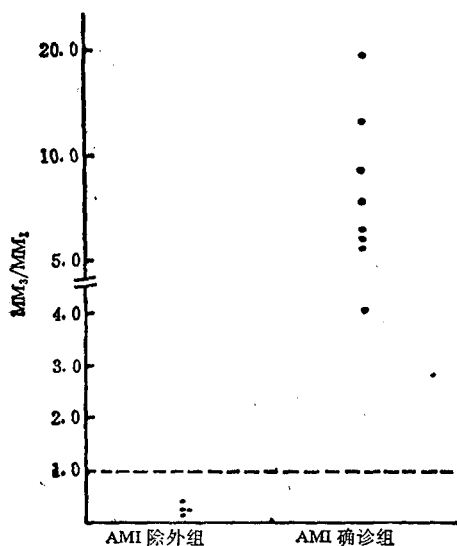


图3 MM₃/MM₁ 比值分布图

(2) 急性心肌梗塞溶栓治疗效果的判断

在 AMI 的治疗上溶栓药物目前应用较多。测定血中 CK-MM 亚型的变化是判断溶栓治疗后是否出现再灌注的最快速而灵敏的方法。有人提出, 以溶栓治疗后 CK-MM₃ 含量变化的峰值或 CK-MM₃/CK-MM₁ 比值变化的峰值提前出现, 做为出现再灌注的标志^[9], 也有人认为, 以 CK-MM₃ 每小时下降率超过 3.1% 为指标, 能更有效的判断是否出现再灌注^[10]。Phast System 电泳仪因其具有快速、灵敏和分辨率高的特点, 可以及时监测患者血中 CK-MM 亚型的变化情况, 为临床溶栓治疗效果的判断提供可靠的依据。

表 7 为一成功进行了溶栓治疗的 AMI 患者发病后血中总 CK、CK-MB 以及 CK-MM 亚型的变化情况。该患者于发病后 2h 开始接受溶栓治疗, 随后出现了明显的再灌注。从实验结果中可以看到, 该患者经过溶栓治疗后, 虽然总 CK 活性、CK-MB 出现峰值的时间均提前到发病后的 8h, 但 CK-MM₃ 和 CK-MM₃/CK-MM₁ 比值的峰值提前的更早, 为发病后的 4h, 与 Apple^[4] 报道的结果相似。从 CK-MM₃ 到达峰值的发病后 4h 到发病后 6h 仅 2h 内, CK-MM₃ 就由 92.5% 下降到 73.6%, 平均每小时下降 9.6%, 远远高于 Puleo^[10] 提出的 3.1% 的数值。本病例充分证实, 血中 CK-MM 亚型的变化做为判断溶栓治疗效果的指标, 不仅与临床诊断相一致, 而且比总 CK 活性及 CK-MB 的测定更及时, 灵敏度更高。

总之, Phast System 全自动电泳仪不仅可以在实验室对血中 CK-MM 亚型进行快速、灵敏和精确的测定, 而且在临床诊断和治疗上发挥着重要的作用。

参 考 文 献

- 1 杨振华等. 中华医学检验杂志, 1990; 34: 134
- 2 王玻等. 中华医学杂志, 1990; 70: 401
- 3 唐志毅等. 中华医学检验杂志, 待发表
- 4 Lessard F et al. Clin Chem, 1990; 36: 1128
- 5 Morelli R L et al. Circulation, 1983; 67: 1283
- 6 Apple F S et al. Clin Chem, 1986; 32: 41
- 7 罗玲等. 中华医学检验杂志, 1990; 13(1): 13
- 8 Jaffe A S et al. Circulation, 1986; 74: 105
- 9 Apple F S et al. Clin Chem, 1987; 33: 507
- 10 Puleo P R et al. Circulation, 1987; 75: 1162

[本文于1990年6月8日收到, 8月24日修回]