

反义技术研究进展

宗建超 倪爱国 刘福森

(南开大学分子生物学研究所, 天津 300071)

提 要

过去几年目睹了反义技术的爆炸性发展, 文章较全面地评述了反义技术的主要内容和近年来的研究进展, 它们包括几类受人注意的 DNA 类似物、RNA 和 Ribozyme. 此外, 基于研究现状还展示了反义技术的前景。

关键词 反义技术, 反义 DNA, 反义 RNA

在生命科学的发展史上有过几次重大的革命。如重组 DNA 技术的出现, 带动了基因工程、蛋白质工程的大发展和一系列分子生物学方法的改进和创立, 使生命科学面目一新。近几年迅速发展起来的反义技术 (Antisense Technology), 则从反向遗传学 (Reverse Genetics) 的角度发现了许多基因调控的新现象, 为分子生物学增添了许多新内容; 在实践中将为各种疑难疾病 (如病毒病、肿瘤和遗传性疾病等) 的“基因治疗”, 为改良动植物品种, 为改进生物技术的研究方法而发挥巨大作用。可以毫不夸张地估计, 反义技术必将为生命科学带来又一场革命。

1 何谓反义技术

根据目前的研究内容, 反义技术可以定义为: 根据碱基互补原理, 用人工合成或生物体合成的特定互补的 DNA 或 RNA 片段 (或其化学修饰产物) 抑制或封闭基因表达的技术^[1]。其主要研究内容和方法至少包括以下几个方面:

1.1 反义 DNA

即用人工合成的与待封闭基因的某一区段互补的正常或化学修饰的 DNA 片段 (8—28 mer) 抑制或封闭某一基因的表达。按其核苷间磷酸的化学修饰情况及核苷的空间构型可分

为以下 6 种^[2,3]:

a. 正常 DNA 片段 (N-ODN) 即用人工合成的以正常 DNA 的磷酸二酯键相连接的 DNA 片段抑制或封闭基因表达。反义 DNA 的第一个应用研究者 Zamecnik 利用人工合成的与劳氏肉瘤病毒 (RSV) 的 mRNA 互补的 13 聚寡核苷酸来抑制该病毒增殖, 使其不能把培养的鸡胚细胞转化成癌细胞^[4]。但后来的大量研究证明: 正常结构的 DNA 片段由于容易被细胞内和体内大量存在的核酸酶所降解, 难以用于预期的体内研究, 现在多用它作为化学修饰的同样序列的 DNA 片段的对照品, 进行作用机理研究或预试验研究。

b. 甲基磷酸型 DNA 片段 (M-ODN) 即人工合成的在 DNA 片段的磷上的羟基由甲基取代而制成的衍生物。这种取代使 DNA 由带负电荷的大分子变成了不带电荷的中性大分子。物理性质研究揭示, 其构象与正常 DNA 片段类似; 但却具备了许多新的特性, 如: 它能够借助细胞的吞饮作用完整地穿透细胞膜并不易被细胞内和体内核酸酶所降解, 能与互补的核酸区段形成双链复合物, 选择性地抑制病毒 mRNA 的翻译, 其抑制程度受其片段序列、长度、结合 mRNA 的部位的影响。美国 Johns

Hopkins 大学 Ts'o 的实验室在该领域有领先水平的研究,他们从 1978 年起就其化学合成、物理化学性质及体外细胞试验做了大量工作,近期还做了动物试验,初步结果是令人高兴的。

c. 硫代磷酸型 DNA 片段 (S-ODN) 这种片段的磷上的羟基被巯基 ($-SH$) 取代,所形成的仍是带电荷的分子。其物理化学和生物学性质与正常 DNA 片段很相似。有证据表明:它可通过受体作用完整地进入细胞内,其抗细胞内核酸酶的能力很强。能与互补的核酸区段形成较稳定的双链复合物以抑制 mRNA 的翻译。同时它还能激活 RNase H,这种酶在体内专门切割 RNA-DNA 杂交体中的 RNA 部分,从而促进 mRNA 的降解。美国 NIH 有几家实验室在这方面有较深入的研究,据说也开始了动物试验。

d. 双硫代磷酸型 DNA 片段 (SS-ODN) 这种片段是在上述硫代磷酸型 DNA 片段的基础上,将磷上未参与形成二酯键的另一个氧也用硫取代,形成双硫代磷酸二酯键。这种结构抑制核酸酶的能力更强,但也可能会增大其细胞毒性。美国 Caruthers 的实验室已开展此方面研究。

e. α -构型 DNA 片段 上面讲的四种 DNA 片段都是 β -构型,即正常 DNA 的构型。法国 Languedoc 科技大学的 Imbach 等人和美国 ISIS 公司合作正在发展一种 α -构型的 DNA 片段。它的构型正好和 β -型相反,尽管没有化学修饰,其抗核酸酶降解的能力却很强。用蛇毒磷酸二酯酶水解时比相应的 β -异构体抗酶解能力高出三十倍以上。同时, α -DNA 还能与互补的单链 β -DNA 或 RNA 形成稳定平行的而不是反平行的双链结构,与 mRNA 结合的稳定性比 β -DNA 高得多,这一性质在设计以 mRNA 为靶子的反义分子时非常有利。遗憾的是 α -DNA 合成困难,代价太高。

f. 各种反义 DNA 片段的末端化学修饰 主要目的是为了弥补以上各种 DNA 片段的不足之处,解决更好地进入细胞,更稳定、特异地和靶 mRNA 结合并破坏掉该 mRNA 的问题。

如 Letsinger 等人给 S-ODN 3'-端共价连接上胆固醇分子,大大提高了细胞摄取量,于是相应提高了 S-ODN 抗 HIV 活性。法国的 He-lene 等把吡啶接在 ODN 上,美国的 Dervan 把 EDTA- Fe^{2+} 接到 N-ODN、M-ODN 上, Ts'o 等将补骨脂分子接在 M-ODN 上,其目的都是为加强和靶 mRNA 结合的稳定性或进一步破坏掉这个 mRNA,使其丧失功能。

1.2 反义 RNA

反义 RNA 是指核苷酸序列与其所调控的 RNA 的序列互补的 RNA 片段^[5]。它通过配对碱基间氢键作用,与对应的 RNA 形成双链复合物而影响 RNA 的正常修饰、翻译等过程,从而起到调控作用。1981 年美国 NIH 的 Tomizawa 就已经发现了细菌中有反义 RNA 在起控制基因表达的作用。后来的研究证明:利用反义 RNA 调控基因活性看来是病毒和细菌里的普遍现象。到 1984 年, Izant 和 Weintraub 等首次提出了反义 RNA 的概念,并用重组 DNA 技术设计和制备出反义 HSV-TK mRNA 的表达载体,注入细胞后明显观察到它抑制了 TK 酶的活性。此后许多实验室都相继开展了有关反义 RNA 研究。反义 RNA 既可以用重组 DNA 技术得到,也可以在实验室里人工合成,然后把它们直接注入到细胞里。

1.3 Ribozyme

这是美国科学家 Cech 于 1982 年创造的一个新名词,指被他发现的具有酶的作用的一类 RNA。Ribozyme 的发现改变了生物催化剂的传统概念,是生命科学发展的又一里程碑,因此他和另一位独立发现 RNA 有催化作用的美国科学家 Altman 分享了 1989 年的诺贝尔化学奖。

现在经过深入研究,人们不仅确认了 RNA 分子可以作为真正生物催化剂的事实,对其催化的机制也有了相当的了解。

Ribozyme 和通常的酶一样,几乎可以催化各类生化反应。它的催化性质的保持也需要一种特定的构象。这种构象在人工制造 Ribozyme 分子的设计中有广泛的通用性。澳大利亚科学

家 Symons 发现“锤头结构”(hammer-head)中的 RNA 催化活性而设计制造出许多 RNA 催化剂,为 RNA 的理论研究和实际应用开辟了广阔的前景。现在可以看出,设计制造一个 Ribozyme 分子至少应注意以下三个区段: A 区,被切 RNA 的切割位点 GUC 及附近序列; B 区,即具有特定二级结构的锤头区,其在空间上必须与 A 区紧邻,为一保守序列; C 区,由配对的碱基构成,以稳定其活性结构。他们以氯霉素乙酰基转移酶(CAT)为靶基因设计了三个 Ribozyme 分子,使它们与 CAT 基因上特定的三个区域配对以构成切割活性区。体外实验结果表明,这三个分子确具内切酶活性,且切割位点高度特异。同时 Ribozyme 的活性随 pH、温度及离子浓度变化而变化,显示出典型的酶特征。这一结果向人们展示了 Ribozyme 的美好前景。1989 年奥地利学者 Cotten 等利用三叶草结构的 tRNA 为母体,在反密码环上安装带有锤头结构的 Ribozyme B、C 区,利用重组 DNA 方法将经改造的卵母细胞 tRNA^{Met} 基因注入蛙卵中,在核外检测到大量 rib-tRNA 及对 U7snRNA 的降解^[6],为在活细胞中的应用又提供一条新渠道。

以上只是罗列了目前已有成功的应用例子的反义技术的有关领域。这些领域还在不断扩展和深化。例如以美国休斯敦 Baylor 医学院著名的生物技术专家 Hogan 为首席顾问的 Triplex 药业公司认为,应将反义技术直接作用于双链 DNA,他们设想用合成的反义 DNA 片段及其化学修饰的衍生物直接作用于某个特定的 DNA 双螺旋区段,在其未转录出 mRNA 时就把它封闭住或破坏掉,从根本上解决问题。这一工作正在进行,如能成功,将对反义技术以极大推动和提高。

2 反义技术在农业上的应用

反义技术在农业上的应用大有可为。因为向植物的体细胞或生殖细胞中引入反义 DNA 或 RNA 都较容易,并且从植物的任何部位提取的单细胞都可再生出新的整株植物。

用反义技术生产的第一个农产品就是软化迟缓的番茄。番茄成熟后即变软,主要是番茄成熟时一种降解它的果胶组织的多聚半乳糖醛酸酶(poly-galacturonase)活性大增,使支撑番茄体的果胶质组织大量降解而变软。美国加州的 Calgene 公司的研究人员将抑制这个酶 mRNA 的反义 RNA 基因引入番茄中,可降低该酶含量 10—40%,产生出一种坚硬比较持久的番茄品系,因为这种番茄生殖细胞中含有上述反义基因,可以遗传给后代。已进行大田试验。据 Calgene 公司称:美国的鲜番茄市场以批发销售量计,每年大致为 25 亿美元左右。番茄在完全成熟后一般是一个星期就变软,倘能使番茄在完全成熟后一个月还不变软,那么这个市场量是相当可观的,因美国每年生产的番茄有 20—40% 就是因为腐败的原因而到达不了市场。其他的水果、蔬菜也有类似的情况,Calgene 公司也正在研究对这些作物使用反义 RNA。

另一项应用是用反义 DNA 抑制咖啡豆中咖啡因基因的表达,来生产一种去咖啡因的咖啡。用反义技术来降低油菜中的芥酸,降低马铃薯有毒生物碱的含量;去各种水果中的酸苦味的研究也在进行。针对植物病毒的反义 RNA 还被用来培育抗病的烟草。反义技术尽管在农业上的应用刚刚开始,但其在改良植物(甚至动物)品种和抗病虫害等方面的潜力是难以估量的,相信它会与重组 DNA 技术互为补充互相促进,为农业带来真正的绿色革命。

3 反义技术在医药方面的应用

在严重威胁人类健康的病毒病、肿瘤和遗传性疾病面前,不能说人们还束手无策,但至少可以认为目前尚无真正根治的办法。主要原因是目前还没有找到“根治”的药物——这个“根”就是有害基因在人体的表达或者正常基因在表达时发生失控甚至基因突变等,为此,必须进行“基因治疗”才能根治这些疾病。反义技术就是目前最具吸引力的手段之一。因为利用反义技术,可以设计出与有害基因、突变基因、非正常

表达基因及其 mRNA 互补的反义“封条”(DNA 或 RNA 片段)封闭这些基因不让它表达。这是最简单明了的思路,而且经过十多年的基础研究,证明也是完全可行的。正因为如此,该领域不但吸引着许多科学家,而且像磁石般地强烈地吸引着商业界。美国就有十几家公司从事该领域研究,1987,1988 这两年就相继成立了四家专门研究反义技术的公司。据美国商用通讯公司最近在一份研究报告中预测:反义技术到 1999 年,市场潜力可望达到 45 亿美元^[7]。这要比目前全部生物技术的市场还大很多。

在医药领域已进行的研究大部分是在体外培养细胞中所进行的抗各种病毒(HSV, HIV, HBV 等)、原虫(布氏锥虫)、肿瘤(带 *rsc* 基因、*ras* 基因的转化细胞等)的试验及为解决反义片段如何进入细胞,如何不被降解,为不产生其他不良毒副作用而要进行化学改性的研究等。已进行动物试验的有三篇报告,只有一篇 Vlassov 的报告讲到了动物实验结果:感染了蜱传脑炎病毒(tick-borne encephalitis virus)的老鼠,在三天内如接受 ODN (与病毒 5'-端序列互补)治疗,可存活 30—50%;不接受治疗的对照组则全部死亡。实际上动物实验结果要多得多,主要是商业上的原因不便马上公布。

反义核酸最终可提供出最合理的药理学方式,因为病原体与其寄主的最终区别就是它们的基因结构。如果能成功地解决给药方法及药物的稳定性,安全性问题,就可成功地进行对病毒病,癌症及遗传性疾病的治疗。

4 反义技术在分子生物学研究上的应用

反义技术不但在农业和医药卫生方面有广阔的应用前景,它在分子生物学研究上也能提供新的认识和新方法。

反义技术弥补了经典遗传学在研究脊椎动物方面的缺陷,并且使突变机制解析更简易。反义分子诱导的拟表型与通常的条件突变型相比有不依赖于温度产生,不改变靶基因型的优点。相信这一手段会促进某些二倍体遗传系统的研

究。1983 年剑桥大学 Hunt 等人发现了一种“周期蛋白”,它在细胞生长过程中逐渐积累,而在细胞分裂过程中被逐渐破坏。此后, Hunt 等证明:针对周期蛋白 mRNA 的反义 DNA 片段能阻碍细胞的生长和分裂。这说明周期蛋白基因在细胞生长和繁殖中起重要作用。慕尼黑大学的 Jackle 和他的同事们用反义技术模拟果蝇胚胎里的突变。他们用反义核酸使一些特定的基因失活后生产出的一些果蝇,其特征可与和这些基因发生突变后的果蝇所显示出的特征相类似。现在包括小鼠在内的更复杂的有机体也获得了这种拟表型。

目前,一般认为反义核酸对不利基因的负调控作用通过两条途径:一是形成 mRNA-RNA 或 mRNA-DNA 双螺旋的立体效应,阻断了翻译起始因子的结合或阻止核糖体的移位;二是通过激活 RNase H,使 mRNA-DNA 杂合双链中的 mRNA 被降解。反义 RNA 还能阻止 mRNA 由核内向外输送;形成的双链的 mRNA-RNA 也是某种核酸酶的敏感的靶子。还可能有其他作用机制。通过以上机制,它可以有效地调节基因的表达,可以取代定点诱变技术,为蛋白质工程设计增添新的内容。

5 问题和展望

反义技术毕竟从发现到现在仅有不足十年的历史,尽管其理论意义重大,发展前景广阔,但至少还要深入解决了以下几个问题才能普遍应用:

5.1 大量(g 级到 kg 级),便宜地制备能够临床试验用的反义 DNA/RNA 片段。目前买 1g 纯品反义 DNA 片段约需十万美元显然是太贵了。

5.2 反义片段如何容易地、完整地进入细胞。

5.3 反义片段如何不被细胞的防御机制(如核酸酶等)所破坏。

5.4 反义片段不能干扰和破坏细胞和机体的正常生理生化功能。

这些问题一直在解决过程中,但远未完成。

毫无疑问,越来越多的信息,越来越精巧的技术,加上越来越丰富的想象,必将引导出更新的思路、更新的方法,使反义技术日趋完善。

参 考 文 献

1 Weintraub H M. *Sci Am*, 1990; 262(1):34

- 2 Stein C A *et al. Cancer Res*, 1988; 48:2659
- 3 Zon G. *ACS Symp. Ser.*, 1989; 401:170
- 4 Zamecnick P C *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1978; 75:280
- 5 Inoué M. *Gene*, 1988; 72:25
- 6 Cotten M *et al. EMBO J.* 1989;8(12):3861
- 7 Armstrong L. *Business Week*, 1990; 3:88

应用膜片钳技术研究细胞分泌

曹忠升 康华光 邹寿彬 周 专

(华中理工大学自控系生物医学电子学研究室, 武汉 430074)

提 要

介绍了应用膜片钳技术研究细胞分泌机制的新进展,简述了时间分辨法在分泌研究中的基本原理与方法以及用此法研究获得的细胞分泌机制的新成果。

关键词 膜片钳,细胞分泌,膜电容,调控因子,时间分辨法

机体的发生、发展以及生命的基本活动都依赖于细胞间的信息联系和调控。生物体内的信息从胞外向胞内传递,从而引起生理效应的生化反应,一直是人们感兴趣的课题。细胞以分泌的化学物质作为传递信息的工具,通过一定的途径传给另一个细胞的化学信息传递形式,是细胞间三大信息传递形式中最重要的一种。细胞分泌的胞吐过程是在细胞膜上进行的,它会引起细胞形态的改变和物质的流动,从而导致细胞膜电参数发生变化,其中尤其突出的是伴随着分泌活性,整个细胞表面积(与膜电容成正比)必然增加,人们可以通过测量细胞膜电容的方法来估计单细胞的分泌活性^[1-4]。这就是用电生理方法研究细胞分泌机制的基础。膜片钳(patch-clamp, PC)技术是80年代初逐步兴起趋于成熟的、用于检测 pA 级微电流而带宽优于 10kHz 的电子测量技术。因此,应用 PC 技术并结合细胞生理学与分子生理学等技术来研究并揭示细胞分泌的机制,是非常新颖而有效的手段。若把信息从胞外到胞内的传递途径按第一信使→受体→换能器→放大器→磷酸化

的前体→第二信使→内部效应器→细胞反应(如分泌)的形式表示,则分泌机制的研究主要

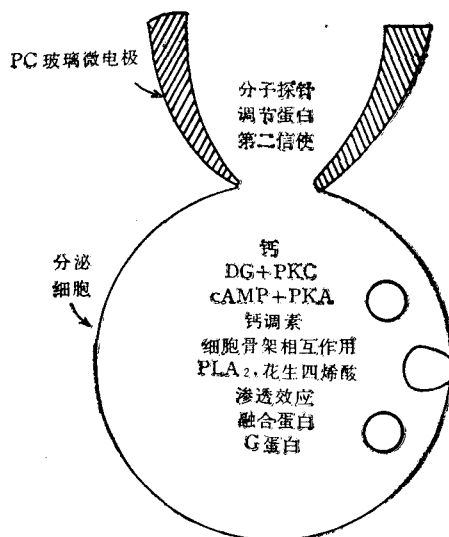


图 1 PC技术研究细胞分泌机制的模式图

围绕这一途径进行,故研究内容包括:分泌的启动、膜融合、胞吐等动态过程、动力学特性和