

述, BRCA1 和 BRCA2(可能)具有转录调控功能,且该功能可能是肿瘤抑制机制的重要环节。因此,对 BRCA1 或 BRCA2 介导的转录调控下游靶标的鉴定,将有助于阐明 BRCA1 和 BRCA2 的肿瘤抑制功能。

六、结束语

乳腺癌和卵巢癌易感基因 BRCA1 和 BRCA2 的发现和对于阐明乳腺癌和卵巢癌的发病机制有着极其重要的意义。迄今所知,两者与细胞周期调控、胚胎生长发育、DNA 损伤修复和转录调控等生命活动有关。尽管如此,目前在该研究领域中仍有一些有关 BRCA1 和 BRCA2 的生物学疑问困扰着研究人员:①当 BRCA1 和 BRCA2 发生突变后,为什么如此普遍表达和参与细胞中普遍途径的基因却会特异地导致乳腺癌和卵巢癌的发生?②为什么 BRCA1 和 BRCA2 无效的小鼠在胚胎早期即已死亡,而 BRCA1 和 BRCA2 无效的乳腺和卵巢细胞却会发育成肿瘤?③为什么一些完全丧失 BRCA1 或 BRCA2 功能的乳腺和卵巢上皮细胞能存活下来,而同样丧失 BRCA1 或 BRCA2 功能的胚胎细胞却完全死亡?④鉴于发现 BRCA1 纯合缺失的乳腺癌患者,由此猜测以小鼠为模型的功能研究所获得的结果能否完全反映在人类中的真实情况?总之,随着该领域研究的进一步深入以及 BRCA1 和 BRCA2 肿瘤抑制功能的阐明,上述疑问必将迎刃而解,从而能早期诊断和基因治疗乳腺癌和卵巢癌患者。

摘要

BRCA1 和 BRCA2 是近年来发现的遗传性乳腺癌和卵巢癌易感基因,分别位于第 17 号和第 13 号染色体上。目前所知,两者与细胞周期调控、胚胎生

长发育、DNA 损伤修复和转录调控等生命活动有关。随着 BRCA1 和 BRCA2 研究的不断深入和其确切生物学功能的阐明,将在临床上帮助早期诊断和有效治疗乳腺癌和卵巢癌患者。

参考文献

- [1] Miki, Y. et al., 1994, *Science*, **866**:66-71.
- [2] Wooster, R. et al., 1995, *Nature*, **378**:789-792.
- [3] Welsh, P. L. et al., 2000, *Trends. Genet.*, **16**:69-74.
- [4] Schuyer, M. et al., 1999, *Molecular and Cellular Endocrinology*, **155**:143-152.
- [5] Milner, J. et al., 1997, *Nature*, **386**:772-773.
- [6] Wong, A. K. C. et al., 1997, *J. Biol. Chem.*, **272**:31941-31944.
- [7] Rajan, J. V. et al., 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **93**:13078-13083.
- [8] Wang, H. et al., 1997, *Oncogene*, **15**:143-157.
- [9] Hsu, L. C. et al., 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **95**:12983-12988.
- [10] Lee, H. et al., 1999, *Mol. Cell*, **4**:1-10.
- [11] Brugarolas, J. et al., 1997, *Nat. Med.*, **3**:721-722.
- [12] Gowen, L. C. et al., 1996, *Nat. Genet.*, **12**:191-194.
- [13] Sharan, S. K. et al., 1997, *Nature*, **386**:804-810.
- [14] Feunteun, J. et al., 1998, *Molecular Medicine Today*, **4**:263-267.
- [15] Shinohara, A. et al., 1992, *Cell*, **69**:457-470.
- [16] Hakem, R. et al., 1997, *Nature Genetics*, **16**:298-302.
- [17] Lorick, K. L. et al., 1999, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **96**:11364-11369.
- [18] Scully, R. et al., 2000, *Nature*, **408**:429-432.
- [19] Khanna, K. K. et al., 2001, *Nature Genetics*, **27**:247-253.
- [20] Chen, C. F. et al., 1996, *J. Biol. Chem.*, **271**:32863-32868.
- [21] Nordling, M. et al., 1998, *Cancer Res.*, **58**:1372-1375.
- [22] Ruffner, H. et al., 1999, *Mol. Cell. Biol.*, **19**:4843-4854.
- [23] Yarden, R. I. et al., 1999, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **96**:4983-4988.
- [24] Fuks, F. et al., 1998, *Oncogene*, **17**:2531-2534.

转基因动物乳腺生物反应器与基因工程药物

杨帆 吴文彦* 杨红

(广东药学院 广州 510224 *中山大学生命科学学院 广州 510275)

转基因技术研究始于 80 年代, Palmiter 等人把大鼠的生长激素基因通过显微注射法导入小鼠受精卵内, 培育出比正常小鼠大一倍的“超级”转基因小鼠, 并提出可以从转基因动物中提取有价值的药用蛋白^[1]。很快人们就意识到转基因技术在制药工业的巨大的应用价值, 到 90 年代人们开始利用某些

转基因动物作为一种生物反应器来生产各种药用蛋白。

乳腺生物反应器(Mammary Gland Bioreactor)是利用转基因动物的乳腺组织生产基因工程人类药用蛋白。由于哺乳动物的乳房是一种天然的高效合成蛋白质的器官, 并具有良好的渗透屏障, 能有效地

限制外源基因表达的产物进入动物体循环,因此对转基因动物自身的损伤小。特别是猪、羊、牛,它们的泌乳量大,活性蛋白的产量高,又容易收集。因此,转基因动物乳腺生物反应器就像一座生产活性蛋白的药物工厂,只要提供牛、羊吃的草,就可以从乳腺中源源不断地生产出人类所需的药用蛋白来。目前世界各国研究人员争相将各种药用蛋白的编码基因导入上述三种动物的乳腺,使之表达、生产相应的活性蛋白,部分产品已进入临床试验。转基因动物乳腺生物反应器已成为 21 世纪生物制药发展的重点方向之一。以下就该领域的现状、发展趋势作一综述。

一、乳腺生物反应器生产基因工程药物的优越性

由于种种原因,人们几乎不可能用传统的化学合成技术生产复杂蛋白质,目前所有的药用蛋白一般采用血浆提取、细菌发酵和哺乳动物细胞培养 3 种方法来生产,但这些生产系统都有不足之处。血浆提取因药用蛋白的含量低,血液供应有限,造成提取费用昂贵,产量难以满足市场需求的局面,而且对于使用者来说,血浆中潜伏着一些传染性病原的威胁,例如 HIV、丙型肝炎、病毒(HCV)等,一旦发生感染,后果相当严重。最近,美国红十字会就因恐惧克雅氏病(CJD),不再从欧洲进口部分血制品^[2]。微生物表达系统(细菌或酵母发酵)无法对表达的蛋白进行翻译后修饰(糖基化、乙酰化等),或虽能进行加工但程度很低,而大多数药用蛋白质的功效依赖于这些修饰基团的存在。动物细胞表达系统可以解决上述问题(病毒污染、翻译后修饰),但其生产成本极高,且浓度低,产量小。同时,由于培养基成分复杂,给蛋白的分离纯化造成了一定的难度^[3]。

转基因动物乳腺生物反应器生产药用蛋白同上述方法相比,具有巨大的优势,它能够生产出具有完全生物活性的药用蛋白,而且产量高,生产成本低,纯化简单^[4]。转基因动物乳腺生物反应器的优越性主要体现在(1)动物的乳腺组织有能力对表达的蛋白进行大规模复杂而专一的翻译后修饰,并且可正确折叠成有功能的构象,所以生产出的药用蛋白与天然蛋白质的活性完全一致^[5]。(2)动物的乳腺不仅能大量、持续地表达蛋白质,而且可维持所表达蛋白质的稳定^[6],并且可通过诱导系统调控表达。一般奶牛每年产奶 10 吨,而每升乳中获得的药用蛋白产量比细菌发酵高 100-1000 倍^[7]。如果 1 升奶

只生产 1 克基因工程药用蛋白,生产 10kg 药用蛋白,也只需饲养 1 头转基因牛就行了。(3)生产成本低。一旦建立了转基因动物乳腺生物反应器,只要简单地饲养好动物,利用动物乳腺的高表达能力,即可源源不断地得到贵重的药物蛋白。例如,生产同样的药物蛋白,用转基因动物生产的成本为 100 美元/g,而细胞培养法生产成本为 1000 美元/g^[8]。(4)药物的分离纯化简单。乳汁内源成分简单,一般的纯化工艺就能获得纯度高达 99% 的产品,且不污染环境。

二、建立转基因乳腺生物反应器的方法

建立转基因动物乳腺生物反应器(1)首先是分离人类药用蛋白的编码基因,随后将其与乳腺特异性表达调节元件相连接;(2)用显微注射等技术将融合基因注射到哺乳动物受精卵或胚胎干细胞,然后植入宿主动物体内;(3)当转基因胚胎长成个体后,在泌乳期选择动物乳汁中表达有药用蛋白的个体。(4)选择表达药用蛋白量最高的雌性个体产下的子代雄性个体,作为第三代转基因动物的父本,然后即可根据市场对药用蛋白的需求量,大量繁殖转基因动物。

建立转基因动物乳腺生物反应器的前提是选择乳腺组织特异性表达的调节元件,因为,乳腺组织特异性表达调节元件可指导与其融合的外源基因在乳腺中专一性表达,而不是在其他组织内表达。目前用于转基因动物乳腺生物反应器的调控元件主要有 β -乳球蛋白基因(BLG)调控序列、酪蛋白基因调控序列、乳清酸蛋白基因(WAP)调控序列、乳清白蛋白基因调控序列。这些乳腺组织专一性表达的调节元件可以跨越种属界限,例如小鼠的乳清酸蛋白基因(WAP)调控元件在转基因猪乳腺中表达人蛋白质 C 要比在转基因小鼠中有效,但不同的调节元件对所引导的外源基因的表达水平不同。

目前,绵羊 β -乳球蛋白基因(BLG)、牛 α -酪蛋白基因被认为是较为理想的生产有价值外源蛋白质的调控元件。Wright 等人将绵羊 β -乳球蛋白基因(BLG)与人的 α 1-抗胰蛋白酶基因(α 1AT)融合,在转基因羊奶中得到含量高达 35g/L 的基因工程药物 α -抗胰蛋白酶^[9];而 Gene Pharming Europe 公司用牛 α -S1 酪蛋白基因序列构建了人乳铁蛋白表达载体,通过胚胎转化、移植制备了转基因奶牛,转基因牛乳中含人乳铁蛋白 1g/L^[10],且这两个产品均已进入临床试验。

建立转基因动物乳腺生物反应器的关键是用融合有外源基因的乳腺特异性表达载体构建转基因动物,目前制作转基因动物的方法主要有DNA显微注射法、胚胎干细胞(ES)介导法、逆转录病毒介导法、精子介导法和体细胞克隆技术等。

(1)DNA显微注射法是以单细胞S期受精卵为靶细胞,利用显微注射技术将构建好的载体DNA直接注入受精卵的原核中,并将被注射的受精卵移入假孕母体输卵管内继续发育,妊娠后出生的幼崽中有一定比例的转基因动物。该方法整合率高,适用于各种动物,对外源基因大小要求不严,是目前使用最广、最有效的方法。

(2)胚胎干细胞(ES)介导法^[11]是利用转染技术(化学转染或电转移法)将外源基因导入未分化的全能性(Pluripotential)胚胎干细胞(Embryonic stem cells,简称ES细胞)中,外源基因通过同源重组整合到细胞染色体基因组特定的位点上,然后将转基因ES细胞注入同系动物胚胎的囊胚腔中,发育成携带有外源基因的动物个体。该方法的最大特点是外源基因可根据需要定位(Targeting)整合到细胞染色体基因组的特定位置上。其另外一个特点是整合率高,但所形成的转基因动物是嵌合性的,即体内只有一部分组织或器官含有外源基因,要得到纯合体转基因动物周期长。而且在大家畜中构建ES细胞不容易。

(3)逆转录病毒介导法^[12]是将外源基因重组到逆转录病毒载体内并予以之注射MII期的卵母细胞,体外受精和筛选后,将胚胎移植入假孕母体的子宫内,继续发育成转基因动物。该方法整合率高,操作简单,但病毒DNA序列的存在具有潜在的危险。

(4)精子介导法^[13]是将精子与外源基因共孵育一定时间,然后将精子的头部显微注射入MII期的卵母细胞,受精卵被移入假孕母体输卵管继续发育成转基因动物个体。该方法的最大特点是操作简单,但成功的例子不多,有待进一步研究。

(5)体细胞克隆技术是以体外培养的哺乳动物体细胞材料,通过普通的哺乳动物细胞基因转移技术,获得相应的经过遗传修饰的细胞后,直接利用核移植介导的哺乳动物体细胞克隆技术,即将该体细胞的细胞核移入去核的卵细胞中,并将所得细胞移入代孕动物,获得转基因动物克隆个体。该系统不仅具有“ES细胞途径”的全部优点,而且物种适用面广,无需经过嵌合体育种就可直接获得纯合个体,实验周期短,效率高。但作为一个新的技术体系,尚待

进一步地完善。

总之,建立转基因动物乳腺生物反应器生产基因工程药物是一个复杂而繁琐的过程,涉及到基因克隆、基因重组、基因的导入、胚胎移植、外源基因的检测和纯化,及动物管理等许多领域。

三、乳腺生物反应器生产基因工程药物的问题

尽管转基因动物乳腺生物反应器是一个低投入,高产出的产业,但至今为止商品化的产品屈指可数。主要是由于转基因动物的效率低和外源基因的表达水平低,在一定程度上限制了乳腺生物反应器产业化的形成与发展。近年来,随着生物学基础研究的不断深入和各种新技术、新方法不断被使用,使转基因动物乳腺生物反应器显示出更加诱人的前景。

1. 转基因动物的低效率

显微注射法制备的转基因动物效率很低,据不完全统计,制备一只转基因小鼠需40个注射过的受精卵,而绵羊、山羊、猪、牛分别需要110,90,110,1600个,而且,转基因动物的后代中最高也只有50%表达转基因^[16]。造成转基因动物低效率的主要因素是转基因的整合率低、胚胎移植的存活率低,结果使有效的转基因动物大大减少,需要大量的供体和受体,并导致费用增高。

Brinster等人^[17]对显微注射法整合率的研究表明:(1)线性DNA的整合率高于螺旋状DNA,但整合率与注入的DNA片段大小无关;(2)注射DNA的浓度应在1-2 $\mu\text{g}/\text{ml}$,过高虽可提高整合率,但对细胞有毒害;(3)稀释DNA的缓冲液离子强度应低;(4)注射钝端的DNA整合率低;(5)注入细胞核比注入细胞质的整合率高很多;(6)注入雄原核比雌原核的整合率稍高;(7)受精卵的注射时间对整合率也有较大的影响,若显微注射的时间与细胞分裂周期的S期(DNA合成盛期)同步,结果可获得最大的整合率,小鼠卵在受精后大约8小时注射,整合率最高;(8)改进胚胎移植技术,减少对受精卵的损伤,也可提高整合率。

最新建立的整合胚胎移植法^[18]和核移植法^[19]能较大地提高外源基因的整合率。整合胚胎移植法是将目的基因注射到受精卵中,经体外培养和胚胎分子鉴定,挑选整合有目的基因的胚胎进行移植。应用整合胚胎移植法建立的转基因羊比用经典的显微注射技术成功率提高十几倍^[18]。核移植法是将

目的基因导入胚胎细胞核中,通过显微操作,将此细胞核移植到去掉细胞核的成熟卵中,经体外培养后,再移植到假孕母体的输卵管或子宫内,发育成个体。核移植法是先体外整合目的基因,再进行显微注射,减少了注射的盲目性,资料表明,应用核移植法建立的转基因羊比用经典的显微注射技术成功率高2.5倍。

2. 目的基因的表达水平较低

乳腺特异性表达调控元件是影响外源基因表达水平的主要因素,因为要使外源基因在乳腺中而不是在其他组织内表达,需要乳腺组织特异性表达调控元件。由于转基因动物的不同和外源基因的不同,要想得到在乳腺组织中高水平地表达具有完全生物活性的重组蛋白,必需选择适当的调控元件。不同的调控元件在表达同一外源基因时,它们的表达水平有很大区别,如在小鼠乳汁中表达人血浆蛋白,羊 β -乳球蛋白基因调控元件BLG/HAS比小鼠乳清酸蛋白基因调控元件WAP/HAS表达人血浆蛋白的水平高10倍^[20]。一些情况下,调控元件也可作为开关,让外源基因随人的意愿表达或不表达,如金属硫蛋白基因和四环素基因^[21]等诱导调控序列已被用于激活或抑制转基因的表达。

在调控元件中非编码区基因对转基因的表达水平有较大的影响,在构建表达载体时,采用较长的调控序列有利于提高表达,而且采用基因组DNA片段或小基因mini gene比cDNA的表达效率高,基因表达水平可提高100-1000倍。因为DNA和较长的调控元件带有的内含子及必要的调控序列(如增强子和位点调控区)具有促进转录和稳定mRNA的作用,是高水平表达的一个必要条件。Sohn等人^[22]研究了全长和部分hTPO片段在转基因小鼠乳腺中的表达,它们的表达量分别是1500 mg/ml和<0.1 mg/ml。而Gene Pharming Europe公司为了提高人乳铁蛋白在转基因奶牛乳汁的表达水平,在第二代重组奶牛的研制中,即用人乳铁蛋白的DNA序列替代了人乳铁蛋白的cDNA序列,估计表达水平将成百倍的提高^[23]。

由于显微注射法制备转基因动物,不能控制外源基因的整合位点,造成外源基因在宿主染色体上的随机整合,可导致外源基因的非正常表达或不表达,同时可导致转基因动物的一些表型发生改变甚至造成不育或夭折。这主要是由于“位置效应”(Position Effect),即邻近基因或异源染色质基因跨越了转基因的控制,从而影响或抑制外源基因的表达。

转基因构件中加上“基因结合区(MAR)”或“基因边界”因子及间隔子(insulator)有利于减少“位置效应”^[24]。另外,利用分别构建的两个载体在受精卵中同源重组,或利用酵母人工染色体(YAC)携带外源基因和侧翼顺序进行基因偶联,可消除基因的位置效应,也可提高转基因表达水平^[25]。Wall等人^[26]将MARs与转基因共同注射纠正了转基因的异常表达,不仅使暂时表达恢复为内源基因形式,而且所有转基因小鼠均有转基因表达。

转基因的注射量也影响表达水平,这与DNA的拷贝数有关。多拷贝重复序列会导致该区域异染色体化,从而使转基因沉默,这种沉默是真核生物基因组受到其他序列的威胁时出现的一种保护机制^[27]。Garrick等人^[28]证明在转基因小鼠基因组中,串联重复拷贝数为5个以下时的转基因表达水平,是串联重复拷贝数超过100个时的100-1000倍。另外,转基因的整合位点的不同,也可造成表达水平在个体之间相差达2000倍。胰岛素、催乳素等激素水平通过调控泌乳而影响转基因的表达水平^[29]。

转基因动物乳腺生物反应器虽然还有许多问题有待于进一步的研究和探索,但通过新技术的不断开发与应用,它必将成为一种全新的生物医药产业。

四、利用乳腺生物反应器生产 基因工程药物的产业化动态

将稀有人体蛋白基因转移至哺乳动物体内,使之表达生产相应的活性蛋白分子是目前基因工程技术应用研究的前沿,也是转基因生产系统的最高层次。1983年中国科学院的施履吉院士首次提出利用转基因动物乳腺生产重组蛋白质,1991年,Wright等人在羊的乳腺中成功地表达了人 α -抗胰蛋白酶基因,转基因羊奶中最高表达量达35g/L,相当于乳汁蛋白量的一半左右,这种高水平表达持续整个泌乳期,而且三只转基因绵羊已将转基因遗传到下一代。随后世界各国研究人员争相将各种外源基因导入动物的乳腺,形成近年来转基因动物表达活性蛋白的一个热点。

其中美国和英国在这方面的技术处于领先地位,进展最快的是英国的PPL(Pharmaceutical Proteins Limited)公司,利用转基因羊成功地生产了 α 1-抗胰蛋白酶(α 1-AT),目前转基因羊的数量已超过200头,每升转基因羊奶中含 α 1-AT 30g,价值6000美元^[25],而且通过常规的层析技术,50%以上的重

组蛋白得到分离纯化,纯度高达98%以上,并且具有与天然蛋白相同的活性,现产品已进入Ⅲ期临床。美国的GTC(Genzyme Transgenics Corporation)公司,利用转基因山羊生产了抗凝血酶Ⅲ,表达量为2-4g/L,通过专门的提取纯化技术,83%的重组蛋白得到分离纯化,公司已具备大规模生产的可能性,并就预研制新药在FDA备案,现产品已进入Ⅲ期临床试验^[30]。美国Gene Pharming Europe公司,与荷兰Nutricia公司合作利用转基因奶牛生产了人乳铁蛋白,产量为1g/L,计划2000年推入市场,预计每年生产的含人乳铁蛋白的奶粉价值达50亿美元^[25]。

目前,世界各国利用转基因动物乳腺系统大量生产的,具有重要的医学实验研究或临床治疗价值的药用蛋白已达十多种,其中组织溶酶原激活因子(tPA)、 α 1-胰蛋白酶(α 1-AT)及抗凝血酶Ⅲ、人血红蛋白(Hb)、人乳铁蛋白(LF)已进入临床试验,可以预料,近几年内将有产品进入市场。

我国在转基因动物乳腺生物反应器研究方面相对较落后,一般停留在转基因小鼠、转基因兔等水平,转基因羊的研制还在摸索阶段。但国家“863”计划已经将乳腺生物反应器的研究作为重大项目进行资助,同时,不少地方和企业也纷纷投资乳腺生物反应器这个领域,使我国转基因动物生物反应器的研究和开发进入了一个蓬勃发展的新时期,估计在2-3年内会产生一定的经济效益。

我国目前在转基因动物乳腺生物反应器研究方面取得的成果有:中国军事医学科学院与其他单位合作在转基因小鼠乳腺中表达了人尿激酶原(UK)^[31]、组织纤溶酶原激活剂突变体(La-tPA)^[32]、人粒细胞集落刺激因子(G-CSF)^[33]。上海医学遗传研究所与复旦大学遗传所合作,成功地在转基因羊乳汁中表达了人凝血因子IX^[34]。扬州大学农学院与中国科学院发育研究所合作,研究了乙肝病毒表面抗原(HBsAg)在转基因羊乳汁中的表达^[35],最近,他们又研制出了具有商业应用价值的人促红细胞生成素(EPO)转基因山羊,而EPO 2000年的全球销售额预计达30亿美元。中国农业大学与北京兴绿原三高生物技术中心合作,培育成功我国首例含人mAAT基因的奶山羊。2000年10月4只转基因山羊在北京诞生,成活3只,12月通过专家鉴定,标志着我国转基因制药已经达到国际先进水平^[36]。

1997年美国红十字会和遗传学会预测,到2005

年,仅美国通过转基因动物生物反应器生产的药物年销售额可达350亿美元,至2010年,所有基因工程药物中利用转基因动物乳腺生物反应器生产的份额将高达95%^[23]。转基因动物乳腺生物反应器这种全新的生产模式,已成为生物反应器技术中最活跃、最有商业化前景的研究领域之一。我国政府和大型制药企业应抓紧时间,增加投资,加快转基因动物乳腺生物反应器的研究速度,使我国的基因工程药物在21世纪的生物医药产业革命中占有一席之地。

摘 要

利用转基因动物-乳腺生物反应器生产药物蛋白,好比在动物身上建“药厂”,可以从动物乳汁中源源不断地获得具有稳定生物活性的基因产品。这是一种全新的药物生产模式,具有投资成本低,药物研制周期短和经济效益高等优点。它已经成为生物技术领域发展的重要方向。本文系统地分析了利用转基因动物乳腺生物反应器生产基因工程药物的优越性、基本生产方法、存在的问题和原因及产业化进展。

参 考 文 献

- [1] Palmiter RD, et al., 1982, *Nature*, **300**:600.
- [2] Veland W H, et al., 1997, *Scientific American*, **1**:70.
- [3] 李辉等, 1999, *实验动物科学与管理*, **16**(2):32-37.
- [4] Brink-MF, et al., 2000, *Theriogenology*, **53**(1):139-148.
- [5] Toman-Pd, et al., 1999, *Transgenic-Res*, **8**(6):415-427.
- [6] Clark-AJ, 1998, *J-Mammary-Gland-Biol-Neoplasia*, **3**(3):337-350.
- [7] Hodgson J, 1992, *Bio/Technology*, **10**:863.
- [8] 卢作勇, 1997, *化学医药工业信息*, **13**(4):6-10.
- [9] Wright G, et al., 1991, *Bio/Technology*, **9**:830-834.
- [10] Scrip, 1997;(2209):27.
- [11] 华进联等, 2001, *生物技术通报*, **1**:6-10.
- [12] Kilian A, et al., 1995, *Nucleic Acids Res.*, **23**(4):2729-2733.
- [13] Devlin B, et al., 1995, *Genomics*, **29**(2):311-322.
- [14] 戴旭明等, 2000, *中国科学基金*, **1**:23-26.
- [15] 谭晓红等, 2001, *生物工程学报*, **17**(2):118-120.
- [16] 林福玉等, 1998, *生物技术通讯*, **9**(3):230-233.
- [17] Brinster RL, et al., 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**:4438-4442.
- [18] 曾溢滔, 1999, *转基因动物与医药产业*, 上海教育出版社.
- [19] 刘建忠等, 2000, *生物技术通报*, **4**:11-14.
- [20] Barash I et al., 1999, *Mol-Reprod-Dev*. **52**(3):241-252.
- [21] Soulier S, et al., 1999, *Eur-J-Biochem.*, **260**(2):533-539.
- [22] Sohn-BH, et al., 1999, *DNA-Cell-Biol.*, **18**(11):845-

- 852.
- [23] 孙国凤译, 1996, 日经生物技术, 3月11日, 2页.
- [24] Bode J, et al., 1988, *Biochemistry*, **27**(13):4706-4711.
- [25] 薛京伦等, 1998, 生物技术通报, **3**:17-20.
- [26] Wall RJ, 1996, *Theriogenology*, **45**:57.
- [27] Steven H, 1998, *BioEssays*, **20**:532-535.
- [28] Garrick D, et al., 1998, *Nat. Genet.*, **18**:56-59.
- [29] Baruch A, 1998, *Transgenic-Res.*, **7**(1):15-27.
- [30] 刘森等, 生物工程学报, 2000, **16**(4):421-424.
- [31] 岳军明, 1998, 中国生物化学与分子生物学报, **14**(2):140-143.
- [32] 陈红星等, 2001, 生物工程学报, **17**(2):135-139.
- [33] 卢一凡等, 1999, 中国生物化学与分子生物学报, **15**(1):15-18.
- [34] 黄淑娟等, 1998, 科学通报, **43**(7):783-784.
- [35] 张靖涛等, 1997, 生物工程学报, **13**(2):154-159.
- [36] 李宁等, 2001, 生物技术通报, **2**:46-47.

缺血再灌注诱发神经元凋亡的机制和影响因素

陈中军 徐志伟

(上海第二医科大学新华医院小儿心胸外科 上海 200092)

细胞凋亡(apoptosis)是由许多生理及病理刺激引发的细胞自杀过程,它是个主动的、按照一定程序进行的细胞死亡。机体通过凋亡可将发育不良、畸变及衰老的细胞从体内清除。因而凋亡在机体的生长发育、疾病、衰老的过程中有着重要的地位。缺血缺氧是一种导致细胞凋亡的病理环境。缺血再灌注是在缺血缺氧的基础上加上再灌注损伤。神经元在这种环境中损伤十分明显,凋亡在其中扮演重要的角色。这种凋亡常发生在海马的齿状回,新皮质的第2层,内嗅皮质的第2、3、5层和基底节^[1]。其中以海马齿状回处的凋亡最明显,也最易被定量检测^[2]。神经系统表现为学习与记忆受损、智力受损等。其中智力受损与海马受损有关^[3],识别记忆受损与新皮层和内嗅皮质有关^[4]。现在对缺血再灌注所引起的神经元凋亡已日益重视,对其中机理和影响因素的研究也不断深入。

一、神经元凋亡的途径

与其他细胞一样,神经细胞凋亡有三条途径:外源性途径、内源性途径和不依赖 Caspase 的凋亡诱导因子(AIF)途径。外源性途径是通过细胞膜上的 Fas 等受体,激活 Caspase-8 再剪切激活 Caspase-3 导致凋亡^[5]。内源性途径是由于线粒体释出的细胞色素 C 在胞浆中与 Apaf-1、dADP、Caspase-9 形成凋亡复合体(aposome)活化 Caspase-9 再激活 Caspase-3 导致凋亡^[6]。凋亡诱导因子(AIF)在细胞正常状态时位于线粒体内。在细胞凋亡时,凋亡诱导因子失去其线粒体定位序列片段并释出线粒体,导致线粒体膜电位消失,细胞色素 C 释放, DNA 断裂,核染色体凝聚^[7,8]。凋亡诱导因子的作用不通过 Caspase,也不受抗凋亡蛋白 Bcl-2 影响^[7]。

在三条凋亡途径中,内源性途径和凋亡诱导因子途径与线粒体直接相关。外源性途径实际上也与线粒体有联系。在细胞膜受体活化 Caspase-8 后, Caspase-8 还可剪切作用于 bcl-2 家族的 Bid 蛋白, Bid 蛋白再作用于线粒体,使细胞色素 C 释出,发动凋亡的内源性途径。因此线粒体在细胞凋亡中起重要作用。中枢神经系统的细胞代谢消耗较大,所以对缺血缺氧的刺激十分敏感。线粒体作为能量代谢的重要细胞器,在缺血缺氧条件下处于能量缺乏状态。在随后的再灌注的过程中,线粒体又受到进一步的损害,使线粒体的通透性改变,通透转运孔(permeability transition pore)开放^[9]。由于通透转运孔的开放,使线粒体基质与胞浆内离子流动,破坏了线粒体内膜的跨膜电位,影响了呼吸链运行,使能量代谢进一步受损^[10,11]。更重要的是,线粒体受损,释出了许多与凋亡相关的活性物质,包括细胞色素 C^[12,13]。它们可直接启动凋亡的内源性途径和凋亡诱导因子途径。因此 Caspase-3 蛋白酶活性在缺血再灌注后的神经元中明显升高^[14]。Bcl-2 家族中的 Bax 在缺血再灌注损伤的神经元中也迅速移动到线粒体,并与线粒体膜上的电压依赖性阴离子通道(voltage-dependent anion channel, VDAC)和腺嘌呤核苷转运体(adenine nucleotide translocator, ANT)发生作用^[15],使线粒体通透性改变,释出细胞色素 C 和 Caspase-9。两者又使缺血再灌注所致的神经元凋亡进一步加重^[16]。

二、神经元凋亡的特点

神经元在缺血再灌注过程中出现的凋亡有一些特点。神经元细胞受损的表现和机制与典型的凋亡有所不同。在典型的凋亡中, Caspase 活化的 DNA