

二甲氨基偶氮苯(DAB)诱发大白鼠肝癌过程中肝细胞染色质非组蛋白含量和磷酸化作用变化的观察

王志洁 徐晓利

(生物化学教研室)

提 要 对 DAB 诱癌早期(1~5个月)大白鼠肝细胞核染色质非组蛋白含量和磷酸化作用的变化进行了观察。发现:①诱癌1个月的鼠肝细胞核各部分蛋白质含量和非组蛋白总磷含量没有有显著的变化;②诱癌3个月的鼠肝细胞核各部分蛋白质含量和非组蛋白总磷含量显著增加,鼠肝出现肝硬变的趋势;③诱癌5个月I组的鼠肝已形成癌块,非组蛋白含量增加,总磷含量增加,有显著意义。II组鼠出现肝硬化,非组蛋白含量降低,总磷含量比I组低。这些结果提示:非组蛋白磷酸化作用与基因表达的调控和癌肿的形成有密切关系。

关键词 诱发肝癌 染色质非组蛋白 磷酸化作用

真核细胞染色质的非组蛋白是不均一的蛋白质,具有种族特异性和器官特异性。Kostraba等^[1]用 Walker 肝癌的非组蛋白激活以正常大白鼠肝染色质为模版的 RNA 合成,得到的染色质转录物具有 Walker 肝癌的特点,表明非组蛋白参与了 Walker 肝癌基因表达的调控。Kleinsmith 等^[2]报告,非组蛋白磷酸化作用与癌肿的形成有密切的关系。本文报告二甲氨基偶氮苯(DAB)诱发肝癌早期(1~5个月)大白鼠肝细胞核非组蛋白含量和磷酸化作用的变化,实验提供了有意义的的数据。

材 料 和 方 法

1. 试剂 蔗糖、氯化钠、乙二胺四乙酸是 AR 级;尿素是 GR 级;丙烯酰胺、十二烷基硫酸钠、氨基萘酚磺酸等经过重结晶;酚经过重蒸馏。其余试剂均为 AR 或 CP 级。

2. 动物的处理 180~200g 的 Wistar 大白鼠随机分为对照组和实验组。对照组饲料含有各种基本营养素,实验组饲料缺核黄素,含有0.06%DAB。大白鼠分为三批,第一批实验组23只,对照组15只,饲养期1个月;第二批实验组及对照组各35只,饲养期3个月;第三批实验组50只,对照组35只,饲养期5个

月。每批动物在处死前禁食24小时,断头放血,剪取肝组织一小块,以10%福尔马林固定后作病理切片,余下的称重,然后制备细胞核。

3. 细胞核的制备及细胞核非组蛋白的抽提 基本上按李北泉等的方法^[3]。操作均在4℃进行。

4. 蛋白质测定 按 Lowry 法。为了排除巯基乙醇等的干扰,采用了去氧胆酸钠-三氯醋酸沉淀技术。

5. DNA 测定 采用 Burton 的二苯胺法。

6. 非组蛋白总磷含量测定 用 Fiske-Subbarow 法直接测定总磷含量。

结 果

1. 病理常规切片检查 诱癌1个月鼠肝组织切片镜下可见14例肝实质细胞具有轻度异型性;3例具有中度异型性;门管区均有不等量的白细胞浸润;有6例轻度肝硬化。诱癌3个月实验鼠肝组织切片镜检21例,普遍可见肝细胞肿胀;肝实质细胞具有轻度或中度异型性;门管区还有中等或大量白细胞浸润;有纤维组织和胆管增殖,是为“胆管纤维样变性”;

其中1例肝硬化。诱癌5个月实验鼠50例中有20例肝表面可见黄豆大到蚕豆大灰白色癌结节,大的直径可达1~2cm。50例实验鼠肝组织切片中,镜下确诊胆管细胞癌4例,肝细胞癌5例,肝细胞癌与胆管细胞癌的混合癌11例。余下的均为肝硬化,可见到明显的胆管上皮增生并发生癌变。癌细胞多数发生变性。对

照鼠肝组织切片镜下未见到异常。

2. 细胞核检查 从实验鼠肝和对照鼠肝制备的细胞核作电镜检查,发现细胞核完整,基本上没有胞浆污染。从肝匀浆滤液制备细胞核,以每100g鲜肝的DNA mg数计算,回收率为82~91%。

表1 细胞回收率

诱癌时间	组别	滤液 DNA (mg/100g肝)	细胞核DNA (mg/100g肝)	回收率 (%)
1个月	对照组	118.40 ± 15.36	100.16 ± 17.23	85
	实验组	103.68 ± 5.7	85.17 ± 6.00	82
2个月	对照组	100.78 ± 3.3	91.33 ± 17.32	91
	实验组	102.33 ± 15.1	89.29 ± 11.90	87
5个月	对照组	108.80 ± 13.03	90.00 ± 20.90	83
	实验组 I	102.33 ± 21.36	85.18 ± 16.46	83
	实验组 II	97.65 ± 3.32	86.38 ± 1.35	88

注: 1. 诱癌1个月组, 对照组n=3, 实验组n=5; 诱癌3个月组, 对照组及实验组n均为7; 诱癌5个月组, 对照组n=7, 实验组 I n=4, 共有大白鼠16只, 13只为癌症, 3只肝硬化, 实验组 II n=7, 共有大白鼠34只, 仅7只癌症, 27只肝硬化。因两组的癌症鼠比例不同, 分别列开
2. 结果以均数 ± 标准差表示

3. 致癌过程中细胞核蛋白质含量变化 结果如表2。

4. 非组蛋白总磷含量的变化 结果如表3。

表2 细胞核蛋白质分部含量及蛋白质与DNA比值

诱癌时间	组别	核 总 蛋 白			核 浆 蛋 白		
		mg/100g肝	蛋白质:DNA	t 检验	mg/100g肝	蛋白质:DNA	t 检验
1个月	对照组	266.82 ± 54.51	2.66		38.86 ± 3.10	0.39	
	实验组	251.96 ± 38.64	2.97	P > 0.05	29.25 ± 3.25	0.34	P > 0.05
3个月	对照组	241.50 ± 14.87	2.64		37.77 ± 8.47	0.41	
	实验组	323.06 ± 64.23	3.63	n=7, t=3.67, 0.02 > P > 0.01	53.78 ± 9.58	0.60	n=7, t=4.52 0.005 > P > 0.00
5个月	对照组	231.50 ± 54.83	2.57		38.67 ± 9.74	0.37	
	实验组 I	255.15 ± 76.84	4.14	n=4, t=3.56 P < 0.05	54.74 ± 19.01	0.64	P > 0.05
	实验组 II	227.30 ± 11.20	2.63	P > 0.05	28.99 ± 3.02	0.34	P > 0.05

注结果以均数 ± 标准差表示

续表 2

细胞核蛋白质分部含量及蛋白质与DNA比值

诱癌时间	组别	组 蛋 白			非 组 蛋 白		
		mg/100g肝	蛋白质:DNA	t检验	mg/100g肝	蛋白质:DNA	t检验
1个月	对照组	100.75 ± 6.25	1.00		24.31 ± 1.76	0.24	P > 0.05
	实验组	92.29 ± 11.50	1.13	P > 0.05	24.73 ± 5.19	0.29	
3个月	对照组	92.20 ± 9.15	1.00		20.01 ± 3.53	0.23	
	实验组	117.82 ± 14.2	1.32	n = 7, t = 5.42 0.002 > P > 0.001	29.59 ± 4.78	0.33	n = 7, t = 5.00 0.005 > P > 0.002
5个月	对照组	90.00 ± 14.92	1.00		21.69 ± 5.46	0.24	
	实验组 I	91.97 ± 31.22	1.08	P > 0.05	25.90 ± 3.60	0.29	n = 4, t = 3.25 P < 0.05
	实验组 II	77.54 ± 8.06	0.90	P > 0.05	12.70 ± 2.10	0.15	n = 7, t = 10.33 P < 0.001

表 3 非组蛋白总磷含量

诱癌时间	组别	非组蛋白总磷含量 (μg磷/1000μg非组蛋白)	t 检 验
1个月	对照组	3.3 ± 0.6	
	实验组	2.9 ± 0.4	P > 0.05
3个月	对照组	4.6 ± 1.8	
	实验组	13.0 ± 2.3	n = 7, t = 6.09 P < 0.001
5个月	对照组	3.4 ± 0.3	
	实验组 I	18.3 ± 6.1	n = 4, t = 4.84 P < 0.05
	实验组 II	7.0 ± 3.3	n = 7, t = 2.64 P < 0.05

讨 论

1. 细胞核纯度问题 本实验以细胞核作起始材料, 采用2.2M蔗糖梯度沉淀法。Blobe₁等^[4]用此法制备的细胞核回收率是91%, 本实验的回收率是82~91%, 电镜检查证明制得的细胞核基本上没有胞浆污染。

2. 蛋白质与DNA 比值的变化 诱癌1个月

鼠肝细胞核各部蛋白质与DNA 比值变化不显著; 诱癌3个月鼠肝细胞核蛋白质:DNA、核浆蛋白质:DNA、组蛋白:DNA 和非组蛋白:DNA 均增加, 全部具有统计学意义, 表明此时基因表达较活跃; 诱癌5个月鼠实验组 I 肝细胞核蛋白质:DNA、非组蛋白:DNA 增加, 具统计学意义, 说明癌组织的基因表达较活跃; 实验组 II 肝细胞核蛋白质:DNA 变化不显著, 非组蛋白:DNA 减少, 说明肝硬化时基因表达活性不如未出现肝硬化时(诱癌3个月)高, 也不如癌肿出现时高(表2)。

本实验在诱癌3个月和诱癌5个月为主的实验组 I 非组蛋白:DNA 增高, 此结果和文献资料是一致的。例如生长缓慢的 Morris 肝癌9618A 和生长快的 Morris 肝癌5123C 的染色质非组蛋白含量升高^[5]。

诱癌5个月鼠实验组 I 共分4批。第1批处死5只, 大部分为分化不好的胆管细胞癌; 第2批处死5只, 第3及第4批各处死3只, 除各有1例为肝硬化外, 均为分化不好的肝细胞癌或肝细胞癌及胆管细胞癌的混合癌。诱癌5个月实验组仅出现20例癌症, 实验组 I

占了13例，虽然未将癌组织和癌周组织分开来做实验，还是能够反映出癌组织细胞核蛋白质：DNA 及非组蛋白：DNA 值增高的现象，实验组Ⅱ共分7批，仅有7例癌症，肝硬化肝所占的比重大。这组鼠肝非组蛋白：DNA 减少，文献资料也未见到这方面的报道，但与李北泉等^[3]发表的结果是一致的。都是出现癌症的肝非组蛋白比肝硬化的肝为高。肝硬化的鼠肝出现这种情况的机理，还不清楚。

3. 非组蛋白总磷含量的变化 诱癌1个月鼠肝非组蛋白总磷含量变化不显著；诱癌3个月鼠肝非组蛋白总磷含量为对照组的3倍，诱癌5个月鼠肝非组蛋白总磷含量为对照组的2~5倍，具显著性意义（表3）。非组蛋白总磷含量的变化和蛋白质：DNA 的变化是一致的。Shea 等^[6]以大白鼠 DNA 为模版，以鼠肝 RNA 聚合酶Ⅱ催化的无细胞系统转录生成 RNA，证实磷酸化的非组蛋白可以激活 RNA 的合成，但含磷量为0.4%的非组蛋白激活 RNA 合成的程度明显不如含磷量为1.2%的磷酸化非组蛋白；当磷酸化的非组蛋白所含的磷酸基团用碱性磷酸酶处理而移走时，这种差异被取消了。本实验的结果表明，诱癌1个月鼠肝非组蛋白磷酸化程度不显著，细胞核各部蛋白质：DNA 变化也不显著；诱癌3个月鼠肝非组蛋白磷酸化程度最高，细胞核各部蛋白质：DNA 均增加，表明此时基因表达活跃；诱癌5个月鼠肝非组蛋白磷酸化的程度也比对照组的高；实验组Ⅰ细胞核蛋白质：DNA 及非组蛋白：DNA 均增高，具显著性，非组蛋白总磷含量为对照组的5倍，表明癌肿出现时基因表达活性是高的。实验组Ⅱ非组蛋白总磷含量仅为对照组的2倍，比实验组Ⅰ低，也比诱癌3个月组低，表明此时非组蛋白磷酸化的程度不如癌肿出现时（实验组Ⅰ）高，也不如肝硬化刚开始出现时（诱癌3个月）高，非组蛋白：DNA 值降低，表明此时基因表达活性较低。Johnson^[7]把刀豆球蛋白（ConA）加到纯制的马淋巴细胞中，刺激淋巴细胞增殖，15分钟内，ConA 导致细胞核非组蛋白与染色质结

合，而且专一激活酸性蛋白质的磷酸化，使非组蛋白磷酸化程度及含量均增加，也使细胞核各部蛋白质：DNA 增加。本实验的结果是诱癌3个月鼠肝非组蛋白磷酸化程度最高，蛋白质合成活跃，病理切片镜检的结果表明，细胞增殖是活跃的，与 Johnson 等的报告极为相似。

Kamiyama 等^[9]的实验表明，基因组的激活引起一般情况下不被转录的基因组序列的转录。从本实验结果可推论：DAB 诱癌3个月大白鼠肝非组蛋白磷酸化，引起基因组表达调控失常，导致诱癌5个月实验鼠有肝癌出现。然而，非组蛋白磷酸化的机理，目前仍不清楚，这问题的阐明，无疑会使我们对 DAB 诱发大白鼠肝癌的机理，有更进一步的认识。

（本实验的鼠肝病理切片镜检承蒙宗永生教授指导，仅此致谢）

参 考 文 献

[1] Kostraba NC, et al. Transcriptional transformation of walker tumor chromatin by nonhistone proteins. *Cancer Res* 1972; 32(11):2348.

[2] Kleinsmith LJ, et al. Dephosphorylation of nonhistone proteins specifically alters the pattern of gene transcription in reconstituted chromatin. *Proc Nat Acad Sci U S A* 1976;73(4):1174.

[3] 李北泉，徐晓利。二甲氨基偶氮苯诱发大白鼠肝癌形成过程中染色质非组蛋白变化的观察。《中山医学院学报》1983; 4(3,4):1.

[4] Blobel G, et al. Nuclei from rat liver: Isolation method that combines purity with high yield. *Science*. 1966;154(3757):1662.

[5] Arnolf EA, et al. A comparative study of some properties of chromatin from two minimal deviation hepatomas. *Cancer Res* 1973;33(6):1169.

[6] Shea M, et al. Template-specific stimulation of RNA synthesis by phosphorylated nonhistone chromosomal proteins. *Biochem Biophys Res Com* 1973;50(2):473.

[7] Johnson E, et al. Early nuclear events in

the induction of lymphocyte proliferation by mitogens. Effects of concanavalin A on the phosphorylation and distribution of nonhistone chromatin proteins. *J Biol Chem* 1974;249(15):4960.

[8] Kamiyama N, et al. Liver chromatin non-histone proteins partial fractionation and mechanism of action on RNA synthesis. *Biochim Biophys Acta* 1973;227(4):576.

OBSERVATION ON VARIANCE OF NONHISTONE CHROMOSOMAL PROTEINS AND NONHISTONE CHROMOSOMAL PROTEINS-PHOSPHORYLATION IN DAB-INDUCED HEPATOMA OF ALBINO RATS

Wang Zhibie Xu Xiaoli

(Department of Biochemistry)

Nonhistone chromosomal proteins (NHCP) play an important role in regulation of gene expression in eukaryotes. Phosphorylated NHCP stimulates the synthesis of RNA in cell-free system using rat liver RNA polymerase and rat DNA as template have demonstrated by many works recently. Here we described our observation on variance of NHCP and NHCP-phosphorylation using DAB induced hepatoma of rats: (1) Liver nuclear protein: DNA and the phosphorylated NHCP showed no significant change at 1 month the DAB diet; (2) Liver nuclear proteins: DNA and phosphorylated NHCP showed significant increase at 3 months fed DAB diet, meanwhile pathological slices showed pre-carcinomatous changes in liver cells; (3) The group I of experimental rats that fed DAB diet for 5 months showed different types of changes of hepatoma significantly increase in NHCP and phosphorylated NHCP. Another group II of rats developed cirrhosis with NHCP and phosphorylated NHCP lower than group I. Our results suggest that the phosphorylation of NHCP is intimately correlated with development of cancer.

Key words Induced hepatoma Nonhistone chromosomal proteins Phosphorylation