



控制白蛋白和甲胎蛋白产生的分子机制 ——研究化学致肝癌物早期效应的系统

S. Sell 等

甲胎蛋白 (AFP) 的产生与发展和致癌活动相结合, 提供了一个研究了体发生和癌形成时基因表达的分子控制系统。血清蛋白—白蛋白 (ALB) 和 AFP 虽有相似的理化性质, 但们是在不同情况下产生的。在大部分胎儿期间, AFP 是主要的血清蛋白, 浓度高达 5 毫克/毫升。胚胎 AFP 主要由正在发育中的肝脏和卵黄束细胞产生, ALB 则是成年的主要血清蛋白 (在大鼠血清中含量为 40 毫克/毫升, 而 AFP 在成年血清中却难以测出 (<0.06 微克/毫升)。成年动物在局部肝切除, 或由化学药物造成肝损伤所引起的代偿性细胞增生, 与各种致肝癌化学药物接触之后, 以及患有原发性肝癌、移植性肝细胞肝癌或卵黄囊瘤的动物血清中, AFP 的浓度也都升高。

免疫荧光研究已经表明, 不同的细胞类型在不同的性形下含有 AFP。胚胎发育时, AFP 存在于发育的肝细胞中。在培养的胚肝细胞里, AFP 的产生与细胞分裂密切相关。在成年增生的情况下, 部分肝切除或毒物损伤的代偿性增生期间, 在分裂的肝细胞中 AFP 是存在的; 在接触致癌物之后, 在肝细胞的未成熟的小“卵圆细胞”和不典型“腺体样”结构中有 AFP, 而在产生 AFP 的肝癌里, 则显示在增殖的癌细胞内。因为 AFP 的产生是继成年动物接触致肝癌药物后的一种早期活动。控制 AFP 产生的分子活动可能与致癌过程有关。我们在本评论中将要提出, 用 ALB mRNA 和 AFP mRNA 的 cDNA 作为探针, 在分析大鼠正常的和肿瘤的组织中控制 ALB 和 AFP 的产生所取得的一些结果。此外, 还将简要地描述正在应用这种方法进行分析的致大鼠肝癌的模式系统。

mRNA ALB 和 mRNA AFP 的分离

由聚核糖体免疫沉淀和 RNA 分子大小的分部来

提纯 ALB mRNA 和 AFP mRNA。在 mRNA ALB 和 mRNA AFP 的分子大小测定中, 比较分泌蛋白分子前体的长度 (对 poly (A) 链的大小作校正), 我们计算出 mRNA ALB 非编码区的非 poly (A) 的碱基大约为 330 个, mRNA AFP 的这种碱基为 220 个。高纯度的 mRNAs 在有 ³Hd CTP 或 ³²Pd CTP 存在下, 经鸟类髓细胞白血病毒的反转录酶的转录得到标记的 cDNA。用碱性琼脂糖凝胶电泳分析标记 cDNA 探针的结果表明, 如果 cDNA 合成是在接近 mRNA 3' 端 poly (A) 区域处起动的, 那末大约总的转录产物的 1—5% 相当于所预期的 cDNA 全长转录物的长度。cDNA ALB 或 cDNA AFP 分别与同源的 mRNA 杂交得到单一的一级动力学, 而与异源的 mRNA 无反应。这些结果是同 cDNA 系转录自单一品系 mRNA, 而不是来自其他 mRNAs 的结论相一致。

mRNA ALB 和 mRNA AFP 的定量

使用这些探针对发育时期肝细胞和移植性肝细胞肝癌的 mRNA ALB 和 mRNA AFP 进行定量。不同年龄的大鼠肝和卵黄囊组织中 mRNA AFP 的含量表明, 每个胎肝细胞中 mRNA 分子的数目直到一周龄时, 大约维持在 10⁴ 个分子, 然而在成年肝每个细胞的 mRNA 分子数目就指数级地下降到 5—15 个。相反, 胎龄 16 天的大鼠, 每个肝细胞中 mRNA ALB 的分子数目为 2000 个左右, 但出生后两周却稳定地增加到成年的水平, 即 6×10⁴ 个分子左右。mRNA 水平的这些变化与相应蛋白在血清中浓度的变化, 以及合成速度的变化是紧密相关的。出生后 mRNA AFP 的量与血清中 AFP 浓度的比较结果见表 1。胎儿血清中 AFP 浓度与成年血清中 AFP 浓

表 1 发育的肝细胞中 ALB 和 AFP 的产生

参 数	ALB			AFP		
	一周	四周	成年	一周	四周	成年
mRNA 分子数/细胞	65,000	80,000	41,000	18,000	90	10—15
组织够出物中的合成, cpm/毫克 (总的%)	683 (10)	583 (13)	1,525 (11)	137 (2)	21 (0.5)	1 (<0.1)
血清浓度 (微克/毫升)	19,000	35,000	40,000	2,675	75	0.04

表2 移植性肝细胞肝癌 mRNA 含量和蛋白的产生

参 数	肝 细 胞 肝 癌							
	7777		8994		311		252	
	ALB	AFP	ALB	AFP	ALB	AFP	ALB	AFP
聚核糖体数/mRNA 分子/细胞	9,000	40,000	280	9,000	451	<15	<15	<15
总聚核糖体RNA的翻译活性, cpm/微克RNA (总的%)	540 (1)	6,240 (10.4)	1,144 (2.4)	3,180 (5.3)	2,281 (3.6)	1,125 (1.8)	220 (L1)	158 (L1)
组织移出物中的合成, cpm/毫克组织 (总的%)	1,473 (4.8)	2,134 (10.5)	324 (2.4)	1,211 (8.8)	1,230 (3.8)	324 (<2)	160 (<2)	132 (<2)
血清浓度(微克/毫升)	40,000	6,150	27,000	2,475	22,000	13	25,000	0.06

度的比值为 10^5 左右,而胎肝 mRNA AFP 分子数与成年肝 mRNA AFP 分子数的比值则大约为 10^3 。这 10^2 倍之高的比值差使得在翻译水平上是否也存在某种程度基因调控的可能性,成为仍待解决的问题。

肝细胞肝癌 mRNA 的量 and 蛋白合成的速度见表 2。挑选这些肿瘤来研究是因为已经知道带瘤大鼠血清 AFP 的浓度范围。所有这些研究都表明,大鼠肝和所研究的各种肝癌,主要是通过相应功能性 mRNAs 的稳定状态的浓度来调节。Innis 和 Miller(1977)和 Miura 等人(1979)在研究发育中的大鼠和小鼠系统有关控制 AFP 的合成也分别得到相似的结论。

大鼠 ALB 和 AFP 基因的初步分析

如果产生 ALB 或 AFP 的量直接关系到不同组织中 mRNA 的存在量,那末控制这些蛋白合成的关键活动可能是在翻译前。这样的控制在 DNA (基因数目或基因的重排列) 转录,或 mRNA 前体的加工等水平上都可能受到影响。为了研究第一种可能性, Sala-Trepal 等(1979)把 cDNA 探针用于测定 ALB 和 AFP 基因的数目和不同组织的基因组成。

cDNA ALB 和 cDNA AFP 与大鼠组织的 DNA 结合的动力学表明, cDNA 探针与大鼠肾,大鼠肝或 Morris 肝癌 7777 中 DNA 退火的动力学都没有差异。两种探针都不与无关的裂解型小球菌 DNA 起反应。二级比率的常数与大鼠细胞核每种基因有 1—3 个拷贝是一致的。经 cDNA 探针与大鼠肝 DNA 和肝癌 7777 DNA 杂交的饱和分析,发现肝癌和正常肝 DNA 的饱和水平之间也没有显著的差异。大鼠 ALB DNA 链为总基因组 DNA 的 1.2×10^{-6} , AFP DNA 链为总基因组 DNA 的 2.2×10^{-6} 。据估计,大鼠的基因组 DNA 有 2.8×10^9 左右个碱基对。我们可算出编码 ALB 的基因有 3360 个碱基对,编码 AFP 的基因有 6160 个碱基对。应用分别为 2265 和 2235 个核苷酸大小的 mRNA ALB 和 mRNA AFP, 估计每个单倍体基因组大约有 1.5 个 ALB 基因和 2.8 个

AFP 基因。

用限制性内切酶 Eco R1 对大鼠肝和肝癌 7777 基因组 DNA 进行酶解,分析 ALB 和 AFP 顺序的分布。在琼脂糖凝胶电泳中酶切片段按其大小分部,把这种片段再转移到硝化纤维素滤膜上与 cDNA 探针杂交,并用放射自显术作定位观察。结果是 cDNA ALB 和 cDNA AFP 杂交的标记带完全不同,但在正常肝 DNA 跟肝癌 DNA 一样, cDNA ALB 都标记在相同的带上。同样, cDNA AFP 与正常肝 DNA 和肝癌 DNA 的标记片段也相同。可是, cDNA ALB 在 Sprague—Dowley 大鼠 DNA 中产生的两条标记带(3.9 和 2.7kb)在 Buffalo 大鼠正常肝 DNA 中是没有的*。因此没有发现在肝癌组织中出现 AFP 和 ALB 基因明显的重排列。然而在 Buffalo 大鼠肝 DNA 中所见到的,而在 Sprague—Dawley 大鼠肝 DNA 中又不存在的标记的 cDNA ALB 片段的发现,提出了不同品系大鼠的 ALB 基因结构存在着不同模式的可能性。这一发现表明,来自不同品系大鼠的移植瘤不能互相比。为了测定基因结构上的差异,只能用同一品系动物的肿瘤。

目前在 ALB 和 AFP 基因结构方面正在进行着更为详细的研究。Sargent 等人(1979)用大鼠基因组 DNA 克隆片段分析已经表明, ALB 基因至少含有 13 段插入的非编码顺序(内涵子)。全部 14 段编码片段(外显子)和 13 个内涵子只占据 14.5kb 基因组 DNA 的极小部分。Tilghman 等人(1979)用 AFP mRNA 的 cDNA 探针分析小鼠基因组 DNA 的限制性酶解

* 经查阅本文作者所引用的 Sala-Trepal 等人的报道(Proc Natl Acad Sci USA, 76: 695, 1979)其结果是:在 Buffalo 和 SD 两个品系大鼠癌脏 DNA 酶切片段中,都出现 10 条 cDNA ALB 的标记带,但前者 4.3 和 1.9kb 的两条带在后者中不存在,而后的 3.9 和 2.7kb 的带在前者中也未出现。

表3 正常成年大鼠肝和肝癌 7777 中 mRNA ALB 和 mRNA AFP 的亚细胞分布

RNA 分部	每个细胞的分子数目			
	正常肝		肝癌 7777	
	ALB	AFP	ALB	AFP
总的细胞	23,000	10—15	7,500	25,000
细胞核	100	1	16	65
聚核糖体	22,600	10—15	6,400	24,000
次一聚核糖体	130	1	80	40

片段,证明 AFP 基因中至少有两段插入顺序。我们实验室里正在进行的有关研究表明,有很高数目的阻断 AFP 编码顺序的内涵子。

信使 RNA 顺序的亚细胞分布

表3所列是正常成年肝和肝癌 7777 亚细胞 RNA 制备物中 mRNA ALB 和 mRNA AFP 的分布。几乎所有的细胞 mRNA 链都存在于聚核糖体 RNA 部分。白蛋白 mRNA 在细胞核中或次一聚核糖体部分几乎是难以测出。正常成年肝细胞中的 10—15 个 mRNA AFP 分子,基本上能在聚核糖体部分回收。即使在肝癌 7777 的不同亚细胞部分中, mRNAs 的绝对量也截然不同于正常肝,但十分明显 mRNA 的相对分布量却是相似的,即全部可测的 mRNA 活性主要存在聚核糖体 RNA 部分。

化学诱发大鼠肝癌的发生

化学致癌物的作用机制是不清楚的。诱发肿瘤的模式,例如大鼠与致肝癌化学药物接触表明,其过程既复杂又包括一系列的积累过程。Teeber 和 Becker (1971) 已经广泛地分析了致肝癌药物 N-2-乙酰氨基氟(FAA)的连续作用。大鼠与 FAA 接触在发育为明显的肝细胞肝癌之前就产生了一系列可逆的形态学和生物化学变化。其最早可识别的效应之一是 AFP 在血清中浓度的持续增加。用这种动物的肝脏作免疫荧光分析表明,AFP 常常见于新形成的称为“卵圆细胞”的小细胞中。稍后,甚至继续与致肝癌药物接触,在血清 AFP 浓度下降中又有其他损伤发展,包括大的 AFP 阴性的“癌前期”结节和 AFP 阳性的非典型的“腺体样”增殖区域。这些变化与肝细胞肝癌原初细胞之间的关系还不明确。应该这样设想,这些新形成的细胞群体的任何一种,以及形态上还没有改变的细胞,都可能是癌前细胞(图1)。

肝细胞肝癌可能来自正常肝细胞、结节细胞、卵圆细胞或不正常增殖的区域。这些细胞类型间的关系还不清楚。肝细胞结节和象是正常的肝细胞不含 AFP,可能是 AFP 阴性肿瘤的前期细胞。卵圆细胞和不正常的细胞含有 AFP,很可能是 AFP 阳性肿瘤的前期细胞。

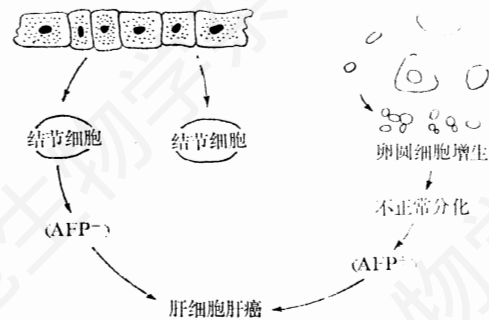


图1 化学诱发肝细胞肝癌可能的癌细胞起源

许多人对于 FAA 在体内和体外的代谢研究表明,原初化合物 N-2-苄基醋酰胺实质上要经过羟基化和酯化,形成一种结构结合到细胞分子上的亲电性近似致癌物。尽管 FAA 的这种代谢产物能与细胞内各种蛋白以及 RNA 相结合,很可能这种最终的致癌物质结合到 DNA 或染色质上是关键性的过程。这种致肝癌物对肝组织的特异性则归因于这一事实,即肝脏是致肝癌药物代谢的主要场所。这种有活性的代谢物存在的时间很短,因而最可能作用于那些能够代谢这种致癌物的细胞。

致癌物结合到 DNA 分子上可能改变基因的表达。长时期致癌物的作用,使受影响的细胞解脱了在长控制效应,从而出现肿瘤细胞的不断增殖,并存活下来。通常 AFP 的产生是同增殖活动(即胚胎生长,成年肝损伤和局部肝切除之后肝细胞的代偿性增殖)密切相关。因此,使正常情况下不活动或不表达的 AFP 基因活化,可能同化学致肝癌物的作用有关。了解这是怎样发生的,将为致癌物如何诱发肿瘤提供关键性的资料。

从最初接触致癌物直到发生恶性肿瘤需要长的时期(直到 40 周)。这个事实就使得了解致癌物的早期效应复杂化了。分析这种肿瘤和“癌前”损害的特征,已经对这种致癌物是怎样起作用的产生了一点见解。了解这种早期效应是十分重要的。在接触化学致肝癌药物—FAA—定时间之内产生 AFP 的事实,为这种致癌物在控制蛋白产生的分子机制的研究方面提

供了一个系统。

迄今,对正常肝和一些移植性肝细胞肝癌的分析,还没有揭露出在 AFP 产生机制中存在着可以识别的差异。正常的或恶性的组织所产生 AFP 的量,是与存在于产生 AFP 细胞中 mRNA 的量直接相关,而在产生 AFP 的肿瘤中并没有基因数目和基因重排列的不同的证据。进一步探索控制 AFP 产生的分子机制,目前正在正常的产生状态和病理的产生状态两个方面进行。在未来的工作中,我们将集中在早期接触致癌物后产生 AFP 的细胞。含有 AFP 的细胞首先出现在卵圆细胞的新群体之中。

近来,Shinozuka 等人(1978)已经看到,用缺乏胆碱食物喂养的大鼠,在与致癌物接触几周内就出现大量的卵圆细胞和血清中高浓度的 AFP。在初步的研究中,我们已经能够在缺乏胆碱食物的 Fisher 大鼠接触 FAA 后的肝脏中,诱导出大量的卵圆细胞。在接触 FAA 两周以后的七天内,这些细胞就很快地出现。过半数的肝脏是由小细胞和许多含有 AFP 的这些细胞所组成。因为很可能并非所有肝细胞在 FAA 处理以后都产生 AFP,所以在这些新细胞群体中 AFP 的定位就允许我们把注意力集中在这些

含有 AFP 的细胞方面。这些细胞远小于正常肝细胞,可以用密度梯度技术把两种细胞分开。肝癌中不同细胞群体的分子分析,包括使用放射性标记 mRNA 探针的原位杂交分析,目前正在进行之中。

然而,即使没有弄清 FAA 的作用机制,也不能认为其他致肝癌药物也有同样的作用。尽管随着接触各种化学致肝癌药物之后都有一些 AFP 表达,但血清 AFP 升高的动力学却因不同的致癌物而完全不同。此外,一些致癌剂,如重氮乙酰丝氨酸和 My14643,虽诱发肝癌而血清中 AFP 并不升高,其他像二乙基亚硝胺,却在每个生癌动物中都引起 AFP 上升。而别的致癌物,如 FAA 所诱发的肝癌,有一些产生 AFP,也有一些又不产生。

因此,化学致癌物作用的复杂性以及因产生肿瘤才表明它们的效应所需要的时间长,使得研究其作用机制很困难。然而了解在接触致癌物后致使 AFP 基因表达的分子活动的过程,可能成为认识化学药物致肝癌作用的重要的第一步。

[李明摘译自(*Cell Biology International Reports* 4:235—254, 1980)姚曾序校]



瑞典 Pharmacia 公司在沪举办 细胞生物学新技术讲习班

四月初,瑞典 Pharmacia 公司 Oldentoff 先生和 Bartlett 博士前来上海细胞生物学研究所举办细胞生物学新技术讲习班。沪、杭、宁、苏地区有关科研机构和高等院校的 100 名人员听了讲座,有 54 人观摩了示范实验并进行了实验操作。讲座内容包括:应用一种新的密度梯度介质 Percoll 分离细胞、细胞器、细菌及病毒细胞亲和层析方法;细胞学研究中 Lectins 和 Protein A 的应用;Cytodex 1 应用于大量繁殖细胞等。瑞典外宾示范了用微量泵制备 Percoll 的连续密度梯度,指导学员应用 Percoll 非连续密度梯度分离人血细胞和利用超离心制备 Percoll 的连续密度梯度以及从酸牛乳中分离乳酸菌。与会者对这些新技术很感兴趣,在讲习班期间,就其讲座内容和实验操作与外宾进行了较为热烈的讨论。

瑞典 Pharmacia 公司出品的 Percoll 引起大家极大兴趣。Percoll 是由硅胶包被 PVP 所组成,它是一种无菌、无毒的稳定的密度梯度介质。它具有十分低的粘稠性,极低的渗透性,不渗入生物膜等独特的优点。Percoll 业已成功地应用于广泛范围的细胞和颗粒的分离,其中包括人血细胞、小鼠 L 细胞、海洋微小浮游生物、大鼠肝溶酶体和病毒颗粒等等。甚至具有活性的整个胰岛也被分离。上海细胞生物学研究所的部分与会者已尝试应用 Percoll 分离畸胎瘤细胞、大鼠肝癌细胞、鸭血中单核样细胞以及小鼠 T 淋巴细胞,获得了可喜的结果。不少与会者正在索取样品,着手移植新技术。

(中国科学院上海细胞生物学研究所陆荣华、李永镛)