维普资讯 http://www.cqvip.com

12-14

放射酶分析法检测红细胞胰岛素降解酶活性

④

临床学院内科 李晨钟* 张素华 邱鸿鑫
基础核医学教研室 王鼎年

R446.63
Q556

提 要 本文采用放射酶分析法检测红细胞胰岛素降解酶活性(EIDEA)。该方法应用方便、灵敏度极高、结果准确。并对酶反应最佳条件进行了实验探讨，底物Km为0.09mU/ml，最适pH值7.40，延滞期25分钟，25～40分钟测得EIDEA基本一致。批内CV为3.0%，批间CV为3.3%。氯化物、EDTA可抑制该酶活性。50例健康人红细胞胰岛素酶活性为80.18±13.80U/mgHb，无性别、年龄差异。

关键词 胰岛素酶；放射酶分析法；红细胞
中图分类号 R817

胰岛素，胰岛素降解酶

胰岛素降解酶(insulin degrading enzyme IDE)是一种能特异、高效地催化胰岛素降解的水解酶。检测该酶活性，不仅可了解机体的胰岛素代谢情况，还可以间接推测机体的胰岛素敏感性[1,2]。目前，国外多采用放射酶分析法检测IDE活性[3]。其中，红细胞IDE活性(EIDEA)的检测方法最为成熟。本文对Standl等的方法[4]进行了改良，优选出最适实验条件，建立了一种适合临床应用的测定方法。

1 材料和方法

1.1 原理

将A_{14}－^{125}I单碘猪胰岛素(标记底物)与富含红细胞IDE的红细胞溶血上清液进行温育，使其在该酶催化下降解，生成短肽和氨基酸。最后加入5% 三氯醋酸(TCA)终止反应，并使胰岛素降解产物溶解于其中。将TCA可溶性片段(标记产物)与未反应的剩余底物分离后，根据所测得的标记产物的放射性计数和标记底物的比放射性，可计算出单位时间内底物的消失量，即酶活性。由于酶活性通常与待测酶液中的总蛋白量平行，为了使测定结果更具有可比性，本方法计算酶比活性，即单位血红蛋白所具有的酶活性[5]。

1.2 主要试剂及仪器

1.2.1 高纯度猪胰岛素(丹麦NOVO公司产品)。

1.2.2 A_{14}－^{125}I单碘猪胰岛素(华西糖尿病应用科技研究所提供)。比放射性4.4×10^{7}～6.7×10^{7}Gbq/mol，以非标记高纯度猪胰岛素为载体，使比放射性降至1.09×10^{7}～2.42×10^{7} Gbq/mol。非标记胰岛素的用量按公式计算[5]。

1.2.3 碘乙酰胺、人体白蛋白及其它试剂由本院内科生化室提供，均为分析纯。

1.2.4 FT－608型γ计数仪，HZ－94型恒温振荡器，721A分光光度计，低温超速离心机及其它常规生化器械。

1.3 标本来源和处理

正常人50例(男26例，女24例)，年龄49.8±12.1岁，空腹血糖、空腹血浆胰岛素、血脂、肝功能及肾功能均在正常范围内。受试者禁食12～14小时过夜，于次晨抽取肘静脉血2ml，肝素抗凝(含20U烤干肝素)，其中15例受试者(男7例，女8例，年龄48.2±11.6岁)于同一部位另抽2ml静脉血，EDTA抗凝(含0.001M EDTA)。标本经4°C、10,000×g离心10分钟后，弃去血浆。将保留的约1ml红细胞用生理盐水洗涤三次，再用10倍体积冷蒸馏水使之溶血。最后再经4°C、10,000×g离心10分钟，弃去沉渣，将保留的约5ml红细胞溶血上清液－20°C冷冻备用。同时测定血红蛋白浓度。

1.4 测定方法及实验条件优选

测定均作复管。每支试管中都装有2ml温育混合液。包括：制备好的红细胞溶血上清液0.5ml，A_{14}－^{125}I单碘猪胰岛素 (1mU/ml)200μl，人白蛋白 (20mg/ml)100μl，HCL－Tris缓冲液(20mmol/l，pH值7.4)。将试管置于37°C恒温振荡水浴中温育25分钟，并在10分钟及25分钟时分别移取温育混合液200μl，并向该液中加入等量5%TCA溶液以终止反应。随后经常温，10,000×g离心15分钟，弃去沉渣，取300μl上清液用γ计数仪测定放射性计数(cpm)。25分钟与0分钟时的cpm之差减去本底即为每测定管的cpm。同时，采用常规氰化高铁法测定每位受试者的血红蛋白浓度，并按公式计算EIDEA，其单位为酶活性单位/毫克血红蛋白(U/mgHb)[6]。

我们同时对酶促反应的最适pH值、温育时间、米氏常数、线性、精密度、抑制剂和激活剂进行了实验探讨。

2 结果

2.1 最适pH值的选择 配制不同pH值(6.0，7.0，7.4，8.0，8.5，9.0)的HCL－Tris缓冲液测定8例受试者(男、女各4例，年龄49.4±6.9岁)的EIDEA。结果表明，pH值在7.40时，EIDEA最高。

2.2 米氏常数(Km)的测定 配制10种不同浓度的标记胰岛素(0.02，0.04，0.08，0.2，0.4，0.8，1.0，1.5，2.0，2.5mU/ml)测定一份标本的EIDEA。通过

* 男，1971－01出生，博士研究生

维普资讯 http://www.cqvip.com

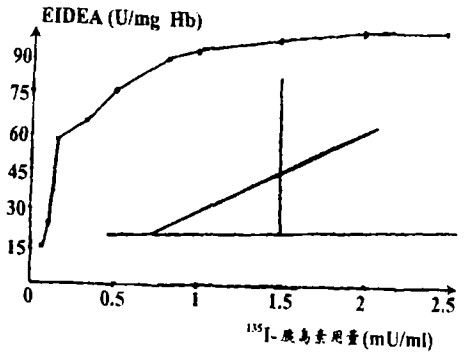


图1 米氏常数测定

林－贝氏作图，求得Km值大约为0.09mU/ml(图1)。本方法选用1mU/ml标记胰岛素，此浓度约为红细胞IDEKm值的11.1倍。

2.3 **温育时间测定** 取一位受试者的标本配制成9份温育混合物，分别温育不同时间(1，5，10，15，20，25，30，35，40分钟)后测定EIDEA(图2)。结果显示，在最初25分钟内酶活性逐渐上升，此时间为延滞期。25分钟至40分钟的EIDEA基本一致。故将温育时间定为25分钟。

2.4 **线性** 取不同体积的同一受试者的标本(0.1，0.4，0.5，0.8，1ml)，用pH值7.40，20mmol/l的HCL－Tris缓冲液补充，使温育混合液的体积保持2ml，分别测定EIDEA，结果见图3。可见，酶活性至少在150U/mgHb内保持线性。

2.5 **精密度试验** 取一位受试者的标本，批内重复测定10次，$\bar{x}$＝81.64U/mgHb，s＝2.45U/mgHb，CV＝3%。将另一位受试者的标本分装于3支小试管，－20°C冷冻保存，每日取一支试管重复测定3次，连续测3天，共测9次，$\bar{x}$＝80.78U/mgHb，s＝2.68U/mgHb，CV＝3.3%。

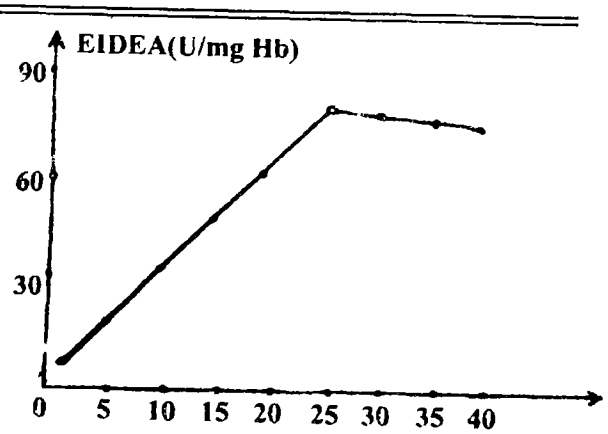


图2 酶促反应时间测定

2.6 **抑制剂与激活剂** 15例受试者(见材料与方法)用EDTA抗凝和肝素抗凝，EIDEA分别为28.6±10.5U/mgHb和81.8±11.6U/mgHb，二者有极显著性差异($P<0.01$)。8例受试者(男、女各4例，年龄48.8±7.6岁)的标本配制成两种不同的温育混合液。一种含10mmol/l碘乙酰胺200μl，另一种用等量HCL－Tris缓冲液代替，测得EIDEA分别为79.7±8.9U/mgHb和77±10U/mgHb，二者无显著性差异($P>0.05$)。取相同体积的同一受试者的标本，配制成7份温育混合液，每份含HCL－Tris缓冲液900μl，用不同浓度(0.5，1，2，4，6，8，10%)的氯化钠溶液补充，保持温育混合液体积为2ml。分别测定EIDEA(图4)。结果发现，随着氯化物浓度升高，EIDEA逐渐下降。

2.7 **正常参考值** 测得50例健康人的EIDEA为80.18±13.8U/mgHb，男性为81.4±10.5U/mgHb，女性为78.9±16.8U/mgHb，男女间无显著性差异($P>0.05$)。按年龄分为三组时，A组(≥50

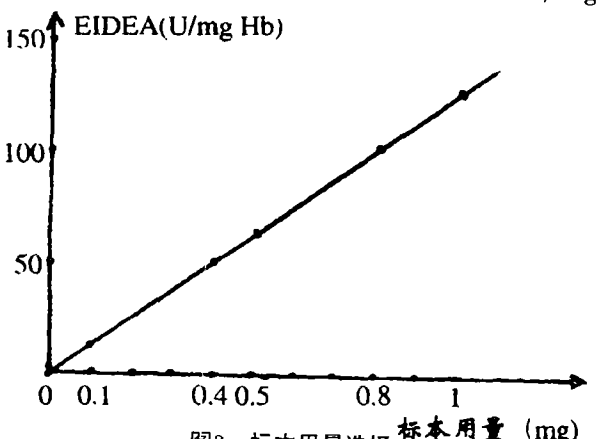


图3 标本用量选择

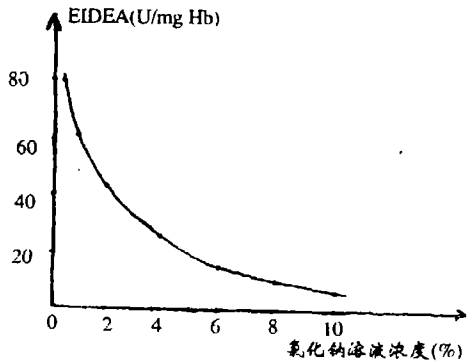


图4 氯化钠对EIDEA的影响

维普资讯 http://www.cqvip.com

岁，共15例)的EIDEA为82.1±11.8U/mgHb，B组（30～50岁，共24例）的EIDEA为80.4±10.2U/mgHb，C组（≤30岁，共11例）的EIDEA为77.1±21.8U/mgHb。三组两两比较均无显著性差异(Newman－Keuls检验，$P>0.05$)。

3 讨论

IDE是一种能特异地催化胰岛素降解的金属内肽酶。该酶催化活性很高，被视为是细胞水平催化胰岛素降解的最主要酶类。由于胰岛素降解过快可引起胰岛素抵抗[6]，而后者是II型糖尿病的主要发病原因，故糖尿病患者的胰岛素降解活性引起广泛兴趣[7]。目前，国外多测定EIDEA。因为红细胞虽不是胰岛素作用的靶细胞，但其IDE的含量和特性与靶细胞IDE极为类似[8]。此外，红细胞还具有来源容易，分离简单等优点。但EIDEA测定在国内尚未开展。我们对国外报道的方法[4]作了一些改良，建立了适用于临床的测定方法。

实验结果表明，我们的方法在测定范围内有很好的线性，所采用的底物浓度超过Km值的10倍，批内及批间重复性良好，温育时间为酶达到最大活性的最短时间，温育混合液的pH值为酶的最适pH值。此外，本方法测定的正常人EIDEA与文献报道相近[4,7]。可见本方法具有特异性高、结果准确、重复性好的特点，尤其是灵敏度极高[5]。

有作者报道氯化物可明显抑制该酶活性[9]，我们得出相同结果。我们还发现，EDTA对该酶活性也有明显抑制作用。其原因可能与EDTA能与金属离子生成稳定的络合物，而IDE是金属酶，Mg、Zn离子对其活性的维持起主要作用有关[10]。本方法根据文献报道[4]，在温育混合液中加入碘乙酰胺，但国外有的方法未使用该物质[9]。我们在碘乙酰胺对EIDEA影响的研究中发现，该物质在EIDEA测定中的作用不明显。

本方法以^{125}I作为标记核素，其半衰期仅60天。配制好的标记胰岛素溶液5周后，放射性即减少约50%(包括脱落碘的氧化逸失)，其放射化学性质也有一定的改变。故标记胰岛素溶液最好临时配制。

参考文献

1.Duckworth WC.Endocrinol Rev,1988;9:318
2.McElduff A,et al.Aust NZ J Med,1980;10:56
3.Duckworth WC.Biochem Biophys Acta,1976;437:518
4.Standl E,Kolb HJ.Diabetologia,1984;27:17
5.闵长庚，主编.检验核医学，第一版，北京，中国科学技术出版社 1993:112－116
6.Kitabchi AE,et al.Diabetes Care,1979;2:414
7.Snehalatha C,et al.JAPI,1990;38:558
8.Neal GW,Kitabchi AE.Biochem Biophys Acta,1982;719:259
9.Hamel FG.Diabetes,1991;40:463
10.Yokono K,et al.Endocrinology,1981;108:1527

(收稿日期 1997－04－21)

The determination of insulin degrading enzyme activity with radioassay of enzyme activity

Li Chenzhong, et al
Department of Internal Medicine,College of Clinical Medicine

This paper described the method of radioassay of insulin degrading enzyme activity of erythrocytes (EIDEA). It is simple, sensitive and accurate. Optimum reaction conditions for EIDEA were investigated. The substrate Km was 0.09mU/ml. The optimum pH was 7.40.The delay time was 25 minutes. The results of determination from 25 to 40 minutes were basically identical. Within－run and between－run precision were 3.0% and 3.3%,respectively. Chloride and EDTA can inhibit EIDEA. The mean EIDEA of 50 healthy subjects was 80.18±13.80mU/mlHb.There was no sex or age difference.

KEY WORDS Insulin degrading enzyme; Radioassay of enzyme activity; Erythrocyte