

人血清生长激素放射受体分析法及其临床应用

上海华山医院核医学科 郑三军综述 林祥通 王世真* 审

提 要: 介绍了生长激素放射受体分析法的优点、具体方法、交叉反应、质控和种属特异性等, 并从生长激素分子的不均一性角度, 讨论了生长激素的异型激素及其分子大小与生物活性及免疫活性的关系。

一、概 述

生长激素(GH)的经典生物学测定方法是利用该激素对软骨的生长促进作用, 对脂代谢的作用(生酮效应及致糖尿效应)等, 均较麻烦, 灵敏度亦低。放射免疫分析法运用于血液循环中GH浓度的测定, 具有灵敏度高, 特异性强及重复性好等优点, 但是也存在一些缺点, 主要是这种方法所测得的结果反映的仅是激素分子的免疫活性, 而并非生物活性。近十年来所发展的放射受体分析法则克服了这一缺点, 因为激素与靶组织受体的结合与其生物活性大体上是平行的, 或者更确切地说, 放射受体分析法所测得的激素分子的数量是具有生物活性的激素分子的数量。此外, 由于受体的种属特异性不强, 放射受体分析法的受体制剂可以选用其它种类动物的组织来制备^[1], 这是放射受体分析法的另一特点。

Gavin等发现¹²⁵I-hGH(人生长激素)能与培养的人淋巴细胞特异受体结合, 从而用培养的人淋巴细胞为特异结合剂, 建立了GH放射受体分析法^[2~5]。此法需选取具有GH受体的特异淋巴细胞株以及细胞培养的一些特殊设备。有许多证据表明^[6], 肝脏是GH作用的主要场所之一, Carr等^[7]用人的肝脏制备肝细胞膜碎片, 以此作为受体制剂, 建立了GH放射受体分析法。以上两种方法所得的结果相同, 仅人和猴的GH能

与¹²⁵I-hGH竞争结合受体, 其它哺乳类动物如羊、猪、牛等的GH不能与¹²⁵I-hGH竞争结合受体。人泌乳素具有很弱的竞争结合能力, 与泌乳素具有弱的GH活性相符合。用人的肝脏制备受体需在死亡后9小时内取出肝脏、保存, 其来源相对较困难。

Tsushima等用兔、鼠及其它动物肝细胞膜碎片分别与¹²⁵I-hGH结合, 发现虽然这些膜碎片都能不同程度地与¹²⁵I-hGH结合, 但是以妊娠20~30天的兔肝细胞膜碎片的结合率最高, 从而用妊娠兔肝细胞膜碎片为受体制剂, 和¹²⁵I-hGH结合, 建立了生长激素放射受体分析法^[8~10]。由于妊娠兔相对较难获得, 而非妊娠兔肝细胞也含有较丰富的GH受体, 且取材方便, 因而也可用非妊娠兔肝脏制备受体。

以下主要介绍用妊娠兔肝细胞膜碎片作为受体制剂, 建立生长激素放射受体分析法及其临床应用。

二、生长激素受体制剂的制备^[8]

选择中晚期妊娠新西兰大白兔一只, 在戊巴比妥麻醉下取出肝脏, 在4℃、0.3mol/L蔗糖溶液中清洗, 除去胆囊、大血管和结缔组织, 分成0.5~1克左右的碎片, 加5倍体积上述蔗糖溶液匀浆, 然后用4~8层纱布滤过。滤液置4℃、600g离心20分钟。上清液置4℃、15 000g离心20分钟, 所得的上清液再于100 000g离心90分钟, 弃去上清

液。沉淀用 25mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH7.4, 含 10mmol MgCl_2) 以每克肝组织加 10ml 缓冲液的比例混悬并用玻璃匀浆器捣匀, 然后再用 10 000g 离心 30 分钟, 弃去上清液, 沉淀用缓冲液混悬, 分装后于 -20°C 保存。在此条件下, 受体制剂至少能保存 3 个月。使用时, 将其用缓冲液稀释至蛋白质浓度为 150~200g/100mL。

受体制剂的进一步纯化可用 Triton X-100 或 Triton X-305 及亲和层析。

三、生长激素的 ^{125}I 碘化标记^[11、12]

一般采用乳过氧化物酶法, 也可采用 Iodogen 法, 二者的标记结果相似。

四、测定程序^[8、12]

反应管内依次加入一定量的 Tris-HCl 缓冲液、标准品或样品、受体制剂、 ^{125}I -hGH, 26°C 保温 3~4 小时, 最后加冰醋酸缓冲液终止反应。离心后弃去上清液, 测沉淀放射性, 制作标准曲线。

五、最佳测定条件的选择

1. pH 值、 Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{++} 、 Ca^{++} 的影响

GH 与受体的结合能在较宽的 pH 值范围内进行, 一般以 pH7.4 为宜^[8]。 Ca^{++} 或 Mg^{++} 的存在能明显增加 GH 与受体的结合率, Na^+ 、 K^+ 等一价离子的影响较二价离子小^[9]。

2. 反应时间和反应温度的影响^[8、12]

GH 与受体的结合率随着反应时间和温度的不同而变化: 在 26°C 时, 4 小时左右达到平衡状态; 37°C 时需要 60~90 分钟; 4°C 时则需要 48 小时才能达到平衡状态。但在 37°C 时, ^{125}I -hGH 及受体易变性分解。

3. 受体蛋白含量的影响^[12]

^{125}I -hGH 与受体的结合率随受体蛋白量的增加而增高, 当受体蛋白量在 20~300 μg

/100 μl 范围内增加时, 结合率直线上升, 实际测定时以蛋白含量为 100~200 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 受体制剂时为宜, 此时, ^{125}I -hGH 受体的结合率约为 30~40%, 测定的灵敏度较高。

4. B 与 F 分离方法

在 Ca^{++} 、 Mg^{++} 存在下, 通过低速离心即可分离 B (结合物) 和 F (游离标记配体), 如果受体制剂经 Triton X-100 纯化, 则需加 PEG 后再离心分离 B 和 F。

六、灵敏度和特异性

激素与受体作用的一个共同特征是激素能调节其特异受体的亲和力和/或受体浓度。Eastman 等利用 GH 对其受体浓度的负反馈调节作用, 使 GH-RRA 的灵敏度提高 5 倍, 达到 1ng/mL 左右^[13]。人、猴、牛、羊的 GH 都能同兔肝细胞膜受体结合, 人泌乳素与人 GH 的交叉反应率为 1%, TSH、LH、FSH、ACTH 与 GH 无交叉反应^[9、12]。

七、应用和讨论

Sneid 等^[14]对一组无内分泌因素可查的正常矮小儿童分别用 RRA 和 RIA 测定血清 GH 浓度, 发现在基础状态下两种方法的测定结果无显著差异, 而在用胰岛素或精氨酸、左旋多巴刺激后 90 分钟内, 两种方法测定结果出现极显著差异, RIA 值 > RRA 值, 说明在刺激后 90 分钟内血循环中出现了具有免疫活性而生物活性下降或消失的 GH 分子, 这些分子在刺激后 1 个多小时消失。Sneid 还对一肢端肥大症患者用两种方法对 GH 分泌昼夜节律进行观察, 对各次测定值平均后发现 RIA 值 > RRA 值, 二者有极显著差异, 推测在肢端肥大症患者血清中可能存在免疫活性完好而生物活性下降或消失的 GH 分子。LaFranchi 等^[15]对 48 例生长迟缓的儿童用 RRA 和 RIA 测定血清 GH 浓度, 发现总的 RRA/RIA 比值为 0.75, 当用左旋多巴和精氨酸刺激 GH 分泌达高峰期时, RRA/RIA

比值显著下降。两例RRA与RIA结果存在显著差异的患者有营养不良和慢性疾病,表明营养状况和RRA/RIA比值间存在着反比关系。因此,RRA/RIA比值下降提示血清中存在生物活性下降或丧失的GH分子,而GH刺激试验、营养不良及慢性疾病均可导致RRA/RIA比值下降。

人脑垂体和血液循环中的GH是不均一的^[16,17]。Hiznka等^[18,19]将正常人和肢端肥大症血清用Sephadex G-100柱层析后,洗脱液呈现三个GH免疫活性峰,分别称为特大、大和小GH。正常人小GH的RRA/RIA比值大于特大和大GH,而肢端肥大症患者小GH的RRA/RIA比值又大于正常人,说明小GH与受体的亲和力最高,而肢端肥大症患者的小GH与受体的亲和力又高于正常人,这些结果提示肢端肥大症患者脑垂体分泌的GH可能与正常人不同。

Tsushima等^[9]用Triton X-100将GH受体从细胞膜上溶解下来后,经Sepharose 6B柱层析,发现其分子量相当于200 000道尔顿,分子半径为49 Å,沉淀常数为7.2S,等电点偏酸性,可能为一种糖蛋白。GH受体经胰蛋白酶处理后与GH的结合率大为下降,而用磷酸酯酶C或神经氨酸处理后对结合率无影响,分子间二硫键的形成对GH与受体的结合是必需的。

有人对102例正常成人、412例肢端肥大症术前、127例肢端肥大症术后患者分别用RRA和RIA测定血清GH浓度发现,正常成人两种方法测定结果间无显著差异,肢端肥大症患者术前两种方法结果有极显著差异,术后两种方法结果间也有显著差异,推测肢端肥大症患者血清中的GH与正常人有所不同,可能存在免疫活性完好而生物活性下降或消失的GH分子。

综上所述,生长激素放射受体分析法特异性强,能反映激素分子的生物活性,对GH分泌异常疾病的诊断、疗效观察和病因

探讨都具有重要价值。此外,该法对生长激素与受体的相互作用机制及受体的结构与功能的研究也具有一定价值。

参 考 文 献

1. Schulster D, et al; J Reprod Fertil 1977, 51(1): 295
2. Gavin JR 3d, et al; Clin Res (Abstract) 1979, 27: 655A
3. Gavin JR 3d et al; J Clin Endocrinol Metab 1982, 55: 133
4. Rosenfeld RG, et al; J Clin Endocrinol Metab 1980, 50: 62
5. Daughaday WH, et al; J Clin Endocrinol Metab 1987, 65: 617
6. Phillips LS, et al; Endocrinology 1976, 98: 606
7. Carr D, et al; J Clin Endocrinol Metab 1976, 42: 484
8. Tsushima T, et al; Biochem J 1980, 187: 479
9. Tsushima T, et al; Gunma Symposia on Endocrinol 1981, 18: 55
10. Tsushima T et al; FEBS LETTERS 1982, 147(1): 49
11. Hughes JP, et al; Endocrinology 1982, 111(3): 827
12. 郑三军等, 核技术 1988, 11(12): 46
13. Eastman RC, et al; J Clin Endocrinol Metab 1979, 49(2): 262
14. Sneider DS, et al; J Clin Endocrinol Metab 1975, 41: 471
15. LaFranchi S, et al; Am J Dis Child 1984, 138: 257
16. Lewis UJ, et al; Endocrinology 1979, 104: 1259
17. Wallis M, et al; Nature 1980, 284: 512
18. Hiznka N, et al; J Clin Endocrinol Metab 1982, 55(3): 545
19. Hiznka N, et al; Endocrinol Jpn 1984, 34: 719