DOI:10.16016/j.1000-5404.1992.05.025

技术与方法

中性粒细胞 LTB_4 及 5-HETE 测定的反相高效液相色谱法

张 敏 尤忠义 雷政宏 王凤君 (第三军医大学西南医院烧伤研究所) 630038

白三烯 B_4(Leukotriene B_4,LTB_4)和 5-羟二十碳四烯酸(5-hydroxyeicosatatraenioc acid,5-HETE)是花生四烯酸(AA)5-脂氧酶的代谢产物。LTB_4 具有促进白细胞游走、趋化、聚集和脱颗粒等作用[1~3],是炎症反应的重要介质。5-HETE 在炎症过程中的作用目前还不清楚,已发现它具有刺激嗜碱性粒细胞释放组织胺的作用[4]。因此,测定 LTB_4 及 5-HETE 的量,不仅能了解 AA5-脂氧酶的活性,而且对揭示它们在人类疾病中的作用,阐明疾病的发生机制,有一定的意义。

目前,测定白三烯的方法有气相-质谱联用,放射薄层扫描,放射免疫分析及反相高效液相色谱法(RP-HPLC)。RP-HPLC 法因分辨率和灵敏度高,重现性好等优点得到广泛应用。然而,目前所用 RP-HPLC 分析 LTB_4 及 HETEs 系列,多用线性梯度洗脱方式,操作较复杂,并且样品保留时间长。此外,在 LTB_4 及 5-HETE 的分离提取方法上,各家报道不一。我们在岳氏等人的方法[5]上加以改进,建立了测定白细胞 LTB_4 和 5-HETE 的 RP-HPLC 分析法。

1 材料与方法

1.1 实验仪器

Gilson 高效液相色谱系统:M-116 双波长紫外检测器,使用波长为 280nm 和 235nm。AUFS 为 0.03。ODS-C_{18}反相柱:10μm(4.6×250mm)。

1.2 试剂

LTB_4、5-HETE、PGB_2 标准品、Calcium ionophore A_{23187}、AA 均为美国 Sigma 公司产品,Percoll 细胞分离液(华美生物工程公司)。

1.3 白细胞 LTB_4 及 5-HETE 样品制备及 RP-HPLC

取家兔抗凝血,用 Percoll 液分离得中性粒细胞(其纯度>95%,活力>95%)。将所得中性粒细胞重悬于无钙的 Hank's 平衡盐液(HBSS,pH 7.4)中,调整细胞数目为 5×10^6 cells/ml。取该细胞悬液 1ml,37℃水浴振荡温孵 10min,加入下列物质,使其终浓度分别为:AA 10μmol·L^{-1},A_{23187} 1μmol·L^{-1},Ca^{2+} 0.5mmol·L^{-1},Mg^{2+} 0.5mmol·L^{-1},继续温孵 5min,加入 2 倍体积无水乙醇终止反应,加双蒸水使乙醇浓度为 15%,再加入 100ng PGB_2 作为内标,3 000rpm、4℃离心 10min,上清液用 1mol·L^{-1} HCl 调 pH 为 3 后,通过一反相小柱(SEP-PAK C_{18} Cartridge,Waters Associates,Milford MA)纯化。该柱预先用无水乙醇活化,再分别加入 15%乙醇 20ml,样品、双蒸水 20ml,石油醚 5ml 及乙酸乙酯 5ml 依次洗脱,收集乙酸乙酯组份,氮气吹干后用 80%甲醇 100μl 复溶,取 50μl 进行 RP-HPLC 分析。取标准品 LTB_4 和 5-HETE 各 20ng,PGB_2 100ng,氮气吹干,甲醇复溶,进 RP-HPLC 分析作为对照;另取同样量标准品,加 HBSS 1ml,按前述方法提取 LTB_4、5-HETE 及 PGB_2,进 RP-HPLC 分析,计算 LTB_4、5-HETE、PGB_2 的回收率。

1.4 色谱条件

流动相:甲醇/水/乙酸(80/20/0.02.V/V/V),用 NH_4OH 调 pH 5.7;流速:0.5ml/min (0~12min),1.0ml/min(12~20min)。

1.5 回收率及 LTB_4、5-HETE 含量计算方法

本方法的回收率分别为:PGB_2 90.95±4.25%,CV 4.67%($n=5$);LTB_4 85.22±3.99%,CV 4.68%($n=5$);5-HETE 83.38±5.29%,CV 6.35%($n=5$)。用记录仪记录色谱图,色谱数据处理机打印峰保留时间和峰面积,用内标法根据 PGB_2 和 LTB_4 峰面积比求 LTB_4 含量,PGB_2 与 5-HETE 峰面积比求 5-HETE 含量。PGB_2、LTB_4 和 5-HETE 消光系数(ε)分别为 26 800、39 500 和 30 500。

2 结果

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.1 中性粒细胞 LTB_4 的鉴别

分别测定白细胞样品中 AA 代谢产物与 LTB_4 标准品在 RP-HPLC 中的保留时间，再将两者混合进行 RP-HPLC 分析，结果如图 1 示。LTB_4 标准品和样品峰 I 保留时间一致，为 10.0min；图 1C 示样品与标准品混合后，峰 I 明显增高。将峰 I 对应组份收集，测紫外吸收曲线，可见 260、270、281nm 处各有一个峰（图 2）与文献报道 LTB_4 的紫外吸收曲线完全一致[6]，证明峰 I 为 LTB_4 的吸收峰。

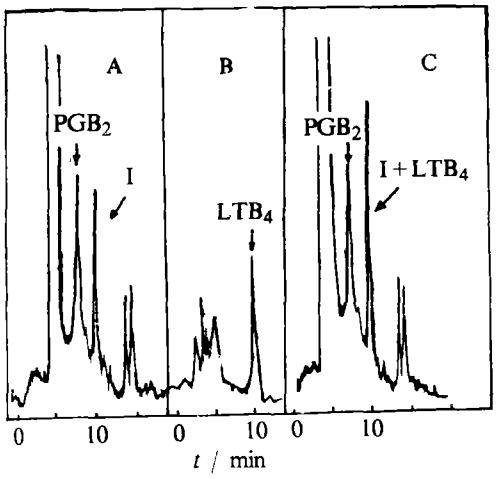


图 1 样品及标准品 LTB4 色谱图

A：样品 B：LTB4 标准品

C：样品＋LTB4 标准品

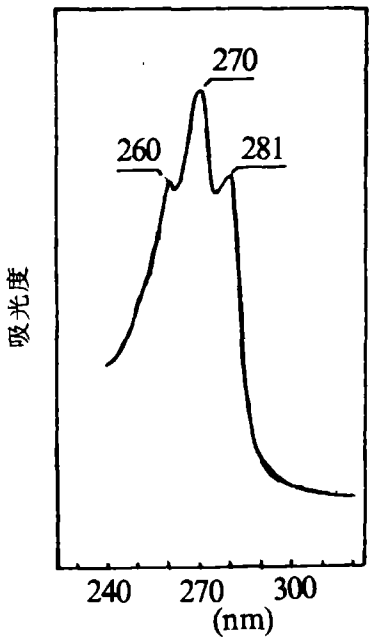


图 2 样品峰 I 紫外吸收曲线

2.2 中性粒细胞 5-HETE 的鉴别

分别测定白细胞样品 AA 代谢物和 5-HETE 标准品在 RP-HPLC 中的保留时间，然后将两者混合，再行 RP-HPLC 分析，结果如图 3 所示。5-HETE 标准品和样品峰 II 的保留时间一致，为 18.4min；生物样品与 5-HETE 标准品混合后，峰 II 明显增高。将峰 II 对应组份收集，测定其紫外吸收曲线，在 235nm 处有一峰（图 4），与文献报道 5-HETE 紫外吸收曲线一致[7]，证明峰 II 为 5-HETE。

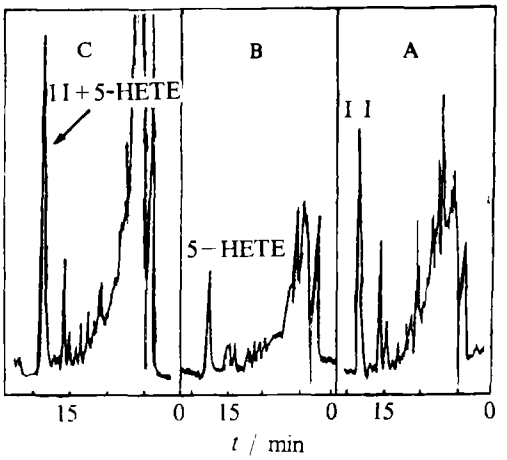


图 3 样品及标准品 5-HETE 色谱图

A：样品 B：5-HETE 标准品

C：样品＋5-HETE 标准品

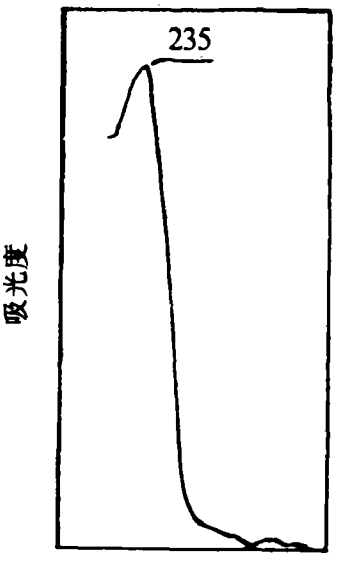


图 4 样品峰 II 紫外吸收曲线

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3 讨论

关于白三烯的测定方法，目前国外应用最多的是放射免疫分析法，此法虽然灵敏，但需要制备药盒，造价高，国内尚不具备此条件。我们采用单泵恒组分溶剂洗脱方式，将流动相甲醇浓度提高到 80%，在分析 LTB_4 时采用低流速以提高分辨率，LTB_4 峰出后加快流速，一方面使分析时间缩短，另一方面 5-HETE 峰形变锐、避免拖尾现象。这样，分析一个样品仅用不到 20min，且同样得到较满意的分离定量结果。

家兔外周血白细胞在钙离子载体 A_{23187} 的刺激下，可以产生多种 AA 5-氧脂酶代谢产物。我们将这些代谢产物分离提取，进行 RP-HPLC 分析，得到峰 I 和峰 II，经与 LTB_4 和 5-HETE 标准品比较，发现峰 I 与 LTB_4 有相同的保留时间和紫外吸收曲线，峰 II 与 5-HETE 有相同的保留时间和紫外吸收曲线，与文献报道一致[6,7]，故可确认峰 I 为 LTB_4、峰 II 为 5-HETE。

关键词 中性粒细胞；白三烯 B_4；5-羟二十碳四烯酸

参考文献

1. Ford-Hutchinson AW, Bray MA, Doig MV, et al. Leukotriene B, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. Nature, 1980; 286(5770): 264～265
2. Rollins TE, Zanolarb B, Springer MS, et al. Synthetic leukotriene B_4 is a potent chemotaxin but a weak secretagogue for human PMN. Prostaglandins, 1983; 25(2): 281～289
3. Showell HJ, Naccache PH, Borgeat P, et al. Characterization of the secretory activity of leukotriene B_4 toward rabbit neutrophils. J Immunol, 1982; 128(2): 811～816
4. Peters SP, Siegel MI, Kagey-Sobotka A, et al. Lipoxygenase products modulate histamine release in human basophils. Nature, 1981; 292(5822): 455～457
5. Yue TL, Varma DR, Powell WS. Effects of protein deficiency on the metabolism of arachidonic acid by rat pleural polymorphonuclear leukocytes. Biochim Biophys Acta, 1983; 751(3): 332～339
6. Borgeat P, Samuelsson B. Arachidonic acid metabolism in polymorphonuclear leukocytes: Effects of ionophore A_{23187}. Proc Natl Acad Sci USA, 1979; 76(5): 2148～2152
7. Borgeat P, Samuelsson B. Metabolism of arachidonic acid in polymorphonuclear leukocytes. Structural analysis of novel hydroxylated compounds. J Biol Chem, 1979; 254(16): 7865～7869

（收稿：1991-11-19；修回：1992-06-19）

经纤维支气管镜双塞保护采样培养对支气管－肺部感染病原学诊断的研究

刘平 胡建林 沈寒放 张蔚东 汪愉 沈渝菊 艾卫东 （第三军医大学西南医院呼吸科）630038

肺部细菌性感染是最常见的感染性疾病之一，其致病菌的分离和判断在治疗上是必不可少的。本文采用经纤支镜单套管双塞保护法采样培养对 1990 年 12 月～1991 年 9 月期间

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net