

α -L-岩藻糖苷酶的研究进展

黄丽君 综述,姚正国 审校(湖北省黄冈市黄州区人民医院检验科 438000)

【关键词】 α -L-岩藻糖苷酶; 生物学标记; 研究

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2012.15.053 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2012)15-1920-02

α -L-岩藻糖苷酶(α -L-Fucosidase, AFU)是一种溶酶体酸性水解酶,广泛分布于人体内的各种组织、细胞及体液中。1977 年研究者在动物实验中观察到 Morris 鼠肝癌组织中 AFU 活力较正常肝脏高 7 倍,且与肿瘤生长期有关。1980 年法国学者首先在 3 例原发性肝癌血清中发现 AFU 活性升高,并提出把 AFU 作为诊断肝癌的一种新的标志酶,并被后来的众多研究所证实。近年来,AFU 检测的方法学研究,及肿瘤或非肿瘤性疾病的血清 AFU 水平变化的研究也日益增多,并且有不同的评价。

1 AFU 的生物学特性

AFU 是一种溶酶体酸性水解酶,广泛分布于人体各种组织及体液中,如胎盘、胎儿组织、脑、肺、肝、胰、肾,以及血清、尿液、唾液、泪液等均含有 AFU。其中以肝、肾等组织活性较高,细胞内的 AFU 主要位于溶酶体内。健康人血清 AFU 的相对分子质量达 $(270\sim 390)\times 10^3$,亚单位的相对分子质量为 $(56.0\pm 2.8)\times 10^3$ 和 $(54.0\pm 2.7)\times 10^3$,大约有 8% 左右的健康人血清 AFU 呈低活力。白细胞 AFU 的相对分子质量为 $(30\sim 130)\times 10^3$,肝脏 AFU 的相对分子质量为 $(220\sim 240)\times 10^3$,亚单位的相对分子质量为 $(53.00\pm 2.65)\times 10^3$ 和 $(49.00\pm 2.45)\times 10^3$ ^[1]。用神经氨酸苷酶处理后,血清 AFU 相对分子质量显著下降到 $(37\pm 4)\times 10^3$ 。而且他们在等电聚焦电泳中行为出现显著改变,在 pH 3.8~5.9 范围的酶活性基本消失,而在 pH 6.0~7.2 范围的酶活性增高。分子三级结构的改变和(或)较多唾液酸的聚集可能是 AFU 相对分子质量较大的原因。经过 1% 十二烷基硫酸钠(SDS)和 5% 巯基乙醇处理的血清、肝的 AFU,用聚丙烯酰胺凝胶电泳可见 2 种相对分子质量十分接近的亚单位。

有资料显示,用聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳分析纯化的人血清 AFU 同工酶显示出 2 条主带及 5 条细带;用蔗糖密度梯度层析法分析透析后的人血清 AFU 同工酶显示出 8 条同工酶区带,用 Sephadex G200 薄层等电聚焦及 Aephadex G25 柱等电聚焦分离 AFU 同工酶,可出现 6 条区带;用琼脂糖凝胶作为支持物做等电聚焦电泳,出现 8 条同工酶区带^[1]。说明人体 AFU 分子根据其糖链组成与结构不同,可出现不同的同工酶表现形式,其原因可能与下列因素有关:(1)与结构基因有关;(2)与酶蛋白四级结构的差异有关;(3)与 AFU 分子中唾液酸含量有关。

AFU 的反应特性:脑与肝 AFU 具有抗原一致性,用肝 AFU 制备的抗体 IgG 可与纯化的血清 AFU 发生免疫沉淀反应;血清 AFU 的反应最适在 pH 4.8 左右,在 pH 6.1 处可出现一个次要的“最适”pH 峰,与脑、肝 AFU 的 pH 反应曲线类似,而且 3 者的 Km 值比较接近,提示血清和脑、肝 AFU 之间存在抗原特性和动力学特征的一致性。

2 AFU 的测定方法

2.1 荧光法 研究者利用 AFU 水解 4-甲基伞型酮- α -L-岩藻吡喃糖苷释放 4-甲基伞型酮,用碱性缓冲液终止反应,并使产

物呈现荧光,用 360 nm 或 365 nm 激发波长和 400 nm 或 448 nm 发射波长检测荧光强度,对照不同浓度 4-甲基伞型酮制备的标准曲线求酶的活性,此法敏感性高,适用范围广。但该方法对仪器条件要求高,不适合用于自动化检测。

2.2 终点比色法 以对硝基苯酚 α -L-岩藻糖苷为底物,在 AFU 催化下生成 α -L-岩藻糖苷和对硝基苯酚,对硝基苯酚在碱性溶液中呈黄色^[2],用分光光度计在 405 nm 波长处检测。本法反应时间长,且操作较繁琐,干扰因素多,也不适用自动化检测。于秀艳等^[3]对其进行了改进,利用对硝基酚毫摩尔消光系数为 18.5 的特性,根据 AFU 在 pH 5.0 的条件下催化对硝基苯-岩藻糖吡喃糖苷,生成对硝基酚和岩藻糖,在 405 nm 波长下,对硝基酚有一吸收高峰,测其吸光度变化,不必做标准曲线,便可准确测出 AFU 含量。因本法采用因数两点法,可去除因溶血黄疸给试验带来的干扰。

2.3 速率法(连续监测法) 血清中 AFU 催化 2-氯-对硝基酚 α -L-岩藻吡喃糖苷(CNP-F)水解生成 2-氯-对硝基酚(CNP),在 405 nm 或 410 nm 波长监测 CNP 的生成速率,计算出 AFU 活性。本法测定对胆红素 250 mg/L、血红蛋白 230 mg/L、抗坏血酸 6 g/L 无明显干扰^[2]。该法操作简便,测定时间短,灵敏度和抗干扰性都有提高,适用于各种半/全自动分析仪器。依据底物的不同,速率法又可分为 PNP 法、CPNP 法、MGC-NPF 法 3 种。PNP 法底物为对硝基苯 α -L-岩藻吡喃糖苷,灵敏度一般,对溶血、黄疸仍表现出一定的基质效应,精密度也较差。CPNP 法采用氯化对硝基苯 α -L-岩藻吡喃糖苷作底物,灵敏度和精密度较 PNP 法都有了很大的改善,但仍未完全解决溶血、黄疸及脂血的基质效应。MGCNPF 为新型底物,灵敏度、精密度、抗干扰性及试剂稳定性都很高,是当前最为先进的检测方法。

3 AFU 的临床意义

AFU 是在 20 世纪 70 年代用于诊断一种 AFU 缺乏的遗传病,因先天缺乏 AFU 可以引起岩藻糖贮积病,对组织细胞、尿液和血清中 AFU 测定可协助该病的诊断,并借以与其他遗传性粘多糖贮积病鉴别。自 1980 年有研究者发现原发性肝癌患者血清 AFU 升高,并被后来的研究证实之后,国内外许多学者对 AFU 在临床应用方面进行了大量的探讨。从此,对 AFU 的临床意义有了全新认识。

3.1 原发性肝癌(primary hepatic cancer,PHC) 近 20 多年来,有关 AFU 于肝癌的相关性研究众多。有资料表明,血清 AFU 对原发性肝癌诊断的阳性率在 64%~84%之间,特异性在 90%左右。血清 AFU 活性升高幅度和阳性率于 AFP 无相关性^[4]。AFU 血清水平和阳性率与肿瘤大小无关,病灶小于 3 cm 的患者血清 AFU 升高的阳性率为 70.8%~80.0%,明显高于 AFP 的阳性率(37.5%~40.0%)。何谦等^[5]通过诱发大鼠肝癌的动物实验发现,AFP 直到第 18 周肝癌演变期与健康对照组比较差异无统计学意义,而 AFU 从第 14 周早期肝癌形成期就与健康对照组比较差异有统计学意义,并且随着肝癌的

动态发展过程进一步升高,从而证实 AFU 对原发性肝癌具有较高的诊断学价值。

3.2 肝炎和肝硬化 大多数肝硬化和一部分乙肝患者的血清 AFU 活性均有不同程度的升高,可能与肝细胞损伤、酶逆流入血有关。乙肝患者血清 AFU 活性和血清 ALT 活性的升高程度具有高度的正相关。经抗肝炎治疗后,血清 ALT 活性下降,AFU 活性也迅速下降,ALT 活性持续不变或上升者,AFU 活性也不下降。肝硬化患者血清 AFU 活性长期升高提示易发展为肝癌,或表示病情危险,或已有小病灶肝癌存在。所以血清 AFU 活性测定有助于乙肝病情发展的预测及肝硬化患者预后的观察^[6]。

3.3 白血病 曾有报道 B 细胞性慢性淋巴细胞白血病患者白细胞 AFU 活性明显低于其他类型白血病,并认为这与 B 细胞属性无关,而是恶性细胞的增殖产物。赵平等^[7]报道,急性白血病患者血清 AFU 活性高于健康对照组,差异有统计学意义。M4、M5 患者血清 AFU 活性与外周血单核细胞数的对数呈显著正相关,提示升高的血清 AFU 可能来源于单核细胞系统。

3.4 卵巢肿瘤 洪开听等^[8]测定 101 例妇科各型肿瘤患者及 50 例健康对照组 AFU 活性发现,90% 的恶性卵巢肿瘤患者血清 AFU 活性明显低于妇科其他肿瘤及健康对照组,且与疾病分期、肿瘤负荷、组织学分型和肿瘤分化程度无关。恶性卵巢癌患者血清 AFU 活性降低可能与遗传因素有关。以 275 kU/L 为临界值,据此诊断卵巢恶性上皮癌的敏感性和特异性分别为 88.5% 和 98.5%。因此,AFU 也可以作为卵巢癌的一个特异诊断指标。

3.5 健康孕妇 樊国萍^[9]测定了 177 例健康孕妇和 69 例健康未怀孕对照组的血清 AFU 活性,并将妊娠组按孕周数不同分为早孕组(1~12 周)、中孕组(13~27 周)、晚孕组(28~40 周)。发现妊娠组与健康未怀孕对照组相比血清 AFU 水平升高差异有统计学意义($P<0.01$);比较 3 组 AFU 水平发现晚孕组 AFU 水平高于早、中孕组($P<0.01$, $P<0.05$),中孕组高于早孕组($P<0.05$),并伴随着妊娠周数的增加 AFU 水平呈升高趋势,在自然分娩或人工终止妊娠后迅速下降,5 d 后降至正常。因此,孕妇血清中 AFU 增高应视为妊娠过程中的特殊生理反应,不同于肝病时的升高,临床医生应加以区别。

3.6 糖尿病 权翠侠等^[10]对 75 例糖尿病患者和 39 例健康者进行了 AFU 活性测定,发现糖尿病患者 AFU 水平明显高于健康对照组,血糖控制差的糖尿病患者其 AFU 酶活力与同时测定的空腹血糖(FBG)和糖化血红蛋白(HbA1c)存在显著正相关,而糖控制好的糖尿病患者组 AFU 酶活力与健康对照组差异无统计学意义,且与 FBG 和 HbA1c 不相关。说明糖尿病患者 AFU 升高与糖代谢控制的好坏有关,糖尿病患者血清 AFU 明显高于健康对照组,糖代谢控制差的患者血清 AFU 与 FBG、HbA1c 有显著正相关。这一结果说明糖尿病患者血清 AFU 可反映 HbA1c 和 FBG 所提示的糖代谢控制现状。

3.7 腹腔积液 段俊林和欧超伟等^[11]测定了 128 例各种病因引起的腹腔积液标本,并按照疾病性质将腹腔积液分成恶性腹腔积液组和良性腹腔积液组。结果显示,在恶性腹腔积液组中 AFU 活性均高于良性腹腔积液组,诊断敏感性为 80.0%,特异性为 87.3%,而且诊断准确率达 83.6%,表明 AFU 活性检测可作为良、恶性腹腔积液鉴别诊断的一种较好标志物。

3.8 肺部疾病 杨沛等^[12]检测了临床诊断明确的肺部疾病患者 97 例,结果显示,除慢性阻塞性肺疾病患者血清 AFU 显

著低于健康人及其他肺部疾病患者外,其他肺部疾病患者血清 AFU 均显著高于健康人。增高的原因可能与感染、免疫紊乱、蛋白质及脂质代谢异常,以及肿瘤的抗原性密切相关。说明 AFU 与肺部疾病的发生、发展有密切关系,对肺部疾病的诊断与鉴别诊断具有一定的临床价值^[13-15]。

4 结 语

综上所述,AFU 在原发性肝癌的研究中正日益引起研究者的重视,并且在对肝炎、肝硬化、白血病、卵巢囊肿、糖尿病和肺部疾病的诊断与治疗,以及健康孕妇腹腔积液的相关检测中,AFU 都有很高的应用研究价值。所以,继续探讨原发性肝癌患者组织和血清中 AFU 活性分布规律和升高机制,以及进行 AFU 同工酶的分离,制备出 AFU 的抗体及单克隆抗体,有可能使原发性肝癌得临床诊断与导向治疗提供更加有效的手段。

参考文献

- [1] 王春新,谢国强.血清 α -L-岩藻糖的研究及其临床应用[J].医学检验进修杂志,1998,5(4):151-152.
- [2] 叶应妩,王毓三,申子瑜.全国临床检验操作规程[M].3 版.南京:东南大学出版社,2006:443-444.
- [3] 于秀艳,王文龙,高海燕,等. α -L-岩藻糖苷酶测定方法及在肝癌诊断中的应用[J].中国实验诊断学,2001,5(4):191.
- [4] 劳明,朱波,黄玲莎,等.三种肿瘤标志物联合检测对原发性肝癌的诊断价值[J].中华消化杂志,2005,25(2):109-110.
- [5] 何谦,刘余静,赵彩蕾.DEN 诱发 SD 大鼠原发性肝癌形成过程中 AFU 诊断价值的研究[J].陕西医学杂志,2005,34(5):532-533.
- [6] 张明珠,何广元,覃强,等.血清 α -L-岩藻糖苷酶活性与乙型肝炎相关性研究[J].宁夏医学杂志,2007,29(5):428.
- [7] 赵平,王江滨,张爱国,等. α -L-岩藻糖苷酶对原发性肝癌诊断价值的探讨[J].临床肝胆病杂志,2003,19(2):109-110.
- [8] 洪开听,夏邦世,陈凤凤.血清 α -L-岩藻糖苷酶对早期原发性肝癌的诊断价值[J].临床医学,2005,25(8):5-6.
- [9] 樊国萍,周定勇.血清 α -L-岩藻糖苷酶在原发性肝癌诊断中的应用[J].淮海医药,2011,29(2):154.
- [10] 权翠侠,王庆国,滕晓梅.血清甲胎蛋白、 α -L-岩藻糖苷酶、 α 1-抗胰蛋白酶在原发性肝癌诊断中的应用[J].医学检验与临床,2008,19(4):67.
- [11] 段俊林,欧超伟. α -L-岩藻糖苷酶的研究进展[J].国际检验医学杂志,2008,29(8):731-732.
- [12] 杨沛,陈伟,石小平.血清 α -L-岩藻糖苷酶对原发性肝癌的诊断价值[J].重庆医学,2004,33(8):1174-1175.
- [13] 张瑞霞,杨义明,赵学峰,等.血清甲胎蛋白、 α -L-岩藻糖苷酶和肿瘤相关物质联合检测对原发性肝癌的诊断价值[J].国际检验医学杂志,2006,27(2):111-112,115.
- [14] 诸天军.血清 α -L-岩藻糖苷酶和甲胎蛋白联合检测在原发性肝癌诊断中的应用[J].首都医药,2009(16):39-40.
- [15] 包广宇,陆奎英. α -L-岩藻糖苷酶对无机磷测定的干扰及排除[J].中国医疗设备,2009,24(5):94.