

**labeled Immunoassays
and
Clinical Medicine**

编 尹伯元

标记免疫分析与

Q939.91

标记免疫分析与临床

Labeled Immunoassays and Clinical Medicine

(3)

主编 尹伯元

原子能出版社

Atomic Energy Press

内 容 简 介

《标记免疫分析与临床》系列书第三辑介绍了一步法放射免疫分析技术和时间分辨免疫荧光分析。前者有“一步法放射免疫分析技术的实验研究”，它报道了以试管为二抗载体的固相放射免疫技术，该法操作简便，各项技术参数优于目前市售试剂盒；后者如“人血清 β_2 -微球蛋白生物素-亲和素系统时间分辨免疫荧光分析法的建立”，首次在国内建立了人血清 β_2 -微球蛋白固相夹心 BAS-TrIFMA，以及“时间分辨免疫荧光双抗体夹心法测定血清胰岛素”。“FRTL5 细胞 cAMP 法测定甲状腺刺激阻断抗体”和“甲状腺刺激抗体与毒性甲状腺肿 (Graves' 病) 患者甲状腺功能 and 甲亢预后的关系”探讨了这两种抗体的检测以及它们在甲亢发病学中的作用。“20 例胰岛素依赖型糖尿病 (IDDM) 胎胰、胸腺联合移植术后 1~4 年外周血 T 细胞亚群的变化及意义”报告了移植前后 CD_3 、 CD_4 、 CD_8 和 CD_4/CD_8 的变化，讨论了联合移植对 IDDM 患者免疫系统的调节作用。此外还有“肾性骨病与钙、磷及调钙激素的关系”等。

Brief Introduction

In volume 3 of **Labeled Immunoassays and Clinical Medicine** series, one-step RIA technique and time-resolved fluorometric assay are presented. The former is “An Experimental Study of One-step RIA Technique”, in which solid phase RIA with test tube as second antibody carrier is reported. One-step RIA is easy to perform and its characteristics are better than those of the commercial kits. The later includes “A Time-resolved Immunofluorometric Assay for Human Serum β_2 -Microglobulin”, in which solid phase sandwich biotin-avidin system time-resolved fluorometric assay is described for the first time in China, and “Time-resolved Immunofluorometric Assay (TrIFMA) for Insulin in Serum”. “A Practical Assay for Thyroid stimulation Blocking Antibodies by Measurement of cAMP in FRTL5 Thyroid Cells” and “Relation of Thyroid stimulating Antibody with Thyroid Function and Outcome of Graves' Disease” deal with the detection of these antibodies and their role in the pathogenesis of Graves' disease. In “Changes of Peripheral T-lymphocyte Subsets After Combined Transplantation of Fetal Pancreas and Thymus in Twenty Cases of IDDM and Its Clinical Significance”, changes of CD_3 、 CD_4 、 CD_8 and CD_4/CD_8 ratio are studied and the regulatory effect of combined transplantation of fetal pancreas and thymus on immune system of IDDM patients is discussed. “Relationship Between Renal Osteodystrophy and Changes of Calcium, Phosphorus and Their Regulating Hormones” and other articles are also included.



标记免疫分析与临床

(3)

主编 尹伯元

出版发行 原子能出版社 (北京市海淀区阜成路 43 号)

通讯处: 北京市 2108 信箱, 100037 (邮编)

印 刷 国防科工委印刷厂

经 销 新华书店总店 北京 发行所发行·新华书店经销
科技

开本 787×1092 mm 1/16 印张 6.25 字数 150 千字

1993 年 4 月北京第 1 版 1993 年 4 月北京第 1 次印刷

印数 1—4000

ISBN 7-5022-0919-0/R·30

定价: 5.00 元

《标记免疫分析与临床》

编委会名单

主 编：尹伯元

副主编：（按姓氏笔划排列）

王仁芝	王浩丹	朱承谟	刘景生	麦荫桥
李振甲	李鹤强	吴 企	吴继琮	邵惠训
邵鹤生	范振符	周甲贤	赵惠扬	莫启忠
徐浩樑	黄 焘	曾熙兰	解汝泰	

编 委：（按姓氏笔划排列）

马祥瑞	王金良	任长征	刘用华	刘鸿义
刘殿文	许元初	许曼音	孙述强	孙恒德
李中华	李美颖	杨永青	杨春生	肖凤云
何静娟	陈智周	邵力正	周志才	郑妙瑢
赵夏令	袁济民	顾维正	徐汇义	徐钟源
郭肖南	黄耀章	梁成章	彭立义	瞿光耀

目 录

· 论 文 ·

血清 β_2 -微球蛋白生物素-亲和素系统时

- 间分辨免疫荧光分析法的建立 陈素娟 李振甲 刘成贵 (1)
- FRTL 5 细胞 cAMP 法测定甲状腺刺激阻断抗体 宗建奇 高 慧 金世鑫等 (5)
- 甲状腺刺激抗体与 Graves' 病患者甲状腺
腺功能和甲亢预后的关系 刘 超 张忠邦 蒋须勤等 (10)
- 20 例 IDDM 胎胰、胸腺联合移植术后 1~4
年外周血 T 细胞亚群的变化及意义 王维娜 刘国林 杨海东等 (14)
- 时间分辨免疫荧光双抗体夹心法测定血清胰岛素 李 红 童钟杭 (17)
- 肾性骨病与钙、磷及调钙激素的关系 王维力 尹伯元 张积熙等 (21)
- 脑损伤周围组织白三烯 B_4 含量的测定及其临
床意义 邵鹤生 尤海清 胡 锦等 (25)
- 冠状动脉造影对血浆降钙素基因相关肽、血栓素 B_2
和 6-酮-PGF $_{1\alpha}$ 水平的影响 杨 晔 石湘芸 赵云涛等 (28)
- 一步法放射免疫分析技术的实验研究 李振甲 陈素娟 王录煊等 (31)
- “益智糖浆”对儿童多动症患者某些临床生化指
标的影响 方 军 孙远岭 (36)

· 工作报告 ·

RIA 测定正常人和不同孕周孕妇血清胎盘型

- 碱性磷酸酶的水平 肖为红 沈 波 俞惠新等 (39)
- 血浆胃动素与小肠传递时间关系的初步探讨 黄裕新 许才媛 张少玲等 (41)
- 支气管肺泡灌洗液结核抗原、抗 PPD 抗体和
抗原抗体免疫复合物测定的初步研究 王 巍 张敦熔 王秋兰等 (44)
- 放射免疫分析用 T_3 、 T_4 和 TRH 人工抗
原的制备 孙恒德 尹伯元 张积熙等 (47)
- 冠心病患者体外反搏前后血浆 6-酮-前列环素
 $F_{1\alpha}$ 及血栓素 B_2 的含量观察 刘革乐 郑振声 刘秀琴等 (50)
- 原发性甲状腺功能减退症的钙代谢研究 (76
例临床分析) 黎云燕 张士明 肖汉友等 (52)
- 老年人和呼吸消化系统恶性肿瘤病人血浆胃动

素的变化	郭启均 卢妙如 赵 力等 (54)
肺癌患者超选择性支气管动脉灌注化疗期间血	
清 CEA 的动态观察	郭爱琴 杨春生 常锦滨 (56)
异羟基洋地黄毒甙配基标记核酸探针检测 HBV	
DNA	段永强 (57)
慢性肺心病急性加重期患者血清胃泌素、 T_3 、	
T_4 测定的临床意义	王书钧 汤兵祥 王锦荣等 (59)
高浓度人绒毛膜促性腺激素测定时稀释液的筛选	吕天河 张小平 祁新华 (61)
不同疾病内源性洋地黄样物质水平的临床意义	刘之武 康信强 赵玲琬等 (63)
TRH 兴奋试验在甲状腺疾病诊断中的临床应	
用 (附 96 例报告)	郑立农 李少华 吕述军 (65)
部分性早熟三例报告	何静娟 吕淑珍 李 欣等 (67)
肾脏病患者血清透明质酸水平的观察	丁友法 施 春 (69)

· 论文摘要 ·

健康小儿血清 T_3 、 T_4 和 TSH 含量测定	吴从寅 裴玉梅 熊海金 (71)
正常孕妇血清铁蛋白检测的临床意义	赵豫琴 (71)
急性肾炎患儿血、尿透明质酸水平变化的临床	
意义	段永强 陈年发 (72)
甲亢患者尿 β_2 -微球蛋白、白蛋白和 IgG 水	
平的变化	徐 浩 黄又真 吴秋莲 (74)
固相放射免疫、酶联免疫吸附及反向被动血凝法	
测定乙型肝炎病毒表面抗原的比较	朱圭如 周至英 郭玲玉等 (74)
一种测定人血清甲胎蛋白的快速放射免疫分析	李锁柱 (76)

· 综 述 ·

铺标记靶细胞的时间分辨荧光法测定细胞介导的细胞毒功能	莫启忠 宫 斌 (77)
论文英文文摘	(85)
论文英文目录	(91)

人血清 β_2 -微球蛋白生物素-亲合素系统 时间分辨免疫荧光分析法的建立

陈素娟 李振甲 刘成贵

(中国人民解放军总医院基础所生化室, 北京 100853)

摘要 本文报告将生物素-亲合素系统 (BAS) 引入时间分辨免疫荧光量度法 (TrIFMA), 成功地在国内首次建立人血清 β_2 -mG 固相夹心 BAS-TrIFMA。本法批内平均 CV 8.0%, 批间平均 CV 11.7%, 最小检出值为 0.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 平均回收率为 101.2%。42 例血清样品分别用 TrIFMA 和 RIA 测量 β_2 -mG 水平, 相关性良好, $r = 0.9614$, $P < 0.001$ 。研究结果表明: 采用戊二醛活化微量滴定条, 多次包被抗体, 每次中间用戊二醛固定, 提高了 IgG 包被含量, 使本方法的检测范围达 1.25~40 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 超过其他 β_2 -mG 免疫分析的最大检出值。

主题词 β_2 -微球蛋白类 生物素-亲合素系统 时间分辨荧光免疫 铜系元素

β_2 -mG 具有重要生物学、免疫学意义, 深受基础和临床医学工作者的高度重视, 应用范围十分广泛, 研究领域不断拓宽。多年来, β_2 -mG 检测主要采用的是多克隆抗体 (PcAb) 的放射免疫分析 (RIA)。作者应用自制的 β_2 -mG 单克隆抗体 (McAb) 在建立了宽范围 RIA 的基础上, 将生物素-亲合素系统 (BAS) 引入时间分辨免疫荧光量度法 (TrIFMA), 在国内首次成功地建立了人血清 β_2 -mG 固相“夹心”BAS-TrIFMA 技术, 现将方法结果报告如下。

材料和方法

一、抗体 IgG 的提取

取羊抗 β_2 -mG PcAb 和 β_2 -mG McAb (均为本室制备)。按常规方法经 3 次不同饱和度硫酸铵沉淀, 装透析袋, 用生理盐水在 4℃ 磁力搅拌器下透析 48h, 将提取的 IgG 冷冻干燥, 备用。

二、固相抗体制备

用 0.05mol/L pH9.6 碳酸盐缓冲液将羊抗 β_2 -mGPcAb 配制成 6.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 溶液。预先活化聚苯乙烯 12 孔微量滴定条, 每孔加入 1% 戊二醛 250 μl , 37℃ 放置 1h。倾去液体, 37℃ 烘干, 每孔加入 β_2 -mG PcAb IgG 液 200 μl , 4℃ 过夜。次日倾出液体, 洗液洗 3 次, 倒干。加入 1% 戊二醛 250 μl , 37℃ 1h, 烘干。每孔再加 200 μl PcAb IgG 液, 4℃ 过夜, 弃包被液, 洗三次后倒干。每孔加入 250 μl 1% 戊二醛, 37℃ 1h, 弃去戊二醛液, 用洗涤液洗 2 次, 置 4℃ 湿环境

下保存备用。

三、生物素化抗 β_2 -mG IgG 的制备

(1) 取纯化的 β_2 -mG McAb IgG 1mg, 溶于 0.1mol/L pH9.6 碳酸盐缓冲液 0.4ml 中。另取 N-羧琥珀酰亚酯活化生物素 0.5mg (溶于 50 μ l 二甲基甲酰胺中) 加入 IgG 液中, 振荡混匀后, 室温避光反应 6h, 4℃ 过夜。

(2) 将反应液加至 1cm×25cm Sephadex G50 层析柱中, 用 50mmol/L pH 7.8 PB 淋洗, 紫外分光光度计 280nm 检测, 收集蛋白峰, 分装, -20℃ 以下保存。

四、链亲合素 Eu^{3+} 标记物的制备

取链亲合素 (Sigma 产品) 1mg, 溶于 200 μ l 0.25mol/L NaHCO_3 溶液中, 加入二乙三胺五醋酸酐 0.6mg (溶于 50 μ l 二甲基亚砷中), 即刻用 0.25mol/L NaOH 调 pH 至 8.5~9.0, 磁力搅拌器下室温反应 1h。然后向反应液中加入 10mmol/L EuCl_3 液 100 μ l, 室温反应 2h。过 1cm×25cm Sephadex G50 层析柱。用 0.1mol/L pH6.0 柠檬酸缓冲液洗脱, 紫外监测, 收集蛋白峰即为标记物。测定其蛋白浓度和 Eu^{3+} 浓度, 计算标记率。向标记物中加少许白蛋白及 0.5g/L NaN_3 , -20℃ 可长期保存。应用时经试验缓冲液稀释 1:2000~1:4000。

五、试验缓冲液

(1) 50mmol/L pH7.75 Tris-HCl 缓冲液, 每 1000ml 中含 NaCl 9g, NaN_3 0.5g, 明胶 1g, DTPA 8mg, Tween-20 0.2ml。

(2) 洗涤液 10mmol/L pH7.4PBS, 每 1000ml 中含 Tween-20 0.1ml, NaN_3 0.5g。

(3) 标准 β_2 -mG 用自制的 β_2 -mG 经与高纯标准品校正后, 以试验缓冲液分别稀释至 1.25, 2.5, 5.0, 10.0, 20.0, 40.0 μ g/ml, 作为标准。

(4) 荧光增强溶液 按文献[1]配制。

六、测定方法

(1) 取已包被抗体的微量滴定条, 空白、标准、样品均做双孔。空白管加 Tris-HCl 缓冲液 100 μ l, 标准曲线加不同浓度标准液 100 μ l, 样品孔加待测血清 100 μ l, 各孔再补加实验缓冲液 100 μ l, 置微量滴定条板振荡器上于室温反应 6h, 4℃ 冰箱过夜。

(2) 倾出反应液, 用洗涤液洗 4 次, 向每孔加入稀释生物素化抗体 (β_2 -mG IgG) 液 200 μ l, 4℃ 反应过夜。

(3) 弃反应液, 洗涤液冲洗 4 次, 每孔加入稀释链亲合素- Eu^{3+} 液 200 μ l, 振荡器上反应 1h。

(4) 用洗涤液洗 10 次, 每孔加入增强液 200 μ l, 振荡 15min, 室温放置 10min, 即可在 LKB Wallac 1230 时间分辨荧光计上测量荧光强度, 用预先编制的程序画出标准曲线, 并直接打印出待测样品中 β_2 -mG 浓度。

结 果

一、实验条件选择

1. 抗体包被浓度

取 PcAb IgG 配制 6.25, 12.5, 25.0, 50.0 μ g/ml 同时分别建立标准曲线, 所得结果见表 1。

2. 抗体包被的次数

为了观察包被次数和包被 IgG 量的关系, 用同一浓度 (6.25 μ g/ml) 经包被, 戊二醛固定, 包被, 固定。将一次、两次、三次包被微量滴定条, 同时作标准曲线所得结果见表 2。

表 1 抗体包被浓度对荧光强度的影响

标准曲线	不同浓度抗体包被测得的荧光强度, 计数/s			
	6.25 μ g/ml	12.5 μ g/ml	25.0 μ g/ml	50.0 μ g/ml
N	1.7 $\times 10^4$	1.4 $\times 10^4$	1.4 $\times 10^4$	1.4 $\times 10^4$
S ₁	3.5 $\times 10^4$	1.9 $\times 10^4$	1.7 $\times 10^4$	1.9 $\times 10^4$
S ₂	5.0 $\times 10^4$	2.0 $\times 10^4$	1.8 $\times 10^4$	2.2 $\times 10^4$
S ₃	6.2 $\times 10^4$	2.2 $\times 10^4$	2.3 $\times 10^4$	3.2 $\times 10^4$
S ₄	9.4 $\times 10^4$	2.7 $\times 10^4$	2.9 $\times 10^4$	3.7 $\times 10^4$
S ₅	1.2 $\times 10^5$	4.4 $\times 10^4$	4.0 $\times 10^4$	5.5 $\times 10^4$
S ₆	1.9 $\times 10^5$	6.7 $\times 10^4$	6.2 $\times 10^4$	7.2 $\times 10^4$

表 2 抗体包被次数对荧光强度的影响

标准曲线	不同包被次数测得的荧光强度, 计数/s		
	一次包被	两次包被	三次包被
N	1.1 $\times 10^4$	1.8 $\times 10^4$	2.3 $\times 10^4$
S ₁	2.1 $\times 10^4$	2.7 $\times 10^4$	3.3 $\times 10^4$
S ₂	2.7 $\times 10^4$	3.9 $\times 10^4$	4.0 $\times 10^4$
S ₃	3.3 $\times 10^4$	4.7 $\times 10^4$	4.8 $\times 10^4$
S ₄	4.5 $\times 10^4$	6.4 $\times 10^4$	7.7 $\times 10^4$
S ₅	7.3 $\times 10^4$	9.3 $\times 10^4$	9.2 $\times 10^4$
S ₆	9.4 $\times 10^4$	1.7 $\times 10^5$	1.6 $\times 10^5$

二、方法学指标

1. 标准曲线范围

标准曲线检测浓度范围为 1.25~40 μ g/ml, 呈良好直线 (见图 1)。

2. 灵敏度

以零标准管平均计数率+3SD 的计算方法从曲线中查得本方法的灵敏度为 0.6 μ g/ml。

3. 精密度

取已知 β_2 -mG 浓度的 3 份混合血清, 测得平均批内及批间变异系数 (CV%) 分别为 8.0% ($n = 7$) 及 11.7% ($n = 3$)。

4. 准确性

在两份已知 β_2 -mG 浓度的血清样品中分别加入 β_2 -mG 标准品 2.5, 5.0, 10.0 μ g/ml, 回收率分别为 99.4%, 103%, 99.5%, 平均为 101.2% $\pm$ 2.0%。

5. 健全性

取 3 份已知浓度的血清样品, 用试验缓冲液作 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 倍稀释, 发现

结果呈直线 ($n = 3$), 测得值与期望值很接近, 相关系数分别为 0.9948, 0.9846, 0.9999。

6. 与 RIA 比较结果

血清样品分别用 BAS-TrIFMA 及 RIA 进行测定, 结果呈高度相关。 $n = 42, r = 0.9614$, $P < 0.001$, 直线回归方程为 $Y = 0.9493X - 0.0036$, 相关图见图 2。

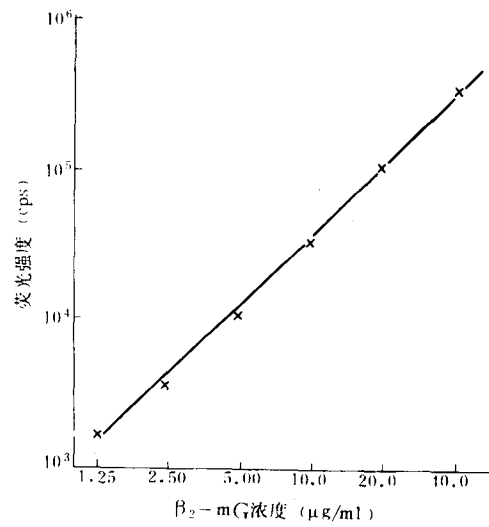


图 1 BAS-TrIFMA 标准曲线

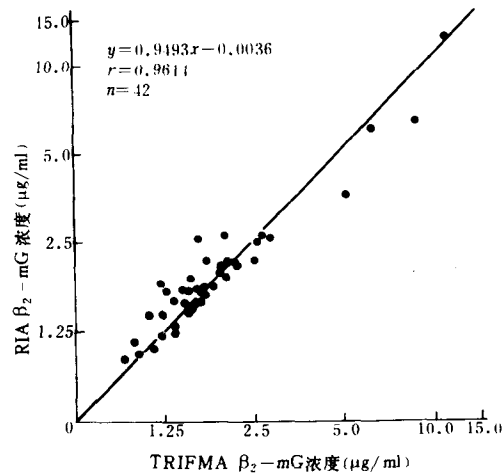


图 2 TrIFMA 与 RIA 结果相关图

讨 论

时间分辨免疫荧光分析 (Time-resolved fluoroimmunoassay, 简称 TrFIA), 创立近十年来, 以其独特的优点, 发展非常迅速, 应用范围越来越广。

BAS 于 80 年代初引入免疫分析领域, 目前其应用范围几乎覆盖了医学生物学的各个学科。我室首先将 BAS 应用于 TrFIA, 成功地建立了 CEA 及 AFP 的 BAS-TrIFMA。作者借助这项技术利用本室制备的羊抗 β_2 -mG PcAb 和 β_2 -mG McAb, 又成功地建立了 BAS-TrIFMA 测定人血清中的 β_2 -mG。

表 3 β_2 -mG 免疫分析检测范围的比较

作者	方法	示踪剂	检测范围
陈洋溢 ^[2]	RIA (PcAb)	^{125}I - β_2 -mG	5~80ng/ml
陈素娟 ^[3]	RIA (McAb)	^{125}I - β_2 -mG	0.31~10 $\mu\text{g/ml}$
Tlehaard ^[4]	TrFIA	Eu^{3+} -抗体	0.4~16 $\mu\text{g/ml}$
本文	BAS-TrIFMA	链亲合素- Eu^{3+}	1.25~40 $\mu\text{g/ml}$

β_2 -mG 在临床上已广泛用于轻度肾脏损伤的早期诊断、肾病的分型、肾小球滤过膜损害特性及范围的诊断、肾移植成活判断、糖尿病、肾病及高血压肾病的诊断、还可在肝脏疾病及恶性肿瘤中作为一种辅助诊断指标。

检测 β_2 -mG 国内应用最多的是 PcAb 的 RIA, 标准曲线范围 5~80ng/ml, 标本需要稀释, 方法较繁琐, 误差大。近年来许多人在探索新的免疫分析法测定 β_2 -mG, 本文所建立的 β_2 -mG BAS-TrIFMA 与各作者的比较见表 3。

从表中可以看出, 本文采用的 BAS-TrIFMA 测量 β_2 -mG, 超过其他免疫分析的最大检出值。由于检测范围宽, 待测样品及高浓度样品均可直接测定, 简化了操作步骤。

为了提高包被 IgG 的量, 以增大检测量, 我们采用了微量滴定条先用 1% 戊二醛活化, 再包抗体, 然后经戊二醛固定再包被的技术。结果证实, 抗体的包被次数与戊二醛固定次数对方法都有明显影响。抗体包被两次, 戊二醛固定两次, 效果最佳, 使最大检出值达 40 μ g/ml。

参 考 文 献

- [1] 李振甲, 等. 时间分辨荧光免疫测定技术及其初步实验研究. 解放军医学杂志 1990; 5: 24.
- [2] 陈泮藻, 等. β_2 -微球蛋白的微量测定和应用. 生物化学与生物物理进展 1985; 12: 76.
- [3] 陈素娟, 等. β_2 -mG 单克隆抗体 RIA 试验的建立. 上海免疫学杂志 1992; 12: 34.
- [4] Tlehaard A, et al. Double monoclonal time-resolved immunofluorometric assay of β_2 -microglobulin in serum. Clin Chem 1990; 36: 1961.

FRTL5 细胞 cAMP 法测定甲状腺 刺激阻断抗体

宗建奇

(二炮西安中医多学科研究所, 西安 710004)

高 慧 金世鑫 徐 莉

(西安医科大学内分泌研究室, 西安 710000)

摘要 本文以鼠甲状腺细胞株 FRTL5 作为靶细胞, 用聚乙二醇 (PEG) 制备粗提 IgG, 以培养细胞上清液中 cAMP 作为终点测定, 并以粗制 IgG 对一定量的 TSH 刺激产生的 cAMP 的抑制表示甲状腺刺激阻断抗体 (TSBAbs) 的活性, 在国内首次建立了 TSBAbs 的检测方法。对 31 例自身免疫性甲状腺炎 (AIT) 甲低患者、10 例 Graves' 病 (GD) 治疗后甲低患者、16 例活动性 GD 甲亢患者及 21 例正常对照血清中 IgG 活性进行了研究, 结果发现: TSBAbs 的活性, AIT 甲低组高于正常对照组 ($P < 0.05$) 和 GD 甲亢组 ($P < 0.001$), 而与 GD 治疗后甲低组差异不显著 ($P > 0.2$); TSBAbs 阳性率: AIT 甲低组为 35.45%, 与 GD 甲低组的 30% 及 GD 甲亢组的 12.5% 比较,

差异均不显著(分别为 $P > 0.75$, $P > 0.05$)。这提示用本法测定 TSBAbs, 方法可靠, 所需血清量少, 操作简单; TSBAbs 参与自身免疫性甲状腺疾病的发病。

主题词 自身免疫性甲状腺病 Graves 病 甲状腺刺激阻断抗体 自身抗体

在自身免疫性甲状腺疾病(AITD)中, 甲状腺刺激阻断抗体(TSBAbs)^[1]是以甲状腺滤泡细胞膜上 TSH 受体为抗原而形成的自身抗体, 能抑制 TSH 或甲状腺刺激抗体(TSAb)对甲状腺的刺激作用, 与甲低形成有关, 主要存在于萎缩性甲状腺炎(AT)和桥本氏甲状腺炎(HT)。近来也有报道, TSBAbs 可在 Graves' 病(GD), 甚至在活动期 GD 甲亢时测出^[2]。现参照 Chiorato 等的方法^[1], 结合国内情况作适当改良, 以鼠甲状腺细胞 FRTL5 作为靶细胞, 用 PEG 制备粗提 IgG, 以培养细胞上清液中 cAMP 作为终点测定, 并以粗制 IgG 对一定量的 TSH 刺激产生的 cAMP 的抑制表示刺激阻断活性, 建立了 TSBAbs 的测定方法, 对自身免疫性甲状腺炎(AIT, 包括 AT 和 HT)和不同甲功状态的 GD 患者血清中 IgG 活性进行了测定研究。

材料和方法

一、研究对象

(1) AIT 甲低组: 31 例(男 10 例, 女 21 例), 平均年龄 36.5 岁(18~65 岁)。

(2) 抗甲状腺药物(ATD)治疗后发生甲低的 GD 组: 10 例(男 3 例, 女 7 例), 平均年龄 41.3 岁(16~65 岁)。

(3) 活动期 GD 甲亢组: 16 例(男 6 例, 女 10 例), 平均年龄 42.0 岁(20~60 岁)。

以上三组患者临床表现及实验室检查符合诊断, 部分患者经甲状腺穿刺病理证实。

(4) 正常对照 21 例(男 10 例, 女 11 例), 年龄 20~50 岁, 均为常规医学检查合格的献血员, 无甲状腺病史及家族史, 甲功检查在正常范围。

二、FRTL5 的培养

FRTL5 细胞的培养参照 Chiorato 等的方法^[1]作适当改进, 简介如下: 该细胞先在含 TSH 的 F₁₂ 培养基中培养 6 天, 让细胞铺满培养孔底, 然后进行无 TSH 的饥饿培养 6 天备用, 以保证细胞对 TSH 有良好的反应性。

三、粗制 IgG 的制备及 cAMP 的测定

取受试血清 0.5ml, 以 20%PEG 沉淀 IgG, 再以含异丁基甲基次黄嘌呤的低张 Hank's 液溶解沉淀即得粗制 IgG, 立即向含备用细胞的实验孔中加入 0.3ml 粗制 IgG(采用双孔法)。同时加入一定量的 TSH, 使培养液中 TSH 的最终浓度保持在 150mU/L。37℃保温育 2.5 小时后, 直接取培养液测定 cAMP(蛋白竞争结合法分析药盒测定), 结果表达为:

$$\text{TSBAbs 活性}(\%) = \left[1 - \frac{(\text{待测 IgG} + \text{TSH}) \text{ 产生的 cAMP}}{(\text{正常混合 IgG} + \text{TSH}) \text{ 产生的 cAMP}} \right] \times 100$$

21 例正常对照 TSBAbs 活性高限($\bar{X} + 2SD$)为 44.57%, 大于该值判断为 TSBAbs 阳性。

四、主要试剂

Ham's F₁₂ 培养基为 Gibco 公司产品, 细胞培养用 TSH、转铁蛋白和胰岛素为 Sigma 公司

产品, T_3 、 T_4 放免药盒和 3H -cAMP 蛋白竞争结合分析药盒由中国原子能科学研究院 (北京) 提供, TSH 分析药盒由天津利科公司提供。

结 果

一、TSH 剂量-细胞反应曲线

以不同浓度 TSH 刺激备用细胞, 测定上清液中 cAMP 含量得 TSH 剂量-细胞反应 (cAMP) 曲线如图 1。

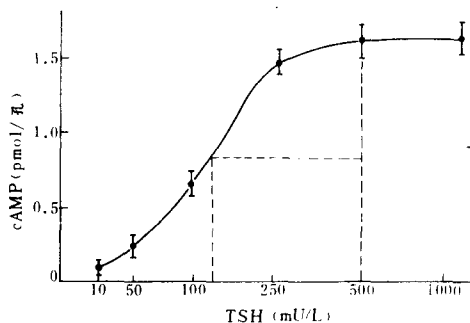


图 1 TSH 剂量-细胞反应 (cAMP) 曲线

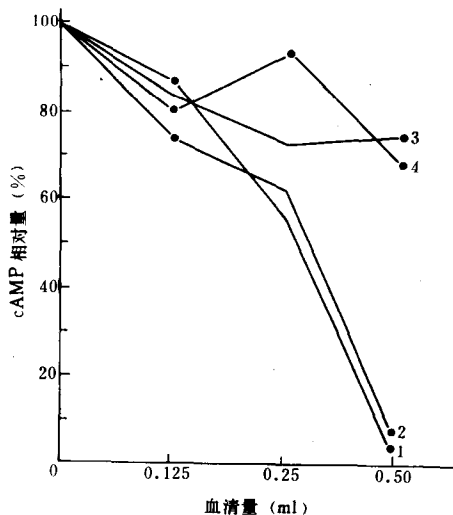


图 2 血清量-cAMP 抑制曲线

(以排除非特异性抑制的影响)。

三、TSBAb 测定结果

从图 1 中可以看出, 随着 TSH 浓度的增加, 细胞被刺激后所产生的 cAMP 呈上升趋势。当 TSH 浓度达 500mU/L 及以上时, cAMP 量已不再增加。TSH 刺激产生的 cAMP 半数最大剂量对应处曲线斜率最大, 提示细胞对该浓度处 TSH 的刺激反应最敏感。因此, 我们选择该浓度 (150mU/L) 作为测定 TSBAb 时 TSH 最终浓度的最佳选择。

二、血清剂量-抑制曲线

取 2 例 TSBAb 阳性的 AIT 患者血清 (图 2 中线 1 和线 2)、1 例 TSBAb 阴性的 AIT 患者血清 (线 3) 和 1 例正常对照血清 (线 4), 分别以不同血清量制备粗提 IgG, 刺激备用细胞。同时加入 TSH (终末浓度为 150mU/L), 测定上清液中 cAMP 量, 观察 IgG 对 TSH 刺激产生 cAMP 的抑制, 得血清剂量-抑制曲线如图 2。从图中可以看出, 两例 TSBAb 阳性的 IgG 呈现出血清剂量与抑制活性正相关 ($r_1 = 0.9929, P < 0.01$; $r_2 = 0.9934, P_2 < 0.01$); 而 TSBAb 阴性的 IgG, 血清量与抑制活性间缺乏相关关系 ($r_3 = 0.7989, P > 0.2$; $r_4 = 0.7647, P > 0.2$)。提示 TSBAb 阳性的 IgG 对 cAMP 产生的抑制是特异性的, 而 TSBAb 阴性的 IgG 对 cAMP 产生的抑制是非特异性的; 当血清量为 0.5ml 时, TSBAb 阳性与阴性的 IgG 对 cAMP 的抑制已有明显的差别。因此, 本研究以 0.5ml 血清量作为标准制备粗提 IgG, 并以正常混合血清作为对照

1. TSBAb 活性

AIT 甲低组 $31.52\% \pm 36.67\%$ 高于正常对照 $3.11\% \pm 20.73\%$ ($P < 0.05$) 和 GD 甲亢组 $22.77\% \pm 64.64\%$ ($P < 0.001$); 而与 GD 治疗后甲低组 $44.71\% \pm 37.32\%$ 比较差异不显著 ($P > 0.2$), 结果提示 TSBAb 参与 AITD 的发病, 与甲低形成有关。

2. TSBAb 阳性率

31 例 AIT 甲低患者 11 例阳性 (35.45%), 10 例 GD 治疗后甲低患者 3 例阳性 (30%), 16 例活动期 GD 甲亢患者 2 例阳性 (12.5%)。X² 检验表明: TSBAb 阳性率, AIT 甲低组与 GD 治疗后甲低组无显著差异 ($P > 0.75$), 说明 TSBAb 在甲低患者中的阳性率与甲低性质无关; 甲低组 (AIT 甲低与 GD 治疗后甲低合并) 与 GD 甲亢组比较, TSBAb 阳性率亦无显著差异 ($P > 0.05$), 这种结果原因不明。

讨 论

本研究采用的靶细胞——FRTL5 细胞株为功能性甲状腺克隆细胞株^[3], 其生长依赖 TSH, 30~40 小时繁殖一代, 可以连续传代培养而保持原代生物学特性, 具有摄碘和合成甲状腺蛋白的功能, 对 TSH 及其类似物的刺激有良好的反应能力, 可与人甲状腺细胞原代培养相媲美, 但比后者更方便, 且性能稳定, 便于质量控制。因此, 在甲状腺疾病的研究领域, 该细胞株应用非常广泛。

目前, 制备 IgG 的常用方法主要包括: 硫酸铵盐析法、DEAE 纤维素层析法及 PEG 沉析法。我们结合本实验室情况, 采用 PEG 法制备粗提 IgG。该方法血清用量少, 便于科研及临床大量应用且操作简便、不丧失抗体活性, 但 IgG 不能定量, 我们以血清量反映 IgG 的浓度^[4]。

本研究发现: TSBAb 活性, AIT 甲低组高于正常对照组 ($P < 0.05$) 和 GD 甲亢组 ($P < 0.001$), 与 GD 治疗后甲低组比较差异不显著 ($P > 0.25$); TSBAb 的阳性率, AIT 甲低组 35.45% 与 GD 治疗后甲低组 30% 无显著差别 ($P > 0.75$), GD 甲亢组 12.5% 与甲低组 (AIT 与 GD 治疗后甲低合并) 差异亦不显著。这表明: TSBAb 参与 AITD 的发病, 尤其在 AIT 时, 与甲低形成有关, 也可在 GD 时, 甚至在活动性 GD 甲亢时存在^[1,2]。

TSBAb 由多克隆抗体成分组成, 分别通过 TSH 受体水平或受体后环节发挥其功能抑制作用^[5]。即①作用于 TSH 受体或其周围, 阻断 TSH 或 TSAb 与 TSH 受体结合, 抑制 cAMP 的产生; ②作用于 TSH 受体后环节, 不影响 TSH 与其受体结合及 cAMP 的产生, 但抑制由 Forskolin 和 (Bu)₂cAMP 引起的¹²⁵I 摄取。以上两种途径的作用成分可以单独或混合存在。目前, 测定 TSBAb 时常用的 cAMP 法, 只涉及到 TSH 受体水平, 其阳性率在 AT 中一般为 40%~60%, 在 HT 中为 20% 左右。本研究测定 31 例 AIT 甲低 (未区分 AT 和 HT) 患者 TSBAb 阳性率为 34.5%, 与国外许多类似方法测定 TSBAb 的结果一致^[1], 国内尚未见到 TSBAb 测定结果的报道。Tokuda 等^[6]用¹²⁵I 摄取法测定 TSBAb。在 AT 中阳性率达 80%, HI 甲低时 40%。他们认为¹²⁵I 摄取法测定 TSBAb 涉及到 TSH 受体及受体后过程两个环节, 故比其它研究具有更高的检出率。但 Yoshikawa 等^[5]用与 Tokuda 相同的方法测定 TSBAb, 在 AIT (亦未区分 AT 和 HT) 阳性率只有 14.6%, 两者结果差别较大, 原因不明。

Chiorato 等^[1]认为 TSBAb 为 AIT 甲低时所特有, Tamei 等^[7]认为 GD 治疗后甲低的发生与 TSBAb 活性出现有关。Fujihira 等^[2]在 79 例活动性 GD 甲亢中发现 9 例 TSBAb 阳性

(11.4%),他们认为抑制甲功的 TSBAb 不但能在甲低时测出,也可以出现在 GD 甲亢时。我们的结果也支持 Fujihira 等的观点。但是本研究中 TSBAb 阳性率在甲低组与甲亢组间无显著差异,尽管甲低组 TSBAb 活性高于 GD 甲亢组。这可能与 cAMP 法测定的灵敏度有关,也可能与本研究中 GD 甲亢组病例较少有关。有些患者在 TSBAb 存在时仍表现出甲亢症状,其确切机理尚不清楚,可能提示这些患者免疫紊乱情况复杂,体内可能还有其它具有刺激活性的物质存在(如 TSAb)^[7]。此外,目前 TSBAb 的测定法是在体外低张条件下进行的,与体内情况有一定的差别。

(本研究是在西安医科大学内分泌研究室完成的,向该室谨表谢忱。)

参 考 文 献

- [1] Chiorato L, et al. Incidence of antibodies blocking thyrotropin effect in vitro in patients with euthyroid or hypothyroid autoimmune thyroiditis. *J Clin Endocrinol & Metab.* 1990; 71 : 40.
- [2] Fujihira T. Significance of circulating anti-TSH receptor antibodies in patients with autoimmune thyroid disease-TSBAb in patients with Graves disease. *Sangyo Ika Daigaku zasshi* 1989; 11 : 393.
- [3] Ambesi-Impimbato F S, et al. Culture of hormone-dependent functioning epithelial cells from rat thyroids. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1980; 77 : 3455.
- [4] Kasagi K, et al. A Sensitive and practical assay for thyroid stimulating antibody using crude IgG precipitated with PEG. *J Clin Endocrinol Metab.* 1986; 85 : 855.
- [5] Yoshikawa N, et al. Activity of thyroid stimulating antibody and thyroid stimulation blocking antibodies determined by radioiodine uptake into FRTL-5 cells. *Endocrinol (Jpn)* 1989; 36 : 55.
- [6] Tokuda Y, et al. Inhibition of thyrotropin stimulating iodide uptake in FRTL-5 thyroid cells by crude immunoglobulin fractions from patients with goitrous and atropic autoimmune thyroiditis. *J Clin Endocrinol & Metab.* 1988; 67 : 251.
- [7] Tamei H, et al. The mechanism of spontaneous hypothyroidism in patients with Graves disease after antithyroid drug treatment. *J Clin Endocrinol & Metab.* 1987; 64 : 71.

甲状腺刺激抗体与 Graves' 病患者甲状腺功能和甲亢预后的关系

刘 超 张忠邦 蒋须勤 陈家伟
覃又文 刘翠萍

(南京医学院第一附属医院内分泌科, 南京 210029)

摘要 本文探讨甲状腺刺激抗体 (TSAb) 在 Graves' 病发生、发展和转归中的作用。结果表明: ①GD 未治组和复发组 TSAb 活性明显高于 GD 缓解组, 三组患者 TSAb 阳性率分别为 91.9%, 94.8% 和 46.3%。②停药时 TSAb 阳性者, 停药后一年内的复发率为 66.7% (10/15), TSAb 阴性者仅为 5.0% (1/20)。停药时 TSAb 活性越高, 停药后越早复发。③停药后一年内复发的病人, 停药时 TSAb 活性与阳性率均显著高于未复发者, 复发后 TSAb 活性较复发前明显升高。这提示 TSAb 在 GD 发病机理中起重要作用, 停药时检测 TSAb 对预测 GD 的复发或长期缓解有重要的临床意义。

主题词 甲状腺 机能亢进 甲状腺刺激抗体 甲状腺激素 甲状腺拮抗剂

甲状腺刺激抗体 (TSAb) 是异质性 TSH 受体抗体的一种类型, 此抗体在 Graves 病的发生与复发中起重要作用^[1~5]。近年来, 学者们对 TSAb 与 GD 患者甲亢以及抗甲状腺药物 (ATD) 治疗 GD 复发或缓解的关系有了比较深入的认识, 但结论仍有争议^[1,4~6]。本文通过对 GD 患者的系统观察, 探讨 TSAb 与 GD 病人甲状腺功能和病情演变的关系以及检测 TSAb 在判断 GD 预后中的作用。

对象与方法

一、对象

(1) GD 未治组 74 例 (男 18, 女 56), 年龄 13~56 岁。诊断依据典型临床表现和高甲状腺激素血症等确定。

(2) GD 复发组 58 例 (男 11, 女 47), 年龄 15~61 岁。诊断依据病史、临床表现和血清甲状腺激素浓度升高确定。

* 国家自然科学基金资助项目。

(3) GD 缓解组 54 例 (男 19, 女 35), 年龄 21~63 岁。患者经 ATD 治疗 12 周以上, 甲亢症状消失, 血清 T_3 、 T_4 、 FT_3 和 FT_4 正常。其中 35 例 (男 11, 女 24) 治疗 18 月甲亢缓解而停药, 停药后严格随访 1 年。

二、方法

1. TSAb 测定

采用细胞培养生物学方法^[7]。GD 甲状腺组织经胰酶和胶原酶消化, 用 Eagle 培养液 (Sigma 公司) 调整细胞浓度为 $5.7 \times 10^5/\text{ml}$ 。于 24 孔培养板中加入细胞悬液 $350\mu\text{l}/\text{孔}$, 培养 72 小时。移去上清液, 逐孔加入病人及对照组粗制 IgG 悬液 $300\mu\text{l}/\text{孔}$ ^[5,7]。刺激 4 小时, 收集培养孔上清液 $200\mu\text{l}/\text{孔}$, -20°C 冻存留测 cAMP。cAMP 采用竞争性蛋白结合法测定 (中国原子能科学研究院产品)。TSAb 活性 (%) = (试验血清 IgG 刺激后 cAMP 释放值/正常血清 IgG 刺激后 cAMP 释放均值) $\times 100\%$ 。正常值 ($n=60$, $\bar{X}+2\text{SD}$) 为 $46\% \sim 136\%$, 凡大于 136% 的值判为 TSAb 阳性。

2. 甲状腺激素测定

T_3 、 T_4 (中国原子能科学研究院药盒) 和 FT_3 、 FT_4 (DPC 药盒) 均采用放射免疫分析。

3. 统计学处理

各均数与百分数分别以 F 检验、 Q 检验、 t 检验或 X^2 检验作显著性分析。相关性采用直线相关分析。

结 果

一、TSAb 与 GD 患者甲状腺功能的关系

如表 1 所示, GD 未治组与复发组血清 T_3 、 T_4 、 FT_3 、 FT_4 水平和 TSAb 阳性率差异不显著, 但均高于 GD 缓解组。此外, GD 未治组和复发组 TSAb 活性与血清甲状腺激素浓度间无明显相关关系。

表 1 各 GD 组患者 TSAb 甲状腺功能的检测结果 ($\bar{X} \pm 2\text{SD}$)

组别	例数	T_3 , nmol/L	T_4 , nmol/L	FT_3 , pmol/L	FT_4 , pmol/L	TSAb 阳性率, %
GD 未治组	74	$6.87 \pm 0.35^*$	$217.60 \pm 12.41^*$	$10.15 \pm 0.69^*$	$35.37 \pm 1.52^*$	91.9
GD 复发组	58	$7.04 \pm 0.22^*$	$230.51 \pm 10.64^*$	$11.32 \pm 0.57^*$	$33.49 \pm 1.33^*$	94.8
GD 缓解组	54	1.93 ± 0.41	107.61 ± 9.87	5.66 ± 0.93	15.87 ± 1.39	46.3

* 与 GD 缓解组比较 $P < 0.01$ 。

二、TSAb 活性与阳性率在 GD 复发组和缓解组之间的差异

由表 2 可见, GD 复发组 TSAb 活性与阳性率显著高于 GD 缓解组。