

免疫分析法在治疗药物监测中的应用

卫生部临床检验中心 黄培生

编者按：治疗药物监测 (Therapeutic Drug Monitoring, 简称TDM) 是最近十年来临床治疗学中发展较为迅速领域之一。对于某些治疗剂量范围较窄的药物, 通过对病人血液或其他体液中药物浓度的监测, 随时掌握药物在体内的变化, 可使临床用药更趋于合理化和个体化, 借以避免或减少药物的不良反应, 从而达到安全治疗的目的。

TDM的理论基础是临床药理学、药效学和药物动力学。通过血药浓度监测为确定给药方案、选择最佳剂量、时间间隔和预测药物的累积毒性提供依据。进行此项工作必须有灵敏和精确的监测方法, 因为血液内药物浓度往往很低, 一般化学方法不易测出。目前较多应用色谱法, 但技术要求较高, 需专人掌握, 而免疫学方法测定血内药物浓度有现成试剂盒, 一般临床实验室较易掌握, 为普及推广TDM工作创造了条件。本文对免疫分析法中常用的放射免疫分析、酶免疫分析、荧光免疫分析等方法作了全面介绍, 可供参考。TDM工作必须有临床药师、临床医师、临床药理医师、临床检验师等共同参加, 密切配合及协作, 才能推广开展, 进一步提高临床药物治疗的水平。

通过测定体液特别是血清(浆)中的药物浓度, 在临床上进行治疗药物监测 (therapeutic drug monitoring, 简称TDM), 可使临床用药做到个体化, 减少或避免药物毒副作用的发生, 提高药物的临床治疗效果。自1968年用放射免疫分析法测定体液中的洋地黄毒甙以来⁽¹⁾, 测定体液药物浓度的免疫分析法陆续建立起来, 并制出测定药盒, 促进了TDM的发展。

免疫分析法的基本原理是抗原-抗体反应, 此反应通常不能用肉眼观察结果, 也不能直接检测, 需要在反应系统中加入一个标记的反应物, 以便示踪观察结果。常用于测定血药浓度的免疫分析法的标记物有放射性同位素、酶(包括辅酶、酶的作用基质)和荧光剂(包括荧光物、荧光团)。其测定技术分别称放射免疫分析(RIA)、酶免疫分析(EIA)及荧光免疫分析(FIA)。其中RIA及和EIA应用较多。近年来FIA的应用日趋普遍。

TDM的免疫分析法的基本原理是竞争结合分析。除免疫酶分析法外, 在分析系统中有三种主要成分, 即(1)标本中的药物, (2)试剂中的标记药物及(3)抗体。标本及标准管中的药物(Ag)和试剂中的标记药物(*Ag), 作为抗原, 都与特异抗体(Ab)结合, 并互相竞争, 生成药物-抗体复合物(Ag-Ab及*Ag-Ab), 比较未标记药物对标记药物与抗体结合的抑制作用, 可求出被测药物的浓度。

根据测定时是否需要分离游离的标记药物和结合的标记药物, 免疫分析法可分为多相(heterogeneous)及匀相(homogeneous)两大类。多相免疫分析在测定前需将游离的标记药物与结合的标记药物分离; 而匀相免疫分析中标记的药物与抗体结合后, 标记物的性质发生改变, 故测定前无需进行分离。

一、放射免疫分析

RIA具有高的灵敏度, 能测定浓度可达

微微克 (μg , 10^{-12}g) 水平的药物。对成分复杂的样品如血液、唾液都能直接测定而无需作预先处理,且能同时进行大批标本测定。这些都是RIA的优点。如采用自动加液装置,测定结果的重现性会更好。

RIA需要将标记药物的游离部分和结合部分进行分离,然后测定。分离的技术有双抗体法、吸附法、化学沉淀法及固相法等。操作较繁杂,不易实行自动化。自1976年以后,虽然陆续有商品的全自动RIA分析仪,但在临床上应用还不够普遍。

RIA是根据免疫化学反应进行测定而不是直接测定被分析物。标本中被测药物的代谢物、与抗原类似的物质都可能与抗血清起交叉反应,标本中的其他干扰物可能与抗体呈非特异结合。反应中的pH也可能影响抗体与药物的结合。这些因素都可能给测定结果带来误差。

二、酶免疫分析

EIA的分析原理与RIA相似,但标记物不是放射性同位素而是一个稳定的对人体无害的酶,近年来还用酶作用的基质及辅酶。EIA有多相及匀相两类。

多相EIA:

酶可标记在抗原上,也可标记在抗体上。为了保持酶活性,分离游离及结合部分的酶标抗原或抗体多采用固相法。在经过洗涤后的固相上或与固相分离的上清液中测定酶活性。多相EIA有两种。

1. 竞争性酶免疫分析:酶标药物与标本中的药物共同争夺抗体上一定量的结合点,反应后将游离药物和药物-抗体复合物分离,测定游离或结合的酶标药物的酶活性。测定时需加入基质,有时还需加入抑制剂以终止酶反应。从测得的酶活性计算药物的浓度。

2. 免疫酶分析法:反应系统包括酶标抗体、固定在固相上的药物及标本中的药物三个组分。用过量的酶标抗体与标本中的药

物保温反应后,在混合液中加入过量的固定在固相上的药物与剩余的游离酶标抗体结合,然后分离,测定上清部分或固相部分的酶活性。上清部分的酶活性与标本中的药物浓度成正比;而固相部分的酶活性与测定的药物浓度成反比。

多相EIA的灵敏度可与RIA相媲美。测定结果与其他免疫方法相关较好,批内与批间的变异不大。但由于测定过程中要进行分离,且多数药物——小分子半抗原物质多可用匀相EIA,所以在体液药物浓度测定中较少采用。

匀相EIA:

匀相EIA在测定血清药物浓度中用得最多的是酶放大免疫测定技术(EMIT),其次为最近发展的用酶的作用基质为标记物来标记抗原(药物)的TDA。与多相EIA不同,匀相EIA不需要分离游离和结合抗原。

1. EMIT:1975年最早在美国应用,现在已用于代表这一类EIA的技术,也是美国Syva公司生产的作TDM测定药盒的注册名称。酶标记在药物分子上之后,活性并不降低。但酶标药物与抗体结合后,酶的活性受抑制而暂时失去活性。这是由于酶的催化部位与基质之间存在空间的阻挡或酶的结构上发生改变,酶的作用部位受到阻挡,基质不能与酶的作用点接触的缘故。在反应体系中血清标本的药物与酶标药物共同竞争抗体上有限数目的结合点。由于酶标药物与抗体结合后失去酶的活性,而未与抗体结合的酶标药物仍保持酶的活性。所以游离和结合两个部分不需进行分离,酶活力的大小与标本中药物浓度成正比。

目前用于标记药物的酶通常有溶菌酶、苹果酸脱氢酶和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶等。溶菌酶标记的药物与抗体结合后,酶的作用部位与基质之间的空间被阻断。用脱氢酶作标记物的情况较为复杂。例如用苹果酸脱氢酶标记吗啡,酶分子的赖氨酸残基与几个吗啡

组分以共价键结合。酶标吗啡与抗体结合后，引起酶的结构改变，呈灭活型。这种酶抑制作用是可逆的，当非标记药物与抗体结合而使标记药物从抗体复合物游离时，酶活性又可恢复。

EMIT药盒中，通常有两种试剂，试剂1含有抗体、酶作用基质和辅酶，试剂2含酶标药物和缓冲液。以抗癫痫药物苯妥英的EMIT药盒为例，用葡萄糖-6-磷酸脱氢酶作标记物，酶作用的基质为葡萄糖-6-磷酸，辅酶为烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD，即辅酶I)。测定时，标本与试剂1及2混合，标本中的药物与试剂2中的标记药物共同竞争与抗体结合，结合后标记酶活性受抑制而失活，余下的游离酶标药物与基质作用，并伴随有辅酶I(NAD)被还原生成还原辅酶I(NADH)。NADH在波长340nm有光吸收，而NAD则无光吸收，由反应液在340nm吸光值的增加，可以计算出标本中的药物含量。

一个酶分子能催化多个基质分子，从理论上说EMIT应是一个很灵敏的测定方法。但由于反应系统中的一些因素，如抗原-抗体结合的特点、试剂对酶促反应的干扰等，都可能影响测定的灵敏度，所以实际上EMIT的灵敏度一般比多相EIA低，但完全能满足临床TDM的要求，是目前临床上测定血药浓度应用最多的方法之一。

EMIT测定试剂保存期较长，药盒在冰箱内能保存半年以上，试剂溶解后在冰箱内能保存12周。测定周期短，一般在30分钟内可得结果。标本用量少，血清仅需3~50 μ l。仪器要求较简单，除一个能控温的紫外分光光度计或酶分析仪外，不需要特殊设备，容易实现自动化操作，特别适于离心式自动分析，便于成批测定。由于EMIT具有简便、快速、准确的特点，特别适于TDM的常规和急诊测定。其缺点是试剂昂贵，目前国内没有生产，必须依靠进口，测定的标准曲线

不够稳定，与其他免疫分析法一样，也不能同时测定几种药物。

2. 基质荧光标记酶免疫分析(SLF-IA)：这是一类与EMIT原理不同的匀相酶免疫分析，药物不是用酶标记，而是用经酶催化后能产生荧光的基质标记。其作用原理⁽²⁾：(1) 药物(Ag)与基质(F)结合，生成药物-基质结合物(F-Ag)。F既是一个酶的作用基质，同时也是一个经酶催化后能产生荧光的染料。F-Ag与酶作用前无荧光，经酶催化后产生荧光。(2) F-Ag与抗体(Ab)结合，生成一个复合物F-Ag-Ab，此复合物失去作为酶基质的作用，不能被酶催化。(3) 血清中的药物(Ag)与F-Ag共同争夺Ab上的结合点，生成Ag-Ab及F-Ag-Ab两种复合物。标本中药物浓度高，则生成F-Ag-Ab少，而游离的F-Ag较多，经酶作用后产生荧光较强。所以荧光生成的速率与被测药物浓度成正比。F-Ag-Ab复合物不能被酶催化，因此不需分离。

这种基质荧光标记酶免疫分析，目前已有测定茶碱、庆大霉素、妥布霉素、丁胺卡那霉素、苯巴比妥和苯妥英的商品药盒，是美国Amcs公司生产的TDA药盒。此种分析方法用的荧光基质标记药物，能被极微量的酶催化而被检出，提高了EIA的灵敏度。这类分析与真正的FIA不同，FIA的标记物为一个具有荧光的原子基团——荧光基团(fluorophore)。

3. 辅基标记免疫分析(PGLIA)⁽³⁾：也属于竞争结合分析。药物与辅基FAD(黄素腺嘌呤二核苷酸)以共价键结合进行标记。当标本中没有被测药物时，FAD标记药物与抗体结合形成标记药物-抗体复合物。这个复合物不能进行进一步的反应。如果标本中含有被测药物，则标本中的药物、标记药物互相竞争与抗体结合，结果有一部分的标记药物不能与抗体结合而呈游离状

态，游离标记药物量的多少与标本中的药物浓度成正比。辅基标记的药物与葡萄糖氧化酶（GOD）的酶蛋白组合成有活性的葡萄糖氧化酶，再与过氧化物酶偶联并与色原作用显色，显色速率与标本中的药物含量成正比。

目前已有苯碱、苯巴比妥、利多卡因及苯妥英测定试条，是医师、患者本人或家属均可使用的快速检测手段。

三、荧光免疫分析

FIA由于灵敏度高，测定周期短，试剂稳定，容易操作，特别适合于临床常规检验。近年来FIA发展很快，并用于测定血清或其他体液的药物浓度。与其他免疫分析一样，FIA亦有多相与匀相两类，但用在TDM，主要是匀相FIA。

1. 荧光偏振免疫分析（fluorescence polarization immunoassay, FPIA）^{〔4,5〕}：药物用荧光团标记，当一个偏振光面投入荧光标记的药物（抗原）时，如果分子长轴与光面平行，荧光团分子吸收偏振光最多，分子呈激发态。当激发的荧光团分子回到基态时，发射一个偏振荧光。

FPIA是根据荧光标记药物与抗体结合后荧光偏振的改变而进行测定的。当偏振荧光发射时，如果分子旋转，则发射偏振荧光减弱，偏振消除。偏振消除的程度与分子旋转的速率成正比，而分子旋转的速率又与物质的分子量的大小成反比，即分子越小，旋转速度越快，荧光偏振消除越多。测定时标本中的药物与荧光标记药物共同争夺抗体的结合点。荧光标记药物与抗体结合后，形成一个大分子复合物，旋转慢，容易接受偏振光的激发而发射荧光偏振；未与抗体结合的标记药物分子小，旋转快，荧光偏振消失。如标本中药物浓度低，与抗体结合形成复合物的数量少，则荧光标记药物与抗体结合成大分子的复合物数量多，被激发而发射偏振荧光强；如标本中药物浓度高，则发射的

偏振荧光弱。测定偏振荧光的强弱可以反映血清中药物的含量。

FPIA特别适于测定半抗原，能直接测定结合的荧光药物-抗体复合物而无须分离。近年来测定仪器有了很大改进^{〔6〕}，英国Abbott公司用一个液晶偏振器制成一个台式TDX药物浓度自动分析仪，适合于常规及急诊TDM分析。近两年来这种分析法在发达国家使用日益普遍。

2. 荧光增强与淬灭分析（fluorescence enhancement and quenching assay）：这种荧光免疫分析法用在免疫球蛋白及甲状腺激素等测定，在TDM测定上很少应用。

四、其他免疫分析法

近年来对发光免疫分析法研究较多，但多用于皮质醇及其他甾体类激素测定，在TDM方面没有广泛采用。

散射比浊匀相竞争结合分析法目前用于苯巴比妥及苯妥英测定^{〔7〕}。

微粒聚集免疫分析用于测定庆大霉素、妥布霉素，已有文献报道，用此法测定其他药物尚未见报道。

综上所述，免疫分析法在测定体液药物浓度上具有灵敏度高、操作简便、测定快速、标本用量少并能同时大批测定、可应用于自动化分析等优点，特别适于常规及急诊检验，同时亦可用于药物动力学的研究。但是抗体可能与药物的衍生物、分子结构与药物相似的化合物有交叉反应，影响测定的特异性。此外抗体如保存或处理不当，效价会下降或失效。同位素标记药物的半衰期短，容易衰变失效，这些都是免疫分析法的不足。

免疫分析法需要有特异性强、亲和力高的抗体，纯化的标记抗原，这些都要有一定的设备条件和技术条件，但不可能也没有必要每个实验室自己制备抗体和标记抗原，因此需要生产合格的测定试剂盒，使试剂商

品化、社会化。这对于免疫分析技术的普及和TDM的开展,是一个亟待解决的重要问题。

参考文献

- [1] Oliver GC, et al. The measurement of digitoxin in human by radioimmunoassay. Clin Invest 1968; 47: 1035.
- [2] Lim TM, et al. Homogeneous substrate-labelled fluorescent immunoassay for theophylline in serum. Clin Chem 1981; 27: 22.
- [3] Tsvhach et al. Adaptation of posthetic-group-label homogeneous immunoassay to reagent-strip format. Clin Chem 1981; 27: 1499.
- [4] Iodoy ME, et al. Fluorescence polarization immunoassay I. Monitoring aminoglycoside antibiotics in serum and plasma. Clin Chem 1981; 27: 1190.
- [5] Popolka SR, et al. Fluorescence polarization immunoassay II Analyzer for rapid precise measurement of fluorescencoc polarization with use of disposable cuvettes. Clin Chem 1981; 27: 1198.
- [6] Jolley ME, et al. Fluorescence polarization immunoassay III Automated system for therapeutic drug determination. Clin Chem 1981; 27: 1575.
- [7] Deaton CD, et al. Performance of nephelometric immunoassay for therapeutic drugs. Clin Chem 1981; 27: 1091.

(原载《中华医学杂志》)



· 文摘 ·

共用注射器是增加爱滋病发生率的因素之一

爱丁堡的医师认为,药房对针头和注射器使用的“非官方限制”可能是该市爱滋病毒广泛流行的一个重要因素。据报道,在爱丁堡市滥用静脉注射药物的人群中,已发现50%者有爱滋病毒的抗体。在英国和欧洲其他地区所报道的情况与上述情况极为相似。Robertson等报道纽约的情况也相同。他们报告了164名应用海洛因的爱滋病毒抗体的情况,其阳性率竟高达85%。

苏格兰家庭卫生部门的调查报告指出,共用注射器和针头的次数与抗体阳性率呈正相关。作者认为爱滋病毒在爱丁堡市迅速传播是由三个因素综合作用的结果:①几乎全部是静脉注射法使用海洛

因;②因当地得不到无菌器械而共用同一器械;③当地注射开业造成了病毒扩散的危险(尤其是共用一套注射器及针头超过20人次的人群)。

迄今,所调查的患者中尚无诊断为爱滋病者,但患有与爱滋病有关的疾病。Robertson等告诫,在爱滋病毒抗体流行尚不广泛,而常常共用注射器械的地区,为防止爱滋病毒的迅速传播,必须“直接干预”。

[P.J.《药学杂志》, 236 (6369) : 261, 1986 (英文)]

戴诗文摘 苏开仲校