

内部资料

1969—1972

研究工作成果汇编

上海实验生物研究所

1973年

毛主席语录

在生产斗争和科学实验范围内, 人类总是不断发展的, 自然界也总是不断发展的, 永远不会停止在一个水平上。因此, 人类总得不断地总结经验, 有所发现, 有所发明, 有所创造, 有所前进。

目 录

一、804 例原发性肝癌临床资料初步分析	肿瘤研究室病因组	(1)
二、甲胎蛋白诊断原发性肝细胞癌的初步报告	姚 鑫 葛锡锐 洪龙生 刘 黎 言穆林	(4)
三、人体甲种胎儿蛋白的分离和提纯	施渭康 何全品 李绍康 刘 黎 许河生	(7)
四、甲种胎儿球蛋白的放射免疫测定	李绍康 刘海湖 李 明 姚 鑫 朱承谟	(12)
五、麻疹病毒处理的小鼠腹水肝癌细胞的免疫性	季永镛 林斯骏 江子卿 黄永安	(20)
六、晚期肝癌的免疫综合治疗	闵绍植 季永镛 江子卿 黄永安	(24)
七、免疫活性细胞的实验抗癌研究	王球达 叶庆焯	(28)
八、斑蝥素对小白鼠移植性肿瘤抑制作用的研究	徐永华 汪福来 徐亚男 刘金妹 沈立美 邓正文 陈汉源	(32)
九、蓖麻毒蛋白抗肿瘤的实验研究	李文裕 王佩瑜 许远钟	(40)
十、肝炎新药疗效的动物筛选和检定试验	施渭康 黄加陵 赵素英 连秉钧 金心梅 马幸园 许河生 叶庆焯 朱 润	(46)
十一、肝炎相关抗原和抗体的初步观察	许河生 施渭康	(52)
十二、硅藻和木贼提取液对体外培养的大鼠肺上皮细胞抗石英毒的作用	沈鼎武 王 珏 叶秀珍 蔡静妍 刘海湖	(54)
十三、木贼治疗矽肺的临床总结	叶秀珍 姜宜荪 执笔整理	(65)
十四、长期注射醋酸诺醇环戊烷丙酸酯的动物实验	曾祥白 谢 根 吕淑霞 戚爱光 邓民任 吴筱兰	(70)
十五、棉花籽抗生育的研究	戚爱光 邓民任 林心楷 柯一保 刘正廉 董蓉花	(81)
十六、乳牛卵巢机能失调的激素治疗	乳牛不孕症治疗组	(93)
十七、 Sn^{113} -三丁基氟化锡在大白鼠体内的分布与排泄	有机锡研究组	(102)
十八、多聚核苷酸的合成与研究 I. 脱氧核糖四核苷酸 $\text{dTpC}^{\text{An}}\text{pC}^{\text{An}}\text{pG}^{\text{Bz}}\text{OH}$ 的化学合成	核酸研究组	(108)
十九、多聚核苷酸的合成与研究 II. 脱氧三核苷二磷酸 $\text{dMTrG}^{\text{Bz}}\text{pA}^{\text{Bz}}\text{pC}^{\text{An}}\text{OH}$ 的化学合成	核酸研究组	(125)
二十、多聚核苷酸的合成与研究 III. 脱氧核糖三核苷酸 $\text{dpG}^{\text{Bz}}\text{pA}^{\text{Bz}}\text{pG}^{\text{Bz}}\text{OH}$ 的化学合成	核酸研究组	(137)
二十一、多核苷酸激酶纯化的报道	核酸研究组	(144)
二十二、牛脾磷酸二酯酶的纯化	核酸研究组	(148)
二十三、三苯甲基纤维素的制备	核酸研究组	(151)
二十四、发酵法制备三磷酸腺苷	胡兆庆 龚启慈 蔡玉生 朱帮宰	(155)
二十五、用发酵法制备脱氧腺嘌呤核苷三磷酸及脱氧鸟嘌呤核苷三磷酸	核酸研究组	(163)
二十六、阴离子交换树脂分离制备腺嘌呤核糖核苷(3',5'-)环磷酸(cAMP)	核酸研究组	(164)

804 例原发性肝癌临床资料初步分析*

肿瘤研究室病因组

肝癌的病因学是一个尚未解决的问题。我国原发性肝癌的发病率虽然很高,但过去的临床或病理研究资料,所包括病例数往往并不很多,因此为肝癌病因研究提出的线索,受到了数量上的限制。我们在无产阶级文化大革命中,先后对上海市长海、中山、工农兵、市一、市六、华山、长征等七个医院,从1949~1967年8月住院经病理确诊的804例原发性肝癌(其中87例仅根据手术中的观察作出诊断)的临床资料进行调查,并作了初步分析,企图发现对肝癌的病因和发病学有启示性的线索,为进一步的工作提供参考。

主要结果

一、年龄和性别的分布

从表1可以看出,肝癌主要是中年人的癌症,40~49岁的病人最多,几乎占全部804例的三分之一(31%),而30~59岁的病人几乎占全部804例的80%。但即使在童年也可能发生原发性肝癌。804例中,有5例发生

表1 原发性肝癌804例的年龄与性别分布情况

组别	男	女	男:女	男女合计
0~9岁	3	2	1.5:1	5
10~19岁	8	6	1.3:1	14
20~29岁	31	6	5.1:1	37
30~39岁	185	14	13.2:1	199
40~49岁	223	27	8.3:1	250
50~59岁	172	42	4.1:1	214
60~69岁	60	17	3.5:1	77
70~79岁	4	4	1:1	8
总计	686	118	5.8:1	804

于10岁之前,其中一例为肝母细胞癌,一例为肝脏胚胎性混合癌,其余三例均为肝细胞癌,年龄最早一例是一个两岁的男孩。

804例原发性肝癌中,男性占686例,女性占118例。男女病例数之比为5.8:1。再从不同年龄组病例数来看,男性原发性肝癌例数最多者在40~49岁组,而女性则在50~59岁组,男性发病高峰年龄比女性提前。两性病例数的差异如图1所示。若比较不同年龄组男女病例数,则可见在20岁以前和70岁以后,男女两性间看不出差异,但由于病例数太少,尚难说明问题。但从20~29岁组开始,男女性比例数显著增高,在30~39岁组等于13.2:1。在此年龄组以后,男女比例又逐渐降低(图2)。

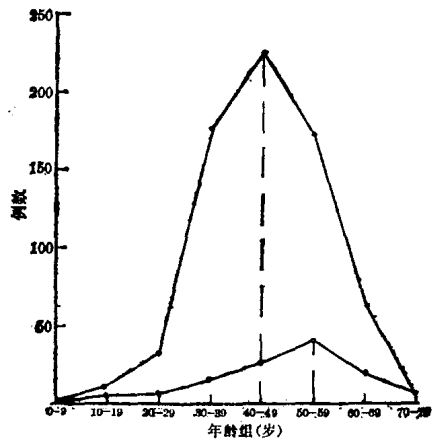


图1 804例男女性原发性肝癌年龄分布

●——● 男性; ○——○ 女性。

* 本文是1967年5月~8月进行的一次调查研究小结,参加人员有邓正文、王衡文、姚曾序、卢延龄、张仕明、刘金妹、蔡锦煊、沈立美、孙燮钧和潘玉芝。本文由王衡文和邓正文整理。

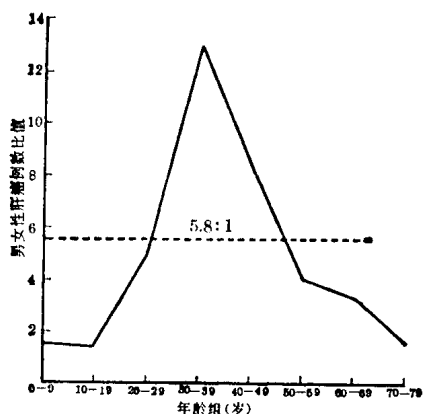


图2 804例原发性肝癌男女相同年龄组病例数比值

二、职业与生活习惯

804例中,有职业登记的748例。其中职工与干部最多,共507例,占748例的67%。农民只有81例。从事家务的肝癌病人有26例,炊事员有7例,两者共占全部病例的4.4%。有饮酒史者258例,占34.5%。

三、籍贯

804例原发性肝癌病人中,有籍贯登记的共741例,其中大多数为本市居民或上海近郊农民。此外宁波人有100例,启东、海门人85例。

四、过去疾病史

全部病例中,有肝炎史者44例,肝硬化史者14例,血吸虫病史者27例,痢疾史者87例,疟疾史者265例,伤寒病史者75例,性病史者49例。

五、病理分型

在有详细病理诊断报告717例中,原发性肝细胞癌最多,共501例,占70%。腺癌和胆管细胞癌47例,混合型18例。原发性肝癌伴有各种肝硬变者305例。若以804例中病理确诊的方式来分析,则经尸检或活检确诊肝癌伴有肝硬变者305例,经剖腹探查活检或尸检未发现肝硬变者342例,经肝穿刺证实有肝癌但未发现肝硬变者256例。

讨 论

原发性肝癌是我国常见的恶性肿瘤之

一。从804例病理确诊的肝癌临床资料来看,男女性肝癌的发病有着明显的差别。在性成熟以后,男性病例数显然多于女性,其发病高峰年龄也比女性超前。这种男女之间的差别,是同国内已发表的临床病理和研究结果一致的(钟学礼等,1956;刘应麟等,1958;叶端复等,1962;王伟等,1962;黄德瞻等,1962;林兆耆等,1962;童国琮等,1964)。本文包括的病例数较过去的资料为多,其中大多数为上海市的职工和干部。上海在解放以来职工队伍中妇女占有很大比重,其就诊和住院治疗机会和男女相同,因此可以认为,住院确诊肝癌病例中的男女比例,不能以社会因素来解释。根据上海市1963~1965全市肝癌发病和死亡率统计(上海市肿瘤研究所,1966),20~60岁肝癌患者男女比例亦在3~5:1之间,女性发病率高亦较男性错后约十年(见

表2 上海市1964年肝癌发病情况

年 龄	男		女	
	发病例数	发病率 (/十万人)	发病例数	发病率 (/十万人)
0~4	1	0.26	1	0.28
5~9	1	0.18	0	0
10~14	3	0.62	0	0
15~19	1	1.49	0	0
20~24	5	4.11	0	0
25~29	14	7.49	3	1.60
30~34	25	9.79	6	2.39
35~39	42	18.49	7	3.12
40~44	70	35.61	13	6.68
45~49	86	54.37	20	12.85
50~54	120	92.32	25	20.02
55~59	121	115.22	43	40.70
60~64	96	135.06	36	43.58
65~69	43	100.23	26	42.30
70~74	19	87.27	30	76.80
75~79	10	111.54	9	42.59
80~	1	62.46	5	43.38

表2),而同期上海市胃癌、肺癌发病率和死亡率的男女比例,均较肝癌为低(肺癌男女比例在2~3:1,胃癌男女比例亦在2~3:1)(上海市肿瘤研究所,1966)。由此可见,女性肝

癌发病率确实远低于男性, 这里是否有特殊的内在因素, 如内分泌因素在起作用是值得探讨的。

上海市居民中, 以江浙籍贯为主。此次调查的临床资料中 741 例有籍贯登记, 其中宁波籍和启东海门籍占很大比例, 这一现象也难用就诊机会特殊来解释。因此, 值得进一步调查宁波和启东海门地区肝癌的发病率, 如果确实较高, 则进一步研究当地的生活环境和生活习惯, 以检查是否存在引致或促进肝癌发生的因子。

在 804 例原发性肝癌中, 以肝细胞癌为主, 这和国内所报道的结果接近(丁茅生, 1953; 林丛, 1958; 梁伯强等, 1959; 雷学熹等, 1959; 应越英等, 1962)。在 804 例中有 256 例肝癌是经肝穿刺确诊的, 镜检材料少, 不易发现肝硬变。若将这类材料不列入统计范围, 则经剖腹探查、手术或尸检的 647 例肝癌中, 47.1% 伴有肝硬变。我国已发表的病理研究资料中, 原发性肝癌合并肝硬变者占 36~85%。这说明肝硬变和肝癌发生有密切关系, 但尚不能认为肝硬变为肝癌病因中的决定性因素。

本文初步分析了 1949~1967 年 8 月上海市部分医院确诊为原发性肝癌病例的临床资料, 但所调查的资料不全, 又仅限于记录的

检查, 也缺乏对病人的直接详细调查, 只能作为今后原发性肝癌临床分析的一般参考。

(1969 年)

参 考 文 献

- 丁茅生, 原发性肝癌。中华医学杂志, 1953 年第 12 号, 945~948 页。
- 上海市肿瘤研究所统计资料, 1966。内部资料。
- 王伟等, 1962。原发性肝癌 65 例临床分析。山东医刊, 第 4 期, 第 3 页。
- 叶端复, 1959。解放以来有关原发性肝癌的临床研究。中华内科杂志, 7: 1042~1043。
- 刘应麟、倪述, 1958。肝癌 95 例临床分析。哈医学报, 4: 58~64。
- 应越英等, 1962。原发性肝癌 107 例(尸检)的病理学上的探讨。肿瘤研究论文集, 318~338 页。上海科学技术出版社。
- 林兆耆等, 1962。原发性肝癌 207 例的临床观察。中华内科杂志, 10: 690~694。
- 林丛, 1958。原发性肝癌在临床和病理形态学上的分析。中华病理学杂志, 4: 52~60。
- 钟学礼、陈灏珠, 1956。原发性肝癌(107 例的分析)。中华内科杂志, 4: 169~177。
- 梁伯强、董郡, 1959。原发性肝癌的病理形态学、病理学和在我国发病率的研究。中华病理学杂志, 5: 161~171。
- 黄德瞻、郑树, 1962。发性肝癌 111 例临床分析。浙江医学, 3: 100。
- 童国琮等, 1964。原发性肝癌 210 例的临床分析。天津医药杂志肿瘤学附刊, 2: 100~113。
- 雷学熹, 钱韵兰, 1959。原发性肝癌之病理研究。上医学报, 第 6 期, 575~576 页。

甲胎蛋白诊断原发性肝细胞癌的初步报告*

葛锡锐 姚 鑫 洪龙生 刘 黎

(肿瘤研究室免疫组)

言 穆 林

(上海第二医学院微生物教研室)

原发性肝细胞癌是我国常见的主要恶性肿瘤之一。多年来,临床对肝癌虽有同位素、超声波以及血清生化测定等诊断方法,但都缺乏特异性。因此,对肝癌的准确而特异的诊断仍然是临床上迫切需要解决的问题。近年,国外根据原发性和移植性小鼠、大鼠肝癌均产生胚胎专一的甲种胎儿球蛋白(简称甲胎蛋白)的事实(Abelev, 1965),在临床也初步证明甲胎蛋白对原发性肝细胞癌具有诊断价值(Uriel 等, 1967; Abelev, 1968)。为了解决国内肝癌诊断问题,我们从1970年8月起开始建立甲胎蛋白的测定方法,研究上海地区肝癌患者的阳性检出率,并希望利用甲胎蛋白来寻找早期诊断肝癌的新方法。本文总结了这项工作初期阶段的成果。

方 法

甲胎蛋白诊断原发性肝细胞癌的方法是一种免疫诊断方法,即将含有甲胎蛋白的胎儿血清或肝癌病人血清作为抗原,免疫家兔,产生抗甲胎蛋白抗体,然后用正常人血清吸收含有这种抗体的兔抗血清后,与病人血清进行琼脂扩散等免疫学反应,以诊断肝癌。

一、抗甲胎蛋白抗血清的制备

取临床人工流产4~6个月胎儿的心脏血液(或甲胎蛋白强阳性的肝癌患者血液),分离血清,加入等量的弗氏佐剂[由40毫升石蜡油,10毫升羊毛脂和经煮沸灭活的100

毫升卡介苗(内含50毫克结核杆菌)的离心沉淀物混合制成],研匀后成乳剂状疫苗。首次免疫家兔时在背颈部皮内分点注射疫苗1毫升,肌肉注射1毫升。间隔两周后,每周免疫一次,每次在皮下、肌肉和脚掌注射不加佐剂的血清共0.2~0.4毫升。这样连续免疫三周,末次免疫后一周耳静脉抽血,用琼脂双向扩散法对不同稀释度的胎儿血清测定抗血清的效价。如效价较好,即行颈动脉放血,分离抗血清。否则继续加强免疫或回忆刺激后放血鉴定。

将兔抗甲胎蛋白抗血清和血库混合正常人血清等量混合,37℃温育半小时,4℃冰箱放置24~48小时,离心去除沉淀,加迭氮钠(0.05%)防腐,分装小瓶,-20℃低温冰箱保存。经过这样吸收处理的兔抗血清,用琼脂双向扩散和琼脂免疫电泳作鉴定时,与正常人血清成分不形成任何沉淀线条,与胎儿血清产生一条沉淀线,电泳位置在 α 区域。这说明吸收的兔抗血清基本上只含有一种抗体,即抗甲胎蛋白抗体,称为抗甲胎蛋白抗血清。

二、琼脂双向扩散试验

琼脂双向扩散法是一种简易而常用的免疫分析方法,使抗原和抗体在凝胶中扩散,相遇后形成抗原-抗体复合物的沉淀线。一般

* 本报告包括1970年8~12月和1971年3~5月两个阶段的工作,其中第一阶段的工作是和上海第二医学院微生物教研组协作的。

采用 1% 的琼脂凝胶。本工作用市售细菌培养用粉末状琼脂, 直接溶于离子强度 0.05, pH 8.2 的巴比妥缓冲液 (47.6 克巴比妥钠盐溶于 4.3 立升蒸馏水, 加 69 毫升 1N HCl, 含迭氮钠 0.05%) 中, 成 1% 浓度, 加热熔化, 成透明溶液, 使用时倒入有玻璃圈的玻璃板、小培养皿或玻璃平板上, 成 3~4 毫米厚的琼脂层。琼脂板中扩散源的排列法采取中央一孔, 周围六孔的排列。中央孔放置抗甲胎蛋白抗血清, 周围孔中两个孔 (12 和 6 点钟位置) 放阳性对照血清 (1/10 稀释的 4 个月胎儿血清), 其余四个孔放待测样品。各孔直径为 5 毫米, 孔间边距 7 毫米。琼脂板孔打好后, 用微量熔化琼脂填补孔底, 以防止抗血清及血清样品的渗漏。

琼脂板加好样品后, 平置于保持一定湿度的容器内进行扩散, 温度最好能保持恒温, 20°C 或 37°C。一般室温在 20°C 左右时, 24 小时内即可观察结果。沉淀线条可在黑色背景下通过散射光观察, 若测定血清样品出现的沉淀线与阳性对照血清的沉淀线相融合, 即说明被测血清是甲胎蛋白阳性反应 (图 1)。

若被测血清不产生沉淀线条, 或产生沉淀线条而与阳性对照血清的沉淀线不相融合, 成交叉或前后平行的关系时, 则被测血清为甲胎蛋白阴性反应。所出现的沉淀线是其他蛋白引起的, 也说明抗血清还不是只含有抗甲胎蛋白抗体的特异抗血清。例如, 我们发现有的胎儿血清免疫后得到的抗血清, 虽经正常人混合血清的吸收, 但能与某些肝癌病人血清在琼脂扩散中产生除甲胎蛋白线条外的第二条沉淀线。这第二条线在扩散板中位于甲胎蛋白线条的后面, 比较靠近抗原孔, 电泳位置在 β 区域, 可能是由乙胎蛋白产生的。

除琼脂双向扩散外, 对部分原发性肝癌患者的血清样品也进行了免疫电泳鉴定, 结果与琼脂扩散法相一致, 阳性血清在 α 区域有一沉淀弧, 其位置与胎儿血清的甲胎蛋白

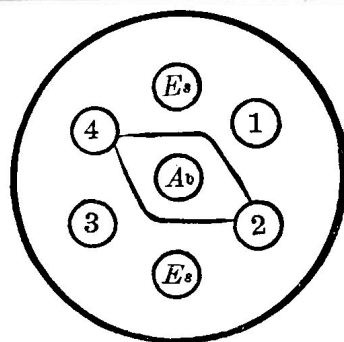
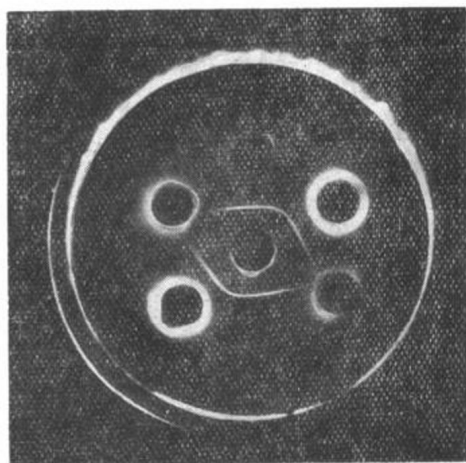


图 1 甲胎蛋白琼脂双向扩散试验

Ab—抗甲胎蛋白抗血清;
Es—1/10 稀释胎儿血清;
1、3—甲胎蛋白阳性肝癌患者血清;
2、4—健康人血清。

沉淀弧相对应。

结 果

应用上述特异的抗甲胎蛋白抗血清与原发性肝癌、转移性肝癌、其他癌肿和其他肝病患者的血清以及正常健康人的血清共 390 多例样品进行琼脂双向扩散试验。用同样方法, 也在本市杨浦区工厂防癌普查中对 7461 例职工中的 921 例进行了甲胎蛋白的检测。现将两方面结果列于表 1。

从表 1 结果可以看出: (1) 甲胎蛋白琼脂双向扩散法对诊断原发性肝细胞癌具有比较高的特异性, 除肝细胞癌外, 只有部分睾丸胚胎癌或胚胎性癌患者的血清也呈阳性反应。在工作过程中, 我们碰到了很多临床病例都

表1 甲胎蛋白琼脂扩散试验测定结果

血清来源*	例数			阳性率 %
	总数	阳性	阴性	
原发性肝癌(手术、 剖腹探查或病理确诊者)	31	20	11	64.5
原发性肝癌(临床 诊断和超声波、同位素、生 化诊断肝癌者)	49	27	22	55.1
其他肝病 胆管细胞癌 转移性肝癌	1 7		1 7	
其他肝病 肝硬化 肝炎(急性、慢性) 肝脓肿	6 52 2		6 52 2	
其他肿瘤 食管癌、胃癌、直肠癌、 肺癌、卵巢癌、绒 癌、白血病等 睾丸胚胎瘤及胚胎性 癌	18 4		18 2	50.0
杨浦区工厂防癌普查 (多数有肝病史)	921	1**	920	
健康人 献血员 所内职工普查	40 181		40 181	

* 肝癌、各种肿瘤和肝病者血清主要由中山、杨中、市二、瑞金、浦江等医院供应,特此致谢。

** 这一普查对象除甲胎蛋白阳性外,没有体征,也没有提示肝癌的其他阳性诊断指标。一年后出现临床症状,剖腹探查证实为原发性肝癌。

是非常典型的。例如有一病例超声波、同位素和生化诊断均阴性,但甲胎蛋白阳性,尸检证实肝脏背面有一肝细胞肝癌结节。另一病例临床诊断为肝癌,超声波和生化诊断阳性,但甲胎蛋白和同位素诊断阴性,剖腹探查证实为肝硬化。此外有不少病例临床诊断为肝癌可疑,部分超声波、同位素和生化诊断指标阳性,但甲胎蛋白测定阴性,手术或剖腹探查都证实为肝脓肿或胰腺癌。因此,利用甲胎蛋白琼脂扩散法,在多数情况下,能够把原发性肝癌和其他肝癌和肝病相鉴别。(2)

从已测定的有限病例来看,甲胎蛋白的阳性检出率只有65%左右,即在相当一部分病理确诊的肝细胞癌患者血清中检测不出甲胎蛋白。除这些肝癌有可能根本不合成分和分泌甲胎蛋白外,这主要是由于所用抗血清效价太低,以及病人血清中甲胎蛋白含量低于检测方法灵敏度的极限。(3)从杨浦区工厂普查中发现的一例甲胎蛋白阳性对象的随访结果来看,甲胎蛋白在病人血清中的出现可远远早于肝癌的临床症状和他其诊断指标。这提示应用甲胎蛋白免疫诊断方法进行普查时,有可能发现较为早期的肝癌病例。

小 结

本文总结了甲胎蛋白琼脂扩散法的建立及其在临床诊断和防癌普查中的初步应用。初步结果表明这一诊断方法对原发性肝癌有较高的特异性,阳性率在65%左右。如能加以改进和提高,并运用于防癌普查,有可能发现较为早期的肝癌,为后者的防治作出贡献。

(1971年)

参 考 文 献

- Abelev, G. I., 1965. Antigenic Structure of Chemically-induced Hepatoma. *Prog. Exptl. Tumor Res.*, 7: 104~157.
- Abelev, G. I., 1968. Production of Embryonal Serum α -globulin by Hepatoma: Review of Experimental and Clinical data. *Cancer Res.*, 28: 1344~1350.
- Uriel, J., de Nechaud, B., Stanislawski-Birencwajg, M., Masseyeff, R., Ledlenc, L., Quenum, C., Loisillier, F. and P. Grabar, 1967. Antigènes embryonnaires et Cancer du foie Chez L'homme. Association de La α_1 -foetoprotéine sérique avec L'hépatome primaire. *C. R. Acad. Sci.*, 265: 75~78.

人体甲种胎儿蛋白的分离和提纯

施渭康 何全品 李绍康 刘 黎 许河生

(肿瘤研究室免疫组)

近年来,大量事实证明某些肿瘤能产生胚胎性抗原。甲种胎儿蛋白(简称甲胎蛋白)就是一种属于这类性质的胚胎血清蛋白。很多哺乳动物和人体的胚胎中均有甲胎蛋白存在,但于出生后不久即逐渐消退至一般免疫血清学方法不易检测的程度。可是当发生肝细胞癌后,血清中又复出现较高含量的甲胎蛋白。甲胎蛋白的免疫测定现已广泛应用于肝癌的诊断(Abelev, 1971)。我所自1970年起开展了甲胎蛋白的研究,建立了方法,并初步测定了临床肝癌患者的阳性检出率(葛锡锐等, 1971)。随后,通过在上海地区一年多的临床和普查实践,进一步肯定了甲胎蛋白对原发性肝细胞癌的诊断价值(上海市肿瘤防治研究协作组, 1972)。

肝细胞癌患者血清的甲胎蛋白含量不一,有些患者的含量低于琼脂双向扩散试验的测试极限。为了研究更为灵敏的免疫诊断方法以提高诊断阳性率,和进一步研究甲胎蛋白的性质,开展定量测定以及探讨甲胎蛋白与肝癌发生的关系,都需要对甲胎蛋白进行分离和提纯。近年来,国外已有不少这方面的报道,主要是用硫酸铵分部沉淀,结合离子交换柱层析和凝胶过滤对甲胎蛋白进行部分提纯(Rapp和Lehmann, 1971; Nørgaard-Pedersen, 1972),用柱层析(或凝胶电泳)结合免疫吸附进行提纯(Purves等, 1970; Iyzen和Hsoba, 1970; Lehmann等, 1971),或从抗原-抗体复合物,通过解离复合物和凝胶过滤进行提纯(Nishi, 1970; Rouslahti和Sepälä, 1971)。我们从1971年下半年起开始

摸索用抗原-抗体复合物法分离提纯甲胎蛋白,先后纯化了9批,获得了一些免疫纯的甲胎蛋白。现将方法和初步结果报道如下。

方法和结果

一、抗甲胎蛋白抗血清的制备

采用3~6个月人工流产胎儿的血清,或甲胎蛋白阳性的肝癌患者血浆,经磷酸钙凝胶吸附处理和硫酸铵分部沉淀的粗制品免疫家兔(Lehmann等, 1971)。用甲胎蛋白阳性肝癌患者血浆的粗制甲胎蛋白抗原免疫时,第一次皮内或皮下分点注射2毫升(粗制抗原的总蛋白量约为20毫克/毫升,与等体积全佐剂混合)。7~10天后,每周一次皮下注射0.5毫升、两后脚掌皮下各注射0.25毫升,不加佐剂,共注射三周。末次注射后一周,测试有无抗甲胎蛋白抗体,放血或继续加强免疫。

上述兔免疫血清以1:1(或1:2)比例和正常人混合血清混和,37°C温育30分钟,放置冰箱24小时,离心除去沉淀。经过吸收处理的免疫血清,用琼脂扩散试验和琼脂免疫电泳都证明只有一条甲胎蛋白沉淀线。

二、抗原-抗体复合物的制备

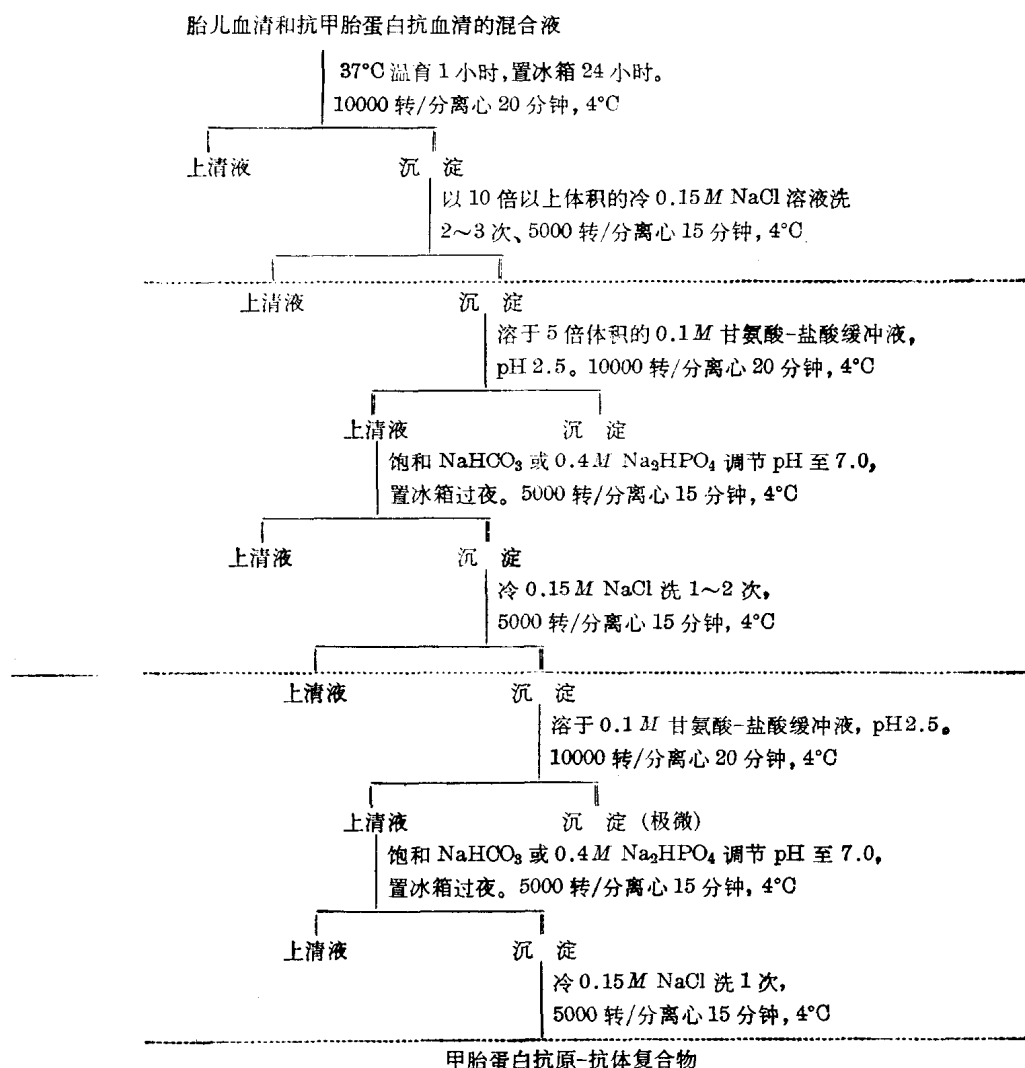
抗原-抗体复合物的制备以及复合物的解离和抗原提纯基本上按照Nishi(1970)的方法,但第一次凝胶过滤时的缓冲液pH和第二次凝胶过滤时所用的缓冲液及其pH都有所改变,凝胶用葡聚糖G-200。

吸收过的兔抗血清以最合适的沉淀比例

与胎血清混合（二者的最合适比值预先用沉淀试验或环状沉淀试验测定（Campbell 等，1963），比值随抗血清效价而不同，一般是1:16~1:30，即每16~30毫升抗血清加1毫

升胎血清）。混合物在37°C温育1小时，置冰箱24小时，产生抗原-抗体复合物。制备和纯化甲胎蛋白抗原-抗体复合物的操作流程见下表。

制备和纯化甲胎蛋白抗原-抗体复合物的操作流程



三、抗原-抗体复合物的解离和甲胎蛋白的纯化

将抗原-抗体复合物沉淀溶于少量体积的 pH 2.5、0.1 M 甘氨酸-盐酸缓冲液中，用同上述缓冲液透析 2 小时，然后用同样缓冲液平衡的葡聚糖凝胶 G-200 柱子进行凝胶过滤。在直径 3.2 厘米、高 110 厘米的柱子，上柱量一般是 6~7 毫升溶液，约含 100~120

毫克抗原-抗体沉淀物。待样品进入凝胶以后，用同样缓冲液以流速 16 毫升/小时连续洗脱，用部分收集器每管 3~4 毫升收集之。用分光光度计测定 280 毫微米波长的光密度。如图 1 所示，第一次凝胶过滤的洗脱液呈现三个吸收峰。根据吸收峰分布，用琼脂双向扩散试验检测洗脱液是否存在甲胎蛋白或抗甲胎蛋白抗体。实验结果证明，峰 1 对

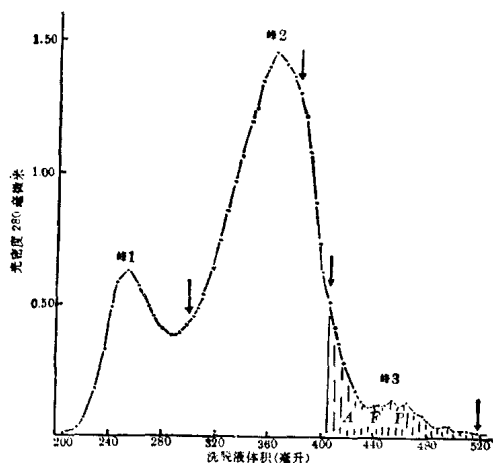


图1 甲胎蛋白抗原-抗体复合物凝胶过滤

支持物: 葡聚糖凝胶 G-200 柱(直径 3.2 厘米, 高 110 厘米);

洗脱液: 0.1 M 甘氨酸-盐酸缓冲液, pH 2.5;

流速: 16 毫升/小时。

峰 1 是可溶性甲胎蛋白抗原-抗体复合物;

峰 2 “↓”之间为抗甲胎蛋白抗体部分;

峰 3 阴影部分为甲胎蛋白。

抗原(胎儿血清)或抗体(抗甲胎蛋白抗血清)均不产生免疫沉淀反应。若将这部分洗脱液中和至 pH 7.0 时, 则总有一定量的白色沉淀物产生, 并可用甘氨酸-盐酸缓冲液重新解离。如再次进行凝胶过滤, 洗脱液在 280 毫微米波长的光密度同样呈现三个吸收峰。因此, 峰 1 可以认为是可溶性抗原-抗体复合物。若将这部分洗脱液浓缩, 与全佐剂等量混合, 免疫家兔可得到对甲胎蛋白呈专一性反应的抗血清。峰 2 大部分同胎儿血清起阳性反应, 而与抗体无反应, 证明是抗甲胎蛋白抗体组成部分。峰 3 同抗甲胎蛋白抗血清起阳性反应, 而与抗原无反应, 证明含有甲胎蛋白。将甲胎蛋白部分合并, 中和, 浓缩至 3~4 毫升, 用 pH 4.8、0.1 M 柠檬酸-磷酸缓冲液透析, 再次凝胶过滤, 去除少量混杂的抗体。第二次凝胶过滤时, 葡聚糖凝胶 G-200 柱子先用 pH 4.8、0.1 M 柠檬酸-磷酸缓冲液平衡。加样后, 用同样缓冲液以流速 20 毫升/小时连续洗脱。测定各管 280 毫微米波长的光密度, 也可以得到三个吸收峰(图 2)。用琼脂双向扩散和免疫电泳检测证明, 图 2 峰 1 洗脱液

与胎血清或抗甲胎蛋白抗血清均呈阴性反应。这是第一次凝胶过滤后样品(图 1, 峰 3)中混杂的抗体重新和抗原形成了可溶性的抗原-抗体复合物。峰 2 的洗脱液经琼脂双向扩散证明为甲胎蛋白部分。峰 3 与抗原或抗体无沉淀反应, 同抗人血清白蛋白抗血清也无反应。合并峰 2 各部分洗脱液, 用重蒸馏水充分透析, 浓缩, 冰冻干燥, 即为纯化的甲胎蛋白。

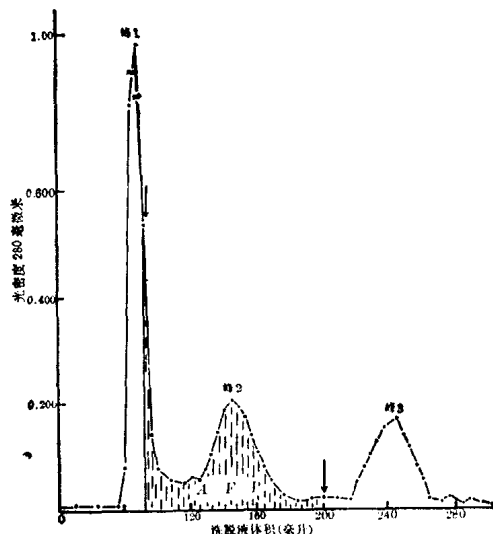


图2 第二次甲胎蛋白凝胶过滤

支持物: 葡聚糖凝胶 G-200 柱(直径 2 厘米, 高 90 厘米);

洗脱液: 0.1 M 柠檬酸-磷酸缓冲液, pH 4.8;

流速: 20 毫升/小时。

峰 2 阴影部分为甲胎蛋白。

纯化的甲胎蛋白极易吸水, 盐分也不易完全透析掉, 很难计算绝对得率。根据 280 毫微米波长的光密度计算, 一般用 15 毫升胎儿血清制备抗原-抗体复合物, 可得纯化甲胎蛋白 10 毫克左右。

纯化甲胎蛋白的鉴定

一、琼脂免疫电泳分析

将胚胎全血清和纯化的甲胎蛋白进行琼脂凝胶电泳, 然后使之与未经吸收的兔抗胎血(或抗肝癌患者阳性血浆)抗血清作免疫扩

散反应, 结果显示纯化的甲胎蛋白仅出现一条沉淀线, 其位置与胎血(或肝癌患者阳性血清)的甲胎蛋白沉淀线完全对应(图3)。用纯化的甲胎蛋白对兔抗人血清白蛋白作免疫电泳观察, 也未发现纯化的甲胎蛋白含有白蛋白污染。

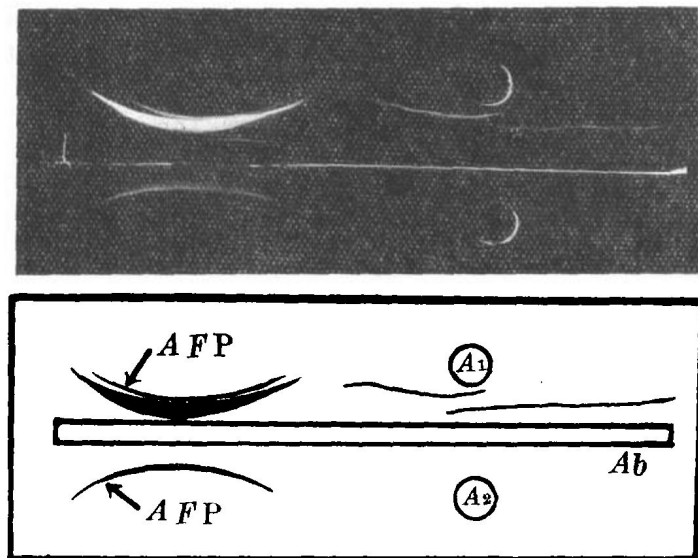


图3 纯化甲胎蛋白琼脂免疫电泳鉴定

A₁—胎儿血清, A₂—纯化甲胎蛋白;
Ab—兔抗胎血抗血清, 未吸收;
AFP—甲胎蛋白。

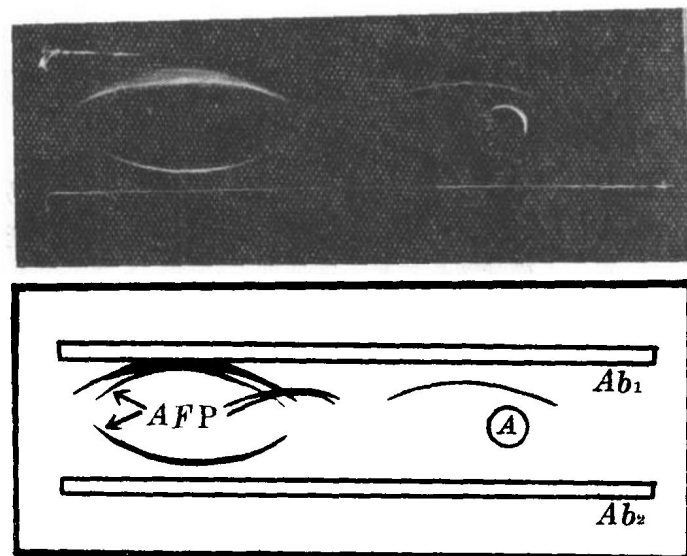


图4 抗纯甲胎蛋白抗血清琼脂免疫电泳鉴定

A—胎儿血清; Ab₁—抗胎血抗血清, 未吸收;
Ab₂—抗纯甲胎蛋白兔抗血清; AFP—甲胎蛋白。

二、免疫动物试验

用纯化的甲胎蛋白免疫家兔, 第一次免疫0.3毫克, 1:1全佐剂混合, 直接注射左、右腋淋巴结内。以后每隔10天后作一次追加免疫, 共两次; 每次注射0.2毫克, 溶于1毫升生理盐水中, 分别在静脉内注射0.2毫升, 腋淋巴结周围各0.2毫升, 前掌皮下各0.2毫升。在第二次免疫后第五天, 即可测出抗甲胎蛋白抗体。如末次免疫后使动物休息两个月, 再作一次回忆刺激, 则免疫血清中抗体水平更高。这样得到的抗血清不经正常人血清吸收, 直接同胎血做琼脂双向扩散试验或琼脂免疫电泳, 都得到单一的沉淀线, 其位置相当于甲胎蛋白的位置, 说明这种抗血清只具有抗甲胎蛋白的抗体(图4)。实验动物对免疫用的抗原是否含杂有其他蛋白相当敏感, 因此这一试验间接证明了所纯化的甲胎蛋白是相当纯的。

讨 论

甲胎蛋白的物理化学特性与白蛋白和其他甲种蛋白很相似, 而且同血清中其他蛋白成份相比, 其含量一般小于总蛋白量的1%, 因此, 甲胎蛋白的分离、提纯比较困难。抗原-抗体反应是一种高度特异性反应。当胎儿血清以最适合的比例同抗甲胎蛋白抗血清混合时, 可产生抗原-抗体复合物形式的专一性沉淀反应。复合物经过反复溶解、沉淀和洗涤加以纯化后, 再用酸解离和凝胶过滤; 这样得到的纯化制品, 其在琼脂双向扩散试验中表现的抗原性

和琼脂免疫电泳中的迁移率,均等同于胎儿血清中的甲胎蛋白。用这种方法提纯的甲胎蛋白免疫家兔,所得抗血清不经吸收也没有其他抗正常人全血清成份的沉淀线条。因此,我们认为最终得到的甲胎蛋白可以说是免疫纯的。目前,我们已利用分离得的纯化甲胎蛋白及其免疫所得的抗血清进行甲胎蛋白的放射免疫测定(李绍康等,1972)。

我们共进行过九批实验,各批样品的第一次和第二次凝胶过滤液都有共同的规律,每次都出现三个吸收峰,峰的高低在各次提纯实验中则有所不同。因此,我们认为用上述免疫化学方法提纯甲胎蛋白是可以重复的。甲胎蛋白的性能比较稳定,虽然经过繁复的纯化过程,长时间接触较酸性缓冲液,但其抗原性仍保持良好,凝胶过滤的洗脱液280毫微米波长的光密度在0.025左右即可用琼脂双向扩散法检得甲胎蛋白活性。另一方面,用这一方法提纯抗甲胎蛋白抗体过去很少注意。从第一次葡聚糖凝胶G-200过滤中得到的抗甲胎蛋白抗体,中和至pH7.0透析,冰冻干燥或中和后用磷酸缓冲液透析,琼脂双向扩散试验证明能保持一定的抗体活力,但仍参有少量的杂质。这类抗体也可通过第二次凝胶过滤再加以纯化。至于抗原-抗体复合物解离法是否能作为分离活力较高的纯抗甲胎蛋白抗体的常规方法,还需进一步加以研究。

(1972年)

参 考 文 献

上海市肿瘤防治研究协作组,1972.甲种胎儿球蛋白检测诊断原发性肝细胞癌的研究。上海市医学科学情报站

编《医学情报交流》。

- 李绍康、刘海湖、李明、姚鑫、朱承谟,1972.甲种胎儿蛋白的放射免疫测定。本汇编,12~19页。
- 葛锡锐、姚鑫、洪龙生、刘黎、言穆林,1971.甲胎蛋白诊断原发性肝细胞癌的初步报告。本汇编,4~6页。
- Abelev, G. I., 1971. Alpha-fetoprotein in Ontogenesis and its association with malignant tumors. *Adv. Cancer Res.*, **14**: 295~358.
- Campbell, D. H., J. S. Garvey, N. E. Cremer, and D. H. Sussdorf, 1963. *Methods in Immunology*. W. A. Benjamin, Inc. N. Y. p. 130~143.
- Lehmann, F. G., D. Lehmann, and G. A. Martini, 1971. α -Foetoprotein. Isolierung und Kristallisation aus Menschlichen Plasma. *Clinica Chimica Acta*, **33**: 197~206.
- Nishi, S., 1970. Isolation and Characterization of a Human Fetal α -globulin from the Sera of Fetuses and a Hepatoma Patient. *Cancer Res.*, **30**: 2507~2513.
- Nørgaard-Pedersen, B., 1972. Purification and Sensitive Immuno-electrophoretic detection and quantitation of Human α_1 -foetoprotein. *Clinica Chimica Acta*, **38**: 163~170.
- Purves, L. R., E. Van der Merwe, and I. Bersohn, 1970. Serum Alpha-Feto-protein. V, The bulk preparation and Some Properties of Alpha-feto-Protein obtained from Patients with primary Cancer of the liver. *S. Afr. Med. J.*, **44**: 1264~1268.
- Rapp, W. and H. E. Lehmann, 1971. Nachweis des α_1 -Fötoprotein in Menschlichem Tumorscites und Seine Partielle Isolierung. *Clinica Chimica Acta*, **31**: 45~53.
- Ruoslahti, E. and M. Seppälä, 1971. Studies of Carcino-fetal Proteins: Physical and Chemical Properties of Human α -Fetoprotein. *Int. J. Cancer*, **7**: 218~225.
- Гусев, А. И. и А. К. Язова, 1970. Выделение и Очистка Эмбриоспецифических α -Глобулинов Человека и животных Методом препаративного дискового электрофореза в Полиакриламидном Геле. *Биохимия*, **35**: 172~181.

甲种胎儿球蛋白的放射免疫测定

李绍康 刘海湖 李明 姚鑫

(肿瘤研究室免疫组)

朱承谟

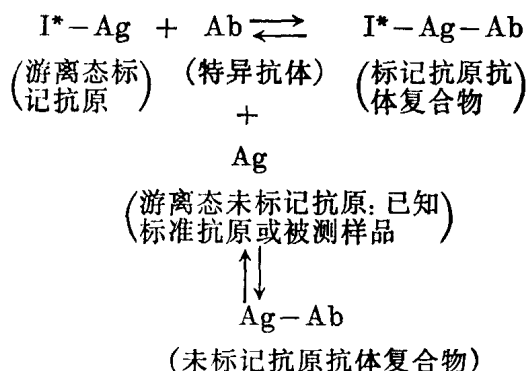
(上海第二医学院瑞金医院同位素室)

近年来,在我国,甲种胎儿球蛋白(以下简称甲胎蛋白或AFP)研究工作有了较大进展,琼脂免疫扩散和对流免疫电泳等方法已在肝癌的临床诊断和普查工作中普遍应用,对原发性肝细胞癌的诊断阳性率可达64.5~80%(上海市肿瘤防治研究协作组,1971)。为了提高甲胎蛋白诊断肝癌的阳性率,并进一步研究它与肝癌的关系,有必要建立灵敏度高的定量检测方法。因此,我们开展了甲胎蛋白放射免疫测定。现将前阶段工作,主要是测定方法和部分结果小结如下:

标记甲胎蛋白的浓度愈高,则标记甲胎蛋白与抗体的结合就愈受到抑制,称为竞争性抑制现象。因此,三者混合后一定时间,分离和测定甲胎蛋白-抗甲胎蛋白抗体复合物的放射性强度,即可推算竞争抑制的程度。通常,先以各种已知浓度的标准甲胎蛋白与一定量的放射性甲胎蛋白及其特异抗体温育,测得标准竞争抑制曲线,再将被测血样的抑制程度与之作比较,可求得该血样中甲胎蛋白的含量。

基本原理

放射免疫反应是一类竞争性抑制反应,可以下式表示:



如上式所示,若将被测的阳性血样和一定量的放射性标记的甲胎蛋白及其特异性抗体相混合,则血样中未标记甲胎蛋白与标记甲胎蛋白共同竞争特异性抗体的结合点。未

材料和方法

一、样品来源

共测定血清样品116例。对照为26例正常输血者血清,18例为孕妇血清,26例为AFP琼脂扩散阴性的原发性肝癌患者血清,10例为AFP琼脂扩散阳性的原发性肝癌患者血清(阳性对照),4例为转移性肝癌患者血清,余32例为各种肝、胆病患者的血清。由于血清来自几个单位,均重复进行了一次琼脂扩散测定。

二、纯甲胎蛋白及其抗血清的制备

人体甲胎蛋白的提纯采用免疫化学方法,将抗甲胎蛋白抗血清和胎血清按一定比例混和,分离和纯化甲胎蛋白-抗甲胎蛋白抗体复合物,再解离复合物,通过凝胶过滤,分离出甲胎蛋白抗原。以纯甲胎蛋白注射豚淋巴结免疫家兔,获得只含抗甲胎蛋白抗体的

抗血清(施渭康等, 1972)。

三、放射性标记甲胎蛋白的制备

参照 Greenwood 和 Hunter (1963) 高比度标记法, 反应瓶装新鲜的 2~4 毫居里放射性 NaI^{131} 或 NaI^{125} (约 200 微升), 加入溶于 5 微升 0.05 M pH 7.4 的磷酸缓冲液的 5~10 微克纯甲胎蛋白。混合后立即喷注新鲜配制的溶于 20 微升磷酸缓冲液的氯胺-T 200 微克, 待反应 1~2 分钟后, 加入溶于 20 微升磷酸缓冲液的焦亚硫酸钠 600 微克以中止反应。各种试剂的采取和混和均用微量注射器。反应中止后, 加适量的碘化钾溶液。反应液转移上柱, 分离标记甲胎蛋白和游离碘。

标记甲胎蛋白和游离碘的分离采用葡聚糖凝胶过滤法。称取 10 克葡聚糖(G-25, 细型), 用 0.05 M pH 7.4 的磷酸缓冲液泡浸、漂洗后装柱, 柱长 0.8×40 公分。然后用溶

于同种缓冲液的 80 毫克结晶牛血清白蛋白上柱饱和, 以减少标记蛋白通柱时的吸附损耗。上述反应液上柱后仍用该缓冲液洗脱, 洗脱速度为 0.5 毫升/分。按每管 1 毫升收集, 共收 30 余管。将各管放置小铅罐内, 离井型计数器一定距离, 在相同的几何条件下测定放射性。约在第 10 管左右见到放射的高峰, 为标记蛋白峰(每一蛋白收集管内预先放入 10 毫克牛血清白蛋白); 约在第 20 管左右, 可见到另一放射性的高峰, 为盐峰(游离碘峰)。

从标记蛋白收集管取出少许收集液, 加入少量兔血清为载体, 再加 15% 三氯醋酸以沉淀蛋白, 离心, 测上清液和沉淀的脉冲数, 以计算标记蛋白的游离碘率。

碘的利用率、标记甲胎蛋白的比放射性和游离碘率的计算如下:

$$\text{I}^* \text{ 的利用率} = \frac{\text{I}^* \text{ 总脉冲数} - \text{盐峰总脉冲数}}{\text{I}^* \text{ 总脉冲数}} \times 100$$

$$\text{I}^* - \text{AFP 的比放射性} = \frac{\text{I}^* \text{ 总强度(投料量的总微居里数)} \times \text{利用率}}{\text{AFP 投料量}}$$

$$\text{I}^* - \text{AFP 的游离碘率} = \frac{\text{上清液脉冲数}}{\text{上清液脉冲数} + \text{沉淀脉冲数}} \times 100$$

本实验的碘利用率为 30~40%, 比放射性为 200~300 微居里/微克, 游离碘率为 3.5~8.7%。

四、测定步骤

1. 标记甲胎蛋白工作液的配制

从标记蛋白收集管内取出少量原液, 以 1:100 的正常兔血清-生理盐水-磷酸缓冲液 (0.05 M, pH 7.4) (以下简称稀释剂) 稀释到每 0.5 毫升在井型计数器内每 30 秒测得 25000 次脉冲(此工作液的比放射性为 0.065 微居里/0.25 毫微克/0.5 毫升), 置冰箱备用。 I^{125} -AFP 的工作液仅需 10000 次脉冲/30 秒/0.5 毫升。

2. 硫酸铵饱和度的选择

把结合态甲胎蛋白与游离态相分离的方法, 是根据 Farr (1958) 提出的硫酸铵共沉淀

原理。用各种饱和度的硫酸铵分别沉淀标记蛋白工作液和经过温育的标记蛋白工作液-过量抗血清混合液, 可获得两条曲线, 分别代表游离态甲胎蛋白(图 1, a) 和结合态甲胎蛋白(图 1, b) 被不同饱和度硫酸铵沉淀的情况。不难看出, 硫酸铵饱和度在 35~40% (0°C) 范围内, 分离效率最高。本实验采用了饱和度为 37.5% 的硫酸铵作为分离结合态甲胎蛋白的条件。

3. 抗血清及其稀释度的选择

本实验采用制备抗血清滴定曲线的方法来选择抗血清。将各号抗血清用上述稀释剂分别配成各种稀释度, 各取 0.1 毫升, 加入标

† 利用率的另一检测法是从反应管中取微量反应液, 加兔血清, 用三氯醋酸沉淀蛋白。放射性在沉淀中的百分率就是碘的利用率。

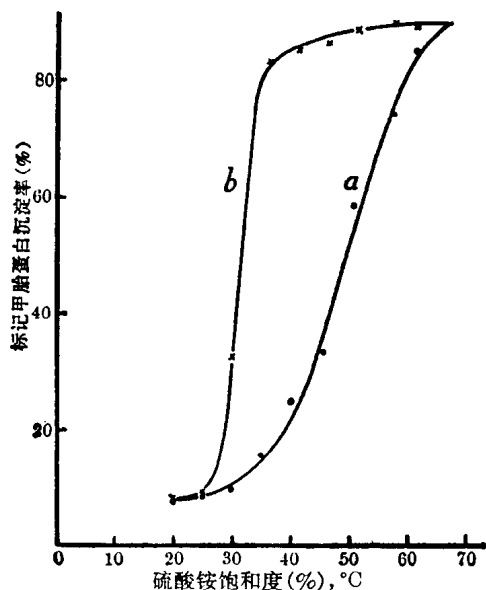


图1 硫酸铵饱和度效应曲线

- a—标记甲胎蛋白工作液(游离态甲胎蛋白)被各种浓度的硫酸铵沉淀的情况;
b—标记甲胎蛋白工作液与过量抗血清(1:10)的混合液(结合态甲胎蛋白)被各种浓度的硫酸铵沉淀情况。

记蛋白工作液 0.5 毫升, 正常人血清 0.1 毫升和稀释剂 0.3 毫升, 混合后 4°C 温育 2 天, 待反应完成后, 加等体积 75% 饱和度硫酸铵, 即得结合率-稀释度曲线, 称抗血清滴定曲线。图 2 表明, 1 号和 4 号抗血清的滴度(以达到 50% 结合率的抗血清稀释度为指标)均较大。本实验选用 1 号或 4 号抗血清, 其稀释度根据每次标记后所作的滴定曲线的滴度配制。

为了进一步比较各号抗血清的亲合力, 还以它们各自的 50% 结合率的稀释度进行标准竞争抑制曲线试验, 4 号抗血清所得的标准曲线的斜率最大, 说明 4 号抗血清的亲合力较强。

4. 标准竞争抑制曲线

取纯甲胎蛋白溶于磷酸缓冲液, 用光密度法或酚试剂法测其蛋白含量, 再用稀释剂配成从 128 毫微克/0.3 毫升开始, 成倍稀释至 1 毫微克/0.3 毫升的各种不同浓度的标准抗原共 8 管。然后在各标准管中依次加入下列溶液:

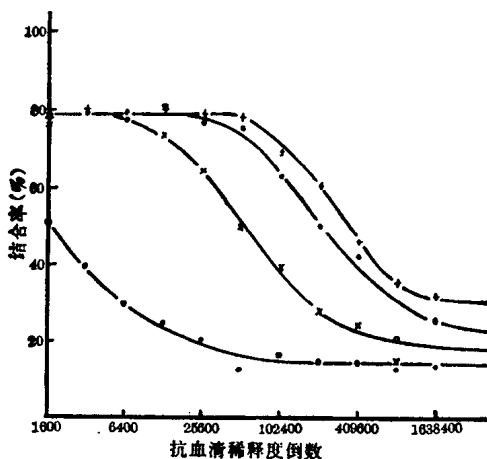


图2 抗血清滴定曲线

标记甲胎蛋白 (I^{125} -AFP) 工作液比放射性为 0.025 微居里/0.1 毫微克/0.5 毫升; 滴度——达到 50% 结合率的抗血清稀释度; 斜率——曲线线性段上抗血清的每次成倍稀释所引起的结合率的下降。

- +——+ 4 号抗血清, 滴度 1:320,000, 斜率 13.5;
○——○ 1 号抗血清, 滴度 1:200,000, 斜率 13.0;
×——× 97 号抗血清, 滴度 1:54,000, 斜率 12.5;
●——● 6 号抗血清, 滴度 1:1,600, 斜率 10.5。

- (1) 标准 AFP 稀释液 0.3 毫升
(2) 正常人血清 0.1 毫升
(3) 抗血清稀释液 0.1 毫升
(4) I^* -AFP 工作液 0.5 毫升

充分混匀后, 37°C 水浴半小时, 再 4°C 温育两天, 加入 75% 饱和度硫酸铵 1.0 毫升, 继续 4°C 温育半小时, 在测定总放射性 (T) 后, 离心 (4000 转/分) 20 分钟, 倒掉上清液, 测定沉淀的放射性 (P)。

对照管中依次加入:

- (1) 稀释剂 0.4 毫升
(2) 正常人血清 0.1 毫升
(3) I^* -AFP 工作液 0.5 毫升

其余步骤相同。为了使标准曲线制作时的工作条件与血样测定时完全一致, 反应中加了正常人血清。正常人血清及家兔血清对甲胎蛋白引起的非专一性结合, 以及用 37.5% 饱和度的硫酸铵造成甲胎蛋白的少量沉淀, 可用对照管测定的沉淀率加以校正。除在测定正常人血清甲胎蛋白含量时外, 在实际检测中校正值可忽略不计, 直接把标准管