

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2005)01-0041-04

## 人肝癌组织中转醛醇酶活性高表达

张 锐, 张一鸣, 孟小鑫, 周锦勇, 顾冬民, 德 伟 (南京医科大学生物化学与分子生物学系, 江苏 南京 210029)

### High expression of transaldolase activity in human hepatoma

ZHANG Rui, ZHANG Yi-Ming, MENG Xiao-Xin, ZHOU Jin-Yong, GU Dong-Min, DE Wei

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

**【Abstract】** AIM: To compare the activity of transaldolase (TAL) in hepatoma and normal liver tissues and to investigate the role of TAL in the formation of hepatoma. METHODS: Total protein was extracted from the liver tissue of 20 patients with hepatoma and 10 healthy controls, and the activity of TAL was evaluated. The TAL expressions at mRNA level were determined by RT-PCR and those at protein level were determined by Western blot. RESULTS: The activity of TAL in hepatoma tissue [ $(674 \pm 44)$  nkat/g] was significantly higher than that in normal liver tissues [ $(287 \pm 44)$  nkat/g] and pericancerous tissues [ $(401 \pm 29)$  nkat/g] ( $P < 0.05$ ). The expression of TAL mRNA and protein was not significantly different between hepatoma tissues and normal liver tissues. CONCLUSION: The activity of TAL in hepatoma was significantly higher than that in normal liver tissue, which may be closely related to the neoplastic abnormalities. The change of activity may be associated with post-translational modification.

**【Keywords】** transaldolase; liver neoplasms; activity

**【摘 要】**目的: 比较人肝癌组织与正常肝组织 TAL 活性差异, 探讨 TAL 活性变化在肿瘤组织增殖中的作用。方法: 取人肝癌组织 20 例, 人正常肝组织 10 例, 癌旁组织 10 例分别测转醛醇酶活性, RT-PCR 检测转醛醇酶 mRNA 表达, Western blot 检测转醛醇酶蛋白表达水平。结果 ①转醛醇酶活性在人肝癌组织中 [ $(674 \pm 44)$  nkat/g] 明显高于正常肝组织 [ $(287 \pm 44)$  nkat/g] 及癌旁组织 [ $(401 \pm 29)$  nkat/g], 组间存在显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 正常肝组织与癌旁组织中转醛醇酶活性无显著性差异。②人肝癌组织与正常肝组织、癌旁组织中转

醛醇酶蛋白、核酸表达水平无显著性差异。结论: 人肝癌组织中转醛醇酶活性较正常肝组织显著升高, 表现出其在癌变组织中的特异性。同时提示其活性的改变与翻译后修饰有关。这为深入研究肝癌的发生机制及癌细胞增殖机制提供了必要的理论依据。

**【关键词】** 转醛醇酶; 肝肿瘤 活性

**【中图分类号】** Q555.2 **【文献标识码】** A

## 0 引言

转醛醇酶(transaldolase, TAL)是磷酸戊糖途径(pentose phosphate pathway, PPP)非氧化阶段的关键酶, 调节 PPP 氧化、非氧化阶段的平衡, 进而调控 PPP 的产物 5-磷酸核糖和尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)的生成。5-磷酸核糖是细胞增殖过程中合成核苷酸不可缺少的原料; NADPH 是体内主要还原物质之一, 广泛参与胞内信号转导、抗氧应激等<sup>[1-4]</sup>。因此, TAL 既是细胞基础代谢所必需的, 也与细胞功能转变、代谢状态变化密切相关, 其活性呈现出组织特异性、生理病理状态差异性。在多种疾病中 TAL 的活性变化可引起疾病的产生或促进其发展<sup>[3, 5, 6]</sup>。恶性肿瘤细胞功能改变、代谢异常, PPP 直接参与癌细胞核酸代谢<sup>[7]</sup>, TAL 作为 PPP 非氧化阶段的关键酶, 在肿瘤组织中的活性如何变化, 其在肿瘤细胞增殖中如何作用? 相关文献报道极少, 国内外均少见人肝癌组织中 TAL 活性报道。我们比较人肝癌组织与正常肝组织中的 TAL 活性, 用 RT-PCR 及 Western blot 方法分析 TAL 基因表达和蛋白变化情况, 并据此推测其活性的改变与翻译后修饰的关系。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 正常肝组织 10 例, 原发性肝癌组织 20 例, 肝癌癌旁组织 10 例(取癌周 5 cm 处组织)标本均来自南京医科大学第一医院。取部分肝组织作病理学检查(HE 染色)(Fig 1), 于  $-70^{\circ}\text{C}$  保存。20 例原发性肝癌, 均为肝细胞性肝癌。主要试剂: 转醛醇酶活性测定试剂购自 Sigma 公司。兔抗-TAL 抗体(Ab170)由巴黎十一大学科学研究中心细胞生长发育信号传导和肿瘤实验室 Lachaise 博士惠赠, 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 购自北京中山生物技术有

收稿日期 2004-06-29; 修回日期 2004-08-27

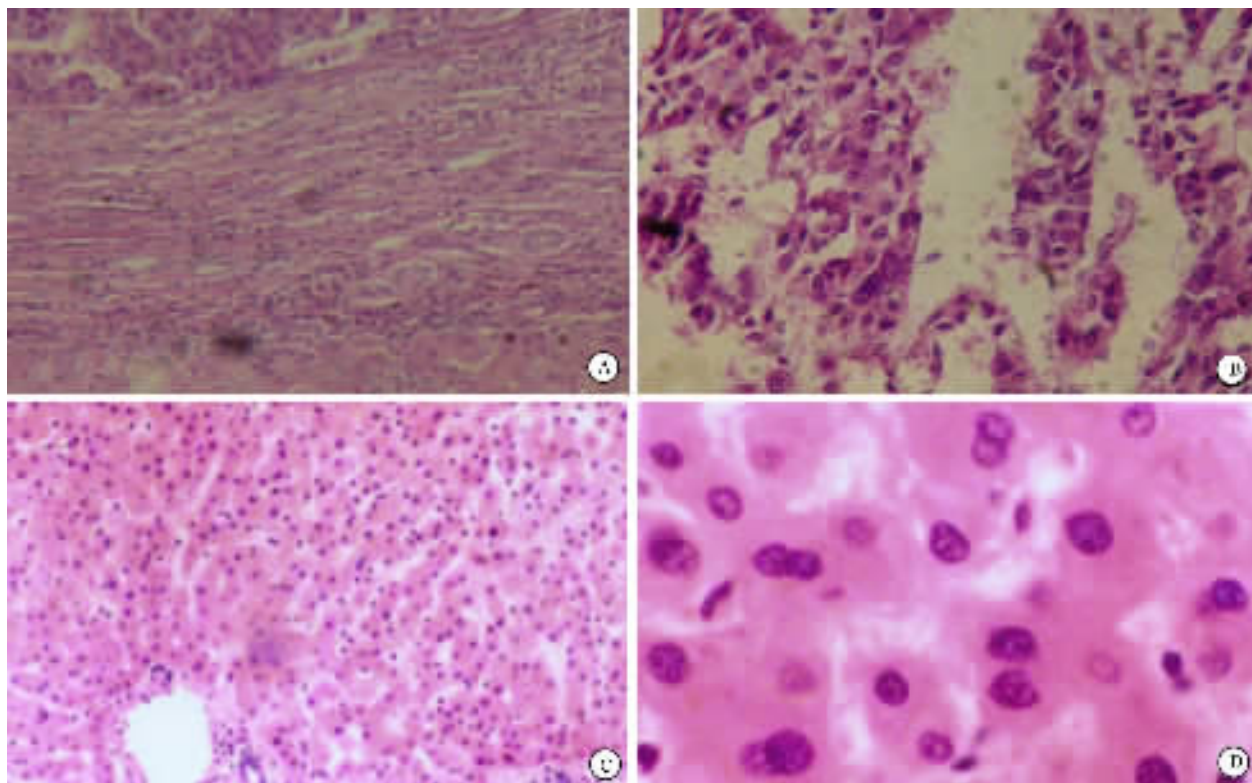
基金项目 江苏省国际合作课题资助项目(Bz2001119), 南京医科大学科技发展基金资助项目(NY2001054)

通讯作者 张一鸣, Tel. (025) 86862729 Email. zym@yahoo.com

作者简介 张 锐(1975-), 女(汉族), 天津市人, 硕士生(导师德伟), Tel. (025) 86863202 Email. zryt02@yahoo.com.cn

限公司。TRIzol 试剂盒购自 Gibco 公司,RT-PCR Kit (AMV) Ver2.1 购自 TaKaRa 公司,免疫印迹检测试

剂盒购自 Pierce 公司。



A :Hepatocellular carcinoma  $\times 100$  ;B :Hepatocellular carcinoma  $\times 400$  ;C :Normal liver  $\times 100$  ;D :Normal liver  $\times 400$ .

Fig 1 HE staining of hepatocellular carcinoma tissue (A B) and normal liver tissue (C D)

图1 肝细胞肝癌肝组织(A B)、正常肝组织(C D)HE染色病理切片

## 1.2 方法

1.2.1 总蛋白提取 组织加含 1 mL/L Triton-X 100 的匀浆液置冰浴中,超声粉碎,上清总蛋白采用 Bradford 法定量。提取的蛋白供 TAL 活性测定用。蛋白质免疫印迹分析所用蛋白的提取以三联表面活性剂裂解液(10 mL/L Triton-X 100, 1 g/L SDS, 100 g/L PMSF, 1 g/L Leupeptin, pH 8.0)裂解组织。

1.2.2 转醛醇酶活性测定 转醛醇酶活性参照 Levering 等<sup>[8]</sup>描述的方法,以 NADH 吸光度衰变率,参照转醛醇酶标准品活性计算得出。反应终体系含 5 mmol/L 6-磷酸果糖, 5 mmol/L 4-磷酸赤藓糖, 0.15 mmol/L NADH, 29.17  $\mu$ kat/L  $\alpha$ -磷酸甘油醛脱氢酶, 166.7  $\mu$ kat/L 磷酸丙糖异构酶,加样 25~35  $\mu$ g 总蛋白,室温下于 340 nm 处连续读取吸光度 60 min,酶活性测定范围为 3.33~33.34  $\mu$ kat/L。

1.2.3 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳、蛋白免疫印迹 40  $\mu$ g 总蛋白以 100 g/L 分离胶、50 g/L 浓缩胶恒流电泳至溴酚蓝达凝胶底部,以低分子质量 Marker 确定转醛醇酶所在位置。SDS-聚丙烯酰胺凝胶半干式转膜 90 min, 50 g/L 脱脂奶粉 TBST(0.02 mol/L

Tris 0.15 mol/L NaCl, 1 mL/L Tween20, pH 7.6) 4 $^{\circ}$ C 封闭膜上非特异性结合位点过夜。兔抗转醛醇酶抗体以 1:2500 稀释,HRP 标记羊抗兔 IgG 以 1:5000 稀释,室温杂交,用化学发光底物显影。免疫印迹结果经 BioRad 公司 Gel Doc1000 图像分析系统作半定量分析。

1.2.4 RT-PCR 小鼠转醛醇酶上下游引物为:5' GGACCAGCTCAAGCAGTTCAC 3', 5' GCCACATGCCAATCAAGGA 3', 预计扩增产物 532 bp;小鼠  $\beta$  肌动蛋白为内参照,引物序列为 5' CCGCGAGAAGATGACCCAGAT 3', 5' GAAGCATTTCGGTGGACGA 3', 预计扩增产物 780 bp,引物均由南京生兴生物技术有限公司合成。

统计学处理:用 SPSS 10.0 统计软件以单因素方差分析对各组进行比较分析,以 SNK 法作组间两两比较,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,以  $P < 0.05$  为显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 转醛醇酶活性测定结果 肝癌组织中转醛醇酶

活性较正常肝组织及癌旁组织明显增高,癌旁组织与正常肝组织中转醛醇酶活性无显著性差异( $P > 0.05$ , Tab 1).

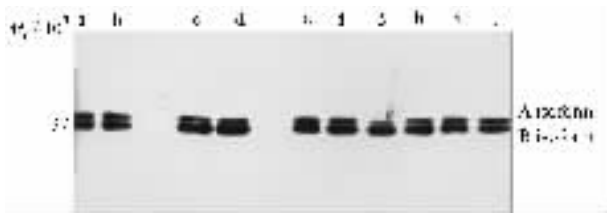
表1 正常肝组织、癌旁组织和肝癌组织中转醛醇酶活性的比较

Tab 1 Comparison of TAL activity in normal liver, pericancerous and hepatocellular carcinoma tissues

Group	n	TAL activity( nkat/g)
Normal liver tissue	10	287 ± 44
Pericancerous tissue	10	401 ± 29 <sup>a</sup>
Hepatocellular carcinoma	20	674 ± 44 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs normal liver tissue.

2.2 免疫印迹检测转醛醇酶蛋白表达 免疫印迹结果显示在  $M_r 37\ 000$  附近转醛醇酶有两个亚型,分别为 A 和 B 亚型。用 BioRad 公司 Gel Doc1000 图像分析系统进行灰度扫描分析,肝癌组织、正常肝组织及癌旁组织转醛醇酶 A、B 两个亚型及完整转醛醇酶蛋白条带密度间无显著性差异( $P > 0.05$ , Fig 2)。证明肝癌组织转醛醇酶活性增高并不是因为转醛醇酶蛋白表达水平增高引起。



a - d : Normal liver ; e - g : Pericancerous tissue ; h - j : Hepatocellular carcinoma.

Fig 2 Expression of TAL protein in normal liver, pericancerous and hepatocellular carcinoma tissues analyzed by Western blot

图2 Western 印迹分析肝癌组织、正常肝组织及癌旁组织转醛醇酶蛋白表达

RT-PCR 检测转醛醇酶 mRNA 表达 结果显示肝癌组织、正常肝组织及癌旁组织转醛醇酶 mRNA 表达水平无显著差异(结果未附)。说明肝癌组织转醛醇酶活性增高不是因为转醛醇酶 mRNA 表达水平增高引起。

### 3 讨论

本实验发现,人肝癌组织中转醛醇酶活性较正常肝组织及癌旁组织明显增高,其活性表现出在癌变组织中的特异性。而肝癌组织中转醛醇酶 mRNA、蛋白表达水平与正常肝组织相比无显著差异,提示转醛醇

酶是在翻译后水平被激活的。该项结果在人恶性肿瘤组织中未见国内外报道。

肝癌发生、发展过程中,肝细胞增殖活性增高需要大量核酸,PPP 的产物 5-磷酸核糖直接参与肿瘤细胞增殖核酸合成,而仅 PPP 非氧化阶段生成的 5-磷酸核糖即可满足细胞增殖需求<sup>[4,7,9,10]</sup>,Boros 等<sup>[7]</sup>发现胰腺癌细胞中约 69% 的 5-磷酸核糖由 PPP 非氧化阶段提供。TAL 是该阶段的限速酶,它的活性变化调控 5-磷酸核糖的生成,从而影响核酸合成、细胞增殖。当 TAL 活性增高时,其催化逆向反应速度大于正向反应速度,推动 PPP 反应逆向进行,生成 5-磷酸核糖增多,从而保证了肿瘤细胞增殖核苷酸合成的需要。另外,已有文献证实<sup>[4]</sup>,TAL 与 PPP 另一产物——还原当量 NADPH 的生成密切相关。NADPH 影响还原型谷胱甘肽生成,及氧化还原环境的稳定。而胞内还原状态的改变可改变某些转录因子如 NF- $\kappa$ B, AP-1 活性,随之调控许多与细胞增殖、肿瘤生成相关因子或基因<sup>[11,12]</sup>。同时,研究表明代谢途径的调控可导致肿瘤生成,一些基本代谢酶如鸟氨酸脱羧酶(ODC)与 TAL 同为糖代谢酶的 6 磷酸葡萄糖脱氢酶(G6PD),不仅与癌变有关,而且在肿瘤产生发展中起到关键作用,被认为是原癌基因<sup>[13,14]</sup>。这也提示我们除了通过调控 5-磷酸核糖发挥间接作用,本实验肝癌组织中 TAL 活性的改变是否有可能作为肿瘤生成的始动因素,通过改变胞内氧化还原环境,参与 CAMP 介导的信号传导通路,直接调控肿瘤细胞增殖?有待进一步的实验证实。

本结果中肝癌组织 TAL 核酸、蛋白表达水平与正常肝组织相比无显著差异,提示 TAL 活性变化原因在于翻译后修饰。这与 Lachaise 等<sup>[15]</sup>在着色性干皮病患者成纤维细胞中的发现,及本实验室既往对性成熟小鼠睾丸间质细胞 TAL 的研究发现是一致的<sup>[16,17]</sup>。本实验室在接下来的研究中,拟将 TAL 正反义真核表达载体短暂转染人肝癌细胞,以研究 TAL 对癌细胞增殖的直接作用,同时以双向电泳免疫印迹联合体外磷酸酶消化法验证假设即 TAL 在肝癌组织中活性增高是磷酸化修饰结果。

本实验为更深入地研究 TAL 生物学功能和肿瘤细胞代谢特点,进而通过调控 TAL 活性及 PPP,探讨对肿瘤细胞增殖的影响提供了新的思路。

### 【参考文献】

- [1] Lachaise F, Somme G, Carpenter G, et al. A transaldolase: An enzyme implicated in crab steroidogenesis [J]. *J Endocrine*, 1996; 15(1): 1-9.
- [2] Katalin B, Eliza H, Nich JG, et al. Elevation of mitochondrial

- transmembrane potential and reactive oxygen intermediate levels are early events and occur independently from activation of caspases in fas signaling [ J ]. *J Immunol*, 1999; 162: 1466-1479.
- [ 3 ] Banki K, Hutter E, Nick JG, et al. Molecular ordering in HIV-induced apoptosis [ J ]. *J Biol Chem*, 1998; 273( 19 ): 11944-11953.
- [ 4 ] Banki K, Hutter E, Colombo E, et al. Glutathione levels and sensitivity to apoptosis are regulated by changes in transaldolase expression [ J ]. *J Biol Chem*, 1996; 271( 51 ): 32994-33001.
- [ 5 ] Colombo E, Banki K, Totum AH, et al. Comparative analysis of antibody and cell-mediated autoimmunity to transaldolase and myelin basic protein in patients with multiple sclerosis [ J ]. *J Clin Invest*, 1997; 99: 1238-1250.
- [ 6 ] Verhoeven NM, Huck JH, Roos B, et al. Transaldolase deficiency: Liver cirrhosis associated with a new inborn error in the pentose phosphate pathway [ J ]. *Am J Hum Genet*, 2001; 68( 5 ): 1086-1092.
- [ 7 ] Boros LG, Lee PW, Brandes JL, et al. Nonoxidative pentose phosphate pathways and their direct role in ribose synthesis in tumors is cancer a disease of cellular glucose metabolism [ J ]? *Med Hypotheses*, 1998; 50: 55-59.
- [ 8 ] Levering PR, Dijkhuizen L. Transaldolase isoenzymes from *Arthrobacter PI* [ J ]. *Methods Enzymol*, 1990; 188: 405-411.
- [ 9 ] Park Y, Chae KJ, Kim YB, et al. Apoptosis and proliferation in hepatocarcinogenesis related to cirrhosis [ J ]. *Cancer*, 2001; 92( 11 ): 2733-2738.
- [ 10 ] Pizem J, Marolt VF, Luzar B, et al. Proliferative and apoptotic activity in hepatocellular carcinoma and surrounding non-neoplastic liver tissue [ J ]. *Pflugers Arch*, 2001; 442( 6 Suppl 1 ): R174-R176.
- [ 11 ] 黄勇, 襄科峰, 蒋建利. 原发性肝细胞癌中核转录因子- $\kappa$ B 表达增强及其意义 [ J ]. 第四军医大学学报, 2003; 24( 24 ): 2269-2271.
- Huang Y, Dou KF, Jiang JL. Overexpression of NF- $\kappa$ B in primary hepatocellular carcinoma and its clinical implications [ J ]. *J Fourth Mil Med Univ*, 2003; 24( 24 ): 2269-2271.
- [ 12 ] 陈保东, 袁先厚, 江普查, 等. 星形细胞肿瘤组织中核因子  $\kappa$ B 的表达与肿瘤增殖 [ J ]. 第四军医大学学报, 2003; 24( 7 ): 651-653.
- Chen BD, Yuan XH, Jiang PC, et al. NF- $\kappa$ B expression in the astrocytic tumors and its relation to tumor proliferation [ J ]. *J Fourth Mil Med Univ*, 2003; 24( 7 ): 651-653.
- [ 13 ] Auvinen M, Paasinen-sohns A, Kangas A, et al. Human ornithine decarboxylase-over-producing NIH 3T3 cells induce rapidly growing, highly vascularized tumors in nude mice [ J ]. *Cancer Res*, 1997; 57: 3016-3025.
- [ 14 ] Kuo WY, Lin JY, Tang K. Human glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) gene transforms NIH 3T3 cells and induces tumors in nude mice [ J ]. *Int J Cancer*, 2000; 85: 857-864.
- [ 15 ] Lachaise F, Martin G, Drougard C, et al. Relationship between post-translational modification of transaldolase and catalase deficiency in UV sensitive repair deficient xeroderma pigmentosum fibroblasts and SV40 transformed human cells [ J ]. *Free Radic Biol Med*, 2001; 30( 12 ): 1365-1373.
- [ 16 ] 顾冬民, 朱慧, 刘颖, 等. 转醛醇酶与青春期小鼠 Leydig 细胞生成睾酮的相关性研究 [ J ]. 中国男科学杂志, 2003; 17( 2 ): 142-144.
- Gu DM, Zhu H, Liu Y, et al. A study on the relationship between transaldolase and testosterone synthesis in puberty mouse Leydig cells [ J ]. *Chin J Androl*, 2003; 17( 2 ): 142-144.
- [ 17 ] 顾冬民, 程志祥, 刘颖, 等. 转醛醇酶在不同发育阶段小鼠睾丸中的表达及其亚型的分离和鉴定 [ J ]. 南京医科大学学报, 2002; 22( 6 ): 465-467.
- Gu DM, Cheng ZX, Liu Y, et al. Expression of transaldolase, isolation and identification of its isoforms in different developmental stages of testes in mice [ J ]. *Acta Univ Med Nanjing*, 2002; 22( 6 ): 465-467.

编辑 何扬举

· 经验交流 · 文章编号 1000-2790(2005)01-0044-01

## 地塞米松不同给药途径致患儿恶心呕吐的比较

赵青华, 王爱玲, 谢艳玲

(河南大学第一医院儿科, 河南 开封 475001)

【关键词】地塞米松 给药途径 呕吐

【中图分类号】R725.6 【文献标识码】B

1 临床资料 2002-01/2004-08 我科收住患儿 135(男 81, 女 54)例, 年龄 0~14(平均 4.1±1.6)岁。上呼吸道感染合并高热惊厥 42 例, 支气管肺炎 53 例, 病毒性脑炎 16 例, 肾病综合征 15 例, 白血病 9 例,  $T > 38.5^{\circ}\text{C}$ , 首次应用地塞米松。用抛币

收稿日期 2004-09-30; 修回日期 2004-11-18

作者简介 赵青华(1966-), 女(汉族), 河南省开封市人, 大专, 主管护师, 护士长。Tel.(0378)5661814

法将患儿分为 3 组, 3 组患儿一般情况比较, 差异无显著性意义。地塞米松用量 0.3 mg/kg, 第 1 组肌肉注射法, 第 2 组加入茂菲滴管法, 第 3 组直接静脉注射法, 观察首次应用地塞米松后 10 min 内恶心呕吐情况。

第 1 组 4 例(8.9%)与第 2 组 6 例(13.3%)比较,  $\chi^2 = 0.45$ ,  $P > 0.05$ , 差异无显著性意义, 第 1 组与第 3 组 21 例(46.7%)比较,  $\chi^2 = 16.01$ ,  $P < 0.01$ , 差异有显著性意义, 第 2 组与第 3 组比较,  $\chi^2 = 12.97$ ,  $P < 0.01$ , 差异有显著性意义。

2 讨论 地塞米松有诱发胃十二指肠溃疡, 甚至大出血和胃穿孔的报道<sup>[1]</sup>。直接静脉注射法易引起恶心呕吐, 安全性小, 肌肉注射法和加入茂菲滴管法导致患儿恶心呕吐发生的概率较小, 且茂菲滴管法操作方便, 不给患儿造成痛苦, 故应提倡。

【参考文献】

- [ 1 ] 王玲, 王化喜, 孙东生. 应用糖皮质激素静滴致胃穿孔 2 例 [ J ]. 中国乡村医药, 2003; 10( 10 ): 47.

编辑 潘伯荣