维普资讯 http://www.cqvip.com

重庆医科大学学报 1991年第16卷第2期

# 分子生物学技术在临床病理学中的应用

病毒性肝炎研究所 范 淳
病理生理教研室 范维珂

中图分类号 Q7

近年来，分子生物学和免疫学的发展为临床病理学提供了新的手段。重组DNA技术应用于临床病理学，代表了最新的基础研究向临床实验室的过渡，是特殊染色，酶组织化学，电镜，单克隆抗体，免疫组织化学及流式细胞计数器等技术的延伸和发展，构成了目前病理学诊断与研究中最为先进而有力的工具。特别是分子探针技术在研究组织中基因的结构及表达，绘制基因图，微生物病原体及肿瘤基因的诊断以及DNA分子重排的分子特征方面起着极为重要的作用[1]。而更为晚近所产生的聚合酶链反应（简称PCR）[2]，又大大提高了检测的灵敏度，从而将分子生物学研究推向了一个更新的高度。毫无疑问，研究基因的结构和表达与组织形态学，临床表现及预后的关系，将进一步提高我们对人类疾病的诊断与治疗的能力。因此，本文拟对可用于临床实验室的分子生物学技术及其应用作一简要的介绍。

## 一、DNA的结构与来源

重组DNA技术最大的优点就是其特异性与敏感性。目前，临床实验室最常用的技术有二种：（1）分子杂交试验；（2）限制性内切酶分析及疾病相关基因多态性分析。

DNA是由二条核苷酸链相互缠绕而形成的双螺旋结构。每条链的核苷酸碱基都特异性地与其相对链的互补碱基通过氢键相连。胸腺嘧啶与腺嘌呤相连，胞嘧啶与鸟嘌呤相连。加热时，碱基间的氢键发生断裂，二个碱基分离，称为DNA变性。而当冷却时，二

# COMPARING INVESTIGATIONS FOR CALCULATING METHOD ON THE THREE CORRELATION ANALYSIS

*Yang Zhongqin*
*Dept. of Math. -phys.*

In this paper, the relationship between calculating methods of the three correlation analyses and the differences in their applications were presented. Another expression about correlation analysis between fuzzy sets was suggested. Examples in calculating the practical datum on digital-time sequences with three correlation analysis were given

KEY WORDS CORRELATION ANALYSIS; DIGITAL-TIME SEQUENCE; FUZZY SETS; WAVEFORM SIMILARITY

维普资讯 http://www.cqvip.com

条链重新连接，称为DNA的复性。复性只有在二个碱基完全匹配时才能完成。

DNA可从活细胞悬液，冷冻保存细胞，整块组织以及冷冻或石蜡包埋组织中分离得到[3]。其中冻存在组织培养基，胎牛血清及二甲亚砜中的活细胞悬液以及立即冷冻在液氮中的组织块，是DNA最稳定的来源。而RNA由于对变性剂极为敏感，且半衰期短，所以要分离得到完整而未降解的RNA是极为困难的。目前仍常使用酚抽提法。但最有效的RNA分离法则是用异硫氰酸胍溶解细胞后，进行氯化铯密度梯度离心，分离纯化RNA。

随着限制性内切酶的发现，使得重组DNA技术得到了迅速的发展。这些酶由细菌产生，能够特异性地识别和切割4～6个碱基的DNA序列[4]。无论特异性碱基序列位于双链DNA的何处，都可被切断。犹如蛋白酶识别其特异性的多肽键一样。目前已发现有几百种内切酶，根据所用酶不同，以及相应切割位点在DNA上出现的频率不同，可产生不同大小及数量的亚基因片段。

## 二、基因的克隆与探针的制备

基因片段可被切取，重组入质粒、噬菌体及柯氏质粒等载体上。克隆的目的在于获得大量的特异性DNA片段[5]。将目的DNA片段，在限制性内切酶的作用下与载体进行重组连接，然后将重组体引入受体菌中进行克隆增殖，最后经分离纯化即可得到大量所需的目的DNA片段。

基因探针可通过不同的方式产生：（1）直接从克隆DNA的酶切片段中纯化得到，称为亚基因克隆探针；（2）也可通过mRNA的逆转录，产生cDNA，然后将cDNA进行克隆增殖而得到；（3）如果DNA的碱基对序列是已知的，则可通过化学方法在体外合成寡核苷酸探针，这种探针特异性高，在高严格度下进行杂交试验，可以检测到单个碱基的变异及单个错配的碱基对。

基因探针的标记主要有同位素和非同位素方法[6]。由于同位素具有很高的比活性，所以在杂交中显示出高度的敏感性。因此，很容易检测到基因组中的单拷贝序列及罕见的mRNA。最常用的同位素标记物有$^{32}P$,$^{35}S$,$^{3}H$及$^{125}I$等。但由于同位素的操作及处理存在着许多困难和危害性，所以，临床实验室中，非同位素探针的使用正在逐步增加。主要有生物素探针，酶探针，荧光素探针及某些化合物探针。但这些探针在检测微量序列方面，尚不如放射性探针敏感。随着许多新技术的发展，特别是采用随机引物，可以大大增强杂交信号，提高试验的敏感性。

目前，最常用的标记方法为缺口翻译法。该方法采用具有5′→3′外切酶活性的EColi DNA多聚酶I，在待标双链DNA中形成缺口，即从缺口的5′端去掉一个核苷酸，然后以原始DNA为模板，在3′端加入一个核苷酸，从而导致缺口沿DNA链移动。若加入的核苷酸带有放射性标记物，则产生放射性探针。该探针的比活性可达$10^{8}$cpm/μg以上，生物素标记的核苷酸也可通过缺口翻译法进行DNA探针的标记。

另外，新近产生一种标记方法，称为随机引物延伸技术。该法首先将待标双链DNA变成单链，然后用一个由6个碱基核苷酸组成的寡核苷酸序列（即随机引物）通过碱基互补，连接到克隆DNA上。这个六聚体对DNA多聚酶起着一个引物的作用。最后利用单链DNA为模板，DNA多聚酶则将放射性标记的核苷酸连接到DNA上。随机引物标记法的优点为：（1）标记核苷酸与DNA结合的程度较缺口翻译法高；（2）能够对极短的DNA片段进行标记(≤100碱基对)。

## 三、杂交反应的种类

**1．溶液杂交** 将探针和待测DNA在溶液中进行杂交反应，即称为溶液杂交。反应

维普资讯 http://www.cqvip.com

中，先将同位素标记的单链探针 DNA 与过量的单链待测DNA 在溶液中进行加热，然后逐渐冷却，使二者进行结合，最后分离双链DNA及单链DNA，测定所形成的双链DNA中标记探针的含量而得到待测DNA的浓度。

溶液杂交能够成功地检测出靶 DNA 中的特定DNA序列的拷贝数以及DNA探针与待测DNA或RNA库的复杂性和相关程度。但这种方法极为麻烦，且需大量靶DNA，所以目前已被其他技术所代替。

### 2．Southern印迹

这是目前最常用的一种 DNA 固相杂交方法。当用限制性内切酶切割DNA时，可形成大约100万个亚基因片段。然而，虽经琼脂糖凝胶电泳后，可经溴化乙锭染色，紫外灯下见到DNA片段。但由于 DNA 片段多，往往在凝胶上呈现一片模糊的阴影，且这些分离的DNA片段仍然很大，难以确定特定的基因片段。Southern 印迹法的建立[7]，为解决以上问题提供了帮助。该方法主要是将凝胶放在一个转移槽中，上面覆以硝酸纤维滤膜。当槽中的高盐缓冲液通过凝胶时，即将凝胶中的 DNA 片段直接转移到硝酸纤维滤膜上。经烘烤后，凝胶上的 DNA 片段精确影像就固定在硝酸纤维滤膜上。然后将经印迹吸附的硝酸纤维滤膜浸泡在含有标记单链的杂交液中，使得探针与特定基因片段的互补序列进行杂交，最后经放射自显影而得知特定基因片段的位置与大小。

### 3．斑点杂交

斑点杂交是一种更为迅速的 DNA 固相杂交方法。将经高盐溶液变性的游离DNA，在真空环境中，点样在硝酸纤维滤膜上，然后与标记探针进行杂交而测定特定 DNA 的存在。这种方法具有迅速，且无需对 DNA 进行内切酶消化，电泳及转移的优点。可用于临床大批量标本的检测和筛选。但其特异性不如 Southern 印迹法。这种方法常用于筛选传染源的病原体。

### 4．“夹心杂交”

以上的杂交方法往往需要经过标本的预处理及吸印等烦锁的过程。而“夹心”杂交法却可避免这些问题。该法的关键就是需要二个与目的基因同源，但均来自同一基因组相邻但不重叠的DNA片段。其中一个 DNA 片段以单链形式固定在滤膜上(滤膜 DNA)，而另一片段则被标记后变性为单链用作探针。将滤膜DNA与探针及目的DNA置于同一反应体系中。若待测DNA与其他二者同源，则可通过目的DNA将探针连接到滤膜 DNA 上，从而形成三者的夹心杂交体。

### 5．原位杂交[8]

这种方法与印迹法相似。探针直接与固定在固相基质上的含有 DNA 序列的标本进行杂交。常用于染色体标本，冰冻切片，细胞标本印片及石蜡切片的DNA分析。

标本组织固定于玻片上后，先用蛋白酶处理，使得探针能与已经热变性的核内DNA进行杂交。如果组织标本中具有能与探针互补的靶 DNA，则发生阳性杂交反应。反应后需进行充分洗涤，以消除未结合的标记探针和错配序列。采用生物素-亲和素酶反应，荧光反应或放射自显影显示系统，则可测定染色体或组织细胞中的DNA的存在与定位。这种方法目前主要用于组织中病毒序列及癌基因的测定。

近来，有人采用双标记原位杂交方法，同时检测二种不同的靶DNA。这主要是根据 $^{3}H$—胸腺嘧啶和 $^{35}S$ 对由薄膜隔开的核子乳胶的穿透力不同。$^{25}S$ 探针可在乳胶的二层均产生银粒子，而另一基因的$^{3}H$探针只在第一层产生银粒子。第一层银粒子变为品红，第二层变为深兰色。Brahic等将原位杂交与免疫细胞化学方法结合起来，在同一细胞中同时检测了病毒 RNA 和蛋白质。表明在石蜡切片中，同时检测病毒基因和外壳抗原是

维普资讯 http://www.cqvip.com

可能的。还有人采用双光束流式细胞计数器对分离间期核中的DNA序列进行荧光杂交定量分析，可以迅速检测单个核中杂交探针DNA的含量。而基因的表达与细胞周期密切相关。

另一种常用的原位杂交方法称为菌落杂交。在检测细菌中的特定核苷酸序列中具有特别重要的应用价值。菌落需要从琼脂板上转移到硝酸纤维膜上。另外，细菌细胞悬液也可被加到硝酸纤维膜上，DNA被释放和固定后，同前述进行原位杂交。

一般来说，探针与互补序列的结合率及特异性取决于多种因素的影响。如该序列中鸟嘌呤-胞嘧啶的含量，DNA长度，温度及杂交液的组成，所形成双链DNA的稳定性依赖于二条互补链的相配程度（即严格度）。在低严格度条件下，形成的杂交分子可以允许有一定程度的错配。而在高严格度条件下，其碱基对的配对一定要精确。通常，调节杂交反应的温度和杂交缓冲液的组份可以控制其严格度。杂交反应的严格度通常为50～75%，允许有25～50%的碱基对错配。

## 四、限制性片段长度多态性（RFLP）分析

目前，已能列举出约3000种单基因疾病[9]。在这些遗传性疾病中，若受累基因明确，且有相应的基因探针，可用Southern法比较患者与正常对照的基因DNA结构，即可找出病变基因。但若受累基因未知，而只知道与疾病有关的染色体位点，则可采用RFLP进行检查[10]。

RFLP是指一个个体与另一个体在DNA序列上的差异。二个在表型上完全相同的个体，可以因为其中一个的基因中核苷酸碱基发生变化，而出现基因序列上的差异，因而在同一内切酶切割时，产生具有不同带型的限制性酶切片段。其方法是用一种内切酶切割来自几个不同个体的DNA，继以Southern印迹，然后与来自受累基因附近的染色体位点的标记探针进行杂交，即可发现RFLP。

Kan等首先应用RFLP作为疾病的遗传标志，在DNA水平上分析了镰状细胞贫血。它以后逐步成为检测产生疾病的基因的一般手段。即使病变并不完全了解，如Duchenne型肌营养不良或Huntington氏舞蹈症，也可用此检测基因的遗传特性。

## 五、分子生物学技术在诊断上的应用

### 1．遗传学诊断

采用外周血淋巴细胞分离的DNA可进行产前和产后的基因诊断。也可用妊娠头三个月的穿刺羊水及绒毛活检来分析胎儿的遗传学组成，以便一旦发现胎儿有危及生命的遗传性疾病，即可在妊娠早期进行安全的人工流产[11]。目前已应用分子杂交技术诊断的遗传病有：苯丙酮尿症，$\alpha_1$抗胰蛋白酶缺乏症，血友病，Duchenne肌营养不良，囊性纤维化，地中海贫血，镰状细胞贫血，Lesch-Nyhan综合征，胶原病，垂体性侏儒，鸟氨酸转氨甲酰酶病，家族性高胆固醇血症，抗凝血酶缺乏症及Huntington氏舞蹈病等。

A型血友病是最常见的遗传性凝血病，由凝血因子Ⅷ的缺乏或异常所致。Ⅷ因子的位点是在x染色体的长臂$x_q24-qter$上。患病男胎可测定经胎儿镜获得的胎血中Ⅷ因子活性及Ⅷ因子抗原的浓度进行产前诊断。目前通过对A型血友病Ⅷ因子基因的克隆，并进行内切酶分析，可发现该基因的携带者。并发现Ⅷ因子基因有二个分子上的缺陷：一是基因缺失或单个核苷酸的改变；一是DNA的多态性。这种分析为缺陷基因的检测提供了精确的方法。

$\alpha_1$抗胰蛋白酶（一种血浆蛋白酶抑制剂）的遗传缺失，可引起肺的退行性变及肝硬

维普资讯 http://www.cqvip.com

化。在生化水平上，这一缺失是由于在人的$\alpha_1$抗胰蛋白酶的第342残基的赖氨酸被蛛氨酸所代替。在基因水平上，这一氨基酸的替代是由于在相当位置上腺嘌呤被鸟嘌呤所代替之故。编码该mRNA的重组DNA克隆已被分离，并已用于结构性染色体基因的分离与分析。

典型的苯丙酮尿症是一种常染色体隐性遗传病。由于肝中苯丙氨酸羟化酶的缺乏，引起苯丙氨酸及其代谢产物堆积。若在发病的头10年中未经治疗，将发生严重的智力减退。目前已克隆了该羟化酶的人cDNA。基因图谱法研究发现，在该基因附近有大量核苷酸的替代。可采用检测RFLP来发现替代的核苷酸。

用合成的寡核苷酸探针的基因内突变位置的直接分析，是产前诊断遗传性疾病的另一方法。合成的寡核苷酸杂交仅需少量DNA，且操作迅速而简便。与RFLP分析不同，预先存在的前带DNA不需要进行分析。不发生在限制性酶识别位点内的突变可用与发生突变的DNA序列互补的小片段合成寡核苷酸探针来诊断。这种方法可测出一个基因内单一的突变。因为单一的核苷酸不配，可使DNA杂交不稳定。如地中海贫血已用一个合成的19个碱基的探针与突变DNA的血红蛋白基因序列杂交而进行诊断。

对有严重性联疾病危险时，在头三个月或头六个月鉴别性别是十分重要的。直到最近，4～6个月胎儿的性别鉴定是依靠羊水细胞的核型分析。y染色体的存在目前可用核型直接观察或DNA分析来确定。DNA分析可用限制酶分析或观察y特异性的重复片段，如HAEⅢ（一个3.4kb的y特异性片段）。或用总DNA与一个y特异性重复序列进行斑点杂交，48h即可得出结果，减少取样与诊断间的时间[12]。

## 2. 微生物感染的检测

微生物理想而快速的诊断方法应该是在临床标本收集后的短时间内进行直接观察。而电镜检查灵敏度差，费时费钱。常用的放免，细胞化学及ELISA方法常较直接病毒分离敏感度差。而DNA杂交技术则显示了其巨大的优越性[13]。目前应用的有：(1)病毒感染的快速诊断，(2)鉴定感染/转化细胞中的微生物，(3)鉴定某一微生物亚类间的遗传相关性，(4)鉴定肿瘤中的病毒感染，(5)鉴定细菌的抗药性，(6)鉴定细菌的毒株，(7)追踪感染的流行病学，(8)检测不易培养分离的微生物，(9)检测病毒的特异性转化区等。

分子杂交技术灵敏度高，可测出相当于10个细胞内的基因组或0.1pgDNA。该技术亦可测定隐性的，不增殖或流产性的感染。在病毒静止或增殖较少的情况下，对测定病毒是否存在，该法较直接病毒分离更为敏感。特别是对那些不能在实验室内进行增殖，或培养麻烦的病毒更为优越。

另一优点，则是对病毒标本的要求不很严格。病毒培养标本中必须含有活病毒，所以在运输，冻存时必须小心。而免疫分析，亦必须保持病毒的抗原性。相反，DNA极为稳定，即使病毒死亡或抗原性消失，甚至DNA断裂，其片段仍可被探针所测得。

检测微生物DNA最容易的方法是将被检匀浆组织转移至硝酸纤维膜上，用探针进行检测。若对匀浆组织进行系列稀释，则可对该DNA进行定量分析。近年来，采用DNA杂交技术诊断的慢性病毒性疾病有慢性肝炎，肝硬化，肝癌，中枢神经系统疱疹病毒感染，艾滋病，宫颈癌，湿疣，肛殖部乳头状瘤，鼻咽癌，扁桃体癌，Burkitt淋巴瘤，中枢神经淋巴瘤，卡波济氏肉瘤等。还有多种细菌，衣原体及利什曼原虫感染。

## 3. 肿瘤的病因及诊断

DNA重组技术的发展及细胞遗传学培养技术的改进，对恶性肿瘤的病因及诊断提供了线索。目前主要应用于(1)预定基因重

维普资讯 http://www.cqvip.com

排的特点，以进行肿瘤的分类，(2)研究癌基因的特定改变，作为特定肿瘤的标记，(3)研究癌基因的表达、扩增程度，以进行肿瘤预后的判定及(4)测定病毒性肿瘤的病因。

当今，引起人们极大关注的一组基因就是癌基因[15]。它是人类基因组中的一些序列。当其受到一定因素激活后，该基因可发生质和量的改变，从而引起组织细胞的恶性转化。激活的机制主要是启动子的插入，易位，点突变，基因扩增及基因重排。

某些肿瘤的核型改变是非随机的，因而推测肿瘤起源于单个转化细胞。非随机染色体改变可直接发生在恶变过程中，所以这一改变可作为特定肿瘤的标记。如在Burkitt淋巴瘤中，发生8-14易位，使8号染色体长臂上的c-myc接到14号染色体$B_{Ig}$基因的重链区附近，从而改变了c-myc转录物的结构及该基因的转录调节，引起持续增殖。而在视网膜母细胞瘤常发现有13q14区的缺失。另一方面，癌基因也可作为肿瘤进展的标记。有人认为，某些肿瘤基因的扩增，使肿瘤细胞生长能力增强，更易发生恶变。在白血病、淋巴瘤及肺，结肠癌中都曾观察到有基因的扩增。在神经母细胞瘤晚期的细胞株中发现有N-myc基因的扩增。而早期常缺乏基因的扩增。因之有人提出癌基因扩增可作为监视某一特定肿瘤发展的标记物。小细胞肺癌也有myc DNA的大量扩增，且其水平增高具有异常的细胞形态，比典型的小细胞肿瘤更为恶性。表明myc表达水平与人体肿瘤的恶性程度有关。

肿瘤的病毒基因在肿瘤发生过程中也起着一定的作用。采用斑点杂交可了解和研究细胞内的病毒序列信息。因此怀疑肿瘤与特殊病毒有关常用杂交技术来检测。斑点杂交曾用于检测中枢神经系统淋巴瘤，鼻咽癌及Burkitt淋巴瘤中的EBV。亦研究过慢性肝病及肝癌中的HBV的作用以及艾滋病中的T细胞白血病病毒的作用[16]。在B细胞淋巴瘤[14]，可用Ig基因探针测定瘤细胞的基因重排类型。

分子杂交试验可以了解病毒DNA的复制，血清感染性及病毒的整合。有人检测了肝及血清中的HBV-DNA，确定了二位慢性病毒携带者。用克隆化的HBV-DNA对患有肝病的儿童肝脏及血清标本进行分子杂交，检测游离HBV-DNA序列及整合在肝细胞基因组中的序列。在10名儿童中见到有HBV-DNA的整合。由于年纪轻，所以推测其整合在肝病早期即可发生，且与病毒感染的时间无关。有些儿童有急性病毒增殖的血清学证据，但只有一名在肝组织内有游离的HBV-DNA。而有三名只测得有DNA整合，而血清中未见HBV抗原及HBV-DNA。所以DNA杂交对于诊断血清HBV阴性的HBV感染是有用的。

整合的HBV曾被克隆与分析，在肝癌细胞内，整合的HBV与细胞序列的联结由于倒置重复发生了广泛的重排，因而推想HBV-DNA整合提供了引起染色体DNA的各种结构变化的潜在信号。可能引起插入特定癌基因部位产生启动子或促进子。

在肿瘤治疗中，由于肿瘤细胞的抗药性常使化疗不能奏效，对细胞毒药物产生耐药性。目前发现，抗药性的第一个证据是肿瘤细胞染色体发生改变。某些称为均匀染色区的地方发生扩增。这与被称为mdr的基因扩增有关。该基因位于7号染色体。用分子生物学方法研究肿瘤细胞，可发现肿瘤是否已产生抗药性，以便采取其他治疗措施。

总之，分子生物学方法在研究遗传病，微生物感染及肿瘤方面具有巨大的潜力与优越性。其优点在于(1)能得到其他方法所不能获得的独特信息，(2)灵敏度和特异性高，(3)方法快速，操作简便，(4)对标本处理要求不十分严格，特别是对微生物标本，(5)可用经济的克隆技术产生大量探针，并进行大批量标本的筛选。随着分子生物学技术不断普及，临床诊断技术必将不断得到提高。

维普资讯 http://www.cqvip.com



# 肿瘤抑制基因

生化教研室 曾昭淳 综述 王征泰 审校

中国分类号：R730.231

1969年Heubner和 Todaro 提出了癌基因的假说[1]。1970年mantin首先观察到癌基因的作用[2]。癌基因是能转化正常细胞而诱发肿瘤的病毒或肿瘤细胞的DNA。在正常动物细胞中存在着癌基因的付本[3][4]，即原癌基因。在适当的条件下原癌基因被激活、导致出现某些与肿瘤细胞有关的表型，引起肿瘤。八十年代另一类与肿瘤有关的基因已被发现[5][6]，它们的产物有控制细胞增殖的功能。失去这类基因的功能可能和正常细胞转化为肿瘤细胞有关。失去功能导致肿瘤的基因称抗癌基因（Anti-Oncogene）或肿瘤抑制基因（Tumor Suppressor Gene）。目前研究比较深入的是视网膜母细胞瘤，结肠癌，肾母细胞瘤和有关的抑制基因。

## 一、视网膜母细胞瘤(Retinoblastoma，Rb)和Rb基因

视网膜母细胞瘤是一种好发于1—5岁儿童的肿瘤，受害器官为眼。其临床表现为视

## 参考文献


[1] Willey AM. Nucleic acid probes in diagnosis of human genetic diseases. Alan R. Liss, Inc. New York, U.S.A. 1988

[2] Hans-Peter Vosboerg. Hum Genet 1989; 83:1

[3] Goelz, SE,et al. Biochem Biophys Res Commun 1985; 100:118

[4] Steel, CM. Lanect 1984; 15:908

[5] Hackett, PB, et al. An introduction to recombinant DNA techniques. 2nd ed. The Benjamin/Cummings Publishing Co.Inc. California. 1988

[6] Langer-Safer, PR, et al. Proc Natl Acad Sci USA 1981; 78:6633

[7] Southern, FM. J Mol Biol 1975; 89: 503

[8] McDougall, JK, et al. In Fenoglio, CM. ed. Progress in surgical pathology.NY. Masson Publishers USA Inc. 1982; Vol.4

[9] McKusick, VA. Mendelian inheritance in man:catalogues of autosomal dominant, autosomal recessive and X-linked phenotypes. 8th ed. The Johns Hopkins University Press, Baltimore and London, 1988

[10] Orkin, SH. Cell 1986; 47:845

[11] Hall, JG. JAMA 1985; 254:2296

[12] Jeanpierre, M, et al. Ann Genet 1984; 27:134

[13] Landry,ML,et al.Clin Lab Med 1985; 5:513

[14] Pelicci, PG, et al. J Exp Med 1985; 162:1015

[15] Tomasi, TB. In Fenoglio-Preiser, CM. ed.New concepts in neoplasia as applied to diagnostic pathology. Baltimore, Williams and Wilkins, 1986; 59

[16] Harper, ME, et al. New Engl J Med 1986; 315:1073


（收稿日期1990-05-29）