

# 사람 혈청 트랜스페린수용체의 단클론 항체를 이용한 방사면역측정과 철영양상태의 진단\*

김승렬 · 정천기\*\* · 한정호\*\*\* · 채범석

서울대학교 의과대학 생화학교실, 신경외과학교실,\*\* 임상병리학교실\*\*\*

## Immunoradiometric Assay using Monoclonal Antibody Against Human Serum Transferrin Receptor for Diagnosis of Iron Deficiency

Kim, Seung Ryul · Chung, Chun Kee\*\*

Han, Jung Ho\*\*\* · Tehai, Bum Suk

Department of Biochemistry, Neurosurgery,\*\* Clinical Pathology,\*\*\* Seoul National University, College of Medicine, Seoul, Korea

### ABSTRACT

The soluble transferrin receptor(TfR) in human serum has been shown recently to be a truncated form of intact membrane bound receptor containing most of the extracellular domain. We purified the transferrin-free TfR from human serum by immunoaffinity chromatography which produced the single protein identity in high resolution gel chromatography. The monoclonal antibodies(MAb) against purified serum TfR were produced by fusion of spleen cells of immunized Balb/c mice and SP2 cells. Ten hybrids producing MAb specific for serum TfR were identified and determined their isotypes. A immunoradiometric assay(IRMA) for serum TfR was established using two monoclonal IgG<sub>1</sub> antibodies as the coating and indicator antibodies on the basis of their suitability in sandwich IRMA of serum TfR. The mean serum TfR levels in the 15 normal male, 15 normal female, and 19 iron-deficient subjects were  $5.4 \pm 0.98$ ,  $4.6 \pm 0.76$ , and  $18.0 \pm 12.8$  mg/l, respectively, and the difference in mean values between normal and iron deficient subjects was significant( $p=0.0005$ ). There existed the inverse logarithmic relationship( $r = -0.9336$ ,  $p < 0.0001$ ) between the serum TfR and ferritin levels. (*Korean J Nutrition* 29(9) : 971~980, 1996)

**KEY WORDS** : serum transferrin receptor · monoclonal antibody · immunoradiometric assay · iron deficiency anemia.

### 서 론

세포 안으로의 철 운송과 적혈구 조혈속도는 혈장 내 철운송 단백질인 transferrin(Tf)에 대한 세포 표면의 특이적 수용체(transferrin receptor, TfR)의 양에 따

라서 조절되며, TfR 농도는 빠르게 증식되는 세포나 혈액소 생성 조직 또는 태반에서 높은 반면 철이 충족된 조직에서는 낮아서 과량의 철에 의한 부작용을 방지한다<sup>1-3)</sup>. 생리적 pH에서 Tf에 대한 TfR의 친화도는 di-ferric형에 가장 높고 iron-free형에 가장 낮으며, Tf-TfR 복합체는 receptor-mediated endocytosis를 통해 세포 내로 들어간 후 acidic endosomes 구조를 이루어 철을 유리시킨다<sup>3)</sup>. 망상적혈구에서 처음 알려진 후 태반 등의 여러 인체조직에서 확인된<sup>4)5)</sup> TfR은 95kDa

채택일 : 1996년 8월 27일

\*본 연구는 1990/1991년도 기초의학연구구성비의 재정지원으로 수행되었습니다.

의 동일한 subunits 두개가 이황화 결합된 당단백질<sup>1)</sup>로, mRNA 염기서열에서 유추된 단백질의 일차구조에 의하면 각 subunit는 C-말단 세포외 영역(671 잔기), 막내재 영역(28 잔기) 및 N-말단 세포내 영역(61 잔기)의 총 760 아미노산 잔기로 이루어진다<sup>67)</sup>.

철공급을 조절하는 TfR의 역할은 일찍이 구명되었으나 임상진단에의 이용은 1986년 Kohgo 등<sup>8)</sup>이 면역학적 측정법으로 미량의 TfR이 사람 혈청 내에 존재함을 보고한 후 가능하게 되었다. Kohgo 등<sup>9)</sup>은 intact cell surface receptor에 대한 단클론 항체 OKT9와 B3/25를 이용한 immunoradiometric assay(IRMA)를 사용하였을 때 정상인에 비해 철결핍성 빈혈이나 자가면역용혈성 빈혈 환자에서는 혈청 TfR(S-TfR) 농도가 3~6배 정도 높다고 보고하였다. 이후 다양한 단클론 항체를 이용하여 S-TfR 측정의 임상적 이용에 대한 연구가 이루어져 철영양상태와 erythropoietic activity의 평가, 특히 중증의 조직 철결핍의 정도를 확인하거나 만성질환에 의한 빈혈과 철결핍성 빈혈을 구분하는데 가치 있는 진단방법으로 인식하게 되었다<sup>10-13)</sup>.

그러나 그 동안 제시된 정상치는 상당한 차이를 보여서, Flowers 등<sup>11)</sup>은 사람 태반에서 정제된 Tf-TfR에 대한 단클론항체 E2H10과 A4A6을 이용한 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)로 Kohgo 등<sup>9)</sup>의 결과에 비해 약 20배나 높은 정상치를 보고하였다. Flowers 등은 그 원인이 단클론항체 OKT9와 B3/25를 이용한 면역학적 측정에서는 표준물질로 사용한 유리형 TfR과 혈청시료 내 Tf-결합형 TfR 간의 특이도와 민감도의 차이에 있음을 밝혔다. 이외에도 인체 TfR은 다형성이며, 적혈구와 비적혈구 조직간에는 단클론 항체가 서로 다른 면역학적 반응을 나타내며, 혈청 내 유리 TfR의 면역학적 성격은 세포표면의 수용체와는 다를 것이라는 논란이 계속되어 왔다<sup>214-17)</sup>. 논란이 많던 혈청 TfR의 본성에 대하여 최근에 Shih 등<sup>18)19)</sup>은 분자량 85 kDa으로 intact 수용체의 세포내 및 막내재 영역의 100개 아미노산 잔기가 제거된 형태임을 보고하였다. 이와 같은 세포표면의 intact receptor와 혈액 내 TfR fragment 간의 차이는 이들을 면역물질로하여 생성된 항체를 이용한 면역학적 측정에서 측정결과의 질에 영향을 줄 가능성을 배제할 수 없게 한다.

본 연구에서는 최초로 사람의 혈청에서 정제된 TfR을 면역물질로하여 단클론 항체를 생성하는 융합세포주를 확립한 후, 이 항체를 이용한 sandwich IRMA법으로 한국인 정상 남녀와 철결핍성 빈혈환자에서 혈청 TfR 농도를 측정 비교하여 앞으로 철영양상태의 진단을 위한 혈청 TfR 측정에서 단클론 항체의 면역학적 특성에 의

해 야기될 수 있는 문제점을 극복하고자 하였다.

## 연구재료 및 방법

### 1. 시 약

Bovine serum albumin(BSA), 사람 transferrin, polyethylene glycol-1500, CNBr-activated Sepharose 4B, 3-[(3-cholamidopropyl) dimethyl ammonio]-1-propane sulfonate(CHAPS), N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethane sulfonic acid (HEPES), dithiothreitol(DTT), phenylmethane sulfonyl fluoride(PMSF), 2,6,10,14-tetramethylpentadecane(pristane), Iodogen 및 horseradish peroxidase는 Sigma사로부터, ImmunoPure binding/elution buffers, 2,2'-azinobis(3-ethylbenzo thiazoline sulfonic acid)(ABTS), Monoclonal Antibody Isotyping Kit I 및 Protein A-Sepharose 4B는 Pierce사에서 구입하였다. 사람의 혈청은 녹십자, 소태아혈청, DMEM, gentamicin, complete Freund's adjuvant 및 goat anti-mouse Ig-peroxidase는 Gibco BRL사, Sepharose CL-4B 및 PD-10 컬럼은 Pharmacia사, desferrioxamine(DFO)은 Ciba Pharmaceuticals사, Na<sup>125</sup>I는 Amersham사, 혈청 ferritin RIA kit(FER-IRON II)는 미국 Ramco Lab사, 그리고 기타의 시약은 Sigma사 또는 일본제 GR급의 시약을 사용하였다.

### 2. 사람 태반 TfR 정제 및 Anti-TfR-Sepharose 4B 컬럼 준비

면역친화성 크로마토그래피에 이용할 anti-TfR 항체의 면역물질로 사용할 TfR는 Turkewitz 등<sup>20)</sup>의 방법에 따라 제대와 막을 제거한 분만 직후의 사람의 태반 약 70g을 균질화하여 원침시킨 후 침전물을 triton X-100으로 추출하고, 황산암모늄 염석(40%)과 Tf-Sepharose 친화성 크로마토그래피로 정제하였고, 전 과정을 4°C에서 시행하였다. 친화성 컬럼은 Karin과 Mintz<sup>21)</sup>의 방법에 따라 CNBr-activated Sepharose 4B 젤 2ml에 10mg의 Tf를 반응시켜 준비하였고, 단백질의 정량은 Bradford<sup>22)</sup>의 방법을 사용하였으며, 전기영동은 변형된 Laemmli SDS-PAGE(6~12% gradient)법<sup>23)</sup>으로 시행하였다. 정제한 TfR 200µg을 토끼에 정맥 주사하고 10일 간격으로 2번 더 주사한 후<sup>24)</sup>, 심장에서 약 60ml의 혈액을 얻었다. 분리된 혈청에 동량의 ImmunoPure binding 완충액을 첨가하여 Protein A-Sepharose 4B 컬럼에 부하하고 Immuno Pure binding 완충액으로 세척하였다. 결합된 항체는 젤 부피의 2배가 되는 Im-

munoPure elution 완충액으로 용출하였다. 항혈청의 역가검사는 연구방법 4에서와 같이 ELISA법을 이용하였으나 단지 96-well plate에 항혈청 시료를 도포 하였으며, 여기에 Nakane과 Kawaoi<sup>25)</sup>의 방법으로 결합시킨 peroxidase-TfR을 반응시킨 후에 기질용액을 가하여 405nm에서 흡광도를 조사하였다. Anti-TfR-Sepharose 면역친화성 컬럼의 준비는 Tf-Sepharose의 경우와 동일하였으나 단지 젤 1ml 당 5mg의 태반에서 정제된 항체를 이용하였고, 여분의 활성기를 차단한 후 0.5M NaCl이 첨가된 0.1M 아세트산 완충액(pH4.0)으로 세척하고 PBS로 평형화시켰다.

### 3. 사람 혈청 트란스페린 수용체의 정제

사람 혈청 650ml에 황산암모늄 470g을 서서히 가하면서 완전히 녹이고 17,000×g에서 20분간 원침하여 침전물을 얻었다. PBS에 부유시킨 침전물을 10mM 인산 완충액(pH7.2)에 투석시키고 40분간 원침하였다. 투석한 시료는 부유물을 제거하기 위해서 Sepharose CL-4B 컬럼을 통해 anti-TfR-Sepharose 컬럼에 부하하였다. Sepharose CL-4B 컬럼을 제거한 후 젤 부피의 5배가 되는 PBS로 세척하고, 50mM sodium citrate-1 mM DFO 완충액(pH4.9)으로 분당 2ml의 속도로 세척하여 철을 제거한 후 다시 PBS로 세척하여 apo-Tf를 제거하였다. 혈청 TfR은 젤 부피의 2배가 되는 PBS-2M NaSCN으로 용출하고 PD-10 컬럼으로 NaSCN을 제거하였다. 앞에서 용출한 혈청 TfR 용액을 Tf-Sepharose 컬럼에 부하한 후 2M NaSCN가 함유된 PBS로 용출하고, 용출액은 PBS로 평형화된 PD-10 컬럼을 통과시켜 NaSCN를 제거하였다. Tf-Sepharose 친화성 컬럼에서 용출한 혈청 TfR를 Protein Pak 300SW 컬럼 2개를 연결한 HPLC(Waters사 600E)를 이용하여 젤 크로마토그래피 하였다. 완충액은 PBS를 사용하였고, 유속은 분당 0.8ml 이었다.

혈청 TfR 정제 과정에서 각 컬럼분획에서 TfR 양을 추정하고자 <sup>125</sup>I-Tf를 이용한 noncompetitive binding assay를 Ecarot-Charrier 등<sup>26)</sup>의 방법으로 시행하였다. 먼저 약 20,000cpm(10ng/100μl)의 <sup>125</sup>I-Tf를 1,000배 농도의 non-radioactive Tf 존재 또는 비존재 하에서 TfR 시료용액 100μl와 반응시키고, 토끼의 혈청에서 정제한 anti-TfR 항체를 Sepharose 4B와 결합시킨 젤에 반응시켜 원침 후 침전물을 γ-counter로 측정하였다. Tf의 iodination은 연구방법 5에서와 동일하였으나, 단지 200μg/100μl의 Tf를 사용하였다.

### 4. Anti-TfR 단클론 항체의 생산

정제된 혈청 TfR 항원단백질을 PBS에 녹이고(1mg/

ml), 동일한 양의 complete Freund's adjuvant로 현탁액을 만든 후, 생후 6주 된 Balb/c 마우스 복강 내에 200μl를 주사하였다. 2주 간격으로 2번 더 주사하고 1개월 쉬게 한 후, 세포융합 3일전에 항원 100μl를 마지막 주사하였다. 면역된 마우스에서 비장을 적출하여 10ml의 세척용 배지(10mM HEPES, pH7.2가 함유된 DMEM)로 세척한 후 60mesh 철망 위에서 집게로 눌러 터뜨리며 10ml의 세척용 배지를 가하여 비장세포를 추출하였다. 2ml의 소태아혈청에 추출한 비장세포를 중첩시켜 상온에서 20분간 방치하고, 상층액을 분리하여 실온에서 300×g로 10분간 원침하였다. 침전된 세포에 0.83% NH<sub>4</sub>Cl-10mM HEPES(pH7.2) 용액을 가하여 적혈구를 용혈시키고 세척용 배지로 세척하였다.

세포융합은 Khler와 Milstein<sup>27)</sup>의 방법을 다소 변형시켜 실시하였다. 8-Azaguanine 배지(20μg/ml 8-azaguanine, 10% 소태아혈청, 50μg/ml gentamicin이 함유된 DMEM)에서 배양하여 수확한 Balb/c 마우스 SP2 형질세포종 세포(1.43×10<sup>7</sup>)와 비장세포(1×10<sup>6</sup>)에 1ml의 50% polyethylene glycol-1500(37°C)을 1분간에 걸쳐 조금씩 가하고, 20ml의 세척용 배지로 5분간에 걸쳐 서서히 희석하였다. 300×g로 10분간 실온에서 원침하여 침전된 세포를 20ml의 2×HAT 배지(200μM hypoxanthine, 800μM aminopterin, 32μM thymidine, 10% 소태아혈청 및 5μg/ml gentamicin이 함유된 DMEM)와 20ml의 condition 배지(1×HAT배지에서 aminopterin이 제외된 1×HT 배지로 형질세포종 세포를 증식시켜 배지가 노랗게 변색되면 원침하여 상층액을 0.45μm filter로 여과한 배지)를 가한 후, 0.2ml 씩 96-well plate에 분배하여 배양하였다. 12시간 후에 1×HAT 배지로 각 well을 가득 채우고, 다시 12~24시간 후에 상층액의 반을 제거하고 1×HAT 배지를 채웠다. 이후로는 매 2~3일마다 배지를 바꾸어 주며, 세포융합 후 약 2주일쯤에 항체검색을 실시하였다.

항체의 검색은 정제한 TfR(2μg/ml)로 도포한 96-well plate에 배양 중인 융합세포 배지 50μl를 가하고 상온에서 2시간 반응시킨 후 PBS-0.05% Tween 20으로 세척하였다. Horseradish peroxidase가 결합된 anti-mouse Ig 항체용액 50μl와 2시간 반응시킨 후 다시 세척하고, 100μl의 기질용액(10mg/ml ABTS-0.02% hydrogen peroxide-100mM citrate phosphate 완충액, pH4.4)을 가하여 37°C에서 20분간 반응시켰다. 100μl의 0.5mM NaN<sub>2</sub>로 반응을 정지시킨 후 405nm에서 흡광도를 측정하여 항체 양성인 융합세포를 검색하였다.

융합세포의 클론화를 위해서 항체에 양성인 융합세포 군을 24-well plate에 옮겨 1×HT 배지에서 mid-log phase에 이르도록 증식시키고 250 cells/ml이 되도록 세척용 배지로 희석하였다. 200 $\mu$ l를 취하여 20ml의 클론화 배지(2×HT 배지와 동량의 conditioned 배지를 섞음)에 희석하고, 200 $\mu$ 씩 분배하여 배양하였다. 일주일 후에 세포군집이 관찰되면 1×HT 배지를 가득 채우고, 10~14일이 지나 항체를 검색하였다. 단클론 항체를 분비하는 융합세포는 대량 배양하여, 미리 pristane을 주사한 Balb/c 마우스에 마리당 5~10 $\times$ 10<sup>6</sup> 세포를 복강에 주사하였다. 10일 후에 채취한 복수를 원침하여 얻은 상층액의 단클론 항체는 Protein A-Sepharose 컬럼을 이용하여 정제하고 PBS에 투석하였다. 단클론 항체의 isotype은 goat anti-mouse Ig과 rabbit anti-mouse IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub>, IgG<sub>2b</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgA, IgM, 그리고 peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG을 이용한 ELISA kit로 결정하였다.

### 5. 단클론 항체의 짝찾기

Two-site sandwich IRMA 측정에 이용하기 가장 적합한 2종의 단클론 항체 짝을 결정하기 위해서 우선 각각의 항체를 iodination 하였다. Iodogen 10 $\mu$ g을 100 $\mu$ l의 ethyl acetate에 녹여 200 $\mu$ g/100 $\mu$ l의 단클론 항체와 1mCi/10 $\mu$ l의 Na<sup>125</sup>I를 첨가하여 30분 상온에서 반응시킨 후 1M KI를 100 $\mu$ l 첨가하여 반응을 종로시켰다. 2.3ml의 PBS로 희석하여 PD-10 컬럼에 부하하고 3.5ml의 PBS를 컬럼에 통과시키며 받은 용출액 3.5ml을 짝찾기에 사용하였다. Polystyrene tube에 각 단클론 항체 50 $\mu$ 씩을 가하고 상온에서 2시간 결합시킨 후 1% BSA로 여분의 단백질 흡착을 blocking하여 세척하고, TfR (100 $\mu$ g/ml) 50 $\mu$ 를 가하여 2시간 동안 상온에서 반응시켰다. 세척 후 각 tube에 <sup>125</sup>I 동위원소로 표지한 단클론 항체를 10,000cpm 첨가하여 상온에 2시간 반응시킨 후 다시 세척하여 결합 방사선량을 gamma counter(Packard사 Minaxi auto-gamma 5000)로 측정하였다. 짝찾기는 10개의 단클론 항체 모든 짝에 대하여 조사되었다.

### 6. 방사면역측정법

사람 혈청 TfR의 IRMA 측정은 앞에서 선정된 단클

론 항체 4-4-1(Table 3 참조)을 1차항체로, 그리고 <sup>125</sup>I로 표지된 22-1-3을 2차항체로 하여 Kohgo 등<sup>9)</sup>의 방법을 이용하여 확립하였다. 일차항체를 polystyrene star tube에 0.5ml(0.5 $\mu$ g) 분주하여 상온에서 2시간 반응시킨 후 상층액을 흡입 제거하고, 1% BSA-PBS 1ml을 넣어 30분간 여분의 비특이적 단백질 흡착을 blocking하였다. PBST로 3회 세척 후 1/200으로 희석한 정상인이나 철결핍성 빈혈환자의 혈청, 또는 혈청에서 정제한 TfR을 농도 별(0~200 $\mu$ g/l)로 0.5ml 분주한 후 상온에서 2시간 반응시켰다. 세척 후 여기에 <sup>125</sup>I가 표지된 이차항체를 0.5ml(200,000cpm) 분주하여 상온에서 2시간 반응시킨 후 세척하여 gamma counter로 각 tube의 방사선량을 측정하고, log-log 표준곡선을 작성하였다. 혈청시료 내 TfR의 농도는 매 실험마다 회귀분석된 표준곡선에서 얻은 수치에 희석배수 200을 곱하여 계산하였다. 혈청 ferritin농도는 sandwich RIA kit(Ramco Lab)를 이용하여 측정하였다.

## 결 과

### 1. 사람 태반조직의 트란스페린 수용체 정제와 면역친화성 컬럼의 준비

사람의 태반 균등액을 원침하여 얻은 침전물을 triton X-100으로 추출하고, 황산암모늄 염석과 Tf-Sepharose 친화성 크로마토그래피를 실시하여 얻은 TfR 정제물은 초기 균등액에 비교하여 0.02%의 단백질 회수율을 보였다(Table 1). 정제된 TfR은 비환원 SDS-gel에서 180 kDa의 단일 단백질 띠를, 그리고 2-mercaptoethanol이 존재할 때에는 180 및 90kDa의 2개의 단백질 띠를 보였고, HPLC 겔 크로마토그래피에서는 분자량이 180kDa인  $\alpha_2$ -macroglobulin(정체시간 12.7분)과 매우 근접한 단일 peak(정체시간 12.8분)를 보였다(data not shown). 정제된 TfR을 토기에 면역하여 얻은 항혈청에서 protein A-Sepharose 컬럼을 이용하여 정제된 항체를 얻고 면역친화성 컬럼을 준비하였다.

### 2. 사람 혈청의 트란스페린 수용체 정제

황산암모늄 염석과 투석을 거친 사람 혈청시료를 anti-TfR-Sepharose 4B 면역친화성 컬럼에 결합시킨 후

**Table 1.** Purification of TfR from human placenta

Procedure	Volume(ml)	Protein Concentration(mg/ml)	Total Protein(mg)	Protein Recovery(%)
Homogenate	1200	5.03	6030	100
Pellet resuspended	1000	1.38	1375	22.8
Detergent solubilizate	1050	1.03	1082	17.9
Salting out(40% sat.)	136	4.57	621	10.3
Tf-Sepharose 4B	3	0.45	1.35	0.02

철과 apotransferrin을 제거하고 2M NaSCN을 함유하는 PBS로 용출하였다. PD-10 컬럼으로 NaSCN을 제거한 용출액은 다시 Tf-Sepharose 4B 친화성 컬럼에 결합시키고 2M NaSCN-PBS로 용출하였다. NaSCN을 제거하고 농축한 시료 0.8ml을 젤 크로마토그래피(유속 0.8ml/min)한 결과, 정체시간이 각각 14분과 19분인 단백질 피크가 2개 관찰되었다. 2개의 피크 중 19분의 피크가 binding assay에서 트랜스페린과 결합하였다. 최종 정제된 혈청 트랜스페린 수용체를 재차 젤 크로마토그래피한 결과 정확한 정체시간은 19.18분으로, 표준 단백질들과 비교한 분자량은 85kDa 정도로 관찰되었다(Fig. 1). 앞의 정제 과정을 순차적으로 거치면서 사람 혈청 650ml에서 약 0.2mg의 혈청 TfR을 얻었으며, <sup>125</sup>I-Tf binding assay 결과로 계산한 회수율은 2.7%이었다(Table 2).

3. 단클론 항체의 isotype 결정 및 1~2차 항체의 짝짓기

사람 혈청에서 정제한 유리형 TfR로 면역된 Balb/c 마우스 비장세포와 SP2 형질세포종 세포의 융합으로 얻

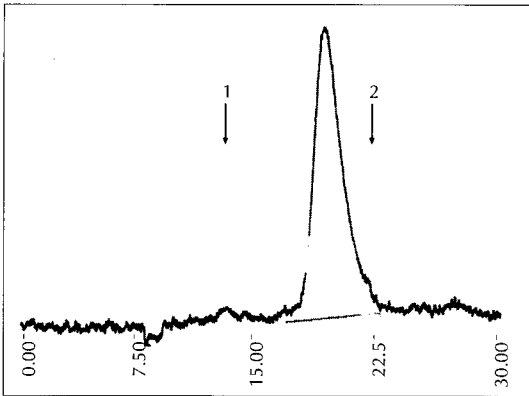


Fig. 1. Elution profile of serum TfR on Protein Pak 300SW. two columns(0.75×30cm) were connected and preequilibrated with PBS. After application of purified TfR, the column was eluted with PBS at a flow rate of 0.8ml/min. The retention times were 19.2min for serum TfR, 12.7min for α<sub>2</sub>-macroglobulin (180kDa, 1) and 21.2min for egg albumin(45kDa, 2).

은 hybridoma를 배양하여 TfR에 특이한 단클론 항체를 생산하는 10개의 clone을 얻었다(Table 3). 단클론 항체의 isotype를 분석한 결과 항체 번호 4-4-1, 6-3-1, 22-1-3, 25-2-2, 30-4-5, 80-3-4와 92-4-5는 IgG<sub>1</sub>이었고, 7-3-1은 IgG<sub>2a</sub> 그리고, 75-2-9와 83-3-4는 IgM이었다. 이 중 two-site IRMA에 이용하기 적합한 단클론 항체 짝으로는 짝짓기 실험에서 가장 결합도가 우수한 항체번호 4-4-1과 22-1-3이 선정되었고, 단클론 항체 4-4-1을 일차항체로 그리고 iodination된 22-1-3을 이차항체로 하여 IRMA를 확립하였다.

4. 사람 혈청 TfR 방사면역측정법의 확립

본 연구에서 확립한 two-site 방사면역측정법은 첨가된 트랜스페린 수용체의 농도와 <sup>125</sup>I 표지된 이차 항체의 bound CPM 간에는 log-log plot에서 직선관계를 보였다(Fig. 2). 또한 트랜스페린 수용체 농도가 각각

Table 3. Isotypes of monoclonal antibodies to serum transferrin receptor

Antibody number	Isotype	Antibody number	Isotype
4-4-1	IgG <sub>1</sub>	30-4-5	IgG <sub>1</sub>
6-3-1	IgG <sub>1</sub>	75-2-9	IgM
7-3-1	IgG <sub>2a</sub>	80-3-4	IgG <sub>1</sub>
22-1-3	IgG <sub>1</sub>	83-3-4	IgM
25-2-2	IgG <sub>1</sub>	92-4-5	IgG <sub>1</sub>

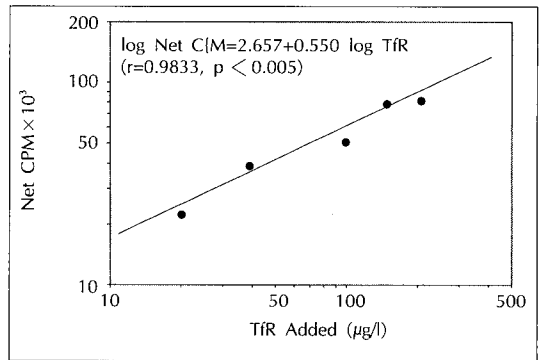


Fig. 2. Standard curve for serum TfR immunoradiometric assay with 4-4-1 and <sup>125</sup>I-labelled 22-1-3 monoclonal antibodies.

Table 2. Purification of S-TfR from human serum

Procedure	Protein Conc. (/ml)	Volume(ml)	Total protein(mg)	CPM <sup>1</sup> (/ml)	Purification Fold	Yield(%)
Serum	52 mg	650	33800	4260	1	100
Salting out	121 mg	195	23595	12160	1.2	85.6
Anti-TfR immunoaffinity	180 µg	10.5	1.890	11210	1280	4.3
Tf-Sepharose 4B	101 µg	3.5	0.354	29430	3553	3.7
Preparative HPLC	18 µg	11.0	0.198	6720	4553	2.7

1) Noncompetitive binding assay with each TfR fraction to <sup>125</sup>I-Tf

58mg/l, 39mg/l, 21mg/l씩 가지고 있는 혈청 시료를 1 : 16까지 순차적으로 희석시켜 측정한 결과도 비교적 직선관계를 관찰할 수 있었다(Fig. 3). 확립된 측정법의 intra-assay variation을 검정한 결과는 시료 I(평균 21.0mg/l)에서는 12번 반복 측정한 표준편차가 0.9mg/l이고, 변동계수(CV)는 4.3%였다. 또한 시료 II(평균 58.0mg/l)의 경우에는 표준편차가 3.0mg/l이고, CV는 5.2%였다. 한편 수용체 농도 58mg/l, 39mg/l 및 21mg/l인 3개의 시료를 10회에 걸쳐 반복 측정하여 between-assay variation을 검정한 결과 각각 CV가

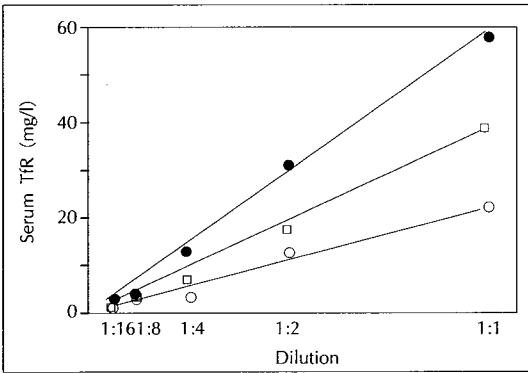


Fig. 3. Serial dilutions of three serum samples for TfR measurement. The initial TfR concentrations were 58mg/l(●), 39mg/l(□) and 21mg/l(○).

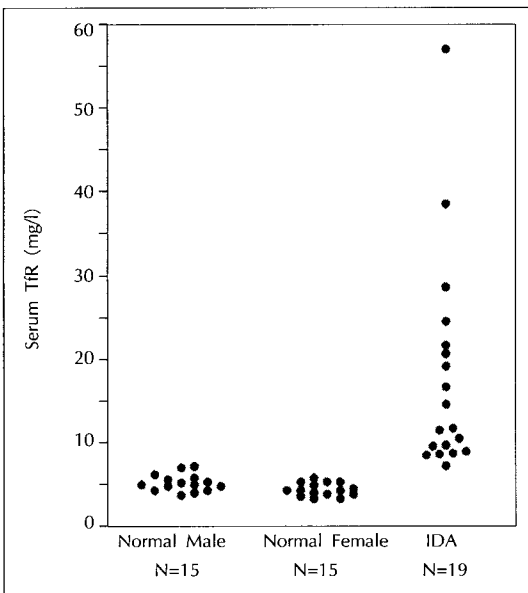


Fig. 4. Serum TfR levels in normal subjects and iron-deficiency anemia(IDA) patients. Mean serum TfR levels were  $5.4 \pm 0.98$ mg/l in 15 normal males,  $4.6 \pm 0.76$ mg/l in 15 normal females, and  $18.0 \pm 12.8$ mg/l in 19 IDA patients.

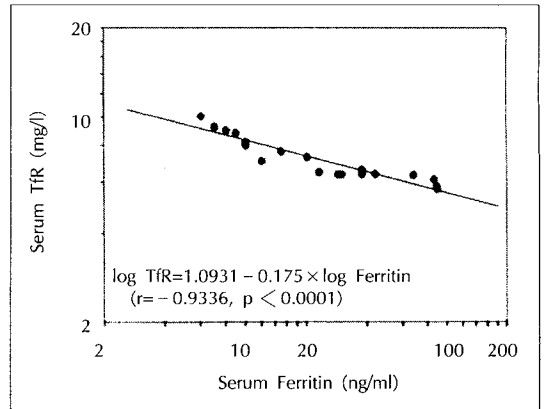


Fig. 5. Logarithmic correlation curve between serum TfR and ferritin levels in 19 normal and IDA patients.

5.6%, 4.3%와 2.8%로 관찰되었다.

### 5. 정상인과 철결핍 환자에서의 혈청 트란스페린 수용체 농도의 비교

정상인과 철결핍 환자에서 혈청 트란스페린 수용체의 농도를 측정된 결과 15명의 정상남자에서는 평균  $5.4 \pm 0.98$ mg/l, 15명의 정상여자에서는  $4.6 \pm 0.76$ mg/l로 남녀간에는 유의한 차이가 없었다. 한편 혈청 ferritin 농도가 12ng/ml 이하인 19명의 철결핍환자에서는 평균  $18.0 \pm 12.8$ mg/l의 혈청 TfR 농도가 관찰되었다(Fig. 4). 철결핍 환자 전례에서 정상 대조군에 비하여 높았고, 이 차이는 ANOVA 분석 결과 유의하였다( $p=0.0005$ ).

### 6. 혈청 TfR과 ferritin 농도의 비교

철결핍성 빈혈의 진단에 널리 이용되고 있는 혈청 ferritin 농도와 혈청 TfR 농도간의 상관관계를 조사한 결과는 Fig. 5와 같다. 남녀 정상인 및 철결핍 환자, 총 49명 중 혈청 TfR 또는 ferritin 농도가 mean $\pm$ 2SD 범위를 벗어나는 대상자를 제외한 19명에서 혈청 TfR과 ferritin 농도간에는 매우 강한( $r = -0.9336$ ,  $p < 0.0001$ ) 대수적 역 상관관계가 관찰되었으며,  $\log(\text{TfR}) = 1.0931 - 0.175 \times \log(\text{ferritin})$ 의 회귀선을 얻었다.

## 고 찰

저장철을 반영하는 혈청 ferritin과 철영양의 기능적 손상의 척도가 되는 혈색소 농도는 신뢰도 높은 검사종목이기 때문에 임상적으로 철결핍성 빈혈의 진단은 빈혈의 또다른 원인이 되는 만성감염, 염증반응, 간질환 등의 다른 질병이 없는 한 별 어려움이 없다. 그러나 집단의 철영양상태 평가가 필요한 역학조사에서나 임신부와 같은 위험군에서는 철결핍의 정도를 조사하는 것이 매우

중요하다. 그러나 저장철은 없으나 아직 빈혈로는 진전이 되지 않은 경증의 철결핍(iron deficient erythropoiesis)의 진단에는 많은 어려움이 있다.<sup>29)29)</sup>

Transferrin(Tf)은 포유류의 hepatocyte와 intestinal mucosa에서는 iron acceptor로 그리고 조혈세포나 철을 필요로 하는 세포에서는 iron donor로 작용하는 철 운반 당단백질로 분자당 2개의 철이온을 결합시킨다. 세포 안으로의 철 운송은 세포 표면의 Tf 수용체(TfR)의 양에 따라 조절되어서, 혈액소 생성 조직 또는 iron 요구량이나 세포성장속도가 높으면 TfR은 증가되며 반면 미성숙의 erythroid가 erythrocyte로 성숙하면 TfR은 사라진다.<sup>30)31)</sup> 인체의 총 TfR의 80%는 bone marrow의 erythrocyte progenitors에서 발견되며<sup>2)</sup>, 1986년 이후 사람에서 망상적혈구 표면의 TfR이 절단되어 Tf와 결합된 형태로 순환혈에서 존재함이 발견되었다.<sup>8)10)18)</sup> 또한 Beguin 등<sup>32)</sup>은 세포표면의 수용체의 양과 혈청 수용체의 양이 비례하며, 순환혈에서 TfR의 농도는 erythroid mass와 밀접히 관련되어 있다고 보고하였다. 이와 같이 혈청 TfR 측정의 임상적 이용에 관심이 모아지면서 1986년 경부터 시도된 S-TfR의 면역학적 측정은 1990년 초에 단클론 또는 다클론 항체를 이용하여 확립되었고, 정상인에 비하여 철결핍성 빈혈, 자가면역용혈성 빈혈 및 적혈구과다증에서는 S-TfR 농도가 3~8배 증가하고, 반면 재생불량성 빈혈에서는 감소함이 보고되었다.<sup>9)11)12)</sup> 또한 Skikne 등<sup>13)</sup>은 반복된 phlebotomy로 저장철이 완전히 고갈되어 철결핍이 진행될 때 S-TfR 농도가 직선적으로 점차 증가함을, 그리고 Ferguson 등<sup>33)</sup>은 철결핍상태 평가에 혼돈을 야기하는 만성염증 등의 질환에서 혈청 ferritin은 철저장량에 비해 증가한 반면 S-TfR 농도는 아무 영향이 없음을 관찰하였다. 이와 같은 결과는 혈청 ferritin이 저장철의 민감한 지표인 반면 S-TfR는 기능적 철결핍, 즉 경증의 조직 철결핍을 민감하게 진단하고, 철결핍성 빈혈과 만성질환에 의한 빈혈을 구분하는데 신뢰도 높은 지표가 됨을 보여준 것이다.

그러나 이와 같이 S-TfR 측정의 중요성이 확인되었음에도 불구하고 그 동안에 보고된 측정치는 상당한 차이를 보여 주어서, Kohgo 등<sup>9)</sup>의 결과와 비교하여 Huebers 등<sup>12)</sup>과 Flowers 등<sup>11)</sup>은 서로 다른 항체를 이용하여 적어도 20배 이상이나 높은 수치를 보고하였다. Flowers 등은 면역학적 측정에서 단클론 항체에 따라 표준물질로 사용한 유리형 TfR 또는 Tf-결합형 TfR이 서로 다른 특이도와 민감도를 보인다고 보고한 바 있다. 다양하게 개발된 TfR 단클론 항체의 epitope은 아마도 서로 다른 oligosaccharide일 것으로 생각되어서<sup>34)</sup>, 생성된 항

체들은 TfR에 대한 동일함 특이도와 친화도를 갖지 못할 것이 예측되고 있다<sup>35)</sup>. 또한 특정 단클론 항체는 인체 미성숙 erythroid의 TfR과 보다 잘 반응하며<sup>15)</sup>, TfR은 다형성<sup>16)</sup>으로 적혈구와 비적혈구계통과 같은 다른 조직간에는 단클론 항체와의 반응에 차이가 있다는 보고도 있었다<sup>2)</sup>. 한편 혈액 내 유리형의 TfR은 erythroid 표면의 수용체와는 구조적인 차이로 특정 단클론 항체와의 면역학적 반응이 다를 수 있다는 주장도 계속되어 왔고<sup>17)</sup>, 실제로 인체 혈청 내의 유리형 TfR은 intact TfR 분자가 세포막의 serine protease에 의해서 잘라져 유리된 85 kDa의 절단분자로 혈액 내에서 Tf와 결합하고 있음이 최근에 밝혀졌다.<sup>18)19)36)</sup> 이러한 세포표면의 intact receptor와 혈액 내 TfR fragment 간의 차이는 이들을 면역원으로 하여 생성된 항체를 이용한 면역학적 측정에서 예기치 못한 문제점이 될 가능성이 있다. 이에 본 연구에서는 혈청 TfR의 면역학적 측정에서 항원과 단클론항체의 특성 차이로 인해 가능한 문제점을 배제하고자 처음으로 사람의 혈청에서 정제된 TfR을 면역원으로 하는 단클론 항체를 생성하고, 이 항체를 이용한 IRMA 측정법으로 한국인 정상 남녀와 철결핍성 빈혈환자에서 혈청 TfR 농도를 측정하고 혈청 ferritin 농도와의 상관관계를 밝히고자 하였다.

본 실험에서 황산암모늄 염석과 투석을 거친 혈청 시료를 anti-TfR-Sepharose 4B 면역친화성 컬럼, Tf-Sepharose 4B 친화성 컬럼 및 젤 크로마토그래피의 과정을 거쳐 유리형의 혈청 TfR을 순수하게 정제하였다. 젤 크로마토그래피 정제과정에서는 관찰된 2개의 단백질 피크(정체시간 각 14분, 19분) 중 나중에 용출된 단백질이 binding assay에서 Tf와 결합함이 관찰되어 유리형 혈청 TfR임을 알 수 있었고, 앞의 단백질은 Tf-결합형 TfR으로 생각되었다. 최종 정제된 혈청 TfR을 제차 젤 크로마토그래피한 결과(Fig. 1) 정체시간은 19.18분으로 표준 단백질과 비교한 분자량은 85kDa으로 관찰되어서 Shih 등<sup>18)19)</sup>이 보고한 혈청 TfR의 분자량과 일치하였다. 전체 정제과정을 통한 혈청 TfR의 회수율은 2.7%로(Table 2) 낮은 편이었고, 특히 anti-TfR 면역친화성 컬럼 과정의 회수율이 5% 정도로 Shih 등<sup>18)</sup>이 단클론 항체를 이용한 면역친화성 컬럼으로 보고한 회수율에 비해서 매우 낮았다. 이와 같은 결과는 본 실험에서 다클론 항체를 사용함으로써 친화성 컬럼의 효율이 낮았거나, Shih 등이 밝힌 것과 같이 TfR의 용출에 염기성 완충액의 사용이 높은 회수율을 얻는데 도움이 되나 본 실험에서는 그렇지 못하였던데 원인이 있으리라 생각된다.

순수 정제된 유리형 혈청 TfR을 면역시킨 마우스

spleen 세포와 SP2 세포를 융합하여 얻은 10개의 단클론 항체 중 혈청 TfR과 binding 실험에서 가장 높은 결합도를 보인 단클론 항체 22-1-3과 4-4-1의 짝을 일차 및 이차 항체로 이용한 two-site IRMA에서 intra-assay variation(CV)은 5% 정도, between-batch variation은 2.8~5.6%로 Flowers 등<sup>11)</sup> 과 비교하여 between-batch variation이 다소 높았으나 임상진단에 이용하기에 적합하였다. 확립된 IRMA로 정상인 30명에서 측정된 혈청 TfR 농도의 평균치는 남자 5.40.98mg/l, 여자 4.60.76mg/l이었고, 그리고 혈청 ferritin 농도가 12ng/ml 이하인 19명의 철결핍 환자에서는  $18.0 \pm 12.8$ mg/l의 유의하게 높은 혈청 TfR 농도가 관찰되었다(Fig. 4). Kohgo 등<sup>9)</sup>은 intact cell surface receptor에 대한 단클론항체 OKT9와 B3/25를 이용한 IRMA로 처음으로 정상인과 빈혈환자에서 혈청 TfR 농도를 측정하여 정상인에서는  $253 \pm 82$ µg/l, 그리고 철결핍성 빈혈환자에서는 정상인보다 2.8배가 높은  $730 \pm 391$ µg/l의 평균치를 보고하였다. 반면 Huebers 등<sup>12)</sup>은 정제된 태반 TfR에 대한 다클론성 항체를 이용한 ELISA법으로 정상인에서는  $8.28 \pm 1.26$ mg/l, 철결핍성 빈혈환자에서는 4.1배 정도 높은 평균치를 보고하였다. 또한 Flowers 등<sup>11)</sup>도 사람 태반에서 정제된 Tf-TfR에 대한 단클론항체 E2H10과 A4A6을 이용한 ELISA 법으로 정상인에서  $5.63 \pm 1.42$ mg/l, 철결핍성 빈혈환자  $18.0 \pm 11.4$ mg/l의 평균치를 관찰하여 정상인과 철결핍성 빈혈환자에서의 농도 비는 3.2배 정도로 보고하였다. 이들의 결과는 철결핍성 빈혈환자와 정상인에서의 농도 비에 있어서는 Kohgo 등의 결과와 큰 차이가 없으나, 평균 농도와 범위는 20배 이상의 차이를 보여주는 것이었다. 본 실험으로 얻어진 남자 5.4mg/l, 여자 4.6mg/l의 평균치는 Flowers 등의 보고와 매우 유사하였고, 이 결과는 유리형 혈청 TfR에 대해 얻어진 단클론 항체들이 Flowers 등이 사람 태반에서 정제된 Tf-결합형 TfR에 대해 얻은 단클론항체 E2H10과 A4A6 경우와 마찬가지로 혈청 내 95% 이상인 Tf-결합형 TfR과 특이적이고 큰 친화도를 갖고 결합함을 보여주는 것이다. 한편 본 연구의 대상이 된 정상인 및 철결핍 환자 총 49명 중 혈청 TfR과 ferritin 농도 모두가 mean  $\pm$  2SD 범위 내에 있는 19명에서 ferritin과 TfR 농도간에는 매우 강한( $r = -0.9336$ ,  $p < 0.0001$ ) 역의 대수적 상관관계가 관찰되어서(Fig. 5), Skikne 등<sup>13)</sup>이 이들 농도가 서로 역의 관계에 있기 때문에 혈청 TfR : ferritin의 비는 폭넓은 범위에서 철영양상태를 보여줄 수 있다고 한 주장을 뒷받침하였다.

## 요약 및 결론

사람 혈청 transferrin receptor(TfR)의 면역학적 측정은 경증의 철결핍을 진단하는데 유용한 검사로 관심을 끌고 있으나, 그 동안 intact cell이나 태반에서 정제된 TfR을 면역원으로 한 단클론 항체가 이용되어서 TfR fragment로 밝혀진 혈청 TfR의 측정에 오차를 가져올 가능성이 우려된다. 본 연구에서는 최초로 사람의 혈청에서 Tf-유리형 TfR를 정제하고, 혈청 TfR로 면역된 Balb/c 마우스 비장세포와 SP2 형질세포종 세포의 융합으로 단클론 항체(MAb)를 생산한 후, 이 항체를 이용한 sandwich immunoradiometric assay(IRMA)법을 확립하여 한국인 정상 남녀 각 15명과 19명의 철결핍성 빈혈환자에서 혈청 TfR 농도를 측정하였으며, 연구 결과의 요약은 아래와 같다.

1) 황산암모늄 염색, anti-TfR-면역친화성 크로마토그래피, Tf-친화성 크로마토그래피, 및 젤 크로마토그래피 과정을 거쳐 정제한 사람의 혈청 TfR의 정제율과 회수율은 각각 4,500배 및 2.7%이었다.

2) 면역된 세포의 융합으로 TfR에 특이한 MAb를 생산하는 10개의 clone을 얻었으며, 단클론 항체의 짝짓기 실험에서 선정된 항체번호 4-4-1과 iodination된 22-1-3을 각각 일차항체와 이차항체로 하여 sandwich IRMA를 확립하였다. 혈청 TfR측정의 intra-assay variation(CV)은 5% 정도이었고, between-assay variation은 6% 미만이었다.

3) 혈청 TfR 농도는 건강한 남자에서는 평균  $5.4 \pm 0.98$ mg/l, 여자에서는  $4.6 \pm 0.76$ mg/l로 남녀간에는 유의한 차이가 없었으나, 철결핍환자에서는 평균  $18.0 \pm 12.8$ mg/l로, 철결핍 환자 전례에서 정상 대조군에 비하여 유의하게 높았다( $p = 0.0005$ ). 혈청 TfR과 ferritin 농도간에는 매우 강한( $r = -0.9336$ ,  $p < 0.0001$ ) 대수적 역상관관계가 관찰되었다.

이와 같은 결과는 Tf-유리형 사람 혈청 TfR에 대해 얻은 MAb들이 혈청 내 Tf-결합형 TfR와 큰 친화도를 갖고 특이적으로 결합함을 암시하는 것이며, 또한 혈청 TfR 농도 자체가 철결핍성 빈혈의 유용한 지표가 되는 동시에 혈청 ferritin 농도와 역의 강한 상관관계를 보임으로써 혈청 TfR : ferritin 비가 다양한 철영양상태를 반영함을 보여주었다.

## Literature cited

- 1) Trowbridge IS, Newman RA, Domingo DL, Sauvage C.



- Transferrin receptors : Structure and function. *Biochem Pharmacol* 33 : 925-932, 1984
- 2) Huebers HA, Finch CA. The physiology of transferrin and transferrin receptors. *Physiol Rev* 67 : 520-582, 1987
  - 3) Ward JH. The structure, function and regulation of transferrin receptors. *Invest Radiol* 22 : 74-83, 1987
  - 4) Jandl JH, Katz JH. The plasma-to-cell cycle of transferrin. *J Clin Invest* 42 : 314-326, 1963
  - 5) Gatter KC, Brown GY, Trowbridge IS, Woolston RE, Mason DY. Transferrin receptors in human tissues : their distribution and possible clinical relevance. *J Clin Pathol* 36 : 539-545, 1983
  - 6) Schneider C, Owen MJ, Banville D, Williams JG. Primary structure of human transferrin receptor deduced from the mRNA sequence. *Nature* 311 : 675-678, 1984
  - 7) McClelland A, Kuhn LC, Ruddle FH. The human transferrin receptor gene : Genomic organization and the complete primary structure of the receptor deduced from a cDNA sequence. *Cell* 39 : 267-274, 1984
  - 8) Kohgo Y, Nishisato T, Kondo H, Tsushima N, Niitsu Y, Urushizaki I. Circulating transferrin receptor in human serum. *Br J Haematol* 64 : 277-281, 1986
  - 9) Kohgo Y, Niitsu Y, Kondo H, Kato J, Tsushima N, Sasaki K, Hirayama M, Numata T, Nishisato T, Urushizaki I. Serum transferrin receptor as a new index of erythropoiesis. *Blood* 70 : 1955-1958, 1987
  - 10) Kohgo Y, Niitsu Y, Nishisato T, Kato J, Kondo H, Tsushima N, Urushizaki I. Quantitation and characterization of serum transferrin receptor in patients with anemias and polycythemias. *Jpn J Med* 27 : 64-70, 1988
  - 11) Flowers CH, Skikne BS, Covell AM, Cook JD. The clinical measurement of serum transferrin receptor. *J Lab Clin Med* 114 : 368-377, 1989
  - 12) Huebers HA, Beguin Y, Pootrakul P, Einspahr D, Finch CA. Intact transferrin receptors in human plasma and their relation to erythropoiesis. *Blood* 75 : 102-107, 1990
  - 13) Skikne BS, Flowers CH, Cook JD. Serum transferrin receptor : A quantitative measure of tissue iron deficiency. *Blood* 75 : 1870-1876, 1990
  - 14) Baynes RD, Shih YJ, Hudson BG, Cook JD. Characterization of transferrin receptor released by K562 erythroleukemia cells. *Pro Soc Exp Biol Med* 197 : 416-423, 1991
  - 15) Lebman D, Trucco M, Bottero L, Lange B, Pessano S, Rovera G. A monoclonal antibody that detects expression of transferrin receptor in human erythroid precursor cells. *Blood* 59 : 671-678, 1982
  - 16) Derks JPA, Hofmans L, Bruning HW, Van Rood JJ. Molecular identification of the TCA alloantigen as the transferrin receptor on T-cells of a leukemic patient with serum from a monozygotic twin brother. *Cancer Res* 43 : 1914-1910, 1983
  - 17) Trowbridge IS. Immunoassay of serum transferrin receptors : Clinical implications. *J Lab Clin Med* 114 : 336-337, 1989
  - 18) Shih YJ, Baynes RD, Hudson BG, Flowers CH, Skikne BS, Cook JD. Serum transferrin receptor is a truncated form of tissue receptor. *J Biol Chem* 265 : 19077-19081, 1990
  - 19) Shih YJ, Baynes RD, Hudson BG, Cook JD. Characterization and quantitation of the circulating forms of serum transferrin receptor using domain-specific antibodies. *Blood* 81 : 234-238, 1993
  - 20) Turkewitz AP, Amatruda JF, Borhani D, Harrison SC, Schwartz AL. A high yield purification of the human transferrin receptor and properties of its major extracellular fragment. *J Biol Chem* 263 : 8318-8325, 1988
  - 21) Karin M, Mintz B. Receptor-mediated endocytosis of transferrin in developmentally totipotent mouse teratocarcinoma stem cells. *J Biol Chem* 256 : 3245-3252, 1980
  - 22) Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72 : 248-254, 1976
  - 23) Hames BD. Gel Electrophoresis of Proteins : A Practical Approach. In Hames BD and Rickwood D, eds. pp1-91, IRL Press, Oxford and Washington D.C., 1981
  - 24) Johnstone A, Thorpe R. Immunochemistry in Practice. 1st ed., pp29-30 Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1982
  - 25) Nakane PK, Kawaoi A. Peroxidase-labeled antibody : A new method of conjugation. *J Histochem Cytochem* 22 : 1084-1091, 1974
  - 26) Ecarot-Charrier B, Grey VL, Wilczynska A, Schulman HM. Reticulocyte membrane transferrin receptors. *Can J Biochem* 58 : 418-426, 1980
  - 27) Khler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256 : 495-497, 1975
  - 28) Fielding J, O'Shaughnessy MC, Brunstrom GM. Iron deficiency without anaemia. *Lancet* 2 : 9-12, 1965
  - 29) Cook JD, Lipschitz DA, Miles LEM, Finch CA. Serum ferritin as a measure of iron stores in normal subjects. *Am J Clin Nutr* 27 : 681-687, 1974
  - 30) Rudolph NS, Ohlsson-Wilhelm BM, Leary JF, Rowley PT. Regulation of K562 cell transferrin receptors by exogenous iron. *J Cell Physiol* 122 : 441-450, 1985
  - 31) Rouault T, Rao K, Harford J, Mattia E, Klausner RD. Hemin, chelatable iron, and the regulation of transferrin receptor biosynthesis. *J Biol Chem* 260 : 14862-14866, 1985
  - 32) Beguin Y, Huebers HA, Josephson B, Finch CA. Transferrin receptors in rat plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 85 :

637-640, 1988

- 33) Ferguson BJ, Skikne BS, Simpson KM, Baynes RD, Cook JD. Serum transferrin receptor distinguishes the anemia of chronic disease from iron deficiency anemia. *J Lab Clin Med* 19 : 385-390, 1992
- 34) Nikinmaa B, Enns CA, Tonik SE, Sussman HH, Schroder J. Monoclonal antibodies to a purified human transferrin receptor. *Scand J Immunol* 20 : 441-447, 1984
- 35) Trowbridge IS, Lopez F. Monoclonal antibody to transferrin receptor blocks transferrin binding and inhibits human tumor cell growth in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 79 : 1175-1179, 1982
- 36) Baynes RD, Shih YJ, Hudson BG, Cook JD. Production of the serum form of the transferrin receptor by a cell membrane-associated serine protease. *Pro Soc Exp Biol Med* 204 : 65-69, 1993