DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.06.035

(附178例报告).中华泌尿外科杂志,1995,16(3):172
2 黄澄如,白继武,梁若馨等.经耻骨及会阴联合修复男童复杂性外伤性后尿道闭锁.中华泌尿外科杂志,1995,16(7):428
3 Bulow H, Bulow U, Forhmuller H G *et al*. Laser investigations of the strictured dog urethra. Invest Urol, 1979, 16:403
4 曾祥福,李炎唐.尿道支架在尿道狭窄中的应用.中华泌尿外科杂志,1994,15(3):220
5 Rosin R D, Edwards L. Endourethral urethroplasty. Brit J Urol, 1979, 51:584
6 董德欣,岑 松,钟 江等.窥视下尿道内切及电切术治疗尿道狭窄及闭锁.临床泌尿外科杂志,1992,7(4):228

(收稿:1996-11-19;修回:1997-09-30)
(编辑 王红)

人胰弹力蛋白酶Ⅰ放射免疫测定方法的建立

Establishment of the radio-immunoassay of human pancreatic elastase Ⅰ

达四平* 徐纬中 于世远 赵小晏 郭 萍 邓居有** 叶恒光** (第三军医大学附属新桥医院消化内科)重庆,400037

提 要 目的:建立改良的人胰蛋白酶Ⅰ放射免疫测定(HPE$_1$ RIA)法并观察此法对临床诊断胰腺癌的价值。方法:纯化HPE$_1$,制备兔抗人HPE$_1$ IgG,在此基础上建立改良HPE$_1$ RIA法,临床测定了82例健康成人和222例各类疾病病人血清HPE$_1$值。结果:82例健康成人血清HPE$_1$值为73~320 ng/dl,93例胰腺癌患者血清HPE$_1$值为833±734 ng/dl($\bar{x}\pm s$)。在胰腺癌患者中,8例肿瘤直径小于3 cm的胰头癌HPE$_1$值(1225±1218 ng/dl)明显高于胰腺癌各分组中任何一组的血清HPE$_1$值($P<0.01$)。结论:改良HPE$_1$ RIA法可作为胰腺癌诊断筛选的一种有价值的新方法。

胰弹力蛋白酶Ⅰ是胰弹力蛋白酶的同功酶之一,用放射免疫法(RIA)测定血清中人弹力蛋白酶Ⅰ(HPE$_1$)的含量敏感性高、特异性强,且不受血液中酶抑制物的影响。自Satake等[1]建立了改良人胰弹力蛋白酶Ⅰ RIA以来,临床研究证实HPE$_1$ RIA法对胰腺癌早期诊断有重要的筛选价值[2,3]。为此本研究建立了改良的HPE$_1$RIA法,可在4 h内完成检测,符合临床需要。

1 方法与结果

1.1 HPE$_1$的分离、提纯及抗血清制备

参照Largman等[4]的方法,将意外死亡健康成人胰腺加适量丙酮制成匀浆,经浸提、硫酸铵盐析后,依次过CM-Sephadex C$_{50}$、DEAE-Sephadex A$_{50}$离子交换层析和Sephadex G$_{75}$分子筛层析,获得纯化的HPE$_1$。以纯化的HPE$_1$ 1 mg免疫纯种雄性日本大耳白兔,每次间隔12 d共4次,第4次免疫后4 d耳静脉采血对流免疫电泳测得抗体效价为1∶64,次日颈动脉放血,分离血清,硫酸铵盐析及DE$_{32}$纤维素层析纯化,免疫电泳和圆盘电泳测得其成分为IgG,蛋白定量的5.5 mg/ml,按1 ml管分装,-30℃保存备用。

1.2 HPE$_1$ RIA的建立

1.2.1 HPE$_1$的^{125}I标记 为了防止标记抗原与血清中蛋白酶抑制物(α_1抗胰蛋白酶,α_2巨球蛋白)的结合,先参照Largman[4]的方法,将纯化的HPE$_1$制成PMS-HPE$_1$(PMS为氟化磺酰苯甲烷,德国Merck公司)。取PMS-HP$_1$ 20 μg和Na^{125}I 1.5 mCi,按Greenwood[5]的方法进行碘化标记。过Sephadex G$_{50}$层析柱,收集第一峰即^{125}I-PMS-HPE$_1$,经计算利用率为51.7%,标记率为57.6%,比放射性为80 mCi/mg,抗血清稀释曲线证实其免疫活性良好,B/T% = 42%时血清稀释度1∶6400作为抗血清最佳稀释度。

1.2.2 改良的HPE$_1$ RIA建立 以平衡法反应,按表1加样。标准液、抗血清及待测样品均用0.05 mol/L、pH7.6PB(含1% BSA和1% EDTA)缓冲液稀释。所有操作均作复管。

1.2.3 亲和常数的计算 按王正品[6]的方法,以HPE$_1$ RLA标准曲线数据计算出本系统中HPE$_1$抗血清稀释度在1∶6400时亲和常数K值为1.81×10^9 L/M。

1.3 临床初步应用

临床检测82例健康成人(献血员)和222例各类病人血清HPE$_1$值,结果见表2。健康成人组血清HPE$_1$值男、女间无显著差异($P>0.05$),以306 ng/dl($\bar{x}\pm 2s$)为正常上限,超过此值为

* 达四平,男,36岁,主治医师,讲师,硕士
** 核医学科

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

阳性,本组 1例超过此值。胰腺癌组 93例血清 HPE_1值为 833± 734 ng/dl($\bar{x}\pm s$),与健康成人组相差非常显著($P<0.01$),阳性率 66.67%,而急性胰腺炎组明显高于健康成人组和胰腺癌组,23例病人全部 HPE_1值阳性。

在胰腺癌患者中,8例肿瘤直径小于 3 cm的胰头癌 HPE_1值(1512± 624 ng/dl)和 6例肿瘤直径小于 2 cm的胰腺癌的 HPE_1值(1225± 1218 ng/dl)明显高于胰腺癌各分组中任何一组的血清 HPE_1值,相差均非常显著($P<0.01$)。

表 1 HPE_1 RIA加样程序(单位: μl)

	零管	标准品管	样品管	非特异结合管	抗血清滴度管
稀释液	100			200	100
标准液		100			
待测样品			100		
第一抗体	100	100	100		100
^{125}I-PMS-HPE_1	100	100	100	100	100
		37℃ 水浴 3 h			
第二抗体	20	200	200	200	200
		37℃ 水浴 15 min			
8% PEG**	500	500	500	500	500
		37℃ 水浴 10 min			
		离心(3500 r/min) 20 min,测定,计算结合率			

*:标准品为 50、150、500、5000 ng等五管,**: PEG为分子量 6000的聚乙二醇

表 2 各组 HPE_1 RIA结果(单位: ng/dl)

对象	例数	$\bar{x}\pm s$ (ng/dl)	范围(ng/dl)	P值*	阳性
健康成人组	82	238± 34	73~ 320		
胰腺癌组	93	833± 734	64~ 5080	< 0.01	62
转移性胰腺癌组	24	312± 74	86~ 769	> 0.05	4
非胰腺肿瘤组	50	257± 67	58~ 769	> 0.05	5
急性胰腺炎组	23	2186± 1632	617~ 6700	> 0.01	23
慢性胰腺炎组	12	309± 78	50~ 688	> 0.01	2
消化性溃疡组	20	240± 58	82~ 334	> 0.05	1

*:与健康成人组相比

2 讨论

1982年 Satake[1]建立 HPE_1 RIA法,该方法具有敏感性高、特异性强、且不受血液中酶抑制物的影响等特点,提高了人胰弹力蛋白酶 I测定的临床实用价值。国外临床研究结果已经证实,多项肿瘤标志物联合检测(包括用 RIA法测定血清 HPE_1含量),对胰腺癌的诊断、特别是对胰腺癌的亚临床筛选 具有重要意义[2,3]。国内学者也有同样的见解[7],戴小晶等[8]用日本 HPE_1 RIA试剂盒检测胰腺癌患者血清的研究结果已见报道。

本试验在分离、提纯 HPE_1的基础上,参照 Satake等[1]的方法建立了改良的 HPE_1 RIA,用双抗体加 PEG沉淀法分离结合的与游离的标记抗原,仅需 4 h即可完成检测,并且操作简便,方法稳定。

临床应用 HPE_1 RIA测得 82例健康成人血清 HPE_1值为 238± 34 ng/dl($\bar{x}\pm s$)。男女之间无显著性差异($P>0.05$)。93例胰腺癌病人血清 HPE_1值低于急性胰腺炎组($P<0.01$),高于正常对照($P<0.01$),也高于另外 4组的血清 HPE_1值($P<0.01$),其中 8例肿瘤直径 < 3 cm的胰头癌、6例肿瘤直径 < 2 cm的胰腺癌的 HPE_1值高于其余的胰腺癌患者的 HPE_1值水平($P<0.01$或 $P<0.05$)。以上结果提示:① 本试验所建立的 HPE_1 RIA对胰腺癌和急性胰腺炎(该疾病临床易与胰腺癌相鉴别)的诊断均有一定价值。胰腺癌患者血清 HPE_1升高的机理可能与癌肿阻塞胰管引起继发性胰腺炎,胰腺腺泡细胞破坏,胰酶释放入血有关[1],但确切机理尚待进一步研究。② HPE_1 RLA能发现肿瘤直径较小的胰腺癌,有用于胰腺癌亚临床筛选 的价值,值得进一步研究和推广应用。

关键词 人胰弹力蛋白酶I;放射免疫测定;胰腺癌诊断
中图法分类号 R735.9

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

参考文献

1 Satake K, Chung Y, Umeyama K *et al*. Serum elastase 1 levels in pancreatic disease. Am J Surg, 1982, 114: 239
2 Satake K, Takeuchi T, Homma T *et al*. CA19-9 as a screening and diagnostic tool in symptomatic patients: the Japanese experience. Pancreas, 1994, 9(6): 703
3 Homma T, Tsuchiya R. The study of the mass screening of person without symptoms and of the screening of outpatients with gastrointestinl complaints or icterus for pancreatic cancer in Japan, using CA19-9 and elastase-1 or ultrasonography. Int J Pancreatol, 1991, 9: 119
4 Largman C, Brodrick J, Geodas M *et al*. Purification of two human pancreatic elastase. Biochem, 1976, 15: 2491
5 Greenwood F, Hunter W. The preparation of ^{125}I-labelled human growth hormone of high specific radioactivity. Biochem J, 1963, 89: 114
6 王正品,蔡文琴.蛋白质和多肽激素的放射免疫测定.见:蔡文琴,王泊　主编:实用免疫细胞化学.成都:四川科学技术出版社, 1988. 185~224
7 赵晓晏,于世远,达四平.胰腺癌血清学诊断的临床评价.第三军医大学学报, 1996, 18(1): 26
8 戴晓晶,于世远,郭　萍.胰弹力蛋白酶 I对胰腺癌诊断价值的探讨.中华消化杂志, 1989, 9(5): 229

(收稿: 1997-05-07;修回: 1997-09-15)
(编辑　刘　鹏)

犬实验性残胃癌前病变的核仁组成区相关嗜银蛋白定量研究

Quantitative study of the nucleolus organizer reigon argentophil associated protein of the precancerous condition in the residual stomach in dogs

麻晓林*　周　华　汤礼军　(第三军医大学附属新桥医院普通外科)重庆, 400037
谢　青　(第三军医大学附属新桥医院病理科)重庆, 400037

提　要　目的:研究胃手术后残胃粘膜癌前期检测方法及用于预测癌变趋势的价值。方法:犬施行 Billroth II式胃手术2月后开始喂饲 MNNG,分别于喂饲 MNNG第2,3,4,6,8,10月各时相点进行胃镜检查及粘膜活检,病理学检查及核仁组成区相关嗜银蛋白(AgNORs)染色。结果:从浅表性胃炎到异型增生, AgNORs数目呈递增性增多,颗粒亦渐增大。正常胃粘膜与浅表性胃炎差异不显著($P > 0.05$),而与萎缩性胃炎、肠上皮化生、异型增生相比有显著差异($P < 0.05$)。肠上皮化生和异型增生的 AgNORs变化在反映细胞增殖、染色体倍数及转录活力方面与其它病变类型相比更具癌前意义。结论:AgNORs作为癌前病变细胞增殖活性及细胞分化异常的指标,具有较好的可靠性和可重复性。可为残胃粘膜癌前期病变的早期检测及癌变趋势的预测提供有价值的依据。

核仁组成区嗜银技术(AgNORs)是近年来发展起来的能够定量反映细胞生长、生物学特性的新技术,由于其在肿瘤和癌前病变的鉴别、分级及预后方面的价值,受到肿瘤病理学家的高度重视。本文应用 AgNORs技术对犬残胃癌变过程各期病变标本进行了定量测定,以期能为临床认识胃手术后残胃癌前病变细胞增殖和分化异常,判断其癌变趋势,进行有效防治残胃癌提供一定的实验依据。

1　材料与方法

本地健康雄性杂种犬9只, 2~3岁,体重8~14.5 kg,平均11.2 kg,施行 Billroth II式胃切除术后1月始,自由饮用200 μg/ml的甲基硝基亚硝基胍(MNNG)溶液10个月。喂饲 MNNG第2、3、4、6、8、10个月各时相点进行胃镜(Olympus GIF-XQ10)活检。

标本用10%福尔马林固定,石蜡包埋、切片, HE染色。病理诊断与分级参照全国胃癌研究协作组病理组制定的标准[1]。AgNORs染色采用 Smith银染法[2]。置油镜下观察,根据 HE染色诊断结果,选择相应区域观察 AgNORs颗粒数量、大小、形态、位置。每例随机观察100个细胞,计数位于核仁和核内的单人银染颗粒。计数方法参照1993年6月在上海召开的全国核仁组成区(NORS)学术讨论会所制定的标准[3]。

* 麻晓林　男, 42岁,副主任医师,副教授,硕士

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net