

淀等繁琐费时的步骤,具有微量、快速、简便等优点,非常适用于大规模筛选抗氧化剂。另外,也适用于多种抗氧化剂活性的比较(同条件)研究。迄今,我们已应用 96 孔板法筛选了 400 多种化合物,并发现了一些具有抗氧化活性的化合物。

参 考 文 献

- 1 Jackson R L, Ku G, Thomas C E. *Med Res Rev*, 1993; **13** (2): 161
- 2 孙士勇. 国外医学肿瘤学分册, 1990; **17** (2): 65
- 3 Halliwell B, Gutteridge M C. *Human Toxicol*, 1988; **7**: 7
- 4 Slater T F. *Methods Enzymol*, 1984; **105**: 284
- 5 孙士勇, 韩 锐. 中国医学科学院学报, 1993; **15** (1): 58
- 6 Bradeford M M. *Anal Biochem*, 1976; **72** (1, 2): 248
- 7 Hageman J J, Bast A, Vermeulen N P E. *Chem Biol Interactions*, 1992; **82** (3): 243

One-Step Microassay for the Measurement of Anti-Lipid Peroxidation in 96-Wells Plate.
Sun Shiyong, Xu Bo, Li Qiuju, Li Runzhao
(*National Laboratories of Natural and Biomimetic Drug, Beijing Medical University,*

Beijing 100083, China).

Abstract Based on the mode of formation of microsomal lipid peroxidation induced by Fe^{2+} /cysteine and the principle of TBA reaction, a simple one-step microassay for the studying and screening of antioxidants in 96-wells plate was established. The comparative studies between the procedures in 96-wells plate and in test tube were also conducted. This microassay requires only small volume of diluted microsome and tested compounds, having the advantages of reliability, rapidness, simplicity and convenience. It is especially suitable for the pilot screening of antioxidants as well as the simultaneous study for many samples. This method can also be used to measure the lipid peroxidation induced by other systems.

Key words microsome, lipid peroxidation, antioxidant

尿中微量白蛋白的测定及应用

魏有仁 侯林浦 王 玫 湛玉良

(中日友好医院, 北京 100029)

朱立华

(北京医科大学第一医院, 北京 100034)

摘要 应用免疫浊度法在自动分析仪上测定了尿中微量白蛋白。对 140 名健康人一次尿样品测定后求出排出率的参考范围(可信区间 95%), 上限为 2.83g/mol 肌酐。此法结合尿中 N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶(NAG)测定应用于糖尿病和高血压患者以检测早期肾损伤。结果表明此法能灵敏地检出早期的尿中白蛋白漏出, 对肾损伤早期诊断比传统的尿蛋白试验更为可靠。尿中溶酶体酶(如 NAG)对肾小管损伤是更特异和灵敏的标志物。联合应用尿中微量白蛋白和酶的测定可进一步提高检出率, 获得更有价值的信息。同时用血清 IV 型胶原测定对糖尿病人作了观察。结果糖尿病人血清 IV 型胶原均值也明显高于健康人对照组。这一指征反映了肾单位基底膜胶原蛋白的合成动态。

关键词 微量白蛋白, N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶, IV 型胶原, 免疫比浊法, 肾损伤, 糖尿病, 高血压

尿中微量白蛋白(microalbumin, mAlb)和糖化血红蛋白测定的应用被称为 80 年代对糖尿病学的两大贡献^[1]。这一进展深化了对糖尿

病肾合并症发病规律的认识, 在早期诊断、早

期控制、改善预后等方面都实现了划时期的进步。mAlb 测定不仅对糖尿病,还对各种因素诱发的肾小球损伤都有重要的诊断价值。它和尿中酶及低分子量蛋白同样成为早期肾损伤监测和追踪的重要标志物。

本文应用免疫透射比浊法测定一批健康人和糖尿病、高血压患者尿中 mAlb,并同时测定尿中 N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶 (N-acetyl-beta-D-glucosaminidase, NAG, EC 3.2.1.30),糖尿病患者还同时测定血清 IV 型胶原 (type IV collagen, CL-IV),对其诊断价值作了综合探讨。

1 材料与方法

1.1 试剂

a. mAlb 透射比浊法试剂盒 (日本ケミフア株式会社):兔抗人白蛋白血清用配套缓冲液稀释 10 倍,以人白蛋白溶液 (200mg/L) 作标准。

b. 2-氯-4-硝基酚-N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷 (CNP-NAG):天津市医药科学研究所、中日友好医院协作研制合成。

c. IV 型胶原酶免疫法试剂盒 (日本第一化学薬品株式会社)。

d. 尿蛋白试纸:UROPAPER (日本 Eiken chem. Co.) 检出限 150mg/L。

1.2 方法

a. mAlb 测定 在日立 7150 型生化自动分析仪上作两点法测定。尿样品 18 μ l, 1:10 稀释抗血清工作液 50 μ l, 磷酸盐缓冲液 300 μ l。主波长 340nm, 副波长 700nm。设 5 点标准,微机非线性计算。检出限 5mg/L。

b. 尿 NAG 测定 以 CNP-NAG 为底物,在日立 7150 型分析仪上用连续监测法测定。结果以酶活性单位和尿中肌酐浓度 (mmol/L) 的比值 (U/mmol creatinine, U/mmol Cr) 表示。各项参数及测定程序见参考文献 [2]。

c. 血清 CL-IV 测定 用单克隆双抗体 (IV 型胶原肽 3 股螺旋 TH 区和 7S 区抗体)夹心酶免疫法。第 1 抗体用固相珠结合,第 2 抗体为

酶标抗体 (辣根过氧化物酶)。经四甲基联苯胺 (TMB) 为色原,450nm 测吸光度。人 IV 型胶原 (2mg/L) 作标准,计算样品中的 CL-IV 浓度 (μ g/L)。参考范围 $99.3 \pm 22.8 \mu$ g/L (95% 可信区间)。

1.3 标本留取

采用任意一次尿,用同一样品白蛋白和肌酐浓度比值计算 mAlb 排出率。单位是 g/mol Cr。

1.4 病例

糖尿病 120 例,高血压 80 例,其中妊娠诱发高血压 22 例,其余为原发性高血压。均经临床确诊。年龄范围:糖尿病患者 28—76 岁 (平均 51.5 ± 7.2 岁);原发性高血压患者 35—68 岁 (平均 55.1 ± 4.8 岁);妊娠诱发高血压患者 23—34 岁 (平均 25.8 ± 2.5 岁)。

1.5 健康人对照组

140 名。选自体检合格的健康人。年龄范围 18—67 岁。男:女=1:1.5。

2 结 果

2.1 健康人尿 mAlb 排出率调查

140 名健康人中频数分布为正偏态。95% 可信限上界为 2.83g/mol Cr。本文临床观察以 3.17g/mol Cr。为截止点 (cut-off point)。

2.2 糖尿病组

a. 120 例糖尿病中筛选出尿蛋白试纸法阴性的 89 例,测定尿中 mAlb 排出率,结果见图 1。患者组与健康人对照组间有显著差异 ($P < 0.01$)。患者组 89 例中 mAlb 排出率超过截止点的有 30 例 (33.7%)。从图 1 中可看出患者组测值的离散度很大,从而影响统计值中的偏差也增大,这在医学统计中是时常遇到的现象。

b. 95 例糖尿病人分为两组:尿 mAlb 排出率正常组和增高组,分别测定尿 NAG 排出率并统计,结果如下:

mAlb 正常组 ($n=58$) 尿 NAG 排出率: $\bar{x} \pm s = 2.26 \pm 1.41$ U/mmol Cr

mAlb 增高组 ($n=37$) 尿 NAG 排出率:

$\bar{x} \pm s = 4.26 \pm 2.36 \text{ U/mmol Cr}$

健康人对照组 ($n=133$) $\bar{x} \pm s = 1.31 \pm 0.56 \text{ U/mmol Cr}$

以上3组间均有显著差异 ($P < 0.01$). 值得注意的是在mAlb正常组58例中NAG排出率增高的有20例, 提示单独有肾小管损伤, 见图2. 图中mAlb与NAG的相关系数 r 为0.7403, 直线回归 $Y = 0.27x + 14.23$. 相关系数显著性测验: $0.7403 > r_{0.0005}(92)$ (根据相关

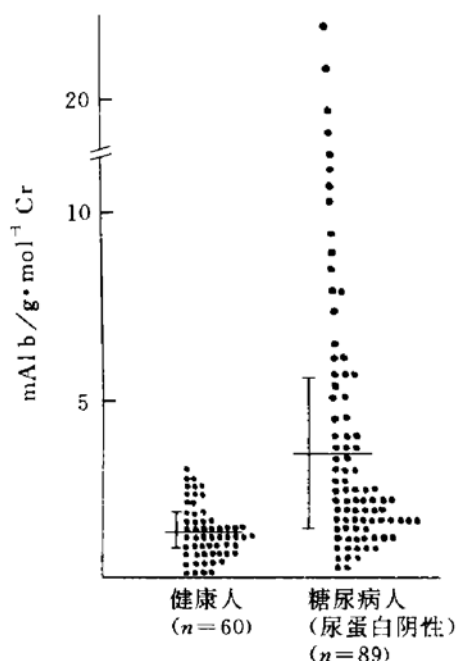


图1 糖尿病人(尿蛋白阴性)组与健康人组尿微量白蛋白(mAlb)排出率比较

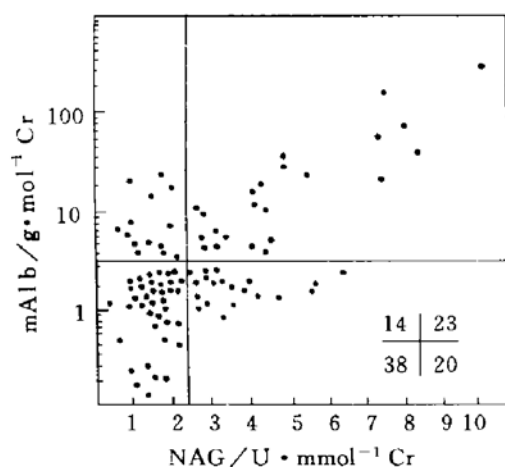


图2 糖尿病人尿微量白蛋白(mAlb)与NAG排出率间的关系

$$r = 0.7403, Y = 0.27x + 14.23$$

系数界值表), 故 $P < 0.0005$, 表明二者有正相关。

c. 尿蛋白阴性的糖尿病患者88例分为两组: mAlb正常组和增高组, 分别测定血清CL-IV水平, 结果如表1.

表1 糖尿病患者血清IV型胶原(CL-IV)水平与健康人的比较

分 组	例数	血清 CL-IV / $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	
		$\bar{x}$	s
mAlb 正常糖尿病人	34	102.7	84.4
mAlb 增高糖尿病人	54	157.3	145.6
健康人	42	80.4	36.5

2.3 高血压组

从80例中选出尿蛋白试纸法阴性的74例, 测定尿mAlb排出率, 发现24例增高, 组均值($\bar{x} \pm s$) $5.15 \pm 3.62 \text{ mg/mmol Cr}$, 非常显著高于健康人对照组 $1.33 \pm 0.73 \text{ mg/mmol Cr}$ ($P < 0.001$). 见图3. 对一组妊娠诱发高血压患者(22例)同时测定尿mAlb和NAG排出率, 结果二者都增高者7例, 只有NAG一项增高者11例. 合计18例有NAG增高, 提示这一组患者肾小管损伤更为明显。

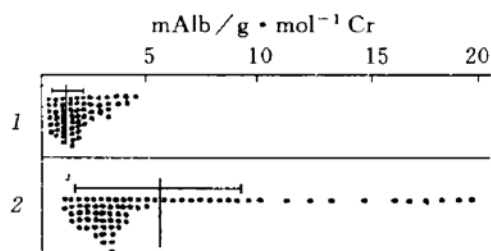


图3 高血压(尿蛋白阴性)组尿微量白蛋白(mAlb)与健康人对照组的比较
1: 健康人对照组 ($n=60$); 2: 尿蛋白阴性高血压组 ($n=74$).

3 讨 论

上述结果表明, 以目前通用的尿蛋白常规试验方法定为阴性的糖尿病和高血压患者, 其

中有相当比例已发生微量白蛋白尿 (microalbuminuria). 这在上述 89 例糖尿病中有 30 例 (33.7%), 在 74 例高血压中有 24 例 (32.4%). 这些“潜在的”肾损伤过去难以早期发现而往往错过早期治疗的时机. 近年由于早期检测手段的进步已能解决这一临床医学中的难点. 特别是高血压肾损伤的发生率可能远高于过去一般的估计.

本文同时观察了上述糖尿病例中尿 NAG 和血清 CL-N 水平的变化. NAG 是肾小管上皮细胞溶酶体酶, 是肾小管损伤的灵敏标志物. 58 例尿 mAlb 排出率正常的糖尿病人中有 20 例尿 NAG 排出率增高, 平均 $3.87 \pm 1.39 \text{ U/mmol Cr}$ ($2.48-7.35 \text{ U/mmol Cr}$), 明确提示有肾小管损伤. Holm^[4]对 110 例糖尿病人同时用尿 mAlb 和视黄醇结合蛋白 (retinol-binding protein, RBP) 两个指征所作观察也表明, 其中 27 例尿 mAlb 正常者尿 RBP 增高, 提示有肾小管重吸收功能障碍. 以上研究资料均能说明在糖尿病肾损伤早期, 甚至在肾小球损伤之前已有部分病例发生肾小管损伤, 支持了近年糖尿病肾病发病学的观点^[5]. 动物模型和细胞培养研究也证明, 糖尿病病理过程除侵犯肾小球基底膜外也损伤肾小管^[6]. 用分子生物学手段能证明细胞高糖环境可促进 IV 型胶原肽、纤维连接蛋白 (fibronectin) 和板层素 (laminine) 的 mRNA 合成, 随糖浓度的递增 mRNA 的表达也增强^[7]. 近年的研究认为这一过程是受转化生长因子 β (TGF- β) 调控的^[8]. 本文用血清 CL-N 测定对一组糖尿病人所作观察也表明, 患者组 CL-N 水平不但明显高于健康人对照组, 而且 mAlb 排出率增高组的 CL-N 也明显高于 mAlb 正常组, 提示糖尿病人肾细胞基底膜中 IV 型胶原肽合成的亢进与 mAlb 排出率的内在联系, 有助于进一步理解糖尿病肾损伤的早期病理变化. Matsumoto 等报告的糖尿病血清 CL-N 测定的研究结果^[9]与健康人间也有显著差异, 并随病情发展而有增高倾向, 与动物模型病理学所见也基本符合.

本文用尿 NAG 和 mAlb 同时观察的结果

提示高血压病理过程也同样损伤肾小管. Ellekilde^[10]用尿 RBP 和 mAlb 两项指征观察了 21 例原发性高血压也得出这一结论. 本文用细胞逸出酶 NAG 来反映肾小管细胞损伤更直接和灵敏. 近年的这些研究结果从不同角度深化了病变内在规律的认识, 对提高早期诊断率和改善预后都有重要的意义.

参 考 文 献

- 1 Watts N B. Clin Chem, 1991; 37: 2027
- 2 胡宗元, 魏有仁, 胡宗华等. 中华医学检验杂志, 1992; 15 (3): 134
- 3 Viberti G C, Hill R D, Jarrette R J *et al.* Lancet, 1982; 1: 1430
- 4 Holm J L, Hemmingsen L, Nielsen N V. Clinica Chimica Acta, 1988; 177: 101
- 5 Ziyadeh F N, Goldfarb S. Kidney International, 1991; 39: 464
- 6 Rasch R. Diabetologia, 1984; 27: 32
- 7 Ziyadeh F N. Kidney International, 1993; 43: 114
- 8 Rocco M V, Chen Y, Goldfarb B *et al.* Kidney International, 1992; 41: 107
- 9 Matsumoto E, Matsumoto G, Ooshima A *et al.* Diabetes, 1990; 39: 885
- 10 Ellekilde G, von Eyben F E, Holm J *et al.* Clin Chem, 1991; 37: 1446

Determination of Urinary Microalbumin and Its Clinical Application. Wei Youren, Hou Linpu, Wang Mei, Zhan Yuliang (China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China), Zhu Lihua (The Frist Hospital, Beijing Medical University, Beijing 100034, China).

Abstract Urinary microalbumin was detected by an autoanalyzer with the method of immunoturbidimetry. The spot urine samples from a group of 140 healthy subjects were determined to establish a reference range of urinary microalbumin excretion rate (confidence interval 95%) and its upper limit was 2.83 g/mol creatinine. This assay and the urinary enzyme (N-acetyl-beta-D-glu-

cosaminidase, NAG) determination were applied in the patients with diabetes mellitus and with hypertension for detecting the incipient nephrological changes. The results showed that this index was sensitive to detect the early elevation of albumine excretion in urine and has been proven to be a more valuable diagnostic tool in the early diagnosis of renal damage than the traditional urine protein test. As the urinary lysosome enzyme (e. g. NAG) is more specific and sensitive marker of renal tubular injury, it is suggested to combine the microalbumin and the enzyme assays to yield

more valuable informations. The serum type IV collagen determination with the enzyme immunoassay was performed simultaneously in the same group of patients with diabetes mellitus. It was found that the mean value of serum type IV collagen was higher than that of the control group. This index indicated the dynamic process of collagen peptide synthesis occurred in the basement membrane.

Key words microalbumin, N-acetyl-beta-D-glucosaminidase, type IV collagen, immuno-turbidimetry, renal damage, diabetes mellitus, hypertension

肌酸激酶同工酶及其亚型的快速测定方法

王 玻 杨振华

(北京医院检验科, 北京 100730)

摘要 用琼脂糖凝胶电泳法同时测定肌酸激酶 (CK) 同工酶及其亚型 (CK-MB 亚型、CK-MM 亚型), 其特点是以不连续缓冲液体系为基础, 在较低电压条件下, 30min 完成分离过程, 能同时报告 CK-MB 同工酶, CK-MB₁, CK-MB₂ 以及 CK-MM₁, CK-MM₂, CK-MM₃ 的百分含量. CK-MB 和 CK-MM 同工酶的亚型最低检出限分别为 2.2U/L, 3.2U/L. 该法具有快速、灵敏度高、重复性好、无需特殊仪器、操作简单等优点.

关键词 CK-MB 亚型, CK-MM 亚型, CK-MB 同工酶

人类肌酸激酶 (CK) 主要由三种同工酶 (CK-BB, CK-MB 和 CK-MM) 组成. 血清中一般只能检出 CK-MB 和 CK-MM 同工酶, 它们还能进一步分为 CK-MB₁, CK-MB₂ 以及 CK-MM₁, CK-MM₂, CK-MM₃ 亚型^[1,2]. 目前, 国内、外建立了多种方法分别测定 CK-MB 同工酶, CK-MB 亚型以及 CK-MM 亚型, 如电泳法^[3]、等电聚焦法^[4]、高效液相色谱法^[5]、色谱聚焦法^[6]和免疫印迹法^[7]等. 但这些方法有的分离时间长、灵敏度不高, 有的所需仪器、试剂昂贵. 最近 Helena 公司推出的 REP/EDC 电泳系统能够同时分离 CK-MB 和 CK-MM 亚型, 但其价格昂贵、需要特殊的仪器和试剂. 本

文介绍的方法选用了合适的不连续缓冲体系, 只需采用普通电泳装置, 即可在 30min 内完成分离过程, 最后采用荧光光密度计扫描, 不仅能够定量测定 CK-MB 同工酶, 而且还可同时完成 CK-MB, CK-MM 亚型的定量测定, 既方便、快速, 又具有较高的灵敏度.

1 材料与试剂

1.1 仪器

DYY-III 2 型稳压稳流电泳仪系北京六一仪器厂生产; 电泳槽系自行设计并由北京六一仪器厂生产; 循环水冷却采用 Pharmacia 公司