

骨型碱性磷酸酶的检测方法和临床应用

深圳市人民医院检验科(深圳 518001) 吴文苑 综述

摘要 骨型碱性磷酸酶(BALP)在人体的生理功用主要是在成骨过程中水解磷酸酯,为羟磷灰石的沉积提供必需的磷酸,同时水解焦磷酸盐,解除它对骨盐形成的抑制作用,有利于成骨过程。检测骨型碱性磷酸酶(BALP)的方法有多种,随着这些检测方法的灵敏度和特异性的增加,骨型碱性磷酸酶(BALP)作为骨代谢异常的标记物越来越受临床的重视。

关键词 骨型碱性磷酸酶;同工酶;检测;骨代谢

碱性磷酸酶(ALP, EC3.1.3.1)是在碱性条件下水解多种磷酸酯并具有转磷酸基作用的一组酶,包括由不同结构基因编码的小肠、胎盘、生殖细胞和非特异型4种同工酶。前三者基因定位于染色体2q³⁴⁻³⁷的相邻位点,后者基因定位于染色体1q³⁶⁻³⁴之间,其中非特异型碱性磷酸酶在基因表达后经过不同的修饰形成肝、肾、骨等次级同工酶。对这些同工酶的理化性质、分子生物学特性、作用机制的深入研究以及准确的定量测定将有助于其在临床上的应用。本文拟就近年来国际上常用的骨型碱性磷酸酶(BAP)研究方法及其在临床上的应用研究进展作一综述。

1 骨型碱性磷酸酶的特性

骨型碱性磷酸酶是成骨细胞的一种细胞外酶,为糖蛋白,分子量约为12000道尔顿。该酶在细胞内合成时新生的酶蛋白先在内质网糖基化,再通过高尔基体转运到细胞膜表面,通过多糖链与磷酸酯肌醇相连嵌合到细胞膜的外浆膜。在多糖-肌醇磷酸特异水解酶的作用下,骨型碱性磷酸酶能被释放到血循环中。骨型碱性磷酸酶在机体的生理功用主要是在成骨过程中水解磷酸酯,为羟磷灰石的沉积提供必需的磷酸;同时,水解焦磷酸盐,解除其对骨盐形成的抑制作用,有利于成骨过程。骨型碱性磷酸酶在体内的其他生化功用有待进一步的阐明。

2 骨型碱性磷酸酶的检测

人血清中含有的碱性磷酸酶同工酶分别来自骨骼、肝脏、小肠和胎盘组织(在妊娠时)。胎盘型和小肠型碱性磷酸酶同工酶的活性能相对容易被区分,而区别骨型和肝型这两种同工酶活性就相当困难。因为这两种同工酶来源于同一基因,其动力学性质、电泳迁移率和其他理化性质均十分相似,且相互间有交叉免疫反应。目前鉴别和定量测定骨型碱性磷酸酶的方法可以分为两大类:电泳法和非电泳法。

电泳法主要利用不同的同工酶之间物理性状、分子大小及电荷量的不同而进行。根据所用的支持物和操作的方法可分为:醋酸纤维薄膜电泳、琼脂糖

凝胶电泳、聚丙烯酰胺凝胶电泳、等电聚焦电泳和亲和电泳等。其中以等电聚焦电泳和亲和电泳的分辨效果较好。等电聚焦电泳分辨率高特别适合次级同工酶的分选。Sinaha等报告的一种固相pH梯度等电聚焦电泳以聚丙烯酰胺为载体,用两性电解质制成固定的pH梯度凝胶,避免了由于不稳定的pH梯度而引起的所谓“阴极漂移”现象。该法可将等电点准确到小数点后两位并把正常血清的10条酶带压缩在pH3.90~4.79的范围。Rosalki等建立的亲和电泳法是利用麦胚植物血凝素(WGA)能特异地和骨型碱性磷酸酶结合形成WGA-骨型碱性磷酸酶复合物,该复合物在电场中不泳动或泳动很慢,从而将骨、肝型碱性磷酸酶清楚地分开。该方法简便,重复性好,骨型碱性磷酸酶的批内与批间CV分别为3.2%和5.2%。亲和电泳的分离效果与WGA的浓度有关,其最适浓度随电泳条件而异。因此,采用不同的电泳载体和不同缓冲液时均应重新评价WGA的最适用量。

非电泳法有化学抑制法、热失活试验、亲和沉淀法和免疫分析法等^[1]。化学抑制法、热失活试验灵敏度和特异性较差,目前只用作鉴别某些病理血清碱性磷酸酶组织来源的过筛试验。亲和沉淀法和亲和电泳法一样利用麦胚植物血凝素的作用将骨型碱性磷酸酶和其他组织来源的碱性磷酸酶分开,然后测定骨型碱性磷酸酶的活性。该方法操作简便,有较好的灵敏度和特异性,但是当血清标本含有胆汁型碱性磷酸酶时,由于该酶也能和麦胚植物血凝素结合而使骨型碱性磷酸酶假性增高。近年建立的免疫分析法能把灵敏度、特异性、可靠及操作简便等特性很好地结合起来,从而满足了临床的常规应用。由Garnro等报道的放射免疫测定法测定的是骨型ALP的免疫活性蛋白而不是酶活力,并具有可以接受的特异性。而最近由Gomez等^[1]应用对骨型碱性磷酸酶特异很强的单克隆抗体建立的免疫分析法具有高度的敏感性和特异性,而且操作简便重复性好,被认为是目前鉴别和定量骨型ALP的最佳方法。

3 骨型碱性磷酸酶与临床疾病

随着骨型碱性磷酸酶检测方法的灵敏度、特异性提高,骨型碱性磷酸酶作为骨代谢异常的标志物越来越受到临床重视。临床研究表明,血清骨型碱性磷酸酶活力的定量测定可作为监测骨形成变化的有效参数^[2]。与大多数代谢性骨骼疾病相似,骨质疏松症是一种骨容量不足的疾病,常见于绝经期妇女。骨容量的生成不足发生于溶骨速率大于成骨速率,有效的治疗需要纠正或者逆转这种不平衡状态。以往的诊断主要依赖于骨密度的测量,但骨密度的改变太慢(在多数情况下,能被测出改变需要一年或更多的时间)以致不能作为临床监测治疗效果的早期反应。作为成骨细胞的一种成分,骨型碱性磷酸酶参与成骨过程并且其活性在血清中稳定没有昼夜变化,因此血清骨型碱性磷酸酶活力的定量测定可作为观察骨形成变化率,为临床提供有效治疗的监测手段^[3-5]。在其他的骨代谢异常疾病,例如骨软化症、佝偻病、Paget病等,以及早期甲状腺机能亢进的病人、慢性肾衰病人、接受肾脏移植的病人,血清中的骨型碱性磷酸酶活性均有不同程度增高,而且增高的程度大于碱性磷酸酶总活性的增高程度^[1,6-8]。在Paget病人,应用Bisphosphonate pamidronate——一种骨重吸收过程及周转率的强抑制剂治疗后,骨型碱性磷酸酶在血中的活性明显下降,其下降的幅度远远大于碱性磷酸酶总活性的下降幅度。多发性骨髓瘤患者由于骨再造(bone remodelling)不平衡,血中的骨型碱性磷酸酶活性明显低于正常人^[9]。生长激素缺乏的儿童,使用生长激素后生长速率加速,血清骨型碱性磷酸酶活性增加,并且与生长激素治疗所诱导的高SD分数呈正相关,能有效地监测对生长激素治疗的反应性^[10]。慢性肾功能衰竭病人在接受肾移植后,常发生持续性的甲状旁腺机能亢进,骨型碱性磷酸酶的活力与甲状旁腺激素呈明显正相

关。与骨皮质的密度呈负相关^[8,11];在接受环孢菌素治疗时,骨骼的合成增加,同时骨型碱性磷酸酶的活力明显增加;而使用皮质类固醇时,皮质类固醇抑制成骨细胞的活性而引起骨质疏松症,同时骨型碱性磷酸酶的活力明显减少。因此,对骨型碱性磷酸酶活性的检测以及动态观察将为疾病的早期诊断、治疗效果的监测、病情预后等提供有效的依据。

参考文献

- 1 Gomez B Jr, Ardkani S, Ju J, et al. Clin Chem, 1995;41:1560-1565
- 2 Garnero P, Delmas PD. Baillieres Clin Rheumatol, 1997;11(3):517-537
- 3 Gonnli S, Cepollaro C, Pondrelli C, et al. J Bone Miner Res, 1997;12(4):624-631
- 4 Heikkinen AM, Parvianen M, Niskanen L, et al. J Clin Endocrinol Metab, 1997;82(8):2476-2482
- 5 Melton LJ, Khosla S, Alkinson EJ, et al. J Bone Miner Res, 1997;12(7):1083-1091
- 6 Thorsen K, Kristoffsson AO, Lorentzon RP, et al. Sugery, 1997;122(5):882-887
- 7 Withold W, Friendrich W, Degenhardt S. Clin Chim Acta, 1997;261(2):105-115
- 8 Reinhardf W, Bartelworth H, Jockenhovel F, et al. Nephrol Dial Transplant, 1998;13(2):436-442
- 9 Withoid W, Arning M, Schwarz M, et al. Clin Chim Acta, 1998;269(1):21-30
- 10 Tobiume H, Kanzaki S, Hida S, et al. J Clin Endocrinol Metab, 1997;82(7):2056-2061
- 11 Behnke B, Kemper M, Kruse HP, et al. Nephrol Dial Transplant, 1998;13(3):662-667

(97-06-09 收稿 98-08-20 修回)

敬告作者

为了扩大刊物容量,增大信息量,将本刊办得更好。请广大作者严格按照本刊要求撰稿,以下著录格式尤请注意:

1. 综述(包括摘要、关键词和参考文献)、讲座限字4000字以内,参考文献不超过15条。可附一作者简介。

2. 文摘在800字以内为宜,请附外文献复印件。

本刊编辑部