

二甲氨基偶氮苯(DAB)诱发大白鼠 肝癌过程中肝内分枝氨基酸 转氨酶同工酶谱的变化

徐晓利 刘洪峰 顾熊飞

(生物化学教研室)

大鼠体内存在三种分枝氨基酸转氨酶(EC 2.6.1.6)同工酶。同工酶Ⅰ和Ⅲ分布广泛,同工酶Ⅱ仅存在于肝脏, K_m 值较高,底物特异性严格,只能催化亮氨酸与 α -酮戊二酸之间的转氨反应,并且受体内糖皮质激素和高蛋白膳食的诱导^[1]。同工酶Ⅲ是分枝氨基酸转氨酶同工酶的胚胎分子形式^[2,3]存在于肾、脑、卵巢和胎盘组织中。文献报导,各种Yoshida腹水型肝癌、Morris肝癌、各种化学致癌剂和致癌病毒转化的肝细胞以及自发转化的细胞中都出现胚胎分子同工酶Ⅲ^[2,4]。近十余年来,大量的研究证明,癌瘤组织中基因表达发生紊乱,产生一些相应的正常分化组织所没有的、或含量极微的基因表达产物,同时正常分化组织所特有的一些功能蛋白则降低或消失。同工酶是研究基因表达的良好指标,它在探索癌瘤的发病机制及诊断指标都具有重要的意义。本文以DAB诱发大白鼠原发性肝癌,观察在诱癌过程中分枝氨基酸转氨酶同工酶的基因表达情况。

材料与方 法

一、动物与诱癌方法 Wistar 雄性大白鼠,重180—200克,随机分为对照组和实验组,实验组再分为诱癌4周组、12周组和肝癌组。诱癌方法按本教研室常用的方法。

二、肝匀浆上清液的制备 肝组织按1:1(W/V)加入冷的 $5 \times 10^{-3}M$ 、pH7.8磷酸钾缓冲液,含 $1 \times 10^{-4}M$ EDTA-2Na, $1 \times 10^{-3}M$ 巯

基乙醇和0.5毫克%5'-磷酸吡哆醛。用Brinkman匀浆器(PT10/35)于冰水浴中匀浆,7档,25~30秒。制成的肝匀浆于 $32,400 \times g$ 离心50分钟,上清液即可用来测定酶活性和同工酶层析分离。

三、酶活性的测定 参照Ichihara等人^[5]的方法,略加修改。以在10分钟内生成1nmole酮酸为一个酶活力单位。总酶活性为酶活力单位数/克肝,比活性为酶活力单位数/毫克蛋白质。同工酶的相对活性以百分比表示。按酶活性的分布区域,分别收集酶活性峰的各管洗脱液,混匀,然后测定各个酶活性峰的酶活力单位,算出各占的百分比。

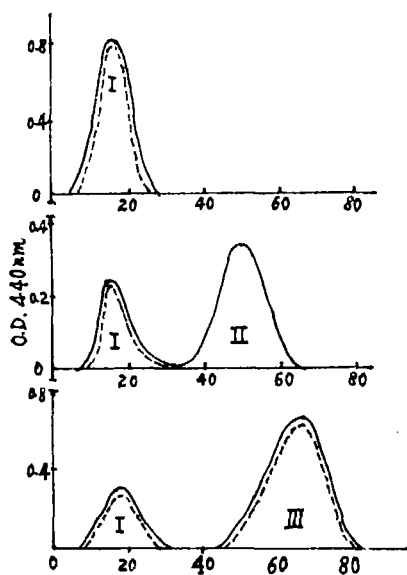
四、DEAE-纤维素-32柱层析同工酶 参照Ogawa等人^[4]的方法。

五、蛋白质测定 按Bradford等人^[6]的染料结合法。

结 果

一、正常大鼠各种组织中分枝氨基酸转氨酶同工酶的分布 在所检查的正常成年大鼠组织中,以心肌中分枝氨基酸转氨酶的总酶活性和比活性最高,肝中的总酶活性和比活性最低。各种组织中的分枝氨基酸转氨酶同工酶谱是不相同的。成年大鼠肝的同工酶谱表现为同工酶Ⅰ和Ⅱ,胚胎鼠肝则为同工酶Ⅰ和Ⅲ。脑和胎盘组织的同工酶谱与胚胎鼠肝的相同,亦为同工酶Ⅰ和Ⅲ,但相对活性不同。肺、脾、肾、心肌、骨骼肌和睾丸组织的同工酶谱仅表现为

同工酶 I, 见表 1 和附图。



附图 大白鼠各种组织中分枝氨基酸转氨酶同工酶谱

——底物为 Leu

---底物为 Ileu

上图 为肺、脾、肾、心肌、睾丸、骨骼肌

中图 为肝

下图 为脑、胎盘、胚胎肝、肝癌组织

二、DAB 诱癌不同时期大鼠肝中分枝氨基酸转氨酶总酶活性和比活性的变化 与正常对照组进行比较, 在 DAB 诱癌 4 周时, 总酶活性和比活性均下降, 见表 2。在诱癌 12 周时, 总酶活性有所回升, 但未能达到正常水平; 比活性也升高, 接近正常水平, 见表 3。肝癌组的总酶活性和比活性则明显升高, 见表 4。DAB 诱癌不同时期大鼠肝中分枝氨基酸转氨酶总酶活性和比活性的变化比较见表 5。

三、DAB 诱癌不同时期大鼠肝中分枝氨基酸转氨酶同工酶谱及同工酶相对活性的变化 正常对照组大鼠肝的分枝氨基酸转氨酶同工酶谱表现为同工酶 I 和 II, 没有同工酶 III, 以同工酶 II 的相对活性在肝中占优势。在 DAB 诱癌 4 周时, 肝中的同工酶谱产生了改变, 7 例全部表现为同工酶 II 消失, 5 例出现了同工酶 III, 见表 2。在诱癌 12 周时, 其中 4 例同工酶谱表现为同工酶 I 和 III, 2 例的同工酶谱与对照组的相同, 但同工酶 II 的相对活性远较对照组的低, 见表 3。肝癌组共有 12 例, 其中 1 例的同工酶谱表现为同工酶 I、II 和 III, 其余 11 例全部表现为同工酶 I 和 III, 并以后者在肝中占优

表 1 正常大白鼠各组织中分枝氨基酸转氨酶同工酶的分布

组 织	总 酶 活 性 (单位/克组织)	比 活 性 (单位/毫克蛋白质)	同工酶相对活性%		
			I	II	III
肝	800.0	13.4	39	61	0
胚胎肝	1526.7	57.8	91	0	9
脑	7300.0	288.0	5	0	95
胎 盘	1980.0	103.2	41	0	59
肺	8765.5	55.3	100	0	0
脾	2758.3	62.6	100	0	0
肾	8053.2	125.1	100	0	0
心 肌	22044.9	446.9	100	0	0
骨骼肌	2848.0	79.1	100	0	0
睾 丸	3583.3	102.4	100	0	0

势, 见表 4。DAB 诱癌不同时期大鼠肝中分枝氨基酸转氨酶同工酶相对活性的变化比较见表 6。

讨 论

本研究观察到, 在 DAB 诱癌过程中大鼠肝癌的病理改变是以变性坏死、卵圆细胞增生开

表2 诱癌4周大白鼠肝中的分枝氨基酸转氨酶

样 本 号 数	总酶活性 (单位/ 克肝)	比 活 性 (单位/毫克 蛋白质)	同工酶相对活性 (%)		
			I	II	III
1	564.9	11.3	76	0	24
2	410.9	9.2	100	0	0
3	417.2	8.6	74	0	26
4	436.8	10.3	82	0	18
5	539.9	10.5	65	0	35
6	657.1	12.5	100	0	0
7	131.0	11.5	69	0	31
$\bar{X} \pm SD$	522.6 ± 102.2	10.6 ± 1.4	81 ± 14		27 ± 7

表3 诱癌12周大白鼠肝中的分枝氨基酸转氨酶

样 本 号 数	总酶活性 (单位/ 克肝)	比 活 性 (单位/毫克 蛋白质)	同工酶相对活性 (%)		
			I	II	III
1	599.9	13.8	80	0	20
2	782.4	18.5	87	0	13
3	577.6	13.6	91	0	9
4	500.7	13.4	82	18	0
5	595.4	13.7	78	22	0
6	606.5	13.9	90	0	10
$\bar{X} \pm SD$	607.0 ± 94.5	14.8 ± 2.0	85 ± 5		13 ± 5

表4 大白鼠肝癌组织中的分枝氨基酸转氨酶同工酶

样 本 号 数	总酶活性 (单位/克肝)	比 活 性 (单位/毫克 蛋白质)	同工酶相对活 性(%)		
			I	II	III
1	1178.8	21.0	31	0	69
2	882.8	23.8	55	0	45
3	1147.8	30.2	40	0	60
4	1162.1	33.0	32	0	68
5	836.8	22.6	23	0	72
6	912.5	22.9	43	0	57
7	957.3	25.2	36	0	64
8	965.2	25.4	39	0	61
9	1000.0	26.3	19	10	71
10	823.9	20.5	58	0	42
11	1280.0	33.7	60	0	40
12	1136.5	35.0	20	0	80
$\bar{X} \pm SD$	1023.2 ± 151.0	26.9 ± 4.9	30 ± 14	0 ± 6	61 ± 13

始, 经过肝硬化、癌前期阶段, 最后形成肝癌, 包括肝细胞癌、腺癌、混合型癌。随着肝癌的病理变化, 大鼠肝中分枝氨基酸转氨酶的酶活性和同工酶谱发生了变化, 其最显著的特点是仅存在大鼠肝脏的同工酶 II 消失, 胚胎型同工酶 III 出现。Ogawa[4, 5]在以3'-Me-DAB

表5 DAB诱癌不同时期大白鼠肝中分枝氨基酸转氨酶总酶活性和比活性的变化比较

诱 癌 时 间	总酶活性(单位/克肝)			比 活 性(单位/毫克蛋白质)		
	对 照 组	实 验 组	t 检 查	对 照 组	实 验 组	t 检 查
4 周		522.6 ± 102.2 (7)	$P < 0.001$		10.6 ± 1.4 (7)	$P < 0.001$
12 周	a. 847 ± 84.4 b. (10)	607.0 ± 94.5 (6)	$P < 0.001$	15.6 ± 1.5 (10)	14.8 ± 2.0 (6)	$P < 0.005$
肝 癌		1023.2 ± 151.0 (12)	$P < 0.001$		26.9 ± 4.9 (12)	$P < 0.001$

a. $\bar{X} \pm SD$

b. 样本例数

诱发的大鼠肝癌研究中报导了类似的结果。

在 DAB 诱癌过程中, 分枝氨基酸转氨酶同工酶 III 在肝中出现的确切机制目前还不太清楚。卵圆细胞的出现, 是一个引人注意的问题。Onoe 等^[7]认为, 在诱癌早期, 由于 DAB 的毒性, 使大量成熟的肝实质细胞变性坏死, 其刺激作用又可引起肝组织中潜在的干细胞卵

圆细胞(一种原始的未分化细胞)迅速增生, 由此产生同工酶 III。徐元鼎等^[8]认为卵圆细胞具有胚胎细胞的特性。Ogawa 等^[9]的实验结果表明, 卵圆细胞与肝癌细胞间有内在联系。本研究在 DAB 诱癌 4 周、12 周时均观察到卵圆细胞出现, 在诱癌 4 周时, 有的还形成了卵圆细胞结节。

表6 DAB诱癌不同时期大鼠肝中分枝氨基酸转氨酶同工酶的相对活性变化比较

诱癌 时间	同工酶 I (%)			同工酶 II (%)			同工酶 III (%)		
	对照组	实验组	t 检验	对照组	实验组	t 检验	对照组	实验组	t 检验
4 周		81 ± 14 (7)	P < 0.001		0 (7)			27 ± 7 (7)	
12 周	a. 39 ± 5 d. (10)	85 ± 5 (6)	P < 0.001	66 ± 5 (10)	19 (2)		0 (10)	13 ± 5 (4)	
肝癌		38 ± 14 (12)	P > 0.05		10 (1)			61 ± 13 (12)	

a. $\bar{X} \pm SD$

b. 样本例数

关于同工酶 III 的出现的另一种解释是细胞群的选择。Ogawa 等人^[10]认为,在正常肝细胞群中,存在很少量的能产生同工酶 III 的细胞。由于很少,所以在正常情况下不能测出同工酶 III。但在癌瘤组织,这种细胞可能增多,在肝中占了优势地位,从而表现出同工酶 III。Ogawa[9]还观察到,具有同工酶 III 的细胞往往都伴随有染色体数目的变化,而只有同工酶 I 的细胞则无染色体数目的变化。Ogawa[4]报告,各种 Yoshida 腹水型肝癌都含有同工酶 III,它们的核型也与正常的明显不同。这都提示,癌瘤组织同工酶表型的表达改变与染色体或基因的畸变有关,并不仅仅是由于细胞群的选择。

以上两种解释只是从细胞学的水平,从分子生物学的水平来解释同工酶 III 的出现是基因的去阻遏。已有研究工作表明,癌瘤组织中的胚胎性蛋白质包括胎儿型同工酶和癌胚蛋白往往与正常组织中相应的蛋白质并无质的差异。我们进行了肝癌组织和脑组织同工酶 III 的酶学动力学研究〔待发表〕,其结果也证实了这点。这提示癌瘤中 DNA 的分子组成没有功能上的改变,只是由于“阻遏”与“去阻遏”机制的改变。按此观点,在正常肝细胞里,细胞核是全能的, DNA 分子中包含有同工酶 I、II、III 的全部基因。Ogawa [4]和本实验的结果也都表明,肝癌组织中同时存在有同工酶 I、II、III。可见在正常情况下,只是同工酶 III 被阻遏,未能表达,而在肝癌细胞中,是同工酶 II 被阻遏,同工酶 III 去阻遏,因而肝癌组

织中的同工酶谱表现为同工酶 II 消失,同工酶 III 出现。不过,诱癌早期和晚期同工酶 III 出现的机制是否相同,目前还不清楚。

本文还观察到,在大鼠胚胎肝和胎盘中含有同工酶 III,这和前人的报导有所不同,他们只报导了胎盘中有同工酶 III,而胚胎肝中没有[4]。但他们选用的是妊娠 19 天的胚胎肝,本实验选用的是妊娠 13~16 天的胚胎肝。这提示,在胚胎肝发育的更早期,细胞中可能存在同工酶 III,随着组织的分化发育成熟,同工酶 III 逐渐消失。在 DAB 诱癌过程中,大鼠肝组织也出现了同工酶 III,这种酶偏倚是与分化不全的胎儿组织胎盘和胚胎肝中的同工酶谱相同,从而提示癌瘤组织中的基因表达似乎是又回到了胎儿组织的未分化状态,所以胚胎分子同工酶 III 在肝中的出现是一种反分化现象。总之,癌瘤组织同工酶基因表达的变化是十分复杂的,同一种癌瘤在不同的情况下也有不同的表达形式。

参 考 文 献

- [1] Ichihara A, et al. Transaminase of branched chain amino acids. II. Physiological change in enzyme activity in rat liver and kidney. Biochem Biophys Res Com 1967; 26(6):674.
- [2] Roth S L, et al. Changes in Leucine aminotransferase isozymes by liver transformation and its correlation with the isozyme changes occurring during differentiation. Cancer Res 1977; 37:1147.
- [3] Kodowaki H, et al. Cytosolic and mitochondrial isoenzymes of branched-chain amino acid

- aminotransferase during development of the rat. *Biochem J* 1982; 202:777.
- [4] Ogawa K, et al. Isozyme patterns of branched-chain amino acid transaminase in various rat hepatomas. *Cancer Res* 1972; 32:1257.
- [5] Ochiyama A, et al. Transaminase of branched chain amino acids. I. Branched chain amino acids- α -ketoglutarate transaminase. *J Biochem Japan* 1965; 59(2):160.
- [6] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248.
- [7] Onoe T, et al. α -Fetoprotein and early histological changes of hepatic tissue in DAB-hepatocarcinogenesis. *Ann NY Acad Sci* 1978; 259:168.
- [8] 徐元鼎等. 肝癌癌变机理的实验病理研究.
- [9] Ogawa Y, et al. Demonstration of glucose 6-phosphatase activity in the oval cells of rat liver and the significance of the oval cells in Azo Dye carcinogenesis. *Cancer Res* 1974; 39:2379.
- [10] Ogawa K, et al. Transaminase of branched chain amino acids. *J Biochem Japan* 1970; 68:901.

Study on Isozyme of Branched Chain Amino Acid Transaminase in Rats Primary Hepatoma Induced by Dimethylaminoazobenzene (DAB)

Xu Xiaoli Liu Hongfeng Gu Xiongfei

(Department of Biochemistry)

Abstract

DAB-induced hepatoma in rats was used as our tool to study isozyme of branched-chain amino acid transaminase. The changes of isozyme patterns during hepatoma carcinogenesis induced by DAB were observed. Total activity, specific activity of branched-chain amino acid transaminase in liver tissues showed remarkable differences between the DAB induced rats and the control groups. At 4 weeks of DAB administration, the total activity and the specific activity declined significantly in liver, enzyme II disappeared and the embryonic molecule enzyme III appeared in liver. The majority of isozyme patterns revealed enzyme I and III, with enzyme I predominating. At 12 weeks of DAB administration, the total activity rose again slightly and the specific activity approached normal level. The isozyme patterns revealed still enzyme I and III in some DAB induced rats. Although some recovered normal isozyme pattern, the relative activity of enzyme II was much lower than that of the control group. When hepatoma developed, the total activity and the specific activity increased significantly. Enzyme II disappeared again except in one sample. The isozyme patterns revealed enzyme I and III were much higher than that of 4 weeks and 12 weeks of DAB administration. These results indicate that during carcinogenesis the changes of isozyme patterns tend to the embryonization, i. e. enzymes II disappears and enzyme III appears. Resemblances in isozyme patterns between embryonic liver and placenta of rat and hepatoma suggest that gene expression in hepatoma may return to undifferentiation situation of embryonic tissue. Alternatively it may be retro-differentiation.

Key words: Dimethylaminoazobenzene (DAB) induced hepatoma Isozyme branched-chain amino acid transaminase.