DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.03.037

技术方法

文章编号:1000-5404(2000)03-0294-02

伴刀豆球蛋白A识别正常与肝癌γ-谷氨酰转移酶的实验观察

Experimental study of ConA affinity micro-column chromatography of human hepatocellular carcinoma specific γ-glutamyltransferase

司维柯[1],李士敏[2],罗朝学[3],胡珍国[3],何长生[4],王 源[1],魏明竞[1](1第三军医大学医学检验系临床检验教研室,重庆400038;2重庆药剂学校临床检验教研室,重庆400000;第三军医大学:3核医学教研室;4附属西南医院检验科;重庆400038)

提 要 目的:观察伴刀豆球蛋白A是否能有效的区分出正常与肝细胞肝癌特异γ-谷氨酰转移酶(HCC-SGGT),为进一步建立简便、快速、灵敏、特异的检测肝癌特异GGT的方法奠定基础。方法:用植物凝集素亲和微柱法,二步洗脱,分离10例正常人、5例肝细胞肝癌病人、5例良性肝病病人血清中的GGT,用速率法检测酶活性。得到层析图谱、总酶活性比和亲和率。结果:正常与良性肝病病人血清第一步洗脱的酶活性较低(平均峰高分别为1.62,1.26),而肝癌病人血清第一步洗脱的酶活性较高(平均峰高为16.8)。总酶活性比分别为0.24,0.13,0.48;亲和率分别为80.6%,88.1%,67.6%。结论:伴刀豆球蛋白A与正常人、良性肝病病人血清中的GGT亲和性较强,与肝癌病人血清中的GGT亲和性较弱,伴刀豆球蛋白A能有效的区分出正常与肝癌特异GGT,利用该特性可建立检测肝癌特异GGT的植物凝集素亲和法。

血清GGT是诊断肝胆胰疾病较灵敏的指标[1],特别是肝癌特异GGT的发现(泽武纪雄1977),使该酶在诊断肝癌方面有重要价值,尤其是AFP阴性的肝癌病人的诊断[2,3]。但目前检测该指标的方法仍以PAGE梯度电泳法为主,该方法虽有许多优点,但仍显繁琐、费时,限制了该指标的应用。本实验拟观察证实:伴刀豆球蛋白A(concanavalin A,ConA)是否能识别正常和肝癌GGT,为建立简便、快速检测肝癌特异GGT的植物凝集素亲和法打下基础。

1 材料和方法

1.1 材料

10例正常人血清标本来自医院门诊体检的正常人。5例良性肝病病人血清来自2例胆道阻塞、3例肝炎病人。5例肝癌病人血清来自病理切片确诊的肝细胞肝癌病人血清。

1.2 试剂

con A-sepharose, α-methylglucoside, methyl-α-D-mannopynoside均为Sigma公司产品。GGT检测试剂盒和试剂均为国产试剂。

1.3 方法

自制微层析装置,微柱1 cm×7 cm,柱体积为1.5~2 ml,两个连续洗脱装置。装好柱后,用第一缓冲液平衡(0.01 mol/L Tris缓冲液,pH 7.2~8.0,内含0.2 mol/L NaCl,0.1%Triton X-100和一定浓度的Mg^{2+},Ca^{2+}等金属离子)。待缓冲液的凹液面刚与柱床面相切时(勿混入空气于柱床内),沿柱壁加待检血清0.2 ml(不能混入血球和血脂!),待血清几乎全部进入柱床时(凹液面刚与柱床面相切时),接上洗脱装置,用第一缓冲液洗脱。按6~12 drop/min的流速洗脱,以0.5~0.7 ml/tube收集,共收集5管,继续洗脱至收集液A_{280}<0.06后,换第二缓冲液(为第一缓冲洗中加入一定浓度的α-methylglucoside和Methyl-α-D-mannopynoside)洗脱,收集方式同前,继续洗脱至收集液A_{280}<0.06后,换第一缓冲液洗脱并平衡。用同样的方法分离第二个标本。每个标本共收集了10管。GGT酶活性采用中生公司试剂盒,在自动分光光度计上测得酶活性。测定时温度为25℃,取收集液0.5 ml,试剂1.0 ml,得到的△A/min值乘以因素316即得酶活性。

2 结果

正常人、良性肝病病人、肝癌病人3组,分别计算出第一及第二次洗脱液的平均总酶活性(E_1,E_2)及其比值(E_1/E_2),亲和率(E_1或$E_2/E_1+E_2\times100$),见表1。

表1 3组血清GGT酶活性、比值和亲和率

	E_1	E_2	总酶活性比(E_1/E_2)	亲和率%
正 常 人	6.88	28.67	0.24	80.6
良性肝病病人	9.33	69.26	0.13	88.1
肝 癌 病 人	82.2	171.24	0.48	67.6

ConA与正常和良性肝病GGT的亲和性强,与肝癌的亲和性弱,它们的亲和率分别为80.6%,88.1%,67.6%。且总酶活性比值经t检验,正常GGT与肝癌GGT间差异显著($P<0.01$),良性肝病GGT与肝癌GGT间差异显著($P<0.01$),正

基金项目:重庆市中青年基金资助项目;第三军医大学校管科研课题

作者简介:司维柯(1958.10),女,山西省晋城县人,博士研究生,讲师,主要从事外源因子抗肿瘤及其机制、肿瘤的实验室诊断方面的研究,发表论文10篇。电话:(023)68752310

收稿日期:1999-04-15;修回日期:1999-10-21

?1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

常和良性肝病 GGT 间差异不显著($P>0.05$)。说明 ConA 可有效的识别出肝癌和非肝癌 GGT。基于此特性,可建立检测肝癌 GGT 的植物凝集素亲和技术。

3 讨论

血清 GGT 同工酶属次级同工酶,同工酶间蛋白质的一级结构均相似,差别仅在糖链的组成上。Joris[5] 在研究肝脏疾病中,血清 GGT 与植物凝集素的关系时,发现 5 种植物凝集素中,唯有 ConA 与肝病血清 GGT 结合有特性,表现出与正常人 GGT 的结合性强,与肝硬化和转移性肝癌的 GGT 结合性较弱(未做肝细胞肝癌病例)。Hideo 等研究肝癌 GGT 的分子组成时,发现 88%~92%的正常肝 GGT 与 ConA 结合,38%~85%的肝癌 GGT 与 ConA 结合。Akira 和 Katsuko 等分别发现植物血球凝集素(PHA)也可识别经神经氨酸酶处理了的肝癌 GGT。丁邦裕等[4] 也曾用江苏菜豆凝集素(E-PHA)分离检测肝癌 GGT。该凝集素应用时,需用神经氨酸酶处理血清 GGT 数小时,才能识别出正常与肝癌 GGT,故费时,不适合临床实验室诊断。本实验选择 ConA 做为亲合配体,为建立一种简便、快速、适于临床应用的检测肝癌 GGT 的方法奠定了基础。

关键词 肝细胞肝癌;伴刀豆球蛋白 A;γ-谷氨酰转移酶
中图法分类号 R392.11;R735.704 文献标识码 B

参考文献

[1] 梁扩寰主编. 肝脏病学[M]. 北京:人民卫生出版社,1995.213—223.
[2] 黄中伟,姚登福,孟宪镛. γ-谷氨酰移换酶肝癌特异区带定量检测的临床意义[J]. 中华内科杂志,1995,34(2):123.
[3] 孟宪镛. 肝癌标记物研究进展[J]. 国外医学:内科学分册,1990,17(1):54—58.
[4] 丁邦裕,载美红,张锡丝,等. 应用江苏菜豆凝集素亲合柱层析检测肝癌特异γ-谷氨酰转肽酶[J]. 临床检验杂志,1991,9(1):14—15.
[5] Joris R De. Marc L De, Ivan K De, *et al*. Lectin affinity chromatography of serum gamma-glutamyltransferase in liver disease[J]. Clinica Chimica Acta, 1987, 162(3):311—318.

(编辑 陈聪连)

文章编号:1000-5404(2000)03-0295-03

技术方法

大鼠蛛网膜下腔出血后脑血管痉挛模型的制备

Establishment of cerebral vasospasm model after subarachnoid hemorrhage in rats

代佳平[1],冯 华[2],刘 昕[1],王宪荣[2] (第三军医大学:[1]基础医学部分子遗传学教研室;[2]附属西南医院神经外科;重庆 400038)

提 要 目的:为了深入研究 SAH 后 CVS 的发生机制及其治疗效果。方法:42 只大鼠随机分:A 组:正常对照组;B 组:注射 0.9% 氯化钠对照组;C 组:采用 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 ml 自体动脉血注入大鼠枕大池制作 CVS 模型。观察大鼠的存活、临床表现、血压、血气分析、rCBF 测定及病理学检查等。结果:B 组大鼠均存活,临床表现典型及和病理学改变轻微,与 A 组差异不明显。C_4:大鼠均存活,但反应迟钝,自洁性差,血压短暂升高,rCBF 下降明显,持续时间长;颅底出血,颅底动脉管壁破坏、层次结构消失,与 B 组差别显著。$C_{1\sim3}$ 组大鼠死亡率高。C_5 组大鼠临床表现肌病理改变不明显。结论:注射 0.2 ml 时,大鼠存活率高,临床表现典型,rCBF 降低和病理改变明显,而且与慢性出血性脑血管痉挛相一致,是最理想的 CVS 模型。

脑血管痉挛(Cerebral vasospasm, CVS)是蛛网膜下腔出血(Subarachnoid hemorrhage, SAH)病人致死致残的主要原因之一,近来的研究也显示,创伤 SAH 后 CVS 也是影响严重颅脑创伤病人预后的重要因素[1]。为深入研究 SAH 后 CVS 发生的机制并探讨各种干预措施,我们利用大鼠枕大池注血法制备了实验性 SAH 模型,报道如下。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39370685)
作者简介:代佳平(1969.9),女,重庆市壁山县人,助理实验师,主要从事蛛网膜下腔出血方面的研究。电话:(023)68752257
收稿日期:1999-01-14;修回日期:1999-04-13

1 材料与方法

1.1 动物分组

Wistar 大鼠 42 只,雌雄不拘,体重 220~250 g,随机分为 7 组,A 组:正常对照组;B 组:在大鼠枕大池注入 0.9% 氯化钠注射液;C 组:在大鼠枕大池注射自体动脉血,剂量按 0.5、0.4、

?1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net