

## 医学生化

## 凝集素法测定骨性碱性磷酸酶及临床应用

彭志英 东云华<sup>1)</sup> 韦晓明<sup>2)</sup> 郑 虎<sup>3)</sup>

(华西医科大学附属第一医院检验科, 成都 610041)

**摘要** 选用凝集素分离法测定骨性碱性磷酸酶 (bone alkaline phosphatase, B-ALP). 分别对健康男儿童 123 例和成人及老年 66 例, 进行 B-ALP 和总 ALP 活性的测定. 结果显示, 在儿童骨生长阶段 B-ALP 水平随年龄增长而增高, 到 14~16 岁时开始逐渐下降至成人水平, 男女间增高和下降时间有所不同. 同时对临床骨折病人 60 例测定以上项目, 表现为 B-ALP 活性在骨折后一段时期内升高, 提示骨形成活跃. 粉碎性骨折两周后 B-ALP 活性有显著性差异,  $t=2.92$ ,  $P<0.01$ , 而裂缝性骨折三周后出现显著性,  $t=5.14$ ,  $P<0.01$ . 骨折病人自身比较, 一周后出现显著性差异,  $t=3.51$ ,  $P<0.05$ . 凝集素法操作简便、重复性好, 高低浓度血清的批内、批间变异系数分别为 6.12%、8.5% 和 6.4%、9.5%. 是临床观察骨代谢情况的一项有用指标.

**关键词** 骨性碱性磷酸酶, 凝集素, 骨折

**学科分类号** R446.11

碱性磷酸酶 (ALP) 可根据所在组织部位分为肝性、骨性、肠性、肾性、胎盘性几种同工酶<sup>[1]</sup>, 其中 B-ALP 来源于成骨细胞, 当骨形成大于骨吸收时, 血清中会明显增高, 它是反映成骨细胞活性和骨形成的敏感指标之一<sup>[2]</sup>. 人类在骨生长期 B-ALP 活性明显增加, 成人活性较低<sup>[1]</sup>. 临床上骨折等引起骨形成活跃的疾病会使 B-ALP 活性升高; 而引起骨吸收增加的疾病如骨质疏松、骨髓瘤等, B-ALP 活性将会减低<sup>[3]</sup>.

B-ALP 的检测方法很多, 有电泳法<sup>[1]</sup>、放免法、免疫捕获法<sup>[4]</sup>、麦胚凝集素沉淀法<sup>[5]</sup>以及多组分抑制系统分析法等<sup>[6]</sup>. 有报道, 测定肝性和骨性 ALP 时, 放免法和免疫捕获法分别有 7% 和 12.7% 的交叉反应<sup>[4]</sup>, 而麦胚凝集素法仅有 4%<sup>[7]</sup>. 免疫法与凝集素法相关系数为 0.95<sup>[7]</sup>. 有人评价麦胚凝集素法时发现在测定肝炎病人血清时, 有病理性骨性反应活性<sup>[5]</sup>, 称假性骨性 ALP. 也有人发现在 B-ALP 中有 < 5% 的非骨性 ALP 存在, 因此参考值偏高<sup>[8]</sup>.

我们选用了 Rosalki 等<sup>[9]</sup>报道的方法. 该法的精密度检测为: 批内重复性 ( $n=24$ ,  $CV=3.2\%$ , B-ALP 活性=67 U/L); 批间重复性 ( $n=20$ ,  $CV=6.9\%$ , B-ALP 活性=76 U/L). 相关性测定: 与相继热失活法 (sequential heat-inactivation) 比较, 133 例 (骨病 24、肝病 50 和

健康人 59) 相关系数  $r=0.98$ ; 与电泳法比较, 骨性 ALP  $r=0.99$ ,  $n=108$ ; 肝性 ALP  $r=0.92$ ,  $n=108$ .

作者采用该法测定 B-ALP 活性, 对健康人和骨折病人分别进行了比较. 以下对方法学及检测结果作一简单介绍.

## 1 材料与方法

### 1.1 标本采集

分别于以下各组人群采集静脉血, 分离血清: 3~6 岁健康儿童 90 例, 其中男 47, 女 43; 11~16 岁健康少年 38 例, 其中男 19, 女 19; 20~79 岁健康成人 66 例, 其中男 36, 女 30; 60 名骨折病人.

### 1.2 试剂及仪器

5 g/L 麦胚凝集素 (Sigma 公司, 临用前配制)<sup>[5]</sup>; 35 mmol/L SDS 生理盐水; 20 g/L Triton X-100; ALP 诊断试剂盒 (北京中生公司); 7170A 全自动生化分析仪.

### 1.3 实验操作

取血清 100  $\mu$ l 至小试管中, 加入 20 g/L

<sup>1)</sup> 华西医科大学分析测试中心, 成都 610041.

<sup>2)</sup> 华西医科大学医检专业 94 级, 成都 610041.

<sup>3)</sup> 华西医科大学药学院, 成都 610041.

Tel: (028) 5422615, E-mail: pengzy@mail.sc.cninfo.net

收稿日期: 1999-11-09, 修回日期: 2000-02-24

Triton X-100 5  $\mu$ l, 振荡摇匀. 置 37 $^{\circ}$ C 水浴箱 30 min. 取出试管, 加入麦胚凝集素 100  $\mu$ l, 振荡摇匀. 再置入 37 $^{\circ}$ C 水浴箱中 30 min. 2 000  $g$  离心 15 min, 弃去上清液后, 并用滤纸吸干离心管边残留的上清液. 用 SDS 200  $\mu$ l 溶解沉淀, 置生化分析仪测定 B-ALP 活性.

#### 1.4 注意事项

**1.4.1** 为防止酶活性降低, 标本应在采集后 4 h 之内测定, 否则应将血清置于有盖离心管中放 -18 $^{\circ}$ C 低温冰箱内保存<sup>[5]</sup>.

**1.4.2** 沉淀应与上清液分离完全, 如残留上清液于沉淀中, 会使 B-ALP 活性偏高.

**1.4.3** 凝集素须在 -18 $^{\circ}$ C 冰箱保存, 配制好的可在 2~8 $^{\circ}$ C 保存 1 个月<sup>[1]</sup>.

## 2 结 果

### 2.1 方法精密度测试

**2.1.1** 批内重复性: 高低浓度血清各同批重复测定 10 次. 高值:  $x = 210$  U/L,  $s = 12.86$ ,  $CV = 6.12\%$ ; 低值:  $x = 54$  U/L,  $s = 4.42$ ,  $CV = 8.5\%$ .

**2.1.2** 批间重复性: 高低浓度血清日间重复测定 7 次, 其结果与 Behr 等<sup>[5]</sup>报道相近 (高值:  $x = 213.7$ ,  $s = 14.76$ ,  $CV = 6.4\%$ ; 低值:  $x = 53.4$ ,  $s = 5.10$ ,  $CV = 9.5\%$ ).

### 2.2 健康人群结果

将 90 例 3~6 岁健康儿童, 38 例 11~16 岁健康少年以及 66 例 20~79 岁健康成人的血清. 分别测定其 ALP 活性及 B-ALP 活性, 并对其结果加以分析. 其中 B-ALP 活性结果见图 1 和图 2.

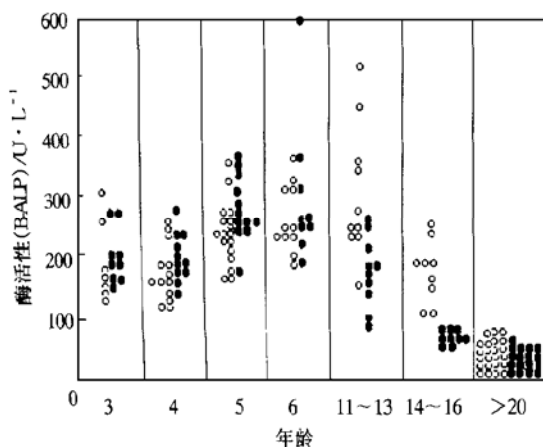


图 1 各年龄组 B-ALP 活性变化

○: 男性; ●: 女性.

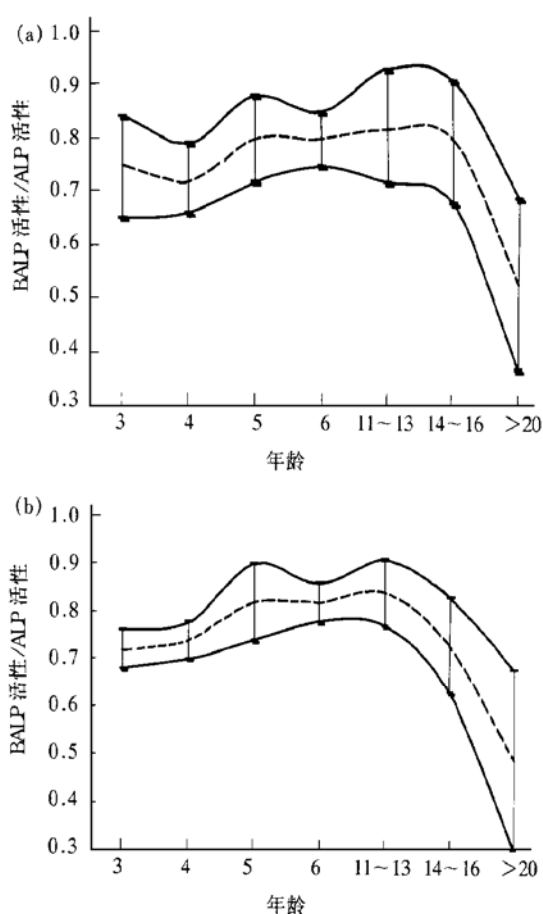


图 2 B-ALP 活性/ALP 活性比值变化图

(a) 男性比值变化图; (b) 女性比值变化图.

从图 1 可以看出, 儿童的 B-ALP 活性随年龄增长逐渐增高, 男性出现高峰较女性晚, 到 14~16 岁时活性出现下降趋势, 这与儿童自然生长规律相吻合. 图 2 是 B-ALP 活性/ALP 活性比值. 可以看到 ALP 骨组分随年龄变化的情况. 儿童期 ALP 主要以骨性为主, 比值随年龄增长而升高, 9~12 岁为最高, 与 van Hoof 等<sup>[1]</sup>的报道基本一致, 到 14~16 岁比值逐渐下降. 另外, 女性 B-ALP 升高较男性早, 下降也较男性早, 且下降较快, 与女性生长发育较早相吻合.

本次实验采集了 66 例健康成人中, 男 36 例 (20~79 岁); 女 30 例 (20~69 岁), 由于例数较少, 没有再分年龄段. 测量结果见图 1 和图 2. 可以看出成年人的 B-ALP 活性比儿童的有明显下降, B-ALP 活性在 ALP 中所占比例亦有显著降低. 可见, 当骨形成与吸收处于相对恒定时期, B-ALP 活性处于一较低的水平.

成年女性 B-ALP 活性较成年男性低, 经两样本均数  $t$  检验 ( $t = 2.29$ ,  $P < 0.05$ ) 有显著性差异.

### 2.3 骨折病人的 B-ALP 活性变化情况

我们先后对本院骨科病房的 60 例 (20~82 岁) 骨折病人测定 B-ALP 活性, 其中 25 例粉碎性骨折, 35 例裂缝性骨折。且有 25 例病人做了一周后的复查。数据分析如下:

**2.3.1 骨折病人 B-ALP 活性变化:** 由于不能较长时间跟踪随访单个病例, 这里仅从总体均数随时间变化情况来观察。图 3 看出骨折后体内 B-ALP 活性有所上升。经两均数  $t$  检验分别与骨折后一天比较, 粉碎性骨折两周后有显著性改变,  $t = 2.92$ ,  $P < 0.01$ , 而裂缝性骨折则 3 周出现显著性差异,  $t = 5.14$ ,  $P < 0.01$ 。可能与断面大小有关。经 1 周和 2 周粉碎性与裂缝性均数比较, 1 周  $t = 1.74$ ,  $P > 0.05$  和 2 周  $t = 0.96$ ,  $P > 0.05$ , 无显著性意义。4 周以后, B-ALP 活性有所下降。

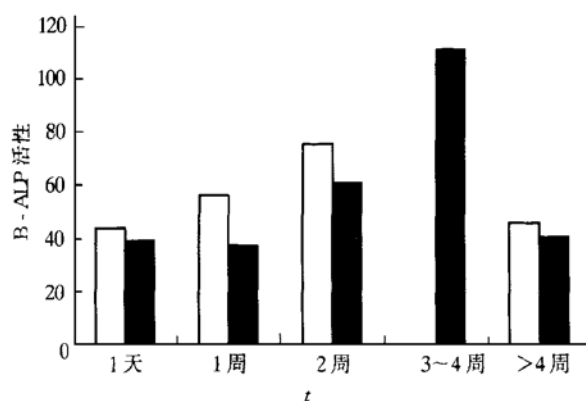


图 3 骨折病人 B-ALP 活性测量结果分析

□: 粉碎性骨折; ■: 裂缝性骨折。

**2.3.2 骨折病人 B-ALP 活性/ALP 活性比值的变化 (图 4):** 经用两均数  $t$  检验与骨折第 1 天比较,

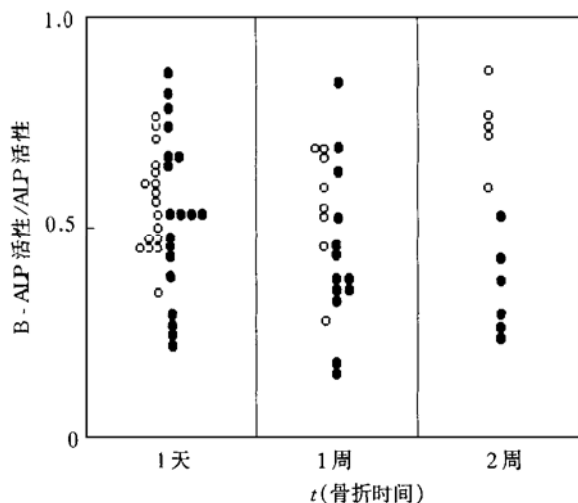


图 4 骨折病人 B-ALP 活性/ALP 活性的变化

○: 粉碎性骨折; ●: 裂缝性骨折。

同样可以看出 B-ALP 活性/ALP 活性比值与 B-ALP 活性改变相同, 只是比值的变化没有 B-ALP 活性变化明显。粉碎性骨折 2 周后出现显著性改变,  $t = 3.91$ ,  $P < 0.01$ ; 而裂缝性骨折改变无显著性意义,  $t = 1.62$ ,  $P > 0.05$ 。

**2.3.3 骨折后 1 周与骨折当天结果比较:** 60 例病人中 25 例做了 1 周后的复查, 结果分析如表 1。

表 1 骨折后 1 周与骨折当天 B-ALP 活性对照

| 时间   | n  | B-ALP     |      |      |        |
|------|----|-----------|------|------|--------|
|      |    | $\bar{x}$ | s    | t    | P      |
| 1 天  | 25 | 40.9      | 26.5 |      |        |
| 1 周后 | 25 | 54.5      | 30.3 | 3.51 | < 0.05 |

经同体比较  $t$  检验对骨折 1 周前后进行比较, B-ALP 活性在骨折后 1 周出现显著性差异,  $t = 3.51$ ,  $P < 0.05$ 。

### 3 结 论

综上所述, 儿童 B-ALP 活性明显高于成人, B-ALP 活性/ALP 活性比值也较高, 男孩 B-ALP 活性升高幅度大于女孩, 上升和下降都比女孩晚, 与生长发育相吻合。成人 B-ALP 活性则处于较稳定的低水平。

骨折病人 B-ALP 活性和 B-ALP 活性/ALP 活性在骨修复期有一定程度的增高, 增高幅度与骨折断面及程度有关。

该方法简便易行, 重复性较好, 实验条件易于控制, 是一种适合临床应用方法。

### 参 考 文 献

- 1 van Hoof V O, Hoylaerts M F, Geryl H, *et al.* Age and sex distribution of alkaline phosphatase isoenzymes by agarose electrophoresis. Clin Chem, 1990, **36** (6): 875~878
- 2 Leung K S, Fung K P, Sher A H L, *et al.* Plasma bone-specific alkaline phosphatase as an indication of osteoblastic activity. J Bone Joint Surg Br, 1993, **75** (2): 288~292
- 3 Price C P, Thompson P W. The role of biochemical test in screening and monitoring of osteoporosis. Ann Clin Biochem, 1995, **32** (3): 244~260
- 4 Price C P, Milligan T P, Dart C. Direct comparison of performance characteristics of two immunoassays for bone isoform of alkaline phosphatase in serum. Clin Chem, 1997, **43** (11): 2052~2057
- 5 Behr W, Barnert J. Quantification of bone alkaline phosphatase in serum by precipitation with wheat-germ lectin: a simplified method and its clinical plausibility. Clin Chem, 1986, **32** (10): 1960~

1966

- 6 Tillyer C R. Error estimation in the quantification of alkaline phosphatase isoenzymes by selective inhibition methods. *Clin Chem*, 1988, **34** (12): 2490~ 2493
- 7 Bouman A A, de Ridder C M, Nijhof J H, *et al.* Immuno-adsorption assay for bone alkaline phosphatase compared with wheat germ agglutinin precipitation assay in serum from (pre) pubertal girls. *Clin Chem*, 1996, **42** (12): 1970~ 1974
- 8 Rosalki S B, Foo A Y, Burlina A, *et al.* Multicenter evaluation of iso-ALP test kit for measurement of bone alkaline phosphatase activity in serum and plasma. *Clin Chem*, 1993, **39** (4): 648~ 652
- 9 Rosalki S B, Foo A Y. Two new methods for separating and quantifying bone and liver alkaline phosphatase isoenzymes in plasma. *Clin Chem*, 1984, **30** (7): 1182~ 1186

**Determination of Alkaline Phosphatase Activity by the Agglutinin Precipitation Assay and Its Clinical Application.** PENG Zhi-Ying ( *First Hospital Laboratory Medicine of West China University of Medical Science, Chengdu 610041, China* ); DONG

Yun-Hua ( *Analyze and Determine Center of West China University of Medical Science, Chengdu 610041, China* ); WEI Xiao-Ming ( *Department of Laboratory Medicine, West China University of Medical Science, Chengdu 610041, China* ); ZHENG Yong ( *College of Pharmacology, West China University of Medical Science, Chengdu 610041, China* ).

**Abstract** The agglutinin precipitation assay was used to determine the bone alkaline phosphatase. The advantage of this assay is simple manipulation, and good reproducibility. Coefficient variation within and between runs were 6.12%, 8.5% and 6.4%, 9.5% respectively. It is concluded that serum B-ALP levels is an useful parameter for clinical observation of the bone metabolism.

**Key words** bone alkaline phosphatase, agglutinin, bone fracture

(上接第 447 页, Continued from page 447)

**Application of Mass Spectrometry in Quality Control of Oligonucleotide Drugs.** YANG Bing-Hu, WANG Sheng-Qi ( *Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China* ).

**Abstract** Synthetic oligonucleotides and their analogs have shown promising potential therapeutic agents in the treatment of viral infections and certain cancers. As drugs, the full characterization of oligonucleotides requires complete verification. Chromatographic or electrophoretic techniques can be used in analysis of concentration and purity of

synthetic oligonucleotides, but the analytic methods have been limited in analysis of base composition, sequence, identity and modification of oligonucleotides. Ability of mass spectrometry to discriminate mass make MS effective, sensitive, rapid and accurate to determine these characterizations of oligonucleotides. application of mass spectrometry in quality control of synthetic oligonucleotides was introduced.

**Key words** oligonucleotides, mass spectrometry, quality control