

- [18] Campell KHS, et al., 1993, *Biol Reprod*, **49**:933-942.
- [19] 李军锋, 2000, 中国养兔杂志, **1**:28-31.
- [20] Müller W A 著, 黄秀英等译, 1998年, 发育生物学, 第119-120页, 北京: 高等教育出版社; 海德堡: 施普林出版社.
- [21] Keith HS, et al., 1996, *Theriogenology*, **47**:63-72.
- [22] Campbell KHS, et al., 1994, *Biol Reprod*, **50**:1385-1393.
- [23] Campbell KHS, et al., 1997(Beijing), Cloned sheep by nuclear transfer from cultured differentiated cells. proceedings of International conference on Animal Biotechnology Suppl. Vol. 61-68. International Academic Publishers.
- [24] Selles F J, et al., 1992, *Genes Dev*, **6**:1202-1212.
- [25] Pennis E., 1998, *Science*, **279**:646-648.
- [26] 今井裕, 高桥清也著, 张明新等译, 1999, 草食家畜, **3**:27-29.
- [27] 程乐平, 景乃禾, 2000, 生命的化学, **20**(1):8-11.
- [28] 陈大元等, 1999, 中国科学(C辑), **29**(3):324-330.
- [29] Schmieke AS, et al., 1997, *Science*, **278**:2130-2133.
- [30] Cibelli JB, et al., 1998, *Science*, **289**:1256-1258.
- [31] Paul GS, et al., 1999, *Nature*, **399**(27):316-317.

植物反应器生产药物大分子的研究现状*

杨蓉 朱睦元**

(浙江大学生命科学学院 杭州 310012)

现代基因工程理论和技术的发展已经使许多有治疗作用、价值极高的蛋白质及多肽类激素在大肠杆菌、酵母或动物体外培养细胞中得到表达,并由此建立了大规模的生产工厂。这种能将外源基因的信息转变成蛋白质的生物体叫生物反应器(bioreactor)。自1982年Gordon和Ruddle等人得到转基因鼠以来,人们已开始利用动物的血液、乳液生产有医用价值的蛋白质药物,这被称之为动物生物反应器^[1]。与细胞培养繁殖相比,植物所具有的自然属性,使其作为生物反应器,将具有更高的经济价值。随着基因工程技术的日新月异,玉米、大豆、油菜等转基因作物(GMO)广泛种植,大田化生产细胞分裂素、抗体、疫苗、酶等药物分子已不是梦想,植物生物反应器(plant bioreactor)的概念也应运而生^[2]。这个引起学术界及各个生物公司极大关注的新兴领域,被称之为是“医学生物技术和农业技术的完美结合”。我们就该领域的研究进展、基因表达的特点及大田生产的风险评估作简单综述。

一、研究进展简介

植物抗体和疫苗一直是转基因植物作为生物反应器生产药物分子的研究热点。1989年Hiatt等在上世界上首次报道在植物中表达全长抗体,随后IgG、IgM、IgG/IgA嵌合体、Fab、V_H等抗体片段的表达使其在免疫治疗、提高植物抗病性、调控植物代谢等方面显示了一定的前景^[3-5]。同时许多科学家开始了植物口服疫苗的研究^[6]。Tariq用农杆菌介导转染烟草叶片和马铃薯块茎获得了肠毒素基因(LT)的表达,它们侵染胃肠和呼吸道上皮黏膜表面,刺激

粘膜免疫反应产生分泌型抗体SIgA,实验证明通过口服疫苗能产生比注射产生更好的免疫效果^[7]。这个重组疫苗的获得为植物口服疫苗的生产奠定了坚实的基础。至今已有霍乱弧菌毒素等十几种微生物病原体疫苗基因在植物体内得到表达^[8-13]。Sandhu等在苹果原生质体内表达了呼吸道合胞病毒F基因,以水果作为表达疫苗的载体,使植物反应器的商业化前景更加令人鼓舞^[14]。此外,在植物体内表达人血清蛋白,干扰素、胰岛素,抗生物素蛋白(avidin)、抑蛋白酶肽(aprotinin)等的研究在国内外也取得了相当的进展^[15-17]。目前,植物反应器的研究已从烟草、马铃薯等模式植物转入禾谷类作物如水稻、玉米等,而蛋白质多肽的表达、修饰、加工、提取等后期下游工作及转基因作物的安全性已成为该研究的讨论焦点。此外,许多公司也加入该领域的研究,其中孟山都和杜邦公司具有相当大的实力。对于生物学家来说,在研究利用转基因植物生产药物分子时,更重要的使命是保证药物分子的安全性和有效性。幸运的是人类在利用某些动物与细菌细胞大规模生产已积累了较多的经验。我们有理由相信,植物将成为生产药物分子的“活的工厂”。

二、基因表达的有效性

植物表达载体的构建对外源基因的表达将产生极大的影响,而组织特异性表达可使外源蛋白特异性定

* 本研究得到国家自然科学基金(39770420、30100115)、浙江省自然科学基金(300255)和省科技厅重点项目(011102186)资助。

** 通讯联系人。

附表:近年来植物反应器生产的药物大分子

基因的来源	植物的物种
单克隆抗体(mAb)	烟草(Hiatt, 1989) ^[3]
ScFv	马铃薯块茎(Ulrike, 1995), 烟草种子(Olga, 1998) ^[18, 19]
肠毒素(LT-B)	烟草(Tariq, 1995) ^[7]
疟疾多抗原表位基因(CTB)	马铃薯(Takeshi, 1998) ^[10] 烟草(李霞, 1999) ^[20]
人呼吸道合胞病毒 F 基因	苹果原生质体(Sandhu, 1999) ^[14]
人乙肝病毒表面抗原(HBsAg)	烟草(刘玉乐, 1993, ^[22] Thanavala 1995 ^[13])
丙肝病毒融合抗原	烟草叶绿体(山松, 2000) ^[21]
人血清蛋白	烟草(Sijmons, 1990) ^[15]
人促红细胞 EPO 生成素基因	番茄(贺竹梅, 1998) ^[24]
人生长激素	烟草(Leite, 2000) ^[16]
胰岛素蛋白	马铃薯(Takeshi, 1998) ^[11]
抑(蛋白)酶肽(aprotinin)	水稻种子(Zhang, 1999) ^[17]
β -干扰素	苜蓿(Medicago 公司, 1998) ^[17]

位,从而提高表达水平,并简化蛋白提取纯化步骤。

在表达载体的构建中,启动子的选择直接关系到转化频率及目的基因的表达水平,这也是植物反应器商品化进程中的两个决定因素。一般常用组成型启动子花椰菜花叶病毒(CaMV)的35S启动子,其活性高且能稳定表达。Olga发现用CaMV35S在马铃薯块茎组织表达外源融合蛋白的能力要强于它自身的组织特异型启动子Patatin^[18]。但CaMV35S在大多数单子叶植物中的活性较低,在某些细胞如花粉中就没有活性。水稻的Act1、玉米的Adh1及Ubiquitin等启动子弥补了这个缺陷,在转基因作物(GMO)中表现出强大地诱导活性^[17]。最近,在植物体内越来越多新的外源启动子被启用。Takeshi使用了一种含有荧光素酶(luciferase)报告基因的甘露氨酸合成酶-Mas二元启动子,表达了霍乱毒素B亚单位疫苗^[11]。它能启动两个重组蛋白的同时表达,有利于两者形成复合疫苗抵抗多种病虫害的侵染。组织特异性启动子,能有效地避免外源蛋白的普遍表达(ubiquitous)外,并有利于药物大分子在特定器官的贮藏和提取。特别是贮藏蛋白特异启动子,如双子叶的豆球蛋白B4^[25]、 β -菜豆蛋白启动^[26]、单子叶的 γ -高粱醇蛋白启动子^[16]能诱导外源蛋白在种子特定发育期内表达,不受植物的正常代谢进程影响。豌豆质体蓝素(Pea Plastocyanin)PetE启动子是光合作用启动子,在光合组织中的诱导能力大于CaMV35S 10倍左右。它的A/T丰富区P268可作为转录增强子与CaMV35S融合,极大地提高了呼吸道合胞病毒F基因在苹果叶肉原生质体内的表达水平^[14]。

在载体的构建中,由于大多数的医药物分子都是糖蛋白,糖基化的模式不同及功能分子折叠和装

配精确性都可能会影响与抗原结合的特异性,这就对质粒构建的精确性提出了更高要求。内质网信号肽(SP)、C末端内质网滞留序列将有利于融合蛋白的细胞分室化作用。网质内的Bip等分子伴侣及一些酶的作用将有助于药物大分子进行一系列的正确翻译、折叠和装配工作。融合不同的蛋白质如葡萄球菌A蛋白、来源于大麦和酵母的 α -amylase^[17]、磷酸酶基因可进行特异性的组织定位而提高表达效率^[25]。C-myc、组氨酸等标记序列的融合使外源蛋白可通过亲和层析等方法而提取在植物体内表达的药物大分子,减少生产过程中的下游流程。总之,启动子、信号肽、标记序列的正确选择将极大地提高植物反应器生产药物大分子的表达水平。

三、基因表达的稳定性

建立可靠和持续的产品来源将是基因工程生产药物分子的一个重要方面,因此外源基因表达的稳定性至关重要。但多种因素,如农杆菌的转染效率和插入的T-DNA拷贝数、整合位点及基因沉默现象等都将影响外源基因表达量的稳定性。植物本身及后代在基因型之间的差异,也可能导致表达水平的不稳定性,因此宿主组织自身稳定性也是一个关键因素。Zhang认为长期保持基因的稳定性的重要条件之一是不断选择高水平表达外源蛋白量的株系,并可通过自交保持其良好的种质品质^[17]。马铃薯块茎自身组织较小的差异性使其作为一个良好的外源基因稳定表达系统而被广泛利用。

基因表达的稳定性还表现在其对贮藏条件的较高要求上。叶片作为外源蛋白的贮藏器官并不非常合适,它有一定的含水量和水解活性,将会不同程度地降解在绿色组织表达的重组蛋白,收获后需要立

即冷冻和提取。因此选择具有良好贮藏功能的器官作为植物反应器的表达部位是相当有必要的。自然贮藏器官,如种子能保存蛋白较长时间不降解并同时不需要特殊的保存条件而被首选。Ulrike 和 Olga 同时证实,即使在室温条件下,ScFv 抗体基因片段在成熟烟草种子和马铃薯块茎组织器官贮藏一年后仍能保持 50% 活性^[18-19]。含种子特异性表达启动子融合蛋白的构建是近年来在植物反应器研究中的新热点,它使转基因植物种子库成为生产生物药物分子的良好贮存系统。为了达到商业化生产的目标,应尽可能地优化贮藏条件,防止被细菌、真菌污染,保持种子活力^[27]。

四、重组蛋白的纯化

植物反应器生产基因药物大分子是一种廉价的生产工程,特别是上游产物在花费上比细菌和动物生产系统来说要少得多。但由于其重组蛋白含量极少,抽提和提纯较为困难,下游工程的花费就远大于细菌和动物表达系统。由于植物大多数器官都能被直接食用,药物大分子被转入谷类作物或水果中,可通过服用植物自身组织而获得免疫效应,由此而提出口服疫苗的思路^[28]。研究表明即使马铃薯块茎组织在被沸水煮至变软时,50% 重组疫苗仍具有活性^[10]。Thanavala 用从烟草中粗提的 rHB_sAg 喂养小鼠,尽管体内产生抗体的水平低于酵母纯品 rHB_sAg 喂养的小鼠,但在整个检测过程中能稳定增加,并在第七周达到最高水平。因此他认为精确的提纯过程并不一定需要^[13]。目前,大豆、玉米、香蕉等遗传转染系统已开始深入研究^[29]。转基因食品(GMF)的上市使我们完全有理由相信,人类通过食用植物获得对某些疾病的免疫力将指日可待。

但目前大多数科学家认为植物中存在着其他的物质,包括具有活性的植物代谢物或生物碱(烟碱)、多糖和脂、农药和除草剂,可能干扰或限制药物分子的免疫原性,在实际使用过程中导致致敏性和变态反应^[27]。因此认为,药物分子生产中的纯化及提取流程是必不可少的。而杂质物质本身的特性、标准的生化测试流程的有效性,在一定程度上决定及控制着有害物质的去除。相对而言,具有活性的水溶性的杂质更难被去除。

重组蛋白相对不稳定,需要在含水的溶液中纯化,不能承受极端的 pH、温度以及与有机溶剂的长期接触。生化技术提取上的困难、昂贵的费用,使转基因植物生产药物分子的提取和纯化流程成为阻止

商业化进程的障碍。目的基因与二磷酸核酮糖羧化酶(Rubisco)小亚基或油质蛋白(olesin)基因融合,定向引导重组蛋白于叶绿体和油体组织,简化了提取纯化步骤,大大减少了生产上的费用^[30]。同时,增强药物分子定向与人体内靶细胞的结合能力也是研究的新热点之一。霍乱弧菌毒素蛋白 B 亚单位(LT-B)基因,利用其与肠道淋巴组织(GALT)细胞表面的 G_{M1} 神经节苷脂有较强的亲和力的特性,作为一种佐剂有效地携带胰岛素分子(INS)到达 GALT 表面,大大增加了 INS 抗原吸收含量从而增强免疫识别能力^[11]。通过这种定向运输的作用,能减少传统治疗所需的高水平抗原数量,并提高了生产口服植物疫苗的可行性。

五、重组产物的特性

与从传统的人类或动物中获得的生物药物分子比较,在植物中产生的重组大分子应具有相似的生物化学特性、药理特性和临床特性。与前两者最主要的结构不同在于糖基化模式上的差异。蛋白质 N-端连接糖基加工过程的不同可能会影响分裂素或激素的活性、药物分子的体内动力学活性及抗原结合性。病人可能产生的对植物来源的寡糖部分的免疫反应,使得我们有必要对它不同于“自然”的模式进行仔细考虑。糖基化的作用效果主要与产物的特殊性相关。例如, mAb_s 中的糖基化的重要性依赖于 mAb_s 产物的类型、药物分子代谢机制等。抗体 F_c 区域的糖基化很少影响单克隆抗体(mAb_s)免疫反应,但它影响 F_c 受体连接和抗体调节的细胞毒性。F_{ab} 区域的糖基化被认为只影响 mAb_s 的连接活性。而在连接区(hinge region)的糖基化可能影响抗体对蛋白水解的敏感性^[27]。

然而我们在临床上并不排除使用这些与“天然”糖基化模式不同的重组药物分子的可能性。酶促反应去除 N-端的寡糖链或利用突变技术都将有可能解决这个问题。物理、化学、生物学、免疫化学测试已被用于测定来源于植物和动物、人类产物的比较研究。如 SDS-PAGE、IEF、HPLC、质谱分析、肽图或其他方法的单独或联合使用都将有助于重组蛋白与天然大分子物质结构的分析和比较。体内效价分析(potency assay)、动物体模型分析、药物代谢动力学和临床实验等将最终鉴定生物药物分子的生物活性。生长激素和抑蛋白酶肽等大分子在植物体内正确表达、折叠使我们由理由相信,生物分子技术和医学技术的共同进步将使转基因植物生产药物大分子

的研究更为深入。

六、大田生产风险评估

食用药物植物、特别是口服疫苗,首先必须评估其对人的安全性。从微生物学角度来考虑,植物相对于细菌、动物系统来说是一个更为安全的系统。但现在还未确切知道植物病毒能否感染人类或动物,或者它们是否本身是一种能在植物体内复制的病害性的人类或动物病毒,因此在生产过程中应尽可能使细菌、真菌的内含量降低到最小,保证它们及其副产物如内毒素、真菌毒素的去除。同时由于转基因植物中的标记基因往往是抗性基因,如卡那霉素等。一些科学家认为这种抗性基因的存在也将对食用转基因作物的安全性产生危害性的影响^[29]。然而人类和动物已受到自然界早已广泛存在的抗性微生物的挑战,但至今尚未发现任何有害效应。因此许多科学家认为任何对这种抗性蛋白可能产生毒性的担心似乎是多余的。此外,转基因扩散即转基因作物与其野生亲缘种间的基因流动将是作物大田生产后可能带来风险的另一重要方面。目前的研究表明种与种之间的限制及转基因作物与野生种之间缓冲区的建立将可能抑制这种基因流动。因此科学家们建议在利用植物组织生产药物分子过程中,除了考虑设计合适的生产和测试流程之外,还应考虑选择植物的品种,大田种植的合适地理位点等一系列问题。

近年来,关于转基因作物安全性的争论,不仅超越了科学的范畴更似乎成了贸易战的口实,使美国和欧盟为了转基因食品的进出口闹得不可开交。植物反应器生产药物大分子的完全商品化,也将面临同样的问题。因此最为迫切的是建立转基因作物可靠的安全性评价技术和政策保障体系。但我们完全可以相信,转基因技术进入21世纪农业和医学领域的趋势是无法逆转的。在不久的将来会有越来越多的植物基因工程生产的药物蛋白问世。

摘 要

随着植物基因工程日新月异的发展,利用植物载体生产有医用价值的蛋白质药物已成为学术和商业界极为关注的新兴领域。在植物体内表达病毒疫苗,单克隆抗体,人血清蛋白,干扰素,胰岛素等的研究在国内外已取得了相当的进展。抗生物素,生长激素和抑蛋白酶肽的商业化,使其前景更为灿烂。近几年植物反应器的研究已更为重视讨论生产药物

分子的有效性和安全性。本文综述了该领域的研究进展,药物蛋白表达的有效性、稳定性及后期下游提取纯化的重要性,并对其大田化生产的风险作了简要评估。

参 考 文 献

- [1] 莽克强、陈受宜、李季伦等,1998,《农业生物工程》,化学工业出版社。
- [2] Meran R. L.,1995, *Transgenic Research* 4:151-152.
- [3] Haitt A, Cafferkey, Bowdish B, 1998, *Nature.*, 342 (6245):76-78.
- [4] Eugeniio B, Ricardo J. O, Raffaella T, et al, 1991, *Plant Molecular Biology.* ,865-874.
- [5] Julian K. C. Ma, Haitt A, Hein M, et al. ,1995, *Science.* , 268:716-718.
- [6] Anne S. M.,1995, *Science.* ,168:5 658-660.
- [7] Tariq A and John D. C.,1995, *Science.* ,268:714-715.
- [8] Mason H. S, Hupith M. B, Jian-Jian S, et al, 1996, *Pro. Natl. Acad. Sci. USA.* ,93:5335-5340.
- [9] Takeshi A, Chong K. X, and William H. R. Langridge, 1998, *Nature Biotechnology.* ,16:292-297.
- [10] Takeshi A, Jie Y, Chong K. X. , et al, 1998, *Nature Biotechnology.* ,16:934-938.
- [11] Takeshi A, Chong K. X, Lawbrence J, et al. , 1997, *Trangenic Research.* ,6:403-413.
- [12] Thonmas H. T, Stephen J, Yupin C, et al. ,1995, *Biotechnology.* ,13:53-57.
- [13] Thanavala Y, 1995, *Pro. Natl. Acad. Sci. USA.* , 92: 3358-3361.
- [14] Sandhu J. S, Osadjan M. D, Kransnyanski S. F, et al. , 1999, *Plant Cell Reports.* ,18:394-397.
- [15] Sijmons P. C,1990, *Biotechnology*,8:217-221.
- [16] Leite A, Edson L. K, Marcio J. D S, et al. ,2000, *Molecular Breeding* ,6:47-53.
- [17] Gan-Yuan Z, Peterson D, Delaney D E, et al. , 1999, *Molecular Breeding* ,5:345-356.
- [18] Olga A, Barbara K, Ulrike F, et al. , 1998, *Molecular Breeding* ,4:313-319.
- [19] Ulrike F and Conrad U, 1995, *Biotechnology.* ,13:1090-1093.
- [20] 李霞、陈杭、陈晓东等,1999,生物工程进展,19(4),39-44.
- [21] 山松、张中林、吴祥甫等,2000,作物学报,26(2),143-147.
- [22] 刘玉乐、王晋芳、邱并生等,人乙肝病毒表面抗原基因在转基因烟草中的表达,中国科学(B辑),1993,23(3):252-255.
- [23] Chong D. K. L, Roberts W, Aralawa T, et al. , *Transgenic Res.* 6:289-296.
- [24] 贺竹梅、曹俊、李宝健,1998,遗传学报,25(2):155-159.
- [25] Lecture presented at the 7th International seed protein symposium Gatersleeb, 1997, *Journal of Plant Physiology* , 1998,152,6,708-711.
- [26] Hoffman L M, Donaldson D D, Bookland R, et al. ,1987, *EMBO J.* ,6:3213-3221.
- [27] Lucio M,1997, *Trends in Biotechnology.* ,15:45-50.
- [28] Mason H S and Charles J, 1995, *Trends in Biotchology.* , 13:388-392.
- [29] Nike L. R and Frederic A L, 1995, *Transgenic Research* , 7:379-386.
- [30] Oscar J. M. G and Pen J, 1995, *Trends in Biotechnology* , 13:379-387.