

DANGDAI SHENGWU YIXUE

当代生物医学研究进展

当代生物医学 研究进展

DANGDAI SHENGWU YIXUE
YANJIU JINZHAN

主编 李君文 石满 周正鸣 徐天昊

军事医学科学出版社

当代生物医学研究进展

主 编	李君文	石 满	周正鸣	徐天昊
副主编	曹晓哲	翟俊辉	文鸣旭	程度胜
	吴奎武			

编 委	万里川	文鸣旭	王良友	冯 凯
	石 满	李君文	张部昌	吴奎武
	周正鸣	郑金来	徐天昊	曹晓哲
	程度胜	翟俊辉		

军事医学科学出版社

·北 京·



内 容 简 介

当代生物医学发展迅速,不断涌现出新的方法、技术及观点,《当代生物医学研究进展》一书的内容主要涉及分子生物学、免疫学、药学、肿瘤学、军事医学等多学科领域。该书介绍了目前较为热门的研究领域,如干细胞与组织工程、基因表达与调控、疫苗的设计与制备、肿瘤的免疫治疗、药物滥用及环境污染的生物治理等;还较为翔实地介绍了最新的生物医学技术,如基因芯片技术、基因敲除技术、模型动物的建立及分子标记技术等。生物医学研究人员可参考本书以了解相关领域的研究动向,衷心希望本书能给您的研究带来有益的提示。

* * *

图书在版编目(CIP)数据

当代生物医学研究进展/李君文等主编.

- 北京:军事医学科学出版社,2000.1

ISBN 7-80121-213-4

I. 当… II. 李… III. 生物工程;医学工程-研究 IV. R 318

中国版本图书馆 CIP 数据核字(1999)第 75327 号

2496/13

* *

军事医学科学出版社出版

(北京市太平路 27 号 邮政编码:100850)

新华书店总店北京发行所发行

北京四环科技印刷厂印刷

*

开本:787 mm×1092 mm 1/16 印张:17.5 字数:430.5 千字

2000 年 1 月第 1 版 2000 年 1 月第 1 次印刷

印数:1-3000 册 定价:25.00 元

(购买本社图书,凡有缺、损、倒、脱页者,本社发行部负责调换)

序

即将到来的 21 世纪是知识经济时代, 创新——这个跨世纪的主题将为新世纪我国科学技术的发展与跨越提供不竭的动力。有人说, 世纪之交的中国和世界, 一个亘古未有的创新高潮正在蓬勃兴起。而青年人思维敏捷、风华正茂, 最富有创新的活力。本书正是基于这种思想, 汇集了来自军事医学科学院不同专业的 99 级博士研究生和部分优秀青年科技工作者, 结合各自研究方向谱写的生物医学领域的发展动向和进展, 旨在互相交流、启发, 更为进一步发挥青年人的创新热情, 推动事业的发展。

创新的基础在于学习, 需要知识的积累和创造性的应用, 所以, 首先希望青年朋友脚踏实地、不畏艰难、刻苦钻研; 创新具有继承性, 要继承前人的知识与成果, 把科学前沿作为新的起跑点, 所以希望青年朋友能虚怀若谷、尊师重教, 向周围的老师们虚心学习, 特别要发扬老一辈科学家爱国拼搏、敬业奉献的作风和传统, 把科学研究的接力棒接好; 创新更需要探索, 要敢于向前人未涉足的领域挑战, 大胆探求、勇于实践; 创新还需要团结协作, 科学研究本身是一项复杂的系统工程, 需要承上启下, 多方合作, 所以还希望青年朋友认真进行理论学习, 加强修养, 善于团结共事, 作出更大成绩。创新是中华民族的优良传统, 是实现跨世纪战略目标的根本保证, 在此, 衷心希望青年朋友真正成为创新的生力军。我想, 青年科学家应有创新的豪情, 为我国科技进步、为赶超世界先进水平而努力! 希望本书能在学术交流和激励创新上发挥积极的促进作用。

晁福祥

一九九九年十二月

目 录

Smads 基因功能的研究进展	杨 晓 黄培堂 黄翠芬(1)
基因芯片技术及应用研究进展	王升启(7)
干细胞与现代组织工程学	冯 凯 裴雪涛(14)
CD19 分子的研究进展	郭燕翔 沈倍奋(20)
Alu-PCR 的基本原理及其应用	葛学铭 陆应麟(23)
病毒的 B 细胞抗原表位研究方法	侯利华 王海涛(27)
ATP 依赖的钾离子通道与动物细胞的低氧抗性	马子敏 谢印芝(31)
炭疽战剂病理病原及其分子生物学研究进展	毛春明(38)
σ^{38} 因子在与渗透压相关基因表达中的调控作用	刘秀丽 丁清泉(49)
λ 噬菌体表达调控的研究进展	万里川(53)
蛋白激酶 C 与肿瘤多药耐药	吴达龙 吴德政(56)
非肽类 G-蛋白激活剂在细胞生物学和潜药先导化合物中的应用	肖丽仁, 编译(60)
尿激酶原纯化研究进展	吴清法 张正光 肖成祖(79)
组织特异性调控元件在肿瘤基因治疗中的研究进展	谢庆军 王会信 陆应麟(86)
噬菌体肽库研究进展	武 婕 陈惠鹏(91)
长链逆转录 PCR 的研究进展	颜 冰(96)
胃泌素及其受体的分子生物学研究进展	张宝林 王嘉玺(100)
动蛋白的研究	修冰水(107)
PTHrP(1-36) 具有潜在的治疗骨质疏松的作用	赵 安 柳 川(112)
人 CD19 基因在痘苗系统中的表达	郭燕翔 胡美茹 舒翠玲, 等(116)
HER-2/neu 与抗肿瘤免疫	贾延军(122)
多肽疫苗的合成策略	王良友 潘和平 吴桂芝, 等(127)
粘膜免疫细胞研究进展	王 华 高杰英(131)
造血生长因子模拟肽研究进展	袁志宏 奚永志 孔繁华(136)
T 细胞疫苗——面向 21 世纪的新型疫苗	徐俊杰 王海涛(140)
红霉素的生物合成	张部昌 赵志虎 马清钧(144)
利多卡因局部神经毒性作用的形态定量研究	曹晓哲 吴江静(148)
肿瘤放疗增敏药甘氨酸双唑钠(CMNa)的药代动力学研究	付良青 郭军华 高洪志, 等(151)
α -芋螺毒素的研究现况	李 赏 程度胜 陈添弥(155)
血管内皮细胞乙酰胆碱激活蛋白的药理学研究进展	山丽梅 汪 海(160)

药物滥用的法医病理学.....	王和枚(166)
常见补益类中药复方的免疫药理学研究进展.....	杨 胜 张永祥(171)
抗焦虑剂研究进展.....	周 勇 姚霞君、恽榴红(180)
科索沃战争对环境的破坏及对我军军事预防医学研究的启示	
.....	李君文 袁著革 晁福寰(183)
环境污染降解微生物研究进展及展望	郑金来 李君文 晁福寰 188)
时间形态学的研究进展.....	曹晓哲(200)
脱氢酶在环境监测中的应用概况.....	陈 翔(203)
精神发育迟滞的遗传学研究进展.....	陈 洁 郭亦寿(207)
从生物医学新技术展望未来生命科学研究新趋向.....	韩红星(213)
模拟光辐射烧伤后大鼠内皮细胞 HSP70 及 ICAM-1 的检测.....	刘 杰 鲁华玉(217)
小麦抗白粉病基因分子标记研究进展	马晓云(223)
肿瘤侵袭转移的体外实验模型	史兆兴 王玉芝 苏国富(230)
生物技术专利及资源查找	于 群 曹 巍 卜凤荣(234)
运动性月经周期紊乱的研究进展	苑晓玲 邹延艾(239)
生物传感器及微生物检测	翟俊辉 孙润桥(243)
酞菁化合物光化学法用于红细胞浓缩制品中病毒灭活的研究	詹林盛(262)
浅谈镁与心血管疾病研究进展	赵贵卿 王化洲 高东明(266)

Smads 基因功能的研究进展

杨 晓 黄培堂 黄翠芬

转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)是一个由分泌型的多肽信号分子,包括 TGF- β s、活动素(activins)、抑制素(inhibins)、骨形态形成蛋白(bone morphogenetic proteins, BMPs)等构成的细胞素超家族。这些信号分子可以调节细胞的增殖、分化、粘附、移行及凋亡,在生物整体及各种器官的发育过程中起重要的作用。TGF- β 信号分子通过跨膜的受体复合物进行信号传导。这些受体根据分子量大小可分成3类,分别称为I型(Mr 50 000-60 000)、II型(Mr 75 000-85 000)和III型(Mr 280 000)受体。I型和II型受体均属于丝氨酸/苏氨酸受体激酶大家族。II型受体能以较高的亲和力与TGF- β 配体结合,并与I型受体结合而形成异源受体复合物。II型受体可将I型受体近膜的一串甘氨酸和丝氨酸残基(又称GS功能域)磷酸化,从而导致细胞内对所结合的信号分子起应答反应。III型受体并不介导TGF- β 的体内传导,但对TGF- β 与信号传导受体的结合具有重要的调节功能^[1]。

最近,研究者发现了脊椎动物体内TGF- β 信号传导途径中一个重要的新基因家族-Smads家族^[1-3]。SMADs是细胞质内TGF- β 信号传导分子,它们可以将TGF- β 信号直接由细胞膜传导入细胞核内。近4年中,对SMADs的研究以一种惊人的速度进展。体外生化实验以及对Smads基因敲除小鼠的研究帮助研究者理解TGF- β 是怎样在体内传导的,并为研究者进一步探讨TGF- β 的成员如何调节特定细胞复杂的行为模式提供了重要的线索。

1 SMADs 的结构及分类

第一个克隆的TGF- β 细胞质内信号传导分子Mad基因是在果蝇的遗传分析中鉴定出来的^[4]。随后在秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)中发现Sma-2、Sma-3、Sma-4与Mad结构类似,并是一个未知TGF- β 配体的丝氨酸/苏氨酸受体daf-4的功能所必需的。迄今为止,至少有8个类似于Mad与Sma的基因在蟾蜍、小鼠及人类中发现,它们均是丝氨酸/苏氨酸受体下游信号传导途径中的成员。研究者将脊椎动物中的这些TGF- β 信号传导基因命名为Smad,意为Sma与Mad的同源基因。Smads编码Mr 42 000-62 000的蛋白质,在不同物种间高度保守。它们含有高度保守的N端功能域和C端功能域,又称为MH1和MH2(Mad homologous domain)功能域。两个功能域之间含有一个富含脯氨酸的连接区。最新的研究显示,SMADs的MH1与MH2功能域相互作用并相互抑制。受体激活后,SMADs分子打开并形成异源三聚体,转移到细胞核内激活下游靶基因的转录。

1.1 受体激活的SMADs

SMAD家族中不同的成员在信号传导中起不同的作用。第一类受体激活的SMADs,包括SMAD1, SMAD2, SMAD3, SMAD5, 以及可能的SMAD8。它们的C端功能域末端含有一个

保守的磷酸化位点 SS(V/M)S。它们可与 I 型受体直接作用并被磷酸化。特定 SMAD 与受体间的相互作用与 MH2 功能域中 L3 环(loop) 结构密切相关^[5]。这种受体与 SMADs 间的相互作用是暂时的, SMADs 磷酸化后会从受体上释放下来。有些 SMADs 在磷酸化位点产生突变后会与受体稳定结合并产生显性负效(dominant-negative)的效应。磷酸化的 SMADs 与通用的 SMAD 形成复合物后可转移至核内, 调节靶基因对 TGF- β 信号的应答。在蟾蜍中的研究表明 SMAD1 和 SMAD5 与 SMAD4 相互作用, 在骨形态形成蛋白信号传导途径中起作用, 在蟾蜍卵中可诱导腹中胚层(ventral mesoderm)的形成^[6,7]。SMAD2 和 SMAD3 可被 TGF- β 和活动素激活, 与 SMAD4 相互作用可诱导背中胚层(dorsal mesoderm)的生成^[8,9]。也有研究者报道 TGF- β 可以诱导 SMAD1 的磷酸化^[10,11], 这可能反映了 TGF- β 信号传导途径中的复杂性和交互作用。

1.2 通用的 SMAD

目前发现的此类 SMAD 只有 SMAD4。SMAD4 与 SMADs 家族成员的同源性较低, 在它的 C 端功能域没有磷酸化位点。它不能与 TGF- β 或 BMP 的 I 型受体相互作用, 也不能被磷酸化, 但它可与 SMAD 家族中的其他成员相互作用并形成稳定的异源三聚体^[3,12]。这种异源三聚体的形成是 TGF- β 信号得以传导所必需的, 因为 *Smad4* 缺陷的细胞不再对 TGF- β 信号产生应答, 且转染野生型 *Smad4* 可以重建细胞对 TGF- β 的应答。影响三聚体形成的突变可使 *Smad4* 失活, 这意味着 MH2 功能域间的相互作用对于信号传导的功能是至关重要的^[12]。

1.3 抑制型 SMADs

SMAD6 和 SMAD7 在结构上与其他 SMADs 有较大的不同。它们的 C 端功能域缺乏磷酸化位点, 没有保守的 MH1 功能域, 而只在 MH2 功能域与其他 SMADs 具有较大的同源性。SMAD6 和 SMAD7 的超表达可以阻断 TGF- β 超家族中多种成员的信号传导, 因而被称为抑制型 SMADs^[3]。*Smad7* 可以抑制 SMAD2 和 SMAD3 受体调节的磷酸化作用, *Smad6* 可以抑制 SMAD1、SMAD2 但不能抑制 SMAD3 的磷酸化作用。它们主要通过竞争性地与 I 型受体结合而抑制其他受体激活 SMADs 的磷酸化作用。对 SMAD6 而言, 它还能与 SMAD1 结合, 抑制它与 SMAD4 的相互作用从而阻断正常的信号传导^[13]。

2 SMADs 介导的信号传导

作为已知的细胞质内唯一 TGF- β 信号传导分子, SMADs 通过直接与 DNA 结合作为转录因子, 与其他转录因子及活化因子相互作用诱导对 TGF- β 信号的转录应答。

2.1 SMADs 可直接与 DNA 结合

最先被证明具有 DNA 结合活性的是果蝇中的 *Mad*。它的 MH1 功能域在体外可与基因遗迹(vestigial)(vg)的 DPP(一种 BMP 同源分子)应答元件结合^[14]。脊椎动物中的 SMAD3 与 SMAD4 也被证实具有 DNA 结合的活性。SMAD3 或 SMAD4 理想的靶位点包括一个 4 bp 的称为 Smad 盒的核心 GTCT 序列^[15,16]。SMAD3、SMAD4 也能与 PAI-1 和 Jun B 启动子的 TGF- β 调节元件结合^[15,17,18]。在 PAI-1 启动子中含有 3 个分离的 SMAD3/SMAD4 结合位点, 必须去除全部 3 个位点才可以消除启动子对 TGF- β 的应答^[15]。删除 SMAD 的 C 端功能域可以增强 SMAD 对这些序列的亲合性^[15,16,19]。对 SMAD3 MH1 功能域晶体结构的分析显示其 N 端一个保守的 11 个残基构成的 β 发夹(β hairpin)可与 4 bp 的 Smad 盒紧密结

合^[20]。

2.2 SMADs 与其他转录因子和辅助活化因子的协同作用

SMADs 可与其他转录因子形成稳定的蛋白质-蛋白质复合物而调节靶基因对 TGF- β 的应答。SMAD2 的 C 端功能域与 Fast-1 或 Fast-2 的相互作用是介导活动素信号以及 Mix.2 或 goosecoid 启动子中 SMAD2/4 介导的转录所必需的^[21,22]。SMAD2 的磷酸化可以增强 SMAD2 和 Fast-1 之间的相互作用。SMAD3、SMAD4 还能与 *c-Jun/c-Fos* 以及 TFE3 分别形成转录复合物诱导相应启动子对 TGF- β 的应答^[19,23]。这些 SMADs 与转录因子间的相互作用全部依赖于配体激活的受体活性,并与配体诱导的 SMAD 活性以及异源 SMAD 多聚体的核转移相一致。

SMADs 也可与其他转录的调节因子相互作用协同调节靶基因的转录。CBP 与 P300 是多种转录因子的辅助活化因子(coactivator)。它们可以将序列特异的活化因子聚集到转录复合物内并可通过组氨酸的乙酰化作用修饰染色质的结构。研究证明 CBP/P300 可以通过与 *Smad 2* 或 *Smad 3* C 端功能域的直接作用而作为它们的共活化因子调节靶基因的转录^[24-27]。*Smad 3* C 端的缺失可以消除与 CBP 间的相互作用,同时灭活转录作用。CBP/P300 表达水平提高可以增强 TGF- β 诱导的 *Smad 3* 的转录活性。*Smad 4* 可以使 *Smad 3*/CBP 复合物变得更加稳定^[24]。

3 用基因敲除技术研究 SMADs 在脊椎动物体内的功能

蟾蜍中的异位表达实验表明 *Smads* 的超表达可以模拟 TGF- β 配体对不同分化组织的诱导作用,如低剂量的全长 *Smad2* 或其功能域的表达可以诱导侧中胚层的分子标记物表达,高剂量的表达可以诱导背中胚层分子标记物的表达,而 *Smad1* 或 *Smad5* 的超表达可以模拟 BMP4 的效应,诱导腹中胚层的形成。C 端功能域缺失的 SMAD4 能抑制活动素诱导的中胚层形成。所有这些数据都显示 SMADs 在中胚层模式形成中的作用^[28]。通过同源重组在小鼠中定位敲除 *Smads* 基因的研究已经开始揭示 *Smads* 在脊椎动物发育过程中的功能。

3.1 *Smad4* 在中胚层诱导及形成中的作用

Smad4 基因敲除导致小鼠在胚胎发育早期(E6.5)死亡。*Smad4* 突变胚胎的生长严重迟缓,卵柱期后期的突变体胚胎的胚外部分不能延长,没有任何中胚层形成或原肠期发生的迹象。体内及体外的实验证实突变体胚胎的增殖能力降低^[29,30]。许多 TGF- β 配体及受体,如 BMP4、I 型 BMP 受体以及 Nodal 对于小鼠正常的原肠期发生以及中胚层模式形成均十分重要。SMAD4 作为 TGF- β 信号途径中通用的 SMAD,其基因敲除导致如此严重的表型也可以说是意料之中的。令人惊讶的是,这种早期中胚层及原肠期发生的缺陷能被突变胚胎与四倍体野生型胚胎的融合所拯救。这种嵌合体中,四倍体野生型细胞能发育成正常的胚外部分,*Smad4* 突变细胞可以发育成早期中胚层并进行原肠期分化。这些结果暗示也许有其他类似于 *Smad4* 的通用 *Smad* 存在,它们可以在 *Smad4* 不存在的时候进行功能代偿。还有另外的可能性是,在某些时候,受体激活的 SMADs 可以在不与 SMAD4 形成三聚体的情况下进行信号传导。此外,Nodal 与 BMP4 在早期中胚层形成中的功能也许经由 *Smads* 之外的信号通路传导。所有这些可能性均需要进一步的实验进行区分和验证。

3.2 *Smad2* 与早期胚胎发育

3 个研究小组独立地敲除了 *Smad2*,所有的突变小鼠均死于胚胎早期,但却有着截然不

同的表型^[31-33]。Waldrip 等^[32]报道的 *Smad2* 突变胚胎有相对正常的胚外组织,中胚层分子标记物短尾(Brachyury)在原肠期早期的胚细胞中表达。而 Nomura 与 Li, 以及 Weinstein 等^[33]报道的 *Smad2* 突变胚胎有严重的胚外组织缺陷,而且在胚细胞中没有中胚层分子标记物表达。这些研究小组均使用类似遗传背景的小鼠进行表型分析。显然,这些表型的差异是由于使用不同的打靶策略替换不同的外显子所引起的,其中某些突变等位基因保存的外显子仍可能具有微弱的抑制或活化的功能。

3.3 *Smad3* 缺失导致粘膜免疫缺陷以及 T 细胞丧失对 TGF- β 的应答

Smad3 基因也被 3 个研究小组独立地敲除^[34-36]。所有这些突变小鼠均在胚胎期发育正常,并可存活至成年。与 *Smad2* 的基因敲除研究相似,研究小组选择不同的外显子进行敲除导致了不同的表型。Zhu 等报道,100% 的在 129SV 遗传背景的 *Smad3*^{ex2/ex2} 小鼠以及 30% 的在 129SVxC57BL/6J 遗传背景的 *Smad3*^{ex2/ex2} 小鼠在 4-6 月龄发生转移性大肠癌。而 Yang 及 Datto 等分别报道的 *Smad3*^{ex8/ex8} 小鼠和 *Smad3*^{ex1/ex1} 小鼠在两个不同遗传背景(129SVEVxC57BL/6J 和 129SVEVxBlack Swiss)下几乎都没有肿瘤^[35,36]。他们非常仔细地分析了 *Smad3*^{ex8} 及 *Smad3*^{ex1} 突变等位基因的功能,用 *Smad3* 应答的报道基因分析证实了 *Smad3*^{ex8} 等位基因没有任何活性。Zhu 等通过测试在蟾蜍卵中诱导中胚层的能力来检测他们 *Smad3*^{ex2} 突变等位基因的功能。他们的数据表明 SMAD3 的前 77 个氨基酸不能诱导中胚层的形成^[34],然而他们却没有检测全长野生型 SMAD3 对中胚层诱导的作用,而且文献中也从来没有 SMAD3 诱导中胚层形成的报道。此外, *Smad3*^{ex2} 突变转录本其外显子 1 和外显子 4 融合处之后紧接着两个读框正常(in-frame)的甲硫氨酸,而他们却没有对可能的翻译产物(从外显子 4 至外显子 9)作任何测试。这一点至关重要,因为从以前的研究中我们知道 SMAD2 的 C 端即使在没有配体的情况下也具有完全的功能^[9]。对人类肠癌中 *Smad3* 突变的分析表明, *Smad3* 可能在肠癌发展中不起关键作用^[37]。显然需要更多的实验来证实 *Smad3* 与肠癌的相互关系。

Yang 及 Datto 等均发现 *Smad3* 基因敲除小鼠有不同于肠癌的表型。离乳后, *Smad3*^{ex8/ex8} 小鼠发生渐进性白细胞增多症、牙周炎、胃炎、肠炎以及粘膜表面附近脓肿形成的慢性感染。对有症状的 *Smad3*^{ex8/ex8} 小鼠淋巴结的组织学及免疫表型分析显示 T 细胞有增强的增殖能力及活化的表型。T 细胞浸润至 B 细胞分布的区域,浆细胞也在淋巴结中富集。分离的 *Smad3*^{ex8/ex8} B 淋巴细胞经 LPS 激活后在培养中依然对 TGF- β 的抑制作用敏感,而被 T 细胞受体抗体激活后的 *Smad3*^{ex8/ex8} 胸腺细胞及外周 T 细胞却彻底失去了对 TGF- β 的应答。这是首次发现生物体内不同细胞对 TGF- β 信号的应答是由不同的 SMAD 蛋白介导的。此外, *Smad3*^{ex8/ex8} 突变中性粒细胞也失去了对 TGF- β 正常的趋化应答。所有这些结果表明 SMAD3 的功能之一是介导 TGF- β 的特异自分泌和旁分泌的功能,调节特定白细胞的移行、活化和增殖。*Smad3* 的定位敲除导致其中一些功能的丧失而引起免疫缺陷,使 *Smad3*^{ex8/ex8} 小鼠易受细菌的感染,最终导致 *Smad3*^{ex8/ex8} 小鼠的死亡^[35]。

3.4 *Smad5* 基因敲除导致原肠期发生后多种胚胎缺陷

Smad5 基因敲除小鼠在胚胎期 E11.5 d 死于多种胚胎及胚外组织缺陷^[38,39]。E8.0 d 的突变纯合子的羊膜及心脏有类似于 BMP-2 基因敲除小鼠的缺陷^[38]。突变胚胎在 E9.5 d 后表现出与 BMP-4, TGF- β 1 及 TGF- β II 型受体类似的血管形成缺陷的表型^[38,39]。*Smad5* 缺陷型胚胎的血管形成可以发生,因为其卵黄膜及胚胎均可检测到内皮细胞粘附分子

(pECAM)阳性的血管内皮细胞。进一步的研究结果表明, *Smad5* 突变胚胎血管直径增加, 不能形成正常的血管网络可能与胚胎内增加的间质细胞凋亡以及血管外周减少的平滑肌细胞有关。 *Smad5* 在原肠期发生的 E7.0 d 便在小鼠胚胎表达。它在胚胎期 E9.5 d 及 E10.5 d 的表达与 TGF- β 1 及 TGF- β II 型受体的表达高度一致^[39]。许多研究表明 TGF- β 1 可以调节血管重塑(remodeling)的过程。TGF- β 1 可以促进细胞外间质的形成, 促进间质细胞分化成血管平滑肌细胞并抑制血管内皮细胞的生长^[40,41]。这些功能在体内是否确实是由 *Smad5* 介导的还需要实验进一步的验证。值得注意的是, 以前的许多体外实验结果将 *Smad5* 置于 BMP 信号传导通路而非 TGF- β 通路中。 *Smad5* 基因敲除小鼠与 TGF- β 1 及 TGF- β II 型受体基因敲除小鼠相似的表型再一次提示体内各 *Smads* 信号通路可能存在复杂的相互作用。与 *Smad2* 及 *Smad4* 不同, *Smad5* 突变胚胎的缺陷发生在原肠期后期, 说明 *Smad5* 并不是原肠期发生所必需的, 或者 *Smad5* 的功能可能被与它高度同源的 *Smad1* 的功能所代偿。要验证这一假设, 可对 *Smad1* 与 *Smad5* 双基因缺陷的小鼠胚胎进行表型分析。

4 总 结

几年来的体外生化研究以及体内功能分析逐步揭示了 SMADs 在 TGF- β 信号传导途径中的作用, 它们可以在特定时空顺序上调节特定细胞的生长、分化、移行和凋亡等复杂的过程。今后的研究将进一步揭示 SMADs 信号通路间的相互关系以及 SMADs 介导的 TGF- β 信号通路与其他细胞素通路间的相互关系, 例如, 已有实验证据表明 EGF、HGF 可使 SMADs 磷酸化。关于 SMADs 在脊椎动物体内的功能, 基因敲除小鼠的研究依然是最有效的手段之一。遗憾的是, 大多数 *Smads* 基因敲除小鼠死于胚胎期, 研究者无法用这些小鼠研究 *Smads* 在成体各器官以及肿瘤形成过程中的功能。因此, 研究者将期待着可以在特定组织器官中定位敲除 *Smads* 的条件敲除小鼠的诞生。

参 考 文 献

- 1 Massague J. Annu Rev Biochem, 1998; 67:753.
- 2 Derynck R, et al. Biochim Biophys Acta, 1997; 1333: F105.
- 3 Heldin CH, et al. Nature, 1997; 390: 465.
- 4 Sekelsky JJ, et al. Genetics, 1995; 139:1347.
- 5 Lo RS, et al. EMBO J, 1998;17: 996.
- 6 Kretzschmar M, et al. Genes Dev, 1997; 11:984.
- 7 Lagna G, et al. Nature, 1996; 383: 832.
- 8 Zhang Y, et al. Nature, 1996; 383: 168.
- 9 Baker JC, et al. Genes Dev, 1996; 10:1880.
- 10 Lechleider RJ, et al. J Biol Chem, 1996; 271:17617.
- 11 Yingling JM, et al. Proc Natl Acad Sci USA, 1996; 93:8940.
- 12 Shi YA, et al. Nature, 1997; 388:87.
- 13 Hata A, et al. Genes Dev, 1998, 12:186.
- 14 Kim J, et al. Nature, 1997; 388:304.
- 15 Dennler S, et al. EMBO J, 1998, 17:3091.
- 16 Zawel L, et al. Mol Cell, 1998; 1:611.

- 17 Yingling JM, *et al.* Mol Cell Biol, 1997; 17: 7019.
- 18 Jonk L, *et al.* J Biol Chem, 1998; 273:21145.
- 19 Zhang Y, *et al.* Nature, 1998; 394:909.
- 20 Shi Y, *et al.* Cell, 1998; 94:585.
- 21 Chen X, *et al.* Nature, 1997; 389:85.
- 22 Labbe E, *et al.* Mol Cell, 1998; 2:109.
- 23 Hua X, *et al.* Genes Dev, 1998; 12:3084.
- 24 Feng XH, *et al.* Genes Dev, 1998; 12:2153.
- 25 Jacknecht R, *et al.* Genes Dev, 1998; 12:2114.
- 26 Pouponnot C, *et al.* J Biol Chem, 1998; 273:22865.
- 27 Topper J N, *et al.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998;95:9506.
- 28 Witman M. Genes Dev, 1998; 12:2445.
- 29 Sirard C, *et al.* Genes Dev, 1998; 12:107.
- 30 Yang X, *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1998; 95:3667.
- 31 Nomura M, *et al.* Nature, 1998; 393:786.
- 32 Waldrip WR, *et al.* Cell, 1998; 92:797.
- 33 Weinstein M, *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1998;95:9378.
- 34 Zhu Y, *et al.* Cell, 1998; 94:703.
- 35 Yang X, *et al.* EMBO J, 1999;18:1280.
- 36 Datto MB, *et al.* Mol Cell Biol, 1999; 19:2495.
- 37 Arai T, *et al.* Cancer Lett, 1998; 122:157.
- 38 Chang H, *et al.* Development, 1999;126:1631.
- 39 Yang X, *et al.* Development, 1999; 126:1571.
- 40 Folkman J, *et al.* Cell, 1996; 87:1153.
- 41 Pepper MS. Cytokine Growth Factor Rev, 1997; 8:21.

基因芯片技术及应用研究进展*

王升启

人类基因组计划(HGP)是人类为了认识自己而进行的一项最伟大和最具影响的研究计划。至1997年末,HGP计划已提前完成遗传图和物理图的制作。人类基因组序列分析已完成2%。预计2003年前将完成全序列分析。此外,还测定了80万个cDNA片段(ESTs),相当于4万~5万个基因,占7万~10万个人类总基因的50%左右^[1]。目前的问题是面对大量的基因或基因片段序列如何研究其功能,只有知道其功能才能真正体现HGP计划的价值,即破译人类基因这部天书。后基因组计划、蛋白组计划、疾病基因组计划等概念就是为实现这一目标而提出的。不同个体基因变异、不同组织、不同时间、不同生命状态等基因表达差异的分析是连接基因组计划和蛋白组计划的研究成果在疾病诊断、药物筛选等领域发挥重要的作用,而且还可作为蛋白组计划的实施提供大量非常重要的线索。这一环节既是基因组计划的补充又是蛋白组计划的航标。基因芯片技术就是为实现这一环节而建立的。

所谓基因芯片就是按特定的排列方式固定有大量基因探针/基因片段的硅片、玻片、塑料片^[1,2]。基因芯片技术是高效地大规模获取相关生物信息的重要手段。目前,该技术应用领域主要有基因表达谱分析、新基因发现、基因突变及多态性分析、基因组文库作图、疾病诊断和预测、药物筛选、基因测序等。从80年代初杂交测序法(sequencing by hybridization, SBH)概念的提出,到90年代初以美国为主开始进行的各种生物芯片的研制,不到10年的功夫,芯片技术得以迅速发展,并呈现发展高峰。国外的多家大公司及政府机构均对此表现出极大兴趣,并投入可观的财力^[3]。本文介绍DNA芯片技术及其主要应用的一些进展。

1 基因芯片的制备

芯片种类较多,制备方法也不尽相同,但基本上可分为两大类:一类是原位合成;一种是直接点样。原位合成适用于寡核苷酸;直接点样多用于大片段DNA,有时也用于寡核苷酸,甚至mRNA。原位合成有两种途径。一是光刻法;一是压电打印法。光刻法可以合成30核苷酸(nt)左右,打印法可以合成40~50 nt,光刻法每步缩合率较低,一般为95%左右,合成30 nt产率仅20%;喷印法可达99%以上,合成30 nt产率可达74%,从这个意义上说喷印法特异性应比光刻法高。此外,喷印法不需特殊的合成试剂。与原位合成法比较点样法较简单,只需将预先制备好的寡核苷酸或cDNA等样品通过自动点样装置点于经特殊处理的玻片或其他材料上即可。

1.1 原位光刻合成^[3-5]

寡聚核苷酸原位光刻合成技术是由Affymetrix公司开发的,采用的技术原理是在合成碱

* 国家自然科学基金重点课题(编号:39889001);军队医药卫生杰出中青年基金课题(编号:98051202)

基单体的 5' 羟基端连上一个光敏保护基。合成的第一步是利用光照射使羟基端脱保护, 然后一个 5' 端保护的核苷酸单体连接上去, 这个过程反复进行直至合成完毕。使用多种掩盖物能以更少的合成步骤生产出高密度的阵列, 在合成循环中探针数目呈指数增长。某一含 n 个核苷酸的寡聚核苷酸, 通过 $4 \times n$ 个化学步骤能合成出 4^n 个可能结构。例如: 一个完整的十核苷酸通过 32 个化学步骤, 8 h 可能合成 65 536 个探针。

目前美国 Affymetrix 公司已有同时检测 6 500 个已知人类基因的 DNA 芯片, 并且正在制备含 50 万 - 100 万个寡核苷酸探针的人类基因检测芯片。该公司每月投入基因芯片研究的经费约 100 万美元, 目前产品尚未公开投放市场发挥经济效益, 但已有许多公司及研究机构与其签约购买其产品。该产品不仅可用于基因表达分析和基因诊断等, 而且在大规模药物开发方面也具有诱人的前景。Affymetrix 的大部分产品在 1998 年底已全面投放市场。其他公司产品也正在从实验室技术研究走向开发应用。目前, 用于分子诊断的 DNA 芯片不仅已可用于检测艾滋病病毒基因还可用于囊性纤维化(CF)、乳癌、卵巢癌等疾病相关基因的基因诊断。鉴于光刻设备技术复杂, 只能有专业化公司生产, 加之成本高及合成效率不高的问题, 因此有待进行以下研究: (1) 对光刻技术进行改进, 提高合成效率; (2) 开发新的原位合成技术, 如喷印合成技术, 该技术既能进行原位合成又能进行非原位合成。

1.2 原位喷印合成

芯片原位喷印合成原理与喷墨打印类似, 不过芯片喷印头和墨盒有多个, 墨盒中装的是 4 种碱基等液体而不是炭粉。喷印头可在整个芯片上移动并根据芯片上不同位点探针的序列需要将特定的碱基喷印在芯片上特定位置。该技术采用的化学原理与传统的 DNA 固相合成一致, 因此不需要特殊制备的化学试剂。

1.3 点样法

点样法是将合成好的探针、cDNA 或基因组 DNA 通过特定的高速点样机器人直接点在芯片上。采用的机器人有一套计算机控制三维移动装置、多个打印/喷印针的打印/喷印头; 一个减震底座, 上面可放内盛探针的多孔板和多个芯片。根据需要还可以有温度和湿度控制装置、针洗涤装置。打印/喷印针将探针从多孔板取出直接打印或喷印于芯片上。直接打印时针头与芯片接触, 而在喷印时针头与芯片保持一定距离。打印法的优点是探针密度高, 通常 1 cm^2 可打印 2 500 个探针; 缺点是定量准确性及重现性不好, 打印针易堵塞且使用寿命有限。喷印法的优点是定量准确, 重现性好, 使用寿命长; 缺点是喷印的斑点大, 因此探针密度低, 通常 1 cm^2 只有 400 点。国外有多家实验室和公司研究开发打印/喷印设备, 目前有一些已经商品化。军事医学科学院和益生堂生物企业公司目前正在联手利用打印/喷印技术进行生物芯片的研究和开发, 预计 2 年内将有用于实验室研究或临床诊断的基因芯片产品问世。

1.4 电子芯片^[1,2,6]

电子芯片是由美国 Nanogen 公司开发的, 目前国内清华大学和复旦大学也在开发这一技术。这种芯片为带有阳电荷的硅芯片、芯片经热氧化, 制成 $1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$ 的阵列、每个阵列含多个微电极, 在每个电极上通过氧化硅沉积和蚀刻制备出样品池。将连接链亲和素的琼脂糖覆盖在电极上, 在电场作用下生物素标记的探针即可结合在特定电极上。电子芯片最大特点是杂交速度快, 可大在缩短分析时间。制备复杂、成本高是其不足。

1.5 三维芯片^[7,8]

三维芯片是由美国 Packard、摩托罗拉、Argonne 国家实验室等 3 家机构与俄罗斯 Engel-

hardt 分子生物学研究所合作开发的一种芯片技术。三维生物芯片实质上是一块显微镜载玻片,其上有 10 000 个微小聚丙烯酰胺凝胶条,每个凝胶条可用于靶 DNA, RNA 和蛋白质的分析。先把已知化合物加在凝胶条上,再用 3 cm 长的微型玻璃毛细管将待测样品加到凝胶条上。每个毛细管能把小到 0.2 nl 的体积打到凝胶上。以上几家机构合作研究的生物芯片系统具有其他生物芯片系统不具有的几个优点。一是凝胶条的三维化能加进更多的已知物质,增加了敏感性。二是可以在芯片上同时进行扩增与检测。一般情况下,必须在微量多孔板上先进行 PCR 扩增,再把样品加到芯片上,因此需要进行许多额外操作。本芯片所用凝胶体积很小。使 PCR 扩增体系的体积减小 3 个数量级(总体积约纳升级),从而节约了每个反应所用的 PCR 酶(约减少 2 个数量级)。三是以三维构象形式存在的蛋白和基因材料可以其天然状态在凝胶打上分析,可以进行免疫测定,受体-配体研究和蛋白组分析。

1.6 流过式芯片(flow-thru chip)^[9]

Gene Logic 正在开发一种在芯片片基上制成格栅状微通道, Gene Logic 设计及合成特定的寡核苷酸探针,结合于微通道内芯片的特定区域。从待测样品中分离 DNA 或 RNA 并对其进行荧光标记,然后,该样品流过芯片,固定的寡核苷酸探针捕获与之相互补的核酸,采用 Gene Logic 的信号检测系统分析结果。流过式芯片用于高通量分析已知基因的变化,其特点在于:(1)敏感性高:由于寡核苷酸吸附表面的增大,流过式芯片可监测稀有基因表达的变化;(2)速度快:微通道加速了杂交反应,减少了每次检测所需时间;(3)价格降低:由于采用了特殊的共价化学技术将寡核苷酸吸附于微通道内,使每一种流过式芯片可反复使用多次,从而使其成本降低。

2 样品制备、杂交和检测

待分析基因在与芯片结合探针杂交之前必需进行分离、扩增及标记。根据样品来源、基因含量及检测方法和分析目的不同,采用的基因分离、扩增及标记方法各异。当然,常规的基因分离、扩增及标记技术完全可以采用,但操作繁琐且费时。高度集成的微型样品处理系统如细胞分离芯片及基因扩增芯片等是实现上述目的的有效手段和发展方向。为了获得基因的杂交信号必须对目的基因进行标记,目前采用的最普遍的荧光标记方法与传统方法如体外转录、PCR、逆转录等原理上并无多大差异,只是采用的荧光素种类更多,这可以满足不同来源样品的平行分析。用计算机控制的高分辨荧光扫描仪可获得结合于芯片上目的的基因的荧光信号,通过计算机处理即可给出目的基因的结构或表达信息。扫描一张 10 cm² 的芯片大概需要 2-6 min 的时间。目前已有 4-5 家生产扫描仪的公司。扫描仪根据原理不同可分为两类:一是激光共聚焦显微镜的原理;另一种是 Charye coupled device 摄像原理。前者的特点是灵敏度和分辨率较高,扫描时间长,比较适合研究用;后者的特点是扫描时间短,灵敏度和分辨率较低,比较适合临床诊断用。

杂交条件的选择与研究目的有关,多态性分析或者基因测序时,每个核苷酸或突变位点都必须检测出来。通常设计出一套 4 种寡聚核苷酸,在靶序列上跨越每个位点,只在中央位点碱基有所不同,根据每套探针在某一特定位置的杂交来谨慎程度,即可测出该碱基的种类。如果芯片仅用于检测基因表达,只需设计出针对基因中的特定区域的几套寡聚核苷酸即可。表达检测需要长的杂交时间,更高的严谨性,更高的样品浓度和低温度,这有利于增加检测的特异性和低拷贝基因检测的灵敏度。突变检测,要鉴别出单碱基错配,需要更高的杂交严谨性和更短

的时间。

此外,杂交反应还必须考虑杂交反应体系中盐浓度、探针 GC 含量和所带电荷、探针与芯片之间连接臂的长度及种类、检测基因的二级结构的影响。有资料显示探针和芯片之间适当长度的连接臂可使杂交效率提高 150 倍^[2]。连接臂上任何正或负电荷都将减少杂交效率。由于探针和检测基因均带负电荷,因此影响他们之间的杂交结合,为此有人提出用不带电荷的肽核酸(PNA)做探针^[2]。虽然 PNA 的制备比较复杂,但与 DNA 探针比较有许多特点,如不需要盐离子,因此可防止检测基因二级结构的形成及自身复性。由于 PNA-DNA 结合更加稳定和特异,因此更有利于单碱基错配基因的检测。

3 应用

3.1 基因表达检测^[10-12]

人类基因组大约编码 100 000 个不同的基因,仅掌握基因序列信息资料,要理解其基因功能是远远不够的,因此,拥有监测大量 mRNA 的实验工具很重要。基因芯片技术可清楚地直接快速地检测出 1:300 000 水平上出现的 mRNA,且易于同时检测成千上万的基因。Lockhart 等^[11]研究人对芯片技术定量检测基因的表达及其敏感性和特异性。在阵列的杂交实验中,从克隆 cDNA 文库或直接从细胞 mRNA 制备标记 RNA 靶,用于杂交的 RNA 靶通过体外转录反应掺入荧光素标记的核糖核苷酸制备,然后随机地将该 RNA 靶裂解为平均 50-100 个碱基大小的片段,样品与阵列杂交 30 min-22 h,阵列的荧光影像用特制的扫描共聚焦显微镜检测。以上述方法为基础,将 10 种细胞因子 mRNA 与来源于 B 细胞 cDNA 文库的标记 RNA 混合,标记 RNA 的水平在 1:300 000 之间,40℃ 杂交 15-16 h,可重复性地检测出该 10 种细胞因子 RNA,且杂交强度与 1:300 000 到 1:3 000 之间的 RNA 靶浓度呈线性关系,在 1:3 000 到 1:3 00 之间信号则呈现 4 或 5 倍增强,但通过减少杂交时间,线性反应范围可延伸至较高浓度。另一实验中,小鼠 B 细胞制备的 cDNA 文库中,已知 IL-10 的水平在 1:60 000 到 1:30 000 之间,将 1:300 000 水平的 IL-10 混合到样品中,仍能正确地检测出加入的 IL-10 RNA 量,这提示芯片技术能敏感地反映基因表达中微小变化。在 T 细胞诱导实验中,小鼠 T 细胞系 2D6 细胞用豆蔻酰佛波醇乙酯(PMA)诱导 0、2、6、24 h 后,分离 mRNA(约 1 μg),转变为标记的反义 RNA,与阵列杂交,检测出 γ -干扰素 mRNA 水平明显增加,同时伴随 4 种细胞因子 mRNA 即 IL-3、IL-10、GM-CSF 和 TNF- α 显著变化, β -肌动蛋白(β -actin)与磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)mRNA 水平无明显变化,而 IL-2、IL-4、IL-6 和 IL-12 mRNA 则检不出。实验结果提示所采用的方法易于监测非常大量的 mRNA。目前,已能够在 1.6 cm² 面积上合成和阅读含 400 000 个探针的阵列,可检测 10 000 个基因。

3.2 寻找新基因^[13,14]

定量检测大量基因表达水平在阐述基因功能、探索疾病原因及机理发现可能的诊断及治疗靶等方面是很有价值的。如该技术在炎症性疾病类风湿性关节炎(RA)和炎症性肠病(IBD)的基因表达研究中,由 RA 或 IBD 组织制备探针,用 Cy3 和 Cy5 荧光素标记,然后与靶 cDNA 微阵列杂交,可检测出炎症疾病诱导的基因如 TNF- α 、IL 或粒细胞集落刺激因子(G-CSF),同时发现一些以前未发现的基因如 HME 基因和黑色素瘤生长刺激因子。Scherer 等^[13]报道了 cDNA 微阵列在人类基因表达监测、生物学功能研究和基因发现方面的应用。采用含 1 046 个已知序列的 cDNA 微阵列,用高速机器人喷印在玻片上,用双色杂交法定量监测不同

基因表达,在一定的实验条件下,不同表达模式的阵列成分通过序列分析鉴定其特征。该方法较以往常用的方法敏感 10 倍以上,检测限度为 1:500 000(wt/wt)总人体 mRNA。在培养 T 细胞热休克反应的测定中,发现 17 个阵列成分的荧光比例明显改变,其中 11 个受热休克处理的诱导,6 个呈现中度抑制,对相应于 17 个阵列成分的 cDNA 测序发现 5 个表达最高的成分是 5 种热休克蛋白,17 个克隆中发现 3 个新序列。另外,在琥珀酯诱导检测中,发现有 6 个阵列成分信号增强超过 2 倍,测序及数据库比较揭示有 5 个已知的,诱导表达最高的两个是 PCA-1 酪氨酸磷酸酶和核因子- κ B1,有一个是未知的。这 4 个新基因的表达水平均相对较低,仅呈现 2 倍的诱导。Northern 杂交结果证实了微阵列的结果。进一步检测了人的骨髓、脑、前列腺及心脏组织中热休克和琥珀酯调节基因的表达,4 种组织中检测出 15 种热休克和琥珀酯调节基因的表达,其表达水平与 Jurkat 细胞中相应成分的表达水平密切相关如在 4 种组织中表达水平最高的两个基因 β -肌动蛋白和细胞色素 C 氧化酶在 Jurkat 细胞中的表达水平也很高。上述实验提示在缺乏任何序列信息的条件下,微阵列可用于基因发现和基因表达检测。目前,大量人类表达序列标签(ESTs)给 cDNA 微阵列提供了丰富的资源,数据库中 400 000 个 ESTs 代表了所有人类基因,成千上万的 ESTs 微阵列将为人类基因表达研究提供强有力的分析工具。这将大大地加速人类基因组的功能分析。

3.3 DNA 测序^[8,15-18]

人类基因组计划的实施促进了更高效率的、能够自动化操作的测序方法的发展。芯片技术中杂交测序法及邻堆杂交(contiguous stacking hybridization, CSH)技术即是一种新的高效快速测序方法。用含 65 536 个 8 聚寡核苷酸的微阵列,采用 SBH 技术,可测定 200 bp 长 DNA 序列,采用 67 108 864 个 13 个聚寡核苷酸的微阵列,可对数千个碱基长的 DNA 测序。SBH 技术的效率随着微阵列中寡核苷酸数量与长度的增加则提高了微阵列的复杂性,降低了杂交准确性。CSH 技术弥补了 SBH 技术存在的弊端,CSH 技术的应用增加了微阵列中寡核苷酸的有效长度,加强了序列准确性,可进行较长的 DNA 测序。计算机模拟论证了 8 聚寡核苷酸微阵列与 5 聚寡核苷酸 CSH,相当于 13 聚寡核苷酸微阵列的作用,可测定数千个核苷酸长的 DNA 序列^[18]。Dubiley 等^[18]将合成的 10 聚寡核苷酸固定于排列在载片表面的 0.1 mm×0.1 mm×0.02 mm 或 1 mm×1 mm×0.02 mm 聚丙烯酰胺凝胶垫上制备寡核苷酸微阵列,先用分离微阵列(fractionation chips)进行单链 DNA 分离,再用测序微阵列(sequencing chips)分析序列,后者联合采用了 10 聚寡核苷酸微阵列的酶促磷酸化、DNA 杂交及与邻堆的 5 聚寡核苷酸连接等技术。该方法可用于含重复序列及较长序列的 DNA 序列测定及不同基因同源区域的序列比较。

3.4 突变和多态性的检测^[19-24]

SBH 技术可大规模地检测和分析 DNA 的变异及多态性。Guo 等^[19]利用结合在玻璃支持物上的等位基因特异性寡核苷酸(ASOs)微阵列建立了简单快速的基因多态性分析方法。将 ASOs 共价固定于玻璃载片上,采用 PCR 扩增基因组 DNA,其一条引物用荧光素标记,另一条引物用生物素标记,分离两条互补的 DNA 链,将荧光素标记 DNA 链与微阵列杂交,通过荧光扫描检测杂交模式,即可测定 PCR 产物存在的多种多态性,该方法对人的酪氨酸酶基因等 4 个外显子内含有的 5 个单碱基突变进行分析,结果显示单碱基错配与完全匹配的杂交模式非常易于区别。这种方法可快速、定量地获得基因信息。 β -地中海贫血中变异的检测也论证了该方法的有效性和可信性^[22]。Lipshutz 等^[23]采用含 18 495 个寡核苷酸探针的微阵列,对