

“10 ~ 23”型脱氧核酶的研究进展

洪洁华, 刘晓波*, 吕小迅

(广东药学院基础学院微生物学教研室, 广东 广州 510006)

摘要: 脱氧核酶是利用体外分子进化技术获得的一种具有酶活性的单链 DNA 分子。迄今为止, 利用该技术已筛选出多种具有催化功能的脱氧核酶分子, 其中研究最多的是具有 RNA 切割活性的脱氧核酶, 尤其是 10 ~ 23 型脱氧核酶, 该酶能催化 RNA 特定部位的切割反应, 从 mRNA 水平使基因灭活, 从而调控蛋白质的表达, 在抗肿瘤、抗病毒等基因治疗领域具有广阔的应用前景。

关键词: 脱氧核酶; 体外筛选; 基因灭活; 基因治疗

中图分类号: Q523 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0971(2007)02-0099-04

Progress in the research on "10 - 23" deoxyribozyme

HONG Jie-hua, LIU Xiao-bo, Lü Xiao-xun

(Department of Microbiology, School of Basic Medicine, Guangdong
Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

Abstract: Deoxyribozyme is a single-stranded molecule with enzymatic activity. It was derived from a random-sequence DNA pool by *in vitro* selection. Up to date, a variety of deoxyribozymes have been isolated *in vitro* that can catalyze different chemical reactions. Of particular interest are deoxyribozymes with RNA-cleaving activity, especially "10 - 23" DNAzyme. It can cleave any RNA in a sequence-specific manner and inactivate gene at the level of mRNA, then regulate the expression of protein. So it may have a wide application prospect in gene therapy as anti-cancer and anti-viral agents and so on.

Key words: deoxyribozyme; *in vitro* selection; gene inactivation; gene therapy

脱氧核酶 (deoxyribozymes, DRz) 是利用体外分子进化技术 (systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX) 获得的一种具有酶活性的 DNA 分子, 亦称酶性 DNA (DNA enzyme, DNAzyme), 能在一定条件下切割 RNA 分子特定位点的磷酸二酯键。自 1994 年首次发现脱氧核酶以来, 迄今已从人工合成的随机多核苷酸单链 DNA 库中筛选出具有 RNA 或 DNA 切割作用、金属螯合作用、过氧化物酶活性、DNA 激酶活性, 以及 DNA 连接酶活性等多种催化功能的脱氧核酶, 研究最多的是具有 RNA 切割活性的脱氧核酶, 尤其是“10 ~

23”型脱氧核酶 (10 ~ 23 DNAzyme, 10 ~ 23 DRz)。除了其廉价低毒, 高稳定性等特性外, 催化活性与底物识别能力的结合, 使具有 RNA 切割活性的脱氧核酶成为目前分子生物学及新药开发等多种领域研究的热点。

1 “10 ~ 23”型脱氧核酶的结构

10 ~ 23 DRz (图 1) 是 Santoro 等^[1] 从 1 个含 10^{14} 个嵌合分子的随机 DNA 序列库中, 通过体外筛选法得到的第 10 轮循环的第 23 个克隆, 是目前研究最多的一种具有 RNA 切割活性脱氧核酶。它的结构包括底物结合臂和催化序列两部分。10 ~ 23 DRz 的活性中心由 15 个脱氧核糖核酸组成, 催化基序中第 8 个碱基可以是 T、C 或 A, 以 T 的活性最高, 其余碱基高度保守, 对其进行碱基突变或反转突变后变体没有活性。活性中心两侧各有约 7 ~ 9 个核苷

收稿日期: 2006-10-16

基金项目: 广东省医学科研基金资助项目 (A2006319)

作者简介: 洪洁华, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 抗体靶向、肿瘤免疫, Tel: 020-39350117, E-mail: sunny7904@163.com

* 通讯作者: 刘晓波, 男, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 抗体靶向研究, E-mail: xiaobo9412@hotmail.com

酸的底物结合臂,底物结合臂通过 Watson-Crick 配对与底物结合后进行底物的定点切割。10~23 DRz 切割位点位于 RNA 分子上的未配对的嘌呤和配对的嘧啶之间。理论上通过改变结合部位的碱基序列就可作用于不同底物靶 RNA 的 AUG 起始密码子,且此酶碱基数少,设计及合成十分方便,因此 10~23 DRz 作为一种潜在的强有力的 RNA 特异性切割工具无论是在体外应用于 RNA 限制性内切酶,还是在体内作为 RNA 水平上的基因失活剂,都具有很好的应用前景。

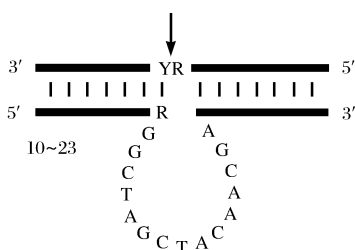


图1 “10~23”型脱氧核酶的结构

脱氧核酶(下链)与 RNA 底物(上链)通过碱基互补配对结合,箭头所示为切割位点,R=A 或 G;Y=U 或 C

2 “10~23”型脱氧核酶的修饰原则及设计策略

脱氧核酶由于其很高的切割活性(K_{cat}/K_m 大约为 $10^9 \text{M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)和极强的切割特异性(单碱基错配即可大幅度降低切割活性),在基因治疗方面有着极其广泛的应用前景。但是,作为一种新型的基因治疗药物,脱氧核酶同其他基因灭活因子一样面临着诸如如何有效进入细胞、如何实现准确的胞内定位、如何对抗核酸酶降解等直接影响催化效率的问题。针对这些问题,目前已有许多学者尝试对脱氧核酶进行修饰以及设计新的导入系统等策略。

Zaborowska 等^[2]研究了 10~23 DRz 催化核心的最佳修饰部位,发现在切割位点临界处的核苷酸改变将会显著降低催化活性,而 8 位的 T 具有最大的自由度,对其进行改动影响最小。Okumoto 等研究表明催化核心区第 9 位 C 磷酸化可使其催化效率提高近 10 倍。

与其他反义分子一样,脱氧核酶在体内也很容易遭受核酸酶降解,为了提高脱氧核酶稳定性,必须对其进行必要的化学修饰。目前常用的对其结合臂进行修饰的方法主要有:3'端添加倒位连接 T 碱基、硫代磷酸修饰和 2'-O-甲基化修饰。最近, Vester 等^[3]发现,利用锁核酸(locked nucleic acid, LNA)修饰的 10~23 DRz 可提高切割短 RNA 底物的效

率,甚至在降解长片段和具有高级结构的 RNA 底物时也一样能保持高降解活性;通过固相片段浓缩技术(solid phase fragment condensation, SPFC)可获得多种类型的 DNA-多肽偶联物,经过偶联修饰的 DNAzyme 与靶标 RNA 的亲合力增强,切割活性也大大提高,并且抵抗脱氧核糖核酸酶-1 降解的稳定性也提高了^[4]。

Chen 等^[5]设计了一种能够在细胞内产生单链 DNA 的表达载体,并应用此载体在细胞内表达的 10~23 DRz 成功下调了 c-raf 激酶基因的表达。鉴于 10~23 DRz 不能内源性地复制,而必须依靠外源性导入,从而使其应用受到限制。Chen 等^[6]最近设计了两种环形的噬菌体脱氧核酶命名为 C-Dz₇ 和 C-Dz₄₈₂,由单链噬菌体载体 M13mp18 携带导入大肠杆菌细胞中,靶向 β -内酰胺酶的 mRNA,结果显示,该环形脱氧核酶不仅能够在细菌中进行复制,而且还显示了很高的抑制 β -内酰胺酶和细菌生长的活性。因此作者认为,该研究为合成具有广泛应用潜能的复制性脱氧核酶提供了一个新的策略。

目前,应用脂质体介导的方法将脱氧核酶导入体外培养的细胞中已得到广泛的应用,但是当前仍然缺乏有效的方法将脱氧核酶导入体内,使其在体内的应用受到限制。Nunamaker^[7]等针对 PKC- ϵ 基因设计了一种脱氧核酶,并尝试应用电穿孔方法将该酶导入小鼠正常的脉管系统中,研究结果显示,电穿孔法能将脱氧核酶有效地导入小鼠肠系膜血管的多个细胞层,该酶能够高效特异地降低培养细胞及未损伤的血管中 PKC- ϵ mRNA 和蛋白的水平。因此,作者认为电穿孔法有望成功应用于将脱氧核酶导入体内。

3 “10~23”型脱氧核酶的应用

3.1 恶性肿瘤的基因治疗

作为 RNA 特异切割酶的 10~23DRz,是最引人注目的。Mitchell 等^[8]以 10~23DRz 为模板,针对转录因子 EGR-1 设计合成的脱氧核酶能够直接地、序列特异性地抑制乳腺癌细胞在裸鼠中增殖、转移和化学入侵,抑制实体瘤的生长,针对 EGR-1 的脱氧核酶还具有抑制血管形成的能力。因此,作者认为这种新型的、靶向基因的药物可能直接或间接地用于肿瘤治疗。

血管生成在肿瘤的发生发展中具有重要作用,抗血管生成是目前肿瘤治疗的热点之一。Zhang

等^[9]设计了一种针对血管内皮生长因子受体 2 (VEGFR2) 的脱氧核酶, 该酶能以浓度和时间依赖性的方式有效地切割 VEGFR2 mRNA, 诱导血管内皮细胞凋亡, 显著地抑制血管内皮细胞生长。注入裸鼠移植瘤后能显著抑制肿瘤生长, 肿瘤内血管密度明显减少, 肿瘤外周区域细胞死亡显著增加, 可望成为抗血管生成的又一新型药物。有研究表明, 碱性亮氨酸拉链蛋白 (basic region-leucine zipper protein) c-Jun 与细胞的增殖、迁移和凋亡相关, 但 c-Jun 是否对血管发生有直接作用仍然不清楚。为了研究 c-Jun 与血管发生的关系, Zhang 等^[10]针对 c-Jun mRNA 设计合成了一种脱氧核酶 (Dz13), 并将其转染人微血管形成细胞 (HMEC-1), 结果显示该酶能明显抑制 c-Jun 蛋白的表达, 阻断内皮细胞的增殖、迁移、化学入侵和血管形成。因此作者认为, 针对 c-Jun 的脱氧核酶在抑制肿瘤血管发生及生长方面具有潜在的治疗价值。

人端粒酶是由 RNA 成分 (hTR) 和蛋白亚基 (hTERT) 组成, 绝大多数恶性肿瘤表达端粒酶活性, 通过抑制端粒酶 RNA 组分或蛋白亚基的表达, 可以降低肿瘤细胞的端粒酶活性, 从而可能达到治疗肿瘤的目的。赵家明等^[11]针对 hTERT 基因的核苷酸序列, 合成“10~23”DRz 及其类似物, 提取总 RNA 在体外切割 hTERT mRNA; 转染鼻咽癌细胞后, 使其在胞内切割 hTERT mRNA, 结果显示, 人工合成的脱氧核酶能够高效特异地切割端粒酶 hTERT mRNA, 并降低鼻咽癌细胞的端粒酶活性, 促进鼻咽癌细胞凋亡。他们以相同的方法设计合成的针对 hTR mRNA 脱氧核酶转染鼻咽癌细胞后, 同样观察到鼻咽癌细胞端粒酶的活性受到明显的抑制^[12]。因此, 作者认为脱氧核酶作为一种新发现的催化性核酸, 在肿瘤的基因治疗领域中具有极其重要的应用价值。

3.2 病毒感染性疾病方面的应用

3.2.1 HIV 病毒的研究 早在 1997 年, Santoro 等^[1]就设计出了可特异性切割 HIV-1 病毒 gag/pol, env, vpr, tat 和 nef mRNA 起始密码区的脱氧核酶, 新近 Chakraborti 等建立了快速鉴别靶标 RNA 切割位点的方法, 应用 10~23 和 8~17 两种催化模序, 针对 HIV-1 病毒基因 5' 端顺式激活反应元件 (TAR), 筛选出许多切割位点用于抑制病毒的复制, 研究发现 8~17 催化模序最为有效, 无论是降解全长或短片段的靶位。作者认为由于 HIV-1 病毒基

因的 TAR 区在功能上是十分保守的, 因此这种抑制效应对一系列分离株都是有效的。

鉴于以脂质体载体导入哺乳动物细胞在活体应用中的可操作性很差, Unwalla 等^[13]利用鸟嘌呤残基可直接与巨噬细胞表面清道夫受体相互作用的能力, 合成了一种在 3' 端包含 10 个 G 残基的脱氧核酶 5970, 经过这种改造的脱氧核酶可不需要载体而被巨噬细胞特异性摄入, 并能够特异性切割 HIV-1 TAT/Rev 的编码 RNA, 从而有效抑制细胞内 HIV-1 病毒的基因表达。该实验为脱氧核酶应用于活体治疗的实用性提供了方法学依据。

3.2.2 肝炎病毒的研究 Wo 等^[14]针对 HBV 基因 ORF 的第 157 位 AUG 和 e 基因 ORF 的第 1816 位 AUG 设计合成的脱氧核酶 DrzBS 和 DrzBC, 能在有效浓度为 0.1~2.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的范围内呈剂量依赖性地抑制 HBVs 基因、e 基因的表达, 最高抑制率分别为 94.2% 和 91.8%; DrzBS、DrzBC 对 HBsAg、HBeAg 表达的抑制效率明显高于作为对照的反义寡核苷酸 AsBS 和 AsBC, 但有效浓度却为后者的 1/10。在高效抑制靶标基因的同时没有发现明显的细胞毒性, 作者认为是一种特异性的、高效的抗 HBV 基因治疗剂。于乐成等以 10~23 DRz 催化基序设计的针对丙型肝炎病毒 (HCV) 5' 非编码区及部分 C 区 (RNA5'-NCR-C) 的脱氧核酶用于治疗 HCV 感染, 也观察到了较好抑制效果。

3.2.3 其他病毒的研究 Toyoda 等设计合成的针对流感病毒 PB2 mRNA 起始密码子的脱氧核酶能在培养细胞中有效地抑制流感病毒的复制, 其作用明显优于反义寡核苷酸 (ASDON) 且毒性较小。Schubert 等^[15]以 10~23 DRz 为模板设计了特异性切割人鼻病毒 14 (human rhinovirus 14) 5' 端非翻译区的脱氧核酶, 通过应用 3'-3'-反相 T 连接、2'-O-甲基化 RNA 和 LNA、调整识别臂的臂长等措施对其进行优化, 大大增强了其催化活性和抵抗核酸酶降解的稳定性, 当切割 RNA 的不同靶点时, 只需对其进行轻微修饰即可, 这为脱氧核酶最终应用于病毒感染的临床治疗奠定了基础。

3.3 心血管疾病方面的应用

早期生长反应因子-1 (early growth response factor-1, Egr-1) 是一种重要的转录因子, 在正常动脉壁表达水平很低, 一般不能测及; 但血管壁机械性损伤后数分钟内, Egr-1 就能在平滑肌细胞 (SMC) 和内皮细胞中呈诱导性表达并促进相关基因的转录和表

达,促进动脉壁细胞的复制和增殖,导致血管阻塞。Fahmy 等^[16]针对人 EGR-1 基因的翻译起始位点设计了一种 LNA 修饰的脱氧核酶(LzF4),该酶能抑制 SMC 中 EGR-1 蛋白的表达,并以一种剂量依赖性和无毒性的方式抑制 SMC 的增殖,还能抑制机械损伤后伤口边缘 SMC 的再生,显示了它对动脉粥样硬化等血管堵塞和损伤性疾病的潜在治疗价值。

纤溶酶原激活物抑制剂-1(plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1)在心肌梗死、动脉粥样硬化,以及再狭窄病人血浆中的水平明显升高,PAI-1 mRNA 和蛋白的表达在动脉粥样硬化病人的动脉中也明显升高,但 PAI-1 表达的升高与不良的心血管疾病预后之间的确切关系仍然不清。Xiang 等^[17]针对人与鼠的 PAI-1 mRNA 设计合成的脱氧核酶能抑制心肌梗死后心脏中 PAI-1 的表达,从而显著地增强了人成血管细胞依赖的新生血管的形成、心肌细胞的再生,促进心脏功能的恢复。

3.4 其他应用

除了作为基因表达抑制剂,Todd 等在 10 ~ 23 DRz 的基础上建立了一种新的 PCR 技术——脱氧核酶荧光定量 PCR(D_{ZN}NA-PCR),以对核酸进行定量检测。Cairns 等用脱氧核酶对核酸突变进行分析。Suenaga 等^[18]则利用脱氧核酶的序列特异性切割 RNA 的特性,对微生物菌群中特异的 rRNA 进行定量检测。

4 结语

总之,脱氧核酶催化能力的高效性、与底物结合的特异性和化学性质的相对稳定性等多种优势是 ASODN 和核酶所无可比拟的,它在用作抗病毒、抗肿瘤以及抗心血管性疾病等疾患的新型基因治疗药物方面有着独特的开发价值和应用前景。尽管面临的实际问题仍很多,但随着各种研究数据的积累和新型高效递送载体的开发,相信这些问题可以得到合理解决。

参 考 文 献

- [1] Santoro SW, Joyce GF. A general purpose RNA-cleaving DNA enzyme[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(9):4262 - 4266.
- [2] Zaborowska Z, Furste JP, Erdmann VA, et al. Sequence requirements in the catalytic core of the "10 - 23" DNA enzyme [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(43):40617 - 40622.
- [3] Vester B, Lundberg LB, Sorensen MD, et al. Improved RNA cleavage by LNAzyme derivatives of DNazymes [J]. *Biochem Soc Trans*, 2004, 32(pt 1):37 - 40.
- [4] Kubo T, Takamori K, Bakalova R, et al. Conjugate DNazymes [J]. *Nucleic Acids Res (Suppl)*, 2003, 3:177 - 178.
- [5] Chen Y, Memicken HW. Intracellular production of DNA enzyme by a novel single-stranded DNA expression vector [J]. *Gene Ther*, 2003, 10(20):1776 - 1780.
- [6] Chen F, Wang R, Li Z, et al. A novel replicating circular DNAzyme [J]. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(8):2336 - 2341.
- [7] Nunamaker EA, Zhang HY, Shirasawa Y, et al. Electroporation-mediated delivery of catalytic oligodeoxynucleotides for manipulation of vascular gene expression [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003, 285(5):H2240 - H2247.
- [8] Mitchell A, Dass CR, Sun LQ, et al. Inhibition of human breast carcinoma proliferation, migration, chemoinvasion and solid tumour growth by DNazymes targeting the zinc finger transcription factor EGR-1 [J]. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(10):3065 - 3069.
- [9] Zhang L, Gasper WJ, Stass SA, et al. Angiogenic inhibition mediated by a DNAzyme that targets vascular endothelial growth factor receptor 2 [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(19):5463 - 5469.
- [10] Zhang G, Dass CR, Sumithran E, et al. Effect of deoxyribozymes targeting c-Jun on solid tumor growth and angiogenesis in rodents [J]. *J Nat Cancer Inst*, 2004, 96(9):683 - 696.
- [11] 赵家明,李明意,李震,等. 脱氧核酶对端粒酶 hTERT mRNA 的切割以及对鼻咽癌细胞凋亡相关基因的影响 [J]. *广东医学院学报*, 2005, 23(3):242 - 245.
- [12] 赵家明,李明意,杨展,等. 脱氧核酶对鼻咽癌细胞端粒酶活性的抑制作用 [J]. *华中科技大学学报*, 2005, 34(3):330 - 333.
- [13] Unwalla H, Banerjee AC. Inhibition of HIV-1 gene expression by novel macrophage-tropic DNA enzymes targeted to cleave HIV-1 TAT/Rev RNA [J]. *Biochem J*, 2001, 357(1):147 - 155.
- [14] Wo JE, Wu XL, Zhou LF, et al. Effective inhibition of expression of hepatitis B virus genes by DNazymes [J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(23):3504 - 3507.
- [15] Schubert S, Gul DC, Grunert HP, et al. RNA cleaving 10 - 23 DNazymes with enhanced stability and activity [J]. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(20):5982 - 5992.
- [16] Fahmy RG, Khachigian LM. Locked nucleic acid modified DNA enzymes targeting early growth response-1 inhibit human vascular smooth muscle cell growth [J]. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(7):2281 - 2285.
- [17] Xiang G, Schuster MD, Seki T, et al. Down-regulation of plasminogen activator inhibitor 1 expression promotes myocardial neovascularization by bone marrow progenitors [J]. *J Exp Med*, 2004, 200(12):1657 - 1666.
- [18] Suenaga H, Liu R, Shiramasa Y, et al. Novel approach to quantitative detection of specific rRNA in a microbial community, using catalytic DNA [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71(8):4879 - 4884.