

人肺癌组织 DNA - 蛋白质交联物的初步探讨

雷毅雄 易菲 陈家堃

广州医学院化学致癌研究所 广州 510182

摘要 为了探讨 DNA - 蛋白质交联物(DPC)与肺癌的联系,以人肺癌组织为研究对象,用敏感的¹²⁵I - 后标记新技术检测了不同细胞类型肺癌的 DPC 形成情况。结果显示,肺癌组织 DPC 的平均水平较癌旁对照肺组织高,提示较高的 DPC 水平可能与肺癌的发生或促进有关。研究结果未见肺鳞癌与肺腺癌之间的 DPC 水平有明显差别,亦未发现吸烟对肺癌组织 DPC 形成有明显的影响。

关键词 DNA - 蛋白质交联;肺癌;吸烟

A PRIMARY STUDY ON THE FORMATION OF DNA-PROTEIN CROSSLINKS IN HUMAN LUNG CANCER TISSUE

本研究将 Kim 的 TRAP 方法稍加修改,利用³H-dCTP 结合液体闪烁计数 cpm,进行端粒酶活性定量。其检测的原理是:在 PCR 扩增过程中,³H-dCTP 掺入到扩增产物中,然后用玻璃纤维滤纸负压抽滤分离游离³H-dCTP,液体闪烁计数扩增产物的 cpm 值。端粒酶活性水平越高,³H-dCTP 掺入量越多,cpm 值越高,根据 cpm 值计算出端粒酶活性水平。采用该方法检测 CNE₂ 细胞端粒酶活性,结果显示 10⁵ 个 CNE₂ 细胞中端粒酶活性 cpm 值很高,10 个细胞中仍可检测到端粒酶活性,通过加热处理或加 RNase A 处理灭活端粒酶后,其 cpm 值接近阴性对照,端粒酶活性水平与放射性活度具有良好的线性关系,说明该方法灵敏度高,特异性强,可用放射性活度 cpm 值半定量反应样品中端粒酶水平。

影响本方法测定结果的因素较多,如反应体系的组成、PCR 扩增前端粒酶延伸温度和时间、PCR 循环参数、产物固定在滤纸的时间和温度、沉淀性洗脱液类型及负压抽滤等均应特别注意,否则可能使实验结果产生偏性,方法的重复性研究结果表明:该半定量方法批内稳定性较好,但不同批次 PCR 扩增的结果有一定的偏差,为此,对不同时间不同批次检测结果应进行校正,以保证实验结果的前后一致性。在每一次 PCR 扩增中均应设立同一阳性细胞作参比,根据阳性细胞的 cpm 值高低,求得本次 PCR 扩增的效率,

然后再根据扩增效率对样本 cpm 值进行校正,校正方法如下:

$$\text{校正 cpm 值} = \text{实测 cpm 值} \times \text{校正系数}$$

$$\text{校正系数} = \frac{\text{各批次一定量的阳性细胞抽提液蛋白端粒酶活性平均值} \cdot \text{空白对照平均值}(\text{cpm})}{\text{本批次等量的阳性细胞抽提液蛋白端粒酶活性值} \cdot \text{空白对照值}(\text{cpm})}$$

总之:该方法具有灵敏性高、特异性强、重复性好,不需使用电泳及放射自显影等,简便快速、经济,可用于大批量样品端粒酶活性的定量检测,但不同时间不同批次的检测均应设立同一阳性标准对照,并严格控制实验条件。

参考文献

- Greider CW. Mammalian telomere dynamics: healing, fragmentation, shortening and stabilization. *Curr Opin Genet Dev*, 1994;4:203
- Shay JW, Chair PH, Wright WE, et al. Telomere, telomerase and tumors. *Amer Soc Clin Oncol*, 1997;9:49
- Shaw JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer*, 1997;33(5):787
- Counter CM, Hirte HW, Bacchetti S, et al. Telomerase activity in human ovarian carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994;91:2900
- Langford LA, Piatyszek MA, Xu R, et al. Telomerase activity: A prognostic indicator ordinary meningiomas. *Hum Pathol*, 1997;28:416
- Kim NW, Piatyszek MA, Prowsa KR, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*, 1994;266:2011
- 陈雯,张桥,万德森,等. 人胃癌结直肠癌组织中的端粒酶活性. *中华肿瘤杂志*, 1998;20(4):261

Abstract In order to investigate the relationship between DNA-protein crosslinks(DPC) and human lung cancer, we have used a sensitive ¹²⁵I-postlabelling assay to detect the formation of DPC in tissues to various cell type of human lung cancer. The results were showed that DPC was increased in lung cancer tissues comparing with its neighbored normal tissues, suggesting that DPC may play a part in the development of lung cancer. No significance differences were observed in DPC of tissues between adenocarcinoma and epidermoid carcinoma, and in DPC of lung cancer tissue between smoker and non-smoker.

Key words DNA-protein crosslinks; lung cancer; smoking

DNA - 蛋白质交联 (DNA - protein crosslinks, DPC) 是环境污染物和化学致癌物对生物大分子物质一种重要遗传损害。DPC 与其他类型 DNA 损害相比, 较难修复, 在细胞周期中持续时间较长, 当 DNA 复制时, 易造成一些重要的基因丢失, 在肿瘤激发和促进阶段可能起着重要的作用^(1,2)。关于恶性肿瘤组织与 DPC 的关系, 国外研究很少, 国内未见报道。为了探讨 DPC 与肺癌的联系, 本研究用敏感的¹²⁵I - 后标记新方法⁽³⁾, 对人肺癌组织 DPC 水平进行了检测。

材料与方

1 标本来源及处理

肺癌组织来源于医院的原发性肺癌手术病人, 共 47 例(男性 38 例, 女性 9 例), 年龄 24 ~ 84 岁, 平均 59 岁。每一病例均经病理诊断确认, 对照组织是同一肺癌病人的正常肺组织。将新鲜的组织匀浆, 按常规方法进行 DNA 抽提(即 DPC 制备)。用紫外分光光度法测定 DNA 浓度和纯度, OD 值(260nm/280nm)在 1.8 - 2.0 之间, 则认为 DNA 纯度合格, 蛋白质已基本被剔除。

2 组织 DPC 的检测

DPC 检测用庄志雄⁽³⁾提出的¹²⁵I - 后标记新技术, 其原理是: DPC 经 SDS/蛋白酶 K 消化, 酚 - 氯仿抽提 DNA 后, 去除了非共价交联的蛋白质, 剩下与 DNA 共价结合(交联)的残留多肽链和氨基酸。酪氨酸是参与交联的主要氨基酸并与 Na¹²⁵I 有良好的亲和力, 因此, DPC 可通过¹²⁵I 对酪氨酸的后标记而被检测。检测步骤是: 50 ~ 100μgDNA 用 SDS/脲素/Tris-HCl 液重悬, 加 10μCiNa¹²⁵I 标记后以 - 巯基乙醇还原, 乙醇冲洗和沉淀后即获得与蛋白交联的 DNA。检测时一个样本同时进行 β - 计数和 DNA 测定。DNA 定量采用紫外分光光度法, 在波长 260nm

紫外分光下, 光程为 1cm, 光密度(A₂₆₀) = 1 时, 双链 DNA 浓度为 50μg/ml。DPC 水平以 cpm/μgDNA 表示。

结 果

肺癌组织及对照肺组织的 DPC 检测结果如表 1, 可见肺癌组织 DPC 的平均水平较对照肺组织高, 差异有显著性意义。

Table 1 Formation of DNA-protein crosslinks in tumor and tumor-neighbored normal tissues in lung cancer

	No. of cases (n)	DNA content (μg)	¹²⁵ I radioactivity (cpm)	DPC	
				$\bar{x} \pm s$ (cpm/μgDNA)	% of control
Tumor tissue	47	60.16	249 062	4 140 ± 1 592	159
Tumor-neighbored normal tissue	47	56.76	147 973	2 607 ± 1 043	100

Compared with control, P < 0.01 (t-test)

从肺癌细胞类型与 DPC 形成的关系来看, 肺鳞癌与肺腺癌的 DPC 平均水平未见明显差别(表 2)。

Table 2 Formation of DNA-protein crosslinks in lung cancer and tumor-neighbored normal lung tissues of different types

	No. of cases (n)	DNA content (μg)	¹²⁵ I radioactivity (cpm)	DPC	
				$\bar{x} \pm s$ (cpm/μgDNA)	% of control
Epidermoid carcinoma	21	53.25	220 401	4 139 ± 1 583	146
Tumor-neighbored normal tissue	21	54.42	154 335	2 836 ± 1 227	100
Adenocarcinoma	22	55.65	225 438	4 051 ± 1 633	168
Tumor-neighbored normal tissue	22	53.10	127 865	2 408 ± 843	100
Other lung cancer	4	56.60	261 888	4 627 ± 1 773	185
Tumor-neighbored normal tissue	4	54.60	136 555	2 501 ± 996	100

Compared Epidermoid carcinoma with Adenocarcinoma, P < 0.05 (t-test)

为了了解吸烟对癌组织 DPC 形成的影响,比较了吸烟者与非吸烟者肺癌组织的 DPC 水平,但未见吸烟对肺癌组织 DPC 形成有明显影响(表 3)。

Table 3 Comparison of DNA-protein crosslinks in tissues of lung cancer between smokers and nonsmokers

	No. of cases (n)	DNA content (μg)	^{125}I radioactivity (cpm)	DPC	
				$\bar{x} \pm s$ (cpm/ μgDNA)	% of control
Tumor tissue of smoker	30	62.92	243 689	3 873 \pm 1 431	154
tumor neighbored normal tissue of smoker	30	58.26	146 174	2 509 \pm 1 109	100
Tumor tissue of nonsmoker	17	58.80	271 127	4 611 \pm 921	166
Tumor neighbored normal tissue of nonsmoker	17	56.82	157 903	2 779 \pm 1 792	100

Compared smoker with nonsmoker, $P > 0.05$ (t -test)

讨论

DPC 的形成机理和生物学意义目前仍在探索中。但近年来的研究已发现,许多环境污染物和化学致癌物包括烷化剂,苯并 a 芘、砷化合物、醛类化合物,以及一些重金属如铬、镍等均可引起 DPC^(1,4,5)。过去的研究已观察到 DPC 与某些化学物的诱变性和致癌性有关,如 Ciccarelli 等⁽⁶⁾通过 CrCO_3 的腹腔注射染毒,观察到大鼠肾 DPC 和 DNA 单链断裂(SSB)升高,认为该结果与 NiCO_3 的肾毒性和致癌性有关;又如 Lam 等⁽⁷⁾的研究发现乙醛引起鼠鼻腔靶组织 DPC 的浓度与其诱发鼻腔癌相关。有关人类肿瘤组织 DPC 的检测,很少见报道。本研究结果表明,肺癌

组织 DPC 的平均水平较癌旁对照肺组织高,未见肺鳞癌与肺腺癌之间的 DPC 水平有明显差异,提示肺组织 DPC 的形成可能与肺癌的发生或促进有关,但与肺癌细胞类型无明显相关。研究结果未发现吸烟对肺癌组织 DPC 形成有明显的影响,显示吸烟因素不是一类强的交联物质,肺癌组织较高的 DPC 水平也可能与吸烟因素无明显联系。至于肺癌组织 DPC 的升高是否与癌基因或抑癌基因有关,需要进一步探讨。

参考文献

- 1 Oleinick NL, Chiu SM, Ramakrishnan N, et al. The formation, identification and significance of DNA-protein crosslinks in mammalian. *Br J Cancer*, 1987;55(Suppl):135
- 2 Costa M. Molecular mechanisms of nickel carcinogenesis. *Annu Res Pharmacol Toxicol*, 1991;31:321
- 3 Zhuang ZX, Costa M. Development of an^{125I}-Postlabelling assay as a simple, rapid, and sensitive index of DNA-protein cross-links. *Environ Health Perspect*, 1994;102(Suppl13):301
- 4 雷毅雄,庄志雄. 外来化合物与 DNA-蛋白质交联关系的研究进展. 国外医学卫生学分册,1995;22(3):149
- 5 Lei YX, Zhang Q, Zhuang AX. Study on DNA-protein crosslinks by chromate and nickel compounds in vivo with ^{125I} postlabelling assay. *Mutat Res*, 1995;329:177
- 6 Ciccarelli RB, Hampton TH, Jennette KW. Nickey carbonate induces DNA-protein crosslinks and DNA strand breaks in rat kidney. *Cancer Letters*, 1981;12:347
- 7 Lam CW, Casanova, Heck HD. Decreased extractability of DNA from proteins in the rat nasal mucosa after acetaldehyde exposure. *Fundam Appl Toxicol*, 1986;6(3):541

(1999-03-18 收稿;1999-06-24 修回)