

核酶及其分子药物设计与应用

侯学文¹, 郭 勇²

(1 华南农业大学资源环境学院, 广东 广州 510642; 2 华南理工大学生物工程系, 广东 广州 510641)

摘要:核酶(ribozyme)是 80 年代初期发现的具有自催化活性的 RNA 片段. 从核酸水平来破坏对人体不利的基因(包括自身突变及外源微生物、病毒等)在人细胞内的表达, 这是一种比较专一, 且对人体危害相对较小的一种治疗方式. 经过改构的核酶不仅能起顺式(*cis*)作用, 更重要的是也能以反式(*trans*)作用, 这样就使得人们能够设计出针对 RNA 的各种具有治疗作用的核酶. 该文着重介绍具锤头型结构域和发夹型结构域的 2 类核酶的设计, 及应用核酶作为治疗药物所要考虑的一些问题.

关键词:核酶; 分子药物

中图分类号:Q 527

文献标识码:A

1 核酶的研究概况

在 80 年代以前, 人们在生物体内发现的酶无一例外都是蛋白质. Cech 等^[1]发现四膜虫的 26SrRNA 可以自催化剪接成为 L19RNA; Altman 等相继报道了大肠杆菌中 RNA 前体加工的 RNase P (由 20% 蛋白质及 80% RNA 构成), 将其中的蛋白质去除, 并相应提高 Mg^{2+} 浓度, 结果 RNA 部分表现出了与全酶相似的催化活性. Cech^[2]又进一步发现 L19RNA 在一定条件下能够以高度专一的方式催化寡聚核糖核苷酸底物的切割与连接, 说明它同时具有核糖核酸酶和 RNA 聚合酶活性; 还发现 L19RNA 还要求高度底物专一性, 符合米氏动力学, 对竞争性抑制剂敏感等米氏酶作用特征. 至此, 具催化活性的 RNA 也被当做酶来看待了, 称作核酶(ribozyme). 随着研究工作的深入, 证明核酶不仅具有核糖核酸酶的剪切功能, 而且还具有核酸聚合酶的聚合作用. 天然的核酶主要有 I 类内元, II 类内元, 发夹型核酶, 锤头型核酶, 而且均为自体催化. 利用基因工程技术, 保留核酶的核心作用区域, 现已成功地构建出了具异体催化作用的核酶.

对病毒及致病菌的治疗, 要获得专一杀灭病原体, 却对人机体没有任何伤害的成功的疗法, 其中的关键是要找到病原体生命活动过程中特异的生命代谢过程. 在这一特异代谢点上设计出专一的化学药物, 以期达到只杀灭病原体而对人机体没有任何伤害的目的. 但因这类特异代谢点并不多见, 且化学药剂的效用是多方面的, 因此设计出来的化学药物都或多或少地对人体有一定副作用. 鉴于此, 人们逐渐将目光转向生化药物, 因为生化药物天然存在

于体内, 用量少而疗效高, 颇受药物学家重视. 核酸类药物是生化药物中重要的一员, 基因治疗中所用的正常基因片段以及反义片段, 就属核酸类药物. 基因治疗是一个较大课题, 在此不拟详述. 反义技术要求反义片段与作用对象以 1:1 比例结合, 虽然也取得了一些成就^[3], 但应用于药物前景不是很大. 核酶近年来异军突起, 在作为新药治疗涉及外源致病基因侵入及自身基因突变的疾病上, 具有其它药物所不具备的优点. 在 4 种核酶中最有应用前景的核酶是锤头型核酶(hammerhead domain)和发夹型核酶(hairpin domain), 下面分别予以详细介绍.

2 两种类型核酶的设计准则

锤头型核酶首先发现于植物病毒颗粒内和水蛭卫星 DNA 转录物中. 在自然界中, 核酶都在分子内起作用, 即核酶的酶活性区域与作用底物 GUC 序列在同一条链上. 该型核酶识别 GUC 序列, 切割点在 GUC3'端, 裂解后形成 5'-羟基和 2', 3'-环磷酸酯末端^[4]. 该型酶作用时需要二价阳离子, 如 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} , 但不需要消耗 ATP 等能源. 要使核酶能作为分子药物应用, 必须能将核酶改造成能够在分子间起作用. 天然的锤头型核酶家族在一级结构上高度保守, 它是由 3 个 Watson-Crick 双螺旋和一个由 13 个保守的核苷酸(5'GAAAC(N)nGUN(N)nCUGA(N)GA3')组成的催化中心构成. 利用基因工程对其进行改构, 保留具催化功能的核心区域, 构建成具异体催化功能的锤头型核酶, 即将催化链的催化中心改构成 5'CUGA(N)GA(N)nGAAAC3', 再在 5', 3'两端连接上与裂解位点上 5'GUC3'两侧核酸序列互补的序

收稿日期:1999-01-22

作者简介:侯学文(1969-), 男, 博士

列^[4],这样一个裂解特异异体核酸片段的锤头型核酶就构建成功了(见图 1)。

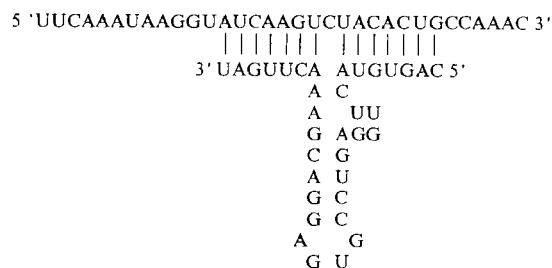


图 1 锤头型核酶模式图

Fig. 1 The schmatic model of hammerhead ribozyme

发夹型的核酶是发现于烟草环腐病毒的卫星 RNA 负链^[5]。研究表明,发夹型核酶由 4 个 Watson-Crick 双螺旋区及 A、B 2 个环构成。利用碱基置换研究表明,对于裂解活性必需的核酶片段位于 A、B 2 个环。最近的研究表明,发夹型核酶可以被拆分成 2 个部分:第 1 部分为底物链(A 环和螺旋 1 和 2),第 2 部分包括 B 环和螺旋 3 和 4,具有催化活性。在应用上更有意义的进展是发现:这 2 个部分可以彻底地分开,位于 2 条不同的链上;当二者相遇,即可形成具有完整的发夹型核酶活力的构型。将具催化活性的链的 H1 和 H2 螺旋区的碱基与底物链裂解目标 5'GUC3'两侧的碱基序列互补,这样就可选择性地裂解特异的核酸片段(见图 2)。也即构建成具异体催化功能的发夹型核酶。

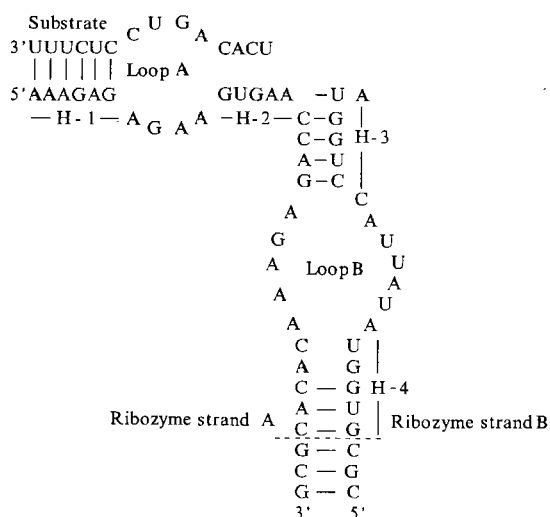


图 2 发夹型核酶模式图

Fig. 2 The schmatic model of hairpin ribozyme

随着人类基因组计划的深入,已经有越来越多的人类基因组以及病原微生物的基因组构成展现在人们眼前,这就为人们设计核酶作为治疗药物提供了广阔的空间。利用电脑检索出病原微生物基因组对核酶的进攻最为敏感的位点,然后利用化学的、生

物化学的或者生物的手段合成出核酶。而且,利用前两者手段可以对碱基及连接方式进行修饰,从而达到在胞内稳定性提高的目的。

3 与核酶应用有关的几个问题

3.1 核酶如何有效地进入细胞

核酶多是在细胞核内或细胞质内发挥作用的,如何将核酶投递到其作用部位,是核酶临床应用中值得考虑的一个问题。当然,对离体细胞,可以应用基因枪、电穿孔法等手段将核酶导入目标细胞。但在临床上,这些手段就不能应用了,需要改用一些温和的手段,如脂质体包埋、离子导入等,这些方法可以将核酶导入细胞内,经发挥一段时间的功用后,逐渐被核酸酶降解而失效,但这些方法选择性较差,不能有效地将核酶定向地导入目标细胞。如果目标细胞上有特异的标志物,就可利用该标志物的抗体与核酶偶联构建出有定向功能的药物导弹。另一种方法是以逆转录病毒为载体,利用 RNA 聚合酶 II 或 III 进行转录,但这种方法转染力差,而且整合方式相当随机以及存在着对编码基因的转录沉默,因此限制了它的应用。目前,腺病毒相关病毒(AAV)因为其较高的转导率以及潜在的单一整合位点,被认为是最有希望的载体。如以 AAV 作为载体构建的反义 RNA,在细胞培养中,已经有效地控制 HIV 的增殖^[6]。

3.2 核酶表达方式的选择

核酶在体内的表达方式应该做到:“应激而发,反应适度”,这样才符合生物体反应灵敏、经济的原则,不会给生物体带来新的灾难。

可以应用在细菌中研究得较为清楚的操纵子——阻遏子系统对核酶的表达进行调控。Bujard 等就设计了利用原核及病毒调控单位构成的哺乳动物表达系统来严密控制基因表达。他将四环素(TET)阻遏子与较强的简单疱疹病毒(HSV)的转录活化子 VP16 融合在一起,并将四环素操纵子元件放在基本启动子元件的上游。在没有四环素时,TET-VP16 融合蛋白结合在操纵子单元上,并且激活了基本启动子的转录。在有四环素存在时,TET-VP16 融合蛋白因与四环素结合而不能与操纵子区域结合,因此转录就被终止了。这种表达系统,已在多种细胞、生物以及转基因鼠中,成功地用来表达 mRNA^[7]。

在某些情况下,核酶需要有组织特异性表达,如构建一个 II 型糖尿病的转基因鼠模型,需要应用胰腺专一的启动子,就需要选择胰岛素启动子以确保降解已糖激酶 mRNA 的核酶主要在胰岛细胞内表达^[8]。Ohta 等^[9]利用组织特异表达的降解 *ras* (一类

癌基因)的核酶抑制人恶性黑色素瘤细胞的扩增。酪氨酸酶是黑色素形成过程中的关键酶,在黑色素瘤细胞中有大量表达。在酪氨酸酶的5'序列克隆到一个 0.27×10^3 b的片段,可以使之在黑色素瘤细胞中特异表达,将这一启动子片段连接上降解基因片段的核酶;把这一新构建的基因载入逆转录病毒载体中在体外有效地抑制了人黑色素瘤的生长、色素形成、外观及*H-ras*基因的表达。有望作为治疗人类癌症的一种新手段。

采用核酶的组成型表达也是选择方式之一,但是采用组成型启动子也不能保证核酶在所有的组织中具有相同的活性。利用巨细胞病毒(CMV)的早期反应基因的增强子启动子构建降解鼠 β -2-微球蛋白mRNA的核酶的组成型表达^[10],虽然在多种组织中检测到了该核酶的表达,但只有在肺中目标蛋白降幅达90%。

哺乳动物U6小核RNA(SnRNA)和腺病毒VA1启动子是2个近来常用作小RNA片段表达的工具^[11]。这2个系统的共同特点是只需要极少的顺式附加序列就可以进行正常的起始和终止转录。对U6系统而言,大约需要成熟U6编码序列的前30个核苷酸就可给转录物加上甲基磷酸的帽子;终止信号是在插入目标序列后加上5个尿苷酸,这样的结构对核酶的稳定性大有帮助。

3.3 核酶与底物RNA是否位于同一细胞分室

对大多数mRNA来说,调控从转录到翻译的转移机制尚知道得不多。但越来越多的证据表明,这些转录物是由特定的途径进行处理与转移的。由此可断言,RNA的分布是不均一的,如肌动蛋白mRNA就位于细胞骨架附近。

RNA的3'不翻译区域(UTR)包含有对其进行细胞定位的信号^[12]。如编码2个肌动蛋白同工本(α -心肌和 β -细胞质)的mRNA在同一细胞中就位于不同的分室。肌动蛋白的UTR也能将编码的LacZ带入与肌动蛋白mRNA相同的部位。因此考察这种细胞内定位信号是否也能将核酶带入与底物mRNA相同的细胞分室,是比较有意义的。将与底物mRNA相同的3'UTR加到核酶的转录物中,如果这种方法能将核酶与底物RNA定位于相同区域,则必能大大增强核酶的功效。

还可将核酶定位于细胞核内,如把反式作用的核酶与定位于核的RNA偶联起来,则可大大提高核内核酶的浓度。如果将核酶与底物mRNA共同定位于核内,则可将异常mRNA在翻译之前即被降解掉。

3.4 核酶作用区域的选择

核酶的作用区域没有通用的模式,但遵守以下

的选择原则是重要的:A:选择区域应是高度保守的。因在RNA病毒中,突变率是较高的,约 10^{-4} 每个碱基,若不选择保守区域,则会因突变而妨碍核酶的活力。B:所选择区域应是核酶能够靠近,便于进攻的。Zheng等^[13]在体外证明了一段对核酶敏感的区域,一旦形成二级结构以后,便变得不那么敏感了。这可利用一种考察RNA二级结构的软件对底物RNA进行分析,从而找出可能的作用位点。C:选定的目标区域一定要有裂解位点。锤头性和发夹型核酶的通常裂解位点是GUC,但研究表明NUX都可作为有效的裂解位点。这样就使选择范围得以大大扩展。

3.5 影响核酶活性的一些因素

研究表明,核酶活性中心两侧与底物RNA互补定位的反义RNA链的长度可以影响核酶的活性。在细胞中具有长的反义互补链的核酶比含短的互补链的核酶活性高^[14]。在降解IL-2 mRNA的锤头型核酶中,具有21或27个核苷酸的互补链的核酶的活性远远高于具14个核苷酸互补链的核酶。还有一些寡核苷酸片段,它们可以与底物上除核酶结合区域外的其它部分结合,并因而对核酶与底物的结合、底物的裂解以及产物的释放等多方面产生影响,从而可能增加或抑制核酶的活力^[15]。

细胞内存在着一些RNA结合蛋白,这类蛋白与核酶及底物RNA相互作用,可以影响胞内核酶活性,如核不均一核糖体蛋白RNPA1在细胞核及细胞质内都能与RNA结合,当将RNPA1纯化并在体外与核酶和底物RNA一起温育,可以促进它们的结合及裂解产物的释放。因此,在活体内,RNPA1及其它一些RNA结合蛋白,很有可能也具有促进核酶活力的功效^[16]。

4 实例及前景展望

利用核酶作为治疗药物,现在还处于基础理论及临床前应用的研究阶段。在体外细胞培养水平上,Ohta^[10]等利用组织特异表达的降解的核酶有效地抑制了人恶性黑色素瘤细胞的增殖。Sarver等^[17]以人组成型肌动蛋白的启动子连接上降解人类免疫缺陷病毒1型(HIV-1)的gag基因转录物的mRNA的核酶,以此转染CD4⁺ Hela细胞,筛选出稳定表达鸟嘌呤-磷酸核糖转移酶的克隆,经PCR及RNA印迹检查,都证明核酶的存在。然后用HIV-1感染含核酶和不含核酶的细胞。经定量检测表明,感染7 d后,转化细胞的gag mRNA和p24抗原均有大幅度下降。更有意义的是,转化细胞中的原病毒DNA含量更比未转化亲株低百倍以上,这说明,组成型表达的核酶能降解进入的病毒RNA基因组。另外,在对含组成型表达的核酶的细胞进行为期9个月的培养观察,在

细胞生长速度、DNA 及 RNA 含量、细胞形态等方面,均未发现转化细胞有中毒迹象,说明这是一种安全、可靠的治疗方法。

核酶现在尚未作为临床药物应用,其中原因可能是正如前文所述在应用中应解决的问题,概括地也即核酶的投送、稳定性、免疫原性、作用区域等问题,但相信随着对核酶的基础理论研究深入及应用中的技术问题的解决,这一新型、安全、高效的治疗方案,必将会在治疗涉及基因突变、微生物感染等方面发挥重要作用。

参考文献:

- [1] Cech T R, Zaug A J, Grabowski P J. In-vitro splicing of the ribosomal RNA precursor of *Tetrahymena thermophila*: involvement of a guanosine nucleotide in the excision of the intervening sequence[J]. Cell, 1981,27: 487 ~ 496.
- [2] Cech T R. A model for the RNA-catalyzed replication of RNA [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1986,83:4 360 ~ 4 363.
- [3] Hutchins C J, Rathjen P D, Forster A C, et al. Self-cleavage of plus and minus RNA transcripts of avocado sunblotch viroid [J]. Nucleic Acids Res, 1986,14: 3 627 ~ 3 640.
- [4] Haseloff J, Gertach W L. Simple RNA enzymes with new and highly specific endoribonuclease activities[J]. Nature, 1988, 334: 585 ~ 591.
- [5] Hampel A, Tritz R. RNA catalytic properties of the minimum (-) sTRSV sequence[J]. Biochemistry, 1989,8:4 929 ~ 4 933.
- [6] Chatterjee S, Johnson P R, Wong K K Jr. Dual-Target inhibition of HIV-1 in vitro by means of an adeno-associated virus antisense vector[J]. Science, 1992,258: 1 485 ~ 1 488.
- [7] Furth P A, Onge L S, Böger H, et al. Temporal control of gene expression in transgenic mice by a tetracycline-responsive promoter[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994,91: 9 302 ~ 9 306.
- [8] Efrat S, Leiser M, Wu Y J, et al. Ribozyme-mediated attenuation of pancreatic β -cell glucokinase expression in transgenic mice results in impaired glucose-induced insulin secretion[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994,91: 2 051 ~ 2 055.
- [9] Ohta Y, Kijime H, Ohkawa T, et al. Tissue-specific expression of an anti-ras ribozyme inhibits proliferation of human malignant melanoma cells[J]. Nucleic Acids Res, 1996,24: 983 ~ 942.
- [10] Larsson S, Hotchkiss G, Andäng M, et al. Reduced β 2-microglobulin mRNA levels in transgenic mice expressing a designed hammerhead ribozyme[J]. Nucleic Acids Res, 1994,22: 2 242 ~ 2 248.
- [11] Noonberg S B, Scott G K, Gorovoy M R, et al. In vivo generation of highly abundant sequence-specific oligonucleotides for antisense and triplex gene regulation[J]. Nucleic Acids Res, 1994,22: 2 830 ~ 2 836.
- [12] Kislauskas E H, Li Z, Singer R H, et al. Isoform-specific 3'-untranslated sequences sort α -cardiac and β -cytoplasmic actin messenger RNAs to different cytoplasmic compartments [J]. J Cell Biol, 1993,123: 165 ~ 172.
- [13] Zheng X, Whitton J L. Ribozymes which cleave Arenavirus RNAs: identification of susceptible target sites and inhibition by target site secondary structure[J]. J Virology, 1992,66: 1 361 ~ 1 369.
- [14] Crisell P, Thompson S, James W. Inhibition of HIV-1 replication by ribozymes that show poor activity in vitro[J]. Nucleic Acids Res, 1993,21: 5 251 ~ 5 255.
- [15] Jankowsky E, Schwenzer B. Oligonucleotide facilitators may inhibit or activate a hammerhead ribozyme[J]. Nucleic Acids Res, 1996,24: 423 ~ 429.
- [16] Bertrand E L, Rossi J J. Facilitation of hammerhead ribozyme catalysis by the nucleocapsid protein of HIV-1 and the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 [J]. EMBO J, 1994,13: 2 904 ~ 2 912.
- [17] Sarver N, Cantin E M, Chang P S, et al. Ribozymes as potential anti-HIV-1 therapeutic agents[J]. Science, 1990, 247:1 222 ~ 1 225.

Ribozyme and Its Design as Molecular Drug and Application

HOU Xue-wen¹, GUO Yong²

(1 College of Natural Resources and Environment, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China;

2 Bioengineering Department of South China Univ. of Tech., Guangzhou 510641, China)

Abstract: Ribozyme is a kind of RNA with self-catalytic activity which was found in 1980s. To block the expression of harmful genes, including self-mutation and heterogenous pathogens, in the human cell at level of nucleic acids, this is a very specific therapy with the least harm to human body. The natural ribozyme has the *cis* activity, but it can be engineered with *trans* activity. This is the base to design ribozyme with therapeutic activity. In this paper, the authors mainly discussed the hammerhead and hairpin ribozymes, and the principles involved in application of ribozyme as therapeutic agents were also given.

Key words: ribozyme; molecular drug

【责任编辑 李 玲】