

Antagonistic Effect of Benzyloisoquine Compound D₂₀ on CaM Activating Phosphodiesterase

Zhang Yuan Hu Zhuoyi Zhao Ye

(China Pharmaceutical University, division of biochemistry, Nanjing 210009)

Cai Huimin

(China Pharmaceutical University, Division of medicinal chemistry)

ABSTRACT

Synthetic benzyloisoquine compound D₂₀ exhibits stronger inhibition on CaM-activated phosphodiesterase than TFP. $IC_{50} = 5 \mu\text{mol/L}$. Fluorescence analysis indicates that the association constant (K_a) for the interaction between CaM and compound D₂₀ is $2.64 (\mu\text{mol/L})^{-1}$ and compound D₂₀ molecule possesses 2 binding sites for CaM. Binding style is discussed.

Key words calmodulin (CaM), phosphodiesterase (PDE), antagonist, benzyloisoquine compound D₂₀, scatchard plot

γ-谷氨酰转肽酶的纯化及其特性的研究

关赛芳 许凯黎 陈复华

(上海市肿瘤研究所, 上海 200032)

提 要

从胎肝和肝癌组织中纯化的 GGTP, 经 4%—30% PAGE 鉴定表明分成二部分, 其中第一部分活力最强, 经亲和层析柱吸附后, 免疫动物获纯的抗血清。该部分 GGTP 经 10% PAGE 显示一条带, 其分子量为 92kD, pI 值为 4.2。但经 SDS-PAGE 则显示二条蛋白带, 其分子量分别为 64kD 和 27kD。酶免疫抑制试验表明该抗血清对 GGTP II, II' 具有抑制作用, 双扩散免疫试验产生单一沉淀线, 并互相融合在一起。说明二种组织来源的 GGTP 的免疫学特性相一致。

关键词 γ-谷氨酰转肽酶 (GGTP), 胎肝, 肝癌组织

γ-谷氨酰转肽酶 (GGTP)[E.C. 2.3.2.2.] 广泛存在于人体肾、胰、肝、脾和小肠等组织中, 其中以肾含量最丰富, 但胎肝和肝癌组织具有高度组织特异性活力^[1]。有关文献提示 GGTP 具有酶分子的不均一性, 以多种同工酶形式出

现, 一旦肝细胞癌变时, 肝癌患者血清中显示肝癌特异性同工酶, 因而通过血清学检测该特异性同工酶可对肝癌起到鉴别诊断作用^[2,3]。为进

一步阐明肝癌特异性同工酶的性质,我们从胎肝和肝癌组织中纯化与肝癌相关的酶蛋白GGTP,并对其免疫特性作一研究。

1 材料与方法

胎肝组织取自水囊引产的19—28周龄的胎儿肝。肝癌组织来自尸解肝癌患者,经组织病理学证实为原发性肝细胞肝癌,放-30℃保存直至抽提用。

GGTP活力测定采用改良的Orlawshi方法^[4],蛋白质含量采用Bearden^[5]等方法测定。

以10% PAGE测定GGTP分子量,亚分子量测定以SDS-10% PAGE, IEF-PAGE测定pI值,4—30% PAGE鉴定GGTP特异带。

纯化方法基本按Toya^[6]等报道方法进行,其中柱层析改用Sephadex-G150及DEAE-Cellulose DE52线性梯度洗脱,收集酶活力部分,第一部分上含抗正常人抗血清的Sephadex-4B亲和层析柱及抗甲胎蛋白抗血清

的Sephadex-4B亲和层析柱。

制备抗GGTP抗血清:用纯化的胎肝(或肝癌)GGTP免疫兔,以每毫升含酶蛋白量0.17g加等量Frund's完全佐剂皮下注射兔,获得抗GGTP抗血清,作酶分析试验。

2 结果

2.1 GGTP的纯化及其物化特性的测定

2.1.1 纯化人胎肝及肝癌组织GGTP的第一部分特异活力分别为13.34U/mg和12.44U/mg(酶单位每毫克蛋白)(见表1和表2)。

2.1.2 DE52柱层析,收集各部分经4%—30% PAGE,胎肝和肝癌组织均显示二个活力部分。第一部分位于肝癌血清GGTP同工酶的I和I'位置,第二部分位于VII带位置(图1)。

2.1.3 第一部分纯化的GGTP经10% PAGE显示单一蛋白带,其分子量为92kD(图2a)。SDS-10% PAGE显示二条蛋白带,其分子量分别为64kD(GGTP_L)和27kD(GGTP_S)。

表1 纯化人胎儿肝组织GGTP
Table 1 Purification of GGTP from fetal liver

部 分 Fraction	体积 Volume/ml	总蛋白量 Total protein/mg	总活力 Total activity/U	特异活力 Specific activity/U/mg	相关特异活力 Relative specific activity	产量 Yield (%)
匀浆 Homogenate	330	14784.0	3300.0	0.22	1.00	100
第一次去氧胆酸钠 Triton X-100, PMSF ¹⁾ 1st deoxycholate extract Triton X-100, PMSF	260	2329.6	2405.0	1.03	4.63	72.88
冷丙酮 Cold acetone fraction (0—50%)	200	840.0	1325.0	1.58	7.07	40.15
热处理第二次去氧胆酸钠 Heat treatment and 2nd deoxycholate extract	170	464.6	1197.0	2.58	11.10	36.27
硫酸铵(40—90%)沉淀 (NH ₄) ₂ SO ₄ (40—90%) PPt	74	92.1	895.4	9.22	43.60	27.13
G150 凝胶过滤 Sephadex-G150 gel filtration	40	63.2	780.0	12.34	55.33	23.63
DE52 柱层析 DEAE-cellulose DE52 chromatography	a b	28.6 18.8	378.5 116.4	13.34 6.19	59.82 27.76	11.47 3.53

1) PMSF 为苯甲基磺酰氟(Phenylmethylsulfonyl fluoride)

表2 纯化人肝癌组织 GGTP

Table 2 Purification of GGTP from hepatocellular carcinoma

部 分 Fraction	体积 Volume/ml	总蛋白量 total protein/mg	总活力 Total activity/U	特异活力 Specific activity/ U/mg	相关特异活力 Relative specific activity	产量 Yield (%)
匀浆 Homogenate	210	13241.0	1764.0	0.13	1.00	100
第一次去氧胆酸钠 Triton X-100, PMSF Ist deoxycholate extract Triton X-100, PMSF	170	1631.0	1232.0	0.76	5.67	69.85
冷丙酮(0-50%) Cold acetone frection (0-50%)	120	568.0	621.5	1.09	8.21	35.23
热处理,第二次去氧胆酸钠 Heat treatment and 2nd deoxycholate extract	75	324.8	542.5	1.67	12.53	30.75
硫酸铵(40-90%)沉淀 (NH ₄) ₂ SO ₄ (40-90%) PPt	26	88.4	485.0	5.49	41.19	27.43
G150 凝胶过滤 Sephadex G150 gel filtration	31	41.8	360.0	8.61	64.66	20.41
DE52 柱层析 DEAE-cellulose DE52 chromatography	a. 18 b. 45	9.28 7.34	115.4 78.6	12.44 10.71	93.39 80.40	6.54 4.46

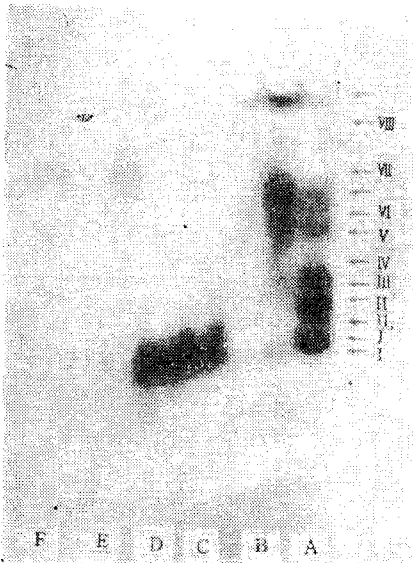


图1 纯化 GGTP 电泳图谱

Fig. 1 Electrophoretic patterns of the purified GGTP fraction using 4%-30% polyacrylamide gradient slab

A 肝癌患者血清 GGTP 同工酶电泳

GGTP isoenzymogram of serum of HCC

B G150 柱层析下来 GGTP

GGTP from Sephadex-G150 chromatography

C, D DE52 柱层析下来第一部分 GGTP (肝癌组织与胎肝)

Frist fraction of GGTP purified from HCC and fetal liver after DEAE-cellulose DE52 chromatography respectively

E, F DE52 柱层析下来第二部分 GGTP (肝癌组织与胎肝)

Second fraction of GGTP purified from HCC and fetal liver after DEAE-cellulose DE52 chromatography respectively

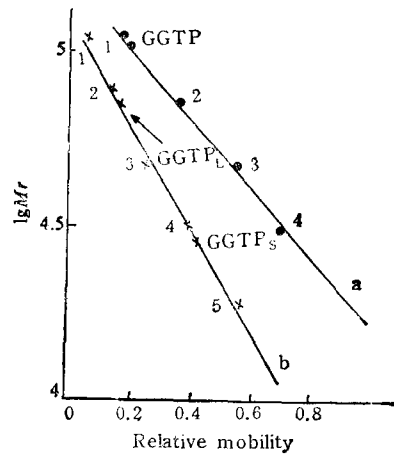


图2 测定 GGTP 及其亚基分子量曲线图

Fig. 2 Estimation of the molecular weight of GGTP and GGTP subunits by PAGE

a. 10% PAGE 测定酶蛋白分子量曲线

Electrophoresis of enzyme protein in 10% PAGE

b. SDS-10% PAGE 测定酶蛋白亚基分子量曲线

标准蛋白分子量分别为: 1.磷酸化酶 b(94000), 2.白蛋白(67000), 3.肌动蛋白(43000), 4.碳酸酐酶(30000), 5.烟草花叶病毒衣壳(17500)

Electrophoresis of enzyme protein in SDS-10% PAGE.

The standard proteins were 1. phosphorylase b(94000), 2. albumin (67000), 3. actin (43000), 4. carbonic anhydrase (30000), 5. TMV-capsid (17500)

(图 2b) IEF-PAGE 检测其 pI 值为 4.2.

2.1.4 抗血清效价为 1:16.

2.2 GGTP 的免疫学特性

2.2.1 抗肝癌特异性 GGTP 血清酶抑制试验 在含有特异带的肝癌患者血清中加入等体积的抗 GGTP 抗血清于 37℃ 培育 1h, 置

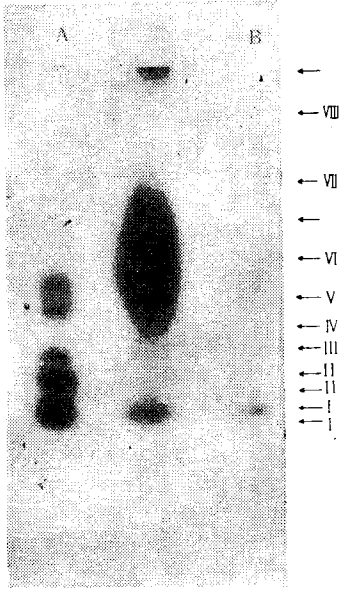


图 3 抗肝癌特异性 GGTP 抗血清酶抑制图谱
Fig. 3 Inhibit pattern of specific GGTP from HCC by rabbit antisera against the GGTP

(A) 肝癌患者血清同工酶酶谱 (B) 该患者血清与抗 GGTP 抗血清培育后血清
GGTP zymogram of sera of HCC (A) and sera of HCC incubated with rabbit antisera against the GGTP (B)

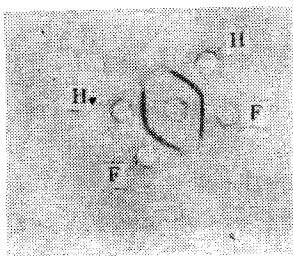


图 4 双向免疫扩散图谱
Fig. 4 Double immunodiffusion in agarose gel (H) 纯化肝癌组织 GGTP (F) 纯化胎儿肝 GGTP 中间为抗 GGTP 抗血清
Purified GGTP from HCC (H) and fetal liver (F) and antisera against the GGTP

4℃ 过夜, 作 4%—30% PAGE. 结果发现 GGTP 特异带 II, II' 消失(图 3).

2.2.2 胎肝和肝癌 GGTP 的免疫沉淀反应 作双向免疫扩散试验, 抗 GGTP 抗血清与纯化的肝癌 GGTP 抗原形成单一免疫沉淀线, 与胎肝纯化的 GGTP 形成的单一沉淀线完全融合在一起(图 4).

以上结果表明从胎儿肝和肝癌组织提取的 GGTP 与肝癌患者血清中显示的特异性 GGTP 的免疫学性质相一致.

3 讨 论

人体及实验动物研究表明肝脏一旦受致癌剂或其它化学物质作用后, 肝细胞损伤, 从而导致肝细胞合成及释放 GGTP 到血液中, 使血清中 GGTP 含量明显升高. 因此仅检测血清中 GGTP 总量尚难于判断肝细胞的良恶性改变. Jalank 等^[7]和 Kitagawa 等^[8]分别报道肝细胞癌变过程中可合成分泌一种胚胎性的 GGTP 同工酶. Hattori^[9]等进一步分析肝癌患者血清中 GGTP 同工酶的临床价值, 结果发现肝癌患者血清中存在多种癌特异性同工酶, 其位置在 I'、II 和 II'. 最近作者^[3]通过 332 例良恶性肝病者血清学的检测, 结果发现 AFP 阳性的 GGTP 特异带阳性率为 67%, AFP 中等浓度的为 38%, AFP 阴性的为 28%. 总的肝癌检测阳性率为 53%, 与 Sawabu^[2]报道的 200 例肝癌患者中 GGTP 癌特异性同工酶酶谱 I', II 和 II' 出现 109 例, 阳性率为 54.5% 相一致. 而非癌性肝病者均不出现特异性同工酶. 为进一步探讨该特异性 GGTP 同工酶的性质, 我们选用了人胎肝和人肝癌组织作酶蛋白的纯化, 发现纯化过程中所使用的去垢剂 Triton X-100 及去氧胆酸钠, 没有改变酶的活性, 而且此酶使用的缓冲溶液, 最适 pH 值为 8.0. 使用 DE52 纤维素进行梯度洗脱的二种组织均分成二部分 GGTP (见图 1), 这表明有二个分子量不一样的 GGTP, 其差异主要是两种 GGTP 所含唾液酸量不一样^[10]. 纯化的胎肝与肝癌组织 GGTP 经 10% PAGE 测定其分

子量为 92kD (见图 2a)。以纯化第一部分作等电聚焦电泳测定其 pI 值为 4.2, 这些结果与 Joya^[6] 报道基本相一致。以 SDS-10% PAGE 主要显示高度纯化 GGTP 的重链亚基, 其分子量为 64kD (见图 2b), 与 Shiozawa^[11] 报道的结果相接近。这些结果说明胎肝与肝癌 GGTP 酶的主要理化特性相似。作者使用高度纯化的胎肝或肝癌组织作抗原制备抗 GGTP 抗血清, 进行双向免疫扩散, 二种组织的 GGTP 所产生的单一沉淀线, 并互相融合在一起 (见图 4)。本文还采用免疫学抑制试验, 即在含有 GGTP II、II' 特异带的肝癌患者血清中加入等体积的抗人 GGTP 抗血清进行免疫抑制试验, 结果发现该肝癌血清 GGTP 特异性同工酶 II、II' 消失 (见图 3), 其主要原因是 GGTP 同工酶具有相同的抗原性决定簇而使其特异带 II、II' 被吸收^[12]。这些结果说明胎肝和肝癌组织与肝癌患者的特异性 GGTP 的免疫学性质相一致。纯化的肝癌特异性同工酶 GGTP 将为今后探讨该酶蛋白糖链的异质性及深入开展肝癌血清学免疫诊断技术提供有效的方法。

参 考 文 献

- 1 Tateishi N, Higashi T, Nomura T *et al.* Higher transpeptidation activity and broad acceptor specificity of γ -glutamyltrans. *Cann*, 1976; **67**: 215
- 2 Sawabu N, Hattori N. In: Takemori Y ed, Serological tumor markers in hepatocellular carcinoma. *Neoplasmes*

- of the liver, Japan: Kanagawa*, 1987; 231
- 3 许凯黎, 关赛芳, 于尔辛等. 多种肿瘤标志物对 332 例良恶性肿瘤的鉴别诊断意义. *肿瘤*, 1991; **11**(2): 86
- 4 Orlowshi M, Meister A. Isolation of γ -glutamyltranspeptidase from hog kidney. *J Biol Chem*, 1965; **240**: 338
- 5 Bearden Jr J C. Quantitation of submicrogram quantities of protein by an improved protein-dye binding assay. *Biochim Biophys Acta*, 1978; **533**: 525
- 6 Toya D, Sawabu N, Ozaki K *et al.* Purification of γ -glutamyltranspeptidase (γ -GTP) from human hepatocellular carcinoma (HCC), and comparison of γ -GTP with the enzyme from human kidney. *Ann NY Acad Sci*, 1983; **417**: 89
- 7 Jalanko H, Ruoslahti E. Differential expression of α -fetoprotein and γ -glutamyltranspeptidase in chemical and spontaneous hepatocarcinogenesis. *Cancer Res*, 1979; **39**: 3495
- 8 Kitagawa T, Watanabe R, Sugano H. Induction of γ -glutamyltranspeptidase activity by dietary phenobarbital in "spontaneous" hepatic tumors of C3H mice. *Gann*, 1980; **71**: 536
- 9 Hattori N, Sawabu N, Nakagen M *et al.* Novel gamma-glutamyltranspeptidase isoenzyme occurring in sera of patients with hepatoma. *Scand J Immunol 8 Suppl*, 1978; **8**: 507
- 10 Hetland O, Anderson T R, Gerner T. The heterogeneity of the serum activity of γ -glutamyltranspeptidase in hepatobiliary diseases as studied by agarose gel electrophoresis. *Clin Chim Acta*, 1975; **62**: 425
- 11 Shiozawa M, Yamashita S, Aiso S *et al.* A monoclonal antibody against human kidney gamma-glutamyltranspeptidase: preparation, immunochemical and immunohistochemical characterization. *J Histochem Cytochem*, 1989; **37**: 1053
- 12 Selvarj P, Balasubramanian K A. Soluble forms of γ -glutamyltranspeptidase in human adult liver, fetal liver and primary hepatoma compared. *Clin Chem*, 1983; **29**: 90

The Study on Characteristics of Gamma-Glutamyltranspeptidase (GGTP) Purified From Human Liver Cancer and Fetal Liver

Guan Saifang Xu Kaili Chen Fuhua
(Shanghai Cancer Institute, Shanghai 200032)

ABSTRACT

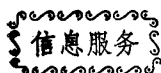
To elucidate characteristics of the novel GGTP specific to liver cancer cells, GGTPs from human fetal liver and hepatoma tissues were purified by Triton X-100 and deoxycholate extraction, cold acetone precipitation, glutathione treatment and bromelain digestion followed by Sephadex G-150 gel filtration and DEAE-cellulose DE-52 chromatography.

The enzymes purified from two sources displayed a pI of 4.2 and an apparent M_r of about 92kD, as judged by polyacrylamide gel electrophoresis, which consists of two non-identical glucopeptides with M_r of 64 kD and 27 kD, respectively.

The purified GGTPs were used to produce antibodies in rabbits. The antisera with titers of 1:16 were observed to be capable of being absorbed by the constituents of the novel GGTP, II and II', in sera of patients with hepatoma. Furthermore, they could form in the double diffusion test a smoothly fused precipitating line with two kinds of purified antigens.

These results show that GGTPs from human hepatoma and fetal liver tissues are of immunological identity.

Key words Gamma-Glutamyltranspeptidase, fetal liver hipatoma tissue



废酒糟制取甘油新技术

项目所属单位: 北京市星火技术研究所。

市场情况: 国内外市场供不应求, 价格连续上涨(每吨 3000—8000 元), 国内需求量 6.5 万吨, 现有产量 2 万吨, 预测 2000 年国内需求达 12 万吨。

产品主要性能: 无毒、无不良气味, 具有吸水性、润滑性和稀释性, 对皮肤有良好的滋润功能。

适用范围: 化学合成、日用化工、食品工业、医药、印染工业、烟草、皮革等行业。

主要原料: 酒糟、麦芽浆、酒药、石灰、盐酸、活性炭等, 其原料在酒厂及化工厂均可买到。

主要设备: 发酵缸、40 升搪瓷桶、铝锅、台秤、量筒、比重计、温度计、离子交换柱, 在五金商店、化工商店、化工仪器及医疗器械商店均有售。

实施条件:

1. 日处理 500 千克酒糟, 设备投资 1—2 千元。

2. 厂房: 50m², 电源: 照明电。

3. 燃料: 煤电、柴均可。

4. 水: 0.6 吨/日。

5. 日处理酒糟 500 千克, 3—4 人即可。总投资 1.5 万元(流动资金 3000 元), 成本约 3000 元/吨, 参考售价 8000 元/吨, 月产 1.5 吨, 月可获利 7500 元, 年利润 10 万元左右。

转让及收费标准: 面授 8000 元, 随到随学, 提供资料, 现场培训操作, 包出产品, 协助销售。食宿自理, 协助建厂, 费用面议。

函授: 800 元, 提供技术资料, 常年免费咨询。

[100024 北京 867 信箱 20816 组 李群 (电话 5762127, 5762194)]

磁性健康睡枕

我们一生中大约有三分之一的时间把头搁在枕头上。枕头过高或过低, 都会影响睡眠。磁性健康睡枕是根据亚洲人的习惯, 利用睡枕的凹凸部分对头部、面部及穴位进行按摩, 睡枕内的磁石有促进人体血液循环及新陈代谢的作用, 可消除疲劳, 治疗失眠及神经衰弱等症, 是理想的磁疗器具。生产此产品需厂房 100m², 职工 5 人, 不需专用设备, 主要原材料为磁石,

合成乳胶, 产品成本约 12 元/件, 参考售价 25 元/件。投资 5 万元即可生产。若年产 5 万件, 年利可达 60 万元以上, 适合中小企业及个体户生产, 特别是缝纫制品厂的理想项目。

[100024 北京 867 信箱 20816 组 李群

电话: 5762127, 5762194]