

# 颅内肿瘤与类固醇激素受体测定

上海医科大学华山医院 乔 健综述 林祥通 唐 谨\*审

对中枢神经组织及肿瘤与类固醇激素受体之间关系的研究近几年正在逐步开展。一些学者已经在颅内脑膜瘤、听神经瘤等一些组织中发现了类固醇激素受体,其中以雌激素、孕激素受体的研究较多。目前认为,测定肿瘤中类固醇激素受体对指导临床肿瘤的内分泌激素治疗有重要价值;了解中枢神经系统组织中不同受体分布的具体部位,常可提示某些中枢结构的功能,对进一步进行神经生物学、生理学和药理学研究具有重要意义<sup>[1,2]</sup>。

## 方法学研究

用于类固醇激素受体测定的方法很多,基本方法是<sup>3</sup>H或<sup>125</sup>I标记的类固醇激素作配体,与含有受体的样品进行结合,然后通过一定的分离方法将激素-受体复合物与游离的激素和结合较松散的那部份(非特异性结合)分开,在液体闪烁计数器上测定激素-受体复合物的放射性。再经过计算,求出样品中受体的含量<sup>[3,4]</sup>。目前,用于中枢神经组织及肿瘤类固醇激素受体测定的方法有以下几种:

1. 蔗糖梯度密度离心<sup>[4~6]</sup>:样品0.3~0.6g,从颅内肿瘤外科手术时获得。组织离体后应立即冰冻在-70℃,最好置于液氮中保存,一般不超过4~8周。分析时取出称重,在冰水浴中剪碎成小块,加2~4倍体积的Tris-HCl缓冲液(10~50mmol/L)或磷酸缓冲液(10~20mmol/L), (这些缓冲液中含1~2mmol/L EDTA,可防止受体聚集;0.25mol/L蔗糖对细胞核有保护作用;10%甘油(W/V),有利于对雌、孕激素受体的测

定)进行组织匀浆。匀浆液经低速离心(600~800g),上清液再经超速离心(105 000g或更高),即为可用于受体测定的细胞浆。然后,用20nmol/L<sup>3</sup>H类固醇激素与细胞浆(200~450μl), 0~4℃,温育2h。与此同时,用过量的100倍非标记的类固醇激素作非特异性结合。其后,200μl标记的细胞浆被分层在10~30%(W/V)蔗糖线性梯度Tris-HCl或磷酸缓冲液中,369 000g,2h,2℃离心。随后,分别测定收集于液闪瓶中收集物的放射性计数。收集4s和8s部份,只有8s部份是用于受体定量,4s部份主要由非受体蛋白组成<sup>[7]</sup>。最后,受体浓度由总类固醇受体结合减去非特异性结合而计算出来,并用结合位点的fmol/mg细胞浆蛋白表示。这个方法是依据分子大小分离受体复合物,方法虽然可靠,但较费时,代价昂贵,不适用于作常规分析。

2. 聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦<sup>[8,9]</sup>:起先用于雌激素受体测定,后又延用于肾上腺皮质激素受体测定。其细胞浆制备方法均同蔗糖梯度离心法,同样用<sup>3</sup>H类固醇激素与胞浆液孵育,然后按胞浆液总量的1/3容量加入右旋酞酐包埋活性炭(简称D.C.C)0~4℃,振动5~30分钟,以除去非结合的激素。然后,0℃离心(1500~3000g)10分钟。吸取200μl上清液加在已经预聚焦的聚丙烯酰胺凝胶板上行等电聚焦。聚丙烯酰胺凝胶板按Karlsson氏方法制备。每块凝胶板可同时测定8~10个样品。等电聚焦电泳条件是电流为20mA,电压逐渐增大至1200V。整个聚焦过程为1.5~2h。全过程在2~4℃冷室中进行。聚焦完毕后,取下

\*中国医学科学院日坛医院核医学科

凝胶。用表面电极测定凝胶板上每厘米距离间的pH值。然后,将凝胶板按所测样品的横向切成 $5 \times 2.5\text{cm}$ 的凝胶条。每一凝胶条又按pH值由高至低的顺序切成 $3\text{mm}$ 宽的17个小条,每个小条顺序置于液闪瓶内,每个瓶中加入 $5\text{ml}$ 闪烁液。剧烈振荡所有小瓶, $50^\circ\text{C}$ 放置 $1\text{h}$ 。然后在液体闪烁计数器中计数,并点画出每一小瓶凝胶条的放射性曲线图。根据所测受体的等电点便可寻知受体的放射性,再将放射性换算成 $\text{fmol}$ 受体/ $\text{mg}$ 胞浆蛋白。这个方法的优点是除能测出特异性结合的放射性外,还有等电点作为另一重要鉴定指标,但是,它整个过程显得比较麻烦,从临床应用角度看不能说是一个较好的方法。

3. 荧光组织化学技术<sup>[1,10]</sup>: 样品采集方法同上。是用低温恒温冰冻切片技术将组织切片至 $6 \sim 10\mu$ 厚度。一片用苏木素-伊红(H·E)染色作普通光学显微镜观察。两片用类固醇荧光染色技术处理后,在一个湿润的容器中温育 $2\text{h}$ 。然后用磷酸缓冲液洗涤两次,每次 $5\text{分钟}$ ;同时用两片以磷酸缓冲液处理作阴性对照。在显微镜下可看到被荧光素染色的肿瘤激素受体,被染色的肿瘤细胞荧光密度范围在 $35\%$ 以下,即为类固醇激素受体弱阳性(+);如果范围在 $35 \sim 65\%$ 之间,即为中度阳性(++);如果肿瘤荧光染色细胞超过 $65\%$ ,即为强阳性(+++)。这个方法有简便、快速的优点,但不能对激素受体作精确定量。

4. 葡聚糖-活性炭吸附法<sup>[3,12~15]</sup>: 这个方法是在组织匀浆、离心取得胞液后加入D.C.C悬浮液( $0.5\%$ 活性炭、 $0.05\%$ 葡聚糖),用以吸附掉组织内源性激素。振荡 $5\text{分钟}$ ,然后 $2000 \sim 10500\text{g}$ 离心,取上清液 $500\mu\text{l}$ ,加入 $5 \sim 7\text{ml}$ 闪烁液。过夜后,在液闪仪中测定放射性计数。再换算成 $\text{fmol}/\text{mg}$ 肿瘤蛋白。可以看出葡聚糖-活性炭吸附法是分离各类结合与未结合类固醇激素最普通的方法。活性炭能吸附游离的类固醇激

素,而葡聚糖可防止前者对激素-受体复合物的吸附。实验证明这种方法简便、迅速、经济,又能同时测定大量样品。所以,比较适用于临床作常规分析。现在普遍使用的D.C.C法,通常是在非特异性结合管中加入过量非标记甾体激素( $100\text{倍}$ ),使特异性结合完全饱和。由于非特异性结合有很高的容量,这样就不会产生竞争作用。在雌激素受体测定中常用乙烯雌酚(DES)作为非标记甾体激素,因为DES不与血浆蛋白和甾体激素结合蛋白(SBG)结合,却能与雌二醇竞争其受体(雌二醇能与血浆蛋白和SBG结合),所以非特异性结合管中其反应达到平衡时,标记物几乎全由DES取代而与受体结合。测得的结合物的标记量大致代表了雌激素标记物同血浆蛋白和SBG的结合(即非特异性结合),从总结合中减去非特异性结合即可得到特异性结合。

5. 实验方法的若干改进: ①近年来,由于人工合成了一种孕激素化合物(R-5020),它比孕酮的生物活性高几十倍,使先前用D.C.C法测定孕激素受体结果不理想的情况得以纠正。因为孕酮受体测定中,激素与受体结合的解离常数比较高,且类固醇激素结合蛋白(CBG)的存在对受体测定结果有严重干扰。然而,R-5020与孕酮受体的结合不受CBG的干扰,所以为孕激素受体测定提供了一条新途径<sup>[8]</sup>。②为了便于一般实验室进行激素受体研究,在制备组织细胞浆的离心条件方面,以往国外文献都介绍用高速或超速离心上清液制取。近年来,许多学者利用常速( $1000 \sim 3000\text{g}$ )离心条件制备胞浆和分离特异性结合甾体受体与非特异性结合部份,也获得了成功。实验结果统计表明两者间没有明显差异<sup>[3,12,14,15]</sup>。这又为甾体激素受体测定的推广应用提供了可行条件。③在实验温度方面,活性炭可能会引起某些特异性结合的解离。所以,实验操作过程中严格控制温度在 $0 \sim 4^\circ\text{C}$ ,一方面可避免因升温引起的特异性结

合解离, 保证实验结果的重复性, 另一方面有利于保持受体的生物活性<sup>[8]</sup>。

### 临床研究

甾体类激素在临床实践中已应用于不同疾病的预后与疗效判定。激素发挥作用的先决条件是针对激素作用的各靶器官中有特异性受体蛋白存在。类固醇激素受体含量与对激素治疗反应之间的互相关系, 已由Jensen及其合作者在乳腺癌中进行了描述<sup>[16]</sup>。其后, 这个受体蛋白也在其它良性和恶性肿瘤组织中被发现。

关于人脑组织中类固醇激素受体的研究和了解较少。一些脑膜瘤和听神经瘤的临床表现提示这些肿瘤可能与激素水平有关, 例如约 2/3 颅内脑膜瘤和 8% 脊膜瘤病人发生在妇女人群中<sup>[10,17,18]</sup>; 又如在患脑膜瘤病人中伴有妊娠, 其症状迅速进展, 二者之间的关系 1929 年由 Cushing 和 Gisenhardt 叙述。此后, 许多作者也先后报道了有关脑膜瘤患者伴有妊娠的病例常有迅速进展的临床病程<sup>[5]</sup>。有趣的是这些病人大多数在分娩后症状明显好转<sup>[10]</sup>。1979 年, Donnell 首次报告了 6 例颅内脑膜瘤中有雌激素受体存在。雌激素和孕激素受体在神经疾病组织中被发现<sup>[10,19]</sup>。1981 年, Kasantikul 和 Brown 通过一种荧光组织化学技术检测了听神经瘤中的雌激素受体。同年, 我国于肇英在瑞典的斯德哥尔摩进修期间进行了 16 例脑膜瘤中的雌、孕激素受体测定, 发现除脑膜瘤外, 与其同时测定雌激素受体的各 4 例听神经瘤、星形细胞瘤和成胶质细胞瘤中仅有一例听神经瘤含有雌激素受体, 其余肿瘤组织内不含易检出的雌激素受体, 所以他认为雌激素受体可能是颅内脑膜瘤的特异性受体。

近年来, 许多学者不仅测定了神经系统肿瘤中类固醇激素受体含量, 还研究了激素受体结合部位与肿瘤解剖部位、病理类型与临床特点之间的关系。临床研究发现孕激素

受体水平与脑膜瘤病理类型间有密切关系, 不同类型的脑膜瘤孕激素受体含量不同, 而与雌激素受体含量间无明显关系<sup>[20~22]</sup>。有人在听神经瘤组织中发现有异常血管, 瘤内常伴有出血, 该现象在女性的巨大听神经瘤中多见, 可能与雌激素有关<sup>[23~25]</sup>。虽然上述各组报告例数还不太多, 实验方法也各有差异, 但从初步研究的结果展示, 随着类固醇激素受体测定技术在神经系统肿瘤研究中的应用, 这项技术将对指导临床肿瘤的综合治疗有所帮助。如对一些激素受体含量较高的肿瘤可用抗相应受体的激素治疗, 以抑制激素对相应受体的影响, 破坏或减少肿瘤血管, 延缓肿瘤生长速度, 尤其是对一些合并有其它疾患不能耐受手术者, 或肿瘤巨大及手术部位特殊不能进行切除的肿瘤控制病情更为适宜。尽管目前这方面的尝试尚不太多, 但可以预期用内分泌激素治疗颅内肿瘤, 无疑将成为一种有益的辅助治疗肿瘤的方法<sup>[2,10]</sup>。因此, 研究颅内肿瘤与类固醇激素受体的关系, 对于临床神经病学及神经核医学均有积极的意义。

### 参考文献

1. Schneegg JF et al: Surg Neurol 15: 415, 1981.
2. Donnell MS et al: J Neurosurg 50: 499, 1979.
3. 刘以训: 生殖与避孕 1: 53, 1981.
4. 邹继超: 中华核医学杂志 3: 21, 1983.
5. Jensen EV et al: in "Estrogen Receptors in Human Breast Cancer" (Mcguire WL et al Ed) Raven Press New York P37, 1975.
6. Spacacu V et al: Eur J Cancer 9: 353, 1973.
7. Powell B et al: Cancer Res 39: 1678, 1979.
8. 于肇英: 中华核医学杂志 3: 42, 1983.
9. Wrange Ö et al: Endocrinology 106: 1455, 1980.
10. Kasantikul MD et al: Surg Neurol 15: 105, 1981.

11. Le Clerg et al : Br Med J 1 : 185 , 1975.
12. 常愈明等 : 中华核医学杂志 5 : 165, 1985.
13. Schmidt TJ et al : Cancer Res 39 : 376 , 1979.
14. 刘以训 : 肿瘤防治研究 1:12, 1980.
15. Raynaud JP : Ann N. Y Acad Sci 286:87, 1976.
16. McGuire WL : Cancer 36: 638, 1975.
17. Mealey J Jr et al : Obstet Gynecol 32 : 204, 1963.
18. Rausing A et al : Acta Neurol Scand 46: 102, 1970.
19. Poisson M et al : Rev Neurol 139: 193, 1980.
20. Magdelenat H et al : Acta Neurochirurgica 64:199, 1982.
21. Martuza RL et al : Neurosurgery 9:665, 1981.
22. Markwalder TM et al : Surg Neurol 20: 42, 1983.
23. Kasantikul V et al : J Neurosurg 52:28 , 1980.
24. Fisher RI et al : Lancet 2: 337 , 1976.
25. Deen HG et al : J Neurosurg 56:317 , 1982.

## 血池显像剂的标记方法及其比较

上海医科大学附属中山医院核医学研究室 黄 钢综述 赵惠杨 刘秀杰\*审

近十年来,心血管核医学迅速发展,新的血池显像剂不断出现,由过去的 $^{131}\text{I}$ -标记人血清白蛋白(HSA)发展到 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 标记红细胞( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -RBC)。前者缺点为:需在显像前三天封闭甲状腺,病人辐射剂量大,且核素能量高,不利于 $\gamma$ 照相机的应用。目前应用的 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 标记的HSA和RBC不仅避免了上述问题,而且显像质量明显提高<sup>[1~3]</sup>。现将几种常用的血池显像剂标记方法作一简述。

### 一、HSA的标记方法

核素标记HSA进行血池显像应用较早。目前主要是 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HSA,其标记方法有电解法、电化学法及化学法,前者标记率较高且稳定,但需繁琐的操作与设备,不易普及。化学法可用于药盒,使用时仅需将 $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ 加入制好的药盒中混匀即可。但在药盒配制中亚锡( $\text{Sn}^{++}$ )化合物的种类及含量较重要。过去人们使用的HSA药盒均以 $\text{SnCl}_2$ 为还原剂,质量难以控制,血液清除率快,且

因易形成胶体而产生明显的肝脏显影,影响血池显像效果。近年来,人们应用酒石酸亚锡作为还原剂,提高了 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HSA的显像质量。其配方为: HSA 7mg、酒石酸亚锡 0.08mg, pH约为3.8,制成药盒后,加入 $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ 淋洗液,经轻摇混匀静置3~5分钟,其标记率可达95%以上。用酒石酸作为螯合剂,可有效地阻止 $\text{Sn}^{++}$ 的氧化,减少锡-锆胶体的形成。当酒石酸与四价锆整合并通过其羧基与锆结合时,其羟基很容易与HSA形成氢键,产生四价锆-酒石酸-HSA复合物,提高了 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HSA在体内的稳定性<sup>[4]</sup>。

### 二、RBC标记法

虽然HSA药盒不断改进,标记方法及显像质量有一定改善,但仍不能从根本上解决肝脏显影及血清清除速率较快等问题,而这些问题在血池显像中尤为重要。因此,目前人们广泛使用 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -RBC替代HSA行血池显像。其优点:(1)RBC是血中含量最高的有形成分,在体外很容易分离及操作,影响因

\*北京阜外医院