

口腔 分子生物学

*KOUQIANG
FENZI
SHENGWUXUE*

● 主编 · 陈谦明



军事医学科学出版社



口腔分子生物学

陈谦明 主编

李秉琦 审阅

编者(按汉语拼音排列)

陈谦明 L. P. Samaranayake

罗 刚 聂敏海 唐高妍

武云霞 曾 昕 赵 蔓

钟 利 周 敏

军事医学科学出版社

·北 京·

内 容 提 要

本书系统介绍了口腔分子生物学的理论与应用成果。主要内容有牙发育、唇腭裂的发生、口腔微生物、口腔颌面部肿瘤、基因治疗、唾液的分泌调节、粘附分子与角蛋白等的分子生物学。为阅读方便,作者还简要地、以图示的方式介绍了分子生物学的基础理论和常用技术。

本书既可供口腔医学本科生、研究生及口腔医学研究人员参考,也可作为广大临床口腔医学工作者更新知识、提高口腔颌面部疾病的防治水平的参考书。

* * *

图书在版编目(CIP)数据

口腔分子生物学/陈谦明主编. -北京:军事医学科学出版社,2000.8

ISBN 7-80121-248-7

I.口… II.陈… III.口腔科学:分子生物学 IV.R780.2

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2000)第 62647 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
潮河印刷厂印刷

*

开本:787mm×1092mm 1/16 印张:14.25 字数:349 千字

2000 年 10 月第 1 版 2000 年 10 月第 1 次印刷

印数:1-3000 册 定价:19.80 元

(购买本社图书,凡有缺、损、倒、脱页者,本社发行部负责调换)

主 编 简 介



陈谦明,男,1963年6月生,华西医科大学口腔医学院教授、中华口腔医学会口腔粘膜病专业委员会常务委员、国际牙科研究协会(IADR)会员。1992年获口腔医学博士学位,师从李秉琦、萧卓然教授;1992~1994年受遗传学博士后培训,师从傅继梁、杨光华教授。后到香港大学工作与研修3年。主研方向为口腔癌前损害发生与防治的分子生物学。主持与参加多项国家、部(委)、省相关课题的研究,在国内外专业期刊发表研究论文50余篇,主编或参编学术专著12部,获部(委)、省级成果奖6项,并先后多次赴美国、加拿大、新加坡等国家和欧洲、台湾等地区参加国际学术研讨会进行学术交流。

序

20 世纪生命科学的突飞猛进,有赖于分子生物学研究的兴起,而分子生物学在口腔医学的应用也极大地推动着口腔医学的进一步发展。事实证明,分子生物学在包括口腔医学在内的医学领域中已经结出了丰硕的成果。

此书是我国第一部口腔分子生物学专著,编著者以专题的方式,较系统全面地介绍了口腔分子生物学的理论与应用成果,并且还简要地介绍了一些常用的分子生物学技术与基本理论,以便于读者理解和应用。

主编陈谦明教授是青年口腔医学专家,编者也主要是年轻的学子。他们以自己的研究工作为基础,结合国内外的最新进展写成此书,体现了“新、快、全”的特点,也体现了青年医学工作者锲而不舍、朝气蓬勃的精神。

我有幸较早地拜读了此书,除增长不少学识之外,深感这是一部新颖、全面、集理论性与实用性为一体的专著。相信此书的出版对读者会有很大的裨益。故我乐于在新世纪伊始将此书介绍给广大的口腔医学临床工作者和研究人员,让我们为创建新的辉煌而共同努力。

李秉琦

1999 年 12 月

自序

有学者指出,21世纪是生命科学世纪,而生命科学发展的首要动力来源于分子生物学的兴起与发展,足见分子生物学的理论和方法对从事生命科学学习与研究人员的重要性。同样,分子生物学在口腔医学领域的应用和发展,已经并且正在极大地推动着口腔医学的进一步发展,并取得了丰硕的成果。有鉴于此,早在1992年,我还在博士后流动站接受基础医学理论与技术培训的时候,就打算结合自己的研究课题,将分子生物学的理论和方法应用于口腔医学领域所取得的成果总结成集,为从事相关领域学习与研究的人员提供一部集理论性与实用性为一体的参考专著。并在有关导师、编辑部门的支持下立项,甚至签下了出版合同。但时光流逝,此书却迟迟没有着落。究其原因有三,其一当然是自己才疏学浅,分子生物学涉及学科领域广泛,新知识与新理论层出不穷,自己都还没有完全掌握,又如何能够转授于人;其二是分子生物学的理论和方法在口腔医学领域的应用研究工作在国内外都还处于方兴未艾的阶段,其理论和成果的完善尚需假以时日;其三是这些研究成果散在于浩瀚的文献大海之中,而在祖国内地获得这些文献的机会有限。因此,对此宿愿也就只有一拖再拖了。直到1998年,我有幸来到了信息灵敏、东西方文化荟萃于一炉的香港大学学习和工作,使我接触到了大量梦寐以求的资料,才使我编写这本专著的心愿得以完成。

口腔分子生物学随着分子生物学的理论与方法在口腔医学领域的应用而诞生,至今还没有确切的定义与研究范围的界定;但是,它与分子生物学的关系应该是属于一般与特殊的关系。考虑到这一点,在此书的体例上基本上采用的是首先概述分子生物学原则,然后,强调口腔医学领域在应用该原则和方法上的特殊性、注意事项及取得的相应成果。此外,尽管分子生物学强调涉及到DNA与RNA的理论和方法,尤其是涉及到克隆这些分子到宿主细胞中的技术,但许多分子生物学的技术来源于传统的生物化学技术,涉及到DNA-RNA-蛋白质这一中心法则的所有环节,同时也包含判定大分子所涉及到的免疫学技术。因此,在成果的取舍上强调了核酸技术的成果而而不仅局限于核酸技术。需再次强调的是,此书所涉及到的理论、方法与成果更新迅速,虽然在编著时相对成熟,但不排除在较短的时间内被修正或取代的可能,敬请读者留意。此外,要想以三十几万字的容量包罗所有该领域所涉及到的专题也是不现实的,一些主要涉及一般理论的专题,如伤口愈合过程中的分子生物学、炎性介质的分子生物学等,只有烦请读者参考其他相关的分子生物学书籍了。如果此书能够为读者的研究工作、理论学习带来一点点裨益的话,编著者们一定会倍感欣慰。当然,受条件与知识面所限,错误在所难免,恳请读者多多指正,便于再版时修正,以免贻害后人。

最后,我要感谢在我人生成长与学习进步的几个阶段上给予我指导的导师们,包括已故的萧卓然教授,健在的李秉琦教授、杨光华教授和傅继梁教授,以及在香港大学合作教授L. P. Samaranayake,没有他们十几年如一日的传道授业、谆谆教诲,不可能有我在学术领域的成长,也不可能有此书的完成与面世。我还要感谢在华西医科大学口腔医学院工作和学习的一批年轻学者,他们知识面宽广,既受过专业的口腔医学教育,又有着良好的分子生物学知识,他们为此书的完成,做了大量的具体工作,没有他们的努力,此书也是不可能完成的。我还要感谢华西医科大学及其口腔医学院的领导们,从一开始,他们就将此书列为基础口腔医学丛书的一部分,给予了支持和协助。我还要特别感谢华西医科大学第四编辑室的蒋长亨主任,自1992年

我有着手编写此书的想法起,他自始至终是我完成此书最强有力的支持者,尤其是在编写过程中遇到困难时,给予我支持和帮助。应该说,没有他的鼓励,可能我早已放弃此书的编著工作了。最后,我还要感谢一直默默无闻、荣辱与共地站在我身后,给予我力量与动力的娇妻与爱女。

陈谦明

1999年12月于香港

目 录

第一章 概论	(1)
第一节 分子医学的兴起与发展	(1)
第二节 口腔分子生物学的发展与成果	(2)
一、龋病替代疗法	(2)
二、基因工程防龋疫苗	(3)
三、颌面部发育的基因调控	(3)
四、口腔微生物种型鉴定	(4)
五、口腔粘膜病病因子的认识与修正	(4)
六、口腔癌的早期诊断与治疗	(4)
七、口腔疾病的基因治疗	(5)
第三节 我国口腔分子生物学的发展	(5)
一、原癌基因与头颈部肿瘤	(5)
二、牙周组织疾病的分子机制	(7)
三、致龋菌毒力因子及基因工程防龋疫苗	(7)
第四节 我国口腔分子生物学进一步发展的策略	(7)
第二章 常用分子技术	(9)
第一节 脱氧核糖核酸及核糖核酸	(9)
一、DNA 的来源	(9)
二、DNA 的结构与功能	(9)
三、RNA	(10)
四、cDNA	(10)
五、DNA 探针	(12)
第二节 DNA 定位图谱	(12)
一、限制性内切核酸酶	(12)
二、Southern 分析	(14)
第三节 DNA 扩增	(15)
一、PCR	(15)
二、PCR 的不足	(16)
三、PCR 变异	(16)
第四节 DNA 克隆	(16)
一、策 略	(16)
二、克隆系统	(17)
第五节 DNA 测序	(19)
一、人工测序方法	(19)
二、自动测序方法	(19)
第六节 定位克隆	(21)

一、功能性克隆	(21)
二、基因图	(22)
三、物理图谱	(23)
四、基因解码	(24)
第七节 突变分析	(24)
一、DNA 缺失的检测	(24)
二、检测点突变	(24)
三、筛选 DNA	(24)
四、点突变的证实	(26)
第八节 染色体分析	(26)
一、染色体核型	(26)
二、荧光素原位杂交	(27)
三、体细胞杂交	(28)
第九节 重组 DNA 的表达	(28)
一、体外表达	(28)
二、体内表达	(29)
第三章 牙发育及先天性唇腭裂的分子生物学	(31)
第一节 造釉蛋白的分子生物学	(31)
一、概 述	(31)
二、造釉蛋白的基因调控	(32)
三、造釉蛋白的分泌	(34)
四、造釉蛋白的结构	(36)
五、胞外造釉蛋白的降解	(36)
六、造釉蛋白的功能	(42)
第二节 牙发育过程中的基因调控	(44)
一、牙胚发育的启动阶段	(44)
二、间充质凝聚区的形成和增殖	(49)
三、牙齿发育后期的基因调控	(53)
四、小 结	(55)
第三节 唇腭裂的分子生物学机制	(55)
一、转化生长因子- α	(55)
二、4p16 区位的 Msx1 基因	(56)
三、17q21 区位的维 A 酸受体- α 基因	(56)
四、唇腭裂中基因与环境因素的相互作用	(56)
五、小 结	(56)
第四章 常见口腔微生物的分子生物学	(58)
第一节 龋病微生物的分子遗传与分子生物学	(58)
一、致龋性链球菌突变株的分离	(58)
二、口腔链球菌分子遗传学特性	(59)

三、口腔链球菌的分子克隆	(63)
第二节 牙周厌氧菌的分子遗传与分子生物学	(69)
一、总 论	(69)
二、实用性分子成分	(70)
三、克隆及插入突变	(71)
四、口腔内的普氏菌及卟啉单胞菌	(71)
五、放线菌	(72)
六、放线杆菌	(72)
七、拟杆菌等位交换突变	(73)
八、诊断探针	(73)
九、牙周细菌的传播	(73)
第三节 单纯疱疹病毒的分子生物学	(77)
一、HSV DNA 的结构与功能	(78)
二、HSV 的复制	(84)
三、HSV 蛋白质	(85)
四、HSV 的潜伏感染	(87)
五、治疗 HSV 感染的分子生物学基础	(88)
第四节 人类乳头瘤病毒的分子生物学	(89)
一、HPV 基因组组成	(89)
二、HPV 种系与癌	(91)
三、正常口腔组织中的 HPV	(92)
四、HPV 的传播方式	(92)
五、HPV 致癌作用的分子机制	(93)
第五章 人类口腔癌的分子生物学	(95)
第一节 概 述	(95)
第二节 口腔癌与癌基因	(96)
一、逆转录病毒与病毒癌基因	(96)
二、原癌基因	(97)
三、癌基因的激活	(98)
四、口腔癌与癌基因	(99)
第三节 口腔癌与肿瘤抑制基因	(101)
一、实验性证据	(101)
二、肿瘤的形成	(103)
三、口腔癌与肿瘤抑制基因	(104)
四、口腔生长抑制因子和信号转导通路	(111)
第四节 DNA 修复基因	(111)
一、修复的生物学	(111)
二、DNA 修复与癌	(112)
第五节 外源因素致口腔癌的分子基础	(113)

一、环境因素致口腔癌的分子基础	(113)
二、人类乳头状瘤病毒与口腔癌	(114)
第六节 口腔癌发生的分子模型	(119)
第七节 口腔癌的分子诊断	(119)
第八节 口腔癌的遗传易感性	(121)
一、肿瘤易感性的概念	(121)
二、头颈部肿瘤易感性的临床证据	(121)
三、肿瘤易感性检测方法的应用	(126)
第六章 口腔疾病的基因治疗	(130)
第一节 基因治疗的基本流程	(130)
一、确定目的基因	(130)
二、重组载体	(130)
三、筛 选	(130)
四、导 入	(130)
五、疗效观察	(130)
第二节 转基因体系	(131)
一、逆转录病毒	(132)
二、腺病毒和腺相关病毒	(136)
三、单纯疱疹病毒	(138)
四、天花病毒	(139)
五、非病毒性基因转导方法	(139)
第三节 启动子	(139)
第四节 基因治疗的应用	(140)
一、肿瘤的基因治疗	(140)
二、感染性疾病的基因治疗	(141)
第五节 口腔疾病的基因治疗	(141)
一、口腔癌与癌前损害	(141)
二、白色念珠菌感染	(143)
三、涉及粘膜角化上皮细胞的基因治疗	(144)
四、涉及唾液腺的基因治疗	(144)
五、其他可开发的基因治疗	(145)
第六节 基因治疗潜在的危险	(145)
第七章 唾液蛋白分泌的分子调节	(147)
第一节 典型的唾液腺基因的结构和表达	(148)
一、激肽释放酶	(148)
二、血管紧张肽酶原	(149)
三、半胱氨酸蛋白酶抑制剂	(149)
四、富脯蛋白	(150)
五、富谷蛋白	(150)

六、富酪蛋白	(150)
七、富组蛋白	(152)
八、点蛋白	(154)
九、 α -淀粉酶	(154)
十、腮腺分泌蛋白	(155)
第二节 唾液基因表达的调节	(155)
一、发育期唾液蛋白基因的调节	(155)
二、胞外刺激时唾液蛋白基因的调节	(156)
第八章 细胞粘附分子的分子生物学	(159)
第一节 细胞粘附分子的基本特征	(159)
一、整合素家族	(159)
二、选择素家族	(168)
三、免疫球蛋白超家族	(169)
四、钙粘附素家族	(171)
五、CD44	(172)
六、细胞外基质分子	(174)
第二节 炎症和免疫反应中的细胞粘附分子	(181)
一、生物反应修饰剂对细胞粘附分子的调节	(182)
二、细胞粘附分子信号传递功能	(184)
三、炎症和免疫反应中细胞粘附分子的功能	(184)
第三节 口腔疾病与细胞粘附分子	(186)
一、炎症性关节疾病中细胞粘附分子的作用	(186)
二、牙周组织疾病中细胞粘附分子的作用	(186)
三、整合素在口腔癌中的作用	(187)
四、粘附分子和口腔大疱性疾病	(188)
第九章 细胞角蛋白与口腔疾病	(191)
第一节 细胞角蛋白的基本特征	(191)
一、细胞角蛋白的分类和结构	(191)
二、细胞角蛋白的基因结构及其表达调控	(193)
第二节 细胞角蛋白的表达部位及其抗体	(195)
一、细胞角蛋白的表达部位、抗体及其影响因素	(195)
二、口腔粘膜上皮的角蛋白表达	(200)
汉英词汇索引	(204)

第一章 概 论

第一节 分子医学的兴起与发展

目前,分子生物学(molecular biology)或称分子细胞生物学(molecular cell biology)是描述包括传统的生物化学、细胞超微结构与生理学(细胞生物学)和遗传学在内的新的学科领域。虽然其学科领域更加广泛,但更强调分子遗传学及发育信号的研究。前者包括遗传信息的转录、翻译及翻译后的修饰等,后者则指象生长因子这样的发育信号及其与组织发生有关分子信号的作用与相互作用。尽管许多分子生物学的技术来源于传统的生物化学技术,同时也包含判定大分子所涉及到的免疫学技术,但是,分子生物学中更为特殊的技术涉及到 DNA 与 RNA 技术,尤其是涉及到克隆这些分子到宿主细胞中的技术。

分子医学(molecular medicine)则指应用分子生物学等相关的生命科学的技术和手段,从分子水平研究人类疾病的病因、病理过程、临床诊断、临床治疗、转归与防治的一门学科。由于医学本身即是属于生命科学的范畴,因此,生命科学,特别是分子生物学的兴起和发展,与医学的研究和发展存在着千丝万缕的联系,它们密切相关、相互促进,很难确切地将分子医学的发展与其他生命学科截然分割开来。目前,分子医学主要的应用范围包括医学遗传学、新生儿疾病、医学微生物学、医学肿瘤学、治疗学、法医学等传统学科。但是,分子医学一词的提法却是 80 年代末、90 年代初随着分子生物学技术的普及和推广而产生的。在这一时期出版了几部以分子医学为题的教科书。其中的典型代表是 R.J. Trent 等编著的《Molecular Medicine: An Introductory Text》。该书在短短的三四年时间里即反复再版,从一个侧面反应了分子医学的普及速度。

表 1-1 列出了一些与分子医学的发展密切相关,获得诺贝尔生理医学奖的一些成果。可以认为,每一项取得的成果,都是分子医学发展的里程碑。

1988 年美国能源部和国立卫生研究院(NIH)发起了人类基因组计划。该计划是一个多学科、跨国性的研究计划。其最终目标是在 2005 年前测定和克隆整个人类基因组和一些模型微生物的 DNA 序列。实施此计划所取得的成果,将会产生无与伦比的科学与社会价值。至 2000 年 6~7 月间,经世界各国科学家共同努力,已完成了人类基因组草图的绘制工作,其中,中国的科研工作人员完成了整个计划的 1% 的工作任务。

人类基因组计划的两个基本部分是遗传和物理图谱的制作。这两大策略都由 80 年代和 90 年代的主要技术的发展而促进。遗传性图谱的制作是间接地通过家谱和 DNA 多态性研究,确定染色体之间的距离。微卫星体多态标记技术使遗传性图谱的制作得以迅速地发展。物理图谱能更好地直接测量实际距离,其制作方法包括脉冲场凝胶电泳(pulsed field gel electrophoresis, PFGE),酵母菌人工染色体(yeast artificial chromosomes, YACs)及荧光原位杂交技术(fluorescence in situ hybridisation, FISH)。这些技术能确定更长的 DNA 片段及其相互位置。

表 1-1 主要的分子医学成果及其诺贝尔奖获得者

获奖年份	获奖者	主要成果
1959	S Ochoa, A Kornberg	体外合成核酸
1962	JD Watson, FHC Crick, MHF Wilkins	DNA 双螺旋结构理论
1975	D Baltimore, HM Temin, R Dulbecco	逆转录酶与致肿瘤病毒
1978	W Arber, D Nathans, HD Smith	限制性核酸内切酶
1980	P Berg, W Gilbert, F Sanger	构建第一个重组 DNA 分子并 建立 DNA 测序技术
1989	JM Bishop, HE Varmus	癌基因的发现
1989	S Altman, TR Cech	RNA 与核酸酶
1993	R Roberts, P Sharp	基因拼接
1993	K Mullis, M Smith	聚合酶链反应与定点诱变
1995	E Lewis, C Nusslein - Folhard, E Wieschaus Wishos	早期胚胎发育的遗传机制

人类基因组计划的另一基本部分是资讯科技 (informatics)。即实施此计划获取的数据可以被储存并被转送,从而使这些成果以尽可能快的速度得以传播和普及。资讯科技的主体成分是计算机网络与数据库。国际互联网与局部的服务商可以将这些成果尽快传播。资源中心与数据库的发展使新的信息得以储存和处理。

第二节 口腔分子生物学的发展与成果

如上所述,在过去近 30 年里,生命科学领域取得了革命性的进步,而这种进步的首要推动力来自分子生物学的兴起和发展。从 1944 年 Avery 等确立 DNA 是遗传的载体,到 1953 年 Waston 和 Crick 创立 DNA 分子双螺旋结构模型;从 1963 年 Nirenberg 等破译遗传密码,到 Baltimore、Nathans 和 Smith 发现逆转录现象和限制性内切酶,到近年来 Anderson、Blaise 和 Rosenberg 等率先开展的人体基因治疗,以及人体基因组计划的实施,无一不使人们对生命现象的认识产生一次次飞跃。既属生命科学范畴,又具有独自特性的现代口腔医学,借助分子生物学的发展,也逐渐进入生命科学发展的时代,并且逐渐形成了自己的新的学科分支——口腔分子生物学。尽管在 1991 年, Ferguson 编著了一本论文集《Aspects of oral molecular biology》,但是至今尚无人对口腔分子生物学下一个明确的学术定义。顾名思义,口腔分子生物学是应用分子生物学的技术和手段,在分子水平,对人类牙、颌、面组织器官的正常生长、发育和衰老过程,以及牙、颌、面疾病的病因、病理、临床诊断、治疗、转归预测和防治进行研究的学科。目前,口腔分子生物学的应用和发展已经并且正在极大地推动着口腔医学的进一步发展。

一、龋病替代疗法

龋病是人类口腔中最常见的疾病,它被世界卫生组织列为威胁人类健康的第三大疾病,因而被作为重点防治对象。所谓龋病替代疗法是指采用一定技术手段从致龋菌获得无毒的突变菌株,将这种突变菌接种于口腔内龋病好发部位,以占据有毒的野生型致龋菌株聚集的位置,

从而预防和治疗龋病。龋病替代疗法为口腔分子生物学的重要研究成果。由于这种防治方式具有可伴随宿主终身,而且又会在宿主之间自动传播的特点,因而倍具吸引力。几十年来的研究表明,变形链球菌是首要的致龋菌。因此,人们先后采用紫外线、X射线、快速中子以及化学诱变剂等手段诱发其突变,并成功地筛选出了乳酸脱氢酶缺陷突变株。这种突变株接种于动物口腔后,不仅仍可定居于动物口腔之中,而且,即使饲以高糖致龋食物,接种动物发生的龋病也较对照组少得多,从而证实了替代疗法的可行性。但是,这些传统诱变方法诱发的突变株常有回复率较高、突变菌株产量小、不适于大规模群体接种等缺点。因此,人们开始着眼从基因水平改造变形链球菌。

Pucci 等首先采用分子克隆技术克隆出了变形链球菌的致病基因——葡萄糖基转移酶 (glucosyltransferase, GTF) 基因 (gtf)。继之,在体外对该基因进行人工修饰,使其出现遗传缺陷后,重新引入野生型变形链球菌体内,获得了较稳定的不产生致龋物质的突变菌株,在动物体内也得到了明显的防龋效果。尽管这项成果的实际应用可能还有一段时间,但 Pucci 的工作至少说明:利用分子生物学手段改造致龋菌,无论在理论上还是在实践中,均可能是行之有效的一条防龋研究新途径。

二、基因工程防龋疫苗

除替代疗法从改造致龋菌入手外,诱导机体自动免疫,干扰致龋菌在牙面的早期粘附与聚集,阻断致龋微环境的形成等,也一直是人们寻求的另一防龋途径。早期的研究是从致病菌如变形链球菌获得全菌或菌体蛋白成分后,免疫机体获得防龋抗体。但不幸的是,由于经这些途径获得的抗原成分不纯,刺激机体产生相应的抗体与心肌组织之间存在着严重的交叉反应。

近年来,由于利用基因工程手段可以获得高纯度的蛋白质产物,因此,人们又开始着眼于基因工程防龋疫苗的研究。现在,国外几家实验室已经通过基因克隆技术,获得了约 30 种致龋基因片段。其中,较为重要的有编码变形链球菌 GTF 的 gtf 基因;编码变形链球菌表面蛋白抗原的 SpaA、SpaPl 基因等。这些基因片段的克隆成功,不仅为进一步从分子结构上研究致龋菌的致病特性打下了基础,而且为利用基因工程生产防龋疫苗作好了必要准备。Curtisse 等人将 SpaA 重组质粒表达于鼠伤寒沙门菌中,用该菌系免疫小鼠后,该菌在鼠内脏中获得了持久性定居能力,并不断刺激机体在体液(包括唾液)中产生了 IgA 防龋抗体。这种高特异性基因工程疫苗诱导产生的高效抗体,有效地抑制了变形链球菌对牙面的粘附,而对心肌组织无交叉反应。

口腔分子生物学的应用,将为人类提供高纯度的防龋疫苗,且这类基因工程疫苗可望成为今后防龋的有效制剂。

三、颌面部发育的基因调控

传统口腔修复材料与人体组织在物理性质、化学结构、生物相容性等方面都还存在着差异。在一些口腔硬组织疾病的病因未完全明了以前,新型生物活性材料的出现是临床口腔医学对这些疾病的诊治水平取得突破的首要条件。而对颌面部发育调控基因的逐步认识,为研制新型生物活性口腔修复材料作好了理论准备。

现在,通过分子生物学理论和技术,已逐步了解到控制颌面部发育的结构基因和调节基因,尤其是与牙体组织发育相关的基因,如牙釉质蛋白相关基因、牙本质磷酸蛋白基因等。假

如这些基因被分离克隆及表达成功,那么,临床口腔医师将利用盼望已久的,与正常口腔组织在生物、物理、化学特性等方面完全一致的基因工程材料,为患者解除病痛。

四、口腔微生物种型鉴定

牙周组织疾病是影响人类口腔健康的另一大类疾病,其病原微生物致病学说已得到公认。近年来了解到,牙周疾病的发展有一个缓解——活跃——缓解的周期性变化过程,而只有活跃期牙周病才具有临床治疗意义。但是,如何判定牙周疾病的活跃期,一直是临床牙周病学界关注的问题。比较成功的传统方法是进行牙周微生物的厌氧分离培养,并且已经确立了一些微生物如放线共生放线杆菌、牙龈卟啉单胞菌及中间普氏菌等的数量与牙周病的活跃期密切相关。由于牙周病的相关菌主要为厌氧菌,从临床取标本进行厌氧分离培养的影响因素又多,因此,采用常规的分离、培养,鉴定较为困难。

近年来较多学者对制备特异、敏感的核酸探针作了有益的尝试。DNA 探针的应用结果表明,放线共生放线杆菌、牙龈卟啉单胞菌、中间普氏菌等菌群的检出量超过 10^5 就极有可能是牙周病的活跃期。与细菌培养对照研究发现,DNA 探针的灵敏度、临床病情吻合度优于细菌分离培养,且特异、快速。因此,DNA 探针已经开始试用于口腔临床。

五、口腔粘膜病病因子的认识与修正

口腔分子生物学有助于确立或修正对口腔疾病病因子的认识,最成功的实例当属口腔粘膜毛状白斑(oral hairy leukoplakia, OHL)病因的确定与修正。1984 年 Greenspan 在研究艾滋病患者的口腔表征时,发现了一种新的疾病。这种病损出现在舌侧缘,呈白色,表面为绒毛样,因不能用以往已认识的任何疾病加以诊断,他将其命名为 OHL。电镜病理观察发现,OHL 病损组织中有较典型的病毒感染征象,电镜观察又发现有大量的病毒颗粒,免疫组织化学染色显示 70% 以上标本中人类乳头状瘤病毒(HPV)抗原阳性,因此,初期认为 OHL 的病因是 HPV。但进一步用对 HPV 特异的 DNA 探针进行 Southern 印迹杂交及组织切片原位杂交,均未找到 HPV 存在的证据,而免疫荧光却发现 EB 病毒衣壳抗原的阳性反应,进一步采用对 EB 病毒特异的 pBg12U DNA 探针进行 Southern 杂交及组织原位杂交,均显示了 EB 病毒存在的证据,从而修正了认识,使 EB 病毒是 OHL 病因子的学说得以公认。

六、口腔癌的早期诊断与治疗

新近的调查结果表明,每年美国有 40 000 人、其他国家有 350 000 人患有口腔肿瘤。在普通人群中,口腔癌在最常见的癌症中居第 6 位,在发展中国家居第三位。约半数的患者将于诊断后 5 年内死亡,而存活的患者将出现美学及功能的缺陷。应用分子生物学技术于口腔癌的早期检测和(或)治疗,对较大地降低其死亡率和发生率都具有重要作用。

现已发现,口腔肿瘤的引发和进展可能与原癌基因突变并获得功能有关。原癌基因的产物大多为具有生长调控作用的蛋白类物质,可干预细胞生长信号调节途径中的某个环节。并且原癌基因在一定条件下可被激活,激活后的原癌基因成为细胞癌基因,其异常表达可导致细胞增殖、生长和分化的失控,进而形成肿瘤。其中原癌基因上皮生长因子受体(EGFR)/c-erb B1, ras 基因家族成员被认为与口腔上皮癌的发生具有密切关系;此外, c-myc, cint-2, hst-1, PRAD-1 和 bcl-1 的非正常表达也被认为在口腔癌的发展中起了很大的作用。已报道在

DMBA 诱导的金黄地鼠颊囊恶性口腔癌模型中,有细胞癌基因 $c-erb B1$ 的过度表达和扩增。也有作者发现转化生长因子 α ($TGF-\alpha$) 在人类口腔癌和金黄地鼠口腔肿瘤中的表达异常,并认为 $TGF-\alpha$ 促进了新的血管化和有丝分裂。

除上述癌基因外,与口腔癌发展有关的癌基因还有: $hst-1$, $int-2$, $bcl-1$, sea , $men-1$, $ems-1$ 。

研究发现,仅有癌基因的激活还不足以引起口腔癌,但癌基因是该过程的重要引发因素。在癌前细胞向恶性细胞转化的过程中,关键的环节是细胞负性调节因子,即肿瘤抑制基因的失活。肿瘤抑制基因是正常细胞基因组的组成部分,具有与原癌基因相拮抗的作用,能抑制肿瘤的形成和生长,故又称为抑癌基因。现已分离鉴定出 12 种以上的抑癌基因,抑癌基因可出现缺失、突变而失活,失去其负向调节细胞生长分化的能力。正是由于对细胞生长的正负调节机制失去平衡,才造成了细胞的无限增殖和生长,使口腔角质细胞的恶性转化,即肿瘤抑制基因功能的丧失这一重要事件难于完成。这可部分解释成年人实体性肿瘤如口腔癌的形成所需的时间较长。到目前为止,只发现少数基因如 $p53$, $doc-1$ 和凝血酶反应素 1 在恶性口腔角质细胞中表现出肿瘤抑制基因的活性。

七、口腔疾病的基因治疗

基因治疗即将正常基因片段插入细胞或有机体,从而修正遗传性缺陷。

对一些遗传性口腔疾病以及非遗传性口腔疾病的分子机制的认识,已为试用基因治疗作了一定的准备。因牛、鼠的牙釉质基因体外克隆已成功,以此作为探针已在人染色体上定位了人牙釉质基因,若人牙釉质基因克隆成功,将为牙釉质发育不全症患者带来希望。牙釉质发育不全症是由于造釉蛋白发育不全而导致的牙体缺陷性疾病,表现为牙釉质缺损或根本没有牙釉质覆盖。在美国,约 14 000 人中就有 1 名牙釉质发育不全症患者。该症目前尚无满意的治疗方法,基因疗法可能是从根本上有效治疗该症的手段。

对调控牙体组织疾病发生基因的研究,亦有利于人为改造牙体外形,增强牙体组织的抗龋能力。在牙体组织表面有龋病较强的好发部位,因为在牙体表面存在一些天然发育缺陷区域,为致龋菌提供了栖身的场所。假如认识了牙体发育的基因调控程序,并从分子水平加以修饰,消除这些发育缺陷区,龋病的防治则可望取得重大突破。

第三节 我国口腔分子生物学的发展

近年来,随着口腔分子生物学的兴起与发展,大量的分子生物学手段亦被我国科学家广泛应用于口腔疾病的病因、发病机制、临床诊断、预后转归与预防等研究中。这些手段和技术的应用极大地推动了我国口腔医学事业的发展。使我们对有些口腔疾病,特别是对部分常见病、多发病的认识提高到一个全新的高度。

一、原癌基因与头颈部肿瘤

目前我国对原癌基因与头颈部肿瘤关系的研究多为 ras 癌基因家族、 myc 癌基因家族和 $erb B$ 癌基因。

有学者应用 DNA 斑点杂交技术,检测 21 例口腔鳞癌中 $c-H-ras$ 基因,发现无扩增现象,