

[6,7-³H]雌二醇交换法测定子宫细胞核沉淀上的雌激素受体复合物

姚连生 周建祿 张武 (中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031)

提要 利用细胞浆内 R_cE 在离体条件下可向核转移的特点, 以含低浓度雌二醇的缓冲液制备兔子或大鼠子宫匀浆, 经过保温, 再测定核沉淀上 [³H]E₂ 的交换量以反映靶细胞中的受体水平, 方法简便, 适用于一般实验室操作。用本方法测得大鼠子宫受体对 E 的亲和力常数为 $1.8 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 。

关键词 雌激素胞浆受体复合物(R_cE); 雌激素核受体复合物(R_nE); 无细胞系统; [6,7-³H]雌二醇-17β交换法; 雌激素作用

雌激素(E)在靶细胞内与胞浆中专一性很高的受体蛋白(R_c)结合成雌激素胞浆受体复

合物(R_cE), R_cE 经过分子构型的变化, 转移进细胞核内与染色质结合, 引起基因表达。这是目前为多数人所接受的甾体激素作用模式⁽¹⁾。因此, 研究雌激素受体蛋白(ER), 了解 E 的作用具有重要意义。

1980年12月27日收稿 1981年1月8日修回
1979年5月在第三届全国生化学术交流会(杭州)上宣读。

ER的测定方法很多。 $[^3\text{H}]$ 雌二醇交换法测定细胞核雌激素受体复合物(R_nE)⁽²⁾,方法简单,不需要特殊设备,低速离心即可获得核沉淀部分,因而适于设备条件一般的实验室采用,可惜它要求整体给激素以饱和受体,使其应用受到了限制。 R_nE 向细胞核上转移的作用在离体的无细胞系统中亦可发生⁽³⁾,能否利用来测定组织中的受体蛋白,是值得探讨的问题。本文用兔子或大鼠子宫匀浆作模型,发现子宫匀浆与雌二醇(E_2) 30℃保温30 min后,可提高 R_nE 的含量,而匀浆上清液中的 R_nE 相应减少,说明在组织匀浆中加入 E_2 ,通过保温,能获得整体给E相同的效果。从而发展了更为简单的 $[^3\text{H}]$ 雌二醇交换法的受体测定技术。

材 料 和 方 法

一、药品、试剂 $[6,7-^3\text{H}]$ 雌二醇-17 β ($[^3\text{H}]E_2$) 38 Ci/mmol由本实验室合成。经硅胶薄层层析鉴定,放化纯度在98%以上。 E_2 (上海第九制药厂)。乙蔗酚(DES)(E. Merck)。葡聚糖 T-70 (Pharmacia)。活性炭(B. D. H.)。Triton X-100 (ROTH)。三羟甲基甲烷(Tris)(西南制药厂)。其他化学试剂均为A. R.

TE缓冲液: pH 7.5 10 mM Tris-HCl缓冲液含 EDTA-Na₂ 1.5 mM。TEG缓冲液: 含25%(v/v)甘油之TE缓冲液。TEGE₂缓冲液: 含1 μM E_2 之TEG缓冲液。0.1% Triton X-100 TE缓冲液: 含0.1%(v/v) Triton X-100之TE缓冲液。DCC悬浮液: 含1%活性炭和0.005%葡聚糖 T-70之TE缓冲液,使用前剧烈摇匀。

二、动物子宫匀浆 家兔子宫: 新鲜未孕子宫,去脂肪等组织, -20℃备用。取子宫角10-15 g,剪开,用手术刀刮取子宫内膜,加入10倍量的TEG缓冲液,匀浆。分成二份,一份在冰浴保存。另一份加入 E_2 (最终浓度为1 μM),在30℃保温30 min后,冰浴冷却10 min。二份匀浆分别离心(1000 \times g, 10 min),

上清液用DCC悬浮液处理,以除去游离之 E_2 。核沉淀依次用0.1% Triton X-100 TE缓冲液和TE缓冲液洗涤,用TEG缓冲液悬浮。

大鼠子宫: 性未成熟之大鼠(体重50-60 g)或性成熟未交配过之大鼠(体重150 \pm 10 g),取子宫,在0-4℃除尽脂肪等组织,称重,剪碎,加5-10倍量的TEGE₂缓冲液,匀浆,用二层纱布过滤,滤液在30℃保温30 min后,冰浴冷却,离心,上清液和核沉淀的处理同兔子子宫内膜匀浆。

三、匀浆上清液 R_nE 的测定 参照文献方法⁽⁴⁾,即将除去游离E之上清液与不同量的 $[^3\text{H}]E_2$ 在25℃保温17h左右,同时平行地测定系统中加入比标记物过量100倍的 E_2 或DES作为竞争剂,其结果代表该系统中的非专一性结合。保温结束后,将反应液移至冰浴10 min左右,加 $\frac{1}{2}$ 体积的DCC悬浮液,冰浴放10 min,离心(1000 \times g, 5 min),取部分清液测放射性,将不加竞争剂样品管的放射性减去加有过量100倍载体样品管的放射性,其差值即代表清液中 R_nE 的含量。

四、细胞核沉淀中 R_nE 的测定 按文献方法⁽²⁾将核沉淀悬浮液加于甲、乙二列试管中,每管200 μl 。甲列试管加不同量的 $[^3\text{H}]E_2$ (最终浓度为0.36-42 nM);乙列试管加同量的 $[^3\text{H}]E_2$ 及过量100倍的DES。每管反应液总容量220 μl ,在30℃保温30 min后,移置冰浴10 min,加入冰冷的TE缓冲液1.0 ml,离心(1000 \times g, 5 min)。倾出上清液,用滤纸吸去残液,复加入2.0 ml TE缓冲液,洗涤2次,最后在沉淀中加1.0 ml EtOH,捣碎沉淀,吸入5.0 ml 闪烁液中。闪烁液组成: 0.4% PPO和0.04% POPOP的二甲苯溶液用于测核沉淀; 水性闪烁液有Unisolve I (Koch-Light)或由下列组份配成的闪烁液(简称混合闪烁液): PPO 7 g, POPOP 0.6 g, 萘 75 g, 乙二醇乙醚 300 ml, 二甲苯加到1000 ml, 每10 ml该闪烁液容水0.2 ml,用于测定匀浆上清液。放射性用NE8312液闪能谱仪测定,外

标准源道比法校正。试管甲减去试管乙的放射性表示核沉淀上 R_nE 的结合量。

E_2 结合量的计算:

$$\frac{\text{样品 dpm} \times \text{样品稀释因子}}{\text{标记物比放射性 (Ci/mmol)} \times 2.22} = \frac{\text{fmol}}{\text{ml}}$$

$\frac{\text{fmol}}{\text{ml}} \div \text{mg 蛋白(或 DNA)/ml} = \text{fmol/mg 蛋白(或 DNA)}$

五、蛋白质和 DNA 浓度的测定 蛋白质按文献方法⁽⁵⁾测定, 用牛血清白蛋白或人血清白蛋白作标准曲线。DNA 按文献方法⁽⁶⁾测定, 用小牛胸腺 DNA 作标准曲线。

结果与讨论

一、子宫匀浆中 R_cE 向核沉淀上转移

图 1 结果显示经 E_2 处理的兔子子宫匀浆, 核沉淀的 R_nE 量是未经 E_2 处理的 3-4 倍, 在上清液中结果正好相反, R_cE 量是未处理的 1/4 左右。这种现象用大鼠子宫匀浆可得到重复。子宫细胞 R_c 与 E 结合的 R_cE 在整体或离体条件下向细胞核上转移的现象, 已有文献报道^(7,8)。

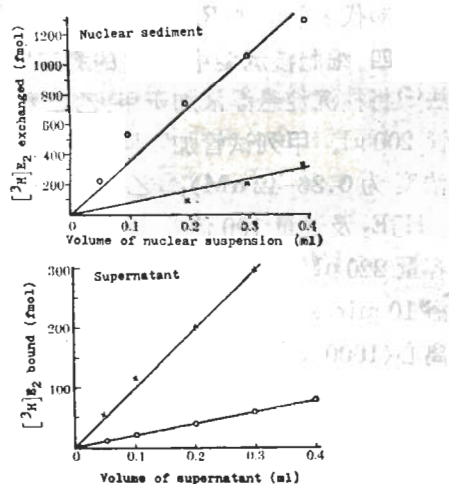


图 1 Effect of treating rabbit endometrial homogenate with estradiol on R_cE and R_nE . DNA in nuclear sediment: 0.51 mg/ml. Protein in supernatant: 3.19 mg/ml.

- — ○ Treated with estradiol at 30°C for 30 min.
× — × Control (without estradiol and kept at 0°C)

Anderson 等利用这种现象, 先给动物以 E 去饱和全部受体, 然后取出靶组织制备匀浆, 分离出核沉淀, 再用标记激素与核上 R_nE 的非标记配基交换, 直接测定其放射性, 以反映细胞内受体总量⁽²⁾。但若用含有 E_2 的缓冲液来制备未给 E 的动物子宫匀浆, 应可稳定 R_c , 并使 R_c 与 E_2 达到饱和结合, 在 25—37°C 影响下 R_cE 向核沉淀上转移, 则同样可以通过 $[^3H]E_2$ 的交换, 测到细胞内受体的总量。实验结果(图 1)表明加有 E_2 的子宫匀浆经保温处理, R_cE 同样可向核沉淀上转移, 与整体给 E 或在 E 溶液中培养离体器官的效果一样, 使细胞核沉淀中 $[^3H]E_2$ 交换量增加。

二、保温时间对匀浆中 R_cE 转移到核沉淀上的影响

一般情况下, 子宫组织中总是含有一定量的内源 E , 因此胞浆内 E 、 R_c 和 R_cE 应该处于平衡状态, 外加 E 或促使 R_cE 向核上转移, 都会影响这种平衡, 其结果是核上 R_nE 增加。将性成熟的大鼠子宫匀浆 30°C 保温不同时间后, 测定上清液中 R_c 和核沉淀上的 $[^3H]E_2$ 交换量指出, 随着匀浆保温时间的延长, 上清液中 R_c 逐渐减少, 0.5 h 后渐趋恒

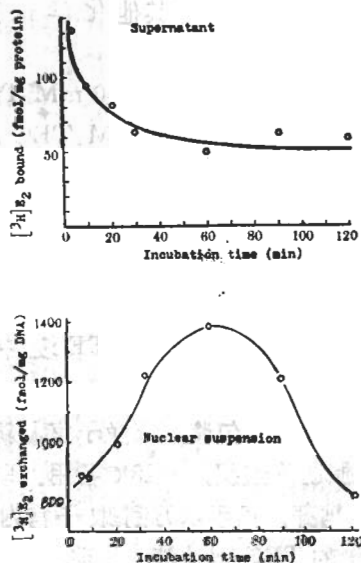


图 2 Effect of the duration of incubation of rat uterine homogenate on R_cE , R_nE in supernatant and nuclear sediment

定(图2), 而核沉淀上 $[^3\text{H}]\text{E}_2$ 的交换量则相应地增加, 在1 h左右达最大值(图2), 再次证明在匀浆中 R_cE 在温度影响下可向细胞核上转移。保温时间长于1 h, 核沉淀的 $[^3\text{H}]\text{E}_2$ 交换量明显下降, 应该是离体条件下 R_nE 不够稳定的反映。

三、 E_2 浓度对核沉淀上 R_nE 量的影响

将性未成熟大鼠子宫匀浆与不同浓度的 E_2 保温处理, 测定核沉淀上 $[^3\text{H}]\text{E}_2$ 的交换量。从表1结果可以看到, 在不外加 E_2 的情况下, 把匀浆保持在 0°C , 或在 30°C 保温, 核沉淀上 $[^3\text{H}]\text{E}_2$ 的交换量是不同的, 30°C 保温的样品比 0°C 的样品要高1倍以上, 而上清液中的 R_c 则低于 0°C 的样品。这种仅仅由温度所引起的差异, 显然是匀浆中内源 R_cE 在温度影响下转移到核沉淀上所造成的结果。如果把不同量的 E_2 加到匀浆中 30°C 保温, 交换量又略有增加, 反映胞浆中的 R_c 与外加 E_2 结合继

续进入核内, 但从 0.05 nM 起核沉淀上 $[^3\text{H}]\text{E}_2$ 交换量已达饱和。尽管 E_2 浓度变化可达一万倍, 对核沉淀上 R_nE 量的影响却不大。这说明子宫细胞匀浆中的 R_c 数目是有限的, 在极低的 E_2 浓度下已达到饱和结合, 并且还表明过量 E_2 不与核沉淀起反应, 反映了 E_2 只有与 R_c 形成 R_cE 后才能在温度活化下结合到核沉淀上, 支持了测定的专一性。

四、核沉淀与匀浆上清液重组保温对 R_nE 的影响

把大鼠子宫匀浆的上清液和核沉淀在 $0-4^\circ\text{C}$ 低温下先行分离, 并将上清液用DCC除去内源 E , 只留下结合状态的 E , 然后按表2实验条件观察核沉淀与上清液重组保温对核沉淀上的 $[^3\text{H}]\text{E}_2$ 交换量的影响。结果核沉淀单独保温, 其 $[^3\text{H}]\text{E}_2$ 交换量低于 0°C 保存的核沉淀, 说明 R_nE 对温度是敏感的, 但是, 将上清液加到核沉淀中重组保温, 可使 $[^3\text{H}]\text{E}_2$ 交换量明显提高, 在上清液与核沉淀重组系统

表1 Influence of temperature and concentrations of estradiol on the levels of R_c , R_nE in supernatant and nuclear sediment of the uterine homogenate of rats

Temp.	Estradiol concentration (nM)	$[^3\text{H}]\text{E}_2$ exchanged	
		Nuclear sediment (fmol/mg DNA)	Supernatant (fmol/mg Protein)
0°C	0	170	243
	0	400	207
30°C	0.01	413	
	0.05	460	
	0.1	453	
	0.2	445	
	1	447	
	10	543	
	100	439	

表2 Effect of incubation temperature on R_nE after recombining nuclear sediment with supernatant of the uterine homogenate of rats

Experimental conditions	Nuclear suspension		
	Buffer	Supernatant	Supernatant E_2 (1 nM)
	0°C	30°C	30 min
$[^3\text{H}]\text{E}_2$ exchanged (fmol/mg DNA)	276	241	312
			359

中再外加 E_2 保温, 则 $[^3H]E_2$ 交换量最高。这说明重组保温条件下, 也有 R_nE 的转移, 而且匀浆上清液也许对核沉淀的 R_nE 还具有一定的保护作用。无论如何, 上清液中 R_nE 转移到核上的量必定是大于温度所引起的 R_nE 失活的量, 因此净结果是 R_nE 量增加。

五、测定结果 上述实验证明用含低浓度 E_2 缓冲液制备子宫匀浆, 并将匀浆在 $30^\circ C$ 保温, 可使核沉淀上 R_nE 量增加, 这是 R_nE 转移到细胞核上的结果, 与文献报告⁽⁹⁾相一致的。应该说明, 匀浆核沉淀除了细胞核外, 还有许多其他的细胞碎片。文献报告用非离子型表面活性剂洗涤子宫细胞核沉淀, 可改善核制剂纯度, 但仍含有一定量的细胞碎片⁽¹⁰⁾。因此用

$[^3H]E_2$ 交换法测定核沉淀上 R_nE 时, 必须同时考虑非专一性结合的干扰。图3是用含 E_2 缓冲液制备的大鼠子宫匀浆保温后的核沉淀与 $[^3H]E_2$ 交换的 Scatchard 图, 根据文献方法⁽¹¹⁾, 对非专一性结合作了校正, 测得大鼠子宫受体的亲和力常数 (K_a) 为 $1.8 \times 10^9 M^{-1}$, 总结合量 (N_m) 为 $8 \times 10^{-11} M$, 这些数值与文献报告 ER 的 K_a 值为 $10^9 M^{-1}$ 数量级相符合的, 证实了测定方法的可靠性。

致谢 张友端教授指导

参 考 文 献

- 1 Gorski J, Gannon F. *Annu Rev Physiol* 1976; 38:425
- 2 Anderson J, Clark JH, Peck EJ Jr. *Biochem J* 1972 Feb; 126(3):561
- 3 Higgins SJ, Rousseau GG, Baxter JO, Tomkins GM. *Proc Natl Acad Sci USA* 1973 Dec; 70(12):3415
- 4 Katzenellenbogen JA, Johnson HJ Jr, Carlson KE. *Biochemistry* 1973 Oct 9; 12(21):4092
- 5 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. *J Biol Chem* 1951 Nov; 193(1):265-75
- 6 Burton K. *Biochem J* 1956 Feb; 62(2):315
- 7 Giannopoulos G, Gorski J. *J Biol Chem* 1971 Apr 25; 246(8):2524
- 8 Muller RE, Traish AM, Wotiz HH. *ibid* 1977 Nov 25; 252(22):8206
- 9 Musliner TA, Chader GJ, Villet CA. *Biochemistry* 1970 Oct 27; 9(22):4448
- 10 Jungblut PW, Kallweit E, Sierralta W, Truitt AJ, Wagner RK. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 1978 Okt; 359(10):1259
- 11 Chanmess GC, McGuire WL. *Steroids* 1975 Oct; 26(4):538

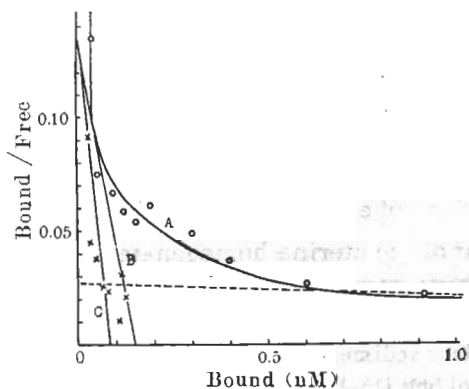


图3 Scatchard plot of receptor binding for E_2 in uterine nuclear sediment. Curve A: ER bound E_2 consisting of specifically bound (Curve B) and nonspecifically bound (dashed line) portions. Curve C: corrected from nonspecifically bound E_2 with the limited value of B/F

Acta Pharmacologica Sinica 1981 Jun; 2 (2): 88—98

[6,7- 3H] ESTRADIOL EXCHANGE FOR ESTIMATION OF ESTROGEN-RECEPTOR COMPLEX ON NUCLEAR SEDIMENT

YAO Lian-sheng, ZHOU Jian-liang, ZHANG Wu

(Shanghai Institute of Biochemistry, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031)

ABSTRACT A method based on the trans- location of cytoplasmic estrogen-receptor

complex to the nuclei in cell-free system was established for the estimation of nuclear estrogen-receptor complex. The homogenates of uteri of rabbits or rats were prepared by using buffers containing a low concentration of estradiol and incubated at 30°C for 30 min. The nuclear sediment was then isolated from the homogenates incubated with [6,7-³H]estradiol-17β in order to fully exchange the unlabeled ligand bound in the nuclear estrogen-receptor complex. The [6,7-³H] estradiol exchanged may be increased 3-fold compared with control

which had not been treated with estradiol prior to the separation of nuclear sediment. The amount of exchange estimated represented the level of estrogen receptor in the target tissues. The binding affinity of estrogen receptor in rat uterus was estimated to be $1.8 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ (K_a).

KEY WORDS cytoplasmic estrogen receptor complex (R_cE); nuclear estrogen receptor complex (R_nE); cell-free system; [6,7-³H]estradiol-17β exchange; action of estrogen