



干细胞 和

发育生物学

主编 叶鑫生 许田 汤锡芳 裴雪涛

STEM CELLS AND
DEVELOPMENTAL
BIOLOGY

The bottom section of the cover features three microscopic images. The left image shows a dense, textured cell culture. The middle image shows a single, dark, rounded cell cluster. The right image shows a more complex, fibrous network of cells.

军事医学科学出版社

图书在版编目(CIP)数据

干细胞和发育生物学/叶鑫生等著.

-北京:军事医学科学出版社,2000.4

ISBN 7-80121-235-5

I.干… II.叶… III.①干细胞-研究-学术会议-文集

②发育生物学-研究-学术会议-文集 IV.Q-53

中国版本图书馆CIP数据核字(2000)第21478号

* *

军事医学科学出版社出版

(北京市太平路27号 邮政编码:100850)

新华书店总店北京发行所发行

北京四环科技印刷厂印刷

*

开本:787mm×1092mm 1/16 印张:16.25 字数:406千字

2000年4月第1版 2000年4月第1次印刷

印数:1-3000册 定价:32.00元

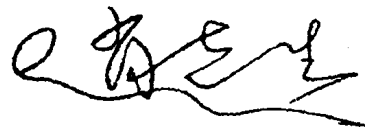
(购买本社图书,凡有缺、损、倒、脱页者,本社发行部负责调换)

前 言

由国家自然科学基金委员会主办、军事医学科学院承办的“海内外生命科学论坛”已成功地举办了4次,产生了较大的影响。“海内外生命科学论坛”每年举办一次,每次一个主题,邀请在国外从事生命科学研究、崭露头角的海外学者回国讲学,与国内同行共同就感兴趣的领域,探索生命科学的奥秘,谋求共同合作和发展。论坛的设立为海内外学者交流与合作提供了舞台,既为海外学者为国服务创造了机会,也为国内同行掌握新理论、学习新技术、引进新方法开辟了渠道,因而广受欢迎。

今年即将举办的第五届海内外生命科学论坛学术研讨会议的主题是干细胞和发育生物学。干细胞和发育生物学是当今生命科学研究的前沿,其研究内容已涉及生命科学领域的诸多热点和难点,并已在部分疾病的研究方面取得了突破性的成绩,展现了诱人的发展前景。我们相信,随着干细胞和发育生物学以及相关基础研究工作的不断深入,科学家们将创造出更多新理论、新技术、新方法,为揭示生命科学的奥秘,为人类的健康做出更大的贡献。

军事医学科学院院长



2000年3月31日

目 录

1	果蝇在癌症研究中的作用	(1)
2	生殖干细胞的自我增殖机制	(13)
3	造血干细胞细胞周期的调节及其遗传学修饰	(24)
4	造血干细胞工程——一个新兴的研究与应用领域	(28)
5	指导神经细胞运动方向的导向性分子	(34)
6	线虫中 RAS 信号传递的研究	(38)
7	基因调控与免疫 B 淋巴细胞发育	(47)
8	丝裂原活化蛋白激酶级联和基因表达的调控	(51)
9	$\beta 1$ 整合素及丝裂原激活的蛋白激酶的信号转导体外决定 人表皮干细胞的命运	(59)
10	从原始生殖细胞分离克隆牛胚胎干细胞	(72)
11	猪胚胎干细胞的分离与培养	(80)
12	牛胚胎干细胞分离与克隆	(87)
13	影响牛胚胎干细胞分离与克隆效率的因素	(93)
14	源于猕猴囊胚的猕猴类胚胎干细胞的分离和培养	(99)
15	胚胎干细胞生物学特性与鉴定方法	(105)
16	胚盘细胞移植法制备鸭鸡嵌合体	(108)
17	体外定向诱导胚胎干细胞为造血细胞的研究	(116)
18	人胚胎成纤维细胞对人胚胎干细胞生长的作用	(121)
19	人参皂甙对 $CD34^+$ 造血干/祖细胞的增殖和分化作用	(124)
20	人参二醇对造血细胞 GATA-1 和 GATA-2 转录调控蛋白的诱导作用	(129)
21	血小板生成素(TPO)诱导的细胞内信号途径的研究	(135)
22	qBm-2: 一个新的 POU 盒基因及其表达模式	(142)
23	两个新的红细胞分化相关因子的 cDNA 克隆及功能探讨	(152)
24	基因图谱分析干细胞移植后免疫重建的淋巴细胞克隆	(159)
25	深低温保存角膜缘干细胞活性实验研究	(167)
26	肝细胞核因子 hB1F 与 HNF1 间存在直接相互作用及功能上的协同	(171)
27	胚胎干细胞的建系方法	(180)
28	小鼠胚胎干细胞的分离与克隆	(185)
29	牛胚胎干细胞饲养层培养体系的建立	(191)
30	牛胚胎在 MEF 细胞饲养层的生长行为	(197)
31	猪囊胚在饲养层上的生长行为	(203)
32	对神经干细胞的初步认识	(209)
33	人胚胎干细胞研究进展	(211)
34	论生物进化与生物发生的基本规律	(217)
35	碱性磷酸酶在文昌鱼胚胎和幼体中表达图式的研究	(230)

36	NGF, BDNF 和 NT-3 在鸡胚背根节神经元发育中的表达	(235)
37	磷脂酰胆碱特异性磷脂酶 C 的抑制剂 D609 抑制中华大蟾蜍发育 后期尾部程序性死亡	(238)
38	非洲爪蟾 <i>Xmyf-5</i> 基因在原肠胚期表达调控的研究	(242)
39	影响血管内皮细胞粘着和铺展因子的初步研究	(249)
40	自体外周血干细胞移植在恶性血液病中的临床意义	(253)

果蝇在癌症研究中的作用

吴晓晖^{1,2} Christopher J. Potter²
Gregory S. Turenchalk² 许田^{1,2}

¹复旦大学遗传学研究所

²美国耶鲁大学医学院霍华德·休斯医学研究所

【作者简介】 许田博士 在耶鲁大学获博士学位,加州大学伯克利分校完成博士后,现任耶鲁大学副教授,休斯医学研究所助理研究员。从事遗传学方法、发育及疾病机理的研究与教学工作。获奖包括 Whitney Fellow Pew 学者,休斯医学研究所助理研究员。现为美国科学院美中前沿科学交流委员会主席。

近年来,果蝇研究者们发展了一系列强有力的遗传学方法以迅速鉴别与研究肿瘤形成与发展相关的基因。果蝇与哺乳动物基因和信号传导途径的高度保守性,细胞水平上生命活动的极端相似性,以及肿瘤抑制基因的功能保守性提示我们对果蝇肿瘤发生的研究能直接增进对人类癌症机理的了解。我们在本文中对利用果蝇研究癌症的历史和现状进行了回顾,并对果蝇作为癌症相关生命活动研究模型的未来作了展望。

果蝇是目前生物学研究中使用的最普遍的模式生物之一。早在 1916 年, Bridges 和 Stark 首先观察到突变型果蝇幼虫会长出黑素瘤样颗粒。这一结果表明果蝇可以生长肿瘤^[1]。接着,人们发现有的自发突变能够引起一些组织的过度增殖而使果蝇死于幼虫阶段^[2,3]。对这一特定表型的遗传学筛选成功地鉴别出了数十个遗传学位点(loci)^[2,4-6]。此时,几乎还不存在已知的人类肿瘤抑制基因。大多数引起果蝇肿瘤的突变是隐性失活突变,从而被认定是肿瘤抑制基因的突变^[7]。对其中一些基因的分子生物学研究表明在对细胞增殖进行调控的过程中,细胞间的相互作用是十分重要的^[3,8,9](表 1)。

虽然起步非常成功,果蝇作为癌症研究的一个模式生物潜力并没有获得许多注意。一些原因可能要对此负责。首先,虽然突变型果蝇的过度增殖或黑素瘤样组织与人肿瘤组织有某些相似之处,它们并不像大多数哺乳类肿瘤一样存在原位的大规模过度增生。其次,早期果蝇肿瘤抑制基因在分子水平上与当时已知的人类肿瘤抑制基因并无相似之处^[10,11]。第三,对这些果蝇肿瘤抑制基因的研究没有能提供与当时已知参与肿瘤发生的生命活动,如细胞周期调控的明显联系。最后,对某些果蝇“肿瘤抑制基因”的轻率认定也导致了普通肿瘤学家们的轻视。例如,果蝇与神经发育相关的基因失活会导致神经系统组织增生。但是这种增生是由于过多的上皮细胞转化为神经细胞,而并不是由于神经组织本身增殖造成的。所以这些基因并非如有人声称的那样是肿瘤抑制基因^[12]。

表 1 黑腹果蝇的癌症相关基因

哺乳类癌基因的果蝇同源基因		哺乳类肿瘤抑制基因的果蝇同源基因		导致肿瘤生长或过度增殖的果蝇基因及其哺乳类同源基因	
果蝇基因	哺乳类基因或基因产物	果蝇基因	哺乳类基因或基因产物	果蝇基因	哺乳类基因或基因产物
<i>armadillo</i>	β -catenin	D-APC	APC	<i>air8</i>	S6 ribosomal protein
<i>D. Abl</i>	<i>c-abl</i>	<i>caudal</i>	CDX2	<i>bag-of-marbles</i>	?
<i>D. Akt</i>	<i>Akt</i>	<i>frazzled</i>	DCC	<i>benign gonial cell neoplasm</i>	?
<i>aurora</i>	<i>aurora 1, aurora 2, AIM-1</i>	<i>gigas</i>	TSC2	<i>cactus</i>	<i>IkB</i>
<i>homothorax</i>	<i>Meis1</i>	<i>haywire</i>	ERCC3	<i>costal-2</i>	?
<i>Dcbl</i>	<i>c-cbl</i>	<i>klumpfuss</i>	WT-1	<i>discs large</i>	<i>hDlg</i>
<i>Dcrk</i>	<i>c-crk</i>	<i>medea</i>	DPC4	<i>expanded</i>	?
<i>cubitus interruptus</i>	<i>Gli1, Gli2, Gli3</i>	<i>mei-41</i>	ATM	<i>fat</i>	FAT
<i>cyclin D</i>	<i>cyclin D/PRAD1</i>	<i>Merlin</i>	NF2	<i>hyperplastic discs/</i>	UBE3A
<i>dorsal</i>	<i>NF-κB/Rel-family</i>	D-NF1	NF1	<i>lats</i>	<i>Lats1, Lats2</i>
<i>D. E2F(D. E2F, + DP)</i>	E2F	<i>patched</i>	<i>ptch</i>	<i>/(1) malignant</i>	?
<i>extradenticle</i>	<i>Pbx1</i>	PP2A-29B	PPP2R1B	<i>/(2) k07918</i>	?
<i>hopscotch</i>	<i>Jak kinase</i>	D-p16	p16(INK4a)/MTS1	<i>/(2) brain tumor</i>	?
<i>D. jun</i>	<i>c-jun</i>	<i>Rbf</i>	pRB	<i>/(2) giant disc</i>	?
<i>kayak</i>	<i>c-fos</i>	<i>spellchecker</i>	hMSH2	<i>/(2) giant larvae</i>	LLGL1, LLGL2
<i>D. myb</i>	<i>myb</i>	D-Xpa	XPA	<i>/(2) talc</i>	?
<i>diminutive</i>	<i>c-Myc</i>	D.XPD	XPD/ERCC2	<i>/(3) giant larvae</i>	?
<i>Notch</i>	<i>hNotch1/TAN1</i>			<i>/(3) malignant blood neoplasm-1</i>	<i>loricrin</i>
<i>pitchoune</i>	<i>MrDb</i>			<i>/(3) malignant braintumor</i>	?
<i>polo</i>	<i>Polo-like kinase</i>			<i>/(3) discs overgrown</i>	CSNK1D
<i>Polycomb</i>	<i>hPc1, hPc2</i>			<i>multi sex combs</i>	?
<i>Ras</i>	<i>Ras</i>			<i>/(1) malignant blood neoplasm-1</i>	?
<i>D. ret</i>	<i>ret</i>			<i>oho23B</i>	RPS21
<i>smoothed</i>	<i>smo</i>			<i>ovarian tumors</i>	?
<i>Src42A, Src64B</i>	<i>c-src</i>			<i>pendulin/oho31</i>	?
<i>string</i>	<i>cdc25</i>			<i>proliferation disrupter</i>	?
<i>trithorax</i>	<i>ALL-1</i>			<i>/(2) tumorous imaginal discs</i>	H. Tid-1
<i>D. TCF</i>	<i>TCF</i>			<i>tu(2)91k</i>	?
<i>torpedo</i>	<i>c-erbB-2</i>			<i>tumor(3)be</i>	?

上述基因的功能与突变表型见于 <http://info.med.yale.edu/genetics/xu/flycancergenes>

然而,相当数量的果蝇基因已被证明是人类癌基因或肿瘤抑制基因的同源基因^[13](表1)。目前,至少有76种哺乳类癌症相关基因的果蝇同源基因在被仔细研究中。这些工作使人们对它们在个体发育中的功能、分子水平上的行为,和信号传导途径中的作用有了深入的认识。我们把这些果蝇同源基因及其功能汇总于 <http://info.med.yale.edu/genetics/xu/fly-cancergenes>。从对这些果蝇基因及其参与的生命活动的研究使人们对其哺乳类同源基因的作用机理有了更多的了解。

1 信号传导途径是从果蝇到人保守的

许多被仔细研究过的信号传导途径是从果蝇到人保守的。对果蝇进行的遗传学研究对揭示这些信号传导途径作出了巨大贡献。例如,Ras 信号传导途径就是首先通过对果蝇复眼光受体细胞^[14]和线虫阴门发育过程^[15]的研究而阐明的。基于这种保守性,从果蝇基因和信号传导途径获得的研究成果正在对人类与癌症的斗争作出贡献。例如,人肿瘤抑制基因 *Patched* 的突变会导致痔样基底细胞癌综合征(nevoid basal cell carcinoma syndrome)。通过对果蝇 *patched/hedgehog* 信号传导途径其他成员的人类同源基因的研究,科学家们已经至少发现了3个与人类肿瘤形成相关的新基因^[16-19]。

值得注意的是,虽然许多与肿瘤形成相关的信号传导途径是从线虫到人保守的,它们中的一部分仍有因物种而异的生物学功能。例如,Ras 信号传导途径在果蝇和人中同时涉及细胞增殖和细胞命运决定过程,但在线虫中它只和细胞命运决定有关^[20,21]。更有甚者,线虫的细胞命运很大程度上依赖于所在的细胞谱系。这暗示着与人类组织分布模式有关的信号传导途径在线虫中或是还不存在,或是执行着不同的生物学功能。事实上,线虫的基因组序列并不包含几个 *hedgehog* 信号传导途径的关键成员^[22]。这些结果表明,作为一个模式生物,果蝇对研究人类肿瘤生物学具有不可替代的作用。

2 果蝇生物学为癌症研究提供了一个合适的模型

果蝇器官芽(imaginal disk)细胞与哺乳类细胞具有很高的生物学相似性,从而为人类癌症研究提供了一个绝对的模型。果蝇的器官芽是一群特殊的上皮细胞,是成虫绝大多数器官的前体。这些单层细胞结构的器官芽在果蝇幼虫时期不断进行细胞分裂而成为具有各自特征的成熟器官芽^[23],最终分化为成虫的各种结构。这些特殊的上皮细胞是二倍体,具有与哺乳类细胞相似的4相(G₁,S,G₂,M)细胞周期^[24,25]。不仅如此,它们在分子水平上也非常相似:由周期素(cyclin,包括CycA,CycB,CycD,CycE)和周期素依赖激酶(cyclin-dependent kinase,包括Cdk1,Cdk2,Cdk4或Cdk6)组成的细胞周期基本控制机制对果蝇和人而言是高度保守的^[25]。除此之外,果蝇和人的细胞周期调节机制也是高度保守的。许多哺乳类细胞周期调节基因,包括成视网膜细胞瘤基因(*pRB*)和 *E2F*,都有果蝇的同源基因(*Rbf*^[26]和 *D.E2F*^[27],表1)。果蝇和人细胞周期调控机理的相似性表明果蝇可以被用作研究肿瘤发生中细胞增殖过程的动物模型。

果蝇器官芽还可以被用来研究哺乳类肿瘤发生中细胞命运的决定过程。器官芽细胞通过与周围细胞的直接或远程相互作用分化产生特定的成虫组织器官^[28,29]。这种镶嵌式的细胞命运决定模式与哺乳类绝大多数组织中的细胞命运决定过程十分相似^[30]。目前已知绝大多数与细胞命运决定有关的信号传导途径在果蝇和人是保守的。例如,*Notch* 跨膜受体就已被

证明在脊椎动物和果蝇中通过相似细胞相互作用机制控制细胞命运的选择^[31]。有趣的是,人 *Notch* 同源基因的突变会导致 T 细胞急性成淋巴细胞白血病或淋巴瘤^[32]。最近在果蝇中进行的实验也表明 *Notch* 活性的变化会引起细胞过度增生^[33]。这样看来,调控细胞命运决定的信号传导途径是从果蝇到人保守的。

除了器官芽之外,果蝇胚胎也是研究发育过程中细胞增殖的好材料。果蝇胚胎的发育过程及细胞周期的更替已经被详细描述过了,用它进行研究可以更好地了解细胞周期与其他发育过程是如何协调的^[34]。最后,果蝇的卵巢对研究发育过程中细胞,尤其是胚胎干细胞增殖的调控也是十分有用的^[35,36]。

3 利用果蝇遗传学研究肿瘤发生

果蝇实验技术的最新发展为利用果蝇研究癌症相关基因提供了独特的优势。例如,癌基因经常过度活跃(如 *Ras*)过度表达(如 *cycD*),在果蝇中研究外源基因的表达又十分容易,所以利用果蝇可以方便地进行肿瘤病因学的研究。通过使用特殊的启动子,果蝇研究者们能过量表达某个基因而又不杀死果蝇。果蝇是唯一的有许多经仔细研究过的启动子可供选择的系统。这些启动子既有普遍表达型的如热休克启动子或肌动蛋白启动子,也有组织特异型的如只表达在神经组织或眼中的启动子。利用热休克启动子,人们还可以在特定时段内诱导基因的表达。各种组织特异的启动子使得人们能够在不杀死果蝇的情况下研究感兴趣的基因的表达。类似地,致癌的点突变或缺失突变可先在体外被诱导于特定基因,再转入体内以测量其致癌性。利用这种技术,在一种多发性内分泌腺瘤(multiple endocrine neoplasia 2B, MEN2B)中发现的突变 *Ret* 基因已被证实是过度激活了的^[37]。

酵母 UAS/GAL4 系统引入果蝇以后,诱导外源基因的表达更加方便,用途也更广泛^[38]。使用该系统时,只需完成一个目的基因的 UAS-cDNA 构建体,携有该构建体的果蝇可与任何组织特异表达 GAL4 的果蝇交配以使目的基因表达于特定组织。利用这一系统,有人将 UAS 序列随机插入果蝇基因组中来筛选基因过量表达导致的表型变化,从而发展了外源激活筛选法^[39,40]。通过筛选肿瘤生长表型,这种方法可被用来获得果蝇癌基因。类似地,用 UAS/GAL4 系统在果蝇发育过程中表达哺乳类癌基因或肿瘤抑制基因,可以进一步了解其生物功能。

另一个在部分组织中获得可遗传的基因过量表达的手段是所谓“弹出”(FLP-out)技术^[41]。它是通过把酵母的 FLP/FRT 系统引入果蝇基因组实现的^[42]。FLP 重组酶催化 FLP 重组靶位点(FLP recombination target, FRT)间的染色体位点专一重组。一个“弹出”构建体包含一组成型启动子,随后是一 FRT 位点。一含多聚腺苷尾(转录中止信号)的标记基因。第二个 FRT 位点,以及目的基因(图 1)。当此构建体整合入果蝇基因组后,热休克启动子诱导的 FLP 重组酶表达使两个 FRT 位点间的 DNA 以一定频率被切除,从而随机地使部分细胞稳定地过量表达目的基因。“弹出”技术与 UAS/GAL4 相结合后更加有用。当“弹出”构建体内的目的基因是 *Gal4* 时,GAL4 的表达可进一步诱导一种或多种 UAS-cDNA 构建体的稳定表达。Neufeld 等^[43]就是使用这个方法研究了细胞周期调控基因,如 *Rbf* 和 *E2F* 对细胞大小、细胞周期和细胞分裂速率等的影响(图 1)。

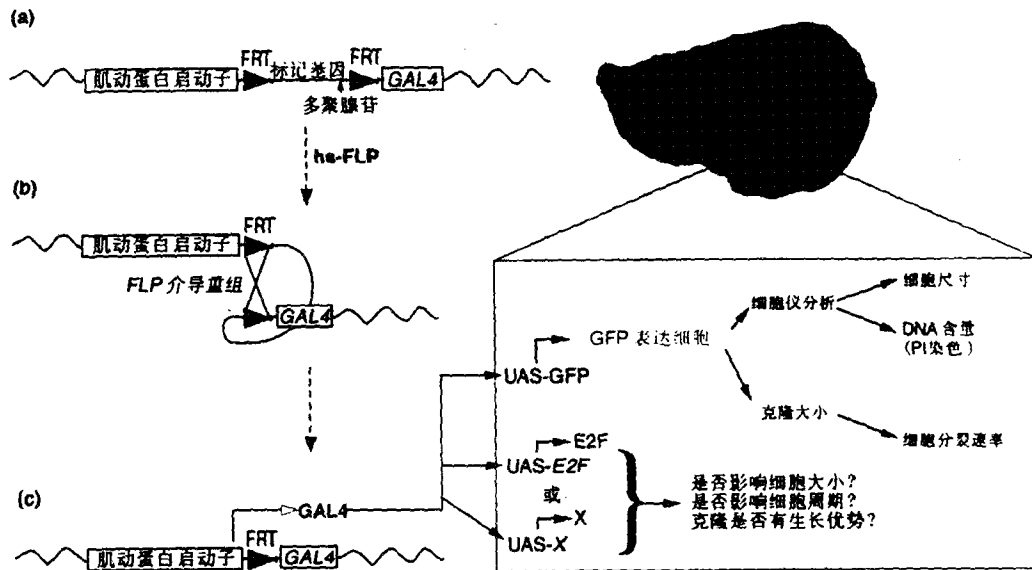


图1 FLP/FRT系统

(a)肌动蛋白启动子引起的 GAL4 表达被一转录中止信号(或一含多聚腺苷尾的标记基因)破坏。(b)受诱导表达的 FLP 重组酶引起部分细胞中串联 FRT 序列间的位点专一重组,使转录中止信号被去除。(c)于是在这些细胞及其子细胞中 GAL4 持续表达,进而诱导任何受 UAS 启动子控制的转基因的表达。本图展示的翅芽中,UAS-GFP(绿色荧光蛋白)被用于标记那些还表达癌症相关基因(如 E2F^[43])的细胞。荧光细胞仪(fluorescence-activated cell sorter, FACS)可被用于分析细胞尺寸和细胞周期的变化。通过比较荧光细胞中目的基因的表达与否还可以进一步地了解细胞分裂速率在体内的变化

与其他模式生物一样,当增加或减少目的基因的活性能引起特定表型后,通过寻找能加强或减弱该表型的第二突变位点。果蝇可被用于筛选与目的基因相互作用的其他基因。这就是所谓的调节基因筛选(modifier screen)。它对于发现信号传导途径的各个成员是非常有用的。例如在某筛选中,Delta 基因突变被发现可以抑制某些 Notch 基因突变的致死性表型,因此 Delta 蛋白被认为与 Notch 受体存在相互作用^[44]。同样的,用 sevenless 引起的眼表型进行的调节基因筛选探明了果蝇 Ras 信号传导途径的其他成员^[45]。如果一个哺乳类基因的过量表达能在果蝇中产生适于进行调节基因筛选的表型,则甚至不需克隆果蝇的同源基因就可直接进行筛选以发现该信号传导途径的其他成员。直接检查人基因在果蝇中过量表达引起的表型已日益普遍^[46,47]。通过这种分析发现的信号传导途径的成员基因应该是哺乳类肿瘤发生研究的理想对象。

像酵母和线虫等遗传学模式生物一样,果蝇基因组可被系统诱变以筛选在肿瘤发生的分子机制中起作用的任何基因。类似的大规模诱变在哺乳类系统中是不切实际的。近年来果蝇遗传学技术的发展也使果蝇能更好地模拟人类癌变发生的过程。人类癌变是在健康的人体中某一体细胞由于癌症相关基因突变的影响而生长失控所导致的一种克隆性现象。许多癌症相关基因是个体发育必需的,其突变纯合子可能死于癌变发生之前。所以只检查突变纯合子个

体的常规遗传学筛选会遗漏这些基因。新兴的镶嵌体筛选(mosaic screen)技术克服了这一困难。它更好地模拟了癌症病人体内发生的情况,使得分离新的肿瘤抑制基因成为可能(图2)。在镶嵌体筛选中,经诱变的雄蝇与野生型雌蝇交配产生一群携带不同突变的杂合子胚胎(图2b)。它们的每条主要染色体臂近着丝粒处都有一 FRT 位点插入,使得胚胎发育过程中姊妹染色体间高频有丝分裂重组可被诱导而在表型基本健康的动物体内产生突变的纯合子克隆^[48](图2a,b)。高比例的带有突变克隆的动物,加上自主性的细胞标记,还使人们可以方便地检查突变在发育过程中或内部器官上的潜在表型^[48]。由于有丝分裂重组还产生了一个野生型的双生子(twin spot)细胞(或克隆),那些具有精细表型,如影响细胞生长速率的突变可以通过比较与双生子克隆的尺寸而被检出^[49](图2)。镶嵌体筛选也是一个更快速的遗传学筛选。比起常规的三代筛选来,它只需要一代即可完成^[48,50]。该技术导致了許多被常规遗传学筛选遗漏了的新基因的发现^[49,51-53](图2d)。

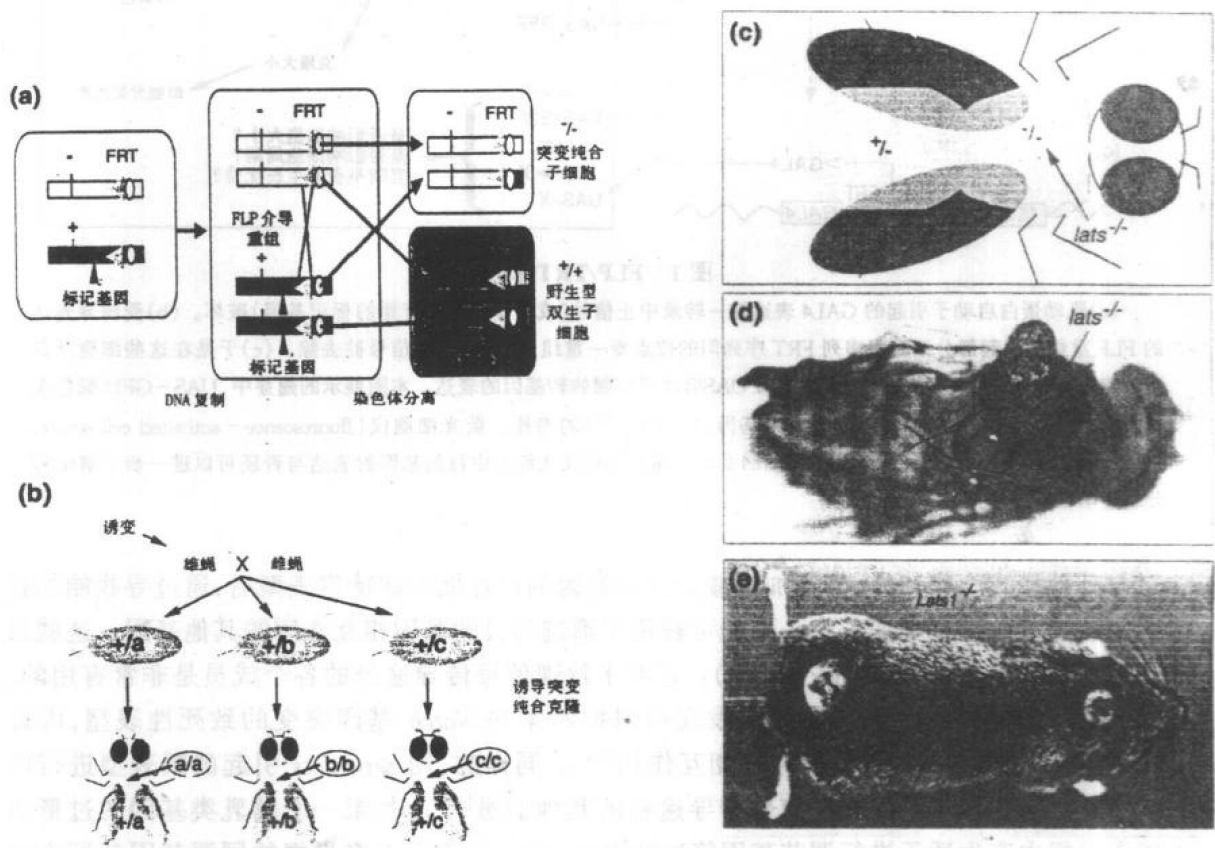


图2 镶嵌体筛选鉴别新肿瘤抑制基因

(a)利用 FLP/FRT 介导的有丝分裂重组在杂合子个体上诱导突变纯合子克隆。黑色或白色的长方形代表同源染色体。FLP 重组酶的受诱导表达可以引起 FLP 重组靶位点(FRT,箭头表示)间的高频有丝分裂重组。染色体分离后,一个含有纯合突变的子细胞(-/-)产生。该细胞还缺失了标记基因。使其可被与野生型双生子细胞(+ / +)或杂合子细胞分别。(b)FLP/FRT 介导的有丝分裂重组可被用于获得带有纯合突变克隆的镶嵌体动物。在这种动物中,肿瘤抑制基因或其他目的基因的突变可在第一代被检出。镶嵌体果蝇是癌症易感者,如肿瘤抑制基因突变杂合子的良好模型。在这些易感者或果蝇模型(c)中丢失一份野生型肿瘤抑制基因拷贝会导致肿瘤发育(白色区域)。(d)肿瘤抑制基因。 *lats* 的功能在哺乳动物中是保守的 *Lats1* 突变小鼠(e)罹患软组织肉瘤

4 作为肿瘤发生模型的果蝇

一个针对过度增生表型进行的镶嵌体筛选已成功地鉴别出了包括 *lats* (large tumor suppressor, 又名 *wts*) 在内的几个新肿瘤抑制基因^[49]。*lats* 突变的体细胞广泛增殖形成与人肿瘤形态相似的瘤样增生。证明了果蝇可产生与人肿瘤可比的性状^[49,54](图 2d)。*lats* 同源基因 (*Lats1*) 缺陷的小鼠会患软组织肉瘤。并对致癌物格外敏感^[55](图 2e), 表明两者肿瘤发生的机制可能是保守的。在果蝇和哺乳类中联合进行的研究证明了这一点。人的 *lats* 同源基因 (*LATS1*) 可被用于抑制 *lats* 突变果蝇的肿瘤生长, 并挽救 *lats* 突变体的生长缺陷^[47]。进一步的研究表明, *LATS* 蛋白可与 *CDC2* 形成复合体, 从而对 *CDC2/CycA* 复合体进行负调节^[47,55]。这一发现在 *lats* 和癌症发生时受累的一般目标细胞周期间建立了联系。果蝇肿瘤抑制基因可在小鼠中起同样作用这一事实体现了利用果蝇搜寻新肿瘤抑制基因的价值。更重要的是, *lats* 基因的功能保守性表明 *LATS* 信号传导途径的其他成员在果蝇和哺乳类中也可能是保守的。在果蝇中对这些基因的研究会对人肿瘤发生过程的了解提供直接的帮助。

5 果蝇在癌症研究中日益重要的角色

果蝇作为癌症研究模式生物的前途至少在几个方面是十分肯定的。随着果蝇和人类基因组计划的进展, 越来越多与癌症有关的候选基因会被鉴别出来。果蝇提供了一个迅速了解这些基因功能的系统。比如, 在果蝇中进行的研究可与在其他模式生物中进行的类似研究一道提供关于致癌分子在生化和分子水平上保守特征的信息。对人结节状硬化综合征 (tuberous sclerosis complex, TSC) 基因 *TSC2* 的果蝇同源基因 *gigas* 的研究就是一例。结节状硬化综合征是一个导致多发性良性肿瘤的常染色体显性遗传病, 其肿瘤组织常有大型细胞存在。类似的, *gigas* 突变在果蝇中也导致大型的多倍体细胞发育^[51]。另一个例子是肿瘤抑制基因 *PTEN* (*phosphatase and tensin homolog*, 又名 *MMAC1*)。在哺乳类和线虫中进行的研究认为, *PTEN* 在胰岛素信号传导途径中发挥功能。对果蝇 *PTEN* 同源基因的研究证实了这一结果。不仅如此, 对果蝇 *PTEN* 的研究还表明它能调节细胞尺寸^[56]。另一方面, 即使是已知的人癌基因或肿瘤抑制基因, 对其果蝇同源基因的研究也是有益的。例如, *src* 是最早被发现的哺乳类癌基因之一, 但人们至今对其致癌机理还不十分了解。果蝇 *src* 基因的发现是利用果蝇研究哺乳类癌基因的首次尝试。今后对果蝇 *src* 基因的研究有望对 *src* 信号传导途径及其调控的生命活动的了解作出巨大贡献^[57-60]。

在那些果蝇不是一个传统模式生物领域, 如检查点 (checkpoint) 对细胞周期控制的研究, 研究人员正日益发现果蝇系统的优点。并满怀希望地开始利用它进行研究^[61-63]。例如, 对辐射损伤检查点调控基因的筛选已经发现了一个新的在利用酵母进行的同样筛选中未被鉴别的基因 (G. Rubbin, 个人通信)。

一些对癌症生物学重要而又不大适合用传统分子肿瘤学手段研究的生命活动也许是未来利用果蝇进行研究的首选。虽然许多肿瘤抑制基因的突变已通过追踪研究癌症易感患者家系被阐明^[64], 导致癌肿转移的突变却因其为迟发事件而难以探明。利用果蝇 *lgl* (*lethal giant larvae*) 突变系肿瘤进行的实验表明, 果蝇中也存在肿瘤转移的现象^[65,66]。*lgl* 突变纯合子死于幼虫阶段。从它移植到野生型果蝇体内的脑瘤组织却可侵染到远处不相邻的器官^[66]。虽然没有证据表明 *lgl* 同源基因参与了人肿瘤的转移过程, 但其他事实却显示人与果蝇肿瘤转

移的生化机制,如IV型胶原酶增多等是保守的^[65-67]。

一些在人肿瘤转移过程中起作用的基因是有果蝇同源基因的。在哺乳动物中,*nm23* 基因被发现在活跃转移的细胞株中表达下降^[68]。对一些黑素瘤和其他类型癌变的研究证实了这一倾向。体外过量表达 *nm23* 也被显示对抑制黑素瘤和乳癌细胞转移有效^[69]。克隆了 *nm23* 被证实是果蝇 *awd* (*abnormal wing disk*) 基因的同源基因^[70]。与人恶性肿瘤相似, *awd* 基因的突变在果蝇中导致组织形态畸形及广泛异常分化。

6 展 望

利用果蝇研究肿瘤抑制基因会促进对导致人类癌症的关键生命活动过程的了解。例如,多细胞生物需要对器官尺寸进行控制以使其长到适当大小时中止生长。年轻的器官芽被移植到成虫体内后仍只长到正常尺寸,表明器官尺寸的控制机理本质上是自主的,并可被遗传^[71]。在小鼠中进行的器官移植实验表明哺乳类也使用类似的机理^[72]。当受到部分切除后,果蝇剩余的器官芽仍可再生成为正常大小。这显示发育中的器官通过增殖细胞的相互作用而保持一定尺寸^[73,74]。器官芽发育过程中,DNA 复制和有丝分裂在前后互不关联的分散小群细胞中发生^[75,76],也支持细胞增殖是受局部细胞相互作用控制的观点。肿瘤抑制基因 *lats* 的突变可破坏细胞的相互作用而使器官芽生长失控(图 3)。未来利用果蝇进行的研究可能会有助于更好地了解尺寸控制机制的分子起源及其与癌症的关系。

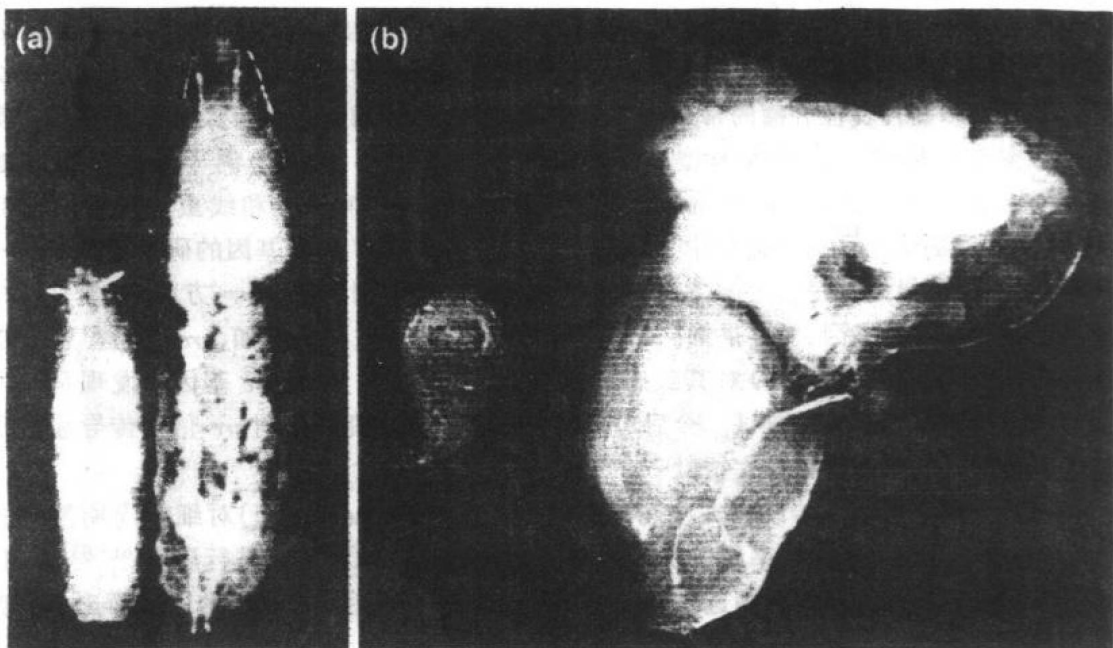


图 3 *lats* 影响器官尺寸的控制

肿瘤抑制基因 *lats* 的突变使果蝇器官尺寸失控。导致巨大幼虫(a) (左:野生型三龄幼虫,右:*lats* 突变体幼虫)和巨大器官芽(b)(左:野生型三龄幼虫翅芽,右:*lats* 突变体幼虫翅芽)

由于果蝇没有血管,它不适于作为研究肿瘤产生时血管发育过程的模型。然而,果蝇 *lats*

突变肿瘤的切片显示它们的确含有管道样结构。这或许是被用于向这些快速生长的组织提供营养的^[45,77]。有趣的是,人黑素瘤发育时也伴随独立于血管发育过程之外的管道形成过程^[78]。虽然尚不明了果蝇与哺乳类肿瘤内的这些管道是否有联系,果蝇肿瘤也许提供了研究这一问题的有力工具。

研究人员们发展更复杂的果蝇遗传学技术的努力将进一步增强果蝇作为癌症研究模式生物的地位。例如,果蝇中迄今只完成了对一条染色体臂致瘤突变的镶嵌体筛选。这必定无法获得涉及不同染色体的复合致瘤突变。即将进行的多染色体镶嵌体筛选或许会检出一类新的肿瘤抑制基因或是与肿瘤转移相关的突变。总之,鉴于其对研究各种癌症生物学问题的普适性以及果蝇肿瘤与哺乳类肿瘤的直接关系,果蝇系统在将来对癌症的研究工作中将发挥重要作用。

致 谢

我们感谢 Karen Wehner 和许田实验室的同事们提供的各种建议。本文由 NIH 基金 R01CA69408 资助。

参 考 文 献

- 1 Stark MB. An hereditary tumor in *Drosophila*. J Cancer Res, 1918, 3: 279 - 301
- 2 Gateff E. Malignant neoplasms of genetic origin in *Drosophila melanogaster*. Science, 1978, 200(4349): 1448 - 1459
- 3 Mechler BM, McGinnis W, Gehring WJ. Molecular cloning of *lethal(2) giant larvae*, a recessive oncogene of *Drosophila melanogaster*. EMBO J, 1985, 4(6): 1551 - 1557
- 4 Gateff E. Cancer, genes, and development; the *Drosophila* case. Adv Cancer Res, 1982, 37: 33 - 74
- 5 Bryant PJ, et al. Tumor suppressor genes encoding proteins required for cell interactions and signal transduction in *Drosophila*. Dev Suppl, 1993: 239 - 249
- 6 Torok T, et al. *P-lacW* insertional mutagenesis on the second chromosome of *Drosophila melanogaster*: isolation of lethals with different overgrowth phenotypes. Genetics, 1993, 135(1): 71 - 80
- 7 Woods DF, Bryant PJ. Molecular cloning of the *lethal(1) discs large-1* oncogene of *Drosophila*. Dev Biol, 1989, 134(1): 222 - 235
- 8 Woods DF, et al. Dig protein is required for junction structure, cell polarity, and proliferation control in *Drosophila* epithelia. J Cell Biol, 1996, 134(6): 1469 - 1482
- 9 Strand D, Raska I, Mechler BM. The *Drosophila lethal(2) giant laryad* tumor suppressor protein is a component of the cytoskeleton. J Cell Biol, 1994, 127(5): 1345 - 1360
- 10 Knudson AG. Antioncogenes and human cancer. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90(23): 10914 - 10921
- 11 Pitot HC. The molecular biology of carcinogenesis. Cancer, 1993, 72(3 Suppl): 962 - 970
- 12 Watson KL, Justice RW, Bryant PJ. *Drosophila* in cancer research: the first fifty tumor suppressor genes. J Cell Sci Suppl, 1994, 18: 19 - 33
- 13 Miklos GL, Rubin GM. The role of the genome project in determining gene function; insights from model organisms. Cell, 1996, 84(4): 521 - 529
- 14 Wassarman DA, Therrien M, Rubin GM. The Ras signaling pathway in *Drosophila*. Curr Opin Genet Dev, 1995, 5(1): 44 - 50

- 15 Sternberg PW, Han M. Genetics of RAS signaling in *C. elegans*. Trends Genet, 1998, 14(11):466 – 472
- 16 Hahn H, *et al.* Mutations of the human homolog of *Drosophila* patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. Cell, 1996, 85(6):841 – 851
- 17 Xie J, *et al.* Activating smoothened mutations in sporadic basal – cell carcinoma. Nature, 1998, 391(6662):90 – 92
- 18 Oro AE, *et al.* Basal cell carcinomas in mice overexpressing sonic hedgehog. Science, 1997, 276(5313):817 – 821
- 19 Dahmane N, *et al.* Activation of the transcription factor Glil and the Sonic hedgehog signalling pathway in skin tumours [published erratum appears in Nature 1997 Dec 4;390(6659):536]. Nature, 1997, 389(6653):876 – 881
- 20 Yochem J, Sundaram M, Han M. Ras is required for a limited number of cell fates and not for general proliferation in *Caenorhabditis elegans*. Mol Cell Biol, 1997, 17(5):2716 – 2722
- 21 Karim FD, Rubin GM. Ectopic expression of activated Ras1 induces hyperplastic growth and increased cell death in *Drosophila* imaginal tissues. Development, 1998, 125(1):1 – 9
- 22 Ruvkun G, Hobert O. The taxonomy of developmental control in *Caenorhabditis elegans* [see comments]. Science, 1998, 282(5396):2033 – 2041
- 23 Bryant PJ, Schmidt O. The genetic control of cell proliferation in *Drosophila* imaginal discs. J Cell Sci Suppl, 1990, 13:169 – 189
- 24 Orr – Weaver TL. Developmental modification of the *Drosophila* cell cycle. Trends Genet, 1994, 10(9):321 – 327
- 25 Edgar BA, Lehner CF. Developmental control of cell cycle regulators; a fly's perspective. Science, 1996, 274(5293):1646 – 1652
- 26 Du W, Vidal M, Xie J, Dyson N. RBF, a novel RB – related gene that regulates E2F activity and interacts with cyclin E in *Drosophila*. Genes Dev, 1996, 10:1206 – 1218
- 27 Dynlacht BD, *et al.* DNA – binding and trans – activation properties of *Drosophila* E2F and DP proteins. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(14):6359 – 6363
- 28 Basler K, Hafen E. Specification of cell fate in the developing eye of *Drosophila*. Bioessays, 1991, 13(12):621 – 631
- 29 Rooke JE, Xu T. Positive and negative signals between interacting cells for establishing neural fate. Bioessays, 1998, 20(3):209 – 214
- 30 Davidson EH, How embryos work; a comparative view of diverse modes of cell fate specification. Development, 1990, 108(3):365 – 389
- 31 Artavanis – Tsakonas S, Matsuno K, Fortini ME. Notch signaling. Science, 1995, 268(5208):225 – 232
- 32 Ellisen LW, *et al.* TAN – 1, the human homolog of the *Drosophila* notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. Cell, 1991, 66(4):649 – 661
- 33 Go MJ, Eastman DS, Artavanis – Tsakonas S. Cell proliferation control by Notch signaling in *Drosophila* development. Development, 1998, 125(11):2031 – 2040
- 34 Foe VE. Mitosis and morphogenesis in the *Drosophila* embryo. In: The Development of *Drosophila melanogaster*. M. Bate and A. Martinez Arias, Editors. Plainview, NY; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993, 149 – 300
- 35 King RC. Hereditary ovarian tumors of *Drosophila melanogaster*. Natl Cancer Inst Monogr, 1969. 31:323 – 345
- 36 Spradlin AC. Developmental genetics of oogenesis. In: The Development of *Drosophila melanogaster*. M. Bate

- and A. Martinez Arias, Editors. Plainview, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993. 1 – 70
- 37 Read RD, Cagan RL. Identifying the RetMEN2B signaling pathway; a *Drosophila* transgenic approach. A. Conf Dros Res, 1998. 39
 - 38 Brand AH, Perrimon N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*, 1993, 118(2): 401 – 415
 - 39 Rorth P, *et al.* Systematic gain – of – function genetics in *Drosophila*. *Development*, 1998, 125(6): 1049 – 1057
 - 40 Xu T. Identifying novel genes and their functions by ectopic expression screens. A. Conf Dros Res, 1997. 38; 283A
 - 41 Struhl G, Basler K. Organizing activity of wingless protein in *Drosophila*. *Cell*, 1993, 72(4): 527 – 540
 - 42 Golic KG, Lindquist S. The FLP recombinase of yeast catalyzes site – specific recombination in the *Drosophila* genome. *Cell*, 1989, 59: 499 – 509
 - 43 Neufeld TP, *et al.* Coordination of growth and cell division in the *Drosophila* wing. *Cell*, 1998, 93(7): 1183 – 1193
 - 44 Xu T, *et al.* The Notch locus and the genetic circuitry involved in early *Drosophila* neurogenesis. *Genes Dev*, 1990, 4(3): 464 – 475
 - 45 Simon MA, *et al.* Ras1 and a putative guanine nucleotide exchange factor perform crucial steps in signaling by the sevenless protein tyrosine kinase. *Cell*, 1991, 67(4): 701 – 716
 - 46 Fogerty FJ, *et al.* Dominant effects of the *bcr – abl* oncogene on *Drosophila* morphogenesis. *Oncogen*, 1999, 18(1): 219 – 232
 - 47 Tao W, *et al.* Human homologue of the *Drosophila melanogaster lats* tumour suppressor modulates CDC2 activity. *Nat Genet*, 1999, 21(2): 177 – 181
 - 48 Xu T, Rubin GM. Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues. *Development*, 1993, 117: 1223 – 1237
 - 49 Xu T, Wang W, Zhang S, Stewart RA, Yu W. Identifying tumor suppressors in genetic mosaics; the *Drosophila lats* gene encodes a putative protein kinase. *Development*, 1995, 121(4): 1053 – 1063
 - 50 Xu T, Harrison S. Mosaic analysis using FLP recombinase. *Methods Cell Biol*, 1994, 44: 655 – 682
 - 51 Ito N, Rubin GM. *gigas*, a *Drosophila* homolog of tuberous sclerosis gene product – 2, regulates the cell cycle. *Cell*, 1999, 96(4): 529 – 539
 - 52 Rooke J, *et al.* KUZ, a conserved metalloprotease – disintegrin protein with two roles in *Drosophila* neurogenesis. *Science*, 1996, 273(5279): 1227 – 1231
 - 53 Theodosiou NA, *et al.* *slimb* Coordinates *wg* and *dpp* expression in the dorsal – ventral and anterior – posterior axes during limb development. *Development*, 1998, 125(17): 3411 – 3416
 - 54 Justice RW, *et al.* The *Drosophila* tumor suppressor gene *warts* encodes a homolog of human myotonic dystrophy kinase and is required for the control of cell shape and proliferation. *Genes Dev*, 1995, 9(5): 534 – 546
 - 55 St John MA, *et al.* Mice deficient of *Lats1* develop soft – tissue sarcomas, ovarian tumours and pituitary dysfunction. *Nat Genet*, 1999, 21(2): 182 – 186
 - 56 Huang H, *et al.* PTEN affects cell size, cell proliferation and apoptosis during *Drosophila* eye development. *Development*, 1999, 126(23): 5365 – 5372
 - 57 Hoffmann FM, *et al.* Nucleotide sequences of the *Drosophila src* and *abl* homologs; conservation and variability in the *src* family oncogenes. *Cell*, 1983, 35(2 Pt 1): 393 – 401
 - 58 Simon MA, Kornberg TB, Bishop JM. Three loci related to the *src* oncogene and tyrosine – specific protein kinase activity in *Drosophila*. *Nature*, 1983, 302(5911): 837 – 839

- 59 Roulier EM, Panzer S, Beckendorf SK. The Tec29 tyrosine kinase is required during *Drosophila* embryogenesis and interacts with Src64 in ring canal development. *Mol Cell*, 1998, 1(6): 819 – 829
- 60 Guarnieri DJ, Dodson GS, Simon MA. SRC64 regulates the localization of a Tec – family kinase required for *Drosophila* ring canal growth. *Mol Cell*, 1998, 1(6): 831 – 840
- 61 Sibon OC, *et al.* The *Drosophila* ATM homologue Mei – 41 has an essential checkpoint function at the mid-blastula transition. *Curr Biol*, 1999, 9(6): 302 – 312
- 62 de Nooij JC, Letendre MA, Hariharan IK. A cyclin – dependent kinase inhibitor, Dacapo, is necessary for timely exit from the cell cycle during *Drosophila* embryogenesis. *Cell*, 1996, 87(7): 1237 – 1247
- 63 Duronio RJ, O'Farrell PH. Developmental control of a G₁ – S transcriptional program in *Drosophila*. *Development*, 1994, 120(6): 1503 – 1515
- 64 de la Chapelle A, Peltomaki P. The genetics of hereditary common cancers. *Curr Opin Genet Dev*, 1998, 8(3): 298 – 303
- 65 Woodhouse E, *et al.* Increased type IV collagenase in lgl – induced invasive tumors of *Drosophila*. *Cell Growth Differ*, 1994, 5(2): 151 – 159
- 66 Woodhouse E, Hersperger E, Shearn A. Growth, metastasis, and invasiveness of *Drosophila* tumors caused by mutations in specific tumor suppressor genes. *Dev Genes Evol*, 1998, 207(8): 542 – 550
- 67 Ambiru S, *et al.* Increased serum type IV collagen 7 – S levels in patients with hepatic metastasis. *Am J Gastroenterol*, 1995, 90(5): 783 – 778
- 68 Steeg PS, *et al.* Evidence for a novel gene associated with low tumor metastatic potential. *J Natl Cancer Inst*, 1988, 80(3): 200 – 204
- 69 Freije JM, MacDonald NJ, Steeg PS. Nm23 and tumour metastasis: basic and translational advances. *Biochem Soc Symp*, 1998, 63: 261 – 271
- 70 Biggs J, *et al.* A *Drosophila* gene that is homologous to a mammalian gene associated with tumor metastasis codes for a nucleoside diphosphate kinase. *Cell*, 1990, 63(5): 933 – 940
- 71 Bryant PJ, Simpson P. Intrinsic and extrinsic control of growth in developing organs. *Q Rev Biol*, 1984, 59(4): 387 – 415
- 72 Leitina BI, *et al.* Enormous organ – like growth of transplants of fetal digestive tract. *Transplantation*, 1971, 11(5): 499 – 502
- 73 French V, Bryant P, Bryant S. Pattern regulation on epimorphic field. *Science*, 1976, 193: 969 – 981
- 74 Meinhardt H. Biological pattern formation: new observations provide support for theoretical predictions. *Bioessays*, 1994, 16: 627 – 632
- 75 Milan M, Campuzano S, Garcia – Bellido A. Cell cycling and patterned cell proliferation in the *Drosophila* wing during metamorphosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(21): 11687 – 11692
- 76 Adler PN, MacQueen M. Partial coupling of the cell cycles of neighboring imaginal disc cells. *Exp Cell Res*, 1981, 133(2): 452 – 456
- 77 St John MA, Xu T. Understanding human cancer in a fly? *Am J Hum Genet*, 1997, 61(5): 1006 – 1010
- 78 Maniotis AJ, *et al.* Vascular channel formation by human melanoma cells *in vivo* and *in vitro*: vasculogenic mimicry [see comments]. *Am J Pathol*, 1999, 155(3): 739 – 752