

· 技术交流 ·

前列腺组织雄激素受体的测定方法

胡笑克* 桂治宁

(实验核医学教研室)

提 要 建立雄激素受体测定的放射配基结合分析法测得人前列腺组织中胞浆 胞核雄激素受体均可被约 5×10^{-9} mol/L 的双氢睾酮饱和, 其最大结合容量 (B_{max}) 及平衡解离常数 (K_d) 分别为: 胞浆 129.4×10^{-15} mol/mg, 0.88×10^{-9} mol/L; 胞核 176.2×10^{-15} mol/mg, 3.2×10^{-9} mol/L。人前列腺癌胞浆、胞核雄激素受体均高于正常前列腺 ($n=3$) 及前列腺肥大者 ($n=32$)。用融液法放射自显影证实雄激素受体主要分布在前列腺组织的腺区, 尤其是在腺上皮细胞核内。

关键词 雄激素受体; 前列腺; 放射配基结合分析; 放射自显影

中图分类号 R817.1

50%~80%的前列腺癌病人在确诊时肿瘤已发生转移^[1]。在70%~80%的前列腺癌病人, 用内分泌药物治疗可以阻滞或减慢肿瘤的生长^[2], 但目前作者尚未能预知什么样的病人用内分泌治疗将会有效。前列腺是一个雄激素依赖性器官, 内含雄激素受体 (androgen receptor, AR), 目前已肯定了内分泌因素在前列腺癌发病中的作用, 而组织对激素的依赖性可以通过测定激素的相应受体含量来预知^[1,3]。因此, 可以试图用 AR 含量的测定来估计患者对内分泌治疗的反应性。本文探讨雄激素受体放射配基结合分析法 (radioligand binding assay, RBA) 及放射自显影法 (autoradiography, ARG) 测定人前列腺组织 AR 的含量及分布, 旨在阐述检测方法和检测结果的意义, 以供进一步研究及应用参考。

材料与方 法

试 剂 [1, 2, 4, 5-³H] 双氢睾酮 (³H-DHT), 放射性比活度 3.6×10^{15} Bq/mol ($97\text{Ci}/\text{mmol}$), 中国科学院上海核技术开发公司生产; 双氢睾酮 (DHT), Sigma 公司生

产; 甲基睾丸素, 上海试剂二厂生产; 丙酸睾丸素, 广州明兴制药厂生产; 己烯雌酚, 意大利产品; 199培养液, 日本制药株式会社生产; 9999型玻璃纤维滤纸, 上海红光造纸厂生产。

标 本 所有标本离体后 15min 内置入液氮保存, 2 周内测定。所有标本均经病理学检查。

方 法

1. RBA法 方法学主要参考文献[4~7]。

①反应液的制备: 标本剪碎后加入 TEDG Mo 缓冲液 (Tris、EDTA、DTT、甘油、钼酸钠), 以高速电动匀浆器间歇匀浆后用细胞尼龙网过滤, 滤液 800×9 离心 10min, 上清以等体积 DCC 液 (dextran-coated charcoal, 葡聚糖包被活性炭液) 吸附 30min 后, $30\,000 \times g$ 离心 40 min, 所得上清为胞浆液。 $800 \times g$ 离心所得沉淀以 STM-PMSF (蔗糖、Tris、 MgCl_2 、苯甲基磺酰氟) 缓冲液洗涤 3 次, 每次 $800 \times g$ 离心 10 min, 沉淀以 TEDG Mo 缓冲液悬浮, 即为胞核液。②胞浆受体饱和分析: 胞浆液分别与 0.5、1、2、5、8、12、 20×10^{-9} mol/L 的 ³H-DHT 在无或有 20×10^{-6} mol/L DHT 存在下, $0 \sim 4^\circ\text{C}$ 孵育 20h, 孵育结束后以两层 9999 型玻璃纤维滤纸, 用多头细胞收集仪抽滤, 纸片液闪测量并计算出受

* 硕士研究生, 现在广州市红十字会医院工作, 邮 码 510220

体含量。③胞核受体饱和分析: 胞核液分别与 0.5、1、2、3、5、7、 $15 \times 10^{-9} \text{mol/L}$ 的 $^3\text{H-DHT}$ 在无或有 $15 \times 10^{-6} \text{mol/L}$ DHT 存在下, 30°C 水浴振荡温育 30 min 后, 用胞浆的方法处理。④单点试验: 经饱和分析测得胞浆胞核 AR 均可被约 $5 \times 10^{-9} \text{mol/L}$ 的 $^3\text{H-DHT}$ 饱和, 故单点试验 $^3\text{H-DHT}$ 浓度取 $5 \times 10^{-9} \text{mol/L}$, DHT 浓度用 $5 \times 10^{-6} \text{mol/L}$, 其余条件同饱和分析。⑤孵育温度与时间的研究: 在 0°C 及 30°C 温度下, 每个温度作 7 个不同时间点的孵育 (0°C : 15 min、30 min、1、2、4、8、20h; 30°C : 10、20、30、40、60、90、120 min) 以测定温度和时间条件对 AR 与 $^3\text{H-DHT}$ 结合的影响。⑥竞争结合研究: 胞浆胞核液与 $5 \times 10^{-9} \text{mol/L}$ $^3\text{H-DHT}$ 在无或分别有 $5 \times 10^{-9} \text{mol/L}$ DHT、丙酸睾丸素、甲基睾丸素、己烯雌酚 (DES)、孕酮及可的松存在下孵育, 以测得的非标记 DHT 竞争抑制 $^3\text{H-DHT}$ 与 AR 结合的抑制率为 100%, 求出其余各非标记甾体激素的抑制率。⑦方法的重复性试验, 孵育方法同单点试验, 每组作 10 个平行管 $\bar{x} \pm s$ 及变异系数 CV。⑧蛋白质含量测定用 Lowry 法^[8]。统计学处理用秩和检验。

2. ARG 法 经反复预实验, 选用融袂法放射自显影。方法主要参考文献[9-12]标本用 RBA 法中所用的前列腺肥大标本。①组织的孵育: 总结合 (TB) 组, 1mm 厚的组织片先在 30°C 通气条件下, 199 培养液中孵育 30min, 然后在含 $5 \times 10^{-9} \text{mol/L}$ $^3\text{H-DHT}$ 的 199 液中孵育 30min, 再另取 199 液, 加牛血清白蛋白 3.5g/100ml, 不通气孵育 2.5h。非特异性结合 (NSB) 组, 组织片在 30°C 通气条件下含 $5 \times 10^{-6} \text{mol/L}$ DHT 的 199 液中孵育 30min, 转至含 $5 \times 10^{-9} \text{mol/L}$ 的 $^3\text{H-DHT}$ 及 $5 \times 10^{-6} \text{mol/L}$ DHT 的 199 液中孵育 30min, 以后的处理同 TB 组。②冰冻切片及放射自显影的制备: 组织片孵育后进行冰冻切片, 切片厚 $10\mu\text{m}$, 融袂法制备放射自显影, 4°C , 干燥曝光 30d。③显影、定影、染色及阅片: D-19

显影液 $18\sim 20^\circ\text{C}$ 显影 5 min, F-5 定影液定影 15min, 流水冲洗 30min; HE 染色; 高倍显微镜下观察银粒在组织中的分布并计数单位面积组织中的银粒数。

结 果

RBA 法

胞浆胞核的饱和浓度均约为 $5 \times 10^{-9} \text{mol/L}$, 用 Scatchard 分析所得平衡解离常数及最大结合容量 (B_{max}) 分别为: 胞浆 $0.88 \times 10^{-9} \text{mol/L}$, $129.4 \times 10^{-15} \text{mol/mg}$; 胞核 $3.2 \times 10^{-9} \text{mol/L}$, $176.2 \times 10^{-15} \text{mol/mg}$ 。证明所测得胞浆胞核 AR 是有高亲和力的低容量受体蛋白质。

温度与时间研究的结果表明, 在 0°C 孵育下其特异性结合约在 4h 达到最大, 且直至 20h 仍维持稳定。 30°C 孵育下, 其特异性结合在开始时上升很快, 30min 即达到最大, 以后很快下降, 至 120min, 几乎下降至零。

竞争结合研究的结果表明: 6 种抑制剂的竞争性抑制力依次为 $\text{DHT} > \text{甲基睾丸素} > \text{丙酸睾丸素} > \text{孕酮} > \text{DES} > \text{可的松}$ (表 1)。除 DHT 外, 甲基睾丸素、丙酸睾丸素对 $^3\text{H-DHT}$ 与 AR 结合也有较强的竞争性抑制作用, 孕酮、DES、可的松的竞争性抑制作用很弱或没有。

表 1 各竞争抑制剂的抑制率

竞争剂	胞浆抑制率 (%)	胞核抑制率 (%)
DHT	100.0	100.0
甲基睾丸素	69.3	80.6
丙酸睾丸素	59.1	71.7
孕酮	6.5	9.1
DES	1.8	0.0
可的松	0.0	0.0

重复性实验 CV, 胞浆: 5.9%, 胞核: 6.3%。

本实验共取得 40 例人前列腺组织标本, 其中前列腺肥大 (BPH) 32 例, 前列腺癌 (PC) 5 例, 正常前列腺组织 (NP) 3 例。RBA 法测得的结果及其统计学处理分别见表 2, 表 3。

表2 各类前列腺标本中AR含量

标本例数	AR 含量 (fmol/mg)	
	胞浆	胞核
1.NP 3	13.2 ± 9.3 (6.6~23.8)	16.3 ± 5.2 (10.3~19.7)
2.BPH 32	50.5 ± 59.4 (0~238.7)	51.3 ± 53.3 (0~176.2)
3.PC 5	170.9 ± 53.7 (94.3~239.5)	513.1 ± 229.1 (174.6~724.2)

表3 根据表2资料作两两比较秩和检验

对比组	T 值	P 值
胞浆 1与2	44	>0.10
胞浆 1与3	6	<0.05
胞浆 2与3	165	<0.01
胞核 1与2	41	<0.10
胞核 1与3	6	<0.05
胞核 2与3	174	<0.01

ARG 实验

TB 组腺区银粒分布明显多于基质区, 整个腺体布满银粒, 腺上皮细胞的胞核区域银粒更多。同一标本在孵育时同时加入³H-DHT 及 DHT 的 NSB 组, 银粒明显减少, 且散在分布, 无明显的腺体或细胞核集中分布。单位面积银粒数见表4。经统计学处理, 腺区的 TB 组明显高于 NSB 组, 腺区有特异性受体结合, 而基质区则没有。可见 BPH 组织中含有一定量的 AR, 且 AR 主要分布在前列腺组织的腺区尤其是腺上皮细胞核中, 而不是基质区。

表4 标本中的平均银粒数(银粒数/μm²)

	TB	NSB	结果判断
腺区	635	121	AR(+)
基质区	239	109	AR(-)

讨 论

RBA 法测定条件的选择 经过饱和性实

验、温度与时间研究、竞争性实验, 表明本实验的被测物质具有以下特点: 可饱和性、低容量、高特异性、有竞争性拮抗剂, 在一定的温度与时间条件下与配基结合稳定, 有热不稳定性, 具备了鉴别受体所必需的条件。所测得参数与文献报道 AR 测定的参数基本相符, 证实了该被测物质是雄激素受体。重复性实验的结果证实了该实验有较好的重复性。

匀浆测量结果的意义 由表2结果可知 PC 患者 AR 水平有一定程度的增高, 且其 AR 主要定位于细胞核, 此结果与文献报道一致^[4]。根据文献报道^[3,6], 前列腺组织中胞浆 AR 的含量与疾病的内分泌治疗无关, 胞核 AR 含量才与前列腺疾病的发生及其内分泌治疗之间有一定的关系, 胞核 AR 含量越高者越适于采用内分泌治疗。这一点正是我们测量不同类型前列腺组织中 AR 含量的目的所在。尽管 PC 标本来源少, 但其 AR 含量与 BPH 及 NP 之间的差异有显著性意义(表3)。

本文测得的5例 PC 标本中, 有1例 AR 含量较低(胞浆 94.3 fmol/mg, 胞核 174.6 fmol/mg), 其值落在 BPH 的测量值范围中, 其余4例测量值均高于 BPH 的最高测得值, 尤以胞核 AR 含量增高明显(胞浆胞核用配对资料秩和检验, $T=18, P<0.05$)。文献报道 PC 患者有 20%~30% AR 含量不增高^[2]。

ARG 法对前列腺组织的定位及意义 本文 ARG 的结果证实了 BPH 组织中的 AR 分布是不均匀的, 受体主要分布在腺体区域尤其是腺上皮细胞的胞核中, 基质区的受体含量很低。这一结果与文献报道相符^[13,14]。受体分布在腺区而不是基质区提示腺细胞是雄激素作用的靶细胞。本文 ARG 法观察到腺上皮细胞胞中 AR 相对集中, 胞浆中则较少。但 RBA 法测得 BPH 时胞浆胞核 AR 含量差异不显著。根据激素作用的“两步学说”机理, 胞浆中的激素受体是游离受体, 而胞核中的则是结合受体。RBA 法测量时, 先将核浆分离再分别测量, 故测得核浆两组分均含有 AR。ARG 法经过配基的掺入过程, 最终也没把核浆分

开。DHT 在胞浆与 AR 结合后可以转移至胞核, 所以结果中可见 AR 主要定位于胞核, 前列腺组织中 AR 的核内定位分布与激素作用机理的理论相符。

参 考 文 献

1. Barrack ER, et al. A critical evaluation of the use of androgen receptor assay to predict the androgen responsiveness of prostate cancer. Current concepts and approaches to the study of prostate cancer. England: Alan R. Liss Inc, 1987:155~187
2. Buttyan R. Androgen receptor assay in advanced prostatic cancer. Urol Clin North Am 1984;11(2):311
3. Gonor SE, et al. Relationship between concentration of extractable and matrix-bound nuclear androgen receptor and clinic response to endocrine therapy for prostatic adenocarcinoma. J Urol 1984;131(6):1196
4. Trachtenberg J. Correlation of prostatic nuclear androgen receptors content with duration of response and survival following hormonal therapy in advanced prostatic cancer. J Urol 1982;127(3):466
5. Hicks LL, et al. A microassay for the measurement of androgen receptors in human prostatic tissue. Steroid 1979;33(4):389
6. Trachtenberg J, et al. Androgen receptors content of normal and hyperplastic human prostate. J Clin Metab 1982;54(1):17
7. 高永良, 等. 人体子宫内膜雌孕激素受体测定方法探讨. 浙江医科大学学报 1985;14(3):122
8. Lowery OH, et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem 1951;193:263
9. Stumpf WE, et al. Autoradiographic techniques for localizing steroid hormones. In: Malley BWO, et al. eds. Method in enzymology. Vol 36. Hormones action. part A. Steroid hormones. New York: Academic Press, 1976:119~142
10. Buell RH, et al. Autoradiographic demonstration of uptake and retention of ^3H -estradiol after in vitro incubation. J Histochem Cytochem 1981;29(11):1316
11. Buell RH, et al. The localization of ^3H -estradiol receptor-positive human mammary carcinoma as visualised by thaw-mount autoradiography. Cancer 1983;51:1625
12. Kuhar MJ. Neurotransmitter receptor binding. Vamamura HI, et al. eds. Baltimore: Raven Press, 1985:154~176
13. Schroder FH, et al. Steroid receptors, metabolism and prostatic cancer. Amsterdam-Oxford-Princeton: Excerpta Medica, 1980:7~20
14. Peters CA, et al. A new method for labeling and autoradiographic localization of androgen receptors. J Histochem Cytochem. 1987;35(7):755

(1992-01-25收稿 1993-07-12修回)

(上接第 I 页)

用一对错配引物进行的 PCR/酶解法检测 β -地中海贫血-28 (A→G) 突变 (李洪义等) (4): 封 2
 广用 RCR 法检测血清 HBV DNA 及其意义 (张春兰) (4): 255
 广东汉族人基因组 D₁₇S₈ 位点遗传多态性 (杨英浩等) (4): 285
 中国人中发现的 6 种 G6PD 基因点突变 (杜传书等) (4): 291

垂体后叶素对小鼠心肌营养性血流量超氧化物歧化酶活性及丙二醛含量的影响 (吴伟康等) (4): 封 3
 青光眼视功能损害与血液流变学, 眼血流图及其它诸影响因素的相互关系研究 (葛 坚) (4): 300
 动脉硬化性脑梗塞 (脑血栓形成) 遗传学系列研究 (刘焯霖) (4): 309
 直流电神经刺激器 (陈光晔) (4): 313
 混合性中风 (黄如训) (4): 320

ANDROGEN RECEPTOR ASSAY IN HUMAN PROSTATE TISSUE

Hu Xiaoke Gui Zhining

(Department of Laboratory Nuclear Medicine)

In this laboratory, to determine androgen receptor, the authors established RBA (radioligand binding assay of receptor) method. The study demonstrated that in the prostate both cytoplasmic and nuclear androgen receptor (AR) can be saturated by 5×10^{-9} mol/L dihydrotestosterone (DHT), the value of B_{max} and Kd are 129.4×10^{-15} mol/mg and 0.88×10^{-9} mol/L in cytoplasmic, 176.2×10^{-15} mol/mg and 3.2×10^{-9} mol/L in nucleus. Both the cytoplasmic and nuclear AR content in prostatic cancer are higher than those in normal prostatic and benign prostate hypertrophy ($P < 0.05$). In addition the authors use thaw-mount autoradiography to confirm the epithelia cells of the glandular tissue of prostate, which are the target cells of AR.

Key words androgen receptor; prostate; radioligand binding assay; autoradiography

• 新成果 •

混合性中风

课题负责 黄如训

(附属第一医院神经科)

由一院神经科黄如训教授等人完成的《混合性中风》成果, 1992年获国家教委科技进步奖三等奖。该成果分别从临床、病理解剖和动物实验等方面, 以可靠的临床影像学、尸解及动物实验资料, 证实了脑出血与脑梗塞可同时或短时间内先后发生于同一患者, 从而肯定了混合性中风的存。研究突破了过去国内外把中风分为出血性和缺血性两大类的框框, 首先提出了混合性中风的概念, 应单列独立诊断, 分别其诊治的特殊性, 具有一定的创新性, 较高的科学性。混合性中风的提出, 对促进中风发病机理的研究, 提高临床诊断水平, 以及探索更合理、更有效的中风防治措施具有重大的意义。

(陈丽芳)