

生化新药—

胸腺素注射液 鉴定会资料集

山东省胸腺素协作组

山东省科学技术情报研究所

一九八一年五月

目 录

山东省胸腺素研制情况	
山东莱阳生物化学制药厂.....	1
山东省胸腺素三次科研临床座谈会的概况及其学术报道.....	2
胸腺素注射液生产工艺	
山东医学院 张天民	
山东莱阳生化药厂 徐文榜等.....	3
胸腺素注射液暂行质量标准	
山东莱阳生物化学制药厂.....	5
胸腺素注射液暂行质量标准起草说明	
山东莱阳生物化学制药厂.....	7
猪胸腺素免疫活性的研究——对猪淋巴细胞E受体的激活试验	
昌潍医学院微生物学教研室 李在连等.....	12
479例胸腺素临床疗效总结	
山东省胸腺素临床协作组 汤千一等.....	18
猪胸腺素临床应用217例疗效总结	
山东省胸腺素临床验证组.....	23
胸腺素治疗慢性乙型病毒性肝炎27例临床报告.....	35
胸腺素应用于眼病的疗效观察	
上海市眼病防治所 吴厚章	
上海市医学化验所 陶义训等.....	40
胸腺素儿科临床应用43例分析	
山东医学院附属医院小儿科 宁铁英.....	46
胸腺素治疗小儿支气管哮喘	
山东省人民医院 冯益真.....	49
胸腺素治疗三例反复发作性口腔溃疡	
山东省千佛山医院 张鸿逵.....	53
免疫药物治疗重症肌无力与免疫学观察31例临床分析	
山东中西医结合研究院内科神经组免疫实验室俞昌正等.....	54
胸腺素治疗类风湿性关节炎近期疗效观察	
山东医学院附属医院免疫组.....	60
胸腺素治疗组织病应用胸腺素临床观察	
山东省人民医院皮肤科 刘洪义整理.....	64
胸腺素在皮肤科的应用	
上海市皮肤病防治所 刘喜义等.....	66

胸腺素治疗慢性肾炎(肾病型)三例报告	
昌潍医学院附属医院内科 张玉太	68
胸腺素治疗三例系统性红斑狼疮总结	
山东医学院附属医院内科血液病组 张季秀	70
胸腺素治疗病毒性肝炎10例疗效观察	
中国人民解放军第145医院 杨树仁 整理	73
胸腺素治疗16例慢性肝炎小结	
中国人民解放军第145医院 门洪利	74
胸腺素治疗慢性肝炎疗效观察	
昌潍医学院附属医院内科 张玉太等	75
胸腺素治疗免疫机能低下所致小儿呼吸道反复感染的临床疗效	
山东省千佛山医院 张鸿逵等	79
猪胸腺素辅助治疗恶性肿瘤临床观察	
山东医学院附属医院外科肿瘤组 吴欣志	84
胸腺素治疗慢性肾功衰竭一例报告	
济南市中心医院 徐庆来	85
猪胸腺素对放疗癌症患者细胞免疫功能的影响	
山东省医学科学研究所等	85
胸腺素治疗慢性肝炎临床观察	
莱阳中心医院 张洪信等	90
胸腺素应用于皮肤病小结	
山东省千佛山医院皮肤科 刘振芝	94
胸腺素治疗结节性脂膜炎一例报告	
昌潍医学院附属医院内科 张玉太	97
猪胸腺素治疗前纵膈胸腺瘤和血管免疫母细胞淋巴瘤病的个案报告	
山东烟台地区桃村中心医院 明俊英	99
胸腺素临床治疗四例类风湿性关节炎和二例哮喘病例报告	
威海疗养院	101
胸腺素治疗胃癌初步观察(附10例报告)	
山医泰安分院附属医院 童瑞田等	103
浆细胞肉瘤胸腺素治疗观察	
泰安地区人民医院肿瘤科 陈问谭	106
胸腺素临床验证20例小结	
莱阳中心医院	107
胸腺素对白血病, 红斑狼疮免疫指标影响的观察小结	
山东省人民医院血液病组	109

胸腺素对小白鼠抗放提白效果观察	
山东省医学科学研究所工业卫生研究室 林好学等	109
猪胸腺素 5 组分对 600 伦照射小鼠血浆 cAMP 及 T 淋巴细胞的影响	
山东省医学科学研究所 方庆龙等	116
胸腺素的抑癌效应	
山东师范学院生物系 王凯华	119
胸腺素 5 组分对 900 伦照射小鼠抗放效果观察	
山东省医学科学研究所 林好学等	123
猪胸腺素对 600 伦照射小鼠血清甲状腺素 (T_4) 含量影响初步观察	
山东省医学科学研究所 谢志淳等	126
猪胸腺素免疫活性的测定方法	
山东师范学院生物系 王凯华	130
山东省胸腺素的聚丙烯酰胺凝胶电泳 (简报)	
山东医学院生化药物研究室 尹德瑛	133
山东胸腺素氨基酸分析	
中国科学院上海生物化学研究所科技处 俞鹤年	134
制备胸腺素栓剂的设想	
山东中医学院药剂教研室 张翌	135
猪胸腺素抗原性的研究	
昌潍医学院微生物教研组 王建业等	136
胸腺素研究进展 (综述)	
山东省胸腺素协作组 张天民等	138
从国际文献报导看莱阳胸腺素产品水平	
山东省图书馆 陶振纲	146
胸腺素的化学和生物学	148
胸腺素对小鼠放射病的影响	
张丹枫译	156
牛胸腺素的纯化和性能	160
技术鉴定书	169

山东省胸腺素研制情况

山东省莱阳生物化学制药厂

细胞免疫的发育及调节需要具有正常功能的胸腺。自格斯登 (Goldstein) 等于1966年从小牛胸腺中部分地提纯了一种胸腺激素并命名为胸腺素 (Thymosin) 以来,其提纯方法逐渐有所改善。现已知某些原发性免疫缺陷病,自身免疫性疾病,恶性肿瘤以及老年性退化性病变与胸腺功能的减退及血中胸腺素水平的降低有关,临床上已有不少试用胸腺素治疗免疫缺陷病及癌等疾病的报道。

1977年我厂和山东医学院参照格斯登的工艺并重新设计,以猪胸腺为原料,制备了胸腺素注射液,经活性测定和动物实验后应用于临床。济南军区一四五医院也参加了初期的实验室试制工作。

从1977年起,列入山东省科研计划项目,1978年卫生、医药、教育、商业四局共同组织了山东省胸腺素协作组,对胸腺素的生产工艺、质量标准、化学和生物学方面(包括有关药理作用)的研究以及临床验证等作了大量研究工作。

根据省科委的安排,省卫生、化工、教育、商业四局于1978年8月15日在山东莱阳召开了第一次胸腺素科研临床座谈会。会后省四局印发的会议纪要指出,“莱阳生化药厂等单位试制的胸腺素,经化验有明显的活性,没有发现毒性……,会议确定立即组织临床验证,”此内容也进行了学术报道。

1979年5月在山东莱阳召开了第二次胸腺素科研临床座谈会。参加这次会议的除我省山东医学院、山东大学、山东师范学院、山东中医学院、青岛医学院、昌潍医学院、山东省医学科学研究所、山东省中西医结合研究院、山东省人民医院、山东医学院附属医院、山东省药检所、烟台地区药检所、济南军区一四五医院、桃村中心医院、莱阳中心医院等医院外,还邀请了上海医药工业研究院、上海皮肤病眼病防治所、上海第二医学院和上海第二医学院附属瑞金医院等单位的代表到会指导,并参加了有关科研项目的协作。会后省四局印发的座谈会纪要指出,“有关单位开展社会主义大协作,积极完成会议分工的科研临床任务,进一步取得了阶段性科研成果。”会后的学术报道指出:

“猪胸腺素经130余例临床证明对免疫缺陷病、红斑狼疮、慢性肝炎及重症肌无力等确有一定疗效,对癌症患者进行化疗、放疗的同时配合使用本品,具有较好的耐受性。会议讨论了提高产品纯度和稳定性的措施及探讨活性测定的技术,还对其抗原性和毒性试验进行了讨论,在猪胸腺素对小白鼠抗放、升白效果方面也进行了一定的研究工作。”

1980年4月在济南召开了第三次科研临床座谈会,会后省四个厅局发了纪要,会后的学术报道指出:“山东省胸腺素协作组于1977年开始,用山东莱阳生物化学制药厂生产的猪胸腺素在11个医院对临床25种疾病至1980年4月共222例病人进行了验证,总有效率为167例(75.22%)。……本组在治疗过程中,随着细胞免疫功能的改善,临床症状及体征均有一定改善,说明本药对治疗本组疾病有一定理论基础,实践证明也是有效

的。”

1980年4月后,根据省四个厅局文件,继续对山东省猪胸腺素的生产工艺、活性检验和临床验证等进行了研究。

自1977年以来我厂共试生产了胸腺素480批,供给临床3万余支。经各大专院校和科研、药检部门的药理、动物实验及活性检查证明生产的质量是稳定的,其免疫治疗作用是显著的,其纯度也比较好。从400余例临床看来,用胸腺素治疗总有效率约在75%左右,副作用较小。

山东省胸腺素三次科研临床座谈会的概况及其学术报道

山东省用猪胸腺为原料提取胸腺素是从1977年开始的,经山东省科委统一安排,省卫生、医药、教育、商业四个厅局,从1978年来,共同组织了胸腺素的全面科研和临床验证。

根据省科委的安排,省卫生、化工、教育、商业四局于1978年8月15日在山东莱阳召开了第一次胸腺素科研临床座谈会议。会后省四局印发了会议纪要〔(78)鲁卫药字第90号、(78)鲁化橡医字第44号、(78)鲁教发字第148号、(78)商食字第570号〕,指出:“莱阳生化药厂等单位试制的胸腺素,经化验有明显的活性,没有发现毒性…”,会议确定立即组织临床验证。”此内容也进行了学术报道〔张天民等,医药工业简讯12:7(1978);张天民等,脏器生化制药3:16(1978);张天民,药学通报14:272(1979)〕。

1979年5月在山东莱阳召开了第二次胸腺素科研临床座谈会议。参加这次会议的除我省山东医学院、山东大学、山东师范学院、山东中医学院、青岛医学院、昌潍医学院、山东省医学科学研究所、山东省人民医院、山东医学院附属医院、山东省中西医结合研究院、山东省药检所、烟台地区药检所、济南军区一四五医院、桃村中心医院、莱阳中心医院等医院外,还聘请了上海医药工业研究院、上海皮肤病眼病防治所、上海第二军医大学附属医院、上海第二医学院、上海第二医学院附属医院瑞金医院的代表到会指导,并参加有关科研项目的协作。会后省四局印发了座谈会纪要〔(79)鲁卫药字第49号(79)鲁化橡医字第15号、(79)鲁教科字第9号、(79)商科字第345号〕,指出“有关单位开展社会主义协作,积极完成会议分工的科研临床任务,进一步取得了阶段性科研成果。”要求制定“产品的质量标准(试用),以利控制试制产品的质量,为鉴定审批正式药品质量标准作好准备工作。”会后的学术报道〔张天民、纪振东,医药工业9:21(1979);张天民、纪振东,脏器生化制药3:67(1979)〕指出:“猪胸腺素经130余例临床证明对免疫缺陷病、红斑狼疮、慢性肝炎及重症肌无力等确有一定疗效,对癌症患者进行化疗、放疗的同时配合使用本品,具有较好的耐受性。会议讨论了

提高产品纯度和稳定活性的措施及探讨其活性测定的技术，还对其抗原性和毒性试验进行了讨论。在猪胸腺素对小白鼠抗放、升白效果方面也进行了一定的研究工作。”

1980年4月在山东济南召开了第三次科研临床座谈会，会后省四局发了纪要〔80〕鲁药科字第194号、〔80〕鲁教科字第12号、〔80〕商科字第312号、〔80〕鲁卫药字第32号。〕会后的学术报道（张天民、梅表良、徐文榜、陈建华，胸腺素的制备性质和临床应用，山东医学院学术招生资料，1980年）指出，“山东省胸腺素协作组于1977年开始，用山东莱阳生物化学制药厂生产的猪胸腺素在11个医院对临床25种疾病至1980年4月共222例病人进行了验证，总有效率为167例（75.22%）。……本组在治疗过程中，随着细胞免疫功能的改善，临床症状及体征均有一定改善，说明本药对治疗本组疾病有一定理论基础，实践证明也是有效的。”

1980年4月后，根据省四局文件，继续对山东省猪胸腺素的生产工艺、活性检验、临床验证等进行了研究。

山东省猪胸腺素的研究过程中，各协作单位在有关刊物、内部资料、学术会议等发表了多篇文章，报道了对山东省猪胸腺素的研究成果，我们将另编写文章目录。

（张丙艾、纪振东、房超狄、张天民）

1981年5月5日

胸腺素注射液生产工艺

山东医学院药学系 张天民

山东莱阳生物化学制药厂 徐文榜 陈建华 梅表良

前 言

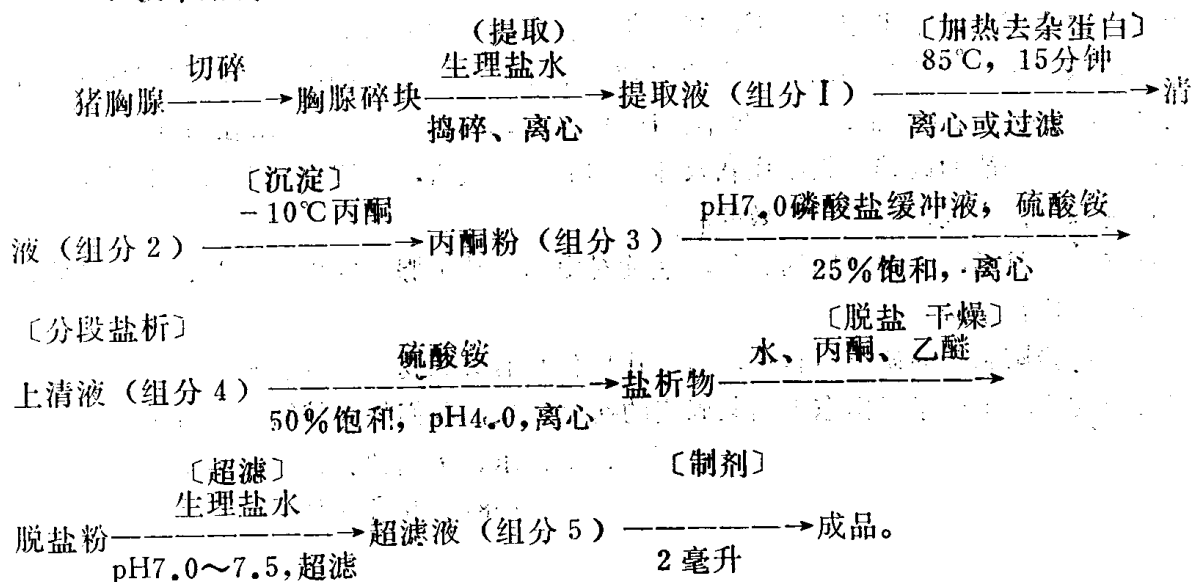
胸腺对动物细胞免疫所起的作用目前已被人们所公认。胸腺素是胸腺产生的一簇多肽或蛋白质激素。它们具有促使淋巴干细胞分化成为成熟的具有细胞免疫活性的T细胞亚群的功能，控制和调节免疫反应的质与量。

已有几组胸腺提取物的报告¹，除胸腺素（Thymosin）外，还有胸腺体液因子（Thymic Humoral Factor）、胸腺生成素I（Thymopoietin I）、胸腺生成素，II、淋巴细胞刺激激素（Lymphocyte-Stimulating Hormones）、自身稳定胸腺激素（Homeostatic Thymus Hormone）、胸腺降钙因子下T₁（Thymic Hypocalcemic Factor）以及胸腺降钙因子T₂等。

自Goldstein等²于1966年从小牛胸腺中部分地提纯了一种胸腺激素并命名为胸腺素以来，其提纯方法逐渐有所改进，1975年发表了适合于较大批量制备的方法³。称为胸腺素组分5的部分纯化提取物，证明对若干动物模型和由于胸腺功能低下所致原发性或继发性免疫缺陷病患者，是一种免疫增强剂（Immunopotentiating Agent）⁴，又称免疫刺激剂（Immunostimulating Agent）⁵，可用于免疫疗法（Immunotherapy）⁶。

我们自1977年开始，根据我国猪源丰富的特点，以猪胸腺为原料，参考了Goldstein的方法，并重新设计工艺，制备了胸腺素注射液。经过三年多来的动物实验和临床验证，胸腺素注射液活性高，无毒性，临床应用安全有疗效。现将我们的生产工艺介绍如下。

一、技术路线



二、工艺过程

1. 提取

将新鲜或冷冻猪胸腺除去脂肪，切成碎块，置高速组织捣碎机内，按每公斤胸腺加3升生理盐水，捣碎5分钟使成匀浆。冷冻离心机离心3000转/分10分钟得提取液（组分1）。

2. 加热去杂蛋白

将提取液于水浴中迅速加热至85℃，保持15分钟，迅速冷却至10℃以下，离心或过滤除去沉淀，收集清液（组分2）。

3. 丙酮沉淀

清液冷至4℃，加入5倍体积的-10℃丙酮，于-10℃放置4小时，过滤收集沉淀，真空干燥得丙酮粉（组分3）。

4. 分段盐析

将丙酮粉溶于pH7.0的磷酸盐缓冲液，使每毫升含蛋白质25毫克，加入pH7.0的饱和硫酸铵溶液使达25%饱和度，离心除去沉淀。上清液（组分4）调pH至4.0，加硫酸铵使饱和度达50%，离心收集盐析物。

5. 脱盐、干燥

盐析物用冷仓水丙酮反复重结晶脱盐，至检查无硫酸盐后，冷丙酮洗2次，冷乙醚洗2次，抽干，真空干燥。

6. 超滤

将脱盐干粉溶于生理盐水并调pH为7.0~7.5，超滤，得超滤液（组分5）。

7. 制剂

超滤液无菌灌装于2毫升安瓿，熔封得成品。

三、讨论

本工艺有以下特点：

1. 因为到目前为止，国外在临床上仍继续使用从小牛胸腺制得的胸腺素组分 5⁷，我们的工艺基本上保留了国外工艺的基本步骤，但结合我国的具体情况，作了相应改革，使其操作简便，适于较大批量生产。

2. 国外工艺对离心力的要求较高，我们则在加热去杂蛋白工序采用快速升温，降温 and 适当提高升温度等方法，使对热不稳定的蛋白质凝固较完全，易于除去，以弥补离心力之不足。

3. 利用冷仓水丙酮对盐析物进行重结晶脱盐，与葡聚糖凝胶法、透析法对比，可达同样目的，但重结晶法操作简便，大大缩短时间，减少污染机会。

用此法制备的胸腺素注射液活性较高，无毒性、无热原，临床应用安全、有效。

参 考 文 献

1. Bach JF, Ann Rev Pharmacol Toxicol 17:281 (1977)
2. Goldstein AL et al, Proc Nat Acad Sci US 56:1010 (1966)
3. Hooper JA et al, Ann N Y Acad Sci 249:125 (1975)
4. 罗高玲君等; JBe 254:981 (1979)
5. Meyer FH et al, Review of Medical Pharmacology, 6th Ed P526 (1978)
6. Fudenberg HH et al, Basic and Clinical Immunology, 2nd Ed P302, 707 (1978)
7. 罗高玲君, 个人通讯 (1981年3月30)

1981年5月

胸腺素注射液暂行质量标准

山东莱阳生物化学制药厂

本品系从猪胸腺提取得到的蛋白质类激素，每ml含蛋白质 1mg。

〔性状〕本品为无色或澄明液体。

〔检查〕pH值：应为6.0~7.5（中国药典1977年版二部附录37页）。

铵盐：取2ml 0.01%硫酸铵溶液（取硫酸铵0.5g加无氨蒸馏水溶解并稀释至500ml，临用时再稀释10倍）置比色管中，加0.9ml 5%三氯醋酸溶液，加水稀释至10ml，摇匀（标准管）。

另取样品1ml，加9ml 5%三氯醋酸，摇匀，放置30分钟过滤，取滤液1ml加水稀释至10ml，摇匀（样品管）。

标准管、样品管各加纳氏试剂2ml，放置10分钟，置白纸上比色，样品管不得深于

标准管。

· 无菌：按生物制品规程中《生物制品无菌试验规程》方法检查，不含防腐剂的制品接种量与培养液之比为1:20。

热原：按生物制品规程中《生物制品热原质试验规程》（其他1~01页）方法检验。注射剂量按家兔体重1ml/Kg。

毒性：按生物制品规程中《人血白蛋白检定规程》项下（V 4~03页）方法检验，每只小白鼠尾静脉注射0.5ml。

过敏：按中国药典1977年版细胞色素C项下过敏试验方法检验。

活性：取本品200vg使细胞免疫功能低下病人淋巴细胞或脐带血淋巴细胞玫瑰花环升高百分率不得低于16%。

测定方法：

一、试液配制

（一）无Ca⁺⁺、Mg⁺⁺的Hank's液

甲液：NaCl80gKCl4g加水至500ml。

乙液：Na₂HPO₄12H₂O1.52gKH₂PO₄0.6g葡萄糖10g，加水至400ml。

另精密称取200mg酚红，置乳钵中加约10mlN氢氧化钠研磨至液透明，再加蒸馏水至100ml，以其混匀为500ml体积。

甲液、乙液可放置冰箱作为贮备液。

试验前一日，取甲液10ml，乙液10ml混匀加水至200ml，用饱和碳酸氢钠溶液调pH7.2~7.4，0.7Kg/Cm²10分钟灭菌。

（二）淋巴细胞分层液

甲液：泛影酸57.7g，葡甲胺18.3g，少量蒸馏水煮沸溶解后补加蒸馏水至100ml。

乙液：聚蔗糖9%的溶液；

取甲液40ml加蒸馏水50ml；

另取乙液192ml，加土液80ml，混匀即得比重为1.077~1.079的溶液，垂熔玻璃漏斗过滤除菌，4℃保存备用。

（三）1640营养液

取1640粉末10.5g，40℃水浴溶解，加蒸馏水至1000ml用饱和碳酸氢钠溶液调pH7.2，垂熔玻璃漏斗除菌，4℃保存备用。

（四）绵羊红细胞悬液制备

无菌脱纤维绵羊静脉血4℃冰箱保存供两周内使用（或肝素抗凝血），用前以pH7.4Hank's液洗三次（2000转/分离心10分钟）。将压积绵羊红细胞用Hank's液配成0.5%悬液，含绵羊红细胞浓度约为 8×10^7 个细胞1ml。

（五）灭活吸收胎牛血清

初生雄性小牛，未进食者颈动脉放血，分离血清经56℃30分钟灭活，按2份体积小牛血清1份体积绵羊红细胞，混匀，置37℃温箱作用30分钟，离心沉淀红细胞，吸取上清液，放4℃冰箱保存备用。

（六）黄焦油兰染色液

0.025%的溶液。

二、实验步骤

（一）免疫机能低下病人或脐带经肝素抗凝血2ml，加等量Hank's液稀释后，用吸管沿管壁缓缓加入装有淋巴细胞分层液的试管内，使血液重叠在分层液上，置离心机中以2000转/分离心20分钟后，以吸管吸取血浆与分层液界面处的淋巴细胞层，置另一试管中，用Hank's液以1000转/分10分钟洗三次，然后用1640营养液将沉淀旋起，显微镜下计数淋巴细胞。

（二）取上述淋巴细胞悬液，按 2×10^5 个细胞分于各管，二管留作空白，其它各管加入待测样品，并将各管补加1640营养液至1ml，密塞，摇匀，置37℃温箱1小时，15~30分钟摇1次，1000转/分离心5分钟，Hank's液1000转/分离心5分钟洗一次，沉淀的淋巴细胞旋起，加灭活吸收的小牛血清1滴（0.05ml），摇匀于37℃放置1小时。

（三）将上述温育的淋巴细胞液加按1:16加绵羊红细胞500转/分离心5分钟，轻轻旋起，加黄焦油兰染色液2滴，摇匀，并以吸管轻轻混匀，取一滴置载玻片上，盖一盖玻片，在高倍显微镜下数200个以上淋巴细胞，算出其中玫瑰花环形成细胞的百分数。

其他：应符合注射剂项下有关规定（中国药典1977年版二部附录）。

〔含量测定〕精密量取本品10ml，照半微量定氮法测定（中国药典1977年版二部附录72页），即得每mlN/100硫酸溶液相当于0.875mg的蛋白质。

〔作用与用途〕作为免疫治疗，用于免疫缺陷病和免疫机能失调所引起的一系列疾病。

〔用法与用量〕肌肉或皮下注射，一次2~4ml，隔日一次或遵医嘱。

〔注意〕注射前或治疗一经终止再用药时，需做皮内过敏试验，阳性反应者慎用（可用脱敏法注射）。

〔规格〕2ml、2mg。

〔贮藏〕在凉暗处保存。

〔有效期〕暂定一年半。

胸腺注射液暂行质量标准起草说明

山东省莱阳生物化学制药厂

一、急性毒性试验

材料与方法

1、动物：杂种小白鼠，每批号5只，体重18~22克，雌雄不拘，雌者无孕。

2、样品：胸腺素注射液，每毫升含旦白质2.5毫克，批号7817、7818、7819、810321、810420。

3、给药方法及剂量：尾静脉注射，一次给药1毫升，（相当于125毫克/公斤体重）。

4、观察项目及方法：观察72小时死亡数及不良反应。

结果

未出现小白鼠死亡和不良反应。

二、最大耐受量试验

材料与方法

1、动物：杂种小白鼠20只，体重18~22克，雌雄不拘，雌者无孕。

2、样品：猪胸腺素注射液：批号7817（2.5毫克/毫升）。790807批（2.7毫克/毫升）。

3、给药方式及方法：静脉注射，腹腔注射。

尾静脉一次注射2毫升（5毫克/20克，5.4毫克/20克）。

腹腔注射，每次1毫升，每隔1小时一次，连续4次（10mg/20g，10.8mg/20g）。

4、观察项目：观察注射后12小时的死亡数和不良反应。

结果

静脉注射2毫升者，无一死亡和不良反应，由此推算，小白鼠一次静脉注射250毫克/公斤体重和270毫克/公斤体重，无不良反应。按人体重50公斤计算，每次用药5毫克，小白鼠的给药量为人给药量的2500~2700倍。

腹腔注射4次，分为500毫克/公斤体重和540毫克/公斤体重，无死亡和不良反应，按人体50公斤体重，每次给药5毫克，小白鼠的给药量为人给药量的5000倍和5400倍。

综上所述，说明本品无毒性。

三、刺激试验

材料和方法

1、动物：白色家兔，体重2~2.5公斤。

2、样品：猪胸腺素注射液，批号7817、7818、810321、810420无菌生理盐水。

3、给药方式及剂量：耳壳皮内注射，每批用家兔两只，左耳壳皮内注射本品0.2毫升，右耳壳皮内注射生理盐水0.2毫升。

每批另取家兔2只，左眼滴入本品0.2毫升，右眼滴入生理盐水0.2毫升。

每批再取家兔两只，分别在臀部两侧股四头肌注射本品1毫升。

4、观察项目及方法：耳壳注射观察有无红肿、充血等反应，并和生理盐水作对照，每2小时观察一次，连续观察12小时。

滴眼试验观察有无充血、流泪，有无分泌物产生等现象，并和生理盐水对照，开始4小时内，每小时观察一次，继后6小时观察一次，共观察24小时。

股四头肌注射：观察注射部位肌肉有无变性、坏死等现象。

每批各取一只在注射后24小时观察，另一只在48小时后观察。

结果

耳壳皮内注射均未发现红肿和充血，与生理盐水比较，无明显差别。

滴眼试验未发现充血、流泪等现象。

股四头肌观察：肌肉无变色、坏死等现象。

四、溶血试验

材料与方法

1、动物：家兔

2、样品：猪胸腺素注射液：7817、7819、810321、810420。

3、方法：取家兔心血，加玻璃珠振摇脱纤维，离心得红细胞，并以生理盐水洗涤离心数次（至上清液不显红色为止），沉降红细胞，用生理盐水配成4%的悬液。

另取干燥、洁净小试管，加红细胞混悬液2毫升，滴加本品1毫升，慢慢摇匀，37℃保温。

4、观察项目及方法：每小时观察一次，连续观察4小时。

结果

在4小时内未发生溶血现象。

五、过敏试验

材料与方法

1、动物：豚鼠，体重250~350克，雌雄不拘，雌者无孕。每批5只。

2、样品：猪胸腺素注射液，批号7808、7811、7815、810124、810321、810420、810424。批

方法：每批取豚鼠5只，腹腔注射本品0.5毫升，间日一次，连续三次，于第一次注射至第14天和21天，分别注射同一批次样品2毫升。

结果讨论

以上7个批次，自注射后观察30分钟，仅7808批其中有一只豚鼠于注射后2分钟干咳一声，其它均无不良反应。

但应说明，如不经超滤产品按上法进行过敏试验，一般在第14天静脉注射时反应不明显，而在第21天注射时，均有不同程度的反应和死亡。

如全部改用腹腔注射则没有反应。

六、活性测定

目前为止用于胸腺素生物活性的测定方法种类较多，有体内法，如切除动物胸腺，形成免疫缺陷，再用胸腺素与对照组作存活率的比较、观察，体外法，如玫瑰花形成试验、细胞毒试验、放射免疫法等。但没有很特异的标准方法。我们根据测定活性淋巴细胞玫瑰花形成试验为基础，再加入胸腺素的作用后，观察活性淋巴细胞有否增加，根据增加的量反应胸腺素的活性大小。

测定方法

（一）试剂

1、无 Ca^{++} ， Mg^{++} Hank's液饱和碳酸氢钠溶液调pH7.2~7.4，灭菌，4℃冰箱保存。

2、淋巴细胞分离液（聚蔗糖-泛影葡胺液，比重1.077~1.079）垂直玻璃漏斗除

菌，4℃冰箱保存。

3、1640营养液，pH7.2（含20%小牛血清）垂熔玻璃漏斗除菌，4℃冰箱保存。

4、0.5%绵羊红血球混悬液（SRBC）：无菌脱纤维绵羊静脉血置4℃冰箱保存供两周内使用，用前以Hank's液洗三次（2000转/分离心10分钟）压积绵羊红细胞用Hank's液配成0.5%绵羊红细胞悬液，约为 8×10^7 个/ml。

5、0.025%黄焦油兰染色液。

（二）实验步骤

结果讨论

胸腺素注射液活性测定结果

批 号	淋巴细胞 计数	玫瑰花环 形成数	玫瑰花环形 成百分率	激活率
7809	200	86	43%	
空白	200	51	25.5%	68.6%
7811	200	72	36%	
空白	200	46	23%	56.5%
7817	200	98	49%	
空白	200	60	30%	63.3%
7819	200	111	55.5%	
空白	200	66	33%	68%
7827	200	110	55%	
空白	200	70	35%	62.8%
790927	200	64	32%	
空白	200	44	22%	54.5%
810420	295	180	61%	
空白	200	75	37.5%	62.5%
810421	345	208	60%	
空白	200	75	37.5%	60%
810424	241	136	56%	
空白	200	75	37.5%	49%

1、取细胞免疫机能低下病人肝素抗凝静脉血2ml，加等量Hank's液稀释后，用滴管沿管壁慢慢加入装有淋巴细胞分层液的试管内，使其重叠在分层液上，置水平离心机中以2000转/分离心20分钟后，吸取两液界面的淋巴细胞，以Hank's液洗涤三次，（1000转/分离心10分钟洗涤）然后用含有小牛血清的1640营养液配成淋巴细胞悬液，显微镜下计数。

2、上述淋巴细胞悬液，按 2×10^5 个分子各管，两管留作空白，其它各管按一定

量加入待测样品，并将各管补加1640营养液至1 ml，密塞，摇匀，置37℃孵育1小时，(15~30分钟摇一次) 1000转/分离心5分钟，Hank's液1000转/分5分钟离心洗涤一次，弃去上清液，淋巴细胞旋起，加灭活的小牛血清0.05ml，摇匀置37℃孵育1小时。

3、将上述孵育的淋巴细胞按1:16加绵羊红细胞，500转/分离心5分钟，轻轻旋起，加黄焦油兰染液2滴，并用尖吸管轻轻混匀后取一滴于载玻片上，盖一盖玻片，在高倍显微镜下数200个以上淋巴细胞，算出其中玫瑰花环形成细胞的百分数。

正常人血淋巴细胞玫瑰花试验结果

批 号	淋巴细胞 计数	玫瑰花环 形成数	玫瑰花环 形成百分率	激活率
7819	200	130	65%	4.8%
空白	200	124	62%	
7819	200	126	63%	6.8%
空白	200	118	59%	

同一批号的胸腺素注射液对不同免疫功能低下病人淋巴细胞激活率的比较：

批 号	淋巴细胞 计数	玫瑰花环 形成数	玫瑰花环 形成百分率	激活率
781011	200	73	36.5%	14%
空白	200	64	32%	
781011	200	138	69%	72.5%
空白	200	80	40%	

胸腺素注射液，对细胞免疫功能低下病人的淋巴细胞玫瑰花形成百分率一般都具有不同程度的提高。但采用不同的方法，玫瑰花形成百分率差距较大。并且花环提高的百分率与个体、空白基数、温度、以及淋巴细胞与绵羊红细胞的比列都有密切关系。

正常人淋巴细胞加胸腺素注射液无明显变化，不同病人加同一批号胸腺素注射液，显示的玫瑰花环升高的较大差异，反应出疾病是否与胸腺素缺乏有关或敏感程度有关予先对病人进行这一测定，有助于决定治疗方案。

另外，我们对冰箱和室温分别保存半年的样品分别进行活性测定无显著差异。如下表所示：

批 号	冰箱保存激活率	室温保存激活率
7807	54%	50%
7808	47.5%	48%

说明胸腺素注射液在室温保存是稳定的。

猪胸腺素免疫活性的研究

一对猪淋巴细胞E受体的激活试验

昌潍医学院微生物学教研室

李在连 冯永堂 杨尧辉 吴国庆

自从Goldstein (1972)¹首先提纯牛胸腺素并进行活性试验之后, Wara (1974)²开始应用于治疗一例濒死的免疫缺陷病患者, 取得良效。1977年以来, 莱阳生化制药厂从猪胸腺组织中提取胸腺素, 实验证明猪胸腺素与小牛ThF₅相似, 对细胞免疫机能有促进与调节的效应, 现已试用于临床免疫性疾病、病毒感染、肿瘤等的治疗³。

我室参加协作组的任务是关于猪胸腺素制剂的活性、抗原性等方面的研究^{4,5}, 以期能获得一个切实有效的胸腺素免疫活性测定方法, 以应用于生产实际。首先, 我们初步观察到各种疾病病人的淋巴细胞, 经猪胸腺素37℃温育处理15分钟后, 便可增加T淋巴细胞形成E玫瑰花的数值, 其增高率在6.5%~11.5%之间, 尤其是患者淋巴细胞E玫瑰花基数越低者处理后的增高率越为明显, 但可能由于温育时间偏短, 其增高率尚不够理想。此外, 我们还使用了脐带血液淋巴细胞做胸腺素的免疫活性测定, 效果优于上述方法。

为了有利于生产, 便于取材, 适应生化制药厂的生产工艺, 我们设计试用猪外周血液淋巴细胞, 使之与猪胸腺素在37℃共同温育, 以不同温育时间及不同的胸腺素剂量进行E玫瑰花试验, 初步结果证明, 此法具有简单易行, 重复性好, 可以定量测定等优点, 建议应用于生产实际, 作为猪胸腺素测定的一种方法。

一、材料与方法

(一) 材料:

1. 猪血液: 准备无菌三角瓶, 预先加入无菌肝素。取每毫升含12,500单位的肝素1毫升, 加HanKs液至12.5毫升。再以0.1毫升抗凝5毫升血液量的比例, 按照采血量加好肝素。

以无菌手续收集猪血液于肝素瓶中, 立即混匀抗凝, 冰箱存放备用。

2. 淋巴细胞分离液: 与常规一样, 配制聚蔗糖—泛影葡胺液, 比重1.077。

3. 无钙镁的HanKs液, pH7.4~7.6, 8磅20分钟灭菌备用。

4. 绵羊红细胞: 无菌采取绵羊血液, 经脱纤维处理后保存于Alsever血球保存液中。羊血液1份, 保存液2份, 保存于4℃冰箱中可使用1周。

5. RPMI 1640营养液, 每毫升含庆大霉素40单位。

6. 胸腺素: 批号: 未超滤—810124, 超滤—810124, 81042。

7. 试管, 毛细滴管, 载玻片, 吕氏美兰液, 1%戊二醛液 (临用时配制)。

(二) 方法:

1. 预备试验:

- (1) 取抗凝猪血液 2 毫升加HanKs液 4 毫升稀释。
- (2) 取13×100mm的试管, 加入淋巴细胞分离液 4 毫升, 将已稀释的猪血液 3 毫升轻轻地加于分离液的上层, 保持清晰的界面, 立即在水平离心机2000rpm离心20分钟。
- (3) 用毛细滴管吸出淋巴细胞层, 置一试管中, 加HanKs液离心洗涤 3 次。每次均须打匀。
- (4) 脱纤维绵羊血液用HanKs液离心洗涤 3 次, 配成0.5%混悬液。

2. 总E玫瑰花环试验:

- (1) 取无菌10×100mm试管 6 支, 每管各加洗涤的猪淋巴细胞0.1毫升。
- (2) 除第 1 管外, 第 2~6 管各加胸腺素0.05毫升及RPMI 1640营养液0.1毫升, 37℃温育。
- (3) 经温育 1 小时、2 小时、4 小时、8 小时、16 小时各取出一管。
- (4) 每管各加0.15毫升0.5%绵羊红细胞。淋巴细胞与绵羊红细胞的比为 $5 \times 10^5/\text{ml}:0.5\%$, 混匀后37℃10分钟, 立即离心500rpm 5 分钟。
- (5) 取出, 立即置 4℃冰箱中 2 小时, 吸出半量液体, 再加0.8%戊二醛0.05毫升, 4℃固定15分钟。
- (6) 轻轻将沉在管底的细胞摇匀, 用毛细滴管吸出滴于洁净载玻片上, 加吕氏美兰液 1 小滴, 复以盖玻片镜检, 计数200个淋巴细胞的E花环形成率。同时, 滴于 2 张载玻片上, 用毛细滴管平行地将细胞悬液铺开, 自然干燥后用瑞氏染液进行染色。

3. 定量E玫瑰花试验:

- (1) 取无菌10×100mm试管 9 支, 每管各加洗涤的猪淋巴细胞0.1毫升 (约 50 万个细胞)。
- (2) 除留有 1 管作为对照管外, 其余 8 管分别加入不同含量的胸腺素0.05毫升。胸腺素予先倍量连续稀释, 依次为150、100、50、25……0.08微克/0.05毫升。
- (3) 上述 9 管均加入RPMI 1640营养液0.1毫升, 37℃温育 2 小时。
- (4) 取出, 每管各加0.5%绵羊红细胞0.15毫升, 混匀, 37℃温育10分钟后500rpm离心 5 分钟, 立即置 4℃冰箱 2 小时。
- (5) 取出各管吸出半量液体, 加入 1%戊二醛0.05毫升, 立即轻轻摇匀, 冰箱固定15分钟。
- (6) 将沉在管底的细胞轻轻摇匀, 吸出, 美兰染色及干片瑞氏染色计数。

二、试验结果

我们共收集了猪血液11份进行试验, 实验结果看出, 猪淋巴细胞经过胸腺素处理后, 在37℃温育 1~4 小时内, E受体被激活, E玫瑰花的形成率有显著增高, 但又随着温育时间的继续延长而逐渐下降 (表一)。

表一看出, 猪淋巴细胞E玫瑰花形成率在个体之间有明显差异, 在14~34%之间, 与文献报导24%相类似⁶。虽然猪血淋巴细胞自然E玫瑰花形成率较低, 但这一特点却有利于作为检测胸腺素免疫活性之用。例如 I 号猪经4小时温育之后的E玫瑰花为45.5%,