



SHENGEWUJIAHUAXUEYICONG

生物化学译丛

第 2 辑

生物化学译丛

(第二辑)

上海第一医学院编

*

上海科学技术文献出版社出版

(上海高安路六八一号)

新华书店上海发行所发行

浙江洛舍印刷厂印刷

*

开本: 787×1092 1/16 印张: 5.5 字数: 134,000

1980年7月第1版 1980年7月第1次印刷

印数: 1—4,100

书号: 13192·11 定价: 0.71元

《科技新书目》 164—114

目 录

肿瘤的生化诊断.....	1
用作药物的酶.....	11
细胞色素 P ₄₅₀ 羟化酶系的再造和今后的问题	15
有关维生素 D 代谢和作用的基础和临床概念 (一)	22
有关维生素 D 代谢和作用的基础和临床概念 (二)	29
代谢调节剂: 果糖-1,6-二磷酸	38
蛋白质磷酸化的代谢调节和疾病.....	45
入胞作用.....	55
禁食对人体血清与尿液中游离和酯化肉毒碱浓度水平的影响.....	67
γ -谷氨酰转移酶和癌前细胞.....	70
环核苷酸和细胞内分布.....	71
胎期类固醇的产生.....	72
肾上腺、性腺的类固醇激素的合成与代谢.....	76
用两相凝胶电泳分析比较大鼠肝脏、Novikoff 肝组织中数量众多的 胞液蛋白质.....	77
简便的小型双向等电聚焦-SDS 凝胶电泳法	83
化学光免疫测定.....	85

肿瘤的生化诊断

——对肿瘤的比较特异的其他检查法

多胺 (Polyamine)

远藤康夫 鲛岛启二郎

多胺的发现始于 1678 年 Leeuwenhoek 在精液中发现精胺的磷酸盐结晶。其后阐明多胺在细菌、植物、动物组织、生物界中广泛分布。近年来进行了细菌或动物组织中多胺代谢及其生理作用的研究,特别是发现多胺与核酸及蛋白质代谢有密切的关系,因而引起重视。特别是 1971 年 Russell 等报告在癌患者尿中多胺排泄增加以来,就把癌的临床诊断与多胺的作用联系在一起了。

多胺是一些含三个胺以上的非蛋白含氮化合物。代表性的是精胺 (Spm)、精脒 (Spd),但一般将其前身物二胺中的腐胺 (Put) 亦包括在内。

1. 多胺的代谢

腐胺是由鸟氨酸经鸟氨酸脱羧酶 (ODC) 的作用而形成的。腐胺与被脱羧的 S-腺苷-甲硫氨酸反应生成精脒,精脒再与一分子的氨基丙基形成精胺。精脒的合成与精脒合成酶有关,精胺的合成与精胺合成酶有关(图 1)。这些酶主要分布于细胞液部分。多胺合成的重要的限速酶是鸟氨酸脱羧酶和 S-腺苷-甲硫氨酸脱羧酶。

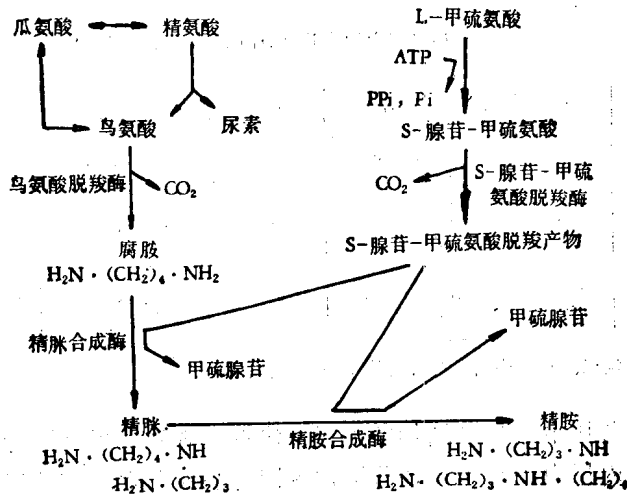


图 1 动物组织中多胺的合成途径

在动物组织中一般精胺、精脒比腐胺含量高,尤其是在核酸、蛋白质合成旺盛的胸腺、骨髓、前列腺、唾液腺等多胺浓度高的组织中。正常肝脏中的多胺合成相当低,而部分肝切除引起的大鼠再生肝中可见到多胺的显著变化。在切除后,鸟氨酸脱羧酶活性开始上升,

16小时内达正常肝的20~40倍。与此相一致的也可发现肝腐胺浓度的上升,4小时增至5倍,其后渐减,6~7日恢复至对照值。精脘较腐胺上升得迟,第10小时开始增加,24小时增至2倍,这比RNA的高峰出现得早些。上升的精脘直到14天后仍显高值。精胺在手术后一度低下,第二天为对照的40%,其后渐增,第14天约达2倍。

肿瘤细胞的增殖也与多胺有密切的关系。以大鼠肝癌为例,增殖越快的肿瘤其鸟氨酸脱羧酶活性就越高,腐胺浓度也高。肝癌的增殖速度与鸟氨酸脱羧酶活性、腐胺水平较平行。肝癌鼠精脘水平虽高,但不一定与增殖速度相关,其精脘/精胺比值与增殖速度相关联,即增殖速度高的,其精脘/精胺比值亦高。

以4-DAB(4-二甲氨基偶氮苯)诱发肝癌时,大鼠肝鸟氨酸脱羧酶活性一个月增至约6倍,S-腺苷-甲硫氨酸脱羧酶(SAMDC)亦增至2倍,第二个月减少,第四个月重又增加,至肿瘤发生时呈持续高值。腐胺量也与鸟氨酸脱羧酶大致平行,增至约二倍。尿中多胺的排泄此时亦增加。

多胺的生理作用有促进培养细胞增殖的作用,促进脂肪组织对葡萄糖的摄取,促进蛋白质、核酸的合成等作用。其对蛋白质、核酸合成的促进作用在无细胞系统中亦可发现。

2. 癌与多胺

如前所述,在再生肝和增殖旺盛的肿瘤中,随着鸟氨酸脱羧酶活性的上升可见到组织中多胺的增加。1971年Russell等测定了尿中的多胺,表明在癌患者尿中多胺的排泄增加。外科切除癌后多胺排泄减少,近于正常值。在白血病急性期尿中多胺排泄显著增加,缓解期则排泄减低,故可作为观察病情进展情况的指标。竹田等及藤田等测定了尿中的多胺,发现到血液疾患及实体癌患者的多胺增加。应用抗癌剂前尿中多胺排泄量特别以造血系统的恶性疾患为高,是正常的2~3倍。实体癌一般高于正常值,尤以有广泛转移者为甚。表1为最近Russell的资料。Russell等指出尿中多胺可作为判断抗癌剂有效性的指标。治疗

表1 癌患者尿中的多胺(治疗前)(毫克/克肌酐)

	腐 胺 平均±SD 范 围	精 脘 平均±SD 范 围	精 胺 平均±SD 范 围
血液恶性疾患	4.4±0.66* 0.45~38 (n=59)	3.7±0.70* 0.58~25 (n=54)	0.8±0.32* 0.25~8.0 (n=53)
实 体 癌	3.7±0.39* 0.29~10 (n=29)	2.7±0.54* 1.09~8.1 (n=30)	0.6±0.28* 0.12~3.7 (n=30)
健 康 人	2.1±0.62 0.40~5.5 (n=16)	1.2±0.13 0.40~2.1 (n=16)	0.04±0.007 0.02~0.3 (n=16)

* 健康人与血液恶性疾患、实体癌间呈有意义的差别(P<0.001)

开始后24~28小时若尿中有精脘增加则表明抗癌剂有效地作用于肿瘤细胞,使其崩解。因此,当48小时以内尿中未见精脘显著增加者即有必要考虑改变抗癌剂。实验表明发展迅速的大鼠3924A肝癌投与5FU或行局部放疗36小时内血中精脘可增至对照组的二倍以上,肿瘤组织中的精脘则相应地减少。因此可以看出血中精脘的增加是由癌细胞的崩解而来。

Russell最初是用盐酸将多胺水解后用高压滤纸电泳分离多胺,再用茚三酮显色测定。鲛岛改用CMC层析将二胺与多胺分离,用荧光红荧光显色之后,以高速液体层析法分离

测定。此法测定结果如表 2。有的肝癌病例腐胺有所增加。

表 2 血清中二胺及多胺值

	腐胺 nmol/毫升 血清		尸胺 nmol/毫升 血清		精脍 nmol/毫升 血清	
	总 量	游 离	总 量	游 离	总 量	游 离
健 康 人 (n=13)	0.29±0.08* (0.20~0.44**)	0.17±0.05	0.11±0.08 (0.03~0.32)	0.03±0.03	0.43±0.15 (0.24~0.59)	0.21±0.04 (n=4)
慢 性 肝 炎 (n=10)	0.37±0.13 (0.22~0.65)	0.16±0.10	0.11±0.04 (0.03~0.21)	0.06±0.03	0.32±0.12 (0.26~0.38)	0.20±0.10 (n=4)
肝 硬 化 (n=8)	0.26±0.05 (0.21~0.40)	0.14±0.06	0.06±0.04 (0.02~0.18)	0.03±0.02	0.29±0.07 (0.26~0.37)	0.18±0.04 (n=4)
肝 癌 (n=4)	0.50±0.18 (0.29~0.76)		0.15±0.10 (0.04~0.17)		0.42±0.15 (0.34~0.49)	

* 平均±SD ** 范围

γ-谷氨酰转肽酶同功酶

泽武纪雄等

1. 实验性肝癌时的 γ-谷氨酰转肽酶 (γ-GT)

成熟哺乳动物中本酶的脏器分布是肾脏中最高，胰次之，肝中的活性非常低。对大鼠 γ-GT 的脏器内分布进行个体发生学的探讨结果表明肝脏中 γ-GT 活性在胎生期最高，随着生长分化，其活性逐渐减低。在成熟肝中其活性约为胎生肝的 $\frac{1}{30} \sim \frac{1}{50}$ 。

对种种致癌物引起实验性肝癌的发癌过程进行的时相性观察结果表明，在尚未发癌的结节性增生期即已出现了细胞质、细胞膜 γ-GT 活性增强的现象，随着癌化的进行，其组织化学的染色性逐渐增强，生化学上也有一致的变化。谷口氏等阐明从 3'-MeDAB(3'-甲基二甲氨基偶氮苯)诱发的大鼠肝癌组织精制的 γ-GT 与由大鼠胎生期肝脏精制的 γ-GT 在酶学性质和免疫学性质上是一样的。这样，由实验性肝癌的结果来看，本酶与甲胎蛋白一样具有癌胎儿蛋白的性质，特别是在结节性增生时期出现强活性，这在研究癌前期病变以及早期肝细胞癌上是有意义的。

2. γ-GT 同功酶的检出法

自 1965 年 Kokat 和 Kuska 首先报告血清 γ-GT 存在着电泳迁移率不同的同功酶以来，试用了各种支持物的电泳，其活性带数及位置各有不同。

作者使用分离效果最佳的聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳，350V 定电压下泳动 3.5 小时或 125V 下泳动 15 小时。底物 γ-glutamyl-α-naphthylamide 可用琼脂糖“夹馅”固化法以节约试剂。

3. 各种疾患时血清 γ -GT 同功酶

用作者等的方法可将血清 γ -GT 分成十二个区带, 自阳极侧命名为 I ~ XII, I 与 II 在健康人浓缩血清中亦可发现, 可能是基本区带。阻塞性黄疸和肝恶性肿瘤时迁移率小的 VII_b、VII_c、VII_a、VII_b 部分的出现率比其他疾患明显为高, 但也无明显的疾患特异性。

另一方面, 血浆铜蓝蛋白区域出现的第 I 部分, 在肝细胞癌 97 例中有 36 例(37%)可以检出, 肝内胆管癌、转移性肝癌也含有, 而其他疾患则尚未见阳性例(表 3)。

表 3 各种疾病病人血清中特异的 γ -GT 同功酶的出现

疾 病	病 例 数	病 人 特 异 区 带 号 数	
		I	I'
肝 细 胞 癌	97	36	26
胆 管 癌	5	0	0
肝 转 移 癌	31	0	0
肝 硬 化	39	0	0
慢 性 肝 炎	40	0	0
慢性乙醇性肝损害	21	0	0
亚 急 性 肝 炎	6	0	0
急 性 肝 炎	16	0	0
肝 内 胆 汁 淤 积	14	0	0
胆 管 癌	12	0	0
胆 石 症	25	0	0
胰 腺 癌	9	0	0
	315	36	26

限定于血清 γ -GT 活性达 100mU/毫升以上的病例, 其阳性率达 57%。此 36 例中有 26 例同时在 I 与 II 部分间, 在 II 近傍有一条 I' 带。其他疾患则不能发现 I' 带。I 与 I' 可能是肝细胞癌中的特异性同功酶。

藤泽等将 7.5% 聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳的凝胶柱分成三十等分, 由其酶提取液的 γ -GT 活性值求出酶谱分为四条活性带, 在 α -球蛋白区域的活性带是肝细胞癌患者血清中特异的同功酶, 这在肝细胞癌组织和胎儿肝中也存在。作者等发现在肝细胞癌中特异的同功酶 I 及 I' 是在 α -球蛋白部分, 然而在各种疾患及健康人浓缩血清中亦可见到的 I 及 II 也是在 α -球蛋白区域, 因而同是 α -球蛋白区域的同功酶也有必要区别其是肝细胞癌中特异性的 I 及 I' 抑或是非特异性的 I 及 II。

4. 各种组织中的 γ -GT 同功酶

将剖检时得到的各脏器的匀浆用 $25,000 \times g$ 离心 15 分钟, 上清作为组织提取液进行 γ -GT 同功酶的分离测定, 结果在肝脏、总胆管、胰脏、附睾、小肠等部位第一部分有尖锐的活性带, 在第 III 部分开始向阴极侧见一宽的活性带。在正常肝中未见与特异活性带 I 和 I' 相一致的活性带, 另一方面, 在肾脏则发现了大致与 II 相一致的活性带及 V ~ VII 的宽活性带。总之, 除肾外并未发现其他脏器有脏器特异性的活性带。在胆汁、胰液、尿液

中的同功酶可得到与各产生脏器相一致的同功酶谱。

肝细胞癌和胎儿肝的组织提取液具有相同的 γ -GT 同功酶谱, 在第 I 部分均有细锐的活性带。从第 II 部分起向阴极侧有宽的活性带。把样品长期放置使其自行溶解后或添加正常新鲜人血清再进行电泳时可清楚地出现与特异活性带 I、I' 相一致的细锐活性带。在非癌部位的肝提取液中不能检出特异的活性带。由上述探讨可推测在肝细胞癌病人血清中见到的特异活性带是起源于肝癌细胞的, 通过某种机制低分子化而出现于血清中。此种特异活性带与胎儿肝中所见的相一致, 说明在人此同功酶具有癌胎儿性蛋白的性质。

5. 肝细胞癌中特异性 γ -GT 同功酶的性质

使用调整用电泳装置得到的分段部分精制的第 I 带与有高 γ -GT 血症的非癌性肝病患者血清中的第 I 带, 这两个组分的酶学性质加以比较的结果如表 4。其对 γ -glutamyl-P-nitroanilide 的 K_m 值、最适 pH 等在二者均无差别。而在 56°C、58°C、60°C 下测定其比活性以观察其耐热性时发现在任一温度及时间都是“II”比“I”高, 即是“II”耐热性高。 Mg^{++} 、 Ca^{++} 等两价离子可使酶活性上升, Zn^{++} 离子显著抑制酶活性, 金属离子的影响在二者间未见差别。免疫学实验表明特异活性带 I 起源于肝细胞, 与胎儿肝中的 γ -GT 同功酶具有同样的免疫学特性, 证明它们与甲胎蛋白同样是癌胎儿蛋白。

表 4 理化学性质

			I 带	I 带
对 γ -glutamyl-P-nitroanilide 的 K_m			1.7mM	1.8mM
热 稳 定 性			(+++)	(+)
最 适	pH		8.0	8.0
阳离子作用	无		100%	100%
(mol)	Mg^{++}	10^{-3}	115%	103%
		10^{-1}	140%	126%
	Ca^{++}	10^{-2}	109%	119%
	K^+	10^{-1}	97%	100%
	Na^+	10^{-1}	96%	99%
	Zn^{++}	10^{-2}	21%	22%
	EDTA	10^{-1}	93%	94%

不饱和脂肪酸

荒木英尔 冈崎伸生

肝细胞癌病人的肿瘤组织、血清中分别可检出 75%、38% 这样频度的 $C_{20:3\omega 9}$ 等非生理性不饱和脂肪酸异性体。此不饱和脂肪酸之一的 $C_{20:3\omega 9}$ 只出现于甲胎蛋白阳性的肝细胞癌组织和血清中。在裸鼠移植肝癌组织中, 即使宿主饲以高亚油酸食, 仍可长期继代移植, 因此本脂肪酸可能是肿瘤时特异的代谢所产生者。

1. 癌患者、诱发癌宿主中血清脂肪酸的组成

1) 一般性变化 在癌患者或诱发癌的动物的血清发生乳浊者并不少见。这说明甘油三酯(或非酯脂肪酸)增加。而就脂肪酸组成上, 深泽、高桥报告 5 例肝癌中胆固醇酯的构成为: 脂肪酸内 $C_{16:0}$ 、 $C_{16:1}$ 、 $C_{18:1}$ 增加, $C_{18:2}$ 、 $C_{20:4}$ 等减少, 磷脂中 $C_{16:0}$ 、 $C_{16:1}$ 、 $C_{18:1}$ 增加, $C_{18:0}$ 及高度不饱和脂肪酸有减少的倾向。

关于与癌相伴随的高脂血症的成因, 迄今有诱发癌机体的澄清不全而致血中脂质呈持续高浓度的学说、脂肪酸作为肿瘤的能源被利用而从脂肪组织动员的学说。

关于脂肪酸与肿瘤能量代谢的关系 Weinhouse 等的研究结果表明, 在发展缓慢的分化型肝癌中, 丁酸、软脂酸几乎不能转变成 CO_2 和乙酰乙酸。 β -羟基丁酸脱氢酶活性(单位/克组织)在肝组织为 16, 在癌的高度分化型、分化型、非分化型则分别为 5, 3, 0。另一方面酰基辅酶 A 合成酶的活性在分化程度最高的肝癌时显最低值。亦即高度分化型的肝癌主要是将脂肪酸氧化, 对葡萄糖的利用少; 而发展迅速的非分化型肝癌几乎失去氧化脂肪酸的能力, 代之而具有利用葡萄糖的能力。人的肝癌也可能依分化程度而以脂肪酸的氧化作能源。

2) 特异性的变化 1968 年作者等对小儿肝癌和胎儿肝组织并行地进行分析, 在其组成脂肪酸中发现了非生理性脂肪酸。用气相层析、硝酸银薄层层析、气相层析-电子冲击质量分析法等判明其为 $C_{20:3\omega9}$ 非生理性脂肪酸。如表 5 所示 $C_{20:3\omega9}$ 在 24 名肝细胞癌患者中有 9 名出现, 占 37.5%。此外, 在转移性肝癌、急性肝炎、肝硬化及胃癌、结肠癌、肺癌、乳癌、宫颈癌与健康人中均未检出。另一点值得注意的是 $C_{20:3\omega9}$ 只能在甲胎蛋白阳性的肝细胞癌中检查得到。用单纯免疫扩散法测定甲胎蛋白阳性(400 毫微克以上)的 19 例中有 9 例的血清检出了 $C_{20:3\omega9}$, 阴性 9 例中完全不能检出。

表 5 血清脂质中 $C_{20:3\omega9}$ 的出现

	例 数	$C_{20:3\omega9}$ 出 现 例	
		数	百 分 率
肝 细 胞 癌	24	9	37.5
转 移 性 肝 癌	18	0	0
肝 硬 化	10	0	0
健 康 人	105	0	0

2. 癌组织中的脂肪酸代谢及其组成的变化

1) 癌组织中的脂肪酸代谢 Spector 用 Ehrlich 腹水癌、白血病细胞等进行了一系列的研究发现在肿瘤细胞中不能合成其迅速生长所必要的脂肪酸, 其 97% 是由腹水中的脂肪酸-白蛋白复合体中摄取, 直接进行酯化或氧化, 另一方面, 在 Morris 肝癌的某系中还具有合成相当量的脂肪酸的能力。

关于脂肪酸合成的调节, 在正常肝脏随着营养条件的变化, 脂肪酸的生物合成可有 4~17 倍这样大幅度的变动, 而在肝癌组织中上述条件却全无影响。但在无细胞系的实验中由醋酸合成脂肪酸的酶无论在肝脏或肝癌都同样存在, 其生物合成亦正常进行。

2) 癌组织中的脂肪酸组成 实验性肝癌、人肝细胞癌的组织中甘油三酯、游离脂肪

酸或胆固醇等增加,甘油磷脂则有减少倾向。在总脂肪酸组成上可发现单不饱和脂肪酸增加及 $C_{18:2}$ 和高度不饱和脂肪酸的减少。在脂质各成分失去固有的脂肪酸谱,各自出现共同性的变化——单不饱和脂肪酸增加, $\omega 6$ 系不饱和脂肪酸减少。此倾向不仅见于人肝癌组织,在小白鼠、豚鼠等的肝癌也同样出现。

3) 肿瘤组织中非生理性脂肪酸的检出 在人的肝细胞癌中除上述变化之外,在患者体液和原发肿瘤及转移肿瘤组织中还有以 $C_{20:3}$ 等不饱和脂肪酸的非生理性异性体的出现。其后用化学离子化质谱层析总共发现 12 种非生理性不饱和脂肪酸的异性体。其中 $C_{20:3}\omega 9$ 在肝细胞癌组织中的检出率约为 75%,在患者血清中约为 38%,连续切片表明肿瘤组织中心部 $C_{20:3}\omega 9$ 出现率高,周围的肝硬化组织中出现率低。

4) 脂质各成分中非生理性脂肪酸的分布 $C_{20:3}\omega 9$ 在肿瘤组织的甘油磷脂特别是磷脂酰乙醇胺、磷脂酰胆碱的第 2 位碳上分布率高,在真脂各成分中亦存在。

5) 裸鼠移植人肝细胞癌中非生理性脂肪酸的存在和继代性 在向裸鼠移植的人肝细胞癌组织中,剖检时采取的组织存在 $C_{20:3}\omega 9$ 者,移植后此 $C_{20:3}\omega 9$ 即被保持下来,但在诱发癌小鼠肝中却完全检查不到。这种倾向在给 50% 以上的高亚油酸食饲养的条件下亦可维持 30 代以上。 $C_{20:3}\omega 9$ 在脂质中的分布是磷脂酰乙醇胺 > 磷脂酰胆碱 > 胆固醇酯,这与手术切下的肝细胞癌组织中的所见是同样的。上述事实表明肝细胞癌中 $C_{20:3}\omega 9$ 的出现不单是基于必需脂肪酸的缺乏,而且是由肿瘤组织本身所产生的。

6) 甲胎蛋白与 $C_{20:3}\omega 9$ 出现之间的关系 胎生三个月前期的人肝组织中发现的 $C_{20:3}\omega 9$ 还可以在甲胎蛋白阳性的肝细胞癌中检出。此外未发现二者直接有关的研究结果。有人认为甲胎蛋白对不饱和脂肪酸有极强亲合性,甲胎蛋白合成需它们作原料,引起这些脂肪酸缺乏,代偿地导致 $C_{20:3}\omega 9$ 的增加。

维生素 A 酸结合蛋白

武藤泰敏 大森正英 四童子好広 佐藤真由美

1926 年 Fujimaki 发现缺乏维生素 A 的大鼠易患胃癌,这是世界上首先发现的发癌的个体代谢因子。事实上癌组织局部处于维生素 A 缺乏状态。最近作者观察到在原发性肝癌中维生素 A 含量比非癌部位显著减低。Saffiotti 等报告投与维生素 A 酯可抑制苯并芘所诱发的肺癌的发生。长期投与维生素 A 可引起中毒,因而使用在人体内没有积蓄作用的维生素 A 酸,进而使用毒性小而能有效地达到癌组织的各种衍生物,总称类视黄醛 (retinoids)。

维生素 A 酸在体内是由维生素 A 生成的,但决不能再被还原 (维生素 A 氧化酶作用不可逆)。因此,当给动物投与维生素 A 酸时不能形成视紫质而导致动物失明,而且也不能维持生殖机能。另一方面维生素 A 酸也可维持上皮组织的生长分化,保持动物的生长。关于体内维生素 A 的转运方式从其特异性结合蛋白 (Retinol-Binding Protein) (RBP) 方面已逐渐阐明 (图 2, 表 6)。

图 2 中:维生素 A 的特异性结合蛋白 (RBP: 分子量 20,000) 在肝细胞中合成,主要在肾脏中被分解。由肠道吸收的维生素 A 由乳糜微粒运输,以酯的形式在肝中储存。另一方面维生素 A 向末梢组织的转运与 RBP 有关,形成结合型而分泌入血液。在血中 RBP 与前清蛋白 (PA: 分子量 55,000) 形成蛋白。蛋白复合体,这种复合体的形成可能是防止

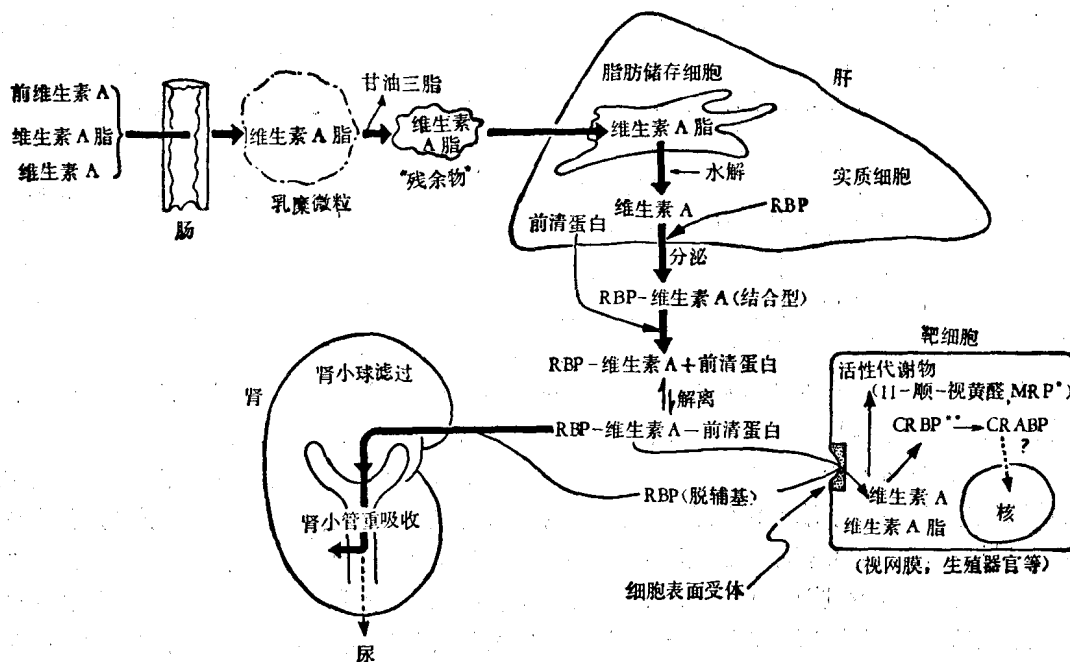


图 2 从 RBP 来看体内维生素A的代谢(说明见正文)

* MRP: (甘露糖-维生素A-磷脂复合体)

** CRBP: (细胞内维生素A结合蛋白)

维生素A从肾中滤出的有效形式。但 RBP 也有一部分解离，它可看做为一个活泼的代谢池，肾小球滤过之 RBP 几乎全被从肾小管再吸收，靶细胞膜面上有 RBP 受体，通过受体控制维生素A的摄取，细胞内维生素A的转运与 CRBP 有关。

表 6 血清及细胞内维生素A结合蛋白的种类

	血 清	细 胞 上 清 (胞液)
维 生 素 A	RBP(在血中与PA形成蛋白-蛋白复合体)	CRBP(与维生素A结合)
维 生 素 A 酸	白蛋白(在体内由白蛋白运输)	CRBP(F)(可与维生素A、维生素A酯结合) CRABP(与维生素A酸结合)
维 生 素 A 酯	脂蛋白(β -脂蛋白)	?

1. 细胞内的维生素A结合蛋白(CRBP 与 CRABP)

血清 RBP 是 1968 年金井等最先从人血清中分离精制出来的。细胞内维生素 A 结合蛋白 (CRBP) 是 1973 年 Chytil 学派发现的。最近 Ong 及 Chytil 由大鼠肝 1.4 公斤/提纯约 3,500 倍，得到单一的 CRBP 样品 (9毫克)，其分子量为 14,600，可按 1:1 的 mol 比与维生素 A 进行非共价结合，解离常数为 $1.6 \times 10^{-8} \text{M}$ 。此样品与大鼠血清 RBP 的抗血清不显免疫学的交叉性，紫外光谱、氨基酸组成等均表明其为单一的物质。

对于细胞内维生素 A 酸结合蛋白 (CRABP)，Sani 和 Hill 及 Ong 和 Chytil 等同样地进行了探讨，认为其分子量为 14,500~17,000 (与 CRBP 大致相同)，但二者可用 DEAE-纤维素柱分离，故 CRBP 与 CRABP 可能是不同的蛋白质。Ong 和 Chytil 指出在成熟大

鼠 CRBP 除肌肉血清以外几乎存在于所有脏器中, 而 CRABP 则只限于生殖器官(睾丸、卵巢)、眼、脑、皮肤等器官; CRABP 及 CRBP 在胎生期除血清外几乎存在于所有脏器中(表 7)。在胎生期一般 CRABP 高, 出生后著减, 但在肺内生后第 10 天有一高峰, 恐与肺泡形成有关。

表 7 胎生期及成熟大鼠细胞内维生素A结合蛋白脏器分布

脏 器	CRBP		CRABP	
	胎 生 期	成 熟	胎 生 期	成 熟
脑	+	+	+	+
眼	+	+	+	+
皮 肤	+	+	+	+
肝	+	+	+	-
肺	+	+	+	-
肾	+	+	+	-
肠	+	+	+	-
心	+	-	+	-
骨 骼 肌	+	-	+	-
血 清	-	-	-	-

* Sani 和 Corbett 未检出, 另外成熟大鼠睾丸、卵巢、气管中 CRABP (+), 子宫、膀胱、前列腺、乳腺亦有少量 CRABP(+)

2. 肿瘤组织中的CRABP

1) 人癌组织的 CRABP Chytil 学派不仅在人乳癌及肺癌中分别发现了在正常组织中检查不到的 CRABP, 而且在大白鼠胎生期的肺中也检出了 CRABP。这说明它很可能是一种癌胎儿蛋白 (onco-fetal protein)。作者等在原发性肝癌组织中检出了 CRABP, 在非癌部位则不存在, 在神经胶质瘤的癌组织中 CRABP 水平高。

2) 肿瘤株细胞的 CRABP 实验性肿瘤或瘤株细胞中有十几种含有 CRABP, Ong & Chytil 将 9 种肿瘤(株细胞)按其 CRBP 与 CRABP 的组合情况分为三型: 第 I 型 (CRBP、CRABP 均可检出): 小白鼠皮肤乳头状瘤, 人腺癌 HAD-1, Dunning 白血病, Walker 256 癌肉瘤, 乳腺癌 MAC-1;

第 II 型(只能检出 CRABP): 软骨肉瘤, 肉瘤 180;

第 III 型(二者均不能检出): Ehrlich 癌 (实体瘤), L₁₂₁₀ 白血病。小白鼠乳头状瘤 CRABP 含量特别高。retinoids 的药理效果与其对 CRABP 的结合能力有关。投与 13-顺维生素 A 酸可抑制移植软骨肉瘤的增殖, 但对 Ehrlich 腹水癌无效(前者有 CRABP, 后者则无)。

3) 癌胎儿性蛋白 CRBP (F) 在鸡胎生期第 14 天的脑中发现了配体特异性不同的结合蛋白, 最近在人胎生肝(第 22 周)胞液中也发现了配体特异性低的 CRBP (F), 在大鼠再生肝中也发现了 CRBP (F)。对一例人的原发性肝癌(癌部与非癌部)进行探讨表明 CRBP (F) 的检出率和含量均高于 CRABP。大致可以得出 CRBP (F) 与 CRABP 都具有

癌胎儿蛋白的特征的结论。

总之, CRABP 及 CRBP (F) 从脏器特异性上来看, 用作癌的诊断期望不大但可作为以类视黄醛对肿瘤进行化学预防的一项指标。类视黄醛抗肿瘤机制学说如表 8 所示, 这些机制亦与 CRABP 和 CRBP (F) 有关。

表 8 类视黄醛抗肿瘤作用机制假说

-
- | | |
|-----|----------------------------------|
| I | 引起肿瘤坏死 |
| | * 溶酶体不稳定化 (Dingle & Lucy) |
| | * 表皮增殖 (Studer) |
| II | 改变免疫反应: 佐剂 (Dresser) |
| III | 与 DNA 的相互作用 (Sporn) |
| | * 减少与致癌物的结合 (Kaufman et al) |
| IV | 抑制多胺的形成 TPA-诱导 ODC 活性 (Boutwell) |
| V | 恢复接触抑制 (Dion et al) |
| | * 产生干扰素 (Blalock & Gifford) |
-

《医学のあゆみ》106(5)282~317, 1978.

(张耀铮摘译 林钧材校)

~~~~~  
(上接第14页)

但是对门冬酰胺的  $K_m$  值比天然酶要大, 并且随流速的变化而变化。Horvath 等把门冬酰胺埋置在吸附于尼龙管子上的聚羧胶之上, 如所期望, 将酶结合在凝胶基质可防止它离开表面, 也可防止酶暴露于蛋白酶和抗体。在此种情况下, 酶的催化活性由底物扩散进入凝胶基质的速率所控制。

Salley 等应用乳化聚合的方法制备了有酶活性的、大小范围可控制的球形聚丙烯酰胺颗粒, 并研究了交联程度对酶在凝胶上的保留和催化活性的影响。

最近, Salley 等又观察到, 当一个单一的、具有门冬酰胺酶活性的羟乙基  $\alpha$ -甲基丙烯酸凝胶圆柱被埋在大鼠腹腔后, 可使血浆门冬酰胺浓度下降。其使血浆门冬酰胺浓度降低的持续时间比天然的酶大约长 5 倍。当血浆门冬酰胺已降到正常浓度的时候, 凝胶圆柱仍有 60~70% 的原来酶活性。其活性降低的原因可能因为蛋白质包围了凝胶的表面而损害其扩散, 或是由于增加了门冬酰胺的合成。

目前, 尚需要进一步研究发展将酶结合在凝胶基质上的方法。这些方法必须包括建立生物学上稳定的键, 以使酶不易从凝胶基质上离开, 保留有效的酶活性和维持移植物(如上述埋置于腹腔的凝胶小圆柱)的生物相容性。

《Ann. Rev. Pharmacol. & Toxicol.》17:97~116, 1977.

(庄庆祺摘译 梅美珍审)

# 用作药物的酶

John S. Holcenberg

酶比一般催化剂优越得多，因为它的反应专一，催化能力强，能在温和的环境（温度和 pH）中作用。这些性质导致一些研究者从本世纪初就企图用一个专一的酶来作为药物。无疑，几世纪来，蛋白水解酶乃是局部应用的动物和植物材料的组成成分。

在三十年代首先采用的实验中，Avery 和 Dubos 分离和鉴定了能分解Ⅲ型肺炎球菌多糖外囊的细菌酶。Pareteral 应用这个酶防止了实验动物被此型肺炎球菌所感染。此后，酶则被用于促进纤溶，蛋白水解和食物消化。近年来，用酶分解氨基酸和叶酸已被用于肿瘤化疗。一个使人鼓舞的新方向是酶的替代疗法可用于治疗遗传病。

酶作为药物有一些固有的缺点：为了以非口服方式给药，它们必须尽力提纯，以消除所含的毒性物质，所以酶的制备一般花费很贵；并且在人体中酶很容易分解；同时因为它们是大分子，它在病人体内的分布受到限制；此外，酶作为外源蛋白质，对宿主来讲是抗原，能刺激产生抗体，因此它不能长期应用，因为这样可能降低酶活力或产生严重的过敏反应。

本综述集中讨论酶治疗的实际应用，将讨论 1) 新酶的发现，2) 酶制剂在体内的药理学，药化动力学和治疗作用，3) 克服不稳定性、半衰期短、分布受限制、免疫刺激问题的实验途径。主要以氨基酸分解酶作为例子。

## 新酶的发展

### 治疗用酶的来源和纯化

一般来说微生物是生产大量治疗用酶最现实的来源。大量微生物可以在短时间内培养出来，花钱又比较少。同时，一般还可通过改善培养条件或选择好的突变种而使酶的产量大大增加（10~100 倍）。当用细菌来制备适合注射用的酶制剂时，必需将最后产品高度提纯以去除内毒素。增菌法培养技术（应用底物作为唯一碳源或氮源）可用来筛选有用的微生物与产生酶。微生物一般用超声波或打匀浆使之溶破，酶用得率高而又能大量生产的方法加以纯化。

当用溶酶体的酶替代此酶缺陷的遗传疾病时有一些特殊的问题。因为这类酶是糖蛋白，具有决定酶是否能有效进入溶酶体的决定基。细菌的酶没有这种决定基，所以人胎盘是溶酶体酶的最主要来源。

### 治疗用酶应有的特点

能选择性分解循环中营养成分或代谢物的酶可用于治疗肿瘤，它们必须有如下特征：

- 1) 在生理 pH 下活性高，稳定；
- 2) 在动物血清或全血中保留活性；
- 3) 对底物有高的亲和力（ $K_m$  低）；
- 4) 注射到动物体内后，由循环清除的速率慢；
- 5) 不被它的产物或正常人体体液中存在的其他成分所抑制；
- 6) 不需要外源的辅助因子；
- 7) 在生理条件下进行有效的，不可逆的酶反应；
- 8) 利用非致病微生物提取，因而含有很少的内毒素。

## 治疗用酶在体内的特征

### 药理学和药物动力学(以门冬酰胺酶, 谷氨酰胺酶为例)

所有用于酶学疗法的门冬酰胺酶和谷氨酰胺酶-门冬酰胺酶都是四聚分子(tetrameric Molecules), 分子量约 140,000, 类似 7S  $\gamma$ -球蛋白的分子量。大肠杆菌的门冬酰胺酶的吸收和分布类似同等大小的其他蛋白质的吸收和分布。在人体或狗体内, 门冬酰胺酶分布容积比血浆大 20~30%, 在人体, 肌肉注射产生的最大血浆浓度只有同一时间静脉注射所达到浓度的一半。相反, 小鼠用同样剂量静脉注射, 肌肉注射和腹腔注射 24 小时之后, 血浆浓度几乎相同。

用狗研究证明, 酶进入淋巴和脑脊液较慢, 静脉注射之后, 2~3 小时才能达到最大值。胸导管淋巴达到血浆的 25%, 而颈和腿淋巴不超过 5%, 脑脊液小于 0.5%。在胆汁中的浓度很快达到平衡, 但不大于 5% 的血浆浓度。根据病人的研究发现, 注射后酶慢慢地出现于胸导管淋巴, 脑脊液浓度很低, 而小便中无活性。当酶直接注入侧脑室脑脊液时, 酶则很快进入血浆, 24 小时之后, 则无酶活性留在脑脊液之中。

### 治疗用酶的例子

用酶学方法耗竭非必需氨基酸治疗肿瘤 用酶学方法耗竭体液特定的非必要氨基酸提供了一种有效的治疗肿瘤的方法。它对肿瘤有相当高的特异性。某些肿瘤, 极端依赖于细胞外的门冬酰胺以维持其生存。因为门冬酰胺由正常细胞合成后进入血液, 所以简单的通过从食物中除去这个氨基酸以使肿瘤得不到它的办法是无效的。为了达到治疗的有效性, 必须通过注射酶制剂入体内不断分解这些氨基酸。门冬酰胺酶正是对某些肿瘤细胞特别需要门冬酰胺起催化作用的。因此对某些门冬酰胺敏感的肿瘤来讲, 这酶比一般化疗药物更有特异性。L-门冬酰胺酶是在人体中广泛研究的第一个有抗肿瘤活性的酶, 大约 1/3 急性白血病人用此酶治疗时达到完全缓解。但是其他人体肿瘤相对地对门冬酰胺酶不敏感。现代的研究已指出, 门冬酰胺酶能够解救大剂量氨甲蝶呤对正常细胞的毒性。因此, 联合应用门冬酰胺酶和氨甲蝶呤能产生令人鼓舞的抗肿瘤活性。

谷氨酰胺酶比门冬酰胺酶有更强的抗肿瘤活性。谷氨酰胺也是人类的非必需氨基酸, 但是, 它在哺乳类细胞中参与许多代谢反应。在细胞培养中, 细胞生长所需的谷氨酰胺比其他氨基酸多 10 倍。谷氨酰胺在某些肿瘤代谢中的一个重要功能是作为谷氨酸的直接前体, 后者可供碳源局部进行三羧酸循环(一个重要的供能途径)。如果与正常组织比较, 某些肿瘤细胞处于谷氨酸利用度受限制的条件下生长, 因为它们合成率很慢而利用却很快。所以剥夺谷氨酸也可能有选择性杀伤某些肿瘤细胞。

近年来, Roberts 从一种由土壤分离得到的微生物 *Pseudomonas 7A* 提取了一种酶, 称为谷氨酰胺酶-门冬酰胺酶, 并制成结晶。此酶所具有的性质使得它很符合用于大动物和人的治疗。它的半衰期长, 又具有相当的抗肿瘤活性, 能对抗各种白血病和实体瘤, 包括 L1210、EARAD-1、CI498 骨髓的白血病、B<sub>16</sub> 黑素瘤和 Walker 256 肉瘤。用此类酶作治疗的重要特点, 是它不会象用门冬酰胺酶和其他抗癌药一样发生耐药性。用此酶治疗 13 代连续传代的 EARAD-1 白血病没有选择性和引起耐药株。相反用大肠杆菌门冬酰胺酶治疗时可于第二代发生耐药性。此类酶和氨甲蝶呤联合化疗, 还可以延缓 L1210 肿瘤对氨甲蝶

的耐药性，同时也降低这个抗代谢物对宿主的毒性。

用酶耗竭必需氨基酸的方法治疗肿瘤 如果肿瘤细胞比正常细胞更需要一个必需氨基酸，用酶耗竭这个氨基酸就能选择性地抑制肿瘤。Abell 等报告，从细菌(*Rhodotorula glutinis*)分离得到的苯丙氨酸-氨-裂合酶能抑制小白鼠白血病 L5178Y。

用酶耗竭叶酸治疗肿瘤 食物中缺乏叶酸，核黄素和 B<sub>6</sub> 可以抑制肿瘤的生长。Bertino 及其同工作者已报道一种羧基肽酶 G (能分解叶酸)在体外能抑制小白鼠白血病 L5178Y 和 L1210 及 Walker 256 肉瘤。

酶用作纤溶剂和去纤维蛋白剂 纤维蛋白凝块可被纤维蛋白溶酶水解。后者由其前体纤溶酶原在内源激活因子存在下产生。纤溶可因加入激活剂而促进，也可加其他能溶解纤维蛋白的蛋白酶来促进。

尿激酶和链激酶是最主要的纤溶酶原激活剂。二者都是单链蛋白质，分子量约 50,000。它们都很快地由循环中清除，因此使用时常须连续灌注。尿激酶是由人尿中分离的天然产品，作为尿的正常成分尿激酶似没有抗原性。可惜，它的制造很费钱，不能达到医药应用所要求的数量。链激酶可能引起纤维蛋白溶酶原构型变化，因而产生一个活性中心，并水解内肽键而形成纤溶酶。许多病人因为以前有链球菌感染，循环血液中有抗体存在，这些抗体可与链激酶反应而破坏它的作用。因此开始时要有充足的剂量以克服抗体的中和作用。

血凝块的溶解依赖于纤维蛋白网内的纤溶酶原的激活。近来，Kakkar 等发现连续地用纤溶酶原和链激酶灌注，可促进深静脉血栓溶解。

遗传性酶缺陷的替代疗法 由于溶酶体内一个酶的缺陷而引起代谢物堆积的病人仍是酶替代疗法的一种理想对象。但是要成功地进行治疗必须解决下列问题：1) 要得到相当数量的人体的酶，近代，此种酶的主要来源是胎盘和尿。这种酶应该能选择性地被细胞摄入，并且在溶酶体内稳定。2) 酶必须无免疫性。3) 酶必须到达代谢物积聚的组织，目前，大多数酶都能被肝摄取，但是有许多积聚物却与心脏、肾、肌肉和中枢神经系统有关。4) 在溶酶体内的酶必须能和积聚代谢物的空泡融合。

## 改善酶学治疗的方法

### 可溶性的化学改造

用脱氨作用、酰化作用以及将自由氨基与碳化二亚胺进行反应等可使门冬酰胺酶的血浆半衰期延长。Holanberg 等证明谷氨酰胺酶-门冬酰胺酶可通过琥珀酸化或与分子量糖肽结合而加以改造，所得到的酶的衍生物在小鼠、大鼠和兔的循环血液中半衰期增加 9~15 倍。

用二甲基辛二酸亚胺使大肠杆菌门冬酰胺酶赖氨酸残基交联可相等地增加对门冬酰胺，谷氨酰胺等底物的作用。相反，用四硝基甲烷使酶的酪氨酸残基交联却改变对底物的特异性。

有人发现，谷氨酰胺酶-门冬酰胺酶琥珀酸化后，大大降低它被胰蛋白酶的敏感性。

用六甲撑二异氰酸盐使  $\alpha$ -半乳糖苷酶交联可以使此酶不被胰蛋白酶的水解。在体内，这些酶蛋白可以被溶酶体的其他蛋白水解酶所分解。Gregoriadis 已证明，用戊二醛使蔗糖酶交联可使它在溶酶体中更稳定。这种防止酶被溶酶体酶所分解的改造可大大延长它们的

作用时间。

已发现,在病人和实验动物中,免疫效应可影响门冬酰胺酶的抗癌疗效。另外,此酶引起过敏反应和清除率快等问题都已有报道。G. Schmer 等曾研究在兔体内产生的抗谷氨酰胺酶-门冬酰胺酶的抗体及其琥珀酸化和糖基化衍生物的抗体,发现每一种酶制剂的抗体在中和与沉淀天然的和改造的酶方面同等有效。在消除抗原性的研究方面, Sela 已证明,用多聚丙氨酸封闭氨基能够减少蛋白质或合成多肽的抗原性。Abuchawski 等也报道,触酶与聚乙二醇反应能降低其在小鼠中的免疫性,这些技术可能应用于治疗用酶上。

#### 微形胶囊、脂质体和红细胞

已有人将酶装入惰性的和可生物降解的胶囊之中,惰性的半透性的超薄尼龙或多聚尿素胶囊能将酶和蛋白水解酶隔开,并防止产生抗体。此方法的缺点是胶囊内的酶的反应速率决定于底物和产物通过膜的扩散速度。所以,胶囊中的 L-门冬酰胺酶的  $K_m$  值比天然的酶大 100 倍。这种胶囊的另一个缺点是用于腹腔注射之后,可刺激异物反应,这种反应使胶囊聚集和封闭,以至使它们不能再降解体内的门冬酰胺。

脂质体是小的胶囊,由脂质双层膜组成,中间隔着水溶液的空隙。脂质膜由卵磷脂,胆固醇和一种带负电的脂质组成,酶和水溶性药物网罗在中间的水相。它们通过入胞作用而很快地被摄取入肝和脾,然后,脂质体与溶酶体融合,最后被代谢掉,巧妙地操纵脂质膜的组成,或与某细胞特异免疫球蛋白或某些糖蛋白结合有希望使脂质体进入某特异细胞而不是肝或脾细胞。

Gregonadis 证明,虽然蛋白质装入脂质体不能防止免疫反应,但是这个办法可以减少反复给药时引起过敏反应的严重程度。

蛋白质可以用快速的逆性的渗透压变动 (Osmotic shock) 而网罗到红细胞之中。按道理,这种技术可能产生天然的酶反应而且有较长的循环时间(则半衰期长)。不幸,装入酶的过程似已引起红细胞的改变,以至它们只有很短的循环时间。当然,通过方法的改进可能使红细胞的循环时间延长,其中包括将红细胞中的酶,细胞器和底物加入运载的混合物之中,和将重新封闭的部位缩得很小等。Thorpe 等曾利用红细胞网罗的  $\beta$ -葡萄糖苷酸酶来改进  $\beta$ -葡萄糖苷酸缺乏小鼠的治疗,发现,红细胞网罗的酶比天然的酶在循环中保持的时间长 4 倍,在肝组织保持的时间长 5 倍,并且似能释放更多的酶进入肝的溶酶体。

有人提出,运载酶的红细胞被肝细胞完整摄取,然后慢慢地被溶酶体分解,所以运载酶的自体红细胞可能提供一种细胞内存积酶的形式以治疗溶酶体酶的缺乏。然而据信,枯否氏细胞似乎是肝中摄取红细胞的主要细胞,所以这种运载酶的细胞在治疗方面的有效性仍是值得怀疑的。

#### 将酶结合于表面

酶可用化学方法连接于表面上,可在凝胶聚合时结合于凝胶的基质中,或结合于微粒的表面。如此所形成的固相酶可能比较稳定,而且如果酶不离开表面,则较少产生免疫反应。即使产生抗体,抗体和固相酶的复合物可能仍然保留活性。因为酶不能到达致敏的肥大细胞,主动的过敏反应也可能不会发生。

固相酶所存在的问题是动力学改变;酶会从表面上溶解下来;生物表面的不相容性和在表面包上血浆蛋白都会使酶失活。

Allison 等用戊二醛将门冬酰胺酶接在尼龙管子上,此固相酶比较稳定,(下转第10页)