

# 基础内分泌学讲座(I)

刘以训

(动物研究所内分泌室)

因为观点不同,对内分泌学下一个完整的、明确的、为所有生物学家能接受的定义是很困难的。现有两派主张,一派认为,内分泌学是通过化学途径调整机体的生物学。根据这一观点,存在于体液中的一切化学调节因素都包括在内分泌学的研究范围;另一派学者则遵循贝利斯(Bayliss)和斯塔林(Starling)的经典概念,把内分泌学的范畴定义为研究无管腺体及其特异产物功能的调节。看来,这两派主张都有其片面性。随着分子生物学和比较内分泌学的进一步深入和发展,一些新的同现有内分泌学定义不符的,中间或过渡化学调整物质肯定会揭露出来,因而对内分泌学定义会不断修正和充实,上述两种主张会逐渐接近。

## 一、内分泌腺体(endocrine gland)<sup>[1]</sup>

内分泌腺体一般是指无管腺体。从个体发生上看,内分泌腺体起源于各胚层。起源于中胚层的内分泌腺体(肾上腺皮质、性腺)产生甾体激素;起源于外胚层和内胚层的内分泌腺体分泌氨基酸或氨基酸衍生物、肽类或蛋白质类激素。在生物学教课书中有人提出3个鉴定内分泌腺体的实验步骤:1.摘除腺体;2.观察摘除后对动物的影响;3.给摘除动物注射摘除组织的提取物,如果注射提取物能使动物恢复摘除前的功能,那么摘除的组织一般定义为内分泌腺体。但在实验中应考虑到下面一些复杂的

因素。

在动物体内有的内分泌腺体只有一个;有的有两个或多个;有些内分泌腺体在数目、大小、形状和位置上变异很大;还有少数内分泌细胞埋藏于其他组织之中。如果摘除不全,留下的内分泌细胞可在短时间内发生代偿性分泌增强,因而观察不到摘除后对动物的影响。另外还要考虑给动物腺体或其提取物的方式。一般有4种方式:1.将腺体剪碎、匀浆或打成粉末与饲料混合投药;2.将腺体匀浆液或提取物溶解或悬浮在动物的刻度饮水瓶中;3.腺体移植;4.给动物注射腺体的提取物。在4种方法中,最后一种比较理想,但必需考虑所用提取溶剂的性质,提取溶剂中不能含有某种(或某些)有药理作用的影响因素。

有关内分泌腺体的报道较多,但看法不一。从某种意义说,下一个公认的定义是困难的。一般认为,一切内分泌腺体都比较小,没有分泌导管,有丰富的血管支配。人体的主要内分泌腺体包括:脑下垂体、甲状腺、甲状旁腺、肾上腺、性腺、胰岛、部分肠胃道、胎盘、松果体和胸腺等。

## 二、激素(hormone)<sup>[1-2]</sup>

激素是一种高效能生物调节物质,它是由内分泌腺体活细胞合成的,并由细胞不经导管而直接分泌于血液中,通过血液循环传送到远

距离的特异靶器官,引起特异的生物学反应。

激素能促进或减缓体内(或离体)的生物学反应,它是通过增强或抑制细胞特异化学反应速率,或改变某些特殊酶的能力而实现的。激素是一种生理调节物质,但是体内的许多生理调节物质不一定是激素;激素在体内的分泌量是极微的,从微克量( $10^{-6}$ 克)到微微克( $10^{-12}$ 克)量,一般可分为四大类。

### (一) 氨基酸或其衍生物

某些激素是氨基酸的前身物或衍生物。这些小分子化合物虽然结构十分相似,但功能绝然不同。例如在变温动物中的去黑素(melatonin)影响皮肤色素颗粒运动,而在仓鼠中的去黑素却与生殖功能有关。随动物进化,肽类激素分子逐渐延长,激素的种族差异性越来越大;但当给一种动物注射另一种动物的激素时,其生理活性往往保持。例如在化学结构上鱼胰岛素不同于哺乳动物胰岛素,但鱼胰岛素能影响哺乳动物的血糖浓度。有些大分子蛋白激素种族差异性很大,如给人注射牛胰岛素无效。有人认为,人和牛相应的组织中所含的激素受体可能不同。属于氨基酸类的激素包括肾上腺素、去甲肾上腺素(酪氨酸衍生物);5-羟色胺(serotonin)和去黑素;甲状腺素也属于这一类,它是由两个酪氨酸经碘化缩合而成的。

### (二) 肽类激素

A. 肽类激素(peptide): 丘脑下部促甲状腺释放激素(TRH)是一个3肽化合物。在所有脊椎动物中,TRH分子结构相同;其他几种丘脑下部释放激素似乎也是小肽化合物。如丘脑下部促黄体素释放激素(LRH),丘脑下部促肾上腺皮质激素释放因子(CRF)等都未发现种族差异性。神经垂体激素(血管加压素和催产素)是一些8肽化合物。

B. 多肽类激素(polypeptide): 在这一类激素中包括由17个氨基酸组成的促胃液素(gastrin);由29个氨基酸组成的胰高血糖素(glucagon);由34个氨基酸组成的降钙素(calcitonin);由39个氨基酸组成的促肾上腺皮质激素(corticotrophin),还包括由13个氨基酸组成的

$\alpha$ -黑色素细胞刺激素( $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone)和由18—22个氨基酸组成的 $\beta$ -黑色素细胞刺激素( $\beta$ -melanocyte-stimulating hormone)。

### (三) 蛋白质激素(protein hormone)

把蛋白质激素和多肽激素严格划一条界限是十分困难的。胰岛素(insulin)是一种多肽激素,现在习惯称作蛋白质激素。它是由A和B链通过二硫键连接起来的。A链含20—21个氨基酸;B链含29—31个氨基酸;甲状旁腺激素(parathyroid hormone)是由80—85个氨基酸组成;生长激素(growth hormone)种族差异性最大,人生长素是由191个氨基酸组成的。

在蛋白质一类激素中,有些含有糖的成分,称作糖蛋白质激素。这些激素有:促甲状腺素(thyrotrophin),促滤泡素(follicle-stimulating hormone),促黄体素(luteinizing hormone),人绒毛膜促性腺素(human chorionic gonadotrophin)和孕马血清(pregnant mare serum gonadotrophin)。

### (四) 甾体激素(steroid hormone)

这类激素是由卵巢、睾丸、肾上腺皮质和胎盘所分泌的脂溶性化合物。它们都是胆固醇一类化合物的衍生物。这类激素包括由27个碳原子组成的肾上腺糖皮质激素(glucocorticoid)和盐皮质激素(aldosterone);由21个碳原子组成的雄激素(androgen)和由18个碳原子组成的雌激素(oestrogen)。

另外,在化学结构上与这类激素相近的维生素D和代谢物也称之为甾体激素。

## 三、化学信使(chemical messenger)<sup>[1-2]</sup>

在机体中起调节作用的除激素外,在体液中还有一些其他化学物质,有人称为化学信使。化学信使是通过体液途径参与机体调节的一切活性物质。

帕克斯(Parkes)和布鲁斯(Bruce)首先提出化学信使的概念,概括参与个体调节的内分泌激素和参与群体调节的外分泌激素(外激素)以及其他相关的物质。化学信使这一名词已被广泛采用。为了讨论和理解上的方便,除

激素外,把体内的其他化学信使分为4大类:

1. 神经传递物;
2. 综合化学信使;
3. 植物激素;
4. 外激素。当然它们之间的界限并不明显。

**神经传导物 (neurotransmitter)** 这一概念于1921年由洛威 (Loewi) 首先用巧妙的实验证实。他剥离出两个离体青蛙心脏,其中一个保留神经联系。任氏溶液经由神经支配的心脏灌注到另一个心脏。当他刺激前一个心脏的迷走神经时,两个心脏的收缩速率同时减缓;当刺激交感神经时,两个心脏速率同时加快。进一步实验证明,迷走神经末梢可释放一种化学信使——乙酰胆碱,使心跳减慢;交感神经末梢释放一种叫去甲肾上腺素的化学信使,可使心跳加快。有些人把这些化学信使称为“局部激素”(local hormone)或“弥散性激素”(diffusion hormone)。神经末梢上的神经传导物是微量的,半衰期很短,并迅速为酶所灭活。显然这是一些非常重要的化学介质,但它们与一般激素不同,不经导管而进入血液循环。从来源上看不同于神经激素,它们产生于一般神经原。

**综合化学信使 (Assorted chemical messengers)** 各类动物细胞都能产生和释放某类物质,改变体内外环境。这类物质很多,为了分类上的方便,通称为综合化学信使。如:CO<sub>2</sub>, 尿素,组织胺,参入发炎过程的血球引诱剂, (attractant) 促红血球生长素 (erythropoietin) 和前列腺素等。

**植物激素 (phytohormone)** 植物没有神经系统,它们的生物调节是通过化学信使完成的。这些化学信使多半是一些植物生长调节物质。如植物生长素 (auxin), 赤霉素 (gibberellin), 创伤素 (wound hormone), 叶生长素 (leaf-growth substance), 根生长调节剂 (root-growth regulator), 激肽 (kinin) 和成花素 (florigen) 等。植物激素和动物激素在许多方面是相似的,就来源和传递方式而言却有很大差异。合成和释放植物激素的细胞不是充分分化的内分泌腺体。植物激素的传递主要是从细胞到细胞(到远距离的靶器官不靠管道运输)。

**外激素 (pheromone)** 外激素化学信使

分为两类:同种个体间通讯(种间通讯)的化学信使,叫做外激素;不同种间通讯的化学信使叫做“别激素”(allomone)。前者指的是有利于生产者的物质;后者则是有利于受者的物质。外激素按激素定义并不属于激素,它们是由外分泌腺分泌的,然而外激素的合成和分泌常受激素的调节。外激素大都是一些简单的小分子化合物,其中许多是脂肪酸或萜烯类的衍生物。外激素一般通过躯体表面吸收,或经嗅觉传入,引起行为、发育或生殖方面的反应。从生态和种族延续的观点来看有重大意义。外激素同激素比较有4点区别:1. 外激素是通过外环境传递的;2. 外激素有明显的种族差异性;3. 外激素是引起其他个体内的调节作用;4. 外激素一般是由外分泌腺体分泌的。但有些内分泌腺体产物,它在个体内起调节作用(激素),也可在同种个体间起调节作用(外激素)。内分泌学家对外激素感兴趣有3个理由:1. 外分泌腺体经常依赖于激素;2. 在某些动物中机体排出的激素代谢物有外激素作用;3. 有些外激素可作为“引子”(primer)激发中枢神经系统和各种内分泌腺体产生长时间的协同调节作用。外激素大致分为两大类:1. 信息 (signale) 和释放 (release) 性外激素,它们通过中枢神经系统或者沿迅速反应的神经内分泌途径引起快速而可逆的反应;2. “引子”外激素。它调节一系列慢慢发展并需长时间刺激的神经内分泌活动。

#### 四、激素的生物合成、释放、贮藏和传递<sup>[1-3]</sup>

过去20年间,通过电镜和生化研究所提供的资料表明,内分泌细胞通过转录和翻译过程合成各种必需的结构蛋白和酶。某些激素可能激活一些在脱氧核糖核酸(DNA)上的特异基因,促进新型核糖核酸(RNA)信使核糖核酸(mRNA)的转录,然后在核糖体上合成特异蛋白。电子显微镜下发现,核膜上有许多小孔,mRNA可能就是通过这些小孔进入细胞质的。分泌蛋白质激素的细胞内质网是高度发展的,属粗颗粒类型。在内质网的外面有数目不定的

核糖体 (ribosome) 和各种 mRNA 形成聚核糖体 (polyribosome)。在翻译过程中, 转移核糖核酸 (tRNA) 把氨基酸带到聚核糖体上集中, 并接受附着在聚核糖体上 mRNA 密码的翻译。合成的蛋白质激素分子通过内质网移动到高尔基复合体, 经浓缩成为膜包小滴或小颗粒, 并粘着到细胞膜上以便使分泌物排出而不致引起细胞膜破裂。当分泌物过多时, 细胞中的溶酶体可将多余的分泌物和核糖体水解。合成甾体激素的内分泌细胞, 在某些超微结构方面有别于蛋白质分泌细胞。像性腺和肾上腺皮质一类甾体激素分泌细胞含很多无颗粒(平滑型)内质网, 常以螺旋状排列, 而颗粒内质网很少。脂肪滴集中于细胞质中, 没有膜包颗粒, 高尔基复合体特别显著, 溶酶体很多。

激素一般是通过血液循环传递的。然而越来越多的事实表明, 某些激素可通过组织扩散的方式引起局部反应。还有许多资料表明, 曲细精管内的足细胞合成胆固醇和各种雄甾体激素, 所合成的大部分激素有可能贮留在此, 对精子形成有局部作用。有人指出, 位于附睾和输精管里的一些细胞不仅能由醋酸盐合成胆固醇, 而且还能合成脱氢表雄酮。这些分泌物可能直接进入精液, 而不是释放于血液循环。从这些例子说明, 内分泌和外分泌之间的差别可能不像人们所假定的那么明显。

血中的激素常同一些特异结合蛋白结合, 否则易受酶解而失活, 或在肝、肾中遭受破坏。神经垂体中的八肽化合物与一种分子量大约为 30,000 的蛋白质结合; 血中甲状腺素和各种甾体激素都同其特异结合蛋白结合。如甲状腺结合球蛋白 (TBG), 对甲状腺素高度特异, 但同三碘原氨酸结合能力较弱。甲状腺素在某种程度上也同血浆球蛋白和球蛋白前身物结合。人的肾上腺结合球蛋白 (CBG) 同皮质素、皮质醇和肾上腺皮质酮一类甾体激素结合, 也同孕酮一类激素结合。性激素结合球蛋白 (SHBG), 只对入血浆中睾酮和雌二醇有高度亲和力。激素与结合蛋白的可逆性结合不仅是一种适当的转运机制, 还有贮藏和缓冲的作用。

结合蛋白调节激素达到靶器官的浓度和代谢量, 保护机体免受过量激素的损伤。

## 五、激素作用原理

### (一) 连锁现象 (cascade phenomenon)<sup>[1]</sup>

激素在细胞代谢中似乎发动一系列相互依赖的变化。在这一连串反应中, 每一步都可促进和加强后一步的变化, 称此为连锁现象。有人认为, 激素的初发作用可能发生在细胞膜某部位上。

(二) 潜伏期<sup>[2]</sup> 对大部分激素, 从注射到出现明显的生理反应之间有一段间隔, 称潜伏期。在潜伏期间激素在细胞上(内)要引起某些变化, 目前由于技术所限, 还不清楚。不过, 随着测定技术的发展, 激素的潜伏期越来越短。

(三) 多相作用<sup>[2]</sup> 一种激素不仅有一种作用, 还可对不同的组织、不同的细胞, 通过不同的作用机制引起多方面的作用, 这种现象称作多相作用。

(四) 许助作用 (permissive action)<sup>[1-2]</sup> 有些激素对某种组织不直接引起生理反应, 而是提供某些条件以有助于其他激素对该组织的反应。例如, 糖皮质激素对肌肉紧张度几乎没有直接影响, 但是它可大大加强去肾上腺素的生物效应。糖皮质激素的这种作用称之为“许助作用”。

(五) 拮抗和加强作用<sup>[1-2]</sup> 当两种激素同时使用时, 一种激素的作用可抵消或部分抵消另一种激素的效能, 称之为拮抗作用。其效能如大于两种激素分别使用时所出现的效应之和, 那么这两种激素有相互加强作用。

(六) 反馈性调节作用<sup>[1-3]</sup> 有两种类型, 即负反馈和正反馈。负反馈作用: 丘脑下部——垂体激素兴奋靶腺的分泌, 当血中靶腺激素分泌增加时, 反过来抑制丘脑下部垂体激素的分泌, 这种相互关系称之为负反馈作用。正反馈作用: 正反馈与负反馈相反, 当血中靶腺激素浓度增高时, 刺激丘脑下部——垂体相应促激素的分泌。性腺激素和丘脑下部——垂体促激素之间的关系就属于这一类。

(七) 时间性<sup>[2]</sup> 激素的作用时间明显影响它的作用效果。在胎儿发育早期,脑细胞成熟需要甲状腺素。但是在发育过程中,如果超出一定时间,甲状腺就会失去上述作用。中午给白头麻雀注射促乳素,可促进体重增加和脂肪贮藏;早晨注射同样激素就失去这种作用。

(八) 对酶活性的加强或抑制<sup>[1-2]</sup> 有人认为,激素对酶的影响通过以下几种途径: 1. 重要酶的底物, 2. 反应产物的清除速度, 3. 改变酶的活性, 4. 改变细胞内酶的含量, 5. 能源的变化, 6. 细胞数目等。

(九) 激素间的相互作用<sup>[1-2]</sup> 内分泌系统之间相互关联, 某一腺体分泌过剩或不足可影响其他腺体激素的产生。一种生理过程受一种作用或连续作用的各激素间的平衡调节。

(十) 受体机制<sup>[4-8]</sup> 按照受体概念, 激素的每一靶器官都有其特异激素结合的受体部位。受体结合部位有两种: 一种是在细胞表面, 即在质膜上; 另一种是在细胞质中。受体蛋白有 3 个特点: A. 低容量, 高亲和力; B. 热不稳定; 在纯化或其他操作过程中趋向于聚合。

一般说, 多肽和蛋白质类激素受体在细胞表面上, 即膜受体; 而各种甾体激素受体都在细胞质中。

A. 蛋白质激素作用机制——第二信使假说 (second messenger hypothesis) 这一学说首先由萨斯兰德 (sutherland) 和同事提出。他们认为, 激素(指肽类和蛋白质激素)是第一信使, 同细胞膜表面特异受体结合, 激活细胞内腺苷酸环化酶。腺苷酸环化酶有两个亚单位, 一个是调节亚单位(或称受体亚单位), 一个是催化亚单位, 受体是调节亚单位的一部分, 它是决定激素特异性的部位。当催化亚单位激活后, 在细胞内就由三磷酸环腺苷酸 (ATP) 转化为 3', 5' 二磷酸环腺苷酸 (3', 5'-AMP), 3', 5'-AMP (c-AMP) 在磷酸二酯酶的催化下, 不断水解为 5'-AMP 而失去活性。细胞内 c-AMP 浓度取决于腺苷酸环化酶和磷酸二酯酶二者活性的大小, 也取决于 c-AMP 生成和 c-AMP 水解之间的相对速度。有人报道, 在上述过程中,  $Ca^{++}$

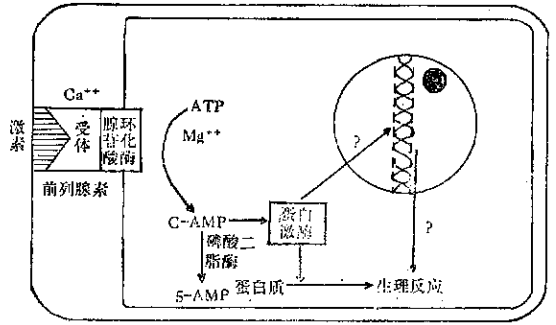


图 1 蛋白质激素作用原理示意图

和前列腺素也起重要作用。经修改后的第二信使假说(见图 1)。

在细胞中除了发现有 c-AMP 外, 还发现一种环苷酸, 即环-磷酸鸟苷 (c-GMP)。实验证明, 肾上腺素和胰高血糖素使肝糖分解, c-AMP 上升; 而胰岛素可促进肝糖合成, 对 c-AMP 含量没有影响, 而使 c-GMP 上升。因此, c-AMP 和 c-GMP 所引起的生物效应正好相反。根据这一发现, 有人提出了激素作用双向控制的概念。最近有些资料证明, 蛋白质或肽类激素能透过细胞膜直接进入细胞质, 甚至细胞核中, 对萨斯兰德学说提出了挑战。但进入细胞的激素是如何将其信息表达出来的, 有待进一步研究。

B. 甾体激素的作用机制——激素受体复合体转入概念: 现以雌激素为例加以说明(见图 2)。詹森 (Jensen) 和同事通过一系列研究发现, 雌激素首先与子宫细胞质受体蛋白结合形成激素受体复合体; 激素受体复合体经过一

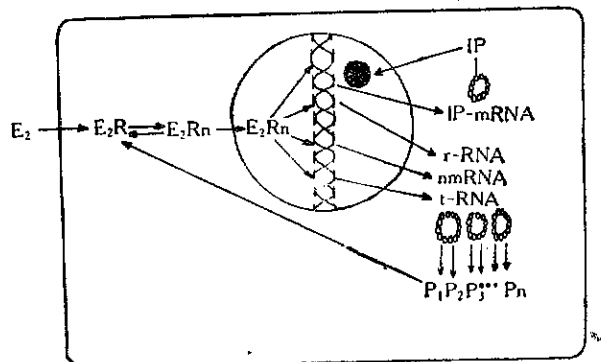


图 2 雌激素作用原理示意图

定的活化过程，然后转入细胞核，与细胞核中 DNA 上的接受器 (acceptor) 结合。其结合形式有 3 种 (见图 3)，激素受体复合体与细胞核接受器结合后，在 DNA 分子水平上产生一系列转录过程。有人报道首先产生雌激素诱导蛋白信息核糖核酸 (IP-mRNA)，通过核孔进入细胞质，在聚核糖体上合成 IP；IP 对 RNA 聚合酶有特异促进作用，促进核糖体-核糖核酸 ( $\gamma$ -RNA) 的产生；此外，受体复合体在 DNA 分子水平上转录出各种 mRNA，t-RNA，然后在细胞质的聚核糖体上合成各种子宫蛋白，其中包括失掉的受体蛋白。

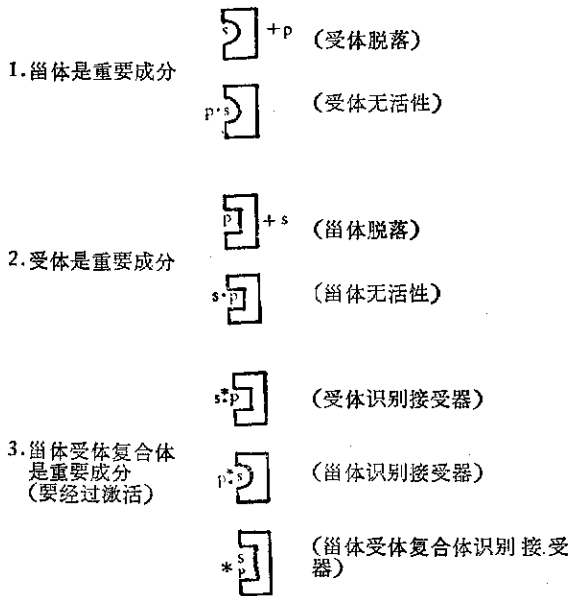


图 3 激素受体复合体与细胞核接受器的结合形式  
S—甾体, P—受体

## 六、微量激素测定技术的发展<sup>[9-10]</sup>

内分泌学进展取决于实验和测定技术的发展。在内分泌学发展早期，没有提纯激素的条件，激素的鉴定依赖于某些特殊的生物反应。例如，胰岛素降低血糖；甲状腺降钙素降低血钙和血磷；雄激素促进阉鸡鸡冠生长；雌激素使啮齿类动物阴道上皮角质化；黑色细胞刺激素 (MSH) 使青蛙皮肤黑色素颗粒扩散；促性腺激素引起性腺的特异性变化；促甲状腺素引起甲状腺结构与功能的变化。大部分有效的生

物鉴定，是在严格控制条件下，把某种激素所产生的特异变化，作为鉴定的终点指标。例如，血糖上升并不是肾上腺作用的一个特异指标。因为胰高血糖素、垂体 ACTH、肾上腺皮质甾体激素，通过不同途径的作用都能使血糖上升。

激素在体内的作用有很多途径。不同种动物对同一激素的反应不同。因此，对生物指标的选择必需要取决于实验方法的客观性、精确性、灵敏性、特异性、重复性和方便性。测定技术应立足于仪器的客观测定，而不是依赖于主观估计。例如人的体型和毛发分布，是性腺甾体激素的可靠指标，但这些指标很难典型化和客观测定。对生理剂量的激素所出现的灵敏反应指标是最令人满意的。如用大量激素所出现的反应是药理性质的，而不是生理的。激素所引起的生理反应一定能重复，剂量反应曲线要明显。

许多因素可改变激素反应，影响生物鉴定，如给药途径，溶液或悬浮激素的溶剂，动物种系，性别，年龄和健康状况。大部分天然激素口服是无效的。一般采用非胃肠道途径，即皮下或静脉注射。甾体激素一般不用静脉注射，激素溶于油剂吸收较慢，可得到相当稳定和长效作用。激素分子的修饰可引起吸收、降解和排泄速度的变化，但不改变特有的作用方式。另一方面，如果改变分子化学结构，即使微小变化也可使激素失效，或者改变对机体的作用。

当人们了解了某些小分子激素的结构以后，物理和化学测定方法开始建立起来。这种方法比较特异和灵敏，对测定血液和尿中甾体激素含量是比较有效的。但是如果人们要确切知道激素的生物活性，物理化学方法有时达不到这一目的。因此不能完全用以代替生物鉴定方法。

由于激素纯化和免疫技术的发展，为建立一种高度精确的蛋白结合测定法提供了基础，蛋白结合测定法灵敏度高，应用范围广，速度快，并适应于自动化操作。近年来发展非常迅速，应用非常普遍。所谓蛋白测定法是一个普遍术语。它不仅包括放射免疫测定 (RIA)，而

且也包括放射受体测定法和血浆结合蛋白测定法。这些方法皆涉及到免疫化学反应。RIA 兼有放射化学和免疫化学的高度灵敏性和特异性。能测定少量血液或样品中激素含量。其灵敏度与特异性基本上能满足有关科研和临床上的需要。目前是最普遍,最方便推广应用的一种灵敏度高的激素测定方法。但是在内分泌学实践中人们越来越清楚的认识,用放射免疫法测激素含量往往产生错觉。显然在放射免疫测定中所测结果只代表激素分子的免疫活性,而不能完全代表激素的生物活性。激素在代谢过程中,免疫活性中心同生物活性中心不同。有免疫活性的激素基团,有时是一种激素前身化合物,有时连结或吸附在无活性的大分子上。因此,早在 1967 年世界卫生组织 (WHO) 标准化专家委员会上就强调指出,用免疫法所测得的激素含量实质上是一些具有特异抗原性的化合物。严格说,它同激素生物活性无直接关系。该委员会提出一项任务,要发展一种“微量激素生物测定法”。WHO 第二十一次专家委员会会议上,进一步强调了这项任务的重要性。放射免疫的另一局限性,是它的灵敏度和精确度。在测定正常人血液中低限激素水平的情况下,放射免疫测定法的灵敏度显然是不够的。很难测定像丘脑下部释放激素、促甲状腺素和具有生物活性的甲状旁腺激素等等。

近年来,英国伦敦风湿病研究所勤 (Chayen) 和毕坦斯基 (Bitesky) 等人,在组织化学和细胞化学基础上发展了一种新型微量激素生物测定法——细胞化学生物测定法。它保持或超出了放射免疫测定法的灵敏度,同时又具备生物鉴定所特有的优点。从第二十六次生物标准化专家委员会会议以来受到普遍重视,并推荐应用。

细胞化学生物测定法的基本原理:激素在靶细胞中引起一系列生化反应,不同剂量激素在靶细胞中所引起的反应程度(或状态)不同,通过组织化学和细胞化学方法(对特异酶、反应底物或其他成分显色)染色,然后用显微密度测定仪 (microdensitometer) 把上述反应作定量记

录。

细胞化学生物测定法的操作步骤: 1. 由适当动物(一般用豚鼠)取得待测激素的靶器官,切成大致相等的若干组织块,并分别放入培养装置(见图 4),加适量无繁殖  $T_8$  (Trowell) 培养液,通 95%  $O_2$  和 5%  $CO_2$ , 密封并在 37°C 培养 5 小时以便完全消除靶器官中的内源激素。2. 经 5 小时孵育后,吸去各培养缸中的旧培养液,加入新培养液,此时在不同组织块培养液中分别加不同浓度(5 毫微微克—5 微微克/管)的标准激素溶液和待测样品(一般作 1:100 和 1:1000 两个稀释度),反应时间为 4—7 分钟,将组织块即刻放入由干冰致冷到  $-70^{\circ}C$  的正己烷中,30—60 秒钟后;取出组织块、放入同温度试管中,  $-70^{\circ}C$  保存。3. 切片,低温切片箱内的温度应在  $-25^{\circ}C$  以下;刀的基部由干冰包埋,刀的温度应在  $-70^{\circ}C$  左右;切片厚度一般为 10—24  $\mu m$ ; 当将室温的载玻片同切片刀上的组织切片接触时,因为两者温差约为  $90^{\circ}C$ ,切片即刻干燥和吸附在载玻片上。4. 染色,各载玻片通过某一装置同时浸入染色混合液中。在染色反应过程中,更换两次染色液,总共染色时间为 15 分钟。切片用自来水冲洗,室温下干燥,二甲苯透明,Depex 固定。5. 测定,切片在 Vicker M85 或 M86 显微密度测定仪 (Microdensitometer, Vickers Limited, Haxhydroad, York, Britain) 中进行测定。选择适当大小的光点,对准切片中特异的靶细胞,各测定 10 个不同的区域;先在颜色吸收的最大波长读数,然后改用本底光吸收波长读数,各取其平均值,前者减去后者此数值代表标准曲线上的一个测定点,或是一个样品的测定点。然后用光吸收指数对已知标准激素浓度作出标准曲线,并算出样品浓度。

细胞化学生物测定法的优点: 现以 ACTH 测定为例对其各种测定指标分别予以说明。重复性: 用同一剂量激素处理其靶器官的不同组织块,其间变异小于  $\pm 4\%$ ; 同一样品两种不同稀释度连续两天的测定结果分别为 a 14.7, 14.7; b 236, 250pg/毫升。灵敏度: 所测最低限浓度为 5fg ( $5 \times 10^{-15}$  克),比 RIA 高 500—

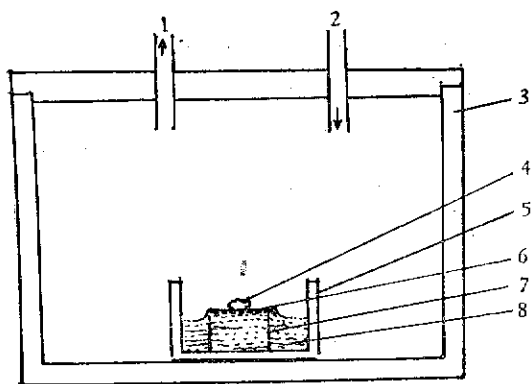


图4 细胞化学生物测定法的培养装置

1.出气孔 2.进气孔 3.培养缸 4.组织块 5.玻璃培养皿 6.脱脂擦镜纸 7.不锈钢网 8.T<sub>1</sub>培养液

1000倍。**精确度**：Buckingham (1974) 连续10次测定所报告的精确度指标为 $0.076 \pm 0.002$ ，准限从86—115%到98—101%；外加激素的回收率为101—102%。**特异性**：实验证明，所测ACTH同其他激素，如促黄体素、催乳素、促肾上腺皮质激素末端多肽无交叉反应；同 $\beta$ -MSH的交叉反应小于0.01%；如果在血清中加过量ACTH抗体，所测到的ACTH活性丧失90%以上。**可比性**：在血浆中加入已知量的ACTH，然后分别用Lipscomb-Nelson生物鉴定法，RIA和细胞化学生物测定法分别进行测定，三者所测结果基本上一致。细胞化学生物测定法兼备RIA和生物鉴定双重优点，样品用量极微，并有可能作1:100和1:1000两个稀释度进行测定。目前用这种方法已有效地测定许多蛋白质和肽类激素。例如促肾上腺皮质激素、促甲状腺素、促黄体素、促胃液素、甲状旁腺激素以及丘脑下

部释放激素等。最近经过测定技术上的某些改进，已开始用切片而代替组织块，大大提高了测定效率，可同时测定几十个甚至几百个样品。此测定法已为WHO确认，并设点推广应用。

## 参 考 文 献

- [1] Turner, C. D. and J. T. Banguale 1976 General Endocrinology (Sixth edition), W. B Saunders company Philadelphia. London. Toronto.
- [2] Martin, C. R. 1976 Textbook of Endocrine physiology. The williams and wilkins company. Baltimore, U. S. A.
- [3] Davson, H and M. B. segal 1975 Introduction to Physiology Vol. 2 Basic mechanisms part 2. Academic press, London. New York, San Francisco.
- [4] Gerald Titwack 1979 Biochemical Actions of Hormones, Academic press, New York San Francisco London.
- [5] King, R. J. B. and W. I. P. Msimwaring 1975 Steroid-cieil Interactions. Bueterworths London.
- [6] Hamilton, T. H., J. H. Clark and W. A. Sadler. 1979 Ontogeny of Receptors and Reproductive Hormone action. Raven Press. New York.
- [7] Pasqualini, J. R. 1976 receptors and mechanism of action of steroid hormones part I. 1976 Marce Dekker Inc. New York and Basel.
- [8] O'Malley, B. W. and L. Birnbaumer 1977 Receptors and Hormone Action 2, 1977. Academic press New York. San Francisco London.
- [9] Chayen, J. J. R. Daly, Loveridge, and L. Bitensky 1976 The cytochemical bioassay of hormones. Recent progress in hormone research Vol. 32 Academic press, Inc. New York San Francisco London.
- [10] Chayen, J. 1978 The cytochemical approach to hormone assay. International review of cytology. Vol. 53. Academic press, Inc. New York San francisco London.