**Thesis** Intestinal Alkaline Phosphatase Isoforms in Healthy Thai Serum and Its Relation to ABH Secretor Status

**Author** Miss Saowarak Teankaow

**Degree** Master of Science (Medical Technology)

**Thesis Advisory Committee** Associate Professor Rujapa Nimsung Chairperson
Lecturer Dr. Phennapha Klangsinsirikul Member

## ABSTRACT

**Background:** Human alkaline phosphatase (ALP; EC 3.1.3.1) comprises four related isoenzymes, the tissue non-specific (TNAP), intestinal (IAP), placental (PLAP) and germ-cells ALP (GCAP). The IAP isoenzyme is found approximately 25% of total ALP (TALP) activity in human serum. The increased IAP activity in serum was observed in liver cirrhosis, chronic renal failure and various diseases of the digestive tract. Since, the IAP isoenzyme appears more frequently in the circulation of blood group B or O secretors than in non-secretors and other blood groups, therefore it is interesting for research study to investigate the diagnosis value of IAP isoenzyme in serum in relation to ABH secretor status.

**Objective:** The purpose of this study was to investigate the TALP and IAP isoform activities in healthy Thai sera in relation to ABO blood group and secretor status. The carbohydrate side chains of IAP isoforms in sera of all blood groups with secretor status were also investigated in order to differentiate the IAP isoforms from other ALP isoenzymes. Another purpose was to estimate the average values (Mean ± SD) of IAP isoforms in fasting normal serum of B or O blood groups in relation to ABH secretor status.

**Materials and Methods:** In this study, 89 normal subjects, 19-67 years of ages, were randomly selected from healthy subject volunteers who come for health check-up program, performed by the Community Service, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University. Blood and saliva samples were collected for blood group typing and evaluating of secretor status, respectively. Aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

(ALT) activities were determined in all serum samples to rule out the liver disease. Total serum ALP activities were measured by kinetic method using 2-Amino-2-methyl-propanol (AMP) buffer and ρ-nitrophenylphosphate (PNPP) substrate in Shimadzu UV-2450 UV-Visible Spectrophotometer. The ALP isoenzymes in serum samples were separated by PAGE method and stained with 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate. Western blot technique was also used to confirm results obtained from the PAGE method.

**Results:** AST and ALT in all serum samples were within the reference range. TALP activities determined at fasting stage in sera of B or O secretors (N = 47) were significantly different from those of B or O non-secretors (N = 29) ($p < 0.001$). However, all of the TALP activity data in both groups were remained within the reference range (40-125 U/L at 37 °C). There was no effect of ages on total serum ALP activity within group of B or O secretors and B or O non-secretors. The PAGE patterns of ALP isoenzyme separation in B or O secretor sera showed at least one tissue nonspecific ALP isoenzyme band and three bands of IAP isoforms. Total IAP activities in sera of B or O secretors and non-secretors were 9.7 ± 4.64 U/L and 0.9 ± 0.42 U/L (Mean ± SD), respectively. The difference between the means of total IAP activity of both groups was statistically significant at $p < 0.0001$. The NIAP and HIAP activities in sera of B or O secretors and B or O non-secretors separated by PAGE were compared. The NIAP activity in serum of B or O secretors was significantly higher than that observed in serum of B or O non-secretors [2.4 ± 0.92 U/L vs 0.9 ± 0.42 U/L (Mean ± SD)], respectively ($p < 0.0001$). Moreover, the HIAP isoform was only found in sera of B or O secretors by the PAGE method.

It was demonstrated that there were three bands of IAP isoform detection by the Western blot analysis. One band of normal molecular weight, NIAP, demonstrated the molecular mass at 75 kDa and two bands of high molecular mass, HIAP, with the molecular mass of 135 kDa and 250 kDa, respectively. The ratios of HIAP and NIAP in B or O secretors was statistically higher than that found in sera of B or O non-secretors [1.3 ± 0.22 vs. 0.8 ± 0.12 (Mean ± SD), $p < 0.0001$].

**Discussion:** The Western blot analysis which used to confirm the detection of IAP isoforms in serum was more sensitive than the PAGE method in detection of HIAP isoforms in sera of B or O non-secretor. The appearances of the IAP isoforms were related to ABO blood group and secretor status. At fasting stage, the HIAP is more abundant than NIAP in sera of B or O secretors and was higher than those of B or O non-secretors and other blood groups. The ratio of Mean ± SD value of IAP isoform activity in serum of B or O secretors obtained from this research study can be applied to use in monitoring colon cancer disease which was previously investigated in this laboratory.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

| | |
|---|---|
| **ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์** | อินเทสทินอลอัลคาไลน์ฟอสฟาเทสไอโซฟอร์มในซีรัมคนไทยปกติและความสัมพันธ์ต่อสถานะการหลั่งสาร เอ บี เอช |
| **ชื่อผู้เขียน** | นางสาวเสาวรักษ์ เทียนขาว |
| **ปริญญา** | วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) |
| **คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์** | รศ. รุจาภา นิ่มสังข์ ประธานกรรมการ<br>อาจารย์ ดร. เพ็ญนภา คลังสินศิริกุล กรรมการ |

## บทคัดย่อ

**ภูมิหลัง:** เอนไซม์ Alkaline phosphatase (ALP, EC 3.1.3.1) ที่พบในซีรัมคนปกติประกอบด้วย 4 ไอโซเอนไซม์ ได้แก่ tissue non-specific (TNAP), intestinal (IAP), placental (PLAP) และ germ cells ALP (GCAP) ในซีรัมคนปกติมี IAP isoenzyme อยู่ประมาณ 25% ของระดับ ALP activity รวม (TALP) พบ activity ของเอนไซม์ IAP มีระดับสูงขึ้นในซีรัมของผู้ป่วยโรคตับแข็ง โรคไตวายเรื้อรัง และโรคต่างๆ ในระบบทางเดินอาหาร เนื่องจากมักพบเอนไซม์ IAP ในซีรัมของคนที่มีหมู่เลือดบีและโอ ที่มีสถานะการหลั่งสารมากกว่าที่ไม่มีสถานะการหลั่งสารและในหมู่เลือดอื่นๆ ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจที่จะทำการศึกษาวิจัยเพื่อหาแนวทางการนำ IAP isoenzyme มาใช้ช่วยวินิจฉัยโรคโดยคำนึงถึงสถานะการหลั่งสาร เอ บี เอช ด้วย

**วัตถุประสงค์:** เพื่อตรวจหา activity ของ TALP และ IAP isoforms ในซีรัมคนไทยปกติที่มีหมู่เลือดบีหรือโอ ที่มีสถานะการหลั่งสาร เอ บี เอช เทียบกับที่ไม่มีสถานะการหลั่งสาร และหาความแตกต่างของสายคาร์โบไฮเดรทที่ติดอยู่บนโมเลกุลของ IAP isoforms ในซีรัมคนไทยที่มีหมู่เลือดต่างๆ โดยคำนึงถึงสถานะการหลั่งสาร เพื่อแยก IAP isoforms ออกจาก ALP isoenzymes ชนิดอื่นๆ นอกจากนี้ยังทำการศึกษาหาค่าเฉลี่ย (Mean ± SD) ของ IAP isoform activityในซีรัมคนไทยปกติที่มีหมู่เลือดบีหรือโอที่มีสถานะการหลั่งสารเทียบกับที่ไม่มีสถานะการหลั่งสาร

**วิธีการทดลอง:** การศึกษาครั้งนี้ได้เลือกเก็บตัวอย่างเลือด และน้ำลายแบบสุ่ม จากอาสาสมัครที่มีสุขภาพแข็งแรง จำนวน 89 ราย ซึ่งมีอายุระหว่าง 19-67 ปี โดยตัวอย่างเลือดและน้ำลายดังกล่าวเก็บจากอาสาสมัครที่มาตรวจสุขภาพซึ่งจัดทำโดยงานบริการวิชาการชุมชนของคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ตัวอย่างเลือดและน้ำลายนำมาตรวจหาหมู่เลือดและสถานะการหลั่งสารตามลำดับ จากนั้นนำตัวอย่างเลือดทั้งหมดมาตรวจคัดกรองภาวะโรคตับโดยตรวจหาเอนไซม์ของตับ 2 ชนิด คือ Aspartate aminotransferase (AST) และ Alanine aminotransferase (ALT) การตรวจหา TALP activity ทำโดยวิธี kinetic ซึ่งทำใน 2-Amino-2-methyl-propanol (AMP) buffer และ ใช้ ρ-nitrophenylphosphate (PNPP) เป็นสับสเตรท ปฏิกิริยาการทดลองทำที่ 37$^{O}$C ในเครื่อง Shimadzu UV-2450 UV-Visible Spectrophotometer สำหรับการตรวจแยกชนิดของ ALP

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

isoenzyme ทำโดยวิธี PAGE และย้อม activity ของเอนไซม์ด้วย 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate จากนั้นตรวจยืนยันจำนวนของ IAP isoforms ในซีรัมที่มีหมู่เลือดบีหรือโอ ที่ทราบสถานะการหลั่งสาร และหาน้ำหนักโมเลกุลของ IAP isoforms โดยวิธี Western blot analysis

**ผลการทดลอง:** การตรวจคัดกรองภาวะโรคตับทำโดยการตรวจเอนไซม์ของตับ พบว่าค่าเฉลี่ยของ AST และ ALT activity ในซีรัมของกลุ่มตัวอย่างที่ไม่คำนึงถึงสถานะการหลั่งสารอยู่ในช่วงปกติ ค่าเฉลี่ยของค่า TALP activity (U/L)ในซีรัมคนปกติที่มีหมู่เลือดบีหรือโอ ที่มีสถานะการหลั่งสาร จำนวน 47 ราย แตกต่างจากค่าเฉลี่ยของระดับ TALP activity ในซีรัมคนปกติหมู่เลือดบีหรือโอ ที่ไม่มีสถานะการหลั่งสารจำนวน 29 ราย อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.001$ อย่างไรก็ตามพบว่าค่าของ TALP activity ในซีรัมของตัวอย่างทั้ง 2 กลุ่มยังอยู่ในช่วงปกติ (40-125 U/L, ที่ 37 °C) และพบว่าอายุในแต่ละกลุ่มตัวอย่างไม่มีผลต่อระดับค่า total ALP activity ในซีรัมของกลุ่มตัวอย่างที่มีหมู่เลือดบีหรือโอ ที่มีสถานะการหลั่งสารและไม่มีสถานะการหลั่งสาร จากการแยก ALP isoenzymes โดยวิธี PAGE ในซีรัมคนปกติที่มีหมู่เลือดบี หรือโอ ที่มีสถานะการหลั่งสาร พบว่าอย่างน้อยมี TNAP 1 แถบ และ IAP isoforms 3 แถบ ระดับของ total IAP activity ในซีรัมของคนปกติหมู่เลือดบีหรือโอ ที่มีสถานะการหลั่งสาร และที่ไม่มีสถานะการหลั่งสาร มีค่าเท่ากับ 9.7± 4.64 U/L และ 0.9 ± 0.42 U/L (Mean ± SD) ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.0001$ ในการศึกษาเปรียบเทียบถึงระดับ activity ของ NIAP และ HIAP isoforms ที่แยกโดยวิธี PAGE ในซีรัมคนปกติที่มีหมู่เลือดบีหรือโอ ที่มีสถานะการหลั่งสาร และไม่มีสถานะการหลั่งสาร พบว่า NIAP activity ในซีรัมของคนปกติหมู่เลือดบีหรือโอ ที่มีสถานะการหลั่งสารสูงกว่าระดับ NIAP activity ในซีรัมของคนปกติที่มีหมู่เลือดบีหรือโอ ที่ไม่มีสถานะการหลั่งสารอย่างมีนัยสำคัญ [ 2.4 ± 0.92 U/L vs 0.9 ± 0.42 U/L (Mean ± SD)]ที่ $p < 0.0001$ นอกจากนี้โดยวิธี PAGE จะตรวจพบ HIAP isoforms ในซีรัมของคนที่มีหมู่เลือดบีหรือโอ ที่มีสถานะการหลั่งสารเท่านั้น

การตรวจยืนยันรูปแบบของ IAP isoforms ในซีรัมโดยวิธี Western blot พบว่ามี IAP isoforms ถึง 3 แถบ ประกอบด้วย normal molecular weight IAP (NIAP) ขนาด 75 kDa และ high molecular mass IAP (HIAP) 2 isoforms ขนาด 135 kDa และ 250 kDa ตามลำดับ อัตราส่วนของ HIAP/NIAP ในซีรัมคนปกติหมู่เลือดบีหรือโอ ที่มีสถานะการหลั่งสาร เท่ากับ 1.3 ± 0.22 ซึ่งสูงกว่าคนปกติหมู่เลือดบีหรือโอ ที่ไม่มีสถานะการหลั่งสาร ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.8 ± 0.12 อัตราส่วนของค่าเฉลี่ยของ IAP isoforms ทั้ง 2 isoforms มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.0001$

**วิจารณ์ผลการทดลอง:** เทคนิค Western blot ซึ่งใช้ในการตรวจยืนยันการตรวจพบ IAP isoforms ในซีรัมมีความไวกว่าวิธี PAGE เนื่องจากสามารถตรวจพบ HIAP ในซีรัมของคนที่ไม่มีสถานะการหลั่งสารได้ การปรากฏของ IAP isoenzyme ในซีรัมคนไทยปกติมีความสัมพันธ์กับหมู่เลือด เอ บี โอ และสถานะการหลั่งสาร ในภาวะงดอาหารพบว่ามี HIAP ปริมาณมากเมื่อเทียบกับ NIAP ในซีรัมของคนที่มีหมู่เลือดบีหรือโอ ที่มีสถานะการหลั่งสารและมากกว่าคนที่มีหมู่เลือดบีหรือโอที่ไม่มีสถานะการหลั่งสาร และหมู่เลือดอื่นๆ ประโยชน์ที่ได้รับจากการศึกษาวิจัยนี้คือ อัตราส่วนของ Mean ± SD ของ IAP isoforms ในซีรัมของคนที่มีหมู่เลือดบีหรือโอ ที่มีสถานะการหลั่งสาร สามารถนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ในการแสดงภาวะการเป็นโรคมะเร็งลำไส้ที่ได้ทำการศึกษามาแล้วในห้องปฏิบัติการแห่งนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved