DOI:10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).1988.0046

大白鼠肝癌组织和脑组织中分枝氨基酸转氨酶同工酶Ⅲ的比较研究

刘洪峰　顾熊飞　徐晓利

（生物化学教研室）

提　要　DAB诱发大白鼠肝癌组织和正常脑组织中的分枝氨基酸转氨酶同工酶Ⅲ得以部分纯化。纯化倍数分别为41和49。两种组织中同工酶Ⅲ的Km值，底物特异性，最适pH值，热稳定性，巯基乙醇和谷胱甘肽的激活作用，实验结果无明显差异。肝癌组织中同工酶Ⅲ也许不是新的基因产物，该结果为外遗传理论提供了实验佐证。

关键词　分枝氨基酸转氨酶同工酶Ⅲ　　二甲氨基偶氮苯。

在二甲氨基偶氮苯（DAB）诱发大白鼠原发性肝癌组织中有分枝氨基酸转氨酶同工酶Ⅲ[1]，这是正常成年大白鼠肝组织所没有的基因表达产物。DAB是一种致癌物，为了证实肝癌组织中的分枝氨基酸转氨酶同工酶Ⅲ是否为DAB致使基因突变后产生的新的基因产物，本实验将肝癌和正常脑组织中的分枝氨基酸转氨酶同工酶Ⅲ进行部分纯化，并对其部分理化性质和酶动力学性质进行比较研究，探讨癌变的可能机制。

材料与方法

1.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。诱癌按本教研室常用的方法[2]。

2.酶的纯化及性质的研究　分枝氨基酸转氨酶同工酶Ⅲ的部分纯化和理化性质及酶学动力学性质的研究，参照Ogawa[3]等人的方法。

3.酶活性测定　参照Ichihara[4]等人的方法。

4.蛋白质测定　参照Gogsted[5]等人的染料结合法。

结　果

1.肝癌组织中分枝氨基酸转氨酶同工酶Ⅲ的部分纯化　肝癌组织中的分枝氨基酸转氨酶同工酶Ⅲ经DEAE-纤维素-32（DE-32）、羟基磷灰石、羧甲基纤维素-22（CM-22）柱层析分离，得以部分纯化。整个纯化过程和结果总结如表1。

表1　肝癌组织中同工酶Ⅲ的部分纯化

纯化步骤	总活性（单位×10^3）	总蛋白（毫克）	比活性（单位/毫克蛋白质）	纯化倍数
提取液	31	2112	15	
DE-32	4.7	110	43	3
羟基磷灰石	2.3	9.9	240	16
CM-22	2.1	3.4	618	41

2.脑组织中分枝氨基酸转氨酶同工酶Ⅲ的部分纯化　脑组织中的分枝氨基酸转氨酶同工酶Ⅲ经DE-32、CM-22、羟基磷灰石柱层析分离，得以部分纯化。整个纯化过程和结果总结如表2。

3.两种同工酶Ⅲ的理化性质和酶促反应动力学特性

（1）Km值　分别以不同浓度的L-亮氨酸、L-异亮氨酸、L-缬氨酸和α-酮戊二酸为底物，测出相应的反应速度V，根据Lineweaver-Burk的双倒数作图法，将底物浓度S和V

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

作双倒数处理，然后经直线回归分析，用所得的数据作图，求得肝癌和脑组织中分枝氨基酸转氨酶同工酶Ⅲ对不同底物的Km值，见表3。

表2　脑组织中同工酶Ⅲ的部分纯化

纯化步骤	总活性（单位×10^8）	总蛋白（毫克）	比活性（单位/毫克蛋白质）	纯化倍数
提取液	350	1215	288	
DE-32	164	145	1131	4
CM-22	145	54	2685	9
羟基磷灰石	56	4.0	14000	49

表3　肝癌组织和脑组织中同工酶Ⅲ的Km值

底物	肝癌(mM)	脑(mM)
L-亮氨酸	0.56	0.55
L-异亮氨酸	0.77	0.77
L-缬氨酸	1.16	0.88
X-酮戊二酸	0.57	0.61

（2）*底物特异性*　以12种不同的氨基酸为底物，分别检测酶活性，以对L-亮氨酸为底物的酶活性作为100%，结果见表4。

表4　肝癌组织和脑组织中同工酶Ⅲ的底物特异性

*底物	肝癌(%)	脑(%)
亮氨酸	100	100
异亮氨酸	102	107
缬氨酸	92	104
正亮氨酸	17	34
谷氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、甘氨酸、丙氨酸、酪氨酸、蛋氨酸	<2	<2

*除甘氨酸外，其余的氨基酸都是L-型

（3）*最适pH值*　把酶和底物混合，放在一系列不同pH的缓冲液里，检测其酶活性，以pH值为横坐标，440nm的吸光率为纵坐标，绘制pH-酶活性曲线。两种同工酶Ⅲ的最适pH值见图1。

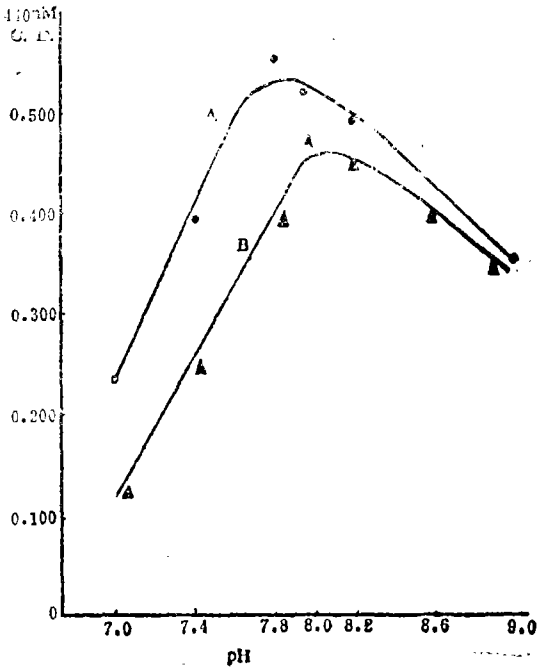

图1　肝癌（B）和脑组织（A）中的同工酶Ⅲ的pH-酶活性曲线

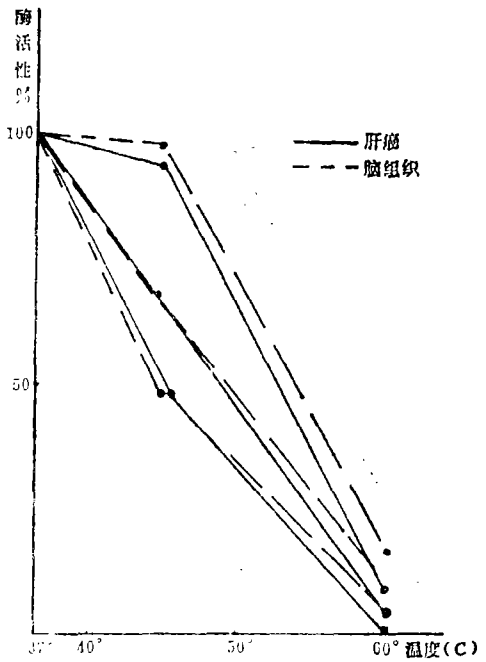

图2　肝癌和脑组织中的同工酶Ⅲ的热稳定曲线

（4）热稳定性　热处理条件为45℃、60℃、80℃三种，每种温度的处理时间分别为15、30

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

和60分钟。两种同工酶Ⅲ在不同的温度、不同的时间其酶活性的丧失情况见表5，热稳定性曲线见图2。

表5　　两种同功酶Ⅲ的热稳定性

酶活性丧失% 温度 / 时间	肝癌			脑		
	45℃	65℃	80℃	45℃	60℃	80℃
15分钟	4	94	100	0	84	100
30分钟	33	99		35	92	
60分钟	51	100		51	99	

（5）巯基乙醇和谷胱甘肽的激活作用　在酶和底物的整个反应系统中加入不同浓度的巯基乙醇和谷胱甘肽（还原型），然后检测酶活性。以巯基乙醇和谷胱甘肽的浓度为横坐标，酶活力倍数为纵坐标，绘制曲线，见图3及图4。

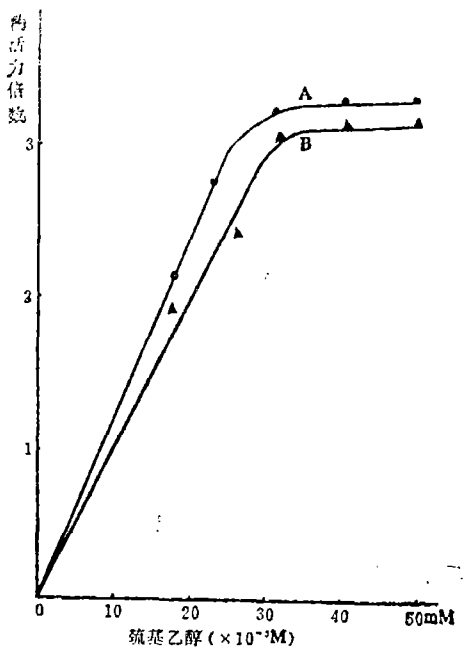

图3　巯基乙醇对肝癌和脑组织中同工酶Ⅲ的激活作用

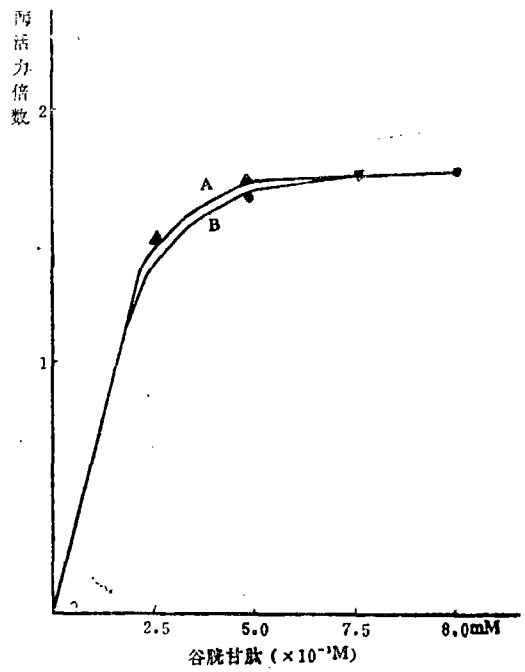

图4　谷胱甘肽对肝癌和脑组织中同工酶Ⅲ的激活作用

讨　论

肝癌和脑组织中的同工酶Ⅲ经部分纯化后，进行理化性质和酶促反应动力学特性的研究，结果表明，两者之间无明显差异。这提示两种同工酶Ⅲ可能是具有相同结构、相同理化性质和相同酶促反应动力学特性的酶。Ogawa等人[3]比较了大鼠腹水型肝癌AH130和脑组织中同工酶Ⅲ的理化性质、酶促反应动力学和免疫学特性，结果也表明，两种同工酶Ⅲ无明显差异。

引起细胞癌变的原因很多，关于癌变机制现在主要有两种基本看法：一种是体细胞突变理论，另一种是外遗传理论。体细胞突变理论早在1915年提出，X射线引起的突变致癌、多环烃与DNA的交互作用、致突变性和致癌性的相关以及癌瘤染色体研究等都支持该理论。然而至今还未发现任何一种癌细胞的某种表型是由于基因突变而产生的[6]。外遗传理论认为癌瘤细胞的DNA没有变化，是基因调控异常所致。Mckinnell等人[7]的核移植试验和Mintz等人[8]的小鼠畸胎瘤实验都说明，癌瘤细胞核仍是全能的，染色体未发生不可逆的变化，可

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

进行正常发育和分化。另外，就目前积累的大量资料表明，无论何种原因引起的细胞癌变，都可产生一些正常细胞所没有的蛋白质，但这些蛋白质并不是新的基因产物，它们往往存在于同种组织的胚胎时期或其他正常组织中。癌瘤组织中出现的胎儿型同工酶、癌胚性蛋白质都支持外遗传理论[9,10]。癌瘤中基因表达的蛋白质其结构和性质与正常的无质的差异，也间接证明癌瘤时同工酶谱的偏倚或异常是由于正常基因的不正常调控和表达。目前，关于癌瘤细胞合成的同工酶、癌胚蛋白与相应正常组织中的同工酶、胚胎蛋白之间究竟有无质的差异，研究得不多。我们在以前的实验里研究了DAB诱发的大白鼠肝癌中分枝氨基酸转氨酶同工酶谱的变化[1]，现在进行对肝癌和脑组织中两种同工酶Ⅲ的研究，实验结果表明：两种同工酶Ⅲ无明显的质的差异，从而提示，肝癌组织中的同工酶Ⅲ可能不是新的基因产物，该结果为外遗传理论提供了实验佐证。

参 考 文 献

[1] 徐晓利，等。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。中山医科大学学报 1988；9(2)：8。

[2] 关惠连，等。在大白鼠低蛋白食料中添加全鸡蛋粉和胆碱对二甲基黄诱发肝癌癌变及肝脏中核酸和磷脂的影响。中山医学院学报 1981；2(3)：569。

[3] Ogawa K, et al. Transaminase of branched chain amino acids. J Biochem Japan, 1970; 68:901.

[4] Ichihara A, et al. Transaminase of branched chain amino acids I. Branched chain amino acids-α-ketoglutarate transaminase J Biochem Japan 1965; 59(2):160.

[5] Gogstad G O, et al. Measurement of protein in cell suspensions using the coomssie brilliant blue Dye-Binding Assay. Analytical Biochem 1982; 126:355.

[6] Coggin Jr J H, et al. Cancer, differentiation and embryonic antigens: Some central problems. Adv in Cancer Res 1974; 19:105.

[7] Mckinnell R G, et al. Transplantation of pluripotential nuclei from trip old frog tumoro. Science 1969; 165:394.

[8] Mintz B et al. Normal genetically mosaic mice produced from malignant teratocarcinoma cells. Proc Nat Acad Sci USA. 1975; 72:3585.

[9] Ibsen K, et al. Development gene expression in cancer. Biochim Biophy Acta. 1979; 560:243.

[10] Farber E. Carcinogenesis-cellular evolution as a unifying thread: Presidential address. Cancer Res 1973; 33:2537.

Studies on Branched Amino Acid Transaminase Isozymes Ⅲ. of DAB-Induced Rat Hepatoma and Normal Rat Brain

Liu Hongfeng　Gu Xiongfei　Xu Xiaoli

(Department of Biochemistry)

Abstract

Rat tissues were found to contain three types of transaminase for branched amino acids, enzymes Ⅰ, Ⅱ, and Ⅲ. Enzyme Ⅰ was present in all normal tissues examined, whereas enzyme Ⅲ was only found in brain and placenta. The DAB-induced rat hepatoma was found to contain enzyme Ⅰ and Ⅲ, but not enzyme Ⅱ. Enzyme Ⅲs from hepatoma and normal rat brain were partly purified and studies of their enzyme kinetics showed that Km values, substrates specificities, the optimal pH values, heat stabilities, activation by 2-mercaptoethanol and glutathione(reduced form) were similar. No significant differences between hepatoma and brain have been found. These results suggested that enzyme Ⅲ in hepatoma might not be a new product of the mutant gene and provided an experimental evidence for the epigenetic theory.

Key words: Branched amino acid transaminase isozymes Ⅲ　Dimethylaminoazobenzene(DAB)

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net