

对红细胞葡萄糖6-磷酸脱氢酶活性的 几种筛选方法的评价

病理生理教研组医学遗传组 许延康 吴秋玲
芮 琳 杜传书

第一附属医院小儿科新生儿研究组

红细胞葡萄糖6-磷酸脱氢酶 (G-6PD) 缺乏是多种溶血性疾患的重要病因之一。对人群进行 G-6PD 活性普查或对临床溶血病人进行过筛, 都需要选择比较准确、快速、简便易行的方法。为此目的, 目前已有多种方法。但这些方法又都必须与酶活性直接测定结果加以比较后, 才能进行正确评价。对此, 文献中尚未见有报道。我们用改良四氮唑蓝法、荧光斑点法、美蓝吸收法和高铁血红蛋白还原试验法检查了一批健康人和 G-6PD 缺乏者, 并分别与同时进行的酶活性直接测定法 (分光光度法) 进行了比较。现将结果报道如下。

方 法

健康人和 G-6PD 缺乏者均由静脉采血, 肝素抗凝 (少数需保存超过 24 小时的标本用 ACD 抗凝), 分别用下列方法进行 G-6PD 测定。

一、G-6PD 活性直接测定法按杜氏^[1]报告的方法。

二、美蓝吸收法按 Sass 等^[2]报告的方法。每次测定前, 美蓝溶液均按一定光密度标定, 一律采用不超过12小时的新鲜血标本。

三、高铁血红蛋白还原法按改良 Brewer 氏法^[3]。

四、改良四氮唑蓝法^[4]系根据 Fairbank 等介绍的方法^[5]设计: (耳垂)取血 1 小滴, 滴于滤纸上, 待干后用打孔机打成直径 0.5 厘米的小圆纸片 (含全血量约为 0.002 毫升)。将浸有血液的小纸片放入比色盘小槽内, 加入蒸馏水 1 滴以溶血, 然后加入反应试剂 (内含 0.06% 吩噻二甲酯硫酸盐 0.1 毫升; 0.3% 硝基四氮唑蓝 0.5 毫升; 0.00625 M 辅酶 I (NADP) 0.1 毫升; 0.00625 M 6-磷酸葡萄糖二钠 (G-6-P-Na₂) 0.4 毫升; 0.12 M MgCl₂ 0.1 毫升) 1 小滴 (约 0.0125 毫升), 轻轻摇匀, 放 37℃ 温箱或水浴中避光 30 分钟保温, 取出观察结果。若纸片呈深紫色示 G-6PD 活性正常, 呈红色为显著缺乏, 浅紫色为中间值。

五、荧光斑点法 (Fluorescence spot test)^[6], 系根据还原型辅酶 I (NADPH) 在长

波紫外光照射下能产生灰绿色荧光。G-6PD 缺乏者,由于不能还原 NADP,NADPH 生成减少(或完全不能生成)故不发荧光,或仅发弱荧光。具体操作步骤如下:取上述浸渍血液的滤纸片1块,剪碎,放入比色盘小槽内,加蒸馏水1滴以溶血,然后加入反应试剂(内含0.01 MG-6-P- Na_2 2.0毫升; 0.75 M Tris-HCl 缓冲液(pH 7.8) 6.0毫升; 0.0075 M NADP 2.0毫升; 0.008 M GSSG 2.0毫升; 蒸馏水4.0毫升) 0.1毫升,于37℃水浴中保温,洗脱20分钟。取上述洗脱液1小滴(约20微升)滴于滤纸上、待风干(一定要干透),在长波紫外光(可用上海出品的 DY-1 型医疗灯加 GUI 滤光片而获长波紫外光)照射下观察荧光情况。G-6PD 活性正常者可见强荧光,严重缺乏者不发荧光,中间值为弱荧光。

结 果

以 G-6PD 活性直接测定法(分光光度法)为标准,依受检查者(健康人或患者)酶活性高低分为“正常”(2.8~7.3 单位);“中间值”(0.7~2.7 单位)和“缺乏者”(0.6单位以下)3组,然后与其他4种方法的检查结果分别作比较。结果见表1~4。

表1 改良四氮唑蓝法纸片法与直接测定法结果比较

G-6PD活性	检查例数	改 良 四 氮 唑 蓝 法				
		正 常	中 间 值	缺 乏	符合率(%)	不符合率(%)
正 常	116	108	8	0	93.1	6.9
中 间 值	13	4	5	4	38.5	61.5
缺 乏	11	0	0	11		0
合 计	140					11.4

表2 荧光斑点法与直接测定法结果比较

G-6PD 活性	检 查 例 数	荧 光 斑 点 法				
		正 常	中 间 值	缺 乏	符合率(%)	不符合率(%)
正 常	120	118	2	0	98.3	1.7
中 间 值	11	6	4	1	36.4	63.6
缺 乏	17	0	0	17	100.0	0
合 计	148					6.1

表 3 美蓝吸收法与直接测定法结果比较

G-6PD 活性	检 查 例 数	美 蓝 吸 收 法*			
		正 常	缺 乏	符合率(%)	不符合率(%)
正 常	69	59	10	85.5	14.5
中 间 值					
缺 乏	22	12	10	45.5	55.5
合 计	91				24.2

* 光密度在0.400以下者为正常；在0.400以上者为缺乏。

表 4 高铁血红蛋白 (MHb) 还原率与直接测定法结果比较

G-6PD 活性	检 查 例 数	MHb 还 原 率 ^Δ				
		正 常	中 间 值	缺 乏	符合率(%)	不符合率(%)
正 常	63	42	15	6	66.7	33.3
中 间 值	11	0	3	8	27.3	72.7
缺 乏	8	0	2	6	75.0	25.0
合 计	82					37.8

^Δ 75%以上为正常；31~74%为中间值；30%以下为缺乏。

讨 论

红细胞 G-6PD 活性缺乏是多种溶血性疾患的遗传基础，这种缺陷在我国南方各省尤为多见。检测这种酶的活性是否缺乏的方法，目前国内多用高铁血红蛋白还原试验，有些单位采用美蓝吸收法，少数单位开始试用荧光斑点法。过去我们一直沿用高铁血红蛋白还原试验，作为普查的方法取得一定的效果，但对临床的溶血性贫血的现症病人，用此法有时出现与 G-6PD 活性直接测定不相符合的情况。1979年我们开始摸索改良四氮唑蓝法和荧光斑点法，并用于普查，上述这些方法的准确性如何需要进行客观的评价，以便能在临床和科研实践中推广应用。为此，我们把国内外目前较常用的四种筛选方法分别与酶活性直接测定法进行了比较。

从上述结果可以看出，荧光斑点法和改良四氮唑蓝法较为理想，其优点是：①与酶活性直接测定法比较，对 G-6PD 活性正常者，二者符合率分别达 98.3% 和 93.1%；G-6PD 活性显著缺乏者则两种方法都能将其全部检出，说明其准确性相当高。②此二法所需血量均甚少，采集标本方便，这在进行群体普查（尤其在农村和对小儿）极为适合。③浸有血标本的纸片可以保存10天左右，有利于邮寄测定，这是其他各种方法所无法比拟的。④二法操作均简便、快捷、重复性较好，稍经训练便可掌握。⑤此二法均用 G-6-P-Na₂ 及 NADP 作底物，特异性较其他间接反映 G-6PD 活性的方法为高。

这两种方法的缺点是：①由于用肉眼判断结果，故杂合子检出符合率不够理想（分别为36.4%和38.5%）。②需用 G-6-P-Na₂ 及 NADP 等较昂贵、难得的试剂。但由于其用量甚微，仅需酶活性直接测定法的1/50~1/80，而且目前国内已有生产，故此二法仍不失为目前较为理想的筛选方法。至于此二法之间的比较，则改良四氮唑蓝法的优点是更为简便，试剂用量更少，而荧光斑点法的优点是浸血纸片可以保存较长时间（室温可达15天）而不明显影响测定结果。在进行普查时，一般可先用改良四氮唑蓝法检查，有怀疑者再用荧光斑点法加以比较。

高铁血红蛋白还原试验法是目前国内最常用的方法之一，但有时可出现假阳性反应。本组与酶活性直接测定法比较，可见 1/3 左右正常人出现假阳性，说明假阳性率相当高。但尚未发现假阴性者，即凡有酶活性缺乏者，不论是中间值还是严重酶缺乏者，均可检出（但杂合子的检出符合率也不高）。另外，此法所用试剂易得，不需特殊设备，故在条件不够的情况下，仍可作为筛选方法之一。如果能进一步排除产生假阳性的原因（不稳定血红蛋白病、血红蛋白H病、高脂血症、巨球蛋白血症、贫血时血细胞压积过低等）估计还可进一步提高符合率。

美蓝吸收法对酶活性缺乏者的检出率较低（45.5%）即假阴性率高，且不能将杂合子和显著缺乏者区别开来，所需血量又多（1毫升）更需新鲜标本，故不大适宜用于大面积普查。但本法试剂简单、便宜、易得、实验快捷，故在其他方法受限时也可考虑采用。

参 考 文 献

- [1] 杜传书：红细胞6-磷酸葡萄糖脱氢酶活性测定及其临床应用。输血及血液学3(2)31,1979
- [2] Sass MD et al: Rapid screening for D-glucose-6-phosphate: NADP oxidoreductase deficiency with methylene blue. J Lab Clin Med 68:156,1966
- [3] Frankel S et al: Gradwohl's Clinical Lab Methods & Diagnosis, 7th ed C V Mosby Co, 1972
- [4] 杜传书等：筛选红细胞葡萄糖6-磷酸脱氢酶的改良四氮唑蓝纸片法（待发表资料）
- [5] Fairbank VF & Beutler E: A simple method for detection of erythrocyte glucose-6-phosphatase deficiency (G-6PD spot test). Blood 20(5)591,1962
- [6] Dow PA et al: Simplified method for G-6PD screening using blood collected on filter paper. Am J Clin Path 61: 333,1974

Evaluation of Several Methods for Screening Erythrocyte Glucose-6-phosphatase Dehydrogenase (G-6PD) Deficiency

Xu Yen-kang Wu Chiou-ling Rui-ling Du Chuan-shu

(Medical genetic research group of Department of Pathophysiology)

Neonatal Disorders Research Group of Department of Pediatrics, Affiliated First Hospital, Zhong Shan Medical College

To detect erythrocyte G-6PD deficiency four common screen-methods, the methemoglobin reduction test(MHb-T), the methylene blue absorption test, the fluorescence spot test, and the modified nitroblue tetrazolium spot test(NBT-T), were compared with the enzyme quantitative assay.

The results suggest that the fluorescence spot test and modified NBT-test agrees well with the G-6PD activity determinations, and are more favorable due to their high-speed, simplicity and specificity.

The MHb-T and methylene blue absorption test were also evaluated.



舌癌 241 例的远期疗效报告

李振权等

中华肿瘤杂志2(1): 11, 1980

本文报告中山医学院附属肿瘤医院头颈科和附属第一医院肿瘤科自 1958~1972 年共 14 年间治疗的舌癌 241 例的远期疗效。全组病例均获随访, 随诊率 100%, 平均五年生存率为 53.9(130/241)。其中, 计划综合治疗组(即原发灶外照射+镭针插植术, 并加颈淋巴结清除术)五年生存率为 68.3%(28/41); 联合根治术组五年生存率为 59.3%(70/118); 镭针插植术组五年生存率为 39.1%(32/82)。全组共有 159 例行颈淋巴结清除术, 术后病理检查有淋巴结转移的 51 例(颈淋巴结转移率为 32.1%)。

本文分析了舌癌治疗各种方法的优点, 认为计划综合治疗组疗效的提高可能与下列因素有关: (1) 镭针插植前⁶⁰钴外照射量 3,500~4,000 拉德/20~25 天, 可抑制癌细胞生长, 防止镭针插植时癌细胞扩散, 同时可消除炎症, 使病灶缩小, 边界清楚, 便于镭针植入。作者认为, 镭疗剂量以 8,000~9,000 拉得为宜。(2) 镭针插植术后, 常规施行预防性颈淋巴结清除术, 可提高疗效。