

自制超薄型琼脂糖凝胶板电泳分离检测血清 LDH 同工酶及成年人参考范围的建立*

申春艳, 陆桂琴, 于嘉屏 (上海迪安医学检验所中心实验室, 上海 200433)

摘要:目的 自制超薄型琼脂糖凝胶板, 建立电泳分离检测血清乳酸脱氢酶(LDH)同工酶的方法并建立成人血清的参考区间。方法 用自制琼脂糖凝胶板分离检测 LDH 同工酶, 对方法学性能包括精密度、正确度、线性范围、参考区间进行确认和建立。结果 5种 LDH 同工酶图谱分离清晰, 批内 CV 值均小于 8.77%, 批间 CV 值均小于 13.12%, 胶板间 CV 值均小于 7.89%。LDH1 在 13.48~287.65U/L, LDH2 在 18.19~575.67U/L, LDH3 在 19.42~504.62U/L, LDH4 在 8.00~342.27U/L 和 LDH5 在 13.88~199.79U/L 的范围内呈线性, 斜率趋近于 1。与 Sebia 配套电泳试剂盒的结果比较, 5种同工酶在两方法间的差异无统计学意义($t=0.0281\sim0.5674$, 均 $P>0.05$), 相关系数 $r=0.9494\sim0.9855$ 。建立的成人参考区间为 LDH1:15.7%~34.3%, LDH2:26.8%~38.9%, LDH3:18.8%~28.1%, LDH4:5.7%~13.7% 和 LDH5:2.7%~15.3%。结论 自制超薄型琼脂糖凝胶板电泳分离检测血清 LDH 同工酶的方法性能良好, 可用于临床检测。

关键词:琼脂糖凝胶电泳; 乳酸脱氢酶同工酶; 分离检测

中图分类号: R446.112 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2019)04-083-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2019.04.020

To Separate and Measure the Lactate Dehydrogenase Isoenzymes in Serum by Self-Made Ultra-Thin Agarose Gel Plate Electrophoresis and Establishment of the Reference Intervals in Adult Serum

SHEN Chun-yan, LU Gui-qin, YU Jia-ping (Department of Central Laboratory, Shanghai Dian Medical Diagnostic Laboratory, Shanghai 200433, China)

Abstract: Objective To separate and measure the lactate dehydrogenase(LDH) isoenzymes in serum with self-made ultra-thin agarose gel plate electrophoresis and establish the reference intervals in adult serum. **Methods** The LDH isoenzymes in serum were measured with the agarose gel electrophoresis. The precision, trueness and analytical measurement range were validated and the reference intervals in adult serum were established. **Results** The electrophoresis pattern of 5 LDH isoenzymes were clear. The within CV values were less than 8.77%, the between CV values were less than 13.12%, the between plate CV values were 7.89%. The range of LDH1 (13.48 U/L~287.65 U/L), LDH2 (18.19 U/L~575.67 U/L), LDH3 (19.42 U/L~504.62 U/L), LDH4 (8.00 U/L~342.27 U/L) and LDH5 (13.88 U/L~199.79 U/L) were linear. The slopes were near 1. Compared with Sebia LDH isoenzymes electrophoresis kit, the difference of 5 isoenzymes between two methods were not statistically significant ($t=0.0281\sim0.5674$, all $P>0.05$) and the significant correlation was demonstrated ($r=0.9494\sim0.9855$). The serum reference ranges of 133 healthy adults were: LDH1 (15.7%~34.3%), LDH2 (26.8%~38.9%), LDH3 (18.8%~28.1%), LDH4 (5.7%~13.7%) and LDH5 (2.7%~15.3%) respectively. **Conclusion** The performance of the method to measure LDH isoenzymes with self-made ultra-thin agarose gel plate were favorable. The method is suitable for clinical application.

Keywords: agarose gel electrophoresis; lactate dehydrogenase isoenzymes; measure

血清中的乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)是以同工酶形式存在的, 包括 LDH1~5 的 5 种同工酶^[1]。由于其具有器官特异性的特点, 已为临床诊治提供了很多有价值的信息^[2-4]。鉴于目前检测 LDH 同工酶基本采用电泳的方法, 商品化的试剂盒还很少, 本研究在制备了超薄型琼脂糖凝胶板的基础上^[5], 建立琼脂糖凝胶电泳的方法来分离和检测血清中的 LDH 同工酶, 也为排除血清中影响 LDH 总活性及同工酶结果的干扰因素提供

了鉴定方法。

1 材料与方

1.1 研究对象 方法学建立采用检验实验室所检测用的新鲜患者血清。参考区间的建立采用 133 例体检正常的成年人新鲜血清。

1.2 试剂和仪器

1.2.1 试剂

1.2.1.1 电泳缓冲液: 称取巴比妥钠 15.4 g, 巴比妥 2.76 g, 乙二胺四乙酸 0.29 g, 加超纯水约 800

* 作者简介: 申春艳(1992-), 女, 技师, 主要研究方向为临床生化检验, E-mail: shency@dazd.cn.
通讯作者: 于嘉屏(1960-), 男, 研究员, 主要研究方向为临床生化检验, E-mail: yujp@dazd.cn.

ml,加热溶解后用1 mol/L 盐酸校正 pH 至 8.6,最后定容至 1 000 ml。

1.2.1.2 琼脂糖凝胶板:用本室前期建立的方法制作超薄型琼脂糖凝胶板^[5]。每个密封盒放 3 块独立包装的凝胶板,用胶带封口,在盒盖上标明相关信息,放 4℃ 冰箱保存。

1.2.1.3 呈色试剂:最终浓度为 632.75 mmol/L 乳酸锂,0.565 mmol/L NAD,0.4 mmol/L 吩嗪二甲酯硫酸盐(PMS),2.67 mmol/L 氯化硝基四氮唑蓝(NBT)。分别称取一定量的乳酸锂,NAD,NBT,PMS,混合研磨,分装 4℃ 避光保存。临用时取出一份加 0.2 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH9.5)2.5 ml,去离子水 7.5 ml 使之溶解。

1.2.1.4 庆大霉素溶液:无菌水配制 12.8 μl/ml (512U/ml)庆大霉素溶液。

1.2.2 仪器:法国 Sebia 公司的 Hydrasys2 全自动电泳仪及 LDH 同工酶电泳试剂盒;北京市六一仪器厂的 DYY-6D 型电泳仪电源和 DYCP-38C 型电泳仪;上海培清科技有限公司的 JS-680D 全自动凝胶成像分析仪。

1.3 方法

1.3.1 酶反应原理:LDH 是糖酵解的一个重要酶,能可逆地催化下述反应:乳酸 + NAD⁺ ↔ 丙酮酸 + NADH + H⁺。根据 LDH 五种同工酶的电泳迁移性的不同可加以识别。迁移最快(最靠近阳极)的为 LDH1,其次依次为 LDH2,LDH3,LDH4 和 LDH5。利用酶的催化反应进行显色:以乳酸锂作为底物,LDH 催化乳酸脱氢生成丙酮酸,同时使烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NAD⁺)还原为 NADH,吩嗪二甲酯硫酸盐(PMS)将 NADH 的氢传递给硝基四氮唑蓝(NBT),使其还原为紫蓝色的甲瓩化合物。其颜色的深浅与 LDH 酶活性成正比,利用光密度仪或扫描仪即可得出各同工酶的相对百分含量。

1.3.2 琼脂糖凝胶电泳及酶带染色:①取琼脂糖凝胶板 1 块,在胶板阴极侧约 1.5 cm 处覆盖一张滤纸条,吸去部分水分,然后将加样孔模条置于其上,轻按模条加样孔四周,使其紧贴在胶板上,避免气泡。然后将 2 μl 样品加入孔内。注意必须使样品全部均匀地充满孔内。加样后静置 5~10 min,待样品扩散进入胶内,然后除去膜条。将胶板放入电泳槽上,两端用 8 层纱布搭桥,电泳槽旁放一冰袋降温,在恒压 50V 条件下电泳 20 min。②电泳完毕将呈色底物均匀布加于胶板上,上面覆盖一张比胶板略大一点的 PE 薄膜,注意避免气泡,置 37℃ 恒温水浴槽内温育 30 min,并注意避光。温育完毕即可见紫蓝色酶带,用 5 ml/dl 乙酸漂洗至背景

干净。③启动凝胶图像分析仪拍摄软件拍照,通过凝胶图像分析软件分析检测结果。

1.3.3 方法学确认

1.3.3.1 精密度:批内精密度实验:将 6 份不同血清样本进行电泳分析,在同一张 10 人份的凝胶板上加样,每份样本加样 5 个泳道,电泳图谱采用光密度扫描计算。批间精密度实验:将 10 份不同血清样本进行电泳分析,分 6 批在 10 人份的凝胶板上加样,每份样本加样 1 个泳道,电泳图谱采用光密度扫描计算。不同胶片间的精密度实验:分别用 6 张胶板对 4 份血清样本进行电泳分析,每份样本加样 5 个泳道,电泳图谱采用光密度扫描计算。

1.3.3.2 正确度及相关:采用自建 LDH 同工酶琼脂糖凝胶电泳方法和 Sebia 电泳仪配套的 LDH 同工酶电泳试剂盒测定方法分别对 31 份血清样本进行比较分析。以自建方法为 Y,Sebia 方法为 X,计算相关系数(*r*)和回归方程($Y=bX-a$)。

1.3.3.3 线性范围:选择高、低 LDH 活性的血清样品各一份。高值活性为 1 910U/L,低值活性为 73 U/L。将高值(H)和低值(L)样品按 5L,4L+1H,3L+2H,2L+3H,1L+4H,5H 的体积比混合成 6 个系列浓度的实验样品。用所建立的电泳方法检测高、混合、低浓度样品,各做 5 次重复检测,取均值。以预期浓度为 X,测定均值为 Y,计算回归方程: $Y=bX+a$ 。以相关系数 $r \geq 0.975$,*b* 趋近于 1 为判断标准。

1.3.3.4 参考区间:取 133 例体检健康成年人新鲜血清样本进行检测,并统计检测结果,建立本方法的 LDH 同工酶参考区间。

1.4 统计学分析 对数据先行正态分布检验,对呈正态分布的数据以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组数据比较采用两样本 *t* 检验,比对结果作相关分析,计算线性回归参数。

2 结果

2.1 琼脂糖凝胶电泳图谱 采用本实验的琼脂糖凝胶电泳方法能成功地分离出 LDH 同工酶的 5 条酶带,各条带分离清晰,带型整齐。根据电泳迁移率的快慢,从阴极(下端)到阳极(上端)的 5 条带依次为 LDH5,LDH4,LDH3,LDH2 和 LDH1。见图 1。

2.2 精密度

2.2.1 批内精密度:6 份血清样本 LDH1 的批内 CV 值为 1.07%~8.77%,LDH2 的批内 CV 值为 1.13%~3.93%,LDH3 的批内 CV 值为 1.01%~4.39%,LDH4 的批内 CV 值为 0.46%~6.23%,LDH5 的批内 CV 值为 2.30%~6.84%。批内 CV 值均小于 8.77%。

2.2.2 批间精密度的10份血清样本 LDH1 的批间 CV 值为 1.93%~9.04%, LDH2 的批间 CV 值为 2.07%~5.85%, LDH3 的批间 CV 值为 2.03%~4.51%, LDH4 的批间 CV 值为 3.15%~12.08%, LDH5 的批间 CV 值为 4.41%~13.12%。批间 CV 值均小于 13.12%。

2.2.3 不同胶板间精密度的4份血清样本在不同凝胶板之间板间 CV 值, LDH1 为 1.04%~2.67%, LDH2 为 1.20%~3.05%, LDH3 为

1.33%~4.52%, LDH4 为 1.74%~7.32%, LDH5 为 2.97%~7.89%。胶板间 CV 值均小于 7.89%。

2.3 正确度及相关分析 31例新鲜血清样本的结果见表1,自建方法与 Sebia 方法的5种 LDH 同工酶结果间的差异均无统计学意义 ($t=0.0281\sim 0.5674$, 均 $P>0.05$),且两方法间5种同工酶均显著相关,斜率趋近于1。

表1 两种方法 LDH 同工酶结果(%)的比较及相关分析

项目	自建方法(Y)	Sebia方法(X)	直线回归方程	相关系数(r)
LDH1	24.47±4.43	23.84±4.29	Y=0.982X+1.058	0.9504
LDH2	33.18±3.92	33.64±4.43	Y=0.840X+4.912	0.9507
LDH3	21.64±2.88	21.22±2.85	Y=0.981X+0.838	0.9716
LDH4	9.15±1.32	9.14±1.43	Y=0.877X+1.135	0.9494
LDH5	11.54±7.28	12.18±7.32	Y=0.979X-0.356	0.9855

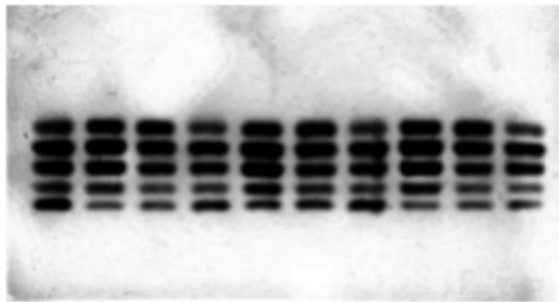


图1 血清 LDH 同工酶琼脂糖凝胶电泳图谱

2.4 线性范围 LDH1~LDH5 的线性范围及回归方程参数、相关系数见表2。5种同工酶的线性相关系数(r)均 ≥ 0.975 , b 趋近于1。表明5个同工酶谱在本方法范围内显示出良好的线性。

表2 LDH 同工酶线性范围及回归方程参数和相关系数

项目	高活性(U/L)	低活性(U/L)	斜率(b)	截距(a)	相关系数(r)
LDH1	287.65	13.48	1.050	-20.60	0.9993
LDH2	575.67	18.19	1.005	16.16	0.9993
LDH3	504.62	19.42	0.931	26.47	0.9986
LDH4	342.27	8.00	1.032	-11.45	0.9993
LDH5	199.79	13.88	1.033	-11.05	0.9905

2.5 参考区间 以 $\bar{x} \pm 2s$ 为参考区间,本方法 LDH 同工酶的参考区间见表3。

表3 LDH 同工酶参考区间(%)

项目	\bar{x}	s	参考区间
LDH1	25.00	4.67	15.7~34.3
LDH2	32.84	3.03	26.8~38.9
LDH3	23.41	2.32	18.8~28.1
LDH4	9.72	1.99	5.7~13.7
LDH5	9.01	3.16	2.7~15.3

3 讨论 LDH 同工酶检测在临床上有着重要的临床意义,肝脏疾病时以 LDH5 升高为主^[6-7],心

肌损伤时以 LDH1 升高为主^[8-9],二者同时受损则 LDH1 和 LDH5 同时升高^[10],对心肌梗死伴有缺氧状况及患者的危险程度具有良好的鉴别价值。

经典的琼脂糖凝胶板厚度常达到 3 mm,染料不易渗透进去,同工酶带常会出现空泡,对扫描定量产生干扰。本研究采用自制的超薄型琼脂糖凝胶板,厚度只有 0.8 mm,用此凝胶板来分离检测 LDH 同工酶,酶染色时间缩短至 30 min,同工酶图谱呈色清晰,分离效果良好。以往的加样方式是通过齿状加样槽在琼脂糖板上留出凹槽,将样品加入其中,这往往会使胶板破裂。本实验采用有孔的加样膜条直接铺在琼脂糖凝胶板上加样,操作方便,且在琼脂糖胶板上不留痕迹,易于干燥保存。本研究配制的凝胶板中含有抗生素,因此不容易长菌,密封放置 4~8℃可长达 3 个月以上。

本法建立的成人血清 LDH 同工酶参考区间符合 LDH2>LDH1>LDH3>LDH4>LDH5 的规律,与 Sebia 的 LDH 同工酶电泳试剂盒中的说明书所推荐的参考范围(LDH1 为 16.1%~31.5%, LDH2 为 29.2%~41.6%, LDH3 为 17.0%~26.2%, LDH4 为 5.9%~12.3%, LDH5 为 3.2%~17.3%)相比较,有一定差异。这与琼脂糖的纯度、胶板厚度、染色深浅以及人种的差异等因素都有关系。

血清中的 LDH 总活性及同工酶结果会受到其它酶分子的干扰,严重影响结果的准确性。①巨分子 LDH 酶^[11-12]:大多是 LDH 的其中一种同工酶与其自身抗体免疫球蛋白结合形成的巨分子酶,在电泳条带上可形成一条宽带,光密度扫描不易分开。巨 LDH 酶的形成有三种形式:一是某一同工酶与免疫球蛋白(IgA 占 60%, IgG 或 IgM)的复合

物;二是与脂蛋白结合;三是同工酶亚基自身异常聚合。聚合物酶带导致电泳图谱发生异常改变,如LDH2至LDH3融合形成一条宽带,或LDH2后有一弥散区,LDH3几乎消失,一般为LDH与抗体结合的免疫复合物。巨分子LDH的出现是否与自身免疫性疾病有关目前尚无定论^[13]。②醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase, AD)^[14]:肝脏中的AD浓度相当高,当肝细胞大量损伤时,AD即从肝脏内释放入血,使血清内AD显著升高,而AD能利用琼脂糖上的羟基等基团参与与LDH同样的反应,导致在LDH染色时在LDH5的阴极侧显示“LDH6”条带。而此“LDH6”条带的出现直接反映了肝脏的损害程度,这类患者死亡率很高^[15]。因此,正确鉴定血清中的LDH干扰物质对疾病的正确诊断具有重要意义,这些干扰物质往往会影响LDH酶活性结果的准确性,以及LDH同工酶谱的紊乱,严重时会造成误诊,直接对患者的健康造成难以预料的后果。而本研究建立的琼脂糖凝胶板电泳法就能鉴别这些干扰物质,以确保检验结果的准确无误。

因此,LDH同工酶琼脂糖凝胶板电泳分离方法的建立,不仅向临床提供了LDH同工酶的检测结果,也有助于检验科对LDH异常升高的患者作进一步的鉴别诊断,防止发出错误的检验报告,其应用前景十分广阔。

参考文献:

- [1] GALLO M, SAPIO L, SPINA A, et al. Lactic dehydrogenase and cancer: an overview[J]. *Front Biosci*, 2015, 20(8):1234-1249.
- [2] 王妍,姚伟,黄钦贤,等.胃癌患者的血清乳酸脱氢酶水平及其基因在癌组织的表达与患者预后的相关性研究[J]. *现代检验医学杂志*, 2014, 29(5):54-57.
WANG Yan, YAO Wei, HUANG Qinxian, et al. Association between the level of LDH in gastric cancer patient's serum the relative expression of LDH in tissues and the patient's prognosis[J]. *J Mod Lab Med*, 2014, 29(5):54-57.
- [3] PURI B K, KINGSTON M C, MONRO J A. Fructose-associated hepatotoxicity indexed by the lactate dehydrogenase isoenzyme LDH-5[J]. *Med Hypotheses*, 2019, 124:40-41.
- [4] LIU Xiaojun, YANG Zhongxia, CHEN Zhaofeng, et al. Effects of the suppression of lactate dehydrogenase A on the growth and invasion of human gastric cancer cells[J]. *Oncol Rep*, 2015, 33(1):157-162.
- [5] 王月婷,陆桂琴,苏照环,等.超薄型琼脂糖凝胶板的制作及血清蛋白电泳方法的建立[J]. *国际检验医学杂志*, 2013, 34(16):2155-2156.
WANG Yueting, LU Guiqin, SU Zhaohuan, et al. Preparation of ultra-thin agarose gel plate and establishment a method of serum protein electrophoresis[J]. *Int J Lab Med*, 2013, 34(16):2155-2156.
- [6] CHEN Ruohua, ZHOU Xiang, YU Zhenhai, et al. Low expression of LDHB correlates with unfavorable survival in hepatocellular carcinoma[J]. *Medicine*, 2015, 94(39):e1583.
- [7] MANERBA M, DI IANNI L, GOVONI M, et al. LDH inhibition impacts on heat shock response and induces senescence of hepatocellular carcinoma cells[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2017, 105:91-98.
- [8] DANESE E, MONTAGNANA M. An historical approach to the diagnostic biomarkers of acute coronary syndrome[J]. *Ann Transl Med*, 2016, 4(10):194.
- [9] 吕晓莉,苍金荣,王华,等.血清心肌酶检测在新生儿窒息诊断中的临床意义[J]. *现代检验医学杂志*, 2014, 29(2):73-75.
LÜ Xiaoli, CANG Jinrong, WANG Hua, et al. Clinical significance of serum myocardial enzyme in newborns with asphyxia[J]. *J Mod Lab Med*, 2014, 29(2):73-75.
- [10] MOLLO A, RAFFONE A, TRAVAGLINO A, et al. Increased LDH5/LDH1 ratio in preoperative diagnosis of uterine sarcoma with inconclusive MRI and LDH total activity but suggestive CT scan: a case report[J]. *BMC Womens Health*, 2018, 18(1):169-183.
- [11] MORIYAMA T, TAMURA S, NAKANO K, et al. Laboratory and clinical features of abnormal macroenzymes found in human sera[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1854(6):658-667.
- [12] PASCARELLA F, CAROPRESO M, MIELE E, et al. Macro-creatine kinase and macro-lactate dehydrogenase in a girl with ulcerative colitis[J]. *Dig Liver Dis*, 2007, 39(8):780-781.
- [13] IZUMI Y, MORITA S, UEDA Y, et al. Transient appearance of lactate dehydrogenase (LDH)-linked immunoglobulin and thyroid dysfunction at the postpartum period[J]. *Intern Med*, 2004, 43(7):575-577.
- [14] JELSKI W, STRUMNIK A, ORYWAL K, et al. Serum alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase activity in the course of hepatitis C[J]. *Clin Lab*, 2016, 62(11):2155-2159.
- [15] 宓庆梅,于嘉屏,王爱华.血液中一种新的“濒亡标志物”(醇脱氢酶同工酶)的鉴定[J]. *临床检验杂志*, 2003, 21(4):203-205.
MI Qingmei, YU Jiaping, WANG Aihua. A new “death marker” presented in serum: alcohol dehydrogenase isoenzyme[J]. *Chin J Clin Lab Sci*, 2003, 21(4):203-205.