

受体结合法与荧光偏振免疫法测定 环孢素 A 血药浓度的比较*

李芳秋 张中书 许瑞吉 储小曼¹ 周燕¹ 武建国

(南京军区南京总医院全军医学检验中心,¹ 国家卫生部临床药理基地, 南京 210002)

摘要 建立了测定全血中环孢素 A(CsA)浓度的受体结合法,并与荧光偏振免疫法(FPIA)进行比较。用环孢素 A 的重组受体亲环素 A 作为结合蛋白,³H-CsA 作示踪剂,活性炭吸附分离结合的与游离的两相,测定结合相的放射性。测定了 30 例肾移植患者 CsA 血药浓度并与 FPIA 的结果进行比较。受体结合法的有效测定范围为 501600 ng/ml,变异系数批内为 8.2%($n=8$),批间为 10.6%($n=6$),测定结果与 FPIA 法相关($r=0.96$, $P<0.001$)。测定 CsA 的受体结合法灵敏、特异、重复性和稳定性好,测定结果与 FPIA 法相关,适用于临床血药浓度的测定。

关键词 环孢素 A; 亲环素 A; 受体结合法; 荧光偏振免疫法; 血药浓度监测

环孢素 A(cyclosporine A, CsA)是真菌来源的十一环肽,具有强大的免疫抑制活性,现常规用于防治器官移植后排斥反应和治疗多种自身免疫性疾病。CsA 的药动学在个体内和个体间差异很大,有效治疗浓度范围狭窄,并常引起严重毒副作用如肾毒性和高血压,用药期间必须定期监测血药浓度^[1,2]。临床常规监测 CsA 血药浓度的方法有放免法(RIA),荧光偏振免疫测定法(FPIA)等^[3]。我们利用 CsA 受体蛋白亲环素 A(cyclophilin A, CyPA)能在体内外与 CsA 特异结合的活性,用基因重组人 CyPA(rhCyPA)作结合蛋白,以³H-CsA 作示踪剂,建立了测定 CsA 血药浓度的受体结合法,并与荧光偏振免疫法(FPIA)进行比较。结果表明,受体结合法特异性强,敏感性好,稳定可靠,测定结果与 FPIA 相关,可用于临床测定 CsA 血药浓度。

1 材料与方法

1.1 重组人亲环素 A(rhCyPA)的制备

rhCyPA 为本实验室利用基因重组技术制备^[4]。重组菌可溶性蛋白经 50%饱和硫酸铵沉淀和 DEAE Sepharose CL-6B 柱层析纯化后备用。

1.2 试剂

CsA 标准品 (Sigma),³H-CsA (code TRK904, 2.96×10^{11} Bq/mmol, Amersham),牛血清白蛋白

(BSA)、二硫赤藓糖醇(DTE)、Tween 20、活性炭均购自 AMRESCO 公司,乙腈(色谱纯),其它试剂均为分析纯。荧光偏振免疫测定法的试剂盒购自 Abbott 公司。

1.3 仪器

FJ-2010 液体闪烁计数仪,为西安 262 厂产品。荧光偏振免疫测定仪(TDx),Abbott 公司。

1.4 标本的处理

自 30 例常规服用 CsA 的肾移植患者静脉抽取血样(肝素抗凝),反复冻融使之完全溶血。取血样 0.5 ml,先加乙腈 0.1 ml,混匀,再在旋涡震荡下加乙腈 1 ml,继续震荡 5 min,2000 r/min 离心 10 min,取上清 1 ml 在 37℃ 下空气吹干,加 60%乙醇 0.3 ml 溶解,取 50 μ l 用于测定。

1.5 受体结合法

参照 Steiner^[5] 等方法加以改进。CsA 标准品用 60%乙醇配制。示踪剂³H-CsA 和 rhCyPA 工作液用 Tris-DTE 缓冲液(0.3 mol/L Tris-HCl, 1.5 mmol/L DTE, 0.3 mol/L 硫酸铵, 0.2 g/L BSA, 0.2 ml/L Tween 20, 0.2 g/L NaN₃, 100 ml/L 乙醇)。将待测样品 50 μ l 与³H-CsA (20 00030 000 cpm)工作液 100 μ l 混合,各管补加 Tris-DTE 100 μ l,再加适当稀释的 rhCyPA 100 μ l,置冰浴反应 30 min。在反应物中加活性炭溶液 250 μ l(20 g/L,含 0.5 g/L Dextran

* 收稿日期 1999-02-26 江苏省自然科学基金资助项目(BK97174)

T70, 混悬于 Tris-DTE 中), 混匀, 置冰浴 5 min, 立即离心(2000 r/min, 5 min), 取上清 400 μl 与闪烁液 5 ml 混合, 次日用液闪计数器进行放射性测定。实验中均采用双管平行操作, 取均值计算。

闪烁液的配制: 2, 5-二苯基恶唑(PPO)4 g/L, 2, 2'-对苯撑双(5-苯基恶唑)(POPOP)0.1 g/L, 乙醇 20 ml/L, 溶剂为二甲苯。

1.6 荧光偏振免疫法测定
按试剂盒说明书进行。

2 结 果

2.1 标准曲线

受体结合法(RBA)测定 CsA 的标准曲线如图 1)。以最大结合率管(B_0)的计数为 1, 其余各管数据的均值与其进行比较(B/B_0)。在 501600 ng/ml 范围内, CsA 浓度与 B/B_0 有良好的线性关系, 回归方程为: $Y=1719.3-24.6X$, $r=0.92$ 。

2.2 精密度

方法的非特异吸附率为 $6.3\% \pm 1.2\%$ 。取高、中、低三种浓度的样品, 每种各测 8 只复管, 批内变异系数(CV)为 8.2%; 在 1 个月内重复测定 6 次, 批间 CV 平均为 10.6%。

2.3 灵敏度

以同批次多管($n=10$)测出方法的检测下限为 43.75 ng/ml。

2.4 回收率

将 CsA 标准品加入抗凝全血中, 配制成 240 ng/ml 和 764 ng/ml 二种浓度, 按全血标本的处理方法提取后测定, 各测 6 只复管, 结果标本提取和测定方法的全程回收率分别为 104%和 106%。

2.5 稳定性

将实验用的全套试剂置于 4℃存放, 于 45 天内标准曲线无明显漂移, 最大结合率及非特异吸附无明显改变。

2.6 RBA 与 FPIA 测定结果的比较

30 例肾移植患者血药浓度分别用 RBA 和 FPIA 测定, RBA 试剂测定值范围为 92.6811.5 ng/ml, FPIA 试剂测定值范围为 67.1766.2 ng/ml, 两法测定值的 $\bar{x} \pm s$ 分别为 309.4 ± 178.4 ng/ml 和 276.3 ± 173.9 ng/ml, 两法测定值相关(图 2)($r=0.96$, $P<0.001$)。

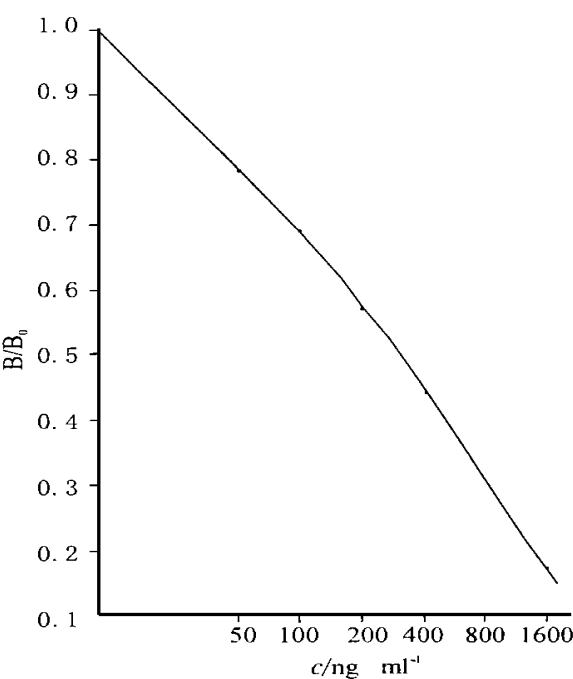


Fig 1. Standard curve of receptor binding assay of cyclosporine A

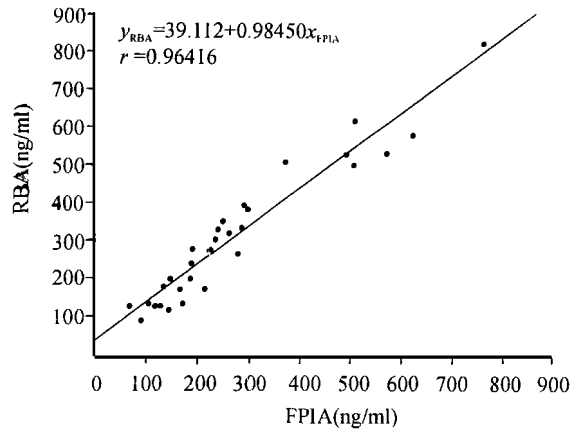


Fig 2. Correlation of blood concentration of CsA measured with RBA and FPIA

3 讨 论

CyPA 是 CsA 的主要细胞内受体, 存在于人体各种组织的细胞质中, 是由 165 个氨基酸组成、分子量约 18 kD 的一种蛋白质。CsA 在体内与 CyP 结合形成复合物, 再与钙调磷酸酶(calcineurin)相互作用, 从而阻断 T 细胞的激活, 达到免疫抑制^[6]。在体外 CyPA 对 CsA 也有很强的特异亲和力^[7]。本项研究表明, rhCyPA 在体外实验中对 CsA 高度特异的亲和力, 及其稳定性, 完全可以代替 CsA 抗体, 作为测定 CsA 方法中的结合蛋白。

CsA 在体内代谢产生 10 余种代谢产物, 其中许多具有药理作用, 可达原型药物活性的 0%~100%^[8]。有活性的代谢产物能象 CsA 一样与 CyP 结合。代谢产物也可对人体产生毒、副作用^[9]。因此, 在进行 CsA 治疗的监测时, 不仅要测定原型药的浓度, 还应该充分考虑有生物活性的 CsA 代谢产物所产生的免疫抑制活性和可能的毒、副作用。受体结合法不仅能测出 CsA 原型药, 同时还可测出其代谢产物^[5, 7, 9], 能提供药动学和药效学之间有意义的联系, 有望改善 CsA 治疗的监测。这一方法的建立, 也为 CsA 血药监测试剂的国产化打下基础。

参 考 文 献

1 Fahr A. Cyclosporin clinical pharmacokinetics. *Clin Pharmacokin*, 1993 **24**: 472
2 Morris RG, Tett SE, Ray JE. Cyclosporin A monitoring in Australia: consensus recommendations. *Ther Drug Monit*, 1994 **16**: 570

3 Kivisto KT. A review of assay methods for cyclosporin. *Clinical implications*. *Clin Pharmacokin*, 1992, **23**: 173
4 李芳秋, 赵 权, 武建国, 等. 重组人亲环素 A 的表达、纯化和活性鉴定. *微生物学报*, 1998, **38**: 211
5 Steiner G, Kullinger B, Mayer G, *et al.* Determination of cyclosporine by a competitive binding assay with cyclophilin. *Clin Chem*, 1991, **37**: 3403
6 李芳秋综述, 单祥年, 武建国 审校. 免疫亲和素与蛋白折叠、信号传导及免疫抑制的关系. *国外医学分子生物学分册*, 1997, **19**: 126
7 Husi H and Zurini MGM. Comparative binding studies of cyclophilins to cyclosporin A and derivatives by fluorescence measurements. *Analytical Biochem*, 1994, **222**: 251
8 Soldin SJ. Receptor (immunophilin-binding) assay for immunosuppressive drugs. *Ther Drug Monit*, 1995, **17**: 574
9 Huupponen R, Hirvisalo EL, Neuvonen P. Comparison of cyclophilin binding assay and radioimmunoassay in monitoring of blood cyclosporine. *Ther Drug Monit*, 1997 **19**: 446

Comparison of Specific Receptor Binding Assay and Fluorescence Polarization Immunoassay in Monitoring of Blood Cyclosporine A

Li Fangqiu, Zhang Zhongshu, Xu Ruiji, Chu Xiaoman¹, Zhou Yan¹, Wu Jianguo
Center of Medical Laboratory Sciences of PLA, ¹Base of Clinical Pharmacology of the National Ministry of Health, Jinling Hospital, Nanjing 210002

Abstract A specific receptor binding assay for the determination of cyclosporine A (CsA) in whole blood was developed and the results with standard fluorescence polarization immunoassay (FPIA) were compared. The recombinant human cyclophilin A (rhCyPA) served as the binding protein with the use of ³H-CsA as the tracer and charcoal adsorption for separating bound and free tracer and the radioactivity of the bound was determined. The results were compared with FPIA in 30 samples taken from renal allograft recipients for therapeutic drug monitoring. The receptor binding assay could detect CsA at the range of 501600 ng/ml. CVs were 10.6% for interassay and 8.2% for intra-assay. The results obtained with two methods were related closely with each other ($r=0.96$, $P<0.001$). The specific receptor binding assay is a sensitive, reproducible and stable method with high correlation to FPIA and is clinically useful for measuring CsA in whole blood.

Key words Cyclosporine A; Cyclophilin A; Receptor-binding assay; Fluorescence polarization immunoassay; Therapeutic drug monitoring