

sis

CYTOPLASM

INTERNAL
MEMBRANES

NUCLEUS

erb-A

mos

mil

myb

myc

fos

ski

B-lym

src

yes

ras

fps

abl

fms

erb-B

val val val gly ala
 T GTG GTG GTG GGC GCT
 eu val val val gly ala
 TT GTG GTG GTG GGC GCT

gly
 GGA
 glu
 GAA

gly val gly lys ser ala leu
 GGC GTG GGA AAG AGT GCC CTG
 gly val gly lys ser ala leu
 GGC GTG GGA AAG AGT GCC CTG

肿瘤 分子生物学 基础

邱政夫 李士谔 何开玲 主编

人民卫生出版社

R.30.
1/1

80704

肿瘤分子生物学基础

邱政夫
李士诤 主 编
何开玲

C0108342



人 民 卫 生 出 版 社

肿瘤分子生物学基础

邱政夫 李士谔 何开玲 主编

人民卫生出版社出版

(北京市崇文区天坛西里10号)

北京卫新综合印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行

850×1168毫米32开本 12 $\frac{1}{4}$ 印张 320千字

1989年5月第1版 1989年5月第1版第1次印刷

印数: 00,001—1,730

220/620

前 言

肿瘤是一类严重危害人体健康的疾病。目前对于肿瘤的病因和发病机制还不清楚，因而影响到肿瘤的诊断、治疗和预防。肿瘤的本质是细胞异常增殖和异常分化的问题。近年来由于基因工程和单克隆抗体技术的发展，对细胞增殖和分化的分子机制有了较深入的了解，因而有可能从分子水平探讨细胞癌变原理。近几年来在癌基因研究方面的突破使人们对肿瘤的认识前进了一大步，相信在不远的将来会有更大的突破，最终达到控制肿瘤发生和发展的目的。

现今在肿瘤分子生物学研究方面已积累了不少资料，将这些资料编辑成册，供肿瘤工作者及医学院校教学参考，这可能对我国肿瘤研究起到一定的推动作用。由于这方面的发展很快，在本书编写和出版过程中不断出现新的内容，因而本书命名为《肿瘤分子生物学基础》，以便在再版时将新的内容补充进去。

本书内容分为专题论述及实验技术两部分，有目的地将理论部分和实验部分结合在一起，使读者能通过实验技术来实现需要解决的问题。在专题论述部分，主要讨论正常细胞及肿瘤细胞的分化，肿瘤基因表型的变化特点，并从基因结构、染色质结构和染色质蛋白水平了解基因表达及其调控以及癌基因等问题。在这部分的最后一章专门讨论基因工程和细胞融合及单克隆抗体等技术。在实验部分的方法学大多是编者之一美国弗蒙特大学医学院生物化学系邱政夫教授实验室的经验，切实可靠，可供从事肿瘤分子生物学的科学工作者采用。

邱政夫 李士诤 何开玲

目 录

理 论 部 分

第一章 细胞的分化

一、细胞分化的概念	(1)
二、细胞分化的特征	(2)
(一) 遗传性	(2)
(二) 繁殖性	(3)
(三) 组织特异性	(3)
(四) 反分化	(3)
(五) 组织功能特异化	(4)
(六) 分化与适应的比较	(4)
三、影响细胞分化的环境因素	(4)
(一) 纤维母细胞生长因子	(7)
(二) 神经生长因子	(7)
(三) 上皮细胞生长因子	(8)
(四) 血小板来源的生长因子	(9)
四、细胞分化的分子机制	(10)
(一) 分化细胞核的全能性	(11)
(二) 动物器官的再生	(11)
(三) 细胞核移植实验	(12)
(四) DNA与RNA杂交实验	(12)
五、细胞分化中基因表达的调控	(13)
(一) 以基因表达为基础的细胞分化假说	(13)
(二) 细胞分化中基因调控的实例	(15)
(三) 正常分化的范例	(19)

第二章 真核细胞基因的调控

一、基因结构的调控	(27)
(一) 基因的丢失	(27)
(二) 基因的修饰	(27)
(三) 基因的扩增和重排	(28)
二、转录水平的调控	(28)
(一) 启动子	(29)
(二) 增强子	(30)
(三) 转录的起始	(31)
(四) 转录的终止	(32)
三、转录后水平的调控	(33)
(一) 戴帽和甲基化	(33)
(二) PolyA尾巴的添加	(34)
(三) RNA 的剪接	(35)
(四) 核和细胞浆间 RNA 的运输	(37)
(五) mRNA 在细胞浆内的稳定性	(38)
四、翻译水平的调控	(38)
(一) 翻译的起始调节	(39)
(二) mRNA 翻译的特异性	(40)
(三) 翻译的起始因子	(41)
五、翻译后水平的调控	(42)

第三章 甾体激素对基因表达的调节

一、甾体激素对靶细胞的作用	(45)
(一) 甾体激素的血浆结合蛋白	(47)
(二) 甾体激素进入细胞	(48)
(三) 甾体激素与受体间的作用	(49)
二、甾体激素对某些特异基因表达的调控	(53)
(一) 雌激素对基因表达的作用	(53)
(二) 糖皮质激素对基因表达的调控	(56)
三、甾体激素-受体复合物与DNA之间的作用模型	(59)

第四章 癌细胞基因表达的改变

一、癌是基因疾病	(64)
----------------	------

(一) 基因突变·····	(64)
(二) 基因调控异常·····	(65)
二、分化与反分化·····	(65)
三、癌细胞的再分化·····	(66)
四、癌细胞基因调控异常的分子机制·····	(70)
(一) 癌变过程中基因转录的改变·····	(71)
(二) 癌细胞基因转录后调控的改变·····	(73)
(三) 癌细胞的翻译调控·····	(74)
五、基因表达的调控与癌变原理·····	(75)

第五章 肿瘤基因表型改变的例证

一、肿瘤酶与同工酶活性变化的特点·····	(81)
(一) 酶与代谢的不平衡·····	(81)
(二) 胚胎型酶与同工酶的基因表达·····	(86)
(三) 异位性同工酶的基因表达·····	(92)
(四) 肿瘤组织特异酶·····	(93)
(五) 肿瘤细胞膜上的酶及蛋白质的改变·····	(93)
二、肿瘤酶与同工酶变化的机制·····	(94)
(一) 抑制物或激活物的产生·····	(95)
(二) 酶的合成与降解·····	(95)
(三) 转录水平的调控·····	(96)
(四) 翻译水平的调控·····	(97)
(五) 基因扩增调节·····	(97)
三、肿瘤酶与同工酶的临床应用·····	(98)
四、肿瘤胚胎抗原的基因表达和临床应用·····	(99)
(一) 甲胎蛋白·····	(99)
(二) 癌胚抗原·····	(101)

第六章 癌基因

一、肿瘤病毒及癌基因·····	(103)
(一) src 基因家族·····	(106)
(二) ras 基因家族·····	(107)
(三) myc 基因家族·····	(107)

(四) myb 基因家族	(108)
(五) sis 基因	(109)
(六) Blym、fos、ski 基因	(109)
二、细胞癌基因	(109)
三、细胞癌基因的致癌作用	(112)
(一) DNA 转化实验	(113)
(二) 人类癌基因的鉴定	(113)
四、原癌基因活化的机制	(119)
(一) 肿瘤病毒插入细胞基因	(119)
(二) 基因突变	(121)
(三) 基因的易位	(121)
(四) 基因扩增	(123)
五、癌基因产物的功能以及对基因表型的影响	(123)
(一) 与酪氨酸蛋白激酶有关的转化蛋白	(124)
(二) P21	(125)
(三) myc 基因的表达及其调控	(126)

第七章 染色质的组成成分

一、脱氧核糖核酸	(129)
(一) DNA 的高级结构	(130)
(二) DNA 顺序的类别	(130)
(三) 真核细胞的基因组	(132)
二、染色质蛋白质	(133)
(一) 组蛋白	(134)
(二) 非组蛋白	(142)
(三) 磷酸化非组蛋白	(147)
(四) HMG 非组蛋白	(152)

第八章 染色质的结构与功能

一、染色质的基本结构单位——核小体	(160)
(一) 核小体的结构概况	(160)
(二) 核小体的 DNA 长度	(161)
(三) 核心颗粒的形状	(163)

(四) 核心颗粒中组蛋白的排列·····	(164)
(五) 组蛋白H ₁ 的位置·····	(164)
二、染色质的二级结构——螺旋筒·····	(166)
三、染色质的三级结构——套圈的形成·····	(168)
四、组蛋白修饰对染色质结构的影响·····	(171)
五、常染色质与异染色质·····	(172)
六、染色质的转录活性·····	(173)
(一) 核酸酶消化·····	(173)
(二) 染色质DNase I超敏感区·····	(176)
(三) 活性染色质的组蛋白及其修饰·····	(178)
(四) 活性染色质非组蛋白·····	(179)
(五) 活性染色质与基因的甲基化·····	(183)
(六) 转录活性染色质的分级分离·····	(184)
七、活性染色质的体外转录·····	(186)
第九章 癌细胞核的异常	
一、癌细胞核的形态异常·····	(191)
二、癌细胞的染色体·····	(192)
三、癌细胞的特异核蛋白·····	(194)
四、细胞癌变过程中核非组蛋白的变化·····	(196)
五、癌细胞核非组蛋白磷酸化及DNA转录的变化·····	(199)
六、致癌物导致细胞染色质结构的改变·····	(200)
(一) DNA的修饰与核小体结构的改变·····	(200)
(二) 染色质结构的变化·····	(201)
第十章 肿瘤特异染色质组分及染色质结构的免疫学 研究	
一、染色质组分的组织和种属特异性·····	(205)
二、分化组织中的特异抗原·····	(206)
三、肿瘤特异核抗原·····	(207)
四、化学致癌过程中肿瘤特异核抗原的出现·····	(209)
五、直肠肿瘤特异核抗原的某些特征·····	(210)

六、测定核抗原的免疫学方法	(211)
(一) 微量补体结合试验	(211)
(二) 放射免疫测定	(211)
(三) 酶联免疫测定 (Elisa)	(211)
(四) 免疫学定位	(212)
(五) 特异抗体的制备	(212)

第十一章 分子及细胞生物学新技术在肿瘤研究中的

应用

一、DNA 分子克隆	(214)
(一) 分子克隆必需的酶	(214)
(二) 载体	(218)
(三) 宿主	(222)
(四) 基因库的建造	(223)
(五) cDNA 库的建造	(224)
(六) 含有特异基因质粒克隆的筛选	(226)
(七) 应用	(227)
二、细胞融合	(232)
(一) 细胞杂交和再造	(232)
(二) 杂交细胞的筛选	(234)
(三) 杂交细胞中基因表达的模式	(235)
(四) 应用	(235)
三、杂交细胞瘤——单克隆抗体的制备和应用	(236)
(一) 单克隆抗体的制备	(236)
(二) 单克隆抗体的特性	(238)
(三) 应用	(240)

实 验 部 分

第一章 体外转录与翻译的测定

实验一 体外转录	(243)
(一) 细胞核的分离	(243)
(二) 体外RNA的合成 (转录作用)	(244)
(三) 特异RNA的杂交法测定	(250)

实验二 特异信息核糖核酸的研究方法	(251)
(一) 游离型多聚核糖核蛋白体的分离	(251)
(二) 多聚核糖核蛋白体的免疫沉淀	(252)
(三) 几种提取 RNA 的方法	(254)
(四) 寡胸腺嘧啶纤维素层析柱纯化信息 RNA	(258)
(五) 信息 RNA 的分部分离	(259)
(六) mRNA 的鉴定	(262)
实验三 体外 mRNA 的翻译	(262)
(一) 麦胚无细胞蛋白质合成系统	(264)
(二) 兔网织红细胞裂解液系统	(267)
(三) 翻译反应中特定产物的鉴定	(269)
实验四 DNA 和 RNA 的体外放射性同位素标记	(271)
(一) 双链 DNA 的缺口翻译标记法	(272)
(二) 互补于 RNA 的放射性单链 DNA (cDNA) 的合成	(273)
(三) ^{32}P 末端标记的单链 DNA 的制备	(275)
(四) DNA 或 RNA 的放射性碘标记	(276)
(五) 从克隆 DNA 中制备单链 ^{32}P 标记的互补 DNA	(277)
实验五 核酸杂交反应	(279)
(一) 放射性探针的制备	(280)
(二) ^{32}P 或 ^3H 标记的 cDNA 与 RNA 的液相杂交	(280)
(三) 固相化 cDNA/RNA 杂交反应——斑点印迹法	(282)
(四) 细胞浆的斑点印迹杂交法	(285)
(五) DNA-DNA 的再聚反应	(286)

第二章 基因工程

实验六 分子克隆	(289)
(一) 以限制性内切酶切割 DNA 片段	(289)
(二) 以 T_4 DNA 连接酶连接 DNA 片段	(291)
(三) S_1 核酸酶裂解 DNA 单链末端及切开双链 DNA 发夹圈	(293)
(四) DNA 末端加上核苷酸同聚物	(294)
(五) cDNA 的合成及克隆	(297)
(六) 重组 DNA 转化大肠杆菌	(310)
实验七 DNA 序列测定	(329)

(一) Maxam-Gilbert 法	(334)
(二) Sanger 链终止法	(343)
第三章 免疫鉴定	
实验八 肿瘤抗原的免疫	(352)
(一) 肿瘤染色质抗原的提取及分部分离	(352)
(二) 染色质抗体的制备	(356)
(三) 常规免疫法	(357)
(四) IgG 的纯化	(358)
(五) 杂交细胞瘤制备单克隆抗体	(361)
实验九 肿瘤特异抗原的免疫学测定	(365)
(一) 补体结合试验	(365)
(二) 琼脂双扩散试验	(368)
(三) 火箭电泳	(369)
(四) 放射免疫测定	(369)
(五) 荧光及酶标抗体的制备	(371)
(六) 核抗原的微量酶联免疫测定法 (Elisa)	(376)
(七) 免疫酶标定位	(377)
(八) 免疫印迹定位技术	(378)

理 论 部 分

第一章 细胞的分化

肿瘤是由有分裂能力的细胞衍生而来的。在细胞分裂和自我更新的基础上，组织的绝大部分细胞均能分化成具有该组织特异功能的细胞。例如脑内的神经元控制思想及行为；肝细胞合成血浆蛋白（如血白蛋白等）以及解毒酶以清除血液中的有毒物质；胰细胞制造胰岛素来调节血液中的葡萄糖以及合成一些消化系统必需的酶（如核酸酶、蛋白酶等）；肾细胞具有透析、分泌及重吸收一些物质并将有毒物质从尿液排出的功能；再如多形核白细胞(polymorphonuclear white blood cells)可吞噬及消灭细菌等等。在致癌物作用下，细胞逐渐失去终极分化並重新获得细胞增殖的能力，导致细胞癌变。在癌变过程中，本来关闭或活性很低的增殖基因被激活；相反，控制细胞分化的基因却不表达或只部分表达，甚至出现异位性基因表达。因此有人认为肿瘤是异常分化问题。基于上述考虑，有必要首先对正常细胞分化的机制有所了解。

一、细胞分化的概念

分化一词来自拉丁语动词“differe”，该词具有可区分的、可分开的意思，由拉丁的differe演变成英文的“to differentiate”及“differentiation”。细胞分化 (cell differentiation) 一词在1956年国际细胞分化讨论会议上第一次使用。当时用分化说明动植物在组织发生及器官发生过程中所产生的细胞表型及基因表达的改变。

细胞分化不只发生在多细胞生物体内，也发生在单细胞体内。如在不同环境下，单细胞对环境的反应，引起不同基因表达

调控的改变，以致单细胞表型及活动发生改变。

分化发生在整个生长过程，即在由单一的受精卵演化成具有不同功能及多细胞组织和器官的不同发展过程中，至少可见到两个现象：其一是由单一细胞发展到多细胞表型上的表达，即细胞分化；另一是由各种不同表型及功能的细胞聚合成为一个组织或器官，即组织形成。

分化细胞合成其特异的蛋白质，例如红细胞合成血红蛋白，肌细胞合成肌动蛋白及肌球蛋白，而其他细胞则不合成。有些蛋白质不但只在特异的细胞内合成，有时还只在特定的分化阶段才能合成，例如在红细胞中至少合成五种不同的血红蛋白单链，即 α 、 β 、 γ 、 δ 及 ϵ 链。在任何时候，红细胞只合成两种不同的血红蛋白单链，再由四条单链（各两条不同的单链）聚合成血红蛋白。在胚胎时期，红细胞只合成 α 及 ϵ 单链，由两条 α 链及两条 ϵ 链聚合成胚胎型血红蛋白（ $\alpha_2\epsilon_2$ ）。在胎儿期， ϵ 链的合成停止， γ 链开始合成，同时 α 链仍继续合成，于是两条 α 链及两条 γ 链聚合成胎儿型血红蛋白（ $\alpha_2\gamma_2$ ）。在胎儿晚期， β 链及 δ 链开始合成，代替了 γ 链的合成，但 α 链仍继续合成，所以晚期胎儿红细胞合成的是 $\alpha_2\beta_2$ （主要的）及 $\alpha_2\delta_2$ （少量）血红蛋白。胎儿出生后到成年期， $\alpha_2\beta_2$ 血红蛋白的数量逐渐增加，而 $\alpha_2\delta_2$ 血红蛋白渐渐减少。这个例子清楚地说明，细胞在分化成长过程中，由于基因表达的调控，不同分化阶段合成不同的蛋白质。此外，在分化过程中出现许多同工酶，当正常细胞发生癌变时，同工酶的表达也发生改变。有关同工酶变化的内容将在第五章详细讨论。

二、细胞分化的特征

前已提及，细胞分化主要是由于不同基因的表达，合成不同的蛋白质，从而影响细胞的形态及功能。在细胞分化过程中，只有表型（phenotype）的不同，而无基因型（genotype）的改变。根据这一特点，不难理解分化细胞具有以下特征：

（一）遗传性

特定分化的细胞在同一组织或器官，乃至在组织培养中，如果环境条件没有改变，它们会继续增殖成为相似的细胞。

（二）繁殖性

分化细胞常可增殖成为更多的相似细胞，但增殖活性常常会因分化程度的增加而减少。例如末期分化的红细胞不再增殖。细胞分化并非限于早期生长过程，成年后，有些细胞仍继续增殖及分化。例如，成年动物能继续产生红细胞、白细胞等，这些细胞由一群称为干细胞的未分化细胞在组织内不断增殖及分化而成。

（三）组织特异性

分化细胞增殖为同种的子细胞，例如肝细胞增殖肝细胞，肾细胞增殖肾细胞，但是肝细胞不增殖肾细胞，其原因不在于环境的影响，即使在相同环境下（如相同组织培养液），细胞仍增殖其同种的相似子细胞。不同种分化细胞的大小、形状、细胞核与细胞浆的比例等，都有很大的差异。

同种动物的不同组织或器官的细胞，差异很大，但不同种动物的相同组织或器官的细胞，差异却不明显。例如，脊椎动物与无脊椎动物的肌细胞很相似，如果把它们在培养液中培养，这两种肌细胞会聚合在一起，而同种动物的不同组织及器官的细胞则否。

必须强调，即使最简单的组织和器官都是由数种细胞组合而成的机能单位，整个人体中至少有百种以上不同的细胞，这些细胞均是由单一的细胞或受精卵增殖分化而成的。

（四）反分化

有些组织（并非所有组织）受到损伤时，常出现反分化现象。这一过程与正常分化的方向相反。由于反分化，细胞增殖力增加，分化程度降低，因而产生一群低分化或未分化的细胞，叫胚细胞瘤（blastoma）。在损伤复原过程中，胚细胞瘤可再分化生成新的原来组织。以反分化及再分化使组织再生的现象，提示细胞分化是表型的改变，而不是基因型的改变。但是必须指出，胚细胞瘤是否真的由分化细胞反分化形成的低分化增殖细胞？或者只是

由极少量早就存在于组织内的低分化细胞增殖而成？目前仍在争论中。

（五）组织功能特异化

细胞分化不一定是由简单的细胞变成较复杂的细胞，例如红细胞及晶状体纤维在分化时失去细胞核，线粒体也被降解，它们通过分化过程，反而简化了细胞内容。细胞分化常使功能特异化，如红细胞、肌细胞及神经细胞在分化后开始对刺激有所反应，而分化前的早期胚胎细胞均没有这些功能。

（六）分化与适应的比较

细胞分化及“适应”最大的不同在于，适应作用的改变很容易回复成原来的细胞，而分化了的细胞则无这种可能。例如一些有光合作用的细菌（如*Rhodospseudomonas spheroides*）可以在有光及无光的环境下生活。在无光（黑暗）的环境下进行需氧代谢；在有光的环境下则进行厌氧代谢。其他如担负光合作用的主要色素构造细胞（*chromatophore*），也发生相应的改变。高级动物细胞也有适应环境的现象。例如肌细胞，一般以需氧代谢方式将葡萄糖分解成二氧化碳和水，但在剧烈运动条件下，供氧不足，则改为无氧代谢，将葡萄糖分解为乳酸。适应现象是由于细胞内酶系随环境发生相应变化，从而使代谢途径发生改变。这一现象或多或少地存在于各种细胞。适应现象也不是在短时间内可以完全改变的，需要产生新的酶系取代旧的酶系后才能实现。虽然适应作用改变了细胞的基因表达和表型，但它可以回复到原先细胞的状态，而分化作用则不可能逆转。例如，肝细胞无法回复到卵细胞；成熟的红细胞也无法回复到前身细胞。换言之，分化作用是改变细胞构造和功能的永久性不可逆的作用。

三、影响细胞分化的环境因素

影响细胞分化的环境因素包括：①位置效应，即细胞所在的位置与其他细胞群的关系；②与周围组织及间质细胞的相互影响；③细胞与细胞的直接接触；④周围环境中氧、营养及离子浓

度；以及⑤特异生长及分化因子。

在胚胎成长及组织形成过程中，细胞的成长取决于细胞所在的位置及其周围细胞所分泌的物质。例如海胆在原肠形成期(gastrulation)，间质上皮细胞与外胚细胞的相互作用对原始肠道形成甚为重要。另外，间质与上皮成分的相互作用对于形成胰腺、唾液腺、肺、肾、甲状腺、乳腺、脑下垂体及肝等器官也有很大影响。细胞与细胞间的信息传递，可由直接接触方式，或经其中一种细胞分泌的激素或生长因子作用于局部来实现。在器官及组织形成过程中，相同结构和功能的细胞会附着在一起。例如，在培养液内将胚胎细胞一一分离后，同一器官的细胞很快又聚合在一起，却不与其他器官的细胞附着一起。这种器官性的相互作用，可能由于在细胞表面存在细胞特异的识别位点，这种识别位点可能取决于细胞表面的糖蛋白。利用这些特异的局部结合点，使得细胞与细胞间形成连接的复合体(junctional complex)或桥立体(一种可以把细胞与细胞串联起来的结构)。细胞间的结合点可以帮助细胞定位(尖端的及基础的)，也可以传递细胞间的信息(化学传递及电传递)。这种细胞与细胞间的联合，对于组织的形成有非常重要的作用，例如原始的肠就是由细胞与细胞联成的一个单层细胞管腔。

局部的营养及离子浓度对细胞分化有很大影响。Hennings等发现钙离子对小鼠上皮细胞的增殖和分化有很明显的影响，如果培养液中钙离子的浓度很低($0.05 \sim 1 \text{ mmol/L}$)，则表皮细胞增殖的速度很快，但不能分化成复层上皮(stratified epidermis)，在这种情况下，不形成桥立体，细胞与细胞间也没有联系。若钙离子的浓度增加到 1.2 mmol/L ，桥立体开始形成，细胞间也有了联系，在3~4天内发生分化。钙离子也是肌肉组织分化的必需因子，它可使鸡肌母细胞(一种未分化的肌细胞)分化及融合成肌小管(myotube)。目前对钙离子调节细胞分化的分子机制还不太明了，很可能是通过细胞内的钙调蛋白(Calmodulin)来实现的。钙-钙调蛋白的复合物能活化多种酶系，包括蛋白激酶及腺苷