

615 系小鼠可移植性肝癌组织中不依赖于 cAMP 的蛋白激酶研究

林 晔 孙芝琳 刘宗定 蓝天鹤

(华西医科大学生物化学教研室, 成都)

提 要

作者对 H₆₁₅ (原发性) 和 H₂₂ (OAAT 诱发) 肝癌组织中不依赖于 cAMP 的蛋白激酶进行了研究, 发现当以内源性蛋白为底物时, H₆₁₅ 和 H₂₂ 组织中的酶活力分别是正常肝脏的 3.10 和 2.44 倍。以脱磷卵黄高磷蛋白和鱼精蛋白为底物时, 肿瘤组织的酶活力是正常肝脏的 1.5—4.45 倍。研究结果表明, 不依赖于 cAMP 的蛋白激酶活力升高与癌变和癌恶性状态的维持有密切联系。

对致癌基因编码蛋白的研究, 已证明许多种癌基因的表达产物具有不依赖于 cAMP 的酪氨酸蛋白激酶活性^[1]。根据致癌基因理论, 这类蛋白激酶活性升高, 造成细胞内蛋白质错时错量磷酸化, 是细胞发生转化的一个关键步骤^[2]。从 1980 年以来, 已见报道数种肿瘤细胞系和肿瘤组织中蛋白激酶活性有不同程度升高。如: 人成骨肉瘤细胞^[3]、结肠癌细胞^[4]、小鼠膀胱癌细胞^[5]、化学致癌剂诱发的大鼠肝癌组织^[6]、白血病等^[7]。但迄今为止, 尚未有关于小鼠原发性肝癌组织中蛋白激酶的研究报告。

本文对 615 系小鼠可移植性肝癌 H₆₁₅ (原发性)、H₂₂ (OAAT 诱发) 和正常肝组织中不依赖于 cAMP 的蛋白激酶进行了研究。这对于进一步了解癌变原理具有重要意义。

材 料 和 方 法

一、材料

1. γ -³²P ATP (比放射性: 5000ci/mM, 浓度 0.7~1.4mci/ml): 中国科学院原子能研究所; 蛋白质分子量标准品: Serva; 卵黄高磷蛋白: Sigma; 硫酸鱼精蛋白: 上海生物化学

制药厂; 脱磷卵黄高磷蛋白: 实验室自制。方法如下: 1% 卵黄高磷蛋白液加等体积 0.2% 碱性磷酸酶液 (pH10) 37℃ 水浴保温水解 5 小时, 沸水浴加热 20 分钟; 酪蛋白: 成都化学试剂厂, 因溶解度较差, 按 Ashby^[8] 的方法配成 6% 酪蛋白混悬液, 用 2N NaOH 调 pH 至 9.5, 煮沸 10 分钟, 5N HCl 调 pH 至 5.9, 离心, 取上清液, 测定蛋白质含量, 稀释至蛋白浓度为 0.5%。

2. 615 系小鼠: 体重 18~21 克, 由卫生部成都生物制品研究所和本室动物房提供。

3. H₆₁₅: 是 615 系小鼠原发性肝细胞性肝癌^[9], 由重庆医科大学病生教研室提供第 37 代瘤株。

4. H₂₂: 是邻位氨基偶氮甲苯 (OAAT) 诱发的肝癌^[10]。由四川省抗菌素工业研究所提供瘤株。

以上两种瘤株均采用 615 系小鼠, 作者自行转种, 用接种 60~70 天的 H₆₁₅ 和接种 5~9 天的 H₂₂ 实体型肝癌组织作为实验材料。

二、方法

1. 蛋白激酶的提取: 按照 Weber^[6] 和

Huang^[11] 的方法,将实验动物饥饿过夜,处死后迅速取出肝脏或肝癌组织,用预冷的缓冲液 A (10mM Tris·HCl pH6.75; 1mM β -巯基乙醇; 1mM PMSF; 0.5% (V/V) NP-40; 0.5% Triton X-100)浸洗,按 1:10(w/v)加入预冷的缓冲液 A 制成匀浆;匀浆液于 10000rpm, 0 ~ 4℃ 离心 20 分钟;取上清液测定蛋白质含量后,稀释至 5mg/ml,以备蛋白激酶活力测定。

蛋白质含量测定按 Lowry^[12] 法进行。

2. 蛋白激酶活力的测定: 按 Weber^[6] 的方法进行。反应液总体积为 25 μ l, 内含 10mM Tris·HCl pH6.8; 0.1mM β -巯基乙醇; 0.1mM EDTA; 0.2mM EGTA; 15mM MnCl₂; 1mM NaF; 0.2mM ATP; 2 μ ci γ -³²P ATP 及 5 μ l 酶液,于 30℃ 准确反应 1 分钟,冰浴冷却,取 Whatman 3 MM 滤纸片 (15 × 15mm) 两张,各加反应液 10 μ l,立即投入冷 10% TCA 中固定 15 分钟,5% TCA (含 5mM NaH₂PO₄; 5mM Na₄P₂O₇) 液洗涤 3 次,每次 5 分钟,无水乙醇脱水;80℃ 干燥后于液体闪烁计数仪上测量。酶活力以 30℃, 1nM P 掺入 1mg 酶蛋白/分钟表示之。

结 果

1. 内源性蛋白为底物时 H₆₁₅、H₂₂、正常肝组织中蛋白激酶活力变化

在以细胞内蛋白质为底物、无外加 cAMP 的条件下,分别测定了 H₆₁₅、H₂₂ 和正常肝组织中的蛋白激酶活力。发现 H₆₁₅、H₂₂ 两种肿瘤组织的蛋白激酶活力均高于正常肝组织,其中以 H₆₁₅ 的酶活力最高(表 1)。与正常肝相比, H₆₁₅

和 H₂₂ 的酶活力分别升高 2.1 和 1.4 倍。实验结果经 t 检验,表明两种肿瘤组织中不依赖于 cAMP 的蛋白激酶活力显著升高 ($P < 0.05$)。

2. 外源性蛋白底物存在时 H₆₁₅、H₂₂、正常肝组织中蛋白激酶活力变化

本实验选择了蛋白激酶活性测定中常用的卵黄高磷蛋白、脱磷卵黄高磷蛋白、鱼精蛋白和酪蛋白等四种底物,比较了这些底物存在时 H₆₁₅、H₂₂ 和正常肝组织中的蛋白激酶活力,实验结果如表 2 所示,有卵黄高磷蛋白和酪蛋白存在时,三种组织的蛋白激酶活力与无外加底物相比无明显变化;有脱磷卵黄高磷蛋白和鱼精蛋白存在时,肿瘤组织的蛋白激酶活力是无外加底物的 3.7~1.9 倍(图 1)。

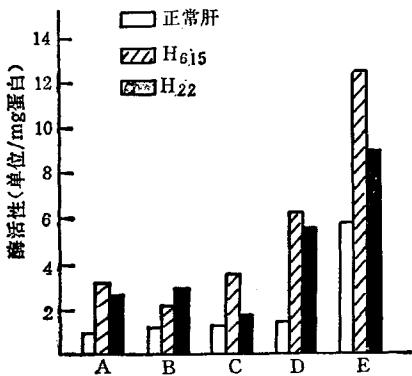


图 1 H₆₁₅、H₂₂ 和正常肝组织的蛋白激酶活性比较
所用的底物依次为:
A. 内源性蛋白质 B. 卵黄高磷蛋白 C. 酪蛋白
D. 鱼精蛋白 E. 脱磷卵黄高磷蛋白

有底物存在时,肿瘤组织与正常肝相比酶活力均有升高,其中,以鱼精蛋白为底物时, H₆₁₅ 和 H₂₂ 的酶活力上升倍数最大。

表 1 内源性蛋白为底物时蛋白激酶活性比较

组 织	酶活性(单位/mg 蛋白)						均 值	肿 瘤 正常肝
	1	2	3	4	5	6		
正 常 肝	0.60	0.65	0.96	1.00	1.18	1.92	1.05	—
H ₆₁₅	1.08	1.37	2.48	3.83	4.42	6.36	3.26	3.10
H ₂₂	1.16	1.35	1.80	2.50	5.37	5.16	2.56	2.44

反应总体积为 25 μ l, 含 1 μ g 样品蛋白质/ μ l 反应液

表2 外源性蛋白存在时蛋白激酶活性比较*

底 物	酶活性(单位/mg 蛋白)			H ₆₁₅ 正常肝	H ₂₂ 正常肝
	正 常 肝	H ₆₁₅	H ₂₂		
卵黄高磷蛋白	1.30	2.10	2.87	1.50	2.20
脱磷卵黄高磷蛋白	5.80	12.30	9.00	2.10	1.50
鱼精蛋白	1.38	6.13	5.67	4.45	4.10
酪 蛋 白	1.42	3.57	1.73	2.50	1.22

* 实验次数 $n = 3$ 。

反应液总体积为 25 μ l。含 1 μ g 样品蛋白质, 1 μ g 外源性蛋白质/ μ l 反应液。

讨 论

近年来的研究表明,癌变时癌基因被激活,这些癌基因编码的蛋白产物与细胞的表型变化有密切联系,迄今为止发现的癌基因产物中,有一类是酪氨酸蛋白激酶,这类蛋白激酶具有不依赖于 cAMP 的特性,主要分布于细胞质膜。文献[1,2]报道带有编码酪氨酸蛋白激酶的致癌基因病毒感染培养细胞,可引起细胞中酪氨酸蛋白激酶活性升高,并同时伴有细胞转化态出现,这提示研究不依赖于 cAMP 的蛋白激酶在癌变作用中的功能和机理是一个值得注意的方向。最近报道^[3]用化学致癌剂诱发大鼠肝癌过程中,不依赖于 cAMP 的蛋白激酶活力较正常肝升高 2~3 倍。在肝脏增生性结节组织中,磷酸化蛋白质的含量升高,而且还有新的磷蛋白出现^[4]。本研究发现原发性肝癌和化学致癌剂诱发的肝癌,经移植传代后不依赖于 cAMP 的蛋白激酶活力显著高于正常肝 ($P < 0.05$),与人类肝癌生物学性状极为相似的 H₆₁₅,其蛋白激酶活力升高倍数最大,这些结果表明不依赖于 cAMP 的蛋白激酶活性升高与癌变和癌恶性状态的维持有密切联系,而且很可能是人类肝癌的转化蛋白之一。

关于不依赖于 cAMP 的蛋白激酶在癌变中

的作用方式目前认为有两种:一是这类酶活性升高可能使细胞内某种磷蛋白的含量急剧升高,使细胞承载过多的、本来是起正常功能的正常蛋白质,从而诱发细胞癌变。二是这类酶可能使许多蛋白质磷酸化,从而直接影响其中每种蛋白的功能^[2]。本研究表明 H₆₁₅、H₂₂组织中的蛋白激酶对脱磷卵黄高磷蛋白、酪蛋白、鱼精蛋白等多种底物均有作用,提示第二种方式可能正确地描述了这类酶的作用。

参 考 文 献

- [1] Hunter, T.: *Sci. Am.*, **251**, 60, 1984.
- [2] Bishop, J. M.: *Sci. Am.*, **246**, 81, 1982.
- [3] Epstein, J.: et al.: *Biochim. Biophys. Acta.*, **676**, 68, 1981.
- [4] Subhas, G. et al.: *Cancer Res.*, **45**, 743, 1985.
- [5] Summerhayes, I. et al.: *Nature*, **284**, 462, 1980.
- [6] Weber, A. et al.: *Eur. J. Biochem.*, **130**, 447, 1983.
- [7] 凌义和等:《生物化学与生物物理进展》, (6), 32, 1985.
- [8] Ashby, C. D. et al.: *Methods in Enzymology*, **38**, 354, 1974.
- [9] 范维珂等:《肿瘤防治研究》, **9**, 130, 1982.
- [10] 马曾辰等:《国外医学肿瘤学分册》**3**, 13, 1982.
- [11] Huang, D. P. et al.: *Cancer Res.*, **44**, 2976, 1984.
- [12] Lowry, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 256, 1951.
- [13] Olson, M. O. et al.: *Cancer Res.*, **39**, 2096, 1979.
- [14] Sugioka, Y. et al.: *Cancer Res.*, **45**, 365, 1985.

[本文于 1987 年 2 月 16 日收到]