

用酶标凝集素检测胃液中的胃蛋白酶* Gastric Juice Pepsin Assay by Enzyme-labeled Lectin

周素芳 秦雪** 梁谷 吴耀生 周德义
Zhou Sufang Qin Xue Liang Gu Wu Yaosheng Zhou Deyi

(广西医科大学生化教研室 南宁 530021)

(Department of Biochemistry, Guangxi Medical University, Nanning, 530021)

摘要 采用辣根过氧化物酶 (HRP) 标记 ALL, 通过夹心酶联法检测各种胃病患者胃液中的胃蛋白酶。结果: 胃蛋白酶在正常组 (15例)、胃炎组 (28例)、十二指肠溃疡组 (25例)、胃溃疡组 (25例) 及胃癌组 (13例) 中的含量无显著性差异。但胃液 pH 值 ≥ 5 的胃蛋白酶含量明显高于 pH 值 < 4 的酶含量。表明胃粘膜屏障的局部缺陷使之为胃蛋白酶抵抗能力下降, 可能与消化性溃疡的发生关系更为密切。

关键词 红桂木凝集素 酶联免疫测定 胃液 胃蛋白酶

Abstract The pepsin contents of gastric juice were determined by ALL-HRP sandwich assay. Results: There were no significant differences in the pepsin contents among the normal controls and patients with various gastric diseases including gastritis, duodenal ulcer, peptic ulcer and carcinoma of stomach. But the pepsin contents of the gastric secretions with pH ≥ 5 were significantly higher than those with pH < 4 .

Key words *Artocarpus lingnanensis* lectin, enzyme-linked-immunoassay, gastric juice, pepsin

中图法分类号 Q55; R573

凝集素的特性之一是可以和糖蛋白特异结合^[1]。作者在研究红桂木凝集素 (*Artocarpus lingnanensis* Lectin 简称 ALL) 对各种糖蛋白的结合特性中发现 ALL 可以和胃蛋白酶结合, 且亲和力很强 (文章待发表)。由于胃蛋白酶、胃酸、幽门螺杆菌等被认为是产生消化性溃疡的攻击因子, 因此采用 HRP 标记 ALL, 通过夹心酶联法检测各种胃液中胃蛋白酶的含量, 以便验证胃蛋白酶在各种胃部疾病中的地位及作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 ALL: 红桂木种子由广西热带植物研究所提供, 广西医科大学生化教研室自备达电泳

1997-06-26 收稿。

* 国家自然科学基金资助项目 (编号 39260023)

** 广西医科大学第一附属医院检验科。

纯。

1.1.2 胃液：收集胃镜确诊患者的空腹胃液， -20°C 保存。广西医科大一附院胃镜室提供。

1.1.3 试剂和仪器：HRP为上海丽珠东风生物技术有限公司产品；底物TMB，A、B液，终止液为华美公司产品；电泳纯胃蛋白酶为Sigma产品；酶标仪为美国Bio-TEK公司产品；酶标板为深圳南园生化试剂厂产品。

1.2 方法

1.2.1 ALL-HRP的制备

按郭春祥的HRP标记抗体的过碘酸钠法^[2]稍加改进，标记物过Sephadex G200柱，收集含ALL-HRP的洗脱峰混合，其酶结合物中HRP浓度按蒋成溢法^[3]计算为 $18\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ，标记率为0.76，加甘油至50%，分装后于 -20°C 贮存备用。

1.2.2 制作胃蛋白酶标准曲线

ALL-HRP测定胃蛋白酶的作用模式为：ALL-胃蛋白酶-ALL-HRP，以 $5\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ALL包被酶标板0.1 ml/孔， 4°C 过夜，PBS吐温洗板3次，加入稀释成不同浓度的标准胃蛋白酶， 37°C 30 min洗板，加入1/1000的ALL-HRP， 37°C 30 min洗板，加含有底物TMB的A、B液各1滴， 37°C 10 min，加终止液1滴，混匀测 A_{450} 。每次同时作空白及阴性对照，并进行重复性实验。

1.2.3 ALL-HRP对胃液中胃蛋白酶的检测

各种胃液经解冻后3000转/min离心15 min，取上清液进行检测并测定其pH值。测定胃蛋白酶的作用模式为ALL-胃液-ALL-HRP，条件及方法和标准曲线制作保持一致，每次同时作空白及阴性对照。

2 结果

2.1 胃蛋白酶标准曲线

将蛋白酶稀释成 $0.05\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 至 $10\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ，据其吸光度 A_{450} 与浓度关系制作标准曲线(图1)，胃蛋白酶在 $0.05\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 至 $3.5\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 之间基本成线性关系，直线回归方程 $y = 0.328x + 0.112$ ，相关系数 $r = 0.979$ ，酶浓度大于 $3.5\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 后，其 A_{450} 基本无线性关系。故胃蛋白酶的检出限在 $0.05\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 至 $3.5\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 之间，用标准胃蛋白酶进行重现性实验，其中批内变异为8.43%，批间变异为12.58%。

2.2 各组胃病患者胃液中胃蛋白酶含量比较

以胃镜检查为准，各种胃病患者大致正常15例，慢性浅表性胃炎及胃窦炎28例，十二指肠溃疡活动期25例，胃溃疡25例及胃癌13例。酶联法测定胃液中胃蛋白酶的 A_{450} ，代入直线回归方程，求出酶的含量。各组数据 $\bar{x} \pm S$ 按组间进行两两比较，方差齐的做 t 检验，方差不齐的做秩和检验，结果表明各组间差别不大，见表1。

2.3 pH值对胃液胃蛋白酶含量的影响

胃液pH值 ≥ 5 的为第1组，pH值3~4的为第2组，pH值1.5~2.5的为第3组，各组数据进行比较，结果pH值 ≥ 5 的酶含量明显高于其他2组，见表2。

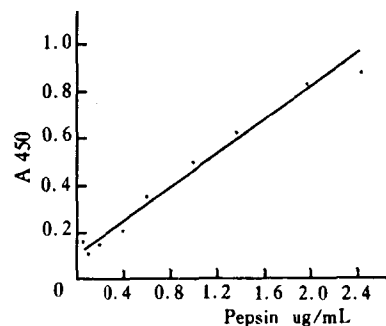


图1 胃蛋白酶标准曲线

3 讨论

目前国内对胃液中胃蛋白酶的检测大多数是采用变性血红蛋白法测定其活性, 而对胃蛋白酶含量的检测未见报道。我们采用 HRP 标记 ALL, 测定胃液中胃蛋白酶含量并制作标准曲线, 方法简单易行, 重现性较好。因此用 ALL-HRP 来检测胃液中的胃蛋白酶含量是一种可行的方法。

胃蛋白酶长期以来一直被认为和慢性消化性溃疡有关, 胃酶提供一个合适的 pH 值环境给胃蛋白酶进行消化作用, 胃蛋白酶在 pH 值等于 2 时活性大, pH 值在 5 以上无活性, 而在 8 以上则失去稳定性^[4]。一般认为十二指肠溃疡患者胃液中胃蛋白酶活性升高, 而慢性胃炎患者酶活性常减弱。作者的实验表明正常组与疾病各组间胃蛋白酶含量均无明显差别, 即酶的活性与含量表现不一致。可能的原因是: 虽然各种胃病患者胃粘膜细胞分泌的胃蛋白酶原含量基本一致, 但不同胃部疾病其胃内 pH

值、胃粘膜屏障等因素不一样, 可能导致对酶原的激活程度不一, 导致酶活性不一样。因此认为胃蛋白酶虽然是消化性溃疡的攻击因子之一, 但胃粘膜屏障等保护性因素的减弱与溃疡发生密切相关, 由于粘液具有高度的粘滞性、内聚性、粘附性、吸附胃蛋白酶和中和胃酸的能力, 它在粘膜上形成了一个连续不断、无缝隙的保护层^[5], 如果粘膜的保护性屏障在某个地方有缺陷, 即使胃蛋白酶含量正常亦可发生消化作用引起溃疡。作者实验也发现胃液 pH 值对胃蛋白酶含量有影响, 当 pH 值 ≥ 5 时, 酶含量明显高于 pH 值 < 4 的酶含量。值得注意的是 16 例 pH 值 ≥ 5 的患者, 胃癌组占 7 例、正常组占 4 例, 其余散布于其他各组。是否由于 pH 值 ≥ 5 时, 胃蛋白酶变性失活, 胃粘膜对失活酶的吸附力下降而使胃液中胃蛋白酶含量升高, 这有待于进一步研究。

表 1 胃病患者胃液中胃蛋白酶含量 ($\bar{x} \pm S$)

| 组别 | 例数 | 含量 ($\mu\text{g/mL}$) |
|--------|----|----------------------------|
| 正常 | 15 | 1.225 \pm 0.795 |
| 胃炎 | 28 | 0.769 \pm 0.44 |
| 十二指肠溃疡 | 25 | 1.122 \pm 0.854 |
| 胃溃疡 | 25 | 0.790 \pm 0.787 |
| 胃癌 | 13 | 1.319 \pm 0.974 |

各组间 P 值均 > 0.05

表 2 胃液 pH 值对胃蛋白酶含量 ($\bar{x} \pm S$) 影响

| 组别 | pH 值 | 例数 | 含量 ($\mu\text{g/mL}$) | P 值 |
|----|----------|----|----------------------------|------------------|
| 1 | ≥ 5 | 16 | 1.482 \pm 0.939 | 1 与 2 $P < 0.05$ |
| 2 | 3~4 | 22 | 0.723 \pm 0.455 | 1 与 3 $P < 0.05$ |
| 3 | 1.5~2.5 | 68 | 0.592 \pm 0.504 | 2 与 3 $P > 0.05$ |

参考文献

- 1 孙 册, 朱 玫, 莫庆汉主编. 凝集素. 北京: 科学出版社, 1988. 1~2.
- 2 郭春祥, 郭锡琼. 介绍一种简单、快速高效的辣根过氧化物酶标记抗体的过碘酸钠法. 上海免疫学杂志, 1983, 3 (2): 97~100.
- 3 蒋成途编著. 酶免疫测定法. 北京: 人民卫生出版社, 1984, 87.
- 4 Douglas. W. piper. 消化性溃疡的病因与治疗. 临床消化病杂志, 1993, 5 (1): 21~23.
- 5 Komarov SA. The Inactivation of pepsin and Its Relation to peptic ulcer. American Journal of Gastroenterology, 1982, 77 (10): 736~741.