

ras-onc 蛋白 P21 片段 (56—66) 抗血清与某些人癌组织的反应

张红 陈韵能 钮经义

(中国科学院上海生物化学研究所)

李士谔 林原 刘彤华

(中国医学科学院基础医学研究所, 北京; 北京协和医院)

关键词 ras 癌基因蛋白 P21、免疫细胞化学方法、人癌组织、癌旁组织

c-ras 癌基因及其产物蛋白 P21 与恶性肿瘤的发生、发展起着重要的作用^[1,2]。c-ras onc 的激活一般有两种机制: (1) 基因中第 12 位或第 61 位密码子发生点突变, 使相应的编码蛋白 P21 中的氨基酸发生改变; (2) P21 的过量表达。C-ras-onc 家族的成员均编码分子量为 21,000 的蛋白质 (P21), 它们与细胞膜结合具有 GTP 结合及 GTP 酶的活性, 它们还参与正常细胞的增殖, 还可能与信号传递有关。例如在 Harvey 鼠肉瘤病毒转化的细胞中胰岛素及表皮生长因子能刺激 H-ras P21 的磷酸化及鸟嘌呤核苷酸的结合活性。P21 也是胰岛素受体激酶的底物, 并涉及胰岛素所诱导的爪蟾卵母细胞成熟的调节^[3]。在 NIH/3T3 成纤维细胞中正常 N-ras P21 的表达导致其与生长因子受体的结合刺激产生磷酸肌醇^[4]。此外, 与三种生长因子受体类似的癌基因所引起的转化也依赖 c-ras 蛋白 P21^[5]。

为了研究 P21 的结构与功能及其在正常与恶性组织中的表达, 许多 P21 的肽段已被合成并得到了抗肽血清或单克隆抗体^[6,7], 有些结合免疫组织化学方法被用来检测 ras-onc P21 在人类良性或恶性乳腺组织以及在正常及病理肝脏疾病等组织中的表达^[8,9]。P21 的放射免疫测定方法也已建立^[2]。我们曾用 ¹²⁵I 标记的 P21 肽段 (56—64) 探测到某些肿瘤患者血清中存在能与此肽段结合的抗体^[10]。C-ras P21 肽段 (*Leu-Asp-Thr-Ala-Gly-Gln-Glu-Glu-Tyr-Ser-Ala*) 包含了第 61 位的点突变部位, 而且这段顺序具有较强的亲水性, 为此我们选择合成了这个肽段^[11]并经过免疫获得了抗肽血清, 又应用免疫细胞化学方法检测了某些人癌组织及其癌旁组织中与此肽段有关的抗原的表达及分布。

一、实验方法

1. C-ras-onc P21 肽段 (56—66) 的合成及其抗血清制备 在固相多肽合成中 α -氨基均用 Fmoc-保护, 侧链羧基、羟基以 tBu 保护, 除 Fmoc-Gly-Gln-OH 以外其余均用 Fmoc-保护的氨基酸进行缩合以逐步延长肽链, 载体采用羟基树脂、缩合剂为二环己基碳二亚胺, 合成完后以 50% TFA/CH₂Cl₂ 25℃, 2—4h, 将肽与树脂脱离同时去除所有侧链保护基,

本文 1987 年 9 月 4 日收到。

所得粗品经 Sephadex G15, G-10 凝胶过滤及 DEAE-Sephadex A-25 离子交换柱层析纯化。合成的 11 肽 ($^{35}\text{Leu-Asp-Thr-Ala-Gly-Gln-Glu-Glu-Tyr-Ser-Ala}^{66}$) 与 BSA 缩合后用作抗原。基础免疫中,先用 3.68mg 抗原溶于 2ml 生理盐水并与等量福氏完全佐剂充分乳化后采用背部皮下多点法及颈部皮下和足掌等途径注射三只日本大耳兔(雄性 2kg),四周后再次注射 4.2mg 抗原与福氏不完全佐剂的乳化剂,方法同初次。又二周后经兔耳静脉注射抗原的生理盐水溶液,每次每只兔子约 0.8mg,三天一次,连续三次,十天后兔耳静脉采血测定抗肽血清滴度 (ELISA),以正常兔血清作为阴性对照。

2. 免疫组织化学方法 手术切除的癌组织及癌旁组织为北京协和医院提供,标本经 10% 甲醛固定,石蜡包埋,做成 $5\mu\text{m}$ 切片,每例先做 H. E. 染色以观察病变,免疫组织化学方法用 PAP 法 (Sternberger)。

二、结果与讨论

ras-onc 编码蛋白 P21 中氨基酸序列 56—66 肽段用固相多肽合成法得到。其纯度经高压纸电泳,氨基酸组成分析鉴定。11 肽与 BSA 的复合物用于免疫家兔(三只),第五次注射后十天测得抗肽血清滴度分别为 1:10000 (2 号兔)和 1:1000 (1,3 号兔)。

2 号兔抗血清 1:100 稀释后用免疫组织化学方法测定了一些人癌组织及其癌旁组织。我们共观察了 6 例人食管鳞癌,6 例人结肠腺癌,10 例人胰腺癌,10 例人肝细胞性肝癌,6 例移行上皮细胞癌(包括膀胱癌及肾盂癌)组织及其相应的癌旁组织,所有样品都经病理切片证实,观察结果见表 1。从表 1 的初步结果可见在所测定的食管鳞癌、胰腺腺癌、移行上皮细胞癌

表 1 人癌组织中抗 11 肽血清的免疫组织化学反应

病理诊断	癌 组 织		癌 旁 组 织	
	例数	反应强度 ^{a)}	例数	反应强度
肝细胞性肝癌	1	$\pm \sim +$ (10%) —	3	$++ \sim +++$ (30%) $++ \sim ++$ (20%) $\pm \sim +$ (10%) —
	9		2	
			1	
			4	
胰腺腺癌	2	$++ \sim +++$ (20%) $++ \sim ++$ (20%) $\pm \sim +$ (20%) —	2	$++$ —
	2		8	
	2			
	4			
结肠腺癌	1	$+$ (16.6%) $\pm \sim +$ (16.6%) —	6	—
	1			
	4			
食管鳞癌	2	$++ \sim +++$ (33.3%) $++$ (16.6%) $+$ (33.3%) —	6	—
	1			
	2			
	1			
移行上皮细胞癌(包括膀胱癌及肾盂癌)	1	$++ \sim +++$ (16.6%) $++ \sim ++$ (16.6%) $+$ (16.6%) $\pm \sim +$ (16.6%) —	1	$++$ —
	1		5	
	1			
	1			
	2			

a) $+++$ 为强阳性, $++$ 为中度阳性, $+$ 为弱阳性, $\pm$ 为可疑阳性, $-$ 为阴性;

b) 部分腺泡细胞及小导管上皮细胞;

c) 正常移行上皮细胞及前列腺上皮细胞抗血清滴度为 1:100, 表中括符内数字为阳性率。

组织中大多数存在与 11 肽抗血清起免疫反应的抗原,其中以食管鳞癌的阳性率最高(83.2%)(图 1);移行上皮细胞癌次之(66.4%)(图2);胰腺腺癌的阳性率为 60%(图 3);而在结肠腺癌中只有 33.2% 呈弱阳性反应。肝细胞性肝癌中则只有极少数呈弱阳性反应。有趣的是,在大多数肝癌癌旁组织(其中多数为慢性肝炎或肝硬化)中呈免疫阳性反应(占 60%),而在其它癌的癌旁组织中除少数呈弱阳性外,绝大多数呈阴性反应,说明肝癌中这种特异抗原的表达较正常肝及肝炎或肝硬化肝显著减少或消失,而在其它癌组织如食管癌、胰腺癌、移行上皮细胞癌的阳性反应可能是由于 ras-onc 的激活所致。

图 1—3

1. 食管鳞癌。部分癌细胞与抗 11 肽血清呈强阳性免疫反应。
抗 11 肽血清 (PAP), $\times 123.75$

2. 肾盂移行上皮细胞癌。
部分癌细胞与抗 11 肽血清呈强阳性免疫反应。
抗 11 肽血清 (PAP) $\times 123.75$

3. 胰腺腺癌。
部分癌细胞与抗 11 肽血清呈强阳性免疫反应。
抗 11 肽血清 (PAP), $\times 123.75$

最近, Charedin 和 Tavitian^[2] 利用人工合成的探针发现了一个新的与 ras 相关但不相同的癌基因,命名为 ral, 此探针是根据 K-ras P21 中第 57—63 氨基酸顺序 (Asp-Thr-Ala-Gly-Gln-Glu-(Glu/Asp)) 合成的寡核苷酸,而本实验中合成的 P21 中 56—66 肽段正包含了这一顺序,因此在本实验中与 11 肽抗血清反应的抗原有可能是 ral 癌基因的产物蛋白(分子量为 23500),而与 K-ras 癌基因的产物 P21 不完全相同。已有资料表明,在人原发性结肠腺癌中出现 H-ras, K-ras 的表达^[2],在人原发性肝癌中出现 N-ras 的表达^[3],但是本实验在人原发性结肠腺癌及肝癌的绝大多数样品中均未查出有与 11 肽抗血清的免疫反应,这进

一步说明本实验中观察到的能与 11 肽抗血清反应的抗原可能与 K-ras H-ras 和 N-ras 基因的产物蛋白 P21 不同,但是否与 *ral* 基因的产物蛋白相同尚需进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Ohuchi, N., Thor, A. et al., *Cancer Res.*, 46(1986), 2511—2519.
- [2] Slamon, D. J., deKernion, J. B. et al., *Science*, 224(1984), 256—262.
- [3] Korn, L. J., Siebel, C. W. et al., *Science*, 236(1987), 840—843.
- [4] Wakelam, M. J., Davies, S. A. et al., *Nature*, 323(1986), 173—176.
- [5] Smith, M. R., DeGudicibus, S. J., Stacey, D. W., *Nature*, 320(1986), 540—543.
- [6] Tanaka, T., Slamon, D. J., Cline, M. J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82(1985), 3400—3404.
- [7] Carney, W. P. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83(1986), 7485—7489.
- [8] Ghosh, A. K., Moore, M., Harris, M., *J. Clin. Pathol.*, 39(1986), 428—434.
- [9] Habib, N. A., Wood, C. B., *Int. Surg.*, 71(1986), 182—183.
- [10] 曾庆镒等,生物化学与生物物理学报, 18(1986), 193—201.
- [11] 张红、钮经义,生物化学与生物物理学报, 20(1988), 84—90.
- [12] Charedin, P., Tavitian, A., *EMBO*, 5(1986), 2203—2208.
- [13] 顾健人等,中国科学, B 辑, 1985, 5: 452—457.