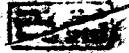


肿瘤免疫、生化诊断与免疫治疗



80286



肿瘤免疫、生化诊断 与免疫治疗

王文字 编著

FA34/05

科学技术文献出版社重庆分社

内 容 简 介

本书介绍了国内外近年来兴起的肿瘤免疫、生化诊断和肿瘤免疫治疗方法。

全书共分二篇六章。第一篇重点介绍肿瘤免疫和生化诊断方法；第二篇介绍部分免疫治疗剂的抗癌机制及临床应用。

本书可供临床、检验医务工作者及肿瘤研究工作者使用。

肿瘤免疫、生化诊断与免疫治疗

王文章 编 著
责任编辑 马 英

科学技术文献出版社重庆分社 出 版 行

重庆市市中区胜利路132号

全 国 各 地 新 华 书 店 经 销
中 共 重 庆 市 委 机 关 印 刷 厂 印 刷

开本：787×1092毫米 1/32 印张：8 字数：17万
1989年5月第1版 1989年5月第1次印刷
科技新书目：195—285 印数：1-3000

ISBN7-5023-0346-4/R·75 定价：2.70元

前 言

迄今,世上尚无一种对肿瘤诊断,特别是早期诊断和治疗绝对有效的方法,诸多现有方法比较起来,肿瘤的免疫和生化诊断确实有它独到之处。比如说用几滴血、几滴尿就可以对大多数的肝癌、鼻咽癌、胃癌、大肠癌、卵巢癌、肺癌、血癌等进行诊断,甚至可进行早期诊断。肿瘤免疫、生化诊断与其它诊断方法比较起来优点是对患者无损伤、无痛苦、无严重的经济负担。它不仅可用在临床诊断,而且可从健康普查中筛选出带瘤患者,从而使患者得到早期治疗。肿瘤免疫和生化诊断方法不需要昂贵的设施,操作人员容易培训,适应基层医院开展。

肿瘤免疫、生化诊断的研究和应用在国内只不过是近十几年的事,对肿瘤免疫、肿瘤生化代谢,特别是肿瘤特异性抗原等问题的研究还不够深入。

但是,肿瘤免疫、生化诊断的前景是光明的,随着肿瘤免疫学、肿瘤生物学的深入研究,它必将在肿瘤诊断和治疗领域独占鳌头,发挥优势。有鉴于此,我把这方面的资料结合自己的工作体会整理成册,旨在引起国内专家、研究人员、临床检验工作者的重视,以便能深入开展研究,使肿瘤免疫、生化诊断与免疫治疗尽快成为独特的肿瘤诊断学与治疗学。

由于水平有限,时间仓促,错误和不足之处在所难免,敬盼读者批评指正。

编 者

目 录

第一篇 肿瘤免疫、生化诊断	(1)
第一章 肿瘤免疫诊断概说	(1)
第二章 肿瘤免疫诊断方法	(3)
第一节 应用血清甲胎蛋白的测定诊断原发性肝癌	(3)
第二节 应用血清醛缩酶A的测定诊断肝癌原理及临 床意义	(11)
第三节 应用血清CEA的测定诊断恶性肿瘤	(18)
第四节 应用胃液CEA的测定诊断胃癌	(22)
第五节 应用肿瘤相关抗原的测定诊断胃癌	(22)
第六节 应用胃液“胃癌相关抗原”的测定诊断胃癌	(25)
第七节 应用胃液SIgA的测定诊断胃癌	(28)
第八节 应用血清α_1-酸性糖蛋白的测定诊断恶性肿瘤	(33)
第九节 应用胎盘提取液皮试法诊断肿瘤	(36)
第十节 应用血清结合珠蛋白的测定诊断恶性肿瘤	(39)
第十一节 应用卵巢癌相关抗原的测定诊断卵巢恶性 肿瘤	(45)
第十二节 应用支气管分泌物SIgA的测定诊断肺癌	(50)
第十三节 应用血清纤维蛋白原降解产物(FDP)的 测定诊断肺癌	(52)
第十四节 应用淋巴细胞转化试验诊断肿瘤	(60)
第十五节 应用白细胞粘附抑制试验诊断恶性肿瘤	(62)
第十六节 应用血清EB病毒壳抗原的IgA抗体的测定 诊断鼻咽癌	(65)
第十七节 应用血清甲状腺球蛋白的测定诊断甲状腺	

癌.....	(68)
第十八节 应用雌激素受体的测定诊断乳腺癌.....	(71)
第十九节 应用血清M-蛋白的测定诊断多发性骨髓瘤.....	(72)
第二十节 应用血清铁蛋白的测定诊断恶性肿瘤.....	(76)
第二十一节 应用巨噬细胞电泳移动的测定诊断肿瘤.....	(81)
第二十二节 应用细胞膜荧光标记技术诊断急性白血病.....	(85)
第二十三节 应用血清循环免疫复合物的测定诊断恶性 性肿瘤.....	(87)
第三章 肿瘤生化诊断概说.....	(91)
第四章 肿瘤生化诊断方法.....	(94)
第一节 应用尿多胺的测定诊断恶性肿瘤.....	(94)
第二节 用血清紫色反应诊断肿瘤.....	(98)
第三节 应用血清唾液酸的测定诊断肿瘤.....	(100)
第四节 应用血清脂质结合唾液酸的测定诊断肿瘤.....	(102)
第五节 应用血清粘蛋白的测定诊断肿瘤.....	(105)
第六节 应用血清铜蓝蛋白的测定诊断肿瘤.....	(107)
第七节 应用血清乳酸脱氢酶及其同工酶的测定诊断 肿瘤.....	(112)
第八节 应用胃液乳酸脱氢酶及其同工酶的测定诊断 胃癌.....	(120)
第九节 应用尿玫瑰红反应诊断恶性肿瘤.....	(123)
第十节 应用白细胞过氧化物酶活性的测定诊断肿瘤.....	(124)
第十一节 应用血清极谱分析诊断恶性肿瘤.....	(126)
第十二节 应用胃液极谱分析诊断胃癌.....	(128)
第十三节 应用血清耐热试验诊断恶性肿瘤.....	(129)
第十四节 应用血清核糖核酸酶活性的测定诊断恶性 肿瘤.....	(131)
第十五节 应用血清 α_1 -抗胰蛋白酶的测定诊断肝癌.....	(136)
第十六节 应用血清异柠檬酸脱氢酶的测定诊断肝 癌.....	(141)

第十七节	应用血清 β -葡萄糖醛酸苷酶活性的测定 诊断肝癌	(144)
第十八节	应用血清 γ -谷氨酰转肽酶及其同功酶的 测定诊断肝癌	(147)
第十九节	应用尿吡啶乙酸的测定诊断胃癌	(149)
第二十节	应用四环素试验诊断胃癌	(152)
第二十一节	应用尿中性硫化物试验诊断胃癌	(158)
第二十二节	应用胃液二巯腺锌的测定诊断胃癌	(159)
第二十三节	应用血清酚试验诊断肺癌	(161)
第二十四节	应用尿中 β -葡萄糖醛酸苷酶活性的测定 诊断膀胱癌	(163)
第二十五节	应用胃液 β -葡萄糖醛酸苷酶活性的测定 诊断胃癌	(166)
第二十六节	应用血液粒细胞锌含量的测定诊断肿瘤	(168)
第二十七节	应用氯醋酸AS-D-萘酚酯酶染色诊断白 血病	(169)

第二篇 肿瘤免疫治疗

第五章	肿瘤免疫治疗的概说	(172)
第一节	肿瘤免疫治疗的免疫学基础	(172)
第二节	对肿瘤免疫治疗的评价及分类	(175)
第六章	常用肿瘤免疫治疗方法	(177)
第一节	特异性主动免疫治疗——瘤苗的应用	(177)
第二节	卡介苗	(179)
第三节	棒状杆菌	(184)
第四节	左旋咪唑	(188)
第五节	链球菌制剂——OK-432	(191)
第六节	干扰素	(195)
第七节	胸腺素	(199)
第八节	植物多糖——云芝多糖	(202)

第九节 转移因子	(204)
第十节 免疫核糖核酸 (IRNA)	(207)
第十一节 白细胞介素-2 (IL-2)	(210)
第十二节 肿瘤坏死因子 (TNF)	(219)
免疫治疗结语	(230)

附 录..... (232)

一、肿瘤细胞膜抗原 3 克分子/升KCl提取法	(232)
二、离子交换层析法	(233)
三、凝胶层析技术	(237)
四、酚酞葡萄糖醛酸苷辛可尼丁盐的合成方法	(243)
五、简易细胞电泳装置	(246)

第一篇

肿瘤免疫、生化诊断

第一章 肿瘤免疫诊断概说

本章概括介绍肿瘤免疫诊断中以肿瘤抗原为中心的免疫学基础，从而对肿瘤免疫诊断的应用及其发展远景有个正确的评价。

肿瘤免疫诊断的免疫学基础是什么？简言之，就是肿瘤的抗原抗体反应。如果肿瘤存在特异性抗原，必然会产生特异性免疫反应，肿瘤的特异性诊断、治疗及预防等重大问题也就迎刃而解了。但为什么截至目前还不能把肿瘤的免疫诊断与免疫治疗摆到应有的重要位置上呢？换句话说，肿瘤免疫诊断至今还只能提供诊断肿瘤的一些参考指标（对大多数病例是这样），根本上这是因为人们对肿瘤特异性抗原还没有真正认识和掌握。

在研讨肿瘤抗原时，肿瘤特异性抗原到底存在与否，这恐怕又是首当其冲的问题。现在让我们作一简单的回顾。早在本世纪初就有人提出肿瘤细胞具有肿瘤抗原。他们的这种认识大致有以下事实来证明。

首先，纯系动物的个体之间不存在组织相容性抗原的差异。当把CH₁小鼠的肉瘤移植给同系的另一个体时，第一次移植造成致敏，第二次移植就出现对肉瘤细胞的排斥反应。这是肿瘤细胞存在肿瘤抗原的有力证据。

其次，如果用某些化学试剂，如甲基胆蒽等诱发的肉瘤进行同种个体移植，肿瘤生长良好。受体动物最后死于肿瘤。如果在肿瘤生长到适当阶段给予切除，受体动物继续存活。对这个存活动物再接种同种肉瘤细胞，则肉瘤细胞不能生长。说明小鼠对这种肿瘤细胞产生了免疫反应，也证实了肿瘤抗原的存在。

第三，接续上面的工作，给已经产生肿瘤免疫能力的受体动物同时移植原肿瘤供体动物的皮肤和肿瘤。结果，移植的肿瘤受到排斥，而皮肤则能存活。这就进一步证实了免疫动物对肿瘤的排斥作用确实是由肿瘤细胞上存在的肿瘤抗原引起的，而不是组织相容性抗原（HLA）引起的。

现在已经证实不仅化学因素诱发的实验性肿瘤是这样，由病毒或物理因素所诱发的肿瘤也存在肿瘤抗原。但是对肿瘤抗原的认识，目前还不深入。肿瘤抗原到底是怎样形成的，还没有明确结论。有人认为肿瘤抗原实质上是细胞癌变过程中相关分子改变的结果，这些分子具有免疫原性。有人认为某些抗原是个体发生的某阶段或组织分化的某一时期作为正常成分出现的物质。于是把肿瘤抗原的概念概括为细胞癌变过程中出现的具有免疫原性的许多新的大分子的总称。

现在大多数人认为肿瘤存在特异性抗原与相关性抗原，而且是两类作用完全不同的大分子物质。

肿瘤特异性抗原：这种抗原只存在于肿瘤细胞（表面），不存在于正常细胞（表面）。但在测定的时候，必须注意方法的灵敏性，并要有严格的正常对照，否则会把个体发育的不同阶段或组织分化过程中出现的正常抗原看成是肿瘤抗原。或把正常组织存在的但含量较低的抗原遗漏。

肿瘤相关性抗原（Tumor-Associated Antigens）：这是

另一类存在于肿瘤细胞表面的大分子。它不是肿瘤细胞所特有的成分，其含量在细胞癌变时明显增高，但没有严格的肿瘤特异性。而且带瘤宿主的免疫系统不能识别这类抗原是否为外来物质。因此对带瘤宿主来说，它不具有抗原性，宿主对它们也不产生免疫反应。这种抗原的特点是：①其含量增加与细胞的癌变过程有关。②可用免疫方法检测。③这种分子对异种动物有很强的免疫性，可用来制备抗血清，借以检测肿瘤患者血清或瘤细胞中存在的这类物质，因此具有很大的临床检验实用价值。以后各节中所介绍的抗原也多属此类抗原。

由于肿瘤抗原的存在，通过体内或体外方法进行研究和检测可提供对肿瘤诊断的依据。一般地说肿瘤的免疫诊断主要有两种方法，即测定肿瘤的相关抗原和测定机体对肿瘤相关抗原的免疫反应。在测定抗原方面，可以测定各种肿瘤的共同抗原，也可以测定胚胎抗原或对某个器官相对专一的肿瘤相关抗原；既可测定癌细胞表面抗原，也可以测定癌细胞分泌到体液内的各种相关抗原，从而在临床上对肿瘤作出诊断。

第二章 肿瘤免疫诊断方法

第一节 应用血清甲胎蛋白的测定 诊断原发性肝癌

原理及临床意义

世界卫生组织及国际癌症研究协会认为：“AFP（甲胎蛋白）是哺乳类动物血清在发育中首先出现的 α 球蛋白，而

且是早期胚胎主要的血清蛋白质，成人血清在一些病理状态下（主要是肝细胞癌），这一血清蛋白质还会再现”。在个体发育中，AFP由胚胎时期肝实质细胞与卵黄囊合成并分泌到血液中。在健康的成年人血清中，用普通的测定方法，例如琼脂扩散法不能测出AFP。

胚胎蛋白在肿瘤发生中出现的机理是什么？一般认为，肿瘤发生中胚胎蛋白的出现是因为基因的抑制和去抑制失控造成的。胚胎细胞的某些基因，在正常发育过程中功能受到抑制，不再指导合成某些蛋白，但在癌变过程中受某些因素如病毒，化学致癌物质等的影响，去除了这种正常抑制作用，使这些基因又恢复了原来合成胚胎蛋白的功能，成为肿瘤胚胎性抗原。

AFP增高尽管也出现在肝癌以外的其它疾患，但测定AFP仍不失为一种特异性较高的肝癌诊断方法。

检测方法一

（放射火箭免疫电泳自显影法）

测定AFP的方法很多，例如琼脂双向扩散法，对流免疫电泳法，补体结合试验以及血凝法等，但敏感性与特异性都赶不上放免法。

（一）材料

1. 取待检对象的静脉血或耳血0.3毫升，立即注入清洁的小玻璃试管内，静置。待析出血清后测定AFP。
2. 甲胎蛋白特异性抗体。
3. ^{125}I 标记的甲胎蛋白。

（二）操作

1. 以巴比妥缓冲液(离子强度为0.025克当量, pH8.6)配制成1%的琼脂, 煮沸融化, 待其冷至56°C时, 迅速取35毫升与0.35毫升1:100的甲胎蛋白特异性抗体混匀, 立刻倾注于9×13厘米的玻璃板上。冷凝后打孔, 孔径为6毫米。

2. 每孔内加待测血清50微升, 再取¹³¹I甲胎蛋白在每个样品孔内分别加入10微升, 标记¹³¹I甲胎蛋白放射性约为300—600脉冲。

3. 用离子强度0.025克当量, pH8.6的巴比妥缓冲液, 电泳3.5小时(先以端电压1伏/厘米30分钟预热, 再以3伏/厘米电泳3小时)。

4. 电泳结束后, 将琼脂板放于烤箱(约80°C)内烘干; 将玻璃板的琼脂面贴上X线胶片进行感光, 过夜。

5. 按常规显影、定影, 通过放射自显影即可显示出甲胎蛋白抗原抗体复合物的沉淀峰。峰值的高度与甲胎蛋白的含量呈正相关。用已知标准甲胎蛋白沉淀峰值的毫米数为纵坐标, 甲胎蛋白含量的毫微克数为横坐标, 绘制标准曲线, 从中即可查出待测血清中AFP的含量。

方法一 结语

1. 本法对原发性肝癌的诊断率可达90%以上, 并有一定的早期诊断意义。但也有少数病例AFP不高或偏高。

2. 妊娠时胎儿体内的AFP可随胎盘进入母体血液。妊娠3—9个月时AFP可达90—500毫微克/毫升。(注)

3. 部分肝炎, 特别是暴发型肝炎患者血清AFP可高达300—1000毫微克/毫升。

4. 判断原发性肝癌, 国内通用的AFP阈值为>400毫

微克/毫升。

5. 睾丸或卵巢畸胎瘤患者的血清可测出较高的AFP值。

6. 正常人血清中含有少量AFP，一般在25毫微克/毫升以下。

7. 本法特异性强，灵敏度高，结果稳定可靠，既适合临床检验，也可用于大面积人群普查。

〔注〕 AFP可能是一种免疫调节因子，对正常妊娠、胎儿发育、分娩有一定生理意义。AFP对细胞介导的免疫反应和抗体合成有抑制作用。免疫抑制的发生对胎儿的意义是：①可使胎儿接受来自母体的免疫球蛋白而不致发生排斥反应，以利安胎；②使胎儿更容易诱导免疫耐受性以防止自身免疫反应的发生；③当母亲的淋巴细胞进入胎儿体内时，可防止发生移植物抗宿主反应。妊娠后期母体免疫功能下降可能与体内出现大量AFP有关。

检测方法二

（酶免疫测定法）

（一）材料

1. 马抗人AFP抗体的制备：采用市售马抗人AFP抗血清，再用硫酸铵沉淀法和DEAE-纤维素型离子交换层析法进一步分离和提纯其IgG部分。经聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳鉴定为一个区带，并经琼脂双扩散测定抗体效价达一定高度即可分装、低温保存备用。

2. 酶标抗体的制备：采用过碘酸盐氧化法，将辣根过氧化物酶与马抗人AFP抗体偶联制备酶标抗体。

3. 塑料板：40孔聚苯乙烯微量培养板。

4. 比色仪：72型分光光度计。

5. 反向被动血凝板。

(二) 试剂

1. 包被缓冲液：pH9.5, 0.1克分子/升的碳酸盐缓冲液。

2. 洗涤液及保温液：pH7.2, 0.02克分子/升的磷酸盐缓冲液，内含0.01%白明胶，0.05%Tween20, 0.13克分子/升的NaCl。

3. 底物溶液：含0.04%邻苯二胺和0.045%过氧化氢的柠檬酸。磷酸氢二钠缓冲液（新鲜配制）。

4. 反应终止液：2克分子/升的 H_2SO_4 。

5. 标准AFP液：AFP标准为1200毫微克/瓶（或2000毫微克/瓶）。使用时用保温液稀释为100毫微克/毫升，再倍比稀释至0.78毫微克/毫升。

(三) 操作

1. 包被抗体：将马抗人AFP抗体用包被缓冲液稀释为5微克/毫升，加入经处置的聚苯乙烯微量培养板孔内，每孔0.2毫升，于4℃静置过夜。次日甩干微孔内液体，用洗涤液清洗三次，每次5分钟。

2. 加入待测抗原：用保温液将待测AFP抗原稀释为适宜浓度（见后述），每孔加入0.2毫升（不加抗原的对照孔加保温液0.2毫升）。37℃保温1.5小时，取出微量培养板，洗涤三次（洗涤方法同上）。

3. 加入酶标抗体：将酶标抗体用保温液1:1000稀释，每孔加0.2毫升，37℃保温1.5小时，取出培养板，洗涤三次（洗涤方法同上）。

4. 底物显色及比色：每孔加底物溶液0.2毫升，37℃保温30分钟，取出培养板，每孔加入反应终止液1滴，在

4℃冰箱内放置30分钟，在（72型）分光光度计上，用492毫微米波长读取各孔光密度值。从标准曲线上查得毫微克/毫升数，乘上稀释倍数，即为血清AFP含量。

（四）几个最适浓度的选择方法

1. 酶标抗体最适浓度的选择：选用足量包被抗体浓度（20微克/毫升）及AFP抗原浓度（脐带血稀释两倍）。酶标抗体由1:100开始倍比稀释至1:25600，按标准程序进行酶免疫试验。以酶标抗体稀释倍数为横坐标，光密度值（OD值）为纵坐标，绘制酶标抗体滴定曲线。选取曲线直线部分的近中心处，此时酶标抗体浓度设为1:1000，作为最适浓度。

2. 包被抗体最适浓度的选择：取酶标抗体浓度1:1000，将脐带血稀释两倍为AFP抗原浓度。包被抗体浓度取41.5微克/毫升，倍比稀释至0.17微克/毫升，按标准程序进行酶免疫试验。以包被抗体不同浓度为横坐标，以OD值为纵坐标，绘制包被抗体滴定曲线。选取产生最大吸收的抗体最高稀释度，在曲线上设2.6微克/毫升，为最合适的包被抗体浓度。但在实际检验中为确保足够数量可采用5微克/毫升的浓度。

3. 待测AFP抗原最适稀释度的选择：酶免疫试验反应的强度，与一定范围内待测AFP浓度的对数呈线性关系。所以，需要选择适宜的AFP浓度，使AFP含量处于标准曲线的灵敏范围以内。可用反向血球凝集试验选择之。以血凝试验出现+++—++++的AFP稀释度为最适稀释度。如血凝试验阴性，要以1:10稀释血清，以减少血清干扰因素对测定的影响。

方法二检测结果示例

据北京市临床医学研究所狄华等报告，应用本法测定的

结果如下:

组别	例数	AFP的主要分布范围 (毫微克/毫升)	阳性率(%) (>25 毫微克/毫升)	备注
正常人	97	0—20		仅1例为20毫微克/毫升其余均在0—11.5毫微克/毫升,
原发性肝癌	49	1000—3000000	95.9	2例 <25 毫微克/毫升
肝硬化	7	6例均 <25	14.3	1例为260毫微克/毫升
妊娠中期胎儿羊水	11	760—4800		

方法二 结语

1. 本法比较简便、快速,特异性和灵敏度也高。微孔板一次可包被多块,放置在冰箱内可备用多日。
2. 酶结合物稳定,辣根过氧化物酶的活性可直接测定,无同位素污染之忧。
3. 本实验影响因素较多,应严格控制实验条件。

检测方法三

(酶标对流参比电泳测定法)

(一) 材料与处置

1. 抗AFP抗体的纯化:将购得的抗人AFP诊断血清用0.01克分子/升、pH7.5的磷酸盐缓冲生理盐水透析过夜,再用DEAE纤维素纯化IgG,使其达到醋纤膜电泳纯,并浓缩至每毫升含IgG 4—5毫克。
2. 辣根过氧化物酶标记抗AFP抗体。
3. 底物溶液配制:在每100毫升0.01克分子/升、pH 6.0