

效率的工作已进行的十分广泛, 被发现的影响表达效率的因素也有很多, 它们之间有很大的相关性. 单单改进其中一个方面往往不能取得明显的效果, 有时还存在一定的机遇性. 但是, 认识到各因素的产生和作用的方式, 就能够提出改进表达效率的方法. 这方面工作的深入研究, 有很深远的理论意义和实际应用价值.

参 考 文 献

- 1 Walker J M, Gingold E B. Molecular biology biotechnology, 2nd edition, London: Burlington House, The Royal Society of Chemistry, 1988; 53-66
- 2 Kobayashi M, Kurusu Y, Yukawa H. Appl Biochem Biotechnol, 1991; 27: 145
- 3 Surek B, Wilhelm M, Hillen W. Appl Microbiol Biotechnol, 1991; 34: 488
- 4 Shibui T, Uchida M, Nagahari K *et al.* Agric Biol Chem, 1988; 52: 1145
- 5 Gan Z R, Condra J H, Gould R J *et al.* Gene, 1989; 79: 159
- 6 Kurland C G. FEBS Lett, 1991; 285 (2): 165
- 7 Grosjean H, Fiers W. Gene, 1982; 18: 199
- 8 Makoff A J, Oxer M D, Romanos M A. Nucleic Acids Res, 1989; 17 (24): 10191
- 9 Brinkmann U, Mattes R E, Buckel P. Gene, 1989; 85: 109
- 10 Spanjaard R A, Chen K, Walker J R *et al.* Nucleic Acids Res, 1990; 18 (17): 5031
- 11 Scorer C A, Carrier M J, Rosenberger R F. Nucleic Acids Res, 1991; 19 (13): 3511
- 12 Jelenc P C, Kurland C G. Proc Natl Acad Sci USA, 1979; 76 (7): 3174
- 13 Makoff A J, Smallwood A E. Nucleic Acids Res, 1990; 18 (7): 1711
- 14 Sung W L, Zahab D M, Barbier J R *et al.* J Biol Chem, 1991; 266 (5): 2831
- 15 Gross G, Mielke C, Hollatz I *et al.* J Biol Chem, 1990; 265 (29): 17627
- 16 Hall M N, Gabay J, Debarbouille M *et al.* Nature, 1982; 295 (18): 616
- 17 Wood C R, Boss M A, Patel T P *et al.* Nucleic Acids Res, 1984; 12 (9): 3937
- 18 Wood T K, Peretti S W. Biotechnol Bioeng, 1991; 38: 397
- 19 Higgins C F, McLaren R S, Newbury S F. Gene, 1988; 72: 3
- 20 Brinbaum S, Bailey J E. Biotechnol Bioeng, 1991; 37: 736
- 21 Studier F W. J Mol Biol, 1991; 219 (1): 37
- 22 Hiraga S, Jaffe A, Ogura T *et al.* J Bacteriol, 1986; 166: 100
- 23 Blackwell J R, Horgan R. FEBS Lett, 1991; 295 (1-3): 10
- 24 Rudolph R. In: Tschesche H ed. Modern methods in protein and nucleic acid research; review articles. Berlin: W. de Gruyter, 1990: 147-171

反义核酸在肿瘤研究中的应用*

孙丛梅 周爱儒

(北京医科大学生生化教研室, 北京 100083)

摘要 反义核酸研究已活跃于肿瘤研究及基因治疗领域. 反义核酸通过碱基配对特异性地抑制基因表达, 因此为研究肿瘤中癌基因和生长因子的功能及癌基因突变检测提供了更为有效的手段, 并为肿瘤的基因治疗提供了可能途径. 文章综述了反义核酸在基因治疗中所面临的问题及部分解决办法.

关键词 反义核酸, 寡聚脱氧核苷酸, 肿瘤

近年来, 随着反义核酸研究的深入, 更多的注意力集中于针对肿瘤的研究. 反义核酸, 它是与目的基因或目的基因 mRNA 互补, 并

以碱基配对方式与目的序列结合的核酸. 它可

*国家教委博士点基金, 国家自然科学基金资助项目.
收稿日期: 1992-11-11, 修回日期: 1993-03-22

通过空间位阻效应或诱导 RNaseH 活性, 在复制、转录、剪接、mRNA 转运及转译等水平上抑制目的基因的表达。反义核酸的这一特点对研究癌基因以及生长因子功能、肿瘤的基因治疗等都提供了新的思路和方法。

1 癌基因及生长因子功能的研究

反义核酸的出现, 为研究癌基因及生长因子的功能提供了直接、简捷的途径。通过反义核酸抑制某一种特殊癌基因或生长因子的表达, 并观察对细胞或机体所带来的影响, 可以判断出该癌基因的功能及作用途径。

在不少恶性肿瘤中均发现 c-myc 基因的扩增, 而正常分化过程中, c-myc 表达下降。这究竟是分化过程的一个伴随现象, 还是细胞增殖分化的一个重要调控因素, 从人外周血中分离出 T 细胞 (G_0/G_1 期), 未测到 c-myc 蛋白的表达; 经有丝分裂原刺激进入分裂期的 T 细胞, 则可测到 c-myc 蛋白。用 c-myc 的反义寡聚核苷酸抑制 c-myc 蛋白表达, 发现有丝分裂原诱导的细胞不再进入 S 期, 但仍可从 G_0 期进入 G_1 期。由此可见, c-myc 蛋白是 T 淋巴细胞进入 S 期的必要调节因子^[1]。

反义核酸还可用于区分原癌基因与癌基因, 特别是由于点突变或移位嵌合而激活的癌基因。ras 基因家族中 Ha-ras, K-ras, N-ras 均可由点突变而激活。在 T_{24} 细胞中 H-ras 因第 12 位密码子点突变而激活, 与这个点突变位点互补的反义寡聚核苷酸可特异性阻抑突变 ras 的 mRNA 表达, 而对原癌基因 ras 的 mRNA 影响甚微^[2]。用 ribozyme 则更突出地区分了这一点突变的变异。突变的第 12 位密码子为 GUU, 可被 ribozyme 识别, 而正常 ras mRNA 第 12 位密码子为 GGU 则不被 ribozyme 识别^[3]。

TGF β_1 (transforming growth factor β_1) 被认为是多种肿瘤的负调控因子, 但一直缺乏直接的实验证据。抗体中和实验存在诱导水平低, 且难于在动物整体水平上进行生物行为研究等局限性。为克服这一困难, 人们用载有

TGF β_1 cDNA 的反义核酸载体转染人的 FET 克隆癌细胞, 发现 TGF β_1 mRNA 水平降低 5 倍, TGF β_1 分泌水平降低 15 倍, 最终导致细胞锚地非依赖性水平增高 4 倍。以 5×10^5 细胞接种裸鼠, 对照组不形成肿瘤, 而反义 TGF β_1 组动物有 40% 形成了肿瘤; 当接种数提高到 1×10^6 细胞时, 反义 TGF β_1 组 100% 形成肿瘤, 而对照组依然无肿瘤形成, 此结果直接证明了 TGF β_1 是人癌细胞的负调控因子^[4]。

本实验室首次报道 TGF α 反义寡聚核苷酸对 BIU87 人膀胱癌细胞的抑制作用。TGF α 反义寡聚核苷酸含 23 个核苷酸 (3' -GATTT TCA CAG GGG AGC CGA CCT-5'), 与 TGF α mRNA 前 6 个密码子及其上游部位的区域互补。对照链与反义核酸链所含的碱基数目及比例均相同, 但与 TGF α mRNA 无互补性 (又称随机链, 3' -GCGCC CGG TCA ATG CAT TAG TAG-5')。在培养的 BIU87 细胞中, 分别加等量的反义核酸链和对照链, 细胞计数表明: 反义核酸明显抑制 BIU87 细胞增殖, 而对照链的抑制作用则不显著^[5]。另有报道运用 C-Ha-ras 的反义寡聚核苷酸抑制肿瘤细胞增殖, 取得了显著效果^[13]。

除了上述几种癌基因和生长因子外, 反义核酸还成功运用于 c-fos, c-src, c-mos, c-abl, c-raf-1, csF-1, bFGF, EGF, EGFR, TGF β_3 等功能及调控的研究。不仅如此, 反义核酸为肿瘤的基因治疗提供了理论基础和直接手段。

2 肿瘤的基因治疗

有人称“反义核酸的治疗代表着药理学上的一次革命”。Texas 大学 M. D. Anderson 肿瘤中心的科学工作者对慢性粒细胞白血病 (CML) 病人进行常规化疗和放疗的同时, 用反义核酸体外处理病人的骨髓, 再将此骨髓输入病人体内, 以治疗白血病。Pennsylvania 医学院也在尝试用反义核酸治疗白血病, 并预期在半年到一年内将其应用于临床。与此同时还在进一步探索用反义核酸治疗其它恶性肿瘤, 以及病毒、炎症、心血管等与基因变化有关的疾

病^[6].

反义核酸用于基因治疗面临的第一个问题是反义寡聚核苷酸最佳作用靶点的设计, 对此现在仍无明确的原则. 大多数人选择基因转译的起始区段, 对于点突变激活的癌基因, 如 ras 基因家族等, 选择点突变位点做为攻击位点更为有效. 另外在 CML 中, bcr-abl 的易位嵌合位点以及 c-myc 异常转录启动位点也是反义核酸的有效靶点. 一般来说, 反义寡聚核苷酸的最佳长度在 12—20 个核苷酸之间, 长度的选择与其 GC/AT 的含量比例有关, GC/AT 含量比越高, 所需长度越短. 与 DNA 双螺旋形成三股螺旋的反义寡聚核苷酸最小长度一般为 17 个核苷酸左右.

要达到治疗效果, 反义核酸必须顺利进入细胞. 然而, 反义核酸的亲水性及细胞表面受体的饱和性限制了它对膜的通透性. 特别在内吞过程中, 大多数寡聚核苷酸均被溶解酶体所降解, 仅少数被释放入胞质中. 于是有人将反义寡聚核苷酸末端连上疏水基团, 如胆固醇, polylysine 等以提高其通透率. 脂质体包装也是有效方法. 为减少体内网状内皮系统对脂质体到达某些器官组织所产生的阻碍, Cabizo 还用糖脂改造脂质体的成分以改善其功能. 最近还有报道采用聚烷基氰基丙烯酸酯 (polyalkylcyanoacrylate nanoparticles) 微囊包装反义核酸, 效果比脂质体更好, 是一个很有希望的基因治疗载体^[7]. 对于逆转录病毒载体重组反义核酸, 还可借助辅助细胞获得最具感染力的重组病毒颗粒, 理论上对细胞转染率可达 80%—100%.

反义核酸进入体内, 还面临着血清和细胞中单链核酸酶的降解. 为克服这种作用, 大量的化学修饰方法, 如硫化、甲基化、 α -异构体应运而生. 然而除了硫化核苷酸, 其它化学修饰虽可抵抗酶降解, 但对 RNaseH 敏感性下降. 为此有人仅在寡聚核苷酸的两端进行化学修饰, 中间保留 4—5 个未修饰的碱基以诱导 RNaseH, 结果发现这种反义寡聚核苷酸果真既可抗降解, 又可诱导 RNaseH^[8].

为进一步提高反义核酸的作用效果, 人们还在反义寡聚核苷酸的末端共价连接一些嵌插分子, 如多环芳香族分子, 以提高其结合目的序列的能力. 也有在反义寡聚核苷酸上连接一些具有诱导靶序列发生不可逆反应的基团, 一旦反义核酸与其靶序列结合, 这些基团即可发生化学或光化学反应导致靶序列的断裂或交联, 从而产生更强的抑制效果^[9,10].

ribozyme 的发现也为反义核酸提供了新启示^[11]. Ribozyme 分为臂部 (两臂) 和中间锤头结构两部分. 其两臂与目的 RNA 互补, 相当于一种反义 RNA, 而锤头部为催化部位, 一旦两臂与目的 RNA 结合, 催化部位即将目的 RNA 中敏感的磷酸二酯键切断. 天然 ribozyme 的锤头结构十分保守, 且识别序列中的 GUC 密码. 实验证明 ribozyme 的自动剪切功能使其比单纯的反义核酸抑制特异基因表达的效果更为突出. 不少实验室已试着设计适当的 ribozyme 以用于基因治疗.

随着反义核酸的研究深入, 人们发现反义寡聚核苷酸不仅可与 mRNA 结合抑制转译, 还可与双螺旋 DNA 结合抑制基因复制及转录. 有人称这种反义核酸为反义基因. 其特点是碱基全为脱氧嘧啶, 它们与双链 DNA 的碱基形成 Hoogsteen 氢键, 并沿着双链 DNA 中氢键所形成的壑穴与 DNA 形成局部的三股螺旋, 干扰 DNA 结合蛋白如限制酶和转录因子的功能, 从而抑制基因复制和转录. 形成三股螺旋的寡聚核苷酸也可采用化学修饰或连接一些嵌插基团及诱导靶基因发生不可逆反应的基团, 以提高作用效果^[12]. 采用微注射的方法可直接将反义核酸注入细胞核内.

反义核酸进入临床治疗仍有许多问题需进一步深入研究. 例如最小治疗量、最大毒性、耐受性以及诱变性等. 如化学修饰提高反义核酸抗降解及通透膜的能力, 同时也增加了毒副作用: 5' -胆固醇寡聚核苷酸和硫化核苷酸其毒性大于未修饰的相应核苷酸; 三股螺旋的形成可能会干扰其它基因的正常复制、转录和修复; 逆转录病毒载体上的 LTR 结构也可能引起人

体细胞的内源性突变. 现已有不少实验室开始研究反义核酸的药物动力学, 进行反义核酸的急慢性毒性实验及诱变性实验. 相信随着研究的深入, 反义核酸将有望成为临床肿瘤治疗的有力手段.

参 考 文 献

- 1 Heikkia R, Schwab G, Wickstrom E *et al.* Nature (Lond), 1987; **328**: 445
- 2 Dsidon-Behmearas, Tocque b, Rey I *et al.* EMBO J, 1991; **10**: 1111
- 3 Koizumi M, Hayase Y, Iwai S *et al.* Nucleic Res, 1989; **17**: 7059
- 4 Shaoping W, Dan T, Robert S K *et al.* J Cell Bio, 1992; **116**: 187
- 5 孙丛梅, 周爱儒. 全军生长因子研讨会论文摘要集, 1992
- 6 Tom R. J National Cancer Institute, 1992; **84**: 288
- 7 Chavany C, Doan T L, Coucreur P *et al.* Pharmaceutical Res, 1992; **9**: 441
- 8 Dagle J M, Andracki M E, Devine R J *et al.* Nucleic Acids Res, 1991; **19**: 1805
- 9 Helence C, Toulme J J. In: Cohen J S ed, Oligodeoxynucleotides, London: MacMillan Press, 1989: 137—166
- 10 Knorre D G, Viassov V V, Zarytova V F *et al.* In: Cohen J S ed, Oligodeoxynucleotides, London: MacMillan Press, 1989: 173—192
- 11 Rossi J J. Trends Biotechnol, 1990; **8**: 179
- 12 Takasugi M, Guendouz A, Chassignol M *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1991; **88**: 5602
- 13 许毅, 邓国仁, 梁亚云等. 中国科学 B 集, 1990; **1**: 64

棕色脂肪的产热及其调控机制*

叶祖承 蔡益鹏

(北京大学生物系, 北京 100871)

摘要 棕色脂肪组织是小型哺乳动物重要的兼性产热器官, 位于棕色脂肪细胞线粒体内膜的解偶联蛋白是此种产热机制的关键物质. 产热刺激激活解偶联蛋白构成的质子通道, 在线粒体内膜形成质子短路, 从而解除 ATP 合成偶联对氧化呼吸速率的控制, 使产热高速进行. 去甲肾上腺素、甲状腺激素、胰岛素、pH 值以及食物、环境温度等因素综合调控着棕色脂肪组织的结构与功能状态.

关键词 棕色脂肪组织, 解偶联蛋白, 质子通道, 兼性产热, 去甲肾上腺素

棕色脂肪组织 (brown adipose tissue, BAT) 是个有着百年研究历史的课题. 到 70 年代初, 解剖学与生理学中的大量工作已证实了 BAT 在冬眠动物与新生哺乳动物中的作用^[1]. 后来, Nedergaard 等以显微热量计测定 BAT 细胞悬浮液产热; Foster 与 Frydman 用改进的放射性微球体 (microspheres) 技术研究不同适应状态下 BAT 的血流分配, 二者相近的结果表明 BAT 也是冷适应 (cold adapted) 成年实验动物非战栗产热 (nonshivering thermogenesis, NST) 的主要来源. 随后, 食物诱导性 BAT 产热的发现则进一步说明了 BAT 兼性产热 (facultative thermogenesis) 的重要性^[2]. 近十几年对解偶联蛋白 (uncoupling protein, UCP) 的发

现与研究揭开了 BAT 兼性产热调节的分子机制. BAT 研究现已涉及并深入到生物学及相关学科的许多领域, 它的产热参数如 UCP 量、GDP 结合量、细胞色素氧化酶活性、甲状腺素-5'-脱碘酶活性等已逐渐成为衡量动物能量代谢状况的重要指标.

1 BAT 的特征与产热作用

BAT 见于食虫、食肉、翼手、啮齿、兔形、偶蹄、灵长等目动物, 主要分布在肩胛间、肩胛下、颈部、肾周、胸大动脉和下腔静脉周围,

* 国家自然科学基金资助项目, 39170106.

收稿日期: 1992-12-05, 修回日期: 1993-03-29

circular and linear DNA, and other RNA N-glycosidases also have this endonucleolytic activity. The same molecular mechanism may exist in the action of trichosanthin on 28S rRNA, supercoiled DNA and HIV-1 RNA.

Key words ribosome topography, ribosome-inactivating protein (RIP), RNA N-glycosidase, trichosanthin

Transcriptional Regulations of Genes in Eucaryotic Cells. Hu Meihao. (*Department of Biology, Peking University, Beijing 100871*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (2): 117

This review summarizes the transcriptional regulations in the eucaryotic genes transcribed by three kinds of RNA polymerases. The regulatory strategies differ for higher eucaryotic cells with their huge DNA contents. First, much greater numbers of transcriptional factors are required. And second, these regulatory proteins simultaneously bind at the nearby specific sites on DNA with proper orders. This demonstrated that the control of transcription in eucaryotic cells involves the interaction of protein factors with specific DNA sequence elements and the interactions between protein factors.

Key words transcriptional regulations in eucaryotic genes, RNA polymerase, transcriptional factors

The Interaction of Nuclear Factors in the Regulation of Gene Expression. Shao Hongbo, Chu Liye. (*The Laboratory for Biotechnology, Siping Normal College, Siping 136000*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (2): 122
Nuclear factors are increasingly important in playing part in regulating the expression of genes. Eukaryotic transcriptional initiation is

controlled by complicated interactions between *cis*-acting DNA motifs and *trans*-acting proteins, which consist of nuclear factors. Four sequences involved in DNA sequence recognition have been determined as follows: zinc fingers; leucine-zippers; helix-turn-helix and helix-loop-helix motifs. Research from viral and animal systems turn to plant gene expression systems. Evidence has shown that the interaction of nuclear factors is the basis and prerequisite for the regulation of gene expression.

Key words nuclear factors, gene expression, *cis*-acting sequences, *trans*-acting factors, protein domains, plant genes

Factors Influencing the Expression of Foreign Genes in *E. coli*. Sui Guangchao, Hu Meihao. (*Department of Biology, Peking University, Beijing 100871*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (2): 128

E. coli (*Escherichia coli*) has been widely used in expressing foreign genes, but different foreign genes may exhibit very different expression efficiencies. This article is the review of factors that influence expression of foreign genes in *E. coli*, and it will be helpful to know the information in this field, in order to take effective measures to improve expression efficiencies of foreign genes in *E. coli*.

Key words *E. coli*, foreign gene, vector, gene expression

The Application of Antisense in Cancer Research. Sun Congmei, Zhou Airu. (*Department of Biochemistry, Beijing Medical University, Beijing 100083*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (2): 132

Antisense can be used to control the expression of specific genes. When targeted to specific messenger RNAs or specific sequences of the

DNA double helix, antisense inhibit translation or transcription. Both strategies can be applied to control the expression of oncogenes and growth factors in tumor cells. Here, the application of antisense was reviewed in cancer research briefly. a. Inhibition of oncogene and growth factor expression to suggest their function in tumor cells. b. Discrimination between proto-oncogene and activated oncogene. c. Problems and approaches in antisense gene therapy.

Key words antisense, oligodeoxynucleotide, tumor

Thermogenesis in Brown Adipose Tissue and Its Regulation. Ye Zucheng, Cai Yipeng. (Dept. of Biology, Peking University, Beijing 100871). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; 21 (2): 135

Brown adipose tissue (BAT) is a kind of facultative-thermogenic organ, especially important in small mammals. The key element in BAT heat production is the uncoupling protein (UCP), a unique protein located in the inner membrane of BAT mitochondria. Thermogenic stimulation of this tissue opens the UCP's proton channel, results in a proton short-circuit, thus bypasses the relatively small amount of ATP synthetase present in BAT mitochondria resulting in a severalfold accelerated oxidative metabolism. The structural and functional state of BAT is regulated by many factors, such as norepinephrine, thyroid hormone, insulin, pH, and food, environmental temperature etc.

Key words brown adipose tissue, uncoupling protein, proton channel, facultative thermogenesis, norepinephrine

A New Era in Production of Monoclonal Antibodies. Zhang Zhiwen, Zou Changjiang. (De-

partment of physiology, Beijing Medical University, Beijing 100083). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; 21 (2): 139

Construction of complex antibody libraries that expressed soluble antibody fragments on the surface of fd-phagemid with high screening efficiency subjected to rounds of *in vitro* mutations. The individual antibody gene can then be affinity matured by emulating the process that occurs in B-cells *in vivo*. The affinity matured antibody fragments are selected for their ability to bind antigen after phage recovery. This novel recombinant DNA methods may replace the technology of using mice and hybridoma for the selection and production of antibodies.

Key words antibody fragment, surface display vector, affinity maturation

A Current Break Through Electrophoresis Technique with Supermost Resolution: Immobilized pH Gradients Isoelectrofocusing. Guo Yaojun, Guo Qiang. (Institute of Biophysics, CAS, Beijing 100101). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; 21 (2): 143

The mentioned immobilized pH gradients isoelectrofocusing is a electrophoresis technique developed in 80' s. An approximate linear pH gradient is generated by titrating weak acidic and basic acrylamide derivatives which then covalent bound into the polyacrylamide matrix. The pH gradient is stable and independent of electric field fluctuation. The present method provides higher resolution and larger loading capacity comparing with conventional carrier ampholyte isoelectrofocusing. It can analyse and purify protein with only minor *pI* difference.

Key words isoelectrofocusing (IEF), immobilized pH gradient (IPG), carrier ampholyte