

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.24.012

葡萄糖磷酸异构酶酶显色定量测定方法的建立及性能评估*

黄亚丽¹, 赵珂², 魏芳³, 马凯惠², 李新华^{2△}

(1. 山东大学齐鲁医院核医学科, 济南 250062; 2. 山东省内分泌与代谢病研究所, 济南 250012;

3. 山东中医药大学附属医院普外科, 济南 250000)

摘要:目的 建立葡萄糖磷酸异构酶(GPI)的酶显色定量测定方法。方法 D-果糖-6-磷酸二钠在 GPI 作用下生成葡萄糖-6-磷酸,葡萄糖-6-磷酸与烟酰胺腺嘌呤二核苷酸在葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PDH)作用下生成还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH),NADH 与水溶性四氮唑盐(WST-3)反应,反应产物在 550 nm 处有最大吸光度值,吸光度值与 GPI 水平呈正比。利用此原理对 39 例类风湿关节炎患者、52 例其他自身免疫性疾病和 32 例健康对照者血清中 GPI 进行检测。同时评价该方法的线性、精密度、准确度、稳定性,并与 GPI 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒进行一致性分析。结果 该方法线性良好($r^2=0.9923$)、精密度批内和批间变异系数均小于 10%、准确度 t 检验显示各水平测试结果偏倚均可接受。试剂稳定性大于 12 个月,测试结果相对偏差在 $\pm 20\%$ 以内均满足试验要求,且与 GPI ELISA 试剂盒相关性良好,测定结果偏差无统计学意义($P>0.05$)。结论 GPI 的酶显色定量测定方法的各项指标均符合临床要求,可用于临床 GPI 水平检测。

关键词:酶显色法; 葡萄糖磷酸异构酶; 类风湿关节炎

中图分类号:R446.1

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2018)24-3687-04

Establishment and performance evaluation of enzymic colorimetric Quantitative

Method for the Determination of glucose phosphate isomerase*

HUANG Yali¹, ZHAO Ke², WEI Fang³, MA Kaihui², LI Xinhua^{2△}

(1. Department of Nuclear Medicine, Qilu Hospital of Shandong University, Jinan, Shandong 250062, China; 2. Shandong Institute of Endocrine & Metabolic Diseases, Jinan, Shandong 250012, China; 3. Department of General Surgery, Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan, Shandong 250000, China)

Abstract: Objective To establish a quantitative detection method for enzymic colorimetric of glucose phosphate isomerase (GPI). **Methods** D-fructose-6-disodium phosphate (F6P) produces glucose-6-phosphate (G6P) under the action of GPI. Glucose-6-phosphate and nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) react with water-soluble tetrazolium salt (WST-3) to form reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) under the action of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH). The maximum absorbance of the reaction product was at 550 nm, and the absorbance value was proportional to the level of GPI. Using this principle, serum GPI was detected in 39 patients with rheumatoid arthritis, 52 patients with other autoimmune diseases and 32 healthy controls. At the same time, the linearity, precision, accuracy and stability of the method were evaluated, and the consistency with the GPI ELISA kit was analyzed. **Results** The linearity of this method was well ($r^2 = 0.9923$), the coefficient of variation (CV) values of intra and inter assay were all less than 10% and accuracy t test showed that the bias of each concentration was acceptable ($P>0.05$). The period of validity was more than 12 months, the relative deviation of the test results was within $\pm 20\%$ which met the experimental requirements. This reagent was well correlated with GPI ELISA kit and the deviation had no statistical significance ($P>0.05$). **Conclusion** This method was valuable for the clinical application and could be used for detection of the level of GPI in the clinics.

Key words: enzymic colorimetric; glucose phosphate isomerase; rheumatoid arthritis

类风湿关节炎(RA)是一种病因尚未完全阐明、以侵犯四肢小关节为主的自身免疫性疾病,RA 早期

即可产生不可逆的骨侵蚀和关节破坏,如果未得到及时治疗,RA 患者在 2~3 年的致残率为 60%~70%。

* 基金项目:山东省医学科学院院级科技计划面上项目(2017-20);山东省重点研发计划资助项目(2015GSF118131)。

作者简介:黄亚丽,女,主管技师,主要从事医学影像及免疫方面的研究。△ 通信作者,E-mail:liesir@126.com。

因此,RA 的早期诊断及规范化治疗极为重要^[1-2]。近年研究发现,葡萄糖磷酸异构酶(GPI)可作为自身抗原,与自身免疫病尤其是 RA 密切相关^[3],且与活动期患者的疼痛及肿胀关节数呈正相关^[4]。有研究表明,GPI 可能通过与抗体复合物激活补体替代途径,诱发关节炎^[5]。本文建立一种定量检测血清 GPI 的酶显色法,并对其性能评估,探讨此方法是否满足临床检测的需求,为 RA 的临床早期筛查和诊断治疗提供技术支撑。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2015 年 12 月至 2016 年 9 月山东大学齐鲁医院风湿科门诊和住院患者 39 例作为 RA 组,其中男 13 例,女 26 例,年龄 20~83 岁,平均(60±15)岁,所有患者均符合美国风湿病学会联合欧洲抗风湿病联盟 2009 年修订的 RA 诊断标准。另选取同期在山东大学齐鲁医院门诊就诊和住院的患者 52 例作为非 RA 组,其中男 18 例,女 34 例,年龄 19~83 岁,平均(54±17)岁,均符合国内或国际相应的诊断标准,其中系统性红斑狼疮 23 例,混合型结缔组织病 2 例,强直性脊柱炎 6 例,干燥综合征 10 例,未分化结缔组织病 3 例,多发性肌炎/皮肌炎 5 例,脊柱关节病 2 例,肠病性关节炎 1 例。选取在山东大学齐鲁医院体检健康者 32 例作为健康对照组,其中男 10 例,女 22 例,年龄 26~81 岁,平均(53±16)岁。排除 GPI 缺乏症患者,所有受试者均空腹采集静脉血 3 mL,分离血清,-80 °C 冰箱保存备用。所有标本一次冻融后测定。

1.2 仪器与试剂

Infinite M200 Pro 多功能酶标仪购自瑞士 Tecan 公司,PHS-3E 型 pH 计购自雷磁公司,Tris 购自美国 Sigma 公司,乙二胺四乙酸二钠(EDTA-Na₂)、氯化钾(KCl)、硫酸镁(MgCl₂)购自西陇化工股份有限公司,D-果糖-6-磷酸二钠、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、GPI 标准品购自瑞士 Roche 公司,水溶性四氮唑盐购自南京旋光科技有限公司,柠檬酸、吩嗪硫酸甲酯(PMS)购自阿拉丁公司,乙基苯基聚乙二醇(NP-40)购自安耐吉公司;GPI ELISA 试剂盒购自上海北加生化试剂有限公司。

1.3 方法

1.3.1 原理及操作步骤

(1)原理:根据 D-果糖-6-磷酸二钠在 GPI 作用下生成葡萄糖-6-磷酸,葡萄糖-6-磷酸再与烟酰胺腺嘌呤二核苷酸在葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的作用下生成还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸,还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸与水溶性四氮唑盐发生颜色反应,在 550 nm 处有最大吸光度,吸光度值与 GPI 水平呈正比。(2)操作步骤:试验前 10 min 先将 R1 与 R2 以 1:1 混匀,每孔吸取 100 μL,再加 10 μL 标本 37 °C 反应 10 min,采用 Infinite M200 Pro 测定其在 550 nm 处的吸光度,根据 GPI 标准品制订的标准曲线计算出标本中 GPI 水平。

1.3.2 试剂制备

配制稀释液 A:其中三羟甲基氨基甲烷 1 210 mg/L,EDTA-Na₂ 372.24 mg/L,KCl 3 725 mg/L,MgCl₂ 1 016.5 mg/L,用 1 mmol/L 的柠檬酸调节 pH 至 8.05。试剂 R1:果糖-6-磷酸 1 200 mg/L,烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 400 mg/L,葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 5 mg/L,用配制稀释液 A 来溶解。试剂 R2:水溶性四氮唑蓝 20 mg/L,PMS 2 mg/L,NP-40 1 000 mg/L。试剂制备好均置于 2~8 °C 保存备用。

1.3.3 性能评价

(1)精密度(CV)与偏倚:抽取 2 个批次的检测试剂,分别对水平 0.05、0.30、0.60 mg/L 的 GPI 质控品进行测定,每个水平重复 20 次,计算批内和批间各水平测试结果的 CV,并统计各水平测试结果的偏倚情况。(2)干扰试验:分别检测标本添加 200 mg/L 胆红素、5 g/L 血红蛋白、15 g/L 三酰甘油前后的检测结果,结果相对偏差在±10%以内认为干扰物不影响标本测试。(3)稳定性试验:试剂置于 2~8 °C 保存,14 个月(试剂有效期 12 个月+延长 2 个月)内每个月分别测试水平为 0.05、0.30、0.60 mg/L 的 GPI 质控品,每个水平重复 10 次,测试结果相对偏差在±20%以内认为试剂稳定性良好。(4)临床验证:用本试验方法检测 123 份临床血清标本,与 GPI ELISA 试剂盒检测结果比较,计算两种方法检测结果的相关性和偏差。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 19.0 软件拟合标准曲线方程, $r \geq 0.99$ 表示线性良好。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,试剂准确度偏倚分析采用 t 检验。两种方法临床定量检测结果的相关性采用 SPSS 一元直线回归分析, $r \geq 0.98$ 表示相关性良好,偏差分析采用配对秩和检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GPI 酶显色法定量测定的标准曲线

见图 1。分析结果显示,线性范围内各水平与测试值呈平滑递增曲线,标准曲线为 $Y = 0.0429X + 0.1083$, $r^2 = 0.9923$ 。

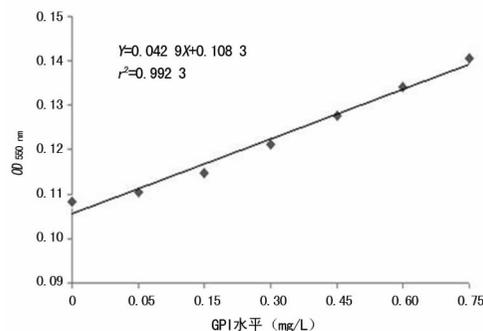


图 1 GPI 酶显色法定量的标准曲线

2.2 GPI 酶显色法定量测定方法的精密度与偏倚分析

见表 1。采用 2 批次配液同时测定,每个质控重复测定 20 次,批内与批间各检测水平 $CV < 10\%$,且 t 检验显示各水平测试结果偏倚可接受($P > 0.05$)。

表 1 两批试剂精密度与偏倚分析结果比较

批次	GPI 质控品水平 (mg/L)	检测次数 (n)	GPI 测定结果 ($\bar{x} \pm s, \text{mg/L}$)	CV (%)	P
	0.30	20	0.280 ± 0.023	8.21	0.673
	0.60	20	0.590 ± 0.053	8.98	0.771
第 2 批	0.05	20	0.046 ± 0.003	6.52	0.466
	0.30	20	0.290 ± 0.022	7.58	0.936
	0.60	20	0.580 ± 0.046	7.93	0.866
批间	0.05	20	0.047 ± 0.003	6.38	0.334
	0.30	20	0.290 ± 0.024	8.27	0.761
	0.60	20	0.580 ± 0.041	7.07	0.613

2.3 各干扰物加入前后测定结果比较 见表 2。临床上对于血清测定的干扰因素主要有脂浊、黄疸和溶

表 2 各干扰物加入前、后测定结果比较

标本	未加干扰物测定值 (mg/L)	加入胆红素 200 mg/L 测定值 (mg/L)	加入血红蛋白 5 g/L 测定值 (mg/L)	加入三酰甘油 15 g/L 测定值 (mg/L)	加胆红素前后差异 (%)	加血红蛋白前后差异 (%)	加三酰甘油前后差异 (%)
1	0.21	0.22	0.21	0.22	104.7	100.0	104.7
2	0.56	0.57	0.55	0.56	101.8	98.2	100.0
3	0.78	0.78	0.79	0.80	100.0	101.3	102.6
4	0.98	0.96	0.97	0.99	97.9	98.9	101.0
5	1.26	1.25	1.26	1.26	99.2	100.0	100.0

表 3 GPI 的酶显色法定量测定稳定性试验结果比较

检测时间 (月)	检测次数 (n)	GPI 质控品 ($\bar{x} \pm s, \text{mg/L}$)		
		0.05	0.30	0.60
1	10	0.049 ± 0.006	0.290 ± 0.060	0.590 ± 0.090
2	10	0.048 ± 0.005	0.290 ± 0.070	0.580 ± 0.100
3	10	0.046 ± 0.006	0.280 ± 0.080	0.590 ± 0.080
4	10	0.048 ± 0.007	0.290 ± 0.090	0.590 ± 0.070
5	10	0.047 ± 0.009	0.280 ± 0.090	0.580 ± 0.110
6	10	0.046 ± 0.004	0.300 ± 0.060	0.590 ± 0.060
7	10	0.045 ± 0.005	0.290 ± 0.030	0.580 ± 0.090
8	10	0.046 ± 0.006	0.280 ± 0.090	0.570 ± 0.120
9	10	0.045 ± 0.004	0.290 ± 0.040	0.590 ± 0.090
10	10	0.046 ± 0.005	0.280 ± 0.050	0.580 ± 0.110
11	10	0.047 ± 0.008	0.290 ± 0.030	0.590 ± 0.100
12	10	0.046 ± 0.005	0.280 ± 0.070	0.590 ± 0.090
13	10	0.048 ± 0.005	0.290 ± 0.050	0.580 ± 0.130
14	10	0.045 ± 0.006	0.280 ± 0.090	0.570 ± 0.120

注: 0.05、0.30、0.60 mg/L 的 GPI 质控品 ± 20% 分别为 0.04~0.06、0.24~0.36、0.48~0.72 mg/L

2.6 两种方法检测 3 组临床标本结果比较 见表 4。分别采用酶显色法和 ELISA 试剂盒检测 123 份血清

血。试验采用添加干扰物的方式进行, 分别在高、中、低值血清中添加不同水平的干扰物质, 该试剂在胆红素水平 ≤ 200 mg/L、血红蛋白水平 ≤ 5 g/L、三酰甘油水平 ≤ 15 g/L 的情况下, 各水平范围的平均偏差均在 5% 以内, 根据临床标准试验要求偏差应在 ± 10% 以内, 完全在临床上使用的可接受范围内。

2.4 稳定性试验结果比较 见表 3。14 个月内检测水平为 0.05、0.30、0.60 mg/L 的 GPI 质控品, 各水平相对偏差在 ± 20% 以内, 试剂有效期 > 12 个月。

2.5 回收率测定 分析样品 1 (GPI 水平 0.30 mg/L) 和样品 2 (GPI 水平 0.60 mg/L) 重复测定 5 次, 平均回收水平分别为 0.31 mg/L 和 0.59 mg/L, 回收率分别为 103.3% 和 98.3%, 平均回收率为 100.8%。

标本, 均得到 123 份有效数据。两种方法在 RA 组 (n=39)、非 RA 组 (n=52) 和健康对照组 (n=32) 间临床标本检测数据比较差异均无统计学意义 (Z = -1.38, P > 0.05)。

表 4 GPI 酶显色法与 ELISA 试剂盒检测 3 组临床标本 GPI 结果比较 ($\bar{x} \pm s, \text{mg/L}$)

方法	RA 组 (n=39)	非 RA 组 (n=52)	健康对照组 (n=32)
酶显色法	1.110 0 ± 0.240 0	0.180 0 ± 0.030 0	0.008 7 ± 0.000 9
ELISA	1.090 0 ± 0.260 0	0.200 0 ± 0.012 0	0.008 5 ± 0.000 8

3 讨论

RA 是一种免疫功能紊乱引起的自身免疫性疾病, 患者体内存在多种自身抗原和自身抗体, 其具体病因和发病机制目前尚不完全明确, 探讨其发病机制对于 RA 的诊治和预防至关重要。GPI 是一种广泛表达并且具有多种功能的蛋白质, 它是能量循环和糖分解过程中必不可少的胞浆酶, 同时它又是细胞外信号的传导分子^[6]。GPI 分泌运动因子和神经细胞因子, 可能在肿瘤和自身免疫方面起一定作用^[7-8]。GPI 可诱导 C57BL/10 小鼠产生关节炎, 疾病的发生与 II 型主要组织相容性复合体相关^[9]。GPI 水平在 RA

活动组和非活动组差异有统计学意义($P < 0.05$),与 RA 患者的关节肿胀、疼痛呈正相关。GPI 对于 RA 疾病的早期诊断,了解病情的发展和发生、治疗及判断预后均有重要价值^[8]。关于 GPI 及其抗体在 RA 中的诊断价值,大多数研究结果表明,GPI 抗原诊断 RA 的敏感度 $> 65\%$,特异度 $\geq 90\%$,有较高的诊断价值^[9-10];而抗 GPI 抗体在 RA 诊断中的研究结果差异较大,特异度为 $64.3\% \sim 95.9\%$ ^[11-12]。因此,临床实验室可选择合适的标志物联合检测来提高特异度和敏感度,更好地对 RA 进行诊断及疗效观察。所以迫切需要一种能快速准确且敏感度和精密度高的检测 GPI 的方法来满足 RA 的临床诊断。

本研究建立了一种新的快速检测血清 GPI 的方法,检测线性范围为 $0.000\ 82 \sim 2.500\ 00\ \text{mg/L}$,在线性范围内有较好的精密度和准确度。稳定性试验结果显示,12 个月内检测水平为 $0.05, 0.30, 0.60\ \text{mg/L}$ 的 GPI 质控品,各水平相对偏差可控制在允许范围内,认为试剂有效期 > 12 个月。干扰物胆红素 ($200\ \text{mg/L}$)、血红蛋白 ($5\ \text{g/L}$)、三酰甘油 ($15\ \text{g/L}$) 不影响试剂检测。GPI 酶显色法检测结果与 ELISA 试剂盒的测定结果有良好的相关性,且两种方法测定结果差异无统计学意义($P > 0.05$)。

随着 GPI 检测项目在临床应用的快速开展,对于检测技术的快速准确和高效提出了新的要求。本研究建立的 GPI 酶显色法定量检测试剂敏感度、精密度和特异度较高,可重复性和稳定性较好,与 GPI ELISA 试剂盒的测定结果比较有较好的一致性。与现有同类产品相比,本研究的创新点在于:(1)可采用酶显色法对 GPI 进行定量检测;(2)操作简单快速,相比现有定量检测产品检测时间短;(3)无需配备大型仪器设备,使用成本相对低廉,适合于地方基层医院应用。本研究不足之处是标本量较少,仍需要收集更多的病例来验证该试验结果,还应同时开展深入大量的临床研究来确定不同地区、不同人种、不同实验室建立相应的诊断标准。

参考文献

[1] 栗占国. 类风湿关节炎在我国的低认知度和高致残率不容忽视[J]. 中华医学杂志, 2009, 89(27): 1873-1875.
[2] RANTALAIHO V, KAUTIAINEN H, KORPELA M, et al. Physicians' adherence to tight control treatment strategy and combination DMARD therapy are additively impor-

tant for reaching remission and maintaining working ability in early rheumatoid arthritis; a subanalysis of FIN-RACo trial[J]. Ann Rheum Dis, 2014, 73(4): 788-790.

- [3] 王友莲, 尚可, 刘燕鸣, 等. GPI 抗原及抗 CCP 抗体对类风湿关节炎诊断研究[J]. 江西医药, 2010, 45(10): 1007-1009.
[4] SCHALLER M, BURTON D R, DITZEL H J. Autoantibodies to GPI in rheumatoid arthritis: linkage between an animal model and human disease[J]. Nat Immunol, 2001, 2(8): 746-753.
[5] MATSUMOTO I, MACCIONI M, LEE D M, et al. How antibodies to a ubiquitous cytoplasmic enzyme May provoke joint-specific autoimmune disease[J]. Nat Immunol, 2002, 3(4): 360-365.
[6] SCHALLER M, STOHL W, BENOIT V, et al. Patients with inflammatory arthritic diseases harbor elevated serum and synovial fluid levels of free and immune-complexed glucose-6-phosphate isomerase (G6PI) [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 349(2): 838-845.
[7] PIZZOLLA A, WING K, HOLMDAHL R. A glucose-6-phosphate isomerase peptide induces T and B cell-dependent chronic arthritis in C57BL/10 mice: arthritis without reactive Oxygen species and complement[J]. Am J Pathol, 2013, 183(4): 1144-1155.
[8] SCHALLER M, BENOIT V M, DITZEL H J. Response to 'autoantibodies to GPI and creatine kinase in RA' and few human autoimmune sera detect GPI' [J]. Nat Immunol, 2002, 3(5): 412-413.
[9] FAN L Y, ZONG M, WANG Q, et al. Diagnostic value of glucose-6-phosphate isomerase in rheumatoid arthritis [J]. Clin Chim Acta, 2010, 411(23/24): 2049-2053.
[10] 吴庆军, 潘童, 邓垂文, 等. 血清葡萄糖-6-磷酸异构酶抗原、类风湿因子和第 2 代抗环瓜氨酸肽抗体对类风湿关节炎诊断价值的比较[J]. 中华临床免疫和变态反应杂志, 2013, 7(2): 115-119.
[11] ZHU T, FENG L. Comparison of anti-mutated citrullinated vimentin, anti-cyclic citrullinated Peptides, anti-glucose-6-phosphate isomerase and anti-keratin antibodies and rheumatoid factor in the diagnosis of rheumatoid arthritis in Chinese patients[J]. Int J Rheum Dis, 2013, 16(2): 157-161.
[12] 武东, 孙琳, 李常虹, 等. 抗瓜氨酸化葡萄糖-6-磷酸异构酶多肽抗体的检测及其在类风湿关节炎中的意义[J]. 北京大学学报(医学版), 2016, 48(6): 937-941.

(收稿日期: 2018-06-08 修回日期: 2018-09-14)