

一九七三年

上海市肿瘤防治研究资料选编

(第一册)

中华医学会上海分会
上海市肿瘤防治研究协作组

1973年12月

854079

72

C-1

目 录

- 一、建立肺癌防治网的初步体会上海市肺癌防治网协作组 (1)
- 二、血清甲种胎儿蛋白测定在原发性肝癌普查中的应用 (6)
- 三、亲和层析法精制甲胎蛋白
.....中国科学院上海生物化学研究所、上海市第六人民医院 (9)
- 四、抗癌药物筛选中几种肿瘤模型敏感性的研究上海药物研究所 (16)
- 五、喜树碱抗癌作用的实验研究上海药物研究所 (25)
- 六、抗肿瘤新药卡氮芥(BCNU)的研究上海医药工业研究院 (32)
- 七、抗肿瘤新药尿嘧啶芳芥(合-520)的研究上海医药工业研究院 (37)
- 八、抗肿瘤新药消瘤芥(AT-1258)的研究
.....上海药物研究所、上海第十二制药厂、消瘤芥临床试用协作组 (44)
- 九、原发性肝癌 1200 例临床分析上海市肝癌协作组 (58)
- 十、原发性肝癌治疗后生存一年以上 214 例分析
.....上海市肝癌协作组 (66)
- 十一、25 例误诊为原发性肝癌的病例分析
.....上海第一医学院中山医院肿瘤组 (72)
- 十二、肺癌 1777 例治疗总结上海市胸科医院 (78)
- 十三、影响肺癌手术后生存率有关因素的探讨 (附术后生存
5~14 年 107 例资料)上海市胸科医院 (89)
- 十四、胃癌的病理组织学改变、胃旁淋巴结反应与预后关系的探
讨(580 例胃癌切除标本临床病理分析)上海长征医院病理科 (100)

- 十五、子宫颈癌的手术治疗——上海市 10 个医院 16 年来临床资料总结.....上海市子宫颈癌协作组 (109)
- 十六、天南星治疗子宫颈癌的研究——164 例临床观察
.....上海第一医学院妇产科医院肿瘤研究小组 (117)
- 附件: 1. 草药天南星的几种剂型的制备工艺
.....上海中药二厂、上海第十三制药厂、上海第一医学院生化、病理、化学教研组 (124)
2. 草药天南星抗宫颈癌有效成份的初步分离
.....上海第一医学院生化、病理、化学教研组、上海中药二厂、上海第十三制药厂 (126)
- 十七、3100 例子宫颈癌放射治疗的疗效分析.....上海市肿瘤医院 妇科 (131)
- 十八、二十年来乳腺癌手术治疗的探讨(附 1251 例分析)
.....上海市肿瘤医院外科 (139)
- 十九、676 方剂合并化疗治疗成人急性粒细胞性白血病的临床疗效观察.....上海第二医学院附属瑞金医院内科 (145)
- 二十、582 例软组织恶性肿瘤的临床分析
.....上海市肿瘤医院、上海第一医学院中山医院外科 (149)
- 二十一、鼻咽癌的放射治疗(附 2752 例分析)...上海市肿瘤医院放射科 (155)
- 二十二、争光霉素治疗口腔颌面癌瘤 141 例分析
.....上海第二医学院附属第九人民医院口腔颌面外科肿瘤组 (163)
- 二十三、上肢恶性肿瘤段切除远侧肢体再植(附 18 例初步报告)
.....上海市第六人民医院断肢再植研究室、上海第一医学院华山医院骨科、上海市肿瘤医院外科 (167)
- 二十四、5-氟脲嘧啶合并血管收缩剂局部注射治疗皮肤癌 15 例初步报告.....上海市崇明县中心医院肿瘤组 (173)

建立肺癌防治网的初步体会

上海市肺癌防治网协作组

概 况

近几十年来,肺癌的死亡率明显上升,特别在男性中其死亡率已居各种恶性肿瘤的首位。肺癌死亡率的上升,除了肺癌发病率显著上升和现有各种治疗措施尚不满足外,大多病例未能早期发现是重要因素之一;而所以不能早期发现的基本原因,在于广大基层卫生医疗单位没有充分地发动起来。据有关专科医院统计:目前手术切除率仅占住院病例的 $\frac{1}{3}$ ~ $\frac{1}{4}$,还不包括很多不住院的晚期病人。因此早期发现,争取早期治疗是肺癌防治工作中的关键之一。

1971年,上海市卢湾区以肺结核病防治网为基础,在市胸科医院帮助下,发动并依靠区内各级医疗保健机构,积极开展肺癌的防治工作,取得一定成绩。以后推广了卢湾区的经验,初步形成了市区的肺癌防治网。据1972年底统计,在建立防治网不到一年的时间内,各区共发现肺癌794例,其中453例(占57.2%)是基层医疗保健机构发现的。肺癌病例的确诊时间(从病员第一次就诊到确诊),已从过去平均3.69个月缩短到28.2天。

肺癌防治网的组织

在市卫生行政部门的领导下,市肺癌协作组下设置市肺癌防治网小组,由市肿瘤医院、市胸科医院及市结核病中心防治所等单位组成。主要任务是:(1)举办肺癌学术讲座和脱落细胞检验培训班,普及肺癌防治工作的业务知识和诊断技术;(2)召开肺癌防治网经验交流会,相互促进,共同提高;(3)收集各区有关肺癌流行病学资料;(4)统一安排三级医院(指专科医院、市级医院、教学医院、结核病院等)与各区防治网间的业务挂钩关系。

各个区以区结核病防治所为主要负责单位,组织区内各级医疗保健机构(主要是基层单位)相应成立区肺癌防治网小组。主要任务是:(1)定期举行有区内各级医疗机构有关医务人员参加的病例讨论会或其它业务活动;(2)根据不同条件,因地制宜地建立肺癌门诊,设立肺癌床位或家庭病床以积极治疗肺癌病人;(3)建立脱落细胞检验和特殊X线检查等以提高诊断水平;(4)健全肺癌病例报告制度;(5)开展有关肺癌流行病学的调查研究。

工作开展情况

(一)普及和提高肺癌防治业务知识和诊断技术

除了举办肺癌防治专业讲座外,各区防治网还定期举行肺癌临床读片讨论会。卢湾区一年来共举行49次病例讨论会。这种由专科医院、结防所和基层单位有关人员参加的读片会,起到集思广益,理论联系实际,能较快提高基层医务人员的业务水平。通过脱落细胞检验技术的培训,目前各区结防所和部分基层机构已能进行脱落细胞检验,阳性率不断有所提高。在

半年多时间内十个区共检查 6,325 张玻片,阳性者有 353 人次。实践证明,初、中级化验员或医务人员,经过短期培训后是能够掌握这一技术的。不少区结防所利用原有 X 线设备,自力更生改装成分层和倾斜分层摄片,这些原来要转到大医院去做的检查项目,现在基层医疗机构也能搞了。既方便了病人,又有利于早期诊断。

(二) 努力做好肺癌的早期发现工作

主要是从两方面着手:

1. X 线肺部检查仍然是早期发现肺癌的主要手段。历年来,这一检查在防癌普查方面做得较多,现在把它和防治肺癌结合起来,可以提高肺癌的早期发现率。据半年多来的统计,在 51 万 8 千多以工人、农民、学生为主要对象的防癌普查中,共发现肺癌 37 例,发现率为 7.1/10 万。根据肺癌的发病特点,有些区结防所和地段医院对年龄较大的机关干部、财贸职工等,进行 X 线胸部普查。如南市区普查机关干部及文教卫生系统职工 14,109 人,发现肺癌 5 例,发现率为 35.4/10 万;黄浦、虹口区普查了财贸职工 12,398 人,共发现肺癌 6 例,发现率为 48.4/10 万;长宁区普查居民 20,340 人,发现肺癌 4 例,发现率为 19.7/10 万。因此有计划地在某些重点对象中定期普查,是早期发现肺癌的一个重要措施。但究竟如何选择对象、间隔期多久才比较合理等,还有待在今后实践中加以摸索研究。

2. 分析肺癌病人的发现方式,80~90% 的病例是因病就诊发现的。据卢湾区九个医疗单位(其中七个是地段医院)统计:在全年因病就诊的胸部 X 线透视者 47,580 人次中,发现肺癌 69 例,发现率为 144/10 万。

据 1972 年有随访记录的 599 例分析,住院手术切除的有 107 例,手术切除率为 13.2%,说明早期病例仍占少数。如能对可疑病例作必要的深入检查和随访观察,必将发现更多的早期病例。此外,对普查发现的所谓“无症状”病例,深入追问病史,大部分均有不同程度的先兆症状,有些甚至有痰血等重要症状。因此加强卫生宣传,普及肺癌防治知识(特别在高年龄人群中),以便出现早期症状后能及早就医。

(三) 建立防治网点,开展群防群治

结核病防治所除负责防治网的组织工作外,还建立肺癌门诊。综合医院、企业医院和地段医院的肺科兼管肺癌防治工作。不少医院(包括有些地段医院)在肿瘤病房中固定或不固定设置肺癌床位,积极收治病人。结防所和地段医院结合下段工作,对肺癌病员进行家庭访问或设置家庭病床,送医送药上门,受到了群众的欢迎。卢湾区的经验推广以来,不到一年时间里,全市已有 230 个医疗单位参加肺癌防治网的活动,发挥了各级医疗机构的积极作用,体现了社会主义医疗制度和开展群防群治的无比优越性。目前肺癌的诊断治疗已不再是少数几个专科医院,而是逐步普及到很多基层医院,有利于肺癌的早期发现、早期治疗。

(四) 健全报告制度,积累流行病学资料

防治网建立后,由于医务人员思想上的重视,结防所又经常与各医院取得联系,肺癌报告制度在原有基础上逐步健全。据上海市肿瘤研究所统计,建立防治网前后比较,市区肺癌新病例报告数有明显上升(表 1)。

此外,不少医疗单位发动群众,大搞协作,摸索了一些肺癌流行病学调查研究的途径,简述如下:

1. 不同工种肺癌发病情况:杨浦、普陀、闸北等区结防所深入基层调查研究,依靠工

表 1. 上海市区 1971、1972 年肺癌新病例报告比较

年 份	新 病 例 报 告 数		比 上 年 度 增 加 (%)
1971	男	719	—
	女	267	—
	小 计	986	—
1972*	男	1,114	55.0
	女	381	43.0
	小 计	1,495	51.0

* 建立防治网

厂保健站, 统计分析了不同产业系统工厂职工的肺癌(包括其他恶性肿瘤)发病情况, 经常积累这方面的资料, 不仅对不同工厂的发病情况做到心中有数, 也可能提示病因学方面的线索。杨浦区调查的 46 个工厂 13 万余职工中, 肺癌发病率为 31.3/10 万, 在各种恶性肿瘤中占 23.8%, 居第一位(表 2、表 3)。各个不同行业系统中的发病率也有差异。但缺少年龄组的进一步分析, 还很难说明问题, 要在今后工作中加以改进。

表 2. 杨浦区 46 个工厂肺癌发病比较

工业系统	厂数	职工人数	肺 癌 例 数				总发病数	平均年发 病率1/10万
			1971 年		1972 年1~6月			
			男	女	男	女		
毛 纺	5	3,569	1	1	2	0	4	31.3
棉 纺	6	35,935	8	1	4	0	13	24.1
卷 烟	1	4,000	3	0	2	0	5	83.3
轻 工 业	7	6,156	6	0	2	0	8	86.0
化 工	4	5,942	4	0	1	0	5	56.6
橡 胶	4	4,450	5	0	1	1	7	104.8
造 船	4	19,951	4	0	1	0	5	16.6
重 工	15	48,765	13	0	3	0	16	21.8
合 计	46	133,768	44	2	16	1	63	31.3

2. 肺癌患病率: 卢湾区淮海、徐汇区新乐等地段医院, 发动群众, 进行社会调查, 首先依靠街道赤脚医生和里弄干部, 提供本地段内常住户口肿瘤患者的名单, 然后医务人员挨门串户, 根据病历卡和询问病史, 核实诊断, 从而基本上摸清了一个地区内肺癌及其他恶性肿瘤的患病情况, 这样坚持下去, 逐年积累资料, 借以分析恶性肿瘤患病率的变化动态, 将为探索肿瘤防治方法提供依据。卢湾区淮海地段常住居民 37,605 人, 1972 年底患恶性肿瘤者 160 人, 其中肺癌 10 人, 患病率为 14.8/10 万, 占各种恶性肿瘤的第五位(表 4)。徐汇区新乐地段(包括湖南地段)常住居民 81,640 人, 患肺癌 13 人, 患病率为 15.9/10 万(表 5), 占第四位。

表 3. 杨浦区 46 个工厂职工中各种恶性肿瘤发病百分比
(1971 年至 1972 年 1~6 月)

病 名	例 数	百 分 比
肺 癌	63	23.8
肝 癌	45	16.8
胃 癌	45	16.8
食 道 癌	26	9.9
乳 房 癌	16	6.0
肠 癌	11	4.2
宫 颈 癌	9	3.3
鼻 咽 癌	9	3.3
膀 胱 癌	4	1.6
甲 状 腺 癌	3	1.1
白 血 病	3	1.1
其 它 癌	32	12.1
合 计	266	100.0

注：职工总人数 133,768 人

表 4. 卢湾区淮海地段恶性肿瘤患病情况
(1972 年 12 月)

肿 瘤 病 名	患 病 人 数	患 病 率 (1/10万)
宫 颈 癌	40	59.1
乳 房 癌	37	54.7
肠 癌	14	20.6
胃 癌	11	16.2
肺 癌	10	14.7
食 道 癌	8	11.8
鼻 咽 癌	8	11.8
其 它 癌	32	47.3
合 计	160	236.6

表 5. 徐汇区新乐地段恶性肿瘤患病情况
(1972 年 6 月)

肿 瘤 病 名	患 病 人 数	患 病 率 (1/10万)
宫 颈 癌	103	127.1
乳 房 癌	52	63.4
胃 癌	20	24.2
肺 癌	13	15.8
肠 癌	12	14.6
食 道 癌	9	11.0
鼻 咽 癌	6	7.3
其 它 癌	60	73.4
合 计	275	336.8

3. 肺癌死亡率：卢湾区结防所与区防疫站密切配合，统计分析了历年来肺癌死亡情况（表6）。肺癌死亡率二十年来有明显上升，在男性中上升更显著，说明积极防治肺癌的重要性和迫切性。

表 6. 卢湾区肺癌死亡专率(1/10 万)

年 份	男	女	合 计
1 9 5 2	2.8	3.8	3.2
1 9 5 3	4.5	4.7	4.6
1 9 5 4	2.5	1.5	2.1
1 9 5 7	10.4	4.8	7.7
1 9 6 3	15.1	7.7	11.3
1 9 6 4	18.5	13.8	16.1
1 9 6 5	30.1	9.8	19.9
1 9 6 6	20.9	11.4	20.1
1 9 7 1	44.8	22.0	33.2
1 9 7 2	43.2	22.5	32.4

结 语

实践证明，建立肺癌防治网有利于早期发现病人，提高治疗效果；有利于就近就医；有利于更完整地积累流行病学资料；有利于调动各级医疗机构和广大医务人员的积极性，发挥结防所一套班子防治两种疾病的作用。由于结防所在防治肿瘤战线上是一名新兵，工作又刚刚开始，目前还存在着发展不够平衡、缺少有效的防治措施和如何对群众恰如其分进行宣传等问题。这些问题，有待进一步加以研究改进，以便更好地开展群众性的肺癌防治工作。

(1973 年 6 月)

血清甲种胎儿蛋白测定在原发性 肝癌普查中的应用*

近年来,血清甲种胎儿球蛋白(AFP)检测已被广泛应用于原发性肝细胞瘤的临床诊断^[1]。自1970年至1972年10月,上海共测定了4,621例血清标本。在797例临床诊断为原发性肝癌的患者中,阳性率为75.65%;在797例内,经组织学证实为肝细胞瘤的139例中,阳性率为76.3%;52例转移性肝癌有6例呈“假阳性”,除肝及畸胎瘤以外的147例肿瘤患者全部阴性;除2例外,2,342例肝、胆系统非肿瘤患者及791例健康人,AFP亦均阴性。

自1972年始,AFP测定应用于上海的一些工厂和江苏省农村人民公社的原发性肝癌的普查,发现了一部分原发性肝癌患者,其中某些系早期肝癌。

材 料 和 方 法

一、普查人口

1. 上海部分工厂的全部在职职工及部分退休工人,共277,167人。
2. 江苏省若干人民公社的自然人群(16岁以上),共28,176人。
3. 江苏省其他人民公社16岁以上的肝病或有肝病史的人群,共38,656例。

二、抗血清

以4~6个月胎儿的混合血清,原发性肝细胞瘤患者的高AFP血清,或全胎儿生理盐水浸出液的部分纯化的AFP制剂,对兔或绵羊进行免疫所取得的抗血清。使用的兔与羊的抗血清经等体积的正常人混合血清吸附过。

三、检查方法

Ouchterlony 双相扩散法和对流免疫电泳法。部分可疑阳性标本以放射免疫测定法核实^[3]。

结 果

一、AFP 普查结果(见表1)

表1 AFP 普 查 结 果

	被 检 人 数	AFP 阳性例数	阳性率 (1/10 万)
上海	277,167	31	11.18
江苏省(自然人口)	28,176	14	49.69
江苏省(有肝病或肝病史 人群)	36,656	102	263.87

*本文系参加1973年4月在意大利波伦亚召开的第二届国际癌症早期诊断和预防学术会议的论文

二、随访结果

147例AFP普查阳性例中,129例(88.4%)经物理检查、其他诊断试验,剖腹探查、病理检验或随访2~10个月,确诊为原发性肝癌;作组织学检验的计21例,其中20例为原发性肝细胞癌,1例为胆管细胞癌。其余18例AFP阳性病例,经3~10个月(平均6.9月)的随访,均未见明显的原发性肝癌临床征象;在随访期间,AFP检测曾重复1~6次(平均3.8次),AFP大部持续阳性,对这些病例作进一步的观察是需要的。

三、AFP普查和原发性肝癌明显体征出现的时间关系

表2示53例自AFP阳性到出现原发性肝癌明显体征的时间(体征:肝大肋下5厘米以上或剑突下7厘米以上,质硬且结节状;肝大质硬,有明显结节;或无适当原因的进行性肝肿大)。53例中有20例在普查时AFP阳性,并伴有上述体征;余33例则于AFP检测阳性后1~10个月才出现体征(平均3.1月)。因此,AFP检测能在明显的临床体征出现之前发现部分原发性肝癌患者。

表 2. 53例AFP阳性至原发性肝癌明显体征出现的时间

月数	AFP普查检测时	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
例数	20	14	3	5	2	4	2	0	1	0	2

四、AFP普查时其他检查的结果

表3示26例AFP阳性者于AFP检测后1~2周内进行的其他检查的结果。26例均经临床诊断或组织学证实为原发性肝癌。在普查中AFP检查阳性时,这些患者的其他检查结果大多阴性,因而提示AFP普查能获得阳性结果比其他检查为早。

表 3. AFP普查时其他检查的结果

检查项目	AKP	γ -GT	AKP和LDH 同功酶	超声波检测	放射性同位素扫描
被检例数	17	7	8	23	21
阳性例数	8	5	4	8	10

病例介绍

例1:孙某,49岁,纺织厂女工,1972年11月3日普查时AFP阳性。无自觉症状。物理检查:肝右肋下2.5厘米,质中,无结节。超声波检查和放射性同位素扫描均阴性。AFP重复阳性。于11月22日手术,见右后叶上部有一直径4厘米的癌结节。行右半肝切除。术后AFP转为阴性,患者情况良好。病理证实为原发性肝细胞癌。

例2:杨某,男,45岁,农民。1972年9月15日普查发现AFP阳性。无自觉症状。物理检查:肝轻度肿大,右肋缘下1.5厘米,剑突下3厘米,质软,触及花生大小的结节。

10月6日手术,左后肝有一4×3.5厘米大小的癌性结节。行左后叶肝切除。术后AFP转为阴性,患者情况良好。病理证实为原发性肝细胞癌。

讨 论

一、AFP检测在原发性肝癌普查中的应用价值

Hull等^[4]曾注意到原发性肝细胞癌的AFP阳性率有明显的地区差异。我们曾观察到37例组织学上证实为原发性肝细胞癌而Ouchterlony双相扩散法和对流免疫电泳法AFP均阴性的患者中,随机选取14例作放射免疫测定,结果12例AFP阳性(AFP水平52~933毫微克/毫升)^[2,3]由此推算,上海地区原发性肝细胞癌AFP的阳性率可在95%左右,且上海和江苏省的原发性肝癌大多是肝细胞型,因此以AFP检测作为普查原发性肝癌的一种方法是恰当的。若采用某些较敏感的方法如放射免疫测定法来普查,则阳性率较高,但AFP试验的特异性降低。

为使AFP普查检测适用于边远地区,我们曾简化了测定方法,如全血双相扩散法和血滤纸片法,已应用于实际。

二、在原发性肝癌普查中重复进行AFP检测的必需性

原发性肝细胞癌AFP的动力学有各种类型。一种是血清AFP水平在开始时很低,随疾病的发展而平行地渐增。另一型则与Watabe等^[5]在动物实验中注意到的相似即呈马鞍型曲线。如果仅在普查时作一次AFP检测,则开始时AFP低水平的或近马鞍型曲线底部的病例将被漏检。在我们11,004例AFP阴性例中,有1例以后于第3、4、5、6、7月时检测AFP均阳性,2例在普查后第8个月时检测结果阳性。因此,在原发性肝癌的高发区重复进行AFP检测是重要的。

小 结

一、本文报告用Ouchterlony双相扩散法和对流免疫电泳法在原发性肝癌普查中对343,999名人群进行AFP检测的结果。

二、通过AFP阳性而其他检查大多阴性,以及肝癌的明显体征于AFP检测阳性后出现的观察,它表明了AFP检测在原发性肝癌的早期发现中有一定的意义。

三、在原发性肝癌高发区中,建议应作重复的AFP检测。

参 考 资 料

- [1] Abelev, G. I.: Alpha-fetoprotein in ontogenesis and its association with malignant tumors. *Adv. Cancer Res.*, 14: 295~358, 1971.
- [2] 上海市肿瘤防治研究协作组: 血清甲种胎儿蛋白检测在原发性肝细胞癌临床诊断和普查中的应用, *中华医学杂志*, 8: 454, 1973.
- [3] 上海实验生物研究所等: 甲种胎儿蛋白的放射免疫测定, *中华医学杂志*, 8: 463, 1973.
- [4] Hull, E. W., Carbone P. P. Moertel C. G., et al.: Serum alpha-fetoprotein in the U. S. A. *Lancet*, 1: 779~80, 11, Apr., 1970.
- [5] Watabe, H.: Early appearance of embryonic-globulin in rat serum during carcinogenesis with 4-dimethyl-aminoazobenzene. *Cancer Res.*, 31: 1192~4, Sep., 1971.

亲和层析法精制甲胎蛋白

中国科学院上海生物化学研究所 上海市第六人民医院

亲和层析法^[1]是利用生物高分子化合物特有的功能专一性,使可逆地与其相对应的固相配基结合,而将生物高分子从其它杂质中分离出来的一种方法。目前已广泛地应用于蛋白质、酶、核酸、抗原和抗体等的提纯。把抗原或抗体用共价键联结到固相载体上,用以分离和纯化相应的抗体或抗原的方法称为免疫吸附法。本文是用经过纯化所制得的单相抗甲种胎儿蛋白抗血清和抗正常人全血清抗血清的 γ 球蛋白,分别联结在琼脂糖载体上,利用其免疫吸附专一性来纯化甲种胎儿蛋白(以下简称 AFP),以供放射免疫测定等检测方法及 AFP 的理化性质及有关的基础研究使用。

材 料 和 方 法

一、抗血清的制备

1. 绵羊抗正常人全血清的制备:取 1 毫升正常人血清加等体积佐剂充分乳化,于公羊两侧颌下淋巴结内及腿部 2 处、皮下 4 处各注射 0.5 毫升,2 周后,每周免疫 1 次,多点注射正常人血清共 4 毫升,4 次后放血。

2. 兔抗人全血清的制备:免疫方法同前述^[2],少数家兔若效价不高,则在末次免疫一个月后于静脉注射聚肌苷酸-聚胞嘧啶核苷酸 (Poly I-Poly C) 0.5~1.0 毫克/毫升及 2~5 倍的抗原量多点注射,隔日腹腔注射 Poly I-Poly C 1 次,7~10 天后放血,可得高效价的抗血清。

3. 绵羊单相抗 AFP 抗血清的制备:用经过一定程度纯化的 AFP 制剂免疫绵羊(免疫法同 1),得到非单相抗 AFP 抗血清。此抗血清和正常人血清、正常人组织提取液在 β 区产生一条较弱的沉淀线。将此抗血清通过正常人血清免疫吸附柱和正常人胃组织提取液免疫吸附柱纯化,吸收去掉非特异部分,可得到比原体积稍大、效价很少下降的单相抗 AFP 抗血清(见图 4 第 6 步)。

4. 绵羊抗兔 γ -球蛋白抗血清的制备:用家兔抗正常人抗血清与正常人血清的复合物免疫绵羊而得。

5. 家兔抗绵羊 γ -球蛋白抗血清的制备:用绵羊抗兔 γ -球蛋白抗血清与正常兔血清的复合物免疫家兔而得。

上述 1、2、3 种抗血清用于 AFP 的制备。

上述 2、4、5 种抗血清用于鉴定 AFP 的纯度。

二、固相载体的制备

1. 琼脂糖的制备:参照 Stellen Hjerter 法^[3]用磷酸缓冲液(以下简称 P. B. S)抽提去

掉琼脂中的琼脂胶而制得琼脂醣。

琼脂粉 20 克, 用 2,000 毫升 pH6.8、0.03M P. B. S. 中抽提 4 天, 每天换 2 次 P. B. S., 4 天后配成 4% 浓度, 高压锅内融化, 冷却后磨碎过 60 目筛成细颗粒。再同上法用 P. B. S. 抽提 4 天后, 仍配成 4% 浓度, 加 5 克氯化钠, 于高压锅内融化后趁热倒入 2,000 毫升无水乙醇中, 迅速搅拌, 即见白色絮状沉淀形成, 待沉淀完全后用 70% 乙醇洗涤以除去微量氯化钠, 再用乙醚洗后烘干得 13 克, 色微黄, 产率 65%。

2. 琼脂醣珠(Sepharose4B)的制备: 参照 S. Bengtsson 法^[4], 喷珠装置如图 1。“A”为可密闭的铜锅, 其盖子上一口以橡皮管“B”接氮气钢瓶, 另一出口接压力表“C”, “D”为不锈钢的开口锅, 锅底出口接开关“E”, 底端装上割去斜口的医用针尖“F”(18 号针尖), 烧杯“G”内为乙醚冰水液和搅拌器, 针尖浸入醚层约 0.5 厘米深, 喷珠时在“A”内装入热水, 将在高压锅内融化的 4% 琼脂醣倒入“D”内, 迅速盖上盖子, 旋紧螺丝以免漏气, 打开氮气钢瓶阀门, 使压力上升到 2.8~3.0 公斤/平方厘米, 边搅拌边打开开关“E”, 液体琼脂醣经针尖喷入烧杯内, 即见珠状琼脂醣颗粒形成, 并渐渐沉积到水层底部中, 喷珠完毕后关闭“E”及氮气钢瓶阀门, 倾去乙醚层, 在显微镜下观察水层中的琼脂醣颗粒为大小不等的球状物, 筛出 60~120 目的珠状物作为免疫吸附柱的固相载体。

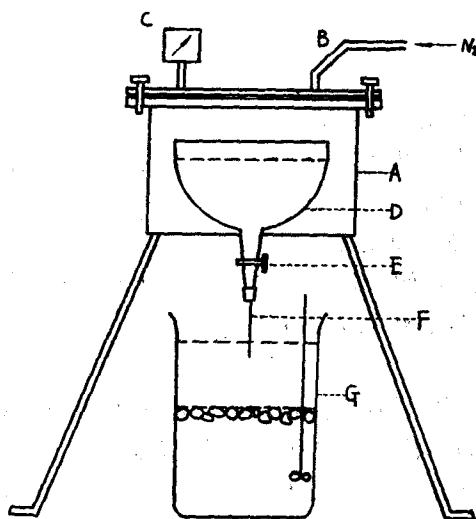


图 1 琼脂醣喷珠装置

三、 γ 球蛋白的制备

用 DEAE-纤维素柱纯化。详细过程见图 2。

除图 2 所示方法外, 我们亦采用抗血清直接上 DEAE-纤维素层析柱^[5], 或经 2 次 50% 饱和度的硫酸铵沉淀或 13.5% 饱和度的硫酸钠沉淀制备 γ -球蛋白, 均得满意结果。

四、抗 AFP 免疫吸附柱及抗正常人全血清免疫吸附柱的制备

固体溴化氰(97%以上) 4 克, 溶于 70 毫升蒸馏水中小心倒入沉积为 100 毫升的琼脂醣中^[6,7], 搅拌滴加 2N NaOH 使 pH 维持 11, 反应 8 分钟后即用 5 倍体积预冷的 0.1M NaHCO₃, 在布氏漏斗或粗砂蕊漏斗上洗涤已活化的琼脂醣, 洗涤时间为 90 秒钟。洗

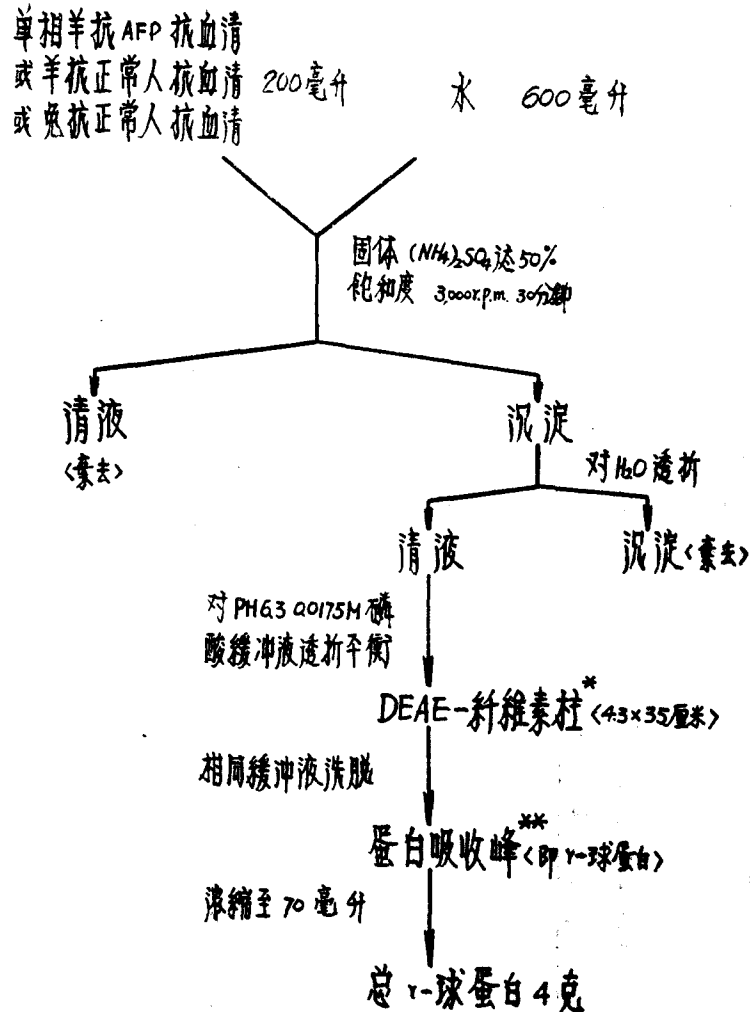


图 2 γ -球蛋白制备

* DEAE-纤维素(Whatman DE11) 0.5N NaOH 处理 2 次后用缓冲液平衡装柱

** 指收集在 280 毫微米有吸收的洗脱液部份

涤完毕后,即迅速加入预先对 0.1M NaHCO_3 透析至平衡的 70 毫升待偶联的 γ -球蛋白(溶液中总蛋白为 4 克), 4°C , 小心搅拌, 反应 6~10 小时后离心除去未偶联上的蛋白, 用生理盐水洗涤免疫吸附剂 2 次, 再装入柱中 $(4 \times 10 \text{ 厘米})$, 然后用生理盐水及 $\text{pH} 2.4$, 0.1M 甘氨酸-盐酸缓冲液, 充分洗涤至流出液 280 毫微米的光吸收均小于 0.02, 再各用 2~3 倍柱体积 7M 尿素及水洗涤, 最后用 $\text{pH} 7.0$ 、0.01M P. B. S. (或生理盐水), 洗至中性即可使用。

将羊和兔抗正常人全血清的免疫吸附剂合并装入柱中, 可增加柱抗体组份的完全性和吸附能力。

正常人全血清和正常人胃组织抽取液的免疫吸附柱依上述相同方法制备。

五、AFP 的纯化

1. 含有 AFP 的肝癌病人腹水、血清或胎儿组织粗纯液^[2]对生理盐水透析平衡后, 上单

相抗 AFP 的免疫吸附柱，用生理盐水洗去杂蛋白，用对流免疫电泳法测定^[8]流出液，AFP 应呈阴性，对抗正常人抗血清应呈强阳性，再继续洗至流出液对抗正常人全血清抗血清呈阴性反应。吸附在柱上的 AFP 用 pH2.4、0.1M 甘氨酸盐酸缓冲液洗脱（流速 5 毫升/5 分钟），洗脱液迅速用 0.5M K_2HPO_4 调节 pH 至中性，收集用对流免疫电泳测定洗脱液对抗 AFP 抗血清呈阳性的部分。样品对生理盐水透析后，上羊和兔合并的抗正常人全血清免疫吸附柱，AFP 在此柱上不吸附而直接流出，用生理盐水洗脱（流速 5 毫升/5 分钟），每管收集液用兔抗 AFP、兔抗正常人全血清及兔抗白蛋白抗血清进行对流免疫电泳测定，结果表明流出液仅对抗 AFP 抗血清有沉淀条纹，收集 AFP 阳性的部分合并浓缩。

2. Sephadex G-200 柱层析：Sephadex G-200 10 克于蒸馏水中溶胀 72 小时后装柱（ 2.5×80 厘米）。上述浓缩样品上柱用蒸馏水洗脱，流速 3 毫升/30 分钟，测定洗脱液在 280 毫微米的光吸收，得二个吸收峰（见图 3），峰 I 经双扩散法鉴定为羊的 γ -球蛋白，峰 II 为 AFP。收集峰 II 浓缩，用 0.3 微米超滤膜（Millipore PHWP25 毫米）过滤后加叠氮钠放入冰箱内保存。经反复多次使用的免疫吸附柱，峰 I 逐渐消失，样品可不经 Sephadex G-200 柱层析即达高度纯化。

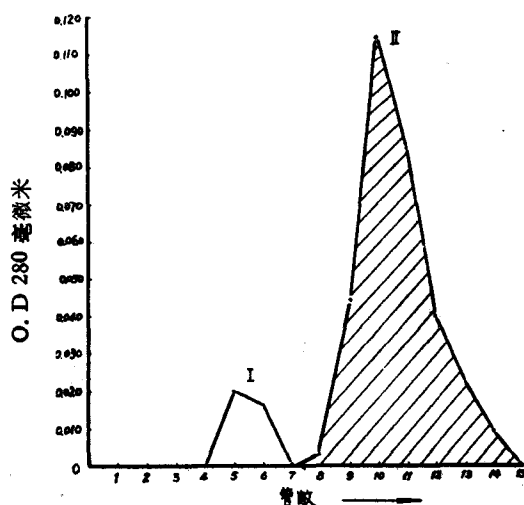


图 3 Sephadex G-200 分离 AFP

- 说明：1. 第 I 峰：羊 γ -球蛋白；第 II 峰：AFP
2. 每管体积为 3 毫升。第 4~15 管是通过对抗羊 γ -球蛋白抗血清扩散测定及对抗 AFP 抗血清对流免疫电泳测定而测知其组成的

3. 免疫吸附柱的再生：抗 AFP 免疫吸附柱用 2~3 倍柱体积 7M 尿素洗涤，然后用蒸馏水洗涤去尿素，最后再用生理盐水平衡，即可重复使用。

被吸附在抗正常人全血清免疫吸附柱上的其它蛋白可用 2~3 倍柱体积的 pH2.4、0.1M 甘氨酸-盐酸缓冲液洗涤，然后依次用 pH7.0、0.1M P. B. S. 及 7M 尿素、蒸馏水洗涤和生理盐水平衡后，即可重复使用。

纯化 AFP 的总流程见示意图 4。

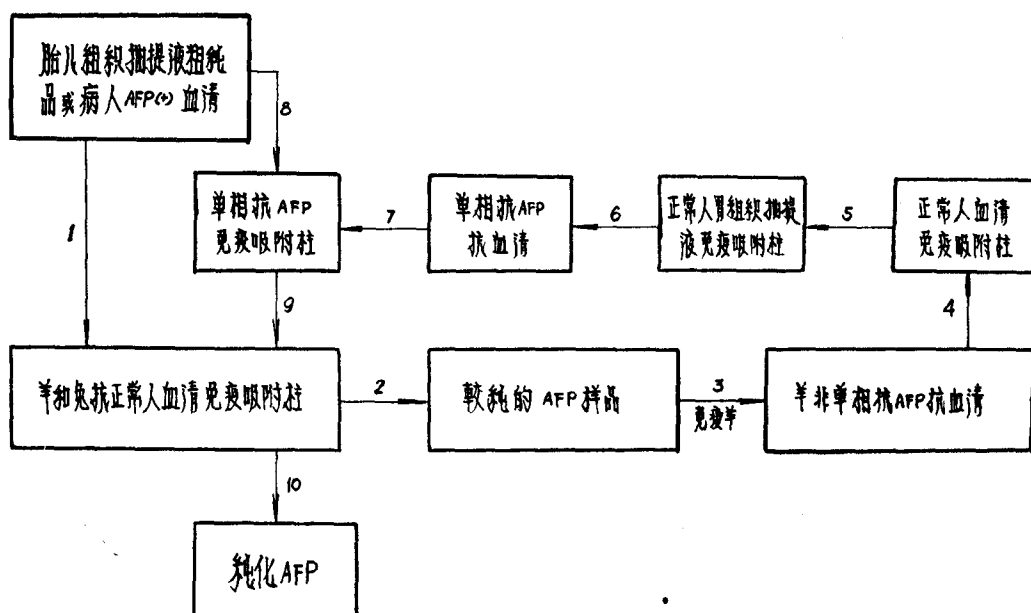


图 4 亲和层析法制备纯 AFP 总流程示意图

说明：1~8 为单相抗 AFP 抗血清制备流程，8~10 为 AFP 纯化流程

结 果

一、提纯倍数

经过上述方法纯化，用免疫电泳扩散法^[9]测定其提纯倍数，结果见表 1。

表 1* 亲和层析法纯化 AFP 的提纯倍数

样 品	纯 化 前 单位**/mg 总蛋白	纯 化 后 单位**/mg 总蛋白	纯 化 倍 数
AFP(+)肝癌病人血性腹水	1895	120588	63.7
胎儿组织提取初纯液	5000	90536	18.1

* 表内总蛋白量，纯化前系用双缩尿法测定，纯化后用 Folin 法测定

** AFP 单位系指用电泳免疫扩散法测出的峰高毫米值

二、纯度鉴定

1. 浓缩后的 AFP 已用多种类的抗血清进行免疫电泳、双向扩散、对流免疫电泳及聚丙烯酰胺电泳等进行分析，结果表明，产品在这些检测方法中是纯的(见图 5-8)。

2. 根据 Greenwood 法^[10]用 I¹³¹标记提纯后的 AFP，在行醋酸纤维薄膜电泳后，用 X 光片感光可得放射自显影纯的图谱(图 9)。

讨 论

一、关于免疫吸附柱法提纯 AFP 的优点

用免疫吸附法纯化 AFP 具有操作简便、特异性强、分离量较大、操作周期短等特点。例

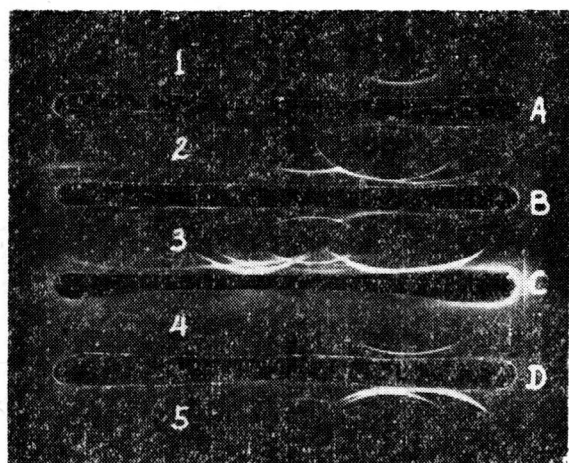


图 5 纯化 AFP 样品的免疫电泳分析

孔: 1、4 为纯化 AFP 样品, 2、5 为 AFP

阳性的肝癌患者血清, 3 为正常人血清

槽: A 为已吸收抗 AFP 抗血清, B、D 为未吸收的抗 AFP 抗血清, C 为抗正常人全血清抗血清

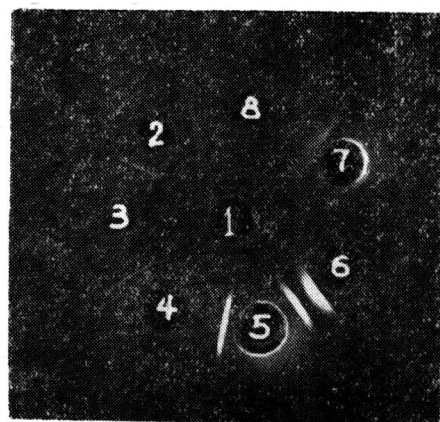


图 6 纯化 AFP 样品的琼脂双向扩散法鉴定

孔 1: 纯化 AFP 样品, 孔 2: 经过吸收的抗 AFP 抗血清, 孔 3: 胎儿组织提取液, 孔 4: 羊抗 AFP 抗血清 (未经吸收), 孔 5: 兔抗羊 γ -球蛋白抗血清, 孔 6: 羊抗兔 γ -球蛋白抗血清, 孔 7: 羊抗人全血清抗血清, 孔 8: AFP(+) 病人血清

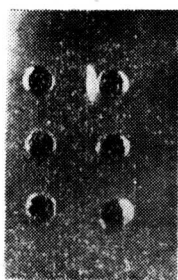


图 7 纯化 AFP 样品的对流免疫电泳鉴定

右孔: 上为未吸收的抗 AFP 抗血清, 中为兔抗人全血清抗血清, 下为羊抗人全血清抗血清

左孔: 上、中、下均为纯化 AFP 样品

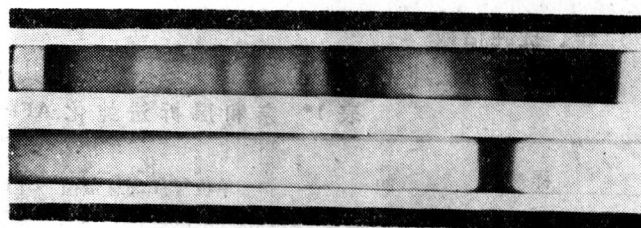


图 8 纯化 AFP 样品的聚丙烯酰胺电泳分析

上: 经免疫吸附柱纯化的 AFP 样品, 下: 上免疫吸附柱前的样品

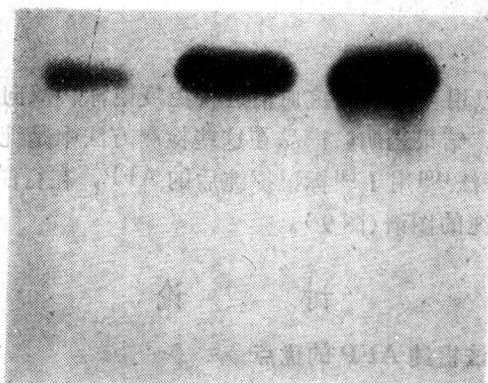


图 9 (不同批号) 纯化 AFP 样品的放射自显影图