

医学检验技术 与临床应用 (下)

周革利等◎主编

医学检验技术与临床应用

(下)

周革利等◎主编

第十一章 临床生物化学检验

第十一章 临床生物化学检验

第一节 蛋白质和含氮化合物的生物化学检验

蛋白质(protein)是人体生命活动中最重要的物质,许多疾病情况下均有蛋白质代谢紊乱,导致血浆蛋白质的种类与含量发生变化,因而可对其进行分析并用于诊断疾病和监测病情等。氨基酸代谢紊乱则以遗传性为主,其发病率虽然很低,但种类多,对其诊断主要依赖于血、尿等体液的氨基酸分析。嘌呤核苷酸代谢紊乱可引起高尿酸血症和痛风,其发病率近年来逐渐上升。

一、血浆蛋白质的生物化学检验

随着检测技术的发展,许多微量血浆蛋白质的分析已变得比较容易,因而血浆蛋白质在临床诊断和病情监测等方面的应用日益广泛。

(一)血浆蛋白质概述

1. 前清蛋白 前清蛋白(prealbumin, PA)是由肝细胞合成的一种糖蛋白,在电泳中迁移在清蛋白之前而得名。在血浆中半衰期很短,约 2 天,因此在营养不良或早期肝炎时,血浆 PA 浓度降低,往往早于其他血清蛋白质成分的改变,从而具有较高的敏感性。可作为营养不良的早期指标,亦作为肝功能不全的评价指标,是一种负性急性时相反应蛋白。

2. 清蛋白 清蛋白(albumin, Alb)又称白蛋白,由肝实质细胞合成,在血浆中半衰期约 15~19 天,是血浆中含量最多且唯一不含糖的蛋白质,占血浆总蛋白的 57%~68%。其合成率主要由血浆中 Alb 水平调节,并受食物中蛋白质含量的影响。

3. α_1 -抗胰蛋白酶 α_1 -抗胰蛋白酶(α_1 -antitrypsin, α_1 -AT 或 AAT)是具有蛋白酶抑制作用的一种急性时相反应蛋白,占血浆中抑制蛋白酶活力的 90%左右。在醋酸纤维素薄膜电泳中,是位于 β 区带的主要组分(约 90%),血浆中的 AAT 主要由肝细胞合成,单核细胞、肺泡巨噬细胞和上皮细胞也少量合成,肝外合成的 AAT 在局部组织损伤调节中起重要作用。

AAT 具有多种遗传表型,迄今已分离鉴定的有 33 种等位基因,其中最多见的是 P_i^{MM} 型,占人群的 95%以上;另外还有两种蛋白称为 Z 型和 S 型,可表现为以下遗传分型: P_i^{ZZ} 、 P_i^{SS} 、 P_i^{SZ} 、 P_i^{MZ} 、 P_i^{MS} , S 型蛋白与 M 型蛋白之间的氨基酸残基仅有一个差异。对蛋白酶的抑制作用主要与血循环中 M 型蛋白的浓度有关,以 MM 型的蛋白酶抑制能力作为 100%,ZZ 型的相对活力仅为 15%、SS 为 60%、MZ 为 57%、MS 为 80%,其他则无活性。

4. α_1 -酸性糖蛋白 α_1 -酸性糖蛋白(α_1 -acid glycoprotein, AAG),主要在肝合成,某些肿瘤组织及脓毒血症时的粒细胞和单核细胞亦可合成。AAG 是血浆中含糖量最高、酸性最强的糖蛋白,含糖量达 45%,包括等分子的己糖、己糖胺和唾液酸 AAG 的肽链结构与 Ig 轻链可变区及部分重链区、结合珠蛋白 α 链结构类似,说明 AAG 从 Ig 家系演变而来。AAG 分解代谢首先是其唾液酸分子降解,接着蛋白质部分在肝中很快降解。AAG 是一种典型的急性时相反应蛋白,在急性炎症时增高,与免疫防御功能有关。

5. 结合珠蛋白 结合珠蛋白(haptoglobin, Hp), 又称触珠蛋白, 也是一种急性时相反应蛋白和转运蛋白。在醋酸纤维膜电泳及琼脂糖凝胶电泳中位于 α_2 区带。Hp 分子是由 α 与 β 链形成 $\alpha_2\beta_2$ 四聚体, α 链有 α_1 及 α_2 两种, 而 α_1 又有 α^{Ff} 及 α^{Sf} 两种遗传变异体; F 表示电泳迁移率相对为 fast, S 表示 slow, 两种变异体的多肽链中只有一个氨基酸残基不同。由于 α^{Ff} 、 α^{Sf} 三种等位基因编码形成 $\alpha\beta$ 聚合体, 因此个体之间可有多种遗传表型, 参见表 11-1。

表 11-1 结合珠蛋白的遗传表型

表型	亚单位的结构	组成
Hp1-1	$(\alpha^{Ff})_2\beta_2, \alpha^{Ff}\alpha^{Sf}\beta_2(\alpha^{Sf})_2\beta_2$	相对分子质量约为 80000, α 链含氨基酸残基 83 个, β 链含氨基酸残基 245 个
Hp2-1	$(\alpha^{Sf}\alpha^2\beta_2)_n$ $(\alpha^{Ff}\alpha^2\beta_2)_n$	相对分子质量为 120000~200000 的聚合体, 由于 n 不同, 可以在电泳中出现多条区带
Hp2-2	$(\alpha^2\beta)_n$ N=3~8	相对分子质量为 160000~400000, 由于 n 不同, 可在电泳中出现多条区带

6. α_2 -巨球蛋白 α_2 -巨球蛋白(α_2 -macroglobulin, α_2 , MG 或 AMG)是由肝细胞与单核吞噬细胞系统合成, 是血浆中相对分子质量最大的蛋白质, 半衰期约 5 天, 但与蛋白水解酶结合为复合物后清除率加速。 α_2 MG 的主要特性是能与多种离子和分子结合, 特别是能与蛋白水解酶如纤维蛋白溶酶、胃蛋白酶、糜蛋白酶、胰蛋白酶及组织蛋白酶 D 结合而影响这些酶的活性, 是血浆中主要的蛋白酶抑制剂。

7. 铜蓝蛋白 铜蓝蛋白(ceruloplasmin, CER)是由肝实质细胞合成的一种含铜的 α_2 球蛋白, 由于含铜而呈蓝色, 故称为铜蓝蛋白。95% 的血清铜存在于 CP 中, 其余 5% 呈可扩散状态。在血循环中 CP 可视为铜的无毒性代谢库。具有抗氧化作用, 能调节铁的吸收和运输。

8. 转铁蛋白 转铁蛋白(transferrin, TRF)主要是由肝细胞合成的一种单链糖蛋白, 能可逆地结合多价阳离子, 包括铁、铜、锌、钴等, 但只有与铁、铜的结合才有临床意义。每一分子 TRF 可结合两个 Fe^{3+} 。血浆中 TRF 浓度受食物铁供应的影响, 机体在缺铁状态时, 血浆 TRF 浓度上升, 经铁剂有效治疗后可恢复到正常水平。

9. C-反应蛋白 C-反应蛋白(C-reactive protein, CRP)由肝细胞合成, 是第一个被认识的急性时相反应蛋白。电泳分布在慢 γ 区带, 有时可以延伸到 β 区带, 其电泳迁移率易受如钙离子及缓冲液成分的影响。因在急性炎症病人血清中出现的可以结合肺炎球菌细胞壁 C-多糖的蛋白质而命名。血浆 CRP 指标极为灵敏, 在急性心肌梗死、创伤、感染、炎症、外科手术、癌肿浸润时迅速显著地增高, 一般在心肌梗死发生后 6~12h 升高, 可达正常水平的 2000 倍。但 CRP 是一项非特异性指标。

(二) 血浆蛋白质测定与评价

1. 血清总蛋白质测定

(1) 方法学概述: 血清蛋白质测定方法很多, 常用的有化学法、物理法和染料结合法。化学法包括凯氏定氮法、双缩脲法和酚试剂法。①化学法: 凯氏定氮法是 1883 年 Kjeldahl 基于蛋白含氮量平均为 16%, 根据所测定的氮来换算成蛋白质的量, 该法是蛋白质测定公认的参考方法。凯氏定氮法操作麻烦, 程序复杂, 且标本用量大, 不适宜临床大批量的常规检测, 目前仅用于蛋白质校正品的定值双缩脲法是早在 1914 年就被用来测定血清总蛋白, 目前仍是简单而准确的方法之一, 是临床测定血清总蛋白首选的常规方法。缺点是测定的灵敏度较低且反应速度慢。Lowry 法是 1922 年 Folin-Wu 提出福林酚试剂法, 利用蛋白质中酪氨酸侧

链的酚基可使磷钼酸还原而显蓝色定出酪氨酸的量,再根据酪氨酸在蛋白质中的含量,从而计算得到蛋白质的含量:1951年Lowry将该方法进行了改进,提高了方法的灵敏度,达到双缩脲法的100倍左右,可用于脑脊液和尿液中微量蛋白质的测定由于标本中各种蛋白质所含酪氨酸的比例不一致,所以该法测定的准确性不够可靠,现已很少应用。②物理法:应用较多的是紫外吸收法,该法是采用280nm和215/225nm紫外吸收值,计算蛋白质的含量。该法易受其他对紫外光具有吸收能力的物质干扰,准确性不如双缩脲法,因而不能作为常规方法广泛应用。但在测定蛋白质时无需加任何试剂,亦无需任何处理,可保留制剂的生物活性,且可回收全部蛋白质,多用于蛋白质的提取纯化其他方法现已很少使用。③染料结合法:蛋白质与染料结合的方法是测定蛋白质较灵敏而特异的一类方法,常用的染料有氨基黑、丽春红、考马斯亮蓝、邻苯三酚红钼。其中氨基黑、丽春红常作为血清蛋白醋酸纤维素薄膜电泳或琼脂糖凝胶电泳的染料。考马斯亮蓝常用于需更高呈色灵敏度的蛋白电泳中,也可用于测定尿液、脑脊液等的蛋白质,优点是简便、快速、灵敏,缺点是不同蛋白质与染料的结合力不一致,且试剂对比色杯有吸附作用邻苯三酚红钼可用于测定尿液、脑脊液等的蛋白质,该法克服了考马斯亮蓝法易吸附于比色杯的缺点,具有简便、稳定等优点,可用于自动化分析仪。其最大吸收峰由染料的467nm转移到染料蛋白质复合物的594nm;该法与球蛋白结合力仅为清蛋白的70%,试剂中加入SDS可使其与两类蛋白质结合力的差别明显缩小;用于自动生化分析仪测定尿液蛋白质的邻苯三酚红钼法商品试剂盒已得到较广泛应用。

(2)测定原理:双缩脲法测定血清中蛋白质的两个相邻肽键($-\text{CO}-\text{NH}-$)在碱性溶液中能与二价铜离子作用产生稳定的紫色络合物。此反应和双缩脲在碱性溶液中与铜离子作用形成紫红色的反应相似,因此将蛋白质与碱性铜的反应称为双缩脲反应。生成的紫色络合物颜色的深浅与血清蛋白质含量成正比,故可用来测定蛋白质含量。

(3)方法学评价:双缩脲法的检测限为蛋白质含量是0.2~1.7mg/ml,该法对各种蛋白质的反应性相近,显色稳定性好,干扰物质少,试剂单一,方法简便,而灵敏度较低,反应时间长,但已能满足常规血清蛋白质测定需要。双缩脲反应对肽键具有较高的专一性,所受的干扰因素小,最主要的干扰物质是右旋糖酐,血清中的右旋糖酐能与反应混合液中的铜和酒石酸结合形成沉淀,影响测定结果的准确度。其他的干扰物质包括胆红素、血红蛋白、脂浊、某些抗生素和铵盐等。在生化分析仪上采用双试剂两点定时法测定,可以有效消除上述的干扰。

2. 血清蛋白测定

(1)方法学概述:清蛋白是血清内含量最多的一种蛋白质,最早分离清蛋白和球蛋白的方法是盐析法,将球蛋白沉淀,清蛋白留在溶液中后分别检测总蛋白的方法测定。染料结合法是目前临床检测清蛋白最常用的方法,常用的染料有溴甲酚绿(bromocresol green, BCG)和溴甲酚紫(bromocresol purple, BCP),其中BCG法是目前我国临床上测定清蛋白最常用的方法。血清清蛋白测定还可运用电泳法和免疫化学法。

(2)测定原理:溴甲酚绿法测定是清蛋白具有与阴离子染料BCG结合的特性,而球蛋白与其染料结合较晚,故可在控制时间下直接测定血清蛋白。血清蛋白在pH4.2的缓冲液中带正电荷,在有非离子型表面活性剂存在时,可与带负电荷的染料BCG结合形成蓝绿色复合物,其颜色深浅与清蛋白浓度成正比。与同样处理的清蛋白标准比较,可求得血清中清蛋白含量。

(3)方法学评价:BCG也能与血清中多种蛋白质成分呈色,但呈色程度远弱于清蛋白,由

于在 30s 内呈色对清蛋白特异,故 BCG 与血清混合后,在 30s 内读取吸光度,可明显减少非特异性反应。非离子型表面活性剂可增强 BCG-清蛋白复合物的溶解度,消除 BCG 同清蛋白反应时可能产生的沉淀,但其浓度变化可导致敏感度降低和直线性丧失,对测定结果有较大影响。

BCG 法灵敏度高、操作简便、重复性好,既可用作手工操作也可自动化分析,但要注意试剂标准化、标准品的选用、反应时间等,如不严格掌握,将会对测定结果造成严重影响。该法随着显色时间的延长,溶液色泽会加深,因为血清中除清蛋白以外还有与 BCG 迟缓作用的蛋白质,Corcoran 将 BCG 反应时间定为 10s(自动化法),就是为了防止非特异反应的干扰。BCG 是一种变色阈较窄的酸碱指示剂,受酸、碱影响较大,故所用的器材必须无酸、碱污染。胆红素和一般脂血对测定无明显干扰,血红蛋白浓度在 1000mg/L 以下无明显的干扰。药物中氨苄西林和安络血也产生明显的干扰反应。BCP 法测定的精密度较好,回收率高,而且不易受溶血、黄疸和脂血等临床常见因素的干扰,但线性范围较窄,与牛、猪等动物血清蛋白的反应性比与人的反应性低,而质控血清往往是动物血清,故其应用受限。

3. 特定蛋白质的测定 血清中的蛋白质因为都是由氨基酸组成,性质相似,故除清蛋白等少数蛋白质有某种特性可利用,因而能使用染料结合法等方法测定外,其他都需制备特异的抗血清,可采用免疫比浊法、免疫扩散法、化学发光免疫法、放射免疫法等方法测定。

目前临床上特定蛋白质多采用免疫比浊法测定,包括散射比浊法和透射比浊法,透射比浊法可在自动生化分析仪中测定,散射比浊法则通常需利用特定蛋白分析仪目前免疫比浊法可以测定多种血清蛋白质,即 Alb、PA、AAT、AAG、Hp、AMG、CER、TRF、CRP,以及免疫球蛋白 IgG、IgM、IgA 和补体 C₃、C₄,这 14 种蛋白质,目前已有国际公认的标准参考物质。此外,免疫球蛋白轻链 κ 和 λ 、甲胎蛋白(AFP)、 β_2 微球蛋白等血液和尿液蛋白质也可用上述方法测定。AAT 测定一般利用 M 蛋白抗血清制成免疫浊度法,因而如果血清浓度 <500mg/L 提示可能存在非 M 型蛋白的变异表型,可进一步通过等电聚焦或淀粉胶电泳证实;测定 AAT 还可利用其对胰蛋白酶的抑制能力而设计。

4. 蛋白质电泳测定

(1)方法学概述:1948 年 Wieland 等建立了区带电泳后,相继出现了滤纸、醋酸纤维素薄膜、淀粉凝胶、琼脂糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶等各种类型的电泳方法,并在临床生物化学检验中得到了广泛应用。1957 年 Kohn 开始将醋酸纤维素薄膜用于血清蛋白电泳分析。现在,醋酸纤维素薄膜或琼脂糖凝胶电泳检测血清蛋白已成为临床常规检测项目,常用染色剂有丽春红 S、氨基黑 10B 等,通过光密度扫描仪对染色的区带进行扫描可进行半定量分析,确定样品中不同蛋白质区带的百分含量。

(2)测定原理:血清蛋白电泳(serum protein electrophoresis, SPE)就是根据血清中各组分蛋白质分子量的不同,将各组分蛋白质分离开,分子大的泳动慢,分子小的泳动快,依次分为清蛋白、 α_1 -球蛋白、 α_2 -球蛋白、 β -球蛋白(有时可出现前 β -球蛋白区带属正常)和 γ -球蛋白 5 个区带或 6 个区带。血清蛋白质电泳图谱是了解血清蛋白质全貌的有价值的方法,在某些疾病时可作为较好的辅助诊断指标。

(3)方法学评价:醋酸纤维素薄膜电泳具有电泳时间短、染料吸附少等优点,但电泳时水分容易蒸发,醋纤膜不透光,光密度扫描前需先进行透明处理。低浓度的琼脂糖凝胶电泳相当于自由界面电泳,蛋白质在电场中可自由穿透,阻力小,不被凝胶吸附,使蛋白电泳图谱无

拖尾现象,分辨清晰,透明度高,故电泳结束后无须进行透明处理。血清蛋白在醋酸纤维素薄膜电泳、琼脂糖凝胶电泳中能分离出 5 条~6 条区带,已能满足临床的一般要求。

(三) 血浆蛋白质测定临床应用

1. 血清总蛋白

(1) 血清总蛋白浓度降低:①蛋白质合成障碍:当肝功能严重受损时,蛋白质合成减少,以清蛋白降低最为显著。②蛋白质丢失增加:严重烧伤,大量血浆渗出;大出血;肾病综合征尿中长期丢失蛋白质;溃疡性结肠炎可从粪便中丢失蛋白质。③营养不良或消耗增加:营养失调、低蛋白饮食、维生素缺乏症或慢性肠道疾病所引起的吸收不良使体内缺乏合成蛋白质的原料;长期患消耗性疾病,如严重结核病、恶性肿瘤和甲状腺功能亢进等,均可导致血清总蛋白浓度降低。④血浆稀释:如静脉注射过多低渗溶液或各种原因引起的水钠潴留。

(2) 血清总蛋白浓度增高:①蛋白质合成增加:大多见于多发性骨髓瘤患者,此时主要是异常球蛋白增加,使血清总蛋白增加。②血浆浓缩:如急性脱水(如腹泻、呕吐、高烧等),外伤性休克(毛细血管通透性增大),慢性肾上腺皮质功能减退(尿排钠增多引起继发性失水)。

2. 血清蛋白

(1) 低 Alb 血症:可见于下述许多疾病情况:①合成不足:如急性或慢性肝疾病及蛋白质营养不良或吸收不良等。②丢失过多:如各种原因使 Alb 从肾、肠道及皮肤丢失。③分解增加:由组织损伤或炎症等引起。④分布异常:肝硬化导致门脉高压时,由于 Alb 在肝合成减少和大量漏入腹腔的双重原因,使血浆 Alb 显著下降。⑤无 Alb 血症:是一种罕见的遗传性疾病,属先天性 Alb 合成缺陷,血浆 Alb 含量常低于 1g/L。

(2) 血浆中 Alb 增高:比较少见,当机体严重脱水时,可表现为相对增高,对监测血液浓缩有诊断意义。

至今已发现有 20 多种清蛋白的遗传变异类型,这些个体可以不表现病症,在血浆蛋白质电泳分析时清蛋白区带出现 2 条或 1 条宽带,有人称之为双清蛋白血症。当某些药物大剂量应用(如青霉素或水杨酸)而与清蛋白结合时,可导致这部分清蛋白电泳迁移率的加快而出现区带形状的改变。

血清蛋白浓度降低,临床上比较重要和常见,通常与总蛋白降低的原因大致相同。急性降低主要见于大出血和严重烧伤;慢性降低见于肾病蛋白尿、肝功能受损、肠道肿瘤及结核病伴慢性出血、营养不良和恶性肿瘤等。血清蛋白低于 20g/L,临床出现水肿。某些患者可同时出现清蛋白减少和球蛋白升高的现象,严重者 A/G 比值 <1.0 ,这种情况称为 A/G 比值倒置。文献报道还有极少见的因清蛋白合成障碍,血清中几乎没有清蛋白的先天性清蛋白缺乏症。

3. 特定蛋白质 临床对特定蛋白质的测定越来越受到了重视。

(1) 急性时相反应蛋白:在急性炎症性疾病如感染、手术、创伤、心肌梗死和肿瘤等情况下,AAT、AAG、CP、CRP、Hp 以及 α_1 -抗糜蛋白酶、血红素结合蛋白、 C_3 、 C_4 、纤维蛋白原等血浆蛋白浓度会显著升高;而血浆 PA、Alb 与 TRF 则出现相应的降低。这些血浆蛋白质统称为急性时相反应蛋白(acute phase reaction proteins, APP),这种现象称为急性时相反应(acute phase reaction, APR)。下降的血浆蛋白质被称为负性急性时相反应蛋白。

(2) 急性时相反应蛋白的评价:急性时相反应是对炎症的一般反应,没有疾病的特异性,常伴有体温和白细胞升高。在复杂的炎症防御过程,尤其是在补体和酶活性的调控中,APP

起一定的作用,这是机体防御机制的一个部分,其详尽机制尚未十分清楚。在损伤和炎症时细胞释放某些生物活性介质,即一些小分子蛋白质,如细胞因子,包括白介素, α 及 β 肿瘤坏死因子,干扰素以及血小板活化因子等,可导致肝细胞中 APP 的合成增加,以及 PA、Alb 和 TRF 在肝细胞中的合成减少。APP 中的不同蛋白升高的速度不同,例如单纯的手术创伤,C-反应蛋白及 α_1 抗糜蛋白酶在 6~8h 内即上升。继之在 12h 内 α_1 AG 上升。在严重病例继之可见到 AAT、Hp、C₄ 及纤维蛋白原的增加,最后 C₃ 及 C_p 增加,2~5 天内达到高峰,同时伴有 PA、Alb 及 TRF 的相应下降。如无并发感染,则免疫球蛋白可以没有特殊变化, α_2 MG 亦可无变化。因此结合后几项可以作为监测患者有否伴随失水及血容量变化的指标。检测 APP 有助于对炎症进程的监测和治疗效果的判断,尤其是检测那些升高最早和最多的蛋白质。常用的急性时相反反应蛋白测定的临床意义见表 11-2。

表 11-2 常用的急性时相反反应蛋白测定的临床意义

项目	临床意义
AAT	①AAT:ZZ 型、SS 型甚至 MS 表型常伴有早年(20~30 岁)出现的肺气肿低血浆 AAT 还可发现于新生儿呼吸窘迫综合征。②AAT:ZZ 型蛋白聚集在肝细胞,可导致肝硬化。③AAT 在炎症、感染、肿瘤、肝病时浓度均显著增加,且与炎症程度相关。
AAG	在风湿病、恶性肿瘤及心肌梗死等炎症或组织坏死时,一般增加 3~4 倍,3~5 天时出现浓度高峰。AAG 增高亦是活动性溃疡性结肠炎最可靠的指标之一。糖皮质激素增加,可引起 AAG 升高。而雌激素可减少 AAG 的合成。在营养不良、严重肝损害、肾病综合征以及胃肠道疾病致蛋白严重丢失等情况下,AAG 降低
Hp	①Hp 浓度升高可见于烧伤和肾病综合征引起大量清蛋白丢失的情况下,机体代偿性合成 Hp 增加,血浆 Hp 浓度明显增加。②Hp 浓度下降可见于溶血性疾病;严重肝病患者 Hp 合成降低;雌激素使 Hp 减少。
α_2 MG	低清蛋白血症,尤其是肾病综合征时, α_2 MG 含量可显著增高。 α_2 MG 降低见于严重的急性胰腺炎和进展型前列腺癌治疗前。 α_2 MG 不属于急性时相反反应蛋白。
C _p	在肝豆状核变性(Wilson 病)、营养性铜缺乏和遗传性铜缺乏(Menkes 综合征)C _p 浓度减少。C _p 属于一种急性时相反反应蛋白,血浆 C _p 在感染、创伤和肿瘤时增加。但在营养不良,严重肝病及肾病综合征时往往下降。
TRF	在缺铁性贫血时,血浆铁含量减少,TRF 代偿性合成增加,铁饱和度减低。而铁利用障碍性贫血时,血浆铁含量正常或增高,TRF 正常或减低,铁饱和度增高。在炎症、恶性肿瘤等急性时相反反应时,常随着清蛋白、前清蛋白同时下降。在营养不良及慢性肝脏疾病时下降。
CRP	①结合病史监测疾病:如评估炎症性疾病的活动度。②监测系统性红斑狼疮、白血病和外科手术并发的感染。③监测肾移植后的排斥反应等。

4. 血清蛋白质电泳

(1)血清蛋白质电泳的正常图谱:血清蛋白在醋酸纤维素薄膜蛋白电泳后,由正极到负极可依次分为清蛋白、 α_1 -球蛋白、 α_2 -球蛋白、 β -球蛋白、 γ -球蛋白五条区带参见(图 11-1A);有时 β -球蛋白区带中可分出 β_1 和 β_2 区带, β_1 中主要是 TRF, β_2 中主要是 C₃;各个区带中多个蛋白质组分可有重叠、覆盖,如 CP 常被 α_2 -MG 及 Hp 所掩盖;两条区带之间也有少量蛋白质,如 IgA 位于 β 和 γ 带之间;某些蛋白质组分染色很浅,如脂蛋白和 AAG,其中的脂质或糖类不能被蛋白染料着色。

血清蛋白电泳各组分的含量通常采用各区带的浓度百分比(%)表示,也可将各区带百分浓度与血清总蛋白浓度相乘后,以绝对浓度(g/L)表示。

(2)血清蛋白质电泳的异常图谱

1)血清蛋白质电泳的异常图谱分型:根据血清蛋白在电泳图谱上的异常特征,不少学者

将其进行分型,使其有助于临床疾病的判断,参见表 11-3。

表 11-3 异常血清蛋白质电泳图谱的分型及其特征

图谱类型	TP	Alb	α_1	α_2	β	γ
低蛋白血症型	↓↓	↓↓	N↑	N	↓	N↑
肾病型	↓↓	↓↓	N↑	↑↑	↑	↓N↑
肝硬化型	N↓↑	↓↓	N↓	N↓	β - γ T(融合)	
弥漫性肝损害型	N↓	↓↓	↑↓			↑
慢性炎症型		↓	↑	↑		↑
急性时相反应型	N	↓N	↑	↑		N
M 蛋白血症型			在 α - γ 区带中出现 M 蛋白区带			
高 $\alpha_2(\beta)$ -球蛋白血症型		↓		↑↑	↑	
妊娠型	↓N	↓	↑	↑	↑	N
蛋白质缺陷型			个别区带出现特征性缺乏			

在某些蛋白质异常增多的情况下,电泳图谱可出现异常区带。如高浓度的甲胎蛋白可表现为清蛋白与 α_1 区带间呈现一条清晰的新带;C-反应蛋白异常增高可出现特殊界限的 γ 区带;单核细胞白血病可出现由于溶菌酶异常增多的 γ 后区带等。

2) 血清蛋白质电泳典型异常图谱:在以下异常电泳图谱中,肾病综合征、肝硬化较多见,且最具有特征性,在临床上诊断意义较大,见图 11-1。

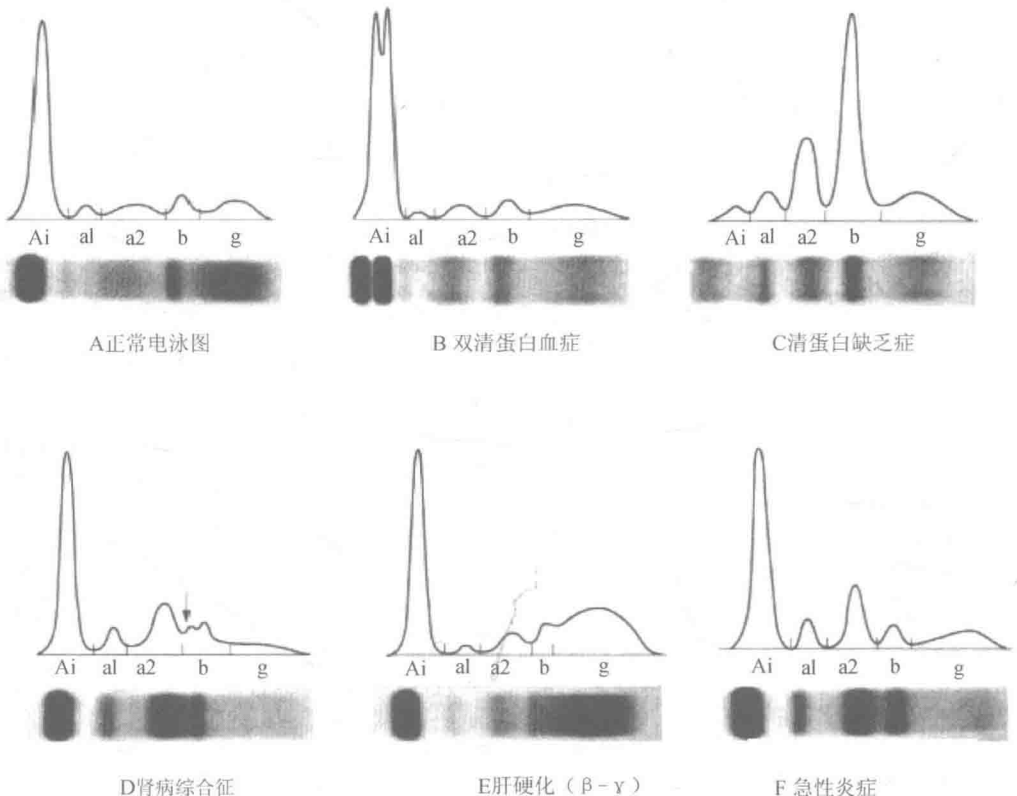


图 11-1 几种典型血清蛋白质电泳图谱及其扫描曲线

3)浆细胞病与M蛋白:血清蛋白电泳正常图谱上显示的宽 γ 区带的主要成分是免疫球蛋白,而免疫球蛋白由浆细胞产生。当发生浆细胞病(plasma cell dyscrasia)时,异常浆细胞增殖,产生大量单克隆免疫球蛋白或其轻链或重链片段,在患者的血清或尿液中可出现结构单一的M蛋白(monoclonal protein),蛋白电泳时即呈现一色泽深染的窄区带,此区带较多出现在 γ 或 β 区,偶见于 α 区。M蛋白有三种类型:①免疫球蛋白型。②轻链型。③重链型。

(3)各电泳区带的主要蛋白质:血浆蛋白质的性质、功能及其与电泳区带的关系,参见表11-4。

表 11-4 血浆蛋白质的性质与电泳区带的关系

电泳区带	蛋白质种类	半寿期(d)	分子量($\times 10^3$)	等电点	含糖量(%)	成人参考区间(g/L)
前清蛋白	前清蛋白	0.5	54	—	—	0.2~0.4
清蛋白	清蛋白	15-19	66.3	4.7	0	35~55
α_1 -球蛋白	α_1 -抗胰蛋白酶	4	51	4.8	10~12	0.9~2.0
	α_1 -酸性糖蛋白	5	40	2.7~3.5	45	0.5~1.5
	甲胎蛋白		69			3×10^{-5}
α_2 -球蛋白	高密度脂蛋白		200			1.7~3.25
	结合珠蛋白	2	85~400	4.1	12	0.3~2.0
	α_2 -巨球蛋白	5	725	5.4	8	1.3~3.0
β -球蛋白	铜蓝蛋白	4.5	132	4.4	8~9.5	0.1~0.4
	转铁蛋白	7	79.5	5.5~5.9	6	2.0~3.6
	低密度脂蛋白		300			0.6~1.55
	C ₁		206		7	
γ -球蛋白	β_2 -微球蛋白		11.8			0.001~0.002
	纤维蛋白原	2.5	340	5.5	3	2.0~4.0
	C ₃		185		2	0.9~1.8
	IgA	6	160~170		8	0.7~4.0
	IgG	24	160	6~7.3	3	7.0~1.6
	IgM	5	900		12	0.4~2.3
	C-反应蛋白	0.8	115~140	6.2	0	0.008

二、氨基酸的生物化学检验

(一)氨基酸代谢紊乱概述

氨基酸代谢紊乱一般分为两类,一是由于参与氨基酸代谢的酶或其他蛋白因子缺乏而引起的遗传性疾病,这是原发性氨基酸代谢紊乱;二是与氨基酸代谢有关的器官如肝、肾出现严重病变导致的继发性氨基酸代谢紊乱。遗传性氨基酸代谢紊乱种类很多,为相关基因突变所致,至今已发现70余种,多数是缺乏某种酶引起,也有因缺乏某种载体蛋白而致肾脏或肠道吸收氨基酸障碍。当酶缺陷出现在代谢途径的起点时,其催化的氨基酸将在血循环中增加,成为氨基酸血症(Aminoacidemia)。这种氨基酸会从尿中排出,称为氨基酸尿症(Aminoaciduria)。当酶的缺陷出现在代谢途径的中间时,则此酶催化反应前的中间代谢产物便在体内堆

积,使其血浓度增加,也会从尿中排出。由于正常降解途径受阻,氨基酸可通过另外的途径代谢,此时血和尿中可能出现这一途径中的产物。表 11-5 列举了一些氨基酸遗传病的名称和体液的检测结果。

表 11-5 氨基酸遗传病的名称和体液的检测结果

疾病名称	缺乏的酶	血浆中增高的成分	尿液中增高的成分
苯丙酮酸尿症	苯丙氨酸羟化酶	苯丙氨酸、苯丙酮酸	苯丙氨酸、苯丙酮酸
I 型酪氨酸血症	延胡索酸乙酰乙酸水解酶	酪氨酸、甲硫氨酸	酪氨酸、对羟苯丙酮酸等
尿黑酸尿症	尿黑酸氧化酶	尿黑酸(轻度)	尿黑酸
同型胱氨酸尿症	胱硫醚合成酶	甲硫氨酸、同型胱氨酸	同型胱氨酸
组氨酸血症	组氨酸酶	组氨酸、丙氨酸、苏氨酸、丝氨酸等	
甘氨酸血症	甘氨酸氧化酶	甘氨酸	甘氨酸
碱糖尿症(支链酮酸尿症)	支链酮酸氧化酶	缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、相应的酮酸	
胱硫醚尿症	胱硫醚酶	胱硫醚	胱硫醚
I 型高脯氨酸血症	脯氨酸氧化酶	脯氨酸	脯氨酸、羟脯氨酸
精氨酸琥珀酸尿症	精氨酸琥珀酸酶	谷氨酰胺、脯氨酸、甘氨酸等	精氨酸琥珀酸
精氨酸血症	精氨酸酶	精氨酸	精氨酸、胱氨酸
胱氨酸尿症	(肾小管碱性氨基酸载体)		胱氨酸、精氨酸、赖氨酸、鸟氨酸
二羧基氨基酸尿症	(肾小管酸性氨基酸载体)		谷氨酸、门冬氨酸
亚氨基甘氨酸尿症	(肾小管亚氨基氨基酸载体)		脯氨酸、羟脯氨酸、甘氨酸

(二)氨基酸的测定与评价

氨基酸种类繁多,理化性质相似,并同时存在于各种生物样品中,因此检测各个氨基酸时必须先将他们分离再分别检测。20 世纪 40 年代出现了离子交换树脂层析分离法;50 年代末又出现了自动装置,随着技术的进步,分析一个样品的时间从 1 周减少到 1 小时左右,同时样品用量也从 mmol 减少到 nmol,使灵敏度提高千、万倍,从而使全自动氨基酸分析仪在临床医学中发挥作用。各种生理体液,如血浆、血清、尿液、脑脊液、羊水、房水、精液,乃至细胞内液(如红细胞、白细胞和肌肉)用量只需数十至数百微升,注入全自动分析仪内,在 2~4h 内,即可得出各种氨基酸含量。此外,酶法测定氨基酸的进展很快,由于方法特异性强,灵敏度高,深受临床欢迎。非专用的高效液相色谱仪也可用于氨基酸测定。

1. 氨基酸自动化分析 氨基酸全自动分析仪主要由五个部分组成,即色谱系统、检测系统、加样系统、控制系统和数据处理系统。检测系统包括反应器、比色计或荧光计、记录器。70 年代以前设计的分析仪都是利用氨基酸与茚三酮加热产生紫色化合物的原理,该产物在 570nm 处具特征吸收峰,亚氨基酸(脯氨酸和羟脯氨酸)与茚三酮反应生成黄色化合物,在 440nm 处具特征吸收峰,所以多数全自动分析仪带有两种波长的比色计,即 570nm 和 440nm。从色谱柱上被逐步洗脱的氨基酸,随即与茚三酮试剂反应并在反应器中加热。茚三酮法只能检出 nmol 水平的氨基酸。70 年代以后检测系统中的比色法有的被荧光法所取代。所用的荧光试剂是邻苯二醛,它可检出 pmol 水平的氨基酸,但亚氨基酸不发生反应,必须加

入某些氧化剂(如次氯酸钠)后才发生荧光反应,使仪器结构复杂化。

2. 氨基酸的纸层析和薄层层析 由于氨基酸全自动分析仪价格昂贵,只能在一些测试中心应用。纸层析的优点是不需特殊设备、经济和操作简单,而且采集在滤纸上的标本可以邮寄,其缺点是灵敏度低、分辨率差和费时。因此,近几年已逐渐由速度快、分离效率高的薄层层析代替。纸层析和薄层层析又分为单向和双向两种;单向层析一般适用于某一个或一组氨基酸增高时的筛选检测,如异常结果可进一步用双向层析分离,定量方法可用薄层扫描仪扫描计算(方法原理同电泳扫描仪)。

3. 氨基酸的化学法测定

(1)色氨酸测定:色氨酸与甲醛缩合,并被三氯化铁氧化,形成具有荧光的去甲哈尔曼(noreharman),用荧光分光光度计测定其荧光可做色氨酸定量。

(2)羟脯氨酸测定:羟脯氨酸主要以多肽形式存在,是体内胶原蛋白的降解产物。先用盐酸加热使结合型的羟脯氨酸水解成为游离的羟脯氨酸,再用氯胺 T 氧化使成为吡咯类化合物。后者与对二甲氨基苯甲醛作用生成红色化合物。

4. 氨基酸的酶法分析

(1)苯丙氨酸测定:有两类酶法分析,一是用 L-苯丙氨酸氧化酶氧化 L-苯丙氨酸,产生的 H_2O_2 与 4-氨基安替比林和 N,N'-二甲苯胺生成醌亚胺,550nm 测定吸光度。二是利用 L-苯丙氨酸脱氢酶催化 L-苯丙氨酸,同时 NAD^+ 被还原成 NADH,检测 340nm 吸光度的增加速率可反映苯丙氨酸含量;利用同一个反应的逆反应,检测 340nm 吸光度的下降速率,则能测定苯丙酮酸含量。

(2)谷氨酰胺测定:在谷氨酰胺酶作用下分解为谷氨酸,后者被谷氨酸脱氢酶催化,有 NADH 的生成,因而可检测 340nm 的吸光度。

(3)支链氨基酸测定:包括亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸均可被亮氨酸脱氢酶催化氧化脱氨生成相应酮酸,同时 NAD^+ 被还原成 NADH,可检测 340nm 的吸光度。

(4)酪氨酸测定:酪氨酸在酪氨酸酶的作用下氧化生成多巴醌,用氧电极测定氧的消耗来对酪氨酸进行定量。

(三)氨基酸测定的临床应用

1. 原发性氨基酸代谢紊乱

(1)苯丙酮酸尿症:苯丙酮酸尿症(phenylketonuria, PKU)是一种常见的氨基酸代谢病,是由于苯丙氨酸代谢途径中的苯丙氨酸羟化酶缺陷,使得苯丙氨酸不能转变成酪氨酸,导致苯丙氨酸及其酮酸蓄积并从尿中大量排出。临床主要表现为智能低下,惊厥发作和色素减少。本病属常染色体隐性遗传病。其发病率各国不同,美国约为 1/14000,日本 1/60000,我国 1/16500。苯丙氨酸转变为酪氨酸的过程参见图 11-2。

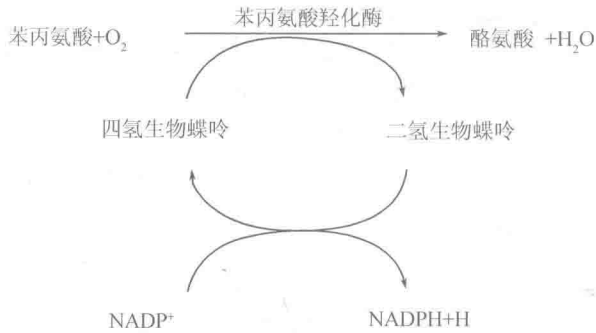


图 11-2 苯丙氨酸转变为酪氨酸的过程

(2)酪氨酸血症:酪氨酸血症可分为 I 型和 II 型,其中 I 型酪氨酸血症(tyrosinemia I)是由于酪氨酸分解途径中的延胡索酰乙酰乙酸水解酶(fumarylacetoacetate hydrolase)缺乏引起酪氨酸代谢异常所致,另外,对一羟苯丙酮酸氧化酶(p-hydroxyphenylpyruvate oxidase)活性也有下降酪氨酸在血和尿中水平增加,血中甲硫氨酸浓度也增加;甲硫氨酸增加是由于琥珀酰丙酮抑制甲硫氨酸腺苷转移酶的活性所致。马来酰乙酰乙酸或延胡索酰乙酰乙酸可还原生成琥珀酰乙酰乙酸,后者如再脱羧则成为琥珀酰丙酮,而琥珀酰丙酮可损害肝、肾功能。故 I 型酪氨酸血症又名肝肾型酪氨酸血症。

(3)同型胱氨酸尿症:含硫氨基酸代谢紊乱最多见的是同型胱氨酸尿症(homocystinuria),它是一组以体内同型半胱氨酸增高为特征的代谢紊乱,与胱硫醚-β-合成酶和甲硫氨酸合成酶的缺失密切相关。该症先是同型半胱氨酸增加,随之引起同型胱氨酸增加,因此同型半胱氨酸代谢紊乱与同型胱氨酸尿症密切相关。本病是常染色体隐性遗传病,根据生化缺陷的部分,主要由以下几种原因引起。①胱硫醚-β-合成酶缺乏。②甲硫氨酸合成酶缺乏。③食物营养缺乏。

同型胱氨酸尿症的诊断:新生儿筛选只适用于胱硫醚-β-合成酶缺乏型,可用 Guthrie 试验检测血浆甲硫氨酸是否升高。但阳性结果的解释应慎重,因为有可能是暂时的,或由于肝损害,酪氨酸代谢病或肝 S-腺苷甲硫氨酸合成酶的缺失所致。暂时性同型胱氨酸尿症目前由于婴儿服用低蛋白奶制品,发生率已下降。如果未进行新生儿筛选,同型胱氨酸尿症需待症状出现或尿液检测才能被发现。

2.继发性氨基酸代谢紊乱 继发性高氨基酸血症或氨基酸尿症主要发生在肝和肾疾患、蛋白质-能量营养紊乱以及烧伤等,其氨基酸异常是该类患者机体物质代谢普遍异常的一部分,体液氨基酸测定对诊治有参考意义。

三、高尿酸血症的生物化学检验

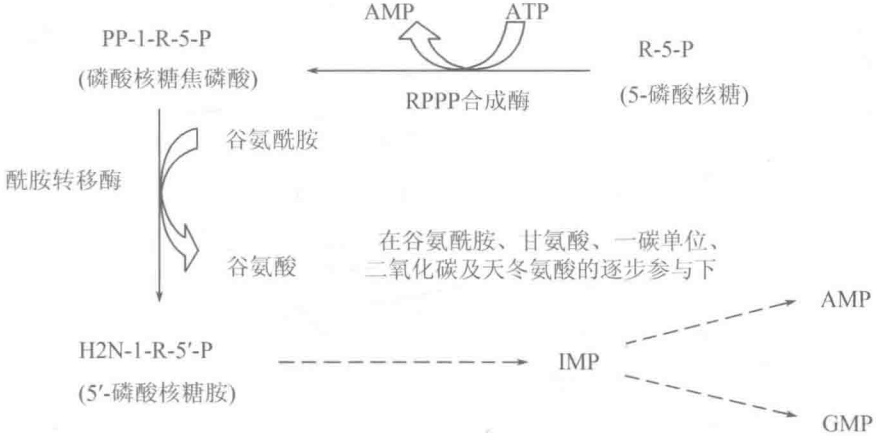
(一)嘌呤核苷酸代谢紊乱概述

嘌呤核苷酸合成和分解中最常见的代谢紊乱是高尿酸血症,并由此导致痛风(gout)。嘧啶核苷酸从头合成途径中的乳清酸磷酸核糖转移酶和乳清酸核苷酸脱羧酶缺陷可引起乳清酸尿症(orotic aciduria),但临床应用很少,故不在本章介绍,本章主要介绍嘌呤核苷酸代谢紊乱。

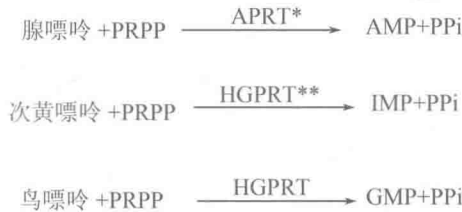
1.嘌呤核苷酸的代谢 体内嘌呤核苷酸合成有两条途径,第一是利用 5-磷酸核糖、氨基

酸、一碳单位和 CO_2 等为主要原料,经过一系列酶促反应合成嘌呤核苷酸,称为从头合成途径;第二是利用体内游离的嘌呤碱或嘌呤核苷,经过简单的反应过程,合成嘌呤核苷酸,称为补救合成途径,该途径是依赖相关组织细胞直接提供嘌呤碱或嘌呤核苷,重复利用以合成嘌呤核苷酸。两条途径在不同组织中重要性各不相同,从头合成途径是主要合成途径,肝组织进行从头合成途径,脑、骨髓等则只能进行补救途径合成。尿酸(uric acid)是嘌呤核苷酸分解代谢的终产物,见图 11-3。

A. 从头合成途径



B. 补救合成途径



APRT*腺嘌呤磷酸核糖转移酶

HGPRT**次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶

C. 分解代谢途径

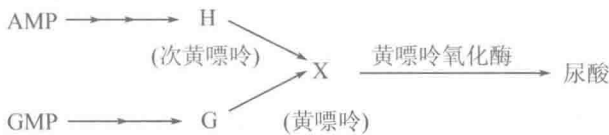


图 11-3 嘌呤核苷酸合成和分解代谢途径

2. 高尿酸血症 高尿酸血症(hyperuricemia)是指 37℃时,血清中尿酸含量男性超过

420 $\mu\text{mol/L}$,女性超过 350 $\mu\text{mol/L}$,是由尿酸排泄障碍或嘌呤代谢紊乱引起。

(1)尿酸排泄障碍:高尿酸血症的形成主要是由肾的清除减退所致。肾对尿酸的排泄是一个复杂的过程,可分为四个步骤:①血浆中的尿酸全部经肾小球滤过。②在近端肾小管的起始部,尿酸的 98%被主动重吸收。③在近端肾小管,尿酸的主动重吸收逐渐减少,而分泌到肾小管的尿酸量却逐渐增多,最后又达到滤过量的 50%左右。④在髓袢降支出现尿酸被动重吸收,重吸收量达滤过量的 40%~44%。经上述四个步骤,最终随尿排出的尿酸只占滤过量的 6%~10%,每天的总量约为 2.4~3.0mmol。当肾小球滤过率下降,或近端肾小管对尿酸的重吸收增加或(和)分泌功能减退时,便导致高尿酸血症。肾尿酸排泄障碍性疾病中,一部分是机制不明的多基因性遗传缺陷引起的原发性高尿酸血症,另一部分由导致肾小球滤过率下降和肾小管排泌尿酸减少的慢性肾疾患等引起。

(2)尿酸生成过多

1)嘌呤合成代谢紊乱:体内 80%尿酸来源于嘌呤的生物合成,嘌呤合成代谢紊乱可致高尿酸血症。其中大多数属多基因遗传缺陷,机制不明,占原发性高尿酸血症的 10%~20%。由特异酶缺陷引起者仅占原发性高尿酸血症的 1%,酶缺乏包括:①次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase, HGPRT)缺乏,可分完全缺乏和部分缺乏。②磷酸核糖焦磷酸(phosphoribosyl pyrophosphate, PRPP)合成酶亢进。③葡萄糖-6-磷酸酶缺乏。④腺嘌呤磷酸核糖转移酶(adenine phosphoribosyl transferase, APRT)缺乏。

2)嘌呤摄入过多:尿酸含量与食物内嘌呤含量成正比。体内 20%尿酸来源于食物中的嘌呤,摄入的食物内 RNA 的 50%,DNA 的 25%都要在尿中以尿酸的形式排泄,正常人严格限制嘌呤摄入量可使血清尿酸含量降至 60 $\mu\text{mol/L}$,尿内尿酸排泄可降至 1.2mmol/天。

3)嘌呤分解增加:内源性嘌呤代谢紊乱较外源性因素更为重要。在骨髓增殖性疾病如白血病、多发性骨髓瘤、红细胞增多症等,有旺盛的细胞合成和分解,从而出现核酸分解亢进,嘌呤和尿酸生成增多。

3. 痛风

(1)痛风的概念:痛风(gout)是长期嘌呤代谢障碍及(或)尿酸排泄减少,血尿酸增高引起组织损伤的一组临床综合征。以高尿酸血症为特点,以及由此引起的痛风性急性关节炎反复发作、痛风石沉积、痛风石性慢性关节炎和关节畸形,常累及肾引起慢性间质性肾炎和尿酸性肾结石。

(2)尿酸结晶与痛风:血浆中尿酸盐以单钠尿酸盐形式存在,其溶解度很低,当血液 pH 为 7.4 时,尿酸钠的溶解度约为 420 $\mu\text{mol/L}$,超过此浓度时血浆尿酸已成过饱和状态。当浓度 >480 $\mu\text{mol/L}$ 持久不降,如遇有下列情况即可使尿酸钠呈微小结晶析出:①血浆清蛋白及 α_1 、 α_2 球蛋白减少。②局部 pH 降低。③局部温度降低。尿酸钠晶体被白细胞吞噬后可促使细胞膜破裂,释放各种炎症介质,引起痛风。

(二)尿酸的测定与评价

目前临床上血清尿酸多用尿酸酶-过氧化物酶耦联法测定。

(三)尿酸测定的临床应用

多种原因可引起高尿酸血症并导致痛风症

1. 原发性高尿酸血症 原发性肾脏排泄尿酸减少,占原发性中 80%~90%,为多基因性常染色体显性遗传所致。尿酸产生过多,以从头合成嘌呤过多占主要,占原发性 10%~20%,也是多基因性常染色体显性遗传;而特异性酶缺陷,如黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HG-PRT)部分缺乏或完全缺乏等,导致鸟嘌呤和次黄嘌呤不能经补救途径合成嘌呤核苷酸,而使尿酸产生过多者,仅占原发性 1%。

2. 继发性高尿酸血症 继发性高尿酸血症可由尿酸产生过多或尿酸排泄减少引起。尿酸产生过多见于骨髓增殖性疾病如各类白血病、多发性骨髓瘤、红细胞增多症、慢性溶血性贫血、全身扩散的癌症、恶性肿瘤化疗或放疗后和严重的剥脱性牛皮癣等。尿酸排泄减少常由引起肾小球滤过减少和(或)肾小管排泌尿酸减少的肾脏疾病所致。

(刘恩才)

第二节 糖代谢紊乱的生物化学检验

糖代谢紊乱是指血糖(blood glucose)浓度过高或过低,其中以糖尿病最为常见,本节重点讨论糖代谢紊乱引起的高血糖症、糖尿病及其相关的实验室检测,简要地阐述低血糖症和部分先天性糖代谢异常。

一、糖代谢紊乱与糖尿病

(一)血糖浓度的调节机制

正常人空腹血糖浓度在 3.89~6.11mmol/L 范围内。血糖浓度变动受多种因素影响,在神经、激素和肝脏等因素的调节下保持在恒定范围内,对维持机体正常的生理功能有重要的意义。血糖的来源与去路见图 11-4。

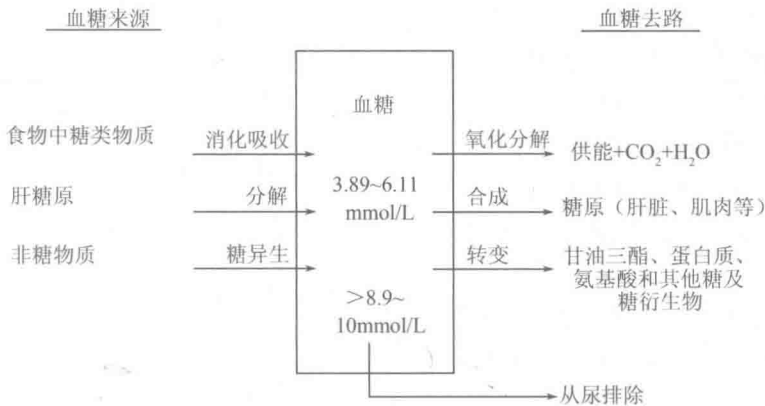


图 11-4 血糖的来源与去路

1. 激素调节

(1)降低血糖的激素

1)胰岛素:胰岛素(insulin, Ins)是由胰岛 β 细胞合成和分泌。首先合成的是 102 个氨基酸残基的前胰岛素原(preproinsulin)。在内质网中切去前面 16 个氨基酸的信号肽序列,生成 86 个氨基酸的胰岛素原(proinsulin, PI),输送并贮存在高尔基体的分泌小泡内,PI 是胰岛素