

## REVIEW ARTICLE

# 分子生物學於臨床醫學之應用

王嘉聲 陳啟信 張德卿

中山醫學院醫學系 微生物暨免疫科

生命現象乃由細胞內遺傳性基因所控制。基因經由複雜的調控機制來生產蛋白質，以執行生命現象。細胞是人體最小的生命單位，當細胞生理運作失常而表現出異常現象，稱之為疾病。控制生命現象的基因由核酸組成，執行生命現象的蛋白質、脂肪及醣類分別由氨基酸、酯酸類及單糖類組成。探討這些影響生命現象最小分子之間的互動關係，稱之為分子生物學。疾病如何形成（病因學）、如何診斷及如何治療，甚至如何預防，這些問題都在考驗人類對生命現象的分子層次的瞭解程度。即使在20世紀即將結束的今天，人類對生命現象的瞭解尚處於啟蒙階段，對癌症、病毒性疾病、老化、死亡及許多臨床常見的疾病，依然束手無策。本文將概略性地介紹分子生物學在病因、診斷及治療的臨床應用。

**關鍵詞：**分子醫學，遺傳工程，基因重組，基因治療

近半個世紀以來，人類對於分子生物學和生物技術上知識的成長，可說是一日千里。而結合了分子生物學和基礎醫學之後，形成了一門新興的學問：分子醫學，它融合了免疫學、微生物學、生物化學、生理學、臨床醫學等各門學問，且從分子層面重新檢視種種舊有的問題，可說是醫學向前跨出的一大步。下面將介紹分子生物學對於致病機轉、臨床診斷及疾病治療的影響。

## 分子生物學於疾病致病機轉的應用

分子生物學的發展，為20世紀的生命科學帶來長足的進步。過去對於疾病的研究，只能以理學檢查、生化方法或觀察組織的變異推測疾病的病徵、病理變化以及致病機轉。藉由分子生物學的方法探討醫學領域的問題，研究者得以更細緻的分子反應研究細胞內部，探討生命現象。所謂的「分子醫學」更結合了免疫學、微生物學、生物化學、生理學、臨床醫學等等

的各門學問，綜合探討疾病發生的機轉，以及疾病生理的種種變化。

1953年，Watson與Crick確定了DNA的雙股螺旋結構，隨之發現基因遺傳密碼三聯體。其後科學家得以利用相關學理基礎和學說，以DNA、RNA、蛋白質之間所組構繁複萬千的各種調控表現，去了解細胞內的生理現象。而DNA結構、DNA複製、細胞分裂、染色體間的種種現象等，進一步使得孟德爾遺傳學由統計、機率所歸納出的結果和理論，有了明確的分子物理層面的解釋，加以電子顯微鏡等科學儀器設備的應用，更使得分子遺傳學能夠由染色體上DNA密碼發生的變異，來解釋遺傳疾病現象，並探討可能的致病因素。遺傳病理學家經由染色體、基因間突變、缺失、互換等等異常現象的研究，成功地解釋某些疾病的機轉；如一些單基因缺陷疾病： $\alpha$  antitrypsin deficiency, haemophilia, cystic fibrosis等等，均可由其基因缺陷位置造成的代謝障礙，進一步了解致病的原因。其他許多基因遺傳疾病，例如fragile-X

syndrome, Swyer syndrome 等等，亦可評估遺傳的發生率與嚴重度，並藉遺傳諮詢、產前檢查等優生學的方式，減少有嚴重遺傳疾病的小孩誕生，以達到防患於未然的效果 [1-3]。對於目前遺傳學上許多未解的謎團，如X染色體不活化的調控機轉、父方與母方所產生的配子中染色體被甲基化(methylation)之特異性的探討等等，均有賴於分子生物學來解答 [4-6]。

最近，醫學界在尋找遺傳性基因缺陷的過程中，產生了繪製人類基因圖的世界性計畫，並預計可於公元2002年完成；屆時可對人類疾病之研究，提供相當重要的參考價值。除了上述遺傳疾病之外，許多疾病目前也被發現與染色體的基因異常有關；例如廣泛影響人類健康的腫瘤與癌症。1960年Nowell在慢性骨髓性白血病 (chronic myelogenous leukemia) 的腫瘤細胞，找到費城染色體(Philadelphia chromosome)，而發現單一染色體上的基因異常亦可導致細胞株的惡性變化之明確證據；後繼的研究更著重於腫瘤惡性變化與基因異常的關係，進而發現了許多致癌基因、抑癌基因，並進而了解二者之間的作用調控機制，對於癌症發病原理和病程的認識與了解有極大的貢獻。1971年，Knudson提出了抑癌基因的two-hit hypothesis，用以解釋遺傳的基因變異，及偶發性腫瘤間看似不同的致病因素，而認為部分惡性腫瘤，導因於先天遺傳上的基因缺陷，合併後天外界的誘發因子的雙重打擊，才會使得癌症表現於人體。至今，two-hit hypothesis可成功地解釋不少腫瘤病徵的發病機轉，而成為癌生物學中許多確定性的觀念之一。除了癌症外，許多慢性疾病，如高血壓、肥胖、腎臟病等，亦可以分子生物的方法進行探討。這些被懷疑可能與遺傳有關的慢性疾病，為當前的熱門研究課題。而可能與致病有關聯的基因亦陸續被發現，對於疾病致病機轉的了解助益匪淺。

1998年，由於發現一氧化氮(nitric oxide, NO)在心臟血管系統內做為訊息傳遞分子，Ignarro等人獲頒諾貝爾醫學獎。此發現提供了治療血管硬化、休克與性無能等疾病的理論基礎，同時也彰顯了心臟血管疾病機轉研究的重要性 [7-8]。分子生物學在此領域提供了細胞和分子層次的研究方法；在動脈硬化的致病機轉方面，獲知內皮細胞受到傷害，會引來活化的巨噬細胞和T細胞的吸附，因而釋放出許多生長因子和細胞激素，造成平滑肌增生及位移到血管內膜，並與巨噬細胞、T淋巴細胞形成脂肪紋，進一步形成纖維化斑塊。而腫瘤內皮血管傷害的因素，如過氧化物、機械化壓力、糖化產物、免疫毒素、以及許多生長因子，更可藉分子生物學的技術來探討。針對特定

因子而設計適合的組織培養實驗方式，可探討不同因子對於血管內皮表現的方式，以及分子細胞方面對於內皮細胞中訊息傳遞的影響。

在免疫學上，透過對於免疫作用因子之基因調控之了解，人類發展出操作及控制一些免疫因子的技巧，例如細胞激素基因的轉殖：IL-2, IL-12, IFN- $\alpha$ , CM-CSF等，可幫助研究者對於種種免疫機制的了解。分子生物學研究的主要目標為核酸及其相關蛋白質的構造和機能；利用分子生物技術，將基因片段插入卵細胞中觀察基因的作用，可得到基因轉殖動物(transgenic animal)，此乃研究基因功能的一大利器。不僅如此，利用分子生物技術，亦可建立種種特定的動物模式、組織模式、細胞模式；腫瘤相關基因、內分泌的疾病、糖尿病相關基因等等的探討，均可在種種模式中逐一進行與驗證。

在肝炎、愛滋病、登革熱等等許多病毒性疾病方面，不但能夠以聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction; PCR)偵測到極微量的病毒，進而分析其核酸序列之外，更能藉由對病毒核酸序列及基因結構之瞭解，進一步探討其複製之過程、與宿主之間之互動、感染方式、表面蛋白和宿主細胞受體的關係。藉由對於病毒生理的了解，闡明其致病機轉，做為病毒性疾病預防與治療的策略。分子生物學應用在醫學方面，使研究者得以由基因層面思考問題，種種的相關技術使得人類可以調控基因、蛋白質的功能及訊息傳遞以研究種種主題，更深入探索人類病徵背後的基本機制及致病機轉。

## 分子生物學在臨床診斷上的應用

以往，因為可用於診斷的工具不足，使得許多疾病的診斷思考的方向被誤導，而在治療上發生嚴重的錯誤或是浪費時間。就結核病而言，過去須依賴X光的診斷及結核菌的培養，但是結核菌的生長速度緩慢，檢驗室的結果常常趕不上病情發展的速度；自從聚合酶反應的方法成熟之後，結核病的診斷不再是曠日費時的事。隨著分子生物學的茁壯，分子診斷學對於臨床第一線工作，造成極大的衝擊。臨床上許多方面，包括產前診斷、傳染性疾病、流行病學和許多其它的疾病，都受惠於分子醫學的發展。茲分述如下：

### (一) 產前診斷及遺傳諮詢

如果沒有產前診斷的幫助，先天有嚴重缺陷的胎兒，將被生產下來，不但造成了父母心理上的衝擊，也造成了社會的負擔。以前，許多只能靠蛋白質或酵

素來診斷的疾病，如今被DNA層面的檢查方法所取代，產前診斷的精確度大為提高。例如：*fragile-X syndrome*，是一種家族遺傳性的疾病，其後代發病愈來越早而越嚴重；決定的因素，在於chromosome 17上*FMR-1 gene*前5個UTR的(CGG)重覆體(repeats)的數目。正常人約有6至56個重覆體組合，如果大於200個重覆體組合，便會出現*fragile X syndrome*。現在我們可用DNA排序(sequencing)的方法，檢測*copy number*，進而評估胎兒疾病的嚴重性。類似的方法也應用在*β-thalassemia*點突變(point mutation)的偵測，或是血友病A(hemophilia A)、鐮狀細胞型貧血症(sickle cell anemia)等等。另外，大段基因的短缺(deletion)，也可利用PCR或是南方點凍法(southern blotting; DNA hybridization)的方法偵測，例如*α-thalassemia*的基因診斷。

## 二)傳染性疾病及流行病學上的應用

傳染性疾病幾乎都是由微生物所造成的。傳統上，須仰賴染色後在顯微鏡下觀察，或在體外培養感染源，或是針對體內抗原、抗體的效價來做診斷上之參考；但也常會遇到時效性、精確度及敏感度上的問題。而分子技術的進步，也解決了許多這樣的問題。目前運用最廣的是PCR，因為不同的微生物有它們各自特別的DNA序列。利用這一獨特的特性可設計專一性的引子(primers)，再經由PCR的放大作用，用以檢測我們預期的微生物之存在，例如*M. tuberculosis*的特異片段IS6110，可用於診斷。另外新發展的*in situ PCR*技術，可以直接對病灶切片做PCR；方法是：先行放大特定的DNA，以提高*in situ hybridization*的敏感度。同樣的，放大訊號及提高敏感度的構想，也發展出一種技術：*branched DNA analysis* [9,10]；利用*branched DNA*的特定序列來取得專一性，加上*branched DNA*上的許多enzyme，可以使微小訊號放大而提高敏感度。在流行病學方面，分子技術幫助我們針對病源淵藪、傳播方式、及不同的種類和分佈進行研究；例如：利用不同種類的限制酶(restriction enzyme)，對*adenovirus*的DNA進行RFLP分析，便可鑑別出不同的病毒類型；另外，對於RNA病毒如登革熱病毒及HIV等，可以利用RT-PCR，將其RNA基因放大，再加以定序分型。同時，由於大片斷電泳法技術的發展，使我們可以對院內感染的傳播狀況進行了解，以掌握感染源。

## 三)內科疾病之診斷

許多內科疾病都是分子層次出了問題，而造成功

能上的不全，因此如果能從分子醫學層次去作診斷，那是最直接且最準確的方法。例如對於NIDDM的病人，可以針對其胰島素接受器(insulin receptor)的基因，以RFLP或SSCP分析、或直接做DNA定序，來確定其突變的狀況[11-12]。這些方法會隨人類基因譜計畫(human genome project)的完成，而對基因和疾病間的關係更加了解。此外，目前仍在研發階段的生物晶片(biochip)，也是一種分子診斷的延伸。也許不久將來，一片指甲大的晶片便可檢測數千種的疾病，而使診斷方面更快、更精準。

## 分子基因工程在製藥上的貢獻

分子生物學促成了基因工程的發展。將某一生物的基因送入另一細胞中表現，用以大量製備此基因之蛋白產物，並可對該蛋白的功能加以研究。在此領域中最重大的突破，即為1979年Cohen等人發表的核酸重組技術[13]。所謂重組技術，指人類能夠在試管中將不同來源的DNA分子加以剪接，重新組合連結為一個新的DNA分子。藉由細菌的環狀DNA質體(plasmid)與此新的DNA分子組合後，人為地將其送入活細胞中表達，產生研究者所設計的功能性蛋白、或製造特定的蛋白質。此觀念與技術的成功建立，亦使得相關技術更為成熟發展，各種不同的基因表現系統也紛紛建立，開創了今日生物科技的輝煌成果。在臨床使用上，利用基因重組技術的菌叢化生物製劑已大量使用，且有極重大的成就。人類胰島素乃是最早利用基因工程經由大腸桿菌合成，是全世界最普遍採用的荷爾蒙製劑，和內生性胰島素具有相同的三度空間結構，解決了過去由豬、牛等動物胰臟萃取出的動物胰島素製劑，可能在人體產生的抗性以及供應不足的問題。此外，利用基因工程也合成了生長激素，以治療生長激素缺乏的小孩。合成似胰島素生長因子-1(insulin-like growth factor-1)，用於糖尿病及小孩之生長激素抗性症候群。還有許多的製劑正不斷地開發，以治療內分泌、代謝等等不同問題的病患。藉由分子生物技術，誘發了生物製劑臨床使用及商業化開發藥劑的重大契機，相關研究亦因而更加完備，因而對人類的醫療技術和增進健康有了極大的貢獻。

## 基因治療

基因治療起源於一個簡單的想法：當一基因缺陷或突變，而使其正常功能無法進行並造成疾病時，是否可以由外界導入正常的基因並使其表達，以修正其



不正常功能呢？許多單一基因缺陷的疾病，如 $\beta$ -hemoglobin缺陷所造成之 $\beta$ -thalassemia、adenosine deaminase缺陷所造成的SCID(severe combined immuno-deficiency)及hemophilia A等的基因治療法，也正在接受臨床的測試。大部份的基因轉殖治療法，利用病毒當載體 [14]，藉其對特定組織作有效感染的特性，提高基因轉殖效率，例如retrovirus及adenovirus。另外還有一些非病毒的載體，例如：liposome-mediated DNA 傳輸(transfer)，以正電的lipid包裹負電的DNA而形成liposome，再和細胞膜融合(fusion)，以達到基因傳輸的目的。除外，目前科學界也更積極的運用基因轉殖的技術，來做為預防性的基因治療，也就是所謂的DNA疫苗(DNA vaccine)；這技術是將負責製造特殊抗原的基因（如B型肝炎之表面抗原，或是日本腦炎的NS蛋白），載入表達力強的載體，再注射入人體肌肉內，經纖維母細胞的吸收再表達抗原，使身體產生免疫反應，這樣的免疫型態常可包括激素性免疫(humoral immunity)和細胞性免疫(cellular immunity)。

## 結 論

應用分子生物技術於臨床醫學的分子醫學時代，確實已經來臨。分子醫學也將是新醫療型態裡強而有力的工具。從各種疾病的探索、遺傳疾病的評估、產前的診斷、傳染性疾病的追蹤及流行病學之研究等等，都由於分子醫學的成熟，而使得以前許多未知的醫療問題，得到更進一步的瞭解或解決。DNA立體結構被確定後的近半世紀以來，人類在分子生物學上的研究及知識的成長，可說是一日千里。但是目前的分子醫學仍有許多極待克服的問題，例如許多疾病的致病機轉仍無法明確地破解，又如以病毒為載體的基因治療，其安全性及效率性都有待突破。而且許多新的問題仍不斷地產生著，像是抗藥菌株的形成，如何進一步發展新藥也是不容遲緩的。這一切並無法在短時間內完全解決，重要的是我們擁有了一套更有效解決問題的方法；分子醫學給了我們新的方向和希望。即將邁入21世紀的醫事人員，對分子生物學應該有所瞭解，以期帶給人類更好的醫療服務。

## 參考資料

- Palmer SE, Stephen K. From the clinical to the laboratory: The role of the clinician in molecular genetic studies. Arch Dermatol 1993; 129: 1424 -

9.

- Holmers NG. Canine genetic disease: The beginning or the end? Veterin J 1998; 155: 1-2.
- McPherson RA. Molecular basis of genetic disease and molecular methods. Clinics Lab Med 1995; 15: 779-94.
- Nicholls RD, Saitoh S, Horsthemke B. Imprinting in Prader-Willi and Angelman syndromes. Trends in Genetics 1998; 14: 194-200.
- Reik W. Genetic imprinting: The battle of the sex rages. Exp Physiol 1996; 81: 161-72.
- Kooy RF, Osdtra BA, Willems PJ. The fragile X syndrome and other site disorders. Cell Differentiation 1998; 21: 41-6.
- Mittal CK, Murad F. Properties and oxidative regulation of guanylate cyclase. J Cyclic Nucleotide Res 1977; 3: 381-91.
- Kattsuki S, Arnold W, Mittal CK, et al. Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine. J Cyclic Nucleotide Res 1977; 3: 23-25.
- Shen LP, Sheridan P, Cao WW, et al. Quantification of cytokine mRNA in peripheral blood mononuclear cells using branched DNA(bDNA) technology. J Immunol Methods 1998; 215: 123-34.
- Yeghiazarian T, Zhao Y, Read SE, et al. Quantification of human immunodeficiency virus type 1 RNA levels in plasma by using small-volume-format branched-DNA assays. J Clin Microbiol 1998; 36: 2096-8.
- Sakane N, Yoshida T, Yoshioka K, et al. Beta3-adrenoreceptor gene polymorphism: A newly identified factor for proliferative retinopathy in NIDDM patients. Diabetes 1997; 46: 1633-6.
- Shin CS, Kim SK, Park KS, et al. A new point mutation (3426, A to G) in mitochondrial NADH dehydrogenase gene in Korean diabetic patients which mimics 3243 mutation by restriction fragment length polymorphism pattern. Endoc J 1998; 45: 105-10.
- Cohen A, Ram D, Paiss A, et al. Deletions, rearrangements and tandem duplications of

- recombinant plasmids containing yeast ribosomal DNA. *Contrib microbiol Immunol* 1979; 6: 146-58.
14. Bunting KD, Sangster MY, Ihle JN, et al. Restoration of lymphocyte function in Janus kinase 3-deficient mice by retroviral-mediated gene transfer. *Nature Med* 1998; 4: 58-64.

## APPLICATION OF MOLECULAR BIOLOGY IN CLINICAL MEDICINE

Gar-Shern Wang, Chi-Hsin Chen and Deching Chang

*Department of Microbiology and Immunology, Shung Shan Medical & Dental College School of Medicine*

Life phenomenon is manipulated by inherent genes. Proteins are expressed to carry out biological functions after a series of sophisticated gene regulations. Cell is the basic unit of life. When a certain event in the cell acts "different", the phenotype might be called "disease". Molecular biology is a discipline of studying the molecular events including gene regulation, gene expression and functions of proteins, lipids and carbohydrates in a cell. Understanding the molecular events occurring in a cell is crucial for diagnosis, treatment and prevention of diseases. Unfortunately, there are a lot of human diseases, such as cancer, viral diseases and aging, which remain obscure. The application of molecular biology in medical science will be briefly described herein with respect to the etiology, diagnosis and treatment of clinical diseases.

**Keywords:** molecular medicine, genetic engineering, recombinant technology, gene therapy

