

TRENDS IN CELL BIOLOGY
Vol.1.1996

细胞生物学 动态

● 第一卷

翟中和 主编

北京师范大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

细胞生物学动态: 1996 第一卷/翟中和主编; 郝水等编著. -北京: 北京师范大学出版社, 1997. 2

ISBN 7-303-04252-0

I. 细… II. ①翟… ②郝… III. 细胞学: 生物学-动态-1996 N. Q28

中国版本图书馆 CIP 数据核字(97)第 00925 号

北京师范大学出版社出版发行

(100875 北京新街口外大街 19 号)

北京昌平兴华印刷厂印刷 全国新华书店经销

开本: 787×1092 1/16 印张: 13 字数: 318 千

1997 年 3 月北京第 1 版 1997 年 3 月北京第 1 次印刷

印数: 1—2 000 册

定价: 12.50 元

编辑委员会

主 编 翟中和

副主编 郝 水 王永潮 汤雪明 王钦南

编 委 (以姓氏笔划为序)

丁明孝	王亚辉	左嘉客	庄临之	刘树森
许智宏	邢 苗	孙方臻	孙敬三	李靖炎
吴 旻	吴祖泽	张 博	张惟杰	陈 竺
陈建国	陈慰峰	杨弘远	杨福愉	周柔丽
贺福初	桂建芳	贾敬芬	徐永华	章静波
裴 钢	薛绍白			

秘 书 陈建国 (兼) 张 博 (兼)

出版说明

根据国家自然科学基金委细胞生物学战略课题组专家的建议,并征求国内一些生物学专家的意见,为适应国内外细胞生物学发展的形势,并为制订我国细胞生物学研究战略与计划提供依据,决定出版“细胞生物学动态”年评,每年一卷,主要目的是介绍国际细胞生物学发展与新动态,以最新最活跃的细胞生物学前沿领域与新的热点为主要内容。其中以综述性文章为主,兼顾刊登短评、快讯与国际国内成果和学术会议动态。以科学研究工作者、高校教师、研究生与大学生为主要对象。我们希望“细胞生物学动态”的出版能为促进我国细胞生物学研究的发展、不断提高细胞生物学教学质量做一些铺路的工作。

《细胞生物学动态》编委会

1996. 8.

本卷内容简介

本卷内容包括细胞结构与功能,细胞周期与调控,细胞分化与发育,细胞编程性死亡,细胞起源与进化,细胞生物活性因子,细胞生物学研究新方法与新技术等诸多领域。在细胞分化与发育专题中,介绍了我国学者首创的应用分化诱导剂治疗急性早幼粒细胞白血病的工作,以及近年来国内外学者应用“基因灭活”(Gene Disruption, Gene Knock out, Gene Targeting)技术研究胸腺内T淋巴细胞发育机理的成果。此外,还总结了目前所知的与乳腺癌发生有关的基因,由此我们可以管窥研究肿瘤发生与治疗的复杂性。1995年度Nobel生理学或医学奖再次惠顾研究果蝇的科学家,本卷在细胞分化与发育专题中对三位获奖者(E. B. Lewis, C. Nüsslein-Volhard, E. F. Wieschaus)的工作作了简要介绍。在细胞周期与调控专题中,既有对细胞周期调控的研究现状进行全面系统的总结,又有针对其中扮演重要角色的因子如负调控因子(CKIs)的剖析,以及对当前研究热点如RNA剪接与激酶及其与周期调控的联系的回顾。本卷的细胞结构与功能专题中介绍有关细胞核的内容。联会复合体是减数分裂前期同源染色体配对时形成的一种引人注目的结构,核纤层则是间期细胞核膜下存在的一层纤维蛋白构成的网络结构。非细胞体系细胞核重建技术建立至今仅仅12年,但已被广泛应用于研究细胞核的结构组装与功能活动,使细胞核领域的研究进展迅速。近几年细胞衰老与死亡领域研究的热点当属细胞编程性死亡(Programmed Cell Death, 或Apoptosis)的研究,为此我们在本卷中选登了数篇各有侧重的综述文章。细胞的起源与进化随着当代生物学的发展不断给我们带来新的认识。在细胞生物活性因子专题中介绍了淋巴细胞特异性蛋白LSP1的研究概况,细胞粘附分子与类风湿关节炎的关系,转化生长因子及其作用机制,以及一种新的植物生长调节物——根瘤菌结瘤因子。本卷的细胞生物学研究新方法与新技术介绍了一个研究蛋白质功能的有效方法——负显性突变,这种技术与上述“基因灭活”技术有异曲同工之妙。

11/11/78/12

征稿简则

一、宗旨：《细胞生物学动态》是为适应细胞生物学迅速发展的情势而创办的综合性年评，介绍细胞生物学（包括分子生物学）前沿领域的发展动态与新的热点，以促进国内细胞生物学的研究与国际水平接轨，并为制订我国细胞生物学研究战略与计划提供依据。

稿件类型：以综述性文章为主，兼顾刊登短评、快讯与国际国内成果与学术会议动态。

读者对象：以科学研究工作者、高校教师、研究生与大学生为主要对象。

二、字数：6 000~20 000 字，由作者根据需要酌定。

格式：题目

作者

作者单位及地址

正文

参考文献：择主要的引用。以在文中出现的先后顺序附于文末。具体格式如下：

(1) 作者，年份，题目，期刊名，卷数（期数），起止页数。

(2) 作者，题目，书名，主编，出版社及其所在地，年份，起止页数。

注意：作者要引全。

名词术语：在文中第一次出现时最好注明英文名称。

计量单位：采用国际单位制。

插图、表格。

三、来稿请用打印件，最好能提供软盘，请采用 WPS 或中文之星系统。

四、来稿请寄 北京大学生命科学学院翟中和教授或张博博士（邮编：100871）。

目 录

细胞分化、发育与肿瘤细胞生物学

维甲酸诱导早幼粒白血病细胞分化.....	1
——肿瘤分化诱导治疗的代表性模式	
从基因灭活理解 T 淋巴细胞发育机理	7
乳腺癌相关基因的研究进展	22
早期胚胎发育的遗传学控制	29
——1995 年度 Nobel 生理学或医学奖介绍	

细胞周期与调控

RNA 剪接与激酶和细胞周期调控的联系.....	33
细胞周期调控	46
细胞周期“驱动器”中的负调控元件——CKIs	61

细胞结构与功能

联会复合体研究进展	66
核纤层研究进展	75
非细胞体系核重建机理的研究进展	93

细胞编程性死亡

细胞凋亡研究进展.....	126
细胞程序性死亡的生化特征及分子机制.....	144

细胞的起源与进化

细胞的起源.....	156
------------	-----

细胞生物活性因子

淋巴细胞特异性蛋白 1 (LSP1) 的研究	161
细胞粘附分子与类风湿关节炎.....	170
转化生长因子及其作用机制.....	176
根瘤菌结瘤因子——一种新的植物生长调节物.....	183

新方法与技术

负显性突变——一个研究蛋白质功能的有效方法.....	193
----------------------------	-----

细胞分化、发育与肿瘤细胞生物学

维甲酸诱导早幼粒白血病细胞分化 ——肿瘤分化诱导治疗的代表性模式

陈竺 陈赛娟 董硕 童建华 朱军

(上海血液学研究所)

恶性肿瘤细胞的基本特征是分化受阻,增殖失控和凋亡异常。近年来,我国学者首创的应用分化诱导剂治疗急性早幼粒细胞白血病 (acute promyelocytic leukemia, APL) 的工作,因其开创了肿瘤治疗的崭新途径,同时又对细胞增殖、分化、凋亡调控的基础理论研究产生重大影响,而倍受科学界的重视。

一、APL: 分化诱导疗法在肿瘤的第一个成功范例

APL 是一种具有特异临床表现和生物学特征的白血病,其白血病细胞的分化被阻断于早幼粒阶段。在绝大多数 APL 患者的细胞中都存在着染色体交互易位 $t(15; 17)(q23; q12 \sim 21)$,而在其他类型的白血病中则无此种异常,提示在 APL 的发生中该染色体的特异性易位起着重要的作用。APL 还有一个重要的特征是其白血病细胞能在体外和体内对全反式维甲酸 (ATRA) 的治疗作出反应^[1~4]。

肿瘤分化诱导的概念是 70 年代提出的。Sachs 的工作首次证实肿瘤表型是可逆的^[5]。对分化诱导剂的搜寻旋即兴起一股热潮,于 80 年代初已证实细胞因子 (如干扰素、集落刺激因子)、激素 (包括类固醇激素、维甲酸 D 及维甲酸)、第二信使 (cAMP 等)、某些小分子化合物如六二甲二乙酰胺 (HMBA)、佛波酯 (TPA)、丁酸盐以及某些化疗药物如阿糖胞苷 (Ara-C) 等,均可在不同细胞体系对恶性细胞产生诱导分化的作用^[6]。在维甲酸研究方面的开创性工作首推 Breitman 等,他们于 1980 年即指出维甲酸 (retinoic acid, RA) 能促进人类早幼粒细胞白血病细胞系 HL-60 的分化^[7]。RA 包括一组天然存在的维生素 A 活性代谢物,已知有 13 顺式 (13cRA)、全反式 (ATRA) 和 9 顺式 (9cRA) 等异构体。受 Breitman 等以及其他作者工作的启发,1984~1985 年上海血液学研究所在王振义教授的指导下,进行用 ATRA (当时在国内唯一能得到的维甲酸构型) 治疗 APL 的研究工作。1986 年,在体外实验肯定了 ATRA 能有效地诱导新鲜 APL 细胞向终末期分化之后,即用于治疗 APL 患者,结果在 24 例 APL 患者中有 23 例得到了完全缓解,该组报告于 1988 年发表后,在学术界引起了轰动。热情的国外学者称之为肿瘤治疗学领域内的一次“中国革命”^[8]。1992 年,我国 APL 治疗协作研究小组又报告了一个大组研究的结果,400 例 APL 用 ATRA 治疗的完全缓解率达 85%^[8,9]。同样的结果随后相继在法国、美国、日本和其他国家的一些血液中心得到证实^[2],所

得到的 85%~90% 的缓解率要高于化疗的结果,尤其是在发展中国家。最近,又有报道表明 ATRA 不仅是一种有效的诱导缓解的药物,而且合并化疗后对提高 APL 患者的长期无病存活率也有重要影响^[10]。目前我国已开始了随机抽样的前瞻研究,以比较缓解后不同的治疗方案,从而提高治愈率。

在过去的几年里,对 APL 的发生机制和维甲酸诱导分化的作用原理在细胞和分子水平上的研究获得了可喜的成果,以下对染色体易位而产生的融合基因和维甲酸治疗 APL 的作用机制之间的关系进行讨论。

二、PML-RAR α 融合基因的分子克隆:基础和临床的相关

80 年代中期以来,两类维甲酸受体的发现大大地推动了对维甲酸所起的生理和药理作用的理解,这两类受体即维甲酸受体 (retinoic acid receptor, RAR) 和视黄醇 X 受体 (retinoid X receptor, RXR), 分别包括 3 个成员: α 、 β 和 γ ^[11]。RARs 和 RXRs 均属于核受体超家族范畴,这个家族还包括甾体类激素受体,维生素 D 受体 (VDR) 和甲状腺激素受体 (THR)。作为激素可诱导的转录因子,这些受体具有从 A 到 E 的六个功能区: A/B 区是不依赖配体的转录激活区, C 区是 DNA 结合区, E 区是配体结合区,并具有依赖配体的转录激活作用。RAR/RXR 异二聚体是受体的活性形式,它能通过与靶基因启动子中的特异 DNA 顺序 (维甲酸反应元件 RARE) 结合来调节其转录表达。在六个受体基因中, RAR α 因其位于染色体 17q21, 正好处于 t (15; 17) 中 17 号染色体的断裂区,而得到人们的特别注意。包括笔者在内的一些研究小组都认为 RAR α 是 t (15; 17) 中的一个候选受累基因。通过 mRNA 和基因组 DNA 分析表明由于 t (15; 17) RAR α 基因断裂于编码 RAR α A 区和 B 区的外显子之间的内含子中^[1~3]。

1991~1992 年,包括笔者在内的数个实验室都克隆到了 15 号染色体上与 RAR α 发生融合基因,这个现被称为 PML (即早幼粒白血病 promyelocytic Leukemia 的缩写) 的基因长约 50kb, 包含 10 个外显子。其基因的外显子-内含子结构和所编码的蛋白的功能区之间有着很好的对应关系, 1 号外显子编码一个富含脯氨酸的转录激活区, 2 号外显子编码一个环指区 (非典型的锌指 C3HC4 型), 3 号外显子编码一个线圈结构, 与蛋白质的二聚化有关, 4 号到 6 号外显子编码一个 α -螺旋区, 7 号到 10 号外显子是可被选择性剪接的 3' 末端^[12]。PML 属于一个新的核蛋白家族, 该家族还有另外一些与肿瘤有关的基因如 Raf 和 Ret。PML 基因的断裂点集中于两个主要区域: PML bcr3 包括 3 号内含子, 4 号外显子和 4 号内含子的 5' 端; PML bcr1 区位于 6 号外显子的下游。具有 PML bcr1 重组类型的病人其 PML-RAR α 融合基因转录本包括 PML 的 1 至 6 号外显子和编码 RAR α B 至 F 区的顺序, 这一融合的 mRNA 被称为长型, 相反, 具有 PML bcr3 重组类型的病人其 PML-RAR α 只包含了 3 个 PML 外显子 (1 号~3 号), 称为短型, 其 RAR α 部分与长型一致。在极少数病例 (我们的报道中占 5%) 中, PML 的断裂点位于 6 号外显子之中, 我们以前将它称为长型变异型, 现在被叫做 PML bcr2^[1~3]。

PML-RAR α 的分子克隆带来了重要的生物学和临床结果。将分子水平的资料与病人的临床资料相比较, 我们与其他小组发现几乎所有表达 PML-RAR α 的 APL 患者对 ATRA 均有反应, 而那些无 t (15; 17) 和 PML-RAR α 的 APL 患者细胞一般都不能分化, 这一现象导致了一个表面看来自相矛盾的观点: 即 ATRA 的疗效依赖于异常融合受体的出现。体外研究表明在与 RARE 的结合和转录激活方面, PML-RAR α 与野生的 RAR α 表现是不同的, 一些实验显示 PML-RAR α 能够拮抗正常的 RAR α 功能。与野生型的 RAR α 一样, PML-RAR α 也能与

RXR 形成异二聚体。由于 RXR 能与包括 RAR 在内的所有核激素受体形成有活性的异二聚体, 因此认为 PML-RAR α 对 RXR 的扣压可能会阻碍其他激素受体调节的正常分化途径。但是 PML-RAR α 应该还是可以被维甲酸调节的, 因为它保留了 RAR α 的配体结合区, 并且与配体具有正常的亲和力。最近, 有人将 PML-RAR α 导入 U937 细胞使得该细胞对 ATRA 具有高度敏感性^[13]。正如下面所要讨论的那样, ATRA 可以改变 PML-RAR α 在亚细胞结构中的分布。因此 PML-RAR α 可能是通过与 ATRA 的结合, 改变其受体的构象和生物性能, 从而由一种分化拮抗剂转变成一种分化诱导剂。运用逆转录酶/聚合酶链反应 retrotranscriptase/polymerase chain reaction, RT/PCR) 技术, 能够将长型和短型的融合转录本进行扩增。有趣的是, 短型融合转录本在那些带有胞浆含较细颗粒的早幼粒细胞的病人中发生率较高, 且愈后较差, 而长型融合转录本则主要见于胞浆呈现粗大颗粒的患者, 这一发现又提供了一个基因型与临床表型相关的证例。对 PML-RAR α 的 RT/PCR 分析可以监测临床缓解后的微小残余病变。我们与其他小组的研究表明, 在长期缓解的随访病人中, PCR 阴性的患者总是处于较好的临床缓解状态, 而 PCR 阳性的患者则有较高的复发危险^[14]。

三、ATRA 改变 APL 细胞, 包括 PML-RAR α 的生物特性

在 ATRA 诱导 APL 缓解的过程中, 业已检测了许多生物指标, 无论在体外还是体内, 加入 ATRA 后, 早幼粒白血病细胞中的蛋白激酶活性 K (protein kinase C, PKC) 明显增高。近来有报道表明, APL 患者的血清中有对造血祖细胞如 CFU-E、BFU-E、CFU-GM 和 CFU-MK 的生长抑制活性, 同样的活性在 NB4 细胞培养上清液中也存在, 这表明这种活性可能直接来自 APL 细胞。有趣的是, 用 ATRA 处理以后这种抑制活性则大为减弱, 正常的造血逐渐恢复以至完全缓解。初步的资料表明一种已知的造血负调节剂 TNF 可能是其中一种抑制因子, 因为在 ATRA 处理以前, TNF 在病人血清和 NB4 的细胞的培养液中水平相对较高, 而在用了 ATRA 后, 则明显降低。但是这些改变看来似乎都不大可能是 ATRA 诱导分化过程中的首发事件^[1]。

晚近, 对有关 PML 正常功能以及 ATRA 作用以后正常 PML 与 PML-RAR α 之间相互作用改变的研究有了重要的突破。PML 的转录表达是很普遍的, 在体外, PML 不但可以形成同源二聚体, 而且还可以通过线圈-线圈结构与 PML-RAR α 形成异二聚体。一些实验室显示 PML 是一种 0.2~0.3 μ m 的多蛋白核结构 (有人称之为核体, 也有人称之为 POD 结构 (PML Oncogenic domain PML 致癌区))。在几乎所有被检测的细胞类型中都有 15 到 20 个 POD 结构。在 APL 细胞中, 正常的 POD 结构被打乱, 呈现出成百个微粒。这些现象提示 PML-RAR α 可能是通过打乱野生型 PML 蛋白的 POD 结构而导致白血病的发生。有趣的是, 在 ATRA 的作用下, POD 结构的失调是可逆的, 无论体外还是体内用 ATRA 处理 APL 细胞可诱导 PML 的重新定位, 恢复其正常的 POD 结构。由于这种恢复定位在 ATRA 作用后发生得比较早 (24 小时内), 因此对于分化来说它可能是首发的事件之一。在对 ATRA 具有抗性的 NB4 细胞中不发生 PML 的恢复定位也支持了这一观点^[15~17]。

四、伴 t (11; 17) 染色体易位及产生的 PLZF-RAR α 的 APL 对 ATRA 反应差

PML-RAR α 不但可以打乱正常的 PML 定位, 而且可以引起 RAR 和 RXR 在亚细胞结构中的分布异常。近来由笔者在国际上首次报道的变异型染色体易位 t (11; 17) 的发现证实了

这样一种观点,即 RAR-RXR 调节的途径受干扰将在白血病的发生中起关键作用。 $t(11;17)$ 产生了一种新的融合基因 PLZF (早幼粒白血病锌指, promyelocytic leukemia zinc finger)-RAR α ^[18~20]。PLZF 属于 Krüppel 基因家族,其 N 末端与 Bcl-6 基因有着很高的同源性,后者在弥漫型 B 细胞淋巴瘤中因染色体易位而发生表达失调。笔者最近所做的转染试验表明 PLZF-RAR α 拮抗野生型的 RAR α 以及 RAR/RXR 异二聚体的转录激活作用。相对 PML 来讲 PLZF 的表达谱要窄得多。在造血系统中,PLZF 主要在早期的粒细胞中表达,在 ATRA 诱导粒系分化的过程中有一个下降调节。十分有意义的是,PLZF-RAR α 也可以与 RXR 形成异二聚体,因此有可能 PLZF-RAR α 也是以与 PML-RAR α 相似的方式阻碍早幼粒细胞的分化。

在 APL 中 $t(11;17)$ 并不是一个偶发事件。一个由中国、法国、美国组成的国际协作小组报道了 6 例伴 $t(11;17)$ 的 APL,它们都有 PLZF-RAR α 融合基因。临床资料显示这些病人用 ATRA 治疗无效。其中三例的细胞在体外培养后对维甲酸亦无反应。因此可以得出结论伴有 $t(11;17)$ 和 PLZF-RAR α 融合基因的 APL 是一种确实存在的临床综合征,其愈后差于伴 $t(15;17)$ 的 APL^[21],这些研究再次提示 ATRA 通过作用于 PML-RAR α 来诱导绝大多数 APL 患者的缓解,而表达 PLZF-RAR α 的细胞何以在对 ATRA 的反应性上不同于表达 PML-RAR α 的细胞,则有待深入研究。

五、ATRA 治疗 APL: 靶诱导疗法

APL 研究给人们最主要的启示之一,便是 ATRA 通过一种相当特殊的方式来克服 APL 中关键的遗传异常。从这种观点出发,ATRA 治疗可以被认为是一种对基因(或基因产物)的靶治疗,其结果是使肿瘤细胞分化。既然 ATRA 改变了融合的维甲酸受体,后者又是一种转录调节因子,因此分离受维甲酸激活或抑制的基因就显得非常重要。若能直接改变在“共同”分化途径中受累的基因,也许可以绕过维甲酸受体而用于其它肿瘤的治疗。

另一个重要的课题是联合使用那些影响不同调节途径的分化诱导剂。最近的研究表明在 APL 细胞中维甲酸可以推动非维甲酸类的分化诱导剂的作用效果,在对维甲酸具耐药性的 NB4 亚细胞株中联合使用 ATRA 和 cAMP 可以诱导细胞分化便是一个很好的例子。新近发现的 9cRA,当其与 ATRA 联合作用时也能够诱导对维甲酸耐药的 HL-60 细胞向终末期分化。已有证据表明 γ 干扰素与 ATRA 合用可产生明显的协同作用。因而不同的维甲类或维甲酸与其他药物共同使用将为临床治疗带来广阔的前景^[3]。

有证据表明每一种肿瘤都有其特有的遗传基础,并且至少要涉及到有关细胞生命的三个基本方面中的一个:增殖、分化和细胞死亡。在那些因分化受阻而引起的肿瘤中,如果能够揭示分化失调的关键点(如同 $t(15;17)$ 和随之而来的 PML-RAR α),并找到合适有效的诱导分化剂(如同 ATRA),那么分化治疗将会是非常有效的。因此,对肿瘤分子生物学的研究以及对那些能够诱导分化的新分子(包括自行设计的药物)的研究必定会促进分化疗法的发展。我们的结论是在未来的肿瘤治疗中分化疗法将是最令人鼓舞的策略之一,它必将会受到广泛的注意,并给肿瘤患者带来福音。

致谢

感谢王振义教授在肿瘤分化治疗方面开创性工作奠定的基础,及近年来对我们的工作的总体指导。本文得到国家自然科学基金、“863”高科技项目、上海市科委自然科学基金、国

家教委基金、卫生部基金及上海血液学研究所胡应洲基金等资助,在此一并致以衷心的感谢。

参考文献

1. Chen S. J. , Wang Z. Y. , Chen Z. Acute promyelocytic leukemia: From clinic to molecular biology. *Stem Cells* 1995; 13: 22~31.
2. Warrell R. P. , de The H. , Wang Z. Y. , Degos L. 1993. Acute Promyelocytic Leukemia N. Eng. J. Med. 329: 177~189.
3. Grignani F. , Fagioli M. , Alcalay M. , Long L. , Pandolfi P. P. , Donti E. , Biondi A. , Lo Coco F. , Grignani F. , Pelicci P. G. 1994. Acute promyelocytic leukemia: from genetics treatment, *Blood* 83: 10~25.
4. Smith M. A. , Parkinson D. R. , Cheson B. D. , Friedman M. A. 1992. Retinoids in cancer therapy. *J. Clin. Oncology* 10: 839~864.
5. Sachs, L. 1978. Control of normal differentiation and the phenotypic reversion of malignancy in myeloid leukemia cell. *Nature* 274: 535.
6. Koeffler H. P. 1983. Induction of differentiation of human acute myelogenous leukemia cells; Therapeutic implication. *Blood* 62: 709~721.
7. Breitman T. R. , Selonick S. E. , Collins S. J. 1980. Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77: 2936~2940.
8. Huang M. E. , Ye Y. C. , Chen S. R. , Chai J. R. , Lu J. X. , Zhao L. , Gu L. J. , Wang Z. Y. 1988. Use of all-trans retinoic acid in treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 72: 567~572.
9. National Cooperative Study Group on Treatment of Leukemias. 1992. Clinical study on all-trans retinoic acid in the treatment of 544 patients with acute promyelocytic leukemia. *Chin. J. Hematol.* 13: 135~137.
10. Fenaux, P. , Le Deley M. C. , Castaigne S. , Archimbaud E. , Chomienne C. , Link H. , Guerci A. , Duarte M. , Daniel M. T. , Bowen D. , Huebner G. , Bauters F. , Fegueux N. , Fey M. , Sanz M. , Lowenberg B. , Maloisel F. , Auzanneau G. , Sadoun A. , Gardin C. , Bastion Y. , Ganser A. , Jacky E. , Bombret H. , Chastang C. , Degos L. , The European APL 91 group. 1993. Effect of all transretinoic acid in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. Results of a Multicenter randomized trial. *Blood* 82: 3241~3249.
11. Leid M. , Kastner P. , Chambon P. 1992. Multiplicity generates diversity in the retinoic acid signalling pathways. *Trends Biochem. Sci.* 17: 427~433.
12. Geng J. P. , Chi ZW, Tong J. H. , Dong S, Wang Z. Y. , Chen S. J. , Chen Z. 1993. Genomic organization of the PML gene and its rearrangement in acute promyelocytic leukemia. *Science in China Series B* 23: 624~631.
13. Grignani F. , Ferrucci P. F. , Testa U. , Talamo G. , Fagioli M. , Alcalay M. , Mencarelli A. , Grignani F. , Peschle C. , Nicoletti L. , Pelicci P. G. 1993. The acute promyelocytic

- leukemia-specific PML-RARa fusion protein inhibits differentiation and promotes survival of myeloid precursor cells. *Cell* 74: 423~431.
14. Huang W. , Sun G. L. , Li X. S. , Cao Q. , Lu Y. , Jang G. S. , Zhang F. Q. , Chai J. R. , Wang Z. Y. , Waxman S. , Chen Z. , Chen S. J. 1993. Acute promyelocytic leukemia; Clinical relevance of two major PML-RARa isoforms and detection of minimal residual disease by retrotranscriptase/ polymerase chain reaction to predict relapse. *Blood* 82: 1264~1269.
 15. Dyck J. A. , Maul G. G. , Miller W. H. , Chen J. D. , Kakizuka A. , Evans R. M. 1994. A novel macromolecular structure is a target of the promyelocyte-retinoic acid receptor oncoprotein. *Cell* 76: 333~343.
 16. Weis K. , Rambaud S. , Lavau C. , Jansen J. , Carvalho T. , Carmo-Fonseca M. , Lamond A. , Dejean A. 1994. Retinoic acid regulates aberrant nuclear localization of PML-RARa in acute promyelocytic leukemia cells. *Cell* 76: 345~356.
 17. Koken MHM. , Puvion-Dutilleul F. , Guillemain M. C. , Viron A. , Linares-Cruz G. , Stuurman N. , de Jong L. , Szosteki C. , Calvo F. , Chomienne C. , Degos L. , Puvion E. , de The H. 1994. The t (15; 17) translocation alters a nuclear body in a retinoic acid-reversible fashion. *EMBO. J.* 13: 1073~1083.
 18. Chen Z. , Brand N. J. , Chen A. , Chen S. J. , Tong J. H. , Wang Z. Y. , Waxman S. , Zelent A. 1993. Fusion between a novel Kruppel-like zinc finger gene and the retinoic acid receptor-locus due to a variant t (11;17) translocation associated with acute promyelocytic leukemia. *EMBO. J.* 12: 1161~1167.
 19. Chen S. J. , Zelent A. , Tong J. H. , Yu H. Q. , Wang Z. Y. , Derre J. , Berger R. , Waxman S. , Chen Z. 1993. Rearrangements of the retinoic acid receptor alpha and promyelocytic leukemia zinc finger genes resulting from t (11; 17) (q23; q21) in a patient with acute promyelocytic leukemia. *J. Clin. Investt.* 91: 2260~2267.
 20. Chen Z. , Guidez F. , Rousselot P. , Adakir A. , Chen S. J. , Wang Z. Y. , Degos L. , Zelent A. , Waxman S. , Chomienne C. 1994. PLZF-RARa fusion proteins generated from the variant t (11; 17) (q23; q21) translocation in acute promyelocytic leukemia inhibit ligand-dependent transactivation of wild-type retinoic acid receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91: 1178~1182.
 21. Licht J. D. , Chen A. , Goy A. , Wu Y. , Scott A. A. , DeBlasio A. , Miller WHJR, Zeleneta A. D. , Willman C. L. , Head D. R. , Chomienne C. , Chen Z. , Chen S. J. , Zelent A. , MacIntyre E. , Veil A. , Cortes J. , Kantarjian H. , Waxman S. Clinical and molecular characterization of acute promyelocytic leukemia associated with translocation (11; 17). *Blood* 85: 1083~1094.

从基因灭活理解 T 淋巴细胞发育机理

陈慰峰 (北京医科大学免疫学系)

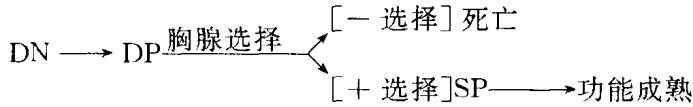
前言

自 1961 年, Miller 报道胸腺是 T 淋巴细胞发育的中枢器官以来, 研究 T 细胞在胸腺内的发育一直成为推动免疫学发展的主要动力之一。在 30 多年的时间中, 此领域的研究已大致经历三个阶段, 第一阶段 (1961~1973): 证实 Miller 的发现, 胸腺是 T 细胞发育必不可少的器官, 新生期小鼠切除胸腺, 人类先天性胸腺缺陷 (digeorge 综合症) 及 NU/NU 突变的无胸腺裸鼠, 均致严重的细胞免疫障碍, 缺乏抗病毒感染免疫, 抗体产生亦显著下降, 进而发现 T 细胞在功能上可分为杀伤 T 细胞 (cytotoxic T cell, CTL) 及辅助 T 细胞 (helper T cell, HTL) 亚群。T 细胞在识别抗原时均受主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex, MHC) 抗原的限制, 即 T 细胞必须同时识别外来抗原及 MHC 抗原, 才能活化。第二阶段 (1973~1991): 提示 T 细胞在胸腺内发育的主要程序, 单克隆抗体 (MAb) 研制, 结合流式细胞计 (FACS) 分选, 将胸腺细胞分为不同亚群, 按其表现型 (Phenotype) 特点、功能状态及重建胸腺细胞能力, 分析各亚群在发育上的前后序列 (Precursor-Product) 关系。在 80 年代初 (1982~1984), T 细胞抗原识别受体 (TCR) 基因 α 、 β 、 γ 、 δ 先后被克隆成功, 进而证明 TCR 基因重排、转录及表达是在胸腺内早期 T 细胞阶段进行并完成的, 分析 TCR 基因活化及表达状态, 成为分析胸腺 T 细胞发育阶段的重要指标之一。第三阶段 (1987~现在) 研究 T 细胞在胸腺内发育的机理, 特别是胸腺微环境基质细胞 (thymic stromal cells, TSC) 对 T 细胞发育的选择作用及其机理, 以嵌合小鼠 (chimeric mice) 研究干细胞 (stem cells) 在与其 MHC 不同的胸腺微环境内的发育, 分析 TSC 表达的 MHC 分子对 T 细胞发育的作用, 进而以转基因小鼠 (Transgenic mice) 分析具有转入的对特异抗原识别的功能性 TCR 基因的干细胞在表达特定 MHC 胸腺微环境内的发育过程, 从而发现胸腺微环境 TSC 对 T 细胞发育有阳性选择作用, 导致功能性 T 细胞的产生; TSC 对 T 细胞发育亦同时有阴性选择作用, 导致消除对自身抗原应答的 T 细胞克隆, 或使应答无能, 形成免疫耐受 (immunological tolerance)。近年来, 基因灭活 (gene disruption, gene knock out, gene targeting) 小鼠的建成, 分析目的基因在囊胚期灭活后, 胸腺内 T 细胞发育异常程度^[1,2]。从反面证实此目的基因在 T 细胞发育中的作用。基因灭活小鼠的应用, 与转基因相配合, 丰富了对 T 细胞发育过程中的分子机理的认识。

一、胸腺内 T 细胞发育的主要程序

为便于理解基因灭活对 T 细胞发育的影响, 此处简介胸腺内 T 细胞发育的基本过程。在胸腺内, T 细胞按其自身编程进行分阶段的又连续的发育过程, 使从骨髓进入的祖细胞 (progenitors, pro-T 细胞), 经历分化和被选择过程, 发育为表现型及功能成熟的 T 细胞, 输出胸腺, 定位于末梢淋巴器官及组织。胸腺内的 T 细胞称胸腺细胞 (thymocytes), 它们处于不同

发育阶段。按细胞表达 CD4/CD8 分子与否, 可将胸腺细胞分为 4 群即: $CD4^-CD8^-$ (double negative, DN), 占胸腺细胞总数的 3~5%、 $CD4^+CD8^+$ (double positive, DP), 占胸腺细胞总数的 80~85%、 $CD4^+CD8^-$ 及 $CD4^-CD8^+$ (single positive, SP), 分别占胸腺细胞总数的 10% 及 5%。DP 细胞定位于胸腺皮质, 称胸腺皮质型细胞; SP 定位于胸腺髓质, 称胸腺髓质型细胞, 此群细胞的大部分 (50%~70%) 已功能成熟, 其发育程序大致为:



DN 阶段是很不均一的细胞群^[3], 按自身再生 (self-renewal) 能力、分化潜能、重建 T 细胞免疫能力、TCR 基因状态, CD3 复合分子传导信息、表现型特点及免疫功能的表达, 可将 DN 细胞分为祖细胞 (Pro-T) 阶段, 此阶段细胞的表现型为 $CD3^-CD4^-CD8^-$ (triple negative, TN) $Pgp-1^+IL-2R\alpha^-$ 及 TCR^- , 基因为生发系状态 (germline, GL) 尚未进行基因重排, 有自身再生能力及分化潜能, 注射入胸腺内, 可分化为各胸腺亚群细胞, 包括 $TCR\alpha\beta^+$ 及 $TCR\gamma\delta^+$ 胸腺细胞, 且可分化为 B 细胞及树突状细胞 (dendritic cells, DC)。按重建胸腺细胞的动态试验, Pro-T 细胞分化产生 Pre-T, 此阶段 TCR β 基因进行重排, α 基因仍为 GL, 表达 IL-2R α 链及 C-Kit (即 $Pgp-1^+IL-2R\alpha^+$, TN), 此群细胞发育完成 TCR β 基因重排, 并同时下调 Pgp-1 及 IL-2R α , 使其表现型成为 $pgp-1^-IL-2R\alpha^-TN$, TCR β 基因已重排 (R), TCR β^R 导致转译成 TCR β 链蛋白, 与 pT α (pre-TCR α , pT α , GP30, 不同于 TCR α 链)^[4] 结合, 组成结构上相似于 TCR α - β 二肽链, 表达于细胞表面, 能识别胸腺基质细胞 (TSC) 上的尚未鉴定清楚的配基, 产生信息, 在此同时细胞表达 CD3 复合分子, 并能传导信息, 细胞即从 Pre-T 阶段发育为 TCR β -pT α^+CD3^+ 的 DN 细胞, 此细胞表面功能性受体 TCR β -pT α 与配基结合后产生的信息, 经 CD3 向细胞内传导, 活化 TCR α 基因, 使之重排, 转录并转译成 TCR α 链蛋白, TCR α 与 β 链经二硫键结合组装成 TCR $\alpha\beta$ 二聚体, 表达于细胞表面, 在此发育同时, 细胞 CD4 及 CD8 基因活化, 在细胞表面表达 CD4 及 CD8 分子, 使细胞表现型分化成 TCR $\alpha\beta^-CD3^+CD4^+CD8^+$ 细胞, 即 TCR-CD3 ^+DP 细胞, 此中间阶段 (intermediate stage) 的细胞经历胸腺选择, 在与 TSC 相互作用过程中产生的阳性选择, 使细胞存活, TCR $\alpha\beta$ 密度增加, CD4 或 CD8 分子下调, 形成表现成熟的 TCR $\alpha\beta^+CD3^+CD4SP$ 及 TCR $\alpha\beta^+CD3^+CD8SP$ 的两个胸腺髓质型细胞亚群, 此两 SP 亚群细胞须再经历胸腺选择后过程 (post-thymic selection), 或再经历胸腺髓质区的进一步选择及发育, 分化成为功能成熟的 T 细胞亚群, 输出胸腺 (图 1)。

在上述胸腺内 T 细胞发育程序中, 有几个关键阶段决定其向下一阶段的发育: ①Pro-T 细胞向 Pre-T 细胞的发育, 产生定向发育为 T 细胞的前体细胞, Pro-T 细胞可分化为 T、B 及 DC 等不同系列的细胞, 而 Pre-T 细胞只能分化为 T 细胞; ②TCR β 及 γ 基因重排, 使 Pre-T 细胞开始向 TCR $\gamma\delta^+$ 及 TCR $\alpha\beta^+$ 两类不同细胞群分化, 形成 TCR $\gamma\delta^+DN$ T 细胞, 直接输出胸腺; ③TCR β 选择导致 TCR α 基因重排, 及 TCR $\alpha\beta$ 二肽链表达于细胞表面, 在尚不清楚的机理作用下, 分化发育为 TCR $\alpha\beta^+DN$ T 细胞输出胸腺, 及 TCR $\alpha\beta^+DP$ 细胞; ④胸腺选择, 阳性选择分化为 SP 细胞; 阴性选择, 克隆消除或无能。⑤选择后发育或二次胸腺选择, SP 细胞功能成熟, 输出胸腺, 在胸腺内 95% 的细胞死亡, 只有 5% 的细胞功能成熟, 细胞未完成功能性 TCR 基因重排者, 不能识别 TSC 上的配基, 而不能活化, 导致细胞的程序死亡 (programmed cell death, PCD) 发生, 细胞经历 TSC 的阴性选择者, 亦能发生 PCD 而死亡, 致克隆消除。

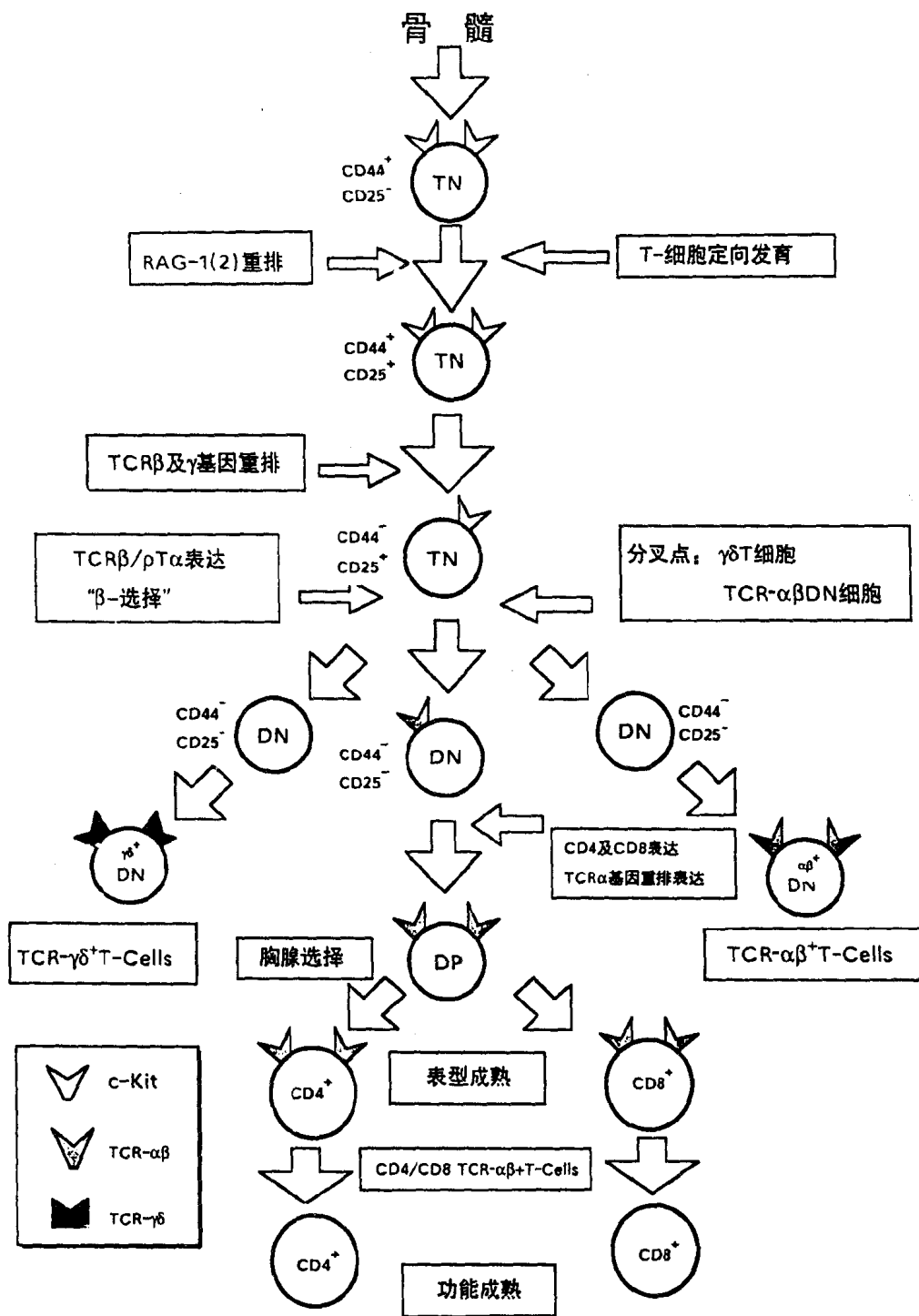


图 1. 胸腺内 T 细胞发育程序
TN, CD3⁻4⁻8⁻; DN, CD4⁻8⁻; DP, CD4⁺8⁻

二、建立基因灭活小鼠的技术原则

在真核细胞进行基因灭活, 是在于在外源 DNA 与内源性染色体上的同源基因之间能进行同源重组, 以此将经破坏或修饰的外源基因引入 ES 细胞 (胚胎干细胞) 染色体上的基因组

内，再将此基因重组后的 ES 细胞注入小鼠来源的囊胚 (blastocyst)，输入假孕的母鼠子宫，带有目的基因灭活的 ES 细胞参与胚胎发育，分化成各系列细胞，包括生殖细胞，而形成嵌合小鼠 (chimeric mice)，有些嵌合小鼠能将 ES 细胞基因组传给后代，培育和交配这些小鼠，从带有基因灭活的杂合子小鼠中，筛选获得基因灭活的纯合子小鼠 (图 2)，这些小鼠则纯粹是由 ES 细胞发育形成的新品种。

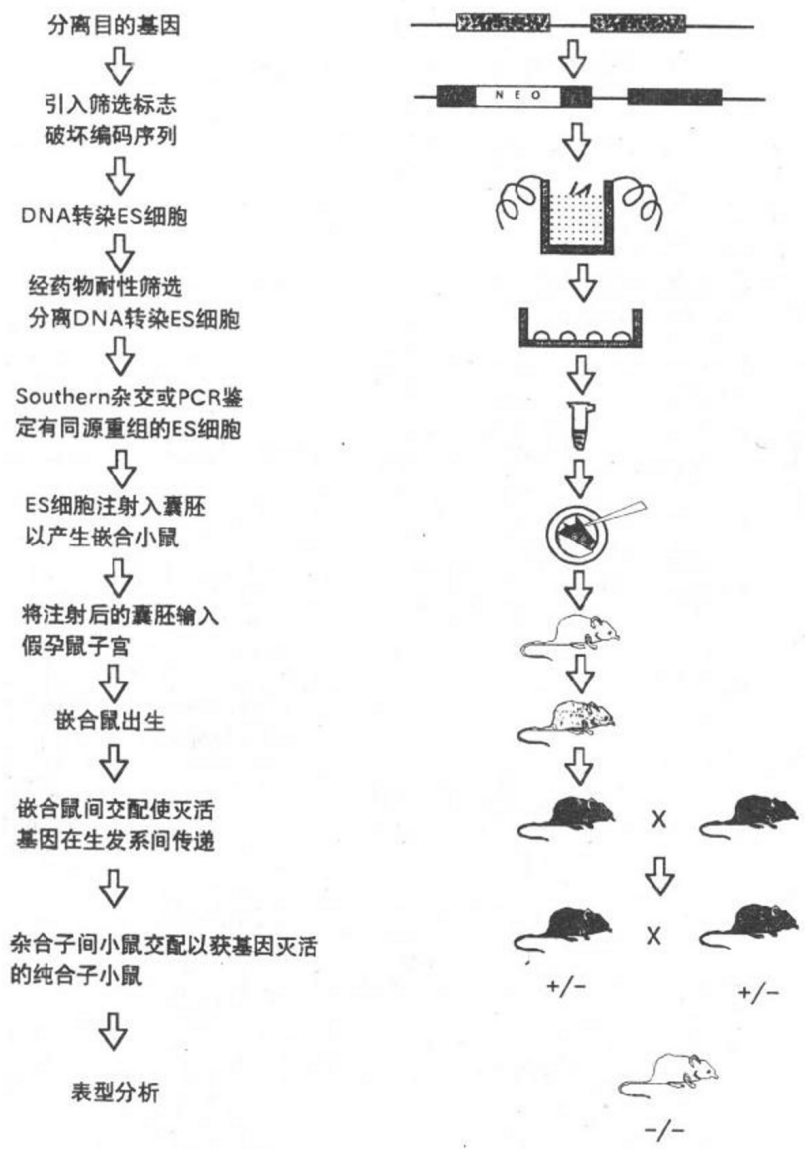


图 2 在 ES 细胞进行同源重组以产生基因灭活小鼠品系

1. 基因灭活技术^[5~8] 将选择性标记 (Selectable marker) 基因插入目的基因的一个外显子或一片段中，破坏目的基因功能，再将此基因构建于载体，形成打靶载体 (targeting vector)，将此载体转染 ES 细胞，经同源重组，在灭活基因与 ES 细胞中相应的野生型 (wild-type) 基因之间，进行置换 (replacement)，或插入 (insertion)，或导致删除 (deletion) 野生型基因的部分片段，这些结果均使目的基因突变。应用选择性标记基因筛选经同源重组后表现突变基因而失去野生型基因的 ES 细胞系。常用的选择性标记基因是新霉素磷酸转移酶 (neomycin phosphotransferase, neo) 基因，使宿主细胞抵抗 G418，常用的基因灭活方法是