

参 考 文 献

- [1] Zeng Mi-bai & Jiang Wan-su, 1990, *Cell Research*, 1: 67—75.
- [2] Nieuwkoop, P. D., 1969, *Roux Arch.*, 162: 341—373.
- [3] Yamada, T., 1940, *Okajimas Fol Anat. Jap.*, 19: 131—197.
- [4] 王绳琦, 1989, 实验生物学报, 22: 189—203.
- [5] Nieuwkoop, P. D. & Nigtevecht, G. V., 1954, *JBEM*, 2: 175—193.
- [6] van Straaten, H. W. M. et al., 1989, *Development*, 107: 793—804.
- [7] Malacinski, C. M. & Youn, B. W., 1982, *Differentiation*, 21: 13—21.
- [8] Zeng Mi-bai, 1993, *Acta Biol. Expt. Sin.*, 26: 361—375.
- [9] 曾弥白, 1994, 实验生物学报, 27: 331—340.
- [10] Chuang Hsiao-Hui & Tseng Mi-pai, 1957, *Scientia Sinica*, 6: 669—709.
- [11] Zeng Mi-bai & Chen Yanhua, 1988, *Scientia Sinica*, 31: 1315—1319.
- [12] 曾弥白, 1990, 实验生物学报, 23: 105—115.
- [13] Keller, R. et al., 1989, *J. Exp. Zool.*, 251: 134—154.
- [14] Zeng Mi-bai & Zhou Mai-yun, 1993, *Roux's Arch Dev Biol*, 201: 12—17.
- [15] Zeng Mi-bai & Wang Ying, 1993, *Cell Research* 1: 67—75.
- [16] 庄孝德, 1990, 细胞生物学杂志, 12: 1—5.

反义战略——分子细胞生物学研究的新手段

林建庆 徐永华

(中国科学院上海细胞生物研究所 200031)

反义战略(Antisense Strategy)或称反义技术(Antisense Technology)是继重组DNA技术后分子生物学领域的又一重大进展。它从反向生物学(Reverse Biology)的角度来研究结构基因的功能、基因表达的调控等等,从而为阐明分子细胞生物学的某些根本问题提供了又一重要手段。在实践中,反义战略已给人类病毒性疾痼和恶性肿瘤的基因治疗、动植物品种的改良等诸多领域带来了曙光,从而吸引了越来越多的临床医学和基础研究科学家的兴趣。

一、反义战略与反向遗传分析

传统的反向遗传战略有^[1-3],异位表达目的基因、过度表达目标基因、同源重组灭活目的基因(也称基因打靶)等,其中以同源重组最为精确有效。然而同源重组在二倍体哺乳动物细胞中灭活基因的效率较低。高等真核生物由于相对长的细胞传代时间和高度复杂的基因结

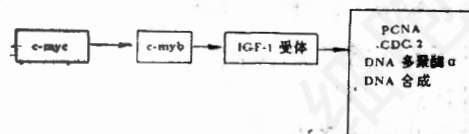
构使基因功能的分析显得更为复杂、困难,而反义战略为研究基因的功能提供了捷径^[4-6]。

反义战略应用反义分子(反义DNA或RNA,包括具催化功能的RNA即ribozyme)干预目标基因表达,使mRNA前体剪接和翻译受阻,达到封闭或阻断特异基因表达的目的。近几年来国内外关于反义分子的应用有很多报道,这种基因操作手段简捷、构思精巧,有效而且可靠,它不需改变基因结构就能分析简单或复杂生物体内基因的功能,从而可以避免应用对基因进行条件性突变进行研究等比较复杂的常规方式;其高度特异性表现为靶基因邻近基因的正常表达不受影响,如反义分子可以通过选择性地抑制单一启动子控制的多基因区内某一基因的表达而不影响这一多基因区内其他基因的表达,甚至某一特定结构基因内不同区域(如N-端或C-端)可被选择性封闭,从而可以判断该序列片段在完整基因中的作用。

二、反义战略与基因功能分析

应用反义分子特异阻断目标基因来研究基因产物的生物学功能已有大量报道。从 *c-erbB-2* 反义核酸抑制细胞核糖体 S_0 激酶活性证明 *c-erbB-2* 酪氨酸激酶调节 S_0 激酶从而影响蛋白质合成^[5]等的研究到其他原癌基因产物在调节细胞增殖分化研究的深入, 逐渐为细胞分化的遗传控制和编程性死亡(Apoptosis)的认识提供了基础。已知 *c-jun* 基因调节细胞增殖, 但 *jun-B*, *jun-D* 的功能不清。为此, 分别应用针对 *c-jun*, *jun-B* 和 *jun-D* 基因的硫代修饰型反义脱氧寡核苷酸(PTOs), 观察受 PTOs 作用后细胞的增殖能力, 发现阻断 *c-jun* 表达后, 细胞增殖受抑, 而 *jun-B* 受抑后细胞增殖能力反显提高, 说明 *jun-B* 有抗增殖活性, 其活性类似于抑瘤基因 *p53*。通过分别阻断原癌基因 *c-fos*, *c-myc*, *c-myb*, *c-εbl*, *bcl-2* 等以及其他基因如 *CDC 2*、*PCNA*、DNA 多聚酶 α 、*bFGF*、*CSF₁* 和 *IL-6* 等表达后, 不同细胞系及造血细胞的增殖受抑, 提示这些基因在细胞增殖调节中具有重要意义^[6]。

静止期细胞受刺激后从 *G₀* 进入 *S* 期时, 与细胞周期密切相关的基因相继有序地表达。应用反义战略, 可以建立细胞周期基因表达的时序关系。如果针对基因 *A* 的反义分子除封闭基因 *A* 外, 还可抑制基因 *B* 的表达, 而基因 *B* 的反义核酸不能抑制基因 *A* 的表达, 说明基因 *A* 的表达先于基因 *B*, 而且基因 *B* 受基因 *A* 产物一定程度的调节。以下从左至右是促细胞分裂素刺激的淋巴细胞部分与细胞周期演进相关的基因的表达时序^[7]:



信号传导途径中不同生长因子受体/癌基因蛋白的相互作用已有不少研究, 然而它们之间功能上的确切关系, 大多尚未明确。单克隆

抗体微注射技术由于注射细胞量有限以及抑制作用短暂等技术上的困难而限制了其应用。反义战略为搞清信号转导过程中分子的相互作用提供了有力工具。在活化的 *ras* 基因转化原代成纤维细胞以及转化表型的维持过程中, 内源性 *c-myc* 究竟有否起作用的问题, 曾经困扰人们。然而利用构建 MMTV 启动的带有新霉素抗性基因的 *c-myc* 反义表达载体, 转染 V-ki-*ras* 转化的 NIH 3 T 3 细胞, 得到的 G 418 抗性克隆在受地塞米松调节下, 转化性状大部分逆转, 撤去诱导剂后又呈转化细胞形态; 持续受 *c-Haras* 和 *N-ras* 转化的细胞系也有类似结果, 而 *c-jun* 或 *c-myb* 的反义表达载体则无类似作用, 说明 *c-myc* 在启动和维持 *ras* 介导的细胞转化中十分重要^[8]。反义战略也可明确信号分子的传导过程, *c-raf-1* 反义分子可以使 *kiras* 和 *Ha-ras* 转化的细胞发生逆转, 提示 *raf* 在 *ras* 下游起作用^[9]。

反义战略应用于受体基因结构和功能关系的分析研究有独到之处。研究基因结构与功能关系的传统方法是通过在异源表达系统中表达定点突变修饰的基因。但异源表达系统常缺乏功能蛋白质分子本身复杂的调节活动, 由此限制了其应用。Cooke 等^[10]报道应用睾丸 Leydig 肿瘤细胞系(MA 10)研究黄体生成素受体(LHR)结构和功能的关系。MA 10 细胞保留了正常 Leydig 细胞的许多特性而且可大量获得, LHR 在这些细胞中可上行或下行调节并可进行 PKA 和 PKC 介导的去敏感作用(Desensitization)的研究。通过利用针对 LHR N-端、C-端及 LHR 胞外第三个 loop 环的 21 聚反义寡核苷酸, 分别研究了不同基因区域缺失对 LHR 合成及 LHR 调节活动的影响, 这些基因功能的研究在异源表达系统中是不可能很好地进行。

三、RNA 转录、转录后调节研究与反义战略

Lamond 等^[11]将耐核酸酶的 2'-氧位-烷基

化寡核苷酸应用于 RNA 加工过程的研究。已知 RNA 剪接机制非常保守,其重要过程包括 snRNPs 与其他蛋白因子一起在 pre-mRNA 上积聚,从而形成功能性的剪接体,剪接体的主要亚单位是 U_1 、 U_2 、 U_4/U_5 和 U_6 snRNPs。为研究单个 snRNPs 在 RNA 剪接过程中的作用,必须获得一系列能与 snRNPs 相互作用的“探针”,这在研究哺乳动物 snRNPs 时特别重要,因为原在酵母系统中采用的遗传学方法已不适用。由于分离针对每个 snRNP 的特异单克隆抗体非常困难,选择针对每个 snRNA 的反义寡核苷酸作为探针,不仅能观察到是否干扰以及如何干扰剪接体形成以判断是否每个 snRNP 都是必须的以及在剪接体形成时 snRNPs 的前后次序;同时尚可以探测到每个 snRNP 结合内含子所必需的独立的功能区,这对于确立 RNA 结构和功能关系提供了又一分析途径。此外,荧光标记的反义分子尚可用于 snRNPs 的定位;生物素化反义分子与链亲和素系统的结合可用于分离、纯化单一 snRNP 或得到特异 snRNP 缺失的 snRNPs。

反义战略也可用于翻译调节的研究^[12]。已知蛤卵母细胞在受精前其内源性核苷酸还原酶和细胞周期蛋白的 mRNA 的翻译受抑,而经高盐条件和凝胶过滤分离得到无蛋白质的 mRNA,其翻译效率明显提高,提示含蛋白质的因子的存在阻断了 mRNA 翻译过程。为明确这些阻遏因子的结合位点,Stankart 等针对不同 mRNA 区域构建反义 RNA,在高盐条件下与含无活性核苷酸还原酶 mRNA 的 mRNP 成分相互作用,发现针对 3' 非翻译区 (3'-UTR) 的 134 nt 的反义分子可以解除该酶的翻译抑制。可能的解释是这些反义核酸的结合位点正是阻遏蛋白因子结合所必需的,反义核酸作为内源性阻遏蛋白的竞争抑制剂促进了该 mRNA 的翻译,这些作者在细胞周期蛋白 mRNA 翻译调节研究中也有类似发现^[13],说明一方面 3'-UTR 可能是有效翻译所必需的,而在不同的基因则可能是被阻抑的单元。Strickland

等^[14]将组织纤溶酶原激活因子(t-PA)mRNA 不同区域的反义 RNA 分别注入鼠卵母细胞,证明卵母细胞成熟过程中 t-PA mRNA 的翻译活化是与 mRNA 的 Poly A 化有关。

四、发育生物学中的反义战略

传统的遗传学只能分析发育初期阶段表达基因的功能。反义战略可以保证特定基因在某一阶段活动,而在另一阶段被诱导失活从而判断基因产物在该阶段的生物学功能。以果蝇发育生物学研究为例,以下三类方法可干扰目的基因表达^[15]:一是将体外合成的反义 RNA 注入早期胚胎,观察基因表达受抑时表型的改变,这种方法最为成功,如对 Krüppel(Kr) 和 Wingless(Wg)等基因功能的分析;二是以受条件启动子启动的反义表达载体转染培养的组织细胞;三是将反义基因整合于种系细胞以在个体水平上分析基因的功能。

然而也有并不成功的例子,如反义 White、反义 Otu 基因诱导表达时未能引起明显的表型改变。虽然从理论上讲,反义 RNA 量已大大超过了内源性转录子,未奏效的可能原因是,反义 RNA 没有在合适的发育阶段表达或反义分子没有封闭目的基因的关键区域。所以在实践时应该考虑到:① 正义和反义分子之间的比例,应尽量保证反义分子数大大超过目标 mRNA。但也有例外情况,如同型细胞中 ADH 比 MAP 的 mRNA 含量高得多,在相同启动子作用下表达于同型细胞的反义分子对前者的封闭作用反而更有效;再如在相同启动子作用下,针对 rpA₁ 和 rp 49 这两种高丰度 mRNA 的反义 RNA 很有效,而针对 White 和 raf 这两种稀少 mRNA 的反义分子则无明显效应,这可能与 RNA-RNA 杂合体的稳定性或目的 RNA 的二级结构本身有关。② 所选择的目标基因。反义分子常不能彻底阻断目标基因表达,有的目标基因如一些酶基因表达量只需达到野生型的 1% 时,就可以发挥功能而不发生表型异常;而另有些目标蛋白出现部分减

少时,就可以从表型上反映出来,甚至是致死性的。因此,从反义战略来考虑,合适的目标基因应该是在早期胚胎发育过程中必需的且表达量改变与表型改变极相关的基因。

五、DNA 三螺旋技术和 ribozyme 的应用

反义战略也包括能形成 DNA 三螺旋结构的寡核苷酸^[16]和 ribozyme 的应用^[4,17,18]。

DNA(或 RNA)的嘌呤碱基(A,G)有接受或供氢位点,反义寡核苷酸可以在 DNA 分子大沟中通过 Hoogsteen 型碱基配对(T:A-T 或 C:G-C,“:”为 Hoogsteen 型碱基配对)与 DNA 双链分子形成稳定的三螺旋结构,这是干扰基因转录或病毒基因复制的另一有效途径。由于 DNA 拷贝数常较低,而且 DNA 复制只发生在细胞分裂前,比基因转录的频率低得多,特别当形成三螺旋的寡聚物与 DNA 交联剂、烷化剂等结合时,可引起目标基因或前病毒长时失活,这对应用三螺旋技术治疗疾病时有重要指导意义。

Ribozyme 是具有酶催化活性的 RNA 分子。植物、细菌、原生生物、真菌和动物中都已发现天然存在的 ribozyme 分子。天然存在的 ribozyme 有四类。ribozyme 可在体外合成,也可经表达载体导入后在胞内生成。它可在无细胞系统和培养细胞中定点、有效剪切目标 RNA,因此被认为是反义战略中的又一有力工具。虽然锤头结构的 ribozyme 其自我剪切功能区结构简单,应用较广,但在 in vivo 体系中应用这些 ribozyme 时很少获得阳性结果,可能是 in vivo 系统中影响因素太多的缘故。In vivo 应用 ribozyme 需考虑的因素很多,诸如其表达水平及表达量、靶 RNA 的结构和半衰期、以及 ribozyme 本身的半衰期等等。为了更好地促进 ribozyme 的应用,有必要继续深入研究生物系统内 ribozyme 和靶基因相互作用的机理。目前已提出将活性 ribozyme 序列整合入 tRNA 基因中,以使 ribozyme 被紧密

折叠入 tRNA 结构中或将反义 RNA 整合于 tRNA 3' 端或反密码环中形成嵌合的反义 RNA,如果同样的设想能使 ribozyme 整合于 snRNA 基因中,就可使 ribozyme 对核内 mRNA 前体进行剪接,这种酶活性与结构 RNA 的耦联,使反义分子具有优越的转录、转运特性和稳定性,而且其酶活性仍然保留着,前景令人鼓舞。

参 考 文 献

- [1] Kintner, 1988, *Neuron* 1, 545—55.
- [2] Dreiver and Nusslein-Volhard, 1988, *Cell*, 54, 95—104.
- [3] Thomas K. R. and Capecchi M. R., 1990, *Nature*, 346, 847—50.
- [4] Colman A., 1990, *J Cell Sci*, 97, 399—409.
- [5] Schlingensiepen K. and Brysch W., 1992, In: *Gene Regulation: Biology of Antisense RNA and DNA*, ed. by Erickson R. P. and Izant J. G., pp. 317—328, Raven Press, New York.
- [6] Ferrari S. et al., 1992, *Ann N. Y. Acad Sci.*, 660, 11—26.
- [7] Baserga R. et al., 1992, *Ann N. Y. Acad Sci.*, 660, 64—69.
- [8] Sklar M. D. et al., 1991, *Mole Cell Biol.*, 11, 3699—3710.
- [9] Kolch W. et al., 1991, *Nature*, 349, 426—8.
- [10] Cooke B. A. and West A. P., 1992, *Biochem Soc Trans.*, 20, 754—6.
- [11] Lamond A. I., 1993, *Biochem Soc Trans.*, 21, 1—8.
- [12] Cirullo R. E., 1992, In: *Gene Regulation: Biology of Antisense RNA and DNA*, ed. by Erickson R. P. and Izant J. G., PP 175—182 Raven Press, New York.
- [13] Standart N. et al., 1990, *Genes Dev.*, 4, 2157—68.
- [14] Strickland S. et al., 1988, *Science*, 241, 680—4.
- [15] Rekha P. and Marcelo-Jacobs-Lorena, 1992, In: *Antisense RNA and DNA*, ed. by James A. H. Murray, pp 77—86.
- [16] Helene C. et al., 1992, *Ann N. Y. Acad Sci.*, 660, 27—36.
- [17] Bertrand E. et al., 1992, In: *Gene Regulation: Biology of Antisense RNA and DNA*, ed. by Erickson R. P. and Izant J. G., PP 71—81, Raven Press, New York.
- [18] Izant J. G., 1992, in *Gene Regulation: Biology of Antisense RNA and DNA*, ed. by Erickson R. P. and Izant J. G. pp 183—195 Raven Press, New York.