

健康人、非癌患者及癌患者外周血淋巴细胞 荧光偏振度的测定

董志伟 万文徽 王 傑 李宪周

(北京市肿瘤防治研究所生化室)

刘树森 丰美福

(中国科学院动物研究所细胞室, 北京)

1973年 Cercek 夫妇^[1]提出细胞胞浆结构性(SCM)的概念, 且认为其与胞浆内微粘度的改变有关, 可借荧光偏振技术测定。稍后, Cercek 等^[2]报告, 该项技术可用以识别肿瘤患者外周血淋巴细胞。以二醋酸荧光素(FDA)作为细胞内标记物, 测定外周血淋巴细胞经植物凝血素(PHA)及肿瘤碱性蛋白(CaBP)刺激后的荧光偏振度, 发现癌患者的淋巴细胞与健康人淋巴细胞有明显的不同。健康人淋巴细胞经 PHA 刺激后荧光偏振度下降, 而对 CaBP 的刺激不起反应; 癌患者则反之。之后, Takaku 等^[3]、Kreutzman 等^[4]、及 Pritchard 等^[5]先后报告该试验可用于癌患者的诊断, 而另一些工作者^[6]则认为该试验极不稳定, 难于重复。虽然 Cercek 等^[7]以后的工作中, 曾就技术条件及各种试验参数做了详细说明, 但 Mitchell 等^[8]并未获得理想结果。Balding 等^[9]的工作则认为淋巴细胞反应的差异可能来源于受检者年龄的不同, 以及淋巴细胞制品中粒细胞的污染。因此, SCM 测定能否真正用于癌的诊断仍然是有争议的。

作者在严格控制实验条件的情况下对 29 例健康人, 12 例非癌患者、27 例癌症患者外周血淋巴细胞的 SCM 进行了检测, 并计算在 PHA 及 CaBP 刺激后的比值(RR_{SCM}), 发现除 1 例非癌患者外, 健康人及非癌患者的比值均大于 1, 而 70% 的癌患者的比值小于 1。本文尚对 SCM 测定在癌症诊断中的价值及存在的问题进行了讨论。

材 料 与 方 法

1. 检测对象 健康人 29 例, 为北京市肿瘤研究所及北京医学院第一附属医院的工作人员。其中, 50 岁以下者 19 例(男 12 人, 女 7 人, 平均年龄 28.2 岁)。50 岁以上者 10 例(男 8 人, 女 2 人, 平均年龄 56.7 岁)。非癌患者及癌患者为北京市肿瘤研究所、首都医院、日坛医院的住院及门诊患者, 经病理诊断证实。非癌患者 12 例(男 4 例、女 8 例, 平均年龄 49 岁); 其中, 乳腺良性肿物 1 例, 肝硬化 1 例, 阑尾粘液囊肿 1 例, 十二指肠溃疡 1 例, 萎缩性胃炎 8 例。癌患者 27 例(男 16 例, 女 11 例, 平均年龄 54.5 岁); 其中, 胃癌 16 例, 十二指肠癌 1 例, 结肠癌 2 例, 直肠癌 5 例, 乳癌 2 例, 肝癌 1 例。

2. 淋巴细胞的分离^[10] 肝素化的外周静脉血 10 毫升, 加入经阿拉伯胶处理的羰基铁粉 100 毫克(粒度 2—8 微米, 北京化工厂), 均匀转动 30 分钟, 倾于 20 毫升烧杯内, 置磁铁上 10 分钟。在两个内径为 16 毫米的聚乙烯离心管内, 加入 Ficoll-Hapague 密度梯度分层液(比重 1.081、25℃; 渗透压 320—330 毫渗量) 5 毫升, 将上述肝素血轻轻吸出, 分置于二管内分层液上, 550g 甩离心 20 分钟。收集分层液表面的淋巴细胞层, 以生理盐水洗两次, PBS 洗一次。将细胞悬浮于 PBS 中, 浓度为 6×10^6 细胞/ml。

本实验分离的淋巴细胞纯度大于 95%, 活度大于 98% (苔酚蓝染色), 回收率约 40%。采

血时抗凝完全,精确配制密度梯度分层液以及严格控制离心条件,是获得满意结果的重要保证。

3. 淋巴细胞经 PHA 及 CaBP 激活 将淋巴细胞悬液分装于 6 个试管中,每管 0.1 毫升。在两试管中,分别加入 1:10 稀释的 PHA10 微升;在另两个试管中,分别加入 CaBP (由胃癌以 Dickinson^[11,12] 法提取) 10 微升 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$); 两个对照管不加任何刺激原。各管均于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中保温 1 小时。

4. 荧光偏振度的测定^[7] 在保温后的各试管及对照管中,加入 $2.5 \times 10^{-6}\text{M}$ FDA 溶液 1.0 毫升。(25 $^{\circ}\text{C}$ 水浴预温 5 分钟)混匀后,迅速注入微量杯中,(容积 1.0 毫升)并置于装有偏振附件及 25 $^{\circ}\text{C}$ 恒温支架的荧光分光光度计中进行测定。测量条件为:灯电流 24 安培,激发光波长 470nm,激发光狭缝 19nm,荧光波长 510 nm,荧光狭缝 7.5nm,光电倍增管负高压 840 伏(自动调节),记录仪灵敏度 100 或 200 毫伏。淋巴细胞悬液与 FDA 接触 1 分钟后开启记录仪,进行扫描(见图 1)。扫描持续 6 分钟,起偏振片位于垂直位置,检偏振片位置每 30 秒改变一次。如图所见,A 至 B 是检偏振片平行于起偏振片时,随着时间的推移记录下的荧光偏振光强度;B 至 C 是改变检偏振片方向,使其垂直于起偏振片的过程;C 至 D 则是检偏振片与起偏振片相互垂直时记录下的荧光偏振光强度。检偏振片方向的变化由自制传动杠杆在样

品室外控制。扫描到 6 分钟时,取出微量杯,将其样品在改装的抽滤装置上进行过滤,抽滤负压为 400 毫米汞柱并将过滤开始及停止的时间标记于记录图上。用 0.2 微米的微孔滤膜。测量滤液的荧光偏振光强度。 $I_{\parallel}(F)$ 表示检偏振片与起偏振片平行时的滤液荧光偏振光强度, $I_{\perp}(F)$ 表示检偏振片与起偏振片垂直时的滤液荧光偏振光强度。样品均做双份测定,其误差应小于 5%。严格控制测量条件及抽滤压力,方能获得较好的重复性。

5. 结果处理及计算 在扫描记录图上,将扫描所得的两条间断线分别外推至过滤时间(过滤开始及终止的中点),即得 $I_{\parallel}(T)$ 及 $I_{\perp}(T)$ 。前者表示起偏振片与检偏振片相平行时细胞内外荧光偏振光的总强度,后者表示起偏振片与检偏振片相垂直时细胞内外荧光偏振光的总强度。据此 $I_{\parallel} = I_{\parallel}(T) - I_{\parallel}(F)$, $I_{\perp} = I_{\perp}(T) - I_{\perp}(F)$ 。 $I_{\parallel}$ 与 $I_{\perp}$ 分别表示检偏振片与起偏振片平行及垂直时,细胞内荧光偏振光的强度。

根据公式 $P = \frac{I_{\parallel} - GI_{\perp}}{I_{\parallel} + GI_{\perp}}$ 即可计算出偏

振度(P)。式中 G 为仪器校正因子,本实验条件下 G 的实测值为 0.63。为比较不同个体淋巴细胞对 PHA 及 CaBP 反应的差异,引入反应比值 RR_{SCM} 。 $RR_{SCM} = \frac{P_{CaBP}}{P_{PHA}}$, 式中 P_{PHA} 及 P_{CaBP} 分别表示淋巴细胞经 PHA 及 CaBP 刺激后的荧光偏振度。

结 果

1. 健康人淋巴细胞荧光偏振度的测定 29 例健康人的 P 、 P_{PHA} 及 P_{CaBP} 见表 1。经 PHA 刺激后,27 例 P 值下降,1 例 P 值上升,1 例 P 值不变(变化小于或等于 5%)。经 CaBP 刺激后,17 例 P 值不变,8 例下降,4 例上升。29 例健康人的 RR_{SCM} 值均大于 1。其范围为 1.032—1.415,平均为 1.147。

2. 非癌患者淋巴细胞荧光偏振度的测定 12 例非癌患者的 P 、 P_{PHA} 、 P_{CaBP} 见表 2。经 PHA

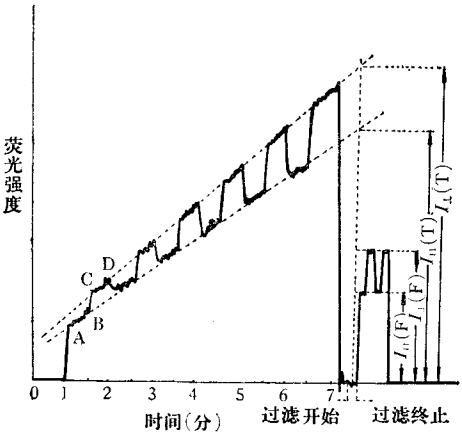


图 1 淋巴细胞 SCM 测定扫描记录

表 1 健康人外周血淋巴细胞经 PHA 及 CaBP 刺激后 P 值的改变

P		P _{PHA}		P _{CaBP}	
范围	M±S.D*	范围	M±S.D.	范围	M±S.D.
0.156—0.291	0.184±0.027	0.120—0.188	0.154±0.015**	0.160—0.193	0.175±0.011***

* 均数±标准差
** t 测验, P_{PHA} 与 P 相比, P<0.01
*** t 测验, P_{CaBP} 与 P 相比, P>0.1

刺激后, 8 例 P 值下降, 4 例无变化。经 CaBP 刺激后, 4 例 P 值不变, 4 例下降, 4 例上升, 除 1 例外, 其余非癌患者的 RR_{SCM} 值均大于 1。其范围为 0.944—1.520, 平均 1.120。

表 2 非癌患者外周血淋巴细胞经 PHA 及 CaBP 刺激后 P 值的改变

P		P _{PHA}		P _{CaBP}	
范围	M±S.D*	范围	M±S.D.	范围	M±S.D.
0.151—0.200	0.169±0.014	0.125—0.166	0.150±0.013**	0.144—0.197	0.167±0.016***

* 均数±标准差
** t 测验, P_{PHA} 与 P 相比, P<0.01
*** t 测验, P_{CaBP} 与 P 相比, P>0.1

表 3 癌患者外周血淋巴细胞经 PHA 及 CaBP 刺激后 P 值的改变

P		P _{PHA}		P _{CaBP}	
范围	M±S.D*	范围	M±S.D.	范围	M±S.D.
0.131—0.230	0.173±0.022	0.141—0.281	0.178±0.033**	0.116—0.257	0.165±0.034***

* 均数±标准差
** t 测验 P_{PHA} 与 P 相比, P>0.1
*** t 测验 P_{CaBP} 与 P 相比, P>0.1

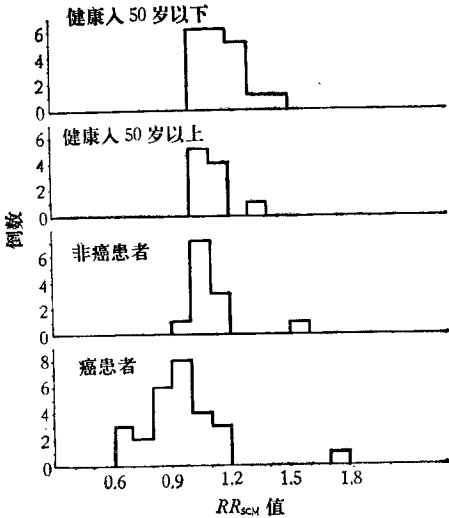


图 2 健康人、非癌患者及癌患者淋巴细胞 RR_{SCM} 值的分布

表 4 健康人、非癌患者、癌患者淋巴细胞荧光偏振度与 RR_{SCM} 值的比较

组 别		例 数	平均年龄	P	P _{PHA}	P _{CaBP}	RR _{SCM} *
健康人	<50岁	19	28.2	0.189±0.031	0.155±0.016	0.177±0.011	1.155±0.105
	>50岁	10	56.7	0.174±0.016	0.154±0.014	0.170±0.008	1.131±0.081
非癌患者		12	49.0	0.169±0.014	0.150±0.013	0.167±0.016	1.120±0.143
癌 患 者		27	54.5	0.173±0.022	0.178±0.033	0.165±0.034	0.944±0.204

* t 测验, 健康人与非癌患者之 RR_{SCM} 相比, P>0.10, 健康人与癌患者之 RR_{SCM} 相比, P<0.001; 非癌患者与癌患者之 RR_{SCM} 相比, P<0.02。

3. 癌患者淋巴细胞荧光偏振度的测定 27 例癌患者的 P、P_{PHA}、P_{CaBP} 见表 3。经 PHA 刺激后, 10 例 P 值不变, 8 例下降, 9 例上升。经 CaBP 刺激后, 12 例 P 值不变, 12 例下降, 3 例上升。27 例癌患者中, 19 例的 RR_{SCM} 值小于 1。其范围为 0.682—1.713, 平均为 0.944。

4. 健康人、非癌患者、癌患者淋巴细胞荧光

偏振度及 RR_{SCM} 值的比较 由表 4 可见, 健康人(大于 50 岁组及小于 50 岁组)及非癌患者经 PHA 刺激后, 其外周血淋巴细胞的荧光偏振度平均下降 11—18%, 而癌患者无大变化。经 CaBP 刺激后, P 值的改变均无显著性差异。健康人及非癌患者 RR_{SCM} 的均值均大于 1.00, 而癌患者的 RR_{SCM} 值小于 1.00, 其分布见图 2。

讨 论

本文报告的 29 例健康人及 12 例非癌患者中,经 PHA 刺激后 P 值下降的 35 例 (85%)。 P 值平均下降 11—18%,有显著性差异。经 CaBP 刺激后, P 值变化不明显。经 PHA 刺激后,50 岁以下健康人组 P 值的下降虽较 50 岁以上健康人组明显,但经统计学处理,并无显著性差异。这与 Balding 等^[9] 报告关于 P 值的改变与受检者的年龄有关的结论不同。除 1 例外, RR_{SCM} 值均大于 1,与 Cercek 等^[2] 的结果颇近似。在检测的 27 例癌患者中,经 PHA 刺激后 8 例 P 值下降 (约 30%),平均值无大变化。经 CaBP 刺激后,12 例下降 (44%),平均值亦无明显下降。27 例中,19 例的 RR_{SCM} 值小于 1 (70%)。如以 $RR_{SCM} = 1.00$ 为癌与非癌的分界点,则 41 例健康人及非癌患者中,符合率为 98%,1 例为假阳性。27 例癌患者中,符合率为 70%,8 例为假阴性。尽管这一结果显示 SCM 试验对癌的诊断有一定辅助意义,但如考虑到采血量大、设备昂贵,方法复杂等问题,则 SCM 试验在改进以前尚无临床实际应用的可能。

表 5 列出国外一些实验室采用外周血淋巴细胞 SCM 测定法诊断癌症的结果。其中以 Cercek 及 Takaku 等所报告的结果最为理想,尤其值得注意的是,对早期癌的诊断亦同样有效。Pritchard 及 Mitchell 等的结果则不理想。本文的结果似乎介于二者之间。在不同实验室,SCM 测定结果不同的主要原因,可能是实验条件及方法的差异。 $\phi rjasaeter$ ^[13] 等报告,在 SCM 测定中起反应的淋巴细胞为 T 细胞,以分离的 T 细胞制品获得满意结果。Cercek 等亦指出以比重为 1.081 的密度分层液所分离的淋巴细胞是富含 T 细胞的,但显然以密度梯度离心法分离 T 细胞并不是理想和稳定的方法。不少作者指出,密度梯度离心过程中可得到双层白细胞,上层细胞富含 SCM 反应细胞。但我们在多次操作中很少发现这种情况。Balding 等^[9] 还认为 P 值的改变与粒细胞的污染有关。在我们分离

表 5 国外若干实验室外周血淋巴细胞 SCM 测定的结果

作 者	分 组	反应例数/ 总例数	P_{PHA}	P_{CaBP}	RR_{SCM}
CerCek et al. 1977 ^[1]	健康人	266/270	↓	—	>1
	非癌患者	30/30	↓	—	>1
	癌患者	269/272	—	↓	<1
Takaku et al. 1977 ^[3]	健康人	15/15	↓	—	>1
	非癌患者	12/12	↓	—	>1
	胃癌患者	33/33	—	↓	<1
Kreutzman et al. 1978 ^[4]	健康人	32/32	↓		<1
	非癌患者	16/18	↓		
	癌患者	19/20	—		
Pritchard et al. 1978 ^[12]	健康人	37/40	↓	—	>1
	癌患者	39/80	—	↓	<1
Mitchell et al. 1980 ^[8]	健康人	9/15			>1
	癌患者	12/17			<1

“↓”: 下降 “—”: 不变

的淋巴细胞中,粒细胞污染鲜有超过 2—3% 者,似不足影响 P 值的改变。但无论如何,采取更理想的方法分离淋巴细胞中 SCM 反应细胞群是改进这一测定的首要问题。其次各实验室采用的肿瘤刺激原—CaBP 的提取方法虽然相同,而材料来源各异,又缺乏统一的鉴定标准,因而很可能导致结果的不同。本实验室所采用的 CaBP,来源于数个胃癌标本的混合组织,经巨噬细胞移动抑制试验证明其生物学活性良好。但用于 SCM 检测结果并不理想。癌症患者外周血淋巴细胞经 CaBP 刺激后其 P 值并无明显下降。这是造成癌症患者组 RR_{SCM} 值偏高的主要原因。因此,制备性质明确、鉴定标准统一的肿瘤刺激原是改进 SCM 检测的另一个关键问题。

有关 SCM 反应的机理所知仍然甚少^[14] 它可能涉及胞浆内各种大分子物质、水、离子、ATP、cAMP 等的相互作用以及各亚细胞结构的物化状态;这方面进一步的工作或可为 SCM 测定提供必要的理论基础。

参 考 文 献

- [1] Cercek, L. et al.: *Biophysik*, **10**, 187, 1973.
[2] Cercek, L. et al.: *Brit. J. Cancer*, **33**, 359, 1976.
[3] Takaku, F. et al.: *Brit. J. Cancer*, **36**, 810, 1977.
[4] Kreutzman, H. et al.: *Brit. J. Cancer*, **37**, 797, 1978.
[5] Pritchard, J. A. V. et al.: *Brit. J. Cancer*, **38**, 339, 1978.
[6] Bagshawe, K. D. et al.: *Brit. J. Cancer*, **35**, 701, 1977.
[7] Cercek, L. et al.: *Europ. J. Cancer*, **13**, 903, 1977.
[8] Mitchell, H. et al.: *Brit. J. Cancer*, **41**, 772, 1980.
[9] Balding, P. et al.: *Brit. J. Cancer*, **41**, 73, 1980.
[10] 丰美福等:《细胞生物学杂志》, 1980年, 第3期, 第30页。
[11] Dickison, J. P. et al.: *Brit. J. Cancer*, **27**, 99, 1973.
[12] Dickison, J. P. et al.: *Brit. J. Cancer*, **28**, Suppl. 1, 224, 1973.
[13] Ørjasæter, H. et al.: *Brit. J. Cancer*, **40**, 628, 1979.
[14] 董志伟等:《生物科学参考资料》, 11, 97, 1978.

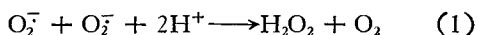
[本文于1982年6月17日收到]

超氧化物歧化酶的辐射失活与自由基作用关系的研究*

李益新 方允中 刘智峰

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京)

超氧化物自由基 O_2^- , 是生物体内有氧代谢的产物, 也是有氧条件下, 电离辐射与生物体作用所产生的活性自由基之一, 它是造成氧的毒性和对辐射损伤增强作用的主要原因。1969年, McCord 和 Fridovich^[1] 从牛红细胞中发现了超氧化物歧化酶 (E. C. 1. 15. 1. 1), 简称 SOD, 该酶能够催化超氧化物自由基的歧化反应:



所以 SOD 具有清除 O_2^- 自由基的能力, 从而在防御氧的毒性, 抗辐射损伤以及预防衰老等方面起着重要作用。近十几年来, 对 SOD 的作用机制、结构与功能的关系, 生物学意义和临床应用等方面的研究, 越来越受到生物物理学家, 生物化学家, 放射生物学和放射医学工作者的重视。

SOD 亦是生物大分子, 在离体照射条件下, 同样会受到辐射作用而发生活性下降、理化性质与结构的改变^[2]。研究 SOD 的辐射失活效应, 自由基与 SOD 的作用关系, 以及自由基清除剂对 SOD 辐射失活的保护, 具有理论上和实用上的意义, 同时也是研究酶的结构与功能的一种手段, 迄今尚未见有关这方面的报道。

在本研究中, 我们所用超氧化物歧化酶活力测定的新方法——化学发光法^[3]。具有灵敏度高, 特异性较强, 分析快速, 用样品量少等优点, 更重要的是, 化学发光法是直接根据自由基反应发光的原理建立的^[4]。应用化学发光法研究 SOD 与自由基作用关系, 已取得较为满意的结果。

材 料 和 方 法

铜锌超氧化物歧化酶根据 McCord 和 Fridovich^[1] 的方法从牛血中提取并纯化, 制得冰冻干燥固体粉末, 经酶学方法和理化性质鉴定为匀一性纯酶, 比活力为 3,000 活力单位/毫克蛋白。实验中用 pH 7.8, 0.05M 磷酸钾缓冲液(含 0.1mM EDTA)溶解成不同浓度, 其实际浓度根据 $O. D_{258}$ 值, 按该波长处的毫克分子消光系数 $\epsilon_{1cm}^{mM} = 10.3^{[5]}$ 计算。

黄嘌呤氧化酶, 根据 Massey^[6] 法从牛奶中制备得粗品, 活性略低于 Sigma 公司产品, 贮存于 60% 饱和度的硫酸铵溶液中。用前摇匀, 吸取乳浊液, 以每分钟 4,000 转离心 10 分钟, 弃

* 本文曾在 1982 年全国放射生物学与放射病临床、实验治疗专题会上宣读。