

- 5 Sellins Y S and Cohen J J. Hyperthermia induces apoptosis in thymocytes. *J Immunol*, 1987; **139**: 3199
- 6 Ohyama H and Yamada T. Reduction of rat thymocyte interphase death by hyperthermia. *Radiat Res*, 1980; **82**: 342
- 7 Phillips H J and Terryberry J E. Counting actively metabolizing tissue cultured cell. *Exp Cell Res*, 1957; **13**: 341
- 8 Ohyama H, Yamada T, Ohkawa A *et al.* Radiation-induced formation of apoptotic bodies in rat thymus. *Radiat Res*, 1985; **101**: 123
- 9 Schwartzman R A and Cidlowski J A. Internucleosomal deoxyribonucleic acid cleavage activity in apoptotic thymocytes: Detection and endocrine regulation. *Endocrinology*, 1991; **128**: 1190
- 10 Wyllie A H, Morris R G, Dunlop D. Chromatin cleavage in apoptosis: Association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J Pathol*, 1984; **142**: 67

放射受体法测定表皮生长因子

贺师鹏 黄天贵 黄力新

(北京医科大学生物物理教研室, 北京 100083)

郭淑英

(北京医科大学生理教研室, 北京 1000083)

提 要

介绍用大鼠肝细胞膜为材料 EGF 放射受体分析方法, ^{125}I -EGF 采用 Iodogen 方法, 其标记率为 50% 左右, ^{125}I -EGF 对受体的结合率为 20—30%。大鼠肝细胞膜 EGF 放射受体法的灵敏度为 28pg/管, 精密度为 6.3%。应用此法测定了大鼠血清, 颌下腺和唾液中的 EGF 的含量。

关键词 EGF, 放射受体分析, Iodogen

表皮生长因子 (EGF) 是分子量为 6405 的小分子多肽, 它能刺激许多类细胞的增殖, 而且能影响细胞分化, 促进细胞内外离子交换, 增加氨基酸和葡萄糖运转, 加速蛋白质和 DNA 合成。因此, EGF 具有广泛的生物学作用。它在肿瘤生物学和胚胎发育等领域的研究中具有突出的地位。

在从事 EGF 的生物学研究中, 需要建立灵敏度高、特异性强、操作简便的测定体液和组织内 EGF 含量的方法。Cohen 等人^[1]首先建立了 EGF 的放射免疫分析, 其标准曲线的范围为 0.03—4ng。稍后 Carpenter 等人^[2]建立了以纤维母细胞为材料的 EGF 放射受体分析, 其标准曲线的工作范围为 1—100ng/ml, 灵敏度较低。我们以大鼠肝细胞膜为材料建立了 EGF 放射受体分析, 标准曲线的工作范围为 0.03—3ng,

灵敏度为 28pg/管, 达到放免分析相同的灵敏度, 方法的稳定性良好。利用它测定了各种组织中的 EGF 含量, 得到相当满意的结果。

1 材料和方法

1.1 材料

表皮生长因子: EGF 标准品购自美国 Sigma Chemical Co. $\text{Na } ^{125}\text{I}$; 购自中国科学院原子能研究所。Tris-HCl 缓冲液: 50mmol/L Tris-HCl pH7.4 + 1mmol/L EDTA + 1mmol/L EGTA。Beckman5500Y 计数器。

1.2 方法

1.2.1 ^{125}I -EGF 制备 1mg Iodogen 溶于 1ml 二氯甲烷, 每反应瓶取 20 μg , 室温真空

减压抽干, 密封 -20°C 保存. 临用前, 于反应瓶中加入 0.2ml 0.2mol/L pH7.4 磷酸盐缓冲液 (PB) 洗 2 次, 洗去未贴壁的 Iodogen, 在反应瓶中加入 200 μl 含有 2 μg EGF 和 1mCi ^{125}I 的 0.2mol/L pH7.4 的磷酸盐缓冲液, 轻轻摇动反应 1.5min, 待反应完毕, 取出反应混合物经 Sephadex G-25 柱层析 (1 $\times$ 20cm), 0.05 mol/L pH7.4PB 洗脱, 收集 ^{125}I -EGF.

1. 2. 2 大鼠肝细胞制备 膜制备参照文献 [3], 稍加修改, 具体方法如下: 体重 200g 左右的大鼠断头放血, 立即取肝脏, 以后操作均在 $0-4^{\circ}\text{C}$ 进行, 去除结缔组织并剪碎, 每克肝组织加 15ml 50mmol/L pH7.4 Tris-HCl 缓冲液 (内含 1mmol/L EDTA, EGTA, 0.25mol/L 蔗糖) 先用高速分散器匀浆 3 次, 每次 1min, 后改用玻璃匀浆器匀浆, 匀浆液 800g 离心 15min, 上清再经 3 000g 离心 30min 弃去沉淀, 上清再经 20 000g 离心 60min, 沉淀改用 50mmol/L pH7.4 Tris-HCl 缓冲液 (内含 1mmol/L EDTA, 1mmol/L EGTA) 溶解, 混悬液再经 20 000g 离心 60min, 取沉淀, 最后, 肝细胞膜以上述相同的缓冲液配成 2ml/g 肝组织制剂, 分装后, -20°C 保存, 膜蛋白含量用染料法测定.

1. 2. 3 测定方法 在 50mmol/L pH7.4 Tris-HCl 缓冲体系内 (内含 1mmol/L EDTA, 1mmol/L EGTA, 1%BSA) 加入约 50 μg 肝膜蛋白和 0.03–4ng 的 EGF, 后加入 50 000cpm ^{125}I -EGF, 25°C 保温 60min. 总反应体积为 0.4ml, 非特异结合管在上述相同的条件下加入约 200ng EGF, 玻璃纤维滤膜用 50mmol/L pH7.4PBS 10ml 洗尽游离的 ^{125}I -EGF (表 1).

表 1 肝细胞膜测定 EGF 加样顺序 加样量/ml

加样顺序	总结合管	标准管	样品管	非特异管 ¹⁾
缓冲液	0.25	0.15	0.15	0.15
^{125}I -EGF	0.05	0.05	0.05	0.05
肝膜	0.10	0.10	0.10	0.10
标准	/	0.10	/	0.10
样品	/	/	0.10	

注: 25°C 保温 60min, 滤膜过滤, 10ml PBS 洗, 放射性测量¹⁾含 EGF 200ng

1. 2. 4 组织样品提取 如颌下腺组织, 大鼠处死后, 摘下颌下腺称重切碎. 加 10 倍体积提取液 (50mmol/L Tris-HCl, pH7.4, 1mmol/L EDTA, 1mmol/L EGTA), 在 PS-10 型高速分散器中将组织捣碎, 移至玻璃匀浆器继续匀浆, 匀浆液在 20 000g 4°C 离心 20min, 取上清液, 分装 -20°C 保存.

2 结 果

2. 1 利用 Iodogen 法制备 ^{125}I -EGF 其标记率一般均在 50% 左右, 与肝膜 EGF 受体的结合率约为 20%–30%, 质量优于氯胺-T 法. 用放射受体自我替代法测其放射性比度在 122–200 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ 之间.

2. 2 大鼠肝细胞膜 EGF 受体的特征 用 Scatchard 作图法测得的肝细胞膜 EGF 受体的亲和常数 K_d 值为 45.3nmol/L, 最大结合容量 $R_t=9.28\text{nmol/L}$, 是属高亲合率低结合容量的受体 (见图 1).

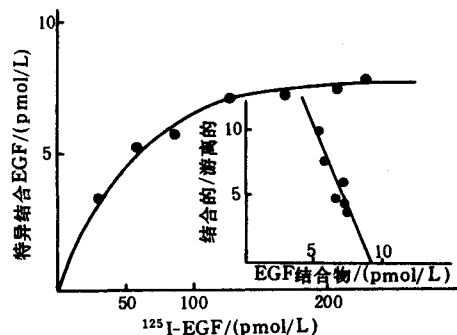


图 1 大鼠肝细胞膜 EGF 受体的 Scatchard 图

2. 3 反应时间对结合反应的影响 将 70 000cpm 约 0.098ng ^{125}I -EGF 和 50 μg 肝细胞膜蛋白在 Tris-HCl 缓冲液 (50mmol/L, pH7.4) 中 25°C 保温, 分别于不同保温时间测其结合物的放射性, 以保温时间为横轴, 结合物放射性为纵轴作图. 由图 2 可知反应开始, 结合物随时间直线上升, 40min 几乎达到最大值, 40min 至 120min 之间不变.

2. 4 灵敏度、精密度、特异性

灵敏度: 以零标准管实测值的 95% 可信限

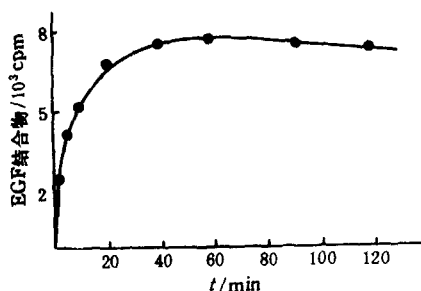


图2 保温时间对EGF结合率的影响

计为28pg/管。

精密度：批内CV值为6.3%，批间CV值为9.9%。

特异性：高出样品10 000倍的胰岛素或胰高血糖素仍不发生交叉反应。

2. 5 膜受体储存对标准曲线的影响

大鼠肝细胞膜制剂-20℃分装保存，在最初5d，每隔1d做一根标准曲线，共做3条。标准曲线每个剂量取代比的误差最大为±4.8%，最小为±1.6%，平均为2.7%。由此结果可知，膜受体在5d内是稳定的，对标准曲线没有影响。

表2 肝膜受体在5d内对标准曲线的影响

剂量/ng	0.06	0.10	0.20	0.40	0.80	1.60	3.00
(B/B ₀)/%	92.7	83.5	73.9	63.0	46.9	31.1	19.1
SD	±2.6	±3.0	±1.6	±4.8	±2.2	±2.4	±2.3

表3 样品的测定

样品	EGF浓度
5周岁儿童唾液：	ng/ml
男童	3.44±1.52
女童	7.02±2.68
大鼠血清：	ng/ml
未孕鼠	0.953±0.43
孕鼠11d	1.730±0.51
大鼠颌下腺：	ng/mg (湿重)
未孕鼠	44.60±20.4
孕鼠11d	179.4±40.0

3 讨 论

3. 1 放射受体分析要求标记配基保持良好的活性。氯氨-T标记法一般只有10%的结合率^[4]，结合率不高，究其原因可能在标记过程受氧化-还原作用使EGF分子中二硫键破坏而失掉了活性。Iodogen法是70年代中期才发展

起来的温和的固相碘化试剂，我们改用Iodogen法标记EGF所得的¹²⁵I-EGF与受体的结合率可达20%—30%左右，明显优于氯氨-T法。这对放射受体分析尤为有利。

3. 2 大鼠肝细胞膜EGF受体K_d值为45.3nmol/L，其最大结合容量为9.28nmol/L，是属于高亲和力低结合容量的受体。我们利用它建立的EGF放射受体分析法，其灵敏度为28pg/管，稳定性和特异性都很好，能适用于血清和其它液体中EGF含量的测定。

3. 3 放射受体分析是基于生物活性测定配基的含量，比较真实地反映组织内该活性物质的含量。而放射免疫分析基于免疫活性测定配基的含量。因此，两者测定结果有时会出现不一致^[5]。有人曾报导^[6]EGF放射受体分析的结果高于放射免疫分析，这是因为抗体可能只对EGF特异性结合无关的部分相结合，而在体液和组织中存在着各种EGF样(EGF-like)的分子，它们不能与抗体起免疫反应，却能与EGF受体相结合。因此，放射免疫分析的结果就可能低估了EGF水平。另外，用抗鼠的EGF抗体测定人的EGF分子时，该抗体对人的EGF不敏感，而鼠的EGF受体对人的所有组织和体液中的EGF具有较高的检出率^[1]。因此，EGF放射受体分析具有一定的重要地位，不可能为放射免疫分析法完全取代。

参 考 文 献

- 1 byyny R L, Orth D N, Cohen S. Radioimmunoassay of epidermal growth factor. *Endocrinology*, 1972; **90**: 1261
- 2 Carpenter G, Lembach K J, Cohen S *et al.* Characterization of binding of ¹²⁵I-labeled epidermal growth factor to human fibroblasts. *J Biol Chem*, 1975; **250**: 4297
- 3 Mukku V R, Stancel G M. Receptor for epidermal growth factor in the rat uterus. *Endocrinology*, 1985; **117**: 149
- 4 Carpenter G. Binding assay for epidermal growth factor In: Birnbaumer L *et al.* ed, *Methods in Enzymology*, Orlando: Academic press, 1985, Vol **109**: 101.
- 5 Ladda R L, Bullock L P, Gianopoulos T *et al.* Radioreceptor assay for epidermal growth factor. *Analy Biochem*, 1979; **93**: 286
- 6 Starkey R H, Orth D N. Radioimmunoassay of human Epidermal growth factor (Urogastrone). *J Clin Endocrinol Metabol*, 1977; **45**: 1144