

• 论 著 •

改良琼脂糖电泳法测定 BALP 在前列腺癌骨转移诊断中的应用

李 强

(成都航天医院检验科 610100)

摘要:目的 探讨改良琼脂糖电泳法检测骨碱性磷酸酶同工酶(BALP)在前列腺癌(PCa)骨转移诊断中的应用。方法 神经氨酸苷酶处理血清,采用改良的琼脂糖电泳法分离测定 50 例健康体检者和 163 例 PCa 患者血清中的 ALP 同工酶。结果 (1)普通的琼脂糖电泳法对肝和 BALP 的分辨率较低,改良琼脂糖电泳法提高了分辨率。(2)PCa 组的总 ALP 和 BALP 均高于对照组,PCa 骨转移组的总 ALP 和 BALP 活性均显著高于对照组和无骨转移组($P < 0.05$),PCa 无骨转移组的总 ALP 和 BALP 活性和对照组差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 BALP 与 PCa 骨转移存在一定的相关性,经神经氨酸苷酶处理血清后,采用改良琼脂糖电泳法分离 ALP 同工酶有助于临床辅助诊断 PCa 有无骨转移。

关键词:前列腺癌; 骨碱性磷酸酶同工酶; 神经氨酸苷酶; 改良琼脂糖电泳法

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.07.016

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)07-0911-03

Application of modified agarose electrophoresis for detecting bone alkaline phosphatase isoenzyme in diagnosis of bone metastasis of prostate carcinoma

LI Qiang

(Department of Clinical Laboratory, Chengdu Aerospace Hospital, Chengdu, Sichuan 610100, China)

Abstract: Objective To discuss the application of improved agarose electrophoresis for detecting bone alkaline phosphatase (BALP) isoenzymes in the diagnosis of metastasis in prostate carcinoma (PCa). **Methods** Serum ALP isoenzymes in 50 persons undergoing physical examination and 163 cases of PCa were detected by the improved agarose electrophoresis after treating serum by neuraminidase. **Results** (1) The resolution of liver and bone ALP by the common agarose gel electrophoresis was lower, and which was increased by the modified agarose electrophoresis. (2) Total ALP and BALP in the PCa group were higher than those in the control group; total ALP and BALP activity in the PCa bone metastasis group were higher than those in the control group and non-metastasis group ($P < 0.05$), there were no statistical difference in BALP and total ALP between the non-bone metastasis group and control group ($P > 0.05$). BALP and total ALP in bone metastasis of prostate carcinoma were higher than no bone metastasis. **Conclusion** Bone ALP has a certain correlation with PCa bone metastasis, also between bone ALP and bone metastasis of carcinoma. After treating serum by neuraminidase, adopting the improved agarose gel electrophoresis for separating ALP isozymes contributes to the clinical auxiliary diagnosis of PCa bone metastasis.

Key words: prostate cancer; bone ALP; neuraminidase; improved agarose electrophoresis.

前列腺癌(PCa)是泌尿系统常见的恶性肿瘤,已位居男性恶性肿瘤病死率的第2位,超过80%的PCa确诊患者会发生肿瘤骨转移,因此,PCa骨转移的早期诊断对选择治疗方案和判断预后等有重要意义^[1]。目前,对PCa骨转移主要采用同位素全身骨扫描(emission computed tomography,ECT),虽然能较早地发现骨转移,但存在放射性、假阳性高和价格昂贵等不足,使得使用受到限制^[2],前列腺特异性抗原是常用的诊断PCa的指标,但无法判断是否存在骨转移^[3]。骨碱性磷酸酶同工酶(BALP)是检测PCa骨转移较为常见的生化指标,与PCa骨转移存在一定相关性^[4],具有来源容易,可以反复检测等优点,本研究采用改良琼脂糖电泳法检测BALP,探讨在PCa骨转移诊断中的应用。

1 材料与方 法

1.1 仪器 重庆仪器厂DYY-3型电泳仪,西门子公司冷却电泳槽,广州仪器厂Micon-10型光密度计。

1.2 试剂 琼脂糖、 α -萘磷酸钠、固兰B和TritonX-100为成都生物制品研究所生产。

1.3 试剂的配制

1.3.1 2-氨基-2-甲基-1,3-丙二醇缓冲液(pH8.5) EDTA 481 mg,2-氨基-2-甲基-1,3-丙二醇 7.1 g,硼酸 204 mg,巴比妥钠 1.37 g,加水 850 mL,用盐酸 1 mol/L 调至 pH 8.5,加水至 1 L。

1.3.2 电泳槽缓冲液(pH8.5) 巴比妥钠 10.5 g,巴比妥 1.81 g,加水至 1 L。

1.3.3 琼脂糖胶液(10 g/L) 琼脂糖 0.15 g 加入 15 mL 2-氨基-2-甲基-1,3-丙二醇缓冲液,20 μ L TritonX-100 隔水煮沸 15 min。

1.3.4 底物液和呈色液 32 mg α -萘磷酸钠和 200 μ L 硫酸镁 22 g/L,溶于 15 mL 0.6% 二乙醇胺。6 mg 固兰 B 溶于 pH 4.6 乙酸盐缓冲液(2.4 mmol/L)15 mL 中。

1.3.5 神经氨酸酶溶液 用含有 60 mmol/L 氯化钠、50 mmol/L 醋酸钠和 4 mmol/L 氯化钙、pH 5.6 的溶液溶解神经氨酸酶,其浓度为 2 kU/L。

1.4 样品收集

1.4.1 50 例健康体检者血清(25~78 岁) 无骨病、内分泌疾病或其他慢性病,未服用影响代谢的药物。

1.4.2 163 例 PCa 患者血清(32~71 岁) 2014 年 1 月至 2016 年 1 月,本院住院患者,均经病理学证实为 PCa,其中无骨转移 91 例,骨转移 72 例,影像学检查证实至少发生一处骨转移,既往未因骨转移接受过放疗或化疗。

1.5 实验方法

1.5.1 总 ALP 活性测定 贝克曼库尔特 680 全自动生化分析仪进行测定,采用连续监测法,试剂盒由浙江东欧公司提供。

1.5.2 神经氨酸苷酶处理标本 神经氨酸苷酶溶于磷酸二氢钠/柠檬酸缓冲液 1 mL,取 10 μL 加入 40 μL 样本,37 °C 水浴 15 min。

1.5.3 电泳 阴极处加样 10 μL,电泳条件:30 mA 恒流,30 min,结束后,加 1 mL 底物液,孵育 40 °C 30 min,加 1 mL 呈色液显色 5 min,用 570 nm 波长,1 mm 狭缝扫描 ALP 区带,光密度计打印各区带百分比。

1.6 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行统计分析,计量资料采用单因素方差分析,计数资料采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 普通琼脂糖电泳法和改良琼脂糖电泳法对 ALP 同工酶扫描结果的比较 普通琼脂糖电泳法不能很好分辨肝和骨 ALP,改良琼脂糖电泳法提高了分辨率。见图 1、2。

2.2 对照组和 PCa 组血清 ALP 同工酶结果 PCa 组无骨转移组总 ALP 和同工酶与对照组差异无统计学意义 ($P >$

0.05);PCa 组骨转移组总 ALP 和骨型 ALP 活性显著高于对照组和无骨转移组 ($P < 0.01$)。见表 1。

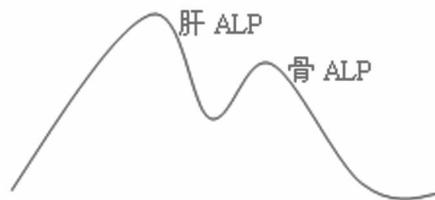


图 1 普通琼脂糖电泳法分离 ALP 同工酶扫描图

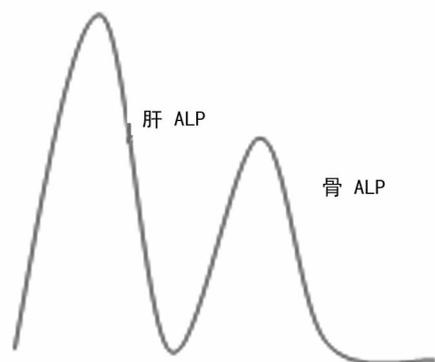


图 2 改良琼脂糖电泳法分离 ALP 同工酶扫描图

表 1 PCa 血清中 ALP 同工酶结果

项目	n	总 ALP(U/L)	肝型 ALP 同工酶		骨型 ALP	
			酶活性(U/L)	酶活性百分率(%)	酶活性(U/L)	酶活性百分率(%)
对照组	50	88.1±11.7	44.3±12.9	0.50±0.07	36.3±5.1	0.41±0.07
PCa 组	163	206.7±78.3	70.9±18.3	0.34±0.07	128.5±23.1	0.62±0.13
无骨转移	91	90.1±20.8	46.1±20.1	0.52±0.07	42.3±11.1	0.47±0.07
骨转移	72	359.1±95.6	75.1±19.4	0.21±0.09	275.5±63.6	0.77±0.14

2.3 BALP 与 PCa 骨转移的相关性分析 BALP 与 PCa 骨转移存在相关性 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 BALP 与临床诊断 PCa 骨转移的比较

BALP	临床诊断度(n)		灵敏度(%)	特异性度(%)
	+	-		
+	60	20	83.3	78.0
-	12	71		

3 讨 论

碱性磷酸酶是一种分布广泛,水解各种磷酸酯的非特异性水解酶,具有多种同工酶的活性,分布于肝脏、骨骼、肾脏、胎盘及小肠等,其中以骨骼和肝脏为主^[5]。BALP 主要来源于骨骼,由成骨细胞合成分泌,可特异性地反映成骨性病变,骨转移是 PCa 较为常见并发症,当肿瘤细胞到达骨组织后,与骨组织分泌细胞因子相互作用,破坏正常骨组织中成骨细胞和破骨细胞平衡,BALP 分泌增加。PCa 骨转移有 3 种组织学类型:成骨型、溶骨型和混合型,以成骨型为主。有报道,当 BALP > 20 U/L 的时候,提示患者骨转移的阳性预测值 58.9%,骨转移的可能性较大^[5],BALP 在 PCa 骨转移患者中较为真实地反映成

骨细胞活性,作为 PCa 骨转移指标中较 ALP 能更准确地反映骨代谢。

骨碱性磷酸酶的检测具有判断疾病来源、标本来源容易和可反复测定等优点,有助于临床对骨来源性疾病进行鉴别诊断、疗效观察和预后判断。目前主要的检测方法有:热失活法^[6]、酶联免疫法^[7]、高效液相色谱法^[8]和电泳法^[9]等,这些方法或操作复杂、或需要昂贵的仪器、或不能有效分辨肝、BALP 同工酶,或特异和灵敏度较差,使得临床应用受到限制,比如常规电泳法,肝和 BALP 同工酶由同一基因编码,蛋白质部分完全一样,只是糖链结构有所不同^[10],导致了一般电泳法不能很好分离肝和 BALP。本研究将血清用神经氨酸苷酶进行预处理,采用改良琼脂糖电泳法分离 ALP,具有以下两个优点:(1)可去除 ALP 糖链末端的唾液酸残基,改变净电荷和电泳迁移率,骨 ALP 较肝 ALP 对神经氨酸苷酶更为敏感,从而达到分离的目的^[11]。(2)在琼脂糖凝胶中加入 TritonX-100,可切割肝型 ALP 中胆汁型 ALP 所带的负电荷,使其向阳极的泳动速度减慢,使得与肝和骨 ALP 更为有效地分离^[12]。因此,本研究结果发现普通的琼脂糖电泳法对肝和骨 ALP 的分辨率较低,改良琼脂糖电泳法提高了 ALP 同工酶分辨率,这与有关的文献报道也是相符合的^[13]。

本实验采用神经氨酸苷酶处理血清,改良琼脂糖电泳法分析测定 50 例健康女性体检者和 163 例 PCa 患者血清中的 ALP 同工酶,其中 PCa 无骨转移 91 例,骨转移 72 例,结果发现 BALP 与 PCa 骨转移存在相关性,PCa 骨转移组的总 ALP 和 BALP 活性均显著高于对照组和无骨转移组,PCa 无骨转移组的总 ALP 和 BALP 活性和对照组无显著性差异,说明只是检测总 ALP 活性,是不能有效判断疾病的来源,通过神经氨酸苷酶处理血清后的改良琼脂糖电泳法,能将 ALP 同工酶进行定量分析,才更助于判断总 ALP 的升高是来源于肝脏还是骨组织。

总之,经神经氨酸苷酶处理血清后,采用改良琼脂糖电泳法可有效分离 ALP 同工酶,不需要特殊仪器,标本来源容易,操作简单,价格低廉,是一种值得推荐的监测 PCa 有无骨转移的,具有较高价值的实验室诊断方法。

参考文献

[1] Oster G, Lamerato L, Glass AG, et al. Natural history of skeletal-related events in patients with breast, lung, or prostate cancer and metastases to bone: a 15-year study in two large US health systems[J]. Supportive Care in Cancer, 2013, 21(12): 3279-3286.

[2] 刘丹, 王伟, 乔庐东, 等. 初发前列腺癌患者骨扫描检查指征的探讨[J]. 中华外科杂志, 2012, 50(5): 443-445.

[3] 毛金磊, 陈宇琼, 何薇. 探讨初诊前列腺癌骨转移风险的预测指标[J]. 标记免疫分析与临床, 2014, 21(4): 390-393.

[4] 罗先道, 郭淑丽, 张朝新, 等. 骨代谢标志物在肿瘤骨转移中的变化和意义[J/CD]. 中华临床医师杂志(电子版),

2012, 6(19): 6056-6057.

[5] 周海中, 王益华. 血清 PSA 和 BALP 测定在前列腺癌骨显像诊断中的应用[J]. 放射免疫学杂志, 2009, 22(1): 77-78.

[6] 李常林, 张艳, 马胜, 等. 热灭活法与干化学法检测骨碱性磷酸酶技术的对照分析[J]. 中国实验诊断学, 2009, 13(7): 923-924.

[7] 郭淑丽, 罗先道, 田永芳. 前列腺癌患者骨代谢标志物水平变化及意义[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2015, 29(7): 708-709.

[8] 张咏梅, 白秀珍, 陈占文, 等. 高效液相色谱法测定全血中骨碱性磷酸酶的活力[J]. 色谱, 2000, 18(3): 235-236.

[9] 汪萍, 钱晓霞, 沈霞. 骨源性碱性磷酸酶同工酶的分离及其临床应用[J]. 临床儿科杂志, 2005, 23(7): 483-485.

[10] Smith M, Weiss MJ, Griffin CA, et al. Regional assignment of the gene for human liver bone kidney Alkaline phosphatase to chromosome 1 p36. 1-p34 [J]. Genomic, 1988, 20(2): 139-141.

[11] 庞博, 吴丽娟. 电聚焦法检测碱性磷酸酶同工酶在肝癌和肝癌骨转移鉴别诊断中的应用[J]. 检验医学与临床, 2015, 12(1): 1-3.

[12] 王瑾, 谭翔. 骨碱性磷酸酶同工酶在乳腺癌骨转移诊断中的应用[J]. 现代肿瘤医学, 2016, 24(15): 2413-2415.

[13] 邓君, 陆学军, 艾桂萍, 等. 骨碱性磷酸酶同工酶的测定及其应用[J]. 中华老年医学杂志, 1998, 17(2): 96-98.

(收稿日期: 2016-09-26 修回日期: 2016-12-28)

(上接第 910 页)

普遍偏低 1~2 个滴度; VDRL 在检测正常对照的血清和血浆标本时均有假阳性, 而在检测 CSF 时两者结果一致。

综上所述, VDRL 在检血清和血浆标本时, 其特异性明显低于 TRUST, 出现部分假阳性; CSF 标本 VDRL 和 TRUST 敏感性和特异性无显著性差异, 但相同标本中 VDRL 的滴度更高, 显示 VDRL 对低滴度样本比 TRUST 有更高的敏感性。因此, 在梅毒的实验室诊断中, TRUST 更适合血清和血浆标本检测, VDRL 适合 CSF 标本, 但不适合血清和血浆检测。在实际工作中, 对待不同的标本, 在 VDRL 和 TRUST 的使用上要有区别, 才能获得准确、可靠的实验结果。

参考文献

[1] 夏玉玲, 李辉, 周玲, 等. 不同检验方法对梅毒不同时期的敏感性和特异性分析[J]. 安徽医药, 2013, 17(5): 811-812.

[2] 陈磊, 孙秀凤. 3 种梅毒检测方法的比较与分析[J]. 医学信息, 2014, 24(2): 163.

[3] 李民, 徐敬星, 史同新, 等. 129 例未经治疗的早期梅毒患者脑脊液检测结果的分析[J]. 皮肤病性病诊疗学杂志, 2014, (3): 185-188.

[4] 赵志强. ELISA 和 TRUST 法在各期梅毒螺旋体抗体检测中的效果[J]. 医学检验与临床, 2014, 25(1): 65-66.

[5] 蒋婷吟, 查金顺, 黄春玲, 等. CLIA、TRUST 和 TPPA 3 种梅毒检测方法的比较[J]. 国际放射医学核医学杂志, 2014, 38(6): 384-386.

[6] 罗均. 用 ELISA 和 TRUST 法检测献血者血清梅毒抗体的效果比较[J]. 广东医学院学报, 2002, 20(4): 327.

[7] 李念宇, 张建萍. TRUST 测定结果与梅毒诊断关系的探讨[J]. 皮肤病与性病, 2003, 25(1): 50.

[8] 严春玲. TPPA 和 TRUST 联合检测梅毒的临床应用效果评价[J]. 现代医院, 2010, 10(1): 63-65.

[9] Weiming G, Yang Y, Lei W, et al. Comparing the performance characteristics of CSF-TRUST and CSF-VDRL for syphilis: a cross-sectional study [J]. BMJ, 2013. 24(1): 1-5.

[10] 苏宗义, 龚爱红, 隋青, 等. 脑脊液 TP-ELISA、TRUST 和 VDRL 检测对神经梅毒的诊断价值探讨[J]. 中国微生态学杂志, 2014, 26(12): 1411-1417.

(收稿日期: 2016-10-19 修回日期: 2016-11-21)