

MAO 诊断试剂盒在肝硬化患者诊断中的应用效能分析

董丽刚¹ 邓 焯¹ (通讯作者) 金 花² 赵 晗¹

1. 内蒙古民族大学基础医学院医学技术教研室 内蒙古 通辽 028000

2. 内蒙古民族大学附属医院检验科 内蒙古 通辽 028000

【摘 要】目的：探讨自行研制的单胺氧化酶（MAO）速率法诊断试剂盒在肝硬化患者诊断中的应用效能。方法：采用酶促反应动力学法建立 MAO 速率法检测体系并制备诊断试剂盒，评估试剂盒的稳定性、线性范围、精密度及正常参考区间。选取肝硬化患者 90 例为实验组，健康体检者 90 例为对照组，检测两组血清 MAO 活性，通过受试者工作特征（ROC）曲线评估 MAO 对肝硬化的诊断效能。结果：研制的 MAO 速率法诊断试剂盒线性范围为 0~240 U/L，批内变异系数<5%，批间变异系数<10%，2~8℃条件下可稳定保存 72 h，正常参考区间为 16~48 U/L。肝硬化组血清 MAO 活性为（175.6±7.50）U/L，显著高于正常对照组的（43.9±3.40）U/L（ $P<0.05$ ），肝硬化组约为对照组的 4 倍。ROC 曲线分析显示 AUC 为 0.971（95%CI：0.948~0.994），以 48 U/L 为诊断截断值时，灵敏度为 91.1%，特异度为 92.2%。结论：研制的 MAO 速率法诊断试剂盒性能稳定可靠，对肝硬化具有良好的诊断效能，可作为肝硬化早期诊断的有效血清学指标。

【关键词】：单胺氧化酶；肝硬化；诊断试剂盒

DOI:10.12417/2705-098X.26.17.020

肝硬化是各类慢性肝病终末阶段的常见结局，全球年死亡约 100 万例，我国乙肝相关肝硬化约占 60%，酒精性与非酒精性脂肪性肝病所致者占比逐年增加^[1]。肝纤维化早期具有可逆性，故早期诊断对改善预后至关重要。

目前临床常用手段各有不足：肝功能生化指标对早期纤维化敏感性低，腹部超声在纤维化早期缺乏特征征象，瞬时弹性成像设备昂贵且基层普及率低，肝穿刺活检有创且易取样误差^[2]。传统血清 MAO 检测需手工操作，耗时长，难以适配自动化批量检测^[3]。

本研究基于酶促动力学原理建立 MAO 速率法检测体系并研制试剂盒，评估其对肝硬化的诊断效能。

1 材料与方法

1.1 研究对象

实验组：选取 2023 年 10 月至 2024 年 8 月在内蒙古民族大学附属医院和通辽市医院确诊的肝硬化患者 90 例，男性 46 例，女性 44 例，年龄 36~61 岁，平均年龄（50.5±4.5）岁。

纳入标准：符合《肝硬化诊治指南》诊断标准^[4]，经肝功能、腹部彩超、临床症状及体征综合确诊，不合并胆囊炎、胆囊结石等其他肝胆疾病。

排除标准：合并恶性肿瘤、妊娠或哺乳期、临床资料不完整者。

对照组：同期健康体检者 90 例，男性 48 例，女性 42 例，年龄 31~60 岁，平均年龄（48.5±5.5）岁，肝功能、彩超、血常规均正常，无肝脏疾病相关症状体征。

两组性别、年龄差异无统计学意义（ $P>0.05$ ），具有可比性。

1.2 标本采集与处理

所有研究对象于清晨空腹采集肘静脉血 2.5 ml，置于含肝素抗凝剂的真空采血管中。采血后将采血管置于 37℃温水浴箱中孵育，待血清充分析出后以 3000 r/min 离心 10 min，分离上层血清，分装于无菌 Eppendorf 管中，置于 -86℃超低温冰箱保存待测。所有标本严格避免溶血，溶血标本不予纳入^[5]。

1.3 主要仪器与试剂

主要仪器：Acroset 2000 全自动生化分析仪（美国雅培公司）、SPX-150-Z 型生化培养箱（上海跃进）、B600-A 型低速离心机（白洋）、FORMAT-86℃超低温冰箱（Thermo）、EK-120 型电子天平（日立）、KHB ST-360 型酶标仪（上海科华）、TG12M 型高速离心机（湖南凯达）。

作者简介：

第一作者：姓名：董丽刚，出生年月：1979.09，性别：男，民族：汉族，籍贯：内蒙古通辽，学历：硕士研究生，职称：讲师，研究方向：临床检验诊断学。

通讯作者：姓名：邓焯，出生年月：1988.10，性别：女，民族：汉族，籍贯：内蒙古通辽，学历：硕士研究生，职称：讲师，研究方向：临床检验诊断学。

第二作者：姓名：金花，医院：内蒙古民族大学附属医院，科室：检验科。

第三作者：姓名：赵晗，单位：内蒙古民族大学基础医学院-医学技术教研室。

课题项目：2023 年度人兽共患疫情防控自治区高等学校重点实验室开放基金项目；课题名称：MAO 诊断试剂盒的研制及对肝硬化病人诊断价值的研究；课题编号：MDK2023014。

主要试剂：反应基质为单胺（对苄胺偶氮-β-萘酚），缓冲溶液为 1 mol/L Tris-HCl（pH 7.4），稳定剂为甘油，防腐剂为叠氮钠，除干扰制剂为羟胺。

1.4 MAO 速率法检测体系的建立与试剂盒制备

检测原理：MAO 催化单胺类底物氧化脱氨生成相应的醛、H₂O₂和 NH₃，NH₃在α-酮戊二酸和 NADPH 存在下经谷氨酸脱氢酶催化生成谷氨酸和 NADP⁺，通过连续监测 340nm 波长处 NADPH 吸光度下降速率计算 MAO 活性。

计算公式： $U/L = \Delta A / \min \times 10^3 \times VT / (6.22 \times Vs)$

经酶促反应动力学法系统优化，确定最佳反应条件：反应温度 37℃，最适 pH5.6，测定波长 340nm，最适底物对苄胺偶氮-β-萘酚（浓度 0.5mmol/L），测定时间 120s，延迟时间 60s，反应方向为逆反应，血清样本量 30μl，试剂用量 150μl。

试剂配制：

（1）1mol/L Tris-HCl（pH7.4）：称取 121.1g Tris 溶于 800ml 去离子水，浓盐酸调 pH 至 7.4，定容至 1000ml，灭菌后室温保存。

（2）0.5mmol/L 对苄胺偶氮-β-萘酚基质液：称取 13.8mg 加入 20ml Tris 缓冲液水浴加热溶解，定容至 100ml，弃不溶物，4℃保存。

（3）10%过氯酸：取 60%过氯酸 8ml 加蒸馏水稀释至 50ml。

（4）对苄胺偶氮-β-萘酚标准液（100nmol/ml）：精密称取 2.77mg，无水乙醇溶解并稀释至 100ml，4℃保存。

1.5 试剂盒性能评价

稳定性试验：MAO 试剂复溶后置于 2~8℃保存，分别于复溶后 0、1、2、3、4 d 测定吸光度值，评估稳定性。

线性范围试验：取 MAO 活性 320 U/L 的高值血清进行梯度稀释（40、80、120、160、200、240、280、320 U/L），各浓度重复测定 3 次，确定线性范围。

精密度试验：批内精密度取高（210 U/L）、中（160 U/L）、低（115 U/L）三个水平血清各重复测定 20 次计算 CV；批间精密度取一份血清用 20 个批次试剂各测定 1 次计算 CV。

正常参考区间：以 90 例健康体检者检测结果建立 95%可信区间。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 26.0 进行数据分析，计量资料以均值±标准差（ $\bar{x} \pm s$ ）表示，两组比较采用独立样本 t 检验，P<0.05 为差异有统计学意义。ROC 曲线分析采用 SPSS 软件绘制，计算 AUC 及其 95%置信区间，以约登指数最大法确定最佳诊断截断值，并计算灵敏度、特异度、阳性预测值及阴性预测值。

2 结果

2.1 试剂盒稳定性

MAO 试剂复溶后于 2~8℃保存 0、1、2、3 d 时吸光度值分别为 0.10、0.11、0.12、0.12，差异无统计学意义（P>0.05）；第 4 天升至 0.49，与前 3 d 差异有统计学意义（P<0.05）。表明试剂复溶后在 2~8℃可稳定保存 72 h，应在 3 d 内完成检测。

2.2 试剂盒线性范围

不同浓度 MAO 样本测定结果显示，活性在 40~240 U/L 范围内吸光度值与浓度呈良好线性关系；浓度超过 240 U/L 后吸光度趋于平台期。确定线性范围为 0~240 U/L，为正常参考值上限的 5 倍，超范围样本需稀释后重测。

2.3 试剂盒精密度的正常参考区间

批内精密度试验结果见表 1，三个不同浓度水平的批内 CV 均小于 5%。批间精密度试验结果显示批间 CV<10%。精密度良好，符合临床检验标准。

表 1 MAO 检测批内精密度试验结果

血清活性值(U/L)	均值(U/L)	标准差(s)	变异系数 CV(%)
210	209.13	4.253	1.27
160	159.73	2.056	0.97
115	114.60	1.121	1.45

90 例健康体检者血清 MAO 检测结果呈近似正态分布，以 95%可信区间确定正常参考范围为 16~48 U/L。

2.4 两组 MAO 活性比较

肝硬化组与正常对照组血清 MAO 活性测定结果见表 2。肝硬化组 MAO 活性为（175.6±7.50）U/L，正常对照组为（43.9±3.40）U/L，肝硬化组约为对照组的 5.2 倍，差异有统计学意义（t=21.37，P<0.05）。肝硬化组 MAO 升高率达 91.1%（82/90）。

表 2 正常对照组与肝硬化组血清 MAO 活性比较

组别	例数	MAO 活性(U/L, $\bar{x} \pm s$)	P 值
正常对照组	90	43.9±3.40	—
肝硬化组	90	175.6±7.50	<0.05

2.5 ROC 曲线分析

以 MAO 活性绘制诊断肝硬化的 ROC 曲线，AUC 为 0.971（95%CI: 0.948~0.994）。以 48 U/L 为截断值时，灵敏度 91.1%，特异度 92.2%，约登指数 0.833，阳性预测值 92.1%，阴性预测值 91.2%（见表 3 及图 1）。

表 3 MAO 诊断肝硬化的 ROC 曲线分析结果

AUC	95%CI	截断值 (U/L)	灵敏度 (%)	特异度 (%)	约登指 数
0.971	0.948~0.994	48	91.1	92.2	0.833

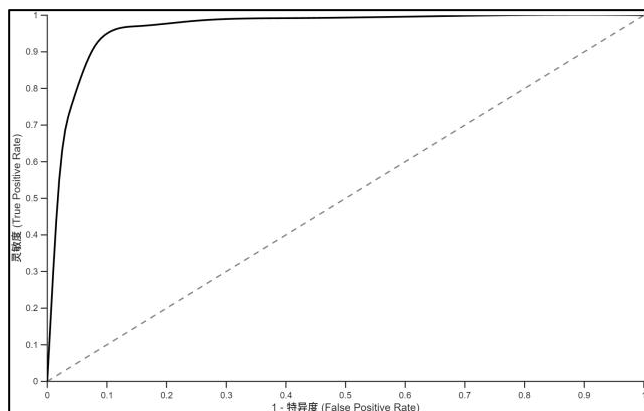


图 1 MAO 诊断肝硬化的 ROC 曲线

3 讨论

肝硬化是各种慢性肝病进展至终末阶段的常见病理状态，全球每年因肝硬化及其并发症死亡的人数高达百万^[6]。在我国，病毒性肝炎仍为主要病因，但随着生活方式的改变，酒精性肝病和非酒精性脂肪性肝病所致肝硬化的发病率亦呈逐年上升趋势。肝纤维化早期具有可逆性，因此肝硬化早期诊断对于改善患者预后、延缓疾病进展至关重要^[7]。然而，目前临床常用诊断手段存在明显局限：常规肝功能生化指标在反映肝纤维化程度方面特异性和敏感性均不理想，难以满足早期诊断需求；影像学检查如腹部彩超在肝纤维化早期缺乏特征性表现，瞬时弹性成像设备成本较高且对操作者依赖性较强，尚未在基层广泛普及；肝穿活检虽为诊断金标准，但因具有创伤性、取样误差及依从性差等缺点，难以作为常规筛查和动态监测手段^[8]。因此，寻找一种简便、快速、准确且易于推广的血清学检测指

标，对于提高肝硬化早期诊断率具有重要的临床意义。

基于酶促反应动力学原理，建立了单胺氧化酶（MAO）速率法检测体系并研制了配套临床诊断试剂盒。通过系统优化反应条件，确定了最佳反应温度、pH 值、底物浓度及检测波长等关键参数，使检测时间从传统手工法的 30~40 分钟大幅缩短至 2~3 分钟，且可适配于各类全自动生化分析仪，显著提升了检测效率。性能评价结果显示，该试剂盒线性范围宽（0~240 U/L），批内变异系数小于 5%、批间变异系数小于 10%，精密度优良；在 2~8℃ 条件下可稳定保存 72 小时，为临床日常使用提供了充足的时间窗口。临床应用方面，本研究纳入 90 例肝硬化患者和 90 例健康对照者，结果显示肝硬化组血清 MAO 活性为（175.6±7.50）U/L，显著高于对照组的（43.9±3.40）U/L，升高率达 91.1%。ROC 曲线分析显示，MAO 诊断肝硬化的曲线下面积（AUC）高达 0.971，以 48 U/L 为诊断截断值时，灵敏度和特异度分别为 91.1% 和 92.2%，表明该指标具有极高的诊断效能。上述结果充分证实，MAO 速率法诊断试剂盒不仅性能稳定可靠，而且能有效弥补传统检测方法在速度和准确性上的不足，为肝硬化早期筛查及辅助诊断提供了新的技术手段。

综上所述，本研究研制的 MAO 速率法诊断试剂盒操作简便、性能稳定、诊断价值确切，具有良好的临床应用前景和社会效益。但本研究仍存在一定局限性：首先，样本量相对有限且为单中心研究，结论的普适性有待扩大样本量及多中心验证加以确认；其次，本研究为横断面设计，未能动态观察 MAO 在肝硬化进展及治疗过程中的变化规律；此外，未按肝硬化病因及 Child-Pugh 分级进行亚组分析，也未与瞬时弹性成像或肝纤维化四项等标志物进行头对头比较。未来研究可进一步扩大样本来源，开展前瞻性纵向研究，探讨 MAO 联合其他血清学指标或影像学方法对肝硬化诊断及预后评估的协同价值，从而更全面地服务于临床诊疗决策。

参考文献：

- [1] 赵晨,姜美玲,邱懿雯.肝纤维化血清学和影像学诊断的研究进展[J].国际消化病杂志,2024,44(1):13-16+35.
- [2] 周鑫,王智,何雪茹,等.潜在抗肝纤维化药物与靶点相关信号通路研究进展[J].临床肝胆病杂志,2023,39(12):2932-2941.
- [3] 周泳威,丁桂贤,刘勇波.血生化指标联合血清酶指标检测对肝硬化的诊断价值[J].深圳中西医结合杂志,2023,33(22):84-86+137.
- [4] 中华医学会肝病学分会.肝硬化诊治指南[J].中华肝脏病杂志,2019,27(11):846-865.
- [5] 吕绮,郑琳,高国生,等.慢性肝病患者超氧化物歧化酶、甘氨酸脯氨酸二肽氨基肽酶、单胺氧化酶检测的临床价值研究[J].中国卫生检验杂志,2022,32(21):2578-2582.
- [6] 欧阳建华,黄善臣,胡峰,等.血清多生化指标联合检测在肝脏疾病诊断中的价值分析[J].黑龙江中医药,2022,51(5):108-110.
- [7] 王华国,林胜.血清 MAO、5'-NT 及 SAA 联合检测在肝脏疾病诊断中的应用价值[J].标记免疫分析与临床,2021,28(3):423-426.
- [8] 余书武.三种血清标志物在肝硬化早期诊断中的应用价值[J].检验医学与临床,2013,10(4):433-434.