

学与生物物理学报》, 9, 169, 1977。

[13] 鲁子贤, 虞荣华: 《中国科学》, 10, 990, 1980。

[14] Blundell, T. L. and Wood, S.: *Ann. Rev. Biochem.*, 51, 123, 1982。

[15] Cutfield, J. et al.: *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 362, S. 755, 1981。

[本文于1983年4月23日收到]

甲种胎儿蛋白分子变异体研究进展

许 凯 黎

(上海市肿瘤研究所)

胚胎发育及癌变过程中, 人或动物细胞癌发育基因产物——癌胚蛋白 (oncodevelopmental proteins) 的量与质均具有一定的相似性。正常与胚胎或癌细胞之间的差异, 仅在于前者的癌基因表达被抑制, 后者去抑制。这一基本概念上的突破推动了生物学及医学的深入研究, 为癌症及其它胎儿先天性疾患的诊断奠定了基础。

当前在临床上 AFP 除已被确认为一种特异性较强的肿瘤标志物, 同时从基础上也研究了它的胚胎发育及癌变过程中基因表达、生物合成和分子构型的演变。本文着重概述 AFP 分子变异体的理化和生物学特性及其临床意义的研究进展。

一、AFP 变异体的物化特性

1. AFP 分子的不均一性

早期资料分析表明 AFP 是均一性的多肽链蛋白, 仅在高度纯化过程中因 AFP 变性形成聚合体, 电泳上才出现多种分带。

随着蛋白质分离技术进展及对 AFP 分子结构的深入了解, 证明 AFP 是由多种不均一的蛋白质分子组成。用等电聚焦电泳分析人体肝癌细胞株及猴肝癌细胞株分泌入培养液中的 AFP, 有 8 M 尿素时出现六条带、分布范围是 pH6.0—6.2, 无尿素时有二条带, 分别在 pH4.6 及 pH5.2。用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析人、大鼠及小鼠的纯化 AFP, 当用 12% 凝胶电泳分析时, 大鼠的 AFP 为二条蛋白分子带, 分

子量分别为 74000 及 72000; 小鼠也为二条带, 分子量为 73000 及 72000; 但人仅为一条带, 分子量为 70000。当凝胶浓度降至 7.5%, 大鼠出现六条带。人出现三条带。这表明在电泳中呈现的不均一性与凝胶浓度有关, 其主要原因是分子表面所带电荷不同, 而与分子大小无关^[1]。

2. AFP 与不同碳水化合物结合形成分子变异体

各种不同来源的 AFP 经电泳分离分析, 表明它们含有不同数量的碳水化合物; 含量范围在 6%—7%。各种 AFP 分子结合的碳水化合物数量上的差异, 是造成电泳分子不均一性的主要原因。用神经氨酸酶处理纯化大鼠 AFP, 使原来二条迁移率不同的蛋白带并成一条。这证实了分子中碳水化合物是造成迁移率不同的根本原因。在确认 AFP 是糖蛋白分子后, Smith 等^[2]首先将大鼠的 AFP 用刀豆球蛋白 A (Con-A) 亲和柱层析, 发现有二种与 Con-A 结合能力不同的 AFP 变异体, 即 Con-A 结合型及 Con-A 非结合型, 或细分成三种类型: Con-A 结合型、Con-A 弱结合型及 Con-A 非结合型。Kerchcart 等^[3]用植物凝集素亲和双相免疫交叉电泳, 分析人、大鼠、小鼠的纯化 AFP 与各种凝集素的结合能力, 结果发现不同的凝集素与各种 AFP 具有不同的结合能力。扁豆植物凝集素 (LCA) 仅小部分分子不与小鼠 AFP 结合, 而 Con-A 却有一半以上分子不与小鼠 AFP 结合。但 Con-A 约有 90% 与人体 AFP 结合, 而 LCA 却有 50% 与人体 AFP 不

结合。Mackiewicz^[3]证实了上述结果,人体 AFP 在 LCA 亲和双相免疫电泳中呈现三种变异体,在 Con-A 亲和电泳中仅为二种。以上结果均可从人或动物血清中获得。这表明 AFP 变异体确实存在于生物体中。

尽管 AFP 中的碳水化合物分子对植物凝集素结合能力有差异,但对 Con-A 结合型 AFP 与非结合型 AFP 中的碳水化合物组成分析表明,两者含有的糖总量几乎接近,不同之处是各种糖基组成上的差异(表 1)。

表 1 大鼠 Con-A 结合型及非结合型 AFP 碳水化合物组成

糖 类	Con-A 非结合型 (糖克分子/ 蛋白克分子)	Con-A 结合型 (糖克分子/ 蛋白克分子)
半乳糖	3.4	1.2
甘露糖	3.7	5.3
N-乙酰葡萄糖胺	2.8	3.0
唾液酸	1.7	1.7
总 量	3.4%	3.4%

Yoshima 等^[4]报道人肝癌纯化 AFP 含有门冬氨酸联结的糖链,此糖链为双叉聚糖。这说明研究 AFP 变异体的碳水化合物构型更为重要。

Bayard 等^[5]建立了高灵敏的同位素薄板层析方法,分析二种 AFP 分子变异体,结果发现每个蛋白分子含有二种聚糖分子,其中非结合型聚糖分子量分别为 2500 及 2300,结合型为 1800 及 1600。已知 AFP 分子量为 72,000—74,000,碳水化合物分子以占有总 AFP6—7% 计数,那么碳水化合物分子量应为 4500—5000 道尔顿。这完全符合每个蛋白质含有二个聚糖

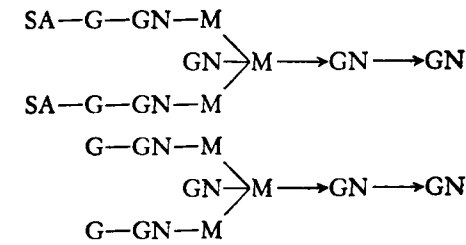
分子。经糖分子组成分析表明非结合型聚糖分子比结合型聚糖分子多二个 N-乙酰葡萄糖胺的残基(表 2)。

表 2 各种 AFP 变异体碳水化合物组成分析

聚 糖	碳水化合物残基在糖蛋白中				
	N-乙酰神经氨酸	D-甘露糖	D-半乳糖	N-乙酰葡萄糖胺	碳水化合物总量
	克分子/克分子聚糖				%
非结合型	4.1	6.0	4.2	9.8	7.4
弱结合型	3.6	6.0	4.1	8.8	6.9
结 合 型	3.7	6.0	3.8	7.9	6.6

其中 Con-A 结合型 AFP 为二个双叉聚糖,非结合型为二个叁叉聚糖,但弱结合型为一个双叉聚糖及一个叁叉聚糖。

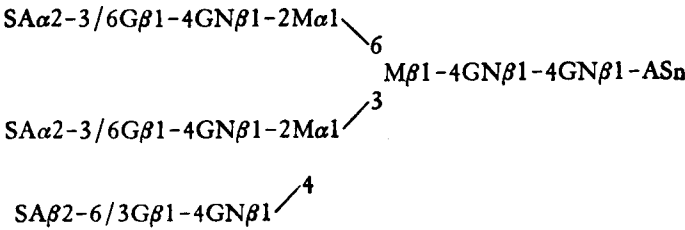
叁叉聚糖



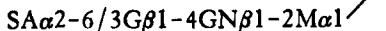
GN: N-乙酰葡萄糖胺
M: 甘露糖
G: 半乳糖
SA: N-乙酰神经氨酸

最近 Krusius 等^[6]分析胎牛血清中二种 AFP 变异体,也证实非 Con-A 结合型 AFP 为叁叉聚糖,结合型 AFP 为双叉聚糖。以下为两种 AFP 寡糖结构:

(1) Con-A 非结合 AFP 寡糖:



(2) Con-A 结合型 AFP 寡糖:



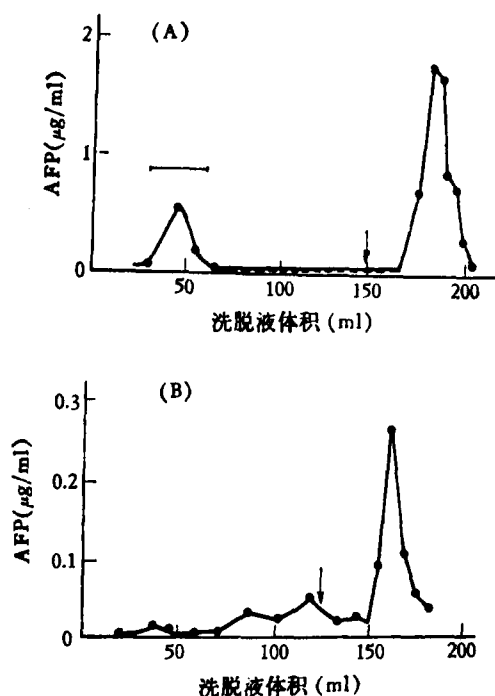


图1 用 Con-A Sepharose 亲和层析柱分离胎儿血清及羊水 AFP

A: 羊水标本 B: 胎儿血清标本
↓ 示 1M 甲基甘露糖苷洗脱起点

Mackiewicz 等^[3]用 Con-A 亲和双向免疫电泳, 检测各种人体胚胎组织体外培养时合成并分泌入培养液的各种 AFP 变异体的比值, 观察到 Con-A 非结合型 AFP 是由卵黄囊, 胚肾及胚胎细胞合成, Con-A 结合型 AFP 变异体是由胚肝细胞合成。

表3 不同时期的各种胚胎组织合成及分泌 AFP 变异体比值

器官	妊娠期(周)	同位素(μCi)	Con-A-AFP	
			结合型(%)	非结合型(%)
卵黄囊	5	¹⁴ C(50)	35	65
肝	8	¹⁴ C(50)	90	10
肝	10—11	¹⁴ C(50)	95	5
肠	8	¹⁴ C(50)	20	80
肠	10	¹⁴ C(100)	10	90
肾	10	¹⁴ C(50)	0	100
肾	13—14	¹⁴ C(50)	0	100

关于 AFP 变异体在胚胎发育中的规律性改变, 其生物学意义还有待深入研究。但已观

察到, 同种蛋白在不同细胞内有不同的糖基化过程; 转化细胞表面蛋白分子与正常细胞蛋白组成一致, 但含糖量不同。转化细胞蛋白含有较大的寡糖分子, 调理素蛋白的糖含量在羊水中含有 7—9%, 而血清仅 5%, 说明蛋白质糖基化过程是在胚胎发育时期进行调节。另外还观察到不少癌胚抗原(包括胚胎性蛋白及酶)及酸性糖蛋白等也具有类似的各种分子变异体。这似乎表明恶性细胞与正常细胞上的糖基化存在差异, 是因为癌细胞具有向胚胎早期糖基化模式转化的倾向。

除此以外, Sala-Trepat 等^[9]发现大鼠癌变时, 肝癌细胞可能存在 2—3 个 AFP 基因, 因此不能完全排除 AFP 分子变异体之间有着极细微的蛋白结构上的差异。

总之, AFP 变异体在胚胎发育及癌变时出现, 究竟是分子水平上各个 AFP 基因转录上的差异, 还是基因转录后合成的蛋白质在分化过程中糖基化不同而产生, 还需深入研究。

三、AFP 分子变异体研究的临床意义

AFP 最早发现于五十年代中期, 六十年代中期至七十年代初, 基本上明确了 AFP 在人体胚胎发育及疾病时的规律性变化。AFP 总量的检测或追踪定量测定可直接用于以下几个方面: (1) 鉴别诊断及早期诊断原发性肝细胞肝癌, (2) 诊断畸胎瘤, (3) 肿瘤治疗愈后观察, (4) 先天性胎儿畸形诊断。

近年来, 随着癌胚蛋白的深入研究, 特别是观察到 Con-A 结合型及非结合型 AFP 分子变异体在胎儿畸形及癌变时具有规律性改变, 使其在临床研究及应用方面达到更准确更深的水平。

1. 胚胎异常发育及胎儿先天性疾患

人或动物, 正常妊娠期母体血清中 AFP 与胚胎中 AFP 达到平衡, 一旦胎儿畸形或胎盘屏障发生异常, 可导致胎儿血清渗入到羊水中, 或羊水倒置入母体血清, 造成母体羊水或血清中 AFP 浓度急剧上升, 故测定母体羊水或血清中 AFP 含量可诊断胎儿疾患。但因羊水中 AFP

含量随妊娠期增加而降低,所以只有确定妊娠期才能判断羊水中 AFP 是否异常。因此总量测定有一定的局限性。

实验结果阐明,妊娠早期羊水中 AFP 约 12%—53% 来自卵黄囊,而胎儿血清中 AFP 主要来自胚肝。当胎儿发育异常时羊水中各种 AFP 变异体比值发生明显改变。Smith 等^[10]采用 Con-A Sepharose 柱分析正常及异常孕妇羊水中 Con-A 非结合型 AFP 比值,观察到胎儿疾患(包括神经管缺损,无脑儿及脊柱裂)之孕妇羊水中 Con-A 非结合型 AFP 比值明显下降,说明胚胎屏障受损使暴露的神经组织脉絡丛的体液及毛细管中胎儿血清漏入羊水,造成 Con-A 结合型 AFP 比值升高,因而测定羊水中 Con-A 非结合型 AFP 变异体比值,可用作产前早期诊断胎儿脊柱裂,而这种疾患仅靠测定 AFP 总量是不能确诊的。Kellher 等 1980^[11]测定 86 例 14—36 周胎龄的正常及异常胎儿的孕妇羊水,证实了 Con-A 非结合型 AFP 的检测具有产前诊断的重要价值。其中尤其是对某些妊娠期未能确定,但羊水中 AFP 含量异常,又和超声显像不符的某些胎儿疾患,或羊水中 AFP 含量正常的胎儿疾患的诊断。

2. 癌变与 AFP 变异体

各种肿瘤的 AFP 分子结构上的差异仅在最近几年才引起重视。特别是由于证实了胚胎细胞合成的 AFP 分子与相应的癌细胞合成的 AFP 是一致的。这种差异的意义更显重要。这为深入研究癌变过程中,癌细胞的癌发育基因产物的表达提供了重要的依据。Sakashita (1979)^[12]曾报道大鼠畸胎瘤 AFP 与肝癌 AFP 在第一相 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳及第二相免疫交叉电泳中看到畸胎瘤 AFP 迁移速度慢于肝癌 AFP,但经神经氨酸酶处理去除唾液酸后迁移率完全一致,显示不同肿瘤的 AFP 具有不同的理化特性,其中主要差异是唾液酸含量。至于人体各种肿瘤的 AFP 之间都未见差异。

Dambuyant 等^[13]从 Con-A 亲和柱层析中观察到肝癌血清中 AFP 变异体比值不同于畸

胎瘤,揭示了卵黄囊与畸胎瘤以及胚肝与肝癌合成的 AFP 分子结构相一致。作者(1982)^[14]采用 Con-A 放射亲和免疫电泳研究各不同来源的血清中 AFP 变异体,其中肝硬化及肝癌血清中以 Con-A 结合型为主,畸胎瘤以 Con-A 非结合型 AFP 为主,进一步证实了上述结果。同时也观察到胃癌肝转移血清中 Con-A 非结合型也占有相当的比值,表明胃癌细胞合成及分泌的 AFP 变异体与胚胎细胞合成的相似。

Breborowicz 等^[7]对 59 例原发性肝癌,转移性肝癌及畸胎瘤和 17 例良性肝病分别采用 LCA 及 Con-A 二种亲和电泳作 AFP 分子变异体比值分析,原发性肝细胞癌 AFP 变异体比值明显地不同于其它二种肿瘤,而三分之二的肝癌患者分子类型不同于良性肝病。宫崎纯等^[15]采用 LCA 亲和免疫电泳分析 AFP 变异体比值,经比较表明此比值可作为鉴别诊断肝癌及肝病的一种方法(表 4)。最近作者采用高灵敏度的放射植物凝集素亲和免疫电泳随访追踪某些 AFP 异常升高者,发现可及时判断各种恶性肿瘤患者(肝癌、畸胎瘤或转移性肝癌)。

表 4 各种肿瘤患者血清植物凝集素非结合型 AFP 之比值

标本	例数	Con-A	LCA
脐带血	7	0±0	97.1±4.0
肝硬化	7	11.4±7.0	87.1±8.2
肝细胞癌	11	6.0±3.9	41.1±34.4
胃肠道癌	3	51.7±12.7	31.6±41.9
畸胎瘤	2	60.0±7.0	15.0±14.1

±=平均偏差

可以预期,随着癌变与 AFP 分子变异体相关性的深入研究,人们将会更深入地了解癌变过程中癌胚蛋白基因表达的理论及实践意义。

参 考 文 献

- [1] Kerckaert, J-P. et al.: *B. B. A.*, 567, 99, 1979.
- [2] Smith, C. J. et al.: *B. B. A.*, 317, 231, 1973.
- [3] Mackiewicz, A. et al.: *Oncodevelop. Biol. and Med.*, 1, 251, 1980.
- [4] Yoshima, H. et al.: *Cancer Res.*, 40, 4276, 1980.
- [5] Bayard, B. et al.: *Eur. J. Biochem.*, 113, 405, 1981.

- [6] Krusius, T. et al.: *J. B. C.*, 257, 3453, 1982.
- [7] Breborowicz, A. et al.: *Scand. J. Immunol.*, 14, 15, 1981.
- [8] Ruoslahti, E. et al.: *Advances Cancer Res.*, 29, 276, 1979.
- [9] Sala-Trepat, J. M. et al.: *Pro. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 76, 695, 1979.
- [10] Smith, C. J. et al.: *Oncodevelop. Biol and Med.*, 1, 241, 1980.
- [11] Kelleher, P. C. et al.: *Oncodevelop. Biol. and Med.*, 1, 241, 1980.
- [12] Sakashita, S. et al.: *Carcino-Embryonic Protein*, 2, pp. 283. Elsevier/North-Holland Biomedical press, 1979.
- [13] Dambuyant, C. et al.: *Scand. J. Immunol. Suppl.*, 8, 323, 1978.
- [14] 许凯黎等:《生物化学与生物物理进展》, 6, 30, 1982.
- [15] 宫崎纯等:《肝脏》, 22(11), 51, 1981.

[本文于1983年4月27日收到]

反 转 录 病 毒 与 致 癌 基 因

尹 明 标 李 占 荣

(中国医学科学院病毒研究所药物研究所, 北京)

RNA 肿瘤病毒,现在一般称之为反转录病毒,是一组动物病毒的总称。自1908年首先发现鸡白血病病毒,1911年发现鸡肉瘤病毒以后, RNA 肿瘤病毒一直被认为是某些小鼠与禽类白血病和肉瘤的病因。最近几年,还发现反转录病毒在一些家养动物及猴子中也可引起肿瘤。反转录病毒分布广泛,不仅分布于不同的动物肿瘤中,而且也分布于正常的鸡与小鼠中。

与大多数其它类型的动物病毒不同,反转录病毒的感染很少导致细胞的破坏。一般认为,病毒感染引起细胞的死亡,是细胞对外源性毒性因子的敏感性增高所致。然而肉瘤病毒感染的细胞转化为恶性细胞,可以传代,同时产生大量的子代病毒。白血病病毒或类白血病病毒感染时,也获得类似的结果。更为有趣的是有些动物细胞从未用病毒感染,表面看来也很正常,但却可诱导出在生理与化学性质方面类似反转录病毒的颗粒^[1]。

反转录病毒与 DNA 肿瘤病毒也有本质上的差异。虽然可以用实验的方法建立 DNA 肿瘤病毒的整合基因组,但它在 DNA 肿瘤病毒的正常生活周期中较少出现。相反,反转录病毒的整合基因组,即所谓“前病毒” DNA (“provirus” DNA), 是反转录病毒正常复制周期中的中间

体。反转录病毒通过 DNA 中间体进行复制,并且在细胞中以“前病毒” DNA 的形式传递它的遗传信息。这一差异是反转录病毒分子生物学和病因学的基础^[2,3]。

因反转录病毒能诱导恶性疾病,具有异常的复制模型(借助于 DNA 中间体),以及作为水平和垂直传播因子而广泛存在于自然界,这些特征引起人们极大的兴趣。尽管反转录病毒的研究已有 70 多年的历史,但只有最近 10 余年才对它的分子生物学进行了深入的研究。阐明反转录病毒基因组结构、复制和整合过程,进而探索它与致癌基因的关系,是本文的主要目的。

一、反转录病毒基因组结构

反转录病毒基因组(禽肉瘤病毒, ASV)负责大约 3×10^5 道尔顿蛋白质的编码。所有非缺损的反转录病毒至少含有 3 个基因: gag 基因,该片段负责一种前体的编码,这一前体可被切割而产生至少 4 种毒粒结构蛋白质; pol 基因,它负责依赖 RNA 的 DNA 聚合酶(反转录酶)的编码;以及 env 基因,它负责毒粒外膜糖蛋白质的编码。这三个基因片段携带病毒复制所必需的所有信息。在某些反转录病毒中发现