

· 临床研究 ·

儿童血浆促酰化蛋白的测定及意义

温宇, 王宏伟, 卢慧玲, 施虹, 胡秀芬

(华中科技大学同济医学院附属同济医院儿科, 湖北 武汉 430030)

〔摘要〕 目的 介绍一种简易、快速、特异性高的人血浆促酰化蛋白(acylation stimulating protein, ASP)的检测技术,并阐明 ASP 测定意义。**方法** 161 例研究对象,其中健康儿童 98 例,单纯性肥胖患儿 63 例,年龄 2~6 岁,ELISA 方法测定血浆 ASP 的浓度,波长 490 nm。**结果** 该方法最佳线性范围:ASP 浓度 0.5~10 ng/mL,平均批内和批间变异系数(CV)分别为 8.17% 和 9.72%。正常学龄前儿童血浆 ASP 浓度为 69.14 ± 25.58 nM;单纯性肥胖症儿童血浆 ASP 浓度为 95.64 ± 36.24 nM,明显高于健康儿童($P < 0.001$);ASP 与 BMI 呈正相关。**结论** 该检测方法能简易、快速对血浆 ASP 进行准确定量,在 ASP 基础和临床相关疾病的研究中有重要的意义。

[中国当代儿科杂志, 2005, 7(5):408-410]

〔关键词〕 血浆;促酰化蛋白;单纯性肥胖;儿童

〔中图分类号〕 R446.11⁺2 **〔文献标识码〕** A **〔文章编号〕** 1008-8830(2005)05-0408-03

Determination of plasma acylation stimulating protein in children

Yu WEN, Hong-Wei WANG, Hui-Ling LU, Hong SHI, Xiu-Fen HU. Department of Pediatrics, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China (Wang H-W, Email: hwwang54@sina.com.cn)

Abstract: **Objective** To introduce a simple, rapid and stable method for the determination of plasma acylation stimulating protein (ASP) and to explore the value of plasma ASP determination. **Methods** Sixty-three simple obese children and 98 healthy controls were included in this study. The ELISA technique was employed to determine the plasma ASP concentration. **Results** The best linearity of test was between 0.5-10 ng/mL. The intra-assay coefficient of variation (CV) was 8.17% and inter-assay CV, 9.72%. The average plasma ASP concentration in healthy children was 69.14 ± 25.58 nM and 95.64 ± 36.24 nM in obese children ($P < 0.001$). Plasma ASP was positively correlated with body mass index in both healthy and obese children ($r = 0.2883$ and 0.337 , respectively, both $P < 0.01$). **Conclusions** Plasma ASP can be quantified by the ELISA method. Plasma ASP determination may be recommended as a new method for lipid metabolism determination in children.

[Chin J Contemp Pediatr, 2005, 7(5):408-410]

Key words: Plasma; Acylation stimulating protein; Simple obesity; Child

促酰化蛋白(acylation stimulating protein, ASP)是由脂肪细胞分泌的一种生物活性物质,是调节机体能量代谢平衡的新型脂源性激素。ASP 通过协调脂肪酸的酯化和葡萄糖的转运来调控脂肪细胞内甘油三酯(triglyceride, TG)的合成和抑制脂解,并促进脂肪细胞和骨骼肌细胞的葡萄糖转运。ASP 代谢途径功能失调,将引起一系列脂质代谢紊乱,与肥胖症、2 型糖尿病、冠心病等代谢综合征发病密切相关^[1,2]。因此,检测血浆 ASP 的水平,对上述疾病的监测有重要意义。但国内尚无有关血浆 ASP 检测方法的报道。为此,我们参考了有关文献^[3-5],建立

了血浆 ASP 的检测方法。

1 对象与方法

1.1 研究对象

共研究 161 例,年龄 2~6 岁,为我院及武汉市妇幼保健院门诊就诊的单纯性肥胖患儿 63 例,平均 4.25 ± 1.48 岁,男 32 例、女 31 例;正常健康儿童 98 例,平均 3.79 ± 1.18 岁,男 51 例,女 47 例。空腹肝素或 EDTA 抗凝静脉血 2 mL, 2 000 r/min,离心 10 min,留取血清,低温冰箱 -70℃ 保存备测。

[收稿日期] 2004-12-30; [修回日期] 2005-06-24

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目:30470645; 对外交流与合作项目:30311120163; 湖北省重点科技项目:2003CA022

[作者简介] 温宇(1979-),女,博士研究生。主攻方向:心血管疾病与脂肪代谢。

[通讯作者] 王宏伟,华中科技大学同济医学院附属同济医院儿科 邮编:430030

1.2 主要试剂与配制

1.2.1 主要试剂 ①ASP ELISA 试剂盒:4H3 单抗包被的96孔板、ASP标准品、兔抗人ASP多克隆抗体(Quide公司USA或HBT公司Netherlands);②对照血浆(HBT公司Netherlands);③辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG(Sigma #A4914);④聚乙二醇:Polyethylene glycol, PEG(Fisher Scientific catalogue #P156B-3);⑤对苯二胺:OPD 10mg/片(Sigma #P-8287)。

1.2.2 试剂配制 ①硼酸溶液(pH值8.3):硼酸钠38.14g, EDTA 2.92g, 蒸馏水1L。②20%PEG液:PEG8000 2g, 上述硼酸钠液10mL(够50例标本)。③洗液:0.9% NaCl 和0.05% Tween-20。④PBS(pH值7.2): KH_2PO_4 0.8g, Na_2HPO_4 4.56g, NaCl 32g, KCl 0.8g, 蒸馏水4L。⑤PBS-Tween20: PBS 1L, Tween-20 0.5mL。⑥100mm 枸橼酸钠-Tween(pH值5.0):A溶液(枸橼酸钠14.7g, 蒸馏水500mL);B溶液(无水枸橼酸9.6g, 蒸馏水500mL);把B溶液加入A溶液至pH值达5.0;Tween-20 0.5mL。⑦4N H_2SO_4 溶液36N H_2SO_4 和蒸馏水1:9稀释。⑧标准品、一抗、二抗均予甘油1:1稀释, -20℃保存备用。

1.3 ASP检测步骤

1.3.1 包被ELISA测定板 ①在96孔塑料平板中每孔加入100 μL 抗ASP单抗(10 ng/mL), 用Pacrafilm盖平板, 4℃过夜;②洗涤:洗液冲洗5次;③终止反应:每孔加250 μL 1.5% BSA(bovine serum albumin, BSA), 37℃孵育120 min; -20℃保存备用, 实验前用洗液冲洗测定板3次(可直接购买)。

1.3.2 准备样本即沉淀C3 取200 μL 血清+200 μL 20% PEG混匀, 冰上放置90 min, 2300 r/min离心20 min, 提取上清, -70℃保存备用。

1.3.3 稀释标准品 建议浓度10 ng/mL, 6 ng/mL, 4 ng/mL, 2 ng/mL, 1 ng/mL及0.5 ng/mL(可根据具体情况调整)。

1.3.4 稀释对照血清 (20% PEG沉淀后1:20稀释) 1×96孔:血清15.7 μL +PBS 284 μL ; 2×96孔:血清26.3 μL +PBS 473 μL 。

1.3.5 稀释样本 1:40或1:60或1:80。血浆建议用1:60。

1.3.6 加样 100 μL /孔, 设副孔, 37℃孵育90 min, 洗液洗5次。

1.3.7 加一抗(1:1000稀释) 多克隆兔抗人ASP抗体10 μL +PBS-Tween 10 mL混匀, 100 μL /

孔, 37℃孵育90 min, 洗液洗5次。

1.3.8 加二抗-酶连接剂(1:2000稀释) 在覆盖铝铂的50 mL圆锥形小瓶中加入:PEG 0.4 g+PBS-Tween 10 mL+二抗(羊抗兔IgG)5 μL 混匀, 100 μL /孔, 37℃孵育30 min, 洗液洗5次。

1.3.9 准备OPD底物 在覆盖铝铂锥形瓶中加入:pH值为5枸橼酸钠-Tween 20 mL+OPD 1片+30% H_2O_2 12 μL , 混匀100 μL /孔, 室温10~15 min, 密切观察颜色变化, 出现明显黄色时终止反应。

1.3.10 4N H_2SO_4 终止反应 50 μL /孔, ELISA检测仪测定OD值, 波长490 nm。

1.3.11 绘制标准曲线 以不同浓度的ASP标准品LOG值即LOG(浓度)为横坐标, 相应的LOG(OD)为纵坐标, 绘制标准曲线, 据OD值从标准曲线中得到相应的ASP浓度。

1.4 统计学分析

用SPSS 11.0软件进行统计分析, 实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间采用 t 检验, 参数间进行相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义的界值。

2 结果

2.1 线性范围

取一定量的标准品按本法进行测定, 表明ASP的浓度在0.5~10 ng/mL内线性良好。 $y = 0.3525x - 0.485$, $R^2 = 0.9627$ (y 为ASP的Log OD值, x 为ASP的Log浓度值)。

2.2 批内和批间精密性

取3份不同浓度样本, 各设10个副孔, 平均浓度分别为 62.31 ± 4.98 nM(CV:7.99%)、 81.77 ± 5.92 nM(CV:7.24%)、 72.14 ± 6.71 nM(CV:9.30%), 平均批内CV为8.17%。上述3份标本, 隔日测定1次, 共3次, 测定结果分别为 65 ± 6.05 nM(CV:9.31%)、 79.58 ± 8.08 (CV:10.15%)、 71.54 ± 6.93 nM(CV:9.69%), 批间CV平均为9.72%。

2.3 干扰试验

在本法测定条件下, $C3 < 50$ ng/mL不干扰, 大于或等于50 ng/mL, ASP检测结果显著升高($P < 0.05$), 因此实验前样本均需行C3沉淀。

2.4 临床标本检测结果

98位健康儿童血浆ASP的浓度为 69.14 ± 25.58 nM, 男女无显著性差异($P = 0.873$)。单纯性肥胖症儿童血浆ASP浓度为 95.64 ± 36.24 nM, 明显高于健康儿童($P < 0.001$)。血浆ASP与BMI

呈正相关(正常组与单纯性肥胖组相关系数 r 分别为0.2883和0.337,均 $P < 0.01$ 。

2.5 误差控制

每个96孔板共享一条标准曲线,同一标本双孔或多孔OD值的标准差(STDEV) $> 20\%$ 应重测,以避免加样误差或样本OD值超过最大浓度标准品OD值(即浓度过高)应根据具体情况进一步稀释,如1:60→1:80再复测;实验中避免反复冻融血标本。

3 讨论

ASP是从血浆分离出的一种小分子蛋白质,分子量8 932道尔顿,与C3a desArg为同一物质^[1]。目前认为ASP是一种新型的脂源性激素,是脂肪储备的重要调节因子,主要作用是调节脂肪细胞甘油三酯的合成速度和抑制其脂解,与肥胖症的发生密切相关。ASP通过与细胞表面受体相互作用,激活胞内第二信使系统来协调葡萄糖的转运和脂肪酸的酯化。ASP代谢途径功能失调,将引起一系列脂质代谢紊乱,可能导致肥胖症、糖尿病和心血管疾病的发生^[1]。已有研究表明,肥胖症、冠心病、糖尿病患者血浆ASP浓度显著升高^[6]。我们的研究表明,儿童血浆ASP浓度与BMI呈正相关,高BMI的个体,血浆ASP水平升高,促进餐后游离脂肪酸的酯化和葡萄糖的转运,从而增加脂肪细胞内TG的合成,促进餐后血循环中TG的清除,最终导致个体总体脂增加。众所周知,肥胖是最常见的营养障碍性疾病,许多成年人肥胖症始于儿童,并与糖尿病、高血压、冠心病等密切相关^[7],但目前尚缺乏监测儿童肥胖

症的发展趋势和可能并发心血管疾病危险性的有效检测手段。因此,检测血浆ASP水平,对了解上述疾病的病理生理变化规律及发病机制有重要意义,血浆ASP的水平可作为判断儿童肥胖症的发展趋势和评价其未来发生心血管疾病、糖尿病危险性的新指标。血浆ASP的检测可作为脂代谢检测的一种新方法。但在实验过程中应注意排除干扰因素,控制误差。

[参 考 文 献]

- [1] Faraj M, Lu HL, Cianflone K. Diabetes, lipids, and adipocyte secretagogues[J]. *Biochem Cell Biol*, 2004, 82(1):170-190.
- [2] 张斌,陈忠,姚顺芳,胡秀芬,王宏伟. 促酰化蛋白水平与儿童肥胖的关系[J]. *中国当代儿科杂志*, 2004, 6(4):291-293.
- [3] van de Graaf EA, Jansen HM, Bakker MM, Alberts C, Eeftink Schattenkerk JK, Out TA. ELISA of complement C3a in bronchoalveolar lavage fluid[J]. *J Immunol Methods*, 1992, 147(2):241-250.
- [4] Saleh J, Summers LK, Cianflone K, Fielding BA, Sniderman AD, Frayn KN. Coordinated release of acylation stimulating protein (ASP) and triacylglycerol clearance by human adipose tissue in vivo in the postprandial period[J]. *J Lipid Res*, 1998, 39(4):884-891.
- [5] Scantlebury T, Maslowska M, Cianflone K. Chylomicron-specific enhancement of acylation stimulating protein and precursor protein C3 production in differentiated human adipocytes[J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(33):20903-20909.
- [6] Cianflone K, Xia Z, Chen LY. Critical review of acylation-stimulating protein physiology in human and rodents[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2003, 1609(2):127-143.
- [7] 潘发明,祁红,陶芳标,曾广玉,周伟,刘旭祥. 儿童血压轨迹现象的研究[J]. *中国当代儿科杂志*, 2003, 5(2):127-129.
- [8] (本文编辑:吉耕中)
- [9] Wong TS, Man MW, Lam AK, Wei WI, Kwong YL, Yuen AP. The study of p16 and p15 gene methylation in head and neck squamous cell carcinoma and their quantitative evaluation in plasma by real-time PCR[J]. *Eur J Cancer*, 2003, 39(13):1881-1887.
- [10] Widschwendter M, Jones PA. The potential prognostic, predictive, and therapeutic values of DNA methylation in cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2002, 8(1):17-21.
- [11] Fruhwald MC, Plass C. Global and gene-specific methylation patterns in cancer: aspects of tumor biology and clinical potential[J]. *Mol Genet Metab*, 2002, 75(1):1-16.
- [12] Pineau P, Marchio A, Nagamori S, Seki S, Tiollais P, Dejean A. Homozygous deletion scanning in hepatobiliary tumor cell lines reveals alternative pathways for liver carcinogenesis[J]. *Hepatology*, 2003, 37(4):852-861.
- [13] Liu LH, Xiao WH, Liu WW. Effect of 5-Aza-2'-deoxycytidine on the P16 tumor suppressor gene in hepatocellular carcinoma cell line HepG2[J]. *World J Gastroenterol*, 2001, 7(1):131-135.
- [14] Jin M, Piao Z, Kim NG, Park C, Shin EC, Park JH, et al. p16 is a major inactivation target in hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer*, 2000, 89(1):60-68.
- [15] (本文编辑:吉耕中)

(上接第407页)