

# 用人甲状腺细胞测定 TSI 的实验及其应用

孙梅励 郭芝生 白耀 戴为信 张祖俊 池芝盛

(中国协和医科大学协和医院内分泌科)

## 摘 要

本文报道了单层培养人甲状腺上皮细胞的方法及应用这种细胞来测定正常人和 Graves 氏病患者血清中的甲状腺刺激免疫球蛋白 (TSI) 活性。实验结果表明正常人血清 TSI 水平多数小于 110%，仍有 9.1% 的阳性率。在 Graves 氏患者中没有经过治疗者 TSI% 为  $270 \pm 176.6$ ，阳性率达 86%。而经抗甲状腺亢进药物治疗 2.5 年以上，患者血清 TSI 水平降至正常。测定血清 TSI 水平对 Graves 氏病患者诊断及治疗有一定意义。

Graves 氏病<sup>[1]</sup>是由于活化的类似促甲状腺激素的免疫球蛋白，引起了弥漫性甲状腺肿伴有甲状腺功能亢进症。1956 年 Adams 等人<sup>[2]</sup>和 1971 年 Adams 和 Kennedy<sup>[3]</sup>分别测定了长活性的甲状腺刺激物 (The long-acting thyroid stimulator) 和它的保护物 (Lats-protector) 作为诊断此病的指标。此方法灵敏度差。1973 年开始用人甲状腺切片法<sup>[4]</sup>、甲状腺细胞膜<sup>[5]</sup>、哺乳动物甲状腺匀浆<sup>[6]</sup>来测定 Graves 氏病患者血清中的甲状腺刺激免疫球蛋白 (Thyroid-stimulating immunoglobulin 缩写 TSI)。1974 年 Smith<sup>[7]</sup>建立放射受体实验测定甲状腺刺激因子。近来 Hinds<sup>[8]</sup>，Etienne<sup>[9]</sup>和 Rapoport<sup>[10,11]</sup>等人分别报道了用甲状腺单层细胞培养得到人甲状腺滤泡上皮细胞、建立了测定 TSI 的方法。此法更灵敏、准确、适于临床应用。国内赵武述<sup>[12]</sup>曾报道(1982 年)测 Graves 氏病血清 Lats 变化，1984 年胡仲懿等人<sup>[13]</sup>和冷松等人<sup>[14]</sup>用甲状腺组织切片测定了 Graves 氏病患者血清中 TSI。我室于 1984 年用甲状腺单层细胞培养得到甲状腺上皮细胞，并用它建立了 TSI 的测定方法。此方法用于临床研究。

## 一、材料和方法

### 1. 材料

- (1) 无钙镁盐水 氯化钠 16g、氯化钾 0.8g、磷酸氢二钠(含 12 个结晶水) 0.304g、磷酸二氢钾 0.120g 混合后加 20ml 0.2% 酚红溶液，用水稀释 200ml。灭菌。用时 10 倍稀释。
- (2) 0.25% 胰酶溶液 胰酶活性为 1:250 灭菌。
- (3) 8% 碳酸氢钠溶液(灭菌)。
- (4) 含有 100u 青霉素和 100 $\mu$ g 链霉素无钙镁盐水。
- (5) Earles 培养基配制 不含有谷氨酰胺和碳酸氢钠。为日本制药株式会社出品。用

时加 8% 碳酸氢钠。

(6) 0.5% 胰蛋白酶 用 0.02% EDTA, 0.8% NaCl, 0.04% KCl, 0.058% NaHCO<sub>3</sub>, 0.1% 葡萄糖混合液配制。配好胰酶溶液在 40°C 温育 1h, 溶液变为透明液, 过滤消毒后分装。用时 10 倍稀释。

(7) 小牛血清 大连产品, 56°C, 30min 灭活补体。

## 2. 方法

### (1) 人甲状腺细胞培养

1) 人甲状腺组织的处理 患结节性甲状腺肿或者甲状腺机能亢进的病人, 手术取出的甲状腺组织迅速取回。立即取组织 10g 左右放在烧杯内剪成碎块, 用无钙镁盐水洗四次, 去掉组织的血渍及杂质。然后将组织在冰浴的平皿内用剪刀尽可能剪碎, 用无钙镁盐水洗三次后制备组织悬液。

(2) 组织悬液的制备 将上述组织块加入 20ml 0.25% 胰蛋白酶进行第一次消化, 在 37°C 恒温振荡消化 30min, 消化后组织块自然沉降, 吸去上清液, 再加入 10ml 0.25% 胰蛋白酶进行第二次和第三次消化(方法同第一次)。取第三次消化液 15ml 在低温 500r/m 离心 2min, 去掉沉淀。然后将上清液再放在 1000r/m 离心 5min, 弃掉上清液, 留下细胞沉降物。组织块经过上述操作过程六次重复消化, 最后合并细胞沉降物。用 5ml Eargles 液洗二次, 离心后细胞沉降物加 2ml 含有青霉素和链霉素无钙镁盐水的 Eargles 培养液混匀后, 计算细胞数。使 0.5ml 细胞悬液中含有  $4.0 \times 10^6$  细胞数, 将细胞悬液分别接种在 25ml 的培养瓶内, 每瓶加入 7ml Eargles 氏培养液内含 10% 小牛血清和青链霉素。

(3) 甲状腺细胞培养 接种的培养瓶放在 37°C 恒温培养箱内培养, 第三天可见甲状腺上皮细胞单层生长, 至第九天培养瓶底长满了上皮细胞, 形态正常健康(见图 1) 用这样方法每次培养结果都可以重复。必要时将此细胞传代或液氮冻存, 使用时复苏。

(4) 甲状腺刺激免疫球蛋白实验 (TSI assay): a. 将若干瓶培养液弃掉, 每瓶再加入 3ml 0.05% 胰蛋白酶(内含 EDTA、NaCl、KCl、NaHCO<sub>3</sub> 和葡萄糖) 溶液, 消化 2—5min (在显微镜下监视消化情况, 适时中止消化反应)。离心弃去上清液, 将沉降细胞加 2ml Eargles 培养液(内含 10% 小牛血清及青链霉素)混匀后分瓶, 每瓶加入 0.3ml Eargles 培养液内含  $3.2 \times 10^5$  上皮细胞, 然后分别再加入 0.5ml 的正常人血清库血清或 Graves 氏病人血清, 在 37°C 温育 48h, 甲状腺上皮细胞单层粘着在培养瓶壁上, 倒掉培养液。下列操作全部在 4°C 条件下进行。用 0.2mol/L 磷酸缓冲液 pH7 洗二遍细胞, 倒掉洗液, 再将各瓶加入 0.5ml 磷酸缓冲液, 用带橡皮头的小棒打散细胞。将细胞悬液放在匀浆器内研磨, 得到细胞匀浆。取 0.05ml 细胞匀浆用 Lowry 法测定蛋白质含量。余下 0.45ml 细胞匀浆加入 50% 过氯酸乙醇溶液, 摇匀后用 10mol/L 氢氧化钾调节 pH7.0, 产生白色沉淀, 在 2500r/m 离心 10min, 取出上清液在真空干燥器内抽干, 每管残渣加入 500 $\mu$ l 0.05mol/L 三羟甲基氨基甲烷(内含 0.004mol/L EDTA) pH7.5 的缓冲液溶解, 此溶液用来测定环一磷酸腺苷 (cAMP) 含量。

b. cAMP 放射免疫测定: 用中国科学院原子能研究所生产的 cAMP 药盒。方法灵敏度达 0.25Pmol。方法重复性好。测定值是以每毫克湿重甲状腺蛋白质含有 cAMP Pmol 数 (PM/mg) 为单位。

c. 结果计算: 分别计算出正常血清库和病人血清中每毫克蛋白质含有多少 cAMP 的

Pmol 数, 然后计算 TSI 活性. 计算公式如下:

$$\text{TSI 活性} = \frac{\text{待测血清 cAMP PM/mg 蛋白}}{\text{对照血清 cAMP PM/mg 蛋白}} \times 100\%$$

TSI 阳性判断标准是待测血清的 cAMP 值高于同批对照血清的 cAMP. 即 TSI 活性 > 110%. 我们用的对照血清是具有正常甲状腺及甲状腺功能, 肝功也是正常的人血清混合成为正常血清库, 分装后深冷贮存待用.

## 二、实验结果

### 1. TSI 测定

我们共做了 28 次人甲状腺单层细胞培养, 每次都能得到良好的甲状腺上皮细胞(见图 1), 用来作 TSI 测定都得到较好结果.

### 2. 正常对照组

22 例正常人(男 14 例、女 8 例)临床检查无甲状腺肿大史和甲状腺机能亢进症状, 甲状腺功能检查见表 1. 三碘甲状腺原氨酸( $T_3$ ) 甲状腺素( $T_4$ ) 及人促甲状腺素(TSH) 都是正常的血清的 TSI 为  $69.2 \pm 40.7\%$  ( $\bar{x} \pm SD$ ), 其中 14 例男性正常值为  $74.3 \pm 44.4\%$ , 8 例女性 TSI 为  $60.2 \pm 33.9\%$ . 在正常值中有二例 TSI% 分别为 186.3% 和 116.4% 为阳性结果, 占总人数 9.1%.

### 3. 病理值

我们测定了 Graves 患者血清 TSI 的水平共 50 次, 30 例 Graves 氏病患者(男 5 例, 女 25 例)年岁在 20—67 岁. 经甲状腺  $^{131}\text{I}$  摄取试验和血清  $T_3, T_4$  测定检查而确诊为 Graves 氏

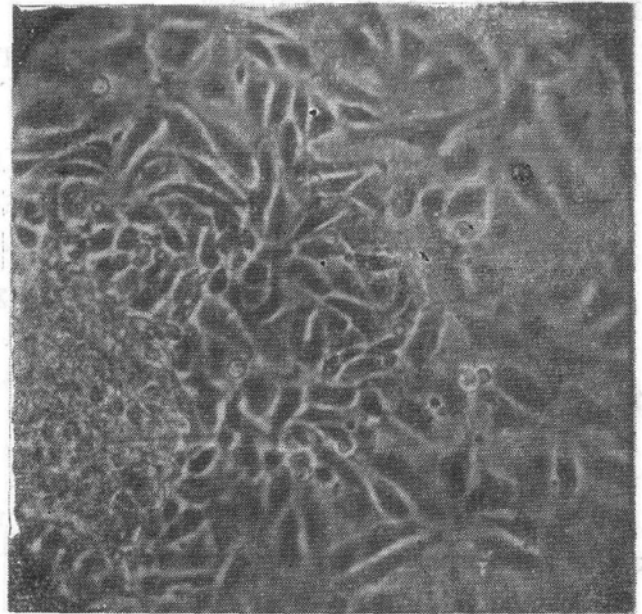


图 1 单层培养的人甲状腺上皮细胞

表 1 正常人和 Graves 氏病患者  $T_4, T_3$  和 TSI 水平\*

项目 组别	例数	$T_4$ ng/ml $\bar{x} \pm SD$	$T_3$ ng/ml $\bar{x} \pm SD$	TSI% $\bar{x} \pm SD$	抗甲状腺药物 治疗时间 (月) $\bar{x} \pm SD$	临床控 制情况
未治疗组	7	104.9 $\pm 36.6$	3.4 $\pm 1.6$	270.3 $\pm 176.6\%$	0	甲亢症状明显
甲亢未控制组	9	102.0 $\pm 44.9$	2.5 $\pm 1.5$	242.4 $\pm 105.0\%$	6.8* $\pm 8.0$	甲亢症状明显
缓解组	14	99.0 $\pm 34.5$	1.6 $\pm 0.9$	47.1 $\pm 30.8\%$	24.3 $\pm 11.2$	甲亢症状被控 制
正常人组	22	87.9 $\pm 11.6$	1.1 $\pm 0.3$	69.2 $\pm 40.7\%$	—	无甲亢正常人

\* 由于本组有二例治疗 21 个月和 24 个月, 甲亢症状仍未控制, 故治疗月分标准差大于平均值.

病患者。将 30 例患者分为未治疗组、甲亢未控制组和缓解组。所测结果见表 1。

从表 1 可以看出,随着用他巴唑或丙基硫氧嘧啶的抗甲状腺药物治疗时间的延长,甲亢症状能够控制,甲亢功能 ( $T_4, T_3$ ) 趋于正常,血清 TSI% 水平也下降。当治疗  $24.3 \pm 11.2$  个月时,多数病人甲亢症状受到控制, TSI%  $< 110\%$  变为正常。并且在 7 例未治疗组中有 3 例经过  $17.7 \pm 5.7$  个月治疗,甲亢症状被控制,甲功转为正常, TSI% 也从  $273.0 \pm 176.6\%$  ( $N = 3$ ) 降至  $64.3 \pm 23.1\%$ , 变为正常。

在缓解组中有 7 例是自身对照。甲亢时 TSI% 为  $222.7 \pm 174\%$  ( $N = 7$ ) 全部为阳性结果,经过  $30.2 \pm 12.2$  月 ( $N = 7$ ) 的治疗, TSI% 为  $37.6 \pm 21.1\%$  全部转为阴性结果,且临床甲亢症状受到控制,甲状腺功能 ( $T_4, T_3$ ) 转为正常。由此可见 TSI% 是反映 Graves 氏病患者病情控制状况的。治疗时间越长 TSI 下降明显。但也有个别病人治疗 24 个月 TSI% 仍不正常。

#### 4. 本室方法与国外同类测定方法比较(表 2)

表 2 表明我们的方法更近似于 Etienne 于 1981 年所测的结果,正常人中 TSI% 阳性率略低些。

表 2 血清 TSI 活性测定方法比较

项目 作者	测定方法	正常值		Graves 氏病早期 TSI 测定		Graves 氏病患者抗甲 亢药物治 1 月至 2.5 年	
		TSI% $\bar{x} \pm SD$	阳性率	TSI% $\bar{x} \pm SD$	阳性率	TSI% $\bar{x} \pm SD$	阳性率
Etienne 1981 年 <sup>[7]</sup>	甲状腺细胞培 养测定 TSI	$100 \pm 20\%$	12%	$204 \pm 14\%$	80%	$131 \pm 9\%$	37%
Simon 1984 年*	甲状腺细胞培 养测定 TSI	$99.7 \pm 15.8\%$	0%	—	95%	—	15%
本 室 1984 年	甲状腺细胞培 养测定 TSI	$69.2 \pm 40.7\%$	9.1%	$270 \pm 176.6\%$	86%	$117 \pm 113\%$	35%

\* Simon, J. B. et al., The assay for Thyroid Stimulating Immunoglobulins Using Cultured Human Thyroid Cells, 待发表。

### 三、讨 论

我们的测定方法对早期 Graves 氏病血清 TSI 的阳性检测率为 86.7%, 经过抗甲状腺药物治疗  $24.3 \pm 11.2$  月, 血清 TSI 阳性率降为 30%。所测 TSI 活性水平能够反映病人甲亢控制情况。并且表明血清 TSI 水平是随治疗时间延长, 逐渐下降的。对于 TSI 降至正常水平的 Graves 氏患者是否再复发甲亢, 这个问题我们正在总结。由于 Lats 法对 Graves 病测定阳性率低; 而 Lats 保护物测定法计算复杂。放射受体测定 TBII 法操作容易、准确, 但常出现假阴性结果。故用甲状腺细胞测定血清 TSI 法阳性率可达 70—100%<sup>[9]</sup>。并且应用人甲状腺细胞可以避免种族特异性干扰, 一次做的标本也较多。对于正常人有 TSI% 阳性结果已有很多报道, 并作了假设分析, 但意见不统一<sup>[9, 13]</sup>。我们正常人中有 9.1% 阳性率, 这二例患者甲状腺功能是正常的, 没有甲亢症状表现。总之根据我们的结果, 我们认为测定 Graves 氏患者的血

清 TSI 活性对 Graves 氏病的诊断和治疗都有一定意义<sup>[1,15]</sup>。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Mckenzie, J. M. et al., *Clinics in Endocrinology and Metabolism*, 7(1978), 31.
- [ 2 ] Adams, D. D. et al., *Proceedings of the university of otago Medical School NZ*, 34(1956), 11.
- [ 3 ] Adams, D. D. et al, *J. Clin Endocr and Metab*, 3(1971), 47.
- [ 4 ] Onaya, T. et al, *ibid.*, 36(1973), 859.
- [ 5 ] Origiazzi, J. et al, *ibid.*, 42(1976), 341.
- [ 6 ] Manley, S. W. et al, *Journal of Endocrinology*, 61(1974), 437.
- [ 7 ] Smith, B. R. et al, *Lancet*, 11(1974), 427.
- [ 8 ] Hinds, W. E. et al, *J. Clin Endocr and Metab*, 52(1981), 1204.
- [ 9 ] Etienne-Decerf, J. et al, *Clin Endocr*, 14(1981), 83.
- [ 10 ] Rapoport, B. et al, *J. Clin Endocr and Metab*, 58(1984), 332.
- [ 11 ] Rapoport, B. et al, *J. Biochem.*, 253(1978), 631.
- [ 12 ] 赵武述, *中华微生物学和免疫学*, 2(1982), 69.
- [ 13 ] 胡仲懿等, *中华内科杂志*, 8(1984), 480.
- [ 14 ] 冷松等, *中华医学杂志*, 64(1984), 200.
- [ 15 ] Smyth, P. P. A. et al., *Acta Endocrinologica*. 111(1986), 321.