

大白鼠肝细胞胰岛素受体的放射受体法测定

郑 玢 顾天爵 邱传禄

(上海第一医学院生化教研室, 华山医院)

肝细胞胰岛素受体的放射受体测定, 已有不少报道^[1-3], 但方法不易重复。我们根据本实验室的条件, 建立了大鼠肝细胞胰岛素受体测定的方法。并采用 Scatchard 作图法^[4]和 De Meyts 作图法^[5], 可分别获得胰岛素受体特性的二个重要参数——受体总数和亲和力。

材 料 与 方 法

一、材料

1. Wistar 大白鼠 160—180g, 2. ^{125}I -胰岛素 258 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ 由华山医院糖尿病研究室提供, 标记方法系采用 B. B. Tower^[6] 双步酶标法。3. 胰岛素由上海生化研究所提供, 效价 27.56 单位/mg。4. 1.55% CaCl_2 溶液新鲜配制。5. 无糖无钙 Hank's 液。6. 混合纤维素酯微孔滤膜、孔径 1.2 μm , 上海医工院生产。7. 牛血清白蛋白(BSA), Fraction No.5, Sigma 产品。

二、方法:

1. 肝细胞悬液的制备 按本室^[7]方法制备的肝细胞基本处于分散状态。在高倍镜下观察, 细胞外形完整, 胞浆有明显的颗粒状细胞器, 核清晰可见, 95% 以上是肝细胞, 未见破损。

2. 反应体系的组成

^{125}I -INS (258 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$) 12ng/ml 50 μl (12 万—14 万 cpm(约 0.601ng)

CaCl_2 1.55% 20 μl

肝细胞悬液 6×10^6 个/ml 200 μl

未标记 INS (6.25 μg —0.625ng/ml) 80 μl

(或无钙无糖 Hank's 液)

总体积 350 μl , 含 0.1% BSA, 每组三复管、pH = 7.5, 在塑料小管中依次加入不同浓度的未

标记胰岛素, CaCl_2 溶液, 肝细胞悬液及 ^{125}I -INS (预先用 FH 408 定标器测定 50 μl 约 12 万 cpm), 混匀后放入 4℃ 冰箱保温 20 小时。

3. 保温结束, 加入 3ml 冰冷的含 0.01% BSA Hank's 液终止反应, 用混合纤维素酯微孔滤膜 (先用 0.1% BSA Hank's 液浸 20 小时) 立即过滤 (每管过滤时间不超过 30 秒)。将细胞与上清液分离, 用含 0.01% BSA Hank's 液 3ml 反复洗涤塑料管四次; 倒入过滤。将沉积有细胞的滤纸片放回塑料管内, 测量计数。(此塑料管经 3ml Hank's 液洗涤四次后, 已基本接近本底范围。)

4. 数据的换算:

T = 加入 ^{125}I -INS 总值 (约 12 万—14 万 cpm)

B_0 = 不加入未标记胰岛素所测得最大结合值

B_{NS} = 加入未标记胰岛素为 ^{125}I -INS 的 8×10^4 倍时 (80 μl 为 50 τ) 所测得结合值。

F = 游离 ^{125}I -INS 值。

B = 加入不同浓度未标记胰岛素所测得结合值。

特异性结合量 = $B_0 - B_{NS}$ 或 $B - B_{NS}$ 特异性

结合率 = $\frac{B_0 - B_{NS}}{B_0}$ 或 $\frac{B - B_{NS}}{T}$ 非特异性结

合率 = $\frac{B_{NS}}{B_0}$ (也称非特异性吸附),

结 果

一、反应条件对结合的影响

根据放射受体分析法原理, 最佳实验条件

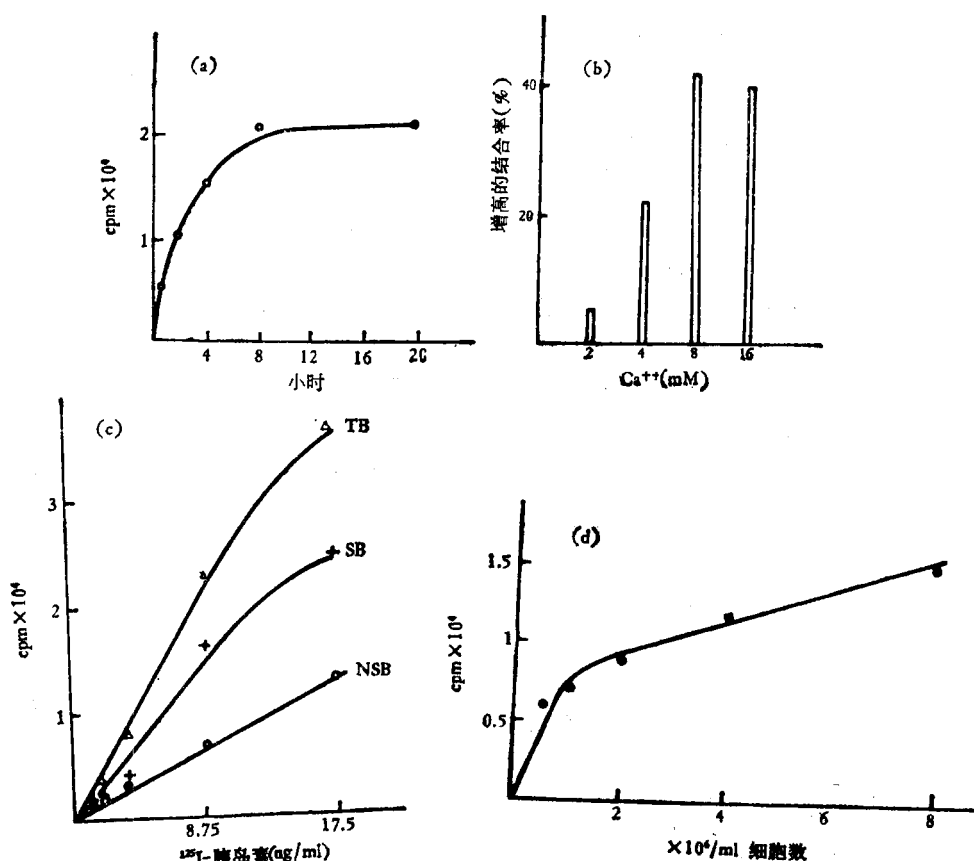


图 1 反应条件对胰岛素与其受体结合的影响

图 1-a 保温时间与结合量关系曲线(4°C)

图 1-b 不同浓度 Ca^{++} 对 INS 与肝细胞表面受体结合的影响

图 1-c 加入不同浓度 ^{125}I -INS 与肝细胞特异性结合曲线

图 1-d 不同浓度大鼠肝细胞与 ^{125}I -INS 特异结合线

必须是在加入未标记胰岛素的最低和最高浓度时所测定的数据差距为最大,即特异性结合量或特异性结合率为最大值。为了满足上述要求,我们改进了 Freeket^[8] 介绍的胰岛素与完整肝细胞表面受体结合测定方法。

1. 反应温度对结合的影响 根据 Ginsberg 等^[9] 报道细胞胰岛素受体和胰岛素结合, 4°C 较 37°C 高 3—4 倍。本实验室进行了温度的选择: 将肝细胞和 ^{125}I -INS, 在 24°C 保温 45 分钟后, 特异性结合率为 30%; 而在 4°C 保温 30 分钟后, 特异性结合率为 45%, 分别在 4°C 和 15°C 保温二小时, 则 4°C 的特异性结合率为 48%, 15°C 时仅为 22.7%, 采用 4°C 保温, 特异性结合率随保温时间延长而增加, 到 8 小时后, 结合反

应到达稳态。为操作方便, 以下实验均采用 4°C, 保温 20 小时。(图 1-a)

2. Ca^{++} 浓度对结合的影响 (a) 取制备好的肝细胞悬液各 200 μl , 分别装入二个塑料管内, 一管内加 1.55% CaCl_2 20 μl , 另一管内加无钙无糖 Hank's 液 20 μl , 放入冰箱中, 4°C 下保温 20 小时后, 发现不含钙管细胞凝集成团块, 而含钙管则细胞分散。(b) 在反应体系中, 加入不同浓度的 Ca^{++} , 观察对结合的影响。由图 1-b 可见, Ca^{++} 的加入可增加胰岛素与受体的结合; 以 8mM Ca^{++} 浓度最合适, 结合可增加到 42%。

3. ^{125}I -胰岛素量的选择 加入不同浓度的 ^{125}I -INS 使之与一定量肝细胞结合, 求得曲线,

表 1

细 胞 数	5×10^5	1×10^6	2×10^6	4×10^6	8×10^6
$\frac{B_0 - B_{NS}}{B_0} \%$	58.4	60.2	66	70	75

见图 1-c. (高浓度 ^{125}I -INS 与肝细胞的结合可达到饱和, 图中未完全显示). 由图可见, 选择加入 ^{125}I -INS 的浓度在 $10.5\text{--}12.5\text{ng/ml}$, 即相当于在 $350\mu\text{l}$ 体积中加入 ^{125}I -INS 的计数为 12 万—14 万 cpm 最好, (实际加入 ^{125}I -INS $0.601\text{ng} \pm 50\mu\text{l}$) 计数不低, 特异性结合率又可达 70% 以上.

4. 细胞浓度的选择 根据特异性结合率对细胞浓度进行选择, 特异性结合率随细胞浓度增加而增大(表 1). 以不同浓度肝细胞对 ^{125}I -INS 与其特异性结合量作图, 图 1-d. 本实验采用肝细胞浓度为 6×10^6 个/ml; 倘若细胞浓度再增大, 每只鼠所制备的肝细胞悬液可能不够使用. 再者, 由于细胞浓度较高, 一定量非标记胰岛素与之结合, 反而对 ^{125}I -胰岛素的竞争不敏感. 因此, 非标记胰岛素、标记胰岛素, 细胞浓度之间必须寻求一个合适的比例.

5. 未标记胰岛素浓度的选择 以各管加入不同浓度未标记胰岛素的特异结合量所占最大特异结合量的百分比 $\frac{B - B_{NS}}{B_0 - B_{NS}}$ 对 不同 未 标记 胰岛素的对数浓度作图 (见图 2). 从图中可知, 当体系中未标记胰岛素最终浓度在 10ng/ml 时, 抑制率达 50%, 在 0.1ng/ml 时, 抑制率达 12%,

1000ng/ml 时抑制率达 90%, 未标记胰岛素在 $0.1\text{--}1000\text{ng/ml}$ 范围内对 ^{125}I -胰岛素与细胞结合的竞争效应变化显著.

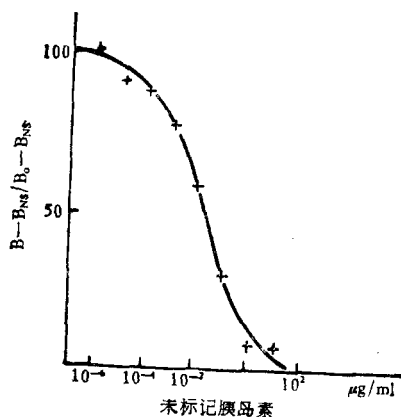


图 2 胰岛素在肝细胞的竞争抑制曲线

二、正常大白鼠肝细胞胰岛素受体测定结果

1. 大白鼠肝细胞与胰岛素特异性结合曲线

以 ^{125}I -INS 的特异性结合率 $\frac{B - B_{NS}}{T}$ 对不同胰岛素浓度对数作用, 得到特异结合曲线 (图 3-a). 本实验中, 非特异性结合不超过总结合的 30%, 不超过加入标记胰岛素总量的 10%.

2. 大白鼠肝细胞与胰岛素结合的受体数 (结合位点) 的测定——Scatchard 作图分析. 以

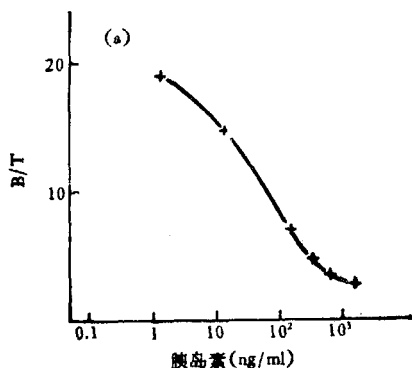
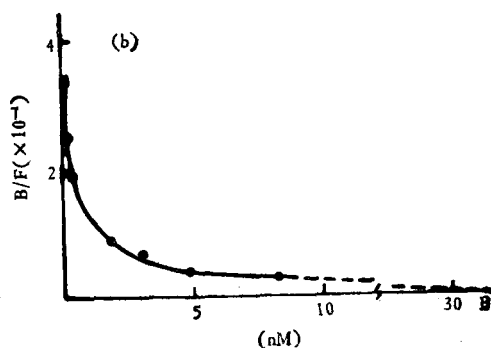
图 3-a 大鼠肝细胞与 ^{125}I -INS 特异性结合曲线

图 3-b Scatchard 作图

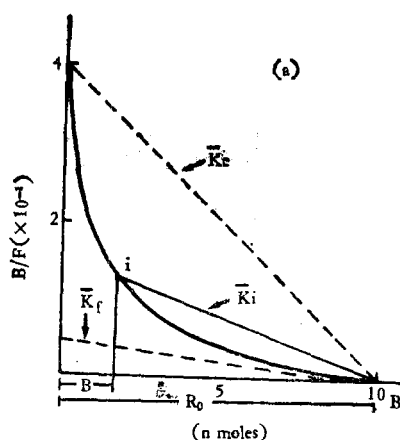


图 4-a 亲和力计算图

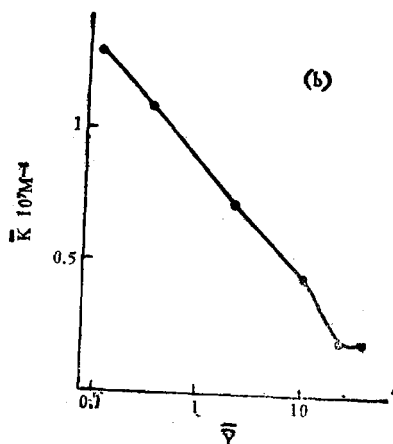


图 4-b 大鼠肝细胞胰岛素受体平均亲和力图

$\frac{B}{F}$ 对 B 总作图(图 3-b),

$$\frac{B}{F} = \frac{^{125}\text{I-INS 特异性结合量}}{\text{游离}^{125}\text{I-INS 量}}$$

$$= \frac{B - B_{NS}}{T - B}$$

B_{NS} = 总结合浓度

$$= \frac{\text{加入胰岛素总量(包括标记及未标记)}g}{350\mu l \times \text{胰岛素分子量}(5600) \times 10^{-6}}$$

$$\times \frac{B}{T} = M$$

将 Scatchard 曲线外推与 x 轴相交,其截距为胰岛素受体总浓度 R_0 。

对 8 只正常 Wistar 大白鼠肝细胞作受体测定,其受体平均总浓度为 $19.83 \pm 7.4 \text{ nM}$ ($\bar{x} \pm \text{SD}$),受体数/每个细胞 $= R_0[M] \times 6.022 \times 10^{23}$ /每升细胞数 $= 19.9 \times 10^7$ 个。

3. 大白鼠肝细胞胰岛素受体平均亲和力图象—De Meyts 图表现同一类受体在不同结合状况下的亲和力大小。以平均亲和力 $\bar{K}$ 对受体结合容量百分比 $\bar{Y}$ 对数作图,平均亲和力 ($\bar{K}$) 计算: 当胰岛素缺乏时,受体处于高亲和力形式,以 $\bar{K}_e$ 表示高亲和力状态的结合常数。当受体位点被胰岛素占领时,部分受体转变成低亲和力形式,以 $\bar{K}_i$ 表示低亲和力状态的结合常数。

对于任何一点中间状态的受体平均亲和力的计算, $\bar{K}_i = \frac{B/F}{R_0 - B}$ 见图 4-a。结合容量百分

比 $\bar{Y}$ 计算: $\frac{B}{R_0} \times 100\%$ 对 8 只大鼠肝细胞胰岛素受体结合情况,作 De Meyts 图分析 $\bar{K}_e = 0.15(\pm 0.05) \times 10^8 \text{ M}^{-1}$, 而 $\bar{K}_i = 0.37(\pm 0.14) \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ 。

实验中承中科院生化所张友尚教授,冯佑民,张新堂老师帮助和指导,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Olefsk, J. M. et al.: *Diabetes*, 24 (Suppl), 801, 1975.
- [2] Kahn, C. R. et al.: *J. B. C.*, 248, 244 1973.
- [3] Freychet, P. et al.: "Hormone and Metabolic Research" Supplement Series, No. 5, 1974.
- [4] Scatchard, G.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 51, 660, 1949.
- [5] De. Meyts, P., Roth.: *J. Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 66, 1118, 1975.
- [6] Tower, B. B. et al.: *Life Sciences*, 21, 959. 1977.
- [7] 朱正美, 顾天爵 《细胞生物学杂志》, 4(3), 1982.
- [8] Freychet, P.: "Methods in Receptor Research" (part 2), p. 385, 1976.
- [9] Ginsberg, B. H.: "Biochemical Action of Hormones", 4, 1977.

[本文于 1984 年 5 月 14 日收到]