·综　述·

我国细胞工程制药的研究现状和发展前景

李　刚　刘　鹏　刘诚迅　王　钊[1](北京 100084 清华大学生物科学与技术系)

摘要　目的:总结综述我国在细胞工程制药相关技术领域,如细胞融合、核移植、染色体改造、转基因和大规模细胞培养等方面的研究现状和未来的发展前景。方法:文献调研与数据整理。结果:我国细胞工程制药相关研究起步晚,发展快,前景广阔。结论:目前研究重点应放在人源化抗体、分子药田动物药厂的研制和生产上。

关键词　细胞工程;细胞融合;核移植;染色体改造;转基因;细胞培养

Present and Prosjecting of Cell Engineering Pharmacy in China

Li Gang (Li G), Liu Peng (Liu P), Liu Chengxun (Liu CX), Wang Zhao (Wang Z)[1] (*Department of Biological Sciences and Biotechnology, Tsinghua University, Beijing* 100084)

ABSTRACT　OBJECTIVE: To review the present and prospecting of cell engineering pharmacy in China. **METHOD:** According to the recent literatures on this field, animal cell engineering and plant cell engineering pharmacy were summarized and evaluated. **RESULTS:** Cell engineering pharmacy in China has been developing but need more supports especially in the research of traditional Chinese herbal medicine. **CONCLUSION:** Cell engineering pharmacy in China possesses tremendous developmental foreground.

KEY WORDS　cell engineering pharmacy, traditional Chinese medicine, transgene, biological reactor

细胞工程制药是细胞工程技术在制药工业方面的应用。所谓细胞工程,就是以细胞为单位,按人们的意志,应用细胞生物学、分子生物学等理论和技术,有目的地进行精心设计,精心操作,使细胞的某些遗传特性发生改变,达到改良或产生新品种的目的,以及使细胞增加或重新获得产生某种特定产物的能力,从而在离体条件下进行大量培养、增殖,并提取出对人类有用的产品的一门应用科学和技术。它主要由上游工程(包括细胞培养、细胞遗传操作和细胞保藏)和下游工程(即将已转化的细胞应用到生产实践中用以生产生物产品的过程)两部分构成。当前细胞工程所涉及的主要技术领域包括细胞融合技术、细胞器特别是细胞核移植技术、染色体改造技术、转基因动植物技术和细胞大量培养技术等方面。

1　动物细胞工程制药的研究现状

动物细胞工程制药主要涉及细胞融合技术、细胞器移植尤其是核移植技术、染色体改造技术、转基因技术和细胞大规模培养技术等。

1.1　细胞融合　是用自然或人工的方法使两个或几个不同细胞融合为一个细胞的过程。可用于产生新的物种或品系及产生单克隆抗体等。

在我国目前动物细胞工程的发展中,技术最成熟的当数细胞融合。其中淋巴细胞杂交瘤在国内已普遍开展,并培育了许多具有很高实用价值的杂交瘤细胞株系,它们能分泌产生在诊断和治疗病症方面发挥重要作用的单克隆抗体。如甲肝病毒单克隆抗体[1]、抗人 Ig M 单克隆抗体[2]、肿瘤疫苗[3]等可用于治疗疾病;抗人结肠癌杂交瘤细胞系分泌的单克隆抗体[4]、抗 M-CSFR(Macrophage Colony-Stimulating Factor Receptor, 巨噬细胞集落刺激因子受体)胞外区的单克隆抗体等[5]则对诊断疾病具有重要价值。由于技术已趋成熟,目前许多单克隆抗体已经进入产业化的生产阶段。

1.2　核移植　就是将一个动物的细胞核,移植到卵细胞中,并发育生长。核移植技术可用于具有良好发展前景的生物反应器的制备。其中乳腺生物反应器的研制是最为看好的一个转基因制药方向。利用转基因动物乳腺作为生物反应器,生产基因工程人类蛋白质药物[6],其成本较微生物发酵、动物细胞培养生产基因工程药物大大降低。但十几年来,显微注射技术一直是生产乳腺生物反应器的唯一实用手段,由于它本身固有的缺点,使得乳腺生物反应器未能有长足的进步。基因打靶与核移植相结合很可能成为生产乳腺生物反应器更有效的途径,它在外源基因定点整合、消除位点效应、降低生产成本、节省时间方面具有明显的优势。

本研究工作得到了清华大学·香港浸会大学中药现代化研究联合实验室和清华大学 985 计划的支持,特此致谢。

作者简解:王钊,男,39 岁。1996 年毕业于日本国立冈山大学药学部生物药剂学专业,获药学博士学位。现为清华大学生命科学院副教授。

[1]通讯作者。电话:010-62772240, Email: tcm@tsinghua.edu.cn。

核移植技术在我国特别是培育鱼类新品种方面已有多年的研究基础。目前我国在哺乳动物细胞核移植方面的研究也开展得很好,除了传统的胚胎细胞核移植外[7,8],体细胞克隆也在牛、山羊、小鼠等物种上均获得了成功。如2000年6月,西北农林科技大学先后培育出了世界上第一只成年体细胞克隆山羊"元元"和第二只成年体细胞克隆山羊"阳阳"[9]。另外,在利用转基因动物作为生物反应器生产基因工程药物方面,上海人类遗传病研究所、中国农业大学、中国科学院发育所、扬州大学、新疆畜牧科学院、解放军军事医学科学院和解放军军需大学等都先后获得了可能有潜在生产人用药物蛋白价值的转基因动物。

1.3 转基因动物 是指经人的有意干涉,通过实验手段将外源基因导入动物细胞中并稳定地整合到动物基因组中,且能遗传给子代的动物。

让动物成为制药工厂、创造人类急需的生物制品,这一直是人们梦寐以求的。转基因动物的出现使得这一梦想正逐步成为现实。在21世纪制药工业中,最具诱人前景的无疑是应用转基因动物生产转基因药物。转基因动物生产药物与以往的制药技术相比,具有不可比拟的优越性。哺乳动物生物反应器好比在动物身上建"药厂"。动物的乳汁或者血液可以源源不断地为我们提供目的基因的产品。它的优越性还表现在产量高,易提纯,表达产物已经过充分修饰和加工,具有稳定的生物活性。另外,作为生物反应器的转基因动物又可无限繁殖,故具有投资成本低、药物开发周期短和经济效益高等优点。可以说转基因动物的问世,为利用基因工程手段获得低成本、高活性和高表达的药物开辟了一条重要途径。

作为生物反应器的转基因动物,主要是利用其乳腺组织和血液组织进行定位表达,特别是用乳腺组织生产具有生物活性的多肽药物和具有特殊营养意义的蛋白质,已成为一个新兴的转基因制药业。至今已在以下动物的乳汁中生产出一些人类蛋白质药物:牛奶中有抗凝血酶、纤维蛋白原、人血清白蛋白、胶原蛋白、生育激素、乳缺蛋白、糖基转移酶、蛋白C等,山羊奶中有抗凝血酶原、抗胰蛋白酶、生育激素、血清白蛋白、组织型纤维溶原激活因子、单克隆抗体,绵羊奶中有抗胰蛋白酶、凝血因子IX、纤维蛋白原、蛋白质C,猪奶中亦有蛋白质C、凝血因子IX、纤维蛋白原、血红蛋白等[10]。我国在这方面的研究也很活跃,并取得了一些成果。早在1996年黄淑帧等成功制备了5头有目的基因(人凝血因子IX基因)整合的转基因羊(3公2母),其中1头母羊已于1997年9月产下小羊羔,进入泌乳期,其乳汁中含有活性的人凝血因子IX蛋白,这种凝血因子是治疗血友病的珍贵药物[11]。而近几年来的转基因产物更是如雨后春笋般的涌现出来,如潘玲、黄俊成和黄英等,分别在转基因小鼠乳汁中成功地表达了人促红细胞生成素、人胰岛素原和人血清白蛋白[12-14]。

转基因动物除了可在生产基因工程药物方面发挥重要作用外,还可用于建立诊断和治疗人类疾病的动物模型[15,16]、生产可用于人体器官移植的动物器官等方面。863高科技展览中展示的长有"人耳"的小鼠显示了这方面的良好前景,这将有效地解决器官异体移植的生理适应难度大的问题和大幅度地降低器官异体移植的成本。

1.4 动物细胞培养 是指离散的动物活细胞在体外人工条件下的生长、增殖的过程。动物细胞培养开始于本世纪初,到1962年规模开始扩大,发展至今已成为生物、医学研究和应用中广泛采用的技术方法,利用动物细胞培养生产的具有重要医用价值的生物制品有各类疫苗、干扰素、激素、酶、生长因子、病毒杀虫剂、单克隆抗体等,已成为医药生物高技术产业的重要部分,其销售收入已占到世界生物技术产品的一半以上[17]。

由于动物细胞体外培养的生物学特性、相关产品结构的复杂性和质量以及一致性要求,动物细胞大规模培养技术仍难于满足具有重要医用价值生物制品的规模生产的需求,迫切需要进一步研究和发展细胞培养工艺。目前,我国众多研究领域集中在优化细胞培养环境[18,19]、提高产品的产率[20]并保证其质量一致性上[21]。

2 植物细胞工程制药的研究现状

人类从植物中得到药物已有很长的历史。随着植物细胞培养、植物基因工程等生物技术的发展,它被赋予了新的内容和广阔的发展前景。我国的中药材是一个具有数千年历史的医药宝库,至今仍在中国和许多国家及地区广为使用。传统药材中,80%为野生资源,但由于盲目挖掘,不仅使野生资源日益减少,还严重破坏了自然界的生态平衡;人工种植又面临品质退化、农药污染和种子带病等问题。而且,人工种植的药材,活性成分的种类和数量往往因地区及气候不同而异,给品质控制带来许多困难。这些问题,严重影响了我国传统药材的生产和供应。据了解,在400余种经常使用的中药材中,每年短缺20%左右。因此除了尽快制定政策法规保护我国不断减少的野生资源以外,更加重要的是必须找到彻底改变这种局面的有效途径。生物技术的兴起为保存和发展我国传统中药材提供了这种机会和方法。

2.1 组织及细胞培养 植物细胞工程涉及诸多理论原理及实际操作技术,首当其冲的自然是培养技术,也就是将植物的器官、组织、细胞甚至细胞器进行离体的、无菌的培养。它是细胞遗传操作及细胞保藏的基础。

近年来植物细胞培养技术主要致力于高产细胞株选育方法[22,23]、悬浮培养技术、多级培养和固定化细胞技术、培养工艺优化控制[24,25]、生物反应器研制、下游纯化技术等方面,并取得了较大进展。有些药用植物种类已实现工业化生产,如从希腊毛地黄细胞培养物通过生物转化生产地高辛、从黄连细胞培养物中生产黄连碱、从人参根细胞中生产人参皂苷等;相当种类的药用植物细胞大量培养已达到中试水平,如长春花生产吲哚生物碱、丹参生产丹参酮、青蒿生产青蒿素、红豆杉生产紫杉醇、紫草生产萘醌、三七生产皂苷等[26]。

2.2 遗传特性改造 仅仅对细胞进行培养还不够,要使培养的细胞能为人类服务,就要对其进行一定的改造,这就涉及到了细胞的遗传操作。可以说,遗传操作是整个细胞工程

中最为重要也最具挑战性的一环。实验技术的发展使精确、高效的遗传操作变得更加方便。将外源 DNA 导入靶细胞的方法不断完善,除了以前经常使用的质粒载体、病毒载体、转座因子和 APC(酵母人工染色体)等途径外,通过 lipoplex/polyplex 介导、裸 DNA、"基因枪"、超声波法和电注射法等非病毒方式转换细胞的方法也开始被广泛使用;细胞融合方法已被不断的改进,融合率增大;细胞诱变也取得了较大的进展,诱变方式不断增加。这些理论和技术的发展都为更好的改造细胞创造了条件。

2.3 转基因植物 利用基因工程技术,把目的基因导入待改造的受体植物细胞,进而培育出获得了目的基因性状的植物,就是转基因植物。

我国转基因植物研究起步较晚。但是,由于确立了正确的发展策略,并将其及时列入重点扶持的"863"高科技发展计划,因此发展较快,并已取得很大成就。

利用转基因植物生产重组蛋白具有以下优点:1. 与动物细胞培养相比,植物细胞培养条件简单且易于成活,有利于遗传操作;2. 植物培养细胞具有全能性,能够再生植株;3. 转基因植物中的外源基因可通过植物杂交的方法进行基因重组,进而在植物体内积累多基因;4. 转化植株系的种子易于贮存,有利于重组蛋白的生产和运输;5. 用动物细胞生产重组蛋白,可能污染动物病毒,这对人类可能造成潜在危险,而植物病毒不感染人类,所以用植物细胞生产重组蛋白更为安全;6. 植物细胞有与动物细胞相似的结构和功能,有利于重组蛋白的正确装配和表达。

利用转基因植物生产基因工程疫苗是当前的一大热点,研究主要集中在烟草、马铃薯、蕃茄、香蕉等植物[27,28],至今已获得成功的有乙型肝炎表面抗原(HBs Ag)、不耐热的肠毒素 B 亚单位(LT-B)、链球菌属突变株表面蛋白(spa A)等 10 多种疫苗[29]。

转基因植物除了可用于生产疫苗以外,还可以用来生产其它蛋白制品如激素等。1995 年赵倩等就成功地把牛生长激素基因导入马铃薯,得到了转基因植株,从而为从植物中大量获得动物生长激素奠定了基础[30]。

3 未来发展前景

综上所述,细胞工程不仅可大量工业生产天然稀有的药物,而且其产品具有高效性和对疾病鲜明的针对性。因而,细胞工程药物的发展必将给制药工业带来一次革命性飞跃,在人类的医疗保健中发挥越来越重要的作用。

根据目前医药业的发展现状和趋势,我国细胞工程制药应该将重点放在以下几个方面:

3.1 人源化抗体的研制和生产 抗体可以对抗各种病原体,亦可作为导向器,但目前的单克隆抗体多为鼠源性抗体,注入人体后会产生抗体(抗抗体)或激发免疫反应。目前国外已研究噬菌体抗体技术、嵌合抗体技术、基因工程抗体技术等来解决人源化抗体问题。为了获得疗效更好、更适于人体使用的抗体,我国的细胞工程研究工作者也应该在这方面有所作为。

3.2 启动"分子药田"工程 随着二十一世纪的到来,传统中药材在保障人类健康的社会医疗事业中的作用越来越重要。因为在传统中药材中包含着许多人们尚未认识和开发的具有新功能的化合物,其中不少有望成为新的药物。借助细胞工程技术,人们可望保存和繁殖那些濒临灭绝的药材资源,也可望扩增那些数量极少而又极有价值的新类型化合物,满足临床的需求,或在遗传上改变现存的传统药材的有效成分,附加新的遗传成分,成为"转基因药材"。从植物细胞工程方面来说,植物细胞的大量培养和天然药物的工厂化生产将是未来一段时间发展的重点,尤其是天然植物蕴藏量少、含量低、但临床效用高的成分,如藏红花、紫杉醇等,利用细胞工程方法进行大量培养生产。可以说,如何将植物细胞工程技术与我国传统中草药研究相结合,是我们面临的一个新的课题。

3.3 实施"动物药厂"计划 在二十一世纪最具希望和发展潜力的制药方向当然是转基因动物生物反应器,尽管转基因动物生物反应器的生产应用仍处于初级阶段,尚有许多问题和限制因素存在,但是我们应该清楚地认识到应用转基因动物生物反应器生产药物的美好发展前景。目前利用转基因动物生物反应器生产药物在伦理学及商品化方面已不存在任何障碍。虽然这项技术的难度较大,成功率较低,而且目前通过转基因动物生物反应器生产的药物尚未形成产业化,但预期在 21 世纪初它们就会鼎足于国际市场,使转基因动物的产业成为最具高额利润的新型产业。

要达到这样一个目标,转基因动物生物反应器的研究必须在以下几方面有所突破的:1. 转入的基因在受体动物基因组中有随机整合、调节失控、遗传不稳定、表达率不高等问题,急需从理论上突破,获得更多的构建合理、有使用价值的结构基因。其关键问题是确保转入基因的有效表达并完全整合,关键技术是基因构建和位点整合;2. 转基因动物的异位表达和表达产物的泄漏问题;3. 转基因表达产物或产品的分离与纯化问题。可能会出现要纯化的产物含量低,且要去除全部可以引起人类变态反应的非人类蛋白;4. 转基因表达产物的结构和生物活性与人体蛋白的相似性问题。转基因产品必须与人体产生的蛋白具有足够的相似性,以免人体对其产生免疫反应。

作为现代生物技术之一的细胞工程技术在近半个世纪来突飞猛进,并已在医药领域取得了许多具有开创性的研究成果,如通过细胞融合技术形成的杂交瘤细胞生产的单克隆抗体已广泛用于临床治疗,并显示出独特的疗效,获得了很好的社会和经济效益。随着细胞工程技术研究的不断深入,它的前景及其产生的影响将会日益地显示出来。

参考文献

1 唐祖明,郑纪山,肖中党等.甲肝病毒单克隆抗体的研制与应用.东南大学学报(自然科学版),2000,30(5):21.

2 姚彩霞,李沪霞.抗人 Ig M 单克隆抗体的研究 - 脾内免疫建立抗人 Ig M 单克隆抗体杂交瘤细胞株.微生物学免疫学进展,1998 年,26(1):66.

3 刘彦君,王皓,卫立辛等.人肝癌细胞与自体激活B淋巴细胞融合制备肿瘤疫苗.第二军医大学学报,1998,19(6):507.
4 张京航,贺武.抗人结肠癌杂交瘤细胞系的建立及单克隆抗体特性研究.细胞与分子免疫学杂志,1997,13(2):25.
5 杨学辉,刘彦信,陈永春.重组人巨噬细胞集落刺激因子受体胞外区蛋白的纯化及单抗的制备.河北医科大学学报,2000,21(4):196.
6 谭晓红,杨晓,程萱等.核移植技术生产乳腺生物反应器的研究进展.生物工程进展,2000,20(6):46.
7 韩建永,常万存,桑润滋等.家兔胚胎细胞核移植的研究.河北农业大学学报,2000,23(2):1.
8 赵浩斌,陈乃清,魏庆信等.猪卵核移植的研究.武汉大学学报(自然科学版),1997,43(4):505.
9 王玉阁,邹贤刚,成国祥等.由胎儿成纤维细胞而来的克隆山羊(Capra hircus).科学通报,1999,44(21):2319.
10 曾溢滔.转基因动物与生物医药产业.生物学通报,1999,34(4):1.
11 黄淑帧,张克忠,黄英等.乳汁中分泌有活性的人凝血因子IX的转基因羊的研制.科学通报,1998,43(7):783.
12 潘玲,徐冲,李光三等.人促红细胞生成素在转基因小鼠乳汁中表达.生物工程学报,1999,15(1):28.
13 黄俊成,史洪才,李文蓉等.人胰岛素原基因在转基因小鼠乳汁中的表达.西北农业大学学报,2000,28(4):65.
14 黄英,黄缨,黄赞等.山羊β-酪蛋白基因启动区指导人血清白蛋白在转基因小鼠乳汁中的高效表达.科学通报,2000,45(19):2081.
15 常洋,秦川,尹红星等.建立阿尔茨海默症的转基因动物模型.解剖学报,2000,31(2):144.
16 秦川,常洋,朱华等.早老性痴呆转基因小鼠的研究.中国老年学杂志,2000,20(1):31.
17 林福玉,陈昭烈,刘红等.大规模动物细胞培养的问题及对策.生物技术通报,1999,1:32.
18 陈昭烈,刘红,吴本传等.产组织型纤溶酶原激活剂CHO工程细胞无血清培基的研究.药物生物技术,1999,6(2):85.
19 胡显文,肖成祖,李佐虎.多孔微载体无血清培养rCHO细胞生产tPA.生物工程学报,2000,16(3):387.
20 张立,范为民,严春等.用国产生物反应器培养Vero细胞和狂犬病毒.高技术通讯,1999,3:53.
21 林福玉,陈昭烈,刘红.5L生物反应器中长期灌流培养CHO工程细胞生产.军事医学科学院院刊,2000,24(1):44.
22 赵德修,李茂寅.培养基及其组成对水母雪莲悬浮培养细胞生长及黄酮形成的影响.生物工程学报,2000,16(1):99.
23 郭志刚,白桂雨,张荫麟.栝楼毛状根培养与天花粉蛋白合成的研究.天然产物研究与开发,1999,12(2):8.
24 郭志刚,刘瑞芝,刘雪.藏红花的叶鞘培养与藏红花素类物质的合成.清华大学学报(自然科学版),1999,39(12):4.
25 郭志刚,冯莹,刘瑞芝.前体化合物与诱导子对紫杉醇和紫杉烷类化合物合成的调控作用.天然产物研究与开发,2000,12(5):34.
26 蔡建秀,肖华山.植物组织细胞培养.泉州师专学报(自然科学),1999,17(6):38.
27 成静,郭勇.植物细胞工程药物生产的研究进展.江西科学,2000,18(1):60.
28 王捷,郭勇.疫苗生产的新途径--转基因植物.广西植物,1999,19(3):260.
29 王新国.用转基因植物生产基因工程疫苗.生物工程进展,1998,18(1):51.
30 赵倩,敖光明,刘书兰等.牛生长激素基因在马铃薯中的表达.植物学报,1995,37(11):842.

收稿日期:2001-12-04

http://www.cnki.net