

不同源性甲胎蛋白分子变异体的研究

许凯黎 顾马林

(上海市肿瘤研究所)

吕丽娜 徐惠群 于尔辛

(上海市第一医学院肿瘤医院)

近年来,随着蛋白质分离技术的发展和甲胎蛋白(AFP)分子结构的深入研究,已了解到AFP分子不均一性与分子表面电荷负载或蛋白质结合的各种基团特性相关。利用各种蛋白质分离技术可以测出不同数量的AFP分子变异体,现已报道人体或哺乳类动物各种组织或同一个体不同时期合成的AFP分子,无论其结构或糖基组成均存在差异^[1]。小鼠妊娠前期羊水中含有5种AFP分子,而后期只有一种,用刀豆球蛋白A(ConA)亲和电泳法分析人体AFP,发现妊娠早期羊水中AFP有与ConA非结合型和结合型二种,而后期仅以ConA结合型为主^[2]。我们也曾观察到肝癌、畸胎癌及肝硬化患者血清AFP分子变异体存在着差异^[4]。

本文用ConA亲和双向免疫电泳研究妊娠后期,CCl₄肝中毒及移植性肝癌大鼠中各种AFP分子变异体,以期阐明癌性及非癌性AFP分子结构及数量上的差异。

一、材料与方 法

1. 动物 健康Wistar纯系雄性大鼠(上海细胞生物所提供),体重120—150克,鼠龄2.5—3.5月。

2. 肝癌及肝中毒动物模型:

(1) 肝癌 移植性大鼠肝癌株(EBRH-2),由上海细胞生物所提供。在无菌条件下将瘤块制成匀浆,取0.1ml(相当于 2×10^6 肝癌细胞)接种于大鼠肝脏。

(2) 中毒肝 雄性大鼠腹腔内注入CCl₄(以1.0ml/kg体重计算)

3 标本 从妊娠14—18天的孕鼠,肝癌及中毒肝大鼠尾静脉取血,获得血清标本。

4 纯化及同位素标记 AFP 按Nishi方法^[5]纯化孕鼠羊水AFP。采用氯胺T法,用¹²⁵I(北京中科院原子能所产品)标记纯化AFP。

5 AFP 定量测定 用放射免疫电泳定量检测血清中AFP浓度。标准大鼠AFP由中科院上海药物所提供。

6 ConA 亲和放射双向免疫电泳 按前报道方法分析^[4]。凡血清中AFP总浓度大于1000ng/ml,双相电泳结束后用考马斯蓝R250显色。总浓度低于1000ng/ml时,第一相电泳需加入¹²⁵I-AFP,第二相电泳结束后,经生理盐水浸泡过夜,烘干后用 α 光胶片显影。

二、结果与讨论

AFP是一种典型的癌发育基因产物,在卵黄囊及胚肝细胞中合成,成熟肝细胞在癌变或再生时再次恢复合成,因而仅作定量测定不能判定肝细胞在胚胎发育及癌变各时期合成AFP分子结构上的差异。

本文从以下几个方面初步探讨肝细胞分化过程中不同时期所合成的AFP分子糖基化的变化。

1. CCl₄ 中毒肝血清 AFP 浓度的动态变化 肝细胞中毒时血清中AFP的浓度高于切除性肝细胞再生的10倍^[6],但只是在短暂的一段时间内升高。我们采用CCl₄腹腔注射大鼠,并动态追踪肝中毒大鼠血清AFP浓度的变化,以便选择高浓度非癌性AFP。实验结果表明:5只雄性大鼠CCl₄中毒后第二天,血清中AFP升高。第三天达高峰,第七天恢复到正常水平(图1)。此结果与文献一致^[7]。我们选用中毒后第三天大鼠血清,属急性肝中毒时,肝细胞再生性AFP。

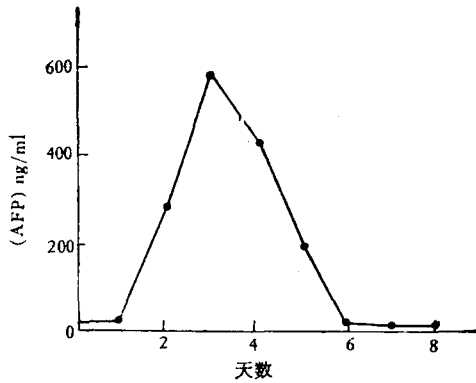


图1 四氯化碳中毒后大鼠血清 AFP 浓度变化曲线
(每点为 5 个大鼠 AFP 血清标本均值)

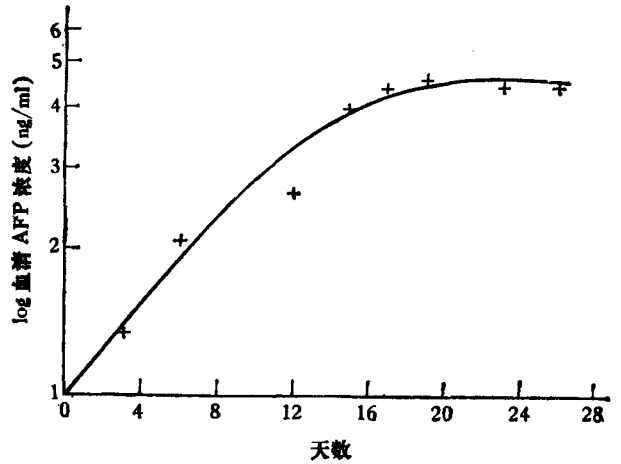


图2 大鼠肝内接种 BERH₂ 后,血清 AFP 浓度变化
(每点为 5 个大鼠血清 AFP 标本均值)

2. 移植性肝癌大鼠血清 AFP 浓度的变化

BERH-2 是一株能合成及分泌 AFP 的大鼠移植性癌,通常以瘤源植入腹腔内而传代。其肝癌细胞增殖与血清中 AFP 浓度动态变化呈平行关系^[8]。本文采用 0.1ml 肝癌组织匀浆(含 2×10^6 细胞)直接植入正常大鼠肝组织,在肝内生长并形成大小不一的瘤结节,后期带瘤大鼠可出现腹水甚至肺部转移。动态测定血清中 AFP 浓度,发现肿瘤移植后第 3—6 天血清 AFP 浓度开始升高,第 15—18 天达高峰。并维持高浓度水平。从图 2 可见从第 3 天至第 15 天,带瘤大鼠血清 AFP 浓度呈指数级递增,表明此时期为癌细胞增殖期。

据文献报道,肝细胞再生时往往在肝大面积切除后第 3—4 天,血清中出现 AFP 高峰,第 5—6 天后降至正常水平。在我们的实验中,当植入肿瘤后第 15—18 天,大鼠血清中的 AFP 才出现高峰,显然这是肝癌细胞合成的 AFP,而不是非癌性 AFP 的混入。

3. 非癌性与癌性 AFP 分子变异体比较研究

大鼠 AFP 因与 ConA 结合强弱不同而分为三种类型的分子变异体: ConA 结合型、ConA 弱结合型及 ConA 非结合型。胚肝发育前期小鼠 AFP 中非结合型占 50%,分娩后,血清中 AFP 主要是 ConA 结合型;这说明胚肝前期 AFP 主要由卵黄囊合成,而胚胎后期则由肝

细胞合成^[9]。Y. Tsuchid 等^[10]从人体畸胎癌移植于裸鼠后,裸鼠血清 AFP 中 ConA 非结合型可达 98%左右,而在畸胎癌患者中只占 50%左右。这说明不同来源的 AFP,可根据其与 ConA 结合的不同程度而区分出不同数量的 AFP 分子变异体。

本文分别选用肝中毒后第三天的大鼠血清、妊娠后期(14—18 天)孕鼠血清及移植性肝癌植入肝后第 10 天血清,作 ConA 亲和双向免疫电泳,表明不同来源 AFP 分子变异体之间的差异。

图 3(a,b 见封 2)为后期孕鼠血清与中毒肝血清 AFP 的电泳图谱,均有二种变异体分子。带瘤大鼠血清 AFP 的电泳图谱呈现三种变异体分子,由此可见,非癌性成熟肝细胞及胚肝细胞在增殖时所合成的 AFP 分子变异体数相同,而肝癌细胞合成的 AFP 分子变异体数多于前者,从变异体数可看出癌性及非癌性 AFP 分子水平上有明显差异。这与 Smith 等^[9]的结果相似。最近,我们在临床上也观察到与上述相似的结果,即人体非癌性肝病血清 AFP 与晚期妊娠孕妇血清均出现 ConA 结合型单峰,而大多数肝癌有 ConA 结合型及非结合型二种 AFP 分子变异体,非癌性 AFP 分子变异体数量少于癌性 AFP^[11]。

本文初步观察到不同来源 AFP 分子变异

体的差异,至于它们的生物学意义及细胞分化与 AFP 糖基化的改变有待进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] 许凯黎:《生物化学与生物物理进展》3, 218, 1984。
[2] Zimmerman, E. F., et al.: *Biochemistry*, 15, 5534, 1976。
[3] Mackiewicz, A., et al.: *Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 1, 251, 1980。
[4] 许凯黎等:《生物化学与生物物理进展》6, 30, 1982。
[5] Nishi, et al.: *BBA*, 278, 293, 1972。

- [6] Watanable, et al.: *Cancer Research*, 36, 2171, 1976。
[7] Smuckler, et al.: «*Onco-developmental gene expression*» (W. H. Fishman and S. Sell; eds.), 253, Acad. Press, N. Y. 1976。
[8] 强家模等:《实验生物学报》11, 1, 1978。
[9] Smith, C. J. et al.: *BBA*, 605, 1, 1980。
[10] Tsuchid, et al.: *Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 4, C53, 1983。
[11] Xu Kai. Li, et al.: *Chinese Medicine Journal*, 97 (7), 538, 1984。

[本文于 1984 年 5 月 17 日收到]

血卟啉衍生物加光对人红血球膜蛋白构象的影响

张绍斌 常金珍 王敖金 宋兰芳 陈玉玲

(中国科学院生物物理研究所北京)

大量资料表明,细胞质膜可能是光敏引起细胞死亡的临界靶结构之一^[1-4]。有的作者认为临界靶分子是膜上的蛋白质^[5],有的则认为膜上的靶事件是膜脂的过氧化^[5-6]。由此可见,为了揭示光敏的靶分子机理,必需进一步探讨膜脂和膜蛋白在光敏损伤中的地位。

血卟啉衍生物 (HPD) 除了能较多地滞留在癌细胞外,也能滞留在正常细胞膜中,它杀死正常细胞和癌细胞的靶分子机理是相似的。基于这一考虑,我们采用血影细胞为材料,观察了 HPD 对血影细胞的圆二色性的影响。

一、材料与方 法

1. HPD 北京制药工业研究所(钠盐 5mg/ml, 批号 831109)。新鲜人血堆积红血球:由北京红十字中心血站购进。一般化学试剂均为国产分析纯。

2. 血影细胞的制备 按 Steck 和 Kant^[7]法。将红血球以 5mM Na₃PO₄(pH8.0)-0.15 M NaCl 洗三次,以 40 倍体积的 5mM Na₃PO₄(pH 8.0) 低渗溶液,迅速搅匀,放置 10 分钟,以 3 × 10⁴g 离心 10 分钟,再以相同缓冲液洗三次,所得红细胞膜(血影细胞)为乳白色。

3. 加 HPD 保温与照光 将血影细胞用

5mM Na₃PO₄(pH7.6) 稀释到 100μg 蛋白/ml。取适量在暗处加 HPD 到 50μg/ml 的浓度,在 25°C 恒温水浴避光保温 20 分钟,然后用自行设计的光源照光(400W 溴钨灯,630nm 截止滤光片产生红光,并加 4cm 厚的水层,滤去产热的红外线)。样品盛在 25ml 烧杯中,上盖表面皿,下有电磁搅拌器中速搅拌,红光自水平方向射入,光源距样品 60cm。

4. 圆二色 (CD) 谱测定 将光敏的血影细胞稀释到 15μg 蛋白/ml,立即(或放在暗处 2-3 小时)在 Mark III 型圆二色仪上测远紫外 CD 谱。测试条件是:灵敏度 10 × 10⁻⁶ΔA/mm,光径为 1cm 的比色杯,波长 200-260nm,取波长 225,219 和 210nm 用三点法^[8]估算 α 螺旋含量。蛋白质氨基酸残基平均分子量按 110^[9] 计。

5. 以 Lowry 法^[10]测定蛋白质含量,标准蛋白为牛血清白蛋白。

二、结 果

一、图 1 是正常对照血影细胞的圆二色谱,它具有典型的双负峰(222nm 和 208nm),和文献报道的一致。用三点法计算的 α-螺旋含量约为 42%。

不加 HPD 照光 20 分钟或者加 HPD (50

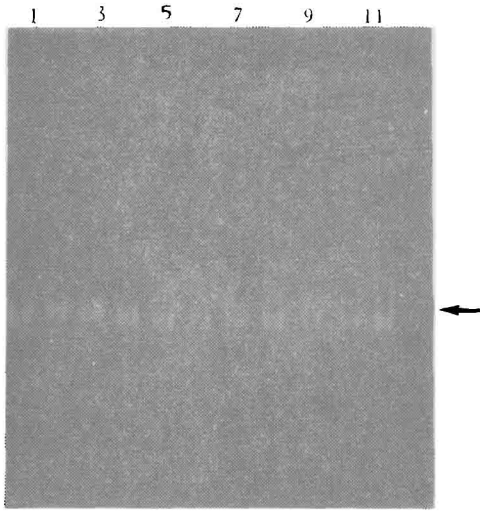


图 1 自无色菌落中提取的单链 DNA 电泳图
 2% 琼脂糖凝胶电泳；→ 示二甲苯蓝 (MG) 染料位置；
 10, 11 为对照。

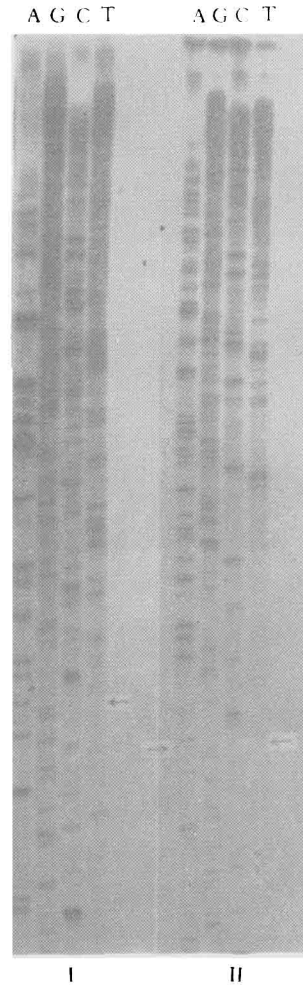


图 2 测序自显影图谱
 → 示插入位点，—GATC 上方为插入片段顺序，I, II 为同一片段不同方向克隆的结果

许凯黎等：“不同源性甲胎蛋白分子变异体的研究”一文的图 3



图 3 大鼠不同源性血清 AFP 变异体之 ConA 亲和双相免疫电泳图谱
 a. 孕鼠 b. 四氯化碳中毒 c. 移植性肝癌