

游离甲状腺素测定方法学进展及临床研究

上海第一医学院核医学研究所 钟志端综述

上海第一医学院华山医院 林祥通审

血清甲状腺素(T_4)呈结合及游离二种存在形式。前者主要与甲状腺素结合球蛋白(TBG)、甲状腺素结合前白蛋白(TBPA)及白蛋白(A)结合。这部分占 T_4 总量的99.95%以上。而后者仅占0.01~0.05%^[10]。游离 T_4 (FT_4)虽然含量甚微,却是甲状腺素进入组织发挥生理作用的部分。血清结合 T_4 含量直接受到甲状腺素结合蛋白(TBP),尤其是TBG含量影响。当TBG含量升高(或降低)时,结合 T_4 含量亦相应升高(或降低),但 FT_4 浓度则能维持在相对稳定的水平,只在甲状腺功能异常等情况下才发生变化。因此,测定血清 FT_4 最能精确反映甲状腺的功能状况。1962年, Sterling K^[6]等首创用平衡透析法测定血清 FT_4 ,虽然该法较精确可靠,但测定较复杂不宜临床实验室开展常规工作。以后不少较为简便、快速的间接、直接测定 FT_4 的方法相继产生。特别是近年来直接测定法日趋受到重视,尤其应用固相技术后测定速度大大加快,操作更为简便,可靠性亦进一步提高,为临床研究及疾病诊断提供了有力的工具。本文就 FT_4 测定方法学进展及其临床研究状况

作一择要概述。

一、方法学进展

(一)间接测定法

1965年, Clark^[1]首创用血清蛋白结合碘(PBI)与血清三碘甲状腺原氨酸(T_3)树脂吸收率(T_3RUT)的乘积($PBI \times T_3RUT$)作为反映血清 FT_4 浓度的指标,称作游离甲状腺素指数(FT_4I)。 FT_4I 值由PBI及 T_3RUT 决定,由于二者受TBG影响结果正相反,因而在一定程度上纠正了TBG的干扰,1970年, Harmada等^[2]为了进一步纠正TBPA对测定的影响,把Clark FT_4I 改良成校准 FT_4I (Corrected FT_4I)。1975年,他们^[3]又把它改进成新 FT_4I (New FT_4I)。但是,不论Clark FT_4I 还是改良后的 FT_4I 都要测定二个或二个以上数据,而且不能直接得出血清 FT_4 浓度值。以后Burr WA等^[4]采用的 TT_4/TBG 比值及其他指标,如ETR等也都有类似的缺点。从方法学上讲,间接测定法只是消极地纠正而不能积极地避免TBP的干扰,这是间接测定法最根本的缺陷。

的是要检验这一假说。

作者把60只13~16周龄的雄性小鼠分成两组,(1)预防组:于照前15分钟1次腹腔注射0.25ml(300毫克/公斤体重)pH7.0的AET磷酸缓冲液;(2)对照组:于照射前15分钟仅腹腔注射0.25ml pH7.0的磷酸缓冲液。以不同照射量率的 $^{60}Co-\gamma$ 线照射10分钟,吸收剂量分别为0、50、100、175和250拉德。照射后24小时处死动物。以改进的Schmid氏法取股骨骨髓制片,瑞氏-姬姆萨染色。每只动物至少观察500个含微核及不含微核的多染性红细胞(PCE),与此同时也计数含微核和不含微核的正色性红细胞

(RBC)数。资料通过回归的协方差及方差分析。结果与Heddle(1975)报告的结果一致。作者列表(见表1)并绘图比较了经AET预防的各辐射剂量组与相应对照组的微核率。结果表明,使用AET防护剂各组较相应对照组的PCE微核率显著降低($P < 0.01$)。证明AET能减少受照射动物微核率的产生。

最后,作者在结合微核形成机制的讨论中认为,本实验结果进一步证明AET是一种能与DNA结合并防止DNA分子受损伤的辐射防护剂。

(霍来文 李藏珍摘 白玉书 刘及审校)

(二) 直接测定法

本类测定方法与间接法完全不同, 具有直接测得FT₄浓度, 受TBP干扰小的显著优点。

1. 早期的测定方法: 用平衡透析法 直接测定血清FT₄浓度是由Sterling K等^[5] (1962) 首先提出来的。尽管该方法比较繁琐, 临床实用价值不大, 但因较精确可靠, 故常作为经典的FT₄测定法用以鉴定其他方法时的对照研究。70年代, 有人测定尿液FT₄含量来估计血清FT₄水平。用这种方法测定时病人不用抽血, 但收集24小时尿液比较麻烦, 还受到尿量、饮食、气温、肾功能等因素影响, 尿中代谢产物也会干扰测定。故此法仍不理想, 未能推广。比较早期的FT₄测定方法还包括超速离心、反向电泳等方法^[6]。但这些方法均较复杂, 不宜临床常规应用。

2. 葡聚糖凝胶结合法: 1974年, Irvine^[7]提出用葡聚糖凝胶结合法测定血清FT₄。他发现500mg葡聚糖凝胶G25加入含40μl血清、¹²⁵I-T₄、4ml生理缓冲液的混合液中, 在37℃温育10分钟, 结果洗脱液中游离¹²⁵I-T₄含量为与葡聚糖凝胶结合¹²⁵I-T₄含量的12%, 且这一比值不受血清总T₄及TBG含量变化的影响。将与葡聚糖凝胶结合¹²⁵I-T₄乘12%即为洗脱液中游离¹²⁵I-T₄, 把游离¹²⁵I-T₄比上洗脱液中总¹²⁵I-T₄便为洗脱液游离¹²⁵I-T₄比值。若洗脱液中TT₄/TBP比值与未稀释血清TT₄/TBP比值相同, 则这一游离¹²⁵I-T₄比值即等于该血清FT₄比值。其乘以已知的该血清TT₄浓度便为该血清FT₄浓度。用本法测定的关键在于保证洗脱液TT₄/TBP比值与未稀释血清中的相同, 否则洗脱液游离¹²⁵I-T₄比值不能代表血清FT₄比值。

1981年, Harpen等人^[8]利用葡聚糖结合法的原理, 提出同时测定血清FT₄及TBG的方法。该法除有葡聚糖凝胶结合法的某些优点外, 还能同时得到TBG值。虽然测定及计算过程较前复杂, 但如果计算部分由计算机担任, 整个测定过程仍很方便。现将此法简单介绍如下:

在一装有葡聚糖凝胶的系统中, 各部分的

T₄含量可用下式表示:

$$(V-I)\rho_B + (V-I)\rho_F + \alpha\rho_F = V\rho_{T_4} \quad (1)$$

式中, V表示混合反应液总体积, I表示进入体积, V-I表示洗脱体积, ρ_F 表示洗脱体积中FT₄浓度, ρ_B 表示洗脱体积中结合T₄浓度, ρ_{T_4} 表示加入葡聚糖凝胶前的最初T₄浓度, α 则表示结合于葡聚糖凝胶T₄含量与洗脱体积中FT₄含量的比例常数。如果用 ρ_S 表示洗脱体积中TT₄浓度,

$$\text{则 } \rho_S = \rho_F + \rho_B \quad (2)$$

在这一系统中加入¹²⁵I-T₄, 于葡聚糖凝胶装入前测得的计数率为R₀, $\rho_{T_4} = \rho R_0$, 于葡聚糖凝胶装入后测得的计数率为R₁, $\rho_S = \epsilon R_1$; 在后者中再加入一定量T₄后所测的计数率为R₁'。I、V、 α 均可在特定条件下测得, ρ_{T_4} 可通过已知的TT₄浓度推算出。将(1)式变形, 便能求出洗脱液中FT₄比值、 ρ_B/ρ_F 比值及 ρ_F :

$$FT_4 \text{ 比值} = \rho_F/\rho_{T_4} = [V + \frac{R_1}{R_0} (I - V)] / \alpha \quad (3)$$

$$\rho_B/\rho_F = \alpha [V + \frac{R_1}{R_0} (I - V)]^{-1} - 1 \quad (4)$$

$$\rho_F = \rho_{T_4} \times FT_4 \text{ 比值} \quad (5)$$

血清游离及结合T₄浓度与TBP量及亲和力有关。当 $\rho_F \ll K_2$ 时, $\rho_B/\rho_F = C_1 / (8.2 \times 10^{-6} + \rho_F) + G$ (6)

式中, $G = C_2/K_2 + C_3/K_3$, $K_{1,2,3}$ 及 $C_{1,2,3}$ 分别代表血清TBG、TBPA和A的亲和力及量, $K_1 = 8.2 \times 10^{-6} \mu\text{g/ml}$ 。设 $Y = \rho_B/\rho_F$, $X = (8.2 \times 10^{-6} + \rho_F)^{-1}$ (7)

$$(6) \text{ 式可变形为: } Y = XC_1 + G \quad (8)$$

将 R_1/R_0 及 R_1'/R_0 代入(3)(4), 利用(5)(7)可得到 X_1, Y_1, X_2, Y_2 。而

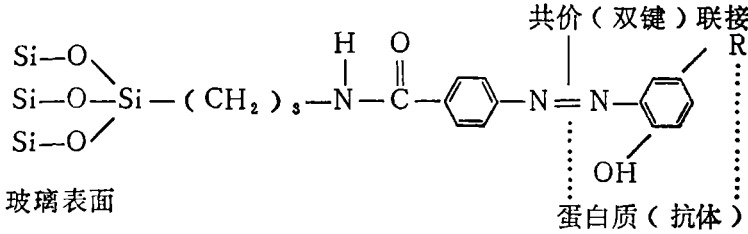
$$C_1 = (Y_2 - Y_1) / (X_2 - X_1); \\ G = Y_1 - C_1 X_1 \quad (9)$$

为了求得相应未稀释血清中 C_1 及G, 必须将(9)式所得值分别乘以稀释因子, 该值等于洗脱体积除以加入试管的血清体积。在生理条件下结合T₄浓度(ρ_B)等于总T₄浓度

(ρ_{T_4}) 减去游离 T_4 浓度 (ρ_F)。因此, 体内 ρ_F 及 ρ_{T_4} 关系式可表达为:

$$\frac{\rho_{T_4} - \rho_F}{\rho_F} = \frac{C_1}{8.2 \times 10^{-5} + \rho_F} + G \quad (10)$$

将已知未稀释血清的 ρ_{T_4} 、 C_1 、 G 值代入 (10) 式后便能求出未稀释血清的 FT_4 浓度。



将这种已固定于载体的 T_4 抗体定量加入反应液中温育一定时间。微玻璃球混悬于反应液中提供了相当大的反应面积, 使反应迅速达到平衡。离心后反应中止, 玻璃微球因比重较大而沉淀, 与游离抗原完全分离。随后测定沉淀部分计数率, 绘制标准曲线, 并从中求出各标本血清 FT_4 值。

在康宁 FT_4 中, 因所依据的原理略不同又有方法一、二之分。方法一以测定快速为其特点, 整个测定过程仅需时 50 分钟, 但测定受 TBG 影响较大, 可靠性相对较差。

Amerlex FT_4 测定法是 Midgley 和 Wilkinse^[10] 1981 年提出的。当半抗原 T_4 偶联一蛋白质分子后便成为完全抗原。而这种完全抗原被抗体及 TBP 识别结合的情形却是不同的。这就有可能合成某种 T_4 衍生物, 他既保持了被抗体识别结合的功能, 同时又由于在结合位点处或其附近的空间障碍或离子排斥效应使其失去与血清 TBP 结合的能力。Amerlex FT_4 测定正是利用了这种特殊衍生物的标志品—— ^{125}I - T_4 衍生物。与常规的 TT_4 、AFP RIA 技术相仿, ^{125}I - T_4 衍生物抗体结合率与 FT_4 浓度呈反相关系。最终利用标准曲线求出各标本 FT_4 浓度。 ^{125}I - T_4 衍生物的特殊结合关系见图 1。本法的关键在于①制备这种性能独特的 T_4 衍生物; ②为避免 FT_4 /TBG 平衡对测定的干扰, 应尽量减少抗体用量, 因而对抗体质量如纯度、特异性、亲和力方面要求很高。

3. 固相测定法: 血清 FT_4 固相放射免疫测定法目前较常用的有康宁 (Corning) FT_4 和英国放化中心的 Amerlex FT_4 。固相 FT_4 测定是先将 T_4 抗体蛋白质用化学方法联接于微玻璃球载体表面。其化学结构式为^[9]:

由于本法操作简便、快速、可靠、重复性好, 目前欧洲已有九个国家的实验室在使用。

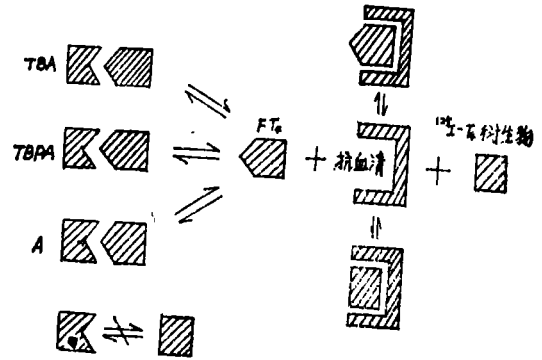


图1 ^{125}I - T_4 衍生物的特殊结合关系示意图

4. 数学计算法: 日本学者 Shishiba^[11] (1983) 提出从 TT_4 及 TBG 二值计算 FT_4 。他用常规 RIA 测出 TT_4 及 TBG 后代入下式计算:

$$FT_4 = \frac{-(R_0 \cdot K - TT_4 \cdot K + 1)}{2K} + \frac{\sqrt{(R_0 \cdot K - TT_4 \cdot K + 1)^2 + 4K \cdot TT_4}}{2K}$$

式中, K 暂定为 0.25, $R_0 = 1.07 \times TBG$ (RIA)。倘若没有计算机帮助, 用本计算方法很难开展常规工作, 不过在一些已有常规 TT_4 、TBG RIA, 又具备计算机的实验室不妨可以借用此法。据 Shishiba 报道, 该法 Damon FT_4 RIA 的相关性很好 ($r = 0.91$, $P < 0.01$)。

在 FT_4 直接测定法中还有微囊抗体放射免疫测定、抗体外套管放射免疫测定, 酶促免疫

分析等分析技术⁽¹²⁾，因已有文章介绍，这里不再赘述。

二、临床研究

(一) 比较研究：

FT₄平衡透析测定法为一般公认的经典方法，常用以对照研究。从表1可发现Amerlex FT₄测定法与平衡透析法的相关性($r=0.98$)明显比康宁FT₄测定法与平衡透析法的相关性($r=0.49$)好。而FT₄-S测定法与Amerlex FT₄测定法相关性亦很好($r=0.91$)。可见

Amerlex FT₄测定法和FT₄-S测定法均较理想。用FTI、TT₄/TBG、FT₄-S测定法及Amerlex FT₄测定法分别与TT₄作相关分析，可发现FTI与TT₄相关性最好，后二者与TT₄相关性较差，TT₄/TBG与TT₄相关性居中。TT₄含量明显受血清结合蛋白影响不能客观反映FT₄水平。所以与TT₄相关性愈好只能说明其可靠性愈差。Amerlex FT₄及FT₄-S测定法因与TT₄相关性差而从反面证明了前述可靠性较好的结论。

各种方法对各甲状腺功能组的分辨能力不

表1 各种方法的相关性研究

作者	比较的方法(Y-X)	相关系数	可靠性
Hamada et al ⁽³⁾	New FT ₄ I-Clark FT ₄ I	0.924	P<0.001
Hamada et al ⁽³⁾	Corrected FT ₄ I-New FT ₄ I	0.875	P<0.001
Edeling et al ⁽¹³⁾	Clark FT ₄ I-TT ₄	0.93	
Edeling et al ⁽¹³⁾	TT ₄ /TBG-TT ₄	0.84	
Edeling et al ⁽¹³⁾	FT ₄ -S-TT ₄	0.76	
Edeling et al ⁽¹³⁾	Amerlex-TT ₄	0.79	
Midgley et al ⁽¹⁰⁾	Amerlex-平衡透析法	0.98	
Edeling et al ⁽¹³⁾	Amerlex-FT ₄ -S	0.91	
Midgley et al ⁽¹⁰⁾	Amerlex-FT ₄ I	0.95*	
Chopra et al ⁽¹⁴⁾	Corning II FT ₄ -平衡透析法	0.49	P<0.01
Chopra et al ⁽¹⁴⁾	Corning II FT ₄ -FT ₄ I	0.89	P<0.001
Shishiba et al ⁽¹¹⁾	Calculated FT ₄ -DamonFT ₄	0.91	P<0.01

* 回归方程为 $Y=0.4 X^2+0.41X+0.26$ ，非线性关系

尽相同。1981年，Midgley等⁽¹⁰⁾对598例(其中甲亢37例、甲减41例，甲功正常520例)作对比研究，发现Amerlex FT₄测定法对甲功正常、甲亢、甲减三种情况的分辨力均较FT₄I好，而后者又比TT₄好。Kaptein⁽¹⁵⁾发表了八种方法(平衡透析法、Damon FT₄、康宁FT₄、抗体外套管放射免疫测定、Clark FT₄I及新FT₄I、酶促免疫分析法、TT₄)对非甲状腺疾病患者(NTI)FT₄测定的比较研究结果，发现平衡透析法、抗体外套管放射免疫测定法及酶促免疫分析法能较好地分辨低TT₄、NTI组与甲减组。这三种方法所测的低TT₄、NTI组FT₄浓度均在正常范围。而其他几种方

法所测值均低于正常，与甲减病人不能鉴别。

(二) 影响因素：对血清FT₄的影响因素很多，有生理性、病理性、药物性，也有测定方法本身的原因。

1) 年龄：Degrossi⁽¹⁶⁾报道，正常人群血清FT₄浓度随年龄增加而下降，其下降幅度较T₃略小，但较TT₄下降幅度大。例如：60岁以后TT₄值为20岁时的83%，但同样情况下FT₄值为73%。有研究资料表明血清TBG含量随年龄增加而增加，这可能是导致血清FT₄随年龄增加而下降的部分原因。

2) 疾病：某些有心脏、肝脏、肾脏疾病的患者，虽然临床上没有甲状腺功能低下的征

象,但血清TT₄及FT₄I值常在“甲减”范围内。Midgley等^[10]用FT₄I及AmerlexFT₄测定法研究了25例慢性肾功能衰竭患者,这些病人均无甲减的临床表现。当用FT₄I时,60%的人低于正常范围,而用AmerlexFT₄测定时,60~70%在正常范围。同样的情形还可在家族性甲状腺结合球蛋白异常病人中发现。造成这种现象的原因是血清TBG含量变化干扰了测定。上述第一类患者均有不同程度肝脏合成TBG减少或TBG丢失过多,导致血清TBG含量下降。前面已述血清TT₄明显受到TBG影响故低于正常;FT₄I亦不能完全纠正TBG影响,故大部分也低于正常;只有AmerlexFT₄不受TBG干扰,所以较真实地反映了FT₄水平。当然亦不排除部分病人血清FT₄确实低于正常,但可能处于与正常下限临界水平,临床上没有明显的甲减征象。

3) 药物:据初步研究表明,口服避孕药一般对FT₄I及FT₄测定无明显影响。T₄替代治疗可增大各甲状腺功能组之间FT₄I及FT₄范围的重叠程度,降低分辨力。抗癫痫或抗炎药物对FT₄测定影响较小,但FT₄水平一般处于正常低值范围。可能与这类药物降低血清FT₄浓度有关^[10]。

(三) 妊娠对血清FT₄的影响:关于妊娠期间血清FT₄浓度问题目前争议较大。各家用平衡透析法对孕妇血清FT₄测定得到三种不同的结果——不变、升高、降低。由于各实验室测定时,孕妇的人数、年龄、妊娠周期等均不相同,因而很难对上述结果作出较客观的估价。用其他方法也同样显示出不一致。一般用FT₄I和康宁固相FT₄测定均显示妊娠组与正常组相同^[14,17~19]。用AmerlexFT₄测定则显示FT₄浓度于妊娠时下降。比较有意义的是Midgley等^[10]用ClarkFT₄I和AmelexFT₄二种方法同时测定了107名甲状腺功能正常的孕妇血清,结果在整个妊娠期ClarkFT₄I无明显变化。在妊娠第九个月时,AmerlexFT₄呈持续、稳定的下降趋势。Hopton等^[20]用AmerlexFT₄及康宁固相FT₄对26名甲功

正常、妊娠36~38周孕妇的测定显示:用AmerlexFT₄时有50%被检者FT₄浓度下降,而用康宁固相FT₄时与正常无异。更有意义的是用其他方法,如直接透析法^[21,22]及对称比率透析法(Ross和Huber1982)等也得到了与AmerlexFT₄法同样的结果。对妊娠期间FT₄浓度下降的可能解释是:妊娠前三个月血清T₄及TBG同时升高,以后T₄浓度相对稳定,而TBG浓度仍持续、缓慢上升,结果使FT₄浓度出现逐渐下降的趋势^[10]。当然对这种解释的圆满程度仍有待商榷。

也有人对AmerlexFT₄的结果表示怀疑。Mardell和Cramlen认为肝素诱导增加血清非酯性脂肪酸(NEFA)浓度,使AmerlexFT₄浓度呈假性降低,因为NEFA可能将标记的T₄衍生物从白蛋白中置换出来。但是,Wilkins和Midgley否定了这种观点,他们证实了即使妊娠期血清NEFA水平相当高,也不可能影响AmerlexFT₄的浓度^[20]。

尽管妊娠期间血清FT₄浓度问题比较复杂,但目前一般倾向于认为妊娠期血清FT₄水平降低。有关下降幅度及下降时期的研究报道很少,而且亦不一致。Midgley^[10]报道下降期在妊娠36周左右;Avruskin等^[23]发现妊娠最初三个月FT₄浓度呈正常低值,以后逐渐呈轻度下降趋势。

三、结语

测定血清FT₄最能精确反映甲状腺的功能状况。在测定方法中,直接法明显比间接法优越。目前直接测定法已发展到十分简便、快速、可靠、精确的程度。尤其是固相FT₄测定法受到普遍重视。国际上已有商业性FT₄试剂盒(Kit)供应,促进了这一测定技术的普及。可以预见,直接测定血清FT₄有希望成为甲状腺功能检查的首选筛选试验。

国内血清FT₄测定工作尚属探索研究阶段。由于目前尚缺乏精制的高品质抗体及优质高比度放射性同位素标记品及多孔玻璃等固相分离剂,给这一研制工作带来了困难。但少数单

位仍然根据我国具体条件,进行FT₄测定研究工作,并取得了某些经验和进展。葡聚糖凝胶结合法测定血清FT₄,简便、快速、可靠,其最突出的优点是试剂简单,不需要精制的抗体、抗原。如无条件进行固相FT₄测定,葡聚糖凝胶结合法,无疑是我们目前可以尝试的比较现实的测定方法。

参考文献

1. Clark F et al: J Clin Endocrinol 25:39, 1965.
2. Hamads S et al: Clin Chem Acta 63: 129, 1963.
3. Hamada S et al: J Clin Endocrinol 31:166, 1970.
4. Burr WA et al: Clin Endocrinol (oxf) 11:333, 1979.
5. Sterling K & Hegedus A: J Clin Invest 41:1031, 1962.
6. 赵惠扬等: 核医学 P227, 上海科学技术出版社 1981.
7. Irvine CHG: J Clin Endocrinol 38:655, 1974.
8. Harpen MD et al: J Nucl Med 22:246, 1981.
9. Free T₄ (IMMO EHASE) Corning Medical, Corning Limited Printed in England.
10. Midgley JEM & Wilkins TA: Amersham International Limited, Amersham U.K. 1981.
11. Shishiba Y et al: Eur J Nucl Med 8:1, 1983.
12. 李振甲: 中国人民解放军军医进修学院学报 3:405, 1982.
13. Edeling CJ et al: Eur J Nucl Med 8:131, 1983.
14. Chopra IJ et al: J Clin Endocrinol 51:135, 1980.
15. Kaptein EM: J Clin Endocrinol 52:1073, 1981.
16. Degrossi OJ et al: Proceedings of the Third World Congress of Nuclear Medicine and Biology August 29-September 2, 1982 Paris France P1137, Ed by Raynaud, C. Pergamon Press, Paris Oxford New York.
17. Braverman LE et al: J Nucl Med 21: 233, 1980.
18. Tuttlebee JW & Bird R: Ann Clin Biochem 18:88, 1981.
19. Bakker AJ & Terpstra I: J Clin Chem Clin Biochem 19:347, 1981.
20. Hopton MR et al: Clin Endocrinol 18: 143, 1983.
21. Kurtz A et al: Br Med J 2:550, 1979.
22. Giles AF: Clin Endocrinol 16:101, 1982.
23. Avruskin TW et al: Am J Med Sci 271: 309, 1976.

核医学检查过程中某些因素及 药物对放射性药物分布的影响

上海第一医学院附属中山医院临床核医学研究室 赵惠扬 张亚田*综述
天津医学院附属医院同位素科 卢倜章 审

近几年来,很多学者注意到某些药物及因素对放射性药物的分布(即药物动力学)有影响。这些影响不包括因产品质量不良或标记过程中的技术差错所引起的不良结果^[1,3]。本

文总结了某些疾病、药物及其他因素对各种放射性药物分布的影响,以供核医学医师在诊断过程中作参考。现按各种常用的脏器显象分述如下^[2]。

* 现美国纽约州立大学下州医学中心研究生院生物物理系研究生