

# 血清甲状腺素放射免疫测定 及其临床初步应用\*

连秉钧

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

邓守真 何婉婷 林祥通

(上海第一医学院附属华山医院)

甲状腺素( $T_4$ )和三碘甲状腺原氨酸( $T_3$ )的放射免疫测定所得结果,对于诊断甲状腺功能以及估价治疗过程中病情的动态变化是一个重要指标。在疾病导致甲状腺功能改变时, $T_4$ 和 $T_3$ 在血清中含量变化基本相似。只是诊断甲亢。 $T_3$ 比 $T_4$ 更灵敏。但是在某些特殊情况下,两者含量变化并不平行。如 $T_3$ 型甲亢者,血清中 $T_3$ 含量增高,而 $T_4$ 正常。反之,轻度原发性甲减者, $T_4$ 含量可有降低,而 $T_3$ 含量有时却显得正常。因此在临床诊断中, $T_3$ 的测定不能完全替代 $T_4$ 的测定,两者间存在着相辅相成、互相补充的关系。同时分析 $T_3$ 和 $T_4$ 在血清中的含量,能提高诊断正确性,减少误诊。为此我们在开展 $T_3$ 放射免疫测定的基础上又相继建立了 $T_4$ 放射免疫测定方法。现将方法学若干问题和临床结果总结如下。

## 材料与方 法

### (一) $T_4$ 半抗原与蛋白质联结

1.  $T_4$  酯化 称 300 毫克经葡聚糖凝胶 G-25 纯化<sup>[2]</sup>的  $T_4$ (图 1),溶解于 10 毫升无水甲醇,然后用 Kipp 发生器通入氯化氢气体 1 小时,继在 50℃ 水浴中减压浓缩至结晶。最后用无水乙醇洗滤,无水乙醚冲洗,得到乳白色的  $T_4$ -甲酯 278 毫克。经纸层析,紫外光谱分析及熔点测定,证明不含杂质,纯属  $T_4$ -甲酯<sup>[3]</sup>。

2. 蛋白质联结 称 30 毫克  $T_4$ -甲酯,溶解在 3 毫升的二甲基甲酰胺,滴加在 100 毫克

BSA 或 HSA 的 25 毫升水溶液中,内含有 30 毫克水溶性碳化二亚胺。反应时 pH5。滴加完毕后再加 30 毫克碳化二亚胺,在缓慢搅拌下反应 1 小时。反应物用蒸馏水透析三天后,离心取上清液,冰冻干燥。得  $T_4$ -甲酯-HSA 105 毫克, $T_4$ -甲酯-BSA 127 毫克。 $T_4$  半抗原与蛋白质结合的克分子比见表 1,紫外光谱分析结果见图 2。

表 1  $T_4$  与蛋白质结合克分子比数

| 化 合 物         | $T_4$ /蛋白质 |      |
|---------------|------------|------|
|               | 1          | 2    |
| $T_4$ -甲酯-HSA | 18:1       | 23:1 |
| $T_4$ -甲酯-BSA | 20:1       | 25:1 |

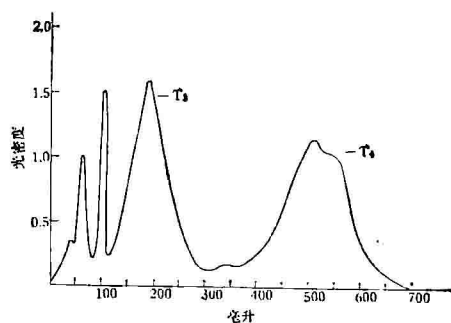


图 1 葡聚糖凝胶 G-25 柱层析分离

洗脱液乙酸乙酯: 甲醇: 2N 氨水 (400:100:40),  
流速 10 毫升/每管波长 328 毫微米

\* 许河生同志参加部分免疫兔子工作表示感谢

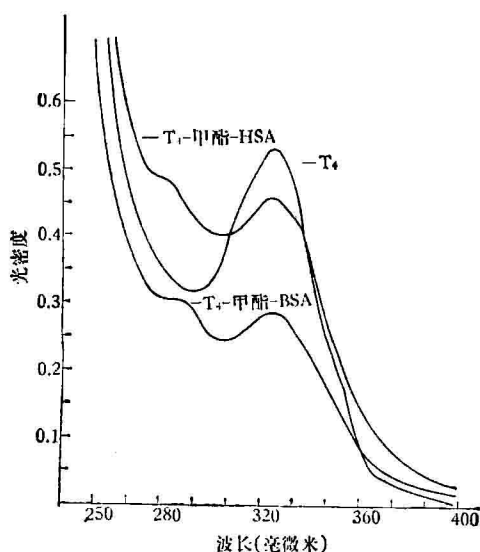


图2  $T_4$ -甲酯-HSA,  $T_4$ -甲酯-BSA

在 0.05M Tris 缓冲液 pH 8.4 紫外光谱扫描分析

## (二) 抗体的制备及鉴定

1. 免疫 1 毫克  $T_4$ -甲酯-BSA 或  $T_4$ -甲酯-HSA 的抗原物质, 乳化在 1 毫升福氏完全佐剂 (含  $10^9$  百日咳菌苗) 中, 家兔股淋巴结直接免疫和皮下多点免疫。每二周免疫一次, 第九次后再相隔三个月作回忆刺激, 放血取血清, 低温保存。

2. 鉴定 根据图 3 中  $T_4$ -甲酯-BSA 和  $T_4$ -甲酯-HSA 所产生抗血清滴定曲线, 表明二者无差别, 抗血清最终稀释度均可达 8,000—12,000 左右。经过放射免疫电泳自显影术的鉴定 (图 4), 证明  $T_4$  抗血清对  $^{125}I$ - $T_4$  抗原具有专一性的沉淀线。在  $T_4$  衍生物及碘化物的干扰试验 (表 2) 中, 除  $T_3$  多达 983 毫微克时, 对  $T_4$  抗血清的交叉活性为正常人血清的 2.75% 外, 其余均无明显交叉。这些干扰对  $T_4$  测定并无

表2  $T_4$  抗血清对  $T_4$  衍生物和碘化物相对活力测定

| 化合物      | 加入量<br>毫微克/毫升   | $T_4$ 测定值<br>毫微克/毫升 | 相对于 $T_4$ 活<br>力百分比 |
|----------|-----------------|---------------------|---------------------|
| 正常人血清    | —               | 72.5                | 100                 |
| 酪氨酸      | 400             | 82                  | 0.24                |
| 双碘酪氨酸    | 3,370           | 74                  | 0.045               |
| 三碘甲状腺原氨酸 | 983             | 100                 | 2.75                |
| 碘化钾      | $1 \times 10^7$ | 82.5                | 0.0001              |
| 他巴唑      | $2 \times 10^6$ | 80                  | 0.0004              |

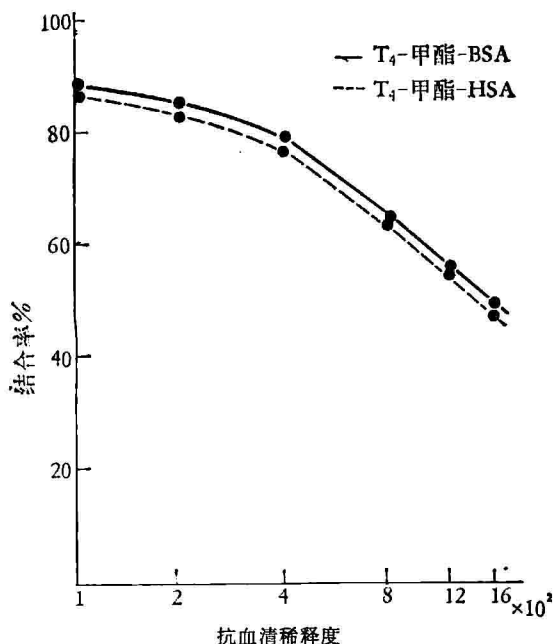


图3  $T_4$ -甲酯-HSA 和  $T_4$ -甲酯-BSA, 抗血清滴度比较

影响, 因此  $T_4$  抗血清品质是良好的。

## (三) 标记抗原制备

以  $T_3$  作为标记底物, 采用氯胺-T 法<sup>[4]</sup>, 经过葡聚糖凝胶 G-25 分离, 得到  $^{125}I$ - $T_4$  抗原物。比度约为每微克 100—160 微居里。保存在 4℃ 的 50% 乙醇或 50% 丙二醇内, 可使用 1 个月左右。如发现脱碘, 经纯化后又可应用。

## (四) 测定方法

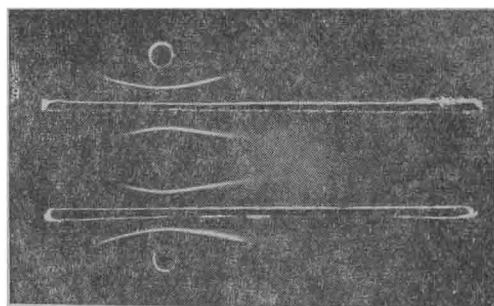
有关测定用的各种试剂的配制, 加样步骤, 双抗体分离技术, 阻止甲状腺结合球蛋白 (TBG) 干扰的阻断剂使用方法等已另文报道<sup>[1]</sup>。按常规每一样品作双份测定, 同时建立去  $T_4$  血的标准曲线 (图 5)。

## (五) 方法学鉴定

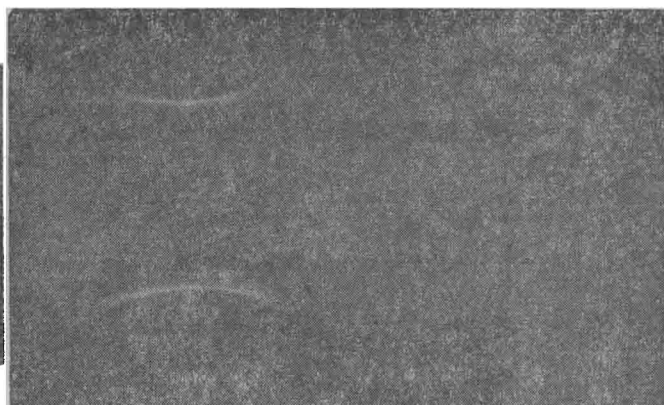
健全性试验 取不同量甲亢患者血清, 然后分别以去  $T_4$  血清及巴比妥缓冲液补足反应体积, 结果两组无明显差异, 均与标准曲线呈平行关系 (图 6)。

回收试验 在同一血清样品中分别加入已知标准  $T_4$  40 毫微克, 80 毫微克, 160 毫微克, 平均回收率为 94.1% (表 3)。

灵敏度和重复性 区别于零最少可测值



(a)



(b)

图4 双抗体放射免疫电泳自显影术

(a) 上下两孔加入  $T_4$  抗血清, 中间孔加正兔血清, 在  $0.025M$  巴比妥缓冲液, pH 8.6, 电泳 1 小时, 然后在两条长槽内加双抗体(羊抗兔), 出现 4 条沉淀线。

(b) 在长槽内加  $^{125}I-T_4$  抗原, 曝光三天, 由 X 光片显影出两条抗  $T_4$  血清专一沉淀线。

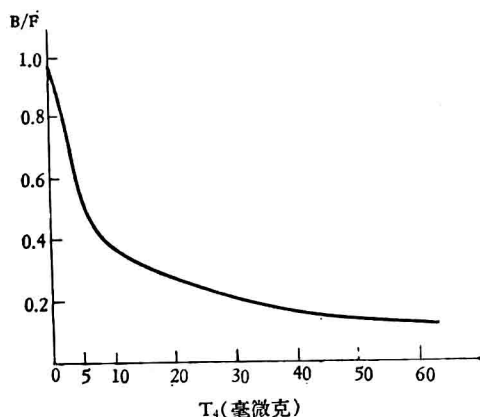


图5 去  $T_4$  血清的标准曲线

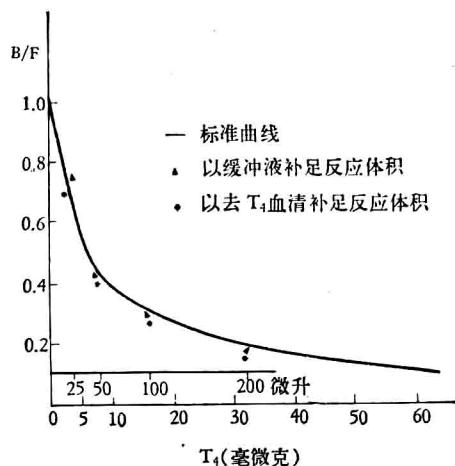


图6 健全性试验

表3 血清中  $T_4$  回收试验

| 加入量<br>毫微克  | 回收测定值<br>毫微克/毫升  | 回收百分比 | 观察次数 |
|-------------|------------------|-------|------|
| 血清 $T_4$ 本底 | $44.9 \pm 0.017$ |       | 3    |
| 40          | $83 \pm 1.04$    | 95.0  | 5    |
| 80          | $12.12 \pm 0.13$ | 95.3  | 4    |
| 160         | $192.5 \pm 1.78$ | 92.1  | 5    |

为 0.1 毫微克/0.1 毫升, 最大可测值 64 毫微克/0.1 毫升。相同血清样品重复测定的批内变系数为 5.6%, 批间变系数为 5.9% (表 4)。

表4 相同血清样品重复性的变异数测定

批内重复性

| 样品 | 测定均值士标准差<br>毫微克/毫升 | 观察次数 | 变异系数 | 均值   |
|----|--------------------|------|------|------|
| A  | $64.5 \pm 5.3$     | 4    | 8.2% | 5.6% |
| B  | $115.9 \pm 9.3$    | 4    | 8.0% |      |
| C  | $157.5 \pm 7.3$    | 4    | 4.6% |      |
| D  | $249.3 \pm 4.0$    | 4    | 1.6% |      |

批间重复性

| 样品 | 测定均值士标准差<br>毫微克/毫升 | 观察次数 | 变异系数  | 均值   |
|----|--------------------|------|-------|------|
| A  | $51 \pm 2.65$      | 7    | 5.1%  | 5.9% |
| B  | $82.3 \pm 6.5$     | 5    | 7.0%  |      |
| C  | $120.1 \pm 6.09$   | 7    | 5.79% |      |

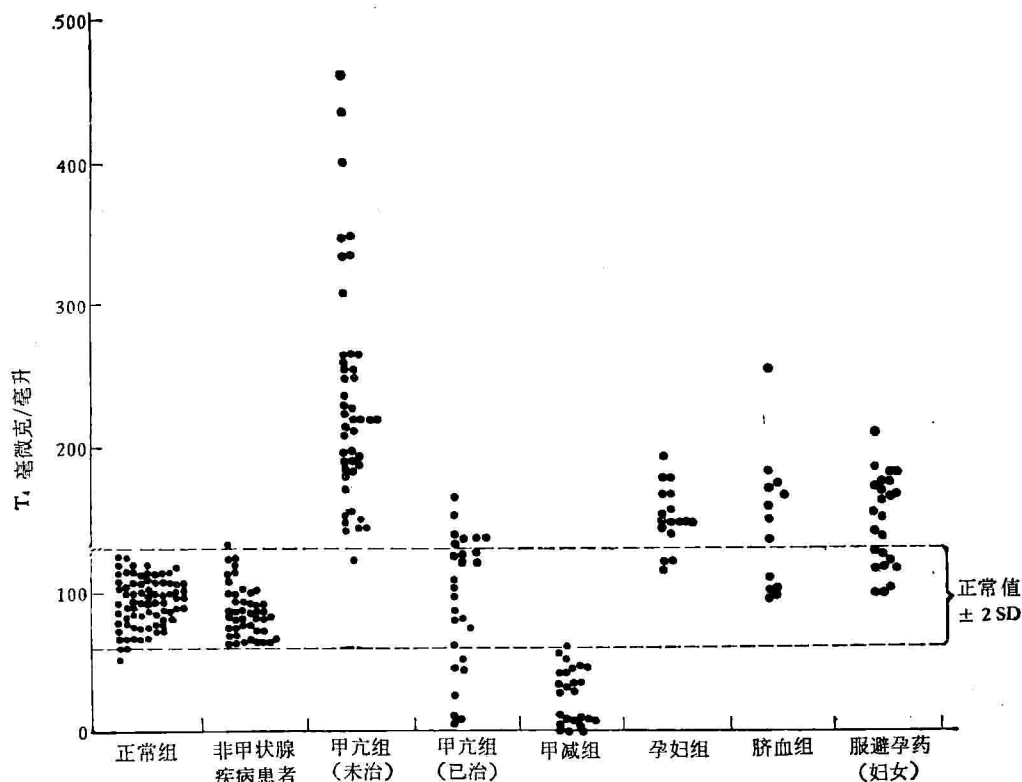


图7 各类甲状腺功能状态血清总  $T_4$  值分布

### (六) 临床初步应用

临床测定共 269 例,其中包括正常人(献血员)75 例,非甲状腺疾病的各种住院病人 43 例,甲亢未治者 45 例,甲亢已治者 27 例,甲减患者 25 例,孕妇 17 例,口服避孕药妇女 24 例,结果见表 5。若以正常人均值 92.3 毫微克/毫升

的  $\pm 2$  标准差(即 57.3—127.3 毫微克)作为正常范围的上下界限,则 43 例非甲状腺疾病患者中,除 1 例为 155 毫微克/毫升外,其余均在上下限之间,符合率达 97.6%,甲亢未治组 45 例,除一例外,均高于正常值的上限,与正常值有明显差别( $P < 0.001$ )。甲亢患者,经过治疗后均

表5 正常人及各种甲状腺功能状态血清总  $T_4$  测定值

| 种 类          |     | 例 数 | 测定值范围<br>毫微克/毫升 | 均值 $\pm$ 标准差<br>毫微克/毫升 | $P$ 值<br>(对正常组比较) |
|--------------|-----|-----|-----------------|------------------------|-------------------|
| 正常人<br>(献血员) | 男 女 | 75  | 50—125.5        | 92.3 $\pm$ 17.5        |                   |
|              | 男   | 30  | 57.5—117.5      | 89 $\pm$ 20.6          |                   |
|              | 女   | 45  | 50—122.5        | 94.5 $\pm$ 17.7        |                   |
| 非甲状腺疾病患者     |     | 43  | 57—130          | 83.6 $\pm$ 18.6        | $>0.5$            |
| 甲亢           | 未 治 | 45  | 142.5—460       | 233.7 $\pm$ 81         | $<0.001$          |
|              | 已 治 | 27  | $<10$ —137.5    | 91.4 $\pm$ 52.2        | $>0.1$            |
| 甲 减          |     | 25  | $<10$ —57.5     | 23.9 $\pm$ 19.2        | $<0.1$            |
| 脐 血          |     | 13  | 90—250          | 139.5 $\pm$ 46.7       | $<0.001$          |
| 孕 妇          |     | 17  | 110—190         | 148.2 $\pm$ 28.6       | $<0.001$          |
| 口服避孕药        |     | 24  | 90—205          | 135.9 $\pm$ 67.4       | $<0.01$           |

值 91.4 毫微克,与正常值无明显差异 ( $P>0.1$ )。甲减组 25 例,除 1 例 57.5 毫微克/毫升外,均低于正常值下限,与正常者有显著差异 ( $P<0.01$ )。不同甲状腺情况的血清中  $T_4$  分布详见图 7。

## 讨 论

一、据文献报道,  $T_4$ -抗血清滴度总比  $T_3$  抗血清滴度要低得多,相差约数十倍。Meinhold<sup>[5]</sup> 用不同蛋白载体与  $T_4$  结合抗原物,所产生抗血清的滴度为 1:6,000。Hesch<sup>[6]</sup> 将  $T_4$  甲酯化后与 BSA 结合,免疫产生的抗血清滴度为 1:5,000。经过我们改进,所得到抗体滴度为 1:8,000—12,000。但与  $T_3$  抗血清滴度相比仍有差距。至于  $T_4$ -甲酯-HSA 和  $T_4$ -甲酯-BSA 所产生的抗体滴度并无明显差别。

二、血清中 TBG 对  $T_4$  抗原和抗体的结合起干扰作用。我们选用水杨酸钠作为对 TBG 干扰的阻断剂。如果阻断剂量选择不当会引起测定值偏高或偏低。在 0.1 毫升血清中阻断剂最佳浓度为 4 毫克(图 8)。此外,必须建立加去  $T_4$  血清的标准曲线,否则曲线会右移(图 9),使样品测定值偏高。

三、标准品  $T_4$  工作母液(1 毫克/10 毫升)放置  $-20^{\circ}\text{C}$  低温下,可保存半年。经稀释成工作液后(640 毫微克/毫升),不宜保存过久,因随保存时间延长,  $T_4$  逐渐分解,造成标准曲线右移,测定值偏高(图 10)。为此一般宜每两周

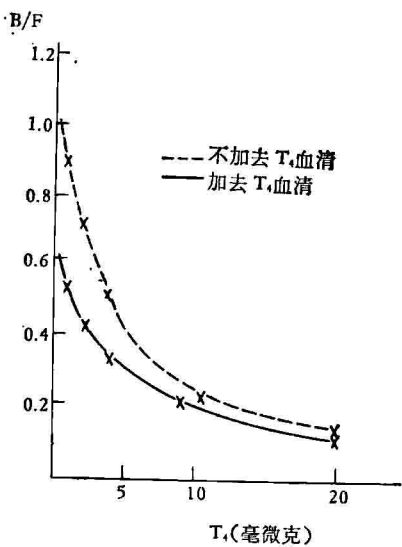


图 9 加去  $T_4$  血清与不加去  $T_4$  血清标准曲线比较

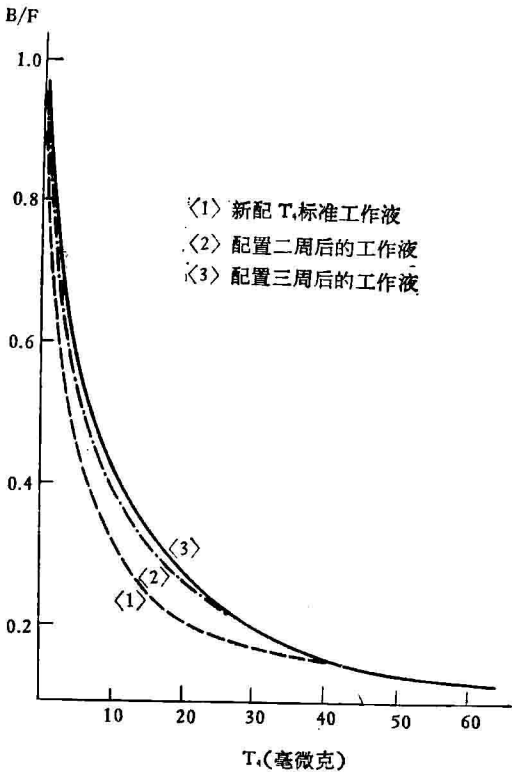


图 10  $T_4$  标准工作液 640 毫微克/毫升  
保存时间对标准曲线影响

配制一次。 $^{125}\text{I}-T_4$  保存时间过长后会造成 B/F 值下降现象,影响方法的可靠性,因此必须纯化后再用。

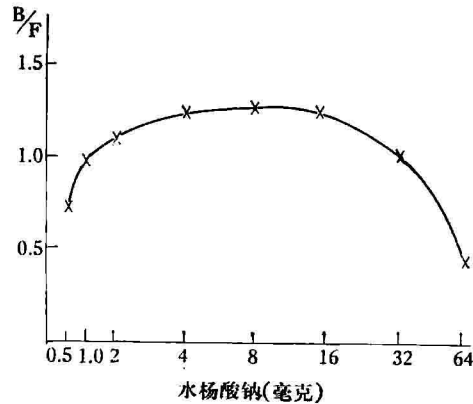


图 8 水杨酸钠浓度对  $^{125}\text{I}-T_4$  与  $T_4$  抗血清结合影响

正常值 22 毫克/100 毫升。其中 8 名的齿龈症状(出血,灼烧感)得到改善。

(8) 消化性溃疡 口服或肌注  $\text{CoQ}_{10}$  60 毫克/日, 14—144 天, 对 27 例患者的有效率为 77.8%。特点是对发病初期、晚期均有效, 治愈后能防止复发。

(9) 坏死性牙周炎 此病患者的齿龈及血淋巴细胞中显著缺乏  $\text{CoQ}_{10}$ 。双盲试验证明,  $\text{CoQ}_{10}$  25 毫克/日/3 周对 8 例患者全部有效, 表现在促进创面愈合、减轻病情。 $\text{CoQ}_{10}$  也有相似疗效。

(10) 糖尿病性神经炎 口服  $\text{CoQ}_{10}$  10 毫克/日 3—13 周, 对 18 名患者中 9 例有效, 表现在感觉异常、局部缺血性疼痛, 肋间神经痛等症状消失或减轻。

(11) 神经性膀胱炎 最近日本卫材公司申请了美国专利, 提出  $\text{CoQ}_9$  或  $\text{CoQ}_{10}$  能治疗此病。

## 2. 国内临床应用情况

国内自 1975 年起对  $\text{CoQ}_{10}$  作了大量的临床应用。我国一般采用肌注  $\text{CoQ}_{10}$  5—10 毫克/日。对少数心脏病患者也试用口服  $\text{CoQ}_{10}$  30 毫克/日, 初步观察到与肌注相仿效果。对少数急性肝坏死患者试用了静注 10 毫克/日。1977 年 12 月 7—10 日在江苏省泰州市召开了生化新药——辅酶  $\text{Q}_{10}$  鉴定会。与会代表一致确认,  $\text{CoQ}_{10}$  在病毒性肝炎亚急性肝坏死的治疗上有良好疗效, 表现在患者生命延长, 病死率减低, 91 例中的有效例为 61 例; 对抢救急性肝坏死

患者及治疗慢性  $\text{HBsAg}$  血症患者、重症肝炎、慢性活动性肝炎患者也有了可喜苗头, 表现在病死率降低,  $\text{HBsAg}$  转阴, 肝功指标显著改善, 43 例中 28 例有效。这方面的临床应用系我国独创。对于高血压病, 各所医院应用  $\text{CoQ}_{10}$  取得的临床效果相差较大, 疗效最差的为 18%, 最好的为 100%, 这可能与病例选择有关,  $\text{CoQ}_{10}$  可能主要适用于其病因为缺乏  $\text{CoQ}_{10}$  的原发性高血压患者。对于冠心病,  $\text{CoQ}_{10}$  的临床效果与国外的结果一致, 16 例中 11 例有效。但在心肌炎的治疗上, 初步结果显示  $\text{CoQ}_{10}$  有良好疗效, 11 例中 9 例有效, 表现在临床症状有显著改善, 但对心电图的改善不明显, 这方面与国外的报道不同, 值得进一步验证, 对于免疫功能低下的恶性肿瘤患者,  $\text{CoQ}_{10}$  能在 1—2 月内改善患者的免疫功能, 如玫瑰花结细胞数增加, OT 试验, 斑蝥发泡试验增强, 23 例中 17 例在这方面有改善。对恶性肿瘤的治疗,  $\text{CoQ}_{10}$  无明显作用。三年来临床应用 292 例, 均未见  $\text{CoQ}_{10}$  有任何毒性, 也未见明显副作用。

## 主要参考文献

- [1] Федуров, В. В.: *Усп. Соврем. Биол.*, **82**, 3, 1976.
- [2] Körner, W. F.: In: "Fermente, Hormone, Vitamine, 3 Auflage, III/I, S. 502, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1974.
- [3] Folkers, K. et al.: Biomedical and clinical aspects of coenzyme Q (Proc. Intern. Symp. CoQ, Sep. 16—17, 1976, Japan), 316pp, Elsevier Holland, 1977.

[本文于 1978 年 4 月 3 日收到]

(上接第 64 页)

四、 $\text{T}_4$ 、 $\text{T}_3$  及促甲状腺激素 (TSH) 等放射免疫测定法有互相补充的作用, 是全面了解甲状腺功能动态变化的最灵敏可靠的测定方法, 其中,  $\text{T}_4$  放射免疫测定对甲亢诊断具有重要意义, 对甲减诊断的符合率比  $\text{T}_3$  高。

## 参 考 文 献

- [1] 连秉钧等: 《生物化学与生物物理进展》, 1979 年, 第

1 期, 第 52 页。

- [2] Williaus A. D. et al.: *J. Chromatography*, **45**, 371, 1969.
- [3] Ashiey J. N. et al.: *J. Biochem.*, **55**, 1436, 1928.
- [4] Kjeld J. M. et al.: *Clinica Chimica Acta*, **61**, 381, 1975.
- [5] Meinhold H. et al.: *Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine*, **2**, 127, 1973.
- [6] Hesh, R. D. et al.: *Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine*, **2**, 161, 1973.

[本文于 1978 年 5 月 31 日收到]