论著

文章编号:1000-5404(2005)14-1450-03

黑熊肌酸激酶及其同工酶活性的检测

侯万儒[1],李家烈[2] (西华师范大学:[1]生命科学学院,[2]学报编辑部,南充 637002)

提 要:目的 对圈养的健康四川黑熊血清中的肌酸激酶(CK)及其同工酶CK-MB活性进行测定,建立起黑熊肌酸激酶(CK)及其同工酶CK-MB活性的生化参考指标,为研究黑熊积累资料,并为黑熊的疾病防治提供科学依据。**方法** 根据酶促反应速率原理,结合分光光度法,对CK和CK-MB的活性进行人工检测。对检测结果进行统计分析,求出酶活性的平均值、变异系数和期望值置信区间。**结果** 在30 ℃条件下,雄性黑熊CK活性平均值为162.70 U/L,变异系数为11.90%,期望值置信区间为148.90~176.50 U/L;CK-MB活性平均值为17.4 U/L,变异系数为17%,期望值置信区间为15.26~19.54 U/L;雌性黑熊CK活性平均值为149.3 U/L,变异系数为8%,期望值置信区间为140.68~157.92 U/L;CK-MB活性平均值为15.8 U/L,变异系数为18.6%,期望值置信区间为13.70~17.90 U/L。**结论** 所得结果可以作为健康黑熊的部分生化指标。

关键词:黑熊;肌酸激酶;同工酶;检测

中图法分类号:Q503;Q555.7 **文献标识码**:A

Detection of the creatine kinase activity and CK isozyme activity of black bear

HOU Wan-ru[1], LI Jia-lie[2] ([1]Life Science College, [2]Editorial Department of Journal of China West Normal University, China West Normal University, Nanchong 637002, China)

Abstract: **Objective** To detect the creatin kinase (CK) and its isozeyme (CK-MB) activity in serum of the healthy black bear (Ursus thibetanus) reared in pens to establish reference standard of biochemistry for CK and CK-MB activities of black bears as well as to offer scientific basis for prevention and cure of the black bear disease. **Methods** The CK activity and CK-MB activity were measured using spectrophotometer based on the principle of enzymatic reaction rate. All data were used to calculate the mean value, variation coefficient and the confidential interval of expected value of enzymatic activity. **Results** Under 30 ℃, of the male black bears, the average CK activity is 162.70 U/L, the variation coefficient 11.90%, the confidential interval of expected value 148.90 to 176.50 U/L, and the average CK-MB activity is 17.4 U/L, the variation coefficient 17%, the confidential interval of expected value 15.26 to 19.54 U/L. Of the female black bears, the average CK activity is 149.3 U/L, the variation coefficient 8%, the confidential interval of expected value 140.68 to 157.92 U/L, and the average CK-MB active is 15.8 U/L, the variation coefficient 18.6%, the confidential interval of expected value 13.70 to 17.90 U/L. **Conclusion** The data we obtained can serve as biochemical indexes for the healthy black bears.

Key words: black bear; creatine kinase; isozeyme; examination

黑熊(ursus thibetanus, black bear)是一种具有较高经济价值和研究价值的国家II级保护动物,近30年来国内不少学者从生态、分类、繁殖、疾病防治、人工驯养以及资源保护等方面对其进行了较深入的研究[1,2]。本研究以圈养的健康四川黑熊为研究对象,对肌酸激酶(creatine kinase,EC 2.7.3.2 简称CK)及其同工酶的活性进行了检测,旨在建立起黑熊的生化参考指标,为研究黑熊积累资料,并为黑熊的疾病防治提供科学依据。

肌酸激酶主要存在于人和动物的心脏、骨胳肌和脑的细胞浆和线粒体中,是细胞内能量转运、肌肉收缩、ATP的再生有直接关系的重要酶类。CK是由M和B两种不同的亚基构成的二聚体,因此人和动物的组织中常含有3种同工酶,即:CK-MM、CK-MB和CK-BB。CK-MM在成年动物的肌肉组织中含量最高,CK-

基金项目:四川省教育厅重点科研项目(2004A101);西华师范大学科研启动项目(2003);四川省重点学科建设项目(SZD0420)
Supported by the Key Scientific Resarch Foundation of Educational Commiffee of Sichuan Province (2004A101), the Scientific Research Foundation of China West Normal University (2003) and Key Discipline Construction Project in Sichuan Province (SZD0420)

作者简介:侯万儒(1954-),男,四川省阆中市人,博士,教授,主要从事生物化学和分子生物学研究,发表论文40余篇,现在西华师范大学学报编辑部工作。电话:(0817)2314311。

收稿日期:2005-01-17;**修回日期**:2005-06-18

MB 在心肌中含量最高,CK-BB 在脑组织中含量最高[3]。各型同工酶中又存在着若干亚型,其亚型的形成主要由 M 和 B 亚基羧基端的修饰差异所致。

本实验仅对圈养的四川黑熊的 CK 及其同工酶 CK-MB 活性进行了检测。

1　材料与方法

1.1　材料

本实验所用黑熊来自四川省中药材公司都江堰养鹿场,为人工驯养下的健康者,用抓阄法随机抽取 1 ~ 4 岁黑熊 20 头(雌、雄各 10 头)。用盐酸氯胺酮(ketamini)作药物保定,剂量为15 ~ 20 mg/kg,肌肉注射,10 ~ 20 min 黑熊处于轻度麻醉状态时,从颈静脉抽取血液 10 ml,置灭菌干燥的离心管中,待血清析出后,立即离心分离(3 000 r/min,5 min),吸取血清测定酶的活力。每份样品重复测定 3 次,其平均值作为每份样品的活力值。

1.2　检测的原理与方法

1.2.1　CK 的检测原理与方法　　采用 Oliver、Szasz 和 Roung 等的检测原理,即应用己糖激酶(HK, EC 2.7.1.1)与 D-葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G-6-PDH,EC 1.1.1.49)相耦联的酶促反应原理。其反应如下:

$$\text{磷酸肌酸} + \text{ADP} \xrightleftharpoons[Mg^{2+}]{CK} \text{肌酸} + \text{ATP}$$

$$\text{ATP} + \text{葡萄糖} \xrightleftharpoons{HK} \text{葡萄糖-6-磷酸} + \text{ATP}$$

$$\text{葡萄糖-6-磷酸} + NADP^{+} \xrightleftharpoons{G\text{-}6\text{-}PDH} \text{葡萄糖-6-磷酸内脂} + NADPH + H^{+}$$

经以上 3 步反应,最终 $NADP^{+}$ 还原为 $NADPH + H^{+}$。NADPH 在 340 nm 处有最大吸收光谱,测定 340 nm 处吸光度的变化率(该变化率代表了酶促反应的速率),然后利用吸光度变化率计算出酶的活性。

1.2.2　CK-MB 的测定原理与方法　　CK-MB 的检测采用免疫抑制检测法,其原理是用抗 M 亚基的抗血清与 CK-MM 和 CK-MB 中的 M 亚基形成抗原抗体复合物,在完全抑制 M 亚基酶活性的条件下,检测酶的活性,将所检测酶活性值乘以 2 则为 CK-MB 的活性值。

1.2.3　检测试剂　　CK 的检测试剂:磷酸肌酸 30 mmol/L,D-葡萄糖 20 mmol/L,AMP 5 mmol/L,ADP 2 mmol/L,N-乙酸半胱氨酸 20 mmol/L,$NADP^{+}$ 2 mmol/L,HK 3 000 U/L,二腺苷戊磷酸(AP_5A) 10 μmol/L, G-6-PDH 2 500 U/L, Mg^{2+} 10 mmol/L, Tris 缓冲液 100 mmol/L pH 6.7。

CK-MB 的检测试剂: D-葡萄糖 20 mmol/L ,醋酸镁 10 mmol/L,EDTA 2 mmol/L,HK 2 500 U/L,G-6-PDH 1 500 U/L, AMP 5 mmol/L, ADP 2 mmol/L, AP_5A 10 μmol/L, $NADP^{+}$ 2 mmol/L, N-乙酰半胱氨酸 20 mmol/L, 抑制 CK-M 抗体 2 000 U/L,磷酸肌酸 30 mmol/L,咪唑缓冲液 0.1 mmol/L pH 6.7。

1.3　操作步骤

①准确吸取 1.0 ml 检测试剂放入比色杯中,于 30 ℃保温 3 min;②在分类光度计 340 nm 处用蒸馏水调"0";③吸取40 μl 被测血清加入相应的比色杯中,迅速混匀,30 ℃于340 nm处保温 0.5 min,读取初始吸光度,同时开始计时,并精确在 1、2 min 时分别读取吸光度,确定每分钟平均吸光度变化率(△A/min),并用此进行计算。

1.4　计算方法

在实验条件下,每升血清每分钟生成 1 μmol NADPH 为 1 个国际单位,按以下公式计算

$$\text{U/L} = \frac{\triangle A/min \times Vt \times 1\,000}{6.22 \times Vs \times d}$$

式中,Vt 为反应体积(1.04 ml),6.22 为 NADPH 在340 nm 处的消光系数,Vs 为被测样品体积(0.04 ml),d 为比色杯光径(1.0 cm)。

1.5　统计学方法

以所测每份样品的平均值为统计计算的基础值,采用 SPSS 10.0 软件对所得基础值进行统计分析得出黑熊(雌、雄)血清中的 CK 和 CK-MB 活性的平均值($\bar{x}$),标准差(s),变异系数(CV)和期望值置信区间($\bar{x} \pm U_a s/\sqrt{n}$)($\alpha = 0.05$)。

2　结果

对所测 20 头黑熊的 CK 及 CK ~ MB 活性数据进行统计分析,最终得到黑熊血清中的 CK 和 CK-MB 活性的平均值 $\bar{x}$、标准差 s、变异系数 CV 和期望值置信区间 $\bar{x} \pm U_a s/\sqrt{n}$,见表 1。用 t 检验对雄性黑熊和雌性黑熊血清中的 CK 和 CK-MB 活性平均值进行比较,其平均值没有显著差异($P = 0.05$)

表 1　黑熊 CK 及 CK-MB 活性的参数指标

Tab 1　Reference standard for CK and CK-MB activity of black bears

Item	Male black bear				Female black bear			
	$\bar{x}$	s	CV(%)	$\bar{x} \pm U_a s/\sqrt{n}$	$\bar{x}$	s	CV(%)	$\bar{x} \pm U_a s/\sqrt{n}$
CK(U/L)	162.7	19.3	11.9	148.90 - 176.50	149.3	12.06	8	140.68 - 157.92
CK-MB(U/L)	17.4	2.99	17	15.26 - 19.54	15.8	2.94	18.6	13.70 - 17.90

3　讨论

检测结果表明,在 30 ℃条件下,雄性黑熊 CK 和 CK-MB 的活性均高于雄性,但不存在显著差异。所测数据可以初步作为健康黑熊血清中 CK 和 CK-MB 活性的生化参考指标。

到目前为止,关于肌酸激酶在生物体内一级结构的肽链折叠成有生物活性的蛋白质的机制和具体过程、折叠中间体的证明及其在生物体内的作用机理等还没有搞清楚,但对肌酸激酶的分子结构,基因结构特点,基因的表达调节等方面的研究已经取得了突破性的进展,尤其是肌酸激酶在临床诊断方面得到了广泛应用。在人类用酶耦联法测定的 CK 正常值通常是:男,15 ~ 130 U/L (30 ℃),25 ~ 200 U/L(37 ℃);女,15 ~ 110 U/L(30 ℃),25 ~ 170 U/L(37 ℃)。当疾病发生时,CK 值通常会有特异性的变化,临床应用上正

是据此作为临床诊断的依据。

急性心肌梗死(AMI),急性心肌炎和急性颅脑损伤等心脑疾病的诊断和疗效判断方面,肌酸激酶和肌酸激酶同功酶及其亚型的变化特别引人注目[4~7]。

除心脑疾病外,其它疾病,如糖尿病、肿瘤、精神分裂、癫痫、有机磷农药中毒等会引起肌酸激酶及其同功酶活性增高,所以肌酸激酶及其同功酶活性的检测常作为这些疾病的辅助诊断手段[8]。

在人类,血清肌酸激酶及其同功酶活性测定,相关生化指标的建立,临床应用等已得到广泛重视,但对动物,尤其是对野生动物血清肌酸激酶及其同功酶活性测定,相关生化指标的建立,尚未得到广泛重视,更谈不上临床应用。实际上动物血清肌酸激酶及其同功酶活性测定,相关生化指标的建立对于野生动物资源的保护和利用具有十分重要的意义:一方面是为研究野生动物积累基础资料;另一方面是为诊断动物的相关疾病提供科学依据,因为在动物相关疾病的诊断中,很难通过问诊的方式得到疾病及其程度的相关信息,较为科学的方法是通过物理和化学手段去获得诊断疾病的相关信息。

参考文献:

[1] 侯万儒, 米志平, 胡锦矗, 等. 黑熊种群年龄结构和生命表初探[J]. 动物学研究, 2000, 2(2): 127-132.

[2] 侯万儒, 张泽钧, 胡锦矗. 卧龙自然保护区黑熊种群生存力初步分析[J]. 动物学研究, 2001, 22(5): 357-361.

[3] 周秀菊, 刘党生, 蒋宇扬. 肌酸激酶结构与功能研究进展[J]. 沈阳药科大学学报, 2002, 19(5): 386-390.

[4] 杨振华. 肌酸激酶测定在急性心肌梗塞诊断上的进展[J]. 中华医学杂志, 1992, 72(1): 51-53.

[5] 周本财. 肌酸激酶的 MM 亚型及其在急性心肌梗塞诊断中的价值[J]. 临床心血管病杂志, 1989, 5(3): 184-185.

[6] 师 蔚. 血清脑型肌酸激酶同功酶活性对急性颅脑损伤诊断的临床应用[J]. 中华神经外科杂志, 1991, 7(1): 34-36.

[7] 王 琦, 张彦林, 张文忠. 血清肌酸激酶及其同功酶的测定及意义[J]. 齐鲁医学杂志, 2003, 18(4): 494-495.

[8] 杨 旭, 行养玲, 吴 斌. 精神分裂症患者治疗初期肌酸激酶活性的临床研究[J]. 中国行为医学科学, 2002, 11(6): 663.

(编辑 张大春)

(上接1449页)

1.3 统计学方法

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 10.0 软件进行方差分析和均数间多重比较。

2 结果

结果表明,WESPL 可明显降低链脲佐菌素所致糖尿病小鼠血糖,明显降低糖尿病模型小鼠血清中总胆固醇、甘油三酯及低密度脂蛋白胆固醇,明显升高高密度脂蛋白,有调节血酯的作用(表1,2)。

表1 WESPL 对链脲佐菌素所致糖尿病小鼠血糖的影响($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 ($g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$)	血糖浓度 (mmol/L) 给药前	血糖浓度 (mmol/L) 给药后	降糖率 (%)
正常对照组	NS	7.89±3.46	8.66±1.308	—
STZ+NS	NS	24.96±6.89	25.64±3.18#	—
STZ+PHF	0.035×30	24.12±6.01	18.79±2.27**	22.08
STZ+WESPL	80(含生药)×30	22.06±5.33	20.09±2.12*	8.90
STZ+WESPL	40(含生药)×30	22.05±5.79	20.90±1.26*	6.00

#: $P<0.01$,与正常对照组比较; *: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* STZ+NS; $F=4.89$, $P<0.01$

表2 柿叶提取物对链脲佐菌素所致糖尿病小鼠血脂的影响($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 ($g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$)	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)	LDL-C (mmol/L)	HDL-C (mmol/L)
对照组	NS	2.29±0.22	0.93±0.33	0.61±0.11	1.20±0.11
STZ+NS	NS	3.49±0.53#	3.40±0.98#	1.46±0.25#	0.67±0.27#
STZ+PHF	35×30	2.61±0.33*	2.62±0.88*	0.77±0.17**	0.94±0.20*
STZ+WESPL	80(含生药)×30	2.63±0.39*	2.26±0.59*	0.80±0.13**	0.81±0.16*
STZ+WESPL	40(含生药)×30	2.98±0.23*	2.56±0.78*	2.89±0.10**	0.81±0.28*

#: $P<0.01$,与正常对照组比较; *: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* STZ+NS; $F=3.25$, $P<0.05$

3 讨论

WESPL 具有显著降低链脲佐菌素型糖尿病模型小鼠的血糖和调节血脂的作用。明显降低糖尿病模型小鼠血清中总胆固醇、甘油三酯及低密度脂蛋白胆固醇,明显升高高密度脂蛋白。

柿叶中5种三帖类化合物都具有抑制超氧化物产生的作用[2]。柿叶茶有清除氧自由基的抗氧化作用[3]。WESPL 是否通过清除氧自由基而解除自由基对胰岛 B 细胞的损伤,及 WESPL 的降血糖机制有待进一步探讨。柿叶茶与鲜柿汁都有降脂作用[3,4],说明柿叶中含有降血脂的生物活性成份。

关键词: 柿叶;血糖;血脂;糖尿病

中图法分类号: R587.105 文献标识码: B

参考文献:

[1] 中华本草编委会. 中华本草(6)[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1998. 5248-5430.

[2] Chen G, Lu H, Wang C, *et al*. Effect of five triterpenoid compounds isolated from leaves of Diospyros kaki on stimulus-induced superoxide generation and tyrosyl phosphorylation in human polymorphonuclear leukocytes[J]. Clin Chim Acta, 2002, 320(1-2): 11-16.

[3] 林赛榕, 江家梨, 吴小南. 柿叶茶抗氧化、降血脂作用的实验研究[J]. 海峡药学, 1996, 8(4): 14-15.

[4] 吴小南, 江家梨. 鲜柿叶汁对实验性高脂大鼠减肥降脂作用的观察[J]. 中国公共卫生, 1999, 15(4): 302-303.

(编辑 王 红)