

2. 棕色颗粒见于细胞核周(↑)×1200
3. 恒河猴肾小管上皮细胞对照片中无棕色颗粒(↑)×500
4. 恒河猴脾白髓可见到棕色颗粒(↑)×500
5. 棕色颗粒见于白髓细胞核周(↑)×1200
6. 恒河猴脾白髓细胞中对照片无棕色颗粒(↑)×500

### 参 考 文 献

- [1] Do bold A. J., 1985, *Science*, 230:761
- [2] Crrie M. G. et al., 1984, *Science*, 233:67.
- [3] Hetsey R. M. et al., 1989, *Ceel bioche-*

*mistry and function*, 7(1):35.

- [4] 戴宗祥等, 1989, 医学生物学研究 2:29.
- [5] Sternborget L. A., 1979, *Immunocytochemistry*, 2nd ed, John Will and Sone Inc NY. 124.
- [6] J Tang et al., 1986, *Life sci*, 40:2077.
- [7] 汤健等, 1984, 北京医学院学报 16(3):198.
- [8] Angelika M. et al., 1989. *Life sci*, 45(14):1293.
- [9] Suhn H. K. et al., 1989. *Life sci*, 45(17):1293.
- [10] 汤健等, 1989, 循环系统的内分泌功能, P., 北京医科大学, 中国协和医科大学联合出版社.

## 二乙基亚硝酸胺诱发肝癌的大鼠中维生素K 依赖性羧化酶的研究

包卫国 沈慧芬 李茂深

(上海医科大学基础医学部生物化学教研室 200032)

在凝血酶原等一些依赖于维生素K的蛋白质的生物合成过程中, 维生素K依赖性羧化酶参与其翻译后加工, 催化某些靠近N端的谷氨酸残基转变为 $\gamma$ -羧基谷氨酸残基(Gla)。这些Gla为凝血酶原等在生理条件下被激活所必需。一旦缺乏维生素K或羧化作用被华法令等拮抗剂所阻断, 未被羧化的异常凝血酶原等将分泌入血。与正常凝血酶原相比较, 异常凝血酶原不能被钡盐所吸附, 也不能通过 $Ca^{++}$ 和磷脂表面结合从而被生理性激活, 而只能通过非生理途径, 如巨齿蛇毒(ECV)的作用, 产生凝血酶<sup>[1,2]</sup>。

1984年, Liebman等<sup>[3]</sup>首先在原发性肝癌患者的血浆中发现异常凝血酶原水平显著升高的现象。这为研究人员寻找更好的肝癌标志提供了新的可能性, 因而, 有关肝癌和异常凝血酶原的研究进展倍受学者的注目。

但是, 迄今为止有关肝癌患者血浆中异常凝血酶原升高的机理仍不清楚。这种羧化受阻

的现象究竟是由于肝癌组织中维生素K的缺乏还是由于其它原因造成的, 有关学者颇有争议。为此, 本文以二乙基亚硝酸胺(DENA)诱发肝癌的大鼠为模型, 观察了诱癌过程中肝脏维生素K依赖性羧化酶以及分泌入血的异常凝血酶原的变化。作者特别研究了肝癌组织中维生素K依赖性羧化酶的情况及其产生的原因, 对有关肝癌大鼠血浆中出现高水平异常凝血酶原的机理进行了探讨。

### 材 料 与 方 法

#### 一、材料

$NaH^{14}CO_3$ (27居里/摩尔), 中国医学科学院放射所。多肽羧化底物 Boc-Glu-Glu-Leu-OMe, 美国Wisconsin-Madison大学J.W. Suttie教授惠赠。维生素K<sub>1</sub>, 无锡制药厂产品。Chromozym P, 东风试剂厂产品。华法令(warfarin), ECV, Sigma产品。Triton X-100, E. Merck产品。二巯基赤鲜醇(DTT),

国家自然科学基金资助课题(第386092号),

牛血清白蛋白(BSA), Serva产品。放线菌酮, Fluka产品。其他均为分析纯试剂。

## 二、方法

1. DENA的合成 根据 Titov 法制备<sup>[4]</sup>。

2. 大鼠肝癌的诱发 120克左右的 Wistar 大鼠100只,雌雄不限,喂以含80ppm的 DENA 饮水(棕色瓶中)两个半月,以后正常喂养。同时,正常喂养40只 Wistar 大鼠为对照组。

3. 动物处理 华法令处理:实验前3小时,腹腔内注射华法令5毫升/千克。放线菌酮处理:实验前3小时,腹腔内注射放线菌酮5毫克/千克。所有动物处死前均禁食18小时。

4. 大鼠肝细胞微粒体的制备 处死大鼠后,迅速取其肝脏,以冷生理盐水淋洗,称取一定重量的肝组织,剪碎,加入两倍(v/w)冷缓冲液A(0.25 mol/L蔗糖,25 mmol/L咪唑, pH7.2),在高速分散器上制成匀浆,于10,000×g离心10分钟(4℃)。其上清再于105,000×g(HITACHI 55 P-1)离心60分钟(4℃)沉淀表面以缓冲液B(缓冲液A+0.5mol/L KCl)洗涤两次,即得微粒体的粗制品。

5. 维生素K依赖性羧化酶活性测定 在上述制备的微粒体中加入缓冲液C(缓冲液B+1 mmol/L DTT+1.5% Triton X-100),加入的体积使溶液最终相当于每毫升中含0.5克肝组织(湿重),用宽松的匀浆器研磨至半透明,再于105,000×g(HITACHI 55 P-1)离心60分钟以去除不溶物质(4℃)。

酶活性测定系统:0.4毫升经 Triton X-100 增溶的微粒体上清液,0.1毫升含5 mmol/L Boc-Glu-Glu-Leu-OMe的缓冲液C,20微居里 NaH<sup>14</sup>CO<sub>3</sub>(27居里/摩尔),10微升(10毫克/毫升)维生素K<sub>1</sub>H<sub>2</sub>。酶反应于25℃保温60分钟,最终分别加入0.4毫升1%BSA和10%三氯醋酸(TCA)终止反应。所有测定均以双复管进行。

反应终止后,于3000 rpm离心10分钟。为测定内源蛋白质前体羧化酶活性,沉淀以1.3毫升0.2 mol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>溶解,再加5毫升10%TCA沉淀蛋白质,以上步骤重复一次,这时的沉淀溶解于0.8毫升1 mol/L NaOH,加入12毫升闪烁液(5.5克 PPO,0.1克 POPOP,333毫升 Triton X-100,667毫升甲苯),70微升浓盐酸中和。为测定外源多肽羧化酶活性,上清于80℃水浴中加热赶气1分钟,取0.4毫升,以40微升5 mol/L NaOH中和,加10毫升闪烁液。样品振荡均匀,至少放置24小时后,于 Beckman LS 8000

液闪仪上测定 cpm 值。

6. 异常凝血酶原活性测定 参照 Francis 报道<sup>[3]</sup>作适当改动。测定中以柠檬酸钡为吸附剂,ECV为激活剂,Chromozym P为显色底物。激活作用40分钟,显色15分钟。

## 结 果

### 一、大鼠肝脏维生素K依赖性羧化酶活性在诱癌过程中的变化

我们分别以人工合成的多肽Boc-Glu-Glu-Leu-OMe和微粒体中内源存在的一些未及羧化的蛋白质前体作为羧化酶的底物,由此测得的酶活性分别称为外源多肽羧化酶活性和内源蛋白质前体羧化酶活性。在 DENA 诱发大鼠肝癌的过程中,每隔2或4周取3—6只大鼠,测定其肝脏维生素K依赖性羧化酶活性(见图1)。

结果显示,无论是外源多肽羧化酶活性还是内源蛋白质前体羧化酶活性均呈现先降低、后升高的现象。诱癌第2周时,羧化酶活性即略有降低,第6至第10周期间,其活性处于低谷,第12周时开始有所回升,以后继续上升,第16周时出现高峰,其活性甚至高于正常值。

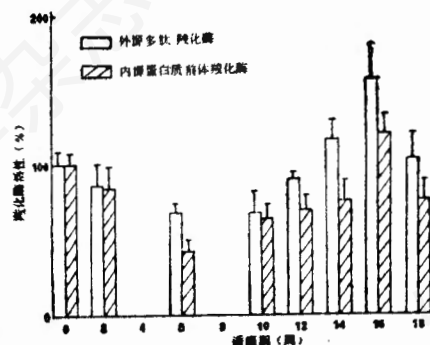


图1 DENA 诱发大鼠肝癌过程中维生素K依赖性羧化酶活性, 每组实验包括5—6只大鼠,以2—3只正常大鼠的羧化酶活性为对照值100%,数据以均值±方差表示。

比较外源多肽羧化酶活性和内源蛋白质前体羧化酶活性的变化曲线,可以发现两者在诱癌过程中的变化趋势是一致的。同时,数据显

示,在羧化酶活性的下降时期,内源蛋白质前体羧化酶活性的下降程度更大,而在酶活性上升时,内源蛋白质前体羧化酶活性的上升程度却要小些。这可能是由于以蛋白质前体作为羧化酶底物测定其活性时,影响因素比较复杂,显然,由此得出的酶活性至少同时反映着羧化酶和蛋白质前体两方面的情况,内源甚至可能有更多的因素影响羧化反应的进行。因此,对上述现象的确切解释可能还有待于对羧化反应系统特别是羧化底物的特性进行深入的研究。

## 二、肝癌结节和癌周组织中的维生素K依赖性羧化酶活性

肝癌组织逐渐增大。第20周时,我们在每只肝癌大鼠中得到足够的肝癌结节以分别制备微粒体。维生素K依赖性羧化酶活性的测定结果显示:肝癌结节中,外源多肽羧化酶活性只

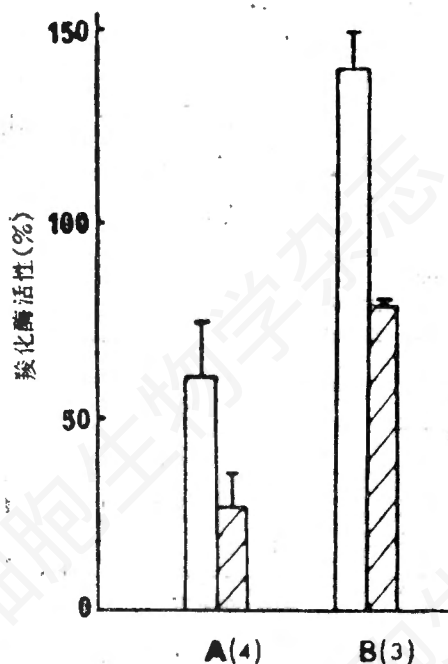


图2 肝癌结节(A)和癌周组织(B)中维生素K依赖性羧化酶活性,3只正常大鼠的羧化酶活性为对照值100%,数据以均值±方差表示,括号内为实验所用大鼠数目。

□ 外源多肽羧化酶,  
▨ 内源蛋白质前体羧化酶。

有正常大鼠肝脏中的62.6%,内源蛋白质前体羧化酶活性仅为27%(见图2)。这表明,肝癌结节中维生素K依赖性羧化酶活性显著降低。

前面的实验观察到诱癌第12周后大鼠肝脏维生素K依赖性羧化酶活性反而上升的现象,这出乎原先的预料,因而在测定肝癌结节中羧化酶活性的同时,我们测定了癌周组织中羧化酶的活性,结果发现其活性较高,是肝癌结节中的2.5倍,外源多肽羧化酶活性甚至高于正常肝组织中的活性(见图2)。

## 三、华法令对肝癌大鼠肝脏维生素K依赖性羧化酶的影响

正常大鼠经华法令处理后,其肝脏维生素K依赖性羧化酶的活性升高了一倍(见图3),外源多肽羧化酶活性与内源蛋白质前体羧化酶活性均同样升高,这说明上述变化不是由于注射华法令后蛋白质前体发生堆积而引起的。

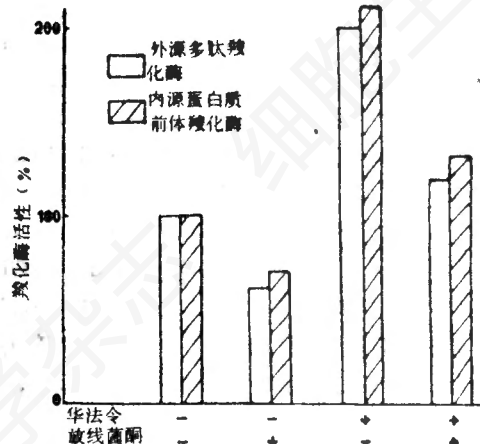


图3 华法令处理对大鼠肝脏维生素K依赖性羧化酶活性的影响。正常大鼠为对照组,数据为两次实验结果的平均值。

放线菌酮能在翻译水平上抑制蛋白质的合成。正常大鼠经放线菌酮处理,其肝脏维生素K依赖性羧化酶的活性只有正常大鼠的60~70%。如同时给大鼠注射华法令和放线菌酮,其肝脏羧化酶活性也只有单独注射华法令大鼠的60%(见图3)。这提示华法令处理大鼠中

表1 华法令对肝癌大鼠肝脏维生素K依赖性羧化酶的诱导

诱癌期(周)	外源多肽羧化酶活性的增高值
6(4)*	90.3±16.6
16(3)	54.5±8.6

\* 括号内为实验所用大鼠数目。

2—3只正常大鼠的羧化酶活性为对照值100%。

维生素K依赖性羧化酶活性的增高是由于羧化酶合成的增强而引起的。这种诱导作用 Shah 等<sup>[9]</sup>也曾报道过。

根据以上结果,我们以同样的方法分别给诱癌第6周和第16周的大鼠注射华法令,观察其诱导能力。羧化酶活性的升高程度以经华法令处理大鼠的酶活性减去同期未经华法令处理大鼠的酶活性的差值来表示。结果(见表1)发现,在诱癌第6周,即诱癌的早期,华法令对大鼠肝脏羧化酶的诱导能力基本上没有受到影响,仍然保持在对正常大鼠作用的90%左右,而在诱癌第16周时,也即诱癌的晚期,华法令对肝癌大鼠肝脏羧化酶的诱导能力大大下降,几乎只有对正常大鼠作用的一半。上述结果提供了一个重要启示,即肝癌细胞中维生素K依赖性羧化酶的合成可能受到阻抑,从而造成其中维生素K依赖性羧化酶的缺乏。

#### 四、血浆异常凝血酶原水平的相应变化

对肝癌大鼠肝脏维生素K依赖性羧化酶的研究是为了探寻其分泌异常凝血酶原的根本原因。为此,我们还分别测定了诱癌各时期大鼠血浆中异常凝血酶原的水平。

如图4所示,在DENA诱发大鼠肝癌的过程中,血浆异常凝血酶原水平出现两次升高的现象。诱癌开始后第2周,大鼠血浆异常凝血酶原即有所升高,随后的第4、6、10、12周,血浆异常凝血酶原则持续保持在高水平,几乎是正常大鼠中的4—5倍。但从第14周开始,血浆异常凝血酶原水平下降。第16、18周大鼠血浆异常凝血酶原水平和正常大鼠之间已无显著性差异。而当诱癌进入第20周时,

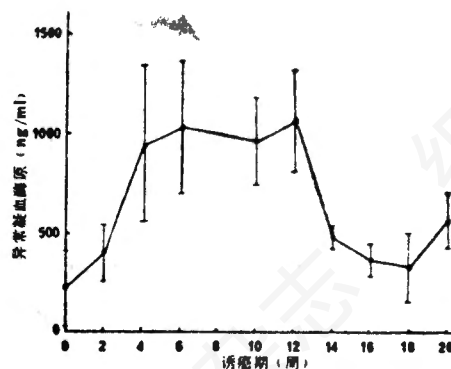


图4 DENA诱发大鼠肝癌过程中血浆异常凝血酶原水平。数据以均值±方差表示,每组实验包括4—8只大鼠。

血浆异常凝血酶原水平再次显著性地升高,是正常大鼠的2.5倍。

#### 讨 论

有关学者曾对原发性肝癌患者血浆中出现高水平异常凝血酶原的机理进行了研究,分别提出了不同的观点。他们的注意点都集中在上述现象是否是由于缺乏维生素K而引起的。有学者认为这不是由于肝癌组织中缺乏维生素K造成<sup>[3]</sup>,而另一些学者的观点则正好相反<sup>[7,8]</sup>,认为这个现象的产生恰恰是由于肝癌组织局部缺少维生素K。本文中以DENA诱发肝癌的大鼠为模型的实验结果支持前一种观点,至少可以认为其主要原因不是缺乏维生素K。

实验证明,肝癌结节中维生素K依赖性羧化酶活性显著降低,外源多肽羧化酶活性和内源蛋白质前体羧化酶活性分别只有正常大鼠肝脏中的62.6%和27%。由于我们是直接测定羧化酶的活性且羧化反应体系中已加入足量的外源维生素K,因此,这个结果表明肝癌组织中缺乏足够的维生素K依赖性羧化酶,羧化受阻是直接由羧化酶本身的不足所造成的。

有关华法令处理的实验为进一步论证上述观点提供了证据。在正常大鼠中,华法令虽然能在体内阻止羧化反应,抑制维生素K依赖性羧化酶的活性,却能诱导肝脏中该酶的合成。而在诱癌晚期的大鼠肝脏中,华法令的这种诱

导能力则大大下降。这提示,肝癌组织中维生素K依赖性羧化酶的合成受到阻抑,不能产生足量的羧化酶而造成这种酶的缺乏。当然,目前不能排除肝癌组织中还存在一些未知的抑制剂或酶的降解加强而造成羧化酶活性下降这些可能性。

比较 DENA 诱发大鼠肝癌过程中肝脏维生素K依赖性羧化酶活性和血浆异常凝血酶原水平的变化曲线,可以发现两者存在良好的对应关系。即在羧化酶活性较低的时期,血浆异常凝血酶原保持在较高的水平,而在羧化酶活性较高的时期,血浆异常凝血酶原保持在较低的水平。肝脏中存在羧化受阻的现象反映在血浆中则表现为异常凝血酶原水平的升高。在诱癌的早期,肝脏维生素K依赖性羧化酶活性曾出现过下降的时期,血浆异常凝血酶原水平相应地上升,这可能是部分肝细胞在诱癌剂 DENA 的作用下发生癌前期病变的表现。由于 DENA 作用于整个肝脏,因而这个时期血浆中异常凝血酶原的上升程度似乎比后一个上升期更强烈。诱癌第20周的肝癌大鼠血浆中再次出现高水平的异常凝血酶原,这是肝癌组织不断发展并增大至一定程度的结果,越来越多的肝癌细胞分泌大量的异常凝血酶原入血。由此可见,异常凝血酶原在诱癌过程中的两个上升期存在着本质的不同。至于稍早时的第16、18周末未发现异常凝血酶原的显著升高可能和肝癌组织的逐步发展过程与异常凝血酶原测定方法的灵敏度等有关。

根据上述结果,我们提出这样的假设:在大鼠肝癌组织中,维生素K依赖性羧化酶的合成减少,由此引起的羧化酶缺乏是肝癌大鼠血浆中出现高水平异常凝血酶原的主要原因。

实验显示,癌周组织中维生素K依赖性羧化酶的活性较高,这显然与动态变化曲线后期羧化酶活性的升高有关。在诱癌后期的大鼠肝脏中存在着两种相对抗的现象:一方面是肝癌结节中羧化酶的低活性,另一方面则是癌周组织中羧化酶的高活性,而前者仅占少数,因而总

的羧化酶活性表现为升高的现象。有些学者曾提出<sup>[9-13]</sup>,一些前凝血因子可能促使形成一个有利于肿瘤生长和转移,使其免受机体防御系统攻击的环境。癌周组织中维生素K依赖性羧化酶所呈现的高活性是否与此有关,还有待于作进一步的研究。

## 摘 要

本文证明 DENA 诱发的大鼠肝癌结节中维生素K依赖性羧化酶活性显著降低,外源多肽羧化酶活性只有正常大鼠肝脏中的62.6%,而内源蛋白质前体羧化酶活性仅为27%。华法令能在正常大鼠肝脏中诱导羧化酶的合成,而这种诱导能力在诱癌晚期的肝癌大鼠肝脏中明显下降。上述结果说明肝癌细胞中维生素K依赖性羧化酶的合成受阻,造成肝癌组织中羧化酶的缺乏。诱癌过程中大鼠肝脏维生素K依赖性羧化酶活性和血浆异常凝血酶原水平形成良好的对应关系。随着肝癌组织的增大,肝癌细胞分泌入血的异常凝血酶原水平显著升高,诱癌第20周时的大鼠血浆中异常凝血酶原含量为正常大鼠的2.5倍。由此认为,肝癌组织由于不能合成足量的维生素K依赖性羧化酶,导致凝血酶原在成熟过程中羧化受阻,分泌入血形成高水平的异常凝血酶原。

## 参 考 文 献

- [1] Suttie, J. W., 1985, *Ann. Rev. Biochem.*, 54: 459—477.
- [2] Esmon, C. T. et al., 1975, *J. Biol. Chem.*, 250: 4095—4099.
- [3] Liebman, H. A. et al., 1984, *N. Engl. J. Med.*, 310: 1427—1432.
- [4] Titov, A. I., 1946, *J. Gen. Chem.*, 16: 2011.
- [5] Francis, J. L., 1988, *Med. Lab. Sci.*, 45: 69—73.
- [6] Shah, D. V. and J. W. Suttie, 1978, *Arch. Biochem. Biophys.*, 191: 571—577.
- [7] 奥田博明等, 1988, (日) 肝脏, 29: 47—51.
- [8] 奥野正隆等, 1988, (日) 肝脏, 29: 669—670.

- [9] Dvorak, H. F. et al., 1979, *J. Natn. Cancer Inst.*, 61: 6—11.
- [10] Roos, E. and K. P. Dingemans, 1979, *Biochim. Biophys. Acta.*, 560: 135—166.
- [11] Hauschka, P. V. et al., 1986, *Haemos-*

*tasis*, 16: 273—287.

- [12] De Metz, M. et al., 1982, *J. Biol. Chem.*, 257: 5326—5329.
- [13] Donati, M. B. et al., 1986, *Haemostasis*, 16: 288—294.

## 传代内皮细胞形态和功能变化的关系

王毅 朱佩芳 王正国

(重庆, 第三军医大学野战外科研究所 630042)

迄今为止, 国内外已有不少学者对体外培养的内皮细胞(EC)进行了研究。并已从凝血因子, 胞浆 Weibel-Palade 小体和染色体数目等方面证明了培养 EC 在有限的传代次数内保持了内皮细胞的生物学性质<sup>[1-5]</sup>。但关于传代 EC 形态和功能研究的专门报道还尚未见到。本实验发现, 传代 EC 在其生物学性质没有发生根本改变的前提下, 也存在着一些形态和功能规律性变化。这些变化对合理选择使用传代 EC 来进行实验研究有着重要的意义。本文结合传代 EC 在相差显微镜下的形态学改变及其图象分析研究和蛋白质分泌功能的变化, 来探讨传代 EC 形态和功能变化的关系, 旨在为合理选择传代 EC 来进行实验研究提供参考。

### 材料和方法

#### 一、内皮细胞分离及培养

参照我室建立的牛肺动脉 EC 的分离、培养、鉴定及纯化方法进行<sup>[6]</sup>。

#### 二、相差摄影

取 1、3、4、7、9、12、15 和 20 代融合单层 EC, 置倒置显微镜(重庆光学仪器厂产品)下, 给出指示光标(100  $\mu\text{m}$ ), 行负相差放大 100 倍摄影, 将其负片行统一倍数的光学放大, 制成照片备用。

#### 三、计算机图象分析

1. 样本 相差摄影所制成的统一放大照片。
2. 仪器 MAS-1 图象分析系统(重大光电精密仪器研究所提供)。

#### 3. 测量参数及计算

测量参数 Area(面积)和 CH(圆形度)。

每次测量, 计算机以照片上光标的长度换算为测量参照单位(mm), 然后直接用积分法算出细胞投影面积; 用细胞周长除以其外切圆周长算出圆形度(见图 1), 其值在 0—1 之间, 它反映细胞接近圆的程度, 比值越接近 1, 说明细胞平面图形越近似圆。

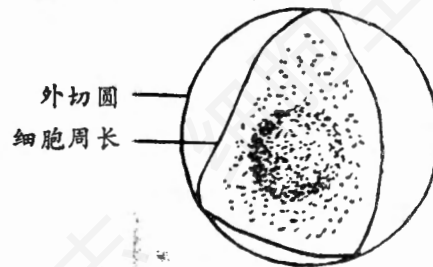


图 1 圆形度计算示意

#### 四、培养液上清蛋白测定

参照吴如丹<sup>[7]</sup>的考马斯亮蓝 G-250 染色法测定培养上清蛋白质。具体方法如下:

1. 标准蛋白质溶液 牛血清白蛋白 1 mg/ml。
2. 染色液 称取 100 mg 考马斯亮蓝 G-250 溶于 50 ml 95%乙醇中, 加 100 ml 85%磷酸, 加水稀释到 1 升。
3. 标准曲线的制作 在试管内分别加 0、5、10、20、25、30、40、50  $\mu\text{l}$  标准蛋白质溶液, 用水补足到 50  $\mu\text{l}$ , 加 3 ml 染色液混匀, 在室温(20—25 $^{\circ}\text{C}$ )中放置 15 min, 用 752 型紫外分光光度计以 595 波长比色, 读 OD 值, 作标准曲线。

本文承蒙重庆大学光电精密仪器研究所大力协助, 在此深表谢意。