

参 考 文 献

- [1] Leith JT, et al., 1991, *Cancer Res*, 51: 5139—5143.
- [2] 许沈华, 等, 1989, 中华病理学杂志, 18: 47—49.
- [3] Kerns BJM, et al., 1992, *J Histochem Cytochem.*, 40: 1047—1051.
- [4] 甘润良, 等, 1993, 上海实验动物科学, 13: 83—86.
- [5] Shimosato Y, et al., 1976, *JNCI.*, 56: 1251—1260.
- [6] Sharkey FE, et al., 1979, *Int J Cancer.*, 24: 733—738.
- [7] Kyrizis AP, et al., 1981, *Cancer Res.*, 41: 3995—4000.
- [8] Toshiharu F, et al., 1993, *Cancer Res.*, 53: 1204—1209.
- [9] Furukawa T, et al., 1993, *Int J Cancer.*, 53: 608—612.

RNA 聚合酶活性变化在 DEN 诱发大鼠肝癌细胞核体外转录中的调节作用

柳君泽* 易禄康

(第三军医大学生化教研室 重庆 630038)

真核细胞的 RNA 生物合成是在 RNA 聚合酶催化下所进行的复杂过程。研究表明,不同肿瘤细胞 RNA 生物合成不仅异常活跃,而且存在着与正常细胞不同的 RNA 转录合成过程的调节机制。本文利用 DEN 诱发的大鼠肝癌模型,观察了肝癌细胞核 RNA 体外转录活性,以期探讨 RNA 聚合酶对转录的调节作用和肿瘤发病的分子机制。

材 料 与 方 法

一、材料

大鼠肝癌模型:健康雄性 Wistar 系大鼠,体重 50—70 克,饮水含 100 ppm 二乙基亚硝胺 (DEN),12 周后改为正常水。实验 18 周时断头处死大鼠,解剖见肝脏增大,表面布满结节,经病理切片鉴定为肝细胞肝癌。

主要试剂: DEN 为 Sigma 产品, Poly (dA—dT) 和 α -鹅膏蕈碱 (α -amanitin) 系 Boehringer-Mannheim 公司产品, 聚乙烯亚胺纤维素 (PEI-cellulose) 为 Serva 公司产品, ^3H -UTP (22 Ci/mmol) 为中科院原子能研究所产品。

二、方法

1. 大鼠正常肝及肝癌细胞核的分离:按 Yu^[1]的

方法进行。沉淀的细胞核按 1 mg/ml 的 DNA 悬浮于 0.34 mol/L 蔗糖溶液中,制成核悬液。

2. 模板结合型及游离型 RNA 聚合酶活性测定:结合型 RNA 聚合酶的活性测定按 Goodlad 的方法^[2]稍加改进。反应总体积为 250 μl , 含 70 mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.5 u 肌酸激酶, 0.03 mmol/L UTP, 2 μCi ^3H -UTP, 其他成分同文献报道。应用 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 α -amanitin 以区别不同种类的 RNA 聚合酶。加入 100 μg DNA 的核悬液起反应, 于 35 $^\circ\text{C}$ 振荡温育 30 分钟, 10% TCA—20 mmol/L $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 终止反应。酸不溶物收集于玻璃纤维膜上, 乙醇抽洗晾干后, 加闪烁液于液闪计数器中测量。

游离型 RNA 聚合酶测定体系总体积 150 μl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为 35 mmol/L, ^3H -UTP 1.2 μCi , 其他成分同结合酶活性测定。加入 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 放线菌素 D 以抑制 DNA 模板, 并应用 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的外源性模板 Poly (dA—dT), 通过加入 60 μg DNA 的核悬液起反应, 于 35 $^\circ\text{C}$ 振荡温育 30 分钟终止反应, 其后处理同上所述。

3. 转录活性酶相对分子数 (relative numbers of transcriptionally active enzyme molecules) 和转录延长速度 (elongation rates) 测定: 结合型 RNA 聚合酶

* 现在第三军医大学病理生理教研室。

活性测定体系中 ^3H -UTP 为 $10 \mu\text{Ci}$ 。反应终产物收集于玻璃纤维膜上, 经 0.4 mol/L KOH 于 37°C 消化过夜, 以酚红为指示剂, HClO_4 滴定至终点。于 -20°C 放置 15 分钟, 经离心去除 KClO_4 沉淀, 上清液真空干燥后加蒸馏水定量溶解, 点样于 PEI-纤维素薄层板 ($10\text{cm} \times 20 \text{cm}$), 用 H_2O 上行展开至薄层板上缘 1 cm 处, 空气中自然晾干。再经 1.8 mol/L LiCl 二次上行展开至薄层板中央, 晾干后紫外灯下观察。圈出分离的 UMP 和 UR 点, 分别刮取于闪烁瓶中, 加 $1.0 \text{ ml } 0.1 \text{ N HCl}$ 于 37°C 消化 1 小时, 加 $0.55\% \text{ PPO}-0.01\% \text{ POPOP}$ 甲苯 Triton X-100 (3:1) 闪烁液, 于液闪计数仪中分别测定其放射活性 (dpm)。

结 果

一、细胞核两类 RNA 聚合酶池 (pool) 活性变化

大鼠肝癌细胞核两类 RNA 聚合酶的活性均明显高于正常的 (见表 1), 其染色质结合的 RNA 聚合酶总活性、酶 I 和酶 II 的活性分别为正常的 1.8、1.3 和 2.9 倍; 游离的 RNA 聚

合酶总活性、酶 I 和酶 II 的活性分别为正常的 2.3、2.1 和 2.4 倍。染色质结合的 RNA 聚合酶总活性中, 正常肝细胞的酶 I 约占 70% (I/II 为 2.3), 而肝癌细胞的酶 I 和 II 近似各占 50% (I/II 为 1.0)。

二、转录活性 RNA 聚合酶相对分子数和转录延长速度的改变

RNA 链经碱水解可产生 3' 端的 UR 和内部的 UMP。UR 代表所生成 RNA 链的相对数目, 反映了与染色质模板紧密结合的、具有转录活性的 RNA 聚合酶分子数目; 而 UMP/UR 比值则代表新生 RNA 链的平均长度, 可用于测定一定时间内转录反应的延长速度^[2-4]。肝癌细胞的转录活性 RNA 聚合酶 II 分子数目明显高于正常肝细胞的 ($P < 0.001$), 而酶 I 的分子数目在两组动物间则无明显差异 ($P > 0.05$); 同时, 肝癌细胞的 RNA 聚合酶 I 和 II 催化转录反应的延长速度均高于正常肝细胞的 ($P < 0.01, 0.001$) (见表 2)。

表 1 染色质结合的和游离的 RNA 聚合酶活性

动物	结合酶活性 (dpm/ μg DNA)						游离酶活性 (dpm/ μg DNA)						
	数	总酶	%	酶 I	%	酶 II	数	总酶	%	酶 I	%	酶 II	
正常大鼠	12	102.1 ± 3.7	100	70.7 ± 6.6	69	31.1 ± 3.7	31	261.1 ± 14.8	100	86.2 ± 11.2	33	174.9 ± 9.2	67
肝癌大鼠	10	183.3 ± 17.4	100	93.5 ± 7.1	51	89.8 ± 17.4	49	606.0 ± 23.6	100	180.2 ± 40.8	30	425.8 ± 51.0	70
显著性差别 P 值		<0.001		<0.05		<0.001		<0.001		<0.01		<0.001	

括号中数字代表测量的总次数。

表 2 PEI-纤维素薄层层析后回收的 ^3H -UR 和 ^3H -UMP/ ^3H -UR 比值

动物	数	^3H -UR (dpm/ μg DNA)		^3H -UMP/ ^3H -UR	
		I	II	I	II
正常大鼠	12	402.2 ± 46.1	791.8 ± 83.2	66.1 ± 7.4	41.5 ± 5.9
肝癌大鼠	10	451.3 ± 70.7	1386.7 ± 29.4	86.1 ± 7.6	91.9 ± 12.7
显著性差别 P 值		>0.05	<0.001	<0.01	<0.001

括号中数字代表测量的总次数。

讨 论

肿瘤组织 RNA 生物合成旺盛,可能有多方面的因素,染色质构象的改变、活性基因的开放、核内肿瘤相关蛋白的产生以及转录调节因子等都在某种程度上起一定的作用。然而就 RNA 聚合酶来说,已有学者观察到其活性或/和含量是其正常组织的数倍乃至数 10 倍^[5,6]。本实验发现, DEN 诱发的大鼠肝癌细胞内结合型 RNA 聚合酶 I 和 II 活性均高于正常的,与 Chesterton 的报道^[7]相近,表明其细胞内大量具有与编码基因结合处于转录状态的、有高催化效率的 RNA 聚合酶池,而不依赖于染色质模板的游离型酶活性的变化,进一步提示 RNA 聚合酶分子本身的含量或/和性质发生了某种变化。由于所用肿瘤组织(或细胞)的种类和实验方法的不尽一致,各实验室的报道也不尽相同^[2],但多数报道以酶 I 含量或/和活性升高为主,且有实验结果表明 RNA 聚合酶 I 活性升高的程度与细胞恶性程度成比例^[8]。

比较本文对结合型 RNA 聚合酶 I 与 II 相对活性的测量结果,正常肝细胞酶 I 的活性是酶 II 的 2.3 倍,而肝癌细胞酶 I 与 II 的活性几乎相等,这提示正常肝细胞以 rRNA 的合成占主导地位,而在肝癌细胞由 RNA 聚合酶 II 催化的特异 mRNA 的生成相对增强。

RNA 聚合酶对转录的调节表现在转录的起始和延长(抑或有终止)两个阶段上,具体表现为转录活性酶分子的多少(量)与延长转录的催化效率(质)上。本实验进一步发现,肝癌细胞 RNA 聚合酶 I 的变化仅表现在转录延长速度增快,而酶 II 的转录活性酶分子数和转录延长速度均明显高于正常细胞,这与正常肝细胞 rRNA 合成占主导地位, RNA 聚合酶 I 多以结合型存在有关,提示肿瘤细胞 rRNA 合成的调节主要表现在转录延长阶段,通过改变酶的催化性质(变构或修饰)来增强转录速度,而 mRNA 的转录调控是在起始和延长两个阶段。就酶的性质而言,磷酸化修饰对酶活性的激

活已得到人们普遍重视^[5,9]。推测肝癌细胞 RNA 聚合酶活性增高与其被蛋白激酶磷酸化有关^[10]。

摘 要

DEN 诱发大鼠肝癌的细胞核 RNA 体外转合成显著增强,染色质结合型和游离型 RNA 聚合酶 I 和 II 活性均高于正常肝细胞,而结合型酶 I 和 II 的活性几乎各占总活性的 50%(正常肝细胞结合型酶 I 约占 70%),表明 II 类基因的转录增强更明显。肝癌细胞核中转录活性 RNA 聚合酶 II 的分子数为正常肝细胞核的 1.8 倍,同时 RNA 聚合酶 I 和 II 催化转录的延长速度为正常肝细胞核的 1.3 和 2.2 倍。结果表明,肿瘤细胞不仅有较多的活性 RNA 聚合酶分子,而且催化转录(延长)的速率也增高。

参 考 文 献

- [1] Yu Fu-Li, 1980, *Biochem. J.*, 188: 381-385.
- [2] Goodlad, G. A. J. and Clark, C. M., 1988, *Biochim. Biophys. Acta*, 950: 296-302.
- [3] Goodlad, G. A. J. and Clark, C. M., 1991, *Biochim. Biophys. Acta*, 1097: 166-170.
- [4] Matsui, H. et al., 1986, *Biochem. J.*, 235: 699-705.
- [5] Jacob, S. T. and Rose, K. M., 1978, In *Methods in Cancer Research*, ed. by Busch, H., pp. 191-214, Academic Press, New York.
- [6] Rose, K. M. et al., 1981, In *Isozymes, Current Topic in Biological and Medical Research*, ed. by Rattazzi, M. C. et al., pp. 115-141, Alan R. Liss, New York.
- [7] Chesterton, C. J. et al., 1972, *Biochem. J.*, 126: 675-681.
- [8] Duceman, B. W. and Jacob, S. T., 1980, *Biochem. J.*, 190: 781-789.
- [9] Michéle, S., 1990, *Annu. Rev., Biochem.*, 59: 711-754.
- [10] Rose, K. M. et al., 1983, *Adv. Enzyme Regul.*, 21: 307-319.