

肾脏 γ 谷氨酰转肽酶的纯化、生化性质及免疫组织化学研究

张迺哲 边立军 付宏杰 孙雅贤 刘志宏

(河北省医学科学院实验医学研究所, 石家庄 050021)

提 要

用 Triton X100 提取、菠萝蛋白酶处理、硫酸铵沉淀、DEAE Cellulose 52 离子交换柱层析及 Sephadex G150 凝胶柱层析, 从人正常肾脏、大鼠肾脏成功地制备了 γ 谷氨酰转肽酶 (γ -GT), 其纯化倍数为 713.5, 比活性 264U/mg 蛋白, 达到了匀质化纯度。用此酶作抗原免疫家兔得到了高效价兔抗人、兔抗鼠 γ -GT 抗血清, 再纯化制成相应的 γ -GTIgG, 检查其纯度和特异性均给出满意的结果。在此基础上又建立了免疫化学、免疫组织化学的研究方法, 并用于实验性肝癌的研究中。

关键词 γ 谷氨酰转肽酶, 动力学性质, 抗血清制备, 免疫组织化学, 肿瘤标志

γ 谷氨酰转肽酶 (γ -GT) 是广泛分布于哺乳动物组织, 催化谷胱甘肽分解的起始酶, 对于氨基酸的转运起着重要作用。近年来人们的注意力逐渐集中到该酶与原发性和化学致癌剂诱导的肝癌发病关系上, 许多肿瘤学者已把它视为肝癌诊断的标志酶^[1]。国外有报道^[2]已从许多正常组织及肝癌组织中制备出高纯度的 γ -GT 制品。我们参照有关方法, 结合本实验室条件成功地建成了人肾脏、大鼠肾脏 γ -GT 纯化制备方法, 并将自制的纯酶作抗原免疫家兔, 得到了满意的兔抗人、兔抗鼠 γ -GT IgG, 进行了实验性肝癌的免疫组化研究工作, 现报道如下:

材 料 和 方 法

标本 人正常肾脏从尸检中得到, 标本取出后立即置 -30°C 冰箱保存。鼠肾来自 Wistar 成年大鼠, 断头处死后迅速剖取肾脏置 -30°C 冰箱备用。实验性肝癌模型制作采用 Wistar 大鼠, 免疫动物为日本大耳白雄性家兔, 体重 2.0—2.5kg。

试剂 L- γ -谷氨酰对位硝基酰替苯胺、菠

萝蛋白酶, Triton X100, DEAE Cellulose 52, α 巯基乙醇、Sephadex G150 及马尿酸盐均为 Sigma 公司产品, 其余为市售国产分析纯试剂。

γ -GT 活性测定 按 Yokosawa 等^[3]的方法, 底物为 18mmol/L γ -谷氨酰对位硝基酰替苯胺和 10 mmol/L 甘氨酸酰替甘氨酸, 在岛津 UV-260 分光光度计上 30°C 保温, 记录 405nm 波长时对硝基酰替苯胺的释放速率。活性单位 (U) 以每分钟释放的对硝基酰替苯胺的 $\mu\text{mol/L}$ 表示。蛋白质测定按 Lowry 等方法。

γ -GT 分离及纯化 采用 Yokosawa 等^[3]的方法, 肾脏组织 50g 用 4 倍体积 10mmol/L Tris-HCl pH8.0 含 0.15mol/L NaCl 的缓冲液制成匀浆, 经 Triton X100 提取, 菠萝蛋白酶处理、硫酸铵沉淀, DEAE Cellulose 52 离子交换柱层析(两次), 收集活性峰部分、透析、冻干后备用, 上述全部操作均在 4°C 进行。

γ -GT 抑制实验 按已报告的^[4]实验方法进行。

SDS-PAGE 亚基分子量测定 采用 Klaus Weber 等方法。蛋白标准物系中国科学院上海生物化学研究所东风化学试剂厂生产的

表1 大鼠肾脏 γ -GT 纯化

步 骤	蛋白 (mg)	活 性 (U)	特异活性 (U/mg)	纯化倍数	产量(%)
1. 匀浆	6732.5	2518.5	0.37	1	100
2. Triton X100 提取	2239.1	2410.9	1.08	2.91	95.7
3. 丙酮沉淀和脱氧胆酸提取	329.3	1549.3	4.7	12.7	61.5
4. 菠萝蛋白酶消化和硫酸铵盐析	159.9	1482.7	9.27	25.1	58.9
5. DEAE Cellulose 52 柱层析	55.2	1480.9	26.8	72.5	58.8
6. Sephadex G150 柱层析(第一次)	7.4	902.3	121.9	329.5	35.8
7. Sephadex G150 柱层析(第二次)	2.2	580.8	264	713.5	23.1

低分子量标准蛋白,用 0.01% Coomassie brilliant blue 250 染色,标准蛋白相对迁移率与分子量的对数成线性关系。

血清免疫 IgG 的纯化制备 用自制的人肾脏及大鼠肾脏 γ -GT 为抗原,与等体积的福氏完全佐剂进行充分乳化反应,待呈乳糜状时,注入家兔两侧腹股沟淋巴结,两周后将抗原量减半进行耳静脉加强免疫,隔周一次共进行五次,于最后一次注射后的一周内颈动脉放血,收集抗血清再用 A. Nowothy^[9]的方法,将抗血清经硫酸铵沉淀,离心、透析后在 DEAE Cellulose 52 层析柱上进行梯度分离,收集第一个蛋白峰部分,进行冷冻干燥后备用。

免疫双扩散分析及免疫电泳分析按一般常规方法进行,免疫抑制实验按已报告的^[4]方法进行。

γ -GT 免疫组织化学研究 采用 Catherine 等^[6]方法进行。取大鼠肝癌组织及正常肝组织,用苦味酸、多聚甲醛、戊二醛固定,低温石蜡包埋,切片厚 $4\mu\text{m}$,家兔抗大鼠 γ -GT IgG(1:25600 倍稀释),与自制的免疫胶体金进行免疫金银法(IGSS)染色,同时与 H.E 染色相对照,光镜下观察。

结果与讨论

1. 大鼠肾脏 γ -GT 纯化 结果见表 1

2. 亚基分子量 纯化后的大鼠肾脏 γ -GT 经 SDS-PAGE 测定,仅显示由两个不同亚基组成的二聚体,而不包括其它的蛋白质(考马氏亮

蓝染色)(图 1),通过标准曲线计算出大小两个亚基的分子量分别为 57000 和 23000。

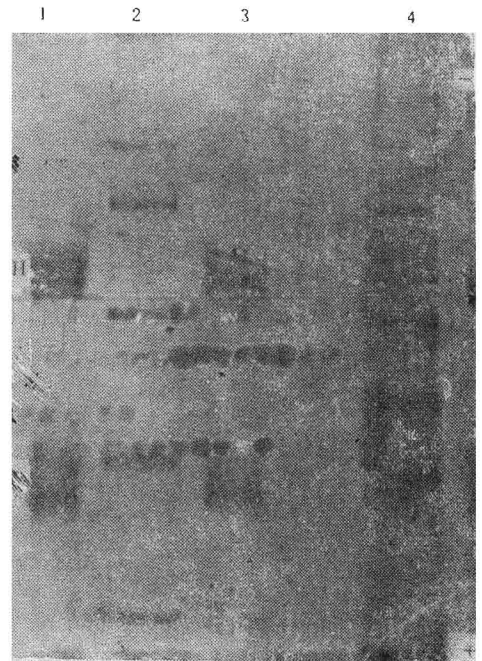


图1 大鼠肾脏 γ -GT 制品的 SDS-PAGE 亚基分布
1,3: 大鼠肾脏纯制备物; 2: 标准蛋白(五种混合物);
4: 大鼠肾脏匀浆

H 为大亚基; L 为小亚基

3. γ -GT 纯制备物某些性质的鉴定

pH 活性曲线: 用不同 pH 的 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液 pH5—10 进行 γ -GT 酶活性测定(图 2),表明转肽反应最适 pH 为 8.0。

K_m 值: 当改变 γ -谷氨酰对位硝基酰替苯胺和甘氨酸酰替甘氨酸的浓度时,从 Line Wea-

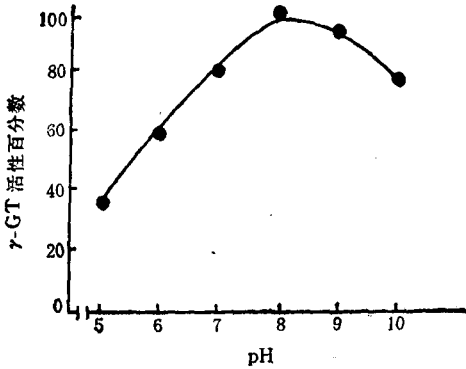


图2 pH对 γ -GT转肽反应的影响

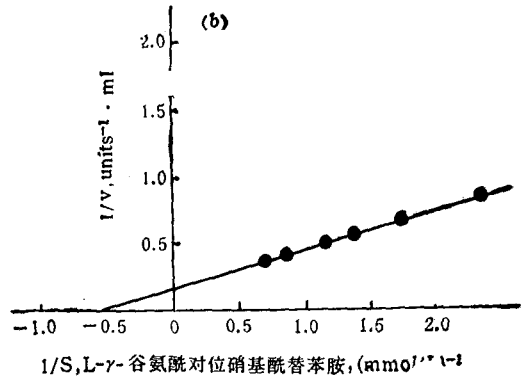
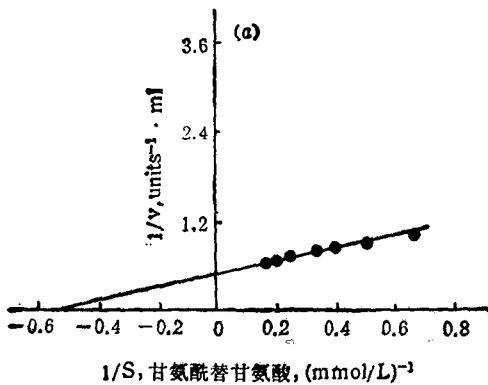


图3 大鼠肾脏 γ -GT底物的 K_m 值

(a) 改变底物甘氨酸甘氨酸浓度时 K_m 值 (b) 改变底物 γ -谷氨酰对位硝基酰基苯胺浓度时 K_m 值

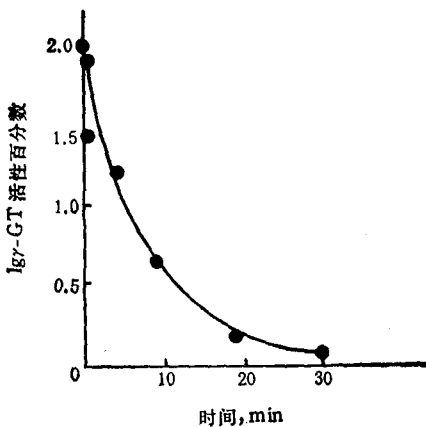


图4 γ -GT热稳定曲线

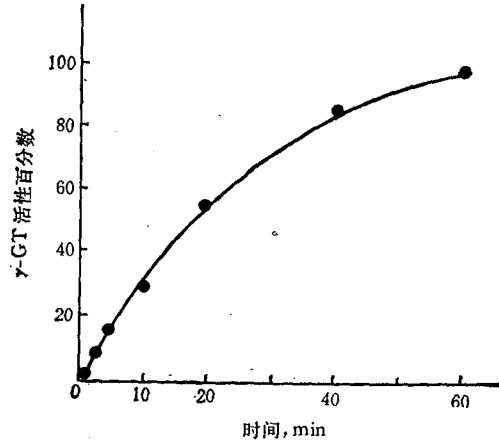


图5 γ -GT活性时间发展曲线

ver-Burk 作图中求得其 K_m 值分别为 2.08×10^{-3} mol/L和 1.8×10^{-3} mol/L(图3a,3b)。

热稳定曲线: 在0.1mol/L Tris-HCl pH 8.0的缓冲液中,加入定量酶溶液于60℃保温不同时间后,终止反应立即进行 γ -GT活性测定。发现 γ -GT对热不稳定,60℃保温5min后活性迅速丢失,当保温10min后其活性几乎丢失95%(图4)。

γ -GT活性时间发展曲线: 测定30℃保温60min内 γ -GT活性发展情况,可看到保温开始10min内活性上升的速率最快(图5),以后则缓慢上升。

马尿酸盐对 γ -GT活性的抑制: 马尿酸盐是内源性苯丙氨酸的代谢产物,是 γ -GT不

可逆的抑制剂,其作用部位相似于顺丁烯二酸,均作用于 γ -GT的半胱氨酰甘氨酸位点,

5mmol/L马尿酸盐与 γ -GT酶制品保温后, γ -GT活性即受到明显抑制,其残留活性为78.9%。

4 γ -GT IgG 纯度和特异性鉴定 应用双重扩散分析法;家兔抗大鼠肾脏 γ -GT IgG与纯化的 γ -GT之间可得到单一的沉淀线(图6),通过免疫电泳分析只出现一条沉淀带(图7)。上述实验如用非特异性IgG代替时,则无沉淀反应出现。

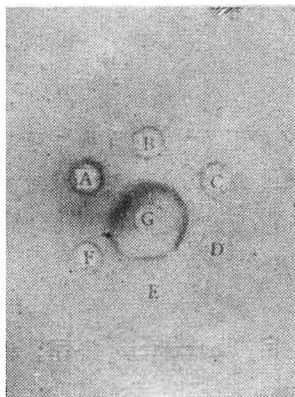


图6 γ -GT 免疫双重扩散分析

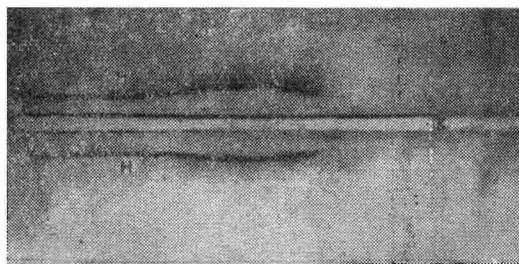


图7 γ -GT 免疫电泳分析

γ -GT 免疫抑制曲线: 随着 γ -GT IgG量的增加(0.7—12.0 μ g)对纯化的 γ -GT抑制作用逐渐增大,几乎可达95%,但非特异性IgG的量即使增加到12 μ g对 γ -GT活性亦无影响(图8)。

5. γ -GT 免疫组化研究 实验性肝癌大鼠肝切片经免疫胶体金(IGSS)染色发现癌细胞浆内和胞膜上有大量的 γ -GT阳性黑色颗粒,并以核周为多,肝硬化结节中 γ -GT阳性颗粒较肝癌细胞内明显减少,随着肝细胞癌变过程的进展 γ -GT阳性颗粒有逐渐增多的趋势。正常对照组胆管细胞有较少的 γ -GT阳性颗粒,而肝细胞则呈阴性。IGSS染色与H. E

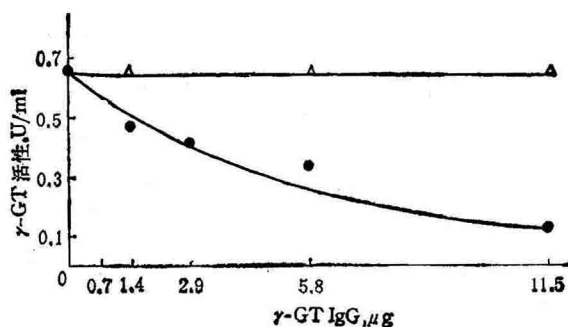


图8 γ -GT 免疫抑制曲线

染色相比有较高的特异性和敏感度,在细胞癌变的早期即可检出 γ -GT阳性颗粒(图略)。

原发性肝癌包括肝细胞性肝癌和胆管性肝癌。甲胎蛋白的产生只见于肝细胞性肝癌,且在早期肝癌时阳性率较低,上海医科大学附属中山医院报道,琼脂扩散法在早期肝癌患者中阳性率只有21.9%^[8],而 γ -GT活性不论是肝细胞性肝癌或是胆管性肝癌均明显升高,表明组织癌变过程中合成 γ -GT的胎儿基因被激活^[9],为提高早期肝癌的诊断率,我们从分离制备 γ -GT入手,经一系列步骤最终纯化为713.5倍,比活性达264U/mg蛋白质,鉴定其纯度基本达到匀质化。通过某些性质的研究与文献报道基本一致^[3,7],得到了比较满意的结果。是目前国内外省去免疫亲和层析步骤,纯化 γ -GT比较简化的理想方法。利用该纯酶作抗原免疫家兔已制备出兔抗人、兔抗鼠 γ -GT IgG,经鉴定表明该抗体有满意的纯度和特异性,在此基础上我们建立了可与放免分析相媲美的酶联免疫吸附分析法(ELISA)(见另篇报道),开展了免疫组织化学研究,观察癌变细胞中 γ -GT的位置及其分布情况,通过对实验性肝癌大鼠 γ -GT免疫组化研究发现, γ -GT阳性颗粒的出现与肝细胞癌变程度成正相关,且在细胞癌变的早期即可检出与国外组织化学方法所得结果相一致^[10],但较组化方法有较高的特异性和敏感度,对肝癌的早期诊断有重要意义。

参 考 文 献

- 1 Naoyuki Taniguchi et al. Cancer Research, 1985; 45:

(下转第158页)

表1 锦橙果实的腐烂率、呼吸强度和果汁的酸度及其电阻的部分测量数据¹⁾

处理方式	测量日期 (月,日)	腐烂率 (%)	呼吸强度 $n=5$ (mg/kg·h)	P	酸 度 $n=6$ (g/100ml)	P	电 阻 $n=10$ (kΩ)	P
紫外照射 40 min	12,29	22	21.056±0.015	<0.001	1.51±0.02	<0.015	5.238±0.095	<0.020
	1,21		14.306±0.015	<0.001	1.24±0.04	<0.025	5.327±0.015	<0.005
	3,17		15.490±0.008	<0.001	0.90±0.02	<0.025	6.115±0.231	<0.040
每月紫 外照射 40 min	12,29	20	23.763±0.012	<0.001	1.35±0.02	<0.015	5.145±0.283	<0.055
	1,21		18.528±0.015	<0.001	1.20±0.03	<0.025	5.264±0.490	<0.080
	3,17		18.120±0.018	<0.001	0.90±0.01	<0.015	6.418±0.472	<0.070
紫外照射 60 min	12,29	18	20.477±0.015	<0.001	1.47±0.01	<0.010	5.238±0.095	<0.020
	1,21		13.014±0.018	<0.002	1.20±0.02	<0.020	5.513±0.150	<0.005
	3,17		13.990±0.021	<0.002	1.03±0.02	<0.020	5.875±0.086	<0.015
每月紫 外照射 60 min	12,29	30	22.805±0.015	<0.001	1.34±0.02	<0.015	5.155±0.012	<0.005
	1,21		17.837±0.023	<0.002	1.20±0.03	<0.025	5.412±0.084	<0.015
	3,17		18.550±0.018	<0.001	0.83±0.02	<0.025	6.353±0.282	<0.045

1) 果实的腐烂率、呼吸强度和果汁的酸度等数据是由中国农科院柑桔研究所测定。

果汁的电阻的部分测量数据。由测量数据作出的电阻随酸度和电阻随时间(t)的变化曲线如图2和图3所示。

结 论

1. 柑桔电阻随酸度增大而减小,几乎成反比关系,变化情况主要决定于品种;锦橙的变化小于温州蜜柑。
2. 电阻随贮藏时间增大而增大。在对所述两个品种的九种处理中,以紫外照射锦橙 60min 的电阻增加得最慢:贮藏三个月后,电阻只增加 12.2%,其它情况的电阻变化远大于此值。
3. 紫外线照射锦橙,能延长贮藏时间,降低呼吸强度,延缓果汁酸度下降。所述九种处理中,以紫外照射锦橙 60min 效果最佳:贮藏 176 天,腐烂率为 18%,酸度只降低 29.9%,呼吸强度降低 23%;而比较果的腐烂率为 45%,酸度降低 74%,呼吸强度降低 5.1%。

[本文于 1989 年 11 月 20 日收到,1990 年 3 月 20 日修回]

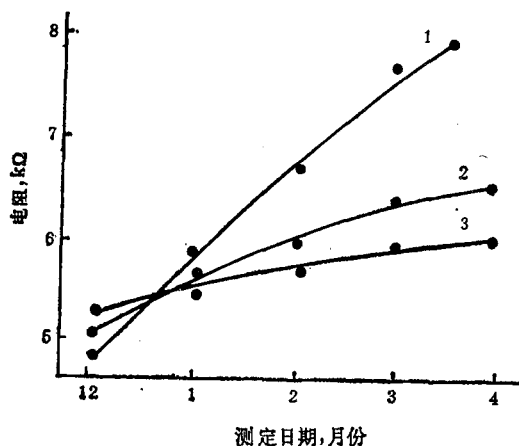


图3 电阻随时间的变化曲线

1.蜜柑 60min 2.锦橙 2,4-D + 60min 3.锦橙 60min

(上接第 145 页)

5835

2. K. Yamashita *et al.* *Cancer Research*, 1983; 43: 5059
3. N. Yokosawa *et al.* *Oncodev Biol Med*, 1981; 2: 165
4. 张迺哲等. 含硫アミノ酸別刷, 1985; 8(1): 159
5. A. Nowotny. *Basic Exercises in Immunochemistry*, New York Springer-Verlag 1979: 8—10
6. M. Catherine *et al.* *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 1985; 33(12): 1247

7 Alton Meister *et al.* *Methods in Enzymology*, 1981; 77: 237

8 黄济群. 甲胎蛋白与肝癌. 广东: 广东科技出版社, 1985; 27

9 N. Taniguchi *et al.* *Jour Nat Cancer Inst*, 1985; 75(5): 842

[本文于 1990 年 2 月 20 日收到, 7 月 3 日修回]