

· 论 著 ·

3-磷酸甘油醛脱氢酶活性检测方法的改良及应用*

刘小青,林志健,张 冰[△]
(北京中医药大学 100029)

摘 要:目的 改良 3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)活性检测方法,并探讨该方法的应用。方法 在经典血清 GAPDH 检测方法基础上,根据该酶的组织分布特点,将血清样本改为全血样本,并对样本及检测条件作了进一步的改良。在方法学研究的基础上,运用改良后的方法分别检测正常鹌鹑、高嘌呤饮食诱导的模型鹌鹑、正常大鼠及高果糖饮食诱导的模型大鼠全血 GAPDH 的活性。结果 全血与血清 GAPDH 酶促反应时间曲线类似,变异系数均小于 10%。方法学应用结果显示,与正常鹌鹑比,高嘌呤饮食诱导的模型鹌鹑在高尿酸血症及其合并脂、糖代谢紊乱状态下(60~140 d)全血 GAPDH 活性显著降低;与正常大鼠比,高果糖饮食诱导的模型大鼠在高三酰甘油血症及其并发尿酸、糖代谢紊乱下(7~28 d),全血 GAPDH 活性显著降低。结论 改良方法血样容易采集,样品用量少,操作简便、重复性较好,经济实用,易于推广应用。

关键词:磷酸甘油醛脱氢酶; 检测方法; 全血; 代谢性疾病

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.02.013

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)02-0160-02

Amendment and application of determination method of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity*

Liu Xiaoqing, Lin Zhijian, Zhang Bing[△]

(Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

Abstract: Objective To improve the determination method of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH) activity and explore its application. **Methods** The traditional determination method of GAPDH activity was amended by changing serum sample as whole blood sample and reforming the related determination condition, according to GAPDH distribution in the tissue. And then GAPDH activity was detected by newly constructed method on quail and rat models. **Results** The time curve of whole blood GAPDH activity was similar to serum curve, and coefficient of variation of the tow methods were both less than 10%. The activity of GAPDH was decreased in quails model group, induced by high purine diet, with hyperuricemia and combined with metabolic disturbance of blood fat and glucose(60—140 d), and was also decreased in rats model group, induced by high fructose diet, with hypertriacylglycerolemia and combined with metabolic disturbance of blood uric acid and glucose(7—28 d). **Conclusion** This newly constructed method could have several advantages as easy collection of sample, less usage amount of sample, good reproducibility and economics.

Key words: phospho glycerate dehydrogenase; detection method; whole blood; metabolic disease

3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)是糖酵解的中枢环节之一。GAPDH 与糖异生途径及体内血糖浓度的维持、糖尿病的发生密切相关,在机体糖、脂、蛋白代谢紊乱疾病中发挥重要作用。检测 GAPDH 活性变化,对代谢综合征机制研究及新药开发均有非常重要的意义。然而现有的检测方法检测样本取得费时、检测响应值低、操作繁杂、耗时,不易推广。因此,本研究在原有方法基础上,改进 GAPDH 活性检测方法,此方法需样品量少、样品易采集、操作简便、方法稳定,只需获得少量的末端全血标本即可进行检测。

1 材料与方法

1.1 材料 迪拉克鹌鹑,雄性,(180±20)g,由北京市种禽公司德岭鹌鹑场提供。SD 大鼠,雄性,(250±20)g,由北京市维通利华实验动物有限公司提供。

1.2 仪器与试剂 紫外可见分光光度计,UV2000,上海光谱仪器厂生产;恒温水浴锅 S1 型,德国 LAUDA DR R. WOBSE 公司生产。三乙醇胺、3-磷酸甘油酸、EDTA、MgSO₄、NADH、ATP、3-磷酸甘油酸激酶。

1.3 测定原理与活性计算公式 本方法测定 GAPDH 活性

是耦联 3-磷酸甘油酸激酶(PGK),以 3-磷酸甘油酸为底物,于 340 nm 处用分光光度计测定 NADH 的减少量,并以每升样品每分钟消耗 NADH 的 μmol 数来表示酶的活性。

1.4 检测方法改良 本方法参考王坤等^[4]报道的检测方法,并加以改进。原方法测定 GAPDH 活性采用的样本为血清,本实验将样本改为全血样本(新鲜大鼠或小鼠尾静脉血、鹌鹑翅静脉血 20 μL 加入 480 μL 双蒸水中),混匀,冰水浴待测。操作步骤见表 1。

1.5 统计学处理 指标检测的实验数据用($\bar{x} \pm s$)表示,用 EXCEL 软件处理,先进行方差齐性检验;两组间均数比较采用 *t* 检验。

2 结 果

2.1 全血测定方法性能研究

2.1.1 血清样本与全血样本反应进程曲线比较 按上述操作方法,分别检测血清样本与全血样本,观察 10、70、130、190、250 s 时吸光度值的变化曲线。结果显示,在活性测定体系中加 20 μL 血清或全血后,随着反应时间的延长,酶促反应不断消耗反应体系中的 NADH,吸光度值下降,70 s 后酶反应速度

* 基金资助:国家自然科学基金资助项目(81073068、30472282);北京市自然科学基金资助项目(7052036);国家重点基础研究发展计划(973 计划)(2007CB512605)。 △ 通讯作者,E-mail:zhangbing6@263.net。

由斜线渐趋平稳。全血及血清反应体系的反应进程曲线类似，吸光度值变化趋势一致。后期实验选择 10、70 s 作为检测时

间点，计算两个时间点的吸光度差值。实验酶活性反应时间曲线如图 1。

表 1 GAPDH 检测操作方法

Reagent	Assay Tube	Control Tube
Reaction solution(Trolamine 82.5 mmol/L,3-phosphoglyceric acid 6 mmol/L,EDTA 0.9 mmol/L,MgSO ₄ 1.7 mmol/L,pH7.5)	0.5 mL	0.5 mL
NADH solution(NADH 0.2 mmol/L)	10 μL	—
Action start solution(ATP 1 mmol/L,3-phosphokinase 14.8 U/mL)	20 μL	20 μL
Whole blood sample(20 μL whole blood add 480 μL double distilled water)	20 μL	—
double distilled water	—	30 μL

反应温度 25 ℃，测定波长 340 nm，空白管调零，加入全血溶液混匀立即计时，分别于 10、70 s 时记录吸光度值。—：无数据。

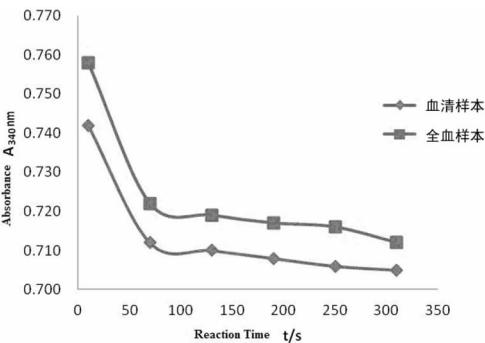


图 1 GAPDH 酶活性反应吸光度值的时间曲线

2.1.2 重复性实验 按上述方法对同一正常样本血清及全血 GAPDH 活性重复测定 3 次，计算均值与变异系数。结果见表 2。

表 2 正常鹌鹑血清及全血 GAPDH 活性测定比较

样本	Activity(U/L)			Mean	CV(%)
血清样本	28.14	30.14	26.13	28.14	7.14
全血样本	36.17	38.18	36.17	36.84	3.15

两种样本的检测结果变异系数均小于 10%，准确性和精确性较为一致。

2.2 全血 GAPDH 活性测定应用实例 按改良全血 GAPDH 活性测定方法，分别检测正常鹌鹑(N-Q)、高嘌呤饮食诱导的鹌鹑模型(M-Q)、正常大鼠(N-R)及高果糖诱导的大鼠模型(HTG-R)全血 GAPDH 活性。分别检测高嘌呤饮食诱导的鹌鹑模型三个不同病理进程(10~60 d 单纯高尿酸血症→60~90 d 高尿酸并高三酰甘油血症→90~140 d 高尿酸并高三酰甘油/高血糖血症)全血 GAPDH 活性。模型组鹌鹑第 60、90、140 天全血中 GAPDH 活性显著降低。结果见表 3。

表 3 高嘌呤饮食诱导的鹌鹑全血 GAPDH 活性变化比较(U/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	10 d	60 d	90 d	140 d
N-Q	30.73±11.32	32.34±9.70	42.05±11.32	27.49±8.09
M-Q	27.49±14.55	19.41±8.09*	25.87±17.78*	17.78±11.32*

*：P<0.05，与 N-Q 组比较。

分别检测高果糖饮食诱导的大鼠模型不同病理进程(第 7 天单纯高三酰甘油血症→14~21 d 高三酰甘油并高尿酸血症→第 28 天高三酰甘油并高尿酸/高血糖血症)全血 GAPDH 活性。模型组大鼠第 7~28 天全血中 GAPDH 活性显著降低，结

果见表 4。

表 4 高果糖诱导的大鼠全血 GAPDH 活性变化比较(U/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	7 d	14 d	28 d
N-R	45.32±10.18	44.06±5.41	39.27±6.83
M-R	27.81±7.60 ^{##}	30.41±6.02 ^{##}	28.77±7.38 ^{##}

^{##}：P<0.01，与 N-R 组比较。

3 讨 论

3.1 GAPDH 活性检测的应用及意义 GAPDH 是由 330 个氨基酸组成的多肽链，由 4 个相对分子质量为 37×10³ 的亚基构成，每个亚基分别结合 4 个 NAD⁺ 分子，总相对分子质量约为 150×10³。研究发现，人类 GAPDH 基因位于 12 号染色体上，鼠类 GAPDH 基因位于 6 号染色体上。GADPH 在同种细胞或组织中表达一般是恒定的，所以把其作为分析其他蛋白质结构和功能的标准或其他基因表达的内参照，很少引起人们的关注。近年来越来越多的研究发现，GAPDH 是糖酵解过程中的一个关键酶，不仅参与体内物质能量代谢，而且还具有多种生理功能。

GAPDH 是反映糖酵解水平最具代表性的酶类之一，其活性水平往往代表糖酵解循环活性的高低。有研究者推测，GAPDH 活性降低可抑制糖酵解途径，在导致糖代谢异常时，可促进三酰甘油合成；而且 GAPDH 活性降低，糖酵解途径抑制，使磷酸戊糖途径活跃，可促进尿酸生成。GAPDH 与体内三大物质代谢糖、脂、蛋白核酸代谢密切相关，可能是慢性代谢性疾病及其并发症的共同病理环节。同时，GAPDH 对于维持细胞正常功能，包括细胞分裂、细胞膜融合、微管形成、细胞内免疫应答反应、RNA 输出及 DNA 修复功能、对环境的适应性等具有重要意义。GAPDH 还与神经元凋亡及神经变性疾病、阿尔茨海默病、亨廷顿舞蹈病、脊髓小脑共济失调症、脊延髓肌萎缩症、前列腺癌、视网膜病变、糖尿病及其并发症等疾病密切相关。而且 GAPDH 的不同功能之间并非完全独立，而是相互联系、互相影响的。

可见，GAPDH 作为一个多功能蛋白，其在机体的生理和病理状态下的作用越来越引起有关学者的关注。因此，研究一种方便可行、操作简单、创伤小的 GAPDH 活性检测方法具有较高的应用价值和现实意义。

3.2 关于检测方法的应用前景 据报道，GAPDH 广泛分布于人体各组织器官，其中骨骼肌、红细胞和肾中的含量最为丰富，而睾丸、肝脏、大脑中含量相对较低。根据红细胞中 GAPDH 含量高的特性，本方法采用直接应用全(下转第 165 页)

[6] Mussap M, Dalla VM, Fioretto P, et al. Cystatin C is a more sensitive marker than creatinine for the estimation of GFR in type 2 diabetic patients[J]. *Kidney Int*, 2002, 61: 1453-1461.

[7] Stevens LA, Coresh J, Schmid CH, et al. Estimating GFR using serum cystatin C alone and in combination with serum creatinine: a pooled analysis of 3 418 individuals with CKD[J]. *Am J Kidney Dis*, 2008, 51(3): 395-406.

[8] Macisaac RJ, Tsalamandris C, Thomas MC, et al. Estimating glomerular filtration rate in diabetes: a comparison of cystatin-C and creatinine-based methods[J]. *Diabetologia*, 2006, 49: 1686-1689.

[9] Perkins BA, Nelson RG, Ostrander BE, et al. Detection of renal function decline in patients with diabetes and normal or elevated GFR by serial measurements of serum cystatin C concentration: results of a 4-year follow-up study[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2005, 16(5): 1404-1412.

[10] Rule AD, Bergstralh EJ, Slezak JM, et al. Glomerular filtration rate estimated by cystatin C among different clinical presentations [J]. *Kidney Int*, 2006, 69(2): 399-405.

[11] Stevens LA, Coresh J, Schmid CH, et al. Estimating GFR using serum cystatin C alone and in combination with serum creatinine: a pooled analysis of 3 418 individuals with CKD[J]. *Am J Kidney Dis*, 2008, 51(3): 395-406.

[12] Bostom AG, Kronenberg F, Ritz E. Predictive performance of renal function equations for patients with chronic kidney disease and normal serum creatinine levels[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2002, 13: 2140-2144.

[13] Rule AD, Larson TS, Bergstralh EJ, et al. Using serum creatinine to estimate glomerular filtration rate: accuracy in good health and

in chronic kidney disease[J]. *Ann Intern Med*, 2004, 141: 929-937.

[14] Poggio ED, Nef PC, Wang X, et al. Performance of the cockcroft-gault and modification of diet in renal disease equations in estimating GFR in ill hospitalized patients[J]. *Am J Kidney Dis*, 2005, 46(2): 242-252.

[15] Branten AJ, Vervoort G, Wetzels JF. Serum creatinine is a poor marker of GFR in nephrotic syndrome[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2005, 20: 707-711.

[16] Rule AD, Gussak HM, Pond GR, et al. Measured and estimated GFR in healthy potential kidney donors[J]. *Am J Kidney Dis*, 2004, 43(1): 112-119.

[17] Perrone RD, Madias NE, Levey AS. Serum creatinine as an index of renal function: new insights into old concepts[J]. *Clin Chem*, 1992, 38(10): 1933-1953.

[18] Grubb AO. Cystatin C-properties and use as diagnostic marker [J]. *Adv Clin Chem*, 2000, 35: 63-99.

[19] Filler G, Bkenkamp A, Hofmann W, et al. Cystatin C as a marker of GFR-history, indications, and future research [J]. *Clin Biochem*, 2005, 38: 1-8.

[20] Erlandsen EJ, Randers E, Kristensen JH. Evaluation of the dade behring N latex cystatin C assay on the dade behring nephelometer II system[J]. *Scand J Clin Lab Invest*, 1999, 59(1): 1-8.

[21] Sahakyan KA, Barbara EK. Serum cystatin C and the incidence of hypertension in type 1 diabetes mellitus[J]. *AM J Hypertension*, 2011, 1: 59-63.

(收稿日期: 2011-10-09)

(上接第 161 页)

血, 制备溶血液进行 GAPDH 活性检测。

许多文献报道, 测定血中 GAPDH 采用的标本为血清, 并且要求在 1 h 内检测。由于血清制备操作较繁琐, 时间较长, 不容易做到所有样本制备条件的一致性。本方法直接测定溶血液中酶的活性, 省去了血清制备过程血液凝固时间, 取血量、样本采集操作简单易行。实验结果表明, 血清和全血检测结果反映 GAPDH 酶催化反应进程曲线趋势一致, 同时, 全血检测方法比血清检测方法的变异系数小(3.15%与 7.14%), 重复性较好。

综上所述, 采用改良全血 GAPDH 检测方法不仅与血清检测方法相似, 而且重复性较好, 方法稳定, 操作简单, 对动物的创伤小。采集 20 μ L 全血即可进行相关活性检测分析, 明显减少取血量。对于小型实验动物(如小鼠等)也可以进行全血 GAPDH 活性变化的动态观察, 在临床及科研中具有广阔的应用前景。

参考文献

[1] 司国爱, 欧松, 郑希明, 等. 膳食结构对居民健康的影响调查[J]. *应用预防医学*, 2006, 12(3): 149-151.

[2] Larissa S, Kerri L, Batra, et al. Medical implications of hyperuricemia[J]. *Med Health/Rhode Island*, 2009, 92(11): 353-355.

[3] 张冰, 刘小青. 鹌鹑高尿酸血症高甘油三酯模型塑造[J]. *中国病理生理杂志*, 2003, 19(8): 1148-1150.

[4] 王坤, 瞿韬, 左砚琴. 3-磷酸甘油醛脱氢酶[M]. 重庆: 科学技术文献出版社重庆分社, 1989: 240-244.

[5] Burke JR, Enghild JJ, Martin ME, et al. Huntingtin and DRPLA proteins selectively interact with the enzyme GAPDH[J]. *Nat Med*, 1996, 2: 347-350.

[6] Kish SJ, Lopes-Cendes I, Guttman M, et al. Brain glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity in human trinucleotide repeat disorders[J]. *Arch Neurol*, 1998, 55: 1299-1304.

[7] Tabrizi SJ, Cleeter MWJ, Xuereb J, et al. Biochemical abnormalities and excitotoxicity in Huntington's disease brain[J]. *Ann Neurol*, 1999, 45: 25-32.

[8] Epner DE. There are multiple forms of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in prostate cancer cells and normal prostate cells[J]. *Prostate*, 1996, 28: 372-378.

[9] Ripple MO, Wilding G. Alteration of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity and messenger RNA content by androgen in human prostate carcinoma cells[J]. *Cancer Res*, 1995, 55: 4234-4236.

[10] Meyer-Siegler K, Mansur NR, Wurzer JC, et al. Proliferation-dependent regulation of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase/uracil DNA glycosylase gene in human cells[J]. *Carcinogenesis*, 1992, 13: 2127-2132.

(收稿日期: 2011-10-11)