DOI:10.16016/j.1000-5404.1985.01.005

四种不同动物红细胞胰岛素受体测定

许霖水 吴喜贵 董燕麟

（生化教研室）

提 要

本文介绍用少量血样品以Normal缓冲溶液为介质在4℃过夜保温条件下红细胞胰岛素受体测定方法。红细胞胰岛素受体与^{125}I-胰岛素结合的竞争抑制曲线和Scatchard作图性质与文献报导结果相同。对人、家兔、狗和大鼠四种不同种属的红细胞胰岛素受体测定最大结合率(B/T%)在10—15%范围。非专一性结合平均为3.5%左右。用Normal缓冲溶液代替BufferG作保温介质同样能得到较好结果。四种不同种属红细胞胰岛素受体数目有差异，依次是狗>兔>大鼠>人。低温(4℃)条件下结合试验可减少胰岛素-受体复合物的降解速度。本方法适合于临床胰岛素受体测定。

严重创伤代谢发生改变[1]，出现糖耐量降低和胰岛素抵抗[2]。为了探讨其发病原因，对胰岛素受体在严重创伤时的动态变化的研究是十分必要的。利用肝或脂肪细胞为研究材料限制了临床应用范围。Gambhi（1978年）[3]建立了人红细胞胰岛素受体测定方法。随后（1979年）进一步提出，人红细胞胰岛素受体测定可以作为反映机体组织对胰岛素敏感性的一种指标[4]。在生理和病理条件下红细胞受体变化与单核细胞相同。

为此，我们探讨了用Normal缓冲溶液为保温介质，在低温（4℃）条件下保温测定人、兔、狗和大鼠的红细胞胰岛素受体的方法。

材料与方法

一、试剂

结晶猪胰岛素，27单位/mg（国家标准品，北京药品生物制品检定所）

^{125}I-Na（北京原子能研究所）

氯胺-T（松江，佘山化工厂）

邻苯二甲酸二丁酯（重庆东方红试剂厂）

Normal缓冲溶液含NaCl 148mM，KCl 5 mM，Tris 17mM，pH7.4。

标准胰岛素溶液：精确称取结晶猪胰岛素(毫克)，用0.03N HCl溶解，加入Normal缓冲溶液配制成500μg/ml。分装置冰箱冻结器备用。临用前用Normal缓冲溶液按需要浓度进行稀释为应用液。

二、^{125}I-胰岛素制备

采用氯胺-T法进行标记。按上海生化所等[5]方法加以调整后操作：胰岛素5μg/10μl，氯胺-T20μg/20μl，用含6%牛血清白蛋白的0.1M磷酸盐缓冲溶液洗脱，收集^{125}I-胰岛素。分装并置冰箱冻结器储存。比活性为100—130μc/μg

三、红细胞制备

取全血5ml（大鼠断头放血）。肝素抗凝，迅速用3000转/分钟离心5分钟。分离血浆后，红细胞沉淀加2-3倍体积的预冷生理盐水洗涤，依上法离心。吸弃上清液和红细胞层上面的白色绒状复盖物，重复洗涤两次。吸尽上清液后用2—3倍体积的预冷Normal缓冲溶液，轻轻混匀。用3500转/分钟离心10分钟。吸净上清液，向细胞层加入等体积的冷Normal缓冲溶液，作成红细胞

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

悬浮液。同时进行红细胞计数和细胞涂片检查有核细胞。上述细胞悬浮液浓度在3.5—4.0×10^9个/ml可见到极少数有核细胞。必要时用锥兰染色检查细胞成活率。

四、结合试验

按照张新堂等[6]介绍方法作适当调整后操作：在置于冰浴上的聚苯乙烯小试管（10×40mm)内加入预冷Normal缓冲溶液100μl（空白管加200μl）。用微量注射器准确加入0—500μg/ml不同浓度的天然胰岛素溶液各100μl（平行3管），混匀。于各管加入^{125}I-胰岛素100μl(相当于0.3—0.5ng/管)，充分混匀。置γ-计数器测定总放射性(T)。然后于各管加入红细胞悬浮液（充分混匀）200μl，总体积为0.5ml。振摇2分钟后置4℃冰箱过夜。保温12小时以上。用0.5ml冷Normal缓冲液终止反应，同时各管加入1.0ml冷邻苯二甲酸二丁酯。用3000转/分钟离心5分钟。溶液分三层。用吸液器小心吸净上两层液体，留细胞层进行红细胞结合放射性测定。

五、计算

1．以加入50μg/管天然胰岛素管的放射性作为非专一性结合[3][6]。各管结合之放射性减去非专一性结合为各管专一性结合，并按下式计算红细胞胰岛素受体结合的百分数（结合率）。

$$\text{结合率(B/T\%)} = \frac{\text{cpm(样品)-cpm(非专一性)}}{\text{cpm（加入总放射性）}} \times 100\%$$

2．Scatchard作图分析

以B/F为纵座标对应结合胰岛素浓度为横座标作图[3]，得到一条凹面向上的曲线。B为^{125}I-胰岛素在红细胞上的结合量，F为未结合(游离)^{125}I-胰岛素的量。由横座标截距，按下式计算每个红细胞的受体数目。

$$\text{每个红细胞受体数} = \frac{\text{每立升胰岛素结合的克分子数}}{\text{每立升细胞数}} \times 6,023 \times 10^{23}$$

结果与讨论

应用我们制备的^{125}I-胰岛素在上述保温条件下红细胞胰岛素受体饱和试验所得结果如图1。结果与文献报导[6]一样，^{125}I-胰岛素与红细胞结合是可被饱和的。

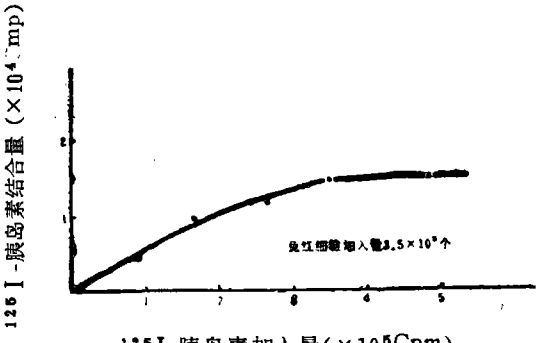


图1 ^{125}I-胰岛素饱和曲线

测定6例正常人（男4，女2；年龄20—58岁）红细胞胰岛素受体最大结合率为17.33±3.46%（示踪物为A_{14}-[^{125}I]-单碘胰岛素）；3只家兔为13.60±1.75%；5只正常四川地区杂种狗为12.30±1.81%；4只大鼠为10.30±2.14%；如图2所示^{125}I-胰岛素结合抑制曲线性质与文献结果[3][6][7]相一致。

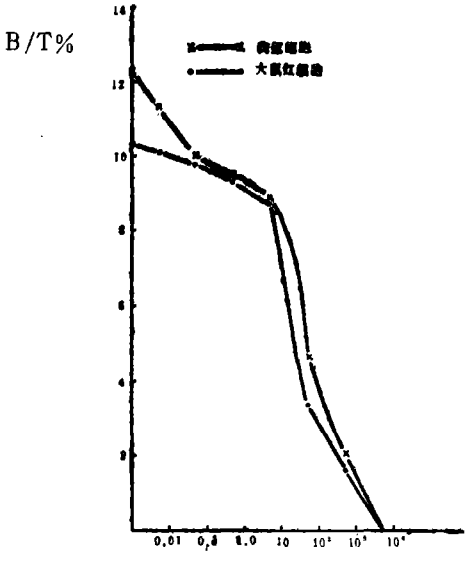


图2 对四只大鼠、五只狗之红细胞结合抑制曲线

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

利用四川医学院附属医院同位素室供应的A_{14}-[^{125}I]-单碘胰岛素对四种不同生物红细胞在同一条件下进行结合试验最大结合率分别为：人17.91%，家兔19.1%，狗27.1%，大鼠25.0%，见图3。仍然是狗的红细胞最大结合率大于大鼠。但家兔红细胞最大结合率则小于前两者。比较两种示踪物的最大结合率可看出A_{14}-[^{125}I]-单碘胰岛素的结合活性高于^{125}I-胰岛素，这与文献[12]报导相符合。前一种标记物生物活性认为100%，而后一种标记物属"混合性"碘标记物，一般只有原型胰岛素的50—70%。但我们制备的^{125}I-胰岛素最大结合率在10—15%之间，而且非专一性结合占总结合的3.5%左右可满足实验要求。同时^{125}I-胰岛素制备简单，产品获得率高。比较两种标记物对相应红细胞结合的Scatchard图，可看到其截距很接近。见图4、图5、图6和图7。同时用A_{14}-[^{125}I]-单碘胰岛素对人和家兔红细胞受体最大结合率与陈曼玲等[7]结果一样，证明我们的实验方法是可靠的。

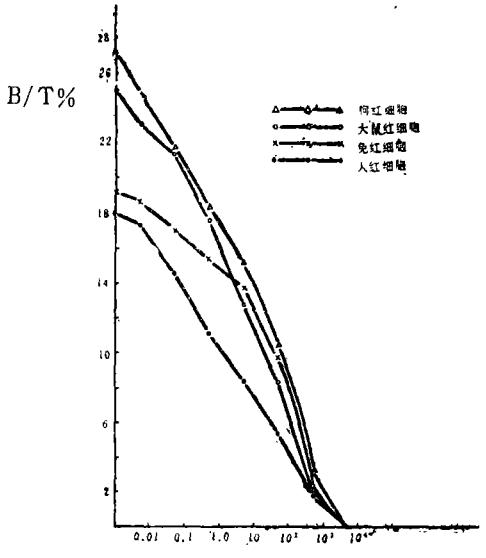


图3　四种不同红细胞与A_{14}-[^{125}I]-单碘胰岛素结合抑制曲线

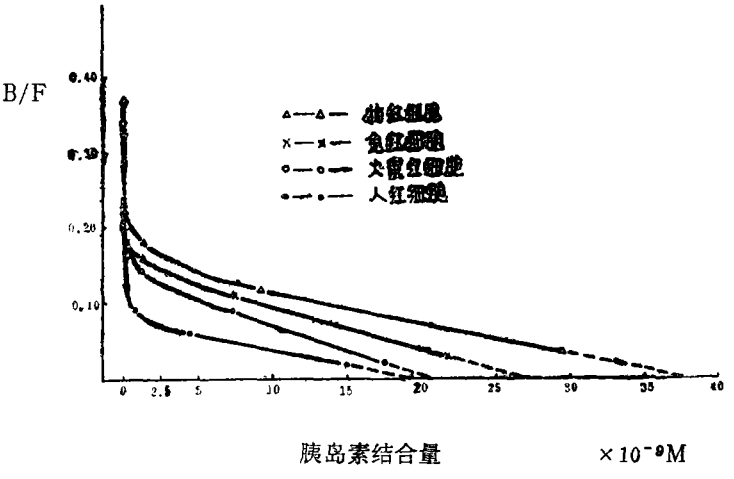


图4　四种不同红细胞与A_{14}-[^{125}I]-单碘胰岛素结合Scatchard图

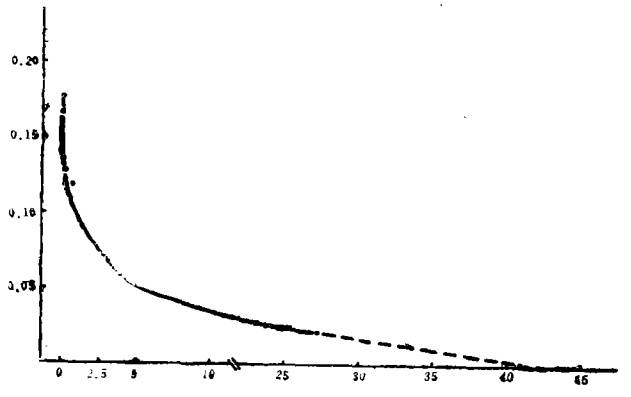
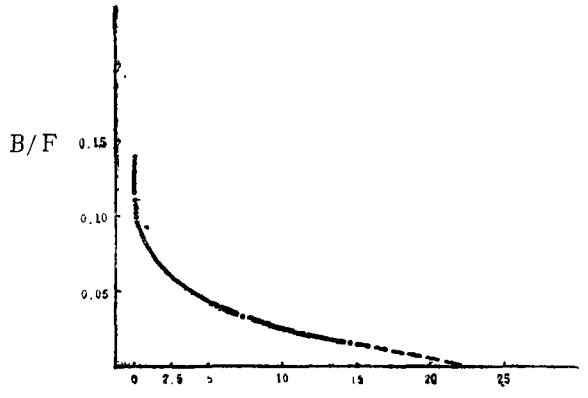


图5　五只狗红细胞Scatchard图

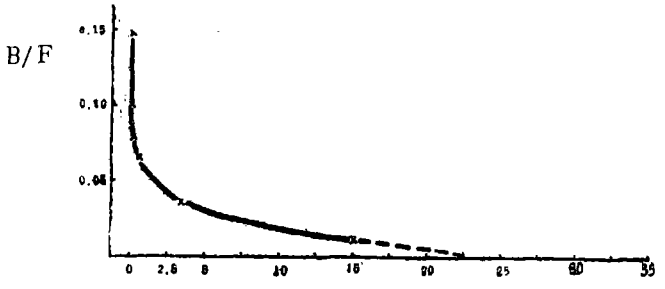
在红细胞数基本相同，加入相同浓度的天然胰岛素的取代结合试验经Scatchard作图分析结果（图4）可见四种不同种属红细胞胰岛素受体结合容量是不同的，其顺序：狗＞兔＞大鼠＞人。每个红细胞表面胰岛素受体数目分别是人2860，大鼠3019，兔3779，狗5300（位点/细胞）。我们的结果偏高。但从已报告文献[3][4][8-10]结果看其数值差别也较大。其原因可能与实验试剂如标记物、标准品等有关。Kappy[9]认为使用标记物浓

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net



胰岛素结合量　　$\times 10^{-9}$M

图6　6例正常人红细胞Scatchard图



胰岛素结合量　　$\times 10^{-9}$M

图7　四只大鼠红细胞Scatchard图

度过大，其非专一性结合增高，可能使计算最大结合容量出现误差。

我们比较Normal缓冲溶液与BufferG缓冲溶液两种保温介质的红细胞胰岛素受体测定结果，证明两种保温介质都能得到较高的结合率。但Normal介质配制简单，而BufferG所需试剂价格较贵。用Normal缓冲溶液代替BufferG。试剂来源方便，无需HEPES（N-2-羟乙基哌嗪-N′-2-乙烷磺酸）可大大节约费用，同样得到满意结果。另外直接用冷生理盐水洗涤红细胞代替用白细胞分离液（Ficoll-Hypaque溶液）制备的红细胞悬浮液，能得到比较纯净的红细胞制剂，完全能满足实验要求，不受试剂来源困难的限制又能进行多样品工作开展。同时我们减少红细胞的加样体积，由0.4ml（1.76×10^{9}细胞/管）[3]减少为0.2ml（$0.7-0.8\times10^{9}$细胞/管）这就减少了血样品的用量（从10ml全血减为5ml全血），扩大了临床研究工作范围，尤其是小儿胰岛素受体的测定[9]。

我们采用4℃过夜保温。低温结合达到平衡的需要时间较长[3]，但低温胰岛素-受体离解和胰岛素降解速度相应减慢。Ozaki等[11]用胎盘膜受体与^{125}I-胰岛素在4℃保

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

温，最大效应时间为36小时，但48小时后胰岛素-受体复合物才开始降解。相反，24℃保温1小时达高峰，但以后逐渐降低。陈曼玲等[7]报导30℃保温30分钟，结合迅速发生，90分钟逐渐下降。我们在（室温）冰浴上操作后置4℃冰箱，由30分钟开始连续测定结合率，反应达平衡后其结合率在24小时内变化很小。虽然15℃，3.5小时可以得到较好的平衡曲线[3][6]，但在高温季节，水温超过15℃后恒温设备要求高。低温过夜保温在高温地区和季节非常便于开展工作。同时低温胰岛素及受体降解速度慢，为大量样品实验赢得足够时间，适合于临床研究工作。

参 考 文 献

1. Smith R, et al: Biochemical effects of human injury. TIBS 1983; 8:142

2. Black PR, et al: Machanisms of insulin resistance following injury. Annals Surgery 1982; 196:420

3. Gambhir KK, et al: Characteristics of human erythrocyte insulin receptors. Diabetes 1978; 27:701

4. Gambhir KK, et al: Insulin receptor assay in human erythrocyte as an index to insulin sensitivity of body tissues. Clin Chem 1979; 251:1673

5. 中科院上海生化所胰岛素组等，胰岛素及其类似物与其受体的相互作用。中国科学1974；6:612

6. 张新堂等：胰岛素作用原理研究 Ⅶ.不同种属红细胞胰岛素受体与胰岛素的相互作用。生物化学与生物物理学报1981；13:385

7. 陈曼玲等：人与兔红细胞胰岛素受体之比较。四川医学院学报1984；15:1

8. 王公禹等：四氧嘧啶引起兔红细胞胰岛素受体变化的初步观察。生物化学与生物物理学报 1981；13:548

9. Kappy MS , et el: Studies of insulin binding in children using human erythrocytes in small amounts of blood. Diabetes 1979; 28:1001

10. Deppirro R, et al: Erythrocyte insulin receptors in non-insulin-dependent diabetes mellitus. Diabetes 1980; 29:96

11. Ozaki S, et al:A radioreceptor assay for serum insulin. J Lab & Clin Med 1977; 90:686

12. 邓尚平等：A_{14}或A_{19}-〔^{125}碘〕-单碘胰岛素的制备及其意义。四川医学院核医学教研室 胰岛素放射免疫分析 1980；23

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Determination of Insulin Receptors of Erythrocytes of Four Different Kinds of Animals

Xu Linshui et al

(Department of Biochemistry, Third Military Medical College)

This article is to introduce our method to determine the erythrocytic insulin receptors of four different species of animals including human being. A small amount of blood with Normal buffer as incubation medium was put at 4℃ over night and then the binding rate of the erythrocytes with ^{125}I-insulin was tested. The highest binding rates (B/T%)of the erythrocytes from human beings, rabbits, dogs and rats were within the range from 10%to15% and the average of nonspecific binding rates was 3.5%. In different animals, the number of erythrocytic insulin receptors was also different, which was the largest in dogs, then in rabbits and in rats, and the smallest in human beings. The competition inhibition curve of the binding of the erythrocytic insulin receptors with ^{125}I-insulin accorded with the nonlinear Scatchard plots and was similar to the results reported by other authors.

Our experiment showed that good results could also be obtained if Normal Buffer was used ot subsitute Buffer G as the incubation medium. Moreover, the degradation rate of insulin-receptor Complex could be reduced when the test was carried out at 4℃, so this method would be useful to assay the erythrocytic insulin receptors in clinical practice.

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net