

生物学的问题。会议还指出,凡有条件的教师都应从事一项科学研究,这样才能更好地吸收新成果,并有利于在传授知识的同时,培养学生的科学研究能力。

要解决上述问题,还要解决一部分教师、学生中的某些认识问题。如认为讲课的内容越

多越好,越细越好,分子水平讲得越多就水平越高等等不正确不全面的观念等等。这样才能调动上上下下各方面的积极性共同把我国的细胞生物学教学水平提高到世界先进水平。

(何大澄、黄纯农、袁仕取等整理)

日本的癌基因研究一瞥——日本癌学会第45届年会见闻

刘定干

(中国科学院上海生物化学研究所)

日本癌学会第45届年会于1986年10月21日至23日在札幌市举行。与会者约五千人,发表报告2,272篇。报告内容遍及致癌机制、免疫学、细胞学、生物化学、组织学、病毒学、癌基因、癌细胞增殖和转移,以及医疗等问题。本文仅就笔者参加的癌基因报告会的内容,对日本癌基因研究现状作简单介绍。

癌基因的检测

会上报告的新发现的癌基因和已知癌基因的关连基因不下十种。

小池克郎等(癌研究会癌研究所)用DNA转化NIH 3T3细胞的方法,在huH 2-2肝癌细胞株中发现了新癌基因hcc-1。hcc-1基因长度在60 kbp以上,位于与整合于该细胞基因组中的乙型肝炎病毒(HBV) DNA不同的染色体上。被huH 2-2 DNA转化的NIH 3T3中不存在HBV DNA片段。此外,在另一肝癌组织中发现N-ras基因活化,其第61个密码子上发生了点突变。而此N-ras基因与整合在该肝癌组织中的HBV DNA也没有关连。因此作者们认为HBV DNA的整合和肝癌之间可能没有直接关系。落谷孝广等(大阪大学)在日本人肝癌患者中检出一个癌基因lca,长约10.5 kbp,位于2号染色体上。以上的lca和hcc-1与已知癌基因都没有同源性。由此看来,在肝癌发生过程中可能有几种不同的癌基因共同起作用。坂本裕美等(国立癌研究中心)发现了新的胃癌基因hst。高桥雅英等(爱知县癌研究中心)用DNA转化NIH 3T3细胞的方法,在来源于白血病的HL-60细胞株和THP-1细胞株中,以及在神经母细胞瘤细胞株SK-N-SH中,发现一个新癌基因ret。ret基因编码

的蛋白,其肽链C端的氨基酸序列,与已知的src基因产物中酪氨酸激酶区的氨基酸序列相比较,有40%—50%的同源性。但这个蛋白的N端序列与所有已知的癌基因产物蛋白都没有同源性。因而作者们认为,ret可能是在细胞内基因重组过程中,由两段DNA片段重组而成的一个新的转录单位。冈本宏等(东北大学)在人工诱发的大鼠胰岛B细胞瘤中,发现一个与该瘤相关的rig基因,并且有表达产物,但这个基因在大鼠正常胰岛B细胞中却不表达。他们所用的方法是:从上述瘤组织的总mRNA制成cDNA库,再用从正常胰岛B细胞总mRNA制得的cDNA(a)和从上述瘤组织总mRNA制得的cDNA(b)作探针,分别与同一瘤cDNA库作菌落杂交,选出与b杂交而不与a杂交的菌落。这就是所谓“differential colony hybridization”。作者们对取得的rig cDNA的序列分析表明,它编码一个分子量为17000道尔顿的碱性蛋白质。rig基因在大鼠、仓鼠和人的胰岛细胞瘤中活化,在人的食管癌和大肠癌中也有表达。

大会上还报告了几种和已知癌基因有关的基因,如与v-yes相关的syn和lyt(仙波宪太郎等,东京大学医科学研究所)、与v-fps相关的基因(平井久丸等,东京大学医学系;此基因尚未正式命名)和与c-src部分同源的c-slk(川上敏明等,美国NCI)。

此外,本文笔者等报告了在原核生物春日链霉菌(*S. kasugaensis*)中,检出了与真核细胞ras基因产物p 21蛋白类似的蛋白。此蛋白具有特异的GTP和GDP结合活力,并能特异地被抗真核细胞p 21的免疫球蛋白所沉淀。该蛋白经SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,

分子量约为 37 k 道尔顿, 由单一多肽链组成。同时在上述菌的 DNA 中也检出了能与真核 *v-Ha-ras* 基因探针杂交的片段。这些事实说明在这种原核生物中有类似于真核生物 *ras* 基因的基因及其产物存在。

“抗癌基因”的研究

“抗癌基因”是指一类细胞基因, 当其表达或加强表达时, 能抑制由活化或过度表达的癌基因造成的细胞表型恶性转化。这类基因目前尚未分离出来, 也有一些人对此持怀疑态度。但近来的实验提示它们极有可能是客观存在的。这次大会上有几个研究组报告了这方面的新进展。

野田亮等(理化学研究所)报告了对 DT 细胞的转化实验结果。DT 是含两拷贝的活化的 *v-Ki-ras* 基因的恶性转化细胞, 来自 NIH 3 T 3 细胞株。用正常人成纤维细胞 cDNA 库和 pSV 2 neo 质粒共转化 DT 细胞, 经 G 418 选择后, 再利用正常细胞抗乌本苷能力比 DT 细胞更强的特点, 用乌本苷筛选, 得到了两株失去肿瘤细胞的形态特征和生长特征的回复突变细胞株。用这些回复突变株的 DNA 再转化 DT 细胞, 不经乌本苷筛选, 直接用 G 418 筛选, 获得的仍是回复突变株。因此回复突变株中与 neo 连锁的某个基因(很可能就是人 cDNA 库中的)具有逆转 DT 细胞的转化表型的能力。葛卷澧等(北海道大学)用诱变剂处理被人 EJ-*ras* 癌基因转化的 NIH 3 T 3 细胞(EJ/NIH), 得到了回复突变细胞株 R-1。Southern 和 Northern 杂交表明, 在 R-1 细胞中 EJ-*ras* 基因的表达水平与 EJ/NIH 相当。EJ-*ras* 基因不能使 R-1 细胞发生转化。但 R-1 细胞的 DNA 却能使 NIH 3 T 3 细胞发生转化。因而, 在 R-1 细胞中, EJ-*ras* 虽然表达, 但其功能受到某种因素的抵消, 不能使细胞转化。及川恒之等(北海道大学)将含有活化的 *c-myc* 基因的小鼠瘤细胞 B 82, 与正常大鼠细胞融合。得到的三种杂交细胞中, 有一种在软琼脂中几乎无集落形成, 在比 B 82 细胞饱和密度低 35 倍时即表现接触抑制, 倍增时间大于 B 82 细胞一倍多。另一种杂交细胞的性质却与 B 82 基本相同。第三种杂交细胞的性质介乎以上二者之间。而这三种细胞中的 *c-myc* 基因 mRNA 的水平与 B 82 细胞没有很大差别。因而, 上述三种杂交细胞的 *c-myc* 的表达, 和细胞的生长特性变化之间, 并不显示平行关系。据此, 作者们推论, 杂种细胞表现失去肿瘤细胞性质, 似是由 *c-myc* 表达以外的原因引起的。平川忠等(味之素公司中央研究所)将 T 24 膀胱癌细胞株的 *ras* 基因, 和 SV40 病毒温度敏感突变株的大 T 抗原基

因, 共转化大鼠 REF 52 细胞。转化后的细胞的增殖速度受温度控制。在容许大 T 抗原基因表达的温度 33°C 下, 细胞增殖迅速。但在大 T 抗原基因不能表达的温度 39°C 时, 细胞增殖完全停止。在这两种情况下, 转化细胞中 *ras* 基因产物 p 21 蛋白的水平都没有明显变化, 提示 *ras* 基因的转化作用需要其他基因的协助, 而且可以通过改变后者的状态来阻遏 *ras* 基因的功能。

癌基因表达的调控

这方面的研究包括 *myc*、*ras* 族、*erb-A* 和 *erb-B*, *src*、*fgr*、*raf*、*abl*、*sis* 等癌基因。

堀井由博等(京都府医科大学)用维生素 A 酸和维生素 A 类似物 E 5166, 处理带有活化的 *N-myc* 基因的神经母细胞瘤细胞株 KP-N-RT, 结果细胞发生分化, 形成长的神经元轴突。同时 *N-myc* 的表达水平下降。因而 *N-myc* 的活化可能与未分化表型的出现有关。野濑清等(东京大学医科学研究所)用 γ 射线照射正常成纤维细胞, 得到恶性突变细胞株 CT-1, 其 *c-myc* mRNA 水平比正常高 10 倍。在 CT-1 细胞中, *c-myc* mRNA 的半衰期与正常无何差异, 但 *c-myc* 基因的转录速度提高了 3—4 倍。DNase I 酶解实验发现 CT-1 细胞的 *myc* 结构基因上游有一区域, 对 DNase I 的敏感度高于正常成纤维细胞。这提示 *myc* 基因的高表达可能与 *myc* 基因启动子附近 DNA 的序列变化所引起的二级结构变化有关。

石井俊辅等(理化学研究所)发现了人 *c-Ha-ras* 基因的促进子(enhancer)。此促进子位于基因下游, 由 28 bp 的序列重复排列而成。他们发现这 28 bp 序列重复的次数会引起促进子功能的相应变化。他们曾证明, *c-Ha-ras* 基因 BamHI 限制片段长度多态性(RFLP)是由促进子区中 28 bp 片段重复次数的变化引起的, 而各种癌症患者的白细胞 DNA 常含有正常人群所没有的 *c-Ha-ras* 等位基因限制片段。他们推测上述与癌相关的特殊 *c-Ha-ras* 等位基因的促进子区可能功能较强。若确如此, 则这个促进子的 RFLP 可能与对癌的敏感性有关。新田纪子等(国立癌研究中心)在直肠癌癌中找到活化的 *N-ras*, 并发现其第 13 个密码子有 G→C 点突变, 使原编码的 Gly 变为 Arg。

镰田伸之等(东京大学医科学研究所), 用部分缺失的 EGF 受体 cDNA(克隆于质粒中)和 pSV 2 neo 质粒, 共转化小鼠表皮细胞株 JB 6, 然后用 G 418 筛选出了约 80 株转化细胞。这 80 株转化细胞中, 有 6 株能在软琼脂上增殖, 分子杂交分析证实上述有缺陷的

EGF受体已重组入细胞基因组并被转录。这6株细胞也失去了对EGF的依赖性。因而他们认为EGF受体与细胞的转化有关。神保猛等(明治药科大学)分析了c-erbB-2基因的核苷酸序列,发现它编码一个185k的蛋白,该蛋白具有与EGF受体极其相似的氨基酸序列。但这个蛋白本身并不能与EGF结合,在EGF作用下也不发生酪氨酸激酶活力。如以EGF作用于c-erbB-2基因异常扩增的人胃癌MKN-7细胞株,发现c-erbB-2基因产物的丝氨酸和苏氨酸残基的磷酸化显著增加。用促癌物十四烷基福波醇乙酸酯(tetradecanoyl phorbol acetate, TPA)作用于MKN-7细胞,也发生同样的现象。EGF和TPA作用下c-erbB-2基因产物的磷酸化肽的肽图(peptide map)图样极为相似。从而c-erbB-2在癌发生过程中的作用及其与促癌因子的关系是很令人感兴趣的。

石川冬木等(国立癌研究中心)发现大鼠c-raf基因活化的机制是5'端与另一蛋白基因相接,形成一个大的融合蛋白基因。佐佐木茂等(日本医科大学)检查了宫颈癌、子宫内膜癌和绒毛膜上皮癌中癌基因表达的情况,发现在宫颈癌和子宫内膜癌中没有发生已知癌基因的扩增、重排等情况。绒毛癌中fms, fos, N-myc癌基因的mRNA水平增高。饭田克平等(金泽大学)在胃癌中发现c-erbB、c-myc或c-sis基因的扩增及mRNA水平增高,但表达的癌基因种类和程度依病例而异。白石昌彦等(国立癌研究中心)在46例肺癌中发现7例c-myc基因扩增,其中两例还有N-ras等位基因缺失或c-Ki-ras扩增。另有1例第8染色体数目增多,导致定位于该染色体上的c-mos扩增。4例有Ki-ras和N-ras扩增。在所有病例中,Ha-ras未见异常。

大肠癌和放射线照射剂量的关系

值得注意的是,关于1945年受原子弹放射线伤

害的人群中发生的大肠癌患者,其癌细胞中ras基因表达率和受辐射剂量的关系的报告。龟田节等(广岛大学)检查了原子弹受害者中的75例大肠癌和未受辐射的人群中的82例大肠癌。两群患者中都有66—67%的病例,其癌组织中Ha-ras基因产物p21的水平增高。受原子弹伤害的人群中,辐射剂量0拉德者,Ha-ras p21水平增高的为35%。辐射剂量为1—49拉德(平均 15.0 ± 2.18 拉德)者,Ha-ras p21水平增高的为40%。辐射剂量50拉德以上(平均 407.7 ± 170.9 拉德)者,Ha-ras p21水平增高的占75%。上述结果表明Ha-ras基因表达的增高与放射线剂量有正相关。

癌基因的克隆与表达

有4种癌基因已在大肠杆菌中克隆并表达,即c-myc(直江知树等,名古屋大学分校)、v-Ki-ras(中野洋文等,协和发酵工业股份公司)、N-ras(松井俊和等,藤田学园)和第61位密码子突变的c-Ha-ras(纸谷浩之等,北海道大学)。c-Ha-ras和v-Ki-ras是直接将军插入表达用质粒,即在大肠杆菌中获得表达的。c-myc蛋白在大肠杆菌中不稳定,因此将它和v-Ha-ras基因的一部分连接成融合蛋白基因,而获得稳定表达。N-ras则是将v-Ha-ras与N-ras的N端同源区域,与N端不完整的N-ras基因的cDNA接成一体,再转化大肠杆菌。表达出的蛋白的氨基酸序列与N-ras基因所编码的氨基酸序列完全相同。

摘 要

本文介绍了在日本癌学会第45届年会上发表的一部分关于癌基因的研究成果。在新癌基因的发现、“抗癌基因”的研究、癌基因表达的调控和癌基因的克隆与表达等方面,都有了不少新进展。