

# 胃癌相关抗原抗血清的制备及应用双向琼脂扩散试验诊断胃癌的初步研究

流行病学教研室

李学信 李 瑛 楚建军  
王少林 翟新民 于鸣娟

胃癌是我国较为常见的恶性肿瘤之一。在各种肿瘤中,胃癌约占30%,死亡顺位常居一、二。胃癌的诊断方法,多沿用x线、胃液分析、脱落细胞学检查、内窥镜检查等手段,难以大面积使用。关于胃癌抗原及其免疫学诊断方法的研究,有不少报道<sup>(1-6)</sup>,但由于特异性不高,待检标本多系胃液,故难以采用,至今多不能应用于临床及流行病学调查研究。我们自1980年以来,开展了胃癌的免疫学诊断研究工作,目的是为摸索一种既特异性高又灵敏度高的实验免疫学诊断方法,以应用于胃癌的临床诊断及现场流行病学调查,本文仅就我们的第一步工作,胃癌相关抗原抗血清的制备及应用双向琼脂扩散试验诊断胃癌的初步研究,小结讨论如下。

## 材料与方 法

一、胃癌相关抗原的制备:取手术切除,经病理证实的胃癌标本5个,在无菌条件下剔除正常胃组织、脂肪等,留下癌组织块,称重,用无菌生理盐水冲洗至无色,在无菌接种罩内将癌组织块剪成米粒样颗粒,再洗至无色,加入2倍0.01 M pH 7.2 PBS(w/v),置磁力搅拌器上

慢速搅拌40分钟,后用100目尼龙布过滤。滤液涂片,瑞氏染色、镜检,观察脱落癌细胞,滤渣同法反复3~4次,直至滤液镜检无脱落癌细胞。合并滤液,经4000 rpm 30分钟,反复3次,沉渣加3倍量0.01 M pH 7.2 PBS液,顺序置-20℃和常温下,反复冻溶3次(同上法染色镜检,直至无完整细胞止),置8000 rpm 40分钟,取上清液,加入硫柳汞(终浓度为1/万),此即为胃癌相关抗原。经751型紫外分光光度计,定氮量平均为1.52毫克/毫升,-20℃保存备用。

二、正常胃抗原的制备:取材为因溃疡病而手术切除的胃标本(经病理证实胃癌早期病变者除外),在剔除溃疡部分组织后,剩下正常胃组织,即可用来制备正常胃抗原,方法与制备胃癌相关抗原基本相同,只是不用磁力搅拌器,而用组织匀浆机(15000转/分)匀浆,将冲洗净的正常胃组织微粒加等量生理盐水,每次一分钟,共八次。制得正常胃组织匀浆,然后顺序置-20℃、常温,反复冻溶3次,镜检无完整细胞,用8000 rpm 40分钟,留上清液。经紫外分光光度计,定氮为0.14毫克/毫升。加入终浓度为1/万硫柳汞,-20℃保存备用。

三、Freund's完全佐剂抗原的制备:

将石蜡油和羊毛脂,按9:1比例混合分装大号试管,高压灭菌,4℃保存备用。取两只10毫升无菌注射器,一只取2毫升抗原,另一只取2毫升Freund's完全佐剂(配方为石蜡油、羊毛脂混合液2毫升,Tween-80 0.2毫升,死卡介苗4毫克),中间连接一聚乙稀塑料管。二人反复来回抽拉15分钟,待充分乳化后(乳剂滴加在冰水上不扩散)即可使用。

四、抗血清的制备:免疫动物为年轻健壮雄性山羊,体重28公斤,其免疫方法如下:

第一次,取胃癌相关抗原2毫升,要求含氮量为5毫克/毫升(原胃癌相关抗原经浓缩而成),加等量Freund's完全佐剂,充分乳化后,分点注射于四足足垫,每点0.5毫升。

第二至第四次,每次间隔10天,除注射部位不同外,方法均同第一次。

第五次,水剂抗原4毫升,分点注射于大腿肌肉。

在末次注射水剂抗原后第10天,颈静脉取血,分离血清,并与胃癌相关抗原做琼脂双扩试验,抗血清效价为1:512,颈动脉放血,收集血清,加入终浓度为

1/万硫柳汞,-20℃保存。

为去除抗血清中非特异成分,在使用之前以正常人ABO型混合新鲜血清吸附抗血清,(其比例为0.3:1)置37℃2小时,然后4℃过夜,次晨4000 rPm 20分钟取上清液。该上清液再用正常胃抗原吸附,比例为1:1.5(正常胃抗原含氮量为0.14毫克/毫升)并用上法处理,所得上清液即为吸附后的抗血清,4℃保存备用。

五、双向琼脂扩散试验:用生理盐水、国产琼脂糖制板(琼脂糖浓度为1.5%),打孔,加样,然后放入带盖湿搪瓷盘内,置20℃分别在24、48、72小时观察结果。凡抗血清孔与被检孔之间出现白色细沉淀线者,判为阳性。琼脂板经氨基黑10B染色,凉干后,保存备查。

结果与分析

一、抗血清是否吸附对沉淀线的影响:

我们用正常人ABO型混合新鲜血清及正常胃抗原,对抗血清进行吸附,在吸附前后,分别作双向琼脂扩散试验,中间孔为抗血清,外周孔为被检血清,结果发现在未经吸附的抗血清板上与被检标本之

表1 抗血清吸附与否其沉淀线出现情况

被检标本	未经吸附的抗血清		吸附后的抗血清	
	沉淀线条数	出现时间(h)	沉淀线条数	出现时间(h)
正常人血清	2	24	0	24
正常胃抗原	2	24	0	24
胃癌病人血清	3	24	1	24
胃癌相关抗原	3	24	1	24

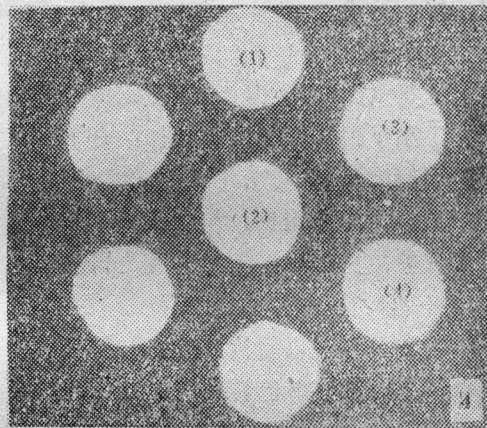
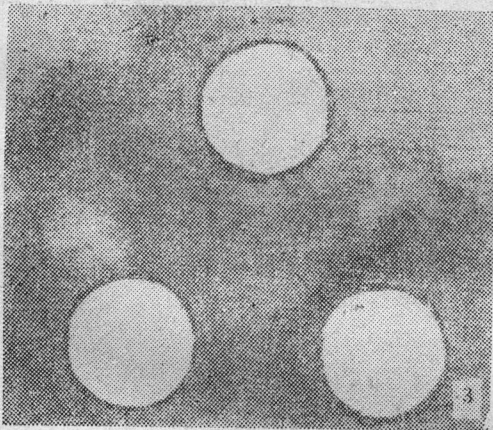
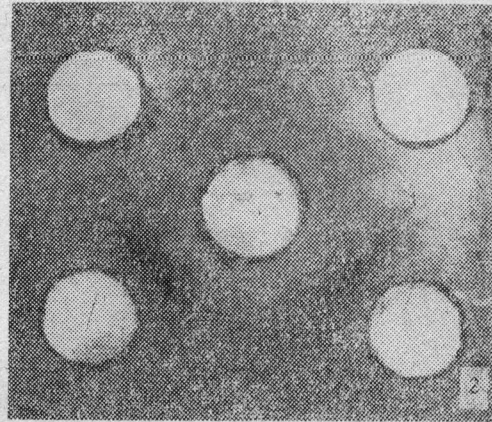
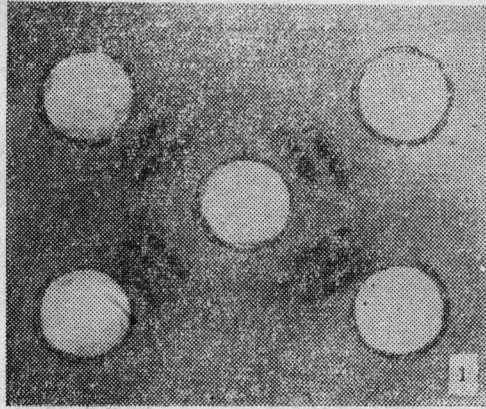


图1 抗血清未经吸附24小时沉淀线出现情况

图2 抗血清吸附24小时沉淀线出现情况

图3 抗血清吸附后与胃癌病人血清双扩试验结果

图4 吸附后抗血清与胃癌病人血清双扩试验结果

表2 不同人群胃癌双向扩散试验结果

检测结果	胃癌病人组	正常对照组
阳性	18	2
阴性	8	30

表3 不同疾病人血清环本检测结果

疾病名称	例数	阳性例数	阴性例数
胃溃疡	1	0	1
食管癌	2	0	2
肝癌	1	0	1
直肠癌	2	0	2
肺癌	1	1	1
宫颈癌	1	0	1

间有2~3条沉淀线,但经过上述方法对抗血清进行吸附后,其间只有一条特异性沉淀线。见表1图1~4。

图1—2标本位置:中间为抗血清孔,左上为正常人血清孔,右上为正常人胃抗原孔,左下为胃癌病人血清孔,右下为胃癌相关抗原孔。

抗血清经吸附后,与被检标本作双向扩散试验,见吸附后抗血清孔与胃癌病人血清孔之间有一条特异性沉淀线。

图4是吸附以后抗血清孔与胃腺癌病人血清、胃腺癌淋巴转移病人血清之间有一条相互融合的特异性沉淀线,而与正常人对照血清之间不出现沉淀线。(1)正常对照血清,(2)抗血清,(3)胃腺癌血清,(4)胃腺癌转移血清。

二、胃癌病人和正常人血清标血检出情况:

我们对27例术后经病理证实为胃癌的病人血清标本和32例正常人血清标本与吸附后抗血清双扩试验,结果见表2。

在27例胃癌病人中,阳性18人,可疑阳性1人和阴性8人,阳性符合率66.67%(18/27),癌阴性率(漏检率)为29.63%(8/27)。正常人32例,阴性

30人,阴性符合率为93.75(30/32),假阳性率(误检率)6.25%(2/32)。

三、不同疾病病人的血清标本双向扩散法检测情况。

我们在收集胃癌血清标本的同时,亦收集到少量的其它病人血清标本,检测结果如表3。

上表提示,在2例肺癌中有1例出现阳性结果,从而说明不同肿瘤之间有某些抗原交叉现象存在。

## 讨 论

随着肿瘤流行病学研究的深入开展,人们对胃癌病因、实验诊断和治疗的研究日趋重视,在生化免疫学诊断方面,文献曾有过不少报道,如测定胃液中的乳酸脱氢酶同功酶试验,尿中吡啶乙酸试验、血清中的四环素荧光试验及皮试等,这类非特异性指标诊断胃癌阳性率一般在63~64.8%,但假阳性率较高(14.7~82.6%)。近年来,在特异性免疫学诊断研究方面,出现了不少可喜的苗头,如胎盘促凝血因子<sup>(2)</sup>,胎盘硫糖蛋白抗原<sup>(3)</sup>,胃癌一癌胚抗原〔CEA〕<sup>(4)</sup>,肿瘤相关胃癌抗原〔TAA—GCA〕<sup>(5)</sup>,和癌组织蛋白抗原

等。其阳性符合率多在53~99%之间,但假阳性率高达12.07%。此外,它们的待检标本均为胃液或组织提取液,故难以推广普及。1972年,沈阳医学院附属一院报道, $\alpha_2$ GP肿瘤抗原<sup>(6)</sup>,阳性符合率在78.8~83.3%之间,假阳性率在15%左右。我们采用的方法阳性符合率较前为低,但假阳性率只有6.2%。由于我们要求病例必须是经病理证实,阳性血清一般取自术后肿瘤患者,可能体液中癌抗原浓度下降而影响了检出率。本试验方法灵敏度虽为66.67%,漏检率29.63%,但特异性却高达93.75%,误检率只有6.25%。除与1例肺癌病人有交叉外,其它尚未见有交叉现象的发生。尽管本实验例数尚少,不足以以下结论,但从总的情况看,如果能取术前胃癌患者的血清,阳性符合率将会提高,故本方法可作为临床辅助诊断指标之一,亦可用作为现场流行病学调查研究中的初筛手段,具有一定的实用价值。

二、在特异性免疫学诊断研究中,不少作者在探索胃癌抗原与相应抗体的免疫学反应的新方法,但由于抗原和抗血清成分复杂,以致特异性较差。我们为了提高这一方法的灵敏度、特异性,首先在抗原取材上,尽量剔除正常胃组织、脂肪和残留血液(块)等,并将癌组织剪成米粒样细小颗粒备用。其次根据癌细胞易于脱落特点,我们采用电磁搅拌器慢速搅拌的方法,收集在搅拌作用下脱落下来的胃癌细胞,制备胃癌相关抗原。第三为去除非特异性成分,我们曾先后使用胃干粉、冻干人混合血浆粉、正常人ABO混合新鲜血清、正常胃抗原等对抗血清进行纯化吸附。结果表明,正常胃干粉、冻干人混合血浆粉的吸附效果不好,而用ABO混合

血清及正常胃抗原吸附效果较为理想。胃癌病人血清孔与抗血清孔之间出现单一白色沉淀线,而与阴性对照血清不出现沉淀线。总结本实验结果,阴性符合率93.75%,假阳性率6.20%,与胃溃疡、直肠癌食管癌、肝癌和宫颈癌不出现交叉现象,从而提示我们所制备的抗原和抗血清特异性较高。

三、用本方法在对不同待检血清检测中,正常人中有二例显现阳性反应(2/32),肺癌病例中有一例亦呈阳性反应(1/2),从而看出尚有交叉现象存在。这就提出我们制备的胃癌相关抗原是否为胃癌病人所特有,还有为肿瘤病人乃至正常人所共有、该抗原的特异性成分是什么等问题,尚有待研究解决。为进一步提高检测方法的灵敏度、特异性,摸索一种更加新的实验方法,是胃癌防治研究中急待解决的问题之一。

### 小 结

本文介绍了用经病理证实为胃癌的术后癌组织块,通过电磁搅拌器慢速搅拌使癌细胞脱落等手段制备胃癌相关抗原,及免疫山羊制备特异性较高的抗血清的技术方法。其次介绍了分别使用胃干粉、正常人胃抗原、正常人混合血浆冻干粉、及正常人ABO血型混合新鲜血清等吸附抗血清非特异性成分的不同效果。第三,在临床实验研究中,我们初步认为,用琼脂双向扩散试验检测血中胃癌相关抗原,可以作为胃癌临床辅助诊断指标和现场流行病学调查研究中的初筛手段,胃癌的阳性符合率66.67%(18/27),正常人阴性符合率93.80%(30/32)。

(在本课题研讨中,得到本院病理教研室、附院内科消化组、外科等单位的大力支持,仅致谢意。)

参考文献从略