

- 103—118.
- [2] 陈禹保, 1989, 生物化学与生物物理进展, 16: 271—275.
- [3] Egan, S. E. and Robert A. Weinberg, 1993, *Nature*, 365: 781—783.
- [4] Boguski, M. S. and McCormick, F., 1993, *Nature*, 366: 643—654.
- [5] Egan, S. E. et al., 1993, *Nature*, 363: 45—51.
- [6] Broek, D. et al., 1987, *Cell*, 48: 789—799.
- [7] Gross, E. et al., 1992, *Nature*, 360: 762—765.
- [8] Egel, R. et al., 1990, *Trends Genet.*, 6: 369—373.
- [9] Powers, S. Sem., 1992, *Cancer Biology*, 3: 209—218.
- [10] Simon, M. A., 1991, *Cell*, 67: 701—716.
- [11] Bowtell, D. et al., 1992, *PNAS*, 89: 6511—6515.
- [12] Feig, L. A., 1993, *Science*, 260: 767—768.
- [13] Gulbins, E. et al., 1993, *Science*, 260: 822—855.
- [14] Lowenstein, E. J. et al., 1992, *Cell*, 70: 431—442.
- [15] Koch, C. A. et al., 1991, *Science*, 252: 668—674.
- [16] Boguski, M. S. et al., 1992, *New Biologist*, 4: 247—260.
- [17] Marchuk, D. A. et al., 1991, *Genomics*, 11: 931—940.
- [18] Duchesne, M. et al., 1993, *Science*, 259: 525—528.
- [19] Zhang, X. et al., 1993, *Nature*, 364: 308—313.
- [20] Kyriakis, J. M. et al., 1992, *Nature*, 358: 417—421.
- [21] Hughes, D. A. et al., 1993, *Nature*, 364: 349—352.
- [22] Crews, C. M. et al., 1992, *Science*, 258: 478—480.
- [23] Parsons, J. T., 1990, *Trends in Genetics*, 6: 169—171.
- [24] Errede, B. and Levin, D. E., 1993, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 5: 254—260.

转基因小鼠在肿瘤研究中的应用

沈锡中

(上海第二医科大学附属仁济医院、上海市消化疾病研究所 200001)

将可能激发肿瘤的基因导入小鼠受精卵, 已制备了许多具有癌症倾向的小鼠系。这些小鼠能使人在整体水平系统研究不同癌基因在细胞分化、增殖中的作用以及在肿瘤发生中癌基因间的协同作用。同时, 这些小鼠具有对病毒和化学致癌物敏感的倾向, 因而为潜在致癌原测试, 治疗和预防肿瘤药物的筛选提供了很有价值的研究模型。

过去20年, 用分子克隆和基因转移等手段, 将癌基因导入特定细胞以研究癌基因在细胞转化过程中的作用机制, 取得了可喜进展。但体外培养系统具有其局限性, 因为活体内肿

瘤的形成受众多因素影响。细胞首先发生恶性转化, 新生的恶性细胞必须逃逸免疫监测, 建立自己的血液供应, 突破周围组织并转移到其他部位。而体外细胞转化受所处的特定生长环境的影响, 无法将单一的目的基因和其在整体的作用加以综合研究, 所以不能从整体水平去全面认识基因的表达, 调节及其功能。80年代初, 人们将克隆的基因导入小鼠生殖细胞系, 建立了转基因小鼠模型^[1], 使在整体水平系统地研究那些具有控制细胞生长、增殖及分

从笑倩副教授曾对本文提出宝贵的意见, 特表谢意。

化等重要功能的基因成为可能。1984年Brinster等将癌基因导入小鼠受精卵,产生的小鼠能形成脑脉络丛乳头瘤^[2],从而被认为开创了肿瘤研究的新纪元。应用转基因小鼠模型极大地推动了肿瘤形成分子机制的研究。在癌基因、抑癌基因的研究中取得了丰硕成果,并为潜在致癌原的测试,肿瘤治疗及预防药物的筛选开拓了新的途径,本文就此作一综述。

一、癌基因、抑癌基因研究中的应用

现已知道,存在于所有正常细胞中的原癌基因,在其遗传性状发生改变,导致基因的表达或产物的功能发生异常,这在许多人类和动物癌症的发生中起着关键性作用^[3]。但在人类肿瘤研究中,确定癌基因的这种改变是肿瘤的起因,还是肿瘤发展的结果是困难的。将突变的原癌基因直接导入小鼠生殖细胞系建立的转基因小鼠模型为解决这一问题提供了比较直接且明确的途径。用大鼠弹力蛋白酶 I 基因的增强子和激活的 H-ras 基因(12 位 Val 取代 Gly)组成融合基因,制备的转基因小鼠几乎 100% 产生胰腺癌^[4],直接证明了癌基因突变是肿瘤发生的起因。最初,Brinster 等将 SV₄₀ 的肿瘤抗原基因转入小鼠,发现大 T 抗原基因能在脑、肾、胸腺等组织中表达,使这些组织增生,在成体常出现脑脉络丛乳头瘤^[2]。如果用胰岛素基因的增强子与 SV₄₀ 大 T 抗原基因重组,产生的转基因小鼠常发生胰腺癌^[5]。用小鼠乳腺癌病毒(MMTV)增强子与 myc 癌基因接在一起,这一重组 DNA 所形成的转基因小鼠主要发生乳腺癌^[6]。而免疫球蛋白重链(Eu)增强子控制的目的基因常在 B 淋巴细胞中表达^[7]。因此导入小鼠生殖细胞系的顺式调控序列如启动子或增强子决定了目的基因的特异性组织表达,而致癌病毒 DNA 和癌基因是形成肿瘤的必要条件。随后的实验证明,许多病毒和细胞癌基因制备的转基因小鼠能稳定地发生肿瘤,而且转

移的特定癌基因从亲代遗传给子代后,子代小鼠常不可避免地发生特异性肿瘤,因而进一步确认癌基因的激活是肿瘤形成的关键^[8]。利用转基因小鼠模型已对几十种涉及肿瘤形成的癌基因进行了广泛深入的研究,包括生长因子基因(如编码转化生长因子 α 的 wnt-1, int-2), 细胞因子受体基因(编码膜相关受体的 erb B₂, ret), 信号转导分子基因(GTP 结合蛋白的 ras; 丝/苏氨酸激酶的 pim-1 以及酪氨酸激酶的 abl, eps 及 LCK 等), 涉及细胞生存的胞浆蛋白基因(bcl-2) 以及编码转录因子或直接调节细胞复制的核蛋白的基因(myc, N-myc, L-myc, fos, jun, 病毒 TAg, 逆转录病毒的 tat)等^[7-9]。已建立的组织特异性肿瘤模型包括血液系、神经组织、皮肤和软组织、脉管组织、乳腺、胰腺、前列腺、晶状体、垂体、心、肝、肺、肾、骨等多种组织和器官^[7-9]。

最近, p 53、RB、WT1, 等抗癌基因正迅速成为肿瘤研究中的热点。根据传统定义,抑制位点的变化是隐性的,除非两个等位基因均丢失或失活,不然无表型改变^[10]。很明显建立这类隐性基因突变至功能丧失的动物模型是很诱人的。Lavigneur 等用突变的 p 53 基因制备的转基因小鼠在多种组织中广泛表达这一突变体,20%的转基因小鼠在实验过程中发生肿瘤,主要是肺腺癌,骨肉瘤和淋巴瘤^[11]。Donehower 等采用同源重组技术将 p 53 基因的两个等位基因同时失活,建立了无功能性 p 53 基因的转基因小鼠模型。这些小鼠发育良好,但在早期即有形成肿瘤倾向,近 75% 的纯合子 6 个月内多种组织发生肿瘤,以淋巴瘤和肉瘤为主^[12]。其肿瘤发生率显著高于仅含一个 p 53 等位基因突变体的转基因小鼠,后者 18 个月内肿瘤发生率为 20%^[11]。这说明即使是单一野生型 p 53 基因也能显著减少肿瘤的发生。

二、癌基因的协同作用

传统的研究认为肿瘤形成是一个多步骤过

程,即不同关键靶基因突变导致细胞连续发生生物学改变,使细胞发生恶性转化。转基因小鼠的研究支持并扩展了这一概念。Sinn等建立了两个转基因小鼠系,其一为MMTV启动子控制的C-myc,另一为相同启动子控制的V-H-ras。将两者杂交获得同时携有myc和ras的转基因小鼠,其发生肿瘤的组织类型均相同,主要为乳腺癌。但在肿瘤发生的时间上却明显不同,myc转基因小鼠50%发生肿瘤的时间为325天,ras转基因小鼠50%发生肿瘤的时间为168天,而同时携myc和ras的小鼠46天就有50%发生肿瘤,到163天则100%发生肿瘤^[13]。证实myc和ras在体内肿瘤形成过程中具有协同作用。转化生长因子 α (TGF α)基因和c-myc在肝脏中的共表达能加速肝癌的发生^[14]。在某些情况下这类癌基因的协同作用可能由感染带有癌基因的逆转录病毒所致,如带有V-Ha-ras或V-raf的逆转录病毒感染新生Euc-myc小鼠能加速其淋巴样肿瘤的发生和发展^[15]。Moloney小鼠白血病病毒(Mo-MuLV)等逆转录病毒,本身缺乏癌基因,其主要通过随机整合于细胞原癌基因附近,影响原癌基因的表达而诱发肿瘤。因此可用MoMuLV作为标志来筛选可能的协同基因。如Eu pim-1转基因小鼠感染MoMuLV后能极大地加速淋巴瘤的发生,所有肿瘤组织的C-myc和N-myc附近均有前病毒插入,提示myc基因可能和pim-1具有协同致癌作用^[16]。但Eu myc转基因小鼠感染这类逆转录病毒后,pim-1基因附近插入前病毒并不明显加速肿瘤的发生,而和另一位点bim-1有关。bim-1表达的mRNA可能编码一种新的锌指蛋白,涉及与DNA的相互作用。因此bim-1的产物可能是一种核调控蛋白,在致癌过程中和myc相互协同^[17]。应用缺陷的逆转录病毒在转基因小鼠中筛选,确定这类控制细胞生长、分化的重要基因,具有十分广阔的应用前景。其他肿瘤病毒也有这种插入激活功能,如用MMTV感染wnt-1转基因小鼠,能显著加速乳腺癌的

发生,且每只小鼠的初发肿瘤病灶由1—2个增至5个以上。分析含前病毒的肿瘤发现两个编码成纤维细胞生长因子的基因,int-2和bst被插入激活,从而加速wnt-1转基因小鼠的肿瘤形成^[18]。

三、致癌原、肿瘤治疗 预防药物的筛选

具有肿瘤倾向的转基因小鼠对众多刺激敏感。突变原N-乙基-N-亚硝基脲能激发pim-1转基因小鼠T淋巴瘤的发生,敏感性比对照小鼠高出25倍^[19]。整合有ras基因的小鼠,单次腹腔注射50 mg/kg的甲基亚硝脲,12周内100%(56/56)出现前胃乳头状瘤,而接受同样剂量的77只对照非转基因小鼠中仅一只发生相应肿瘤^[20]。TGF α 转基因小鼠可发生肝癌,而多种化学致癌物能加速其肝癌的发生^[21]。因此转基因小鼠模型提供了很有价值的生物分析途径以检测潜在的致癌物。这种小鼠对致癌物的高度敏感性将避免检测时使用高滴度,因为高滴度时致癌物的细胞毒和丝裂原作用将占优势。这类小鼠同样也可用来测试预防肿瘤的药物。在组织培养和荷瘤裸鼠中,维生素D能抑制人视网膜母细胞瘤的生长。给转Rb基因小鼠腹腔注射维生素D₃能明显抑制该肿瘤的发生和发展^[22]。氧甾衍生物如7 β -羟基胆固醇能预防和延缓SV₄₀大T抗原转基因小鼠肝癌的发生^[23]。许多肿瘤高发品系的转基因小鼠可用于筛选治疗肿瘤的药物^[24,25]。

化学致癌物常通过诱发原癌基因和抑癌基因的突变而诱发肿瘤。如亚硝酸盐化合物能使鸟嘌呤O⁶位甲基化。在DNA合成过程中O⁶甲基鸟嘌呤能致G→A点突变。O⁶-甲基鸟嘌呤-DNA-甲基转移酶(MGMT)能将双链DNA分子中O⁶-甲基鸟嘌呤上的甲基转移到酶分子自身的半胱氨酸残基上,从而能抑制亚硝酸盐诱导的细胞恶性转化。Nakatsurn等将大肠杆菌MGMT基因导入小鼠受精卵,产生能高度

表达 MGMT 的小鼠, 其中肝脏 MGMT 的水平高出对照小鼠 3 倍。用二甲基亚硝胺诱发肿瘤, 结果表明 MGMT 转基因小鼠的肝癌发生率显著低于对照动物^[26]。Dumenco 等用人 MGMT 基因制备了能在胸腺组织高度表达的转基因小鼠, 其能防止甲基亚硝胺诱发的胸腺淋巴瘤的发生^[27]。细小病毒是一组结构简单的单链小 DNA 病毒, 能明显抑制实验动物的自发和诱发肿瘤, 能抑制包括病毒和细胞癌基因在内的多种致癌物所诱导的细胞转化^[28]。其抗肿瘤形成机理可能与它的非结构蛋白 1 (NS₁) 有关。NS₁ 具有多种生物学活性, 它通过调节 p 38 启动子而控制病毒衣壳蛋白的合成。NS₁ 能抑制 SV₄₀、LTR、HIV 等多种异源性启动子, 抑制起始密码子诱导的 DNA 放大, 以及抑制细胞癌基因如 C-myc 和 C-ras 的表达^[28,29]。我们目前正在制备细小病毒 NS₁ 基因转移小鼠模型, 以研究整合和表达的 NS₁ 基因在癌基因及致癌物诱导的肿瘤发生过程中所起的作用。这类研究无论是对了解肿瘤形成机理还是对肿瘤的预防都是很有意义的。

小 结

转基因小鼠已极大地加强了分子肿瘤学的研究, 为许多人类肿瘤的研究提供了很有价值的模型, 能精确地确定肿瘤发生各个阶段中癌基因和抑癌基因的变化, 了解肿瘤的发生, 发展过程。利用这一技术不仅能解决有关癌基因和抑癌基因体外研究中发现的许多问题, 而且能检测细胞生长和分化中起重要作用的新的基因位点。由于转基因技术具有分子及细胞水平操作, 整体水平表达的特点, 使人们能从更完整的系统中去认识生物分子的作用, 因而具有广阔的应用前景。

参 考 文 献

- [1] Costantini F and Lacy E., 1981, *Nature*, 294: 92—94.
 [2] Brinster RL. et al., 1984, *Cell*, 37: 367—379.

- [3] Bishop JM., 1987, *Science*, 235: 305—311.
 [4] Quaife CJ. et al., 1987, *Cell*, 48: 1023—1034.
 [5] Hanahan D., 1985, *Nature*, 315: 115—122.
 [6] Stewart TA. et al., 1984, *Cell*, 38: 627—637.
 [7] Adams JM., 1991, *Science*, 254: 1161—1167.
 [8] Hanahan D., 1989, *Science*, 246: 1265—1275.
 [9] Fowles DJ and Balmain A., 1993, *Eur. J. Cancer*, 29 A(4): 638—645.
 [10] Knudson AG., 1971, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 68: 820—823.
 [11] Lavigne A., 1989, *Mol. Cell. Biol.*, 9: 3982—3991.
 [12] Donehower LA. et al., 1992, *Nature*, 356: 215—221.
 [13] Sinn E, et al., 1987, *Cell*, 49: 465—475.
 [14] Murakami H. et al., 1993, *Cancer Res.*, 53: 1719—1723.
 [15] Langdon WY. et al., 1989, *Oncogene Res.*, 4: 253—258.
 [16] Van Lohuizen M. et al., 1989, *Cell*, 56: 673—682.
 [17] Haupt Y. et al., 1991, *Cell*, 65: 753—763.
 [18] Shackelford GM. et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 90: 740—744.
 [19] Brucier M. et al., 1989, *Nature*, 340: 61—63.
 [20] Ando K. et al., 1992, *Cancer Res.*, 52: 978—982.
 [21] Takagi H. et al., 1993, *Cancer Res.*, 53: 4329—4336.
 [22] Albert DM. et al., 1992, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 33: 2354—2364.
 [23] Allemand I. et al., 1993, *Anticancer Res.*, 13: 1097—1101.
 [24] Nielson LL. et al., 1992, *Cancer Res.*, 52: 3733—3738.
 [25] Dexter DL. et al., 1993, *Invest. New Drugs*, 11: 161—168.
 [26] Nakatsuru Y. et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 90: 6468—6472.
 [27] Dumenco LL. et al., 1993, *Science*, 259: 219—222.
 [28] Rommelare J and Cornelis JJ., 1991, *J. Virol. Methods*, 33: 233—251.
 [29] Caillet-Fauquet P. et al., 1990, *EMBO J.*, 9: 2989—2995.