

人绒毛膜促性腺激素 (HCG) 的放射免疫测定法

上海实验生物研究所
上海第一医学院华山医院同位素室

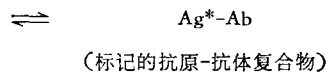
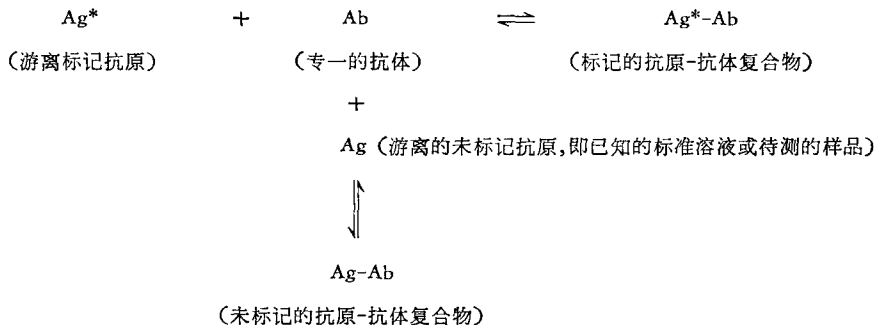
六十年代初期,出现了利用同位素技术和免疫反应以测定痕量蛋白质激素的一种新方法,这就是放射免疫测定法。大家知道,在这以前,要测定蛋白质激素的活力或效价,唯一的方法只有通过生物检定:选择相当数量的某种动物,注射一定剂量的某一蛋白质激素,看它对动物靶器官的效应怎样?比方说,测定促滤泡激素(FSH),可用未成年雌大鼠的子宫或卵巢重量变化为指标,同时再跟普遍采用的一种FSH制剂作比较,通过生物统计方法来计算其活力或效价。显然,生物检定有它本身的弱点:需要一定数量的动物;操作繁琐;动物存在个体差异;灵敏度低,因此要采集一定量的生物样品,并进行化学提取以去除干扰物质。放射免疫测定与生物检定比起来,有突出的优点:灵敏度高(可测量值为 10^{-12} — 10^{-9} 克的水平),专一性强,精确度高。这一方法为蛋白质激素的定量研究开辟了一条技术途径。十多年来,放射免疫测定已逐步发展成一门独立的方法学学科,从早期只能测定蛋白质激素,到现在已扩大应用到非激素的重要生理物质;并从免疫系统扩展到非免疫系统。截至目前为止,已经建立的放射免疫测定法,可以用来测定不下六十种激素和非激素。例如,蛋白质和多肽激素类有胰岛素、生长激

素、促甲状腺激素、人绒毛膜促性腺激素、催产素等,甾体激素类有雌激素、雄激素、肾上腺皮质激素等,以及重要的生理活性物质像维生素、叶酸、环化腺一磷等。

由于放射免疫测定技术的广泛应用,已为激素和许多重要生理活性物质的作用机制、生理效应及代谢方式,积累了大量资料;这不仅使一些长期以来悬而未决的生物学问题,得到了解释和阐明,而且也为临床医学上的一些疑难病症,提供了早期诊断、治疗和预后的重要线索。例如,促胃液素(gastrin)的含量变化,可以作为鉴别诊断 Zollinger-Ellison 综合症的可靠依据;测定甲种胎儿蛋白的量,对早期诊断原发性肝癌有帮助;用放射免疫法测定人绒毛膜促性腺激素,对妊娠的早期诊断和绒毛膜上皮癌的早期诊断、治疗措施及预后,都有一定的价值。无疑,今后医学发展的趋势将从疾病的诊断和治疗,走向疾病的早期预测和防止,因此放射免疫测定技术就成为一种有效的工具。随着这一技术的进一步发展,它在生物学理论研究和临床医学实践中的应用,将有更加广阔的前景。

一、放射免疫测定法的基本原理

放射免疫测定法的基本原理,可用下式表示:



在上述反应系统中,当 Ag^* 和 Ab 的量保持恒定时,则 Ag^*-Ab 复合物的形成量与 Ag 的含量多少呈相反的关系。因为 Ag 含量高,则 Ag 对专一抗体 Ab 结合位置的竞争能力强, $\text{Ag}-\text{Ab}$ 复合物就增多,使 Ag^*-Ab 复合物的形成量相对减少;反之, Ag 的含量低,则 Ag 对专一抗体 Ab 结合位置的竞争能力弱, $\text{Ag}-\text{Ab}$

复合物就减少,使 Ag^*-Ab 复合物相对增多。也就是说, Ag^*-Ab 复合物的形成量与 Ag 的含量呈一定的函数关系。因此,用各种已知浓度的标准物质,与一定量的同位素标记的标准物质及一定量的专一抗体作用,即可测得在各种浓度该物质的标记抗原抗体复合物的结合率,绘成曲线,称为竞争性抑制标准曲线。只

要将被测物质的结合率与“标准曲线”相比较,即可求得该物质的含量。

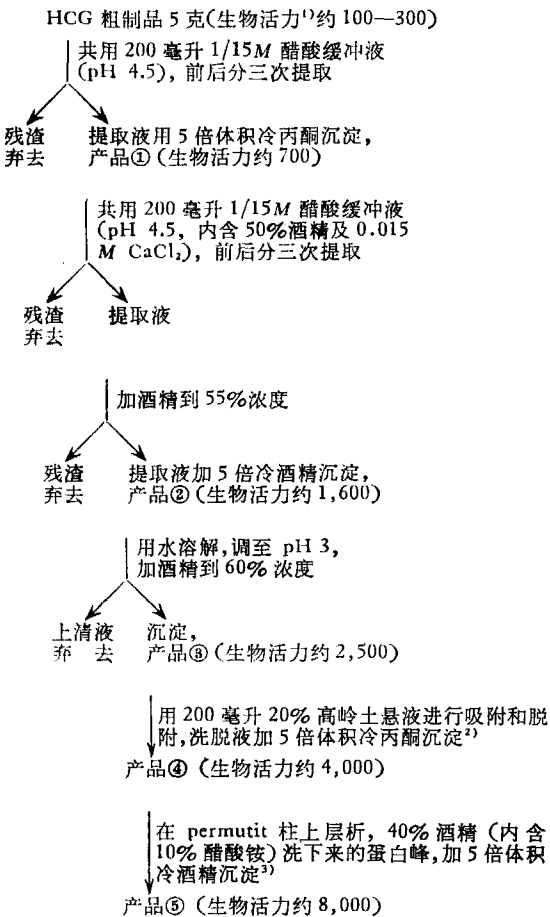
根据上述原理,要建立人绒毛膜促性腺激素(HCG)的放射免疫测定法,必须具备的条件是:(1)制备专一的亲和力强、高效价的抗HCG血清;(2)制备高纯度的HCG,作标记放射性同位素(^{131}I 或 ^{125}I)之用;(3)制备高比放射性且具免疫活性的碘化HCG;(4)免疫反应完成后,需能很好地分开游离的抗原和结合的抗原抗体复合物;(5)选择一种高纯度的HCG作标准品,绘出标准曲线。

二、HCG的提纯及兔抗HCG

血清的制备

1. HCG的提纯

抗原提纯是放射免疫测定的一个重要环节,为了提高放射免疫测定的灵敏度和专一性,一定要用高纯度的抗原进行碘化和做标准品。提取高纯度的HCG,我们采用Got, B. (1960)的方法,原料是宁波水产养殖场生产的HCG粗制品,在 5°C 下进行操作,详细步骤如下。



2. 兔抗HCG血清的制备

一般说,用来制备抗血清的蛋白质抗原,如果是从天然物质提取的,高纯度并不是很重要的;因为高纯度的蛋白质比较不稳定,而且混有变性物质的可能性大,因此宁可用纯度较差的蛋白质免疫。我们用的是HCG高岭土产品 $^{4)}$ 2毫克,溶于0.5毫升生理盐水,加福氏(Freund)完全佐剂0.5毫升,制成1毫升乳剂,免疫体重2.5公斤的雄兔。每隔两周,在兔颈背部皮下注射一次,连续注射四次;末次注射后十天左右,即可自家兔耳中央动脉抽血,制成抗血清,内含0.01%的硫柳汞作防腐剂,在低温(-14°C)冰箱保存备用。为维持家兔的免疫状态,每隔一月重复注射一次。

三、兔 γ -球蛋白的提纯及绵羊

抗兔 γ -球蛋白血清的制备

很好地分开游离的抗原和结合的抗原抗体复合物,是放射免疫测定中的一个重要问题;实际上,有多种多样的分离方法,各有优缺点。我们采用的是比较常用的“第二抗体法”,即用兔血清提取 γ -球蛋白作抗原,免疫绵羊,产生绵羊抗兔 γ -球蛋白血清(又称为第二抗体),它能将结合的抗原抗体复合物沉淀下来,从而把留在上清液的游离抗原分开。

1. 兔 γ -球蛋白的提纯

在 5°C 下进行操作,步骤如下:

兔血清+3倍体积蒸馏水

加0.05M醋酸(或0.05M Na_2HPO_4)
将pH调到7.6—7.7

一边搅拌,一边逐滴加入50%冷酒精,至最后浓度为20%,过夜,离心

沉淀物,干燥,为 γ -球蛋白粗制品

- 1) 国际单位/毫克,下同;
- 2) 将高岭土先用浮选法漂去细颗粒后,用1N HCl进行活化处理,再用蒸馏水洗到pH4左右,最后以1/15M醋酸缓冲液(pH 4.5)配成20%高岭土悬液;产品 $^{3)}$ 溶于其中,调pH到4.5,在电磁搅拌下吸附一小时左右;吸附完毕后离心,弃去清液,将沉淀共用120毫升1N NH_4OH 洗脱两次,每次在电磁搅拌下进行一小时,再离心分开,合并两次洗脱液,调pH到中性左右,加5倍冷丙酮沉淀,即得产品 $^{4)}$;
- 3) permutit为阳离子交换树脂,取60—100目的颗粒,其处理及再生法是:先以1N NaOH洗,用水洗,然后用0.25N CH_3COOH 洗,再重新用水洗,最后以0.05N, pH5.4的醋酸缓冲液洗。取处理好的permutit颗粒,装入 2.8×30 (厘米)的层析柱,然后将产品 $^{4)}$ 约250毫克,溶于少量0.05N, pH5.4的醋酸缓冲液上柱;用自动部分收集器进行收集,每管10毫升,速度为10毫升/10分钟。用紫外分光光度计280毫微米波长的光密度来测定蛋白质浓度。用0.05N, pH5.4的醋酸缓冲液洗下的一个峰,这是不要的部分。再用40%酒精(内含10%醋酸铵)洗,又洗下一个峰,这是含HCG活力的部分,用5倍体积冷酒精沉淀,即得产品 $^{5)}$

将以上获得的 γ -球蛋白粗制品,再通过 DEAE-纤维素的层析柱进行纯化。DEAE-纤维素为阴离子交换树脂,它的处理及再生法是:先以 2N NaCl 洗,用水洗,然后以 0.5N NaOH 洗,再重新用水洗,最后用 0.0175M, pH6.3 的磷酸缓冲液洗。

取处理好的 DEAE-纤维素,装入 2.2×35 (厘米)的层析柱,然后将上述 γ -球蛋白粗制品约 300 毫克,溶于少量 0.0175M, pH6.3 的磷酸缓冲液上柱;用自动部分收集器进行收集,每管 10 毫升,速度 10 毫升/10 分钟。用紫外分光光度计 280 毫微米波长的光密度来测定蛋白质浓度。 γ -球蛋白直接洗脱下来,而其他的血清蛋白则吸附在层析柱上。

2. 绵羊抗兔 γ -球蛋白血清的制备

用提纯的兔 γ -球蛋白 50—70 毫克,溶于 3 毫升生理盐水,加福氏完全佐剂 3 毫升,制成 6 毫升乳剂,免疫一周岁的雄绵羊。在羊颈背部皮下,一次分两点注射。每隔两周,按照上述剂量和方法,重复注射一次;共注射四次。末次注射后十天左右,即可自颈静脉采血,制成抗血清,内含 0.01% 的硫柳汞作防腐剂,在低温(-14℃)冰箱保存备用。为维持绵羊的免疫状态,每隔 1—2 月重复注射一次。一般根据琼脂扩散法测定,其抗血清效价可达 1:320。

四、 ^{125}I -HCG 的制备、分离和鉴定

HCG 是一种蛋白质,含有 C 和 H 结构的化合物,有利于同位素 ^{14}C 或 ^3H 的标记,但它们的放射性比强弱,早被比强高的 ^{131}I 或 ^{125}I 所取代。因为 ^{125}I 比 ^{131}I 有下列优点:半衰期长,碘丰度大,计数效率高,所以又多采用 ^{125}I 来标记。

1. 供标记试剂的配制

$\text{Na-}^{125}\text{I}$: 20 毫居里/毫升,无载体,每毫升约含还原剂硫代硫酸钠 1 毫克。

HCG: 即上述通过 permutit 层析柱的产品⑥,生物活力约 8,000 国际单位/毫克,未经透析,按 Lowry, D. H. 等 (1951) 的方法估计,蛋白含量约占总量的 77%。经放射免疫法测定,每毫克 HCG 相当于国际第二次 HCG 标准品 10,101 个国际单位。

0.5M 磷酸缓冲液 (pH7.5), 作为 HCG 的稀释液。

0.05M 磷酸缓冲液 (pH7.5), 作为稀释液及葡聚糖 G-25 凝胶过滤用的洗脱液。

以下四种溶液,也用 0.05M 磷酸缓冲液 (pH7.5) 配制:

1% 碘化钾溶液,作为载体。

1% 及 5% 牛血清清蛋白液 (简称 BSA 液)。

0.8% 氯胺 T 液,临用前新配。

0.48% 偏焦亚硫酸钠液,临用前新配。

2. 供测定试剂的配制

等渗磷酸缓冲液 (简称 PBS): 为含 0.15M

NaCl 的 0.01M 磷酸缓冲液 (pH7.0)。

0.1M EDTA-PBS 液: 以 PBS 作稀释液,其作用为螯合血清中的钙离子,并减少血清中补体的干扰。

1% 正常兔血清 (简称 NRS)-PBS 液: 其作用为增加第二抗体反应的沉淀量,减少反应管对标记蛋白的非专一吸附,从而提高本方法的灵敏度和正确性。

3. ^{125}I -HCG 的制备和分离

根据常用的微量蛋白标记法,稍加修改。其反应原理为利用氯胺 T 将 $\text{Na-}^{125}\text{I}$ 氧化为 $^{125}\text{I}_2$ 等的复合物, $^{125}\text{I}_2$ 和 HCG 中的酪氨酸残基起碘化反应,过量的 $^{125}\text{I}_2$ 再用偏焦亚硫酸钠还原为 ^{125}I 化物。以葡聚糖 G-25 凝胶过滤来分离 ^{125}I -HCG 和游离的 ^{125}I 化物。

进行凝胶过滤之前,分别以 5% 和 1% BSA 液饱和葡聚糖凝胶柱和收集管,以防止 ^{125}I -HCG 在柱上和收集管上的吸附。

在盛有 0.1 毫升 2 毫居 $\text{Na-}^{125}\text{I}$ 的反应管中,加入 0.025 毫升含有 5 微克的 HCG 溶液 (用 0.5M, pH7.5 的磷酸缓冲液配制),充分摇匀,再用微量注射器加入 0.05 毫升新配制的 0.8% 氯胺 T 液,用盖塞紧,待反应管内作用时间持续 4 分钟后,立即加入 0.1 毫升 0.48% 偏焦亚硫酸钠液,以结束碘化反应。

碘化反应结束后,以载体 (1% KI 液) 稀释标记反应液至 0.4 毫升,用滴管吸出,转移到事先经 0.05M, pH7.5 的磷酸缓冲液平衡过的粗颗粒葡聚糖 G-25 凝胶柱 [1×14 (厘米)] 上,再以 0.4 毫升 1% KI 液洗涤残留在反应管中的标记物,追加上柱。等到总量为 0.8 毫升的标记反应液完全进入柱后,就开始用 0.05M, pH7.5 的磷酸缓冲液洗脱,按每分钟一管,每管 0.5 毫升的速度收集。

收集完毕后,在距井型闪烁计数器固定的空间位置上进行计数,由此得到两个放射性高峰:第 8—15 管为 ^{125}I -HCG 峰,第 16—50 管为 $\text{Na-}^{125}\text{I}$ 峰 (图 1)。

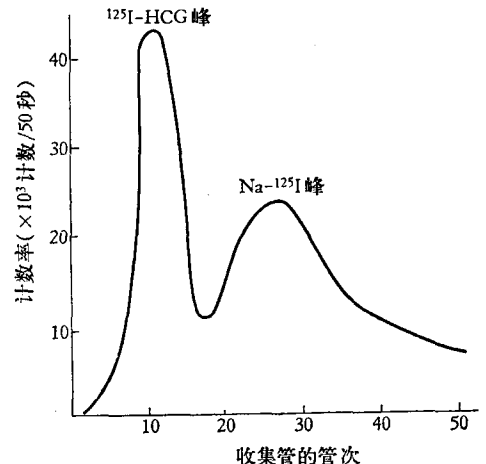


图 1 标记的 ^{125}I -HCG 和游离的 $\text{Na-}^{125}\text{I}$ 经葡聚糖 G-25 凝胶过滤后的分离

4. ^{125}I 的利用率、 ^{125}I -HCG 标记率及 ^{125}I -HCG 比放射性的计算法

$$\text{利用率}(\%) = \frac{{}^{125}\text{I} \text{ 投料总脉冲数} - (\text{盐峰总脉冲数} + \text{标记反应管、滴管、柱中残留物总脉冲数})}{{}^{125}\text{I} \text{ 投料总脉冲数}} \times 100\% = \frac{{}^{125}\text{I}\text{-HCG峰总脉冲数}}{{}^{125}\text{I} \text{ 投料总脉冲数}} \times 100\%$$

$$\text{标记率}(\%) = \frac{{}^{125}\text{I}\text{-HCG峰总脉冲数}}{{}^{125}\text{I}\text{-HCG峰总脉冲数} + \text{盐峰总脉冲数}} \times 100\%$$

$${}^{125}\text{I} \text{ HCG 比放射性}(\text{微居里/微克}) = \frac{{}^{125}\text{I} \text{ 投料总微居里数} \times \text{利用率}}{\text{HCG 投料总微克数} \times \text{T 值} \times \text{K 值}}$$

$$\text{T 值} = \frac{{}^{125}\text{I} \text{ 投料总脉冲数} - \text{标记反应管、滴管中标记残留物的总脉冲数}}{{}^{125}\text{I} \text{ 投料总脉冲数}}$$

$$\text{K 值} = \frac{\text{上柱后收集的}^{125}\text{I}\text{-HCG 总脉冲数}}{\text{上柱前的}^{125}\text{I}\text{-HCG 总脉冲数}}$$

为了测定葡聚糖 G-25 [1 × 14 (厘米)] 柱的 K 值, 我们用纯化的 ^{125}I -HCG 通过柱, 分别测得通过柱前、后 ^{125}I -HCG 的放射性计数, 两者的比值即为 K 值。在常规标记条件下, 粗颗粒葡聚糖 G-25 [1 × 14 (厘米)] 柱的平均 K 值为 0.947。

按本法制备的 ^{125}I -HCG, 比放射性为 54—125 微居里/微克, ^{125}I 的利用率为 14—29%, ^{125}I -HCG 的标记率为 16—31%。

5. ^{125}I -HCG 的再纯化

提纯的 ^{125}I -HCG 液, 用 0.1% BSA-PBS 液作 1:10 的稀释, 称为工作母液, 在 4℃ 冰箱中保存备用。每隔两周, 要将 ^{125}I -HCG 再纯化一次, 即通过葡聚糖 G-50 [1 × 14 (厘米)] 柱的凝胶过滤, 除去脱落的游离 ^{125}I , 以提高本方法的精确度。随着 ^{125}I -HCG 母液保存时间的延长, 从 ^{125}I -HCG 上脱落的游离 ^{125}I 量亦逐渐有所增加。

五、标准曲线的建立和样品的测定

1. 抗 HCG 血清的选择

对于放射免疫测定法的专一性、灵敏度和精确度来说, 抗 HCG 血清的品质占有显著地位。抗 HCG 血清中的专一抗体及其对抗原亲和力的大小, 随免疫动物的个体而异, 甚至同一个体的抗 HCG 血清, 也随免疫次数和时间而有所不同。因此应仔细挑选最适用的抗血清。我们鉴定了 10 只免疫家兔抗 HCG 血清的品质, 其中有 3 只达到了适用标准。

2. 抗 HCG 血清最适稀释度的测定

在理论上, 以最简单的双分子反应作为模式, 用数学推导的方法, 证明当适量抗体与微量标记抗原反应后, 结合的标记抗原抗体复合物的放射性量 B 与游离标记抗原的放射性量 F 之比值, 即 B/F 为 0.5 时, 标准曲线的斜率变化最大, 灵敏度最高。实际上, B/F 值在 0.5—1 范围内, 标准曲线的斜率变化均较显著。图 2 是 12 号免疫家兔抗 HCG 血清稀释度的滴定曲线。在总反应液中最适稀释度为 1:200,000, 其 B/F 值为 0.5 左右, 因此选它为最适稀释度。

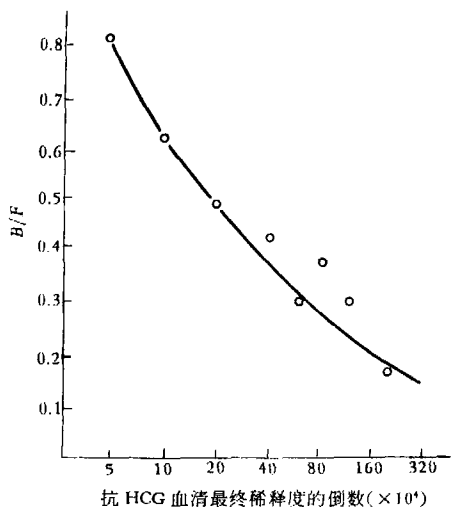


图 2 12 号家兔抗 HCG 血清的稀释度和 B/F 值的关系曲线

当稀释度为 1:200,000 时, B/F = 0.5, 灵敏度最高; 总反应液量为 1 毫升, 其中 ^{125}I -HCG 100 微升, 接近 10,000 计数/100 秒, 抗 HCG 血清为 100 微升

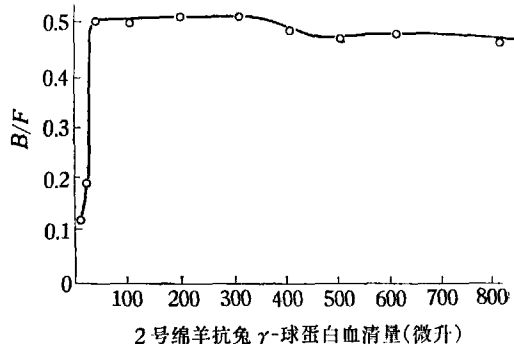


图 3 绵羊抗 γ-球蛋白血清量和 B/F 值的关系
总反应液量 1 毫升; 其中 12 号兔抗 HCG 血清 100 微升 (1:20,000), ^{125}I -HCG 100 微升, 接近 10,000 计数/100 秒, 1:250 NRS (最终稀释度)

表 1 HCG 放射免疫测定常规用表

组别	管号	0.1M EDTA-PBS (微升)	1% NRS-PBS (微升)	PBS (微升)	HCG 标准品 100毫微克/毫升(微升)	样 品			12号兔抗 HCG 血清 1:20,000 (微升)	¹²⁵ I-HCG 约10,000计数/100秒 (微升)	4°C	绵羊抗兔γ-球蛋白血清 (微升)	4°C	结 果			
						检号	稀 释 度	容 量 (微升)						B+F	B	B/F	
标 准 曲 线 组	1	100	400	100	200				100	100	温 育 三 天	100	温 育 一 天				
	2	100	400	100	200				100	100				100			
	3	100	400	200	100				100	100				100			
	4	100	400	200	100				100	100				100			
	5	100	400	250	50				100	100				100			
	6	100	400	250	50				100	100				100			
	7	100	400	265	35				100	100				100			
	8	100	400	265	35				100	100				100			
	9	100	400	275	25				100	100				100			
	10	100	400	275	25				100	100				100			
	11	100	400	285	15				100	100				100			
	12	100	400	285	15				100	100				100			
	13	100	400	292.5	7.5				100	100				100			
	14	100	400	292.5	7.5				100	100				100			
	15	100	400	300	0				100	100				100			
	16	100	400	300	0				100	100				100			
	17	100	400	400	0				0	100				100			
	18	100	400	400	0				0	100				100			
样 品 测 定 组	19	100	400	200				100	100	100							
	20	100	400	200				100	100	100							
	21	100	400	200				100	100	100							
	22	100	400	200				100	100	100							
	⋮	⋮	⋮	⋮				⋮	⋮	⋮							
	⋮	⋮	⋮	⋮				⋮	⋮	⋮							

注: (1) HCG 标准品,是采用通过 permutit 柱层析的高纯度产品⑤(8,000 国际单位/毫克),也就是用来标记 ¹²⁵I 的产品;
 (2) 每次从事常规 HCG 放射免疫测定,标准品和样品两组要同时进行,以便根据标准曲线求得样品含量;
 (3) 为减少随机误差的可能性,每个标准品和样品都要作双份测定

3. 分开游离抗原和结合的抗原抗体复合物

我们采用第二抗体(绵羊抗兔γ-球蛋白血清)来分开游离抗原和结合的抗原抗体复合物。因为家兔的抗 HCG 血清(即γ-球蛋白部分),与¹²⁵I-HCG 结合成为抗原抗体复合物,仍是可溶性的,如加入绵羊抗兔γ-球蛋白血清,就能与该抗原抗体复合物中的γ-球蛋白结合,形成不溶性的沉淀,由此达到与游离抗原分开的目的。这一方法又名双抗体法。

为保证第二抗体反应的最大沉淀量,尽可能减少上清液中抗原抗体复合物的残留,在常规测定中选择了稍微过量的2号绵羊抗兔γ-球蛋白血清100微升。从图3可见,倘抗血清用量不足,则B/F值低;超过量时,B/F值又略有下降。

4. 标准曲线的建立

见表1,按表1自左至右的顺序,将各试剂分别加入1×7.5(厘米)玻管中。

为了起见,解释如下。

按下列次序,分别加入各种试剂:

0.1M EDTA-PBS液 100 微升;

1% NRS-PBS液 400 微升;

PBS液 100 微升到 300 微升不等(视加入 HCG 标准品的体积而定,两者的总体积应为 300 微升),在抗 HCG 血清空白对照组中,PBS 的加入量应为 400 微升;

HCG 标准品(浓度为 100 毫微克/毫升) 200 微升到 0 微升不等;

1:20,000 的 12 号兔抗 HCG 血清 100 微升,其中有一组不加抗 HCG 血清,作空白对照;

¹²⁵I-HCG 液 100 微升(大约 10,000 计数/100 秒),约含 ¹²⁵I-HCG 0.3 毫微克。

将上述总量为 1 毫升的反应液,在偏心平面迴旋器(vortex mixer)上进行充分混和,之后放在 4°C 温育三天。

温育完毕,再加入绵羊抗兔γ-球蛋白血清 100 微升,仍用偏心平面迴旋器充分混匀,放 4°C 中继续温育

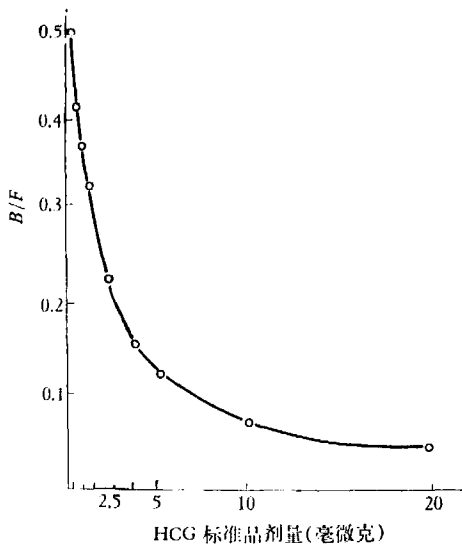


图4 HCG 放射免疫测定之标准曲线

一天。次日,对总反应液和沉淀中的放射性脉冲分别计数,算出各个标准品剂量的平均 B/F 值。

用双抗体法分离游离抗原和结合的抗原抗体复合物,其非专一性沉淀量很少,仅占1%。根据投入的标准品剂量与所测得的 B/F 值,绘出标准曲线如图4。

5. 样品的测定

(1) 血样 自患者前臂静脉抽血,制成血清,置低温冰箱中保存。根据标准曲线可测范围,临测前,或取原血清,或以 PBS 液将原血清作 1:10, 1:100, 1:1,000 的稀释,取出 0.1 毫升,用于测定。

(2) 尿样 收集患者的全日尿,从其中取出 5 毫升,以 1N 醋酸或 0.1N NaOH 调 pH 为 4—5,加两倍体积丙酮混匀,4℃ 过夜,离心,弃去上清液,沉淀用 P_2O_5 抽空干燥,放冰箱保存。根据标准曲线可测范围,临测前将干燥物溶于 2 毫升 PBS 中,或以 PBS 再作 1:10 的稀释,取出 0.2 毫升,用于测定。

六、方法学的鉴定

为了验证本测定法的可靠性,对所采用的实验条件和结果,作了若干必要的方法学鉴定,包括健全性、专一性、灵敏度、精确度和正确性等方面的分析。

1. 健全性 (validity) 和专一性

随机抽取检号为 5737、稀释度为 1:100 的孕妇血清 100 微升、50 微升、25 微升和 12.5 微升四种体积,测定它与标准曲线的平行性,结果良好(图5)。这表明所测样品与标准品具有免疫活性上的一致性,而且也说明了不会因为测定样品稀释度的不同而发生改变。

凡抗 HCG 血清,均与 LH (黄体化激素)有交叉反应。通过对 48 例正常未孕妇女血清的测定,发现每毫升血清中 LH 的平均含量约折合 5 毫微克 HCG,最高

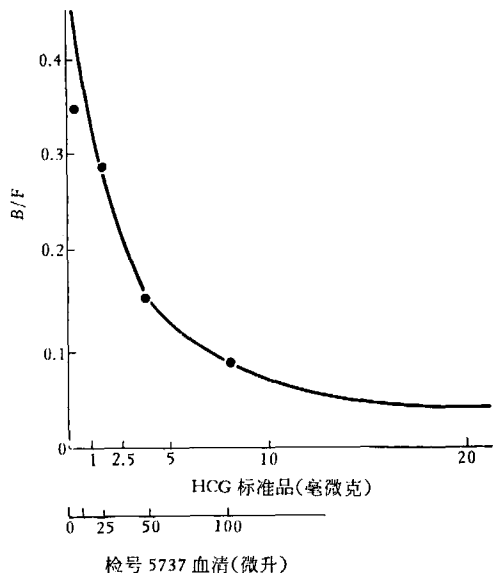


图5 HCG 放射免疫测定(双抗体法)的健全性鉴定

—标准曲线 ●检号 5737 血清

者达 13.5 毫微克,低者少于 2.3 毫微克。这样的 LH 含量,对测定正常孕妇 HCG 的影响不大,因为怀孕三周(自末次月经的第一天算起)的妇女,每毫升血清中的 HCG 量为 95 毫微克,以后迅速增加,达到数千或数万毫微克。另一方面,由于正常未孕妇女不能产生 HCG,所以利用 ^{125}I -HCG 和抗 HCG 血清,对正常未孕妇女的 LH 进行放射免疫测定,同样不会引起干扰。

HCG 与某些糖蛋白激素具有类似的抗原决定簇,抗 HCG 血清往往可能与 TSH (促甲状腺激素)及 FSH (促滤泡激素)发生交叉反应。所以事先应对 TSH 和 FSH 作干扰试验,以筛除对 HCG 和 LH 专一性不高、亲和力不强的抗 HCG 血清。

正常成人每毫升血浆中 TSH 含量为 0.19 毫单位左右,比儿童或老年人少些;而患有原发性甲状腺功能减退者,TSH 的平均含量达 2.83 毫单位,为正常成人的 15 倍。如加入相当于原发性甲状腺功能减退者血浆 TSH 平均活性高 30 倍的牛 TSH (其抗原决定簇与人的 TSH 一致),并未对本测定法引起干扰,仅在活性高达 10,000 倍时,才产生相当于 2 毫微克 HCG 的干扰量。

在去卵巢妇女的血清中,FSH 的平均含量较正常育龄妇女高 10 倍以上,LH 的含量一般也略多些。我们用一位切除了双侧卵巢妇女的血清作干扰试验,结果从每毫升血清中,只测得相当于 16.25 毫微克的 HCG 干扰物质;照此推算,正常育龄妇女每毫升血清 FSH 的含量,仅相当于 1 毫微克左右的 HCG 干扰物质,这对现用的常规测定,影响也不大。

2. 精确度、灵敏度和正确性

由表 2 看出,本测定法的可测范围在 0.75—20 毫

微克之间,测定的重复性良好,标准差不大;在可测范围的两端变异百分比稍大,特别是在接近 20 毫微克左右。如果将可测范围规定在 0.75—10 毫微克,则方法的精确度可大为提高;在此范围内,共观察 34 次,标准差

$$s. D. = \sqrt{\frac{\sum d^2}{2n}}^{1.1}$$

为 0.55 毫微克。再从表 2 也可看出:本测定法的灵敏度,最小可测量为 0.75 毫微克左右。

表 2 HCG 放射免疫测定中精确度和灵敏度的鉴定

HCG 投入量 (毫微克)	HCG 回收测得量 (毫微克±标准差)	观察次数 (n)
20	19.87±4.6	10
10	9.83±0.82	10
5	5.0±0.24	10
3.5	3.5±0.24	10
2.5	2.51±0.14	10
1.5	1.58±0.11	10
0.75	0.71±0.09	10
0	0±0.57	10

回收率是鉴定正确性的标准之一。我们在一位因患脑垂体肿瘤而切除了脑垂体,并经放射治疗的病人血清样品中,分别投入 5 毫微克和 0.5 毫微克的外源 HCG,得到的回收率分别为 96% 和 104%。

通过上述各项鉴定,有力地证明了这一方法的可靠性,它完全能适用于临床和科研的测定工作。

七、HCG 放射免疫测定法应用示例

1. 正常妇女妊娠过程中血清 HCG 的变化

通过对 70 例正常孕妇血清 HCG 含量的初步分析,表明整个妊娠过程中 HCG 含量的变化(图 6): 出

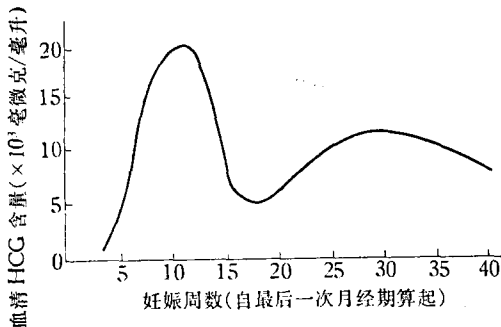


图 6 正常妇女妊娠期血清中 HCG 含量变化

现了两个峰和一个低点。第一个峰出现于第 8—14 周,每毫升血清中 HCG 的平均含量为 13.6 微克;第 15—20 周为低点,每毫升血清中平均含 5.8 微克;自 20 周后,形成第二个峰,HCG 的平均含量达 9.1 微克。这种变化情况,与国外资料中报道的变化曲线的

趋势是一致的(表 3)。表 3 中各实验室的测定值之间有差异,可能是由于所用的抗血清与抗原不同之故。

2. 治疗绒癌过程中血清 HCG 的变化

我们曾用喜树碱加手术治疗一例绒毛膜上皮癌患者,测定该患者血清 HCG 含量的变化,如图 7 所示;说明喜树碱对癌细胞合成 HCG 具有抑制作用,HCG 含

表 3 正常妇女妊娠期中血清 HCG 含量变化的比较

作者	每毫升血清中 HCG 的含量 (微克或国际单位)		
	第一个峰	低点	第二个峰
本文	13.6 微克 (8—14 周)	5.8 微克 (15—20 周)	9.1 微克 (22—40 周)
Varma, K. 等 (1971)	13.6 微克 163.2 国际单位 (8—10 周)	1 微克 12 国际单位 (17—19 周)	5.3 微克 63.1 国际单位 (35—37 周)
Gosignani, P. 等 (1971)	29 国际单位 (第一季度)	11.2 国际单位 (第二季度)	13.6 国际单位 (第三季度)
Faiman, C. 等 (1968)	40—50 国际单位 (8—10 周)	10—15 国际单位 (17 周之后)	25 国际单位 (34 周之后)
Goldstein, D. 等 (1968)	58 国际单位 (8—12 周)	12—28 国际单位 (15—31 周)	45 国际单位 (31—39 周)

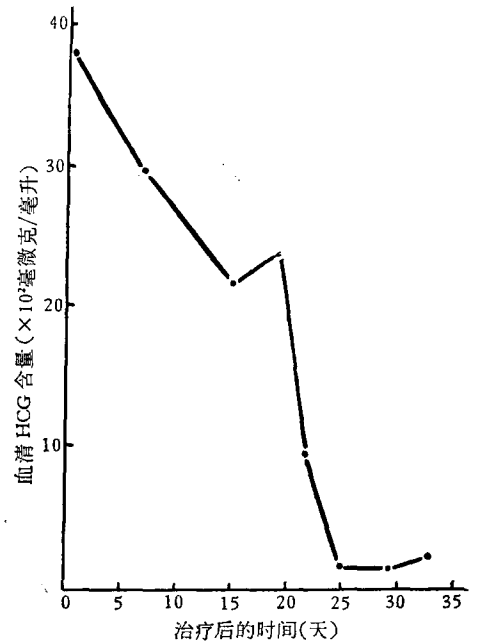


图 7 用喜树碱(加手术)治疗绒癌过程中血清 HCG 的变化

量下降到最低点,标志临床症状显著好转。

参 考 资 料

[1] Snedecor, G.W.: *Biometrics*, 8, 85, 1952.

[本文于 1974 年 11 月 19 日收到]