

小鼠再生肝、Hca 腹水型肝癌与正常肝 组织核内非组蛋白的电泳比较研究

张宗玉 曹西南 姜春霞*
王武康** 李晓莉 张迺衡

(北京医学院生化教研室)

核内非组蛋白蛋白质(简称 NHP)是一类极不均一的蛋白质,代谢上不稳定,转换率较快^[1]。有人认为 NHP 与基因表达的调控有关^[2],而癌变过程可能是基因表达的调控失常所致,因此当正常细胞转化为癌细胞时,NHP 会发生改变^[3]。据文献报道,某些分化旺盛的组织,其 NHP 亦会发生变化,那么,癌变过程中 NHP 的变化是否与组织增殖者相同。换言之,癌细胞中 NHP 的变化是特异的,还是非特异的,似有研究的必要。本文以小鼠 Hca 腹水型肝癌为模型,小鼠正常肝为本底,小鼠再生肝为对照,用十二烷基硫酸钠(SDS)聚丙烯酰胺凝胶电泳——等电聚焦双向电泳为手段,观察比较了三组 NHP 的异同。同时还作了三组 NHP 的氨基酸组成分析。现将所得结果作一简要报道。

一、材料与 方法

1. 动物模型 (1) 小鼠 Hca 腹水型肝癌 取体重 22 克左右的瑞士种雄性小鼠,无菌操作,腹内注射事先用生理盐水 1:1 稀释的小鼠 Hca 腹水型肝癌腹水液 0.2 毫升,一周后即形成 Hca 腹水型肝癌,禁食 16 小时后杀鼠取腹水。每批约 15 只,共四批。

(2) 小鼠再生肝^[4,5] 取体重 25—30 克正常雄性瑞士种小鼠,乙醚麻醉行无菌手术,切去肝正中叶及左侧叶,共切去原肝重 65—70%,

结扎、止血、缝合,存活率 20—60%。每批手术 40 只,共 6 批。手术后第四天杀鼠取肝,杀鼠前禁食 16 小时。再生肝约为原肝重的 70%。

(3) 正常小鼠 取体重 22—25 克正常雄性瑞士种小鼠,禁食 16 小时后杀鼠取肝。每批约 15 只,共四批。

2. 试剂 Biolyte pH3—10 (Bio-Red); 考马斯亮蓝 R₂₅₀ (Fluka); 脱氧核糖核酸(DNA) (上海东风试剂厂); 酵母核糖核酸(RNA) (Darmstadt); 牛血清清蛋白 (Mw. 68,000), 脱氧核糖核酸酶 I (DNaseI) (Mw. 31,000), 核糖核酸酶 (RNase) (Mw. 13,700), 糜蛋白酶元 (Mw. 25,700), 胃蛋白酶 (Mw. 35,000), 卵清蛋白 (Mw. 43,000) Serva 产品。

3. 分离细胞核以及酚抽提 NHP 基本按 Teng 氏法^[6]。

4. SDS 聚丙烯酰胺圆盘凝胶电泳^[7,8]

样品的预处理 取酚抽提的 NHP 用高浓度尿素溶液透析,将酚相变成水相后,取出样品溶液 2 毫升加等体积的样品配制液, (0.05M Tris-HCl 缓冲液(pH6.8)10ml 加 SDS 0.1g, β 巯基乙醇 0.2ml)混匀。沸水浴中加热 1—2 分钟,冷却后取出此样品混合液置透析袋中对样品配制液透析 16—24 小时,透析后用 Lowry 氏法测定样品混合液中蛋白质的含量。然后与下述

* 核工业部北京九所。 ** 遵义医学院生化教研组。

混合液混合,于 37℃ 保温 2—4 小时。透析后的样品液 2ml;甘油 0.5ml;巯基乙醇 0.25ml;溴酚蓝 (0.05%)0.25ml。

电泳 取清洁干燥玻管 (10.6 × 0.6cm)12 支,置于圆盘电泳仪上,每管灌 12% 的分离胶 (7.5cm 高),3.6% 浓缩胶 (1cm 高),每管的蛋白质上样量为 60μg, Tris-甘氨酸溶液作电极液。电泳开始时电流为 1mA/管,当溴酚蓝染料进入分离胶后,调整电流为 2mA/管,5 小时后当溴酚蓝前沿行至管底部 0.5cm 处即行终止。取出胶条在 12.5% 三氯醋酸溶液中固定过夜,然后用 0.25% 考马斯亮蓝液染色 6 小时,再在酸性乙醇漂洗液中漂洗至本底洁白为止。每组三批样品,每批样品为 15—20 只小鼠混合肝 NHP。

5. 等电聚焦——SDS 双向凝胶电泳 基本按 O'Farrell 氏法^[9],等电聚焦柱电泳为第一向,SDS 聚丙烯酰胺凝胶板电泳为第二向,具体操作步骤见另文^[10]。本实验所用的载体两性电介质为 pH3—10 的 Biolyte (Bio-Red),蛋白质上样量为 300μg/管。

6. 氨基酸分析 用酚抽提的三组 NHP 分别经 6N HCl, 110℃ 消化 23 小时,用日立 835-50 氨基酸自动分析仪测定氨基酸的组成。

二、结果与讨论

1. 核制品的纯度

从表 1 可知小鼠正常肝、Hca 腹水型肝癌和再生肝细胞核的 RNA 与 DNA 重量比分别为 0.11,0.23,0.25,组蛋白与 DNA 重量比分别为 1.01, 0.93, 1.08, 再生肝细胞核有关资料尚

表 1 三种肝细胞核中 RNA、DNA 组蛋白, 非组蛋白的重量比

	RNA:DNA	组蛋白:DNA	NHP:DNA
小鼠正常肝 细胞核	0.11(n=4)	1.01(n=4)	0.30(n=4)
Hca 腹水型 肝癌细胞核	0.23(n=4)	0.93(n=3)	0.53(n=3)
再生肝细胞核	0.25(n=5)	1.08(n=3)	0.83(n=3)

注:表内数值为平均值,括号内数字为实验次数。

未见报道,但正常肝细胞核与肝癌细胞核的结果与文献报道相符^[11,12]。核制品用台盼蓝染色在显微镜下可见圆形蓝色的核,可见我们制备的细胞核基本是纯的。

2 SDS 不连续圆盘凝胶电泳

用 SDS 不连续圆盘凝胶电泳可将三组 NHP 各分为 20 多条蛋白质区带。三组 NHP

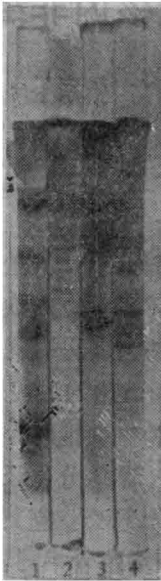


图 1 小鼠正常肝, Hca 腹水型肝癌与再生肝 NHP 的 SDS 凝胶电泳图比较

从左至右: 1. 标准蛋白 (牛血清蛋白 (M.w. 68,000) 卵清蛋白 M.w. 43,000, 脱氧核糖核酸酶 I (M.w. 31,000), 糜蛋白酶元 (M.w. 25,700), 核糖核酸酶 (M.w. 13,700) 2. 正常肝 NHP 3. Hca 腹水型肝癌 NHP 4. 再生肝 NHP

电泳胶条之间有差异,正常肝组与再生肝组差异较小,肝癌组与两者差异较大。再生肝组与正常肝组均具有表观分子量为 115,000, 102,000, 41,000 及 36,000 四条蛋白区带,而肝癌组缺失它。再生肝组具有表观分子量为 31,000 的一条特有蛋白区带,肝癌组具有表观分子量为 25,000 的一条特有蛋白区带。此外,余下蛋白区带也有量的差异,见图 1。

3. 等电聚焦——SDS 双向凝胶电泳

为了证实 SDS 单向凝胶电泳图象显示的三组的差异是否存在,我们进一步用分辨力更高的等电聚焦——SDS 双向凝胶电泳作了比较研究。结果每个电泳胶片上呈现 100 多个蛋白质多肽点^[13]。再生肝为 123 个点;肝癌为 124 个点;正常肝为 129 个点(见封 3 图 2)。这些蛋白质多肽点的近似等电点在 pH5.0—8.5, 表观分子量是 10,000—170,000。在三组 NHP 蛋白质多肽点中,1 号群点(等电点在 pH6.5—7.5, 表观分子量为 60,000—67,000), 2 号群点 (等电点在 pH7.5—8.5, 表观分子量为 55,000—70,000) 以

及3号群点(等电点在 pH7—8.5, 表观分子量为 30,000—35,000)为三组所共有,但也略有差异。4号点(等电点在 pH5.5, 表观分子量为 155,000)见于正常肝组及再生肝组。5号点(等电点在 pH4.8, 表观分子量为 127,000), 6号点(等电点在 pH6.7—7.3, 表观分子量为 48,000)以及7号点(等电点在 pH7.0—7.5, 表观分子量为 41,000)只见于再生肝组。8号点(等电点在 pH6.0, 表观分子量为 57,000)只见于肝癌组。

再生肝细胞不仅具有正常肝细胞的功能,还具有组织增殖的特性。如核内非组蛋白与基因调控有关,再生肝的 NHP 应与正常肝 NHP 不完全一致。本实验证明再生肝组与正常肝组的核内非组蛋白的电泳图基本相似,但再生肝又有其特有的 NHP 蛋白区带,是否这些区带确与组织增殖的调控有关,尚需进一步研究。

癌变时基因表达的调控失常,组织分化极不完全,恶性生长,其 NHP 有显著变化,肝癌细胞也不例外。本实验肝癌组的非组蛋白蛋白质电泳图与正常肝组有明显差异,它丢失了一些 NHP 带,增加了一些新的蛋白区带。如8号点,尚不能确定这一蛋白区带是否与癌变过程特异基因的表达有关。实验结果也证实患肝癌时 NHP 的变化,与肝再生时 NHP 的变化有显著差异。

SDS 不连续单向凝胶电泳与等电聚焦 SDS 双向凝胶电泳样品处理方法完全不同,前者的样品须在含 SDS 的溶液加热煮沸;而等电聚焦 SDS 双向凝胶电泳,因第一向是等电聚焦,样品中不含 SDS,不须经加热煮沸处理,因此二种方法的结果难以比较。

4. 核内非组蛋白蛋白质的氨基酸组成

我们对三种肝组织细胞核中 NHP 的氨基酸组成进行了比较研究(见表2)。结果表明除个别氨基酸含量有差异外,余者基本相似。三者酸性氨基酸如谷氨酸和天冬氨酸含量均高于碱性氨基酸如组氨酸,赖氨酸和精氨酸。三者的酸性氨基酸和碱性氨基酸的比值均大于

1^[14],但这一结果只反映三种肝细胞核内的所有酚溶的 NHP 的氨基酸组成。

表2 三种肝细胞核 NHP 的氨基酸组成

	正常小鼠肝 NHP (%)	小鼠再生肝 NHP (%)	肝癌细胞 NHP (%)
天门冬氨酸	10.5	10.0	10.4
苏氨酸	5.4	5.4	5.6
丝氨酸	7.3	6.8	7.1
谷氨酸	15.8	15.1	15.2
甘氨酸	10.7	9.0	10.1
丙氨酸	7.8	7.9	7.9
胱氨酸	0.2	0.5	0.4
缬氨酸	5.7	6.0	5.6
蛋氨酸	0.4	1.7	2.1
异亮氨酸	4.5	4.8	4.8
亮氨酸	9.5	9.9	9.1
酪氨酸	2.2	2.9	3.0
苯丙氨酸	4.0	4.1	3.0
赖氨酸	6.1	6.4	6.2
组氨酸	2.4	2.3	2.3
精氨酸	7.6	6.7	6.7

参 考 文 献

- [1] 张宗玉, 张迺衡: 《生理科学进展》, 3: 233, 1980。
- [2] 童坦君, 张昌颖: 《生物化学与生物物理进展》, 5: 40, 1978。
- [3] Baserga, R. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, 458, 109, 1976。
- [4] Hiqqins, G. M. et al.: *Arch. Pathol.*, 12, 186, 1931。
- [5] Martinez-Sales, V. et al.: *Cell Mol. Biol.*, 27 (2/3), 223, 1981。
- [6] Teng, C. S. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 40, 1231, 1970。
- [7] Laemmli, U. K.: *Nature*, 227: 680, 1970。
- [8] Chan, P. K. et al.: *J. Biochem. Molecular Aspects*, 183: 148, 1979。
- [9] O'Farrell, P. H.: *J. Biochem.*, 250: 4007, 1975。
- [10] 曹西南, 张迺衡, 张宗玉: 《北京医学院学报》, 15 (1, 增刊), 12, 1983。
- [11] Altman, P. L. (eds.): *Biology Data Book* (2nd ed.), Vol. 1, 1972。
- [12] Choie, D. D. et al.: *J. Neurochemistry*, 29, 811, 1977。
- [13] Mac' Gillvray, A. J. et al.: *Eur. J. Biochem.*, 41, 181, 1974。
- [14] Suria, D.: *Can. J. Biochem.*, 52, 1143, 1974。

【本文于1983年3月7日收到】

小鼠再生肝、HcA 腹水型肝癌与正常肝组织核内非组蛋白的电泳比较研究一文的图

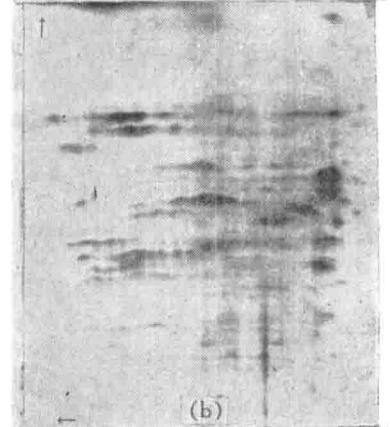
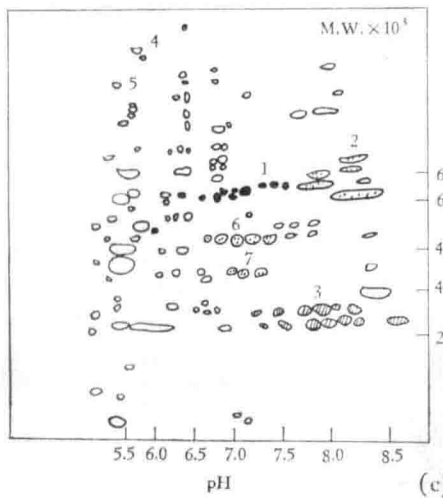
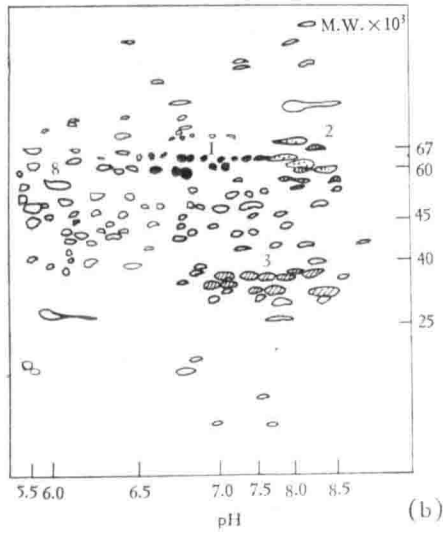
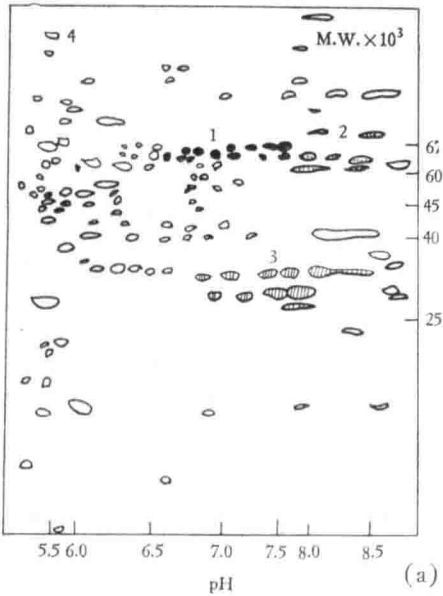


图2 小鼠正常肝 NHP (a)、HcA 腹水型肝癌 NHP (b)、再生肝 NHP (c) 双向电泳模式图(上)及照片(下)