

# 肝病患者血清酸性 $\alpha$ -醋酸萘酯酶及其同工酶的变化

肖芸, 王燕, 戴志敏, 张维, 廖若男

肖芸, 戴志敏, 廖若男, 贵阳医学院附院血液检验科 贵州省贵阳市 550001  
王燕, 贵阳医学院附院消化内科 贵州省贵阳市 550001  
张维, 贵阳医学院附院血液内科 贵州省贵阳市 550001  
项目负责人: 肖芸, 550001, 贵州省贵阳市, 贵阳医学院附院血液检验科.  
电话: 0851-6855119-3145  
收稿日期: 2004-02-28 接受日期: 2004-04-05

## 摘要

**目的:** 探讨肝病患者血清酸性 $\alpha$ -醋酸萘酯酶(acid alpha naphthyl acetate esterase,  $\alpha$ -ANAE)及其同工酶的临床应用价值。

**方法:** 通过比色法测定血清ANAE总活性。ANAE同工酶的检测采用琼脂糖凝胶电泳法及聚丙烯酰胺凝胶电泳法。

**结果:** 肝病患者包括肝炎、肝硬化及肝癌血清ANAE含量均低于对照组, 肝硬化组及肝癌组明显低于肝炎组。通过琼脂糖凝胶电泳法可以在肝病患者血清中检出两种ANAE同工酶异常谱形。聚丙烯酰胺凝胶电泳可分离出更多ANAE同工酶谱带。

**结论:** 血清ANAE含量测定可作为评价肝细胞变性坏死、肝脏合成功能异常的一项血清学指标。肝病患者血清中检出的异常ANAE同工酶谱带性质、组成及在临床应用上的价值还有待于进一步探讨。

肖芸, 王燕, 戴志敏, 张维, 廖若男. 肝病患者血清酸性 $\alpha$ -醋酸萘酯酶及其同工酶的变化. 世界华人消化杂志 2004;12(8):1932-1933  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1932.asp>

## 0 引言

酸性 $\alpha$ -醋酸萘酯酶(acid alpha naphthyl acetate esterase,  $\alpha$ -ANAE EC3.1.1.1)是一种细胞溶酶体酶, 主要作用于短链脂肪酸使其发生水解。ANAE主要分布于肝、胰、肾、小肠、单核巨噬细胞及组织细胞内。血清ANAE主要来源于肝脏内B酯酶。由于对血清ANAE的研究报告较少, 人们对血清ANAE在肝病患者中的变化了解得也很少, 因此我们参考文献方法[1], 对86例肝病患者血清ANAE含量进行检测, 并采用琼脂糖凝胶电泳和聚丙烯酰胺凝胶电泳两种方法检测ANAE同工酶, 初步观察血清ANAE含量及其同工酶在肝病中的变化规律, 探讨其临床运用价值。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 我院2003-10/12住院肝病患者86例, 其中肝炎20例, 肝硬化35例, 肝癌31例; 男45例, 女41例, 平均年龄54(27-76)岁。肝炎及肝硬化诊断标准

符合中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会联合修订的病毒性肝炎防治方案<sup>[2]</sup>, 肝癌诊断标准符合原发性肝癌的临床诊断与分期标准<sup>[3]</sup>。正常对照为健康体检者53名, 男27名, 女26名, 平均年龄35(28-43)岁。静脉取血2 mL, 分离血清, 于4℃保存, 1wk内检测。底物液: 2 mol/L  $\alpha$ -醋酸萘酯(上海振兴化工厂)。终止液: 1.75 mol/L 冰醋酸。显色液: 1 mmol/L 固蓝B盐(上海化学试剂站进口分装)。标准液: 2 mmol/L  $\alpha$ -萘酚(湘中化学试剂开发中心)。聚丙烯酰胺凝胶电泳所需试剂: 3 mL/L THB(pH8.9), 0.5 mol/L THB(pH6.7), 360 g/L Acr-10 g/L Bis(Sigma), 100 g/L Acr-25 g/L, 50 g/L TeMed(AmresCo), 12.5 g/L APS, 20 × 甘氨酸-Tris 电极缓冲液。721 分光光度计(上海申化仪器自控公司)、DYY-III型水平电泳槽、DYCZ-24D型垂直电泳槽(北京市六一仪器厂)、凝胶成像系统: UVP公司。

**1.2 方法** 比色法测定血清酸性 $\alpha$ -醋酸萘酯含量参照文献[1]进行。显色反应后用721分光光度计, 520 nm波长, 以空白管调零后读取测定管和标准管吸光度, 根据标准管吸光度及含量换算受检标本血清ANAE含量。单位定义: 每升血清在37℃酶反应1 s产生1  $\mu$ mol  $\alpha$ -萘酚为一个 $\mu$ Kat/L。琼脂糖凝胶电泳法检测ANAE同工酶参照黄志华方法<sup>[4]</sup>, 略有改进。电泳槽及载体缓冲液采用巴比妥-巴比妥钠缓冲液(pH8.6,  $\mu$ =0.06)。于10 g/L琼脂糖-PVP凝胶板上加样后, 胶面朝上置于电泳槽上, 两侧用三层纱布搭桥, 电泳槽两侧加入同等量电泳缓冲液。电流2 mA/cm, 电压80V, 稳定通电50 min。取下凝胶, 加入显色液(称取 $\alpha$ -醋酸萘酯5 mg溶于0.2 mL丙酮中, 加0.1 mol/L pH6.2磷酸盐缓冲液10 mL, 固蓝B盐10 mg 振荡过滤, 再加0.04 mL吐湿20)。置37℃水浴显色20 min, 再用30 mL/L冰醋酸漂洗, 待漂洗的胶面清晰后观察并照相保存。聚丙烯酰胺凝胶电泳采用75 g/L聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳, 分别配制分离胶和浓缩胶。首先将分离胶灌入电泳槽中, 小心在胶面上叠加1 mm厚水层, 在灯光下聚合30 min后, 倾去水层, 再灌入浓缩胶, 装好样品梳, 继续聚合2 h。取出样品梳, 每孔加样血清10  $\mu$ L, 电泳槽中加入1 × 电极缓冲液后开始电泳, 电压160 V, 电泳40 min后, 取下胶板显色、固定(同琼脂糖凝胶电泳)。

## 2 结果

**2.1 血清ANAE含量正常参考值**( $n=53$ )为 $28.0 \pm 5.8 \mu$ Kat/L (mean  $\pm$  1.96 SD)。在肝细胞受损时, 包括肝炎、肝硬化和肝癌, 患者血清ANAE含量均明显下降, 经 $t$ 检

验,与对照组相比有极显著差异.肝硬化组与肝癌组比较无显著性差异,二者与肝炎组比较有差异(表1).各肝病组患者血清 ANAE 阳性率分别为肝炎 55.0%(11/20),肝硬化 85.7%(30/35),肝癌 90.3%(28/31).经  $\chi^2$  检验,肝炎组与肝硬化组、肝癌组之间比较有显著性差异( $P < 0.05$ ).

表1 不同类型肝病患者血清 ANAE 含量

分组	n	血清 ANAE( $\mu$ Kat/L)mean $\pm$ SD	阳性率(%)
对照组	53	28.0 $\pm$ 2.9	-
肝炎组	20	20.6 $\pm$ 5.4 <sup>b</sup>	55.0
肝硬化组	35	14.6 $\pm$ 7.4 <sup>bd</sup>	85.7 <sup>e</sup>
肝癌组	31	15.3 $\pm$ 6.0 <sup>bc</sup>	90.3 <sup>e</sup>

采用 *t* 检验: <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 对照组; <sup>c</sup> $P < 0.05$ , <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs 肝炎组; 采用  $\chi^2$  检验: <sup>e</sup> $P < 0.05$  vs 肝炎组.

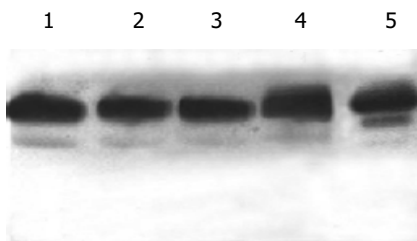


图1 ANAE 同工酶检测 -10 g/L 琼脂糖凝胶电泳. 1: 正常对照; 2-5: 肝病患者的.

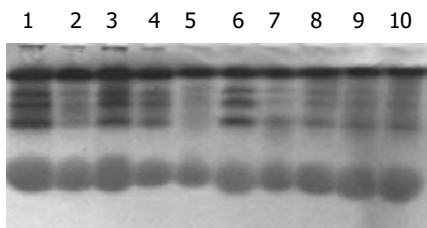


图2 ANAE 同工酶检测 -75 g/L 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 160 V, 50 min. 1: 正常对照; 2-10: 肝病患者的.

2.2 ANAE 同工酶琼脂糖凝胶电泳检测按 IUPAC/TUB 建议从正极到负极分别用 E1.2..... 表示相对电泳位置在位置, E1: Alb/a1, E2 在 a2 位置, E3 在 a2/B 位置. 血清  $\alpha$ -ANE 同工酶区带从阳极到阴极分别为 E1, E2, E3, 色强度为 E3>E1>E2, E1 与 E2 几乎合并. 正常对照可见较明显的 E1, E3 带, E2 带着色浅, 有的不易见(图 1-带 1). 受检的几组肝病中出现三种谱形(图 1): 一种与对照相同(图 1-带 2, 3); 一种出现异常谱带(慢带), 靠近阳极端(图 1-带 4), 检出率为肝癌 22.6%(7/31), 肝硬化 20.0%(4/20), 肝炎 5.0%(1/20); 还有一种谱形为 E2 色度增强(图 1-带 5), 仅在肝癌组中检出, 检出率为 9.7%(3/31). 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测 ANAE 同工酶采用 75 g/L 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 经 160 V 50 min 电泳, 对照可分离出 5 条谱带(图 2-1 泳道). 肝病组的变化主要表

现在中间区带, 表现为谱带色度减弱或出现异常谱带.

### 3 讨论

血清 ANAE 主要来源于肝脏内 B 酯酶. 当肝细胞变性、坏死和纤维化后, 血清中 ANAE 的活性下降<sup>[1]</sup>. 我们发现三组肝病患者的血清 ANAE 含量均低于正常对照组, 且肝硬化和肝癌组又明显低于肝炎组. 但后二者比较无明显差异, 阳性率也较为接近(85.7%, 90.3%). 由于 ANAE 可作为 T 淋巴细胞的一个表面标志, 因此常用 T 淋巴细胞的 ANAE 活性来反映机体免疫功能. 动物实验和临床研究证明, 肿瘤患者的血清、癌组织匀浆上清液、腹水对 T 细胞的免疫反应有抑制作用. 当切除肿瘤而又无远处转移时, 可解除这种免疫抑制作用. 这可以解释本实验中肝癌组与肝硬化组比较无显著差异的原因, 且肝癌组并非所有患者血清 ANAE 含量都呈减低的表现. 为了检测 ANAE 同工酶, 我们采用琼脂糖凝胶电泳和 75 g/L 聚丙烯酰胺凝胶电泳方法分别进行检测. 正常人群的血清酸性  $\alpha$ -ANE 同工酶的谱形基本是恒定的, 肝病患者中除正常谱带外, 可检出两种异常谱带: 一是在阴极侧出现慢带, 另一异常是 E2 色度增强. 黄志华 *et al*<sup>[4]</sup> 研究肝癌时也检出了第一种异常谱带, 认为是 E5 带, 而同样也属于慢带的 E4 带不出现在肝癌中, 可在 I 型重症糖尿病患者血清中检出. 本研究中出现此慢带异常的以肝癌组检出最多(22.6%), 其次为肝硬化组(20.0%)、肝炎组(5.0%). 另一异常谱带为 E2 色度增强, 仅出现在肝癌血清中, 检出率为 9.7%. 应用聚丙烯酰胺凝胶电泳检测 ANAE 同工酶, 我们发现肝病组的变化主要表现在中间区带, 表现为谱带色度减弱或出现异常谱带. 有关 ANAE 同工酶的研究报道较少, ANAE 同工酶及异常谱带的结构、组成及与疾病的关系还有待于进一步研究.

总之, 我们认为血清酸性  $\alpha$ -醋酸萘酯酶活性在一定程度上可以反映肝功能损坏程度, 不同肝病时期该酶活性可能与机体免疫功能有关, 血清酸性  $\alpha$ -醋酸萘酯酶含量测定可作为评价肝细胞变性坏死、肝脏合成功能异常的一项血清学指标. 琼脂糖凝胶电泳检测酸性  $\alpha$ -醋酸萘酯酶同工酶, 在肝病患者血清中可以检出一些异常谱形. 有关各谱带的性质、组成及在临床上的参考价值还有待于进一步探讨.

### 4 参考文献

- 1 周玉贵, 王传芳, 陆晓云, 金勇, 刘昌元. 血清酸性  $\alpha$ -醋酸萘酯酶的比色测定及初步临床应用. 临床检验杂志 2003;21:211-213
- 2 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会联合修订. 病毒性肝炎防治方案. 中华肝病杂志 2000;8:324-329
- 3 中国抗癌协会肝癌专业委员会. 原发性肝癌的临床诊断与分期标准. 中华肝病杂志 2001;9:324
- 4 黄志华, 周玉贵, 刘昌元. 血清  $\alpha$ -醋酸萘酯酶同工酶琼脂糖凝胶电泳及临床应用. 临床检验杂志 1998;16:155-157