哺乳类细胞基因表达系统

马文丽　薛社普

(中国医学科学院基础医学研究所，北京 100005)

摘要　通过适当的设计，可以构建在哺乳类细胞中表达的质粒，将其导入哺乳类细胞后，可以有效地表达外源基因. 文章主要就这类质粒的特征、分类及其研究进展等方面予以综述.

关键词　哺乳类细胞，表达载体，表达系统

众所周知，真核与原核基因存在明显差异，一般来说，真核表达系统更易于表达来自高等生物的外源基因[1]. 例如，建立在酵母、昆虫细胞基础上的真核表达体系，可以高效地表达一些具有生物活性的重组蛋白. 然而，哺乳类细胞千差万别，它们在转录、翻译后修饰过程中的差异，常常使产生的蛋白质生物活性、半衰期、抗原性变化较大. 因此，根据需要建立可用的哺乳类细胞表达系统很有必要. 近年来，基因治疗研究的兴起与发展，进一步促进了哺乳类细胞表达系统的深入研究.

哺乳类细胞表达载体可分为两大类，一为病毒性载体系统，包括逆转录病毒载体及其它 DNA 病毒的载体，这类病毒在包装时，对其基因组的长度有严格的限制. 因而，这类载体插入外源基因一般较短小，其优点是对于敏感的细胞能够高效地导入外源基因[2]. 另一类为质粒性载体系统，这类载体虽然导入外源基因的效率不如逆转录病毒，但由于其不受导入基因大小的限制，具有广泛的宿主，因此，随着转基因技术的发展，这类载体开始引起人们的重视. 本文主要针对这类载体予以综述.

经过适当的设计与改建，来自病毒及原核的质粒可被改造成为能在哺乳类细胞中表达的质粒载体. 这些载体可通过分子克隆技术重组外源功能性基因，进而可通过各种转基因手段，将外源的功能性基因引入哺乳类细胞并在其中表达. 因此，哺乳类细胞表达性质粒为研究在哺乳类细胞中外源基因整合、调控及表达提供一有效的途径.

1　哺乳类细胞表达性质粒的基本特征

作为表达性质粒首先要求能够准确、有效地转录克隆的外源基因. 控制外源基因转录的因素有三方面：其一，在转录起始位点的上游固定区域存在的转录启动子 (promoter)，其二，在距离更远的部位存在的增强子 (enhancer)，其三，是在插入基因下游的转录终止结构，后者常具有核心序列 (consensus sequence) AATAAA，在其下游 10—20 个碱基的部位，转录出的 mRNA 常在尾部被加上 Poly A (poly A tract).

表达性质粒应能够进行自身复制，但复制并不一定要在哺乳类细胞胞质中. 许多这样的质粒都含有原核复制子及特殊的抗菌素抗性，因而可以在大肠杆菌中大量繁殖扩增. 还有一些质粒载体分子量太大，为使其在大肠杆菌中有效复制，常常将外源基因及载体的部分序列插入小分子质粒中，以扩增基因，然后通过同源重组的方式 (homologous recombination)，使外源基因插入真核表达载体中，从而达到复制外源基因的目的. 分别含有原核与真核两种复制子 (replicon) 的质粒，通过不同的复制起始点，在原核与哺乳类细胞中均可复制，这种

收稿日期：1993-06-25，修回日期：1993-09-22

载体称作“穿梭载体”(shuttle vector).

表达性质粒最好能携带有可供筛选的标志基因(marker gene). 常见的标志基因可分为两类：一类属于隐性基因，含有这类基因的载体只适用于突变的、不能表达该种隐性基因的细胞，例如胸腺嘧啶激酶(TK)，二氢叶酸还原酶(DHFR)，腺嘌呤磷酸核糖转移酶(APRT)及次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HGPRT)的基因，所以，使用这类载体明显地限制了宿主细胞的范围. 第二类属于显性基因，这类基因编码的产物可以使宿主细胞产生对异常代谢条件的抗性，从而能使表达该基因的细胞被筛选出来. 这类基因主要包括以下三种：一种为突变的二氢叶酸还原酶的基因，使表达该基因的细胞能够产生对氨甲喋呤的抗性；一种为细菌的黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(gpt)基因，使表达该基因的真核细胞可以生长在含有霉酚酸及黄嘌呤的培养基中；另外一种为细菌转座子基因 neo(氨基甙-3′-磷酸转移酶)，使细胞产生对新霉素衍生物 G418 的抗性. 标志基因并非一定与外源靶基因在同一载体上. 经常地，将分别含有标志基因与靶基因的质粒同时导入哺乳类细胞中(又称作共转染，cotransfection)，然后用相应的筛选方法筛选被转入标志基因的哺乳类细胞. 在这类细胞中，有一定比例的细胞同时摄取了两种质粒，因而亦可被筛选出来.

2 质粒的种类

哺乳类细胞表达性质粒主要根据质粒中 promoter/enhancer 的来源、性质等分类[3]. promoter/enhancer 主要包括三部分结构：a. TATAA box：多位于 mRNA 转录起始的上游第 25—30 碱基处，限定了 RNA 多聚酶 Ⅱ 的结合部位，因而确定基因转录的起始位点. b. CAAT box：位于起始位点上游－80 碱基处的一段保守序列，序列范围为 GGPyCAATCT，通过与其它因子间的结合，据信可以决定启动子的转录效率. c. 转录增强子(enhancer)：含有一些特殊的保守序列，与所控制基因之间的相对位置及方向无关. 一个强的 enhancer 常常可以增加 10—100 倍的转录效率. 因此，一般构建的载体中都有一强的 enhancer. 一些来自 Moloney 鼠类病毒的 enhancer，需要特殊细胞作为宿主，从而使宿主细胞的范围被局限，而来自 SV_{40}，RSV(Rous 肉瘤病毒)，CMV(巨细胞病毒)的 enhancer 则具有较广的宿主细胞谱. 具有严格细胞特异性的 enhancer，可见于某些特异真核基因，如免疫球蛋白基因、胰岛素基因等的调控序列中[4].

根据 promoter 是否可以被诱导，载体又可分作非诱导性和可诱导性两类. 可诱导性载体的利用，使具有细胞毒性的蛋白基因以可被诱导的形式，在适当的细胞生长阶段被诱导表达，因而，限制了外源基因产物早期对细胞生长的影响而增加蛋白产量. 常见的可诱导性载体如：a. β-干扰素启动子，可被病毒感染或双链 RNA [poly (rI) -poly (rC)] 所诱导. b. 热休克启动子，来自果蝇的热休克蛋白(hsp70)，含有这种载体的哺乳类细胞在高温或其它应激条件下，该启动子可被启动. c. 重金属诱导的启动子，来自 metallothionein 蛋白的启动子，该蛋白在重金属的解毒中起作用，因此，在有二价重金属离子如镉、锌存在时，启动子可被激活. d. 糖皮质激素诱导的启动子，常用的启动子来自小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)的长末端重复序列(LTR)，含有这种启动子的重组载体转入有皮质激素受体的宿主细胞，在糖皮质激素(如地塞米松)的作用下，可见表达产物的量明显提高.

3 哺乳类表达载体的发展

使用由病毒改进的载体进行转基因实验时，常需要与辅助病毒共转染，才能将外源基因包装于病毒颗粒中. 最早期开始使用的载体 pSVGTX 系列，主要宿主细胞是非洲绿猴肾细胞系 CV-1，能允许病毒进行裂解细胞的循环，产生重组与辅助病毒颗粒. Gluzman (1981 年)[5]将 SV_{40}基因中与 pSVGTX 能产生互补的成分转染 CV-1 细胞，得到的转化细胞

系可以分泌 SV_{40}的大 T 抗原以及其它病毒复制所必需的因子，称作 COS 细胞 (CV-Origin-SV_{40}). pSVGTX 载体在其中复制时，不需要辅助病毒，即可利用 COS 细胞中分泌的互补成分产生重组病毒颗粒. 但由于病毒基因组长度、宿主细胞等方面的限制，加之产生野生型病毒的危险，目前这类载体已不常用.

采用进一步的分子克隆操作，构建了哺乳类表达性质粒载体. 这类载体由于不需要包装成病毒颗粒，因而在外源基因插入的长度、宿主细胞的来源等方面不受太多的限制. SV_{40}基因组中一些序列被广泛用于 pSV 系列质粒的构建. pSV 系列质粒可以方便地在大肠杆菌中扩增，体外重组插入外源靶基因，然后用于转染哺乳类细胞进行基因表达的相关实验. 该系列中最常见的载体是 pSV_2，如图 1 所示，在其结构中含有来自 pBR322 的复制子、氨苄抗性的部分及来自 SV_{40}的真核表达单位 (包括 enhancer/promoter，来自小 t 抗原的一段内含子、剪接信号以及 Poly A 加接信号). 这样构建的载体导入细胞后可发生与基因组的整合，但在 SV_{40}大 T 抗原存在或其它情况下，pSV_2 质粒也可在胞质中以独立于染色体之外的形式进行复制 (episomal fasion)，增加基因的拷贝数以及基因表达的程度[6].

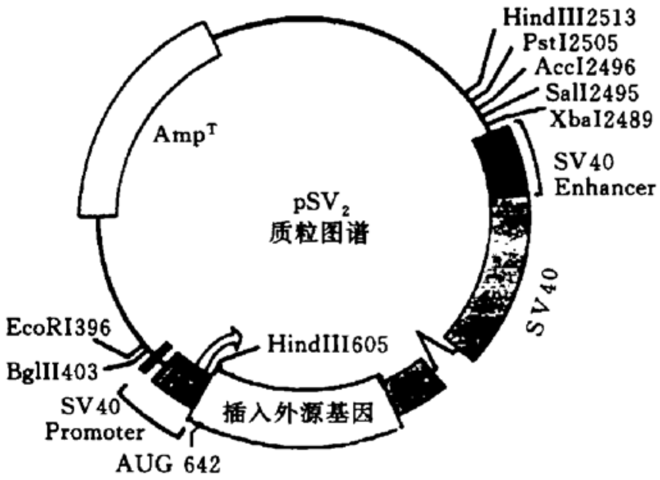

图 1 pSV_2 质粒图谱

近来载体构建方面有很大的进展. 实验技能的提高及对转录调控机制的进一步了解，使构建更有效的哺乳类表达载体成为可能. D. T. Berg (1992 年) 等[7]将来自不同病毒的高效调节序列通过分子克隆的手段连在一起，构建了载体 pGBMT 调控区，分别含有 poly GT 元件 (来自腺病毒 Ela 蛋白的反式激活增强子 GTe)，BKV 病毒的 P_2 调控区 (BKV-P_2)，腺病毒 Ⅱ 型晚期主要启动子 (MLP) 及来自腺病毒的合成前导序列 (TPL)，然后将外源基因插入载体，并与 pSV_2-Ela 共转染细胞，可以检测到插入外源基因的高效表达.

哺乳类细胞表达载体使外源蛋白在哺乳类细胞中有效表达，可以用来生产许多具有生物活性的蛋白质. 常用的生产蛋白质的细胞是 CHO 细胞系 (中国仓鼠卵细胞). 但由于 CHO 细胞正常生长过程中没有主要的蛋白质表达，因而，通过分子克隆手段也不易达到很高水平外源基因的表达. 最近 Needham 等[8]发现，小鼠的红白血病 MEL 细胞在导入巧妙构建的载体后，可以成为非常满意的体外表达系统. MEL 细胞在诱导分化的条件下，可以产生大量的血红蛋白，表达量可达细胞总蛋白量的 25%. 正常珠蛋白表达受两个结构区的促进，一为珠蛋白基因座位控制区 (globin locus control region，LCR)，另一为珠蛋白基因的启动子 (GP). LCR 含有高密度的非组蛋白结合位点，包括红系分化特异的转录因子 GATA 和 NF-E_2 的结合位点，可以不依赖于染色体特殊整合部位进行 Hb 基因的转录. 因此，将外源基因连于 LCR-GP 的下游导入 MEL 细胞，当诱导 MEL 分化的因子作用于细胞时，载体上的 LCR-GP 同时被启动，而被 LCR-GP 控制的外源基因也随之高效表达 (相当于 β-珠蛋白被诱导表达的程度). 进一步通过适当信号序列的重组，由载体表达的蛋白质可以被分泌到 MEL 细胞之外，为外源基因在哺乳类细胞的表达提供了极好的模型.

近年来，哺乳类细胞表达载体的研究发展迅速，但迄今有关宿主细胞的研究报道都为有核细胞. 有核细胞作为外源基因导入的靶细胞，有利于外源基因整合至宿主细胞核内，进

而在遗传基因水平获得持续性表达．然而，外源基因的随机整合，也有可能导致基因组结构与功能的紊乱，尤其是整合于癌基因或抗癌基因附近的外源基因，有可能引起癌基因的激活或抗癌基因的灭活，从而导致细胞转化、肿瘤发生．

无核胞质体特别是终末分化期自然去核的网织红细胞，可否作为外源基因导入的宿主细胞？网织红细胞虽然没有核，但却具有蛋白质合成的完整细胞器，且体外翻译系统也常常利用其细胞提取物进行[9]，因此，它有可能成为一种特殊且良好的真核宿主细胞．其优点是：a．网织红细胞已无细胞核，不会发生上述外源基因整合而引起的细胞转化；b．网织红细胞有一定的寿命，外源基因导入后产生的效果能随着其成熟而终止，不会对整个机体的基因组产生影响；c．将网织红细胞作为暂时宿主，转入可供选择的外源基因，使之成为标记基因的携带者，再与其它有核细胞进行融合，进而筛选出杂交细胞，可为研究胞质因子的作用提供新的实验模型．该过程结合基因工程和细胞工程手段，将使类似的研究胞质因子相互作用的实验步骤大为简化[10]．

哺乳类细胞表达系统的发展，不仅为细胞生物学研究开辟了又一崭新的研究领域、为细胞分子生物学研究展示了更加广阔的前景，而且为基因治疗的发展奠定了理论基础[11,12]．

参 考 文 献

1 Allaway G P, Vivino A A, Kohn L D *et al*. Biochem Biophys Res Commun, 1990; **168**: 747
2 Swain A, Coffin J M. Science, 1992; **255**: 841
3 Nakayama N. Curr Opin Biotech, 1992; **3**: 497
4 Bird P. Gene, 1992; **121**: 178
5 Gluzman Y. Cell, 1981; **23**: 175
6 Trojan J, Blossey B K, Johnson T R *et al*. Proc Natl Acad Sci USA, 1992; **89**: 4874
7 Berg D T, Mcclure D B, Grinnel B W *et al*. Nucl Acid Res, 1992; **20**: 5485
8 Needham M, Gooding C, Hudson K *et al*. Nucl Acid Res, 1992; **20**: 997
9 Polayes D. Focus, 1991; **13**: 130
10 马文丽，薛社普．科学通报，1993；**38**：950
11 Fredman T. Nature Genetics, 1992; **2**: 93
12 Trojan J, Johnson T R, Ilan J *et al*. Science, 1993; **259**: 94

细胞间粘附分子 1 的研究进展

梁 华 马大龙

（北京医科大学免疫教研室，北京 100083）

摘要 细胞间粘附分子 1（ICAM-1），又名 CD 54，是一种重要的细胞表面粘附分子，属免疫球蛋白超家族．它可与鼻病毒以及整合素家族成员结合，参与炎症，普通感冒，变态反应及移植排斥反应．文章就其细胞分布、表达调节、结构功能、基因工程以及临床应用进行了综述．

关键词 CD 54，ICAM-1，鼻病毒，炎症

细胞间粘附分子 1（ICAM-1）是一种分子量为 76 000—114 000 的细胞表面粘附分子，它与 ICAM-2，ICAM-3 同属免疫球蛋白超家族，都能与 LFA-1 分子即（CD 11a/CD 18）结合．1986 年，R. Rottclein 等人在研究佛波脂刺激的同种异型淋巴细胞的粘附中发现了一种 LFA-1 的配体，是细胞粘附必需的，定名为细胞间粘附分子 1（intercellular adhesion molecule-1），后统一命名为 CD 54[1]．1989 年

收稿日期：1993-06-10，修回日期：1993-09-28

New Trends in Artificial Imitation of Enzymes. Luo Guimin. (*The National Laboratory of Enzyme Engineering, Jilin University, Changchun* 130023). *Prog. Biochem. Biophys.* (China). 1994; **21** (4): 290—294

Catalytic antibodies and molecular imprinting are two new trends in artificial imitation of enzymes, and their recent advances have been reviewed on the basis of the host - guest chemistry and supramolecular chemistry.

Key words host-guest chemistry, supramolecular chemistry, catalytic antibodies, molecular imprinting, artificial imitation of enzymes

Structure and Function of Apolipoprotein J. Liu Bingwen. (*Apolipoprotein Research Unit, West China University of Medical Sciences, Chengdu* 610041). *Prog. Biochem. Biophys.* (China). 1994; **21** (4): 294—299

Apolipoprotein J (apo J) has been purified from human plasma HDL and characterized by de Silva *et al* in 1990. Apo J is a 70kD glycoprotein, comprised of two disulfide-linked subunits designated apo Jα (34—36kD) and apo Jβ (36—39kD). The sequence of the 427 amino acid residues of apo J was deduced by the cDNA cloning and sequencing. The predicted α helical regions of apo J indicated that three of these could generate amphiphilic α helices, and may be lipid - bind domains in apo J. Apo J mRNA was expressed in relatively high levels in brain, ovary, testis and liver. Apo J is unique among previous characterized human apolipoproteins in its structure and tissue distribution. The function of apo J is thought to be involved in a variety of physiological processes, including bind and transport lipids, regulation of complement function and sperm maturation etc.

Key words apolipoprotein J, apo Jα and apo Jβ, apo J HDL, structure and function, apo J homologs

Gene Expression System in Mammalian Cells. Ma Wenli, Xue Shepu. (*Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing* 100005). *Prog. Biochem. Biophys.* (China). 1994; **21** (4): 300—303

Through appropriate design and molecular manipulation, mammalian expression vectors could be constructed. Such plasmids, when introduced into suitable mammalian host cells, would effectively express foreign genes of interestes, which constitutes a mammalian gene expression system. Here, the current advances in this field are reviewed.

Key words mammalian cells, expression vector, expression plasmids

Advances in the Researches of Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1). Liang Hua, Ma Dalong. (*Department of Immunology, Beijing Medical University, Beijing* 100083). *Prog. Biochem. Biophys.* (China). 1994; **21** (4): 303—307

Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1, CD54), which belongs to the immunoglobulin superfamily, is one of the important adhesion molecules on the cell surfaces. It can bind rhinovirus and some of the members of the integrin family and involves the developments of inflammation, commen cold, allergy and graft rejection etc. A brief review about the cell distributions, expression regulation, structure, fuctions and clinical applications of ICAM-1 is described.

Key words CD 5 4, ICAM - 1, rhinovirus,