

生物科学参考资料



第二十三集

Q-53
KXC

科学出版社

生物科学参考资料

第二十三集

科学出版社

1987

内 容 简 介

本专辑着重介绍医学遗传学中最活跃和富有成果的进展。除“基因治疗”一文外,有 8 篇文章选译自 1983 年 10 月在北京召开的中美第一次人类遗传学研讨会的论文集。此外又选译了有关癌基因、染色体重排和有关限制性酶切片段长度多态性的两篇综述。可供生物学、医学和遗传学工作者参考。

生物科学参考资料

第二十三集

责任编辑 刘安

学 苑 出 版

北京朝内大街 137 号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1987 年 12 月第 一 版 开本: 787×1092 1/16

1987 年 12 月第一次印刷 印张: 7 1/4

印数: 0001—1,700 字数: 162,000

ISBN-7-03-000092-7/Q·17

统一书号: 13031·3945

定 价: 1.80 元

目 录

基因治疗.....	1
对人类遗传性疾患的重组 DNA 研究：用基因分析法对经典的苯酮尿症进行 产前诊断和携带者检测.....	11
对人类药物遗传疾患的重组 DNA 研究.....	22
转化基因和癌.....	35
遗传性代谢疾患研究与基本生物学过程阐明的关系.....	42
21-三体的动物模型 (Down 氏综合征)	52
产前诊断的新进展.....	56
与异常 DNA 修复有关的疾病.....	70
人类基因组的重组现象.....	78
染色体、基因和肿瘤：肿瘤中染色体异常的分类	84
应用限制性酶切片段长度多态性建立人类基因连锁图.....	95

基 因 治 疗

吴 昊

在许多发达国家由于卫生与健康水平的不断提高,寿命延长,医疗和预防中的重点已经从传染病、寄生虫病、营养不良等转向威胁新生儿、幼儿、少年和青年健康或生命的遗传性疾病,以及威胁中、老年的严重疾病,如恶性肿瘤、心血管病、糖尿病等。这类疾病的患者众多,已成为许多国家中的主要死亡原因。由于这类疾病大都没有理想的防治手段,因而成为社会和家庭极其沉重的负担。如单基因病大都自出生时即有表现,呈慢性过程,往往需要长期应用特殊饮食或昂贵的天然产物,如凝血因子 VIII 或全血。对于每个有这种患儿的家庭来说都是沉重的经济和心理负担。据世界卫生组织新近的调查,全世界有一亿多人患有像镰形细胞贫血和地中海贫血这类可能致命的遗传性血液病,每年有 20 万左右患儿死于这一组缺陷基因。这一数字并未包括我国的患者,近年来进行的全国性调查证明我国的血红蛋白病在某些省份的患病率相当高。事实上,在我国较发达的大城市如北京,各种先天性疾病已经上升到儿童、少年死亡原因的第一位。广西的一份调查中发现, α -地中海贫血的发病率在新生儿中高达 14.9%。在英国约 1% 的儿童患有严重的单基因缺陷,如囊性纤维化、肌营养不良和血友病等。

对于如此众多的患者,要采取目前国外应用的饮食疗法或天然产品替代疗法,在我国是难以想像的。在人口较少的发达国家(如加拿大、北欧各国),产前诊断已十分普遍,随着早期绒毛的采取和基因探针的不断增加,越来越多的遗传性疾病将在孕早期(2—3 月内)检出,可通过人工流产而大大降低患儿的出生。即使有些国家、地区或集团由于某种原因(如宗教)而反对人工流产,然而他们一旦认识到这类疾病对生命、智力或体力的危害程度及其对家庭和社会带来的后果后,也会放松限制,同意流产的。然而,总会有些家庭不愿流产,宁愿有一个残疾儿童。或由于某种原因发生了误诊、漏诊或错过了流产的时机。因此,可以肯定,在相当长的时期内,任何国家或社会都不可能通过产前诊断结合人工流产消除一切严重的先天性疾病患儿。通过基因治疗来改善或治愈他们的残疾或挽救他们的生命,仍具有十分重要的意义。

在我国,虽然由于政府大力提倡和支持,人工流产已在全国(除少数边远和少数民族地区外)通行无阻。产前诊断在全国各大城市也正逐步开展,但要做到在十亿人口的大国中成为一种普遍享受的医疗保健手段,则仍是遥远的目标。研究和开发基因治疗,解救千万名的患者,仍是摆在我们面前的迫切任务。

何况,基因治疗的潜力并不限于对付各种单基因决定的疾病。还有众多的多基因决定的常见病,由环境因素引起遗传物质改变而产生的疾病,例如恶性肿瘤、动脉硬化、高血压、糖尿病……等,也不是有可能通过有目的地改变患者的基因型而得到治愈。甚至改善人的体力、智力、延长人的寿命,也是基因工程和细胞生物学的显而易见的目标。

既然上述疾病的起因都离不开基因的突变、缺失或异常表达,那么,合乎逻辑的防治办法理应在基因水平上进行。如用正常基因去取代突变基因或补充缺失基因,或直接修补异常基因,或使异常基因关闭,或降低其表达水平(如癌基因)等等。这种治疗一旦成为现实,就必然是一种经济的、“一劳永逸”的办法,因为修补好的或引入的正常基因,不但会长期地转录和翻译出正常的基因产物,矫正疾病,而且会随细胞的增殖而增殖,直到宿主死亡。如果生殖细胞也接受了基因治疗,则连患者的后代也可得到矫正。

但是,早期的实验性试探大都以失败告终。主要问题是缺乏适用的转移基因的方法和转移的外来基因不能在靶细胞内正常表达。1980年美国洛杉矶加州大学的 Martin Cline 在向小鼠骨髓细胞转移耐药基因取得初步结果后,立即对意大利和以色列的两位地中海贫血病人首次进行了基因治疗的尝试。尽管这两位病人既没有因此受益,也没有遭到明显的损害,Cline 却受到了美国国立卫生研究院(NIH)的公开谴责和处分,理由是他违反了美国道德规则(有条例)和有关基因工程的规定^[1]。1982年在冷泉港召开的一次“基因治疗”专题讨论会上,不少人仍对于基因治疗的迫切性、可能性和现实性持怀疑态度^[2]。但在1985年元月22日美国健康和人类服务部NIH出版的联邦记录(Federal Register),发表了人类基因治疗工作小组草拟的“在设计和提出申请进行人类体细胞基因治疗方案时应考虑的要点”,征求公众的评议,同年6月在重组DNA技术公报第8卷第2期上正式公布此“要点”。说明基因治疗研究,在短短五年中取得了突破性的进展,大大超出了人们的预料。美国政府面对现实,及时地开放了基因治疗的部分领域(限于体细胞)。以利这一新生事物的迅速发展成熟。目前已有若干个实验室正式提出申请,估计到1986年即将开始对2—3种遗传病的基因治疗研究。

近年来取得了哪些突破,足以促使美国政府采取上述措施呢?开展基因治疗必须具有几个先决条件:正常基因、运载系统、正常表达和安全保障。

自1977年首次克隆到人体 β 珠蛋白基因以来,分离人体基因技术已日趋完善,在有一定经验和较完善设备的实验室已经近似常规性工作。继珠蛋白、生长激素、胰岛素、干扰素、苯丙氨酸羟化酶等数以百计的结构基因的分离,最近,代谢活化化学致癌物的多环芳香碳氢羟化酶的基因也在NIH和Duke大学的实验室内分离出来(私人通讯),利用这个基因有可能检出某些恶性肿瘤(如肺癌、食管癌等)的易患个体。有助于进行肿瘤的预防工作,尤其是近4年来,在癌基因研究方面的飞速进展,已经分离和鉴定了20多个与肿瘤发生有关的转化顺序(即所谓癌基因),这些癌基因所编码的蛋白质的结构,在细胞中的位置和作用正在被阐明^[3]。基本弄清癌变的分子机理已经不是一个遥远的目标了。

向细胞内导入外源基因的手段也趋于完善化,目前已经建立了近十种不同的方法,大体上可归纳为四大类:(1)利用病毒作为运载系统,如RNA病毒(即逆转病毒)和DNA病毒(如SV40、腺病毒和牛乳头瘤病毒);(2)化学方法,如磷酸钙沉淀的DNA;(3)融合法,用薄膜包裹DNA的小泡去同细胞进行融合,如脂质体、鬼影红细胞和原生质体等;和(4)物理方法,包括显微注射和电导穿入(electroporation)^[4]。

上述不同方法各有其优缺点,适用于不同类型的实验要求,但就其效率来说则差别很大。如利用病毒载入的效率可达到100%,显微注射的转化率也比较高(1—10%),而化学方法则只能达到 10^{-3} — 10^{-7} ,即一千到一千万个细胞中只有一个细胞能稳定整合外源基因。但此法比较安全和简便,早期的许多实验(小鼠)乃至上述Cline所做的人体实验

都是用这种办法进行的(即把骨髓细胞取出,在瓶中进行 DNA 转染,再注回体内)。融合法在基因治疗中亦具有前景。而用改建的 RNA 作为载体导入是目前认为最有前途的方法。改建(包括切去致癌顺序)成的 RNA 病毒(如 MoMLV,一种小鼠白血病毒和 MSV,小鼠肉瘤病毒)颗粒能够传递其运载物,却不能包装成具感染性的完整病毒。在动物实验中已成功地将有功能的耐药基因(neo^r)转入成年小鼠的骨髓^{[5][6]}。但由于 RNA 病毒易变,有可能在体内与内源的“辅助”病毒重组后恢复感染性和致癌性,因此,还需进一步进行改建和通过一系列实验,以确保其安全性。利用病毒运送可通过静脉注射的途径,十分简便易行。具增殖能力的造血干细胞都会接受 RNA 病毒传递的基因。

DNA 病毒 SV 40 虽已被许多实验室应用于基因转移,但因其潜在的致癌性而不易用于临床。目前不少人转而利用重组体乳头瘤病毒作为基因媒介,如牛乳头瘤病毒可在转化细胞中以染色体外多拷贝形式复制^[7];人乳头瘤病毒可作为稳定的附体以每个细胞 50—200 个拷贝而繁殖^[8];此外,牛痘病毒、多瘤病毒等 DNA 病毒也是供择对象。但他们的前景在人类体细胞基因治疗上,似乎都不如 RNA 病毒。

所有上述方法至今只能把外源基因转入靶细胞(插入基因组或以染色体外的遗传物质而存在),不能使外源基因插入特定染色体的某个部位。那么,随机插入靶细胞基因组的外源基因是否能正常表达呢?

1982 年以前,向哺乳类动物引入的外源基因大都没有或只有极低的表达,不能应答生理性的刺激(如激素)。因为引入基因的拷贝数和位置都是随机的,无法加以控制。因此当时认为,要把正常基因引入目的器官基因组的特定部位,使其在正确的地点、时间,以正确的剂量表达,发挥其生理功能,几乎是一个不可逾越的障碍。

然而对早期胚胎的基因治疗方面却取得了不少的进展。近年来,有几个实验室利用显微注射术对受精卵进行基因注入,取得了引人注目的成就。从基因治疗的角度看,这种处理方法只需对一个细胞进行微量注射,如果它同许多国家已经开展的体外受精(试管婴儿)结合起来,可取得治疗的效果。从生命科学的角度看,这一系统还提供了研究生长、分化、发育过程中基因表达的调控的一种理想途径。

开展这方面的工作较早的主要有两组科学家,一组以 Beatrice Mintz 为首, Mintz 是最先利用显微注射、胚胎移植等方法处理早期鼠胚的科学家。1981 年她和同事们把含有人的 β 珠蛋白基因的质粒和单纯性疱疹病毒的胸苷激酶基因注入小鼠受精卵的雄性前核,然后用手术把注射过的受精卵植入假孕小鼠的输卵管内,任其进入子宫发育,至妊娠末期时取出胚鼠,提取 DNA 后,从中可以查出完整的外源(人 β 珠蛋白和病毒 TK 激酶)基因。接着 Mintz 等又以同样方法向 394 个受精卵注入前述质粒,每个受精卵大约 3,000 个拷贝。有 304 个受精卵经受住了显微注射,被移植入假孕的母鼠。这次的实验是待小鼠出生,长到 8—10 周龄时对 62 头存活者切除脾脏,提取 DNA,在 2 头中查出了人 β 珠蛋白基因和单纯性疱疹病毒的 TK 基因。其中一头保有完整的上述两个外来基因,另一头则至少保有部分人珠蛋白基因。从第一头雌鼠产出的 15 头小鼠的脾脏 DNA 中,均未查出注入的人体基因、病毒基因或质粒顺序。说明这头小鼠可能是嵌合体,生殖细胞内基本上没有保留外来基因。第二头是雄鼠,它的 14 头子代小鼠中有 8 头查出了父本中保有的部分人 β 珠蛋白基因。说明人 β 珠蛋白基因已插入染色体,并能按孟德尔方式遗传下去。在前一个实验中,大约 15%(5/33)的晚期胚鼠中保有注入的基因,而在这

一实验中仅有 2 头 (约占 3%, 即 2/62) 成鼠保有外源基因, 其中仅一头能传递给后代。此外, 在晚期胚鼠中平均每个细胞内能找到 3—50 份珠蛋白基因, 3—20 份 TK 基因, 而在后一实验的成鼠中却只能查出一份不完整的人珠蛋白基因。说明外源基因在体内是不稳定的, 易于丢失的。其他实验室用兔 β 珠蛋白基因或 HSV-TK 做的类似实验 (10%, 即 4/41 有体细胞 TK 的表达) 也获得相似的结果^{[9][10]}。观察到重排了的或部分缺失的基因通过生殖细胞传到后代^{[9][11]}。可见, 存在的主要问题是注入受精卵的外源基因是否具有正常功能。在 Mintz 等的第一个实验中, 33 头胚鼠中有 5 头的组织中查出有外源基因的存在, 其中至少有一头查出了 HSV 的 TK。但在第二个实验中却未能查出成鼠中有人珠蛋白或 HSV-TK 的存在。

另一组比较系统的实验是由美国费城宾州大学兽医学院生殖生理实验室的 Brinster 等和华盛顿州西雅图华盛顿大学生化系 Palmiter 等合作进行的。1957 年 Margoshes 和 Vallee 在研究一种同金属镉结合的蛋白质时, 发现了一种小分子量 (6000—7000) 结合金属的蛋白质, 后来命名为金属硫因 (MT)^[12], 其特征为富含半胱氨酸而不含芳香氨基酸或组氨酸, 它可同镉、锌、汞和铜结合, 一般推测这种蛋白质参与锌的代谢和重金属的解毒。大多数脊椎动物组织内含有两种具有不同氨基酸顺序的 MT。小鼠中的这两种 MT 称为 MT-I 和 MT-II。Palmiter 在 1980 年分离并鉴定了小鼠的金属硫因 I 基因 (metallothionein I gene, MT-I), 这是一种所谓的看家基因 (house keeping gene), 在大多数细胞内都表达。更重要的是它可通过其启动子顺序 (位于该基因转录起始点上游 40 至 180 bp 处) 接受许多种环境刺激的调控, 其中包括某些重金属如镉和锌^[13]。他们最初是把单纯疱疹病毒 TK 酶的结构基因 (HSV-TK) 同小鼠 MT-I 基因的启动子/调节顺序连接成一个基因 (称 MK), 重组成质粒 pMK。他们把大约 200 个拷贝 pMK 质粒注入受精卵的雄性前核内, 然后再把受精卵移入假孕小鼠的输卵管内。第一次实验一共给 15 头假孕小鼠做了这种手术, 每头大约移植 16 个注射了的受精卵, 共有 7 头鼠总共娩出 12 头雄鼠和 7 头雌鼠, 其中有一头的肝和肾有 HSV-TK 酶的高水平表达。在这头小鼠的几种不同组织中均能测出同样数量的 pMK DNA 顺序。此外, 在三头并不表达 HSV-TK 酶活性的小鼠中也测出类似数量的 pMK DNA 顺序。在杀死小鼠测定 HSV-TK 酶活性之前 18 小时, 先给小鼠注入 CdSO_4 (2mg/kg), 因该剂量可诱导小鼠肝、肾中 MT-I mRNA 的转录^[14]。他们的几次实验结果加在一起, 是 41 头小鼠中有 4 头表达了 HSV-TK 酶的活性。还有 4 头虽未表达, 但组织内有 pMK DNA 顺序。一头雄鼠和一头雌鼠 (都是有表达的) 的子代中又各有一头表达了 HSV-TK 酶的活性 (肝), 说明引入的 MK 基因已整合到生殖细胞内, 并能遗传给下一代。另有两头含有 pMK 顺序却并未表达 HSV-TK 活性的小鼠的 6 头子代都未能从其肝中发现有 pMK DNA 的顺序。这一实验的意义, 首先在于提供了一种使外来基因能够在异种生物内受控表达的方法。无论在研究胚胎发育的过程中, 基因启用 (commitment) 和基因表达等基本生命现象, 还是利用来矫正某些遗传缺陷方面都有着巨大的潜力。

这组科学家接着把含有小鼠 MT-I 基因的启动子的 DNA 片段同大鼠生长激素的结构基因连接起来, 组成 pMGH 质粒。如上法注入小鼠受精卵的雄前核中, 移入假孕的雌鼠输卵管后, 总共得到 21 头仔鼠, 其中 7 头携有融合基因, 有 6 头长得比同窝小鼠大得多。这些转基因小鼠 (transgenic mice) 中有几头的肝内有极高水平的融合 mRNA, 血

清中有极高水平的生长激素。这些小鼠的饮水中含 5,000 ppm 的 ZnSO_4 (76 mmol/L), 用以刺激大鼠生长激素基因的表达。有些小鼠中的 GH 水平的升高同肝内的高水平 MGH mRNA (可达 3,000 分子/细胞) 相一致, 可同小鼠内源性 MT-I mRNA 的水平相比拟, 差不多是前一实验中 MT-I 和 HSV-TK 融合基因 mRNA 的 100 倍。这很可能是由于 GHmRNA 的稳定性比 TKmRNA 的高所致, 但也不能排除由于不同融合基因构建上的差别而影响转录率和加工效果所致。在某些转基因小鼠中 GH 的水平相当于正常小鼠的 800 倍, 使这些小鼠的体重比它们的同窝的普通小鼠大一倍。这种情况相当于我们临床上见到的巨人症。多数是由于脑下垂体腺瘤引起, 极少数是由于肺癌细胞产生异位生长激素所致。而这些巨型小鼠则是由于缺乏正常的反馈机理及许多大的器官如肝、肾、肠等的 GH 基因也进行表达的缘故。一般认为, GH 的主要功能是刺激肝脏产生 somatomedin, 这是一种类似胰岛素的生长因子, 可以刺激中胚叶组织, 如肌肉、软骨和骨的生长。因此, 有几头转基因小鼠的血中 GH 水平虽然仅略高于正常, 但由于肝脏内 GH 较高, 已足以促进产生足够的 somatomedin 以刺激生长。有一头小鼠虽有 MGH 基因整合和表达, 但生长却未见得到明显促进。

经济上的前景更是前途无量。用上述方法去建立有商业价值的家畜品系, 有可能繁殖出巨型的羊、兔, 获得更多价廉的肉食和皮毛。当然应该首先研究长期高水平 GH 的作用对于肌肉、毛和皮质量的影响。GH 同催乳素是同类的激素。有些动物的 GH 同催乳素的受体结合, 外源的 GH 也可增加奶产量^{[15][16]}。

有的小鼠血清中极高的 GH 水平还提示有可能利用大家畜生产具有重要经济价值的多肽类物质。有一头小鼠血清中的 GH 浓度比目前利用基因工程在细菌或哺乳动物细胞培养物上生产的 GH 浓度高 10—100 倍。这种遗传农业 (genetic farming) 的观念同利用动物生产有用的抗血清是一样的, 只是前者仅需向受精卵内注射一次, 而后者要向动物体内多次注射。而且受精卵的一次注射成功后, 还可以遗传给后代。那些要求特殊共价修饰才能具有活性或稳定性的蛋白质尤其宜用这种方法生产^[17]。

接着, 这两个实验室又把小鼠 MT-I 的启动子或调节区 (MT) 同人生长激素 (hGH) 的结构基因融合为一个基因 (MThGH), 构建成 MThGH 111 和 MThGH 112 两个质粒。把它们注入小鼠受精卵的雄前核, 每卵约 1,000 拷贝。生出的 101 头小鼠中 33 头有 hGH DNA, 其中 23 头的血清中, 有高浓度的人生长激素, 并长得比对照鼠大 18% 到一倍。人生长激素的合成也是用 Cd 或 Zn 诱导的。表达人生长激素的转基因小鼠的血清中, 胰岛素样生长因子 I 的浓度也增高了。垂体的组织学检查表明, 在正常情况下产生生长激素的细胞功能有异常。融合基因在所有检查的组织中都有表达, 但人生长激素 mRNA 对内源性 MT-I mRNA 的比例则在不同组织和不同个体间有差别, 似乎说明外源基因的表达受整合位置和组织环境的影响。

在这一实验中, 显然由于注射技术和受精卵移植等技术的进一步完善, 出生的小鼠头数、基因转移的成功率 (33/101) 和表达率 (70%, 23/33) 都高于以前的实验。在生长率和 MThGH 基因拷贝数之间不存在相关, 因为有几头长得最大的小鼠只有几份拷贝。但 10 头正常大小的转基因小鼠中, 有 7 头拥有的拷贝数少于 3 份。对转基因小鼠血清中 hGH 的放射免疫测定表明: 循环的 hGH 水平自不能测知至 $64 \mu\text{g/ml}$ 。而小鼠 GH 的正常值是 10—100 ng/ml, 所有长得大于对照的转基因小鼠都能显示血清中 hGH 的阳

性反应,但生长率和 hGH 在循环中的水平之间的关系却不是平行的,每毫升血清中只要有不到 100 ng hGH 就能使小鼠接近最大的体重。而有些小鼠血清中虽有中等或高水平 hGH 仍不能使小鼠长得比正常的大。生长率最大的一头转基因小鼠仅整合了 2 拷贝 MThGH 基因/细胞,其循环中的 hGH 水平也仅属中等 (250ng/ml)。表达 MThGH 基因的小鼠在断奶时 (5 周左右),已经稍大于它的同窝小鼠,然后生长加快直到 11—13 周龄,这个期间的生长率是同系正常小鼠的 2—3 倍。这种加速的生长可以同外源的 MThGH 基因一起传递给下一代。在比较一头转基因雄性小鼠子一代的生长速度时,发现从其父本遗传到 MThGH 的小鼠,在出生后 16—23 天之间开始加速生长。但在出生之前 MThGH 就已经表达。如前所述, GH 是通过刺激 IGF-I 的产生而促进生长的,对四头转基因小鼠血样进行一个月的检测 (饮水中含 25 mmol/L ZnSO_4), 结果表明,在这段时期中每头小鼠血清中的 hGH 浓度相对恒定,但各鼠之间则差别甚大, IGF-1 水平大约增高 2—3 倍,而且同循环的 hGH 浓度成反比。

在这项实验中,作者还定量测定了 MThGH 信使 RNA 是否可被 Cd、Zn 等重金属所诱导,他们采用了一种十分灵敏的溶液杂交法^[19],可测出每个细胞少于一个分子的 mRNA。使用的探针是一个 Taq1 片段^[19](相当于外显子 4 和 5 的一部分,共有 272 bp)。他们先把受检小鼠作部分肝切除(可刺激 MT 基因表达),然后又在饮水中加 25 mmol/L ZnSO_4 ,两周后再进行另一次部分肝切除。结果 Zn 处理使 4 头受检转基因小鼠的 MThGH mRNA 量增加了 3—170 倍,说明外来基因似乎同内源的 MT 基因以同样方式受到调控。MThGH mRNA 的诱导造成循环的 hGH 之增加。此外,作者们还研究了 MThGH 基因的组织特异性表达。他们的结果提示,同内源性 MT-I mRNA 相比,不同组织产生 MThGH mRNA 的量是肝>睾丸>心>肺、脾、肠>肾、脑。

从上述实验中我们可以得到许多启发,人的 MThGH 可以同大鼠的 MTrGH 一样地促进小鼠的生长,虽然大鼠 GH 的 191 氨基酸中有 67 个不同于人的^[20]。只要每毫升有不到 100 ng 的人 GH 即可促进小鼠生长,这个浓度仅稍高于小鼠的 GH 水平。说明 mGH 和 hGH 同 mGH 受体结合后都同样地有效。一般认为,当激活肝 GH 受体后,后者又刺激 IGF-I 的合成和分泌,这种含 70 个氨基酸的多肽激素循环到末梢组织而刺激其生长。受检转基因小鼠的 IGF-I 浓度果然提高 2—3 倍。说明后者在生长激素的环链链中的重要作用。巨型小鼠的身体比例正常,并未表现肢端肥大症状,直到出生三周之后,生长方才加快,虽然从胚鼠起 MThGH 已经表达,说明在胎儿和新生儿期的生长是受别的基因所调控的(如胎盘催乳素,即绒毛生长催乳素通过 IGF-II)。小鼠长到 3 个月时,即不再对 hGH 敏感。在用 MThGH 的实验中,约有 70% (23/33) 的转基因小鼠长得比正常同窝小鼠大,似乎比用 MTrGH 实验的结果差些 (6/7)。但这个百分比仍是很高的,而且数据更为可靠些。表达水平同 MT-TK 融合基因的结果类似,但还不能说所有同 MT 融合基因都能得到如此高的表达率。因为作者们同其他实验室合作构建的 MT-人 α 珠蛋白和 MT- β -半乳糖苷酶融合基因却未能很好地表达。而且这 23 头巨型小鼠中外源基因的表达水平的控制仍是一个尚未解决的问题。在不加外源重金属(水中不加 Cd 或 Zn)的情况下,不同小鼠血清中 hGH 的浓度就有 10—64,000 ng/ml 这样大的差别。这种差别可能部分由整合的基因拷贝数目决定,但更重要的大概仍是整合的部位具有决定性的意义。这个实验的结果同整合的病毒基因组的结果类似^[21],却又迥然不同

于 P 成分 (P element) 载体引入果蝇的外源基因, 后者的表达水平不管整合位置如何, 都比较一致^[22] (*Cell* 34:47, 1983)。这种情况也许是由于果蝇和小鼠的基因启用机理不同, 或者是由于 P 成分能够较均一地启动基因表达, 或能抑制邻近染色质的影响。如果在哺乳类动物中也能找到或构建一种像 P 成分那样的转座顺序用于基因转移, 则将是一个不小的突破。在该实验的转基因小鼠中每头小鼠的 MThGH 插入部位都不同。因此, 可用于研究染色质位置对基因表达的影响。

由于正常情况下只有脑垂体产生生长激素, 而在该实验的转基因小鼠中, 则几乎所有组织(胸腺除外)都能产生, 因此, 有些小鼠中的血清 hGH 含量很高。有 4 头小鼠的 hGH 量在未饮含重金属的水之前就平均高达 4,400 ng/ml, 这些小鼠的 MThGH mRNA 在肝内的水平都差不多, 但在其他组织中则差别很大, 这也可能同整合位置有关。如外源基因整合在一个正常情况下仅在肾脏表达的基因附近, 则在肾脏应能测出该基因的高效表达。这种情况同内源癌基因因易位而被激活的情况类似。

作者们还证明 MT 不管它邻接的是大鼠 GH 或人 GH 的结构基因, 还是 HSV 的 TK 基因, 都能像天然的 MT-I 一样, 对重金属 CdSO₄ 或 ZnSO₄ 发生反应, 增加转录率。说明这种转录反应并不取决于 MT 的结构基因顺序或染色体的位置。

作者们还证明转基因小鼠的外源基因和巨大的表型, 可以遵照孟德尔定律传递给后代。并正在繁殖纯合的巨鼠系, 用以研究基因的遗传传递、表达和超量 GH 对各种生理过程的影响。

接着作者们用这种办法对由于基因突变使血清中生长激素水平降低所致侏儒小鼠(相当于人的垂体侏儒症)进行了基因治疗^[23]。把大鼠生长激素基因引入侏儒小鼠基因组内, 得到高水平的表达, 矫正了该小鼠的生长激素缺陷, 并使之在生长发育期迅速长大。然而, 就像前二个实验一样, 基因的表达水平难以控制, 有的侏儒小鼠长成了巨型小鼠, 为正常小鼠的 1.5 倍大小。外源基因的准确调控问题仍是当前基因治疗中一个有待解决的难题。

目前在基因治疗方面取得完美疗效的例子是 Spradling 和 Rubin 在黑腹果蝇身上进行的工作^[24]。野生型的黑腹果蝇是红眼, 由于 X 染色体上的一个基因突变可产生白眼个体。作者们用果蝇的转座顺序 P 成分连接上正常基因, 引入白眼胚胎, 结果成虫的眼睛成为红色。P 成分是果蝇中发现的一种转座子, 它与结构基因连接后, 插入任何一条染色体的任何部位都能使结构基因正常表达, 不受邻近基因或染色质结构的影响。可惜, 在哺乳类动物中尚未能发现这样的转座顺序。

上述实验显示了通过引入外源基因改变细胞和个体表型的成功例证。由于是对受精卵进行了外源基因的注入, 因此, 个体的免疫系统不会把外源基因的产物当作“非己”而排斥。当涉及成人体细胞的基因治疗时, 问题就比较复杂了。但在治疗单基因疾病时, 引入的基因同突变基因的差别极微, 其产物常只有一个氨基酸的差别。引起机体免疫反应的可能性不大。上述实验还说明, 外源基因亦可在天然的特殊组织或器官之外进行表达并发挥其生理效应, 只要接上适当的启动基因/调控顺序。说明在进行基因治疗时, 也许不一定都要把外源基因引入天然的表达器官。对于某先天性缺陷只要基因产物能够进入循环, 即可达到矫治的目的。即使必须引入天然的表达器官, 也不是无法达到的。寻找和改造具有特殊器官亲和力的病毒作为外源基因的运载体, 使其将外源基因特异性地引入靶

器官将不会是不可克服的障碍。困难的是不易做到使外源基因整合到基因组的正确座位,可能会因此而影响表达。但如能在外源基因接上 MT 之外,再接上能抗拒邻近染色质干扰的顺序,即可通过简单的环境因子对插入基因进行表达调控。即便如此,对于体细胞的治疗大概也应在生命的早期进行,尤其当涉及脑细胞时更应如此。已经损伤或坏死的脑细胞是很难恢复正常的。

因此,我们应该把基因治疗的概念扩大到预防性治疗。在这方面最有前途的应该是恶性肿瘤的基因预防和基因治疗。已经知道临床上恶性肿瘤的发生要经历多阶段的改变,其间有若干不同的癌基因被依次激活。这个阶段一般长达数年或数十年。有足够的时间采用调控顺序的引入或基因调控药物的处理,使癌变过程中止或逆转。对于晚期肿瘤,尤其是那些生长旺盛或足以致人于死命的干细胞,在许多性状方面比较接近胚胎细胞。使携带特定 DNA 顺序的病毒选择性地感染这类细胞,干扰和中止其繁殖周期的各种可能性也是存在的。

Brinster 等用他们的老办法把 SV 40 病毒的 T 抗原基因注入小鼠受精卵雄前核,结果拥有 SV 40 T 抗原基因^[25]的小鼠后来发生了脉络丛乳头瘤,并能将此性状遗传下去。另一个引起轰动的实验,是哈佛大学 Philip Leder 的实验室进行的。他们把正常小鼠的 *myc* 基因(一种癌基因)同小鼠乳腺瘤病毒(MTV)的启动基因连接起来,成为一个 MTV/*myc* 融合基因^[26]。用微量注射法注入小鼠受精卵雄前核,再植入假孕雌鼠的输卵管,令其发育和娩出小鼠,这样他们建立了 13 个拥有 MTV/*myc* 融合基因的转基因小鼠系,MTV 的启动基因是受激素调控的(催乳素和糖皮质激素)。有两头最初接受 MTV/*myc* 融合基因的雌鼠在第三次妊娠时都发生了乳腺腺癌。它们的遗传到该基因的子 1 代雌鼠也都在 5—6 月龄,第 2—3 次妊娠时发生了乳腺腺癌。而这种小鼠在过去几年的相同饲养条件下从未发生过一例乳腺腺癌。这是世界上首次建成体内癌基因转移小鼠实验系统后的第一篇报道。已获得的信息是:*myc* 在许多不同组织内的长期无节制的表达并未影响小鼠的生长发育;在二个转基因小鼠系中经 2—3 次妊娠刺激 MTV/*myc* 的高水平表达同自发乳腺腺癌有关;以及单独的 *myc* 基因脱调节(deregulation)大概还不足以引起细胞癌变,因为所有的自发乳腺腺癌都是单个结节状的,并不是十个乳腺的全部腺上皮均匀、同步地发生了癌变。说明还需有别的(癌基因)突变事件参与才能使乳腺上皮恶化。作者们利用这一模型系统研究癌变、早期诊断和防治中许多关键问题,新的报道将会陆续问世。

综上所述,我们可以得出几个简单的结论:

1. 基因治疗中使用的正常基因的分离、拼接、稳定地插入受治疗者的基因组或细胞内,乃至表达均可得到或可望很快得到解决。但要达到准确的可控表达,则仍是一块硬骨头。因此,认为地中海贫血之类的疾病可作为基因治疗首选对象的早期看法未必是正确的。因为正常人的 α 和 β 珠蛋白基因总是严格地以 1:1 的比例产生 α 和 β 珠蛋白分子的。而引入的外源基因是很难做到如此准确表达的。因此,最近已有人认识到,首选的基因治疗病种应该是那些在表达调控上属于“永开放型”的基因缺陷。如引起 Lesch-Nyhan 病(亦称自毁容貌症)的 HPRT(次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸糖苷转移酶)缺乏,引起重症免疫缺陷病的 PNP(嘌呤核苷磷酸化酶)缺乏,以及引起重症联合型免疫缺陷病的 ADA(腺苷脱氨酶)缺乏^[27]。

2. 基因治疗在遗传性疾病中主要考虑用于隐性纯合的酶缺陷。因为目前能做到的还是外源正常基因的引入和表达,以补充缺失的或失去正常功能的酶,并不能做到用正常基因去替换突变基因,摘除突变基因或选择性地使突变基因失活。因此,显性遗传的疾病大概还不能很快地用现有的基因治疗手段去矫正。

3. 据我个人看法,基因治疗的首选目标应该是恶性肿瘤。理由有:(1)前面列举的各种遗传性疾病,除地中海贫血外,大都是比较罕见的,其重要性和危害性远不及恶性肿瘤。(2)恶性肿瘤的现有治疗手段都不能令人满意。对晚期肿瘤甚至某些较早期的恶性肿瘤仍然束手无策。在美国至今仍有不少社会势力反对将基因工程手段用于人体。生怕褻渎了人体基因组的纯洁性。尤其反对触动生殖细胞的基因组。最近,美国居然还有人(Rifkin)代表动物保护组织向地方法院控告 Brinster 和美国农业部合作进行创造巨猪、巨羊的科学研究,认为那是对动物的虐待。一般反映,这将是一场长期的不分胜负的官司(吴旻,中华医学杂志,1985)。但是,目前广泛应用于肿瘤治疗的药物和放射疗法虽然都是严重损伤人体遗传物质(包括生殖细胞)的,却没有受到宗教团体和其他社会势力的反对。外源基因的引入对患者来说,很难达到放射疗法和化学疗法的损害程度,而且它影响后代的可能性也较小。因此,我估计这个阻力较小,而社会经济效益特大的领域必将迅速发展起来。(3)照目前对癌变分子机理的了解和进展速度,以及外源基因导入和表达调控研究的成就,利用改造的 RNA 病毒把外源 DNA 顺序引入有分裂能力的恶性细胞是不难做到的。要使恶性肿瘤停止肆虐,关键就在于使具有分裂能力的肿瘤干细胞停止繁殖。在基因水平上做到这点,显然将成为最经济、省事,对患者损害最小的一种有效疗法。(4)随着癌变各阶段中那些癌基因被逐个卷入过程的阐明,应用对基因拷贝数(或 mRNA 定量)或癌蛋白的测定,就能准确地诊断出早期癌变(或癌前病变),而针对该阶段或下一阶段癌基因表达的基因预防措施也是不难设计的。在这方面,由于我国有经过详细遗传流行病学调查过的高发现场(如食管癌高发区山西阳城,中华肿瘤杂志,1985 专刊),可作为进行基因预防基地,因此,可望较快地作出任何发达国家难以实现的成就。

参 考 文 献

- [1] NIH censure for Dr. Martin Clin-Tighter rules for future research plans. *Nature* 291: 369, (1981).
- [2] Williamson, B. (1982): Gene therapy. *Nature* 298: 416.
- [3] Hunter, T. (1984): The protein of oncogenes. *Scient. American* 251(2): 60.
- [4] Neumann, E. *et al.* (1982): *EMBO J* 1: 841.
- [5] Mann, R. *et al.* (1983): *Cell* 33: 153.
- [6] Williams, D. A. *et al.* (1984): *Nature* 310: 476.
- [7] Sarver, N. *et al.* (1981): *Mol Cell Biol* 1: 486.
- [8] La Porta *et Taichman* LB (1982): *Proc Natl Acad Sci USA* 79(11): 3393.
- [9] Costantini, F. *et Lacy*, E. (1981): *Nature* 294: 92.
- [10] Brinster, R. L. *et al.* (1981): *Cell* 27: 223.
- [11] Gordon, J. W. *et Ruddle*, F. H. (1981): *Science* 214: 1244.
- [12] Kaegi, J. H. R. *et Nordberg*, M. (1979): in *Metallothionein* (Birkhauser, Basel)
- [13] Brinster, R. L. *et al.* (1982): *Nature* 296: 39.
- [14] Durnam, D. M. *et Palmiter*, R. D. (1981): *J Biol Chem* 256: 5712.
- [15] Shiu, R. P. C. *et Frieson*, H. G. (1974): *J Biol Chem* 249: 7902.
- [16] Peel, C. J. *et al.* (1981): *J Nutr* 111: 1662.
- [17] Palmiter, R. D. *et al.* (1982): *Cell* 29: 701.
- [18] Durnam, D. M. *et Palmiter*, R. D. (1983): *Anal Biochem* 131: 385.

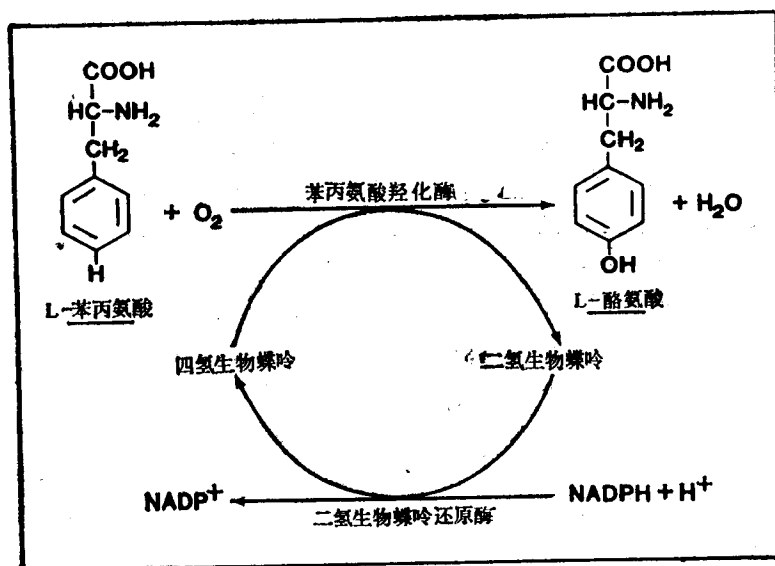
- [19] Seeburg, P. H. *et al.* (1977): *Cell* 12: 157.
- [20] Seeburg, P. H. *et al.* (1977): *Nature* 270: 486.
- [21] Feinstein, S. C. *et al.* (1982): *J Mol Biol* 156: 549.
- [22] Lacy, E. *et al.* (1983): *Cell* 34: 47.
- [23] Hammer, R. E. *et al.* (1984): *Nature* 311: 65.
- [24] Spradling, A. C. *et al.* (1982): *Science* 218: 341.
- [25] Brinster, R. L. *et al.* (1984): *Cell* 37: 367.
- [26] Stewart, T. A. *et al.* (1984): *Cell* 38: 627.
- [27] Anderson, W. F. (1984): *Science* 226: 401.

对人类遗传性疾患的重组 DNA 研究： 用基因分析法对经典的苯酮尿症 进行产前诊断和携带者检测

Savio L. C. Woo (胡流清)

I. 引 言

经典的苯酮尿症 (PKU) 是一种由于芳香族氨基酸代谢的先天性缺陷所致的人类遗传性疾患。约 50 年前首次观察到本病患者的尿中具有过多的苯丙酮酸^[1]。其后有人发现, 这类患者的肝脏不能把苯丙氨酸转变成酪氨酸, 而后者则是苯丙氨酸的主要代谢途径^[2-5] (图 1)。因此, 经典的 PKU 的特征是, 在肝脏中缺乏苯丙氨酸羟化酶 (PAH) 活性^[6]。这种酶活性的缺陷引起持续性高苯丙氨酸血症, 其临床症状则表现为不可逆的脑发育的损害, 从而在未经治疗的儿童中导致智力障碍^[1,7]。



经典的苯酮尿症: 苯丙氨酸羟化酶缺陷 高苯丙氨酸血症: 苯丙氨酸羟化酶水平减低
非典型性苯酮尿症: 二氢生物蝶呤还原酶缺陷

图 1 人类肝脏中由苯丙氨酸羟化酶所催化的酶反应的模式图。该酶需要一种辅助因子四氢生物蝶呤的存在, 以便利用分子氧把苯丙氨酸转变成酪氨酸。被氧化的辅助因子, 二氢生物蝶呤, 再借助于肝脏中另一种酶二氢生物蝶呤还原酶而被还原成四氢型。

不论表型的变异如何,苯丙氨酸羟化酶缺陷是作为一种常染色体隐性性状而被传递的。在白种人中,PKU 的发病率约为 1:10,000,而本病的携带者估计 50 人中即有一人。最近在中国曾发现,PKU 的发病率约为 1:20,000。在北京和上海的大医院中,PKU 患者约占所有智力障碍患者的 10%。Guthrie 和 Susi^[9] 已建立了一种简单的人群筛选方法,用来测定新生儿小量血液标本中的苯丙氨酸。经此试验确定的 PKU 新生儿可以用一种苯丙氨酸含量低的矫正饮食进行治疗^[9,10]。目前,还没有一种诊断方法能够在产前确定隐性纯合子。本文讨论的题目就是建立对这一遗传疾患进行产前诊断和检测肯定的携带者的方法。

II. 用分子克隆方法分离大鼠和人的 PAH 基因

利用一种针对纯化的大鼠肝 PAH 的单一特异性抗血清制品,我们已从大鼠肝脏中通过对多核蛋白体的特异性免疫沉淀纯化到 PAH 的 mRNA。纯化的 mRNA 已用来在酶作用下合成 cDNA 拷贝,后者随后被制成双链 DNA,并用分子克隆化方法引入细菌内^[11]。为了分离人类 PAH DNA 顺序,我们采取人肝的病理学标本,并从中制备 mRNA、cDNA 并插入到细菌中,从而建立了一个包括 40,000 个独立的细菌克隆的基因文库。这种含人肝脏 DNA 顺序的 40,000 个细菌克隆是用大鼠 PAH DNA 探针来加以筛选的,从中鉴定到了若干个含同源人类 DNA 顺序的细菌克隆^[12]。对这种克隆化 DNA 所进行的限制性顺序分析表明,人类 PAH DNA 与大鼠 DNA 几乎有 90% 是同源的。这些观察证明,这一基因在进化过程中是何等保守。

III. PKU 不是由于整个 PAH 基因缺失所致

一旦分离到了人类 PAH cDNA 克隆,它们就成为非常特异的探针,可用来查明人类染色体 PAH 基因的结构。我们要问的第一个问题是,PKU 是否由于人类基因组中 PAH 基因的缺失所致。因此,我们从人类突变株供应中心索取了两个独立的来自 PKU 病人的细胞系,从中分离了总的细胞 DNA,并用分子杂交法进行了分析。这一分析的实验程序模式图如图 2 所示。

总基因组 DNA 是由巨大的分子所组成的,它们的长度有几百万个碱基对,而且含有能被限制性核酸内切酶辨认的特异性核苷酸顺序。限制性核酸内切酶可在这些特异性位点切断 DNA 分子。一旦 DNA 分子被某种限制性核酸内切酶消化成具有一定长度的许多片段时(步骤 1),这些 DNA 片段可通过琼脂糖凝胶电泳,根据其大小加以分离(步骤 2)。凝胶上的 DNA 经过溴化乙锭染色后可以在紫外线照明下进行观察,好象是在凝胶上涂抹的痕迹(步骤 3,第 1—3 行),后者实际上是由亿万个具有不同长度的 DNA 片段所组成的混合形象。含苯丙氨酸羟化酶基因顺序的片段就隐藏在上述痕迹中,可通过以下程序加以鉴定:在凝胶中的 DNA 片段可转移到一张硝酸纤维素滤膜上^[13](步骤 4),并用放射性标记的人类 PAH 基因 DNA 探针加以处理(步骤 5)。这一特异的 DNA 探针被凝胶上含互补顺序的 DNA 片段所辨认并与之结合。其余的基因组 DNA 片段不同任何标记 DNA 探针结合,结果游离的探针可被冲洗掉(步骤 6)。经过洗涤的滤膜可

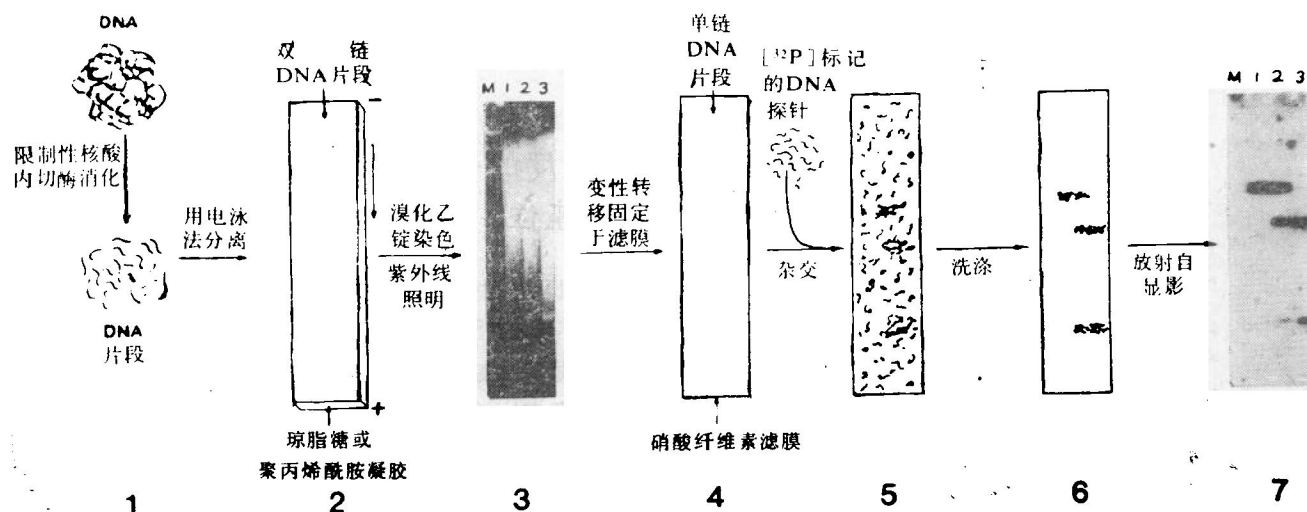


图2 用于检测含人类苯丙氨酸羟化酶基因顺序的基因组 DNA 片段的程序模式图。

进行放射自显影，结果代表凝胶中基因组苯丙氨酸羟化酶 DNA 片段位置的特异的带，可在 X 线照片上显示出来(步骤 7)。该特异性 DNA 片段的分子量或长度可通过与一些已知大小的标记(marker) DNA 相比较而加以确定。

基因组 DNA 是从两个明显正常的个体和两个来自人类细胞突变株供应中心的 PKU 细胞系制备的。这些 DNA 制品在用三种不同的限制性核酸内切酶消化后用上述程序进行分析，如图 3 中 A, B, C 方格所示。在所有 3 个方格中，1 和 2 行是从正常人体制备的 DNA，3 和 4 行则是从 PKU 细胞系制备的 DNA。结果表明，在正常的和 PKU 细胞系 DNA 之间 PAH 基因的外观是完全相同的。由此实验可得出结论，至少在这两个



图3 从正常个体分离的基因组 DNA 样品(1 和 2 行)及从 PKU 成纤维细胞系分离的样品(3 和 4 行)的分析。消化 DNA 所用的限制性核酸内切酶，在方格 A, *Bam*HI, 方格 B, *Pvu*II; 方格 C, *Eco*RI。