

等电聚焦法检测碱性磷酸酶同工酶在肝癌和肝癌骨转移鉴别诊断中的应用^{*}

庞 博¹, 吴丽娟^{2△} (1. 四川省彭州市中医院检验科 611930; 2. 成都军区总医院实验医学中心, 成都 610083)

【摘要】 目的 探讨碱性磷酸酶(ALP)同工酶在肝癌和肝癌骨转移鉴别诊断中的应用。**方法** 用等电聚焦法(IEF)分离测定 80 例健康体检者和 153 例肝脏疾病患者血清中的 ALP 同工酶。**结果** 采用神经氨酸苷酶处理标本后, IEF 能分辨出 ALP 同工酶 pI6.0、pI6.1、pI6.4 和 pI6.5 共 4 个亚型。ALP 的 pI6.0 和 pI6.4 亚型的检出率在健康体检组、非肝癌组、肝癌组之间差异无统计学意义($P>0.05$); pI6.5 亚型的检出率在肝癌患者组明显高于健康体检组和非肝癌组($P<0.01$); pI6.1 检出率在肝癌骨转移组明显高于肝癌无骨转移组、健康体检组和非肝癌组($P<0.01$)。pI6.5 用于肝癌诊断的灵敏度是 60.7%, 特异性是 83.3%, 阳性预测值是 69.2%, 阴性预测值是 77.4%, 符合率为 74.7%。pI6.1 用于肝癌骨转移的诊断灵敏度是 70.0%, 特异性是 81.3%, 阳性预测值是 84.5%, 阴性预测值是 84.8%, 符合率为 77.6%。**结论** IEF 法能分离 ALP 同工酶不同亚型, pI6.5 亚型可作为肝癌鉴别诊断指标, pI6.1 亚型可作为肝癌骨转移鉴别诊断指标。

【关键词】 碱性磷酸酶; 同工酶; 琼脂糖等电聚焦电泳; 肝癌; 肝癌骨转移

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2015.01.001 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)01-0001-03

Application of isoelectricfocusing method for detecting alkaline phosphatase isoenzymes in differential diagnosis of liver cancer and bone metastasis of liver cancer^{*} PANG Bo¹, WU Li-juan^{2△} (1. *Department of Clinical Laboratory, Pengzhou Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Pengzhou, Sichuan 611930, China*; 2. *Experimental Medicine Center, General Hospital of Chengdu Military Region, Chengdu, Sichuan 610083, China*)

【Abstract】 Objective To investigate the application of alkaline phosphatase(ALP) isoenzymes detected by the agarose isoelectricfocusing(IEF) method in the differential diagnosis of liver cancer and bone metastasis of liver cancer. **Methods** The serum ALP isoenzyme level was detected in 80 people with healthy examination and 153 cases of liver diseases by the agarose IEF method. **Results** After treating the specimen by neuraminidase, ALP isoenzymes subtypes of pI6.0, pI6.1, pI6.4 and pI6.5 could be identified by the agarose IEF. The detection rates of pI6.0 and pI6.4 had no statistical differences among the healthy group, non-liver cancer group and liver cancer group ($P>0.05$); the detection rate of pI6.5 in the liver cancer group was significantly higher than that in the healthy control group and the non-liver cancer group ($P<0.01$); the detection rate of pI6.1 in the liver cancer bone metastases group was significantly higher than that in the liver cancer non-bone metastases group, the healthy group and the non-liver cancer group ($P<0.01$). The sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value and coincidence rate of pI6.5 for diagnosing liver cancer were 60.7%, 83.3%, 69.2%, 77.4% and 74.7% respectively; which of pI6.1 for the diagnosis of liver cancer bone metastases were 70.0%, 81.3%, 84.5%, 84.8% and 77.6% respectively. **Conclusion** The subtypes of ALP isoenzymes can be separated by the improved agarose IEF method. The subtype pI6.5 can be used as a differential diagnosis indicator of liver cancer and the subtype pI6.1 can be used as a differential diagnosis indicator of liver cancer bone metastases.

【Key words】 ALP; isoenzyme; agarose isoelectricfocusing; liver cancer; bone metastases of liver cancer

肝病是严重危害人类身体健康的常见病和多发病, 为了进一步探讨碱性磷酸酶(ALP)同工酶在不同类型肝病之间的临床意义, 帮助预测肝病的转归和预后, 本文采用特异性较强, 敏感性较高的琼脂糖等电聚焦电泳法对健康体检者、慢性肝炎、梗阻性黄疸、肝硬化及原发性肝癌患者血清 ALP 同工酶进行

了分析测定, 探讨了 ALP 同工酶在肝脏疾病特别是肝癌诊断中的应用。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2010~2012 年成都军区总医院健康体检者 80 例, 其中男 40 例, 女 40 例, 年龄 35~75 岁。选择

^{*} 基金项目: 国家高技术研究发展计划(863 项目)资助项目(2014AA022304)。

作者简介: 庞博, 男, 副主任技师, 硕士, 主要从事生化检验及分子生物学检验方面研究。

[△] 通讯作者, E-mail: wulijuan1638@126.com。

2010~2012 年成都军区总医院住院部肝癌患者 89 例,男 49 例,女 40 例,年龄 35~75 岁,其中发生肝癌骨转移 70 例,包括男 45 例,女 25 例,年龄 35~71 岁。选择 2010~2012 年成都军区总医院住院部非肝癌组 64 例,包括慢性肝炎 32 例(年龄 35~75 岁,男 22 例,女 10 例)、梗阻性黄疸 21 例(年龄 35~75 岁,男 12 例,女 9 例)、肝硬化 11 例(年龄 35~75 岁,男 7 例,女 4 例)。上述各组年龄分布之间差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。

1.2 材料及方法

1.2.1 标本及采集 采集健康体检者和患者的非抗凝空腹血 3 mL,分离血清,进行等电聚焦电泳分析。

1.2.2 主要仪器 仪器 LK-2006 多用途等电聚焦电泳仪,光密度扫描仪。

1.2.3 主要试剂及配制 两性电解质(pH3.0~9.5)400 g/L,甘油、山梨醇、固兰 B 琼脂糖、A-萘磷酸钠均为南京精细化工公司生产,蛋白标准品为 Sigma 公司生产。试剂配制方法:电极溶液阳极液为柠檬酸溶液 0.2 mol/L。阴极液为乙醇胺溶液 0.5 mol/L。底物液:A-萘磷酸钠 30 mg 溶于 10 mL 10.5%乙二醇胺,加入 20 g/L 硫酸镁溶液(硫酸镁 200 mg 溶于去离子水 10 mL)200 μ L。呈色剂:pH4.7 的乙酸缓冲液 10 mL 溶解固兰 B 5 mg 中。胶液的配制:琼脂糖 0.1 g,硫酸锌 0.008 g,加去离子水 5 mL,隔水煮沸 15 min 后,加入 50%甘油 5 mL,混合,至 70 $^{\circ}$ C 左右时,加入两性电解质 0.8 mL。

1.2.4 神经氨酸苷酶处理标本^[1] 神经氨酸苷酶(10 U/L, TypeV,来源于产气荚膜梭状芽孢杆菌属)溶于磷酸二氢钠/柠檬酸缓冲液 1 mL 中,神经氨酸苷酶 10 μ L 加入 40 μ L 标本,37 $^{\circ}$ C 水浴 15 min。

1.2.5 热失活实验 5 min 56 $^{\circ}$ C 水浴,骨 ALP 失活,10 min 65 $^{\circ}$ C 水浴,肝 ALP 失活。

1.2.6 电泳检测^[2]

1.2.6.1 等电聚焦 将准备好的胶板置于电泳槽冷却板上,其间涂煤油,用相应的电极液润湿阴极和阳极电极条分别放在模板标记的位置上。预电泳 15 min。加样滤纸放在离阴极端 2.5 cm 处后电泳,上限电压 700 V,上限电流 50 mA,功率 15 W,冷却水温度 4 $^{\circ}$ C,时间 85 min。

1.2.6.2 呈色和扫描 IEF 结束后,取出胶板,在胶面涂布 1.5 mL 底物液,40 $^{\circ}$ C 25 min,用蒸馏水洗去多余底物,加入 0.5 mL 呈色液,光密度计扫描,滤光片 570 nm,狭缝 1 mm。

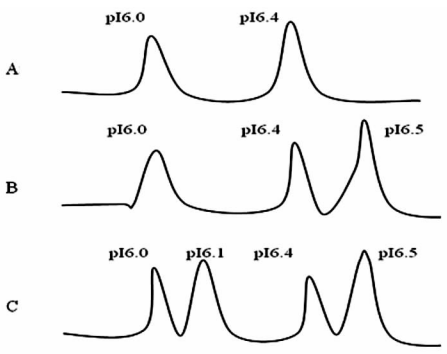
1.2.6.3 测等电点 取 20 μ L 蛋白标准品加样,与标本同时进行电泳,IEF 后将带有蛋白标准液的胶片切割下来,进行考马斯亮蓝染色,以区带离阴极的距离为横坐标,蛋白标准品的等电点为纵坐标,作标准曲线,根据标本的区带离阴极的距离,查标准曲线求得等电点(pI)。

1.3 统计学处理 数据分析采用 SPSS17.0 统计软件进行处理,计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验,计数资料以率表示,比较采用 χ^2 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 等电聚焦法血清 ALP 同工酶亚型检测电泳扫描图阅读结果见图 1。该法分析血清 ALP 亚型可以在获得的电泳扫

描图上清晰见到 4 个亚型,即 pI 为 6.0、6.1、6.4 和 6.5 对应的电泳结果扫描峰;其中 pI6.0 和 pI6.4 两个亚型见于健康对照组和各疾病组,对与肝脏疾病包括非肝癌、肝癌和肝癌是否骨转移均无鉴别诊断意义;pI6.5 亚型主要见于肝癌患者,而 pI6.1 见于肝癌发生骨转移患者。



注:A 为健康体检者;B 为肝癌患者;C 为肝癌骨转移患者。

图 1 等电聚焦法检测 ALP 同工酶亚型电泳扫描图

2.2 等电聚焦法 ALP 同工酶亚型检出率 结果见表 1。表 1 结果提示,pI6.0 和 pI6.4 的出现率在健康体检组和非肝癌组以及肝癌组之间差异无统计学意义($P>0.05$);pI6.1 和 pI6.5 的出现率在健康体检组和非肝癌组之间差异无统计学意义($P>0.05$);pI6.1 和 pI6.5 的出现率在肝癌组和健康体检组以及非肝癌组之间差异有统计学意义($P<0.01$);pI6.5 的出现率在肝癌无骨转移组和有骨转移组比较差异无统计学意义($P>0.05$);pI6.1 的出现率在肝癌无骨转移组和有骨转移组之间差异有统计学意义($P<0.01$)。

表 1 等电聚焦法 ALP 同工酶亚型检测结果

组别	n	总 ALP 活性 ($\bar{x}\pm s$,U/L)	不同亚型的检出率(%)			
			pI6.0	pI6.1	pI6.4	pI6.5
健康对照组	80	88.8 $\pm$ 11.5	86.1	17.5	65.2	16.2
非肝癌组	64	110.8 $\pm$ 28.6	82.9 ^a	20.3 ^a	60.1 ^a	17.2 ^a
肝癌组	89	498.9 $\pm$ 59.3	80.1 ^a	62.3 ^b	61.1 ^a	56.1 ^b
肝癌无骨转移组	19	496.8 $\pm$ 45.5	78.3	19.3 ^d	58.5	59.3 ^c
肝癌骨转移组	70	502.9 $\pm$ 61.3	80.1	65.0	55.1	54.9

注:与健康对照组比较,^a $P>0.05$,^b $P<0.01$;与肝癌骨转移组比较,^c $P>0.05$,^d $P<0.01$ 。

表 2 等电聚焦法分离 ALP 同工酶(pI6.5)用于肝癌的诊断效率

肝癌组	健康体检组和非肝癌组	
	+	-
+	54	24
-	35	120

注:十表示阳性,一表示阴性。

2.3 等电聚焦法 ALP 同工酶用于肝癌及肝癌骨转移的诊断效率 结果见表 2、3。经过统计学计算,pI6.5 用于肝癌诊断的灵敏度是 60.7%,特异性是 83.3%,阳性预测值是 69.2%,阴性预测值是 77.4%,符合率为 74.7%。pI6.1 用于肝癌骨转

移的诊断灵敏度是 70.0%，特异性是 81.3%，阳性预测值是 84.5%，阴性预测值是 84.8%，符合率为 77.6%。

2.4 等电聚焦法 ALP 同工酶亚型检出率与总 ALP 活性之间的关系 ALP 总活性的升高不能判断是来源于肝还是骨 ALP 同工酶的升高,采用 IEF 可分离 ALP 同工酶亚型,其中 pI6.5 的出现率在肝癌患者组明显升高,而 pI6.1 的出现率在肝癌骨转移组明显升高,若 pI6.5 和 pI6.1 同时出现在 ALP 总活性升高的患者血清中,提示该患者可能存在肝癌骨转移。

表 3 等电聚焦法分离 ALP 同工酶(pI6.1)用于肝癌骨转移的诊断效率

肝癌骨转移组	健康体检组和非肝癌组	
	+	-
+	49	27
-	21	117

注: + 表示阳性, - 表示阴性。

3 讨 论

ALP 广泛存在于人体各组织器官中,由 4 种不同的基因位点(小肠、组织非特异性、胎盘和生殖细胞)编码小肠,很多疾病都会导致其发生变化,检测 ALP 同工酶及亚型有助于临床诊断、治疗疾病和判断预后,目前分离 ALP 同工酶有很多种方法,所用的支持物有聚丙烯酰胺、琼脂糖、蔗糖和甲基化的醋酸纤维膜^[3-4]。这些方法中,有的分辨率低,有的所用时间长,有的所用的支持物是剧毒的^[5-10]。本研究以琼脂糖为支持物,对制胶和电泳条件进行了改进,缩短了分离时间,提高了灵敏度和分辨率。

本试验发现肝病患者中肝癌、慢性肝炎、梗阻性黄疸和肝硬化的总 ALP 活性差异无统计学意义($P>0.05$),说明总 ALP 的升高对判断肝病的来源是很困难的。本试验发现 pI6.0 和 pI6.4 的出现率在健康对照组和非肝癌组以及肝癌组之间差异无统计学意义($P>0.05$),pI6.1 和 pI6.5 的出现率在健康对照组和非肝癌组之间差异无统计学意义($P>0.05$),而 pI6.1 和 pI6.5 的出现率在肝癌组和健康体检组以及非肝癌组之间差异有统计学意义($P<0.05$),pI6.1 的出现率在肝癌无骨转移组和有骨转移组之间差异有统计学意义。在 89 例肝癌患者中 54 例有一 pI 为 6.5 的区带,经热失活试验处理后,区带消失,作者分析可能来源于原发性肝癌,因此, pI6.5 的区带对鉴别诊断肝癌有一定的临床意义。70 例肝癌骨转移患者中 49 例有一 pI 为 6.1 的区带,出现此区带的阳性率为 73.0%,这条带的出现与总酶活性无关,将血清进行 65℃水浴

10 min 后,这条区带消失了,作者认为这条等电点为 6.1 的区带可能来源于骨 ALP,对于肝癌骨转移的鉴别诊断具有一定的临床参考价值。本研究结果还提示,若 pI6.5 和 pI6.1 同时出现在 ALP 总活性升高的患者血清中,提示该患者可能存在肝癌骨转移。

综上所述,经改良的琼脂糖等电聚焦电泳法可有效分离 ALP 同工酶,其操作简单,价格低廉,不需要特殊的仪器设备,是一种值得推荐的实验室诊断方法。

参考文献

[1] 张丽娟,吴颖,王晓鸿. 肿瘤标志物联合检测对原发性肝癌的诊断价值[J]. 中国卫生检验杂志,2011,21(1):137-138.

[2] 鲁亮,李杭,张汉群,原发性肝癌中多项肿瘤标志物检测的临床意义[J]. 现代肿瘤医学,2014,22(3):601-603.

[3] 李萍,史茜,王波. 多项生化指标在常见肝病诊断中的价值[J]. 国际检验医学杂志,2013,34(23):3205-3207.

[4] Sidney B, Rosalki A, Ying F. Incubation with neuraminidase and affinity electrophoresis with wheat germ lectin compared for separating and quantifying AKP isoenzymes in plasma[J]. Clin Chem,1985,31(6):1198-1200.

[5] 邓君,王波,杨振华,等. 琼脂糖等电聚焦分离碱性磷酸酶同工酶[J]. 临床检验杂志,1996,14(6):283-286.

[6] 章希文,高琳,张玲. 降钙素原、C 反应蛋白、中性粒细胞碱性磷酸酶联合检测在新生儿肺炎早期的诊断价值[J]. 中国乡村医药,2012,21(9):56-57.

[7] 王蓓,闫国庆,任丽丽. 北京市空港地区 976 例小儿骨源性碱性磷酸酶检测结果分析[J]. 公共卫生与预防医学,2014,25(2):27-32.

[8] 李贤煜,赵新元,应万涛,等. 等电聚焦预分离用于肝癌细胞分泌蛋白质组的分级与鉴定[J]. 色谱,2013,31(9):831-837.

[9] 黄传钟,林科灿,王斌,等. 肝癌切除肝缺血再灌注损伤前后的蛋白质组学变化[J]. 中国组织工程研究,2012,16(40):7539-7543.

[10] 邓君,饶绍琴,蒋黎,等. 电聚焦法分离碱性磷酸酶同工酶在肿瘤诊断中的应用[J]. 四川省卫生管理干部学院学报,2001,20(2):84-85.

(收稿日期:2014-05-05 修回日期:2014-09-22)

医学统计工作的基本内容

按工作性质及其先后顺序,可将医学统计工作分为实验设计、收集资料、整理资料、分析资料。实验设计是开展某项医学研究工作的关键,包括医学专业设计和统计学设计,医学专业设计的内容包括研究对象纳入和排除标准、样本含量、获取样本的方法、分组原则、观察(检测)指标、统计方法等。收集资料的方法包括各种试验、检测或调查,要求资料完整、准确、及时、有足够数量、具有代表性和可比性等。整理资料包括原始资料的检查与核对、对资料进行分组与汇总等。分析资料即对资料进行统计学分析,包括进行统计描述和统计推断。