

· 思路与方法学 ·

血栓素B₂[¹²⁵I]放射免疫分析及其应用

解放军总医院基础所生化研究室 杨梅芳 汪 钟* 黄如松* 马三元 董小军

血栓素A₂(TXA₂)和前列环素(PGI₂)为两种作用截然相反的活性物质,在生理状态下两者维持动态平衡,当平衡破坏时可能导致血小板聚集、血栓形成、血管痉挛等病理改变,这常常是临床血栓证发生发展的重要原因。

体内这两种物质极不稳定, TXA₂可迅速降解为血栓素B₂(TXB₂), PGI₂则分解为6-酮-前列腺素F_{1α}(6-keto-PGF_{1α})。通过放射免疫分析(RIA)测定TXB₂和6-keto-PGF_{1α}含量可以反映其前身物质TXA₂与PGI₂的体内水平。本文建立了用¹²⁵I标记TXB₂RIA,并进行了初步应用。

实验结果表明: TXB₂抗血清特异性高,与PGF_{2α}、PGE_{1α}、PGE₁、PGA₁、6-keto-PGF_{1α}、PGB₁、13,14,2H,15-keto-PGF_{1α}等7种前列腺素的交叉反应均<0.42%,用此TXB₂抗血清做10条标准曲线,测定范围为2.50~160pg/管,0pg管结合率为34.8±1.4%(M±SD),抗血清亲和常数为2.44×10¹⁰L/mol,冷回收率为94.7±7.0%~106±13.1%,批内变异6.4%,批间变异11.8%。上述各放射免疫测定指标均达到RIA要求。同时采用国产¹²⁵I和英国Amersham公司生产的¹²⁵I标记TXB₂,所测得的比活性、结合率、非特异结合均相近似。

用本法测定了17例正常人血浆TXB₂含量,其值

为143.5±8.8pg/ml,14例正常人尿液TXB₂含量为229.9±14.4pg/min,8例冠心病患者血浆TXB₂值为245.4±38.0pg/ml,11例心肌梗塞患者尿液TXB₂值为472.4±72.4pg/min,上述样品同时还用³H-TXB₂RIA进行测定,二者相关良好。此外,还测定了口服阿斯匹林(0.3g,2次/日,共3日)前和后的正常人血浆和尿液(剂量减半)TXB₂含量,其值分别为256.8±21.1和179.5±12.2pg/ml,229.0±14.4和163.0±23.6pg/min,与文献报告结果相符。

此外,我们还应用 [¹²⁵I]-TXB₂、 [¹²⁵I]-6-keto-PGF_{1α} RIA观察了大鼠口服脑益嗪(200mg/kg)和静脉注射毛冬青甲素(25mg/kg)后血小板生成TXB₂及主动脉环生成6-keto-PGF_{1α}含量的影响。结果表明:脑益嗪对大鼠血小板生成TXB₂和主动脉环生成6-keto-PGF_{1α}的水平与生理盐水对照组相比无明显差异。毛冬青甲素组大鼠血小板生成TXB₂水平明显低于生理盐水对照组,其值分别为0.37±0.03ng/10⁹血小板及2.68±0.36ng/10⁹血小板,而对主动脉环生成6-keto-PGF_{1α}含量虽有轻微的抑制作用(毛冬青甲素组6-keto-PGF_{1α}值为5.84±1.29ng/mg/3min,生理盐水对照组为7.90±0.98ng/mg/3min),但两组之间相比无明显差异。因此,毛冬青甲素是环加氧酶抑制剂,还是TXA₂合成酶抑制剂,尚待进一步研究。

6-酮-前列腺素F_{1α}[¹²⁵I]放射免疫分析及初步应用

解放军总医院基础所生化研究室 汪 钟* 李振甲 朱国强* 安 岩* 胡艳华*

建立用 [¹²⁵I] 6-酮-前列腺素F_{1α}(6-keto-PGF_{1α})放射免疫分析法对研究血栓证及活血化瘀药物与前列腺素的关系具有重要的意义。我们用 [¹²⁵I] 标记6-keto-PGF_{1α}、制备6-keto-PGF_{1α}抗血清,建立了 [¹²⁵I] 6-keto-PGF_{1α}放射免疫分析法,并用这种方法进行了人体及动物实验,结果表明6-keto-PGF_{1α}抗血清亲和常数为1.48×10¹⁰L/mol,0pg管结合率为35.0±6.69%,与PGA、PGB、PGD、PGF_{1α}、15-keto-PGF_{1α}、PGF_{2α}及TXB₂的交叉反应均<0.5%。样品测定的最小检测值为10.0pg/管,批内变异系数为

8.1%,批间变异系数为8.9%,回收率为101±12.2~110±26.8%。用此方法测得17名正常人血浆6-keto-PGF_{1α}平均值为204.6±12.2pg/ml,27名正常男性尿液6-keto-PGF_{1α}平均值为319.6±25.4pg/ml,14名正常人服用阿斯匹林,每日2次,每次0.3g,共3天,服药前后血浆6-keto-PGF_{1α}含量的平均值分别为218.9±20.1和134.6±6.1pg/ml。另14名正常男性服阿斯匹林,每日1次,每次0.3g,共3天,服药前和后留取尿样,其6-keto-PGF_{1α}平均值分别为275.4±42.2和159.8±25.2pg/ml。动物实验结果表明:正常家兔血浆6-keto-PGF_{1α}含量为375.0±159.2pg/ml,而高胆固醇血症家兔含量为286±46.8

*中国医学科学院基础医学研究所药理室

pg/ml, 体外实验中取20块大小相同的兔主动脉组织, 分成两组, 对照组(10块)在1 ml含有花生四烯酸(终浓度10 μmol/L)的Tris-HCl缓冲液中, 于37°C孵育30分钟, 药物组将动脉块放入1 ml含消炎痛(终浓度20 μmol/L)和相同浓度花生四烯酸的Tris-HCl缓冲液中, 37°C孵育30分钟, 孵育液中6-keto-PGF_{1α}含量分别为1.23±0.1 ng/mg组织和0.49±0.07 ng/mg组织。

在药物研究方面, 为了探讨中药对花生四烯酸代谢途径中几种酶活性的影响, 首先我们以山羊精囊和花生四烯酸(AA)为原料, 生物合成了前列腺素内过氧化物, 经硅胶柱层析纯化, 并利用前列腺素内过氧化物在氯化亚锡(SnCl₂)作用下完全转变成前列腺素F_{2α}的原理以及同位素示踪法, 对合成的前列腺素内过氧化物进行了鉴定与定量, 其纯度可达90%, 生物合成转换率为34%。我们分别以AA和合成的前列腺素内过氧化物为底物, 以猪肺微粒体供给酶, 探讨了活血化瘀中药当归与川芎的有效成份阿魏酸钠和秃毛冬青的有效成份3,4-二羟基苯乙酮(DHAP)对AA环加氧酶代谢途径中环加氧酶、TXA₂合成酶、PGI₂合成酶活性的影响。结果表明: 以AA为底物时, 阿魏酸钠(剂量为10~600 μg/ml)明显抑制TXB₂的生成, 而对6-keto-PGF_{1α}的生成没有明显影响, 但以前列腺素内过氧化物为底物时, 阿魏酸钠(剂量为10~150 μg/

ml)也明显抑制TXB₂的生成, 而对6-keto-PGF_{1α}的生成不仅没有降低, 还有所增加, 与已知的TXA₂合成酶抑制剂吡唑的作用相似。提示阿魏酸钠也是一种特异性的TXA₂合成酶抑制剂。此外, 实验结果还表明DHAP与阿魏酸钠的作用不同, 以AA为底物, DHAP(剂量为50~400 μg/ml)对TXB₂和6-keto-PGF_{1α}的生成均有明显的抑制, 而以前列腺素内过氧化物为底物, DHAP(剂量为50~400 μg/ml)对TXB₂和6-keto-PGF_{1α}的生成均无影响; 与已知的环加氧酶抑制剂消炎痛的作用相似, 提示DHAP是一种特异的环加氧酶抑制剂, 对TXA₂合成酶、PGI₂合成酶无影响。以上研究表明, 前列腺素内过氧化物的合成和(¹²⁵I)6-酮-前列腺素F_{1α}及血栓素B₂放射免疫法(RIA)的建立, 对于研究血瘀证及活血化瘀药的作用机理将起重要作用。

此外, 我们同时用³H-6-keto-PGF_{1α} RIA对上述部分样品进行了测定, 结果表明: 两种RIA所测得的值相关良好, 其回归方程的相关系数非常显著。我们还分别用国产¹²⁵I和Amersham公司生产的¹²⁵I标记6-keto-PGF_{1α}, 结果发现: 二者的比活性、结合率及非特异性结合均近似, 符合RIA要求, 因此可以用国产¹²⁵I代替进口¹²⁵I。

活血化瘀法治疗小儿过敏性紫癜29例

中国中医研究院西苑医院儿科 魏佑莲 郭 薇

我科于1980~1987年应用活血化瘀法治疗29例过敏性紫癜住院患儿, 效果较好, 现报告如下。

临床资料 29例患儿中男16例, 女13例, 年龄4~13岁。入院时病程1天~4个月。合并紫癜性肾炎15例。临床表现有皮肤瘀斑、瘀点, 关节肿痛, 腹痛, 呕吐, 呕血, 便血, 舌质紫暗或舌体瘀点。

治疗方法 属热盛血瘀型21例, 治以清热解毒、凉血活血。方选犀角地黄汤合银翘散加减: 水牛角、生地、丹皮、赤芍、银花、连翘、黄芩各10g等为主药。属瘀血阻络型8例, 治以活血通络。方选桃红四物汤加减: 桃仁、红花、川芎、赤芍、丹皮、鸡血藤、生地各10g, 木香6g等为主药。加减: 皮肤紫癜反复发作者加地肤子、蝉衣各10g; 关节肿痛甚者加牛膝、防己各10g; 腹痛甚者加元胡3~6g, 木香、陈皮各6g; 便血者加地榆炭、侧柏炭各10g; 蛋白尿、血尿明显者加益母草、白茅根各10g。紫癜性肾炎后期多兼有肾气虚衰征象, 故予以益气补肾、活血化瘀治疗。

选用活血化瘀药加六味地黄汤加减: 丹皮、熟地、川芎、丹参、茯苓、泽泻、山药、山萸肉、生地各10g等。以上诸药均为每日1剂, 分2~3次内服, 连用2~3周, 无效者更方, 有效者继服至痊愈。

结果 疗效判定以皮肤紫癜全部消退, 腹痛及关节肿痛消失, 尿常规及爱迪氏计数正常, 大便潜血试验阴性者为临床痊愈; 皮肤紫癜全部消退, 无腹痛及关节肿痛, 尿爱迪氏计数正常, 或尿蛋白及红细胞减少(++)以上, 大便潜血试验阴性者为好转; 病情无明显变化或尿蛋白(++)以上者为无效。皮肤紫癜、关节肿痛及腹痛、便血等症状、体征消失较快, 最短3~4天, 最长者1个月, 平均13天。紫癜性肾炎15例中, 尿常规及爱迪氏计数检查, 7例1~2周转阴, 4例1~2个月转阴, 3例3~5月转阴, 1例服药24天无效, 改用其它方法治疗, 平均疗程44天。其中痊愈8例, 好转6例, 无效1例; 余14例均临床痊愈。总有效率为96.5%。