

- [24] Markaverich, B. M., et al., 1989, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 165: 391—400.
- [25] Hua, S. Y., and Y. Z. Chen., 1989, *Endocrinology*, 124: 687—691.
- [26] Draetta, G., 1990, *TIBS.*, 15: 378—383.
- [27] McKinney, J. D., and N. Heintz., 1991, *TIBS.*, 16: 430—435.

转基因动物的应用及前景

田小利 陈兰英

(中国医学科学院心血管病研究所研究生实验室 北京 100037)

过去 20 年,用分子克隆及基因转移(*gene-transfer*)等手段,将目的基因导入特定细胞后,通过观察外源基因在靶细胞中的行为,研究真核基因的结构与功能,包括基因调节的顺式元件、反式作用因子及基因产物的生理学特性等,已取得可喜进展。其不足之处,是无法将单一的目的基因和其在整体中的作用加以综合研究,所以不能从整体(个体)水平去全面认识基因的表达、调节及其在发育和疾病中的作用。Jaenisch^[1]及 Gordon^[2]等曾将外源基因导入胚泡或受精卵原核内,然后使之发育成个体,为研究目的基因在整体水平的功能作了有意义的探讨。1981年, Costantini^[3]首次将构建的兔 β -血红蛋白基因用显微注射法转入小鼠受精卵,并发育成可将外源基因传给子代的小鼠,产生了第一批转基因动物,这些工作为从分子到个体多层次、多方位地研究基因提供了新的方法和思路。本文主要介绍转基因动物的应用及前景。

一、转基因动物的应用

(一) 研究基因的结构和功能

1. 转录和复制调控的研究

曾用爪蟾卵母细胞作为受体细胞,注入外源 DNA 或 mRNA,研究外源基因的复制、转录或 mRNA 翻译的调控。实际上爪蟾卵母细胞常常不能从正常的转录起点开始转录^[4],且外源 DNA 在该细胞中的复制也常不需特殊的

调控元件,所以由此得出的实验结果很难推演于哺乳类基因^[5]。用转染细胞研究细胞分化和基因表达的选择性开启会受到限制。但用转基因技术将不同周围序列的目的基因转入动物(如小鼠)的受精卵中,观察外源基因在发育不同时期胚胎或个体中的复制和表达行为,有助于找出复制和调控的元件。用此法研究 SV40 早期基因转录活动时发现:SV40 早期基因转录的增强子在二细胞期后才发挥作用,尽管 SV40 在分化后的小鼠细胞中失活,但在小鼠胚胎发育的早期有活性。这一研究提示人们可用转基因技术在胚胎发育早期研究分化后不再表达的基因的调控^[6]。

2. 组织表达特异性元件的寻找

把含不同长度周围序列的基因转入动物受精卵,发育成个体后,检查其表达的组织特异性,以推知组织表达特异性的顺式调控元件。如 Fukamizu 等^[6]将包括上游 3 kb、下游 1.2 kb 的人肾素基因转入小鼠,发现其表达有组织特异性,并认为调节肾素表达的组织特异性元件存在于转入基因的周围序列中。

3. 研究基因改变和功能的关系

将自然或人工突变的基因转入动物,通过研究异常基因和表型的关系,可以有目的地研究兴趣基因结构和功能的关系。目前多用融合基因作转基因^[7],而直接突变基因表达区的转基因工作目前较少。

(二) 建立动物模型

人类的许多疾病(如高血压)涉及多个基因的异常。研究每个候选基因在发病中的作用,对综合分析各相关基因的整体效应是必要的。就高血压而言,目前已有许多动物模型,如自发性高血压鼠及盐敏感性高血压鼠等,为高血压研究提供了方便。由于这些模型的遗传背景复杂,无法单独考察各基因在血压调节中的作用。Mullins 等于 1990 年^[8]首次将小鼠肾素(Ren-2)基因转入大鼠,产生了因单一基因改变而引起的高血压鼠,成为高血压研究的新模型。此外,如动脉粥样硬化的转基因模型也已建成^[9]。

(三) 基因治疗

人类体细胞基因治疗始于 1990 年,但尚无用生殖或胚胎细胞进行基因治疗的报道。用改造的生殖细胞对小鼠遗传病的治疗却已取得惊人进展。选用可遗传的基因缺失性疾病的动物(小鼠)为受体,将其缺失的正常基因导入受精卵,使其子代的疾病得到校正。如一些小鼠 β -血红蛋白基因缺失,其表型类似于人的溶血性贫血;将正常的人 β -血红蛋白基因导入小鼠受精卵后,发现得到的转基因鼠红细胞正常,贫血好转^[10]。对于因某些基因过度表达而造成的疾病,则可通过导入产生反义 RNA 的 DNA 序列加以调整^[11]。这些工作为人类的基因治疗打下了基础。

(四) 基因产品的制备

传统的基因产品制备是把目的基因克隆于表达型的质粒上,转入宿主菌,靠宿主菌的发酵生产,诸如人胰岛素、干扰素及生长素等。可是真核基因在原核细胞中表达面临许多问题,如原核 RNA 聚合酶不能识别真核基因启动子,真核基因的 mRNA 无原核核糖体识别 SD 序列,内含子无法剪切,转录的 RNA 或产生的蛋白无法修饰,因缺乏伴侣分子^[12]难以完成其天然构象等。尽管针对上述缺点已做了不少努力,但有些问题仍不能解决。

用转染真核细胞表达这些基因^[13]虽能解决上述问题,但由于真核细胞的大规模培养有

一定困难,致使产品难于大批量制备。转基因动物却为基因产品的大量制备开辟了新天地,因此这种转基因动物也被称为动物生物反应器(animal bioreactor)或动物个体表达系统(whole animal expression system)。1982 年 Palmiter 等^[14]成功地将大鼠生长素基因转入小鼠,在 21 只子代中,有 7 只整合有外源基因,6 只高度表达生长素的小鼠体积明显增加,证实了用转基因动物生产外源基因产物的可行性。最近人 β -干扰素^[15]、 γ -干扰素^[16]、尿激酶^[17]及牛 α -半乳清蛋白^[18]的转基因动物已产生,为用转基因动物生产外源基因产品奠定了基础。

(五) 研究基因表达和发育

由于转基因动物是将目的基因直接转入受精卵或着床前胚细胞后产生的,故把特定基因转入后,可以观察该基因在胚胎不同发育时期的表达改变,研究目的基因在胚胎发育过程中的启闭和作用。Krumlauf 等^[19]曾将甲胎球蛋白基因转入小鼠后发现其先在卵黄囊中表达,后于肝、肠中表达。

(六) 发病机制的研究

除建立疾病动物模型外,在研究基因异常和疾病关系及病毒性疾病中,转基因动物也大有可为。特定的基因(异常或正常)或病毒基因(全长或片段)转入动物后,观察转基因动物的病理改变,研究基因或病毒在发病中的作用。

在高血压和肾素基因的转基因研究中,Mullins 发现将同一肾素基因(Ren-2)转入小鼠后,虽然高度表达,但血压不高^[20];而转入大鼠后,尽管表达不高,但血压升高^[8]。这为人们从更深层次去认识肾素系统在血压调节中的作用给予了新的启示。在乙型肝炎的转基因研究中,Ghungmin 等^[21]将 HBx 基因转入小鼠后产生了肝癌,直接证明了 HBx 对肝癌的诱发作用。

(七) 研究癌基因

原癌基因在调节代谢和癌变中的作用是不言而喻的。转基因动物可供从整体水平研究癌

基因(包括原癌基因及病毒癌基因)的作用。将其转入动物后,可观察其表达水平、组织特异性和病变的关系,甚至可以将几个癌基因同时转入,研究癌基因间的相互作用。Brinster曾将SV40病毒T和t抗原基因转入小鼠后,发现T抗原基因在脑、肾、胸腺中表达,使这些组织增生,但仅在脉络丛成癌^[22]。1992年Lakso^[23]将晶状体特异性蛋白的启动子和T抗原基因重组后转入小鼠,研究了T抗原在设定组织(晶状体)中的致癌性。为这方面的研究作了有意义的探索。

(八)应用于免疫学研究

该研究领域较为活跃,主要是将一些特定的抗原基因、抗原受体基因及MHC基因转入小鼠后,研究转基因动物的免疫耐受性等。

(九)应用于抗病育种

将抗病毒基因或具优良性状的基因转入受精卵后发育成的个体原则上应具有抗病或获得优良性状的表型,目前这方面研究主要试用于小动物如鼠、兔等。澳大利亚学者曾报道用转基因技术增加羊毛产量^[24]。

二、展 望

由于转基因技术具有分子及细胞水平操作、整体水平表达的特点,使得人们能从更完整的系统中去认识生物分子的作用,所以具有广阔的应用前景。预测今后几年的转基因工作在下述方面将有所发展或突破:(1)同时转入两个或更多个基因,研究多基因间的相互作用;(2)基因产品的制备和抗病育种等方面工作将走出实验室取得经济效益;(3)涉及免疫、发育等重要基因的研究将有新的突破;(4)遗传病及病毒性疾病的研究和治疗将取得新的进展。

三、结 语

转基因动物自1980—1981年产生后,迅速发展。文献检索表明,1983年后有关转基因的(transgenic)文献呈指数上升,在生命科学研究中形成了新的浪潮。目前国内一些实验室也已开展这方面的工作,其意义是显而易见的。当然,转基因工作目前还存在许多难以解决的问题:如受精卵经体外操作后成活率低,外源基因整合率低,整合位点及拷贝数不能控制,表达不能和预期结果相符,外源基因插入后易引起插入或缺失突变乃至不育。但相信随着技术的提高,新一代转基因仪器的产生,定点整合的实现,这些问题将被部分或全部避免。转基因动物将成为生命科学研究中的有力工具。

参 考 文 献

- [1] Jaenisch, R. et al., 1974, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71: 1250.
- [2] Gordon, J. W. et al., 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 7380.
- [3] Costantini, F. et al., 1981, *Nature*, 294: 92.
- [4] Steinbeisser, H. A. et al., 1988, *Nucl. Acid. Res.*, 16: 3223.
- [5] Depamphilis, M. L. et al., 1988, *Biotechniques*, 6: 662.
- [6] Fukamizu, A. et al., 1988, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 165: 826.
- [7] Sigmund, C. D. et al., 1991, *Hypertension*, 17: 1167.
- [8] Mullins, J. J. et al., 1990, *Nature*, 344: 541.
- [9] Lawn, R. M. et al., 1992, *Nature*, 360: 670.
- [10] Costantini, F. et al., 1986, *Science*, 233: 1192.
- [11] Bevilacqua, A. et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 831.
- [12] Ellis, J. 1987, *Nature*, 328: 378.
- [13] Coulombe, B. et al., 1986, *Gene*, 46: 89.
- [14] Palmiter, R. D. et al., 1982, *Nature*, 300: 611.
- [15] Chen, X. Z. et al., 1988, *J. Virology*, 62: 3883.
- [16] Young, H. A. et al., 1989, *J. Immun.*, 143: 2389.
- [17] Meade, H. et al., 1990, *Biotechnology*, 8: 443.
- [18] Hochi, S. I. et al., 1992, *Mol. Reprod. Develop.*, 33: 160.
- [19] Krumlauf, R. et al., 1985, *Mol. Cell.*

- Biol.*, 5: 1639.
- [20] Mullins, J. J. et al., 1989, *J. EMBO.*, 8: 4065.
- [21] Kim, C. M. et al., 1991, *Nature*, 351: 317.
- [22] Brinster, B. L. et al., 1984, *Cell*, 37: 367.
- [23] Lakso, M. et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 8: 6232.
- [24] Speedy, A. W. 1992, *Progress in sheep and goat research*, C. A. B. International, Wallingford, England, UK p 257.

研究工作

缺氧对新生大鼠海马培养细胞的影响*

丁爱石 王福庄 赵桂玲**

(军事医学科学院基础医学研究所 北京 100850)

脑缺氧的研究, 通常使用整体动物模型, 为了排除麻醉、温度、酸中毒等因素的影响, 有人用脑片方法^[1-3], 但不易鉴别神经细胞和非神经细胞发生变化的差别。体外培养的细胞易于进行形态观察分析, 近年来已开始应用于缺氧的研究^[4-7]。本实验选用对缺氧较为敏感的海马脑区进行体外分散培养, 探讨了缺氧对海马神经元的损害。

材料和方法

一、海马神经细胞培养

海马神经细胞的培养采用我们实验室建立的神经细胞培养方法^[8,9]。取当天出生的 Wistar 大鼠, 在无菌条件下分离出双侧海马, 用 0.125% 胰蛋白酶消化 (36℃, 30 min) 分散后, 制备成 5×10^5 细胞/ml 密度的细胞悬液。接种细胞悬液于涂有小牛皮胶的 35 mm 塑料培养皿中, 每皿 2 ml。置标本于 36℃、含 90% 空气、10% CO₂ 的培养箱内培养 12 天。培养液由 94% Eagle's MEM, 5% 马血清和 1% N3 组合液^[10] 组成。另加入葡萄糖 300 mg/100 ml 培养液。接种第 3 天, 在培养皿中分别加入细胞分裂抑制剂 5-氟-2'-脱氧尿苷 15 μg/ml 和尿苷 35 μg/ml 以抑制非神经细胞的过度增殖, 作用 48 小时后更换新鲜培养液。以后每周换液两次, 每次更换一半。实验前 24 小时再更换新

鲜培养液 1 ml。

二、免疫组织化学观察

取培养 12 天的神经细胞做神经特异性烯醇化酶 (NSE) 抗血清 ABC 法染色, 随机计数 500 个相邻细胞, 算出 12 天培养物中神经细胞所占的百分率。

三、缺氧实验

取培养 12 天的海马神经细胞, 按实验分为对照和缺氧两组。对照组神经细胞仍置于 36℃, 含 90% 空气、10% CO₂ 的培养箱内继续培养 4、8、12 和 24 小时; 缺氧组神经细胞移置 2000 cm³ 的恒温 (36℃) 密闭容器内, 连续充以无氧气体 (90% N₂、10% CO₂), 在缺氧条件下继续培养 4、8、12 和 24 小时。两组实验平行进行, 每组实验均重复 5 次。

四、形态学观察

用倒置相差显微镜分别观察对照和缺氧培养 4、8、12、24 小时后神经细胞的形态变化, 并用 0.5% 台盼蓝浸染 3 分钟, 在倒置相差显微镜下分别观察计数 500 个相邻神经细胞中蓝染 (死神经细胞) 及未蓝染 (活神经细胞) 的细胞数, 计算神经细胞死亡百分率。每组实验均重复 5 次。

五、乳酸脱氢酶 (LDH) 和 K⁺ 流出的测定

取对照和缺氧培养 4、8、12、24 小时的细胞培养液各 1 ml, 用 0.45 μm 滤器过滤后, 立即用 IMP-

* 国家自然科学基金资助课题。

** 山东医科大学。