

肿瘤的看门基因。除了皮肤肿瘤外,PTCH 基因突变也被发现存在于髓母细胞瘤^[21],髓母细胞瘤是一种神经外胚叶肿瘤,中枢神经系统缺陷是 NBCCS 的临床特点之一。但从目前的研究结果来看,皮肤^[22]、肺和食管鳞癌是缺乏 PTCH 基因突变的^[23],提示这些肿瘤的发生不是由 PTCH 基因的突变所引起,而是与其他未知肿瘤抑制基因的突变有关。

结 语

大约 1/100 的癌起源于癌症易感遗传性疾病。对于这些癌症易感遗传性疾病的研究具有重要意义,它不仅可以提供遗传性癌和相应散发性癌的发病原因,而且还可验证很多发育调控方面的知识。NBCCS 是一种罕见的肿瘤易感同时又伴有明显的发育异常的常染色体显性遗传性疾病,它目前被认为主要与果蝇发育基因 Ptc 同源的 PTCH 基因突变或 LOH 有关。PTCH 基因突变或 LOH 主要影响遗传性癌和散发性 BCC 始动过程,其他肿瘤抑制基因如 TP53 的失活或突变可促进 BCC 的生长。因此对该基因的进一步研究,将有助于产生更多的分化与生长控制之间关系方面的知识。

参 考 文 献

- [1] Gorlin, R. J. 1995, *Dermatol. Clin.*, **13**: 113—125.
[2] Hahn, H. et al., 1996, *J. Biol. Chem.*, **271** (21): 12125—12128.

- [3] Hahn, H. et al., 1996, *Cell*, **85**: 841—851.
[4] Johnson, R. L. et al., 1996, *Science*, **272**: 1668—1671.
[5] Gailani, M. R. et al., 1996, *Nat. Genet.*, **14**: 78—81.
[6] Ananthaswamy, H. N. et al., 1996, *Cancer Res*, **48**: 3341—3346.
[7] Chidambaram, A. et al., 1996, *Cancer Res*, **56**: 4562—4565.
[8] Stone, D. M. et al., 1996, *Nature*, **384**: 129—134.
[9] Knudson, A. G. 1971, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **68**: 820—823.
[10] Oro, A. E. et al., 1997, *Science*, **276**: 817—821.
[11] Altaba, A. R. 1997, *Cell*, **90**: 193—196.
[12] Therond, P. P. et al., 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**: 4224—4228.
[13] Kizler, K. W. et al., 1987, *Science*, **236**: 70—73.
[14] Dahmane, N. et al., 1997, *Nature*, **389**: 876—881.
[15] Gailani, M. R. and Bale, A. E. 1997, *J. Natl. Cancer Inst.*, **89**: 1103—1109.
[16] Vorechovsky, I. et al., 1997, *Cancer Res.*, **57**: 4677—4681.
[17] Nusse, R. J. 1994, *Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **43**: 9—12.
[18] Gailani, M. R. et al., 1992, *Cell*, **69**: 111—117.
[19] Gailani, M. R. et al., 1996, *J. Natl. Cancer Inst.*, **88**: 349—354.
[20] Sidransky, D. 1996, *Nat. Genet.*, **14**: 7—8.
[21] Raffell, C. et al., 1997, *Cancer Res.*, **57**: 842—845.
[22] Eklund, L. K. et al., 1998, *Mol. Carcinog.*, **21**(2): 87—92.
[23] Suzuki, K. et al., 1997, *Jpn. J. Cancer Res.*, **88**: 225—228.

端 粒 酶 与 肿 瘤

张如刚 袁金辉 谢 弘

(中国科学院上海细胞生物学研究所 上海 200031)

端粒(telomere)是存在于真核生物线性染色体末端,由串联重复的 DNA 序列及其相关蛋白所组成的结构。由于能防止染色体的端-端融合、重组和降解,故具有稳定染色体的作用。众所周知,参与真核生物线性 DNA 复制的

DNA 聚合酶并不能使染色体 DNA 完全复制,因而染色体末端的端粒序列在不断分裂的过程中逐渐缩短。当人染色体的末端,又称末端限制片断 TPF (terminal restriction fragments),缩短到 5—7Kbp 时,细胞就会发生衰老^[1],因此,

端粒的长度和细胞寿命的控制相关。

端粒酶是一种由蛋白质和 RNA 构成的核糖核蛋白体。在绝大多数真核生物的细胞中,端粒的长度都是通过端粒酶(telomerase)维持的。正常体细胞中,除生殖细胞、骨髓造血干细胞及外周淋巴细胞等少数细胞外,端粒酶的活性一般难以测知,随着细胞的不断分裂,染色体末端的端粒序列便会不断缩短。由于肿瘤细胞是无限增殖的细胞,不会衰老,而 85% 的肿瘤细胞都具有端粒酶的表达^[2],因此,端粒酶的活性与表达程度和肿瘤的发生、发展及转归间的关系便成为近年来生物学和基础医学共同关注的热点。

一、端粒酶与肿瘤的发生

端粒酶究竟同癌细胞的无限增殖有何关系? Harley 提出了“端粒—端粒酶”假说^[3]。他认为:由于端粒酶活性的缺如,随着二倍体细胞有丝分裂的不断进行,端粒的长度便不断缩短,当端粒长度缩短到一定程度,即所谓末端限制片段(TRF)的长度为 5—7Kbp 时,细胞进入危机期 M1(crisis M1),从而触发某种信号,使细胞周期在检查点(check point)处受阻,细胞退出细胞周期并出现衰老。如果细胞此时被病毒转染,或者某些抑癌基因如:P53、Rb 等发生突变,则细胞可以越过 M1 期而继续分裂。此时端粒酶仍然没有活性,端粒长度继续缩短,最终当细胞端粒的长度短到极限,即末端限制片段长度为 2—4Kbp 时,细胞进入危机期 M2。此时,由于染色体端粒对染色体的保护作用丧失,染色体的不稳定性增加,染色体间出现端-端融合的现象,细胞因而死亡。但其中有极少数细胞在此阶段其端粒酶活性因某种原因被激活,从而使端粒不断维持在一定的长度而不再缩短,从而稳定了染色体,细胞亦逃过死亡成为无限增殖的细胞。

这一假说已为越来越多的事实所证实:Harley 等发现人的成纤维细胞的端粒的长度

随着年龄的增长而不断地缩短^[4]。de Lange 等证明在转化细胞中端粒的长度则不变^[5]。精子中的端粒长度不因年龄而变化似可用精细胞中存在有端粒酶的活性来解释^[6]。Hiraga 等发现只有具端粒酶活性的神经上皮瘤才可以建成细胞株,而没有端粒酶活性的神经上皮瘤则不能建成细胞株^[7];这说明端粒酶的激活对于神经上皮细胞的永生是必须的。Cheng 等发现早期鼻咽癌细胞的端粒酶便已激活,提示端粒酶的激活可能是肿瘤发生的早期事件^[8]。

二、端粒酶与肿瘤的诊断和预后效果的判断

端粒酶是肿瘤诊断和预后的重要指标。Shay 等总结了近年来各种恶性肿瘤组织、癌旁组织、癌前组织及良性肿瘤组织中的端粒酶活性^[1]。发现 85% 的恶性肿瘤组织端粒酶活性均呈阳性;癌旁组织的阳性率只有 6%,而且很可能是因为 TRAP 法很敏感从而使混入其中的极少量恶性肿瘤细胞同时也被检测出来的缘故;良性肿瘤和癌前组织的阳性率分别为 14%,而正常组织,除少数种类外,其阳性率均为 0。所以端粒酶活性显然是恶性肿瘤的一种标志,其作为肿瘤标志广泛性和明确性要优于 Ki-67 和 MIB1。

端粒酶活性可以作为目前尚未发现有标志物的肿瘤的诊断指标,如恶性嗜铬细胞瘤^[9]。端粒酶活性的表达可以用来区分肿瘤的良好和恶性^[10],如前列腺肿瘤就很需要用这一类诊断手段来判断是否为前列腺癌。此外,端粒酶活性水平还可以区分肿瘤的恶性程度,从而选择恰当治疗方法,对原发性肺癌、膀胱癌、结肠癌和甲状腺癌等的研究已初步证明其可行性^[11-14]。

可以用多种材料来检测端粒酶活性,例如:对膀胱癌、结肠癌的诊断可以采用尿液和结肠洗液中的脱落细胞^[12-13],对头颈部鳞状细胞癌的诊断可以采用痰液中的脱落细胞^[15],对于乳腺癌的诊断可以采用穿刺样品^[16],对于肺癌的

诊断可以采用支气管洗液中的脱落细胞^[17]。这些诊断方法都不必采用手术取样,因此也很方便。

少数情况下,正常组织的细胞也具端粒酶活性,但比之对应恶性组织,显然要低。Kyo 等对子宫颈癌、鳞癌样内皮样品和正常宫颈样品中的端粒酶活性定量分析后发现:虽然宫颈样品和癌前样品都有端粒酶活性,但宫颈癌的端粒酶活性要比前两种高得多,可以明显区分^[18]。对卵巢癌、对应癌前组织、卵巢囊肿组织和正常卵巢组织的端粒酶活性定量分析后,得出了同样的结果,即虽然在其他非癌组织中都有端粒酶活性的表达,但和癌组织相比要低得多^[19]。

还发现部分肿瘤的端粒酶活性与肿瘤的转移相关。Hoos 等发现出现转移的乳腺癌其原发灶的端粒酶活性要比未发生转移的乳腺癌高^[20]。Hiyama 等发现端粒酶阳性的胃癌患者其淋巴结转移率较端粒酶阴性者高,且预后差^[21]。

端粒酶还可判断肿瘤的预后。Tahara 等发现端粒酶活性阳性的胃癌患者其生存期明显短于端粒酶阴性者^[22]。同样情况亦见于成纤维细胞瘤的患者,端粒酶活性阴性的 IV-S 型成纤维细胞瘤的病人还会发生肿瘤的自发退化现象^[23]。Nakarani 等发现端粒酶活性阳性的胶质母细胞瘤患者其平均生存期为 8 个月,而端粒酶活性阴性的患者则为 13.8 个月^[24]。Hiraga 等发现星形胶质瘤患者情况类似^[7]。

三、端粒酶作为肿瘤治疗靶点的可行性

由于绝大多数的正常体细胞不能测出其端粒酶活性,因此,端粒酶就有可能成为肿瘤治疗的理想的靶点。越来越多的研究表明抑制端粒酶的活性可以导致肿瘤细胞的凋亡和衰老。Horikawa 等将正常人的第三号染色体导入人肾癌 RCC23 细胞可以导致其端粒酶活性的抑

制及衰亡^[25]。Kondo 等将带有人端粒酶 RNA 组分的反义核酸的载体转入人神经胶质瘤细胞后,可引起该类细胞的凋亡和分化^[26]。

尽管上述结果令人鼓舞,但仍有一系列问题需要解决。如端粒酶活性抑制后,肿瘤细胞是否会像在某些低等生物发现的那样通过其他的途径来维持端粒的长度?端粒酶活性的抑制剂是否会对生殖细胞和骨髓造血干细胞等具端粒酶活性的正常体细胞有不良影响?端粒酶活性在肿瘤细胞的分布并非 100%,也是一个问题;迄今为止尚无动物实验治疗方面的成功报道,因而应用前景尚待论证。

总而言之,端粒酶在肿瘤的发生中具有重要的作用,有可能成为重要的肿瘤诊断和判断预后的指标。同时,它也可能成为肿瘤治疗的新靶点。

参 考 文 献

- [1] Harley CB et al., 1997, *Cancer Surveys*, 29: 263-284.
- [2] Shay JW et al., 1997, *Eur. J. Cancer*, 33: 787-791.
- [3] Harley CB et al., 1991, *Mutat. Res.*, 256: 271-282.
- [4] Harley CB et al., 1990, *Nature*, 345: 458-461.
- [5] de Lange T et al., 1990, *Mol. Cell. Biol.*, 10: 518-522.
- [6] Richard CA, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 10114-10116.
- [7] Hiraga S et al., 1998, *Cancer Res.*, 58: 2117-2125.
- [8] Cheng RYS et al., 1998, *Br. J. Cancer*, 77: 456-460.
- [9] Kutota Y et al., 1998, *Cancer*, 82: 176-179.
- [10] Lin Y et al., 1997, *J. Urol.*, 157: 1161-1165.
- [11] Albanell J et al., 1997, *J. Nat. Cancer Inst.*, 89: 1609-1615.
- [12] Kavalier E et al., 1998, *Cancer*, 82: 708-714.
- [13] Yoshida K et al., 1997, *Br. J. Cancer*, 75: 548-553.
- [14] Umbricht CB et al., 1997, *Cancer Res.*, 57: 2144-2147.
- [15] Califano J et al., 1996, *Cancer Res.*, 56: 5720-5722.
- [16] Villa R et al., 1998, *J. Nat. Cancer Inst.*,

- 90:537-539.
- [17] Yahata N et al., 1998, *J. Nat. Cancer Inst.*, **90**:684-690.
- [18] Kyo S et al., 1998, *Int. J. Cancer (Pred Oncol)*, **79**:66-70.
- [19] Kyo S et al., 1998, *Clinical Cancer Research*, **4**:399-406.
- [20] Hoos A et al., 1998, *Int. J. Cancer (Pred Oncol)*, **79**:8-12.
- [21] Hiyama E et al., 1995, *Cancer Res.*, **55**:3258-3262.
- [22] Tahara E et al., 1996, *Semin. Oncol.*, **23**:307-315.
- [23] Hiyama E et al., 1995, *Nature Medicine*, **1**:249-255.
- [24] Nakarani K et al., 1997, *Cancer*, **80**:471-476.
- [25] Horikawa I et al., 1998, *Mol. Carcinogenesis*, **22**:65-72.
- [26] Kondo S et al., 1998, *FASEB*, **12**:801-811.

噬菌体肽库技术

朱忠玉

(中国科学院上海细胞生物学研究所 上海 200031)

80年代中期,George P. Smith^[1]在前人对丝状噬菌体分子生物学研究的基础上首先提出了噬菌体展示技术(Phage Display),其核心就是将蛋白质分子的表型和基因型巧妙地结合于丝状噬菌体这样一个便于对其进行一系列生化与遗传操作的载体上,从而大大简化了蛋白质分子表达库的筛选和鉴定。基于这一优点,噬菌体库技术从出现到现在已经在现代生物学的诸多领域中得到非常广泛的应用。

噬菌体肽库技术作为噬菌体展示技术的一个非常重要的分支,其原理就是通过把大量的随机肽段与丝状噬菌体的外壳蛋白(PVIII或PIII)融合表达而被组装展示于噬菌体颗粒的表面,从而组成每个噬菌体都带有一个不同肽段的重组噬菌体库,然后用目标蛋白来筛选与之相互作用的噬菌体肽,通过分析所筛到的噬菌体肽的结构和序列,为蛋白质分子之间(如抗原与抗体,受体与配体,酶与底物)的相互作用机理提供依据,因而,这一技术在免疫学、细胞生物学和药物开发等领域中越来越受到重视。

一、噬菌体肽库技术在免疫学中的应用

噬菌体肽库技术最初在免疫学中的应用是被用于抗原决定簇的定位(Epitope mapping),

而此前对抗原决定簇的定位研究大都通过测定经过对抗原进行物理化学的降解修饰所得片段或合成的一系列来源于抗原的肽段与相关抗体的结合活性而得到的。显然,这些方法都比较费时费力。噬菌体肽库技术的引入则大大简化了这一过程。具体而言就是通过将抗原的基因片段进行随机降解然后与丝状噬菌体的外壳蛋白基因融合表达而构成一个展示于噬菌体表面的表位库(Epitope library),继后用抗原特异的抗体来进行筛选,然后分析所得的能与特异抗体结合的噬菌体肽的序列,再经过与抗原序列相比较也就得到了抗原决定簇的定位。如Wang^[4]等人成功地利用这一方法对蓝舌病毒的外壳蛋白VP5的抗原决定簇进行了定位研究。然而,在很多情况下,人们并不知道疾病的致病原,而且,也很难得到病原体特异的单克隆抗体,这也就限制了这一技术的应用。Folgori^[17,21]等人首先提出应用病人的阳性血清中的多抗就可以从噬菌体随机肽库中分离得到病原特异的噬菌体模拟肽,而且他们利用受乙肝病毒感染的病人的阳性血清中的多抗成功地验证了这一方法的可行性。同样在这一工作中,他们将得到的能与阳性血清特异结合的噬菌体肽免疫小鼠后所得的抗体与血清中抗体有交叉反应,同时也证实了这些噬菌体肽具有用作疫苗