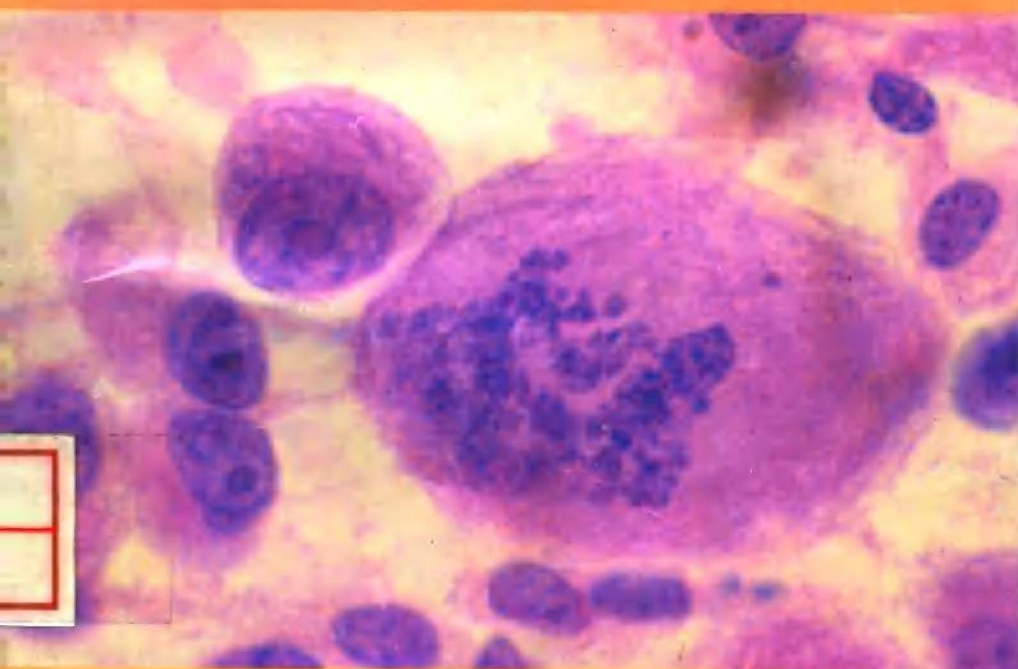


王顺祥 主编

肿瘤酶学研究

Research of Cancer Enzymology



中国科学技术出版社

肿瘤酶学研究

王顺祥 主编

中国科学技术出版社

图书在版编目(CIP)数据

肿瘤酶学研究/王顺祥主编. 北京:中国科学技术出版社,
1996. 6

ISBN 7-5046-2179-X

I. 肿… II. 王… III. 肿瘤学:酶学—研究 IV. R73:Q55
中国版本图书馆 CIP 数据核字(96)第 03086 号

中国科学技术出版社出版

北京海淀区白石桥路 32 号 邮政编码:100081

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

黄河水利委员会印刷厂印刷

*

开本:850×1168 毫米 1/32 印张:12.75 字数:358 千字

1996 年 6 月第 1 版 1996 年 6 月第 1 次印刷

印数:1—3000 册 定价:21.50 元

前 言

肿瘤酶学是近年来兴起的一门医学生物学分支学科,发展十分迅速。为了反映肿瘤酶学的研究进展,编者搜集近10年来发表的文献资料,加上自己的实践,编成此书,供肿瘤防治研究工作者参考。希望能从肿瘤酶学角度来研究、洞察肿瘤发生、发展的某些规律,积极寻求先进的肿瘤诊断和防治方法。

肿瘤酶学的研究领域极其广泛,本书仅将研究工作比较成熟、文献资料较多的、与肿瘤有关的酶类加以介绍。在介绍肿瘤酶学研究理论的同时,更详细介绍有关酶类的实验方法,以方便读者的科研实验工作和临床应用。

本书不仅对肿瘤医学的广大研究者和初学者有用,而且可供临床医师、检验师、研究生、医学生参考。

限于编者的学识水平,书中不妥之处在所难免,敬请广大读者批评指正。

河南省肿瘤研究所 (邮编 450003)

王顺祥

1995年12月20日

内 容 提 要

本书介绍了国内外近年来关于肿瘤酶学的研究进展和实验方法。全书共分 14 章,每章均按概论、理化性质、生物学特性、与肿瘤的关系、实验方法等项叙述,理论与实践并重。本书可供科研人员、临床医师、检验师、研究生、医学院校师生阅读参考。

主 编	王顺祥			
副主编	许 东	王奕琳	孟爱民	魏经建
	杨建勋	王明臣	姚 武	
主 审	陆建邦			
编 委	(按姓氏笔划为序)			
	王奕鹏	王 璟	王建峰	张纪平
	张秀丽	邢陆伟	阮丽荣	李志远
	李时恩	何燕霞	杨 融	杨艳燕
	赵一波	赵卫星	赵月香	高其鑫
	秦裕民	徐玉宝	程学敏	蒋力莉

责任编辑 许 慧

目 录

第一章 多胺及其代谢酶类	(1)
一、多胺的生物合成与代谢	(1)
(一) 多胺的生物合成	(1)
(二) 多胺的分解代谢	(3)
二、酶在控制多胺合成中的作用	(3)
三、多胺的生物作用	(5)
(一) 促进细胞生长发育	(5)
(二) 影响核酸、蛋白质的合成	(5)
(三) 人体组织和体液中的多胺水平	(6)
四、多胺作为肿瘤诊断和治疗的标志	(7)
(一) 癌症病人体液的多胺水平	(7)
(二) 多胺测定作为判定疗效和预后的标志	(13)
五、鸟氨酸脱羧酶与肿瘤.....	(15)
(一) 鸟氨酸脱羧酶活性的诱导作用	(16)
(二) 鸟氨酸脱羧酶促使肿瘤生成的作用机制	(18)
(三) 鸟氨酸脱羧酶作为肝癌标记物	(21)
(四) 鸟氨酸脱羧酶作为大肠肿瘤的标记物	(23)
六、5'-甲基硫代腺苷磷酸酶代谢的重要性	(25)
七、多胺生物合成抑制剂.....	(28)
(一) 鸟氨酸脱羧酶抑制剂	(28)
(二) S-腺苷蛋氨酸脱羧酶抑制剂	(33)
(三) 丙胺转移酶抑制剂	(35)
八、抗多胺合成抑制剂(抗酶抑制剂).....	(36)
九、多胺及其代谢酶的测定方法.....	(37)

(一) 鸟氨酸氨基甲酰转移酶测定法	(37)
(二) 鸟氨酸脱羧酶活性测定法	(39)
(三) 尿多胺层析-常压电泳测定法	(42)
(四) 尿多胺的测定——试纸法	(44)
(五) 尿多胺的高效液相色谱测定法	(46)
(六) 血中多胺的高效液相色谱分析	(48)
(七) 癌瘤组织多胺的测定法	(49)
(八) 人血清精胺的放射免疫测定法	(51)
(九) 血清精胺放射免疫测定法	(53)
第二章 活性氧及抗氧化酶	(70)
一、自由基的产生及其清除体系	(70)
(一) 自由基产生途径	(70)
(二) 机体的抗氧化防御体系	(74)
二、自由基代谢失衡与肿瘤发生	(76)
(一) 肿瘤组织细胞中自由基存在的状况	(76)
(二) 脂质过氧化与肿瘤	(77)
(三) 化学致癌的自由基机制	(80)
三、超氧化物歧化酶与肿瘤	(81)
(一) 超氧化物歧化酶	(81)
(二) 异常转化细胞及实验动物肿瘤组织细胞的 超氧化物歧化酶状态	(83)
(三) 人体肿瘤组织细胞及肿瘤宿主血中的 超氧化物歧化酶状态	(84)
四、过氧化氢酶与肿瘤	(86)
五、谷胱甘肽过氧化物酶及其他抗氧化酶与肿瘤	(89)
六、部分抗氧化酶活性及过氧化脂质测定方法	(92)
(一) 超氧化物歧化酶活性测定法	(92)
(二) 全血谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性测定法	(93)

(三) 过氧化氢酶(CAT)活性测定法	(97)
(四) 丙二醛(MDA)含量测定法	(98)
第三章 谷胱甘肽 S-转移酶	(109)
一、理化性质	(109)
二、生理功能和分布	(110)
三、谷胱甘肽 S-转移酶与肿瘤	(112)
(一) 谷胱甘肽 S-转移酶与肿瘤的发生及预防	(112)
(二) 人类肿瘤组织中的谷胱甘肽 S-转移酶表达	(115)
(三) 谷胱甘肽 S-转移酶与肿瘤多药耐药性	(117)
四、谷胱甘肽 S-转移酶检测方法	(123)
(一) 人胎盘谷胱甘肽 S-转移酶的纯化	(124)
(二) 抗血清的制备	(124)
(三) 抗体的纯化	(126)
(四) 抗 GST- π -IgG 与辣根过氧化物酶(HRP)	
交联制备酶标抗体	(126)
(五) 双抗体夹心型酶联免疫吸附测定血清/	
血浆 GST- π 含量	(126)
(六) GST- π 免疫组织化学染色法	(128)
第四章 酪氨酸蛋白激酶和酪氨酸蛋白磷酸酶	(140)
一、酪氨酸蛋白激酶	(140)
(一) 酪氨酸蛋白激酶基本特性	(141)
(二) 酪氨酸蛋白激酶与肿瘤	(142)
二、酪氨酸蛋白磷酸酶	(149)
(一) 酪氨酸蛋白磷酸酶结构及生物学特性	(150)
(二) 酪氨酸蛋白磷酸酶与肿瘤	(152)
三、检测方法	(153)
(一) 原理	(154)
(二) 抗血清的制备	(154)
(三) 抗体的纯化和标记	(154)

(四) ELISA 测定	(156)
第五章 O⁶-烷基鸟嘌呤-DNA 烷基转移酶	(168)
一、O ⁶ -烷基鸟嘌呤-DNA 烷基转移酶的生物学特性	(168)
(一) O ⁶ -烷基鸟嘌呤-DNA 烷基转移酶的功能 及理化特性	(168)
(二) O ⁶ -烷基鸟嘌呤-DNA 烷基转移酶的结构 和基因	(170)
(三) O ⁶ -烷基鸟嘌呤-DNA 烷基转移酶在正常 组织中的分布	(172)
二、O ⁶ -烷基鸟嘌呤-DNA 烷基转移酶与肿瘤	(173)
(一) O ⁶ -烷基鸟嘌呤-DNA 烷基转移酶在肿瘤 细胞中的表达	(173)
(二) Mer ⁺ 与肿瘤化疗的关系	(174)
(三) O ⁶ -烷基鸟嘌呤-DNA 烷基转移酶功能的去除	(176)
(四) O ⁶ -烷基鸟嘌呤-DNA 烷基转移酶与肿瘤易感性	(178)
三、检测方法	(179)
(一) O ⁶ -烷基鸟嘌呤-DNA 烷基转移酶蛋白溶液的制备	(179)
(二) O ⁶ -[³ H]MeG DNA 底物的制备	(180)
(三) O ⁶ -烷基鸟嘌呤-DNA 烷基转移酶定量测定	(180)
(四) 蛋白质定量测定(Lowry 法,又名 Folin-酚测定法)	(181)
第六章 烯醇化酶及其同工酶.....	(196)
一、烯醇化酶的分布及化学结构	(196)
二、神经元特异性烯醇化酶的生物学性质	(197)
三、神经元特异性烯醇化酶与肿瘤	(198)

(一) 健康人血清和脑脊液的神经元特异性烯醇化酶水平	(200)
(二) 原发性肺癌	(201)
(三) 神经母细胞瘤	(205)
(四) 神经内分泌肿瘤	(206)
(五) 精原细胞瘤	(207)
(六) 胺前体摄取脱羧细胞瘤	(208)
四、烯醇化酶及其同工酶测定方法	(208)
(一) 直接分光光度法	(209)
(二) PK-LDH 酶偶联速率法	(210)
(三) PK-HK-G6PD 酶偶联速率法	(212)
(四) 生物发光法	(213)
(五) 琼脂糖凝胶电泳法	(215)
第七章 丙酮酸激酶	(221)
一、丙酮酸激酶的分布	(221)
二、理化特性	(221)
三、丙酮酸激酶与肿瘤	(222)
(一) 丙酮酸激酶在化学诱癌过程中的变化	(223)
(二) 丙酮酸激酶活性在肿瘤中的改变	(223)
(三) 丙酮酸激酶同工酶谱改变的意义	(226)
四、检测方法	(228)
(一) 丙酮酸激酶活性测定	(228)
(二) 丙酮酸激酶同工酶测定	(229)
第八章 DNA 聚合酶	(235)
一、概述	(235)
二、 α -DNA 聚合酶的分布及理化性质	(237)
三、 α -DNA 聚合酶的活性与肿瘤	(239)
四、血清 DNA 聚合酶活性测定的 RIA 法	(241)
第九章 α-L-岩藻糖苷酶	(246)

一、 α -L-岩藻糖苷酶的分布、理化性质及功能	(246)
二、 α -L-岩藻糖苷酶与原发性肝癌的相关性研究	(247)
三、原发性肝癌宿主血清 α -L-岩藻糖苷酶升高的可能机制	(249)
四、血清 α -L-岩藻糖苷酶活性测定方法	(251)
第十章 γ-谷氨酰转肽酶	(254)
一、 γ -谷氨酰转肽酶的生理功能	(255)
二、 γ -谷氨酰转肽酶的临床应用	(257)
三、 γ -谷氨酰转肽酶与肿瘤	(259)
四、 γ -谷氨酰转肽酶与肝癌的关系	(260)
(一) 肝癌癌组织的 γ -谷氨酰转肽酶实验研究	(260)
(二) 血清 γ -谷氨酰转肽酶的临床应用	(261)
(三) γ -谷氨酰转肽酶的变异体	(264)
(四) γ -谷氨酰转肽酶 I 对肝癌的诊断价值	(266)
五、血清 γ -谷氨酰转肽酶的测定方法	(268)
(一) 国际临床化学学会推荐的测定法	(268)
(二) 对氨基苯磺酸法	(270)
(三) γ -GT 同工酶的聚丙烯酰胺阶段梯度凝胶 电泳测定法	(272)
第十一章 醛缩酶	(279)
一、醛缩酶及其同工酶的分布	(280)
二、醛缩酶的化学组成和性质	(283)
三、醛缩酶的作用机理和生理功能	(285)
四、血清醛缩酶及其同工酶测定的临床意义	(286)
五、醛缩酶与肝癌关系的研究	(291)
六、醛缩酶及其同工酶的检测方法	(293)
(一) 醛缩酶总活性测定	(293)
(二) 醛缩酶同工酶的测定	(297)
第十二章 乳酸脱氢酶	(302)

一、乳酸脱氢酶同工酶的化学组成	(302)
二、乳酸脱氢酶同工酶在机体组织中的分布	(304)
三、乳酸脱氢酶同工酶的生理意义	(307)
四、乳酸脱氢酶同工酶与肿瘤	(310)
(一) 正常细胞癌变时乳酸脱氢酶同工酶谱的 返祖现象	(310)
(二) 乳酸脱氢酶同工酶变化与糖代谢异常	(311)
五、乳酸脱氢酶同工酶的临床应用	(312)
(一) 胃癌	(313)
(二) 食管癌及贲门癌	(318)
(三) 卵巢癌	(321)
(四) 宫颈癌	(322)
(五) 白血病	(323)
(六) 肝癌	(326)
(七) 脑瘤	(328)
(八) 睾丸癌	(330)
(九) 前列腺癌	(330)
(十) 肺癌	(331)
(十一) 其他恶性肿瘤	(331)
六、乳酸脱氢酶同工酶的测定方法	(333)
(一) 聚丙烯酰胺凝胶电泳测定乳酸脱氢酶同工酶 ...	(335)
(二) 小柱层析法分离测定乳酸脱氢酶同工酶	(337)
(三) 血清乳酸脱氢酶总活性测定	(340)
七、影响乳酸脱氢酶同工酶谱的因素	(342)
第十三章 肿瘤化学防治的新靶点——蛋白激酶 C	(351)
一、蛋白激酶 C 的组成与分布	(351)
二、蛋白激酶 C 的结构特征	(352)
三、蛋白激酶 C 的活化机制	(354)
四、蛋白激酶 C 的抑制作用	(356)

五、蛋白激酶 C 的生理意义	(357)
六、蛋白激酶 C 与肿瘤发生	(360)
七、蛋白激酶 C 与抗肿瘤药物研究	(363)
(一) 蛋白激酶 C 抑制剂的抗肿瘤作用	(364)
(二) 蛋白激酶 C 与多药耐药性	(365)
八、蛋白激酶 C 的提取和活性测定方法	(366)
(一) 蛋白激酶 C 的提取及部分纯化	(367)
(二) 蛋白激酶 C 活性测定——同位素标记法	(367)
(三) 蛋白激酶 C 活性测定——非同位素酶解测定法	(369)
第十四章 DNA 拓扑异构酶与抗肿瘤药物研究	(373)
一、DNA 拓扑异构酶的生化特性.....	(373)
(一) DNA 拓扑异构酶 I	(373)
(二) DNA 拓扑异构酶 II	(375)
二、DNA 拓扑异构酶的生理意义.....	(378)
三、DNA 拓扑异构酶与抗肿瘤药物.....	(379)
(一) DNA 拓扑异构酶抑制剂	(379)
(二) DNA 拓扑异构酶与抗药性的关系	(383)
(三) DNA 拓扑异构酶与抗癌新药的研制展望	(385)
四、DNA 拓扑异构酶及其抑制剂的有关实验研究方法	(385)
(一) DNA 拓扑异构酶提取纯化方法	(385)
(二) DNA 拓扑异构酶活性检测及其药物效应测试方法	(386)

第一章 多胺及其代谢酶类

多胺(polyamine)广泛分布于生物体内,是一种低分子长链脂肪族胺类化合物,含有多个氨基和(或)亚氨基,包括腐胺[1,4-双胺丁烷,Putrescine, Pu, 分子式 $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$]、精脒[N-(3-丙胺基)-1,4-双胺丁烷,Spermidine, Sd, 分子式 $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$]和精胺[N,N'-双-3-丙胺基)-1,4-双胺,Spermine, Sm, 分子式 $(\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3)_2\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$]。一般来说,原核细胞内的腐胺高于精脒而缺乏精胺,真核细胞内腐胺较低而精脒和精胺含量逐渐增高。多胺在快速增殖的组织细胞内含量较高,且随细胞的生长或分化,其含量逐渐增高。在生理 pH 条件下,多胺的氨基带正电荷,它们是分布在直链碳原子上的可变正电荷,能与带负电荷的大分子形成电偶,结合能力随电荷数的增加而加强(腐胺<精脒<精胺)^[1]。多胺是细胞启动剂,与细胞的分化、增殖、发育有关,并能影响细胞 DNA、RNA 和蛋白质的代谢。近十年来,许多研究揭示多胺代谢异常可能在肿瘤发生、发展过程中起重要作用^[3,4]。

一、多胺的生物合成与代谢

(一)多胺的生物合成

在微生物和动物组织中,多胺最初的前体都是 L-鸟氨酸和 L-蛋氨酸。L-鸟氨酸经鸟氨酸脱羧酶(ornithine decarboxylase, ODC)催化脱羧形成腐胺。L-蛋氨酸被 S-蛋氨酰腺苷脱羧酶(S-adenosylmethionine decarboxylase, AdoMetDC)催化生成

S-腺苷蛋氨酸(S-adenosylmethionine, AdoMet, SAM)。精脒合成酶催化 AdoMet 脱去羧基并将其分子中的丙胺基转移到腐胺分子上形成精脒及 5'-甲基硫代腺苷(S-腺苷-3-甲硫基丙胺, 5'-Methythioadenosine, MTA)。精胺合成酶以相同的方式催化 AdoMet 和精脒形成精胺。

腐胺可由鸟氨酸经 ODC 作用生成,而鸟氨酸来源于血浆,或由肝外精氨酸酶作用于精氨酸生成。已知肝外精氨酸酶是多胺合成代谢的部分途径,故某些缺乏精氨酸酶的细胞,进行细胞培养时,需在培养基中加入含精氨酸酶的血清,使之能使精氨酸转变成鸟氨酸。

腐胺通过精脒合成酶和精胺合成酶(均为丙氨基转移酶),以 S-腺苷蛋氨酸作为丙氨基的供体,将丙氨基转移至腐胺,依次生成精脒和精胺,即 S-腺苷蛋氨酸酶作用于 S-腺苷蛋氨酸的脱羧作用,是多胺合成代谢的关键步骤^[28]。

精脒和精胺在多胺氧化酶和精脒/精胺乙酰转移酶的作用下,可以相互转换和降解成腐胺,后者能将精脒和精胺乙酰化。精脒和精胺的乙酰化产物多是多胺氧化酶的作用,分裂出乙酰氨基丙醛(3-acetamidopropanal, $\text{CH}_3\text{CONH-CH}_2\text{CH}_2\text{CHO}$)后生成精脒和腐胺,此反应与丙胺基转移酶联合作用,将脱羧后的 S-腺苷蛋氨酸转变成甲基硫代腺苷(MTA),此相互转换过程中的限速因素是乙酰转移酶。通常此酶活性很低,但可受外源性多胺及其同系物或各种毒物诱导(可能使多胺从结合部位释放),当细胞内多胺含量过高时,通过乙酰化/氧化系统进行调节。腐胺可被二胺氧化酶(Diamino Oxidase, DAO)分解或排出细胞外。

此外,参与多胺代谢的酶还有乙酰辅酶 A (coacetylase A, CoA)、多胺 N'-乙酰转移酶(polyamine N'-acetyltransferase, ace-CoA, PAT)、胞浆乙酰转移酶(cytosolic acetyltransferase, cSAT)、多胺氧化酶(polyamine oxidase, PAO)等。以上几种酶均有严格的调控系统,并有较高的可诱导转换率。依生理条件之不

同,其中任何一种酶都可成为限速酶,与鸟氨酸脱羧酶和 S-腺苷蛋氨酸脱羧酶等共同控制着多胺的转换,协同调节细胞内多胺水平^[2]。

(二)多胺的分解代谢

多胺的终末分解由 Cu^{2+} 依赖的胺类氧化酶催化,其中只有二胺氧化酶研究的较为详细。通过对伯氨基团的氧化脱氨基作用,多胺互变途径中的每一个中介物均可转换为醛,进而氧化为氨基酸或 r-乳酸(r-lactic amine)^[46]。终末分解代谢的产物及乙酰化多胺经尿液排出体外。这些反应的产物包括^[48]:N-(α -羧基乙基)精脒、精胺酸、腐胺、丙酰胺、D-胺基丁烷酸、吡咯烷-2-酮、 β -丙酮酸及其衍生物。由于这种由 Cu^{2+} 依赖性胺类氧化酶催化的反应产物无法再直接转换为多胺,故被称作终末分解代谢途径^[4]。因此,实验中以耗竭细胞内多胺来控制细胞生长时,必须彻底阻断每个中介物的来源,排除互变可能,才能达到多胺的完全耗竭。

二、酶在控制多胺合成中的作用

腐胺的合成由鸟氨酸和 ODC 调节,而腐胺转变成精脒和精胺是由 AdoMetDC 调节。在此过程中酶的一系列改变是由 AdoMet 脱羧调控。许多影响生长的刺激因素,包括肝部分切除、寒冷、激素(如生长激素、皮质类固醇、睾丸甾酮)、生长因子(如表皮生长因子)、培养基中的离子和氨基酸含量变化以及促癌剂等^[29],可引起体内及培养的哺乳细胞 ODC 迅速增加 10~20 倍。ODC 和 AdoMetDC 对细胞内腐胺、精脒和精胺含量变化反应灵敏。最近采用放免技术证实,多数情况下,ODC 活性升高一部分是由于稳定性高,大部分是由于合成增加。

多胺生物合成和互变通道的三个关键酶(ODC、AdoMetDC 和精脒/精胺 N'-乙酰转移酶),在许多细胞内转换很快,其半衰期