

MOLECULAR SURGERY
FOR BRAIN TUMOR

脑肿瘤分子外科学

名誉主编 杜子威
主编 黄强

副主编 陈忠平
兰青



中国科学技术出版社

R739.41
H9

脑肿瘤分子外科学

MOLECULAR SURGERY FOR BRAIN TUMOR

名誉主编	杜子威
主 编	黄 强
副 主 编	陈忠平
	兰 青

中国科学技术出版社

·北 京·

图书在版编目(CIP)数据

脑肿瘤分子外科学/黄强等主编. - 北京:中国科学技术出版社,1997

ISBN 7-5046-2454-3

I. 脑… II. 黄… III. 脑肿瘤-分子生物学:外科学 IV. R739.41

中国版本图书馆 CIP 数据核字(97)第 27245 号

中国科学技术出版社出版

北京海淀区白石桥路 32 号 邮政编码:100081

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

北京市燕山联营印刷厂印刷

*

开本:787 毫米×1092 毫米 1/16 印张:17.875 字数:429 千字

1998 年 5 月第 1 版 1998 年 5 月第 1 次印刷

印数:1—1 000 册 定价:40.00 元

内 容 简 介

本书深入浅出地介绍了肿瘤基因及其治疗、肿瘤免疫及其治疗、肿瘤标志物、细胞分化与凋亡等各类肿瘤,特别是脑肿瘤在病因、诊断与治疗方面的基础研究及进展情况。全书贯穿了从分子水平设计、细胞水平验证到整体水平实施的新思路。阐述的内容中有基本概念、最新成果和对未来的展望,多数还涉及到当今科研的前沿情况。本书不仅适合神经外科学界、肿瘤学界医生,而且还适合医学院校学生、研究生和临床医师、教师参考。

MÓLECULAR SURGERY FOR BRAIN TUMOR

INTRODUCTION

This book introduces the latest progress in oncogenes, tumor vaccination, antitumor antibodies, tumor markers, cell differentiation, apoptosis, etc, for pathogeny, diagnosis and treatment of human tumors, especially brain tumors, using molecular biological techniques. "Designing at the molecular level, confirming at the cellular level and practising at the systemic level" is a concept pervading the whole book. This book includes some fundamental concepts, advanced achievements, and even future prospects of the most prominent researchers. It could be a very useful reference tool not only for neurooncologists, neurologists, neurosurgeons and oncologists, but also for medical students, graduate students, general practitioners and teachers.

编委会名单

名誉主编	杜子威	教授	中国苏州医学院 日本国庆应义塾大学
主 编	黄 强	教授	中国苏州医学院 日本国藤田保健卫生大学
副 主 编	陈忠平	博士	中国苏州医学院 加拿大国麦吉尔大学
	兰 青	博士	中国苏州医学院 日本国昭和大学
编 委	杨伟廉	博士	中国苏州医学院 美国俄亥俄州大学
	朱剑虹	博士	中国南京医科大学 美国哈佛大学医学院
	李晓楠	博士	中国苏州医学院 美国得克萨斯州儿童医院
	孙林泉	博士	中国苏州医学院 瑞士洛桑大学医学中心

Editors

- Editor-in-chief of honor **Du Zi-wei**, Professor, M.D., Ph.D.,
Suzhou Medical College of P.R. China
Keio University School of Medicine, Tokyo, Japan
- Editor-in-chief **Huang Qiang**, Professor, M.D.,
Suzhou Medical College of P.R. China
Fujita Health University School of Medicine,
Toyoake, Japan
- Associate Editor-in-chief **Chen Zhong-ping**, M.D., Ph.D.,
Suzhou Medical College of P.R. China
McGill University of Montreal, Quebec, Canada
Lan Qing, M.D., Ph.D.,
Suzhou Medical College of P.R. China
Showa University School of Medicine, Tokyo, Japan
- Editors **Yang Wei-lian**, M.D., Ph.D.,
Suzhou Medical College of P.R. China
Ohio State University of U.S.A.
Zhu Jian-hong, M.D., Ph.D.,
Nanjing Medical University of P.R. China
Harvard Medical college of U.S.A
Li Xiao-nan, M.D., Ph.D.,
Suzhou Medical College of P.R. China
Texas Children's Hospital of U.S.A.
Sun Lin-quan, M.D., Ph.D.,
Suzhou Medical College of P.R. China
Centre Hospitalier Universitaire Vaudois of
Lausanne, Switzerland

Table of Contents

Chapter 1. Oncogenes and Gene Library	Wu Jian-qiang.
Chapter 2. Gene Therapy for Tumors	Sun Lin-quan.
Chapter 3. Drug Resistant Genes of Brain Tumors	Chen Zhong-ping.
Chapter 4. Pedigree of Gliocyte Differentiation and Glioma	Xia Chun-lin.
Chapter 5. Differentiation Therapy for Tumors	Li Xiao-nan.
Chapter 6. Antiglioma Monoclonal Antibody from Hybridoma	Yang Wei-lian.
Chapter 7. Monoclonal Antibody from Genetic Engineering	Xu Zhi-yuan.
Chapter 8. Specific Bifunctional Antibody	Lou Mei-qing.
Chapter 9. Brain Tumor-Immune Networks	Chen Zhong-ping.
Chapter 10. Antitumor Vaccination	Dong Jun.
Chapter 11. Immuno-Radioisotope	Lan Qing.
Chapter 12. Immuno-Cytotoxin	Shao Guo-fu.
Chapter 13. Apoptosis and Brain Tumors	Gong Zhi-gang.
Chapter 14. Markers of Brain Tumor	Huang Qiang.
Chapter 15. Brain Tumor Models	Yi Fu-xin.
Chapter 16. Tumor Angiogenesis	Chen Zhong-ping.
Chapter 17. Brain Microvascular Endothelial Cell: Culture and Characteristics	Qian Zhi-yuan.
Chapter 18. Human Glioma Cell Lines: Culture and Biological Characteristics	Guan Wei.
Chapter 19. Blood Brain Barrier and Blood Tumor Barrier	Yang Wei-lian.

前 言

现代分子生物学在生命科学领域中所起的作用越来越受到人们的重视,其中对脑肿瘤的防治倍受关注。“分子水平的设计与研究,细胞(亚细胞)水平的验证,整体水平的实施”这一科研模式,已成为时代的趋势。就脑肿瘤而言,因位于神经中枢这一特殊部位,在防治方面,比其他肿瘤有更大的难度,既往的外科手术只能治愈脑外疾病,如脑膜瘤和脑动脉瘤等,而脑内疾病如胶质瘤和帕金森病等则无法用手术治愈,因而人们对用分子生物学技术治愈外科手术无法治愈的疾病寄予厚望。Richard Stone(1992年)首先提出了分子外科治疗脑肿瘤(molecular surgery for brain tumor)这一新概念,很快得到了 Jack. A. Roth 的响应,他以分子外科治疗癌症(Molecular Surgery for Cancer)为题,发表了长篇论著,引起同仁们的极大关注。那么,分子外科的含意是什么呢? Richard Stone 指出:美国国家卫生保健中心一个外科小组决心在基因治疗的基础上,用分子技术开创新的治疗手段,以治疗那些不能手术的肿瘤,这一方法称分子外科学(molecular surgery)。而 Jack. A. Roth 则将其引伸为:在分子水平上对肿瘤预防、诊断和治疗都可归入分子外科范畴。这当然是可以理解的,对现代外科学来说预防和诊断同样是外科医生工作不可分割的一部分。本书取名为“脑肿瘤分子外科学”是在他们的启发下产生的,旨在介绍,但更主要的是探索用分子生物学技术诊断和治疗脑肿瘤的新途径。

本书的 10 多位编著者都是著名的神经外科学专家、笔者的恩师杜子威教授的弟子,目前他们虽然人在四方(海内外),却都向着同一专业方向——分子外科学迈进,在长达 20 多个春秋中,始终如一地遵循着上述的“分子—细胞—整体”这一科研模式,所取得的研究成果将在本书中得到反映,他们撰写的有关章节都是在攻读神经外科学博士和/或硕士学位课题,或从事博士后研究期间所做的相关课题的一部分或全部。在基因治疗等分子外科领域中,脑肿瘤可谓“后起之秀”,但在其他方面则是“后生之辈”,为了力求知识的完整性,本书还介绍了其他肿瘤分子外科内容。此外,还通过电子信箱收集国际资料,尽可能地将一些最新信息收入其中,但由于分子生物学这门崭新的学科正处在日新月异的变化中,加之笔者水平有限,取舍可能欠妥,不尽人意之处在所难免,恳请同仁们和读者们不吝批评指正,以便再版时改正。

在本书的编著过程中得到了苏州医学院神经科学研究所包仕尧教授、苏州医学院学报编辑室杨仲昆教授的指导,在此谨致谢意。

黄 强

1997 年 5 月于苏州医学院

FOREWORD

The importance of molecular biology in the field of life science has been evidenced by many studies, and the application of this new technology in the prevention and diagnosis of brain tumors has attracted more and more attention. "Designing and testing hypotheses at the molecular level, confirming results at the cellular (subcellular) level and practising methodologies at the systemic level", as a research idea is becoming the tendency of the day. The prevention and treatment of brain tumors, due to their specific localization in the central nervous system, are more difficult than that for other tumors. Since conventional surgery can only cure extraencephalic diseases, such as meningioma and aneurysm, but not intraencephalic diseases, such as, glioma and Parkinsons' disease, the molecular biological approach provides a potential for curing these challenging diseases. In 1992, Richard Stone introduced, for the first time, the concept of "molecular surgery for brain tumor" in Science. This new idea was immediately addressed by Jack A. Roth and has now attracted serious attention among researchers. What does "molecular surgery" mean? Dr. Stone suggested introducing gene therapy as molecular surgery for the treatment of inoperable tumors. In "Molecular Surgery for Cancer" published in Arch Surg in 1992, Dr. Roth extended application of molecular biological techniques for the prevention, diagnosis and treatment of cancer. This is understandable since prevention and diagnosis are inseparable parts of the job for surgeons in this modern surgery era. Inspired by them, this book, named "molecular surgery for brain tumor", will not only introduce but, more importantly, explore new approaches for diagnosis and treatment of brain tumors using molecular biological techniques.

The contributors of this book are all students of professor Du Zi-Wei, a famous neurosurgical specialist and my respectful teacher. Although they are all over the world, they have aimed at the same point-molecular surgery. The work described in this book presents the abundant successes of more than 20 years of uninterrupted research following the idea of "molecule-cell-system" as mentioned above. These chapters represent the works of their graduate and/or postdoctoral researches. Using on-line literature search, we have collected the largest and the latest information possible. In view of the rapid changes occurring in this field, this book may not cover all aspects concerning brain tumors. The editors would welcome any comments or suggestions for future editions.

Huang Qiang
Suzhou Medical College
March 1997

目 录

1. 肿瘤基因及其文库	吴建强(1)
2. 肿瘤基因治疗	孙林泉(20)
3. 肿瘤耐药基因	陈忠平(38)
4. 胶质细胞分化谱系与胶质瘤	夏春林(50)
5. 肿瘤促分化治疗	李晓楠(70)
6. 杂交瘤单克隆抗体	杨伟廉(79)
7. 基因工程单抗	许志元(88)
8. 双特异性抗体	楼美清(109)
9. 脑肿瘤免疫网络	陈忠平(122)
10. 肿瘤疫苗	董 军(132)
11. 免疫核素	兰 青(154)
12. 免疫毒素	邵国富(168)
13. 细胞凋亡与脑肿瘤	贡志刚(183)
14. 脑肿瘤标志物	黄 强(194)
15. 脑肿瘤模型	衣服新(207)
16. 肿瘤血管形成	陈忠平(221)
17. 脑微血管内皮细胞的培养及其生长特征	钱志远(232)
18. 人胶质瘤细胞体外培养及其生物学特征	官 卫(243)
19. 血脑屏障与血瘤屏障	杨伟廉(262)

1. 肿瘤基因及其文库

1992 年, Richard Stone 提出的肿瘤分子外科新概念, 在某种程度上可以理解为进入分子医学时代的外科医生, 应把用“分子刀”治疗手术刀不能根治的恶性肿瘤视为己任, 而“分子刀”的“开刀”对象最主要的就是肿瘤基因, “开刀”的方法就是对那些异常基因进行改造。本章仅介绍前者, 后者将在其他有关章节中叙述。

1.1. 基因和基因调控

1.1.1. 基因的基本概念

在自然界各种生物都能通过生殖产生子代, 子代和亲代之间不论其形态构造还是生理机能的特点都相似, 这一现象称遗传; 但是, 子代和亲代之间, 子代各个体之间亦存在差异, 这种现象称变异。自然界的遗传和变异的现象, 究竟是通过何种途径产生的呢? 1865 年, 孟德尔发现并提出了“基因”这一概念, 试图回答此问题, 但由于当时技术条件的限制, 未能深入研究。基因究竟是什么物质? 化学结构如何? 有何功能? 直到 20 世纪中叶才被人们重视。Avery 等 (1944 年) 从死亡的致病性肺炎球菌中提取与纯化到 DNA, 并证实这种纯化的 DNA 能使非致病菌株转化为致病菌型, 确定了 DNA 控制表型的作用, 人们才开始找到基因是生命的遗传物质的证据, 其本质是脱氧核糖核酸(DNA)。遗传物质以遗传信息的形式不断传递给子代, 保持了生物种系和个体的稳定延续; 同时, 在进化过程中, 基因亦在不断地发生改变, 从而导致变异。

1.1.2. 基因的结构^[1]

基因是基本的遗传单位, 其本质是 DNA。Watson 和 Crick(1953 年)提出的 DNA 双螺旋模型学说(图 1-1)显示了 DNA 自我复制机理, 从而使人们能够用分子生物学知识来解释遗传现象, 大大推动了分子生物学的发展。从生化角度看, 基因的化学成分是 DNA, 它是合成有功能的蛋白质多肽链或核糖核酸(RNA)所必需的全部核苷酸序列。DNA 的分子量很大, 其中含有许多基因, 每个基因就是 DNA 分子中某一特定的功能性片段。根据功能不同, 可分为结构基因(structure gene)和控制基因(controlling gene)。结构基因是指决定生物蛋白质分子结构的基因; 控制基因本身并不决定生物的蛋白质分子结构, 但其产物能调节结构基因的活性。

Philip Sharp 和 Philip Leder(1977 年)发现并提出了断裂基因(split gene)这一概念, 即真核细胞的基因中并非整个连续的 DNA 片段都编码相对应的蛋白质, 其中间隔着一些不编码蛋白质的节段, 即内含子(intron), 而对蛋白质编码的节段则称为外显子(exon), 同时, 一个完整的基因还包含着其他一些成分, 如启动子、增强子等(图 1-2), 从而使人们对基因的分子结构有了更深入的了解。Sharp 和 Leder 的这一研究成果获得了诺贝尔医学奖。

1.1.3. 基因与染色体

在任何种系的细胞中, 由许多基因组成的基因组总是定位于一定的染色体上, 要了解基因的化学本质, 必须对染色体的化学成分进行分析。染色体是由核蛋白构成, 用化学方法将核蛋白分解后发现染色体的主要组成成分为 DNA 和碱性蛋白(组蛋白), 同时, 亦含有非组蛋白(酸性蛋白)和 RNA。一般情况下, 基因组在染色体上的排列较稳定, 但也可以发生易位、缺失和重排。例如, 对胶质瘤来说, 自 Yamada 和 Sadi(1980 年)首次将 G 带技术应用于脑实体瘤染色体分析以来, 已发现脑胶质瘤中有多种染色体畸变, 以 7、9、10、13、17、19、22 和 X 染色体改变

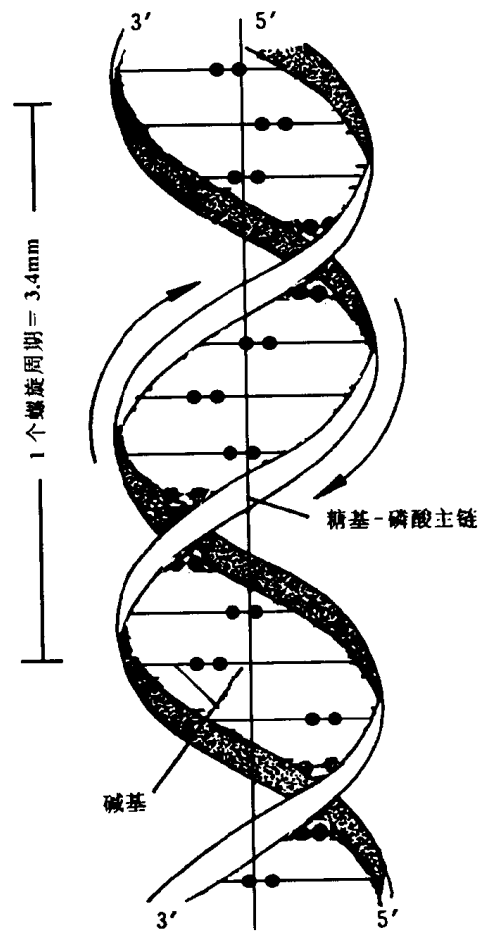


图 1-1 DNA 双螺旋结构模型

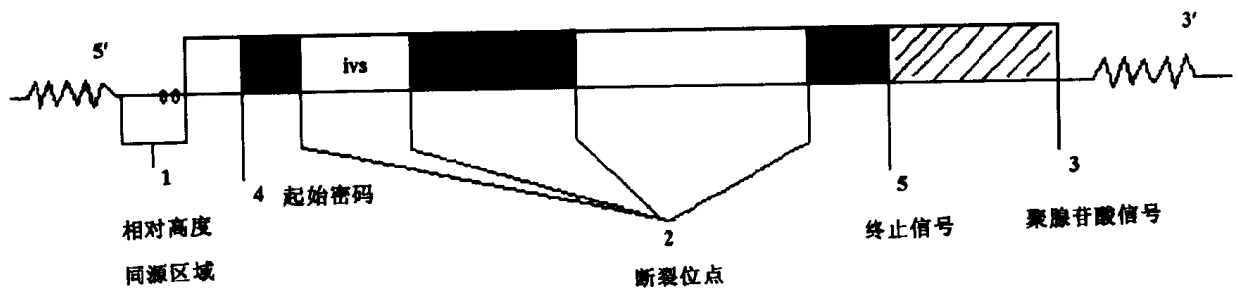


图 1-2 基因的结构(以 γ -球蛋白为例)

最常见^[2-4]。正是由于这些染色体的异常变化,导致了某些基因的缺失、激活和(或)失活,从而导致肿瘤形成。笔者曾用13例胶质瘤手术标本直接制片分析染色体的变化,结果与上述的基本一致^[5,6]。

1.1.4. 基因的表达和调控^[7,8]

1.1.4.1. 基因的表达

(1)中心法则及扩充

遗传信息存在于DNA分子中,这些遗传信息通过以DNA为模板,以碱基互补的方式合成mRNA(即转录),再由mRNA从细胞核进入细胞浆,在细胞浆里以mRNA为模板,按照其本身的核苷酸序列指导和控制蛋白质的合成(即翻译),此即为中心法则。但后来发现,一些RNA病毒,如流行性感冒病毒,在感染宿主细胞后,则在宿主细胞内以病毒的RNA为模板合成子代病毒RNA,遗传信息通过RNA复制的方式进行传递,因此,中心法则有了扩充,将经典的中心法则进行修正(图1-3)。

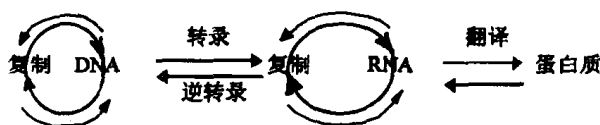


图1-3 修正后的中心法则

(2)遗传密码词典

蛋白质都是由氨基酸组成,这些氨基酸首先连接成多肽链,然后再形成具有一定空间构象的蛋白质,蛋白质种类的不同主要取决于多肽链中各种氨基酸的排列顺序差异。众所周知,mRNA的4种碱基为A(腺嘌呤),U(尿嘧啶),G(鸟嘌呤),C(胞嘧啶),它们影响多肽链中不同氨基酸的排列顺序是每三个相邻碱基(三联密码)决定一种氨基酸,因此,根据A、U、G、C的排列组合得到了一个遗传密码词典(表1-1),其中UAA、UAG和UGA是无意义的密码,即它们并不决定任何氨基酸,但在蛋白质合成时,它们却是肽链增长的停止信号(称终止子)。每一种三联密码指使一种特定的氨基酸与毗邻的氨基酸连接起来,形成一种肽链(蛋白质),如合成肽链很长,也可形成有立体结构的蛋白质。

1.1.4.2. 真核基因表达的调控

真核生物体中不同的细胞分担不同的蛋白质合成,每个细胞接受基因组中一个DNA拷贝,一个基因合成一种多肽,但有的基因处于永久开放状态,有的基因处于半开放状态,有的基因则是永久性关闭的,这一生理过程受到目前尚未完全阐明的“生物钟”控制,支配着某一基因是否表达,何时表达,如何表达,此即基因调控。真核生物基因调节是一个非常复杂的过程,至今对此知之甚少。本节简要介绍真核基因表达调控的基本原理。

(1)转录前基因表达的调控

转录前的调控是指发生在基因组水平上基因结构的改变。这种调控方式较稳定持久,常见方式有:

①基因丢失 体细胞分化过程中,必须将某些基因永久性关闭,达到此目的最为简单有效的方法是将这些基因丢失,但这种基因丢失主要见于一些低等真核生物,并非普遍存在。

表 1-1 遗传密码词典

第一位	第二位				第三位
(5'端)	U	C	A	G	3'端
U	苯丙氨酸	丝氨酸	酪氨酸	半胱氨酸	U
	苯丙氨酸	丝氨酸	酪氨酸	半胱氨酸	C
	亮氨酸	丝氨酸	终止	终止	A
	亮氨酸	丝氨酸	终止	色氨酸	G
C	亮氨酸	脯氨酸	组氨酸	精氨酸	U
	亮氨酸	脯氨酸	组氨酸	精氨酸	C
	亮氨酸	脯氨酸	谷氨酰胺	精氨酸	A
	亮氨酸	脯氨酸	谷氨酰胺	精氨酸	G
A	异亮氨酸	苏氨酸	天冬酰胺	丝氨酸	U
	异亮氨酸	苏氨酸	天冬酰胺	丝氨酸	C
	异亮氨酸	苏氨酸	赖氨酸	精氨酸	A
	甲硫氨酸	苏氨酸	赖氨酸	精氨酸	G
G	缬氨酸	丙氨酸	天冬酰胺	甘氨酸	U
	缬氨酸	丙氨酸	天冬酰胺	甘氨酸	C
	缬氨酸	丙氨酸	谷氨酸	甘氨酸	A
	缬氨酸	丙氨酸	谷氨酸	甘氨酸	G

②基因扩增 当发育分化或环境条件发生改变时,对某种基因产物的需求量剧增,而仅靠调节其表达活性不足以满足需要时,常通过增加该基因的拷贝数即基因扩增来调节基因表达。扩增的基因可游离存在,亦可嵌入染色体。其机理目前仍不清楚,多数学者认为是基因反复复制的结果,但亦有人认为是姐妹染色体单体不均等交换所致。值得注意的是,不适当的基因扩增如某些癌基因的扩增,可能与肿瘤形成相关。

③基因重排 基因重排是指某些基因片段改变原来存在的顺序而重新排列组合。重排可以是空间位置或方式的改变,亦可能同时伴有某些基因片段的扩增或丢失。基因重排是基因表达转录前调控的重要方式之一。

(2)转录水平的调控

转录水平的调控是真核基因表达调控中最重要的一环,涉及多种因素的作用。虽然其确切机理仍不十分清楚,但已发现与下列因素密切相关。

①启动子(promoter) 真核生物转录的启动必须有启动基因序列,这一转录开始时使 RNA

聚合酶Ⅱ得以结合并开始转录的 DNA 序列称为启动子。启动子常位于基因转录起始位点 5' 端,只能在近距离起作用,有方向性,空间位置较恒定。其实质目前不很清楚,但典型的启动子常有下列两种:

a. TATA box: 位于转录起始点上游 30bp 处,对转录起始位置的精确性具有重要作用。

b. CAAT box: 位于转录起始点上游 50~110bp 处,它可能代表某些蛋白质辅助因子的结合部位,虽然与转录起始位置的精确性无关,但它影响转录起始的效率。

②增强子(enhancer) 增强基因表达的一段 DNA 序列称增强子,在转录过程中能增强启动子的效率,它可以位于启动子的上游或下游,且与启动子间距离不固定,无方向性,但能明显增加转录的效率。

③转录因子(transcription factor) 除启动子和增强子外,还有许多蛋白质作为转录因子参与基因转录的调控。转录因子必须具有特定的构型才能调控基因的转录,目前发现的常见转录因子的构型有 3 种,即锌指结构(Zinc finger motif)、螺旋—环—螺旋结构(helix-loop-helix motif)和亮氨酸拉链结构(leucine zipper motif)。

(3)翻译水平的调控 转录产物属 mRNA 前体,需经加帽、聚腺苷酸化、剪接和甲基化等才能成为成熟的 mRNA。在加工过程中内含子被剔除而降解,外显子则相互拼接而成为成熟的 mRNA。翻译水平的调控一般是指对 mRNA 品种的选择和 mRNA 翻译效率的调控,这大都发生于翻译起始阶段,包括:

①mRNA 掩盖蛋白(masking protein) 目前发现,有些 mRNA 结合蛋白可以通过与 mRNA 的结合而抑制其翻译的起动,只有起掩盖作用的蛋白质与 mRNA 脱离后,mRNA 才能被翻译,这种 mRNA 核蛋白复合体已在大部分真核细胞中发现。

②起动因子的活性控制 翻译的起动阶段是一个十分复杂的过程,催化该过程的已知蛋白因子很多。控制这些起动因子的活力是控制翻译的主要手段。常见方式有二种:一是起动因子的共价修饰,它主要是通过共价修饰调节起动因子活性。二是起动因子的降解灭活,即通过控制起动因子的生成和(或)促使其降解,达到控制其活性的目的。例如:脊髓灰质炎病毒通过使宿主细胞中一种帽结合蛋白(eIF-4F)的一个亚基降解,从而有效地抑制了宿主细胞自身的蛋白质合成。

③反式作用因子(trans-acting factor)mRNA 的 5'端非翻译区可能存在着翻译调节因子的识别位点,某些蛋白质因子或甾体激素—蛋白复合物可以促进自身 mRNA 的翻译,这些因子称为反式作用因子。例如:艾滋病病毒基因的某些蛋白质产物可能是其 mRNA 的反式作用因子,具有促进其 mRNA 翻译的作用。

(4)翻译后水平的调控

除上述调控外,许多蛋白质在翻译后还存在着加工、修饰、聚合等多个环节。即使同一翻译原始产物,通过不同的切割方式亦可产生不同的活性肽。

总之,基因表达的调控是一个多步骤多环节的复杂过程。除了上述顺式作用的特殊 DNA 序列影响外,转录亦受到起反式作用的蛋白质或甾体激素—蛋白复合物的影响。对于基因表达的调控虽然目前还存在着许多尚未明了之处,但是细胞中的各种成分总是相互影响、相互制约的,基因经过转录与翻译控制蛋白质的合成,蛋白质转过来又调节基因的活动。探索真核生物中基因表达调控的机制已成为分子遗传学研究的一个前沿阵地。

1.1.5. 肿瘤基因

1.1.5.1. 基本概念

自 1911 年 Rous 发现鸟类中 Rous 肉瘤病毒可使鸡发生白血病以后,人们才开始逐渐认识病毒与肿瘤的关系。特别是近年来,随着分子生物学技术的飞速发展,人们发现除了在逆转录病毒中存在肿瘤基因——癌基因(oncogene)外,在正常组织中亦存在病毒肿瘤基因,即原癌基因(proto-oncogene),它们在正常细胞的生长、发育、分化过程中起着重要的作用。正常情况下,其表达水平很低,它们的存在并不使细胞获得恶性表型,也不具备使靶细胞恶性转化的能力,只有当其被改变或不适当表达(例如扩增、重排、过度表达等)时,才引起细胞的转化和无限生长。同时,随着对遗传性肿瘤研究的深入,发现肿瘤总有某些染色体或染色体的一部分丢失,而其起源的正常组织细胞中该染色体完好无损,揭示这些染色体上具有肿瘤抑制基因(tumor suppressor gene),目前已分离到一些肿瘤抑制基因并在染色体上定位。肿瘤抑制基因参与细胞周期调节系统的负调控,即抑制细胞的增殖,这种作用一旦失去,将会导致细胞的无限增殖,即肿瘤形成^[10]。

1.1.5.2. 基因检测的临床应用

(1)检测的基本方法

①限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)分析

限制性片段长度多态性是指在基因组 DNA 中,限制酶识别位点所限定的、在不同个体中不一致的单拷贝序列,这一现象普遍存在于人类基因组中,并以简单的孟德尔显性方式遗传。在非染色体缺失性疾病中,突变往往会产生新的或消除原有的内切酶位点,而某一或某些酶切位点的改变往往与不同的遗传性疾病有连锁关系。因此,分析基因组 DNA 上多态性位点及新的酶切位点的产生,或原有酶切位点的消失而引起的酶切长度变化,是进行遗传性疾病诊断的一个重要手段。

②分子杂交 核酸分子杂交是分子生物学领域中最常用的一种基本技术方法,其基本原理是具有一定同源性的两条核酸单链在一定条件下可根据碱基互补原则结合建成双链结构。此杂交过程具有高度特异性,常用方法如下。

Southern Blot:这是指将电泳分离的 DNA 转移到一定的固相支持物(如硝纤膜、尼龙膜)上,进行杂交反应和放射自显影以测定目的基因扩增水平。利用 Southern blot 可进行克隆基因的酶切图谱分析,基因组基因的定位及定量分析,基因突变分析及限制性片段长度多态性分析。

Northern Blot:这是指将 RNA 变性电泳分离后转移至固相支持物(如硝纤膜、尼龙膜)上,并进行杂交反应以鉴定其中特定 mRNA 分子的量和大小。

点杂交(dot blot):这是近年发展起来的一种简便的分子杂交技术。可不必了解大分子 DNA 中某一特定序列的大小和位置,而只需了解 DNA 分子群体中某一序列成分的多少时,可用此法,即将待测核酸(DNA 或 RNA)加样于硝纤膜或尼龙膜,经烘烤固定后,与探针杂交和放射自显影,最后根据圆点的深浅程度判别 DNA 群体中目的基因的多少。

核酸原位杂交(nucleic acid hybridization in situ):用特定标记的已知序列核苷酸作为探针与细胞或组织切片中核酸进行杂交,并对其进行检测的方法称核酸原位杂交。该技术能在成分复杂的组织中进行单一细胞的研究而不受同一组织中其他成分的影响,特别是近年来核酸原位杂交技术更为完善和稳定,因而被广泛应用于医学分子生物学的研究。