

技术与方法

糖皮质激素受体交换测定方法的改进*

谭金兴 徐仁宝

(第二军医大学病理生理教研室, 上海)

提 要

本文改进了内源性糖皮质激素存在条件下, 胞液糖皮质激素受体(GCR)总量的检测方法, 在钼酸钠和巯基乙醇保护下, 采用 25℃ 30 min 的条件使和 GCR 结合的糖皮质激素和 [^3H] 地塞米松交换。实验结果表明, 在此条件下, GCR 活性不变, 交换率达 $94.9 \pm 4.2\%$ (皮质酮 100_nM 浓度下), 受体亲和力不变。本法适用于生理和病理条件下, 特别是血浆糖皮质激素高浓度时的胞液 GCR 的检测。

在受体的放射配体结合测定中, 测定内源性配体存在时的受体总结合量, 这是研究生理、病理条件下受体变化必须解决的问题。我们在测定活细胞的糖皮质激素受体 (GCR) 时, 通过加温促使细胞内 GCR 与内源性糖皮质激素 (GC_E) 解离, 将 GC_E 洗去, 再测定 GCR 总量, 得到了满意的结果^[1]。但此法不适用于胞液 GCR 的测定, 因为加温会使胞液 GCR 迅速失活。为此, 胞液 GCR 的测定只能在 $0 \sim 4^\circ\text{C}$ 下进行。如 Rosner^[2] 将 [^3H] 地塞米松 ([^3H] Dex) 加入大鼠肝胞液后, 于 0°C 放置 20 小时, 待内源性皮质酮 (B) 分解后测定。Giannopoulos^[3] 将标记配体加入胞液后, 0°C 放置 5 小时, 使其与内源性 B 交换后再测定 [^3H] Dex 特异结合。我们曾用此法测定大鼠肝^[4]、脑^[5]胞液 GCR, 发现此法虽然可以得到稳定的结果, 但交换率仅为 88% (肝) 和 70% (脑)。由于交换不完全, 加上游离的内源性 B 降低了标记配体的放射比度, 因此测定值低于实际值, 内源性 B 愈高, 二者之间的差别就愈大。

1979 年 Sando 等^[6]发现, 胞液内加钼酸钠和二硫苏糖醇 (DTT) 可以保护 GCR 在 25°C 数小时内免于失活。在这一发现的启示下,

Hubbard 等^[7]建立了肝胞液 GCR 的快速高温交换测定法, 即胞液内加钼酸钠和 DTT, 使 [^3H] Dex 和内源性 B 于 15°C 进行 2 小时的交换, 测定达到了满意的结果。但作者只报告了一点分析的结果, 未提及该测定法是否能得到合理的解离常数 (K_d) 值。鉴于 DTT 目前还系进口试剂, 价格昂贵, 我们用巯基乙醇代替 DTT 对 Hubbard 法作了修改, 对方法作了严格的检验, 证明修改后的 Hubbard 法是一种简便的、比较理想的 GCR 交换测定法。

一、材料和方法

1. 试剂

[1、2、4- ^3H] Dex, 中国科学院上海原子核研究所产品, 20 Ci/mmole , 放化纯度约 95%; 稀释成 1:200 备用。

皮质酮、地塞米松, Sigma 产品

钼酸钠、巯基乙醇及其他试剂皆为国产 A. R.

2. 肝胞液的制备

* 中国科学院科学基金资助课题《糖皮质激素对糖皮质激素受体的调节》的方法部分。

大鼠断头处死,用冰冷的生理盐水从肝静脉灌注,将血冲净,取出肝脏,加3倍(W/V)量的匀浆缓冲液(蔗糖 0.25M, KCl 25mM, MgCl₂ 1mM, CaCl₂ 1mM, 钼酸钠 10mM, Tris 50mM, pH 7.40。使用前加巯基乙醇,最终浓度为0.1%),匀浆,175,000×g离心30分钟,取上清(胞液)2ml,加5%葡聚糖加膜活性炭(Dextran coated chaecoal, DCC) 1ml,离心,取上清测定GCR。

3. 肝胞液 GCR 的测定

取胞液 0.25ml,加 [³H]Dex (最终浓度,一点分析时用饱和浓度 40nM, Scatchard 分析时 5~40 nM),非特异结合校正管再加 500 倍浓度的非标记 Dex, 25℃ 放置 30 分钟,再于 0℃ 放置 2 小时,加 DCC,离心,取上清,液闪测量其放射活性,详见前文^[4]。

4. 内源性皮质酮模拟试验

大鼠去除双侧肾上腺 4~5 天后处死,制备肝胞液。然后分成两份,其中 1 份内加入 B50~100 nM (以下简称 B_E 模拟胞液),另 1 份内只加溶剂(对照胞液),0~4℃ 放置 2 小时,使 B 与 GCR 结合达到平衡,然后两份胞液同时加等量 (V/V)DCC, 0~4℃ 下摇 1 分钟,离心去除游离 B,取上清,加 [³H]Dex,按上述方法测定两份胞液的 [³H]Dex 特异结合。

二、结果和讨论

1. 交换条件的选择

肝胞液内加 100 nMB, 0℃ 放置 2 小时,使其与 GCR 结合形成皮质酮-受体复合物后,加 [³H]Dex 40 nM,放置于 15℃ 和 25℃,于不同时间取出部分胞液,再于 0℃ 放置 2 小时, DCC 处理后,测定其 [³H]Dex 结合量。如图 1 所示, 15℃ 时, 60 分钟交换达到平衡, 3 小时内结合量不变,说明 GCR 没有失活。与此不同, 25℃ 条件下,只要 20 分钟交换已基本上达到平衡, 50 分钟内稳定, 60 分钟后受体有失活趋势。

2. 交换率

比较了同一肝脏的 B_E 模拟胞液和对照胞

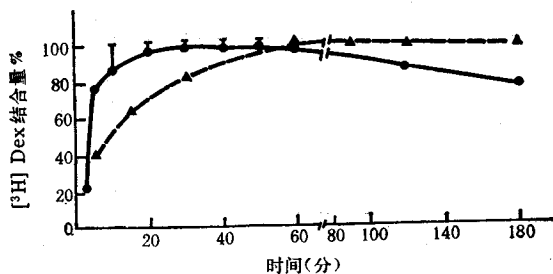


图 1 大鼠肝胞液皮质酮-受体复合物与 [³H] 地塞米松交换的时间曲线

液的 [³H]Dex 特异结合,按下式计算交换率。

交换率(%) =

$$\frac{B_E \text{ 模拟胞液的 } [^3\text{H}]\text{Dex 特异结合}}{\text{对照胞液的 } [^3\text{H}]\text{Dex 特异结合}} \times 100$$

结果, 15℃ 90 分钟, [³H] Dex 40 nM 对 B50nM 的交换率只有 77.2±3.22%, 而 25℃ 30 分钟对 B100nM 的交换率已达 94.9±4.2% (图 2)

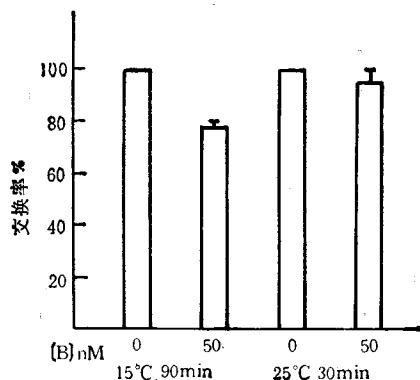


图 2 大鼠肝胞液皮质酮-受体复合物和 [³H] 地塞米松在 15℃, 25℃ 的交换率 (三次实验的结果)

3. B_E 模拟胞液和对照胞液的 Scatchard 分析

由一个肝脏制备对照胞液和 B_E100 nM 的 B_E 模拟胞液,作 Scatchard 分析,比较两份胞液的 [³H]Dex 特异结合的结合容量 (R₀) 和 K_d。在 25℃ 30 分钟的交换条件下测定了两只大鼠,其实验结果见表 1。图 3 A 为其中 1 只大鼠的实验结果的 Scatchard 作图。结果表明,模拟胞液的 K_d 和对照胞液基本相同,但 R₀ 略低于对照胞液 (90.3% 和 98.6%)。在 15℃ 90 分钟的

交换条件下测定的结果,二者的差别更大,模拟胞液的 R_0 为对照胞液的 75.3% (图 3B)。

表 1 “内源性”皮质酮 (100nM) 对 [3 H]Dex 特异结合的结合容量 (R_0) 和平衡解离常数 (Kd) 测定值的影响 (25℃, 30 分钟)

动物号	R_0 fmol/0.17 ml 胞液		$Kd \times 10^{-8} M$	
	对照胞液	B_E 模拟胞液	对照胞液	B_E 模拟胞液
1	969.9	875.7	1.20	1.20
2	726.8	716.5	0.75	0.68

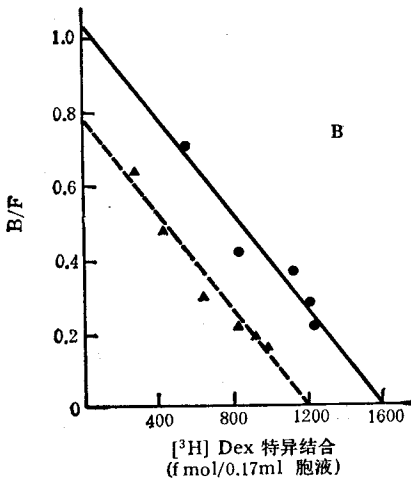
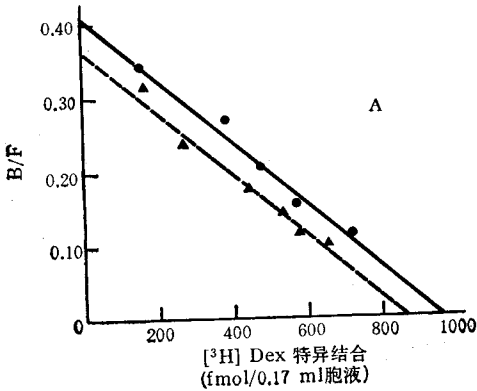


图 3 大鼠肝胞液内加皮质酮 100 nM (B_E 模拟胞液 $\triangle$ --- $\triangle$) 和不加皮质酮 (对照胞液 $\bullet$ — $\bullet$), [3 H]Dex 特异结合的 Scatchard 作图

A: 25℃, 30 min. 详见表 1 中 1 号动物结果
B: 15℃, 90 min. 对照胞液 R_0 1595 fmol/0.17 ml 胞液, Kd $0.77 \times 10^{-8} M$. B_E 模拟胞液 R_0 1201 fmol/0.17 ml 胞液, Kd $0.77 \times 10^{-8} M$

4. DCC 对 [3 H]Dex 特异结合的影响

在交换测定中,事先用 DCC 去除游离的 GC_E 无疑是合理的。但 DCC 不仅吸附 GC_E , 还

吸附其他小分子 (如 ATP), 因此令人对 DCC 的预处理产生了顾虑。我们比较了同一份肝胞液用和不用 DCC 预处理的 [3 H]Dex 特异结合, 结果表明, 在我们所采用的 DCC 预处理的具体条件下, 对 R_0 、 Kd 的测定值皆无明显的影响 (表 2)。

表 2 DCC 预处理胞液对 [3 H]Dex 特异结合的 R_0 、 Kd 测定值的影响

动物号	R_0 fmol/mg 蛋白质		$Kd \times 10^{-8} M$	
	溶剂预处理	DCC 预处理	溶剂预处理	DCC 预处理
1	561.6	551.3	1.7	1.2
2	569.1	565.7	1.3	0.8
3	669.9	745.7	1.6	1.9

用本法测定了 8 只健康成年雄性 Sprague-Dawley 大鼠的肝、脑胞液的 [3 H]Dex 特异结合, 分别为 750.5 ± 93 fmol/mg 蛋白质和 621.9 ± 37 fmol/mg 蛋白质, 由于钼酸钠的保护, 受体失活少, 因此高于我们用过去的方法测得的数值^[4,5]。

本法和 Hubbard 的方法比较: (1) 以廉价的国产试剂巯基乙醇代替进口价昂的 DTT; (2) 以 25℃ 30 分钟代替 15℃ 60 分钟, 提高了交换率, 还为室温超过 15℃ 时的操作提供了方便。和我们过去用的修改的 Giannopoulos 方法比较: (1) 提高了交换率, 减小了测定值和实际值之间的差别; (2) 内源性 B_{100nM} 时的交换率仍在 90% 以上, 大大扩大了本方法的可用范围; (3) 受体受到钼酸钠的保护, 失活少, 提高了测定值。人以及常用实验动物的血浆游离 GC 的基础值不超过 30 nM, 严重应激时, 血浆游离 GC 的浓度也不致于超过 100 nM, 胞液 GC 的浓度更不可能达到 100 nM, 因此本方法适用于一切生理和病理条件下, 特别是血浆糖皮质激素浓度很高时的胞液 GCR 的交换测定。

参 考 文 献

[1] 田英等:《中华核医学杂志》, 3, 27, 1983。
[2] Rosner, W. et al.: *Steroids*, 31, 427, 1978。
[3] Giannopoulos, G. et al.: *Steroids*, 28, 51, 1976。
[4] 徐仁宝等:《生理学报》, 34, 460, 1982。
[5] 徐仁宝等:《科学通报》, 28, 178, 1983。

相思豆毒素及其两个肽链的分离纯化

苗积生 吴吉勇 沈毅 黄利群 谈立松

(上海市结核病防治中心第一防治院)

提 要

相思豆毒素是由 A、B 两条肽链组成的,是对动物细胞毒性最强的蛋白质之一。A 链是毒素的毒性部份; B 链是毒素的载体部份,它可将 A 链转运至靶细胞而杀死细胞。本文报道我们提取制备相思豆毒素及其 A、B 链的方法步骤,以及如何分析鉴定其各个组份。方法上有所改进。

相思豆 (*Semen jequiriti*) 亦称红豆,古代医书称之为相思子,是有毒性的植物药材^[1]。六十年代就有人从中提取毒素蛋白 (abrin) 和凝集素 (abrus agglutinin)^[2]。前者毒性极强,小鼠注射几十毫微克就可能致死;后者毒性很弱,但对某些动物红细胞有凝集作用。它们的分子量分别为 65,000 和 130,000。毒素是由两条肽链通过二硫键连接,经 β -巯基乙醇处理可将其拆开。其中一条较小的肽链称之为 A 链,分子量为 30,000,是毒素的毒性部份;另一条较大肽链称之为 B 链,分子量为 35,000,是毒素的载体部份,能与细胞表面含有半乳糖残基的糖蛋白结合,携带 A 链,使之进入细胞内,实现对细胞的杀伤作用^[3,4]。

相思豆毒素对真核细胞的毒性很强,据分析,只要有一个毒素分子进入细胞,就可使细胞死亡^[5]。毒素对肿瘤细胞的杀伤具有一定的特异性,因此,国外已在临床上应用毒素开展治疗肿瘤的实验研究^[6]。随着单克隆抗体技术的发展,将完整毒素或其 A 链通过双功能试剂与单抗联接,制成导向毒素(免疫毒素)进行特异性

杀伤肿瘤细胞的实验和临床研究,已引起人们的日益重视。这项研究很有可能使肿瘤的药物治疗取得重大进展。

本文介绍了我实验室对相思豆毒素及其 A、B 链的提取制备过程,并对各组份进行了分析鉴定,方法上作了一些改进。

材 料 和 方 法

一、毒素制备

毒素提取 相思豆购自四川,去壳后浸入 5% 乙酸液 4℃ 过夜。用组织搅碎器打碎,冷冻离心 8000 g 20 分钟,取清液。沉淀重复提取两次,合并清液。清液用 5 mol/L NaOH 调至 pH5,加入固体 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,使呈 70% 饱和度,4℃ 置 1 小时,冷冻离心 8000 g 20 分钟。沉淀以少量水溶解,即为粗毒素样品。

凝胶过滤脱盐提纯 Sephadex-G75 层析柱 (2.8 × 100 cm) 以 pH7.7 Tris-HCl 10mmol/L 缓冲液 (以下简称缓冲液) 平衡。粗样品以 0.2 mol/L Tris 调至 pH7.7,每次上柱 20 ml,流速 15 毫升/小时 (以下同)。在流出液的体积为

[6] Sando, J. J. et al.: *J. Biol. Chem.*, 254, 4779, 1979.
[7] Hubbard, J. R. et al.: *Mol. Cell. Biochem.*, 65, 95,

1984.

[本文于 1987 年 2 月 22 日收到]