DOI:10.16016/j.1000-5404.1988.04.011

技术与方法

蛋白尿患者尿中两种酶和蛋白质的分析

魏明竟 李可能 洪荣秀 陈绍华 李文庆 赵树铭（第一附属医院 检验科）

尿中出现异常量蛋白质可以是由于肾脏及尿路疾患，亦可是其他疾患或生理性蛋白尿。为此，我们对65例尿蛋白定性阳性的住院病人新鲜尿标本中几种蛋白质和酶进行分析，探讨选择性蛋白尿及尿溶菌酶和γ-谷氨酰基转移酶等的鉴别诊断意义。

对象和方法

1．检验对象

为住院病人中尿蛋白定性阳性者，包括肾脏疾病36例、下尿路及其他疾患29例。临床诊断以出院第一诊断为准。

2．方法

（1）尿蛋白定量：磺基水杨酸比浊法。

（2）尿肌酐测定：苦味酸法。

（3）溶菌酶测定：光电比浊法。

（4）γ-谷氨酰基转移酶（γ-GT）：重氮反应法。用U/mmol肌酐表示。

（5）免疫球蛋白G（IgG）和运铁蛋白(Tf)定量：单向环状免疫扩散法，上海生物制品所提供的抗血清和参考品。

（6）根据下列公式计算蛋白质/肌酐指数（PCI），

$$PCI = \frac{\text{尿蛋白 mg/L}}{\text{尿肌酐 mmol/L}}$$

结果和讨论

1．尿中几种蛋白质的浓度变化（见表1）

表1 疾病时几种蛋白质的浓度

疾病名称	n	总蛋白mg/ml $\bar{X}\pm SD$	PCI $\bar{X}\pm SD$	IgG mg/ml $\bar{X}\pm SD$	Tf mg/ml $\bar{X}\pm SD$	IgG/Tf $\bar{X}\pm SD$
慢性肾小球肾炎	22	5.77±7.05	677.1±896	0.31±0.54	1.19±1.98	0.64±0.47
肾病综合症	9	5.71±2.92	961.1±531.2	0.28±0.16	0.25±0.15$^{\Delta}$	1.39±1.10$^{\Delta}$
中毒性肾病	5	3.74±3.69	877.7±845.6	0.43±0.18	0.22±0.16$^{\Delta}$	3.63±4.28$^{\Delta}$
尿路感染	9	1.19±0.7$^{\Delta}$	265.7±82.9$^{\Delta}$	0.15±0.06$^{\Delta}$	0.06±0.04$^{\Delta}$	2.78±1.52$^{\Delta}$
其　他	20	0.84±0.41$^{\Delta}$	124.9±81.1$^{\Delta}$	0.08±0.17$^{\Delta}$	0.12±0.19$^{\Delta}$	0.92±1.83$^{\Delta}$

有$^{\Delta}$号者为：与肾小球肾炎组比较，相差显著（$P<0.05$）

2．用随意新鲜尿作尿蛋白定量

可因尿液浓缩或稀释使结果解释困难。肌酐的产生量较恒定，通常可根据尿肌酐浓度来估价尿标本的浓缩和稀释情况。Shaw等报告用随意新鲜尿标本测定尿蛋白并同时测定尿肌酐，计算PCI，结果与收集24h尿的蛋白定量诊断意义很一致[4]。我们的观察发现，PCI对鉴别肾脏疾病和非肾性蛋白尿有帮助。肾脏实质损伤时，由于肾小球滤过率下降，在尿蛋白排出增加的同时，尿肌酐排出减少，其PCI明显上升。36例肾脏疾病PCI平均775.9，而29例非肾性蛋白尿患者PCI平均为158.9，两者相比，$t=3.74$，相差非常显著（$P<0.001$）。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3．正常情况下，血浆中分子量4万以下的蛋白质可以通过肾小球，其中大部份被肾小管重吸收，故正常人尿液中仅含微量的中分子及低分子量蛋白质。当蛋白尿中仅见少量高分子量蛋白质排出时，称为选择性蛋白尿。IgG分子量为16万，属于高分子量蛋白；运铁蛋白分子量为7.6万，属于中分子量蛋白。Cameron提出用IgG与Tf清除率之比（C_{IgG}/C_{Tf}）作为指标，如果比值<0.20，属于选择性蛋白尿；比值>0.30者属于非选择性蛋白尿[1]。在临床上要计算IgG和Tf的清除率，须同时测定血清及尿液的IgG和Tf，这增加了实验室工作量。为减少手续，我们试着直接计算尿IgG/Tf比值，以比值<0.8为选择性蛋白尿，>1.2为非选择性蛋白尿，这对肾脏疾病的病情及预后判断有一定的帮助。肾病综合症及中毒性肾病时，IgG/Tf比值常>1.0，明显高于慢性肾小球肾炎患者（$P<0.05$）。当比值>1.2时，其病情常较重，预后较差。但应指出，包括肾盂肾炎在内的尿路感染患者，其尿中Tf排出量明显偏低，而由于感染局部的免疫应答，可产生少量IgG，此时的IgG/Tf比值可明显增高，这不具有选择性和非选择性意义。

4．疾病时尿中溶菌酶的变化（见图1）

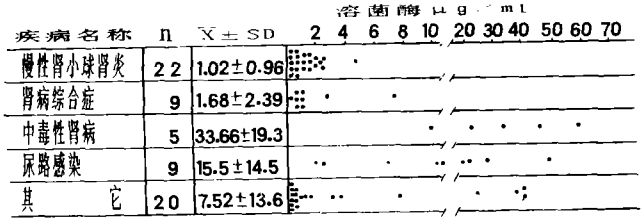


图1 疾病时的尿中溶菌酶

溶菌酶是分子量1.5万的低分子量蛋白。血浆中溶菌酶主要来自骨髓，由嗜中性粒细胞和网状内皮系统的单核细胞及巨嗜细胞产生。血浆中的溶菌酶可以通过肾小球，正常时，肾小球滤液中的溶菌酶绝大部份被肾小管重吸收，故正常人尿中溶菌酶含量很低（<1 μg/ml）。当各种疾病，溶菌酶产生过多或肾小管功能损伤时，尿中溶菌酶可明显增加。溶菌酶属于醣类水解酶，能水解革兰氏阳性菌胞壁中的乙酰氨基多糖，为机体内重要防御组成部份。尿路感染时，尿中溶菌酶含量可明显增加[2]。从本文的结果中可见，中毒性肾病和尿路感染时增加明显。但其他疾病，包括各种感染性疾病，某些血液病时均可增加，因而尿中溶菌酶的增加对肾脏和尿路疾患较少特异性。

5．疾病时尿中γ-GT活力的变化（见图2）

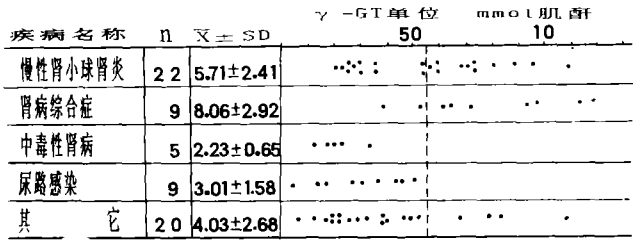


图2 疾病时尿中γ-GT活力

γ-GT在人体中广泛分布，肾脏含量最高。在肾脏，γ-GT主要存在于肾小管刷状缘[3]。当肾脏实质损伤时，尿中γ-GT可增加，以肾病综合症增加明显，肾小球肾炎时亦有相当部份增加。尿中γ-GT的增加与肾脏损害程度有关，因而是很有用的一个临床诊断指标。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

参考文献

1. 陈宏础。肾小球选择性滤过的临床意义。魏明竟等主编《肾功能检验进展》，科技文献出版社重庆分社，1986
2. 丁振若，等。溶菌酶测定用于脑脊液、尿液感染的鉴别诊断。临床检验杂志 1983；1:70
3. 屋形稔·他。尿中γ-グルタミルトランスペペチダーゼ。日本临床 1985秋季增刊 240页
4. Shaw AB, et al. Protein creatinine index and Albustix in assessment of proteinuria. Br Med J 1983: 287:929

(收稿日期：1987年8月19日，修回日期：1988年5月5日)

生物素标记HBV DNA探针在肝石蜡切片上作原位杂交技术操作和经验体会

张士敏* 李奇芬** 朱纯吾* 王慧芬**

在肝组织切片上作HBV DNA的原位杂交实验，是继Soathern blot分子杂交方法（吸印法）之后发展起来的又一种新方法。原位杂交法与吸印法相比有其优点：首先，它是在肝组织切片上进行，不仅可观察HBV DNA的分布和数量等，还可观察HBV DNA与细胞病变的关系，这是吸印法所不及的；其次，原位杂交法所需肝组织少，而吸印法一般需10mg肝组织才能进行[1]；再则，有人认为原位杂交法比吸印法敏感[2]。HBV DNA探针有用同位素如^{32}P或^{3}H标记，也有用生物素标记的。而生物素标记的探针具有可在普通光学显微镜下观察，组织切片可长期保存，操作安全，无放射性沾染等优点。虽然，最初人们认为其敏感性不如同位素标记的探针，但随着标记技术的改进，其敏感性已可与同位素标记探针媲美[3]。

我们应用Enzo Biochem生产的生物素标记的HBV DNA探针（HBV Patho-Geno Kit），在福尔马林固定、石蜡包埋的肝穿刺组织和尸检肝组织上进行原位杂交实验，取得了成功。现将我们的方法以及初步的经验和体会介绍如下：

* 解放军302医院
** 第三军医大学第一附属医院

原位杂交技术操作流程

原位杂交技术操作步骤多，所用试剂繁杂，文献报告所用方法不甚一致。在实验中最大的困扰是易于发生脱片和出现假阳性。我们经过反复摸索，采用以下操作流程，基本上控制了脱片，并初步解决了假阳性现象。

1. 载玻片预处理：先经洗液浸泡→清洗→95%酒精浸泡→擦干→均匀涂布玻片粘附剂（Slide adhensive, Pacific Trade d Service Co）→空气干燥。

2. 切片敷贴后，温箱60℃烤片48h左右。

3. 常规脱蜡至80%酒精。

4. 去内源性过氧化物酶（80%甲醇-0.6% H_2O_2液，室温，15'）→PBS冲洗。

5. 0.2N HCl处理，室温，20'→PBS冲洗。

6. 链霉蛋白酶（Pronase E, E. Merck公司产品）消化（0.1mg/ml, pH7.4, 37℃, 10'）。链霉蛋白酶应于配制后，室温放置至少30min再用。

7. 0.2%甘氨酸-PBS液，pH 7～8，冲洗5'。

8. 4%多聚甲醛-PBS液，pH 7～8，5'～

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net