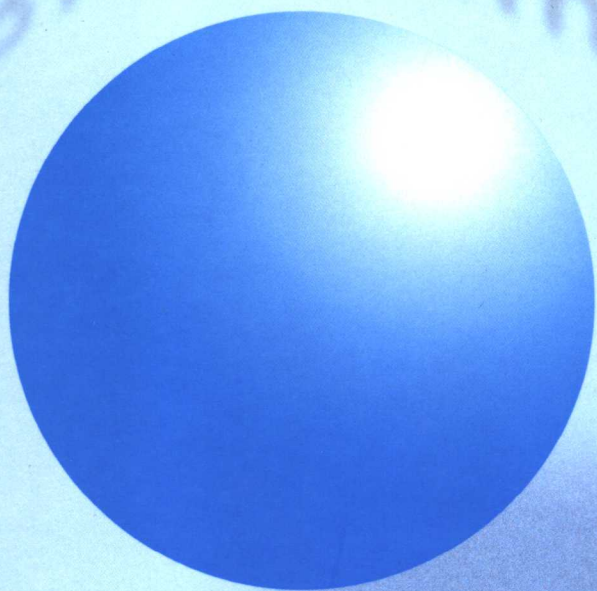



# 新药药物靶标 开发技术

主编 李其翔 张红

Biotechnology

Biotechnology



 高等教育出版社

# 新药药物靶标开发技术

主编 李其翔 张 红



高等教育出版社

## 内容提要

本书介绍了有关工业上药物靶标开发的几种主要新技术,力图从实用的角度来阐明它们的原理,并结合实例来讨论药物靶标的发现和鉴定。这些技术包括反义寡核苷酸、核酶、RNA 干扰、锌指蛋白、DNA 微阵列、蛋白质组学和生物信息学等。除此之外,还讨论了靶标研究在新药开发中的重要作用和促进靶标研究的许多关键因素。本书各章由来自该领域的专家所著,可作为生物医药相关科系研究生的教学选读书,也可用作新药研发人员、制药工业界及生物高科技投资者的实用参考书。

## 图书在版编目(CIP)数据

新药药物靶标开发技术/李其翔,张红主编.—北京:  
高等教育出版社,2006.7  
ISBN 7-04-018953-4

I.新… II.①李…②张… III.药物化学—研究  
IV.R914

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2006)第 043598 号

策划编辑 李冰祥 责任编辑 孙葵葵 封面设计 刘晓翔  
责任绘图 朱 静 版式设计 马静如 责任校对 王效珍  
责任印制 韩 刚

---

出版发行	高等教育出版社	购书热线	010-58581118
社 址	北京市西城区德外大街 4 号	免费咨询	800-810-0598
邮政编码	100011	网 址	<a href="http://www.hep.edu.cn">http://www.hep.edu.cn</a>
总 机	010-58581000		<a href="http://www.hep.com.cn">http://www.hep.com.cn</a>
		网上订购	<a href="http://www.landaco.com">http://www.landaco.com</a>
经 销	蓝色畅想图书发行有限公司		<a href="http://www.landaco.com.cn">http://www.landaco.com.cn</a>
印 刷	北京中科印刷有限公司	畅想教育	<a href="http://www.widedu.com">http://www.widedu.com</a>
开 本	800×1050 1/16	版 次	2006 年 7 月第 1 版
印 张	15.5	印 次	2006 年 7 月第 1 次印刷
字 数	260 000	定 价	38.00 元

---

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题,请到所购图书销售部门联系调换。

版权所有 侵权必究

物料号 18953-00

# 前 言

现代分子生物学对细胞内外分子间相互作用的深入研究，不仅加深了我们对人类生命和正常生理过程的了解，同时还揭示了人类疾病发生的分子机制，使我们有可能寻找到既能防止致病而又没有或较少影响到正常生理过程的新的疾病治疗途径。药物的发展具有随着生物、医学的进展而不断更新的特点，新药的发现和开发正为新一代药物治疗打下基础。现代新药是建立在充分了解药物靶标及作用机制的基础上，即通过调节控制药物靶标的功能而纠正或减缓疾病的病理过程。因此，发现和鉴别出好的靶标是现代新药发现和开发这个高科技、高投入、高风险工程中的一项首要任务。

人类基因组计划的完成以及随后的功能基因组学 (functional genomics)、蛋白质组学 (proteomics)、生物信息学 (bioinformatics) 和系统生物学 (system biology) 的进展为药物靶标的研究提供了许多信息和先进技术。尤其是有关基因沉默 (RNA interference, RNAi)、高通量的基因和蛋白分析的技术等，都为药物靶标的发现和鉴定建立了基础。近 20 年来，很多新的生物技术公司致力于药物靶标开发，成为创立和完善这些技术的先驱者，同时也促进这些技术迅速和广泛地应用在今天的医药工业上。一个理想的药物靶标应具有如下特点：① 药物作用于靶标对疾病治疗的有效性 (efficacy)；② 药物作用于靶标 (中靶, on-target) 后引起的毒副反应小；③ 靶标方便用于筛选药物的可制药性 (druggability)，如细胞表面受体常能被抗体类药物所抑制，而酶可被小分子化合物所抑制。靶标的生物学特性决定了靶标的有效性和中靶毒性，而靶标的生化特性决定了靶标的可制药性。

本书力图从实用的角度来介绍各主要靶标技术的原理，并结合靶标的特点和实例来讨论药物靶标的发现和鉴定。全书共分八章。第一章概述药物靶标的发现和鉴定在新药开发中的作用和目前应用的主要技术及发展方向；第二~四章分别介绍以 RNA 为靶标的技术，包括反义寡核苷酸、核酶及 RNA 干扰技术；第五章描述锌指蛋白在转录水平上调控基因表达的技术；第六章介绍 DNA 微阵列技术及其在药物靶标发现和鉴定上的应

用；第七章介绍蛋白质组学的应用；第八章则讨论生物信息学在药物靶标发现上的应用。各章内均附有图表，章后还提供了参考文献，以帮助读者理解和获得更详细的阅读资料。本书作者均来自药物靶标开发技术领域内的一流公司，均为该领域的专家，如 Affymetrix Inc 是全球最大 DNA 微阵列技术的公司，Applied Biosystems Inc (ABI) 是世界最大的尖端生物科技和设备公司之一，Isis Pharmaceuticals Inc 是全球最大的反义寡核苷酸技术和制药公司，Immusol Inc 是世界上最早开发以核酶和 RNAi 为基础的 Inverse Genomics 技术的公司，Sangamo Biosciences Inc 是全球唯一开发和应用锌指蛋白基因调控技术的公司。他们在建立和开发许多药物靶标相关的技术及平台中作出重要的贡献，具有丰富的实践经验。由于本书讨论的这些技术在理论上和应用上发展很快，因此读者从新近发表的文献中获取更新的信息也是有帮助的。

中国的医药工业正在走向开发自己的新药这一新时代。高等院校、科研机构乃至政府、制药工业和高科技投资者正共同努力促进新医新药发展。作为新药发现的重要一环，基因靶标的发现与开发具有重要的意义。因此，本书的出版有助于国内读者对药物靶标及其相关技术的了解。它不仅可作为生物医药相关科系研究生的教学选读书，也是新药研发人员、制药工业界及生物高科技投资者的实用参考书。

张礼和

2006年1月

# 目 录

<b>第1章 新药的发现与药物靶标开发</b> .....	1
1.1 引言 .....	2
1.2 生物技术制药 .....	3
1.3 基因表达的调控 .....	7
1.4 以基因功能为基础的药物靶标的发现 .....	11
1.5 药物靶标开发技术 .....	13
1.6 新药药物靶标开发的战略决策 .....	17
参考文献 .....	21
<b>第2章 反义寡核苷酸技术和利用反义寡核苷酸技术发现新药</b> .....	23
2.1 引言 .....	24
2.2 反义寡核苷酸的化学修饰 .....	25
2.3 反义寡核苷酸的作用机制 .....	29
2.4 反义寡核苷酸的生物学特性 .....	34
2.5 利用反义寡核苷酸研究基因功能 .....	40
2.6 确定药物靶标的治疗应用价值 .....	45
2.7 结论和展望 .....	56
参考文献 .....	57
<b>第3章 核酶在药物开发上的应用</b> .....	61
3.1 核酶生物学简介 .....	62
3.2 利用核酶作为基因失活的工具 .....	64
3.3 核酶用于药物靶标的验证 .....	70
3.4 利用组合核酶文库发现药物靶标 .....	72
3.5 核酶在治疗上的应用 .....	80
3.6 总结 .....	81
参考文献 .....	81
<b>第4章 RNA干扰在药物开发上的应用</b> .....	85
4.1 RNA干扰的生物学简介 .....	86

4.2 RNAi 作为使哺乳动物细胞基因失活的新工具 .....	93
4.3 RNAi 在医药学研究上的应用 .....	103
4.4 总结 .....	109
参考文献 .....	109
<b>第 5 章 锌指蛋白技术及其在生物医学和药物开发中的应用</b> .....	113
5.1 前言 .....	114
5.2 锌指蛋白生物学 .....	116
5.3 锌指蛋白因子的设计和构建 .....	121
5.4 锌指蛋白技术在生物医学和药物开发中的应用 .....	133
5.5 结论和展望 .....	141
参考文献 .....	142
<b>第 6 章 浅谈微阵列技术的应用</b> .....	149
6.1 概述 .....	150
6.2 微阵列技术原理 .....	151
6.3 微阵列技术的发展 .....	152
6.4 微阵列检测技术 .....	162
6.5 微阵列数据分析简介 .....	163
6.6 微阵列技术的应用 .....	166
6.7 微阵列分析的未来: 个体化医疗 .....	172
参考文献 .....	173
<b>第 7 章 蛋白质组学在药物靶标开发中的应用</b> .....	175
7.1 序言 .....	176
7.2 与蛋白质组学和药物靶标发展相关的技术和仪器 .....	181
7.3 蛋白质组学与药物靶标的开发 .....	184
7.4 蛋白质组学的应用与前景展望 .....	192
参考文献 .....	193
<b>第 8 章 生物信息学在后基因组时代药物研发中的应用</b> .....	195
8.1 导言 .....	196
8.2 基因组学、药物研发与生物信息学 .....	197
8.3 生物信息学应用于药物靶基因的发现和验证 .....	198
8.4 根据蛋白质功能区及其三维结构的预测对药物靶标 进行鉴定 .....	206
8.5 知识产权及专利文件的查询 .....	213

---

8.6 结语 .....	214
参考文献 .....	215
展望 .....	217
常用术语英中对照 .....	222
索引 .....	230



# 新药的发现与药物 靶标开发

## 第 1 章

张 红

1.1 引言	(2)	1.5 药物靶标开发技术	(13)
1.2 生物技术制药	(3)	1.6 新药药物靶标开发的 战略决策	(17)
1.3 基因表达的调控	(7)	参考文献	(21)
1.4 以基因功能为基础的 药物靶标的发现	(11)		

## 1.1 引言

药物靶标是指正常或异常细胞中具有重要功能而可作为药物应用的分子。药物靶标虽然通常以基因名相称,但可以是基因表达的任何形式,如DNA、RNA或蛋白。药物靶标开发包括确定基因顺序和变化、表达产物分子的功能、表达的调节和控制、相关的组织细胞特异性以及确定靶标有效性和获取靶标技术等。随着人类基因组计划测序的完成和科学技术的迅速发展,从基因及其产物的序列、变异、结构、表达、调控、激活、结合物、功能和信号传导等各个方面入手寻找药物靶标,并继而利用现代技术开发新药,已获得了广泛的应用。随着工业技术的发展,寻找药物靶标已成为新药开发的关键产业环节。这一高密度资金和高技术投入通常是由工业界而非单由学术界来完成的。小的生物技术公司一般研究开发数个药物靶标分子,而国际性大制药公司往往同时研究开发几十个甚至上百个药物靶标分子,投资规模从数百万美元到每年数亿美元。这一关键产业环节为有效利用现代科学、医学和技术来开发新药提供了源泉,为新药开发和风险投资的有机结合提供了平台,也为新药的商业化提供了完整的知识产权构架。当一些药物的靶标被人们所认知时,其相关开发药物的应用可能早已经成为密集专利保护的价值千万至上亿美元的知识产品。这一产业环节已成为现代生物医药可持续发展的战略关键。

采用新的、快速和大批量的获取药物靶标技术,从而保证今后获取更多新药的商业利润份额,已成为各大国际性制药公司投资的重点。各大公司都已采用至少一种乃至数种药物靶标技术。在基因表达调控领域里,很多公司都应用了新的技术,如基因芯片技术、反义寡核苷酸技术、转基因技术、锌指蛋白技术、核酶技术等,近年来同时又采纳了核糖核酸干扰等技术。这些技术正被用来快速和大批量地获取新药物靶标,其技术自身也日趋成熟,互相补充,并已成为多用途的新药物开发的中上游高技术产业化平台。这种以靶标开发新药的策略已开始显现成效。以美国食品和药品管理局审核的临床试验药物为例,在过去的5年中,由各生物技术制药公司开发的药物已从6%迅速增长到36%。仅单克隆抗体药物,在2000年就有21亿美元的销售额。第一个针对药物靶标设计开发的药物Gleevec(为阻止Bcr-Abl酪氨酸激酶的磷酸化激活,用于治疗慢性髓样粒细胞白血病的新药)也已

于 2001 年进入市场,其在 2003 年销售额已达到 11 亿美元。

药物靶标技术产业化应用是直接针对整个医药产品市场的,个别实验室和公司的零星应用在速度和规模上无法使药物靶标开发在战略上占领高度,势必影响到新医药产品的开发,影响到知识产权产品的开发,影响到特有生物医药资源的有效和深度利用。构建新医药产品开发的上中游高技术产业化平台是中国制药工业现代化的关键之一。但是利用生物科技来发现和开发新药相对于传统的药物开发有何特点,其主要技术的特点是什么,利用生物科技来发现和开发新药在治疗疾病上的特点、在审批管理上的特点、在全球化的经济中我国利用生物科技在新药药物靶标领域内的发展机遇和优势等问题,都值得深入探讨。

本书将主要介绍新药药物靶标开发在当今生物制药产业界的位置,系统地描述新药药物靶标开发的一些已经产业化应用的主要技术,包括反义寡核苷酸技术、核糖核酸干扰技术、核酶技术、锌指蛋白技术、寡核苷酸芯片技术以及相关的生物信息技术和蛋白质组学技术,并举例介绍各技术在新药药物靶标开发的实例。

## 1.2 生物技术制药

有史以来,药物的发现和应用是基于人类的经验。随着化学的发展,某些有生物活性的化学结构逐渐被人们所认识,因而大部分经典药物的发现和开发致力于化学结构的改造和发现新的具有生物活性的化学结构,制药技术也主要限于大量获取和化学制备特定的药物化合物。但是近数十年来,药物的发现、研究、开发和制药等各阶段发生了巨大的变化,引入了越来越多的生物概念、方法和技术。例如,随着 DNA 克隆和基因表达技术的突破,用基因工程方法可产生大量的具有治疗活性的生物因子。促红细胞生成素就是一个成功的范例,从而利用 DNA 重组克隆和工程菌株表达修饰的技术来制药获得了广泛的应用。再比如,单克隆抗体技术自从 1981 年第一次被批准应用于临床诊断以来,经过不断的技术改造,现已有 14 个药物被批准,其 2005 年总销售预测额超过 80 亿美元。目前应用单克隆抗体技术的药物靶标范围在不断扩大,治疗的疾病已超过 10 种,有近 10 个单克隆抗体药物的开发已进展到临床 III 期试验阶段。其他与生物紧密相关的技术,如核苷和核苷酸类似物化学、组合化学技术、天然产物活性分子、活性多肽

分子、小分子技术、反义寡核苷酸技术、基因治疗技术等,都被广泛地应用于制药,并且已逐渐成为成熟的制药产业技术。就药物的发现、开发过程和其生产方法而言,这些技术已逐渐脱离依赖于某些具有生物活性的化学结构来开发新药的模式,进而发展为直接针对药物靶标,充分利用生物技术的特点,并结合药物化学来开发新药。

### 1.2.1 高科技条件下新药物的发现和开发

随着人类基因组计划的进行、基因功能的发现、生命科学的突破以及技术的不断发展,医药学已进入分子时代,分子医学的概念也已提出。例如,1994年 Jeffrey Friedman 发现瘦素(leptin)是一个人脑对脂肪反应的关键的调节因子。之后,对与肥胖及饮食有关的细胞内信号调节分子的研究有了长足进展。肠道和脂肪等器官组织与脑的信号联系也被勾画出来。对于热量摄入和能量消耗,脂肪、肌肉、肝、脑等组织内的信号通路,以及这些器官组织间信号的互相调节关系的研究迅速地进入分子水平。寻找相关基因功能、基因突变和细胞信号通路的异常以及对肥胖与脂质代谢、心血管疾病、糖尿病、肿瘤等之间关系方面的研究,为肥胖及其相关疾病的预防与治疗提供了基础。

生命科学研究的不断发现和突破与技术的发展是不可分割的。从手工 DNA 测定序列到大规模自动测序,从单个基因及其 RNA 和蛋白质分析到基因芯片和蛋白质组学,从基因载体、基因抑制剂到转基因动物,从细胞培养到干细胞功能和组织工程,乃至生物计算机信息学和数据库以及其他多学科交叉结合,生物测试技术、分析仪器和试剂的产业化和商业化等,无一不对促进生命科学的研究发展作出贡献。分子医学领域内的科学技术发展同样也改变了新药的发现和开发,这种改变的形成是由于生命科学发现和生物技术发展的促进和要求的双重作用。一方面生命科学新的发现使人们对疾病有了更深入的了解,也为新药的研究开辟了新的领域;另一方面也对新药的开提出了更高的要求。

高科技条件下的药物开发已与传统制药有本质的不同,其中对药物靶标的开发是最显著的特征。由于药物靶标贯穿于药物开发的整个过程,新的药物将为个性化治疗及药物的高疗效提供可能。同时,高科技条件下的药物开发已成为一个战略性的布局。在科学上,它要尽可能利用当代科学研究的新发现,来回答当代科学所能提出的问题;在技术上,它需尽可能利用当代技术的突破,来解决当代技术所能解决的问题;在产业组合和管理机制上,则须符合当代投资人对中远期而非近期的利益目标。所以,高科技条

件下药物开发的最主要特征就是,药物必须是针对某个与疾病有关的在分子水平的生物过程,即在药物的治疗原理和作用上必须符合与疾病有关的分子病理,包括药物靶标的寻找和确认以及分子药理试验等,而这一部分在传统制药中并不需要。其次,现代新药发现和开发往往会要求有效地利用现代技术手段来解答药物开发中的上、中和下游的所有问题。其三,由于在新药开发中的大量投入,知识产权的建立和风险投资及其运作机制贯穿其中。

药物发现与药物靶标开发的模式见图 1.1。

### 1.2.2 药物靶标和生物技术制药

显而易见,生物技术制药的关注点已从传统的药物化学结构上转移到药物的靶标上。传统制药主要关注某些化合物与一定疾病相关生物表象之间的关系。这种模式随着技术的不断发展,近年来已发展到高通量地直接筛选化合物库,如利用化学合成技术造成含有几万个乃至几百万个不同化合物的组合化学库,从中筛选出有生物活性的药物分子。近年来,随着基因组学的发展,人们发现至今所有开发成功的药物所针对的只有 400~500 个基因。这与人类所有的 20 000~30 000 个基因,加上它们的不同调节版本,近 100 000 个基因的潜在功能相比,显然还有许多基因可供作为药物应用来发掘。同时,生命科学突飞猛进发展所带来的对生命现象的新认识使人们相信,直接针对基因及其产物在决定生命和疾病相关现象中的功能进行筛选,可有效地获得对于新药开发具有重要价值的药物靶标。

药物靶标的发现和开发已成为生物制药的最大特点。随着药物靶标技术产业化发展,靶标的开发已成为与生物制药技术相对独立的环节。其位于新药发现与开发的上游,为不同的生物制药技术提供了源泉,同时它与生物制药开发技术又密切相关,在确定药物靶标的同时就需根据该靶标的特点而选择合适的生物制药开发技术。例如,可利用开发好的药物靶标来筛选中草药中的有效活性分子(中药现代化的一个途径)或筛选组合化学库中的有效活性分子。再例如,对某些急性疾病的靶标可考虑采用小分子制药的技术针对疾病的靶标蛋白,而对某些慢性疾病则可考虑采用调控基因表达水平的制药技术。

各种不同生物制药技术各有其特点,目前也各有其主要应用限制。例如,小分子技术主要需解决靶标空间结构数据的获取和靶标空间结构的特异性问题,核苷和核苷酸类似物技术则需解决细胞利用度、毒性和抗药性的局限问题,单克隆抗体技术还需降低人体免疫反应程度和生产成本,反义寡

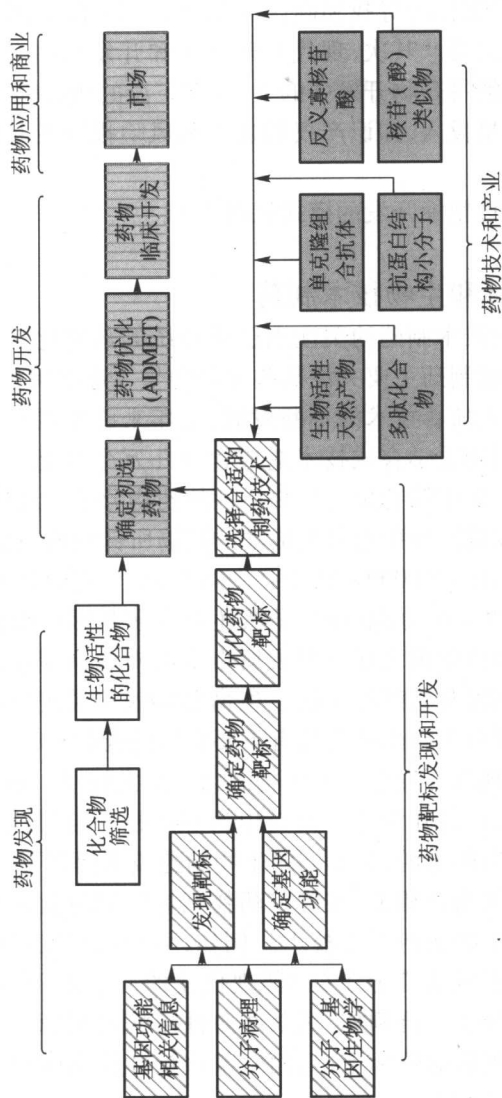


图1.1 药物发现与药物靶标开发

核苷酸技术需在脏器分布和口服性上有所突破,基因治疗技术则需解决载体构建和潜在毒性的问题。所以从开发角度来说,这些不同技术也带来了药物开发下游的新课题,如毒性、吸收、分布、稳定性、代谢乃至大量生产工艺、质量控制等。但是,这些生物制药技术会随着药物的开发应用而不断解决自身问题,逐步成熟,互相补充,成为新药开发的支柱产业。

## 1.3 基因表达的调控

编码在 DNA 中的基因须经过表达而最终实现其功能。基因表达通常指基因编码产物(RNA 和蛋白)的量,但广义地讲,表达还包括了基因的功能。基因表达的调控则是指对基因编码产物的量、形式、活性、位置乃至功能的调节控制。除了通常在 RNA 合成、蛋白翻译、蛋白修饰水平上的调节,近几年来,基因表达的调控被发现具有更广泛和更复杂的形式。这些不同水平上的多形式的调节使得药物靶标以及各种靶标技术具有更广泛的应用空间,但同时同时对靶标发现和开发提出了更高的要求。

### 1.3.1 基因表达调节的形式

人类仅有 3 万个基因,却能产生 100 000 种蛋白,这就主要与基因在 RNA 水平上的剪(编)接(alternative processing)有关。40% ~ 60% 的人类基因有两种以上不同的 RNA 版本,这是通过对 pre-mRNA 选择性拼接(alternative splicing)和选择性多聚腺苷酸化(alternative polyadenylation)转录后加工而产生的。而某些 mRNA 在转录完后还可进行单个碱基的编辑(mRNA editing),从而生成不同版本的蛋白。

例如,Myd88 在 IL-1 和 TLR 介导的炎症反应中起着重要作用。去除 Myd88 基因的细胞和动物可减低对 IL-1 和炎症总体反应程度,Myd88 表达缺陷的高血脂小鼠较少发生血管硬化症。然而,Myd88 基因含有 5 个外显子,已发现的不含外显子 2 的剪接版本 Myd88s 仍可与 IL-1 受体以及 IL-1 受体相关激酶(IRAK)相结合,但无法导致 IRAK 的磷酸化,致使无法最后活化核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)而引起炎症细胞因子的表达和释放。Myd88s 为 Myd88 反向调节起到平衡作用,因此,Myd88 的剪接版本的缺陷将会导致人体对细菌 LPS 的耐受性产生变化。

再例如,Apo B(apolipoprotein B)是低密度脂蛋白(LDL)中的主要结构

蛋白,它在脂肪的代谢及三酰甘油和胆固醇的运输上扮演着重要角色。血中 Apo B 浓度上升会明显增加冠状动脉硬化的危险几率,临床上常利用 Apo B/Apo A1 的比值来评估冠状动脉硬化的程度。但 Apo B 却会通过脱氨基酶进行 mRNA C 到 U 编辑,使翻译终止位点提前,而生成一个分子量较小、寿命较短,因而较少导致动脉粥样硬化的蛋白 Apo B48。Apo B mRNA 的编辑还明显带有生物种和组织的特异性。人 Apo B mRNA 的编辑发生在肠,但不在肝;而血中 LDL 很低的生物种(如马、狗或兔)的这一 mRNA 编辑除发生在肠,还发生在肝。更为复杂的是,Apo B mRNA C 到 U 的编辑是由一酶复合体(editosome)催化完成的,该酶复合体含有胞嘧啶脱氨基酶(APOBEC-1)和一个 mRNA 结合蛋白 APOBEC-1 补偿因子(ACF, auxiliary protein)。鼠的 ACF 基因由 12 个外显子组成,其启动子区具有多个 SP1 转录因子的结合位点,可使用多个位点起始转录。已发现有两个通过 pre-mRNA 选择性拼接和选择性多聚腺苷酸化产生的 ACF mRNA 版本(ACF45 和 ACF43)。实验表明,当鼠禁食时,ACF45 和 ACF43 的表达量相对于 ACF 增加,而同时 Apo B mRNA C 到 U 的编辑活动明显减少。当鼠恢复喂食时,这些不同 ACF 相对表达量又逆转。说明这些通过选择性拼接等方式产生的不同 ACF mRNA 版本的产物虽不一定会取代 ACF 的功能,但对 ACF 功能起着有效的调节作用。可见针对一个生物学功能,仅以 RNA 的不同调节方式以及多层次的调控关系,便使得基因的调控变得复杂而及其精密。在这些 RNA 的不同调节方式的过程中出现任何问题,将在冠状动脉硬化化疾病的分子病理机制上产生重要影响。

生物的某些功能在蛋白水平上的调控亦是非常广泛的。例如,HIF1 是一个参与调节体内供氧的转录因子。在常氧情况下,细胞内表达的 HIF1 经泛素途径(ubiquitin pathway)与泛素蛋白形成泛素偶联复合体,最终经由蛋白酶体(proteasome)而被快速降解。HIF1 的翻译生成和降解之间形成平衡。但在缺氧情况下,HIF1 与 mRNA 结合并被转运到细胞核内与 DNA 调控区结合,转录表达促进供氧等的基因,如血管内皮细胞生长因子(VEGF)和促红细胞生长素(erythropoietin,EPO)等。此时,HIF1 的结合使 HIF1 更稳定,细胞核内 HIF1 蛋白量明显增多。但是,在恢复常氧条件的数分钟内,HIF1 蛋白量又迅速明显减少,而在此过程中 HIF1-mRNA 的量则维持恒定。说明 HIF1 的生物调节作用是在蛋白质水平上的。p53 是一个转录因子,其功能与细胞凋亡、增殖及 DNA 修复有关。约 50% 人的肿瘤具有某种 p53 变异,而调节 p53 表达量的也正是经由蛋白酶体降解的蛋白水平上的调控。

近年来,一种非编码的微小 RNA(microRNA, miRNA)被发现对基因表



达具有重要调节功能。这种小分子 RNA (pre-microRNA) 是由真核生物自身编码的, 由其细胞内的特殊机制剪切为一类长度为 20 ~ 25 nt 的短的双链 RNA。已知其中的负链(miRNA) 可通过序列互补性与它们的靶 mRNA 相结合, 阻碍蛋白的翻译, 从而抑制靶基因的表达。miRNA 抑制靶基因表达的调节机制已在发育生物学中对不同基因的利用中得到了充分证实。有趣的是, 不少病毒被发现会利用这种调节方式来控制宿主的基因表达, 从而帮助病毒复制和生存。如 SV40 病毒编码两个 miRNA, 其中之一证实会与 SV40 早期病毒 RNA 互补结合, 造成 T 抗原 RNA 模板降解而表达减少, 但这并不影响病毒的产量。经与无 miRNA 的变异 SV40 比较, 这个 miRNA 的表达使得宿主 T 细胞对 SV40 病毒的杀伤力减弱, 并产生较少的细胞介素, 以利于病毒在宿主细胞内复制。已发现 EBV 编码 5 个 miRNA, HIV 可能也编码 5 个 miRNA。据信 HCV 虽没有编码病毒 miRNA, 但却是利用宿主细胞的 miRNA 帮助病毒感染和复制。目前已发现了近 700 个 miRNA。根据与 miRNA 互补 mRNA 的 3' 末端序列分析推测, 大约有一分之一的 mRNA 的表达会受到 miRNA 的调节作用。

还有一种基因表达调节方式称为 DNA 甲基化(DNA methylation)。哺乳动物 DNA 中普遍存在 DNA 甲基化修饰, 由 DNA 甲基转移酶催化完成, 如染色质局部的甲基修饰达到一定程度可使局部的基因被打开转录。DNA 甲基化是细胞关闭基因表达的一种方式。例如, 细胞可以借甲基化程度的高低来调控组织专一性基因的表达, 甲基化程度越高, 基因就越“沉默”(silence), 反之则否。DNA 甲基化对细胞正常发育、基因表达方式以及基因组稳定性起着至关重要的作用。近年来引起广为关注的是一种基因外特别是启动子的修饰(epigenetic regulation)。全基因组低甲基化而启动子原未甲基化的 CpG 变为高甲基化是人类肿瘤中普遍存在的现象。CpG 二核苷酸中的胞嘧啶第 5 位碳原子被高甲基化可导致许多抑癌基因(tumor suppressor gene)失活。如此, 癌细胞通过抑制抑癌基因就可以有效地关闭大批与抑癌作用有关基因的表达, 起到促进癌细胞生长的作用。甲基化的调节也可作用于蛋白, 如对染色质组蛋白的甲基化调节基因表达的作用。但最近发现, 同样的一个组蛋白甲基化酶也可相对特异性地甲基化肿瘤抑制蛋白 p53。甲基化发生在 p53 C-末端调控区的赖氨酸, 而该调控区还集中了许多其他蛋白修饰调控的位点, 如磷酸化、乙酰化位点等。这预示着各种蛋白修饰有可能互相作用共同影响 p53 的功能。经甲基化的 p53 稳定性增加, 其转录下游基因的活性也增加。

基因表达调控的方式是多种多样的, 本节只列举了有限的例子。例如,