

# 治疗药剂的新纪元——微生物生产人体蛋白质的进展<sup>1)</sup>

诺威尔·斯特宾

(美国旧金山 Genentech, Inc.)

很早以前,人们就开始用天然物质治疗疾病,尤其在中国,中草药的应用已有悠久的历史。表面上看来,西医具有不同的特点,因为其兴趣在于使用合成的化合物。然而,西医发明的很多治疗药物,也往往起源于对天然化合物的研究<sup>[1]</sup>。一般地说药物的效力在于它们能提高人体的抗病力,或者防止病原体的生长而又不伤害人体。当药物的作用类似于人体内产生的物质时,人体天然的防御力可能会增强。因此,对天然物质本身的使用是医学的一个具有重要意义目标。

近年来,重组 DNA 或基因拼接的研究已经为生产有效的人体蛋白质提供了新的方法,这就是将编码蛋白质的基因拼接细菌或其它微生物内能正常复制的 DNA 中。用这种方法通过发酵可以获得大量的人体蛋白质。另外,这些新方法也有助于鉴别和鉴定天然生产的药剂,因而,就今后可能会用于医学的天然药物的生产而言,现在已经有了新的很有效的方法了。本文综述最近的工作,目的是为了阐明有关问题的实质

和解决它们的方法。

## (一) 基因拼接技术

像酶、血液中的各种因子和激素这样一些有生物活性的蛋白质的结构,都是由以线性形式排列在染色体上的基因分别决定的。构成基因 DNA 的 4 个碱基的线性排列决定着蛋白质中氨基酸的线性排列。一个外来的基因如果组装在质粒 DNA 内的合适部位,就能大量地合成由该基因编码的蛋白质。这很容易,只要把新的基因放入通常控制细菌基因表达的 DNA 区域内就能实现。质粒是特别有用的载体,因为它们是比较小的 DNA,而且对它们的特性已有很好的了解。首先插入质粒的基因必须是以甲硫氨酸的密码子 AuG 为起点(所有的细菌蛋白质都起始于此)。第二,凡易于被控制的细菌基因,像那些合成  $\beta$ -半乳糖苷酶和色氨酸的基因,都可以被组装到重组的质粒上。通过这些步骤,外来基因的表达能像其它的细菌蛋白质一样受到调控,各种有关的过程,包括细菌中蛋白质的

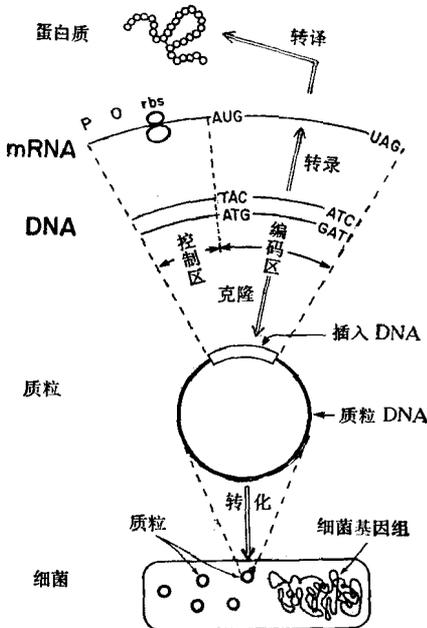


图 1 在细菌操纵子控制下,一个外来基因在 *E. coli* 中克隆并表达的主要步骤及物质

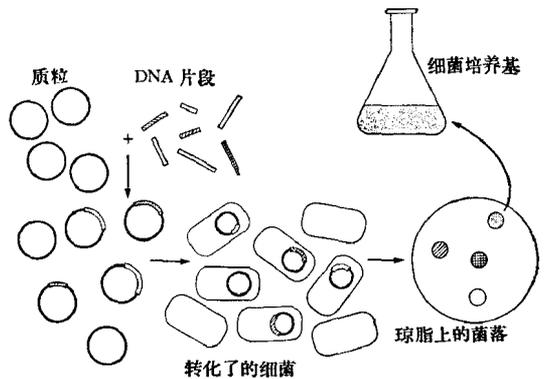


图 2 克隆化的细节

DNA 片段重组入质粒 DNA 后,它们用于转化细菌,只有那些从琼脂皿上挑选出来的个别细菌的菌落方能转化,它们在培养瓶中生长,插入的基因就被鉴定出来。

Nowell Stebbing: A New Era of Therapeutic Agents: Progress in Production of Human Proteins in Micro-organisms

1) 本文由蔺耀青、周震仙、朱立煌等同志整理。



待于进一步研究。但是用基因拼接技术进行的研究工作正在揭示这一问题的解决办法。

## (二) 最新成就

目前克隆基因已成为广泛应用的研究方法。但是,使基因表达以产生有效量的蛋白质,则要困难得多。迄今为止,在微生物中已能有效地表达的有:生长激素释放抑制因子(somatostatin)<sup>[2]</sup>、胰岛素<sup>[3]</sup>、胸腺激素、胸腺素(thymosin  $\alpha_1$ )<sup>[4]</sup>、人的生长激素<sup>[5]</sup>、各种干扰素<sup>[6-8]</sup>、牛的生长激素以及口蹄疫病毒的抗原肽。还有很多其它物质正处于研究的不同阶段。有时在微生物中制造的真核生物的蛋白质,不一定与原来的完全一样。因此,对上述的各种蛋白质的生物学活性进行检验是非常重要的。现以人的生长激素为例,它的结构如图3所示。为了使人的生长激素基因在细菌质粒中能正确地启动和表达,可用人垂体的 mRNA 为模板,经反向转录成互补的 DNA 而获得该基因的大部分序列。由于在该基因 DNA 的第 23 及 24 位氨基酸的密码子之间发现了一个限制酶 *Hae* III 的切点。因此用化学方法可以合成编码这前 24 个氨基酸的 DNA 片段,并且使这种片段的一端含有 *Hae* III 的粘性末端,另一端则包含 *Eco*RI 识别的位点和在其后的是甲硫氨酸起始密码子。互补 DNA 和合成的 DNA 片段因为都具有 *Hae* III 的粘端,所以能连接成一个完整的基因。然后将这种基因克隆到适当的质粒上,使人类生长激素在 Lac(乳糖操纵子)控制之下直接表达<sup>[9]</sup>。

人的生长激素是一种比较大的蛋白质,含有 191 个氨基酸,其中包括 2 个二硫键(图 3)。由细菌生产的这种生长激素有一个额外的氨基末端氨基酸<sup>[9]</sup>。这是因为细菌的起始甲硫氨酸在合成后并未去掉。可能的原因是通常用来除去末端甲硫氨酸的酶系统不能满足这种基因高效表达的要求。

从细菌获得的人生长激素的生物活性可以用经外科手术已摘除垂体的大鼠进行检测<sup>[9]</sup>。图 4 中有关剂量-效应的资料表明,来自细菌和垂体的两种生长激素的制剂具有相同的效能。不施用激素时,这些大鼠根本不生长。因此,这种在细菌中产生的人类蛋白质是有生物活性的,值得注意的是,这两种(分别由人的垂体和细菌制备的)激素制剂的混合物也具有同样的效能。这说明垂体产生的人生长激素的生长促进作用,只能归诸于人生长激素这一种激素。因此,存在于垂体生长激素制剂中的其它已知的生物活性蛋白质,如:促滤泡素、促甲状腺素、促黄体生成激素及催乳激素,都没有促进生长的作用。

这项工作还有第二个有趣的结果。从人类生长激素基因的编码顺序推测的氨基酸顺序与经蛋白质顺序分析获得的氨基酸顺序有 3 个氨基酸之差,即第 74、107 和 109 位的氨基酸<sup>[5]</sup>。现在用基因拼接法获得 DNA 再从 DNA 解读蛋白质顺序的方法,比直接测定

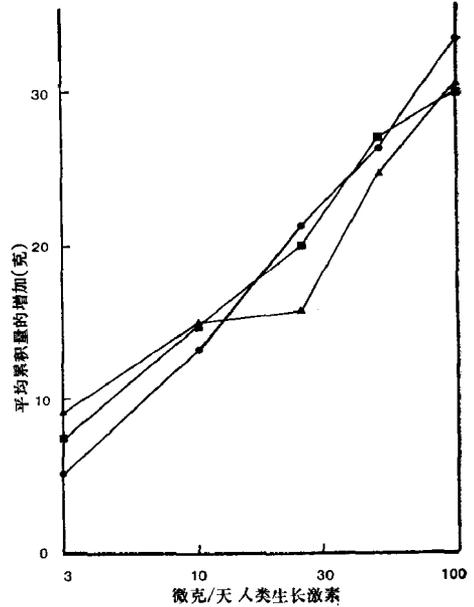


图 4 用人类生长激素处理切除垂体的大鼠的剂量-效应曲线

●表示生物合成的人类生长激素; ▲表示垂体人类生长激素; ■表示 1:1 混合物。

	s	b	λ
▲	4.89	14.8	0.331
■	3.74	17.6	0.212
●	4.74	16.8	0.282

每组 6 只大鼠的各实验组每天腹腔注射,共 12 天  
(据 Stebbing 等的工作复制<sup>[9]</sup>)。

蛋白质顺序更为迅速和准确。因为两条 DNA 的链都可用来解读,从而验证顺序的正确性。

在基因拼接法用于克隆基因前,干扰素的结构是未知的。克隆工作从分离 mRNA 开始,按前述的人类生长激素相同的方法进行。这方面的工作已经证明人类白细胞干扰素具有一系列亚型,然而,在所有的亚型中,半胱氨酸是成熟蛋白质的第一个氨基酸;而且在各种亚型的基因中,在半胱氨酸与下一个氨基酸的密码子之间,都有一个限制酶 (*Sau*3a) 的识别位点。因此和克隆人生长激素的基因一样,只要再用化学方法合成一个 DNA 片段就能使干扰素基因在大肠杆菌中直接表达,不过就白细胞干扰素而言,这个合成的片段只须包含一个 *Eco*RI 的识别顺序,继之以甲硫氨酸及半胱氨酸的密码子再加上一个 *Sau*3a 的粘性末端就够长了<sup>[7]</sup>。

所有的白细胞干扰素都具有 165 个或 166 个氨基酸,而且在所有不同的亚型中,74% 的氨基酸顺序是一致的<sup>[7]</sup>。图 5 显示的是一种人白细胞干扰素的结构。早在 24 年前就已知干扰素的存在了,但只是到最近才能制备足够纯度的物质以测定其结构。正是基因



图5 一种人类白细胞干扰素亚型 LeIF-A 的结构<sup>[10]</sup>

此干扰素亚型含有 165 个氨基酸残基以及 4 个半胱氨酸，后者形成两个二硫键。对高度纯化的制剂的分析表明，约一半的分子仍保持起始甲硫氨酸残基（它是在 *E. coli* 中合成期间未完全去除所造成的）（据 Wetzcel 等工作<sup>[10]</sup>）。

拼接技术解决了这个问题，并能产生大量的干扰素。用这种方法生产的干扰素已经在几个测试系统中被证明是具有生物活性的。如图 5 所示的这种亚型以及克隆的其它亚型可使猴子抗致死的实验室病毒感染<sup>[7]</sup>，也能使兔子抗疱疹病毒感染<sup>[11]</sup>，而且在不同的实验动物模型中，显示了它们的抗癌效应<sup>[12]</sup>。天然的白细胞干扰素制剂是若干亚型的混合物，其中 8 种已被鉴定<sup>[7]</sup>。因此，测定纯化了的每种亚型的活性，并与天然混合物进行比较，是很重要的。很可能每一种亚型在不同的疾病中会有其独特的用途。

这里介绍的研究工作为大家提供了基因拼接技术的概貌。这些方法还只有几年的历史，但是已有 3 种产物正在美国进行广泛的临床实验：人的胰岛素、生长激素和白细胞干扰素的一种亚型——白细胞干扰素 A (LeIF-A)。

### (三) 展望

还有很多其它的人体蛋白质能用基因拼接法生产。生产像白蛋白和因子 VIII 这样一些血液的成份也是可能的。制备因子 VIII 基因面临的现实困难是它的结构复杂，以及不知道其 mRNA 的组织来源。其它的疫苗也可能用基因拼接技术制备。这些新型的疫

苗由于能避免病毒 RNA 或 DNA 的副作用，可能是非常有用的。除了人的生长激素以外，其它许多激素也可以按此法制备。因而，它们在医学上可能有广泛的应用价值。我们已着手开始研究许多新的多肽，它们在代谢的调节中似乎有重要的作用。淋巴细胞活素和单核细胞活素是由免疫系统的细胞（淋巴细胞和单核细胞）产生的，似乎能调控免疫反应。诸如移动抑制因子和淋巴细胞毒素这类因子的结构及其用处目前尚未阐明，但看来有可能用来治疗癌症。胸腺也能产生很多修饰免疫反应的蛋白质<sup>[13]</sup>，这些蛋白质的特性现在正在研究之中。基因拼接能提供测定这些物质的结构和它们的作用方式的手段，同时也能大量地生产这些物质以满足临床研究的需要。

要使一种人类蛋白质在微生物体内成功地克隆和表达，在战略上的要求首先取决于是否已经搞清这种蛋白质的结构。对未知结构的蛋白质，必须从 mRNA 反向转录成互补的 DNA，然后再克隆。然而，在人的生长激素及干扰素的基因克隆时所使用的战略是将合成的 DNA 与反向转录的 DNA 组合在一起，这是非常有效的。至于肽链内部没有甲硫氨酸的蛋白质，无需

(下转第 47 页右栏)

染色体而产生的。但同时，两个种的基因组之间易位的情况可能业已发生。要用细胞学方法分析 *H. vulgare* 的染色体结构是很困难的，但我们所得到的这些个体的染色体有很多比正常个体的染色体大些或小些。经过筛选，从这些个体中发现很多表现出我们所关心的、来自 *H. jubatum* 的特性，如抗盐、抗杂草、抗病等。有一些个体还出现了 *H. jubatum* 特有的、*H. vulgare* 通常没有的同功酶谱带。这样，我们从形态上和生物化学方面都证明了 *H. jubatum* 的特性转入了 *H. vulgare*。这些植株在染色体加倍后即可用于育种实践。我们现在已经得到了 3000 株从杂种 F<sub>1</sub> 组织培养来的、象 *H. vulgare* 的植株，其中一些正在密执安州立大学被用于育种工作中。在上述实验中，我们还可以用一些诱变处理来增加组织培养中细胞的染色体数目及结构的变异，这些诱变因素包括  $\gamma$ -射线、紫外线、5-溴脱氧尿嘧啶核苷、丝裂霉素 C 等。

4. 其它 我想再介绍一个我的实验室现在刚刚完成的工作，借以说明在病原物不分泌毒素的情况下植物抗病性的选择问题。

用单倍体烟草为材料，有关的病害是烟草黑胫病 (*Phytophthora parasitica*)。由于 *P. parasitica* 不产生毒素，所以普通抗毒素选择方法不适用。我们的办法是从病原物的突变选择入手。我们筛选了很多 *P. para-*  
(上接第 44 页)

所以，我认为对医学院学生而言，遗传学的教学应该有 3 个阶段：(1) 中学阶段，了解生物界遗传变异的现象和基本概念；(2) 医学院校一年级医用生物学中讲授以医学为中心的遗传学内容；(3) 高年级应开设以遗传性疾病为中心的医学遗传学(临床遗传学)。

目前开课是否有困难？综观目前国内各医学院校中从事遗传学教学和研究的教研室并不少，人数虽不很够，但开课还是有条件的。我建议各医学院校，目前可以组织有关教师或临床医师，先以“医学遗传学”讲座的形式讲授十几个专题，每次 2 学时，这样总学时数可约为 40 学时左右。妥否，供研究。

附表：美国部分医学院校讲授“医学遗传学”的课时

Arkansas U.	19
Yale U.	18+9*=27
Howard U.	45
U. Georgia	10
Morehead U.	15+10*=25
U. Illinois	16
St. Louis U.	33
Washington U.	36
U. Rochester	31+11*=42
Duke U.	18+11*=29
U. Mississippi	23+ 1*=24

\* 实验课或讨论课时数。

*sitica* 的温度敏感型突变体，它们在较低温度下 (22°C) 可以生长，在较高温度 (28°C) 下不生长。在一般情况下，如果把易感病植株的细胞培养在含有致病真菌孢子或菌丝的培养基中，因病菌生长太快，不久便完全掩盖了植物细胞，这样得不到抗性突变体。我们的做法是：将新鲜植物细胞群体与温度敏感型病菌混在一起，在较低温度 (22°C) 下培养两天半。这期间易感病的细胞将受到侵染并被杀死，抗性细胞则不受感染。此后把温度提高到 28°C，真菌就停止生长了，未感染的细胞活着并继续生长，形成愈伤组织并最终再生植株。这样，我们通过利用温度敏感型病原真菌突变体，较好地控制了培养皿中病原菌的生长，得到了抗病细胞系。用这种方法已选出一些植株，它们对 *P. parasitica* 的抗性增加了。

总之，筛选抗病性的方法很多，但最重要的是要有一个能够选择所需要的细胞的体系。

在植物病理方面有很多利用新技术的例子，在其它方面都不是那么成功，我认为原因之一是，植物对病害的反应是由一个或很少数的基因控制的，而且这种反应的方式很简明：抗病或易感染，或正或负。其它一些重要农业性状，如产量、抗旱性、抗盐性等，就不是这样，因此应用新技术就较困难些。

(陈之征根据 Peter S. Carlson 讲话录音整理)

(上接第 42 页)

采取这种直接表达的方式，可先使细菌产生细菌和人的融合蛋白质，然后再用溴化氰切割这种融合蛋白质，从而获得所需要的人体蛋白，如同胸腺素  $\alpha_1$  那样<sup>[4]</sup>。在这种情况下，天然的、氨基末端乙酰化的产物在最后一步是用化学方法得到的<sup>[4]</sup>。然而，其它的修饰，如糖基化，都比较困难，在克隆时需以真核细胞为宿主。蛋白质产物的大小也是一个关键；小的蛋白质常常在细菌中降解，不过这可以借产生一个较大的融合的前体蛋白来解决，这一措施对胸腺素  $\alpha_1$  是很有效的<sup>[4]</sup>。如果基因没有内含子顺序，克隆则可以从基因 DNA 的加工开始。这对于干扰素也是适用的，虽然在最初的克隆工作成功以前并未发现它们缺乏内含子。

临床应用新的生物活性肽也会提供新的研究课题。胰岛素及生长激素的使用，显然是根据过去的临床工作，而且由它们的重组 DNA 衍生的物质与天然物质是同样的或者是非常相似的。但很多由重组 DNA 产生的新的治疗药剂则不是这种情况。不过，基因拼接技术将为药理学问题提供解决方法。添加额外的肽的片段是很容易做到的，通过这条途径能将需要的药物性质赋予有生物活性的蛋白质，如阻滞血液对药物的清除能力或使药物趋向于需要的靶组织上。

因此不难看出，基因拼接技术为什么对治疗药剂的生产是很有前途的，它提供了发现新的天然药剂结构的方法，并使之能大量生产。