

小鼠腹水型肝癌中蛋白激酶 C 的研究及硒对该酶的调节作用

陈焕朝 黄佳康 魏长利 于树玉

(中国医学科学院肿瘤研究所,北京)

关键词 硒,蛋白激酶 C,小鼠肝癌,生长抑制

蛋白激酶 C(PKC) 是一种依赖于磷脂和 Ca^{2+} 的蛋白激酶,在生物界中广泛存在,并分布在哺乳动物的各种组织中。在信号传导过程中,磷脂肌醇系统最终以活化 PKC 和 Ca^{2+} 动员的方式完成胞外信息的传递。由于磷脂肌醇系统介导的胞外信号之广,因而 PKC 与诸如受体的增效和脱敏等生理过程以及细胞分化增殖,细胞癌变的调控等重要事件密切相关。另外有报道指出,对 PKC 有抑制作用的化合物,很可能是有效的抗癌药物。过去我们曾报道^[1,2],人体必需微量元素硒对肿瘤细胞有促进分化、抑制分裂的双向调节作用;在化学致癌过程中,硒可拮抗致癌物引起的许多生化改变,对始发及促进阶段皆有阻抑作用,并可调节肿瘤中 *c-myc* 等癌基因的表达。本研究报道了小鼠腹水型肝癌(HepA)腹水瘤细胞可溶性部分的 PKC 活性,以及硒对正常肝、瘤细胞中 PKC 的影响。

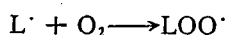
正常的昆明种小鼠常规接种腹水型肝癌,接种三天后, *i. p.* 注射亚硒酸钠 (Na_2SeO_3)·1mg/kg,连续四次,至第七天处死动物,取出腹水,离心洗涤,以 Tris 缓冲液匀浆后,4℃超速离心(105 000g 1h),上清部分过 DEAE-Sephacel(0.5ml) 柱,以含不同浓度 NaCl 之缓冲液洗脱,收集 0.1mol/L NaCl 缓冲液下的洗脱峰,取得部分纯化的 PKC,用作酶活性测定。正常小鼠肝及给药后的正常小鼠肝依同法处理。测定 PKC 活性以混合磷脂和 TPA 为激活剂, Histone Type-3 为底物,以 γ -³²P ATP (Amersham) (> 10Ci/mmol) 转移至底物的 ³²P 量表示酶活,反应总体积 250 μ l, 30℃保温 5 分钟。以 5% TCA 终止反应,负压抽滤

法将标记有 ³²P 的底物蛋白转移至滤纸膜片上,液闪计数。结果表明, HepA 中 PKC 活性较高,平均达到 363pmol/mg·min,正常小鼠肝 PKC 活性为 194pmol/mg·min,肿瘤中酶活性比正常高 87%。在本实验条件下,硒能够明显地抑制肿瘤细胞的生长增殖,给硒以后,腹水瘤细胞总数从 1.21×10^9 降至 2.8×10^8 ,为给药前的 23.1%; 细胞密度则从 2.67×10^8 (cells/ml) 下降到 4.3×10^7 ,是给药前的 16.1% ($P < 0.001$),荷瘤小鼠寿命也有所延长。同时,肿瘤细胞中 PKC 的活性明显受到抑制,为 217 pmol/mg·min,与正常肝中酶活性接近。正常小鼠肝在给药以后,其活性为 223pmol/mg·min,与给药前无显著变化(每组结果来源于 5 只小鼠)。PKC 在肿瘤中高表达的活性与一些癌基因的表达关系密切,在 DA31 细胞(二甲苯转化的 A31 细胞)中,*c-myc* 的高表达就受到 PKC 和 PKA(依赖于 cAMP 的蛋白激酶)的协调控制,它们受到抑制后,*c-myc* mRNA 可降至静止的 A31 细胞水平^[3]。本实验还对来源于小鼠脑组织的 PKC 粗提液在体外实验中硒对 PKC 的影响进行了研究,结果发现,硒可以抑制酶的活性,并随硒浓度(1 μ g/ml 到 10 μ g/ml) 增加而增强,呈剂量效应关系,说明硒化合物在酶的活化过程中可能有抑制作用。我们过去的实验表明^[4],硒对 *c-myc* 基因表达及 PKA-I 型同功酶皆有调控作用。已知在正常状态下,从细胞可溶性部分获取的 PKC 是以无活性形式存在的。当细胞受到信号刺激后,该酶转移至膜上,与磷脂结合被活化,发挥促进细胞

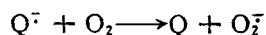
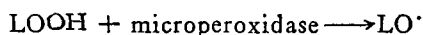
(下转第144页)

讨 论

CuOOH 为一含过氧键的化合物,其结构中的过氧键可发生均裂而形成羟自由基和异丙苯自由基,这两种自由基可引起不饱和脂肪酸及胆固醇的自由基链反应,从而形成各种脂质及胆固醇的过氧化物:



样品中的脂质过氧化物经 HPLC 柱而被分离,脂质过氧化物在柱后反应中与发光液中的微过氧化物酶及鲁米诺作用产生化学发光而被检测。脂质过氧化物发光反应的机理^[3] 简示如下



CL-HPLC 结合了化学发光的高灵敏性和高效液相色谱的高分辨性,因而具有很高的灵敏度和分离鉴定各种脂质过氧化物的特点。因为目前应用于测定脂质过氧化的方法中,一般测定的只是不饱和脂肪酸氧化总的结果,不能鉴定每一个脂肪酸氧化的量,也不能检测胆固醇过氧化物的存在。应用 CL-HPLC 法,就可以研究不同的脂质对自由基反应的敏感性。图 1, 图 2 的结果说明红细胞膜及血浆中的亚油酸及胆固醇对自由基反应极为敏感。胆固醇是

生物膜的重要组成成分,它对于维持膜的稳定性起重要作用,研究胆固醇在生物膜内的自由基反应和胆固醇过氧化物对膜结构及功能的影响将有助于阐明某些疾病如动脉粥样硬化的发病机理^[7]。

CL-HPLC 法可以分离鉴定不同种类的脂质过氧化物,因此,就可应用此法检测抗氧化剂保护膜脂质免受氧化损伤的能力并对其抗氧化机理进行研究。根据过去的实验,麦芽醇为有效的抗氧化剂^[8],但不知其保护膜脂质的哪一个成分,图 3 表明它不能和 CuOOH 直接作用,但它能阻断 CuOOH 引发的自由基链反应,从而保护膜脂质免遭氧化损伤。

CL-HPLC 法有很高的灵敏度及分离鉴定各种脂质过氧化物的能力,可用于不同脂质对自由基反应的敏感性,脂质过氧化反应和抗氧化剂作用机理研究。随着实验条件的改进,CL-HPLC 法可望用于生物样品中脂质过氧化物的直接测定。

参 考 文 献

- 1 陈翠等. 中华医学杂志, 1985; 65(11):730
- 2 Yamamoto Y *et al.* *Biochem Biophys Acta*, 1985; 819: 29
- 3 Yamamoto Y *et al.* *Anal Biochem*, 1987; 160: 7
- 4 Teruo Miyazawa *et al.* *J Biochem*, 1988; 103: 744
- 5 Dodge J T *et al.* *Arch Biochem Biophys*, 1963; 100: 119
- 6 Rose H G. *J Lipid Res*, 1965; 6: 428
- 7 夏光焯. 生理科学进展, 1988; 19(1): 23
- 8 黄芬等. 科学通报, (待发表)

[本文于 1988 年 12 月 8 日收到]

(上接第 140 页)

增殖的效应。综合上述结果,可以认为,硒的抗癌作用与调节蛋白激酶系统有关,它在其中直接或间接地发挥了重要作用,其进一步的作用机制以及信号传导系统和 PKC 在肿瘤癌变中

的作用,正在研究中。

本工作曾得到于秉治副教授的帮助,特此志谢。

[本文于 1989 年 10 月 6 日收到]