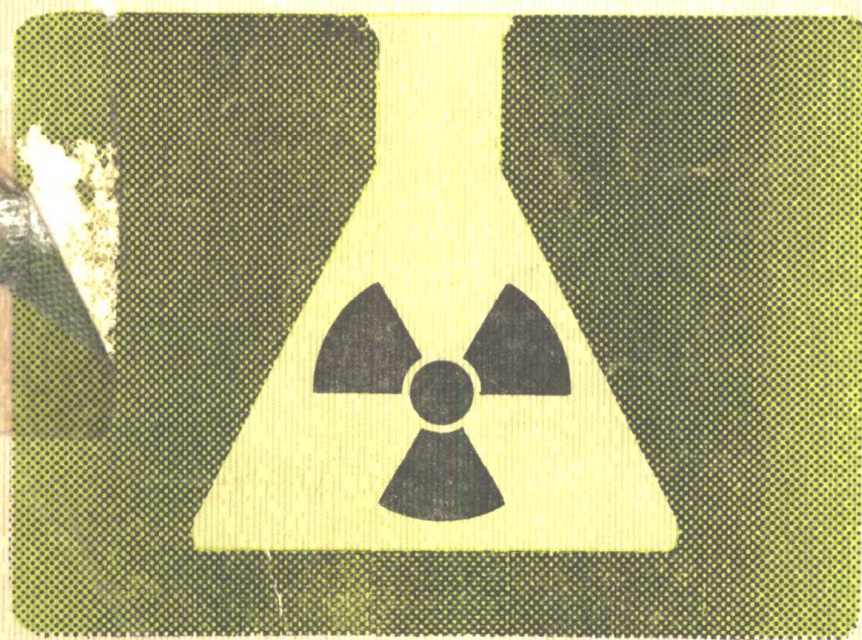
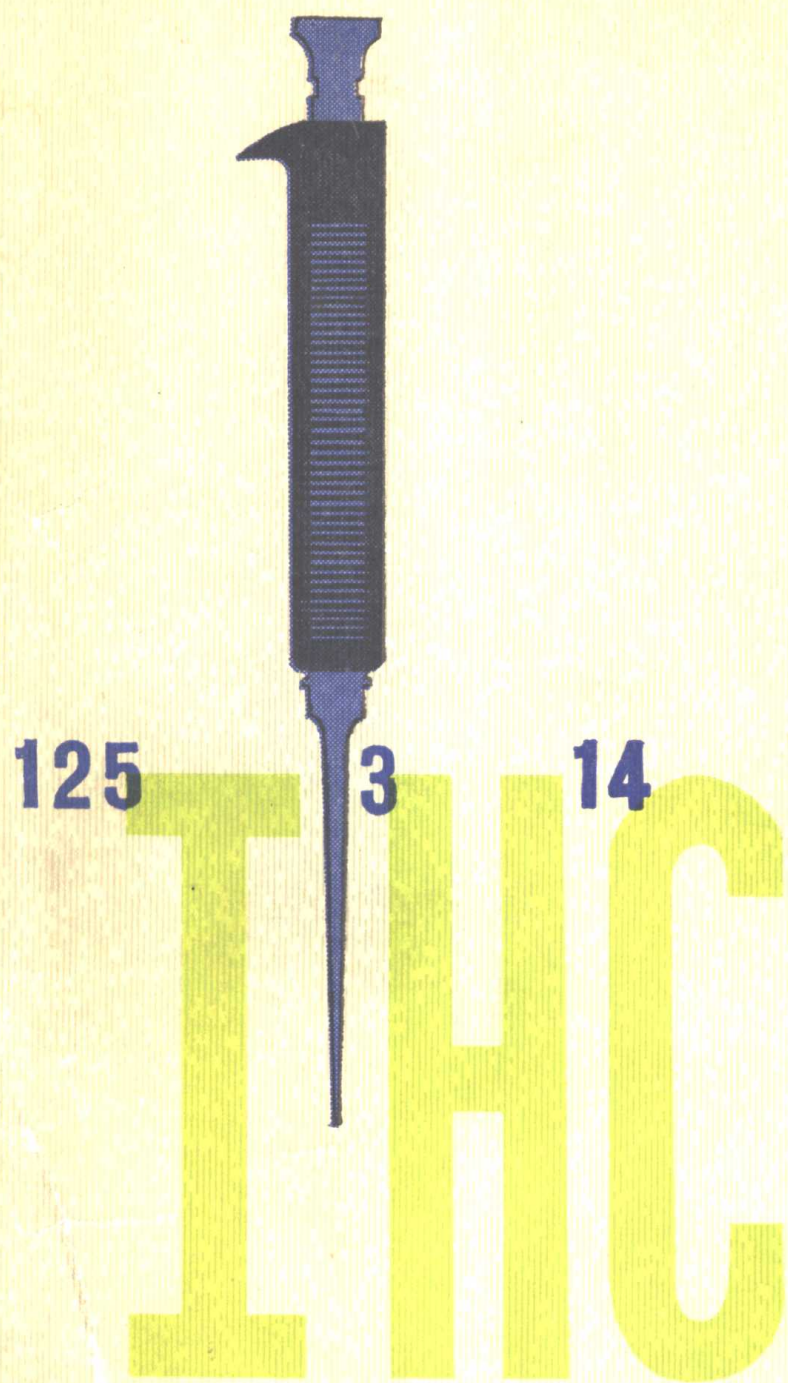


放射性同位素在基础医学中的应用



放射性同位素在基础医学中的应用

系

7.1

X

4

版

社

放射性同位素 在基础医学中的应用

1977年全国放射性同位素技术
经验交流会基础医学部分论文选编
《放射性同位素在基础医学中的应用》编辑组

原 子 能 出 版 社

内 容 简 介

本书为1977年7月全国放射性同位素技术经验交流会基础医学部分资料选编。共选论文53篇,包括中子活化分析、液体闪烁测量、放射自显影等测量技术;气管炎、大骨节病发病机理的探讨;针麻原理的研究;同位素技术在免疫学中的应用;放射免疫分析和竞争蛋白结合分析等,以及同位素在药理、药物研究中的应用。所选论文反映了我国1973—1977年放射性同位素在实验医学领域中所取得的大部分科研成果。

本书可供从事核医学、生物学、医药学工作者参考。

放射性同位素

在基础医学中的应用

1977年全国放射性同位素技术
经验交流会基础医学部分论文选编
《放射性同位素在基础医学中的应用》编辑组

原子能出版社出版

(北京2108信箱)

北京印刷一厂印刷

新华书店北京发行所发行·新华书店经售

(限国内发行)

☆

开本787×1092¹/₁₆·印张18·字数421千字

1979年11月北京第一版·1979年11月北京第一次印刷

印数001——5300·定价:2.20元

统一书号:15175·170

前 言

1977年7月23日至8月1日,由中国科学技术情报研究所主办,在哈尔滨召开了全国放射性同位素技术经验交流会。

当前,在我国基础医学各学科的科学研究工作中,同位素技术的应用越来越广泛。为此,我们根据各地许多同位素技术工作者的要求,将会议上交流的有关资料汇编出版。由于交流的资料很多,只能选择一部分刊印,主要是与基础医学有关的原始研究资料。综合性的报告、临床应用资料,以及原来决定不在此次会议交流范围的资料(如有关甲胎蛋白的应用、标记化合物的制备及已在其他全国性会议上交流过的资料等),均未纳入本选编;属于基础医学范围的交流资料,凡已在杂志上公开发表的或即将发表的,不予刊登或只刊登摘要;有些专题交流的内容较多(如竞争蛋白结合分析法及药物吸收、分布、排泄等),只酌选了一部分有代表性的或与基础医学关系较密切的。

由于我们的水平有限,编辑时间仓促,编选工作难免有不当之处,希望读者批评指正。

在本选编的整理、编选和加工过程中,得到王世真、夏宗勤和刘鼎新等同志的大力支持和帮助,在此表示感谢。

编 者

1977年8月

目 录

介绍一种经济简便的 ³⁵ S闪烁液湿润纸片测量法	1
国产49型玻璃纤维滤纸在同位素液体闪烁测量中的应用	7
放射自显影对机体标记同位素的微观和宏观定位机理探讨	13
放射自显影术中的人工假相——张力显影的原因及排除方法	20
癌细胞的电镜放射自显影	23
微型放射自显影对标记溴甲素的代谢定位和肌松作用探讨	26
³ H和 ¹⁴ C双标记样品液体闪烁测量法及其应用	30
液体闪烁测量方法的研究	38
用 ³⁵ S研究大骨节病患者的硫代谢	65
放射性同位素在慢性气管炎、肺气肿和肺心病发病原理及防治研究中的应用	70
应用同位素技术研究脑内去甲肾上腺素在针刺镇痛中的应用(摘要)	78
¹²⁵ I-脱氧尿嘧啶核苷(¹²⁵ I-UdR)参入法测定人外周血淋巴细胞体外转化	81
用 ³ H-胸腺嘧啶核苷参入液闪计数法测定急性白血病人外周血的初步结果	86
急性白血病患者骨髓体外氚-胸腺嘧啶核苷参入实验	92
³ H-TdR测定淋巴细胞转化率的简便方法(摘要)	95
淋巴细胞转化反应——放射自显影测定法	96
人体肝癌靶细胞的微量细胞毒性实验(摘要)	98
应用放射性抗原微量沉淀实验(双抗体法)诊断日本血吸虫病的初步探讨	99
应用氚化胸腺嘧啶核苷参入法观察同种肾脏移植病人的细胞免疫反应(摘要)	101
放射性同位素膀胱/肾比值预测同种异体肾移植排斥反应	102
¹⁴ C-川芎嗪在小白鼠体内的分布、排泄和代谢的初步研究	107
创新霉素分子中硫原子的生物来源	113
葛根有效成分的代谢研究	
—— ¹⁴ C-黄豆苷元在大鼠体内的吸收、分布和排泄(摘要)	115
冠心2号方对小鼠心肌营养性血流量的影响	116
利用 ¹²⁵ I标记的血浆蛋白观察穿心莲对早孕小鼠子宫、卵巢血量的影响	121
用 ³⁵ S示踪法观察合成大蒜素在动物体内的吸收、分布、排出	124
丹参注射液对家兔桡骨骨折以后肢体血容量的影响	131
马薊子甲素对小鼠巨噬细胞吞噬功能的影响	138
³ H-青蒿素和 ³ H-还原青蒿素在小鼠体内吸收、分布、排泄和代谢的初步研究	144
⁸⁶ Rb清除率在评价中草药对小白鼠营养性冠脉血流量中的应用	150
蟾立苏在小鼠体内分布与排出的研究(摘要)	153
氚标记四环素对四环素与胃癌组织亲合现象的初步探讨(摘要)	154
放射性柠檬酸 ¹⁶⁹ Yb自体内加速排出的研究	155
国产环一磷酸腺苷(cAMP)测定箱及其应用	163
急性心肌梗塞时血浆环一磷酸腺苷含量的变化	173

针刺镇痛时大白鼠脏器中环一磷酸腺苷 (cAMP) 含量变化	179
针刺肾经、膀胱经对肾脏活动及尿中 cAMP 影响的初步观察	184
针麻诱导前后血浆 cAMP 含量与针麻效果的初步观察	192
复方中药 (白蛇酒) 和 3',5'-环核苷酸 (cAMP) 对小鼠艾氏腹水癌细胞的 抑制效果 与癌细胞内cAMP 含量变化的关系	197
急性白血病周围血白细胞 cAMP 含量变化与临床观察	203
血清孕酮的竞争性蛋白质结合分析法	209
大白鼠LH的放射免疫测定	214
血浆睾酮的放射免疫测定	222
人体绒毛生长促乳素放射免疫测定法(摘要)	232
血浆皮质醇放射免疫测定用于观察复方炔雌醚对肾上腺皮质功能的影响	233
血浆皮质醇的放射免疫测定	236
血浆皮质醇竞争性蛋白结合分析法	241
慢性气管炎患者“扶正固本”治疗前后血浆皮质醇的放射免疫分析	247
SIgA的放射免疫分析及其在气溶胶免疫中的应用	249
放射免疫分析法测定疫苗中小牛血清含量	258
肿瘤手术患者于针刺麻醉和药物麻醉时血浆皮质醇的变化	265
人血浆中血管紧张素II放射免疫直接测定法	270
血管紧张素II的速尿与低钠激发实验——测定肾素-血管紧张素系统反应性的方法	275

介绍一种经济简便的 ^{35}S 闪烁 液湿润纸片测量法

西安医学院工业卫生教研组

液体闪烁测量法是最近二十几年出现的一种测量软 β 射线的新技术。此法具有灵敏度高、测量时间短、便于重复测量、耗样少等优点。自1973年国产FJ-353型双道液体闪烁器成批生产以来,大大推动了国内液体闪烁测量法的应用与发展。我组自1974年以来,根据实际工作的需要,对 ^{35}S 样品试用了闪烁液湿润纸片测量法。此法不仅操作简便,测量稳定,样品可以回收、保存和复查,且大大节约了闪烁液,是测量大量放射性非脂溶性样品比较理想的方法。现将已做的一部分工作介绍如下。

一、闪烁液湿润纸片测量法

将放射性样品处理后,以溶液形式均匀滴加在长方形(4×2.5厘米)纸片上(纸片大小根据测量杯直径与高度而定)。一次滴加样品容量为0.2毫升,如样品量多,或样品放射性强度低时,可吹干后重复滴加。待干燥后,将纸片直立于测量杯中央,滴加闪烁液至纸片完全湿润,置于与光电倍增管光阴极平行位置测量。一个样品每次测量仅需闪烁液0.3毫升。

二、闪烁液湿润纸片测量法的测量效率

纸片法测量效率低于均相法,且能谱向低能端移位。从 ^{35}S 均相法与纸片法测得的微分谱中可以看出,在微分谱的全部计数率中,纸片法在低能量部分所占百分率高于均相法,反之,在高能量部分纸片法所占百分率低于均相法。见表1。

表1 湿润纸片法与均相法脉冲高度的分布情况

	0.5—5.0伏	5.0—5.5伏	5.5—6.0伏	6.0—10伏
均相法	12.88%	31.84%	45.55%	9.73%
纸片法	18.28%	31.29%	44.53%	5.92%

样品吸附在纸片上,射线能量有部分损失,但在样品有足够放射性强度做相对测量时,保持一切测量条件不变,可以满足一般测量要求。

对非脂溶性样品(以 $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ 为例)的测量效率为:

(1) 均相法与纸片法采用闪烁剂不同或是否加助溶剂,其效率相差不大。

1 均相法采用二氧六环闪烁液, 纸片法采用甲苯闪烁液, 纸片法测量效率为均相法的 78.97%。

2 均相法采用甲苯闪烁液加助溶剂, 纸片法不加助溶剂, 纸片法测量效率为均相法的 80.23%。

(2) 均相法与纸片法均采用甲苯闪烁液加助溶剂, 纸片法测量效率为均相法的 78.70%。

测量效率与纸片厚度、纸片质量及闪烁液配方有关。一种闪烁液采用不同批号的溶剂配制, 对测量效率也有影响。因此一次实验, 需采用同样的纸片, 闪烁液才能保持测量恒定、重复性好。

三、闪烁液配方的选择

我们配制了七种闪烁液配方, 对非脂溶性样品进行了纸片测量法比较。

七种闪烁液配方:

1 号: 0.5% PPO + 0.05% POPOP 甲苯溶液。

2 号: PBD 12 克 + POPOP 0.6 克 + 萘 110 克, 1000 毫升二氧六环。

3 号: 0.5% TP + 0.05% POPOP 甲苯溶液。

4 号: PPO 0.7 克 + POPOP 0.06 克 + 萘 7.5 克, 乙二醇乙醚 30 毫升, 加甲苯至 100 毫升。

5 号: PPO 1.2 克 + POPOP 0.04 克, 苯甲醚 12.5 毫升, 乙二醇二甲醚 12.5 毫升, 加二氧六环至 100 毫升。

6 号: PPO 1 克 + POPOP 0.05 克 + 萘 5 克, 乙二醇乙醚 16.7 毫升, 加二氧六环至 100 毫升。

7 号: PPO 1.4 克 + POPOP 0.02 克 + 萘 6 克, 甲醇 10 毫升, 乙二醇 2 毫升, 加二氧六环至 100 毫升。

测量结果见表 2 (放射性样品: $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$)

表 2 湿润纸片法中不同闪烁液配方的比较

闪 烁 液 配 方	1	2	3	4	5	6	7
计 数 率 (cpm)	5390	5381	5335	5101	4324	4470	4748
测 量 效 率 (以 1 号闪烁液作为 100%)	100	99.83	98.97	94.63	80.22	82.93	88.08

做纸片测量时, 样品应完全不溶于闪烁液才能保持测量稳定。表中结果表明, 非脂溶性样品宜采用甲苯闪烁液, 以避免放射性样品溶解洗脱, 实际测量效率也较高。用 TP 代替 PPO, 可得相近的计数效率 (见 3 号闪烁液), 这在实际应用中是值得注意的, 因 TP 价廉, 用于大量放射性样品的测量比较经济。

四、纸片类型和纸片样品在测量瓶中 不同位置对计数率的影响

我们采用层析纸、新华 1 号滤纸和普通粗滤纸三种纸型进行测量比较。测量结果以层析纸计数率最高, 该纸薄而致密, 粗滤纸计数率最低。擦镜纸不适于作纸片湿润法, 故未

采用。

做测量时，将纸片样品放在与光电倍增管阴极呈平行位置时计数率最高。此时，将纸片直立于测量杯中央，或贴附于测量杯左壁、右壁，计数率无显著差异，而取与光阴极垂直位时，不论将纸片置于测量杯中央，或贴附杯外侧、内侧，计数率均降低5%左右。

表 3 纸片在测量杯中的位置对探测效率的影响

样 品 号	平 行 位 置 (cpm)			垂 直 位 置 (cpm)		
	中 央	左 壁	右 壁	中 央	内 侧	外 侧
1	26013	25962	25366	24794	24904	24972
2	26110	25843	25838	24655	24815	25079
3	25475	25805	25365	23684	24497	23989
4	25342	25426	25332	23832	24453	24818
5	25348	25199	25012	24186	23875	23510
平 均 值	25649	25647	25383	24230	24509	24373
不同位置的比较 (以中央平行位置作为100%)	100	99.99	98.96	94.46	95.55	95.00

在做具体测量时，只要固定在一定的几何位置，可以得到较好的重演性，在一个较小的范围内变动，影响也不大。

五、闪烁液湿润纸片法的特点

(1) 节省闪烁液 当样品为非脂溶性时，在纸片样品上滴加闪烁液只要使纸片完全湿润就可达到最高计数率。在 4×2.5 厘米纸片上，一次测量只需滴加0.3毫升，过多并不提高计数率。将闪烁液滴加在纸片样品上使之完全湿润情况下测量和将纸片完全浸泡在闪烁液中，可得相同的计数率（见表4）。

表 4 非脂溶性样品闪烁液量和计数率的关系
(放射性样品: $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$)

闪烁液量 (毫升) (甲苯闪烁液)	计数率 (cpm)
纸片样品基本湿润 (滴闪烁液0.15毫升)	3755
纸片样品完全湿透 (滴闪烁液0.3毫升)	3995
纸片样品上共加闪烁液0.6毫升	3849
纸片样品上共加闪烁液0.9毫升	3861
纸片样品部分浸泡 (加闪烁液3.5毫升)	3815
纸片样品基本浸泡 (加闪烁液7毫升)	3837
纸片样品完全浸泡 (加闪烁液15毫升)	3830

实验结果表明，脂溶性样品的测量，在纸片基本湿润时，测量效率高，但不易控制，测量不稳定。当闪烁液逐渐增多时，即发生样品的溶解洗脱，致使测量效率下降。当纸片样品部分浸泡在闪烁液中时，测量效率随闪烁液量的增加而上升。因闪烁液的溶剂一般均为有机溶剂，对脂溶性样品均有程度不同的溶解作用，故不宜作闪烁液湿润纸片法（表5）。

(2) 化学猝灭作用小。由于样品不与闪烁液成溶液状态，对闪烁液中能量转移的影响

表 5 脂溶性样品闪烁液量和计数率关系
(放射性样品: ^{14}C -正十六烷)

闪 烁 液 量 (毫升) (二氧六环闪烁液)	计 数 率 (cpm) (为10个平行样的平均值)	测量效率% (与均相法比较)
纸片样品基本湿润 (滴闪烁液0.15毫升)	3523	91.24
纸片样品完全湿透 (滴闪烁液0.3毫升)	3100	80.29
纸片样品上共加闪烁液0.6毫升	2746	71.12
纸片样品上共加闪烁液0.9毫升	2636	68.27
纸片样品部分浸泡 (加闪烁液3.5毫升)	3181	82.38
纸片样品基本浸泡 (加闪烁液7毫升)	3634	94.12
纸片样品完全浸泡 (加闪烁液15毫升)	3756	97.28

较小, 即使样品中有化学猝灭物质, 对计数率的影响比均相法小。表 6 是以 NaCl 为猝灭剂的实验结果。

表 6 不同浓度 NaCl 对均相法和纸片法探测效率的影响

样 品 (放射性元素 ^{35}S)	均 相 法 cpm (用二氧六环闪烁液)	纸片法 cpm (用甲苯闪烁液)
对照样品 (蒸馏水)	6238	5244
0.5 N NaCl	1846	5219
0.8 N NaCl	2418	5307
1.25 N NaCl	1787	4786
1.50 N NaCl	1381	4684
2.00 N NaCl	1201	5103

纸片测量化学猝灭作用小, 这在实际应用中有一定的优越性, 尤其在处理大量生物样品时, 可以使操作简便, 得到相对高的计数效率。测量有色样品时, 应在铺样前脱色。经消化处理的样品, 常因有色杂质或某些消化剂引起纸片变质产生颜色导致颜色猝灭而使效率减低。脱色后测量效果较好, 可使计数少受影响或基本不受影响。表 7 是肝组织甲酸消化样品的实例。

表 7 颜色猝灭及脱色对湿润纸片法测量效果的影响

样品号	计 数 率 cpm		
	对照样品 (蒸馏水)	肝 组 织 样 品	经 H_2O_2 脱色后的肝组织样品
1	39058	34143	39782
2	12355	11199	12553
3	12014	10793	12361

(3) 重复性好

1) 铺样的重复性好 见表 8。

表 8 湿润纸片法铺样的重复性

纸片样品(号) $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ 溶液铺样量0.2毫升	计数率 (cpm)	纸片样品(号) $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ 溶液铺样量0.2毫升	计数率 (cpm)
1	3399	7	3376
2	3375	8	3310
3	3340	9	3383
4	3304	10	3361
5	3385		
6	3388	平 均 值	3362 ± 34

2) 测量的重演性好 对重演性进行检测的方法如下:纸片样品经测量后,从测量杯中取出,在自然环境中待纸片上甲苯闪烁液挥发干燥后,重新滴加闪烁液进行测量,如此重复四次。测量结果表明,用闪烁液湿润纸片法测量时重演性良好(见表9)。在纸片上多次滴加闪烁液后并不发生放射性样品的洗脱,样品计数率并不降低。因水溶性样品不会被甲苯闪烁液溶解,所以测量后不会引起样品放射性强度的改变。

表9 湿润法纸片的重演性

纸片样品号	原 计 数 率 (cpm)	纸 片 样 品 取 出 干 燥 后 滴 闪 烁 液 重 测			
		第一次 (cpm)	第二次 (cpm)	第三次 (cpm)	第四次 (cpm)
1	26826	26843	26566	25625	26159
2	26780	26749	26252	25374	26520
3	26594	26308	26023	25777	26966

(4) 测量杯易于清除处理 用闪烁液湿润纸片法不易污染测量杯,在测样后,本底不增高。我们曾测定15个测量杯的本底,平均值为29(cpm)。测样后、将放射性纸片样品取出后再测定测量杯本底,本底平均值为28(cpm),和测样前一致。当测量杯多次测样后,本底才见增高。

六、纸片测量法的猝灭校正

对于非均相测量的猝灭校正,目前尚无很理想的方法。鉴于当前在均相测量中,内标准法是应用最广的校正方法之一,我们亦采用内标准法对纸片样品的猝灭校正作了初步试验。

放射性样品: $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ 。

由于 ^{35}S 无理想的内标准源,我们即采用与 ^{35}S 被测样品同样形式的 ^{35}S 化合物作为内标准源来校正 ^{35}S 猝灭样品,现举例如下。

标准源(A)取比放射性较高的 $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ 水溶液,在纸片上铺样10—20片,,测量后计算其平均测量值为A。

猝灭样品(B) $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ 肝组织甲酸消化液在纸片上铺样测量后,得测量值为B。

测量值(C)猝灭样品测量后,在原肝组织甲酸消化液中加入体积小、比放射性高的标准源A,待充分混匀后,在纸片上重新铺样测量,得其测量值为C。

校正计算方法 先计算计数效率(E):

$$E(\%) = (C - B) / A \times 100\%$$

校正后的样品计数率(D)为:

$$D = B / E \times 100\%$$

以上所得计数效率实际是相对值,因标准源放射性强度并非绝对值,而是在一定条件下由仪器所测得的计数率(cpm)。因此每次进行猝灭校正时,必需将标准源和被测猝灭样品在同样测量条件下同时进行测量。标准源取样必需十分准确,最好采用微量注射器。

我们用以上方法对 ^{35}S 肝组织甲酸消化样品进行过多次猝灭校正,每次制备 ^{35}S 肝组织甲酸消化样品10—20片,标准源($\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$)10—20片,并制备和 ^{35}S 肝组织样品放射性强度完全相等的水样品作为对照,即代表 ^{35}S 肝组织甲酸消化样品无猝灭时的原计数率,以

检验本法校正的百分误差（见表10）。

表 10 湿润纸片法同标准源猝灭校正的误差

实验次数	样品原计数率 (cpm)	肝组织样品计数率 (cpm)	肝组织样品经校正后计数率 (cpm)	百分误差 (%)
第一次	1737	1439	1708	1.67%
第二次	1735	1541	1712	4.09%
第三次	1696	1530	1765	4.07%
第四次	1700	1509	1617	4.88%

七、存 在 问 题

在做大量放射性生物样品测量时，可采用闪烁液湿润纸片法。这种方法不仅节约闪烁液，样品可以回收、保存和复查，且操作步骤简便、测量重复性好，不易造成污染。计数效率虽低于均相法，但可满足一般示踪实验的要求。本法对于 ^{14}C 、 ^{35}S 或射线能量更强的非脂溶性样品，效果较好，而对脂溶性样品测量不稳定，不宜采用。

对 ^3H 做纸片测量存在问题，因 ^3H 能量弱，局部猝灭严重，我们曾用微孔薄膜做湿润纸片法测量，效率虽比擦镜纸提高4—5倍，但测量效率仍不能满足要求，且不稳定，有待选择更合适的支持物做进一步探索。

对纸片法的猝灭校正方法不够完备。我们试用内标准源法，但操作程序多，每一样品在测量中间要加入内标准源重复铺样测量，比较费时间，且定量吸取过程也易引起操作误差。此外，目前供应的标准源均为脂溶性，如 ^{14}C -正十六烷。在做非脂溶性样品纸片猝灭校正时存在以下问题：（1）把脂溶性标准源加入到非脂溶性样品时，两者互不相溶，无法铺样；（2）当用脂溶性标准源做纸片铺样测量时，又易被闪烁液溶液洗脱，测量不稳定。

国产49型玻璃纤维滤纸在同位素 液体闪烁测量中的应用

上海第二医学院基础部同位素室
上海第二医学院免疫研究室
上海中医研究所

当前玻璃纤维滤纸在生物样品软 β 射线的测量中已日益广泛应用。我们在以前的工作中曾用酸碱消化法对组织细胞内核酸等生物大分子进行均相测量,处理样品时方法比较繁杂,实验周期长,成本也高。为此,我们与上海红光造纸厂配合,摸索了国产49型玻璃纤维滤纸在细胞样品软 β 射线测量中的应用。

一、材 料 和 方 法

(1) 国产纤维滤纸 该滤纸又称空气净化滤纸,简称49型滤纸,其孔径可阻止0.3微米粒子通过,滤过率仅万分之一(即过滤效率为 $\geq 99.99\%$)。滤纸厚为0.25毫米左右,吸水性能强,抗张强度 >230 克。根据滤器板及测量杯底面积大小,制成相应大小之滤片。我们使用的滤片直径约2厘米,使用时预先于生理盐水中浸透1—2分钟,置抽滤瓶上。弃去放射性样品的上清液后,重新悬浮再滴于滤片中心,随即用10毫升生理盐水洗涤,再用5毫升5%TCA固定洗涤,最后用3毫升无水酒精洗涤、脱水、脱色。滤片于60—70℃烘箱中烘干15分钟,冷却后置于5毫升0.3%TP, 0.01%POPOP(或0.6%bis-MSB)闪烁液中,用国产YSJ-76型液体闪烁计数器测量。结果以 1×10^6 淋巴细胞数的计数率(或所加放射性的百分数)表示。若为全血样品,则预先低渗处理红血球,其余操作方法同前。

(2) 同位素 胸腺嘧啶核苷(^3H -TdR,比放射性5居里/mM), ^3H -尿嘧啶核苷(^3H -UR比放射性11居里/mM)由上海原子核所供应,用量为1微居里/毫升培养液。

(3) 细胞培养 培养液为RPMI 1640 2—3毫升(每管),取肝素化外周全血或分离淋巴细胞,37℃保温72小时,淋巴细胞混合培养则为6天。同位素参入时间一般为终止前20—22小时。

(4) 植物血凝素 自广东红肾豆中提取,由本院自制半精制干粉,用生理盐水或1640稀释, -15℃冰箱保存。

二、实 验 结 果 和 分 析

1. 线 性 关 系

(1) 水溶性 ^3H -TdR测量之线性关系 用微量注射器分别吸取10, 20, 30微升(0.02,

0.04, 0.06微居里) ^3H -TdR水溶液, 滴于滤片上, 边滴边吹干, 于5毫升闪烁液中测量, 结果见图1。

(2) 全血样品白细胞数量与 ^3H -TdR参入强度的线性关系 取0.3ml肝素化全血, 加 ^3H -TdR及PHA刺激培养72小时。低渗破坏红血球后, 再将白细胞悬液混匀, 计算每毫升内白细胞数, 分别吸取10万, 20万, 30万, 40万细胞悬液于滤片上, 抽滤、洗涤、烘干、冷却后测量, 结果见图2。

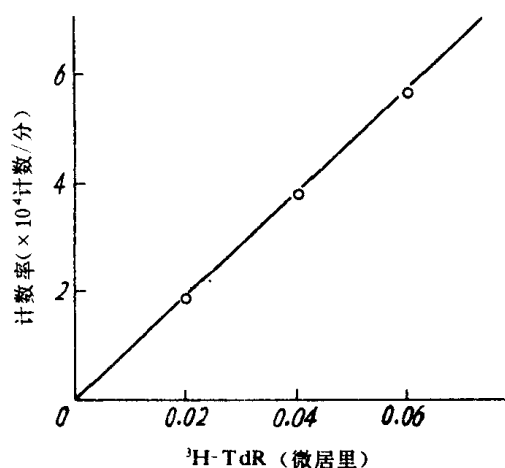


图1 水溶性 ^3H -TdR测量之线性关系

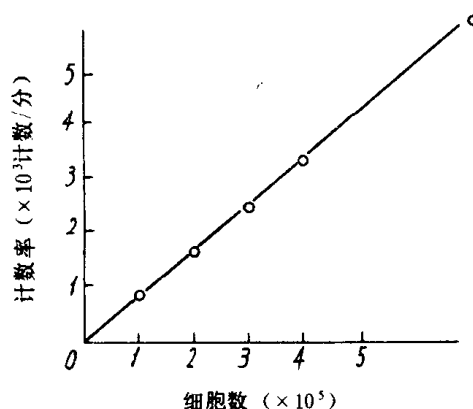


图2 全血样品不同白细胞数与计数率的线性关系
计数率为三个复管的均值, CV为3.4-5%。

(3) 分离淋巴细胞 ^3H -TdR参入的线性关系 健康人肝素化全血, 经聚蔗糖-泛影葡胺(Ficoll-Isopaque $d=1.077$) 梯度离心分离淋巴细胞, 每组接种不同量细胞数, 每管所加PHA与 ^3H -TdR相等。样品处理如前所述。结果如表1所示。

经计算直线回归方程, 求得 $P < 0.01$ 。

上述三项线性关系的实验结果表明, 国产49型滤纸无论对水溶性 ^3H -TdR, 全血白细胞或分离淋巴细胞等样品, 在一定范围内 (如细胞样品在 1×10^6 之内) 符合线性关系, 各组复管标准差的变异系数(CV)在1.9-8.5%之间, 复管稳定性尚好。

表1 PHA激活的分离淋巴细胞 ^3H -TdR参入的线性关系

接种淋巴细胞数 ($\times 10^6$)	cpm [$\bar{X} \pm \text{SD (CV)}$] ($n=3$)
对照	172
0.1	10725*
0.2	28055 $\pm$ 1439 (5%)
0.4	72269 $\pm$ 1360 (1.9%)
0.6	108472 $\pm$ 9300 (8.5%)
0.8	181713 $\pm$ 4145 (2.3%)
1.0	215909*

* 为二个实验复管; n 为三个实验复管。

2. 测量效率

(1) 水溶性 ^3H -TdR样品的测量效率 取水溶性 ^3H -TdR 0.04微居里/20微升, 分别滴在49型滤纸、GF/A (英) 滤纸, 及均相法闪烁液中 (含乙二醇乙醚), 先用均相法测得效率, 算出dpm, 再求出49型滤纸及GF/A之相对效率, 结果三者效率相接近, 见表2。

表 2 49型滤纸相对效率(水溶性³H-TdR 样品)

	二 种 方 法		
	49型滤纸 (n = 5)	GF/A 滤纸 (n = 6)	均相法 (n = 3)
cpm [$\bar{X} \pm SD(CV)$]	38369 $\pm$ 1934 (5%)	42428 $\pm$ 1637 (3.8%)	44096 $\pm$ 779 (1.76%)
相 对 效 率	39.2%	43.4%	45%

n 为实验复管数。

(2) 全血白细胞样品测量效率 0.3ml 肝素化全血, 培养及操作如前, 分别采用49型滤纸, GF/A 滤纸和均相法(样品预先经H₂O₂-HClO₄消化), 比较三者实际应用时细胞样品的相对效率及复管稳定性(见表3)。

经³H-TdR 参入的全血白细胞样品所测cpm值, 49型滤纸与GF/A 滤纸测量相对效率较接近, 而HClO₄-H₂O₂消化后均相测量者, 由于HClO₄-H₂O₂ 有严重的猝灭作用, 所以测量效率较低。因此, 在细胞样品测量时, 在一定量细胞范围内, 滤片法似乎优于所用的均相法。而49型滤纸无论在实际效率或复管稳定性方面与GF/A 滤纸相比均无明显差别。

3. 其他有关测量条件的实验

(1) 滤纸正反面测量效果之比较 一般观察滤纸无明显正反面, 我们是以细绸纹面为正面。在测量全血样品时有意改变几何条件, 结果见表4和表5。

表4结果说明, 滤片正反面方向改变, 对样品测量效率没有明显的影响。对于滤片样品其他几何条件的变化, 例如反面滴样反面测量或反面滴样正面测量, 甚至将滤片贴于测量杯壁测量, 效率亦无显著改变。

表 3 全血白细胞样品相对效率及稳定性的比较

复 管 数	49型滤纸的cpm (n = 6)	GF/A 滤纸的cpm (n = 8)	均相法cpm (HClO ₄ -H ₂ O ₂ 消化) (n = 8)
1	33188	30917	19315
2	31578	24555	12682
3	31106	28353	14771
4	33406	28940	12110
5	34597	20011	8552
6	29753	23859	14630
7	*22680(色猝灭)	23859	15485
8	*20223(色猝灭)	32415	13805
对照(加 ³ H-TdR 不保温)	299	281	279
空 白	31	31	85
复管的cpm [$\bar{X} \pm SD(CV)$]	30309 $\pm$ 2006 (6.6%)	26339 $\pm$ 1330 (5%)	13640 $\pm$ 3061 (22.4%)
P值(与49型滤纸比较)	P > 0.05		P < 0.001

* 有色猝灭, 未作统计; n 为实验复管数。

表 4 滤 片 正 反 滴 测 比 较

滤 纸	cpm 几何条件	正 滴 反 测	反 滴 正 测	去 滤 片 后
		cpm [$\bar{X} \pm SD(CV)$] n = 6	cpm [$\bar{X} \pm SD(CV)$] n = 6	cpm n = 6
49 型 滤 纸		140506 $\pm$ 13700 (9.8%)	137288 $\pm$ 3536 (2.6%)	$\bar{X} = 55$
GF/A 滤纸		145537 $\pm$ 14660 (10%)	142880 $\pm$ 11530 (8.1%)	$\bar{X} = 67$

n 为实验复管数。

表 5 滤片叠加测量

样 品 号	几何 条件	单 片 测	叠 加 测
1	cpm	15424	137922 (降低1.7%)
2		124919	
3		2845	5863 (降低6.4%)
4		3394	

表 5 表明, 两张滤片样品叠加后测量结果与分别测量之和较为接近。表 4 和 5 均说明 49 型滤纸透光性能良好, 而且除去样品滤片后, 闪烁液一般仍在本底水平, 可反复使用, 节省人力物力。样品叠加后, 测量效率略有下降, 除仪器误差外, 可能与部分光子被吸收有关。

(2) 闪烁液体积与 cpm 测量值的关系 同一样品于不同体积之闪烁液中测量结果如表 6 所示, 闪烁液在 2—6ml 范围内, 其 cpm 值变化不大, 除非将闪烁液倒尽, 仅保留样品滤片浸透的情况下, 其测定值才有明显的下降。

表 6 闪烁剂体积与 cpm 值之关系

闪烁液 体积(毫升)	样 品 号	cpm		
		①	②	③
5		6086	6546	4990
倒去		4677	5402	4371
2		6118	6782	4960
4		6286	6669	5079
6		6195	6530	4954

4. 初步应用结果

我们利用国产 49 型玻璃纤维滤纸, 在临床及实验研究中初步进行某些方面的应用, 实例如下。

(1) 肿瘤病人免疫状态的测定 肝素化静脉全血 0.2ml, 经 PHA 刺激, 37℃ 培养 72 小时, 于终止前 20 小时加入 ^3H -TdR, 以测定淋巴细胞合成 DNA 的能力。实验观察了正常人及头颈部恶性肿瘤患者的细胞免疫功能。10 例正常人淋巴细胞的 ^3H -TdR 参入强度 (cpm/ 10^6 淋巴细胞) 为 $\bar{X} \pm \text{SE} = 25 \times 10^4 \pm 3.5 \times 10^4$, 而部分恶性肿瘤病人显著低于正常, $\bar{X} \pm \text{SE} = 12.2 \times 10^4 \pm 2.9 \times 10^4$, $t = 2.779$, $P < 0.05$, 两组有显著差别, 见表 7。

表 7 肿瘤病人细胞免疫状态

病 例	诊 断	^3H -TdR 参 入 强 度 cpm/ 10^6 淋巴细胞
夏 × ×	上颌窦癌转移下颌骨中心性癌	0.18×10^4
马 × ×	腮腺癌, 手术后复发	0.91×10^4
庞 × ×	颈部黑色素瘤	0.46×10^4
徐 × ×	口腔圆柱瘤转移肺	11.70×10^4
胡 × ×	牙龈横纹肌肉瘤	12.30×10^4
胡 × ×	颊部腺瘤, 复发	15.10×10^4
刘 × ×	腮腺粘膜表面癌	16.20×10^4
镇 × ×	颊癌复发	16.80×10^4
曹 × ×	腮腺恶性肿瘤	19.80×10^4
丁 × ×	黑色素瘤淋巴转移	29.00×10^4

病例由上海第二医学院附属第九人民医院口腔外科病房提供。

初步表明用同位素参入法测定细胞免疫功能是有一定意义的，且比形态上观察淋巴细胞转化率更为客观。

(2) 小牛胸腺提取物对小白鼠胸腺细胞 $^3\text{H-TdR}$ 的影响 $^3\text{H-TdR}$ 参入细胞 DNA 法亦适用于衡量胸腺细胞的分裂增殖速度，以及一些制剂对它的影响。已知青年动物的胸腺细胞自动分裂 (Spontaneous division) 极为旺盛，只要在适当的培养条件下既能参入 $^3\text{H-TdR}$ 。我们摸索了这个体外系统 (培养条件与周围淋巴细胞的相近似) 用作某些 T 细胞抑制剂活力测定的方法。下列实验结果初步说明，由小牛胸腺中提取的淋巴球抑制素 (Lymphocyte chalone 主要成分是蛋白质) 有抑制小白鼠胸腺细胞对 $^3\text{H-TdR}$ 参入的作用 (见表 8)。

表 8 小牛胸腺提取物对小白鼠胸腺细胞参入 $^3\text{H-TdR}$ 的影响

实 验 批 数	加淋巴球抑制素 毫克/毫升	cpm [$\bar{X} \pm SD$] ($n = 3$)	抑制率 (%)
一	0 (对照组)	23660 $\pm$ 3502	0
	0.125	24169 $\pm$ 1439	0
	0.25	18904 $\pm$ 2639	20
	0.50	13739*	42
	0.80	10078 $\pm$ 576	57
二	0 (对照组)	15557 $\pm$ 1933	0
	0.50	7576 $\pm$ 595	51
	1.0	4366 $\pm$ 369	72

注：① * $n=2$ ； ② 反应系统：每培养管总体积 2 毫升 RPMI 1640 (20% 小牛血清) 每管含小鼠 (4—6 周) 胸腺细胞 1×10^7 ，于 37℃ 保温 3 小时后加入 $^3\text{H-TdR}$ 1 微居里/毫升，继续培养 1 小时后收集细胞进行测定。(抑制物质由本院生化教研组提供，并参加部分实验工作。)

(3) 植物血凝素 (Phytohemagglutinin, 简称 PHA) 活力的测定 体外 PHA 能刺激外周血中淋巴细胞合成 DNA 一事，已为人们所了解。因而借助于 $^3\text{H-TdR}$ 参入强度 (cpm) 能够反应 PHA 之活力，本实验取 0.3 毫升肝素化全血，以不同 PHA 浓度刺激，结果如图 3 所示。

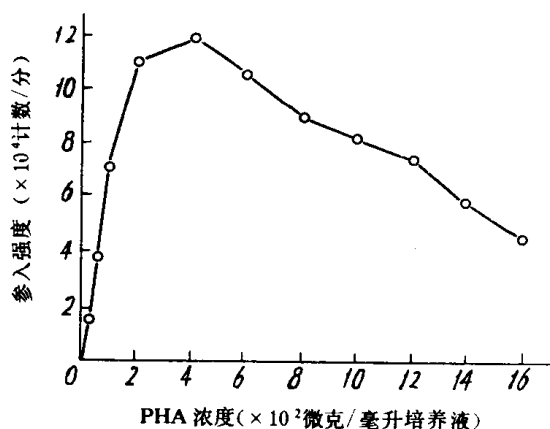


图 3 PHA 的活力测定曲线

从测定结果清楚地看出，PHA 刺激的最佳浓度为 400 微克/毫升培养液，此效价与红血球凝结法及形态检查结果一致，这表明本实验方法能够敏感地反映 PHA 的抗原活力。

(4) 健康人双相混合淋巴细胞的培养 哺乳动物带核细胞表面存在某些共同的器官特异性抗原，所以将两个无关供体的外周淋巴细胞混合培养时，由于淋巴细胞受到异体抗原