

学术报告

反义寡聚脱氧核糖核苷酸对 P21 合成的抑制作用*

癌基因本是存在于人类基因组中的一组正常的基因。在许多恶性疾病中,它表现出基因突变或过度表达。正常的 *ras* 基因产物在控制细胞的生长和分化中起着重要作用,该基因的质或/和量发生改变,都可引起细胞的生长异常而恶变^[1,2]。早在 1982 年,张惠萍等就用病毒癌基因 *v-ras* 作探针,从正常人的基因组文库中克隆出四个不同的与 *ras* 相关的 DNA 序列^[3,4]。其中两个与 Ha-*ras* 密切相关,两个与 Ki-*ras* 密切相关。它们都能产生分子量约为 21KD 的蛋白质,称 P21^[5]。它们是免疫学上相关的,均可被 P21 的抗体免疫沉淀。P21 有两个重要的性质:一是与 GTP 结合;二是具有 GTP 酶活性。众所周知, GTP 结合蛋白在细胞生长分化中起着至关重要的作用,它在质或量上失去平衡,都可导致细胞生长分化发生一系列的紊乱。但尚不知 P21 与细胞转化之间的确切关系。目前认为, P21 很可能有传递信号的作用,它可将信号从与生长因子结合的受体传递给细胞内的信使系统,后者又进一步作用于蛋白激酶,使蛋白激酶 C 的活性增高;它还可使细胞内 pH 值升高,从而导致细胞分裂失去控制而转化。

正常人的基因组中仅有单拷贝的 *ras* 基因^[6],当用 1—5 个拷贝的 *ras* 基因去转化 NIH 3T3 细胞时,无转化发生。但如果给 *ras* 基因的上游区接上一个来自于小鼠或猫类的逆转录病毒的长末端重复顺序(LTR)后,再转入 NIH 3T3 细胞,细胞就发生恶性转化^[1,2,7]。在转化细胞中可测到高水平的 *ras* 基因 mRNA 和其正常产物——P21。将这些细胞注入小鼠体内,可很快地诱发出肿瘤^[7]。实验提示我们,不正常地过度表达一个正常基因,可以转化细胞,那么能否用一些药物或生长因子,如肿瘤抑制因子或干扰素等来抑制癌基因的表达,使转化的细胞逆转成生化指标和表型均正常的细胞呢?

干扰素可以抑制许多基因的表达。用鼠 β 干扰素 (IFN) 处理已被 *ras* 基因转化的细胞,用量仅为 200 单位/ml。三周后,发现有些细胞转变成正常表型。将这些细胞克隆培养,然后注入裸鼠体内,未见肿瘤产生。软琼脂中也不能形成集落^[8]。Southern 杂交分析表明, *ras* 基因仍存在于这些细胞中,与逆转前的细胞没有区别。为了进一步分析干扰素是作用于转录水平

还是翻译水平,又对细胞内 *ras* 基因的 mRNA 和 P21 进行检测。发现 mRNA 水平比对照降低 80% 以上, P21 水平也降低 80%。此实验结果说明,如果把某一特定癌基因的表达降低到一个较低的水平,即使达不到正常水平,则有希望使转化的细胞变成正常细胞,这也符合许多肿瘤治疗的原则。如果能使 *ras* 基因的表达降低 80%,即可达到使转化细胞逆转为正常细胞的作用。

以往对核酸基本结构和性质的研究表明,当两条单链的 DNA 或一条单链的 DNA 和 RNA 的碱基顺序互相匹配时,可以通过氢键的作用结合在一起。这个特性提示,如果已知某一基因的序列,可以合成一段碱基顺序与之匹配的寡聚核苷酸,用它将 mRNA 上与之互补的区域封闭起来, mRNA 的翻译不能进行,蛋白质合成受阻。在使用寡聚核苷酸之前,先对它们进行甲基化处理。这样做有三点益处: 1. 容易进入细胞; 2. 与互补顺序结合的更牢固; 3. 可抵抗细胞内各种核酸酶的降解,因而可长时间地发挥效用。

ras 癌基因导致细胞恶性生长的机制之一是过度表达,故使用的第一类寡聚核苷酸是特异地与 *ras* 基因 mRNA 的翻译起始区互补,分别称作 IC-0、IC-1 和 IC-2。它们均为十一个核苷酸的寡聚体。IC-0 指这个寡聚体与翻译起始密码子 IC(Initiation Codon) 完全匹配。IC-1 指有一个核苷酸不匹配; IC-2 有两个核苷酸不匹配。为了获得清晰的自显影带和省去费时费力地提取 RNA 的步骤,可采用体外翻译系统,即用兔网织红细胞离体翻译系统合成 P21。在此系统中,采用 SP6 载体合成纯的 Ha-*ras* RNA 作为模板,加入合成蛋白质所需的各种氨基酸,包括 ³⁵S 标记的甲硫氨酸,在体外无细胞系统中合成 P21,并用 P21 的单克隆抗体,免疫沉淀翻译产物。经聚丙烯酰胺/SDS 电泳和放射自显影,可判断体外合成的 P21 蛋白含量。当加入的寡聚核苷酸达到 200 μ mol 时, IC-0 使 P21 水平较对照(不加寡聚核苷酸)下降 97%, IC-1 使 P21 下降 31%,而 IC-2 仅下降 16.5%。这说明封闭 IC

* 此文是根据美国 USUHS 大学张惠萍 (Chang, E. H.) 教授在北京市肿瘤防治研究所所做的学术报告整理的。

区的确可使 P21 合成受阻。当封闭物不完全匹配时,结合不牢固,封闭物可能分开,而 mRNA 仍可进行翻译。只有完全匹配,才能有效地抑制,故作用是非常特异的。

ras 癌基因导致细胞恶性生长的另一个机制是质的改变,即基因突变。所以使用的第二类寡聚核苷酸是特异地互补于 ras 基因含有点突变的区域,为八个核苷酸的寡聚体。包括三种:第一种与点突变区完全匹配;第二种与点突变区有一个核苷酸不匹配;第三种则有两个不匹配。分别加入上述的离体翻译系统中,分析其对 P21 合成的影响。结果表明,第一种使 P21 合成抑制最明显,第二种次之,第三种抑制作用最差。这说明可以用反义寡聚核苷酸特异地阻断突变 P21 的合成。

上述两个实验都是从体外翻译系统得出的结果。还可以进一步试验寡聚核苷酸对细胞内 P21 合成的影响。要使转化的细胞逆转为正常细胞,从上面两个实验可以看到,反义寡聚核苷酸在细胞外的确起到了调节 P21 合成的作用,但在细胞内是否也能起到同样的作用呢?可以合成八个核苷酸的寡聚体,它与 ras 基因第一个内含子和第二个外显子交界处相匹配。然后分别试验它对三个转化细胞系的作用:第一个是用正常的 c-Ha-ras 转化的,第二个是用膀胱癌转化基因 EJC-Ha-ras 转化的,第三个则是用 v-Ha-ras 转化的。如果这个寡聚体能与有内含子信息的 RNA 结合,则剪切 RNA 内含子的过程受阻,RNA 不能成熟为可进行翻译的 mRNA,使 P21 合成障碍。而 v-Ha-ras 没有内含子,故不应被封闭。用此寡聚体处理这三个

转化细胞系 8 小时,然后加入 ^{35}S 标记的甲硫氨酸培养过夜,24 小时后分析 P21 含量。发现第一个和第二个细胞系中 P21 含量均降低,而第三个细胞系中 P21 水平无改变。尽管前两个细胞系中 P21 水平降低很明显,但所有的细胞均未见到有表型的逆转。这可能是因为观察的时间太短(24 小时),还不能看到细胞表型的变化。为此,如果能得到更多的反义寡聚体,就可以研究使细胞表型发生逆转的规律,并从细胞水平跨到整体动物水平进行实验,将其注入裸鼠体内,观察其能否抑制诱发肿瘤或使肿瘤生长发生改变,并探讨寡聚核苷酸对体内 ras 基因表达的调节作用。

参 考 文 献

- [1] Chang, E. H. et al.: *Science*, 1980, **210**(4475), 1249.
- [2] Defeo, D. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1981, **78**(6), 3328.
- [3] Chang, E. H. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1982, **79**(16), 4848.
- [4] O'Brien, S. J. et al.: *Nature*, 1983, **302** (5911), 839.
- [5] Tabin, C. J. et al.: *Nature*, 1982, **300**(5888), 143.
- [6] Chattopadhyay, S. et al.: *Nature*, 1982, **296** (5855), 361.
- [7] Chang, E. H. et al.: *Nature*, 1982, **297** (5866), 479.
- [8] Samid, D. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1984, **119**(1), 21.

[北京市肿瘤防治研究所 刘景梅整理,邓国仁审校]

(上接第 311 页)

式形成、形态发生等)、社会生物学研究。

二、量子生物学室(方向在转变)。现在进行生物膜的动态结构(流感病毒与细胞间的相互作用,包括膜融合的分机理)、细胞内吞作用(包括铁盐颗粒的内吞)、嫌高黏的结合等研究。

三、生物高分子反应室。进行光生物学及感觉生理学工作。包括光感受物质(视紫质、菌紫质、视锥色素等)的光物理、光化学过程、酶级联反应的增幅过程、光感受器电位的发生研究。

四、分子生物学(分子遗传学)室。进行大肠杆菌的 tRNA 基因表达、T 细胞受体、叶绿体基因组等研究。

五、原形质物性学室。进行形成生物大分子、形成不同组织的分子机理研究。

六、生物高分子构造室。

七、形质发生学室。进行 mRNA 的前体拼接反应中的降解物基因活化蛋白、鸡 α 晶状体蛋白的基因等

研究。

访问后的印象是,该系进行着分子生物学、生物物理学中的一些前沿工作,设题具有远见性。工作扎实深入。仪器新老兼有,维护的好,使用率高,能发挥作用。班子配套,工作效率高。

这次会增强了两国生物物理学家的友谊,增进了科研工作的了解和合作。

1985 年曾在我国无锡召开了首届双边会议,规模达到 270 人,日方有 89 人参加了会议。那次会开得很成功,为这次第二届会议打下了良好基础。

这次会议闭幕时大西俊一(京都大学教授)发言并咏诗,大意是:第一届无锡会议播下了种子,这次会议使种子发了芽,我们要精心培育它,使它茁壮成长。

会后双方商定 1991 年在我国西安召开第三届中国双边生物物理学学术会议。希望我国生物物理学工作者努力工作,拿出高水平的成果,迎接下届会议的召开。
[中国生物物理学会供稿]