

- [18] Simpson J., et al., 1986, *Nature*, 323: 551-553.
- [19] Najy B. F., et al., 1986, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 314: 493-500.
- [20] Fluhr R., et al., 1986, *Science*, 232: 1106-1112.
- [21] Kuhlemeier C., et al., *Ann. Rev. Plant Physiol.* 38: 221-257.
- [22] Voelker T., et al., 1987, *The EMBO J.*, 6: 3571-3577.
- [23] Slougaard J., et al., 1987, *The EMBO J.*, 6: 3565-3570.
- [24] Schoffl B. F., et al., 1986, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 314: 353-368.
- [25] Hershey H. P., et al., 1987, *Gene*, 61: 339-348.
- [26] Chen Z. L., et al., 1988, *The EMBO J.*, 7: 297-302.
- [27] Goldberg B. R. B. 1986, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 314: 343-353.
- [28] Chang, et al 1986, *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, 83: 1411-1412.
- [29] Schreier P. H. et al., 1985, *The EMBO J.*, 4: 25-32.
- [30] Lycett D. W. et al., 1983, *FEBS Letters*, 153: 43-46.

## 真核基因反义 RNA 研究进展

金 健 健

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

反义 RNA (antisense RNA) 是指能与特定的 mRNA 互补的 RNA 片段, 1981 年 Tomizawa 首先报道<sup>[1]</sup>。目前已发现在原核生物中存在不少天然的反义 RNA 系统, 它们对基因的复制、转录和翻译起着重要的调节控制作用<sup>[2][3]</sup>。在真核生物中, 至今尚未观察到有天然的反义 RNA 存在。但通过不同的途径, 把体外人工构建的反义 RNA (或基因) 引入到细胞内进行基因调控的研究, 已有不少报道。本文介绍近几年来这方面工作的一些进展。

### 一、反义 RNA 的作用

#### 1. 表达反义 RNA 的基因质粒

Izant 和 Weintraub<sup>[4]</sup>最先提出了真核细胞反义 RNA 研究的重要性并建立了一个模型系统。他们将单纯疱疹病毒 (HSV) 的胸腺嘧啶核苷激酶 (TK) DNA 反向插入在 HSV-TK 启动子或小鼠肉瘤病毒 (MSV) LTR 与 SV 40 polyA 信号之间, 获得 HSV-TK 的反义 RNA 基因重

组质粒。将上述反义 HSV-TK 基因质粒和 TK 基因质粒以 100:1 引入到小鼠 LTK<sup>-</sup>细胞, 结果发现, 与单独引入 TK 基因质粒的对照组相比, 细胞内 TK 的瞬时表达大大下降。这个实验表明: 一个外源反义 RNA 基因可以抑制真核细胞内特定基因的表达。在上述工作的基础上, 其它一些基因的反义 RNA 基因质粒也进行了构建并研究, 如鸡的 TK 基因<sup>[5]</sup>, 小鼠  $\beta$ -肌动蛋白基因<sup>[5]</sup>, 劳氏肉瘤病毒 (RSV) env 基因<sup>[6]</sup>, 果蝇的 hsp 26 基因<sup>[7]</sup>, 氯霉素乙酰转移酶 (CAT) 基因<sup>[5]</sup>, c-fos 基因<sup>[8]</sup>和 c-myc 基因<sup>[9]</sup>等等。

考虑到某些基因的抑制对细胞可能产生致死效应, 或实验要求反义 RNA 只在特定的阶段表达, 不少反义 RNA 重组质粒采用了可诱导的启动子<sup>[5][9]</sup>。较为常用的是小鼠乳腺肿瘤病毒 (MMTV) 启动子, 在地塞米松的诱导下, 带有上述启动子的反义 RNA 基因可在细胞内表达, 其表达量在一定范围内随药

物浓度增高而加大。如在 MMTV-TK 反义 RNA 基因表达系统中, 随着地塞米松浓度的增高, 细胞内 TK 酶活力呈现剂量依赖的下降, 最大可达 90% 的抑制<sup>[5]</sup>。同样, 带有 MMTV 启动子的 c-fos 反义 RNA 表达质粒, 在药物存在的情况下, 细胞 DNA 的合成也有明显的下降<sup>[9]</sup>。McGrarry<sup>[7]</sup> 等利用果蝇的热休克蛋白 (heat shock protein) hsp 70 基因的启动子, 构建了 hsp 26 基因的反义 RNA。所用受体细胞有一特点, 即在 30℃ 以上培养时, 细胞可诱发表达热休克蛋白, 其中以 hsp 26 对热诱导最敏感, 其 hsp 70 基因的启动子最有效。因此在这种启动子的控制下, 反义 hsp 26 RNA 基因也只有在一定温度下 (>30℃) 才表达。除了上述两种特定条件下才表达的系统外, 带有金属硫蛋白 (metallothionein) 启动子, 受重金属诱导的反义 RNA 基因质粒也有报道<sup>[11]</sup>。

已经知道, 二氢叶酸还原酶 (DHFR) 基因在氨甲喋呤的存在下可以进行扩增, 从而使与之相连的基因也大大增加, 为建立一个稳定的、高表达的反义 RNA 基因质粒系统, Kim 和 Wold<sup>[11]</sup> 构建了 DHFR 与反义 TK 基因的杂合质粒, 并在小鼠 L 细胞内扩增。通过氨甲喋呤的筛选, 基因的扩增可高达  $5-10 \times 10^3$  分子/细胞, 从而使细胞内 TK 酶活力下降 85—90%。在热休克基因反义 RNA 的研究中, DHFR 基因质粒和反义 hsp 26 基因质粒以一定的比例 (20:1, 5:1 或 1:1) 共转染果蝇细胞<sup>[7]</sup>, 在药物诱导下, 细胞内可产生 50—1000 个拷贝数的反义 hsp 26 基因, 与对照组相比, hsp 26 表达的抑制最大可达 89%。

## 2. 体外合成的反义 RNA

体外合成的反义 RNA 常常借用显微注射引入到细胞内。这个方法对那些不能获得稳定转化的, 或是启动子不能有效表达的细胞系统尤为适合, 例如卵母细胞。最初研究的是爪蟾  $\beta$ -球蛋白基因<sup>[12]</sup>。利用 SP6 RNA 多聚酶系统,

从 cDNA 克隆体外合成了  $\beta$ -球蛋白的 mRNA 和反义 RNA。然后把与 mRNA 不同区域互补的反义 RNA 先注射入蛙的卵母细胞, 温育一定时间后, 再注入  $\beta$ -球蛋白 mRNA, 结果观察到球蛋白合成的受阻。Harland 和 Weintraub<sup>[13]</sup> 也用类似的方法合成了 TK 基因和 CAT 基因的 mRNA 和反义 RNA, 将它们注射到爪蟾卵母细胞, 也发现 CAT 和 TK 基因产物合成被抑制。而且, 注射到核内的 CAT 基因的表达还能被注射到细胞质内的反义 CAT RNA 所抑制。

## 3. 人工合成的寡聚核苷酸

Kawasaki 观察到, 在爪蟾卵母细胞中寡聚核苷酸能与相互补的 mRNA 结合, 从而阻止 RNA 的翻译<sup>[14]</sup>。在此工作基础上, 利用人工合成的寡聚核苷酸 (14—32 个核苷酸) 或与相应 mRNA 互补的单链 DNA, 研究了白细胞间介素 2、白细胞间介素 3<sup>[14]</sup> 和肿瘤坏死因子<sup>[15]</sup> 基因表达的抑制。当寡聚核苷酸注射到卵母细胞 1 小时后, 再注射相应的 mRNA, 结果发现 mRNA 翻译抑制最大可达 88%, 表明寡聚核苷酸介导的阻遏也是一种较有效地抑制基因表达的途径。

## 二、反义 RNA 抑制作用的特点

### 1. 作用区域的特异性

从已有实验结果看, 对于大部分基因而言, 互补 RNA 5' 端的反义 RNA 作用最有效。在 Izant 和 Weintraub 的 HSV-TK 实验中<sup>[5]</sup>, 最初构建的质粒可合成一个 1364 bp 的反义 RNA, 它与 TKmRNA 的 +51—+1415 区域互补, 从而使瞬时 TK 基因的表达下降约 4—5 倍。后来证明, 一个更短的, 仅与 TKmRNA 的 5' 端 -80—+343 区域互补的反义 RNA 基因也有类似的抑制效果。而 HSV-鸡 TK 融合基因重组子的实验表明<sup>[6]</sup>, 只要与 TKmRNA 5' 端非翻译区 52 个 bp 互补的反义 RNA 顺序, 就能非常有效地阻碍 TK 的表达, 而且其抑制效率比

互补大部分 TK 编码顺序(包括起始密码)的长顺序反义 RNA 更有效。同样地,与爪蟾球蛋白 mRNA 5'端或翻译起始区互补的反义 RNA,也能有效地抑制球蛋白的合成,而与3'端翻译或非翻译区互补的反义 RNA,则对球蛋白的合成没有明显可见的影响<sup>[12]</sup>。

然而,分析显微注射法引入卵母细胞的反义 HSV-TK 和 CAT 基因,却发现互补3'端的反义 RNA 基因也能阻遏 CAT 和 TK 的合成,但不及5'端的反义 RNA 有效<sup>[13]</sup>。最近有人报道<sup>[10]</sup>,在成熟的小鼠次级卵母细胞中,组织血纤维蛋白溶酶原激活因子(t-PA)基因的5'端,中部编码区及3'端反义 RNA 均可抑制 t-PA 的合成,而以3'端反义 RNA 最有效,其抑制效率可达97%。在小鼠的初级卵母细胞中,唯独3'端反义 RNA 才能起抑制作用。两者的差异可能是卵母细胞内 RNA 存在的状态不同所致。此外,env 基因的3'和5'端反义 RNA 基因,对抑制 RSV 的产生均具同样的效果<sup>[18]</sup>。核糖体蛋白 L1 的3'端反义 RNA 几乎与完整反义 RNA 的作用一样有效<sup>[19]</sup>。

## 2. 反义 RNA 对内源、外源基因均有抑制作用

在研究某一外源基因的抑制实验中,常常是把反义 RNA 基因以一定的比例与外源基因混合后共同引入细胞。而且一般来说,所用受体细胞系统均有明显的可筛选的标志,如 HSV-TK 基因所用的受体细胞是小鼠 LTK<sup>-</sup>细胞<sup>[4]</sup>。当把反义 TK 基因与 TK 基因共注射入细胞后,可通过 TK 酶活力的比较来检测其抑制效率。RSV env 基因反义 RNA 研究中所用的 R(-)Q 细胞,来源于缺失了 env 基因的 RSV 感染的鹤鹑细胞,当含 env 基因的质粒引入细胞,能够有效地获得有感染性的病毒颗粒。因此当反义 env 基因与 env 基因共转染 R(-)Q 细胞,能观察到病毒的产生明显受抑制<sup>[18]</sup>。

除了上述以反义 RNA 基因与 RNA 基因

同时引入细胞所进行的研究外,不少实验还选用已在细胞内稳定整合的外源基因进行分析。如 Kim 和 Wold<sup>[11]</sup>选择的 APRT<sup>+</sup>TK<sup>+</sup>细胞,TK 基因和 APRT(腺苷酸磷酸核糖转移酶)基因在细胞内均稳定整合,回复突变率很低,而且可以在 APRT 的选择性培养液中生长,因此直接引入 TK 反义 RNA 质粒,就能观察到 TK 酶活性的抑制。

利用反义 RNA 对存在于细胞染色体上的内源基因的功能进行研究,近来也有不少报道。如与分化和发育有关的内源细胞角蛋白 B(endo B Cytokeratin)基因<sup>[20]</sup>,一些原癌基因如 c-fos<sup>[8]</sup>, c-myc<sup>[9]</sup>等,通过这一途径,更进一步了解到它们在细胞生长、分化中的作用。

## 3. 反义 RNA 抑制作用的种属特异性

不少实验已证明<sup>[7,9,13]</sup>,反义 RNA 对细胞内非同源基因的表达及 RNA 转录物没有影响。即便是类似的基因,也不会产生抑制效应。如反义 HSV-TK 基因只抑制小鼠 LTK<sup>-</sup>细胞中的 HSV-TK 基因,而对鸡-TK 基因的表达没有影响;同样地,反义鸡-TK 基因也只能特异性地抑制鸡-TK 基因的表达,而不改变 HSV-TK 基因的表达状况<sup>[5]</sup>。这种特异性在原核生物反义 RNA 系统中也观察到<sup>[17]</sup>。

## 三、反义 RNA 的作用机理

有关反义 RNA 作用的具体机理目前了解的还不多。在原核生物中,反义 RNA 的抑制功能是通过控制翻译<sup>[16]</sup>或通过控制启动附加体 DNA 复制的 RNA 引物活力来实现的<sup>[1]</sup>。但在真核生物中还没发现类似的机制。从现有大量的实验结果来看,推测有两种可能:

1. 反义 RNA 在细胞质内与 mRNA 结合形成 RNA:RNA 二聚体,阻碍 mRNA 的翻译。

在  $\beta$ -球蛋白反义 RNA 基因研究中发现<sup>[12]</sup>,注射 mRNA 和反义 RNA 的卵母细胞,其 RNA 经核糖核酸酶(仅对单链 RNA 有作

用)消化后, 仍有 mRNA 和反义 RNA 存在。但这种 RNA:RNA 二聚体的形成是时间依赖性的, 因为在注射反义 RNA 后短时间内, 不能观察到这种二聚体。同时还发现, 如果先注射球蛋白 mRNA, 几个小时后再注射球蛋白的反义 RNA (与抑制实验顺序相反), 结果依然能够观察到球蛋白合成的明显抑制, 提示即便 mRNA 已附着到了多聚体上, 反义 RNA 还是能够与之结合阻断翻译。在小鼠初级卵母细胞内, t-PA mRNA 以稳定的、非翻译状态存在。只有在卵母细胞成熟过程中, t-PA mRNA 才进行 3'-多聚腺苷化、翻译、最后降解。当把 3'非编码区反义 RNA 注射入初级卵母细胞, 然后用 RNA 印迹法检测成熟卵母细胞内 RNA 的情况, 发现 3'端 RNA:RNA 杂合体形成部分被切除了, 由此, 影响了 t-PA mRNA 的 3'腺苷化和翻译活性<sup>[10]</sup>。

2. 反义 RNA 在核内与新生 mRNA 结合, RNA:RNA 二聚体不能进入细胞质。

用磷酸钙沉淀法, 把外源 TK 基因和反义 TK 基因引入细胞, 在无反义 TK RNA 的细胞中, TK mRNA 主要存在于细胞质内, 而在反义 TK RNA 高表达的细胞中, TK mRNA 却主要集中于核内。这表明, 反义 TK RNA 的合成, 改变了 TK mRNA 的分布; 此外, 几乎所有的 RNA:RNA 杂合体都是在细胞核内检测到的。依据这些结果, Kim 和 Wold 推测 TK 酶活性抑制的机理: 当反义 TK RNA 的浓度足够高时, 它在核内与 TK mRNA 杂合形成双链分子, 后者很难输入细胞质, 从而减少了细胞质 mRNA 的量。但也不排除其他的可能, 如细胞质内的双链 RNA 分子逆向运送到细胞核内, 或它本身就在细胞质内迅速降解了。

从上述这些实验结果看, 无论在核内还是在细胞质内, 反义 RNA 与 mRNA 均可形成二聚体。各个实验系统没有统一的抑制机理, 或许是由于基因结构、表达条件及其它一些因素不同所致。

#### 四、结 语

近几年来, 许多实验室利用反义 RNA 做了不少工作, 取得了一些结果, 反义 RNA 高度专一性的调控作用为在分子水平上进行基因分析提供了一个很有用的工具。一方面, 由于反义 RNA 特异性地抑制某一基因的表达, 我们可利用它研究特定基因在细胞生长、分化中的功能; 另一方面, 反义 RNA 也可能是基因治疗的一个颇有前景的手段, 通过诱导型、组织特异性的启动子控制反义 RNA 的表达, 特异性地抑制癌基因或一些缺陷型基因的功能, 从而达到治疗的目的。因此, 反义 RNA 工作无论在理论研究或实际应用中都有很重要的意义。

#### 摘 要

反义 RNA 是指能与特定 mRNA 互补的 RNA 片段。本文介绍了近年来真核基因反义 RNA 研究的一些进展, 包括不同基因反义 RNA 的作用, 反义 RNA 抑制作用的特点, 以及反义 RNA 的抑制机理。反义 RNA 对基因表达具有高度专一性的调控作用, 因此可利用它研究特定基因在细胞生长、分化中的作用, 同时, 反义 RNA 系统也可用于抑制有害基因的表达, 从而为治疗提供新的途径。

#### 参 考 文 献

- [1] Tomizawa, J. I. and Itoh, T: 1981, *PNAS*, 78: 6096—6100.
- [2] Rosen, J. et al., 1981, *Nature*, 290: 794—799.
- [3] Kumar, C. C. and Novick, R. P: 1985, *PNAS*, 82: 638—642.
- [4] Izant, J. G. and Weintraub, H. 1984, *Cell*, 36: 1007—1015.
- [5] Izant, J. G. and Weintraub, H: 1985, *Science*, 229: 345—351.
- [6] Stoltzfus, C. M. and Chang, L: 1985, *Mol. Cell. Biol.*, 5: 2341—2348.
- [7] McGarry, T. J. and Lindquist, S: 1986, *PNAS*, 83: 399—403.
- [8] Nishikura, K. and Murray, J. M: 1987,

- Mol. Cell. Biol.*, 7(2): 639—649
- [9] Griep, A. E. and Westphal, H. 1988, *PNAS*, 85: 6806—6810
- [10] Strickland, S. et al., 1988, *Science*, 241: 680—684
- [11] Kim, S. K. and Wold, B. J. 1985, *Cell*, 42: 129—138
- [12] Melton, D. A. 1985, *PNAS*, 82: 144—148
- [13] Harland, R. and Weintraub, H. 1985, *J. Cell. Biol.*, 101: 1094—1099
- [14] Kawasaki, E. S. 1985, *Nucleic Acids Res.*, 13: 4991—5004
- [15] Wang, A. M. et al., 1985, *Science*, 228: 149—154.
- [16] Mizuno, T. et al., 1984, *PNAS*, 81: 1966—1970.
- [17] Coleman, J. et al., 1984, *Cell*, 37: 429—436.
- [18] Stacey, D. W. et al., 1977, *PNAS*, 74: 1614—1618.
- [19] Wormington, W. M. 1986, *PNAS*, 83: 8639—8643.
- [20] Trevor, K. et al., 1987, *PNAS*, 84: 1040—1044.

## 荧光漂白恢复技术在细胞生物学中的应用\*

张 孔 华

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

近十几年来, 荧光漂白恢复 (Fluorescence photobleaching recovery, FPR) 技术的迅速发展, 并与其它新技术的结合, 为研究膜的流动性提供了新的手段<sup>[1]</sup>。目前, FPR 技术已广泛应用于定量测定人工膜、细胞膜以及细胞质分子的二维运动。

FPR 技术的基本原理是用荧光探针进行标记, 强激光脉冲照射, 使待测细胞表面的微区 (小于  $10\ \mu\text{m}^2$ ) 上的标记分子产生不可逆的光化学漂白, 随即用微弱激光束监测漂白区域的荧光恢复过程。由于该区域内外标记荧光分子的彼此随机扩散或流动, 从而可获得一条以时间为函数的 FPR 动力学曲线。通过 Axelrod 等<sup>[2]</sup>的理论模型, 从 FPR 曲线可获得以下的信息: 1. 运动过程的类型是随机扩散还是定向流动。2. 计算出扩散系数 ( $D$ ) (本方法测量的有效扩散系数范围在  $10^{-6}$ — $10^{-12}\text{cm}^2/\text{s}$ ), 或流动速度。3. 测定出被标记分子的可动及不可动部分的比例。这些信息将有助于了解它们的运动方式、功能以及与其他分子的相互关系。

关于 FPR 的方法学和 FPR 对细胞的影响等问题可参阅前文<sup>[1,3]</sup>。本文拟就 FPR 技术在细胞生物学中的应用, 作简略地论述。

### 一、细胞膜中分子的运动

1. 膜组分的扩散速度<sup>[4]</sup> FPR 测量表明, 人工膜和绝大多数细胞膜上脂质的扩散系数均为  $10^{-8}\text{cm}^2/\text{s}$ , 个别的  $\ll 10^{-10}\text{cm}^2/\text{s}$  (见后), 这与电子顺磁共振波谱测量的值相同。细胞膜蛋白质的扩散系数则在  $10^{-9}$ — $10^{-12}\text{cm}^2/\text{s}$  之间。大部分蛋白质的扩散系数  $\leq 10^{-10}\text{cm}^2/\text{s}$ , 可动组分  $\leq 80\%$ , 少数的  $< 10^{-12}\text{cm}^2/\text{s}$ , 即在 FPR 测量时间内几乎不动。这些结果反映了生物膜结构流体性的特征和动态性质。同时也说明大多数膜蛋白质在膜平面上的扩散运动, 是有一定限制的。Suffman 和 Delbuck 通过一个简单的流体动力学模型, 求解蛋白质的侧向扩散速率。计算表明, 蛋白质分子的大小对扩散速率的影响很小, 仅受磷脂双分子层的粘滞度限制。

\* 本文承蒙顾国彦教授指导, 特此致谢。