

# 放射配体结合分析法测定 外周血白细胞 GCR 探讨在白血病诊治中的意义

王浩丹 李大培 王维岳 刘德宜  
王清华 宋素芹 张茂宏

(山东医科大学同位素中心实验室, 济南 250012)

研究了人外周血白细胞糖皮质激素受体(GCR)检测方法的最佳条件。检测了29例正常人及80例急性白血病患者外周血白细胞GCR水平。 $K_d$ 值分别为 $5.1 \pm 2.01$  nmol/l和 $5.38 \pm 1.21$  nmol/l。重点探讨了GCR与激素联合化疗疗效及近期预后的关系,结果提示凡患者在疗前GCR $>6000$ 位点/细胞,近期预后都好(16/16),凡 $<6000$ 位点/细胞者,近期预后均差(14/14)。对非淋巴细胞白血病患者疗前GCR的量与疗效及预后无密切关系。报道了15例正常人及10例白血病患者外周血淋巴细胞及白细胞糖皮质激素低亲和力结合位点(GCSBL)的测定,其 $K_d$ 值分别为 $0.8224 \pm 0.241$   $\mu$ mol/l和 $1.067 \pm 0.496$   $\mu$ mol/l, $R_0$ 分别为 $3614.43 \pm 1233.33$  fmol/ $10^7$ 细胞和 $3488.94 \pm 2272.56$  fmol/ $10^7$ 细胞。

**关键词** 糖皮质激素受体(GCR) 糖皮质激素低亲和力位点(GCSBL) 受体的放射性配基结合分析(RLBA) 白血病

我们于1988—1990年曾应用放射配体结合分析法对正常人及白血病患者外周血白细胞进行了糖皮质激素受体(Glucocorticoid Receptor 简称GCR)测定,并对它在白血病治疗中的意义作了报道<sup>[1]</sup>。在此以后,我们又继续观察了较大量病例,并根据文献[2—4]有关大鼠肝细胞胞浆存有糖皮质激素低亲和力结合位点(GCSBL)的报道,我们首次对正常人及白血病人外周血白细胞进行了研究。

## 1 资料与方法

### 1.1 研究对象

急性白血病80例(男50、女30),年龄2—67岁(中位数27岁),其中急性淋巴细胞白血病(简称急淋,ALL)50例,急性非淋巴细胞白血病30例,全部急淋患者和大部分急性非淋巴细胞白血病患者接受包括强的松联合化疗,检测前二周内未使用过糖皮质激素(GC),正常人29例(男19、女10),年龄19—38岁(中位数27岁)。

### 1.2 试剂

[6,7-<sup>3</sup>H(n)-地塞米松(<sup>3</sup>H-dexamethasone, <sup>3</sup>H-DXM),美国Du Pont公司产品,比活度1.77

TBq/mmol, 放化纯度 99%; 地塞米松、皮质酮、脱氧皮质酮、雌二醇、睾酮等纯品均购自美国 Sigma 或 Serva 公司; 淋巴细胞分离液为上海试剂二厂产品; 皮质醇放免药盒由北方免疫试剂研究所提供。

### 1.3 方 法

根据我室建立方法的最佳条件进行<sup>[1]</sup>。完整细胞 GCR 测定结果以“位点/细胞”表示; 将<sup>3</sup>H-DXM 比活度, 加入的<sup>3</sup>H-DXM Bq 值, 总结合 Bq 值及非特异结合 Bq 值输入计算机处理, 并作 Scatchard 图, 求得平衡解离常数  $K_d$  及最大结合容量  $R_0$ 。低亲和力结合位点的分析, 是在结合管中分别加入一定量的<sup>3</sup>H-DXM (终浓度为  $5 \times 10^{-8}$  mol/l) 和不同量的 DXM, 使 DXM + <sup>3</sup>H-DXM 的终浓度为  $5 \times 10^{-8} - 1 \times 10^{-5}$  mol/l。非特异校正管加相同量的<sup>3</sup>H-DXM 和 2000 倍的 DXM。分别计算各管的校正总放射性, 校正总结合和特异结合放射性活度, 运用 LIGAND 程序, 由 IBM 计算机作图, 得高亲和力结合位点和低亲和力结合位点的  $K_d$  和  $R_0$  值。

白血病患者血清总皮质醇测定: 用<sup>125</sup>I-皮质醇放免药盒, 根据说明书操作, 应用 Beckman DP-5500  $\gamma$  计数器测量。

白血病临床疗效及近期预后判断标准, 参照 1987 年苏州会议确定的白血病化疗疗效标准。

## 2 结 果

### 2.1 正常人外周淋巴细胞 GCR 测定

测得正常外周血单核白细胞 GCR 的  $R_0$  值为  $6878 \pm 1563$  位点/细胞,  $K_d$  为  $5.51 \pm 2.01$  nmol/l。结果示于图 1。

### 2.2 GCR 甾体特异性测定

用竞争结合分析研究 GCR 甾体特异性, 将细胞悬浮液分为 5 组, 分别加入 2000 倍<sup>3</sup>H-DXM 浓度的非标记 DXM、皮质酮、脱氧皮质酮、雌二醇和睾酮, 替代 DXM 校正非特异结合。以 DXM 组特异结合为 100%, 计算患者白细胞 GCR 与各种甾体激素的亲合力, 结果为: DXM(100%) > 皮质酮(63.42%  $\pm$  11.3%) >

脱氧皮质酮(43.05%  $\pm$  9.72%) > 睾酮(6.78%  $\pm$  2.33%) > 雌二醇(2.19%  $\pm$  2.79%); 表明所得的 GCR 与 GC 亲和力最高, 与性激素亲和力很低, 有明显的甾体特异性。

### 2.3 急性淋巴细胞白血病患者白细胞 GCR 测定

用急淋患者外周血白细胞作多点法测定, 其  $K_d$  值为  $5.38 \pm 1.21$  nmol/l,  $R_0$  为  $7549 \pm 1497$  位点/细胞。同样的实验证明也有明显的甾体特异性, 其所测受体与 GC 亲和力最高, 证明急淋患者外周血白细胞具有 GCR 的低容量、可饱和, Scatchard 作图为一曲线, 有  $K_d$  值小, 亲和力高的特点。50 例急淋患者 GCR 水平与白血病亚型有一定的关系(表 1)。

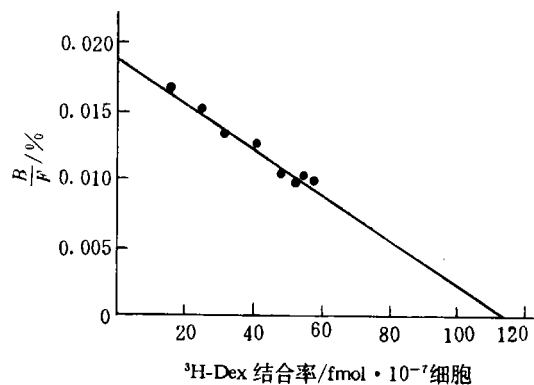


图 1 Scatchard 图

表1 急淋亚型 GCR 数量( $X \pm SD$ )

亚型	n	结合容量/位点·细胞 <sup>-1</sup>	亚型	n	结合容量/位点·细胞 <sup>-1</sup>
N-ALL	12	9281±5911	B	8	3751±1311
C-ALL	9	8748±4545	T	14	4950±3081
per-B-ALL	7				

N-ALL 型及 per-B-ALL 型 GCR 水平较高, B 型及 T 型白血病 GCR 水平较低, 两组间差异有显著意义( $P < 0.05$ ); 而 N-ALL 型、C-ALL 型、per-B-ALL 型间和 B 型与 T 型间差异均无显著意义。由于各型白血病例数少未作统计学处理。30 例急性非淋巴性白血病, 实验数据列于表 2。

表2 急淋非淋巴性白血病亚型 GCR 水平( $X \pm SD$ )

亚型	n	结合容量/位点·细胞 <sup>-1</sup>	亚型	n	结合容量/位点·细胞 <sup>-1</sup>
M <sub>1</sub>	4	4310±3389	M <sub>4</sub>	4	5645±1879
M <sub>2</sub>	7	8316±7483	M <sub>5</sub>	10	9005±11107
M <sub>3</sub>	5	7877±3229			

#### 2.4 GCR 与激素联合化疗疗效和近期预后的关系

随访观察 30 例急淋患者 GCR 水平与临床疗效及近期预后(表 3), 初步提示 GCR 水平与患者疗效及预后相关, 可望作一项独立的指标反映急淋患者疗效及预后。

随访观察 15 例急性非淋巴患者临床疗效及近期预后(表 4), 初步提示 GCR 水平对预测急性非淋巴患者临床疗效及近期预后也具有一定的价值。

表3 急淋患者 GCR 水平与化疗反应及近期预后的关系

GCR/ 位点·细胞 <sup>-1</sup>	例数	疗 效		近期预后	
		有反应	无反应	好	差
>6000	16	16	0	16	0
<6000	14	0	8	0	14

表4 急性非淋巴患者 GCR 水平与临床疗效及近期预后的关系

GCR/ 位点·细胞 <sup>-1</sup>	例数	疗 效		近期预后	
		有反应	无反应	好	差
>6000	8	8	0	4	4
2000-6000	4	4	0	0	4
<2000	3	0	0	0	3

#### 2.5 正常健康人及白血病患者外周血白细胞内 GCSBL 的观察。

分别对 15 例正常人及 10 例急性白血病患者外周淋巴细胞及白细胞进行了 GCSBL 的检测, 首次证实在正常人及急性淋巴细胞性白血病、急性单核细胞性白血病、急性粒细胞性白血

病白细胞内除经典的 GC 高亲和力结合位点 GCR 以外,均存在 GCSBL。运用 LIGAND 程序作 Scatchard 图表现为上凹的曲线(图 2)。正常健康人和白血病患者外周血细胞  $K_d$  值分别为  $0.8424 \pm 0.24 \mu\text{mol/l}$  和  $1.067 \pm 0.456 \mu\text{mol/l}$ ,  $R_0$  分别为  $3756.57 \pm 1341 \text{ fmol}/10^7$  细胞和  $3548.56 \pm 1988.79 \text{ fmol}/10^7$  细胞。

### 2.6 白细胞 GCR 与血清皮质醇的关系

29 例正常人血清皮质醇浓度与 GCR 之间无明显相关( $r=0.24$ ),血清总皮质醇不能反映 GCR 水平。白血病患者:20 例高受体组的血清总皮质醇浓度为  $222.33 \pm 123.21 \mu\text{g/l}$ ,12 例低受体组患者血清皮质醇浓度为  $234.24 \pm 1.03 \mu\text{g/l}$ ,两者间差异无显著意义,均在正常范围内。

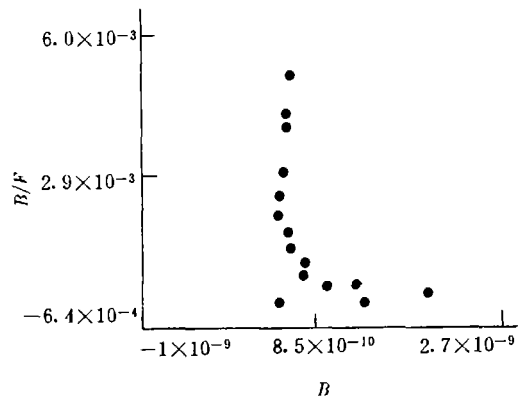


图 2 正常人外周血单个核细胞 GCSBL Scatchard 图

## 3 讨论

(1)对在本实验条件下测得的<sup>3</sup>H-DXM 特异结合进行了鉴定,符合国内外目前确定的受体标准,即具有低容量、高亲和力、甾体特异性、能诱导产生生物效应等特点。目前已知白细胞是 GC 的效应靶细胞,由此可认为测得<sup>3</sup>H-DXM 高亲和力的结合位点是经典的 GCR。20 例正常人外周血白细胞 GCR 水平与文献[5,6]报道相近,说明本法基本上满足完整白细胞 GCR 研究的需要。

(2)急性白血病患者白细胞 GCR 水平与疗效、近期预后的关系<sup>[7]</sup>:急淋患者 GCR 水平与疗效、预后密切相关。用激素联合化疗后,高 GCR 病人(>6000 位点/细胞)往往疗效和预后都较好,而且 GCR 水平也与白血病亚型相关,N-ALL、C-ALL 及 per-B-ALL 的 GCR 水平较高,T 型及 B 型 ALL 的 GCR 水平低,与治疗疗效及预后相符合<sup>[8-11]</sup>;因此 GCR 检测对于预测 ALL 患者疗效及近期预后具有较大的价值。对于急性非淋患者 GCR 的预测,我们的结果认为价值不大。但由于检测及随访病例较少,有待进一步证实。

(3)对 GCSBL 的结构与理化性质目前尚不清楚,根据我们的资料 GCSBL 能介导药理浓度 GC 的生物效应,并能特异地被 GC 拮抗剂 Ru38486 所阻断,阻断率大于经典的 GCR 的最大效应。GCSBL 与甾体激素相对亲和力的大小提示既非 GCR,亦非皮质类固醇运载球蛋白或其它甾体激素受体的交叉反应。实验初步证实了正常人及白血病患者外周血白细胞可能存在有 GCSBL,所测得的  $K_d$  值与文献[2,3]报道相似,这不仅为研究白血病 GC 的治疗对耐受机制提供了新的线索。对于 GCSBL 的本质及与 GCR 的关系,其生理与药理意义尚有待深入研究。

## 参 考 文 献

- 1 王浩丹,李大培,王维岳,等. 外周血白细胞 GCR 及其在白血病治疗中意义的研究. 中华核医学杂志, 1992, 12(3):162.
- 2 Kaufman SH, Shaper JH. Binding of Dexamethasone to Rat Liver Nuclei in Vivo and Vitro; Evidence for Two Distinct Binding Sites. J Steroid Biochem, 1984,20:699.
- 3 Howell GM, Lefebvre YA. Characterization of High Affinity and Low Affinity Dexamethasone Binding Sites on

- Male Rat Nuclear Envelopes. *J Steroid Biochem*, 1989, 33:977.
- 4 Boyum A. Isolation of Mononuclear Cells and Granulocytes From Human Blood. *Scand J Clin Lab Invest*, 1968, 21 (Suppl 97):77.
  - 5 田 英. 人外周血白细胞 GCR 的测定. *中华核医学杂志*, 1983, 3:27.
  - 6 黄宗海, 高 瀚, 徐仁宝, 等. 外周血白细胞 GCR 的测定方法改进. *第二军医大学学报*, 1989, 10(1):59.
  - 7 1987 年 11 月苏州全国白血病化疗治疗讨论会. 急性白血病疗效标准. *中华血液学杂志*, 1988, 9:183.
  - 8 Shipman GF, Bloomfield CD, Gajl-Peczalska KJ. Glucocorticoid and Lymphocytes Effect of Glucocorticoid Administration on Lymphocyte GCR. *Blood*, 1983, 61:1086.
  - 9 Quddus FF, Leventhal BG, Boyett JM, et al. GCR in Immunological subtypes of Childhood Acute Lymphocyte Leukemia Cell; a Pediatric Oncology Group Study. *Cancer Res*, 1985, 45:6482.
  - 10 Bloomfield CD. GCR in Leukemia and Lymphoma. *J Clin Oncol*, 1984, 2:323.
  - 11 Francoise HD. GCR and Steroid Sensitivity in Normal and Neoplastic Human Lymphoid Tissue. *Cancer Res*, 1984, 44:431.

## THE ASSAY OF GLUCOCORTICOID RECEPTOR OF PERIPHERAL LEUKOCYTES USING RADIOLIGAND BINDING ASSAY DIAGNOSTIC VALUE IN LEUKEMIA TREATMENT AND PROGNOSIS

Wang Haodan Li Dapei Wang Weiyue Liu Deyi

Wang Qinghua Song Suqin Zhang Maohong

(*Shandong Medical University, Jian250012*)

### ABSTRACT

The method of measuring the glucocorticoid receptor (GCR) is studied by using whole peripheral leukocytes, and the GCR level of 29 normal cases and 80 cases of acute leukemia are measured. The  $K_d$  are  $5.1 \pm 2.01$  nmol/l and  $5.38 \pm 1.21$  nmol/l respectively. The study is emphasized in the relationship between GCR level and the effect of chemotherapy or its short-term prognosis, the result indicates that patients with GCR higher than 6000 site/cell have good short-term prognosis (16/16), whereas less than 6000 site/cell have poor short-term prognosis (14/14), and there is no such obvious relationship in the cases of non-acute leukemia. The low-affinitive binding site of glucocorticoid (GCSBL) in the peripheral lymphocytes in 15 normal cases and 10 cases of acute leukemia, the  $K_d$  are  $0.8224 \pm 0.241$   $\mu$ mol/l and  $1.067 \pm 0.496$   $\mu$ mol/l respectively, and the  $R_0$  are  $3614.43 \pm 1233.33$  fmol/ $10^7$  cell and  $3488.94 \pm 2272.56$  fmol/ $10^7$  cell as well.

**Key words** glucocorticoid receptor low-affinitive binding site of glucocorticoid radioligand binding assay leukemia