

# 兔血浆中肾素活性与血管紧张素 II 的放射免疫测定

陆以信 张 昀 吴士渭

(上海市高血压研究所)

肾素 (R)——血管紧张素 (AT) 系统不仅存在于人体,而且也存在于各种动物中。各种动物之间、动物与人之间血浆中不仅 R、AT 含量不等,而且 AT 原、AT 酶、可能存在的激活或抑制因子等,在性质及浓度上也不相同。因而,对人血浆的测定方法照搬于动物血浆测定是不适当的。

在已建立的人血浆中 AT II<sup>[2]</sup>及肾素活性<sup>[1]</sup> (PRA) 的放射免疫测定中,我们均使用了双抗体分离技术,并曾用于狗、大白鼠的血浆测定。但对兔血浆中 AT II、AT I 作直接测定时,随着待测兔血浆的加入,同时引进了大量的兔血浆丙种球蛋白,这样,原法所使用的羊抗兔丙种球蛋白血清(双抗体 AAb)就完全不够量了,以至兔抗 AT 抗体结合的 <sup>125</sup>I-AT 不能定量沉淀。如果一味增加 AAb 量,不仅耗费过大,而且非特异性结合值也势必升高,因而并无实用价值,在实验研究中,家兔是一种常用动物,我们将人血浆测定法作改进用于兔血浆 RA 及 AT II 测定中。文中介绍各改进之处,余依原法<sup>[1,2]</sup>。

## 一、葡聚糖包裹活性炭 (DCC) 分离法的确立

(一) DCC (1.25%) 的配制 活性炭 2.5 克,用低速离心法,以蒸馏水漂洗三次,除去不能沉淀的微粒。葡聚糖(分子量 90,000) 250 毫克,溶于 200 毫升 0.1M 磷酸盐缓冲液 (pH7.6, 含洗必太 0.002%),将二者混合,充分搅拌半小时,存 4℃。

(二) DCC 最适加入量的确定 制备标准曲线中的零标准管 (St<sub>0</sub>) 及无抗体管 (Ab<sub>0</sub>) 二组,加入不同体积 DCC 悬浮液,观察抗体结

合与游离 <sup>125</sup>I-AT 的分离效率,表明使用 Norit A 配制的 DCC 时,各测定管中加入 1.0 毫升已足以达到完全分离的效果。

(三) 加入 DCC 后至离心的适当时间 一分钟内已完成吸附过程,以 2—5 分钟内离心即可。

(四) 孵育液中正常兔血浆含量对分离效果的影响 在所用条件下,当每管总体积为 2 毫升孵育液中的正常兔血浆量不超过 0.3 毫升时,对分离效果无明显影响。

(五) DCC 分离法的操作及 b/f 计算 依常规法加样孵育<sup>[1,2]</sup> 约二天后,各管中注入 1 毫升 1.25% DCC 悬浊液,4℃ 混匀,2—5 分钟内冷离心(5000g) 5 分钟(4℃ 离心),吸除上清液,碳粉沉淀在单道 γ 谱仪中测每分钟脉冲数(cpm),代表游离的标记抗原 AT\*(F),以含 AT\* 的无抗体管 (Ab<sub>0</sub>) 被 DCC 吸附后的碳粉沉淀计数为总计数 (T) (通常为加入 AT\* 计数的 92—98%)。依下式计算结合与游离 AT\* 的比值:

$$b/f = (T - F) / (F - G) \quad (G \text{ 为仪器本底计算})$$

由样品管 b/f 值,查标准曲线即得相应 AT 微微克,再以测定样品体积校准,即得每毫升所含 AT 微微克值。

## 二、DCC 分离法的竞争抑制曲线与双抗体法比较

(一) 竞争抑制曲线及与双抗体分离法的比较 当以  $\frac{b/f}{b_0/f_0} \%$  对 AT 加入量作图时, DCC

\* 最小检出量,指与“0”标准能区别一个标准差的 AT 微微克 (P = 0.05)。

RIA, 即 Radioimmunoassay

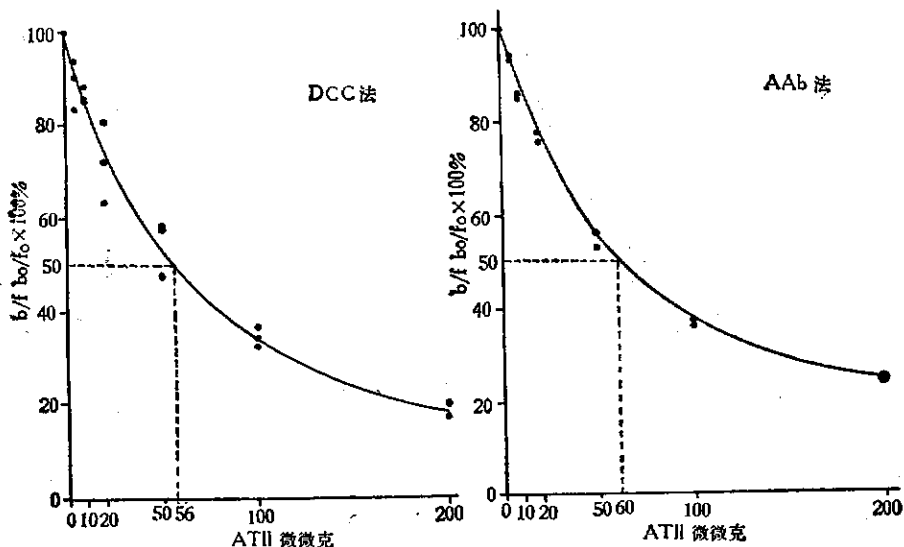


图1 DCC 法测 ATII 时标准曲线与 AAb 法比较

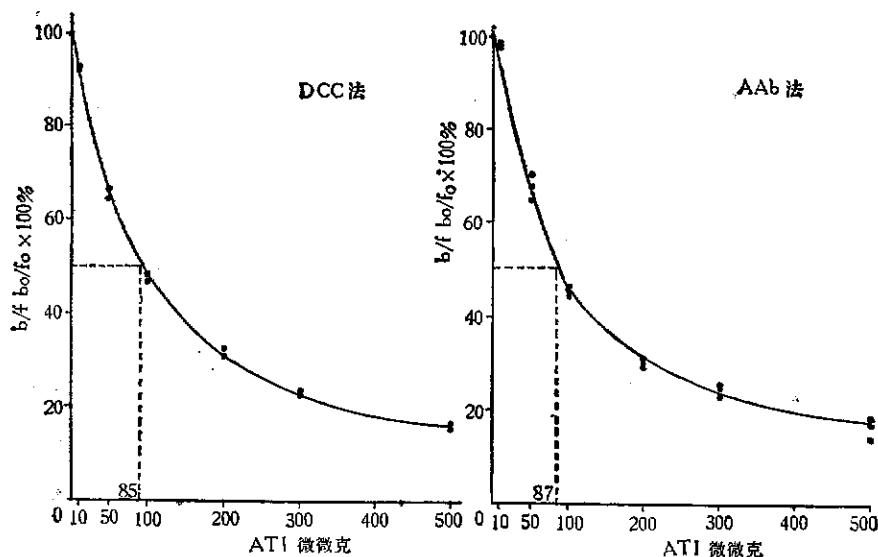


图2 DCC 法测 ATI 时标准曲线与 AAb 法比较

法与 AAb 法所得的二条竞争抑制曲线几乎可以重合(见图1及图2)。

(二) DCC 法的竞争抑制曲线达到的指标(见表1)

由表1可见, DCC 法代替 AAb 分离法能灵敏可靠地测定兔血浆中 AT 量。

$B_0I_{50}$ , 即产生  $S_0$  结合率被抑制 50% 时相应的标准 AT 微微克

精度 %, 计算在各剂量标准时各个测定管

计数与该剂量时平均计数的百分误差, 再予以平均。

表1 DCC 分离法 AT RIA 标准曲线的灵敏度和平均百分精度(平均值±标准差)

RIA	统计标准曲线数	最小检出量(微微克)	$B_0I_{50}$ (微微克)	精度 %
ATII	3	$5.17 \pm 2.93$	$41 \pm 16.8$	$1.53 \pm 0.69$
ATI	10	$6.0 \pm 4.2$	$81.8 \pm 20.6$	$1.01 \pm 0.44$

### 三、兔血浆中 AT II 浓度测定法及正常值

(一) 采血 兔在安静状态下, 切开耳外缘静脉, 血滴入已加有 4.44% Na<sub>2</sub>·EDTA (收集血量的 1/44 体积) 的抗凝管中, 立即混匀后投入冰水浴中, 4℃ 离心分得血浆, 按血浆体积 (V) 再加入 1/100 的 0.3M Na<sub>2</sub>·EDTA, 1/50 的 0.3M 8-羟基喹啉, 1/100 的 0.32M 的二巯基丙醇, 置 -20℃ 保存待测。

(二) 测定 测定时每测定管中加含有酶抑制剂的兔血浆 0.3 毫升, 并以 DCC 法作分离技术, 余同人血浆法<sup>[1]</sup>, 查得值乘以 10/3, 再乘以 1.06, 即得每毫升兔血浆含 AT II 的微克数 (1.06 为稀释因数)。

(三) 正常值 大白兔 11 只, 各 2 次测定 AT II, 得 103.6 ± 44.4 微微克/毫升血浆 (平均值 ± 标准差)。

### 四、兔血浆肾素活性测定

#### (一) 37℃ 体外孵育条件的确定

1. 酶抑制剂对 AT I\* 与抗 AT I 结合的影响: 依 AT I RIA 的条件, 加入浓度为 0—2.5 [I] 的混合酶抑制剂 25 微升 (以兔血浆 RA 测定法中抑制剂浓度为 [I]), 对 St<sub>0</sub> 管的结合率没有见到影响 (见图 3)。

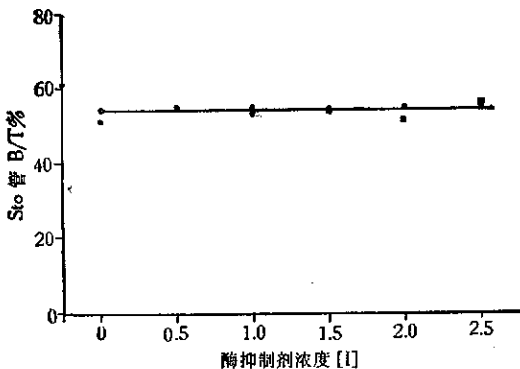


图 3 酶抑制剂浓度对 AT I\* 与抗 AT I 结合率的影响

2. 酶抑制剂浓度的确定——添加 AT I 回收试验: 以混合兔血浆, 分三组, 分别加入酶抑

制剂浓度为  $\frac{1}{2}$  [I]、[I] 及 2[I], 各添加不同量 AT I。每个血浆的一部分置 37℃ 孵育 20 分钟, 然后吸出少量作 AT I RIA, 另一部分留置 4℃, 不经 37℃ 孵育, 同样地测定作对照 (结果见图 4)。回收率以回归系数表示, 在 84—105% 之间, 当抑制剂浓度为 [I] 时, 37℃ 孵育后回收率为 102%, 较  $\frac{1}{2}$  [I] 时高。

3. 37℃ 孵育时间与 AT I 产生量的线性关系: 取 4 只家兔及一份混合兔血浆, 依常规处理, 加酶抑制剂至 [I] 及  $\frac{1}{10}$  体积 4M 的 Tris·HCl (pH 7.4) 缓冲液, 测定 37℃ 孵育期间各个时间时孵育液 AT I 浓度, AT I 产生的速率在 60 分钟期间内基本不变 (见图 5)。

(二) 测定方法及计算 依兔血浆 AT II 测定法同样采血及分离血浆, 加入各酶抑制剂 [I], 保存于 -20℃。测定时取出, 冰水浴中融化, 吸取 0.2—0.5 毫升, 加入  $\frac{1}{10}$  体积的 4M Tris·HCl 缓冲液 (pH 7.4), 吸出双份 25 微升不经 37℃ 孵育作 RIA, 供对照, 余血浆在 37℃ 水浴中孵育 20 分钟, 再吸出双份 25 微升作测定, AT I RIA 定量似兔 AT II 法, 以 DCC 作分离。计算公式:

$$PRA \text{ (AT I 微微克/毫升} \cdot \text{小时)} = \frac{[\text{微微克}(37^\circ\text{C}) - \text{微微克}(4^\circ\text{C})] \times 1000 \times 60}{1000 \times 25 \times 20 \times a}$$

式中微微克 (4℃) 为 4℃ 对照管测得 AT I 量  
微微克 (37℃) 为 37℃ 孵育管测得 AT I 量  
a 为血浆稀释因数, 常规法中为  $\frac{1}{1.18}$

#### (三) 方法学鉴定

1. 准确性 外加 AT I, 经整个 PRA 测定后, 可以基本定量回收 (见上述), 表明在本测定中已基本排除了 AT 酶及其他非特异性因素的干扰。

#### 2. 重复性

(1) AT I 的 RIA 测定批内误差: 从五批连续测定中, 各抽取首五个兔血清 PRA 测定

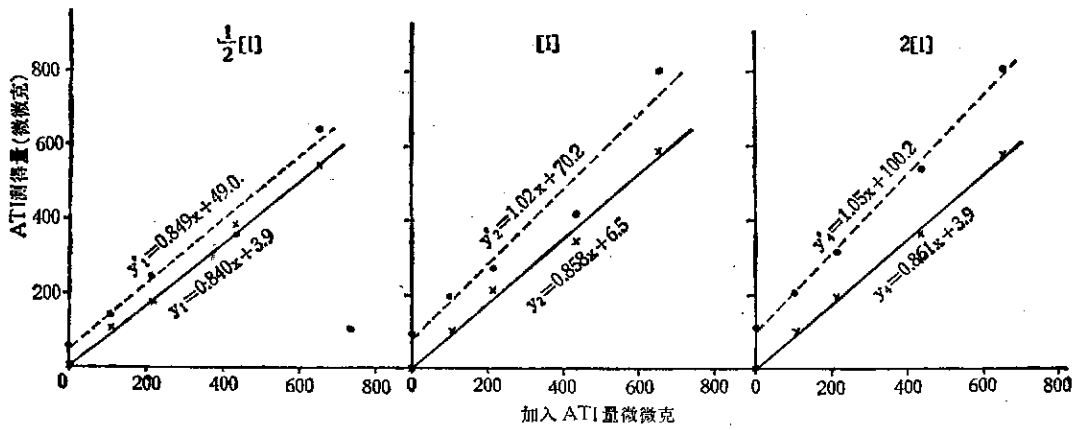


图4 酶抑制剂效应——添加 AT I 回收试验

[I] 代表在兔血浆 PRA 测定时所用酶抑制剂浓度 ×—× 0°C 孵育对照，  
○—○ 37°C 孵育 20 分钟

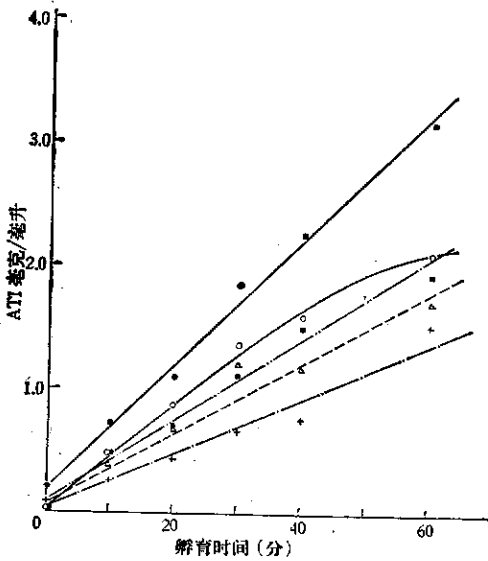


图5 孵育产生 AT I 的时间效应

管,统计其复管间百分误差 (设各对复管碳粉沉淀计算为  $CP_{m_1}$  及  $CP_{m_2}$ , 则其百分误差 =  $\frac{CP_{m_1} - CP_{m_2}}{CP_{m_1} + CP_{m_2}} \times 100\%$ )。对 25 只兔血浆的  $4^\circ\text{C}$  对照管为  $0.824 \pm 0.52(\%)$ ;  $37^\circ\text{C}$  孵育后为  $0.682 \pm 0.52(\%)$ 。显示出批内误差很小。

(2) PRA 测定批间误差: 同份兔血浆, 2 个月期间 6 批测定值为  $5.2 \pm 0.89$  (AT I 微微克/毫升·小时), 变异系数(C、V)为 17.1%。PRA 测定的是酶活性, 手续繁多, 与已往报道比, 可认为方法的重复性较好。

(3) 血浆的贮存条件: 曾发现  $\text{Na}_2\cdot\text{EDTA}$  抗凝兔血浆, 即使贮于  $-20^\circ\text{C}$ , 随时间延长, PRA 仍有升高趋势, 文献也有类似报告。我们改变为分得血浆后, 即加入各酶抑制剂至 [I] 浓度, 再贮于  $-20^\circ\text{C}$ , 未再见此种升高。因而这个改进是必要的。

3. 兔肾动脉狭窄后 (手术后) PRA 升高 (内部资料)

(四) 家兔 PRA 正常值 (单位 AT I 微微克/毫升·小时)

正常大白鼠, 雄性, 2.3—3.5 公斤/只,  $7.39 \pm 5.43$  (平均值  $\pm$  标准差, 108 只兔)。

## 五、小 结

在本所人血浆测定法基础上, 建立了兔血浆中血管紧张素 II 及肾素活性的 RIA 技术, 用葡聚糖涂复活性碳法代替双抗体法分离结合与游离的  $^{125}\text{I}$  标记血管紧张素, 确定了合适的分离条件。在肾素活性测定中, 使用较人血浆法浓度高一倍的混合酶抑制剂, 它完全地抑制了血管紧张素酶活力, 有效地保护了当  $37^\circ\text{C}$  孵育时产生的血管紧张素 I;  $37^\circ\text{C}$  孵育时间缩短至 20 分钟, 既保证 PRA 与 AT I 产生速率间的正比关系, 又扩大了可测定的范围。这两个改进后的方法在灵敏度、重复性和正确性等方面较好, 可供有关研究中使用。

(下转第34页)