

胡远贵 主 编

沈云峰 副主编

化学发光免疫分析技术 在检验医学中的应用

HUAXUE
FAGUANG
MIANYI
FENXI
JISHU
ZAI
JIANYAN
YIXUE
ZHONG
DE
YINGYONG

湖北科学技术出版社

胡远贵 主 编
沈云峰 副主编

化学发光免疫分析技术 在检验医学中的应用

编 委 (按姓氏笔画为序)

田 强 沈云峰 吴 瑶 杨卫萍 陈凤萍
张洪波 胡 伟 胡远贵 廖钰霖 袁 慧

湖北科学技术出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

化学发光免疫分析技术在检验医学中的应用 / 胡远贵
沈云峰著. — 武汉: 湖北科学技术出版社, 2009.7
ISBN 978-7-5352-4351-5

I. 化… II. ①胡…②沈… III. 化学发光分析—应用—
医学检验 IV. R446

中国版本图书馆CIP数据核字 (2009) 第083393号

责任编辑: 兰季平 黄一

封面设计: 王梅

出版发行: 湖北科学技术出版社

电话: 027-87679468

地 址: 武汉市雄楚大街268号

邮编: 430070

(湖北出版文化城B座12-13层)

网 址: <http://www.hbstp.com.cn>

印 刷: 武汉汉邦彩色包装印制有限公司

邮编: 430070

787×1092 1/16

12.50印张 278千字

2009年7月第1版

2009年7月第1次印刷

定价: 38.00元

本书如有印装质量问题 可找本社市场部更换

内 容 提 要

化学发光免疫分析技术具有灵敏度高、特异性好、仪器设备自动化、操作方便等特点,广泛地应用于临床检验医学、环境化学、药物分析和工业分析等多领域。本书共分上、下两篇,共有 16 章,上篇系统介绍了化学发光的原理、免疫标记技术的发展、化学发光免疫分析技术的原理类型。下篇重点介绍了化学发光免疫分析技术在检验医学中多方面的应用,包括肿瘤标志物、心脏标志物、甲状腺功能、胰岛素及 C - 肽与糖尿病、感染性疾病、骨代谢、细胞因子、激素、生长激素系统、贫血诊断与鉴别诊断、过敏反应和治疗药物浓度监测。第 16 章简要介绍了检验分析中的质量管理与控制。本书可供从事检验医学和临床医学工作者参考,也可作为大专院校相关专业师生的教学参考书。

目 录

上篇 化学发光免疫分析技术的基本原理

第一章 化学发光	2
一、发光.....	2
二、生物发光.....	3
三、化学发光基本概念.....	3
四、化学发光物质.....	4
五、化学发光的应用.....	5
第二章 免疫学与免疫标记技术	10
一、免疫学概述	10
二、免疫学检测技术	11
三、免疫标记技术	12
第三章 化学发光免疫分析	20
一、化学发光分析法	20
二、化学发光免疫分析	20
三、全自动化学发光免疫分析系统	30

下篇 化学发光免疫分析技术的临床应用

第四章 肿瘤标志物	38
一、基本概念	38
二、肿瘤标志物临床应用的基本原则	40
三、肿瘤标志物检测的影响因素	42
四、肿瘤标志物检测的标准化和质量控制	44
五、肿瘤标志物的检测	46
第五章 心脏标志物的临床应用	62
一、心肌损伤标志物	62
二、心脏功能的标志物—脑钠肽	66
三、心血管炎症疾病的标志物	75
四、同型半胱氨酸	77
五、心脏标志物的联合应用	81
第六章 甲状腺功能	82
一、甲状腺概述	82
二、甲状腺激素	83
三、甲状腺功能调节	84

四、甲状腺功能指标	85
五、甲状腺疾病	88
第七章 胰岛、胰岛素、C-肽与糖尿病	95
一、胰岛	95
二、胰岛素与 C-肽	95
三、胰高血糖素	105
四、糖尿病	106
第八章 感染性疾病	109
一、肝炎病毒	109
二、人类免疫缺陷病毒	115
三、TORCH	119
第九章 骨代谢指标监测	127
一、老年性骨质疏松症	127
二、骨代谢指标监测	131
第十章 细胞因子	136
一、概述	136
二、细胞因子检测	139
第十一章 激素	155
一、性激素	155
二、其他激素	160
第十二章 生长激素系统	162
一、生长激素系统	162
二、生长激素的临床实验及临床诊断	166
第十三章 贫血诊断与鉴别诊断的应用	169
一、概述	169
二、贫血的检测指标	170
第十四章 过敏反应	173
一、免疫球蛋白 E	173
二、嗜酸性阳离子蛋白	174
三、过敏原检测	175
第十五章 治疗药物浓度监测	177
一、概述	177
二、药物浓度监测	178
第十六章 化学发光实验室室内质量控制	181
参考文献	187

上 篇

化学发光免疫分析技术的基本原理

第一章 化学发光

一、发 光

光是一种以电磁波形式存在的物质,电磁波的波长范围很宽,包含了无线电波、红外线、可见光、紫外线、X 射线、宇宙射线等。其中,波长为 380 ~ 780nm 的电磁波能够引起人眼的视觉反应,因而称为可见光。

处于基态的分子中的电子吸收能量(电、热、化学和光能等)被激发至激发态,这些处于激发态的电子,通常以辐射跃迁方式或无辐射跃迁方式再回到基态。

辐射跃迁:荧光、磷光的发射。

无辐射跃迁:振动弛豫(VR)、内转化(IC)、体系间窜跃(ISC)等。

荧光是由激发单重态最低振动能层至基态各振动能层间跃迁产生的,而磷光是由激发三重态的最低振动能层至基态各振动能层间跃迁产生的。

我们所说的光就是可见光部分。

1. 可见光的特性

(1) 可见光波长范围有限,只占整个电磁波波谱的极小一部分。

(2) 不同波长的光呈现的颜色各不同,波长从长到短,分别呈现红、橙、黄、绿、青、蓝、紫。

(3) 单一波长和波谱宽度小于 5nm 的光称为单色光。含有两种或两种以上波长成分的光称为复合光,复合光使人眼产生混合色。由于它不能作为单色光出现在光谱上,所以又称为非谱色光。

2. 三基色原理

人们通过大量实验发现,用 3 种不同颜色的单色光按一定比例混合,可得到自然界中绝大多数的彩色。具有这种特性的 3 个单色光叫三基色光,而这一发现也被总结成三基色定理,其主要内容是:自然界中绝大多数彩色都可以由三基色按一定比例混合而得。反之,这些彩色也可以分解成三基色。三基色是相互独立的,即其中任何一种基色都不能由其他两种基色混合得到。混合色的色调和饱和度由三基色的混合比例决定。混合色的亮度是三基色亮度之和。另外,任何一种颜色都有 1 个相应的补色。所谓补色,就是它与某一颜色以适当比例混合时,可产生白色。红、绿、蓝的补色分别是青、紫、黄。

3. 材料的发光光谱的类型

宽带:半宽度为 100nm,如 CaWO_4 。

窄带:半宽度为 50nm,如 $\text{Sr}(\text{PO}_4)_3\text{Cl}$, Eu^{3+} 。

线谱:半宽度为 0.1nm,如 GdVO_4 , Eu^{3+} 。

4. 发光效率的表示方法

量子效率:指发光的量子数与激发源输入的量子数的比值。

能量效率:指发光的能量与激发源输入的能量的比值。

光度效率:指发光的光度与激发源输入的光度的比值。

5. 光的分类

(1)根据激化能量方式:光致发光材料;阴极射线激化发光材料;电致发光材料;X射线发光材料;化学发光材料;放射性发光材料。

(2)根据发光材料的组成:无机发光材料;有机发光材料;复合发光材料。

二、生物发光

来自生物体的发光现象,叫做生物发光(bioluminescence)。是生物体释放能量的一种形式,这种发光现象广泛地分布在生物界中。动物的发光,除其自身发光即1次发光以外,由寄生或共生而产生二次发光的例子也不少。生物发光是化学发光,也是氧化发光的一种。根据对萤火虫、壳头海笋、萤火虫、赫氏海萤、发光细菌等的研究,与发光直接有关的物质有对热稳定和不稳定的两种成分,分别称为荧光素和荧光素酶。但也有许多生物的发光并没有证实有此两种成分。荧光素-荧光素酶反应引起的发光可分类如下(L:荧光素, $h\nu$:光量子)。

直接氧化型: $L + O_2 \rightarrow h\nu$ (海萤、海笋)。

过氧化型: $L + H_2O_2 \rightarrow h\nu$ (柱头虫、蚯蚓)。

对萤、海萤和发光细菌的发光机制曾进行了详细研究,在荧光素-荧光素酶反应以外的生物发光中,已从腔肠动物(水母、硅角海绵贝)内发现了发光蛋白质。水母的发光蛋白质是通过 Ca^{2+} 而发光的。发光颜色可因动物而异,以蓝、绿、黄色的较多,也有呈红色的。发光最大波长:海萤为460nm、发光细菌为490nm、萤火虫为544~582nm。萤火虫的发光颜色有赖于荧光素酶。生物发光的一般特点是冷光(萤的发光效率为88%,光度5~10烛),而不伴有热辐射或产生热。发光性物质多为细胞内的发光颗粒。夜光虫和萤火虫是发光颗粒在细胞内发射的,称此为细胞内发光。而海萤是将分泌物放出体外后再发光,称为细胞外发光。发光通常是发光细胞或发光腺的细胞对刺激的反应。萤火虫的发光器、海仙人掌等受刺激发光时,伴有电的变化,可描记出电发光曲线。

三、化学发光基本概念

化学发光是某种物质在进行化学反应过程中,分子吸收化学能而伴随产生的一种光辐射现象。任何一个化学发光反应都包括两个关键步骤,即化学激发和发光。

化学发光可以分为直接发光和间接发光。直接发光是最简单的化学发光反应,有两个关键步骤组成:激发和辐射。如A、B两种物质发生化学反应生成C物质,反应释放的能量被C物质的分子吸收并跃迁至激发态 C^* ,处于激发的 C^* 在回到基态的过程中产生光辐射。这里 C^* 是发光体,此过程中由于C直接参与反应,故称直接化学发光。

间接发光又称能量转移化学发光,它主要由三个步骤组成:首先反应物A和B反应生成激发态中间体 C^* (能量给予体),当 C^* 分解时释放出能量转移给F(能量接受体),使F被激发而跃迁至激发态 F^* ,最后,当 F^* 跃迁回基态时,产生发光。

一个化学反应要产生化学发光现象,必须满足两个条件:第一是该反应必须提供足够的激发能(170 ~ 300kJ/mol),并由某一步骤单独提供,因为前一步反应释放的能量将因振动弛豫消失在溶液中而不能发光。第二是要有有利的反应过程,使化学反应的能量至少能被一种物质所接受并生成激发态。第三是激发态分子必须具有一定的化学发光量子效率释放出光子,或者能够转移它的能量给另一个分子使之进入激发态并释放出光子。

化学发光分析测定的物质可以分为三类:第一类物质是化学发光反应中的反应物;第二类物质是化学发光反应中的催化剂、增敏剂或抑制剂;第三类物质是偶合反应中的反应物、催化剂、增敏剂等。这三类物质还可以通过标记方式用来测定其他物质,进一步扩大化学发光分析的应用范围。

化学发光反应的发光类型通常分为闪光型(flash type)和辉光型(glow type)两种。闪光型发光时间很短,只有零点几秒到几秒。辉光型又称持续型,发光时间从几分钟到几十分钟,或几小时至更久。闪光型的样品必须立即测量,必须配以全自动化的加样及测量仪器。辉光型样品的测量可以使用通用型仪器,也可以配有全自动化仪器。

化学发光是由于化学反应(通常是氧化)或生物化学反应产生电子能级处于激发态的物质,通过跃迁释放能量并产生光子,从而导致的发光现象。与荧光最大的区别在于无需激发光,因此后者也被称为光致发光。生物发光和化学发光均属于冷光,即发光不是由于发光体温度升高所致,因此其反应能量绝大部分用于发光而不是发热,发射波长也与温度无关。发光测定属发射光谱分析,多采用动力/速率法或积分法,无需终止反应,也不受朗伯-比尔定律限制。

四、化学发光物质

到目前为止,所研究的化学发光反应大多为氧化还原反应,且多为液相化学发光反应。化学发光反应的发光效率是指发光剂在反应中的发光分子数与参加反应的分子数之比。现将几种发光效率较高的常用的发光剂及其发光机理归纳如下。

1. 鲁米诺及其衍生物

鲁米诺的衍生物主要有异鲁米诺、4-氨基己基-N-乙基异鲁诺及异鲁米诺等。鲁米诺在碱性条件下可被一些氧化剂氧化发生化学发光反应,辐射出最大发射波长为425nm的化学发光。在通常情况下鲁米诺与过氧化氢的化学发光反应相当缓慢,但当有某些催化剂存在时反应非常迅速。最常用催化剂是金属离子,在很大浓度范围内,金属离子浓度与发光强度成正比,从而可进行某些金属离子的化学发光分析,利用这一反应可以分析那些含有金属离子的有机化合物,达到很高的灵敏度。其次是利用有机化合物对鲁米诺化学发光反应的抑制作用,测定对化学发光反应具有猝灭作用的有机化合物。其三是通过偶合反应间接测定无机或有机化合物。其四是将鲁米诺的衍生物如异鲁米诺标记到羧酸和氨类化合物上,经过高效液相色谱(HPLC)或液相色谱(LC)分离后,再在碱性条件下与过氧化氢-铁氰化钾反应进行化学发光检测。也可以采用其他分离方法,如将新合成的化学发光试剂异硫氰酸异鲁米诺标记到酵母RNA后,通过离心和透析分离,然后进行化学发光检测。

2. 光泽精

光泽精以硝酸盐的形式存在,在碱性介质中,过氧化氢将其氧化成四元环过氧化物中间体,而后裂解生成激发态的吡啶酮而发光。利用光泽精与还原剂作用,可用于测定临床医学上一些重要的还原性物质,如:抗坏血酸、肌酸酐、谷胱甘肽、葡萄糖醛酸、乳糖、葡萄糖等。

3. 洛粉碱

洛粉是文献上记载最早的化学发光试剂,但却迟迟未得到应用,直到1979年Marino等人将它应用于Co的测定后才得到重视。此试剂已被用于多种元素的分析测定。

4. 过氧化草酸酯类

草酸盐类化学发光反应大都生成过氧草酰(peroxalate)中间体,因此这类反应亦称过氧草酰类化学发光反应。过氧草酸盐类化学发光分析应用的推广还有赖于新的荧光衍生试剂的开发。

5. 吡啶酯类

McCapr等人合成了一系列吡啶酯类化合物,对该类试剂的化学发光机理研究表明,发光效率与试剂中的可解离酸性基团的pKa有密切关系,pKa一般应小于11。吡啶酯类化合物是一类很有前途的非放射性核酸探针标记物,用作DNA的发光探针,发光量子产率高,稳定性好,标记物对杂交反应的动力学和杂交体的稳定性无影响,可以直接在碱性介质中进行化学发光反应。

以上5种化学发光剂化学发光量子产率高,水溶液稳定,能被多种氧化剂直接氧化而发光,也可被众多的金属离子催化发光反应而发光,许多无机、有机和生化组分也能增强或抑制其发光,因此应用十分广泛。目前报道的有邻菲咯啉、碱基水杨酸、罗明丹—B、没食子酸、香豆素、皮素,茜素紫、苏木色精、培花青、三苯甲烷类染料、丙酮、乙醇、羟胺等。这些试剂商品化程度高,价廉,使用方便,但化学发光量子产率较低,因此,研究增敏试剂来提高它们的化学发光量子产率是非常关键的。

五、化学发光的应用

1. 无机化合物化学发光分析

1) 金属离子分析

金属离子对化学发光反应具有很好的催化作用,因而化学发光测定金属离子得到广泛的应用。但是,由于不同金属离子催化氧化发光试剂时,发光光谱相同,致使金属离子催化化学发光反应的选择性较差。为提高分析的选择性,可采用以下方法:利用待测金属离子与干扰离子配合物稳定性不同进行选择分析,如加入掩蔽剂EDTA或水杨酸掩蔽干扰离子,优化实验条件以减少其他离子的干扰,稀释样品溶液,加入敏化剂。

但是,当样品中待测物相对于干扰物浓度很小时,上述方法也无济于事,只有进行前处理,常用的分离方法有色谱、溶剂萃取等。色谱分离的高选择性与化学发光检测的高灵敏度相结合,是一种很有前途的联用技术。关键是流动相的选择,流动相选择得好,不仅可以提高选择性,还可以进行多个离子的同时测定。溶剂萃取也是提高化学发光测定金

属离子选择性的一个有效方法,这种方法的主要问题是费时,因为进行化学发光检测前必须将无机物从有机溶剂中反萃取出来,或者将有机溶剂蒸发除去。较好的方法是自动在线溶剂萃取选择性检测待测物。

2) 其他无机化合物的分析

化学发光反应中,过氧化氢是最常用的一种氧化剂,因此有关 H_2O_2 化学发光分析的报道较多,涉及到鲁米诺、过氧草酸酯及光泽精等化学发光反应。根据鲁米诺化学发光反应制成的 H_2O_2 光纤传感器与流动注射法联用,可检测 $10\text{nmol/L} \sim 1\text{mmol/L}$ 的 H_2O_2 ,用模拟酶代替辣根过氧化物酶催化鲁米诺发光,检测限可达 $5.5 \times 10^{-9}\text{mol/L}$ 。根据 ClO^- 对鲁米诺的氧化作用,可用于测定 ClO^- ,其他物质如 Cl_2 的干扰,可用流动注射法消除。利用停流技术测定水中 ClO^- 不必进行前处理。

2. 有机化合物的化学发光分析

1) 有机酸

有机化合物的同系物结构和性质相似,使单一组分的测定遇到困难,因此有机化合物同系物的分析常与 HPLC 相结合。有机酸的化学发光分析,一般是先将其衍生成荧光物质,经色谱分离后进行化学发光检测。但衍生法有如下的缺点:①衍生反应不完全。②衍生物稳定性差,要求及时检测。③限制了分离方法和条件的选择。

由于衍生产物的性质与待测物不同,导致分离效率和分辨率下降,同时增加分析的时间和劳动强度。在临床医学上,草酸是一个重要的检测项目,可以直接用氧化化学发光反应测定尿液和草酸二乙酯中的草酸盐及游离的草酸。另外还可以测定苯酮尿症病人尿液的苯丙酮酸含量,方法是先在碱性条件下将苯丙酮酸氧化成 1,2,2 二氧杂环丁烷类化合物,然后裂解产生化学发光。另外可以将 Fe^{3+} 草酸配合物光解得到 Fe^{2+} ,催化鲁米诺-过氧化氢化学发光反应,此法线性范围为 $0.1 \sim 100\mu\text{M}$ 。此外酶联偶合反应也可以用于某些有机酸的化学发光分析。

2) 有机碱

胺类化合物第一离子化电势呈如下规律:伯胺 > 仲胺 > 叔胺,并随碳链增长,离子化电势逐渐下降,因此叔胺化合物的检测限较低,达 0.28pM 。胺类化合物的分析,较多的是经柱前衍生成成荧光衍生物,分离后用过氧草酸盐化学发光体系检测,也可将其生成希夫碱或其他产物氧化而发光。有些碱如肾上腺素等可直接氧化而发光。通常有一个经验规则,例如一物质具有荧光或其反应产物有荧光,该物质一般可发生化学发光反应,但也有例外。嘌呤碱是核酸的基础物质,因此对嘌呤碱的分析测定将推动 DNA 分析方法的发展。在酸性醇液中腺嘌呤与苯甲醛反应,然后用过氧化氢氧化反应产生化学发光,此法具有很好的选择性,线性范围为: $1.5 \times 10^{-7} \sim 5.0 \times 10^{-7}\text{M}$,用此法测定鸟嘌呤灵敏度比荧光法高 20 倍。

3) 氨基酸

氨基酸分析方法的改进有利于推动生物技术、基因工程、DNA 重组和基因克隆等的发展。由于绝大多数氨基酸没有内源荧光特性,因此用过氧草酸盐体系测定氨基酸需将其衍生成荧光物质,但此法避免不了衍生法所固有的缺点。此外亦可通过测定氨基酸与

氨基酸氧化酶反应产生的过氧化氢来测定氨基酸的含量,如 L2 氨基酸经反相色谱柱分离后流经 L2 氨基酸氧化酶反应器产生过氧化氢,然后用过氧草酸盐体系检测。氨基酸与 $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{3+}$ 反应,用流动注射化学发光法检测,相对于脯氨酸和天冬酰胺检测限可分别达到 20pmol 和 50pmol。一般来说,仲胺反应产生的发光强度比伯胺大。对氨基酸上取代基的性质研究表明,给电子基有利于增强化学发光强度。

4) 糖类

光泽精体系可用于测定一些还原性物质,如:乳糖、葡萄糖,用于抗坏血酸和脱氢抗坏血酸的分析测定有很高的灵敏度,但此法用于复杂样品分析却因干扰多而受到限制。

用草酰胺化学发光照相法测定葡萄糖:在微量滴定板上将草酰胺发光剂、荧光增感剂及 50 μL 试样混合,于 5min 内用照相荧光剂测定液斑的发光强度,可检出 100pmol 的葡萄糖。

糖类物质测定的另一个重要方法是测定酶反应产生的 H_2O_2 ,由此对酶底物——葡萄糖、乳糖等进行测定。而酶的固定化技术为此法的发展注入了新的活力。采用物理包埋法将葡萄糖氧化酶固定在聚丙烯酰胺凝胶中并制成酶柱,再将酶柱接入流动注射系统中,用流动注射化学发光法测定由酶促反应产生的 H_2O_2 ,从而测定人体血液中的葡萄糖,检出限可达 0.1mg/L。

5) 类固醇与类酯

一些特异性酶如类固醇脱氢酶和其他荧光素酶与合适底物反应产生 H_2O_2 ,通过测定 H_2O_2 达到分析测定底物的目的。

6) 药物

根据药物的不同类型选择不同的化学发光分析方法。目前较常用的方法是直接氧化化学发光。在碱性溶液中用 N-溴代丁二酰亚胺氧化含有酰胺基的药物产生化学发光,如:利福霉素等,检测限在 1.23mg/L ~ 0.5g/L 之间。氧化四环素类药物检出限在 0.02 ~ 0.04mg/L 之间。

3. 化学发光在生物领域的应用

化学发光在生物学领域也有着很多应用,主要简介如下。

1) Fe^{2+}

离子催化的化学发光自由基启动的脂质过氧化(LPO)是一个链式反应过程。在链式反应过程中, Fe^{2+} 离子起着启动和催化的作用。反应过程中产生脂自由基(R^\cdot)、烷氧自由基(RO^\cdot)、共轭二烯和脂过氧化自由基(ROO^\cdot)等中间产物。 ROO^\cdot 自反应会产生激发的烷氧自由基(RO_3^\cdot)和单线态氧(O_2),其回到基态时产生发光。另外,2个 O_2 分子相互作用也可产生发光。因此,把 Fe^{2+} 盐加入含有脂肪的系统中,如:细胞膜、线粒体、微粒体、血浆、组织匀浆、尿液等,可产生化学发光。化学发光的动力学曲线可分为快速闪光期、潜伏期、缓慢发光期和稳定发光期。有报告提出,快速闪光期的发光强度与样品中过氧化氢含量有关,潜伏期的长短与样品中抗氧化剂含量有关,而缓慢发光期和稳定发光期的发光强度则反映了系统的过氧化水平,即系统产生活性氧的能力。

2) 血浆和血清的化学发光

许多实验研究对加入 Fe^{2+} 盐的不同疾病患者血浆和血清的化学发光进行的测量表明,与正常健康人相比,腹腔器官局部缺血、肢端闭合性局部缺血、血氧含量下降以及出血、手术性休克病人血浆和血清的发光强度降低。与此相反,风湿性关节炎、阑尾炎、胆囊炎、胰腺炎等炎性疾病患者血浆和血清的发光强度升高。降低和升高的幅度与疾病的严重程度有关。有研究提出,利用此方法有可能对非典型的心肌梗死和腹腔器官炎性疾病做出区别诊断。

3) 血浆脂蛋白的化学发光

有研究提出,以分离的血浆脂蛋白悬液作为系统模型可以研究不同物质对系统过氧化的调节机制。在分离的血浆脂蛋白悬液中加入胆固醇,温育一定时间后再加入 Fe^{2+} 盐,测量化学发光,发现胆固醇能使系统的发光强度降低。分析认为,这可能是由于类固醇的存在抑制了系统的过氧化。对实验性胆固醇过多血症家兔和动脉粥样硬化早期病人进行的测量发现,载脂蛋白 APO - B 在 Fe^{2+} 存在条件下的发光强度出现了增长。同样的现象在肝硬化和慢性肝炎患者身上也被发现。

4) 尿液的化学发光

利用尿液的化学发光可以研究肾脏功能的变化。将 Fe^{2+} 盐加入尿液中,测量其化学发光,发现肾功能不足者尿液的发光强度降低。与正常健康人相比,阑尾炎患者尿液的发光强度则有不同程度的提高。利用这一方法可以评估肾脏的排泄及收缩功能。

5) 物质抗氧化活性的测定

利用发光测量技术可以评价某些生物组织和体液的抗氧化活性。以某一稳定的发光系统为模型,如:脂肪体、线粒体、卵黄脂蛋白等,将待测的抗氧化物质加入该系统,然后加入 Fe^{2+} 盐,测量其化学发光。根据系统化学发光被抑制的程度可以评价物质的抗氧化活性,利用这一方法进行的研究证明,不同疾病患者血浆和血清的抗氧化活性是不同的。

6) H_2O_2 激发的化学发光

(1) 血浆和血清的化学发光。在血浆和血清中加入 H_2O_2 溶液后能激发化学发光。有报告提出,发光强度与血浆中血红素的水平呈线性相关,相关系数为 +0.71。在上述发光系统中,加入过氧化氢酶或松香油后,发光被抑制,加入叠氮化钠(NaN_3)后,发光几乎完全消失。 H_2O_2 激发的血浆和血清的化学发光,其启动因素很可能是血红素过氧化物酶催化 H_2O_2 分解引起的。血红素过氧化物对 H_2O_2 的分解是以 H_2O_2 氧化其底物为前提的。在这一反应过程中导致自由基及其中间产物生成,并与机体分子相互作用,产生 O_2 等活性物质,产生发光。 NaN_3 和松香油是 O_2 的抑制剂,所以在上述发光系统中加入松香油的 NaN_3 后,发光被抑制。血液中血红素过氧化物酶等以自由基方式分解 H_2O_2 ,而过氧化氢酸则以非自由基方式分解 H_2O_2 ,生物体内这两类反应体系协同作用,能很好的清除细胞内的 H_2O_2 。病理条件下,这一反应体系的平衡被破坏, H_2O_2 激发的化学发光强度将发生相应改变。因此,根据血浆和血清化学发光的变化,有可能对某些疾病进行区别诊断。

(2) 红细胞的化学发光。1981年 Сергиеко 等人在分离出的红细胞悬液中加入 H_2O_2

溶液,对其化学发光进行测量发现,随着红细胞的老化和溶解,系统发光强度呈增长趋势。随后对实验性动脉粥样硬化家兔红细胞化学发光进行的测量发现,与正常对照组相比,发光强度出现了降低。这可能是由于细胞膜中胆固醇含量过高造成的。对恶性肿瘤患者的调查也发现发光强度的改变。红细胞的衰老与脂质过氧化有关。 H_2O_2 能引发膜脂过氧化, H_2O_2 和脂质过氧化产物都能引起血红蛋白释放 Fe^{2+} , Fe^{2+} 是诱发一系列自由基反应、启动脂质过氧化的催化剂。自由基的产生不仅促进了红细胞的衰老和溶解,而且引发的脂质过氧化还可以导致膜脂组分和结构的改变,直接影响红细胞的生理功能。

第二章 免疫学与免疫标记技术

一、免疫学概述

免疫学是研究自身防御,机体如何识别异物并与之发生反应的一门基础医学。所谓“免疫”原由拉丁字“immunis”而来,其原意为“免除税收”(exception from charges),也包含着“免于疫患”之意。这门学科在生长、遗传、衰老、感染、肿瘤以及自身免疫的发生等方面均有重要作用。免疫学最早是研究抗感染问题,是微生物学的分科。然而自 20 世纪 60 年代后,免疫学有了迅猛的发展,已冲出了抗感染免疫的范畴而涉及多种非感染性的问题,它既有其本身的基础理论,又牵涉到许多实际问题,如:移植免疫、肿瘤免疫、自身免疫、生殖免疫等。临床上有不少疾病可以用免疫学的基础理论来理解,免疫学已渗透到临床各学科中。免疫学学科本身既有其特有的研究方法,又吸收了细胞生物学、生物化学、生物物理学、分子生物学等学科的方法,为其进一步发展创造了有利条件。目前免疫学中已形成了许多分支。研究免疫的基本理论和方法学的有免疫化学、免疫生物学、分子免疫学、免疫遗传学等,它们是免疫学发展的前沿,发展迅速。

研究免疫与疾病关系的有免疫病理学,其中包括抗感染免疫、肿瘤免疫、移植免疫、自身免疫以及研究临床各专题的临床免疫学。关于免疫药物治疗的研究则有免疫药理学、免疫毒理学等。

1. 免疫学开创阶段

早在我国南宋时期,公元 11 世纪时,我国创造性地发明了人痘苗,即用人工轻度感染的方法,达到预防天花的目的。这实际上是免疫学的开端。至 17 世纪时,不但在我国已普遍实行以人痘苗接种预防天花,而且也引起邻近国家的注意,人痘法已传入朝鲜、日本及俄国,并由俄国传入土耳其,后经中东再传入欧洲。1721 年英国驻土耳其公使夫人 Montagu 将人痘法传入英国,在英国曾进行了人体实验:把接种人痘者移居至天花流行区,结果发现接种者均获得免疫力。

2. 免疫学的兴建阶段

继人痘苗以后,免疫学上的一个重要的发展是 Jenner 首创的牛痘苗。他观察到挤牛奶女工得过牛痘以后,就不再得天花的事实,通过长期的研究,证实牛痘苗可以预防天花。牛痘给人接种后,只引起局部反应,对人的毒力并不增加。因牛痘苗对于人体无害,以后它就完全代替了人痘苗。自 Jenner 发明牛痘苗后,免疫学的发展停滞了将近一个世纪。到 19 世纪末,由于微生物学的发展,相继地发现了许多病原微生物,免疫学也随之迅速发展。其中 Pasteur 受到人痘和牛痘苗的影响,通过系统研究,找到用理化和生物学方法,使微生物的毒力减低,以减毒株制备菌苗或疫苗,如:炭疽菌苗、狂犬病疫苗等。Pasteur 减毒苗的发明,不但为实验免疫学建立了基础,也为疫苗的发展开辟了前景。德国学者 Behring 和日本学者北里用白喉脱毒外毒素注射动物,在血清中发现有一种能中和白喉外毒素的物质,称为抗毒素,此种中和毒素的能力能被动地转移给正常动物,使后者获得抗

白喉毒素的免疫力。抗毒素可用于临床治疗,效果良好,以后很多人从免疫动物或传染病病人血清中发现有多种能和微生物或其产物发生结合反应的物质,通称为抗体,而引起抗体产生的物质称为抗原。抗原和抗体因能发生特异性结合,这样就为诊断传染病建立了血清学诊断方法。随着研究的进展,免疫现象所涉及的本质问题就必然要被提出来。19世纪末,对于抗体免疫机制的认识,存在着两种不同的学术观点。Ehrlich 提出免疫反应必须具有其化学反应基础,血清中的抗体是抗感染免疫的重要因素,即体液免疫学说。1904年 Arrhenius 在研究抗原—抗体反应时提出免疫化学概念。免疫化学研究首先从 Landsteiner 用偶氮蛋白人工抗原研究抗原—抗体反应的特异性问题开始。Haurowitz、Breinl及 Marrack 等在此领域内丰富了研究的成果。Mitchnikoff 所提出的细胞免疫学说认为免疫由体内的吞噬细胞所决定。体液免疫和细胞免疫学说两种理论在当时曾有着不同程度的争论,然而它们只是说明了复杂免疫机制的一面,本身都存在着一定的片面性。

3. 现代免疫学

20世纪60年代,免疫学有了迅速发展,最大的突破是对体内淋巴细胞的种类和功能有了进一步的认识。Glick 发现早期摘除鸡的腔上囊可影响抗体的产生。Miller 在新生期小鼠中进行胸腺摘除实验,发现此种动物不能排除同种异体植皮,证明了胸腺在多数淋巴样组织的发生以及维持免疫应答的完整性上是必需的。Claman, Miller, Mitchell, Davies 等提出了 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞的概念。Good 等对临床上免疫缺陷症病人进行观察,从先天性无胸腺 Di - George 综合征和先天性无丙种球蛋白血症病人中也证实了胸腺的免疫功能和存在两类淋巴细胞。由于这些研究成果,使视机体免疫应答过程为单纯化学反应的片面看法得到了纠正,并转向以生物学观点来看待免疫学。使人们逐渐考虑到免疫应答是机体对“自身”和“异己”的识别与反应的生物学现象。在理论上起着主导作用并导致免疫学能进一步发展的学说,此应归之于 Burnet 所提出的细胞克隆选择学说 (clonal selection theory)。这一学说认为体内事先就存有能识别各种抗原的细胞克隆 (clone),每一细胞表面均有对特定抗原的受体,能与相应抗原结合而识别它们。抗原的作用在于选择与其相应的细胞克隆与其受体结合后,引起细胞的增殖分化,产生免疫应答。此学说对免疫学中的根本问题——自我识别有了比较满意的解释,对免疫学中的其他重要问题,诸如免疫记忆、免疫耐受性、自身免疫性等现象也能做出恰当的说明,故已被多数免疫学家所接受。

二、免疫学检测技术

免疫学在理论和实际应用上的进展和免疫学技术的进展神速、日新月异是分不开的。从免疫学的发展史中,也能看出技术促进学科发展的关系。由于 Leeuwenhoek 对显微镜的完善,才有可能使 Pasteur 在细菌学上、Metchnikoff 在吞噬现象的研究上取得成就。Landsteiner 在免疫学特异性的研究中,其所应用的化学方法起到很大的作用。物理学和物理化学方法的建立对开拓新的研究领域极为重要,如:超速离心沉淀法、液相中电泳法、吸附柱过滤法 (sephadex)、电镜、放射性核素标记法、免疫荧光法、免疫酶标法等,是免疫学在各个研究领域中取得长足进展的保证。此外,免疫学本身亦有其特有的技术,它们在