

· 论 著 ·

3 种方法对酸刺激前后唾液淀粉酶活性及其活性比值检测的影响*

杨泽民¹, 林 静¹, 杨小蓉², 陈龙辉³, 陈蔚文³

(1. 广东药学院基础学院, 广东广州 510006; 2. 广东药学院附属第一医院检验科, 广东广州 510080;

3. 广州中医药大学脾胃研究所, 广东广州 510405)

摘要:目的 比较碘-淀粉法、Bernfeld 法和 EPS-G7 速率法 3 种方法检测酸刺激前后唾液淀粉酶(sAA)活性及其活性比值的差异,探讨 3 种方法检测 sAA 活性之间的相关性。方法 采集 5 例健康志愿者柠檬酸刺激前后的唾液标本各 5 份,分别用 3 种方法 3 次重复检测每份唾液标本的 sAA 活性,计算 sAA 活性及其活性比值的变异系数,并对 3 种方法检测的 sAA 活性的相关性进行分析。结果 3 种方法检测的 sAA 活性及其总变异系数差异有统计学意义($P < 0.05$),其中以 EPS-G7 速率法检测 sAA 活性和总变异系数最小;3 种方法检测的 sAA 活性比值及其比值的变异系数差异无统计学意义($P > 0.05$);3 种方法中的任意 2 种方法检测的 sAA 活性都有显著相关($P < 0.05$),相关系数都在 0.96 以上。结论 3 种方法检测的 sAA 活性可以通过回归方程进行相互转换,检测精度以 EPS-G7 速率法的最高,而且 sAA 活性比值的处理方式可以减少 3 种方法之间变异系数的差异。

关键词:碘-淀粉法; Bernfeld 法; EPS-G7 速率法; 唾液淀粉酶; 活性比值

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.11.004

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)11-1488-03

The influences of three methods on determination of salivary alpha-amylase activity and its activity ratio from the saliva before and after citric acid stimulation*

Yang Zemin¹, Lin Jing¹, Yang Xiaorong², Chen Longhui³, Chen Weiwen³

(1. School of Basic Courses, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou, Guangdong 510006, China;

2. Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Guangdong Pharmaceutical

University, Guangzhou, Guangdong 510080, China; 3. Pi-Wei Institute, Guangzhou

University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510405, China)

Abstract: **Objective** To compare the differences of salivary alpha(α) amylase (sAA) activity and its activity ratio from the saliva before and after citric acid stimulation and approach the correlations among sAA activity determined by the methods of iodine-starch, Bernfeld and EPS-G7 velocity respectively. **Methods** Ten saliva samples were collected from five healthy volunteers before and after citric acid stimulation. Their activities were determined three times by the three methods, and the variation coefficient (CV) of sAA activity and activity ratio were calculated. Moreover, correlation among sAA activities determined by the three methods were analyzed. **Results** The significant differences ($P < 0.05$) were found in sAA activity and total CV from three determined methods, and sAA activity and total CV by the method of EPS-G7 velocity were minimum. There were no significant differences ($P > 0.05$) in sAA activities ratio and its CV; Significant correlation was found between sAA activity determined by random two of three methods ($P < 0.05$), and their correlation coefficients were above 0.96. **Conclusion** The sAA activity data determined by three methods could be transformed each other by regression equation, and determined precision by the method of EPS-G7 velocity is highest, and data processing method of sAA activity ratio could decrease differences among CV from three methods.

Key words: method of iodine-starch; method of Bernfeld; method of EPS-G7 velocity; salivary alpha amylase; activity ratio

唾液淀粉酶(sAA)的分泌受交感神经的调控^[1],其作为交感神经活性的生物标记物已被广泛用于心理和精神生理的相关研究^[2-3]。另外,sAA 活性比值(酸刺激后 sAA/酸刺激前 sAA)作为中医脾虚证辨证和疗效观察的参考指标,用于临床近 30 年^[4-5]。然而,目前报道的 sAA 活性检测方法很多,如脾虚证研究主要采用碘-淀粉酶法^[4,6-7],而心理压力测试研究中主要采用国际临床化学协会(IFCC)推荐的 EPS-G7 速率法^[2]。这些方法的精度各不相同,而且方法之间没有统一的标准,这既不利于同行对 sAA 活性相关研究结果的比较和参考,也将为医院间临床资料的交换和诊断带来困难。对此,本研究以 sAA 活性和活性比值这 2 项常用指标作为检测对象,比较碘-

淀粉法、Bernfeld 法和 EPS-G7 速率法这 3 种常用的 sAA 活性检测方法的精密性,探讨 3 种方法对 sAA 活性和活性比值检测结果的影响。同时,对 3 种方法检测的 sAA 活性进行相关性分析,为 3 种方法检测的 sAA 活性的数据转换提供参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料 参与本研究的 5 例健康志愿者均为广东药学院在校本科生,均为女性,年龄 19~21 岁,平均(20.2±0.8)岁。纳入对象均排除有精神、心理疾病,内分泌及心血管疾病,急性发作或感染性疾病如上呼吸道感染,其他器质性疾病等,一周内有服用精神病药物、 β 受体阻滞剂、糖皮质激素等。所有志愿者均签署《知情同意书》。

* 基金项目:国家自然科学基金青年基金资助项目(81102703);广东省科技计划项目(2013A032500005);广东省中医药管理局项目(20123001)。作者简介:杨泽民,男,高级实验师,主要从事中西医结合代谢相关疾病的发生机制研究。

1.2 标本采集 唾液标本的采集参照本课题组前期的研究方法进行^[8]。简单介绍如下:(1)唾液采集前需禁食 1 h 以上,除水外,需禁饮其他液态物质,静坐休息 10 min 以上;(2)正式采集唾液前,先通过吞咽的方法将口腔唾液排净,然后让唾液在口腔内汇聚 3 min 后一次性自然流出至一支 5 mL 的 EP 管中,获得刺激前唾液标本;(3)将 0.4 mol/L 1 cm×1 cm 的柠檬酸滤纸置于舌尖刺激 1 min,去掉滤纸后,让刺激后的唾液自然流出到另一支 5 mL 的 EP 管中,获得酸刺激后的唾液标本。所有采集的唾液标本全部放入 -20 ℃ 保存过夜,次日解冻后,13 000 r/min 离心 5 min 去黏蛋白^[4],上清分装后 -20 ℃ 保存,用于 sAA 活性检测。

1.3 sAA 活性检测 利用碘-淀粉法、Bernfeld 法和 EPS-G7 速率法 3 种方法分别检测每一份唾液标本的 sAA 活性,并且重复检测 3 次。(1)碘-淀粉法:该方法根据碘与淀粉直接显色的原理设计。实验时,将分装的唾液标本用蒸馏水稀释 200 倍,采用文献^[4]的方法,用 751 型可见分光光度计(上海棱光)检测标准管和检测管 630 nm 的吸光度(OD)值,利用公式 $(OD_{标准} - OD_{检测}) / OD_{标准} \times 3.75 \times 2\ 000$, 计算标本 sAA 活性(U)。酶活性单位定义为 1 mL 唾液在 37 ℃ 中保温 15 min,在实验条件下水解 1 mg 淀粉为 1 单位。见表 1(见《国际检验医学杂志》网站“论文附件”)。(2)Bernfeld 法:该方法利用 sAA 水解淀粉产生的麦芽糖与 3,5-二硝基水杨酸(DNS)显色的原理设计。实验时,将分装的唾液标本稀释 1 000 倍,按照文献^[12]的方法先将淀粉液和唾液样品放在 37 ℃ 水浴保温,然后用 751 型可见分光光度计(上海棱光)检测检测管和标准管 540 nm 的 OD 值,最后通过续表 2 制作的标准曲线和检测管的 OD 值,检测样品 sAA 活性。酶活性单位定义为在 37 ℃ 和 pH6.9 的条件下,3 min 水解淀粉产生 1 μmol 还原物质(以麦芽糖计算)所需要的酶量为 1 单位。见表 2(见《国际检验医学杂志》网站“论文附件”)。(3)EPS-G7 速率法:该方法为 IFCC 推荐的临床唾液淀粉酶活性检测方法^[2]。将分装的唾液标本稀释 200 倍,采用 α-AMY 检测试剂盒(广州科方)中的对硝基苯麦芽庚糖苷(亚乙基-G7-pNP)为底物,葡萄糖苷酶作为指示酶,底物被 sAA 和糖苷酶水解后产生对硝基苯酚(pNP),pNP 生成速率与标本中 sAA 的活性呈正比。因此,检测单位时间内 pNP 在 405 nm 的吸光度值的差值(ΔOD/min),即可算出标本中 sAA 的活性(U/mL)。sAA 活性由广东药学院附属第一医院检验科在日立 7180 全自动生化分析仪上进行检测。

1.4 统计学处理 采用 GraphPad Prism 5 软件进行数据处理及统计学分析,其中 sAA 活性比值=酸刺激后 sAA 活性/酸刺激前 sAA 活性;变异系数(CV)=标准差(s)/平均值(X)×100%;3 种方法 CV 值之间的比较采用单因素方差分析,方法之间的两两比较采用配对 t 检验。由于 sAA 活性不符合正态分布,故将 sAA 活性数据进行对数转换后,再对不同方法检测的 sAA 活性进行 Pearson 相关分析。参与本研究的 5 例健康志愿者酸刺激前后的唾液标本共 10 份,取每种方法 3 次重复检测的 sAA 活性的平均值,对 3 种方法中的任意 2 种方法检测的 sAA 活性进行相关性分析。

2 结 果

2.1 3 种方法检测的 sAA 活性、活性比值和 CV (1)由于检测方法的原理和酶活力单位的定义不同,3 种方法检测的 sAA 活性差异有统计学意义($P < 0.05$),其中 EPS-G7 速率法、碘-淀粉法、Bernfeld 法酸刺激前、后 sAA 活性分别为(65.61 ± 39.97)、(92.09 ± 47.64) U/mL, (3 810.24 ± 1 846.40)、(4 800.96 ± 2 029.92) U, (1 753.22 ± 948.91)、2 167.22 ±

1 134.75)U;(2)每一种方法检测 sAA 活性的 CV 值在酸刺激前、后的唾液标本之间差异无统计学意义($P > 0.05$),其中 EPS-G7 速率法、碘-淀粉法、Bernfeld 法酸刺激前、后 CV 值分别为(6.93 ± 2.42)%、(6.34 ± 2.57)%、(10.88 ± 5.55)%、(13.08 ± 7.53)%、(9.56 ± 5.00)%、(15.29 ± 6.69)%。提示酸刺激前、后的唾液标本对 sAA 活性检测方法没有影响;(3)3 种方法检测 sAA 活性的总 CV 值(包括刺激前、后的 CV 值)之间差异虽无统计学意义($F = 3.619, P = 0.0605$),但 EPS-G7 速率法(6.64 ± 2.37)%明显低于碘-淀粉法(11.98 ± 6.34)%和 Bernfeld 法(12.42 ± 6.34)% , 差异有统计学意义($P = 0.0305, 0.0156$),后 2 种方法之间差异无统计学意义($P = 0.8876$),提示 EPS-G7 速率法精密度最高;(4)3 种方法的 sAA 活性比值及其比值的 CV 值差异均无统计学意义($P > 0.05$),其中 EPS-G7 速率法、碘-淀粉法、Bernfeld 法 sAA 活性比值和比值的 CV 值分别为(1.85 ± 1.67)%和(7.52 ± 2.77)%、(1.37 ± 0.66)%和(16.83 ± 7.06)%、(1.43 ± 0.94)%和(14.83 ± 13.65)% , 提示 sAA 活性比值处理可以减少 3 种方法之间的精密度差异;见表 3~4(见《国际检验医学杂志》网站“论文附件”)。

2.2 3 种方法检测的 sAA 活性之间的相关分析 任意 2 种方法检测的 sAA 活性之间都呈显著相关(r 均大于 0.96, $P < 0.05$),提示 3 种方法检测的 sAA 活性之间可以通过回归方程进行转换。见图 1。

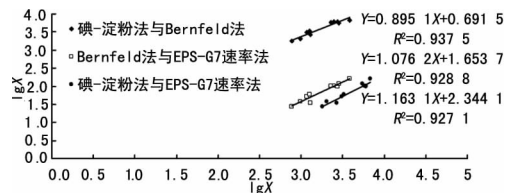


图 1 3 种方法检测 5 例健康志愿者酸刺激前后 sAA 活性之间的相关性

3 讨 论

检测淀粉酶活性的方法很多,根据其底物的不同可以分为以天然淀粉作为底物的方法和以分子组成确定的化合物作为底物的方法^[9-11]。对于前者,由于检测对象的不同又有直接检测底物和检测酶解产物的不同。目前在脾虚证研究中广泛应用的碘-淀粉法就是通过直接检测底物淀粉的量来计算酶的活性^[4],而 Bernfeld 法则通过检测酶水解淀粉产生麦芽糖的量来确定酶的活性^[12]。目前临床上广泛使用的淀粉酶活性检测方法大部分采用以分子组成确定的化合物作为底物的方法,其中 EPS-G7 速率法因为得到 IFCC 的推荐而被广泛使用^[2]。本研究通过对 3 种常用淀粉酶活性检测方法的比较,发现 3 种方法检测 sAA 活性的精确度存在明显差异,并且它们对 sAA 活性和活性比值有着不同的影响。

sAA 活性的检测易受底物浓度、pH 值、温度、反应时间等影响,这为 sAA 活性检测的准确性增加了困难。本研究以反映精确度的 CV 值作为观测指标,对比了 3 种方法的 CV 值。结果显示,3 种方法检测 sAA 活性的总 CV 值(包括刺激前、后的 CV 值)之间存在明显差异,其中 EPS-G7 速率法明显低于碘-淀粉法和 Bernfeld 法,而且后 2 种方法之间没有差异,该结果提示 3 种方法中以 EPS-G7 速率法精密度最高。对于导致 3 种方法的精密度存在差异的原因,可能与 sAA 活性检测原理、底物选择和环境因子的控制相关。碘-淀粉法和 Bernfeld 法都是以天然淀粉作为 sAA 活性检测的底物。除了不同植物来源和不同批号的天然淀粉分子结构的不确定性导致的检测误差

外,天然淀粉的溶解度和稳定性还易受时间、温度和微生物等的影响,使淀粉溶液的浓度会随时间发生改变。这些细微的变化对于直接以淀粉作为计量关系的碘-淀粉法来说有着很大的影响。此外,以淀粉液作为标准管的实验设计,并以此作为计算 sAA 活性的方法(见方法部分),都是增加该方法误差的重要来源。Bernfeld 法以淀粉的酶解产物麦芽糖作为计量关系的指标,并通过麦芽糖标准曲线计算 sAA 活性,这在一定程度上减少了类似上述碘-淀粉法误差的来源。但是 Bernfeld 法检测的线性范围低,相同唾液标本稀释倍数的增加(Bernfeld 法 1 000 倍稀释,另外 2 种方法 200 倍稀释)可能会增加其取样误差。此外,操作过程的复杂性,实验过程中温度、时间的控制,以及口腔淀粉或淀粉水解产物的影响等,这些都是碘-淀粉法和 Bernfeld 法的误差来源。然而 EPS-G7 速率法操作简单,只需实验者处理好待测样品,实验过程中的温度和时间全部由全自动生化分析仪控制,人为产生的误差大为减少。而且 EPS-G7 法采用分子组成确定的亚乙基-G7-pNP 为底物,葡萄糖苷酶作为指示酶,以反应释放的 pNP 作为计量关系的指标。该方法避免了以天然淀粉作为底物产生误差的来源,而且不受口腔淀粉和淀粉水解产物的影响。因此,EPS-G7 法具有更高的精密性,应作为 sAA 活性检测的首选方法。此外,唾液标本与血液和尿液标本不同,其黏蛋白水平较高,新鲜采集的唾液标本黏稠,尤其是刺激前的唾液标本,必须经过冻存一次以上的处理去除唾液中的黏蛋白^[13-14],这样不仅可以减少黏蛋白对 sAA 活性的影响^[15],而且还有利于唾液标本的分装和准确取样。本研究结果显示,经过处理的酸刺激前、后的唾液标本不会对 sAA 活性检测方法的 CV 值产生影响。

sAA 活性比值或差值作为机体对生理或心理刺激的应激反应已经被广泛应用到唾液分泌或心理学相关的研究中^[13,16]。中医学将酸刺激前后 sAA 活性比值降低作为脾虚证的诊断和辨证参考指标指导脾虚证的临床和实验研究^[5,17]。本研究通过对 3 种方法的 sAA 活性比值及其比值的 CV 值进行比较,发现 3 种方法之间都没有明显的差异。该结果提示 3 种方法检测 sAA 活性的精密性虽然存在差异(如前所述),但是 sAA 活性比值的处理方式可以降低 3 种方法之间的这种差异。在中医脾虚证的研究中,有些报道脾虚证患者酸刺激前的 sAA 活性比健康人高^[4,6],而有些结果则与此相反^[7],并且这些报道中健康人和脾虚证患者的 sAA 活性差异很大,甚至没有可比性,但是酸刺激前后 sAA 活性比值却都明显低于健康人。究其原因,可能与其利用碘-淀粉法检测 sAA 活性和采用酸刺激前后 sAA 活性比值的处理方式有关。

此外,由于检测原理和酶活性单位定义的不同,3 种方法对同一标本的检测结果存在明显的差异,这给临床资料的交换和诊断带来了困难。对此,本研究对 3 种方法检测的 sAA 活性结果进行了相关性分析,结果显示 3 种方法之间存在明显的正相关,该结果与临床血液和尿液 α -淀粉酶的相关研究结果基本一致^[11,18],提示 3 种方法检测的 sAA 活性也可以进行相互转换。

综上所述,碘-淀粉法、Bernfeld 法和 EPS-G7 速率法 3 种方法检测的 sAA 活性精密性存在明显差异,但是 sAA 活性比值的处理方式可以有效减少方法之间的差异。EPS-G7 速率法作为国际通用的 sAA 活性检测方法,具有简便、快速、精密性高的特点,应作为 sAA 活性检测的首选方法。此外,3 种方法检测的 sAA 活性差异明显,但是 sAA 活性之间可以通过回归曲线进行相互转化,这样可以比较不同 sAA 活性检测方法在同类研究中的结果,尽早结束国内在淀粉酶活性检测上

的不可比性和混乱局面。

参考文献

- [1] Chatterton RT, Vogelsson KM, Lu YC, et al. Salivary alpha-amylase as a measure of endogenous adrenergic activity[J]. Clin Physiol, 1996, 16(4): 433-448.
- [2] Rohleder N, Nater UM. Determinants of salivary alpha-amylase in humans and methodological considerations[J]. Psychoneuroendocrinology, 2009, 34(4): 469-485.
- [3] Schumacher S, Kirschbaum C, Fydrich T, et al. Is salivary alpha-amylase an indicator of autonomic nervous system dysregulations in mental disorders—a review of preliminary findings and the interactions with cortisol[J]. Psychoneuroendocrinology, 2013, 38(6): 729-743.
- [4] 广州中医学院脾胃研究组. 脾虚患者唾液淀粉酶活性初步研究[J]. 中华医学杂志, 1980, 60(5): 290-292.
- [5] 中华人民共和国卫生部. 中药新药临床研究指导原则[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 1995: 114.
- [6] 郭娇, 程锡箴. 心、肺、脾气虚证的唾液淀粉酶测定[J]. 广州中医学院学报, 1990, 7(2): 87-89.
- [7] 陈治水, 张丽明, 孙九杰, 等. 158 例脾虚型结肠炎患者唾液 pH 值、淀粉酶及钠钾含量分析[J]. 辽宁中医杂志, 1992, 19(10): 4-5.
- [8] 陈龙辉, 杨泽民, 李茹柳, 等. 柠檬酸滤纸面积及浓度对刺激健康人唾液分泌和唾液淀粉酶活性改变的影响[J]. 广州中医药大学学报, 2013, 30(2): 186-190.
- [9] 张邦能, 张东鹏. 30 例脾虚型 2 型糖尿病患者唾液淀粉酶含量测定[J]. 中医研究, 2012, 25(3): 20-22.
- [10] 蒋晓军, 罗甫花, 王朝燕. 3 种淀粉酶测定方法的应用评价[J]. 检验医学与临床, 2012, 9(6): 661-662.
- [11] 张正飞. 血清淀粉酶两种测定方法医学决定水平值测定[J]. 检验医学与临床, 2011, 20(8): 2544-2545.
- [12] Sterchi EE, Stöcker W, Bond JS. Membrane-bound and secreted amylase with all otoproteases[J]. Mol Aspects Med, 2008, 29(5): 309-328.
- [13] Strahler J, Mueller A, Rosenlocher F, et al. Salivary alpha-amylase stress reactivity across different age groups[J]. Psychophysiology, 2010, 47(1): 587-595.
- [14] Shirtcliff EA, Granger DA, Schwartz E, et al. Use of salivary biomarkers in biobehavioral research: cotton-based sample collection methods can interfere with salivary immunoassay results[J]. Psychoneuroendocrinology, 2001, 26(11): 165-173.
- [15] Iontcheva I, Oppenheim FG, Troxler RF. Human salivary mucin MG1 selectively forms heterotypic complexes with amylase, proline-rich proteins, statherin, and histatins[J]. J Dent Res, 1997, 76(3): 734-743.
- [16] 林传权, 陈玉龙, 李茹柳, 等. 利血平致脾虚大鼠唾液蛋白分泌改变及其机制的探讨[J]. 中国中西医结合杂志, 2010, 30(5): 509-512.
- [17] 吕琳, 韦金育, 陈永红, 等. 壮医药线灸对脾虚患者唾液负荷分泌的影响[J]. 中国针灸, 1998, 18(7): 391-393.
- [18] 陈小剑, 丁红香, 张信良, 等. 三种方法测定尿液 α -淀粉酶活性的相关关系[J]. 温州医学院学报, 2001, 31(6): 396-397.

(收稿日期: 2015-01-28)

