

文章编号:1009-038X(2001)05-0545-05

反义核酸研究进展

王武, 杨胜利, 季文明, 吕陈峰

(江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214036)

摘要: 随着反义核酸的发现及对其研究的深入,反义技术已被应用于生物基因调控的研究,并逐步应用于抗病毒及肿瘤、爱滋病等基因水平治疗等新兴药物的开发.概述了反义核酸概念及作用机理,人工反义的设计、合成以及应用前景.

关键词: 反义 RNA; 复制; 靶

中图分类号: Q 522

文献标识码: A

Progress of Antisense RNA Researches

WANG Wu, YANG Sheng-li, JI Wen-ming, LU Chen-feng

(School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: With the discovery of antisense nucleic acid and further research, antisense technique has been applied in the study of gene regulation, and progressively find its application in gene therapy comprising fighting virus, preventing and curing cancer & acquired immunity deficiency syndrom (AIDS), developing novel medicines, etc. This paper reviews the definition, action mechanism of antisense nucleic acid, as well as the design & synthesis of artificial antisense RNA and its prospect of utilization.

Key words: antisense RNA; copy; target

1 概述

随着分子生物学技术的发展,从20世纪70年代开始,人们陆续从某些病毒、细菌乃至哺乳动物胞内发现有天然反义核酸分子(反义RNA).它们是一类相对分子质量较小的多聚核苷酸序列,大多数序列长度不到200个核苷酸.这类单链RNA分子的序列正好与生物体双链DNA的正义链的一段序列互补,或与某一种mRNA分子的某段序列互补,故称为反义核酸.随后的研究发现,反义核酸比较

广泛地存在于生物的各类物种中,与生物基因的表达、调控有密切关系,甚至还涉及到某些病毒的繁殖、噬菌体生命周期转换的调控,转座子的转座作用,质粒复制、接合以及相似不相容机制的控制等.

各种天然反义RNA分子,相对分子质量小,扩散性强,序列的特异性强,与正义链核酸的互补部位适配性好,因而在发现反义核酸存在之际,就引起了分子生物学家的浓厚兴趣,希望深入研究其在生物体内的作用部位和作用机理,将其开发成能防止病毒侵染,抑制异常基因表达或增强有用基因表达的新型药物.

收稿日期:2001-09-01; 修订日期:2001-09-10.

作者简介:王武(1952-),女,福建福州人,教授,博士生导师.

2 作用机理

2.1 原核细胞中的反义作用

对原核生物细胞,特别是大肠杆菌的反义核酸的研究已经得知,它们至少在以下几个不同的遗传信息传递过程中起着控制作用。

2.1.1 在 DNA 复制原点处(origin)控制复制 其中最典型的例子是大肠杆菌的质粒 ColE1(目前人工重组的大肠杆菌质粒多带有 ColE1 的复制原点)的复制受反义 RNA 分子的控制。ColE1 复制起始时,一种自 ColE1 复制起点延伸约 500 个核苷酸的转录物作为复制引物的 RNA II (正义 RNA)促使 ColE1 的复制原点处双螺旋 DNA 解旋,继而 RNA II 与其中的 DNA 反义链结合,成为复制的引物,引导 DNA 多聚酶在 RNA II 的 3'端接上脱氧核苷酸,合成新的 DNA 子链。但是很快就有一种长约 100 个核苷酸的反义 RNA 分子生成,它在 ColE1 复制过程中能与 RNA II 的 5'末端互补结合,使其构型改变,从而阻碍了 RNA II 与 DNA 反义链的结合, RNA II 不再起到引物的作用,质粒 DNA 的复制终止。

2.1.2 在转录水平上的控制

如大肠杆菌的 cAMP 受体蛋白基因(CRP)的转录会受到一种小分子反义 RNA 的制约。这种反义 RNA 可与 CRP 基因转录起始生成的 mRNA 分子的 5'端序列相互补,形成特异的二级结构,它类似于能促使转录作用终止的柄-环结构,空间构象障碍迫使 RNA 多聚酶脱离 DNA 模板,停止转录。

另一类情况下,反义 RNA 分子中可带有质子化的胞嘧啶碱基,这种反义 RNA 插入到能被其识别的一段双螺旋 DNA 区段中,形成了局部的三螺旋 DNA 结构。这种异常的结构自然不能被 RNA 多聚酶所识别,转录作用被阻止。

2.1.3 对转译水平的抑制作用

许多原核生物 mRNA 分子 5'端距离转译起读密码 AUG 约 3~11 个碱基处富含嘌呤序列,如 GGAGG(称 S.D. 位点),这是核糖体中 16SrRNA 分子 3'端所识别和结合部位,核糖体借此坐落于 mRNA 分子的起读密码前端,启动转译作用。某些反义 RNA 分子具有与 16SrRNA 3'端相类似的序列,可与 16SrRNA 竞争对 mRNA 5'端的结合,间接的抑制了转译的进行。

更有甚者,一类反义 RNA 分子是某段基因正义链的互补序列,虽然不能插入双螺旋 DNA 形成

三螺旋结构,却能与相应的 mRNA 分子(正义 RNA)的编码区相结合, mRNA 分子无法与核糖体结合,直接妨碍了转译的进行。

2.2 真核生物细胞中的其它反义作用

2.2.1 对真核 mRNA 前体拼接的影响

真核生物基因表达的环节比原核生物复杂,绝大多数真核生物基因中含有非编码序列(内含子),它们是在转录后的拼接过程(Splicing)中被去除掉,各段编码序列按次序连接成为转译模板。现已发现一些真核的反义 RNA 分子直接影响拼接过程。在体外试验中,反义 RNA 分子对人 β 珠蛋白 mRNA 前体分子的拼接有明显的抑制作用,抑制的程度与反义 RNA 的序列长度、浓度、作用位置相关。发现只有在 mRNA 前体刚被提取的瞬间就加入反义 RNA 才有抑制效应,这可能是因为反义 RNA 跨越拼接位点与 mRNA 前体局部结合,及时地阻止了非编码序列形成环状剪接体,阻止了拼接的进行。

反之,也发现某些小分子反义 RNA 与真核 mRNA 前体中内含子共性的 5'端拼接位点相互补,这种配对结合促进了 mRNA 对其所含的内含子的加工剪除。

2.2.2 影响 mRNA 前体的转移 真核 mRNA 前体是在细胞核中转录形成的,它们必须被转运至细胞质中才能被转译。发现某些反义 RNA 可与真核 mRNA 前体分子的 5'端结合,阻挡了这种转移的发生,直接影响了相应基因的表达。

2.2.3 影响真核 mRNA 分子 5'端和 3'端正常的修饰 绝大多数真核 mRNA 分子的 5'端要经过加帽(Capping)反应,如带上甲基化 G-3'端要经过加尾反应,接上多聚 A 尾巴。加帽和加尾修饰使真核 mRNA 分子比原核 mRNA 分子更稳定,能抗 RNA 酶的降解作用,具有更长的分子寿命。前面所提及的影响转移作用,实际上同时也影响了加帽反应。在鸡胚肌组织中还发现多聚乌嘧啶 RNA,它能与鸡肌球蛋白重链 mRNA 的多聚 A 部分互补结合,致使这种 mRNA 的转译受阻。小鼠的网状红细胞中也发现有多聚 U 反义 RNA, Volloch 推测这类反 A 的多聚 U RNA 在细胞质中形成,它们可能以正常的 mRNA 的多聚 A 尾巴为模板,在那种依赖 RNA 模板的 RNA 复制酶的作用下形成的。

2.2.4 其他作用 反义 RNA 的作用机理被不断的揭示出来还有人认为反义 RNA 会激活 RNA 酶 H, RNA 酶 H 专性降解 DNA-RNA 杂合双链中的 RNA,造成转录过程中尚未从 DNA 模板上剥离下的 mRNA 链被降解。

3 人工反义 RNA 的设计与合成

详尽了解反义 RNA 的作用机理后,人们可以有的放矢地设计并合成出一些特殊的反义核酸分子,使其专一性地作用于生物基因表达的某个环节,以达到控制表达的目的。

3.1 人工设计反义 RNA 的策略

3.1.1 阻止病毒 DNA 复制 某些病毒 DNA 的复制机理有些类似于质粒 DNA 的复制,当探明病毒 DNA 复制原点区域序列后,可以设计出一段反义 RNA 序列,使之与病毒 DNA 复制原点互补结合,从而阻断病毒的增殖。

3.1.2 阻止反转录病毒的反转录 某些反转录病毒可导致癌症的发生,如 AMV 病毒导致禽类白血病的发生。这类病毒侵入宿主细胞后,它以 RNA 模板在自身的反转录酶的作用下合成 DNA 链,再以第一条 DNA 链为模板合成第二条 DNA 链,最终双链 DNA 整合入宿主基因组,依赖宿主基因的表达系统进行反转录病毒的增殖繁衍。探明反转录病毒的模板后,可以设计出反义 RNA,使之与模板互补结合,阻止反转录酶的功能,或者可以设计出与反转录酶具有更强亲和性的 RNA 分子,屏蔽了反转录酶与模板的结合。

3.1.3 阻止坏基因的表达 新兴的基因疗法通过体外诱变或体外合成获得正常 DNA 序列,再通过重组 DNA 技术送回染色体基因组中,但是病体中的异常基因并非都能获得有效敲除(Knock out),异常基因与正常基因并存的状态也许仍然会干扰机体的生理代谢。利用反义技术,设计出与异常基因中的异常序列相对应的反义 RNA,可以阻止异常基因的发达,保证正常基因正常功能的发挥。

3.1.4 设计抗降解的反义分子 若用正常的核糖核酸 A、U、C、G 为单元合成反义 RNA,所获得的 RNA 分子照样很容易受到胞内核酸酶类的攻击,因此要使得反义分子有效地抵达作用靶位,必须赋予其抗降解的性能。人们曾经发现氨基磷酸核苷酸或硫代磷酸核苷酸可以作为核酸聚合的底物,但是一旦这些化学修饰过的底物聚合到核酸链上就难以被核酸酶活力所水解,可以想象用化学修饰过的核苷酸底物来合成反义分子,能够更好地抵御核酸酶的破坏。

3.1.5 反义分子运送载体的选择 设计合成好的反义 RNA 分子如何送到靶细胞中,至今尚需要进一步研究开发更多更有办法。直接吞摄反义分

子是绝对无效的,静脉注射法也无法解决反义分子被降解或难以通过毛细血管进入靶细胞。目前人们选择出一些相对有效的载体帮助运送反义分子,其中包括利用带电荷的多聚赖氨酸或带正电的脂类屏蔽反义分子的负电荷;利用脂质体介导反义分子;研究靶细胞的特异受体,选择识别性能的配体,将反义分子连接在配体上,以生物导弹的模式,使反义分子有效地抵达靶细胞,将反转录病毒改造成安全性或低毒性的变异株,由它携带反义分子,插入癌基因部位。

3.1.6 反义序列排序和长度的设计 反义序列的核苷酸排序的特异性直接决定了它的作用效应,准确探明靶序列是设计反义序列的前提,由于核酸序列分析技术的发展突飞猛进,只要能准确地取下靶序列,探明其碱基排列已不成问题。反义序列长度也会直接影响其与靶序列的适配性,对于人的基因组而言,也许短于 15 个核苷酸的反义序列的特异性不够强,基因组中可能存在多个近似靶序列。由于反义序列的全互补性且片段较长,其与靶序列之间的亲和性一定很强,但长片段中的某一区段也许还能和别的靶外序列结合,造成意想不到的副作用。目前常采用的反义序列长度约为 20 个核苷酸长,靶序列如果不是重复序列或共性的调控序列,这种长度的反义序列造成随机误配的几率仅为 1.1×10^{-12} ,理论上,它与靶序列的互补特异性是很强的。

3.2 反义核酸分子的合成

人工合成核酸分子有多种方法,如化学法、带模板的体外酶法聚合以及基因工程制备法。所制备的反义核酸可以是反义 RNA 也可以是单链的反义 DNA。

3.2.1 化学法制备 主要技术有固相磷酸三酯法和亚磷酸胺法,其基本原理是,根据设计好的序列,先将 3'端的第一个核苷酸的 3'-OH 连接在固相载体上,按 3'→5'方向将核苷酸逐个加上去。为防止核苷酸单体之间 3'-OH 和 5'Pi 相互酯化,所有的加成底物的活性基团都加上保护基保护。第一个单元反应的主要步骤为:第一个核苷酸上柱固定,加入去保护基试剂脱去保护基团,洗柱,加入第二个核苷酸与第一个核苷酸发生酯化反应,对第二个核苷酸的保护基团脱保护,洗柱。如此按序列特点进行单元反应循环,直至寡聚核苷酸加成结束,将其从柱上释放出来,再经电泳分离纯化出目的序列。目前化学法制备已达到微量化、自动化、程序化程度,是较理想的制备方法。

3.2.2 带模板的体外酶法制备 获得靶序列后,选择其中适应的部位与人工引物粘合,利用 PCR 技术,在 DNA 多聚酶的催化下,能够很快地扩增出大量的反义 DNA 序列.利用 cDNA 合成法,阻止第二条 cDNA 链的合成,也可以得到互补于 mRNA 的反义 DNA 链(以 mRNA 为模板的体外反转录所合成的第一条 cDNA 就是反义链).

3.2.3 基因工程法制备 这一类方法的原理是将特定的反义序列的靶序列取出,反向插入到一个较强的启动子下游,迫使原先的正、反链互为颠倒,于是转录出反义 RNA^[5].这一技术的优点在于,可将基因工程处理过的靶序列留在靶细胞内,随细胞的生理活动不断产生出反义 RNA,直接作用于靶序列,解决了运送反义核酸分子的问题.根据不同的要求,就克隆的反向靶序列可以由质粒或病毒 DNA 束携带,也可以利用 DNA 同源性自发重组作用,将其整合到宿主染色体的基因组中.

4 反义技术的应用前景

近年来分子生物学技术的突飞猛进为改造物种遗传性状以及人类遗传病的纠治提供了许多新的技术途径.反义技术作为其中的新兴技术之一,与转基因技术相比有其独到的优点:①由体外合成反义核酸,运送到靶细胞起作用,它只产生短效应,不会留下长效的遗传效应,这对于前期研究尚未探明其副作用的情况下,有较好的安全性;②反义核酸的用量可以人为控制,作用于靶序列表达的哪一个环节可以人工设计,是以体外合成还是克隆入靶细胞的策略可以科学地策划;③精确设计的反义序列原则上不会干扰其它的基因结构和它们自身正常的调控方式;④坏基因无法敲除时,可采用反义技术.

20 世纪 80 年代中叶,美国科学家将疱疹病毒的胸腺激酶(TK)基因的编码序列反向克隆在基因启动子的下方,将正义 TK 基因和反义 TK 基因都挂在克隆载体上,导入 TK 基因缺陷鸡的细胞中,反义 mRNA 的出现确实阻止了正义 TK 基因的表达.接着不是用整个 TK 基因,而是其中一个非编码区

52 个碱基序列反向插入 TK 启动子下方,所产生的反义 mRNA 只阻断病毒正义 TK 的表达,而对鸡的 TK 表达无抑制作用.

20 世纪 90 年代初,一项利用反义技术进行苜蓿基因改造的获得了专利.这项研究的目的是,通过抑制苜蓿根组织特异表达的谷氨酰胺合成酶亚基,使根合成谷氨酰胺的水平降低,以减缓谷氨酰胺对根中固氮酶的抑制作用.大致的做法是,把上述目的基因反向插入到自身启动子下方,整个反义基因加上一段取自原染色体的长 25 个碱基对的同源序列重组入 Ti 质粒,Ti 质粒中含有氨基嘌呤标记,最终这段反义序列整合到苜蓿染色体中.反义技术的应用使谷氨酰胺合成酶活性下降了 80%,苜蓿固氮能力大大增强,与对照相比,同一生长期中,反义改造新品系的干重提高了 50%.反义技术在植物基因工程领域中的应用相当广泛,人们利用反义技术控制番茄和其它水果的成熟,改变花卉的颜色,控制油料植物种子中脂肪酸的合成等^[6,7].

人们对利用反义技术进行抗病毒,防治肿瘤、爱滋病以及遗传病基因水平治疗方面具有浓厚的兴趣.近年来,反义技术用于临床治疗的例子屡有报道,其中包括以反转录病毒作为载体,运载反义核酸导入癌靶细胞,降低了致癌基因 C-myc 的表达^[8].还有利脂质体介导反义 RNA,在恶性肿瘤细胞内阻断肿瘤生长因子基因的表达^[9].诱发爱滋病的一类 HIV 病毒是反转录病毒^[10],反义技术对于抑制 HIV 病毒的基因表达已显示出可观的前景.科学家期待利用多点反义处理,以及反义技术与核酶技术相结合的途径,使 HIV 病毒的表达活性受到极大的抑制.一些分子生物技术公司正在着手开发经化学修饰过的异型反义核酸,研究开发能够激活 RNA 酶 H 活性,增强反义核酸效应的促进因子,它们是各种特殊的寡聚核苷酸.在美国,多项利用反义技术治疗遗传病、恶性肿瘤和爱滋病的临床方案已获 NIH 审批,反义技术的安全性问题仍然是科学家的关注点.有理由相信,反义技术具有很好的应用前景,随着反义技术作用机理的进一步探明,反义工具生产成本的进一步降低,反义技术将为人类带来福音.

参考文献

- [1] 宫明,宫锋.反义 RNA 调控的不同方式[J].生命的化学,1996,16(4):17~19.
- [2] GREEN P. The role of antisense RNA in gene regulation[J]. Ann Rev Biochem, 1986. 55: 569~576.

- [3] IZANL G. Inhibition of thymidine kinase gene expression by antisense RNA: a molecular approach to genetic analysis[J]. *Cell*, 1984, 36:1007~1018.
- [4] WEINTRAUB H M. ANTISENSE RNA and DNA[J]. *Scientific American*, 1990, 262(1):34~40.
- [5] KROL A R, MOL J N. Antisense genes in plants: an overview[J]. *Gene*, 1988, 72(4):5~10.
- [6] HOFVANDER P, PERSON P T, TALLBERG A, *et al.* Genetically engineered modification of potato to form amylose-type starch[P]. WO 9211375, 1992.
- [7] HOFANDER P, PERSON P T, TALLBERG A, *et al.* Genetically engineered modification of potato to form amylopectin-type starch[P]. WO 9211376, 1992.
- [8] LIN SB, HSIEH SH. Antisense Oligodeoxynucleotides of IGF- II selectively inhibit growth of human hepatoma cells overproducing IGF- II [J]. *Biochem*, 1997, 122:717~722.
- [9] LONG L, RUBIN R, BASERGA K, *et al.* Loss of the metastatic phenotype in murine carcinoma cell expressing an antisense RNA to the insulin-like growth factor receptor[J]. *Cancer Res*, 1995, 55, 1006~1009.
- [10] 张无敌. 日新月异的 RNA[J]. 云南大学学报, 2000, 3, 20(2):59~63.

(责任编辑:朱明)

(上接第544页)

以 $r = R_j$ 代入 (5) 式即得线布力矩 m 作用引起的齿 j 根部的挠度 w_j 和转角 $\Psi_j = (\frac{dw}{dr})_j$.

3 数值结果及讨论

设转子尺寸为: $R_1 = 17.5$ mm, $R_2 = 66.5$ mm, $R_3 = 82.5$ mm, $t = 6$ mm, 在 $r = R_2$ 处有一圈梳状齿, 齿高 35 mm, 齿厚 6 mm, 材料弹性模量 $E =$

200 Gpa, 泊松比 $\mu = 0.3$. 转子转速 $n = 5000$ r/min. 用本文推导的公式计算得 $\Psi_j = 0.003844$ rad, 而三维有限元计算结果为 0.003920 rad. 从而证明本文推导的计算公式是正确的.

(5)、(3)、(6)式是解析法计算的基本公式, 在此基础上应用叠加原理可计算有若干圈齿的转子. 再进行展开和简化处理后, 可进行结构参数优化工作.

参考文献:

- [1] 黄克智. 板壳理论[M]. 北京:清华大学出版社, 1987.

(责任编辑:朱明)