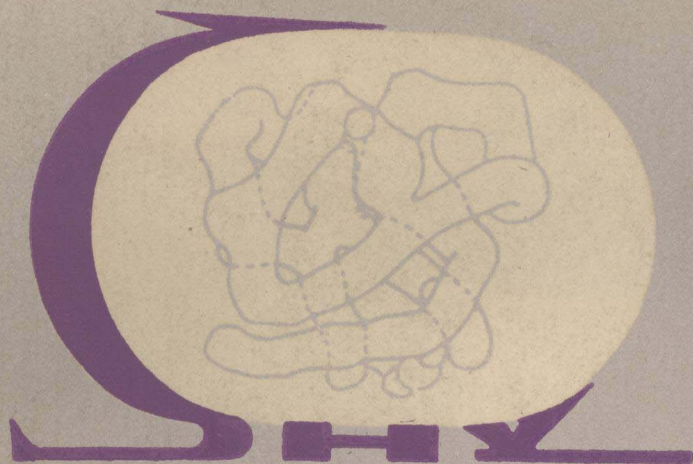




癌基因和癌变专辑

SHENGWUHUAXUEYICONG

生物化学译丛

第 7 辑

生 物 化 学 译 丛

第 7 辑

癌基因和癌变专辑

上海科学技术文献出版社

前 言

癌基因的发现是在近代有关肿瘤发病机理研究上激动人心的成就。自从第一个癌基因被公认后,已有许多癌基因被发现,它们不但存在于一些致癌病毒体内,还普遍存在于肿瘤组织,甚至正常细胞组织中。利用基因转移和分子克隆技术,已有可能深入了解癌基因的致癌作用,并且可以基因的改变进一步解释癌的许多生物学特性。寻找抑制癌基因及其产物的活性的物质是寻找新的抗癌药物的途径。如果阐明了癌基因如何工作,就可能找到如何去对抗它们,以致有一天我们将会了解如何使癌细胞逆向行驶倒转成正常细胞,终于控制了肿瘤,这确是值得注意的重大信息。

为了尽可能地介绍国外关于癌基因研究情况,本辑选译了九篇文章,供有兴趣的人员参考,但因癌基因的研究发展迅速,很可能译文出版时已落在形势后面。

上海第一医学院生化教研室 何开玲

1984年9月

目 录

1. 癌的分子基础.....	(1)
2. 癌基因和原癌基因.....	(13)
3. 癌基因.....	(20)
4. 关于癌基因的见解.....	(25)
5. 人体癌基因活化的机理.....	(32)
6. 细胞癌基因和逆病毒.....	(33)
7. 有关肿瘤遗传基础的线索.....	(59)
8. 人类肿瘤形成的遗传学.....	(64)
9. 细胞癌基因和多步骤的致癌过程.....	(70)

癌 的 分 子 基 础

Robert A. Weinberg

人类的癌是由癌基因所致，它是正常基因的变体。某种情况下，这种关键的变化只是单独一点的突变，只改变了由基因编码的蛋白质中的一个氨基酸。

病人身上切下的肿瘤是大量癌细胞的聚集物。它们全是由一个缔造细胞繁殖的。这一祖先曾经是某一组织中具有正常功能的正常细胞，它以某种方式经历了一个基本的变化，结果开始按自身规律进行分化和繁殖，而不受通常细胞生长所需的外界刺激因素影响。显然，此细胞繁殖了数万亿相同的变态细胞，构成了肿瘤块。

癌发生的关键问题要追溯到“奠基”细胞的变态。这细胞怎会逃避开对细胞生长的正常约束呢？过去几年已开始进行一些回答。癌基因已在肿瘤细胞的染色体上发现。这些通常称为癌基因的基因成为许多癌细胞异常生长的动力。这些基因在正常“奠基”细胞转化为癌细胞时被激活，基因便具有能持续指导着细胞转向称为癌状况的异常行为。

基 因 多 类 性

癌细胞的异常行为是指许多与众不同的特征，其中最明显的特征是无控制的生长。癌细胞常常有着与其相应的正常组织很不同的形状；它们不遵守限制正常细胞于一定组织的规则；它们多以异常高的速率摄入糖分子；它们不需氧，依靠异常程度的厌氧代谢进行能量转换。癌细胞的外膜与正常细胞不同，它有特殊的肿瘤抗原而赋予细胞与众不同的免疫学特性。

这仅仅是长的癌基因分类表项目的一个开端，此项目的长度和其所含的癌的表现型（整套决定癌细胞的结构和功能特征）的复杂性又引出了重要问题：这些特征中那些对于癌状态来说是基本的，那些是外表的呢？如一个癌细胞有一百种明显特征，它们的每一个特征都是在癌发生的过程中分别获得的吗？是否这细胞在其从正常组织的演变过程中经历了一百个阶段，每个阶段都标志着不同的变化吗？或更简单些说，“基因多类性”的机制在起作用吗？也许一个唯一的中心行动的细胞因子的启动能同时诱导大量表现型的变化。

幸而事实表明这是简单的。早期证据是在约二十年前由 Marguerite Vogt 和 Renato Dulbecco 对数种在某些诱发动物癌的小 DNA 病毒的研究所提供的。他们首次能在实验室的培养皿里将正常细胞转变为肿瘤细胞。他们用多瘤病毒感染生长在培养皿里的田鼠胚胎成纤维细胞（结缔组织细胞），结果观察到受感染的培养组织产生变态细胞病灶或克隆，且堆积于其它细胞上，而不是象正常细胞形成平的单细胞层。把这变态的细胞接种于幼鼠时，便增生为肿瘤。换句话说，在培养皿内处理正常细胞可产生肿瘤细胞。细胞被诱导，经历了一个“转变”而成为肿瘤细胞。肿瘤的诱导不再是一个只发生在动物体内不能接近的组织中的神秘过程（图1）。

病毒转化的细胞表现出了许多与癌的表现型有关的变态特性。Dulbecco 等人指出：转化是由病毒基因以某种方式诱导的，病毒遗传信息的各部分在感染过程中引入了细胞。信息是

由病毒颗粒中的 DNA 分子携带的。一个感染肿瘤的病毒引入动物细胞的仅仅是非常少量的 DNA，大概相当于细胞本身染色体的百万分之一。因此，微量的病毒基因能够引出许多细胞结构与特性的变化。基因多类性在转化中的作用是明确存在的。

这个早期工作最终导致了发现另一个关于转化的分子基础。如果此病毒基因从增生的肿瘤中丢失或发生实验性抑制，细胞便回复为正常状态。病毒基因保持肿瘤的表现型不仅是起始转化需要，而且它们的持续存在及活化也是必需的。

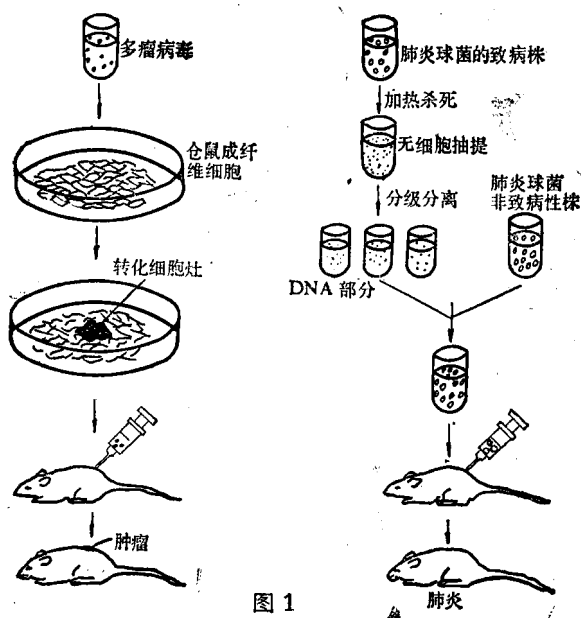


图 1

左图为 Marguerite Vogt 和 Renato Dulbecco 进行的用病毒 DNA 转化细胞。他们用多瘤病毒处理仓鼠成纤维细胞，仅有小病毒基因组(这种机体的整体基因)进入动物细胞，但已足够产生具有许多变态性质的转化细胞克隆，转化细胞注射到鼠能产生肿瘤，仍需要一个直接实验证明细胞的 DNA 在转化中的作用。此实验基于 1944 年 Oswald T. Avery 及其同事们确定 DNA 为遗传物质的历史性实验(右图)，把致病性肺炎球菌的抽提物分级分离，仅含 DNA 的部分使原先非致病性株致病。

遗传基础

在这阶段的研究中，人们可以以逻辑地跨越推测到由其他因素转化，而不是病毒转化的癌细胞有类似的机制。可能不是所有的肿瘤细胞都带有小量对维持肿瘤细胞复杂的行为是必需的基因。这样的想法含义是：指癌的基础是遗传的；癌的状态是由基因保持的，而不是由其它影响细胞的调节系统保持的。

二十年前，这个想法是远远不能被普遍接受的，即使很久就有迹象表明基因在癌中是被累积的。研究者积累了非病毒诱癌剂的资料，这些诱癌剂包括各种形式的射线和广泛的化学剂。能诱导细胞转化的化学剂不是引入新的基因，而是使现存的遗传信息——靶细胞的基因改变。许多致癌剂的作用是破坏 DNA，因此引起基因突变，这再次提示了癌生长过程中基因的中心作用。只能说“提示”，因为缺乏直接的证据。为直接验证癌细胞内变态基因负责指导细胞的异常行为，需要一个实验，这样的证实需要分析细胞非常复杂的 DNA，而不是相当简单的肿瘤病毒的 DNA。实验的一个方法是历史上有名的实验——三十九年前首次论证 DNA 中心作

用是作为遗传信息携带者的实验。Rockefeller 医学研究院的 Oswald T. Avery, Colin M. MacLeod 和 Maclyn McCarty 研究了两株肺炎球菌, 其中只有一株在鼠体内引起致死性肺炎。这两株间不同的分子基础是什么? 研究者分析了致死菌的抽提物, 分离到了纯化的转移因子, 它能使非致死菌转化为有活力的致病体。他们证实此转移因子为 DNA。DNA 分子的转移能把致病的遗传信息从一个细菌传递给另一个。DNA 是决定各自特性的遗传信息携带者。

基因的转移

五年前, Chiahoh Shih 在我的实验室里进行了类似的基因转移实验。他问: 癌的特性能够通过 DNA 分子的转移从一个哺乳动物细胞传递给另一个吗? 几年前, 荷兰工作者已发展了转移基因的方法。人们按着他的做法, 用磷酸钙晶体分离 DNA 分子, 然后将此晶体加到培养细胞内, 能起促进 DNA 进入细胞的作用。被转移的 DNA 一旦进入受体细胞内, 便整合入染色体 DNA。Shih 从肿瘤细胞中抽提 DNA, 此肿瘤是鼠的纤维细胞, 它是由化学致癌剂甲基胆蒽诱发的。供体细胞的 DNA 与磷酸钙一同沉淀, 并用于未转化的称为 NIH3T3 的鼠纤维细胞的培养。应用供体 DNA 二周后, 在 NIH3T3 培养里出现转化细胞集落。用显微镜观察, 可看到转化的克隆非常象由病毒感染诱发的肿瘤。将此转化细胞接种到小鼠体内, 小鼠便生长肿瘤(图2)。

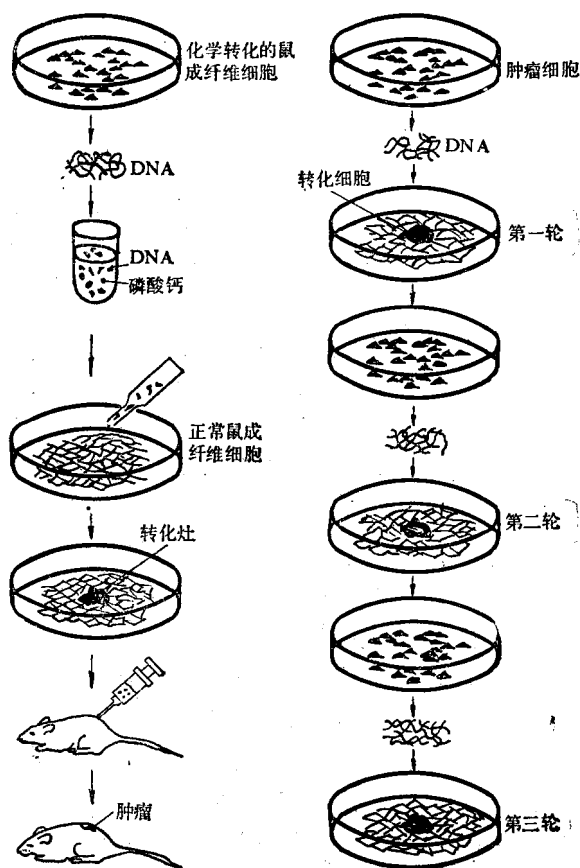


图 2

左图表示通过基因转移实验肿瘤细胞 DNA 编码癌性质。从已由化学致癌剂转化的鼠细胞抽提到的 DNA, 用磷酸钙共沉淀, 磷酸钙能促使它进入正常鼠细胞, 被转化的正常细胞产生一个转化灶, 将转化细胞注射鼠内使之产生肿瘤。在系列转移实验(右图)中, 从人肿瘤细胞抽提的 DNA 转化鼠正常细胞, 此转化细胞大量培养后抽提其 DNA 再用以转化鼠细胞。这个过程重复三次甚至四次。在反复抽提过程中只有短片段 DNA 能幸存并一同沉淀, 因此连续转化说明转化因素一定存在于一个单一片段。

肿瘤细胞的信息通过 DNA 分子由一个细胞转移给另一个细胞。癌表现型的某些部分的表达,可直接追溯到由化学致癌剂转化的哺乳动物细胞 DNA 分子携带的信息。正常的 DNA 细胞同样转移时,它没有这样的作用。这表明,供体肿瘤细胞中的 DNA 顺序与正常细胞 DNA 中的相应顺序不同。我们推测,这些差别是由于甲基胆蒽引起供体肿瘤细胞 DNA 的突变。

那些首次观察到的现象多数是值得探讨的,因为供体 DNA 是从化学转化的鼠成纤维细胞中取出,并引入未转化的同样类型的细胞内。可能我们观察到的 DNA 介导的转化仅仅是这类特殊类型的供体和受体细胞的特点,而不是其他类型细胞的特性。实际情况并不是这样。我们实验室及其他几个实验室的工作者用从不同组织细胞取出的 DNA 重复了这起始实验,发现了同样的转化活性。在人体肿瘤中,用以作为 DNA 供体的有:膀胱肿瘤、直肠肿瘤、肺肿瘤及纤维肉瘤,神经纤维瘤甚至白血病。

看来,某些普遍特征是化学转化的鼠纤维母细胞和所有这些自发的人类肿瘤共有的,因为它们的 DNA 在转移时有同样作用。如人体的直肠癌的 DNA 能转化鼠成纤维细胞。显然,肿瘤 DNA 的转移顺序能够在不同的种属、组织间起作用。最后,由基因转移而进入细胞的转化 DNA 似乎具有基因多类性作用,因为由引入的 DNA 而转化的细胞,表现出许多肿瘤细胞的特征性。有限的供体遗传信息在受体细胞内表现出能产生数种不同性质的反应,就象多瘤病毒 DNA 的情况一样。

确定转化的要素

虽然通过基因转移实验获得了信息,但是更深入的了解则靠对特殊的顺序或与转化有关的顺序的控制和描绘上。到目前为止,甚至连肿瘤的 DNA 转化要素的最基本特性还未确定。使细胞转化可归之于 DNA 的一个片段或数个独立的遗传单位的协同作用吗?如果确实有一个独立的活性片段,那么将可暗示有一个功能象在细胞基因组——整套基因中其它独立的确定基因那样的唯一的基因存在。

已有一个实验指出在单一 DNA 片段中的转化定位原则。从供体细胞中抽提出 DNA,如以上所描述那样加至鼠成纤维细胞培养中,的确诱导了几个转化的成纤维细胞的集落。来源于一个转化集落的细胞被分离出来并大量培养、生长。当从这些培养中抽提出 DNA 并再次加至正常细胞中,又出现了转化细胞集落。基因转化过程可经过 3 次,甚至 4 次重复进行。这提示转化要素存在于单一 DNA 片段的基因中。无论其性质怎样,其完整性能在一系列转移中保存下来。连续的抽提和有关的操作能使细胞 DNA 的长链断裂成上千个小片段,它们中只有几段能进入单个的鼠细胞。如果转化活性是依赖于个别的因子的协同作用,由于协同的组分将互相分开,所以它一定会在一系列的转移过程中丢失(图3)。

因此,问题是要找到转化片段并研究它。实验设计是由 DNA 结构的细节所决定。DNA 分子是双螺旋结构,由两条互补的核苷酸链组成,每条链以一个碱基为特征。碱基有 4 个:腺嘌呤(A),鸟嘌呤(G),胸腺嘧啶(T)和胞嘧啶(C)。这 4 种 DNA 核苷酸顺序携带遗传信息。在单一的 DNA 链转录成 RNA, RNA 翻译成蛋白质的氨基酸时,表达了遗传信息。我们推测,这些差别是由致癌剂甲基胆蒽引起的供体肿瘤细胞 DNA 的突变。

细胞的基因组是由大约 60 亿个 DNA 的碱基对组成,平均一个基因是由 5 千至 1 万 DNA 碱基对组成。要求是从细胞内百万倍以上的无关遗传物质中分离出单一的携带转化要素的遗

传片段。新发展起来的基因克隆技术有可能达到上述目的。此技术使人们能够从细胞的基因组中取回单一的遗传片段，并扩增出成千的同一拷贝。用所掌握的这种材料，人们能够研究一个纯化的基因而不被大量的作为遗传环境的物质污染。

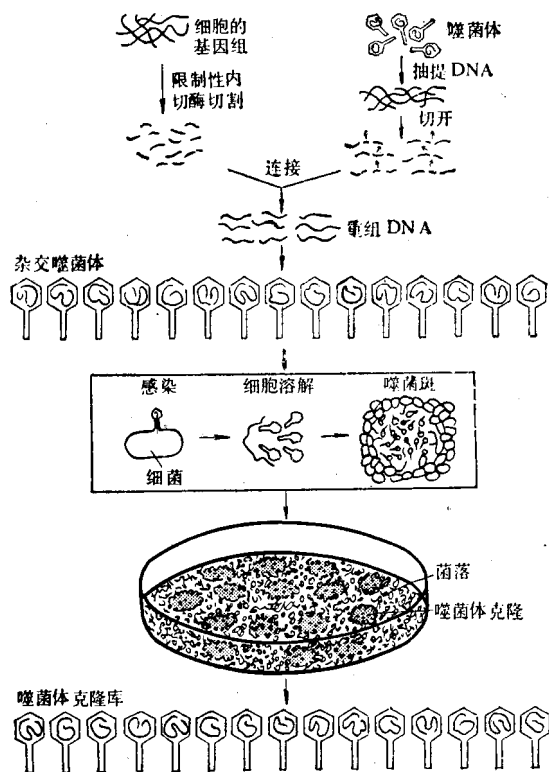


图 3

基因库可由在称为 λ 噬菌体中克隆基因而建立。细胞的和噬菌体的基因组用限制性内切酶切割，噬菌体DNA的一个片段被弃掉而剩余的用DNA连接酶与细胞DNA片段连接，重组DNA用 λ 噬菌体外壳蛋白包装，当杂交噬菌体感染大肠杆菌，噬菌体繁殖，溶解细胞，噬菌体子代逸出感染并杀死细菌平板中邻近细胞，形成噬菌斑。当培养皿中细菌被大量不同的杂交噬菌体感染时，平板中每个噬菌斑中是由原始感染噬菌体传下来的单个克隆噬菌体。每个克隆携带有细胞DNA的不同片段。现在的问题是要鉴别携带有特殊的感兴趣的基因的克隆。通常的做法是用与所需基因相关的DNA或RNA探测克隆，但目前没有能有助寻找转化DNA的探针。

基因克隆有不同方法，有的涉及细菌的质粒（染色体外DNA的小环状粒），有的涉及噬菌体，都有一个普通的推理。细胞的基因组被切断成数十万个片段，每一片段被插入载体的基因组中，此基因组常为 λ 噬菌体的小DNA基因组，它可作为载体感染大肠杆菌。每个杂交噬菌体在本身的一些基因中带有一个单一的插入DNA片段。成千的杂交噬菌体的集合体称为基因库。因为集合体携带了全部基因组的遗传信息，原来基因组的每一部分应该存在于组成此库的一个或更多的噬菌体中。

每个噬菌体可生长在大肠杆菌中而独立增殖；每个噬菌体感染一个细菌细胞并进行复制，产生若干自身的拷贝。此噬菌体的子代杀死了这个细胞并继续感染邻近的细胞，在几小时内生产出数千子代噬菌体。它们都位于细菌平板的单一噬菌斑或穴内。在一个噬菌斑内所有的噬菌体是克隆的，它是由单一的祖先传下来的。人们从一个噬菌体的克隆能够分离此数千拷贝的插入DNA，并且人们用此方法获得一个克隆的DNA片段。

噬菌体库的探测

在这样一个克隆实验中，中心问题是在基因库中鉴别出那些很少的携带感兴趣的插入DNA的噬菌体克隆。最能便利地进行的方法是用一个单链DNA“探针”，它的核苷酸顺序与被克隆的基因密切相关。因为双股的DNA分子是互补的（A与T配对，G与C配对），探针特

异地与要寻找的单股 DNA 杂交。把标有放射性同位素的探针应用于噬菌区，人们便能追踪并精确定位带有感兴趣的 DNA 的噬菌斑。（放射自显影使探测成为可能。）

但是转化的顺序不能够由这种标准步骤确定，没有任何特殊顺序的探针可用。我们要寻找的 DNA 只能由其生物学活性——这种诱导转化的能力来确定、鉴别。因此需要新的技术。

三个实验室从事了此克隆工作，每个实验室都有不同的设想。由 Dana-Farber 癌症研究院的 Geottrey M. Cooper 领导的一个小组与 Harvard 医学院合作，简单进行而没有用探针。用鸡的淋巴瘤细胞 DNA 建立了一个基因库，从基因转移实验中知道其带有转化顺序，数十万的杂交噬菌体被分成 10 个分库，从每个分库的噬菌体制备 DNA，并通过基因转化实验以试验其转化鼠成纤维细胞能力。任何阳性的分库进一步分成 10 个亚分库，由基因转移实验筛选其中每一个。这样呈指数缩减的反复筛选结果，最后得到有有效转化活性的单噬菌体克隆，因此得到了转化 DNA(图 4)。

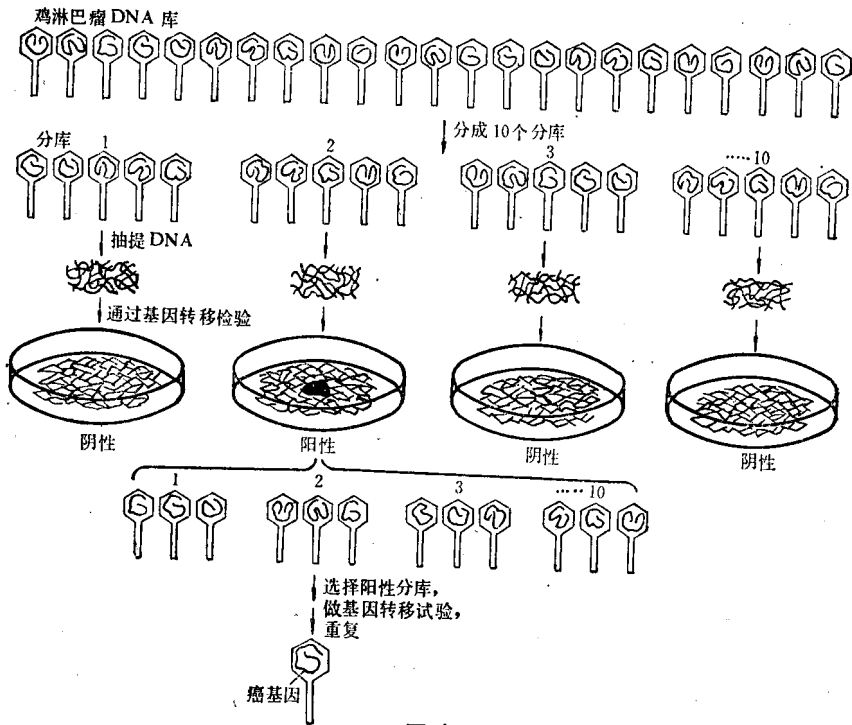


图 4

Geottrey M. Cooper 的组设计了探索常规以分离转化 DNA。他们从鸡白血病细胞 DNA 建立了一个约 200,000 噬菌体克隆库。他们把这库分成十个分库并通过基因转移来检测每个分库 DNA，如果转移产生了转化细胞，这个有关的分库一定含有感兴趣的 DNA，再把它分成 10 个亚亚库，对每个亚亚库进行检测。成功检测亚组直到发现一个具有转化活性的噬菌体单克隆。用这种方法分离到了鸡淋巴瘤转化基因或癌基因。

我室的 Shin 做了另一种探索。他以人的膀胱癌 DNA 开始做实验。用人的肿瘤 DNA 转化鼠细胞，然后再用转化了的鼠细胞 DNA 去转化第一轮的鼠细胞。基因库是用第二次转化的细胞 DNA 建造的。现在的鼠细胞 DNA 只含少量的人体 DNA，它们与转化活性有直接关系。其余的人体 DNA 片段在连续的基因转移中已丢弃，因为此转移仅仅选择有转化活性的。Shih 应用只能识别人体来源的 DNA 探针来追踪这些少量的 DNA，此探针叫 *Alu* 顺序，这些顺序只存在于人 DNA，它们随机分布于完整的基因组中。用 *Alu* 特异的探针进行筛选，

Shih 找出并分离出了一个带有人体 DNA 的噬菌体克隆。在基因转移实验中，发现象所期望的那样，人体 DNA 包含有要探索的转化活性(图 5)。

在冷泉港实验室，Michael Wigler 组是把细菌标记的基因接到人体膀胱癌 DNA 的每个片段上，然后经过连续的基因转移，制备了只带人体转化 DNA 的鼠 DNA 以及标记基因紧密连接的拷贝。他们通过把鼠 DNA 插入有缺失编码的数个噬菌体蛋白的顺序中，建立了

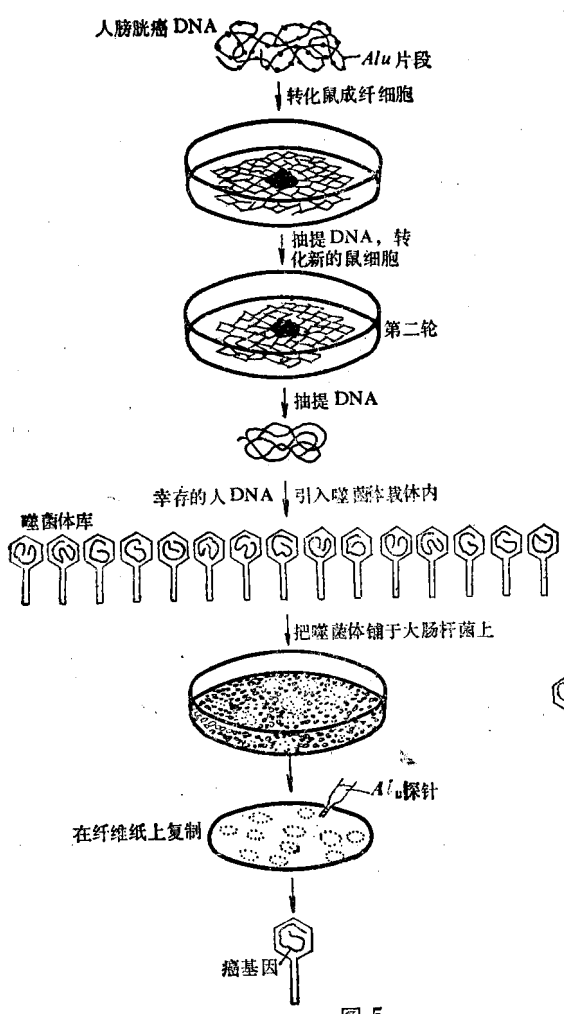


图 5

在作者实验室里 Chiaho Shih 探测人类 DNA，寻找人膀胱癌转化基因。称为 *Alu* 的短 DNA 链散布在人基因组内。用肿瘤 DNA 转化鼠细胞；转化细胞的 DNA 再用于转化新的鼠细胞，从系列转化细胞得来的 DNA 只含少量人 DNA，此 DNA 与转化有直接关系，将系列转化细胞的 DNA 建立的噬菌体库铺于大肠杆菌上，再将噬菌斑上 DNA 转移至纤维纸上复制。在上面可用标有放射性同位素的 *Alu* 片段进行探测。放射自显影可以显示带有与探针杂交的 DNA 的噬菌斑。检测噬菌斑中的噬菌体克隆的转化能力，表明其 DNA 中带有膀胱癌的癌基因。

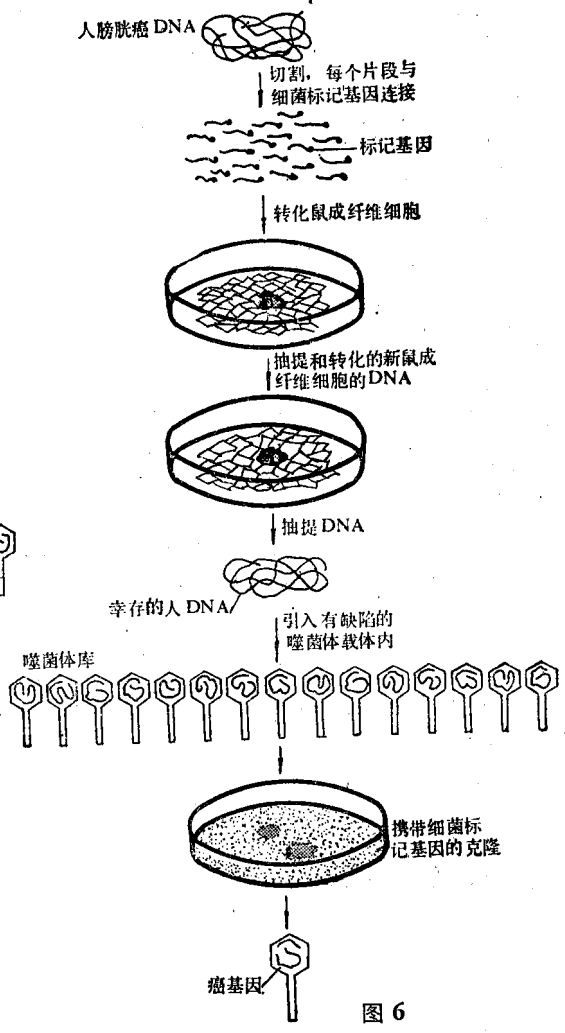


图 6

Michael Wigler 组把细菌标记基因作为探针。他们切开膀胱癌 DNA，并将每个片段与细菌基因拷贝连接。通过连续基因转移他们制备了只携带有转化基因而无其他人 DNA 的鼠 DNA，转化基因紧连接着细菌标记基因拷贝。通过把鼠 DNA 碎片引入一株具有抑制其生长缺陷的噬菌体建立一个噬菌体库，选择的细菌基因能克服这个缺陷。结果把这个库铺于大肠杆菌上时仅有携带细菌基因的噬菌体能生长。发现某些克隆中携带有膀胱癌 DNA。

基因库。只有携带有细菌标记物的基因，才能够抵抗残缺噬菌体遗传缺陷，在细菌培养中生长良好，在可存活的噬菌体中带有难以捉摸的转化片段(图6)。

癌 基 因

三个实验用不同方法成功地分离出转化 DNA，这直接把转化活性与分离的 DNA 片段联系起来，再也不必含糊地说“转化要素”了。每一步分子克隆产生带有一定结构的 DNA 片段，这些克隆基因具有强大的生物活性。原始的膀胱癌 DNA，平均每两微克可诱导一个转化细胞克隆，相同量的克隆的转化基因可诱导 5 万个集落。原先被认为是全部肿瘤细胞 DNA 的转化活性，现在可指定为单个基因所具有，它是一个致癌基因，一个癌基因。

人体的癌基因是从哪儿来的呢？在 Wigler 的实验室、我自己的实验室和国家癌症研究院的 Barbeid 实验室里得到了答案。用如上的方法从一种叫 EJ 或 T24 的肿瘤株中分离到的人体膀胱的癌基因，当克隆的癌基因被用以作为探针探测正常人的基因组时，它很快牢固地与正常基因组的有关 DNA 顺序杂交。发现癌基因和正常基因有同样大小。进一步鉴定两种基因，发现它们几乎是同一的，但实际上我们知道它们不是完全同一的，因为其功能很不同，即癌基因的克隆能转化细胞，而正常基因的有关克隆无此作用，它们不可能是同一的双胞胎。确切地说，癌基因是正常基因的细微变体，这种与癌基因相似的正常基因通常称为原癌基因。

膀胱癌的癌基因不是人体 DNA 上携带的唯一原癌基因。到目前为止，已经找到了与其他 3 种人类肿瘤的活性癌基因相应的原癌基因。为什么在人类基因组中有细微变化的基因会成为能转化细胞并产生肿瘤的动因？为什么机体携带有毁灭自己的潜伏基因？

目前还没有有关这些重要问题的答案，但有一点是清楚的，除非原癌基因在正常细胞中有一定的重要作用，否则它们不会在基因组中保持下来，实际上它们已经被保存下来了。人体原癌基因的相应物已在大量的哺乳动物、在鸡、甚至在果蝇的 DNA 中发现。因此，人类原癌基因的祖先一定早在 60 亿年前已由人类和蝇类的共同祖先进化。除非原癌基因过去是并持续是生命必需的，否则它是不会不变地存在这么多年。这些基因在代谢中的确切作用仍不知道，但一些迹象表明它们与控制细胞的增殖有关。

病毒的癌基因

人们通过基因转移实验揭露了一类癌基因和原癌基因。通过逆病毒的工作早已发现另一类癌基因。逆病毒是某些动物引起癌的一组病毒，其遗传物质不是 DNA 而是 RNA，当感染细胞时，它反向转录成 DNA。此病毒带有一个与癌的诱导有关的基因。经 J. Michael Elshop 和 Harold E. Varmus 及他们的同事们在加州大学和旧金山医学院的研究指出：病毒癌基因事实上本不是病毒的，而是来源于细胞。它们是由感染动物细胞的逆病毒摄取并携带的原癌基因，在结合进病毒的基因组后，原癌基因以某种方式被活化成癌基因，并用以转化被感染的细胞。至今为止，已经确定了 17 种这样的细胞原癌基因。其中每一个都与它的相关的逆病毒联合而成为活性癌基因。

似乎有两套正常的原癌基因及它们的活化癌基因的衍生物，每套是以不同的方式激活的。

由基因转化实验发现的是一组由突变产生的原癌基因，而由病毒学家先发现的另一套是被逆病毒活化的。现在我们知道这两组基因不是不相容的。几年来的杂交实验已经表明，有些人类肿瘤的癌基因与由感染鼠的逆病毒所携带的癌基因有密切关系。例如上面提到的人的膀胱癌的癌基因与 Harvey 肉瘤病毒所携带的癌基因密切相关，此基因是从鼠的基因组中获得的。这就意味着同一原癌基因可以由两种不同的机制激活，即在人体突变或由逆病毒从鼠获得。继此模式以后，已经发现了第二种原癌基因，它既可以通过掺入 Kirsten 鼠肉瘤病毒而活化，也可以由突变产生。此基因存在于人类的许多肿瘤中，如：结肠癌、肺癌、膀胱癌和胰腺癌，还有一些存在于肉瘤中。

两种分别与 Harvey 病毒和 Kirsten 病毒有关的原癌基因之间，在进化上是相关的。它们是一种叫做 *ras* 基因族中的成员，Edward M. Scolnick 等作了详细研究。最近 Wigler 组把第三种人类癌基因与 *ras* 基因族联系起来（但还未在逆病毒中发现它）。这个叫 *N-ras* 的癌基因存在于各种白血病、淋巴瘤、神经纤维瘤、结肠癌和数种肉瘤细胞的 DNA 中。*ras* 癌基因的存在表明：在不同的肿瘤 DNA 中，特异细胞的原癌基因的激活不是特定限于单一的组织；相同的基因可以在任何组织中激活，产生不同类型的肿瘤。

这样一个简单的见解代表了一个较大的进展。从一个分子生物学家观点来看：癌症再不会多于一百种，它们每种是以不同的肿瘤类型为特征的。而在开始似乎认为只有少量的分子机制。因为至今只有少量的人类肿瘤得到了详细研究，这个观点需要更多的调查来巩固。

突变的定义

突变涉及良性的原癌基因转化为活性的癌基因的机制，但对于其本质仍是模糊的。一旦两种基因的克隆的转变有可能，突变就能精确定位，原则上人们已能确定有 5,000 对碱基对基因的核苷酸顺序并比较这两个顺序。实际上，最好是先确定一个基因顺序上有关键性的差异的区域。可以应用遗传工程技术模拟经典遗传学的双交叉型，把两个基因之间部分重结合。目前我、Barbacid 及 Wigler 等三个研究组正在进行着这个实验(图 7)。

首先，用限制性内切酶在两种基因的相同部位切成几个片段。限制性内切酶是切在特异的核苷酸顺序的部位。从这两个基因上切下的特殊片段用 DNA 连接酶连接成两个杂交基因。这两个基因一部分来自癌基因，一部分来自原癌基因。通过将此杂交分子转移至鼠成纤维细胞的实验，观察哪个丢失了癌基因活性，哪个获得了它。

在我的实验室里，Clifford J. Tabin 等在重复连续地交换膀胱癌的癌基因及它有关的原癌基因的更小片段，最后发现，把一个仅有 350 个核苷酸的癌基因片段引入到原癌基因中，就能把原癌基因转变为有活性的转化分子。这就意味着，区别这两个密切相关的基因的关键性损害位于这 350 个核苷酸片段中。国家癌症研究院的 Ravi Dhar 分析此片段的活性及非活性变体的顺序，发现了一个引人注目而预想不到的现象：癌基因的关键性 350 个核苷酸顺序和原癌基因相应片段的顺序仅差一个碱基，即原癌基因中的鸟苷酸由胸腺苷酸取代。这就是说，在正常人体 5,000 个核苷酸基因中有一个变化——一个点突变，即转化为癌基因。第一次精确确定了基因损害能导致人体肿瘤生长。可能许多癌的起始是由于环境损害了 DNA，造成原癌基因的突变(图 8)。

近来，描述了原癌基因活化的其它机制。染色体的重组机制首先由圣·路易斯大学医学

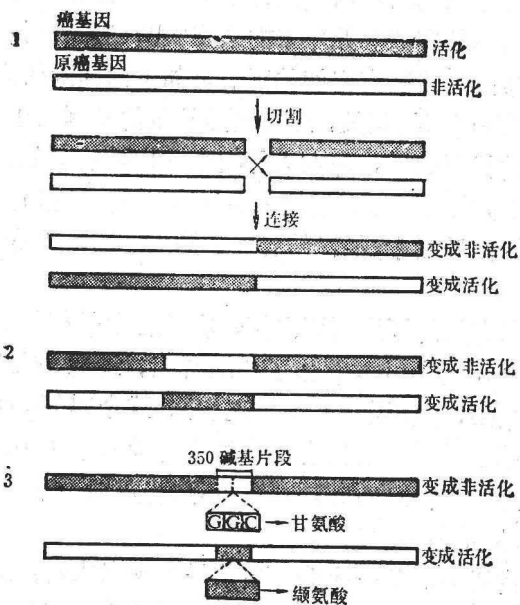


图 7

首先通过在基因中寻找有关键性差异的部位的片段，然后再比较这个片段确定了使 EJ 膀胱癌细胞株的原癌基因转化成活性癌基因的点突变。原癌基因和癌基因(1)在相同部位切开，将得到的片段接起来。重组的基因由基因转移实验检测，看其是变成活化的还是失去活性。连续交换更小的片段(2)直到仅有 350 个碱基长度显示是关键性的(3)。这段里有一个单点突变：原癌基因中鸟嘌呤(G)转变成癌基因中的胸腺嘧啶。因此这个三联密码指明是缬氨酸而不是甘氨酸。

中心的 Grace L. C. Shen-Ong 和 Harvard 医学院的 Philip Leader 实验室 Michael D. Wle 及 Rebecca A. Taub 和她的同事们发现。此机制与叫做 *myc* 的原癌基因激活有关。已在鼠骨髓瘤和人 Burkitt 淋巴瘤中发现转化为活化的癌基因，此细胞原癌基因从它的正常位于一条染色体的一端分出而转到另一染色体的一端。在那里它与合成免疫球蛋白有关的基因并置。种基因在对抗原的免疫反应过程中以高速率转录。原癌基因与免疫球蛋白基因的关系显然使原癌基因失去控制，并使它获得一个新的生物功能。

另一个情况是，发现在每个细胞中，原癌基因有很多拷贝，而不是正常细胞基因的两个拷贝。这种基因的扩增结果导致高水平的基因表达，似乎也有癌基因作用。换句话说，就是有许多机制能迫使正常基因起癌基因的作用。对于哺乳动物肿瘤基因来说包括点突变，染色体重排和基因扩增。对逆病毒有关的基因，由于转导可能发生突变，或是最后邻接于病毒操

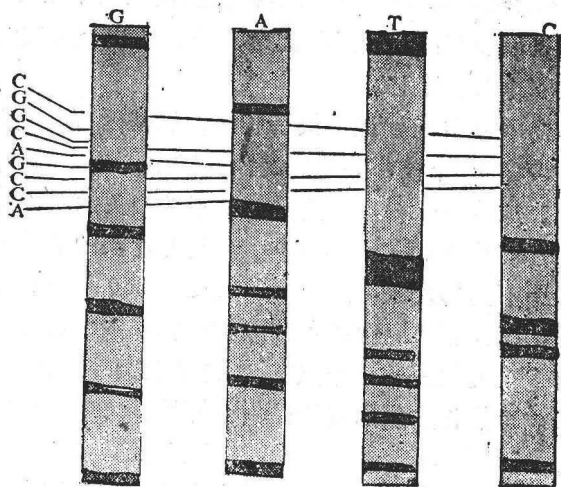


图 8

原癌基因和癌基因中的 350 个碱基片段的氨基酸顺序是由 Ravi Dhar 测定的。凝胶电泳的放射自显影显示了癌基因的关键性突变。条带的梯形排列表示片段的碎片逐渐缩短（从顶至底）。制备了四套片段。每套用双脱氧法标记四个碱基的一个来标记末端。加样至凝胶中不同的行内。仔细观察每条带的位置可以读出这顺序。因为凝胶是用癌基因的互补链制备的而不是用密码链，突变显示为腺嘌呤(A)而不是胸腺嘧啶(T)。

纵子从而增加表达水平。

癌 蛋 白

对于癌机理的基础探索从遗传因子的模糊描述到 DNA 分子，再到 DNA 中的特定基因，已经有了很大进展。似乎探索以精确确定这样基因中突变的发现而告终。事实上，最困难的问题还未解决。

已经假定：一个癌基因的产生可能导致癌变。但人们并未洞悉此改变了的基因在癌变过程中怎样作用的、癌基因的功能是什么？和其它基因一样，它编码蛋白质结构。Scolnick 组已经阐明：许多 *ras* 基因指导一个分子量为 21,000 的蛋白质合成。在膀胱癌癌基因中，观察到点突变改变了蛋白质的结构。蛋白质中的每个氨基酸由编码此蛋白的基因中的三个碱基密

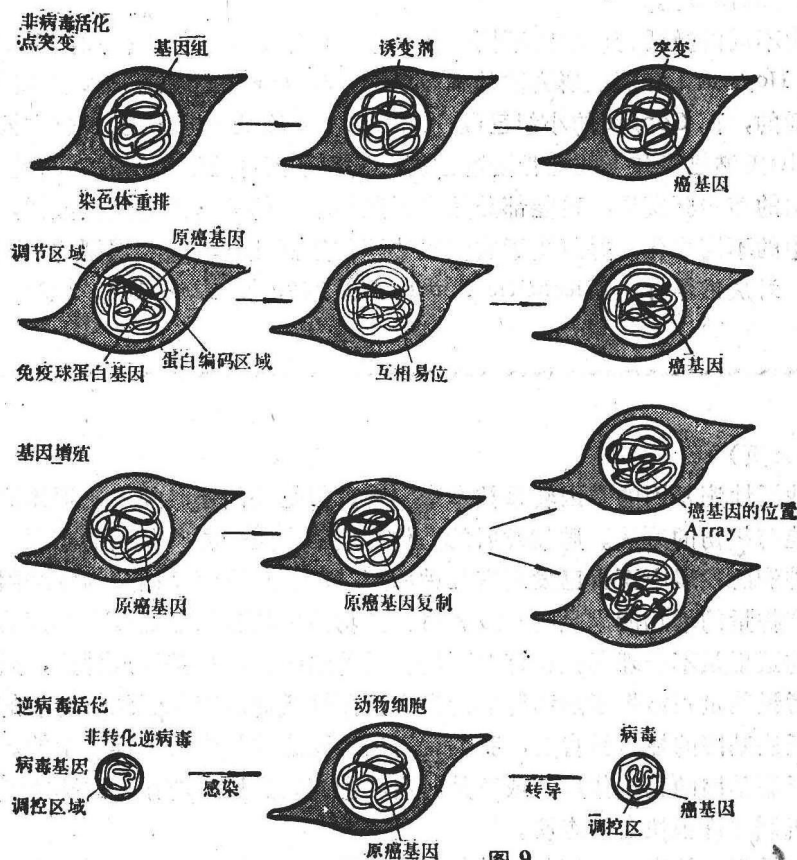


图 9

原癌基因可经四种方式活化，其中三种涉及细胞 DNA 的变化，一种由感染的逆病毒参与，一种非病毒的方式是点突变。如果正常细胞中的原癌基因由于放射或化学致癌剂发生了突变，突变可能改变编码蛋白质的信息，变化的蛋白质可能引起一种或更多的与癌生长有关的变化。另外，原癌基因的蛋白编码区可能在染色体重组过程中与免疫球蛋白基因的调控区连接，使原癌基因的遗传信息以不适当水平表达。第三种活化方式是增殖，原癌基因以某种方式复制使其在细胞中存在多个拷贝，每次连续复制的片段可在染色体内也可能独立于染色体外。结果是不适当的过度表达。许多动物致癌的逆病毒是由感染动物细胞而获得它们的癌基因。在感染过程中，病毒摄取细胞的片段并把它整合入自己基因组。原癌基因可能与病毒基因组的调节区作用而被活化，如图所示，或在被逆病毒携带(转导)时发生了突变。

码专一决定的，观察到的点突变使原癌基因中的 GGC 密码变成了致癌基因中的 GTC，结果改变了癌基因蛋白质结构。蛋白质中某一位置上的甘氨酸被缬氨酸取代。显然这唯一的替换能使蛋白表现出新功能，根本地改变了细胞的代谢。

象癌基因蛋白质一类的细胞成分在癌变过程中一定起重要作用，但它们如何作用还不清楚。有人设想，它们以某种方法控制细胞生长，而癌基因编码的变形蛋白质迫使细胞呈瘤性生长。

对癌基因蛋白质精确功能的理解，显然有可能发展抑制这些功能的拮抗剂及发展一个主要只伤害癌细胞的治疗方法。因为致癌作用是一个多步骤过程，可能有大量缺陷。种种来源的资料表明：一个正常细胞要变成一个真正的肿瘤细胞，一定要经数种不同的改变。产生一个异常的蛋白质变体的点突变，只相当于影响一个基因的一个步骤。完成形成肿瘤的一个要求，还有其他必要的步骤，癌基因也是必要的，但它很难说是足够的条件，已有人开始探索其他步骤的实质(图 9)。

在两种由不同的激活物产生的不同癌基因中导致了种种肿瘤。例如：Rockefeller 大学的 William S. Hayward 和癌症研究院的 Svvan-M. Astrin 已经发现 *myc* 原癌基因是在鸡淋巴瘤中被激活的，而 Copper 的小组已经发现第二种原癌基因叫 *B-lym*，也在同样的肿瘤细胞中。在 Burkitt 氏淋巴瘤和人的前骨髓淋巴瘤，发现了两种处于激活状态的癌基因，这些资料提示致癌作用的多步骤实质：可能部分是由于数种不同的癌基因需要被激活，每个癌基因可能引起细胞中的不同变化，并且由于它们可协同作用而获得肿瘤表现型的重要外貌。

刘庆俐译自 《Scientific American》249(4): 126~143, 1983, 何开玲校

(上接第58页)

通过扩大寻找活性癌基因的基因转移技术来实现。但是我们还必须发明揭露癌基因调节位点上的隐性功能与损伤的方法。肿瘤发展的遗传物质不会是一种易找到的东西。

在恶性肿瘤的发展中至少已发现有几种原癌基因。从原癌基因变为癌基因的转化性质是什么？基因产物量的增加能满足吗？或者对密码功能区的损伤必定改变基因功能吗？期望以上两种答案均适用是不合理吗？也许对不同种类的致癌剂，癌基因或肿瘤，只有其中一个解释适用。或者说剂量可能用于启动肿瘤的发生，而性质的改变用于维持肿瘤的生长。

一旦活跃癌基因的性质被肯定，我们就可以追踪这些损伤是怎样发生的。我们能追踪是由致癌剂靠近癌基因的直接作用，或者是对启动肿瘤发生以后的作用，那末长期弄不清楚的致癌剂作用机制也许很快会被查明。

结论是有希望辨认出病毒癌基因转化细胞的机制，以致了解各种形式的癌如何形成的机制。我们已经认识到对酪氨酸特异的蛋白激酶在控制细胞生长和由某些癌基因诱导的肿瘤转化中占有重要的地位。但是我们也应当相信，蛋白质的磷酸化只是我们努力寻找的几个，也许是许多线索之一。因此我们的注意力不能只停留在由癌基因编码的蛋白质上。病毒或是细胞癌基因的分离都不能解决这些基因是如何工作的问题，在癌症研究中这个问题对我而言是个严峻的挑战。

邵明川译自《Ann Rev. Biochem.》1983, 52:301~354 陈惠黎、何开玲校

癌基因和原癌基因

J. M. Bishop

在正常细胞内发现含有同已知的病毒癌基因相似的原癌基因这一事实，不仅为了解同肿瘤发生有关的某些病理生理机理，而且为分析正常细胞生长过程和对此生长过程的进化发育控制提供了捷径。

当各个独立的研究路线开始交汇的时候，往往对某个研究对象会表现出极大的兴趣。当今此种情况正发生在癌症研究领域内。近 15 年来，医学遗传学和肿瘤病毒学各自的许多发现都集中于癌基因方面。研究家族性癌症发病率的医学遗传学家提出了有关引起肿瘤的特异基因的概念。通过肿瘤的基因分析发现了一些肿瘤和染色质异常间的关系。同时肿瘤病毒学家还鉴定了许多能诱导实验动物癌变的病毒基因。综上所述，意外地发现正常细胞含有与已知的病毒基因相似的基因。这一类 DNA 可能代表了癌变不同阶段的病因步骤，从而引起了全球性的癌症研究热潮。

本文讨论关于利用可在动物中引起癌变的病毒作为实验工具以分析癌细胞。开始时我们丝毫没有认为这些动物病毒可能引起人的癌变。相反，我们相信必然有最基本的东西与癌变细胞进化有关，不论癌细胞究竟由病毒诱导还是自发产生，如果我们能够找出如病毒这类实验性作用物是如何引起癌变的，也就有望找到自发癌变的机理。

当我们还不知道病毒能否引起人的癌变，而已经相当确定化学物质能致癌时，为什么我们还用病毒代替化学物质呢？回答十分简单：化学致癌剂启动癌变细胞之间的相互作用而导致癌变是很难研究的。化学致癌剂诱导癌变时间很长，因此不易对癌变过程进行生物化学和分子水平的研究。相反，组织细胞培养的病毒转化十分迅速，有利于作生化分析。许多肿瘤基因病毒具有单一基因，所以具有单一化学活性，可将正常细胞转化为癌变细胞。这样，肿瘤基因病毒至少提供了探索癌变的某些机制的途径。

自然癌变是多步骤的过程。利用在一夜之际就诱导癌性生长的病毒时，我们能防止除了维持细胞呈癌性生长的最后阶段以外的其他过程不再发生。如果我们企图根据对癌细胞发生了那些异常的了解，尝试建立常规的预防和治疗措施，就需明了癌变的最后阶段，所以利用诱癌病毒就可为我们提供很好的出发点。

Rous 肉瘤病毒是第一个被证明具有致癌潜力的病毒。因为它的繁殖是以 RNA 指导 DNA 合成的方式进行的，所以被叫做逆病毒(retrovirus)。它的 RNA 基因经逆向转录酶的作用转录于 DNA 内，然后 DNA 插入或整合入宿主细胞的 DNA 内，成为宿主细胞染色质的一部分并可表达出病毒的蛋白质。一些逆病毒具有单种癌基因，即仅仅具有诱导肿瘤发生的能力。大多数具有癌基因的病毒能够转化组织培养细胞，并且在某些实验动物中于数天至数周内引起肿瘤(表 1)。另一些引起肿瘤的病毒，缺乏癌基因，不能转化组织培养细胞，但是这类病毒能在 6~12 个月以上较为缓慢地诱发实验动物肿瘤。这两类病毒致癌过程均有以下特征：在宿主细胞存活时，宿主细胞内有病毒的基因组。