

中国医学科学院

中国协和医科大学

科学年会学术论文集

(1998·北京)

中国医学科学院中国协和医科大学科研处编

北京医科大学中国协和医科大学联合出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

中国医学科学院中国协和医科大学科学年学术论文集/中国医学科学院、中国协和医科大学科研处编. - 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1998

ISBN 7-81034-905-8

I. 中… II. 中… III. 医药学-学术会议-文集 IV. R-53

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (98) 第 24140 号

中国医学科学院 科学年会学术论文集
中国协和医科大学
(1998·北京)

中国医学科学院 中国协和医科大学科研处 编
责任编辑: 陈永生

北京医科大学 联合出版社出版
中国协和医科大学

北京迪鑫印刷厂印刷
新华书店北京发行所发行

787×1092 毫米 1/16 11.25 印张 275 千字
1998 年 11 月第一版 1998 年 11 月北京第一次印刷
印数: 1—1000

ISBN 7-81034-905-8/R·903

定 价: 50.00 元

序

中国医学科学院、中国协和医科大学科学年会已举办过两届。院校决定定期召开科学年会的初衷是要创造一种更浓郁的学术气氛，为科技工作者提供一个平等竞争、自由讨论、共同提高的机会，促进科研水平的提高。科学年会上，卓有成就的科学家在报告自己研究进展的同时，也传递严谨求实的科学精神；一大批颇有见解、很有前途的中青年科学家，在学术交流过程中显现才干和水平，被大家所识别、所认同。前两届科学年会的圆满成功充分证明，利用科学年会进行学术交流有助于互相启迪、互相借鉴、互相学习，有助于活跃学术空气、净化学术环境，有利于在中国医学科学院、中国协和医科大学不断培育出新概念、新方法、新技术，还可发现新的科技人才。

在本次科学年会上，将有 125 篇论文进行交流，其中 14 篇在全体会议上交流，62 篇在分组会议上交流，49 篇列题交流。我相信，有了前两届科学年会的经验，通过全校的共同努力，今年的科学年会一定会取得圆满成功！



1998 年 7 月

目 录

一、大会交流论文

- 1 红细胞分化去核因子 (EDDF) 对肿瘤细胞恶性调控及其相关基因的克隆 (综述) 薛社普等 (3)
- 2 脑干内血管畸形的诊断及治疗——附 100 例病例报告 王忠诚等 (14)
- 3 肿瘤转移相关新基因的克隆 张友会等 (21)
- 4 胃幽门十二指肠运动生理和病理生理研究 柯美云等 (22)
- 5 补体介导炎症损伤机理的新概念与炎症应答的调控 侯健存等 (33)
- 6 尖锐湿疣的实验和临床研究 王家璧等 (42)
- 7 番荔枝科植物的化学成分研究 杨世林等 (47)
- 8 3 个月至 5 岁法乐四联症患儿根治术的结果及高危因素分析 刘迎龙等 (55)
- 9 T 淋巴细胞激活与凋亡的信号传递 (研究工作综述) 郝德先等 (60)
- 10 骺骨软化症的综合研究 叶启彬等 (65)
- 11 一种新的羧基特异的核蛋白相关基因特性的研究 高 颖等 (71)
- 12 去神经肌肉游离移植的基础研究与临床应用 李森恺等 (81)
- 13 慢性肺间质性疾病的实验研究 郭子健等 (92)
- 14 抗 HPV16 核酸疫苗及基因工程疫苗的分子免疫学研究 司静懿等 (99)

二、小会交流论文

【基础医学】

- 1 人 hsp90 α 及 hsp90 β 基因转录机制的研究 王晓哲等 (107)
- 2 甲基硝基亚硝基胍诱发哺乳类细胞遗传不稳定机制的研究 余应年等 (108)
- 3 抗人 VEGF 中和抗体对乳癌生长及转移的影响 王贵齐等 (108)
- 4 瞬态诱发耳声发射的识别 张正国等 (109)
- 5 磷酸酶和糖苷酶对 Alzheimer 神经元纤维缠结的作用 王建枝等 (109)
- 6 组织因子凝血途径与生物材料血液相容性关系的研究 冷希岗等 (110)
- 7 PHF2 全长 cDNA 及剪接异构体的克隆鉴定 汪俊华等 (111)
- 8 医用胶原膜在人工种植体中的研究 张其清等 (111)
- 9 FMRP 相互作用蛋白的研究 陈雨亭等 (112)
- 10 可移植性 BALB/c 小鼠红白血病模型的建立及其生物学特性 丁顺利等 (113)
- 11 α -甘露糖苷酶基因的表达及其功能初探 朱立平等 (113)
- 12 孟德尔隐性主基因遗传——食管癌的分选分析 张卫华等 (114)
- 13 原发性胃癌的细胞遗传学和分子细胞遗传学研究 李 璞等 (115)
- 14 河豚鱼基因组细菌人工染色体文库的构建 刘山鸣等 (116)
- 15 重组人白介素 2-穿孔素双功能蛋白的制备及功能初步研究结果 王一理等 (116)
- 16 人食管癌表达下调基因的分离和表达分析 许智雄等 (117)

17	扩增的人肿瘤浸润 $\gamma\delta$ T 细胞的体内外研究	于松涛等 (118)
18	EcoRI 限制 - 修饰基因的表达及特异位点甲基化细胞株的建立	刘金毅等 (119)
19	Yunnanese (A $\gamma\delta$) ⁺ - 地中海贫血缺失 3' 端点位于 ... L1 顺序内 ——涉及缺失及 γ 珠蛋白基因再活化的机制	张雪青等 (119)
20	先天性骨 - 肾畸形综合征小鼠 (KM - ld) 致病基因 ld 的染色 体定位	孟 雁等 (120)
21	一氧化氮介导循环自然杀伤细胞的抗肿瘤细胞毒作用	肖林生等 (121)
22	戊型肝炎病毒 (HEV) 实验感染恒河猴的研究	马雁冰等 (122)
【临床医学】		
23	NOD 小鼠口服胰岛素对胰岛 Fas 和 FasL 表达的影响	王 娟等 (123)
24	吸入一氧化氮治疗肺动脉高压的实验与临床研究	何建国等 (124)
25	小血管吻合技术在整形外科困难病例中的应用 ——十四年临床科研工作总结	周 刚等 (125)
26	神经内分泌肿瘤阳性显像剂 ¹¹¹ In - pentetreotide 的研制 及其初步临床评价	陈 方等 (126)
27	全国两万例急性缺血性脑卒中早期抗血小板治疗临床对照研究 结果 (CAST 临床试验)	谢晋湘等 (127)
28	困难气管插管方法的临床研究	安 刚等 (128)
29	感染性体克的临床与实验性研究	刘大为等 (128)
30	去白细胞含血心肌停跳液临床研究	龙 村等 (129)
31	耳廓岛状瓣修复大面积鼻翼缺损方法的研究	范 飞等 (129)
32	获得性血友病的临床研究	季林祥等 (130)
33	电子束 CT 在冠心病诊断的应用研究	戴汝平等 (131)
34	骨髓增生异常综合征免疫表型的研究	陈桂彬等 (132)
35	中国致病真菌十年动态流行病学研究	吴绍熙等 (132)
36	Perfect 牛心包瓣的临床和血液动力学评价	朱俊明等 (133)
37	人类疱疹病毒 6 型与血液病、淋巴瘤关系的探讨	马小彤等 (134)
38	丙型肝炎病毒感染的献血者病程及预后的研究	季 阳等 (134)
39	心肌显像剂 ^{99m} Tc - MIBI 的研制与推广应用	文蓉芳等 (135)
40	抗 Pgp 单抗 PHMA02 在白血病临床中的应用研究及预后分析	许元富等 (136)
41	微弹簧圈囊内栓塞出血后早期颅内动脉瘤	吴中学等 (136)
42	北京郊区农村心血管病人群防治结果分析——心血管病发病率、 死亡率和潜在寿命损失年数的分析	黄广勇等 (137)
43	中国医用诊断 X 线工作人员职业剂量重建方法研究	张良安等 (138)
44	大疱性类天疱疮自身抗原 BP180 的研究	林 麟等 (139)
【药 学】		
45	国产红豆杉细胞培养及紫杉醇类物质产生的研究	朱蔚华等 (140)
46	突变的 DHFR 肿瘤耐药基因转导脐血干细胞的体外实验研究	吴瑞球等 (141)
47	NG108 - 15 细胞阿片受体对延迟整流通道的调节作用及其机	

理研究·····	李庆霞等 (141)
48 6/12 型紫杉烷类二萜化合物的质谱-质谱研究·····	再帕尔·阿不力孜等 (142)
49 药用植物生物多样性的特点及保护对策·····	张本刚等 (143)
50 紫杉烷化合物生物合成与紫杉烯合成酶 cDNA 克隆的初步研究·····	程克棟等 (143)
51 微生物来源的胆固醇酰基转移酶抑制剂的筛选研究·····	唐 勇等 (144)
52 单克隆抗体 H1M ₈₂ 对中性粒细胞 (N _P) 趋化信息传递的 降调节作用·····	法祥光等 (144)
53 对几种动物中药研究的概况及体会·····	柳雪枚等 (145)
54 生物防治技术在绿色中药材生产中的应用研究·····	程惠珍等 (147)
55 中药中 α -葡萄糖苷酶抑制剂的研发和开发·····	申竹芳等 (147)
56 粘膜抗菌肽的分离及抗菌肽基因粘膜转染表达·····	王伯瑛等 (148)
57 白藜芦醇对白细胞介素 6 生成抑制及抗炎机理研究·····	钟 森等 (149)
58 青蒿素抗心律失常作用的离子基础·····	杨宝峰等 (149)
59 法尼基蛋白转移酶及 P21 ^{ras} 蛋白膜结合抑制剂研究·····	陈晓光等 (150)
60 肝脏和肝细胞内靶向万乃洛韦毫微粒的研究·····	张志荣等 (151)
61 核磁共振新技术在糖甙结构解析中的应用·····	庚石山等 (151)
62 生枝霉素稳定型基因工程菌的构建·····	尚广平等 (152)

三、列题论文

1 增生性瘢痕裸鼠动物模型的建立及可行性研究·····	程洪伟等 (155)
2 鼠 I 型可溶性白细胞介素 1 受体基因在昆虫细胞的克隆和表达·····	张治平等 (155)
3 MDA 在小鼠不完全性脑缺血再灌注时的变化及其规律·····	杜力军等 (155)
4 三氧化二砷 (As ₂ O ₃) 诱导人肺癌 GLC-82 细胞凋亡及分子 机制的研究·····	邓友平等 (156)
5 人参农家庭类型的 AFLP 指纹研究·····	马小军等 (156)
6 生物电阻抗新方法研究与应用·····	任超世等 (156)
7 用 FISH 法对 X 线工作者回顾性剂量重建的研究·····	王知权等 (157)
8 血清可溶性 HLA-I 类抗原的定量检测·····	兰炯采等 (157)
9 HBV X 蛋白能在体内和体外结合普通转录因子 TFⅡB·····	杨盛大等 (157)
10 人新的大肠癌相关基因的研究·····	郑 树等 (158)
11 CETP 新突变点 Ala373Pro 和 Arg451Gln 及其座位关系·····	陆付平等 (158)
12 扩张型心肌病免疫基因及体液免疫反应的研究·····	王秋芬等 (158)
13 宫颈癌组织中 HPV16L1 基因的克隆及其序列的测定·····	谷鸿喜等 (159)
14 长效二氢吡啶类钙拮抗剂对心肌梗塞再灌注犬的作用·····	李为民等 (159)
15 中国西北地区汉、回、维、藏民族 HLA DRB 基因多态性的研究·····	赖淑萍等 (159)
16 脊髓灰质炎病毒缺陷型载体瞬时表达系统 1 的构建研究·····	李琦涵等 (160)
17 腺病毒介导的反义 c-myc 特异性诱导肿瘤细胞 G ₁ 期 阻滞和凋亡·····	魏 玥等 (160)
18 人 IL-15 重组质粒的构建与表达·····	张叔人等 (160)
19 人 IL-12 的克隆、表达及生物学活性的鉴定·····	曲春枫等 (161)

20	临床分离绿脓杆菌耐药机制的研究·····	左 联等 (161)
21	西藏地区一个家族性痉挛性截瘫家系的连锁分析·····	李 辉等 (161)
22	性发育异常的分类、处理与分子生物学的研究·····	葛秦生等 (162)
23	皮下埋植式动脉灌注顺铂及咖啡因治疗肾盆恶性肿瘤的近期报告·····	李鼎锋等 (162)
24	普胸术后急性肺动脉栓塞的诊断及治疗·····	杨 林等 (162)
25	儿童恶性淋巴瘤的综合治疗研究结果与分析·····	周立强等 (163)
26	应用国产 PET ¹⁸ F-FDG 心肌代谢显像检测心肌存活的价值·····	张晓丽等 (163)
27	右外侧小切口剖胸小儿先天性心脏畸形矫治术 319 例体会·····	刘迎龙等 (163)
28	原发性高血压与血浆肾素活性及血管紧张素原关系研究·····	公茂莲等 (164)
29	左心室舒张功能不全在卧位型心绞痛发病中的作用·····	陈纪林等 (164)
30	射频消融治疗伴发于 Ebstein 畸形的房室折返性心动过速·····	姚 焰等 (164)
31	埋藏式心脏复律除颤器治疗快速室性心律失常随访观察·····	华 伟等 (165)
32	我国重点人群 HIV/AIDS 危险行为现状及干预效果评价·····	左 群等 (165)
33	病人自控镇痛临床研究·····	赵 熙等 (165)
34	外源性碱性成纤维细胞生长因子对薄皮瓣真皮下血管网 筑变化影响及断蒂时机的实验研究·····	景伟明等 (166)
35	下颌角肥大的整形美容治疗·····	归 来等 (166)
36	WT1 基因在髓细胞白血病中的表达及与其病程关系的研究·····	秘营昌等 (166)
37	甲状腺功能低下大鼠小脑程序化细胞死亡增加·····	张桂华等 (167)
38	中国麻风流行状况及流行趋势的预测·····	陈祥生等 (167)
39	钨丝微弹簧圈血管内栓塞 36 例外伤性颈内动脉海绵窦瘘·····	黄正松等 (167)
40	IL-12 协同 B7-1 增强 C57BL/6 小鼠的抗肿瘤免疫·····	王志华等 (168)
41	感觉信息在外周的跨节段传递·····	赵 晏等 (168)
42	颈内-眼动脉段动脉瘤·····	赵继宗等 (168)
43	反转恢复序列在颅脑磁共振成像的应用·····	戴建平 (169)
44	分子生物学技术在姜黄属和红豆杉属的应用研究·····	陈 毓 亨 (169)
45	中药材的 X 衍射付里叶谱分析方法研究·····	吕 扬等 (169)
46	降脂药物对动脉内膜损伤后细胞凋亡的影响·····	周 游等 (170)
47	吗啡依赖小鼠脑组织 cAMP 系统的变化及 AC 磷酸化调节·····	方 芳等 (170)
48	海风藤及其代用品药理作用的比较研究·····	孙绍美等 (170)
49	高效液相色谱法测定醉鱼草甙·····	李延生等 (171)

一、大会交流论文

1. 红细胞分化去核因子 (EDDF) 对肿瘤细胞恶性调控及其相关基因的克隆 (综述)

薛社普 刘友华 张世馥 王 鑫 费仁仁
杜 权 章正琰 刘世广 章静波

(中国医学科学院中国协和医科大学基础医学研究所、北京 100005)

摘要 目的 本文报道对哺乳类红细胞终末分化去核因子 (EDDF) 调控恶性骨髓瘤细胞分化及其相关基因的分离、提纯及克隆的系列研究结果。方法 选用不同分化期哺乳类红细胞为研究对象, 通过对自然排核前后的细胞形态变化和与之对应的物质代谢改变的分析, 用自建的红细胞胞质体杂交模型, 分别对红系的红白血病和非红系的骨髓瘤细胞进行同种和异种的细胞杂交实验和用不同方法对不同阶段分化基因进行克隆和序列分析。结果 积累大量证据表明哺乳类红细胞在终末分化期出现分化去核因子 (EDDF), 调控不同分化阶段相关基因的活动。该因子呈时序性出现, 与血红蛋白表达, 细胞核停止分裂转向分化, 核偏位、核浓 (固) 缩和自然去核等终末分化特征呈现明显的因果关系。分离提纯的 EDDF 活性蛋白可逆转体外培养的肿瘤细胞系 (MEL, K562, L929 及 KB) 的恶性生长及诱导终末分化产物的表达。在上述基础上分别采用不同的分离、提纯及基因克隆路线, 已从人和小鼠红细胞中连续克隆到 4 种在 GenBank 查询并无同源序列的不同终末分化阶段的分化相关基因的全长序列和若干 cDNA 片段, 为终末分化期存在分化相关基因家族及其结构、功能的深入研究奠定了基础。

关键词 终末分化 分化去核因子 (EDDF) 恶性调控 基因克隆

细胞如何由增殖转向分化, 何种细胞因子调控终末分化相关基因表达开关, 这是国际上一个研究热点的生物医学问题。哺乳类红细胞终末分化的主要特征是表达血红蛋白, 停止细胞分裂和出现为哺乳类以下动物所无的核固缩和自然去核活动。癌变时这些特征消失, 变为核分裂失控, 分化被抑的红白血病肿瘤。这一涉及细胞分化及癌变机制两大领域的重大生命科学问题, 正是研究细胞分化和癌变的分子机理及其调控的理想模型。红细胞分化决定于细胞内、外因素和不同发育阶段细胞核内诸多调节蛋白的协同作用。它们可与基因的顺式调控元件结合, 决定着细胞发育分化阶段特异性基因的表达顺序^[1-4]。文献上已报道了一系列红系造血因子如 EPO, SCF, BSF-E, CSF-E, IL-3, IL-6 和一些癌基因蛋白等, 分别作用于造血干细胞、原红细胞和早幼红细胞等不同阶段, 介导细胞向特定基因的程序性表达^[5-8]。但自早幼红细胞期以后的终末分化因子尚无确切的报道。Ito (1987) 曾继我们发表

的红细胞质因子^[10]之后报道从人红白血病细胞培养液中提纯到一种可诱导 MEL 细胞表达血红蛋白的 EDF 因子^[9]。但其序列与 GenBank 中的激动素 (activin) A 为同源物。在来源及序列结构上与我们已克隆到的各阶段分化相关基因 GenBank 新序列有基本区别。逻辑上, 我们认为哺乳类红细胞终末分化期出现的分化去核物质 (EDDF) 在来源上可能是红细胞本身在长期进化过程中形成的细胞内自分泌产物。癌变后这一分化物质消失, 导致终末分化特征的血蛋白、核固缩、和自然去核等表征受抑。理论上如予以补充所缺失的去核分化 (EDDF) 物质, 应能逆转癌变和恢复分化。这是我们实验中用以检验红细胞中是否自然存在 EDFF 的客观标准。另外, 核固缩实质上是核染色质组分浓缩 DNA 和封闭基因表达的指标, 去核分化物质 EDFF 终末分化期调控核浓缩和中断细胞分裂, 是分化相关基因家族中可供利用以抑制癌变和治疗肿瘤的一个重要环节。本研究以上述的问题为研究目标开展了较系统的研究工作, 本文简要综述研究进展。

1 哺乳类红细胞发育过程中自然排核的物质基础及排核机理工作假说

为验证哺乳类红细胞终末分化期自然去核的独特规律, 我们自 80 年代初期便在排核问题上先后报道了小鼠和兔红细胞排核过程的电镜观察^[11]; 红系祖细胞 BFU-E 和 CFU-E 体系在培养条件下自然排核过程^[12], 提出排核是哺乳类红细胞终末分化的一种自主性活动。排核

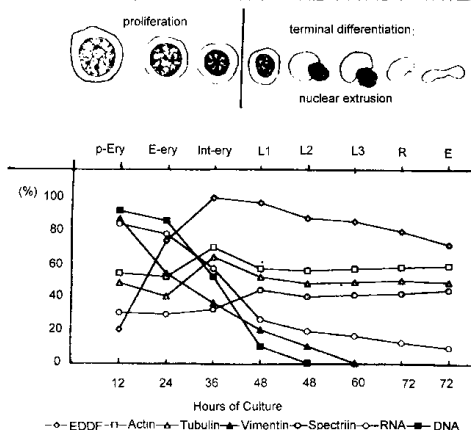


图1 红细胞发生过程中核酸 (DNA, RNA) 以及一些特异蛋白质 (骨架蛋白、波形纤维蛋白)、红细胞分化去核蛋白 (EDFF) 在定量上的改变与细胞增殖、分化及自然排核的关系示意图

E. 成熟红细胞; E-ery. 早幼红细胞; Int-ery. 中幼红细胞; L1, L2, L3, 晚幼红细胞分期, 分别示停止分裂、核固缩和排核阶段; P-ery. 原红细胞; R. 网织红细胞。

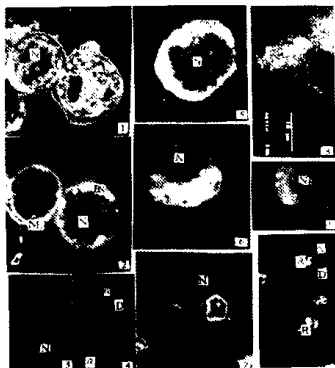


图2 激光共聚焦显微镜下小鼠脾红细胞培养不同时期(12, 24, 36, 48, 60, 72小时)后3种骨架蛋白的免疫荧光分布动态变化图

1, 2. 培养12~24小时后的成红细胞示波形蛋白呈强荧光的核周层(PNL)和伸入核膜下与核纤层(NL)相连的结合位点(RS); 3. 示核偏位(培养36小时), 波形蛋白消减明显; 4. 排核期(培养48小时), 荧光消失; 5. 示微管蛋白核周强荧光层(培养12小时); 6. 示核偏位(36小时), 微管荧光增强; 7. 示排核期(48小时), 微管蛋白集中在初网织红细胞区; 8. 示微丝蛋白呈弥散状及块状束(24小时); 9. 示核偏位(36小时)及10. 示排核期(48小时), 微丝荧光增强和集中在初网织红细胞区; N, 细胞核; D, 去核中细胞; R, 初网织红细胞

前出现核骨架-中间纤维体系(NM-IF)的超微结构改变(IF波形纤维蛋白 Vimentin 降解和解聚), 与非排核的鸟类(鸡)红细胞表现绝然不同的形态特征^[13], 为在进化上由不排核演变至排核提供了证据。

哺乳类红细胞在排核前还出现了一系列与形态改变互为相应的可测物质代谢变化。用细胞化学、免疫荧光、电泳及分离提纯等方法进行分析, 发现排核期核酸(DNA及RNA)、LDH同工酶^[14]、波形纤维蛋白等均在排核前急剧下降, 而酸性磷酸酶、血红蛋白、膜收缩蛋白(spectrin α 及 β)、微管、微丝蛋白, 尤其胞质中EDDF蛋白则迅速上升至高峰^[14, 26, 30, 31](图1)。这些变化均以晚幼红细胞期为转折点, 而且与细胞核的活动状态及排核过程密切相关, 提示哺乳类红细胞在终末分化期出现去核物质, 并可能导致排核期间物质代谢上的剧烈改变。以不影响红细胞生长分化的 Friend 贫血病毒(FVA)感染小鼠, 取其脾原红细胞进行离体培养12, 24, 36, 48, 60, 72小时后, 分别取材分离提纯EDDF蛋白质,

对小鼠 MEL 红白血病细胞的生长进行生物活性的动态分析,发现该活性蛋白在早幼红细胞期已经出现,在中幼红细胞期含量达高峰(图 1),与排核及细胞骨架蛋白等物质代谢呈正相关^[26,30,31]。用间接荧光法处理上述各期脾红细胞的微管、微丝、波形纤维蛋白等骨架系统在激光共聚焦显微镜下观察,可见作为锚定细胞核位置的波形纤维蛋白(图 2)在晚幼红细胞早期突然下降和降解(图 1, 2),导致细胞核偏位(图 3);微管和微丝蛋白及其纤维则随细胞核外突排出过程而上升(图 1)和密集在缢痕区(图 3),这为我们首次提出排核的三期相细胞骨架系的作用规律提供了证据^[31]。

基于上述实验资料,尤其在排核前可观察到的特异活性蛋白质高峰和骨架蛋白等相关物质代谢的急剧变化,我们提出了哺乳类红细胞在种系发生过程中出现“红细胞分化-去核因子(erythroid differentiation - denucleation factor, EDDF)”的工作假说^[10,15,26],是导致自然去核和始动细胞由增殖期转向终末分化期和调控终末分化去核相关基因呈阶段性表达的调节物质。

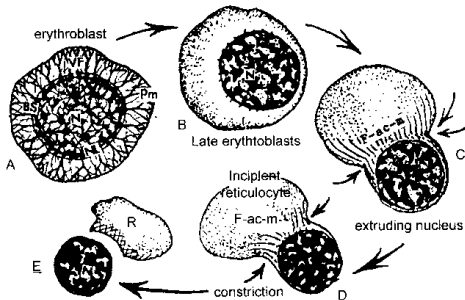


图 3 哺乳类红细胞排核过程中细胞骨架系的作用规律示意图

A. 成红细胞(erythroblast)波形蛋白纤维与核纤层(NL)连结(结合位点BS)后向外延伸与质膜(PM)相连,将细胞核位置锚定;B. 示晚幼成红细胞(late erythroblast)波形蛋白纤维降解,导致核固缩和核偏位的排核初期相;C、D、E. 排核二期相,示微丝(F-actin)、微管(m)纤维随细胞核外突排出过程而密集在初期网织红细胞(incipient reticulocyte)和缢痕(constriction)区。X - extruding nucleus, 外突核;F - ac - m, 微丝微管束;R. 网织红细胞。

2 红细胞胞质杂交模型的建立和对红白血病及非红系骨髓瘤细胞的诱导分化作用

为了验证上述假说,我们选用自然去核而富含珠蛋白 mRNA 和次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转化酶(HGPRT)阳性的正常小鼠或兔的网织红细胞,与小鼠和人类红白血病细胞(MEL 及 K562)和非红系的恶性骨髓瘤细胞进行杂交,创建了同种和异种细胞胞质杂交模型。选用网织红细胞作为“胞质体”,除了因为它在自然去核后的胞质体中含有丰富的基因产物(珠蛋白基因 mRNA)可作为遗传标志外,还因它本身是 HGPRT 强阳性,便于在与缺失此酶的

骨髓瘤细胞融合后用 HAT 选择液来纯化杂种细胞。表 1 为我们近年来建立的同种（小鼠—小鼠）和异种（小鼠—兔、小鼠—人）的胞质体杂种细胞（cybrid cells）和用大鼠有核红细胞与小鼠浆细胞瘤杂交建成的杂交细胞（hybrid cells）及其表型特征^[10,15,16,17,19,30]。表中 1~8 为红细胞质体与非红系骨髓瘤，9 为与红系肿瘤红白血病细胞的杂交。

表1 红系细胞 × 肿瘤细胞的同种和异种杂交细胞系的建立及其表型特征

红系细胞	恶性细胞系(骨髓瘤)	胞质/杂交细胞 (cybrid/hybrid)	表型特征	作者 文献
1. 小鼠网织红细胞(R)	小鼠 BW5147 胸腺淋巴肉瘤细胞(BW)	BW-R	*恶性逆转, 表达小鼠型血红蛋白	[10]
2. 小鼠网织红细胞(R)	小鼠浆细胞瘤 NS-1(NS)	NS-R	*恶性逆转, 表达小鼠型血红蛋白	[10]
3. 小鼠网织红细胞(R)	小鼠 SP2/O 浆细胞瘤(SP)	SP-R	*恶性逆转, 表达小鼠型血红蛋白	[10]
4. 小鼠网织红细胞(R)	人 HL-60-AR 早幼粒白血病突变株细胞(HL)	HL-R	*恶性逆转, 表达人型及小鼠型血红蛋白	[15]
5. 小鼠网织红细胞(R)	人 HMy-2 浆细胞瘤(HMy)	HMy-R	*恶性逆转, 表达人型及小鼠型血红蛋白	[19]
6. 兔网织红细胞(RR)	小鼠 BW5147 胸腺淋巴肉瘤细胞(BW)	BW-RR	*恶性逆转, 表达小鼠和兔型血红蛋白	[16,25]
7. 兔网织红细胞(RR)	小鼠 SP2/O 浆细胞瘤(SP)	SP-RR	*恶性逆转, 表达小鼠和兔型血红蛋白	[16,25]
8. 大鼠中、晚幼红细胞(RNR)	小鼠 SP2/O 浆细胞瘤(SP)	SP-RNR	*恶性逆转, 表达大、小鼠型血红蛋白	[17]
9. neo 标记的兔网织红细胞(RRneo)	人红白血病 K562 细胞(K)	K-RRneo	*恶性逆转, 波型蛋白基因表达受抑, 表达人型血红蛋白	[28,29]
10. 非红系对照—小鼠 B 淋巴细胞	小鼠 SP2/O 或 NS-1, BW 等	淋巴杂交瘤	*各型恶性淋巴瘤, 产生抗体	[10,15,16] [17,19,28]

* 恶性逆转包括生长曲线、分裂指数、³H-TdR 掺入率下降, 在软琼脂中失去集落形成及在裸鼠体内丧失致瘤能力等, 部分标本测了癌基因探针的 Northern blot, 表明癌基因 C-myc 等被抑制。

表 1 中 1~3 为小鼠网织红细胞 (R) 与小鼠骨髓瘤细胞 (BW5147 胸腺淋巴肉瘤、NS-1 及 SP2/O 浆细胞瘤) 分别进行同种杂交所建成的 3 种胞质体杂种细胞 (cybrid cells)。BW-R、NS-R 及 SP-R 均呈现恶性逆转的表型特征 (包括生长曲线、分裂指数、³H-TdR 并合率下降, 失去集落形成和在裸鼠体内的致瘤能力等) 和表达小鼠型的血红蛋白等分化特征。

表 1 中 4、5 为小鼠网织红细胞与人类早幼粒白血病突变株细胞 (HL-60-AR) 及人类浆细胞瘤细胞 (HMy-2) 分别进行异种杂交建成的 HL-R 及 HMy-R 胞质杂种细胞系, 除呈现恶性表型逆转 (包括癌基因表达受抑) 外, 并表达了人型血红蛋白。表中 6、7 为兔网织红细胞 (RR) 与小鼠 BW 及 SP2/0 二种骨髓瘤细胞分别异种杂交, 所建立的 BW-RR 及 SP-RR 两种胞质杂种细胞。同样出现恶性表型逆转, 而且同时表达了小鼠和兔型血红蛋白。8 为用大鼠有核红细胞 (RNR) 与小鼠浆细胞瘤 (SP2/0) 杂交建成的 SP-RNR 杂交细胞 (hybrid cells), 在恶性逆转的同时, 表达了大、小鼠型血红蛋白。表中 9 为兔网织红细胞与人 K562 红白血病细胞异种杂交的胞质杂种细胞。呈现恶性表型逆转和表达人型血红蛋白。对照实验均以小鼠淋巴细胞与上述部分相应肿瘤细胞进行同条件下融合作为比较, 它们均形成众所周知的淋巴杂交瘤细胞, 并未逆转肿瘤恶性。

表中 4, 在杂交前先用 MNNG-8Ag 处理, 将人早幼粒白血病细胞 (HL-60) 变成缺失 HGPRT 的突变株 (HL-60-AR), 然后与网织红细胞杂交; 另将此突变株异种移植至裸鼠皮下, 建成了在体内传代的裸鼠人白血病细胞系 (HL-60-AR/NU)。实验证明, 这二种突变细胞在诱导分化药物维甲酸 (RA) 和二甲基亚砜 (DMSO) 等作用下, 与胞质体杂交的结果一致, 可以向正常方向分化。细胞形态、功能、膜受体、酶活性、增殖能力、致癌性以及 7 种癌基因表达 (C-myc, H-ras, fos, sis, abl, erb-B 及 V-Ki-ras) 等均发生了改变, 分化性状具有遗传稳定性^[18]。

值得注意的是, 宿主瘤细胞中原来不活动的珠蛋白基因, 在杂交后可为外源红细胞胞质中的 EDDF 因子所激活。呈现反式调节效应 (transacting regulatory effect)。1986 年, Baron 亦曾报道经 DMSO 诱导的小鼠红白血病细胞 (MEL) 或人类红白血病 K562 细胞, 与人成纤维细胞或 HeLa 细胞杂交后的杂种细胞中, 出现人型 α 及 β 珠蛋白基因产物血红蛋白, 和我们的结果不谋而合。表明, 已分化和癌变的细胞珠蛋白基因并不是不可逆地受抑 (封闭) 或丢失, 在适当的相应因子作用下, 仍可重新被激活。Westin 等^[21]指出, HL-60 细胞被诱导进行分化时, C-myc 癌基因的表达率下降 80%~90%, 我们的胞质体杂交细胞中, C-myc 基因的表达活性也明显受抑, 这为红细胞分化去核因子调控肿瘤恶性提供了基因水平的证据。在我们的实验中, 分化去核因子 (EDDF) 还特异抑制起锚定细胞核位置作用的波形蛋白基因的活动, 准确地模拟了哺乳类红细胞终末分化期的停止细胞分裂, 转向细胞去核分化的自然现象, 并重排细胞分化基因表达的开关调节, 这为长期未解决的细胞分化机理问题提供了线索。

3 EDDF 的分离、提纯、活性分析及基因克隆

在上述一系列实验证明哺乳类红细胞中存在终末分化去核调节因子的基础上, 我们进行了从红细胞中分离纯化活性因子、活性作用分析以及基因克隆的工作。首先制备兔网织红细胞裂解物上清液, 用 Sephadex G-100 进行柱层析后, 加到体外培养的转化小鼠成纤维细胞 L929 体系中, 可见浓度达到占培养液终体积的 1.5% 时, L929 细胞的分裂活动及集落形成能力即明显受抑, 表明兔网织红细胞裂解上清液中含有该活性物质^[22]。进一步从盐酸苯胍诱发贫血的新西兰兔网织红细胞中 (表 2) 提纯活性物质, 发现微量浓度 (0.1~0.2 μ g/ml) 的提纯物即可达到完全抑制体外培养 L929 细胞及人鼻咽癌 KB 细胞株的分裂及集落形成活动。提纯物在电泳上为单一条带, 分子量约 15kD。理化性质分析表明为蛋白质 (在蛋白酶 K 处理后失活, 耐热力达 100℃10 分钟以上)^[23,24]。

表2 红细胞分化去核因子的提纯及其生物学活性

提纯步骤	蛋白质含量	抑制浓度	纯化倍数	产率 (%)
1. 兔网织红细胞裂解液	1000mg	3mg	1	100.00
2. 选择性变性	13mg	80~100 μ g	33	43.20
3. Sephadex G-100 洗脱液	53 μ g	0.5~1 μ g	4000	21.00
4. DEAE 纤维素洗脱液	5 μ g	0.1~0.2 μ g	20000	10.10
5. CM 纤维素柱洗脱液	3 μ g	0.05 μ g	31000	9.10

对上述二种体外培养细胞进行了一系列指标的分析,表明除生长曲线、分裂指数较之对照组明显下降外,生长抑制率(>50%), ^3H -TdR 参入率(下降2~8倍),群体倍增率(由对照的6.6%~8.6%下降至3.6%~0.15%),集落形成率则完全被抑制^[24]。取得了与细胞杂交类似的抑制肿瘤或转化细胞恶性生长的效果。

采用硫酸铵盐析的分离、等电聚焦,正相和反相高压液相色谱等纯化手段,取感染 FVA (Friend 贫血病毒) BALB/c 小鼠的脾红细胞经培养不同发育期(12, 24, 36, 48, 60, 72 小时)后,分别分离纯化,比较各期 EDDF 对 MEL 红白血病细胞生长的抑制率。绘制分化各期细胞 EDDF 活性的动态曲线(图1),证明从中幼红细胞分离的活性蛋白含量最高。经反复纯化后的 8kD EDDF,对 MEL 及 K562 细胞有明显的抑制分裂作用。而且所有上述提纯的 EDDF 均能与 β -珠蛋白基因上游区的 HS2 增强子标记探针有特异结合活性^[33]。

3.1 EDDF 的氨基酸序列分析及基因克隆

将 8kD EDDF 进行氨基酸序列分析,表明为碱性蛋白, N 端下列 15 个氨基酸的序列³³与上述从兔提纯的活性蛋白前 7 个氨基酸序列完全^[23]相同:

N'-Leu - Arg - Ile - Gln - Thr - Ile - Lys - Val - Trp - X - Asp - Gln - Lys - Gln
(X 为未确定氨基酸)

查询蛋白质数据库,未发现同源序列。以上述氨基酸序列设计引物,对用人胚肝细胞 mRNA 为模板进行 RT-PCR 扩增取得的片段,合成混合寡核苷酸探针。从 λ gt11 人胚肝文库中筛选阳性片段,再扩增和克隆至 T 载体,经过数次文库的筛选克隆和 PCR 扩增,得到一个全长为 759bp 的 cDNA 序列(图4),具有加尾信号和 225nts 的阅读框架,编码 73 氨基酸。查询 GenBank (编号为 Accession AF048847)未见同源序列,只在终末分化期出现核浓缩的人红细胞和睾丸中特异表达。

GenBank Accession Number: AF048847 (Quan Du and S. P. Xue 1997)

Product: HFLEST-741 Human fetal liver EDDF Erythroid

differentiation related factor

```

1  TAATACCACT  CACTATAGGC  AGACCCAAGC  TTGGTACCGA  GCTCGGATCC  50
51  ACTAGTAACG  GCCGCCAGTG  TGGTGGAATT  CCGTTCCTGC  AGATCACCAA  100
101 GCAGTCTCCT  GGCCCGCGGC  TGCTCCGGGC  CTCACATCTG  CTGCTGGCCT  150
151 CGGTGGGCTC  TGACTGCGGG  GCTCAGGGGC  CTGGGGCCAT  GCCTTCTTTC  200
201 TCGCCCCCCA  AATGCCTTTC  CTGGAGTGGC  TAAGCCTCTC  CTGACGAGGC  250
251 TCCTC

```

```

256 ATG CGG GGA GAG GGC TGG GGT CCA GGG GTT TCC CGG CCC 294
    M  R  G  E  G  W  G  P  G  V  S  R  P
295 TTT CTG CAA GTG TGC CAC CCC CCT CCA GTC TGC GAC TGC 333
    F  L  Q  V  C  Q  P  P  P  V  C  H  V
334 CGT GCC CGG GGG ACA TCC TGC GCC CAG GCT GGA GGC CCT 372
    R  A  R  G  T  S  C  A  Q  A  G  G  P
373 GCC TCG CTG CTT GCC AGC CTC ACC TGC TGG GGC TGG AGG 411
    A  S  L  L  A  S  L  T  C  W  G  W  R
412 CCA TGG ATC CCT CAT AGT ACT CAA GTT TTG AGT TCC TGT 450
    P  W  I  P  H  S  I  Q  V  L  S  S  C
451 TTT TCG CCT TAT AGT TTT GTG AGT GTT TGA 480
    F  S  P  Y  S  F  V  S  V  *

481 GGGACAACGA CCAAAGGTCT TTTCCGCACC ATGTTTAAAT CAAAGTTGTT 530
531 TAAAACAAA TTAATTTTAA AAAATACATA AAAGCAACCC ATGCTTATGC 579
580 TTA AAAAAGA GTACAGCAT CTGGAGTCCG TTGAAGGCTA AAGGCCCTGC 628
629 GCAAGCTGCC AGTCGGCTCT TTTTCGCAA GCCTTCCAGA AGTTTTCGT 677
678 GCTTATGAAA GCGTATGTGT GGCCTTCTC TTCCCTTCTT TTATTAAACA 727
728 CAGATAGCTT TATGCTGGAA AAAAAAAAAA 757

```

图4 人胚肝红细胞分化去核相关基因(EDDF)克隆的核苷酸全长序列及其下方编码起始及终止密码区内的氨基酸序列

3.2 免疫法筛选人胚肝红细胞分化相关基因

以人胚肝终末分化期红细胞中 HS2 (珠蛋白基因 5'端 LCR 区增强子) 结合蛋白为抗原免疫 BALB/c 小鼠, 通过杂交瘤单克隆抗体技术, 筛选抗红细胞分化相关单抗。采用表达文库的免疫筛选法, 从 λ gt11 人胚肝文库中筛选到二株部分序列的 cDNA^[32], 再以之为探针, 进一步从人胚肝文库中筛选出二个全长序列的红细胞终末分化相关基因: EDRF1 (长 1.2kb, 阅读框编码 147 氨基酸) 和 EDRF2 (长 500bp., 阅读框编码 107 氨基酸, 有一典型亮氨酸拉链结构域, 为一反式调节因子)。二者的对应 mRNA 只在终末分化期人红细胞中出现。在 GenBank 中的编号分别为 AF040247 和 AF040248, 均为无同源序列的新基因。在 GenBank 的序列如下:

```

AF040247      (Wang, X., Shen, B, F, and Xue, S, P. 1997)
product = "erythroid differentiation - related factor 1"
translation = "DESYSEEEEEMPDSDENGSYSTSSDPSDDSKAVAIKSV
               GELSVPEKYKSIHQIRPSCAFPVCHDTEERCRLVLVSYVL
               EGLKFVDSSIRKEATFQQLDPSTPIPLKYEDDLPE"
BASE COUNT    115 a    69 c    75 g    80 t

```