

文章编号: 1005-2216(2002)07-0441-03

# 女性生殖内分泌功能检测的方法学进展

沙桂华 林守清

中图分类号: R71 文献标识码: A

女性生殖内分泌功能检测的内容包括相关激素分子的分泌量及其生物学效应的检查、鉴别病变部位的功能试验及对相关激素和相应受体的基因突变的检测等。在临床工作中则是以激素的定量、生物学效应的检测为主, 本文重点简介生殖激素定量检测方法及被检激素种类的发展。

## 1 卵巢甾体激素及垂体促性腺激素定量测定方法的发展

激素分子, 尤其是雌激素分子( $10^{-12} \text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), 以极微量的浓度存在于血循环中, 所以发展对微量物质的特异性定量检测技术是生殖内分泌疾病研究和临床治疗的限速步骤。激素定量测定有以下几种。

1.1 生物测定 早期性激素的测定方法是生物测定法, 标本为尿液, 优点是直接测定激素分子的生物学效应, 如生殖器官的重量改变, 缺点是周期长, 实验条件难以标准化, 结果的可比性差。

1.2 生化法 上世纪 50 年代开始使用生化法, 用有机溶剂提取, 然后层析、比色等, 缺点是费时费力, 不能作微量检测。

1.3 免疫定量分析 随着免疫学的进展, 有了可高度特异性识别抗原的抗体后, 发展了免疫学检测方法。

1.3.1 放射免疫分析(RIA) 1959 年创立的 RIA 在激素分子检测史上具有划时代意义, 为此发明者获得了诺贝尔医学奖。该技术的关键是将有放射性的物质标记在待测物上, 通过特殊设备放大标记物的信号, 明显提高了检测灵敏度, 用抗体作为结合物取代以往用的有机、无机物, 大大提高了特异性, 即把放射性核素的高灵敏与免疫反应的高特异结合起来, 使免疫分析从定性变为定量, 从常量分析提高到微量, 甚至是超微量( $10^{-6} \sim 10^{-12} \text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), 从而检查到以往无法检测到的微量分子, 使内分泌学科进入快速发展阶段。到了上一世纪 90 年代初期, 传统检测的卵巢甾体激素: 血雌二醇、睾酮与孕酮, 垂体激素: 血卵泡刺激素、黄体生成素与催乳素, 即大家经常统称为血六项激素放免测定在我国的中等城市得到普及。但是 RIA 的缺点即同位素标记物半衰期短, 试剂盒的有效期短, 尤其是  $^{125}\text{I}$  的半衰期为 60 天, 试剂盒需每个月供应一次; 受放射性的衰变影响, 每次测定都需作标准曲线; 并在每批测定中, 同时检测高、中、低剂量的相同血清, 对测定进行质量控制, 使测定精确

性误差控制在批内应低于 10%, 批间 < 15% (当然由 RIA 开始的质量控制概念以后被推广到其它测定中, 从而推动了检验学的发展); 抗原抗体的反应达到平衡需时长, 需数小时甚至过数夜; 放射线的信号测量需足够时间才能积累到满足要求, 常常每一样品管(瓶)需一分钟, 基于这些问题 RIA 无法进行快速的自动化分析。此外放射性物质污染环境, 如  $^3\text{H}$  半衰期长达 12 年, 需要足够的空间存放放射性废物, 等待其衰变。

1.3.2 RIA 后的发展 近年来, 随着单克隆抗体、基因重组、新材料、电子计算机、自动化等各门技术的发展和组合, 针对 RIA 的缺点, 激素的免疫分析在临床上出现更新换代式的发展, 用非放射性物质如酶、荧光、发光、重金属离子替代放射性核素的标记技术如下(见表 1)。

表 1 免疫测定技术的种类

类别	名称	英文缩写
放射免疫	放射免疫	RIA
	免疫放射定量分析	IRMA
酶免疫	发色	ELISA
	荧光	EIFA
	发光	EILA
荧光免疫	荧光偏振	FPIA
	时间分辨荧光	DELFLIA
发光免疫	发光免疫	LIA
	电化学发光	ECL
免疫传感器		SPR, SAW

新检测手段和设备使从计数放射性变为测量光的吸收、荧光和发光的强度, 从取样、加液、温育、结合/游离(B/F)被测物的分离、免疫反应的测量、结果的计算实现了全过程的自动化。

(1) 酶免疫: 酶取代放射性核素作示踪剂, 其催化底物与核素一样起到信息放大的作用。酶联免疫吸附法(ELISA)通过检测生色底物在酶作用下产物的吸光值测定激素抗原, 但不限于发色反应, 也不只是指应用微孔板的“板式酶标”。板式酶标, 由于孔间的均一性欠佳, 及显色体积太小, 比色光径不足, 以至重复性不够理想, 难于满足要求精度 ng 以上, 且量程要求三个数量级的实验。瑞士 Serono 等公司推出“管式酶标”增加了光径, 增大了抗体结合量, 从而放大了效果; 并采用异硫氰基荧光素(FITC)连

接第一抗体和通用抗 FITC 磁化颗粒作 B/F 分离;在显色底物上,采用了磷酸酚酞,提高了显色的稳定性。与放免法比较,其优点在于可利用存储的标准曲线,不必每次测定都作标准曲线。其缺点是反应的底物是有毒的,酶不稳定,反应需严格控制温度和 pH 值。此外,应用发色底物的方法,其灵敏度和重复性低于放免分析。

酶免疫反应的底物改为荧光底物后,便成了酶免疫荧光分析(EIFA),由于荧光的强度可大于激发光 10 倍之多,故有效地提高检测灵敏度,又由于荧光测量的范围比分光测量宽,即线性范围大,可测范围将提高一个数量级,如美国 ABBOTT 公司的 IMX 快速微粒子酶免疫荧光。

酶免疫反应的底物改为发光底物时,便成了酶免疫发光(EILA)技术。

(2) 荧光免疫:直接用荧光物质标记抗体或抗原来进行分析,包括荧光偏振免疫分析(FPIA)和镧系元素标记的时间分辨荧光免疫分析(DELFIA)。生物梅里埃公司推出了全自动荧光免疫测定仪,其特点是将测定用的试剂组合在一包括数个孔的试剂条上,测定一份样品可快速得到多种激素的结果,用于人工助孕技术的促排卵过程中雌激素水平的监测极为方便,不必积累病人标本成批地测定,但是灵敏度低,为  $10^{-9} \text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,通常需要预处理样品以减小背景及标本干扰,并且不能测定大分子质量的物质。时间分辨荧光测量技术是用镧系元素螯合剂作示踪剂,来标记抗原或抗体,反应物荧光明显增强而持久,用延迟测量的办法可消除样品自身的早期背景荧光而提高检测灵敏度。

(3) 发光免疫:化学发光免疫分析不使用酶而直接用发光物质标记抗原或抗体来进行分析。如美国 CHIRON 公司生产的 ACS-180 使用类均相的包被抗体的磁性微粒,扩大了反应面,加速了免疫反应,不用酶,避免了许多影响因素,无需催化剂,故大大提高了速度,每一反应仅需 7.5 分钟,每小时可分析 180 份标本。

德国 BM(Borhringer Mammheim)公司,最近推出了更新的方法,电化学发光(ECL),利用稀土元素钆进行标记,利用磁颗粒作 B/F 分离,利用电极板上的氧化还原反应来进行分析。这一方法,光子测量的数量级高达 6 级,物质的量程高达 4 个数量级,其测定结果十分稳定,可测定包括大分子蛋白、抗体、小分子多肽及核酸等各类生命物质。

(4) 免疫传感器:免疫传感器将抗体固定在特制的探针上,将其插入待测样品,相应抗原即会被结合,应用表面等离子体共振和表面声波技术,可在微量样品中测多种物质,目前尚处于研究阶段。

放免的灵敏度、特异性都是很高的,至今它仍是各种免疫定量分析的参比“金标准”。但是,由于其存在的缺点,近年来发展了上述快速及全自动化的测量技术。这些进展给生殖内分泌领域的研究和临床工作带来了广阔的发展空间。但是,这些方法或多或少还存在某些不足,还有待进一步完善。

## 2 被检测激素种类的发展

除了传统血六项激素外,现已可测的有关生殖激素或物质还有雌酮、雄烯二酮、去氢表雄酮、游离睾酮、性激素结合球蛋白等。下面对近年来增加的测定项目抑制素和瘦素作一简介。

卵巢肽类激素——抑制素、激活素:

抑制素(inhibin)为异二聚体肽类激素,分为两种类型,抑制素 A 含有  $\beta_A(\alpha\beta_A)$ ,抑制素 B 含有  $\beta_B$ 。两条  $\beta_A(\beta_A\beta_A)$  链构成激活素(activin)A,两条  $\beta_B(\beta_B\beta_B)$  链构成激活素 B。

抑制素主要由卵巢的颗粒细胞分泌,有反馈抑制垂体 FSH 分泌的作用。抑制素 A 主要由优势卵泡及黄体分泌,抑制素 B 主要由中小窦状卵泡分泌,反映本周期早期窦状卵泡数目和活性,为卵泡储备下降的最早指标<sup>[1]</sup>。在绝经过渡期抑制素的下降早于 FSH 的上升和  $E_2$  的下降,可作为卵巢功能下降的指标。胎盘也产生抑制素和激活素,检测循环血液和羊水中抑制素和激活素的浓度有助于比常规的方法提早判断植入胚胎的成活,在先兆子痫、早产和 21 三体综合征的早期诊断中有预测价值<sup>[2]</sup>。

早期的检测方法是 Monash 的碘标记放免法,测定抑制素的公共  $\alpha$  亚基,其缺点是不能鉴别抑制素 A 和抑制素 B,现用 Groome 的双位点 ELISA 法,可同时测定  $\alpha$  和  $\beta$  两条肽链。

瘦素(leptin)是脂肪组织的肥胖基因编码的信号分子,瘦素含 146 或 147 个氨基酸,16ku。瘦素基因突变的纯合子小鼠有肥胖、低促性腺激素、无排卵和无生殖功能综合征;人类下丘脑、卵巢和子宫组织,甚至卵细胞中均发现了瘦素受体,其基因突变会引起肥胖和低促性腺激素血症。

美国 Linco 公司提供商品化试剂盒供检测瘦素水平,方法有 RIA 和 ELISA 法。其基本原理与上述的相同,两种方法采用相同的兔抗人瘦素抗体,与其它激素的交叉反应极低。灵敏度基线均为  $0.5 \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,体重指数在 18~25 的瘦女性血清水平为  $(7.4 \pm 3.7) \mu\text{g/L}$ 。北京协和医院内分泌科吴从愿教授建立的 ELISA 检测方法灵敏度为  $0.05 \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,批内和批间变异小于 10%<sup>[3]</sup>。

## 3 激素分子作用的生物学效应检测

雌激素作用于生殖器官上的雌激素受体产生相应的雌激素生物效应。对雌激素生物效应的检测是对受体表达量、亲和力和受体后信号传导途径的综合评价,而且生物学效应评价方法简单、易行、可靠,是生殖内分泌先驱者们多年观察得到了经验的总结,在临床工作中有重要的作用。

卵巢周期性功能的检测有阴道脱落细胞学检查、BBT、宫颈粘液检查、内膜活检组织学检查等。此外,乳腺、阴毛等发育情况对青春期发育有重要参考价值。以上功能评价的方法已较成熟,多年来没有明显的发展。

#### 4 影像学检测

近年来,阴道超声监测排卵及子宫内膜的厚度在人工助孕技术中有了广泛的应用;多囊卵巢综合征有其特征性的卵巢图像。对于有闭经、溢乳和性早熟的病人,需作鞍区和头颅的放射学检查除外器质性病变。用 X 线测定骨龄对性早熟和雌激素低落性疾病患儿病情的估计和治疗方案的选择有重要的意义。这些方法学的进展与超声和放射学显像技术的进步密切相关,在此不赘述。

#### 5 女性生殖内分泌功能试验

孕激素试验和雌孕激素序贯应用的试验作为闭经程度和定位诊断方法在临床上较为常用。GnRH 兴奋试验用于定位下丘脑、垂体性闭经及鉴别真假性早熟,目前临床较多采用简化的 GnRH 兴奋试验。其它功能试验包括地塞米松抑制试验、ACTH 兴奋试验、克罗米酚试验在妇科内分泌临床实践中目前应用较少。多囊卵巢综合征的病人常伴有胰岛素抵抗,口服糖耐量试验可对胰岛素抵抗情况进行评

估。

#### 6 基因突变研究方法

性激素或促性腺激素受体基因缺陷都有可能导致激素不能发挥正常作用,如垂体 GnRH 受体的基因点突变会导致不同程度的低促性腺激素性性功能低下。此类疾病最根本的诊断依赖于对相关基因的序列分析。

#### 参 考 文 献

- 1 Kligman I, Rosenwaks Z. Differentiating clinical profiles: predicting good responders, poor responders, and hyperresponders. *Fertil Steril*, 2001, 76(6):1185
- 2 Florio P, Cobellis L, Luisi S, et al. Changes in inhibins and activin secretion in healthy and pathological pregnancies. *Mol Cell Endocrinol*, 2001, 180(1-2):123
- 3 史轶懿. 协和内分泌和代谢学. 北京: 科学出版社, 1999. 342

(2002-04-09 收稿)

### 短篇报道

## 高位截瘫孕妇剖宫产术中发生高血压 1 例

李胜平 唐小丽 柏朝益 韩仕碧

患者, 25 岁, 孕 1 产 0, 因外伤后高位截瘫(T4~6)伴大小便失禁 8 年, 孕 37<sup>-1</sup> 周, 胆汁淤积症于 2001 年 8 月 17 日待产入院。查体: BP 12/8kPa, 双下肢肌力 0 级, 肌肉萎缩, 剑突以下触、痛、温觉消失, 锥体束征阳性。宫高 34cm, 腹围 86.5cm, 胎位及骨盆外测量正常。彩超示: 胎儿双顶径 8.6cm, 胎盘 I~II 级, 脐带绕颈 1 周, 双下肢动静脉未见血栓征象。入院后予保肝、促胎儿成熟等处理。2001 年 8 月 20 日孕妇感心慌、头昏, BP 16/11kPa, P 100/min, 有宫缩。考虑子宫收缩引起自主性反射亢进导致血压急剧升高, 胎心监护又提示胎儿窘迫, 遂于 2001 年 8 月 20 日在持续硬膜外麻下行剖宫产术。在切开子宫后血压升高至 18.6/12.0kPa, 予尼卡地平 0.2mg 静推后降至 16/10kPa。婴儿娩出静脉滴注催产素 20IU 后, 血压急剧上升至 20.7/12.7kPa, 再次尼卡地平 0.2mg 静推, 血压降至 16/11kPa。缝合子宫切口期间, 血压第 3 次升高至 18.6/12.0kPa, 尼卡地平 0.2mg 静推后降至 16/8kPa。手术结束后血压稳定在 12/8kPa 左右。术后第 7 天拆线, 母子平安出院。

讨论 截瘫妇女妊娠以至分娩比较少见, Goller 和 Paeslack 总结了 24 个国家 42 个中心的病例, 只有 175 例<sup>[1]</sup>。本例孕妇在 T4~6 完全性截瘫后 8 年结婚并怀孕分娩, 则少见。截瘫孕妇主要的并发症是肺活量和动脉压降低、血栓栓塞、贫血、泌尿道感染、早产、异常的分娩进程

及自主性反射亢进, 尤其是后者, 最为严重<sup>[2]</sup>。当脊髓损伤在 T6 以上时, 85%~90% 的截瘫孕妇都会出现自主性反射亢进, 主要特征是动脉压阵发性过度升高<sup>[3]</sup>。若不及时处理, 可以致死。判定标准是与产前的血压对照, 如果产前血压是 (10.7~12.0)/8kPa, 产时血压达 17.3/10.7kPa 则表明出现了自主性反射亢进<sup>[1]</sup>。而且分娩时子宫收缩引起的急性自主性反射亢进最危险, 如果子宫收缩是由催产素诱发的, 则风险更大<sup>[1]</sup>。目前认为硬膜外麻醉是预防自主性反射亢进最好的方法<sup>[4]</sup>, 并可配合使用降压药物(如肝素、咪唑)。<sup>[2]</sup> 本例孕妇在硬膜外麻下行急诊剖宫产术, 虽在术中出现 3 次高血压, 但加用尼卡地平后并未出现严重后果。

#### 参 考 文 献

- 1 Verduyn WH. Pregnancy and delivery in tetraplegic women. *J Spinal Cord Med*, 1997, 20(3): 371
- 2 Pardina B, Metje T, Villalonga A, et al. Pregnancy and partum in the woman with a spinal cord lesion in chronic phase. *Rev Esp Anesthesiol Reanim*, 2001, 48(2): 93
- 3 Plotz J, von Hugo R. Autonomic hyperreflexia, pregnancy and delivery in para-tetraplegia; the obstetric anesthesiologic viewpoint on a case. *Anaesthesist*, 1996, 45(12): 1179
- 4 Kaidomar M, Raucoules M, Ben MM, et al. Epidural anesthesia and prevention of autonomic hyperreflexia in paraplegic parturient. *Ann Fr Anesth Reanim*, 1993, 12(5): 493

(2001-09-13 收稿 2002-01-17 修回)