

# 基因定位修复技术 ——嵌合修复术 (chimeraplasty)

欧阳立明 张嗣良

(华东理工大学生物工程学院, 上海 200237)

刘志敏\*

(军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100071)

**摘要** 传统的以病毒 DNA 为载体的基因治疗方法存在病毒导入的靶向性差、整合位点的特异性差、基因剂量的可控性差以及病毒载体具有一定的免疫原性的缺点, 而实际上许多单基因遗传病只要将突变的单个碱基校正就能达到基因治疗的目的, 不必置换或整合入整个基因。嵌合修复术 (chimeraplasty) 是近年来迅速发展起来的一种基因定位修复技术, 该技术利用 RNA/DNA 嵌合体分子与要修复的宿主染色体 DNA 碱基序列互补而精确定位并原位修复, 也可用于人工定点突变, 已在单基因遗传病的基因治疗及植物遗传改良等方面获得了成功的应用。介绍了该技术的原理、应用举例及前景。

**关键词** 基因定位修复, 基因治疗, 嵌合修复术

**学科分类号** Q78

基因治疗是指将外源正常、有功能的基因导入体内置换体内的变异基因或增补缺陷基因。如果能将缺陷基因原位校正, 保证患者基因组序列不发生其他变化, 并且导入的基因能接受体内原有的复杂调控, 就是理想的和真正意义上的基因治疗。传统的基因治疗方法是以病毒 DNA 为载体, 连接正常基因后转染宿主细胞, 或是借助逆转录病毒载体上的长末端重复序列 (long terminal repeats, LTRs) 将外源基因整合到宿主细胞基因组上, 或是以附加体形式独立在宿主细胞内复制、转录、翻译以实现基因转移。这种方法存在病毒导入的靶向性差、整合位点的特异性差、基因剂量的可控性差以及病毒载体具有一定的免疫原性的缺点, 因而人们一直热衷于寻找更高效、更安全的替代方法。

在大多数情况下, 单基因遗传病的分子遗传学病理基础是点突变, 也就是单个碱基的突变, 而基因的其他序列都是正常的, 因此只要将突变的单个碱基校正就能达到基因治疗的目的, 而不必置换或整合入整个基因。这种基因定位修复技术可以使单基因遗传病得到永久性的治愈, 有一定的吸引力, 但长期以来没有实现这种理想的效果。近几年, 该技术获得了突破性的进展, 使人们对基因治疗又充满希望。这项技术的主要改进在于使用单链 RNA/DNA 嵌合体寡聚核苷酸分子 (chimeric oligonucleotide, CO) 作为基因定位修复的工具, 这样的嵌合体比全 DNA 序列对靶基因的结合能力更强。由于修复过程

中嵌合体对含有突变的靶基因的修复类似于外科整形手术, 因此这项技术又被称为 chimeraplasty (笔者试译为嵌合修复术), 用于修复的分子又被称为 chimeraplast (嵌合修复体)。

## 1 Chimeraplasty 的原理

Chimeraplast 是由一段 DNA 和一段 2'-O-甲基化 RNA 组成的单链互补结构 (图 1)。5~9 个 DNA 单核苷酸碱基与要修复的靶基因序列配对 (靶基因上的突变碱基不能配对), DNA 两侧各有 10 个 2'-O-甲基化 RNA 单核苷酸, 也与相应的靶基因序列互补。O-甲基化是为了保护 RNA 不在细胞中被 RNase H 迅速降解。5 对 GC 配对形成的“夹子”保护 3' 端免受降解。链的 3' 端和 5' 端之间有一个缺口, 可允许分子拓扑缠绕在靶基因序列上。整个分子结构中只有 2 个由 4 个胸苷 (T) 构成的小环不配对, 使分子两端回折, 形成稳定的茎环结构<sup>[1]</sup>。Chimeraplast 分子导入细胞后, 能主动寻找到互补的靶基因序列, 并激活宿主细胞自身的修复酶, 使靶基因上的错配碱基得以修正。碱基转换需要宿主重组酶 RecA 和错配修复酶 MutS 的参与。在细菌系统的研究中, 整个修复过程分为两

\* 通讯联系人。北京市丰台区东大街 20 号 8 所 2 室, 邮编 100071。

Tel: 010-63833524

E-mail: Liuzm 2001@21cn.com 或 ouyangpq@263.net

收稿日期: 2000-06-22, 接受日期: 2000-08-23

步: 首先, RecA 介导靶基因序列和 chimeraplast 分子的配对以及 chimeraplast 分子自身互补序列的配对, 并形成双 D 环; 然后在这种复合结构上由 MutS 进行原位修复. 在人体系统中, 另一种重组

酶 HsRec2 能显著加强 RNA/DNA 嵌合体分子与互补靶 DNA 序列的结合, 结合能力远高于全 DNA 的寡核苷酸分子链<sup>[2]</sup>.

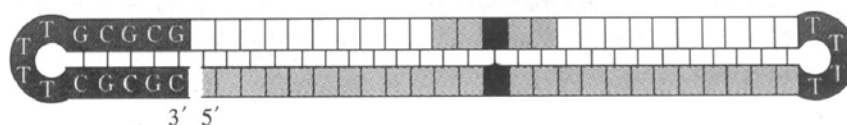


Fig.1 The configuration sketch map of the Chimeraplast

图 1 Chimeraplast 分子结构示意图

■: 与靶基因配对的 DNA 碱基; ■: 与靶基因不配对的 DNA 碱基; □: O-甲基化的 RNA 碱基; ■: T 环和“GC 夹子”.

## 2 Chimeraplasty 应用举例

1996 年, chimeraplasty 技术首次应用以修复一个共转染到 CHO 细胞的质粒上碱性磷酸酶基因的点突变, 获得成功. 其后, 又成功用于以下试验: 修复位于染色体的引起镰刀状细胞贫血病的  $\beta$ -珠蛋白基因突变; 尾静脉注射使小鼠肝细胞凝血 IX 因子基因发生点突变; 修复酪氨酸酶基因, 使白化病小鼠细胞产生黑色素, 等等. 在这里, 我们重点介绍两个体内基因定位修复治疗分子病的例子. 一例是克-纳二氏综合症 I 型 (Crigler-Najjar syndrome type I), 另一例是杜兴肌营养不良症 (Duchenne muscular dystrophy).

克-纳二氏综合症又名遗传性黄疸病, 属常染色体隐性遗传. 其致病机理是肝内二磷酸尿苷葡萄糖转移酶 (UDP-glucuronosyltransferase, UGT) 1A1 基因内部发生点突变, 使该酶活性丧失, 导致胆红素不能葡萄糖苷酸化并从胆汁排除. II 型酶活部分丧失, I 型则完全丧失. 血液中游离的胆红素引起皮肤和眼睛变黄 (黄疸), 并对脑有致命的损伤. 患该病的儿童不得不每天在蓝光下生活 10~12 h, 以分解胆红素. 而随年龄增大, 光疗法的效果越差, 往往使儿童在成年前死亡.

该病的 Gunn 大鼠模型在 UGT1A1 基因内部第 1206 位鸟苷酸 (G) 缺失, 导致移码突变和提前终止. 其表型是 UGT1A1 酶活丧失, 及血清胆红素水平过高. 采用 chimeraplasty 技术, 将如图 1 模式设计合成的 RNA/DNA 嵌合体寡聚核苷酸分子 (CO) 与乳糖化的聚乙烯亚胺或阴离子脂质体混合, 经尾静脉注射入大鼠体内. 在乳糖化的聚乙烯亚胺或阴离子脂质体对肝细胞表面无唾液酸基糖蛋

白受体的亲合导向下, 将 CO 分子定向导入肝细胞. 同时在体外也转染了培养的肝细胞. 体外和体内基因治疗的肝细胞基因组 DNA 经 PCR 扩增, 菌落印迹杂交, 特异性酶切, DNA 测序以及 DNA 印迹、蛋白质印迹杂交都证明基因组内缺失的 G 能被高效、特异、稳定地修复. 体外一次转染的 G 插入率达 15.3%, 二次转染后增至 23.7%; 体内注射 7 d 后的 G 插入率约为 20%, 4 个月后和 6 个月后检查, G 插入率基本不变. 体内治疗后的大鼠检测其血清游离胆红素水平、UGT1A1 酶活水平和胆汁色素类型, 也表明缺失的酶活性得到了有效的恢复. 荧光标记 CO 示踪表明, 体内注射 CO 后 2 h 内即到达肝组织, 只有少量进入肺、心、肾组织; 用无唾液酸胎球蛋白 (asialofetuin, ASF) 做竞争抑制试验, 几乎能完全抑制肝组织对修饰的 CO 的吸收. 这说明乳糖化的聚乙烯亚胺或阴离子脂质体修饰的 CO 能经肝细胞表面的无唾液酸基糖蛋白受体介导而对肝产生组织特异性. 另外, 试验 48 h 后, 即检测不到荧光, 说明该分子能在体内自动降解, 无残留, 不存在对机体致突变、致癌的危险. 发明 chimeraplasty 技术并对其拥有专利的 Kimeragen 公司 (现已并入 Valigen 公司) 希望本年度能得到 FDA 批准, 使治疗克-纳二氏综合症的分子药物成为第一个基因治疗产品<sup>[2]</sup>.

杜兴肌营养不良症也是一种儿童致死性疾病, 为 X-连锁伴性隐性遗传, 男孩发病率高于女孩. 据统计美国发病率约 1/3500 新生儿患有该病. 其致病机理是编码肌细胞增强蛋白 (muscular dystrophin, MD) 的基因发生了点突变, 无法表达正常的蛋白质产物. 因为 MD 基因太大, 用以往的病毒载体或裸基因注射等方法都难以操作. 该病

的 mdx 小鼠模型在 MD 基因内有一处点突变, 从而引起肌营养不良症. 用设计合成的 chimeraplast 分子 (命名为 MDX1) 注射胫骨肌前肌后, 免疫组化分析显示 MD<sup>+</sup> 纤维聚集在注射部位. 2 周后任一肌肉中纤维的 1%~2% 都为 MD<sup>+</sup>, 10 周后与 2 周后的结果相似, 而对照没有 MD<sup>+</sup> 的纤维出现, 说明发生了稳定的基因转换<sup>[3]</sup>. 最近, 在该病的狗动物模型上用 chimeraplasty 治疗也获得了成功.

### 3 Chimeraplasty 的应用前景

近年来, 用 chimeraplasty 方法进行基因治疗取得了非常鼓舞人心的实绩, 但要有效地应用它, 必须在某些环节谨慎对待. 有一些实验室声称不能利用它有效地工作, 这主要是因为该技术对 CO 分子合成的质量和纯度有很高的要求. 明尼苏达大学的 Steer 就曾在对凝血因子 IX 的改造中使突变率高达 40%. 另外一点令人忧虑之处是, 由于被修复的基因可能在基因组内有很多同源性极高的家族成员, 所以 CO 分子有可能影响到其他的同源基因. 但该技术最关键的地方可能是有效导入靶细胞的方法. 前述的克-纳二氏症基因治疗就建立了一种很好的靶向性导入肝细胞的体系<sup>[4]</sup>.

单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphisms, SNPs) 近年来被认为是许多疾病发生和治疗的关键. 据报道伴有 SNPs 的常见疾病有肿瘤、哮喘、肥胖、糖尿病、血胆固醇过高引起的心脏病发作等. 近年发明的 chimeraplasty 技术能安全、特异、高效、稳定地对 SNPs 的致病突变碱基进行定位修复, 可以说是治疗 SNPs 疾病的首选方法. 尤其是在 1999 年美国发生腺病毒载体介导的基因治疗使患者产生急性免疫反应致死事故后, 使基因治疗的前景笼罩了一片阴影. 而 chimeraplasty 技术在动物实验上取得的成功使其成为目前取代传统病毒载体基因治疗的最具希望的方法.

实际上, chimeraplasty 的应用还远不止于 SNPs 疾病的基因治疗, 它的宿主可以是人体、动

物、细菌、酵母、果蝇和植物, 其用途还可以扩大到植物和家畜的遗传改良等. 例如, Kimeragen 公司于 1999 年成功地运用该技术培育出抗除草剂的烟草品种. 其原理是, 用基因枪法将设计合成的 CO 分子导入培养的烟草细胞, 使基因组内编码乙酰乳酸合成酶的基因发生一个错意突变, 从而使再生的植株产生对磺酰脲类除草剂的抗性, 而且抗性能以孟德尔规律遗传到子代<sup>[5]</sup>. 类似的, 抗除草剂的玉米也相继培育出来. 由于没有外源基因导入植物, 因此这种遗传改良作物可能更易被官方批准和被大众接受. 据此推想, 该技术期望能进一步应用到植物的抗虫、抗病和增加营养成分等遗传改良工程.

在畜牧业方面, Kimeragen 公司已与制造克隆羊多莉的 Roslin (Bio-Med Ltd) 合作, 计划将 chimeraplasty 应用于治疗疯牛病、绵羊瘙痒病和消除超急性反应使动物能为人体提供无免疫排斥的脏器.

如果能在人体临床和动植物田间实验中继续获得成功, chimeraplasty 必将在人类定向修复和改造基因方面发挥重要的作用.

### 参 考 文 献

- 1 Hohn B, Puchta H. Gene therapy in plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96** (7): 8321~8323
- 2 Kren B T, Parashar B, Bandyopadhyay P, *et al.* Correction of the UDP-glucuronosyltransferase gene defect in the Gunn rat model of Crigler-Najjar syndrome type I with a chimeric oligonucleotide. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96** (8): 10349~10354
- 3 Rando T A, Disatnik M-H, Zhou Lucy Z-H. Rescue of dystrophin expression in mdx mouse muscle by RNA/DNA oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97** (5): 5363~5368
- 4 Stephenson J. New method to repair faulty gene stirs interest in chimeraplasty technique. *Journal of the American Medical Association*, 1999, **281** (2): 119~121
- 5 Beetham P R, Kipp P B, Sawycky X L, *et al.* A tool for functional plant genomics: chimeric RNA/DNA oligonucleotides cause *in vivo* gene specific mutations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96** (7): 8774~8778

## A Tool for Site-specific Gene Repairing: Chimeraplasty

OUYANG Li-Ming<sup>1)</sup>, ZHANG Si-Liang<sup>1)</sup>, LIU Zhi-Min<sup>2)\*</sup>

<sup>1)</sup> College of Bioengineering, East China University of Science & Technology, Shanghai 200237, China;

<sup>2)</sup> Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Science, Beijing 100071, China)

**Abstract** The problems existing in the conventional gene therapy involves low effectivity in virus' targeting transduction, low speciality in integration, low effectivity in controlling the gene expression dosage and immunogenicity of virus vector. While most single gene genopathies can be cured by correct the single mutant nucleotide using gene therapy, without changing the whole gene. Chimeraplasty is a tool for site-specific gene repairing which developed rapidly in recent years. The RNA/DNA chimeric oligonucleotide can located to the exact site and repair the wrong base in situ by complementing to the host chromosome DNA sequence, and it can also be used to produce targeted mutation. It has been successfully applied in the gene therapy of some single gene genopathy and plant genetical modification. The principle, examples and prospect of this technique was described.

**Key words** site-specific gene repairing, gene therapy, chimeraplasty

---

\* Corresponding author (Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Science, Beijing 100071).

Tel: 86-10-63833524, E-mail: liuzm2001@21cn.com or ouyangpq@263.net

Received: June 22, 2000 Accepted: August 23, 2000