

的一些最新进展,着重阐明 GA、ABA 等对 α -淀粉酶基因表达,生长素刺激细胞生长以及乙烯对成熟基因表达的调节。生长素和乙烯诱导专一基因表达的快速性可以解释“快反应”,表明植物激素初始作用可能包括对基因表达的调节。

参 考 文 献

- [1] Higgins T. J. V. et al., 1976, *Nature* 260 : 166.
- [2] Ho D. T. H, Varner J. E. 1974, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71 : 4783.
- [3] Muthukrishan S, et al. 1983, *Pl. Mol. Biol.* 2 : 249.
- [4] Huang J. K, et al., 1984, *J. Mol. Appl. Gen.* 2(6) : 579.
- [5] Jacobson J. V. Beach L. R, 1985, *Nature* 316 : 275.
- [6] Nolan R. C. et al., 1987, *Pl. Mol. Biol.* 8 : 13.
- [7] Deikman J, Jones R. L, 1985, *Pl. Physiol.* 78 : 192.
- [8] Deikman J, Jones R. L, 1986, *Pl. Physiol.* 80 : 672.
- [9] Muthukrishan S, 1983, *J. Biol. Chem* 258 : 2730
- [10] Parthier B, 1985, in "Plant Growth Substances" ed by Bopp M. 169.
- [11] Vanderhoef L. N, Dute R. R, 1981, *Pl. Physiol.* 67 : 176.
- [12] Theologis A, Ray P. M, 1982, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 : 418
- [13] Theologis A, et al., 1985, *J. Mol. Biol.* 183 : 53
- [14] Zurfluh L. L, Guilfoyle T. J, 1982, *Planta* 156 : 525.
- [15] Zurfluh L. L, Guilfoyle T. J, 1982, *Pl. Physiol.* 69 : 332.
- [16] Hagen G, et al., 1984, *Planta*, 162 : 147.
- [17] Hagen G, Guilfoyle T. J, 1985, *Mol. Cell. Biol.* 5 : 1197.
- [18] Theologis A, 1986, *Ann. Rev. Pl. Physiol.* 37 : 407.
- [19] Sze H, 1985, *Ann. Rev. Pl. Physiol.* 36 : 175.
- [20] McGlasson W. B, 1985, *Hortsci.* 20 : 51.
- [21] 刘愚, 1986, 大自然探索, 5 : 127.
- [22] Grierson D, 1986, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 134 : 399.
- [23] Slater A, et al., 1985, *Pl. Mol. Biol.* 5 : 137.
- [24] Tucker M. L, et al., 1985, in "Ethylene and Plant Development" ed by Roberts J. A, Tucker G. A, 163.
- [25] Smith C. J. S, et al., 1986, *Planta* 168 : 94.
- [26] Lincoln J. E, et al., 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 : 2793.
- [27] 张德颐, 1986, 大自然探索, 5 : 1215

癌细胞抗药性的分子基础

沈 鼎 武

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

肿瘤化疗过程中的最大障碍之一,乃癌细胞产生抗药性。近年来,关于癌细胞抗药机理的研究已取得了重大进展,一系列具有抗药性

的细胞突变株、系已在体外建成^[1-5],从而促进了对癌细胞抗药机理进行广泛而深入的研究。由于近代分子生物学及基因工程的快速进

展, 已能在基因水平上探讨癌细胞抗药性的分子基础。目前, 从仓鼠、小鼠及人的抗药细胞中分离出抗药基因^[6-10], 并作了DNA序列分析。抗药基因的产物为分子量170 kDa的膜糖蛋白(P170)^[11,12]。应用抗药基因作探针, 可探查抗药细胞中抗药基因之扩增及高度表达^[13-15]。藉基因转移术, 进一步证明了人抗药基因在小鼠受体细胞内表达并致使受体细胞产生抗药表型^[16,17]。晚近, 研究者的兴趣已转向更广、更深层次的探索, 即有关抗药基因产物P170的作用机制以及抗药基因研究的临床应用等。本文仅就晚近该方面工作的进展并结合作者在美国国立癌症研究所分子生物学实验室工作期间所取得的一些结果, 作一概述。

抗药细胞

为研究临床肿瘤的抗药性, 建立一系列具抗药性的人癌细胞, 无疑是有价值的。为此, 选用人表皮癌KB细胞, 经乙基甲烷磺酸盐(EMS)处理后, 分别培养于含有各种不同化疗药物如秋水仙素、长春花碱或阿霉素的培养液内一段时间, 可获得对上述药物具有不同梯度抗性的细胞。细胞的抗药性随选择时药物的浓度递加而增加。例如, KB-C6即是生长于秋水仙素6微克/毫升培养液中的细胞, 乃至KB-C10(秋水仙素10微克/毫升培养液)(作者未发表资料); 而亲本的KB细胞在秋水仙素1纳克/毫升培养液时, 仅半数存活($LD_{50} = 1$ 纳克秋水仙素/毫升培养液)。KB-A1.8和KB-V₁分别生长于阿霉素1.8微克、长春花碱1微克/毫升培养液的KB细胞。令人感兴趣的是, 这些各别分离出来的抗药细胞, 尽管在选择时采用的药物在结构和作用方式上并不相同(如阿霉素与长春花碱), 却显示出交叉抗药性。换言之, 一个对某一药物具抗药性的细胞常常具有对多种药物的耐受性或抗性。因之, 对这一特征, 已称之为癌细胞的多药耐受性(Multidrug Resistance, 缩写MDR)。诚然, MDR并不是对所有药物都是

耐受的, 如抗秋水仙素的KB细胞可耐受长春花碱和阿霉素, 但对氨基嘌呤、阿糖胞苷或地塞米松等仍然是敏感的。此外, 若将MDR细胞置于无选择压的培养液中培养一段时间后, 可获得MDR的返转细胞, 如KB-C1-R1仅保留相当低的抗药性, 这说明MDR细胞的抗药表型是可逆现象, 随着环境中的药物剂量之递减而降低。MDR细胞系列及其返转细胞系的建立, 为研究癌细胞抗药机理提供了理想的实验模型。

MDR细胞的遗传学特征

如上所述, 经一种药物选择获得的抗药细胞往往可对另一些药物也产生抗性。这提示MDR基因可能是连锁的, 并可能是一个单个基因或一组调节基因表达的结果。细胞杂交实验指出, MDR细胞与敏感细胞杂交后的子代细胞是显性的, 进一步强化了上述看法。再者, 从人的MDR细胞制备基因组DNA, 再以磷酸钙沉淀法转移到对药物敏感的小鼠NIH 3T3细胞中, 则可获得MDR的小鼠转化细胞。藉人的Alu探针证实在小鼠细胞中含有人的DNA顺序, 且随着药物选择压的增高而扩增。反之, 若用对药物敏感的人细胞的DNA或将MDR细胞的DNA以机械法剪切, 则均无此MDR转化效应^[18]。上述结果提示, 细胞的抗药性与MDR的基因(组)有密切关系, 且其基因是相当大的。

基因扩增

基因扩增现象已在一些抗药细胞中观察到^[17-20]。双微体(double minute chromosome)和同源染色区(homogeneous staining region)一般认为系基因扩增的细胞遗传学特征。经分析KB-MDR细胞的染色体组成, 发现在高度抗药性的KB-C2.5细胞内存在着大量的成对的微小染色体片段, 即双微体^[21], 而在亲本细胞及MDR返转系细胞中则未出现这类双微体结构。Roninson等^[22]在近年发展了凝胶内复

性(in gel renaturation)技术, 可用来直接探查细胞中扩增的基因顺序。其方法是将须分析的基因组 DNA 以限制性内切酶切割, 经 ^{32}P 标记后作凝胶电泳。然后予以变性、复性、及以单链专一性的 S1 核酸酶消化。由于扩增的 DNA 片段比单拷贝片段更有效地复性, 因而可防止 S1 核酸酶的消化。藉这一技术探查到 KB-MDR 细胞基因组中扩增的 DNA 片段估计在 80 kb 以上。进一步比较分析 KB-MDR 系列中不同的抗药细胞系, 如抗秋水仙素、抗长春花碱或抗阿霉素等 KB 细胞, 发现有一些扩增的基因区带在这三系抗药细胞中是共同的, 而另一些扩增的区带则因细胞而异, 显示特异性。对这一结果的最简单的解释是, 相同的基因扩增区代表了功能区, 而另一些非共同的区带则可能为伴性扩增。事实证明, 从共同扩增区中分离出的 DNA 片段可与 MDR 细胞的基因组 DNA 有杂交反应, 而与对药物敏感的亲本细胞无反应。这一方法的建立不仅可用来探查基因的扩增及扩增的基因区, 并开拓了分离目标基因的新途径。应用这一技术, 从 KB-MDR 细胞中分离出 MDR 基因, 定名为 *mdr-1*。

基因表达

应用 *p mdr 1* 探针对 KB-MDR 系列不同程度抗药细胞的 mRNA 进行 Northern 杂交, 可发现在 4.5 kb 区有一明显的杂交区带。滴

样稀释法杂交试验表明, *mdr 1* 表达的程度与细胞的抗药性强度成正相关。KB-C6 细胞的 *mdr-1* 表达可为敏感的亲本细胞之 11.000 倍; *mdr-1* 基因扩增为 80 倍, 见表 1。饶有兴趣的是, 在早期阶段的低抗药性细胞 (KB-8 和 KB-8-5) 中, 尽管细胞已呈抗药性, 且 *mdr-1* mRNA 之表达已为亲本细胞的 42 倍, 但未能探查出基因扩增现象。这一结果提示, 早期阶段的 MDR 细胞中很可能是转录基因之激活而无基因顺序之扩增。在一些其它的哺乳类 MDR 细胞系中, Northern 杂交证明 *mdr-1* 的 mRNA 亦位于 4.5 kb 区带, 其表达程度也与细胞的抗药性有关, 反映了 *mdr-1* 基因之表达在各类 MDR 细胞系中是一共同特征。DNA 介导的基因转移实验进一步证实, 获得人基因组 DNA 的小鼠 MDR 转化细胞中可发现 4.5 kb mRNA 表达区。应用克隆的 *mdr-1* 基因表达载体所进行的基因转移实验, 结果雷同。

Ling 实验室^[23,24]应用 P-膜糖蛋白(可通透的膜糖蛋白, 分子量为 170 kDa, 即 P170)抗体, 在仓鼠 MDR 细胞中分离出为 P170 编码之 cDNA。其它实验室^[26,28]也相继取得了类似成就。所有这些克隆的 P170 cDNA 均能与 MDR 细胞所表达的 4.5 kb mRNA 杂交, 与我们在人 KB-MDR 细胞中所得结果相吻合。这表明 *mdr-1* 基因与 P170 膜糖蛋白基因是同一

表 1 KB 细胞抗药性与 *mdr-1* 基因之扩增和表达*

细胞系**	相对抗药性			<i>mdr-1</i> 基因	<i>mdr-1</i> RNA
	秋水仙素	阿霉素	长春花碱	相对扩增倍数	相对表达水平
KB-3-1	1	1	1	1	1
KB-8	2.1	1.1	1.2	1	14
KB-8-5	4	3	6	1	42
KB-8-5-11	40	23	51	7	1100
KB-C1	260	160	96	10	3800
KB-C6	2100	320	370	80	11000
KB-C1-R1***	6	3	4	1	14

* 资料取自沈等^[4]和 Pastan 等^[30]。

** 人 KB 细胞经秋水仙素选择培养后获得的抗药细胞系列。

*** KB-C1-R1 系 KB-C1 的返转细胞系, 培养于无秋水仙素的培养液内。

的或极为相似的。

mdr-1 基因编码的 P-膜糖蛋白 (P 170) 之结构

用 mdr-1 基因片段作为探针, 可分离编码整个 mdr-1 基因产物的 cDNA。应用高抗药性的 KB-C 2.5 细胞的 mRNA, 制备了一个 cDNA 库, 并分离出为整个 mdr-1 基因产物 P-膜糖蛋白编码的交叠的 cDNA。顺序分析表明这种 P-糖蛋白含有 1280 个氨基酸。DNA 顺序及其编码的蛋白质顺序之分析结果提供了几个重要的线索。第一, mdr-1 基因内有两个大致相等的同源部分, 因而推测是来自一个较小基因的复制。第二, 该基因的两部分均编码六个疏水的膜跨越区 (hydrophobic membrane-spanning domains), 因而总数为 12 个区域。第三, 顺序所编码的两个核苷酸结合位点十分类似于细菌转运蛋白的亚单位, 后者是 ATP 依赖性的。实验进一步证明 ATP 结合于 P-糖蛋白上的事实, 提示核苷酸结合在这些位点上可能为转运过程提供了能源。类似的结构特征亦已在小鼠和仓鼠的 MDR 基因中观察到。

尽管 mdr-1 基因的顺序分析仍不能阐明药物结合的位置, 但鉴于这种 P-糖蛋白是由两个相似但不完全等同的部分所组成, 即每一部分具有各自的核苷酸结合位置, 提示不同部分的分子可能参与不同药物的转运之可能性。

根据 mdr-1 基因产物 P170 糖蛋白顺序的分析^[12, 26], 提示了一个简单的多种药物抗性的模式, 见图 1。推测其功能起着象外流泵 (efflux pump) 样的作用。利用磷酸核苷作为能源, 将有毒的亲水性分子通过外流泵排出细胞外。若这一模式成立的话, 则 Verapamil 可能会起到通过抑制细胞毒药物在外流泵上结合的作用, 从而克服细胞对多种药物的抗性。

mdr-1 基因在人正常组织与肿瘤中的表达

为了评估临床肿瘤中 mdr-1 之表达, 有必要先了解各正常组织中 mdr-1 的 RNA 基础水平。Fojo 等^[27]曾检测了大量的人正常组织, 发现在肾上腺(包括髓质与皮质)、肾、结肠、

表 2 正常组织和肿瘤中 mdr-1 RNA 的表达水平*

正常组织	肿 瘤	
	化 疗 前	化疗后产生抗药性
	高 表 达	
肾上腺	副神经节瘤	副神经节瘤
结肠	肾上腺皮质瘤	急性淋巴细胞白血病
肾	结肠癌	神经母细胞瘤
肝	肾 癌	
肺(2/7)**		
	低 表 达	
骨髓、脾	白血病	
皮肤、皮下组织	乳 癌	
肺(5/7)**	卵巢癌	
骨骼肌、心肌	甲状腺癌	
前列腺	神经母细胞瘤	
卵巢	副神经节瘤	
胃	肾上腺皮质瘤	

*资料取自 Fojo 等^[27]

空肠和肝等组织中有很高或较高水平之 mdr-1 表达(表 2); 而在一些其它组织中, 如脑、骨髓、脾、肺、肌肉、皮肤、卵巢、胃、前列腺等则呈现低或很低水平之表达。

临床肿瘤标本的测定结果表明, 肾上腺肿瘤、肾癌、及结肠癌等亦具有与其相应的正常组织之同等 mdr-1 RNA 含量。肾癌与结肠癌在临床上已知是十分耐受化疗因子的。这种内源性的抗药性很可能即是归诸于这些组织中 mdr-1 之高表达水平。

进一步比较分析一些肿瘤在化疗前后的 mdr-1RNA 水平, 已获得了有价值的证据。在 4 例未经化疗的急性淋巴细胞白血病患者中的癌细胞中, 全部呈低水平 mdr-1 表达。然而, 1 例在化疗过程中复发, 嗣后死亡的患者, 其 mdr-1 表达水平是相当高的, 提示该例白血病患者在化疗过程中获得了抗药性。在通常情况下未经化疗的神经细胞瘤的 mdr-1RNA 含量很低, 而在化疗一段时间后产生了抗药性, 经检测其 mdr-1 表达水平有明显增高。横纹肌肉瘤的情况雷同。副神经节瘤显示高水平的 mdr-1 表达, 推测系正常肾上腺皮质本身所具

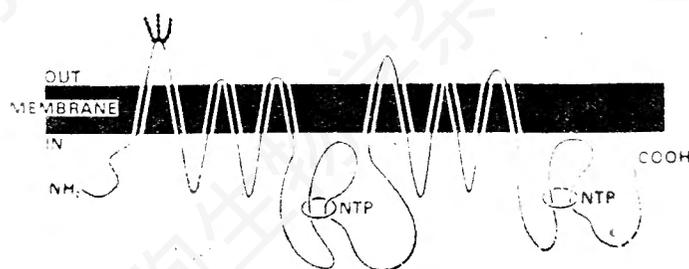


图 1 人 P-糖蛋白的模式^[12]

有的水平。上述结果表明，在化疗过程中某些肿瘤具有抗药性或在化疗过程中产生了抗药性，与 *mdr-1* 表达水平之增高有相应关系。进一步扩大对各类肿瘤、特别是化疗前后的 *mdr-1* 表达水平之检测，无疑将有助于对该一问题的深入了解。

至于为何在一些正常组织，如肝、肾、结肠及肾上腺中 *mdr-1* 基因呈高水平表达，其机理推测可能是由于 *mdr-1* 基因产物是一药物转运蛋白，因而很可能有助于肝、肾等组织把食物中的有毒物质排出。然而，人肾上腺皮质和髓质中的高水平 *mdr-1* RNA 量，则仍是一个谜，也许与这些组织中的疏水代谢物的转运有关。

临床应用与展望

上述资料表明，组织培养细胞抗药性的产生与 *mdr-1* 基因及其产物药物转运蛋白——P 170 之表达有关，在一些临床肿瘤标本中也可探查内源性 & 获得性的 *mdr-1* 过量表达。若进一步广泛分析临床手术或活检肿瘤标本之 *mdr-1* RNA 水平，将对临床决定采用何种化疗方案有指导意义。此外，若研究某些能克服细胞抗药性的化合物，亦将会增加临床化疗的成功率。晚近 Fojo 与作者等^[28] 曾应用钙离子通道阻遏物 Verapamil 和 Quinidine 观察了对 4 例 *mdr-1* 基因表达中等水平的人肾癌细胞 HTB-44、-45、-46、和 -47 之抗药性的逆转作用。发现这两种化合物均能明显增加一些化疗药物如秋水仙素、长春花碱及阿霉素等对一些已具有抗药性的细胞之杀伤力。这一证

据表明，藉某些钙离子通道阻遏剂可有效地防止癌细胞的内源的或获得的抗药性。关于 Verapamil 和 Quinidine 的作用机理，很可能系阻止药物与 P-糖蛋白之结合，从而阻断了 P-糖蛋白所起的外流泵作用^[29]。上述结果如能进一步降低 Verapamil 或 Quinidine 的自身毒性，或者采用某些类似的化合物能致使化疗药物在癌细胞内滞留积聚，从而增加抗癌药物的杀伤力，这将在临床化疗是有前途的。

结 语

综上所述，近年来有关癌细胞抗药机理的研究已取得了令人鼓舞的成就。业已阐明，细胞的抗药性与细胞内的抗药基因 *mdr-1* 之扩增与表达有关。抗药基因的产物为可通透的膜糖蛋白(分子量 170 kDa)，其功能可能起着外流泵的作用，把药物排出细胞外。然而，一些基本的科学问题仍有待深入探索。一个单个蛋白何以能结合许多不同结构的化合物，且具有相当高的亲和力？P-糖蛋白是否具有一个以上的药物结合位置？或者是否须要有多种的 P-糖蛋白来提供广谱的结合专一性？是否还涉及其它的蛋白在抗药表型中起调节作用？又是否来自于同一的 *mdr-1* 基因而通过不同的 mRNA 切割事件或者还涉及 *mdr* 基因簇中其它基因之表达？这些问题之澄清不仅可深化对细胞抗药机理的了解，且在分子细胞生物学的基础研究中也具有重要意义。

摘 要

在分子水平上研究肿瘤细胞的抗药机理业

已取得重大进展。抗药基因的分离成功及其产物P-膜糖蛋白之阐明,在抗药基因的结构与功能研究方面已进入了一个新阶段,且引向临床应用之探索。本文仅就抗药细胞之选择、遗传学特征、抗药基因的顺序分析及P-膜糖蛋白的结构以及基因的扩增、表达与转移等诸方面作了概述。对抗药基因研究之临床应用可行性亦作了探讨。

参 考 文 献

- [1] Schimke R. T. et al., 1978, *Science* 202 : 1051—1055.
- [2] Beck W. T., 1979, *Cancer Res.*, 39 : 2070—2076.
- [3] Akiyama S. I. et al., 1985, *Somatic Cell Mol. Genet.*, 11 : 117—126.
- [4] Shen D. W. (沈鼎武) et al., 1986, *J. Biol. Chem.*, 261 : 7762—7770.
- [5] Shelagh E. L. et al., 1987, *Cancer Res.*, 47 : 2594—2598.
- [6] Roninson I. B. et al., 1985, *Nature* 309 : 626—628.
- [7] Roninson I. B. et al., 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83 : 4538—4542.
- [8] Gros P. et al., 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83 : 337—341.
- [9] Gros P. et al., 1986, *Nature* 323 : 728—731.
- [10] Ueda K. et al., 1986, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 141 : 956—962.
- [11] Ling V., 1985, In: *Molecular Cell Genetics*, ed. by Gottesman M. New York, John Wiley, P. 773—787.
- [12] Chen C. J. et al., 1986, *Cell* 47 : 381—389.
- [13] van der Blick A. M. et al., 1986, *Mol. Cell Biol.*, 6 : 1671—1678.
- [14] Shen D. W. (沈鼎武) et al., 1986, *Science* 232 : 643—645.
- [15] Scott K. W. et al., 1986, *Science* 232 : 751—755.
- [16] Shen D. W. (沈鼎武) et al., 1986, *Mol. Cell Biol.*, 6 : 4039—4044.
- [17] Ueda K. et al., 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84 : 3004—3008.
- [18] Kaufman R. T. et al., 1981, *Mol. Cell Biol.* 1 : 1084—1093.
- [19] Wahl G. M. et al., 1983, *Mol. Cell Biol.*, 3 : 2066—2075.
- [20] Lau Y. F. et al., 1984, *Mol. Cell Biol.*, 4 : 1469—1475.
- [21] Fojo A. T. et al., 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 82 : 7661—7665.
- [22] Roninson I., 1983, *Nucleic Acids Res.*, 11 : 5413—5431.
- [23] Kartner N. et al., 1985, *Nature* 316 : 820—823.
- [24] Riordan J. R. et al., 1985, *Nature* 316 : 817—819.
- [25] Gros P. et al., 1986, *Cell* 47 : 371—380.
- [26] Gerlach J. H. et al., 1986, *Nature* 324 : 485—489.
- [27] Fojo A. T. et al., 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84 : 265—269.
- [28] Fojo, A. T. & Shen D. W. (沈鼎武) et al., 1987, *J. Clinical Oncol.* 5 : 1922—1927.
- [29] Cornwell M. M. et al., 1987, *J. Biol. Chem.*, 262 : 2166—2170.
- [30] Pastan I. & Gottesman M. M. 1987, *New Engl. J. Medicine*, 316 : 1388—1393.

人类特定染色体 DNA 文库的建立和利用

M. A. Van Dilla, L. L. Deaven 等

DNA 文库的建立及其应用于基因定位的可能性首先在基因组较小的生物(如果蝇)中得到证实。由于近年来原位噬菌斑和克隆杂交,改进的 λ 克隆载体以

及体外包装系统的发展,对于具有较复杂的基因组的生物(包括哺乳动物)也进行了基因文库的建立和筛选工作。已经建立了人类胚胎 DNA 片段的文库,并分