

功能基因组学中的功能缺失研究策略

成军

成军, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039

成军, 博士, 教授, 主任医师, 博士生导师, 男, 1963-08-17生, 山东省淄博市人, 汉族. 1986年毕业于第一军医大学军医系, 获医学学士学位, 1989年毕业于军医进修学院, 获传染病学硕士学位, 1994年毕业于北京医科大学, 获传染病学博士学位, 1994-11-17至1997-12-01在美国得克萨斯大学健康科学中心临床免疫与传染病学完成博士后研究. 回国后从事传染病特别是病毒性肝炎的临床工作和基础研究, 主要学术研究方向是肝炎病毒与肝细胞相互作用的分子生物学机制, 出版专著5部, 发表论文及综述300余篇. 现任中华医学会传染病与寄生虫病学分会副主任委员、中华医学会热带病与寄生虫病学分会常委、解放军医学会传染病专业委员会委员, 《胃肠病学和肝病杂志》副主编、《传染病信息》杂志副主编、《热带病与寄生虫病杂志》副主编, 《中华传染病杂志》、《中华肝病杂志》、《世界华人消化杂志》编委等. 国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689

军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063

军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038

军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138

军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135

项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路100号, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室. c@genetherapy.com.cn

电话: 010-66933391 传真: 010-63801283

收稿日期: 2003-12-10 接受日期: 2004-04-28

成军. 功能基因组学中的功能缺失研究策略. 世界华人消化杂志 2004;12(10): 2269-2275

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2269.asp>

0 引言

在功能基因组学(functional genomics)研究中, 阐明各种蛋白的结构和生物学功能是其核心任务, 不仅是生物学的主要研究方向, 而且也是医学研究的主要内容, 毕竟细胞的功能和表型是由细胞中的蛋白来主导的, 许多疾病都是蛋白结构与功能、表达水平与调节的异常引起的. 研究蛋白的功能, 常常通过改变蛋白的表达水平, 观察细胞的生物学特性的变化, 来研究蛋白相应的生物学功能. 这种研究策略包括强制性地升高特定蛋白的表达水平, 也包括蛋白表达水平的缺失. 研究表明, 在功能基因组研究中, 功能缺失(loss of function, LOF)策略具有特殊重要地位.

1 反义寡脱氧核糖核苷酸和反义 RNA

反义分子包括反义寡脱氧核糖核苷酸 (oligodeoxynucleotide, ODN)和反义 RNA(antisense RNA)等. 反义技术(antisense technique)是指反义DNA/反义RNA分子作用及其机制研究的技术. 他是通过以碱基互补配对方式结合, 抑制、封闭或破坏目的基因结构及其表达的核酸分子, 利用反义技术可以了解特定基因的功能, 同样也可以利用反义技术抑制封闭某些有害或致病基因的表达, 在新一代抗病毒、抗肿瘤领域中具有巨大发展潜力^[1].

反义(antisense)的概念早在1967年即被提出. 如果这

核酸分子为DNA, 则称为反义DNA;如果这核酸分子为RNA, 则称为反义RNA. 反义DNA分子就是各种修饰或未经修饰的反义ODN片段. 1973年首先报道非离子型ODN及其衍生物, 能够特异性抑制细胞DNA复制、RNA的表达、转录、翻译功能. 1978年首次报道反义ODN可抑制劳氏肉瘤病毒(RSV)的复制. 当时应用的ODN是人工合成的未经修饰的反义ODN, 取得了意想不到的结果. 之后, 合成了多种反义ODN片段研究其对其他严重危害人类健康的病毒的抑制作用, 也取得了满意的结果. 目前认为, DNA双链其全长并不是从头到尾都处于双链结合状态, 这些非结合区域将可能成为反义ODN的结合部位. 另外反义ODN能与双链DNA结合形成局部三螺旋结构, 从而在转录水平抑制基因表达. 已有许多文献报道这种三螺旋结构在体外可抑制癌基因表达及猿猴病毒复制. 20 a来大量研究证实反义ODN特异性抑制基因表达的能力, 人们也逐渐认识到其在疾病治疗方面的巨大潜能^[2].

1.1 反义寡脱氧核糖核苷酸 反义ODN要发挥作用, 必须具备以下几个条件: (1)稳定性: 反义ODN容易被体内广泛存在的核酸酶破坏而失去活性, 故从策略上说, 反义ODN抗病毒治疗以基因表达途径更为有效. 因此反义ODN要发挥治疗作用必须通过化学修饰等以抵抗核酸酶的裂解增强其稳定性. 维持充分的细胞内浓度, 较长的细胞内半衰期; (2)透膜性: 自然反义ODN的不易透过细胞膜而达到作用靶位, 经过修饰的反义ODN可以增加透膜性, 增强治疗作用. 目前有许多载体系统用于增加反义ODN对细胞的通透性, 和其靶向mRNA结合位点的释放, 如反义ODN结合到胆固醇、多聚赖氨酸及阳离子脂质体中, 在提高细胞对反义ODN的摄取方面, 阳离子脂质体的应用最广泛. (3)特异性和亲和性: 影响特异性和亲和性的因素很多. 如反义ODN的序列、长度、作用环境中的温度离子等. (4)低毒性: 注意选择无毒或低毒的反义ODN. 注意观察其对人体细胞的毒性. (5)作用于病毒不同生活周期的多靶位反义ODN联合作用, 有可能比单靶位有更强的抑制作用, 可能提高抗病毒效果^[3].

为了满足以上条件, 反义ODN可以进行结构上的化学修饰, 包括ODN的骨架修饰, 磷酸基修饰, 糖环修饰, 碱基修饰. 常用的是磷酸基修饰. 在单核苷酸的磷酸基中4个氧原子, 可以由其他化学基团替代, 可以明显增强核酸酶的抗性, 和细胞膜通透性, 经过修饰后的反义ODN可以增强抗病毒的活性. 无论是自然状态下

的反义ODN还是化学修饰反义ODN,其骨架中的五碳糖都是其他构型.上述各种化学修饰反义ODN,其着眼点在于提高其核酸酶的抗性,增强其稳定性,但同时也产生了另外一个问题,这就是反义分子的过度累积,造成的细胞毒害.因此考虑到另外一种化学修饰的方式和类型.即在反义ODN的两端进行化学修饰.这样的目的是弥补DNA片段的不足之处,解决更好地进入细胞,更稳定,特异地和靶mRNA结合并破坏掉该mRNA的问题.如反义DNA 3' -端共价连接上胆固醇分子,大大提高了细胞摄取量,于是相应提高了反义DNA抗人类免疫缺陷病毒(HIV)的活性.将补骨脂分子接到反义DNA上,其目的是加强和靶mRNA结合的稳定性或进一步破坏掉mRNA,使其丧失功能.把反义RNA与核酶(ribozyme)串连成融和基因,可同时具有反义抑制及剪接功能,必定会提高反义ODN的抑制效率.另外,脂质体修饰能够明显增强硫代磷酸化ODN的反义抑制作用,其原因可能与下面两个因素有关:(1)脂质体使ODN的转染效率提高.(2)修饰后可避免核酸酶的裂解增强其稳定性.用硫代磷酸化、硫代磷酸化和硫代磷酸化等基团修饰,对丙型肝炎病毒(HCV)的复制均有较好的抑制作用,并认为经过化学修饰的ODN类似物能抵抗核酸酶的裂解,提高其生物活性^[4].

现阶段的反义技术还存在很多问题.(1)继续研究能高效抑制基因的复制和表达的靶序列,设计和合成相应的反义ODN,研究反义ODN的修饰,提高反义ODN对核酸酶的抗性,细胞膜的通透性,增强对基因靶位的特异性和亲和性,减少对细胞的毒性.(2)如果反义ODN没有封闭基因复制的原始模板,一旦停止治疗,将会引起复发,这是一个值得研究的重要问题.(3)反义ODN目前主要靠人工合成,合成量小.(4)反义ODN在应用人体前,必须进行动物实验研究,检验在活体中的有效性和安全性,但选择合适的动物模型也是一个难题.此外还面临其他方面基因治疗的共同问题,如目的基因的选择,病毒表达载体的安全性问题,基因的选择及基因转移靶细胞的选择,导入方法,靶器官的特异性及治疗后如何调控导入基因的表达等还需深入研究^[5].

由于反义技术能抑制基因的复制,并在不同水平上阻断其功能的发挥,因此是一种很有潜力的治疗方法,反义技术的体外实验已初步证明了这一点.也许在不久的将来,反义技术能够真正成为治疗某些疾病的突破口,如肿瘤、病毒性疾病、遗传病等.反义基因治疗应用于临床将预示着一个新时代的来临^[6-8].

1.2 反义RNA 1981年首次报道了天然反义RNA的存在及其生物学功能.1983年又发现反义RNA不仅可以抑制DNA的复制,而且可以调节基因的转录和翻译,可以抑制基因表达,是基因表达的调节因子.在生物体内存在反义RNA,由于反义RNA和mRNA互补,可以抑制mRNA的翻译功能.使基因的表达受到抑制.1984年首次提出反义RNA的概念,并用重组DNA技术设计和

制备出反义RNA.利用重组DNA技术将编码单纯疱疹病毒(HSV)胸腺嘧啶核苷激酶(TK)基因特异性反义RNA所对应的DNA的片段重组到一种真核表达载体中,再将这种重组的反义RNA表达载体,注射到细胞里,明显观察到反义RNA的表达,抑制了HSV的复制和表达活性及TK活性.此后开展了反义RNA表达载体的构建,以及转基因表达和抗病毒的研究.反义DNA分子不象反义RNA分子除了化学合成以外,别无其他来源,不能采取基因工程技术生产,或体内表达的基因治疗技术.但反义DNA分子比反义RNA分子较容易得到,也较稳定^[9-11].

2 核酶

核酶是一类独特的RNA分子,具有自我剪切和催化功能,其特异性序列通过碱基配对识别并结合靶RNA,催化裂解靶RNA,抑制基因表达,特别是抑制某些有害基因表达.1983年两位科学家Cech和Altman发现了核酶.核酶发现于对四膜虫以及一些植物病毒、类病毒等的观察.他们的核酸分子都具有自我剪切的功能.这些自我剪切反应都是可逆的,具有酶催化反应的性质.到目前为止,至少提出三种不同的核酶活性中心的结构形式,他们分别是锤头状,发夹状,斧头状结构.这三种主要类型的核酶RNA分子,其基本构成都是由活性中心及其侧翼序列组成,核酶RNA的活性中心决定了酶的催化活性,其侧翼序列决定了核酶RNA结合与裂解靶RNA的特异性.以后根据这些天然核酶的结构,人工合成具有催化活性的RNA片段(人工核酶).核酶具有序列特异性,不编码蛋白亦无免疫原性,又可重复利用等优点.此外还可以通过体外转录的方式获得核酶RNA分子的表达^[12].

核酶的发现及其研究不仅具有理论上的指导意义,而且也具有极大的实用价值.核酶的发现,使反义技术发展到一个新的高度,核酶RNA分子不仅为反义技术增添了新型分子,而且其作用效率更高,作用机制更复杂,同时核酶RNA分子也是基因调控的重要分子.结合一些基因的治疗手段,对遗传病、癌症和病毒性疾病,尤其对我国人民危害极大的病毒性肝炎开展基因治疗,具有十分诱人的应用前景^[13].

乙型肝炎病毒(HBV)为部分双链的DNA病毒.其复制过程中有一个从前基因组RNA到DNA的逆转录过程.如果以这段3.5 kb的前基因组RNA为靶子,设计核酶对其进行降解就可以打断他的生活周期.核酶能特异地切割HBV前基因组RNA,使其丧失模板活性.1992年Weizker *et al*针对HBV前基因组RNA的一些关键部位设计了3个锤头型核酶,与体外转录的全长RNA在50℃温育,聚丙烯酰胺凝胶电泳显示RNA被切割成不同长短的片段,与预测的长度相符.为了排除非特异性切割或RNA的降解作用,他们还把冷的RNA与核酶放在一起,此时就不会出现以上的片段.还发现3个核酶同时切割的效果明显大于单个核酶的效果,这可以用来对

抗病毒的变异. Beck *et al* 所设计的核酶针对 HBV 前基因组 RNA 的包装信号, 他是一个高度保守的、茎环结构的顺式因子, 在基因组中出现了 2 次, 他对病毒的包装及反转录都起着很重要的作用. 根据这些特点被认为是比较理想的靶子. 竺来发 *et al* 设计针对 HBeAg mRNA 编码序列的核酶, 在 Mg^{2+} 存在下, 将 137 nt 的核酸准确地了解得到 97 nt 和 40 nt 两个片段, 可有效的剪切 HBV mRNA. 王平 *et al* 针对 HBV 前 -C / C 区基因的锤头状核酶, 经体外转录后可定点切割靶 RNA, 在 HepG2 细胞亦可显著抑制 HBeAg、HBsAg 的表达和 HBV DNA 复制; Weizsacker *et al* 构建了串联的核酶, 针对 HBV mRNA 第 2029–2031 nt, 2044–2046 nt 和 2049–2051 nt 位点设计的 3 组锤头状核酶, 可有效的切割靶 RNA, 抑制或阻断 HBV 的复制, 并可减少变异病毒逃逸的机会. Beck *et al* 设计了针对 HBV 包装点的锤头状核酶, 体外切割靶 RNA, 用 U6 snRNA 表达核酶与 HBV 共转染, 也可有效切割靶 RNA. 国内体外合成核酶, 并对鸭 HBV S 基因体外转录物定点切割, 发现对病毒抗原表达的抑制作用. Welch *et al* 使用三个发夹状核酶, 在 Huh7 细胞中与 HBV 共表达, 使其 HBV 表达下降 66%, 对核酶修饰后则抑制率达 83%. 在真核细胞表达的成功, 预示对 HBV 基因治疗是有效的^[14–15].

和文超 *et al* 针对 HBsAg、HBeAg、HBcAg 设计了 5 种锤头型核酶, 不仅在细胞外, 而且在细胞内观察到了其对 HBV 的抑制, 各抗原及病毒颗粒都明显减少. 设计的核酶构建了带有 5' -、3' - 自身修剪的真核细胞核酶表达质粒, 包括含单个核酶和多个串联的鸟枪型核酶基因的质粒, 通过转染把他们同带有 HBV 基因组的质粒转入 HepG2 细胞. 用 Southern blot、ELISA、RNase 保护法等测定结果后, 显示 HBsAg、HBcAg、HBeAg 以及他们相应的 RNA、Dane 颗粒数都因为核酶的作用而明显地减少^[16].

Puttitz *et al* 学者用重组筛选的方法从一个发夹型核酶文库中 (5×10^9 个) 确定能有效地在转基因人肝癌细胞 (HCC) 中切割 HBV 前基因组 RNA 的核酶. 这个核酶文库包含了任意序列的底物结合位点. 通过实验发现 RNA 上有 40 个部位可以和核酶结合, 其中 17 个在 HBV 所有 4 个亚型中都存在. 然后他们根据这 17 个保守位点设计了 4 个发夹型核酶, 与一个有复制活性的 HBV DNA 二聚体同时转入 HCC 细胞系中. 结果核酶对 HBV 的抑制分别达到 80%、69%、66% 和 49%^[17].

HCV 是一种 RNA 病毒. 用目前的抗病毒手段非常容易诱导变异从而产生耐药性. HCV 基因组核心区高度保守, 其 5' -NCR 含有惟一的翻译起始点, 且全长 5' -NCR 对病毒复制和装配也必不可少, 因而抗 -HCV 核酶设计是针对 C 区和 5' -NCR 以及针对 mRNA 二级结构的单链间隙, 在细胞内外均能抑制 HCV 病毒 RNA 的复制. 对于 HCV 的感染, Welch *et al* 使用发夹式核酶作为抗 HCV 感染的有效治疗物质, 以阻碍病毒基因组复

制, 阻止病毒蛋白的表达. 保护细胞免受 HCV 感染. 该核酶针对 5' -NCR 及编码衣壳蛋白的区域. 由于 5' -NCR 区的二级结构相对复杂, 影响了核酶的结合. 使得编码 HCV 衣壳蛋白区域的核酶成为目前最有希望的抗 HCV 核酶. 首先使用的是 RNA 强子, 而非 DNA 增强子. 也曾有应用锤头状核酶清除肝细胞内 HCV RNA 的报道, 并在 HCV RNA 的 AUG 启动子附近发现了核酶的切割位点. 该方法是通过 HCV 感染的肝细胞培养建立的核酶文库选择合适的核酶切割位点, 因此可能对寻找 HBV 的核酶酶切位点也很有帮助. Welch *et al* 针对 HCV 正链与负链 RNA 高度保守的区域设计了多个核酶. 在体外比较了他们对 RNA 的切割活性. 挑选了其中几个最有效的核酶, 连接入腺相关病毒 (AAV) 载体和腺病毒载体. 发现他们在组织培养中对 HCV 病毒有非常明显的抑制作用. 这一结果为将来研制抗 HCV 药物带来了希望. Welch *et al* 还设想可以将这种核酶插入嗜肝病毒载体静脉注射入人体, 使其在人体肝细胞中不断地释放出来, 降解 HCV RNA 正链甚至负链. 贾战生 *et al* 研究抗 HCV 5' -NCR 双位点 213 和 260 核酶在细胞内对 HCV 翻译启动功能的抑制作用. 通过脂质体介导的基因转染方法, 转染核酶基因和带萤虫素酶的靶基因真核表达载体于人肝癌细胞, 检测报告基因的活性, 结果表明两种核酶均能在肝癌细胞内有效地抑制报告基因的表达, 其抑制率在 40–75% 之间. 国内刘克洲 *et al* 设计和合成 HCV 5' -NC 区和 C 区的特异性核酶基因并克隆入真核表达载体 pSV2-gpt、CD-Sra 中, 转染 HCV 感染的 MT-2 细胞, 用定量 PCR 方法检测核酶对 HCV 的抑制作用, 结果显示两种核酶对 HCV 均有抑制作用, 抑制率分别为 54% 和 62%, 二者联合作用时抑制率达 78%^[18–19].

丁型肝炎病毒 (HDV) 的基因链和抗基因链均具有核酶活性, 能催化自我切割和自我连接, 他最可能是导致核酶活性的结构. HDV 基因组自身裂解位点位于 688/689 nt 位置上, 斧头状核酶就是根据 HDV 核酶结构提出的. 抗 HDV 核酶技术包括阻断这种自身剪切过程, 另一方面, 设计其他核酶分子裂解 HDV RNA 基因组. 在抗 HIV 核酶研究中, 设计多靶位核酶切割病毒的 RNA, 到目前为止, 已设计出 HIV RNA 特异性的 9 个靶位的核酶 RNA 分子, 这样避免了单个核酶识别, 切割位点的基因突变造成的切割失败, 同时也提高了抗病毒效率^[20].

影响核酶催化活性的因素主要有: (1) 二价金属阳离子 (如 Mg^{2+} 、 Ca^{2+}). 核酶的裂解反应, 至少要有 0.5 mmol/L 的 Mg^{2+} 或 Ca^{2+} 存在. Mg^{2+} 以一种独特的方式促进核酶的裂解反应, 当其浓度在 25 mmol/L 以上时, 裂解活性迅速增加. 有人认为在 Mg^{2+} 浓度较高时, 核酶可能变成了另一种构型. (2) 变性剂. 当低浓度变性剂存在时可以增强核酶的催化活性, 而高浓度变性剂 (> 2M 的尿素或 > 5M 的甲酰胺) 存在时可抑制核酶的催化活性. (3) 温度. 适当的温度可增强核酶的催化活性. (4) 酸碱度. 三种基因

结构类型的核酶 RNA 分子,其反应条件中的最佳 pH 值是 7.0,反应环境过酸,过碱都将影响核酶 RNA 活性中心的形成,进而影响催化效率.在所有的因素中,二价金属阳离子是绝对需要的. Beck *et al* 报告,在抽提的细胞而不是完整的细胞中,锤头状核酶能有效地切割 HBV 的壳膜信号.体外试验表明,经过蛋白 K 酶和酚抽提处理的细胞,随着 $MgCl_2$ 浓度的提高,胞外终浓度达 5–10 mmol/L(胞内 $MgCl_2$ 浓度为 1 mmol/L)时,该酶的切割效率是最高的.核酶—底物复合物活性是通过核酶结构的改变来实现的, $MgCl_2$ 浓度的高低是诱导核酶结构变化的关键,因此细胞内 $MgCl_2$ 浓度可影响靶 RNA(如 HBV 壳膜信号)的延伸.由于 HBV 前基因组转录的结果是使 HBV RNA 不断合成,因此在 HBV 前基因组内更容易找到核酶的切割位点^[21].

为了使核酶成功地用于临床,首先要从以下几方面进行研究.(1)设计最佳的核酶结构首先要确定核酶的类型.锤头状核酶对靶序列的要求稍低,且分子较小,易于获得较高产量,也较经济,是目前广泛使用和首选的类型,其次是选择靶 RNA,核酶的作用效率与其裂解的靶序列有关,不同的 NUH(N 为 A、C、G、U; H 为 A、C 和 U)序列能使其裂解效率改变 100 倍以上.锤头状核酶包括二个侧翼的臂,核酶可以借助该臂识别产底物的 NUH 序列,然后催化核酶裂解 RNA 3' 端的 NUH 三联子.发夹状核酶识别的裂解位点位于 GUC 的上游.发夹状核酶二级结构中某些碱基的变化,可导致核酶裂解活性的全部丧失.斧头状核酶裂解位点位于 GAU 的下游,是从研究 HDV 基因组复制过程中阐明的.核酶 RNA 分子活性中心及其侧翼序列的组成和数目对核酶 RNA 分子都有影响.设计核酶 RNA 分子要注意防止自身折叠成稳定的二级结构.裂解靶位的选择应尽量避免茎—环稳定的二级结构,而应选择较为松散的单链结构区,以达到理想的治疗效果,对核酶 RNA 的侧翼序列,从理论上讲,最好要保证侧翼序列的长度在 17 nt 以上,以保证其与底物 RNA 分子结合的特异性.(2)寻找有效的导入及表达系统最常用的载体是选择病毒载体系统,如腺病毒载体或逆转录病毒载体.在核酶表达载体的选择与构建中,要考虑启动子本身活性的强弱及其组织细胞特异性问题.(3)提高核酶在细胞内的稳定性,为了稳定核酶在细胞内的结构,可对核酶结构进行化学修饰.在体外许多研究针对 2' -OH 进行修饰,以增加核酶的稳定性.如 Taylor *et al* 设计的 DNA-RNA 杂合核酶,即与底物配对部分用脱氧核苷酸替代,结果其体外活性提高 6 倍,稳定性提高 2 倍. Heidenreich *et al* 则以 2' -氟替代,发现提高了稳定性但也降低了剪切活性,亦有以 2' -甲基,2' -脱氧基,2' -氨基,磷硫替代等修饰的报道.核酶在细胞内提高稳定性则通过装在 tRNA 反密码环或在核酶末端引入茎环结构来进行.(4)改善和提高核酶活力,减少影响核酶作用效率的因素.多位点核酶联合可以提高核酶的剪切率,

可以阻止病毒变异逃逸核酶的攻击,和减少空间构型的影响.如 Weizsacker *et al* 所用 3 个核酶的串联作用.核酶也可以与反义技术相结合,或与定向技术相结合,如 HBV 外膜蛋白包装含有 HDV 核酶的毒株,可使其定向作用于靶器官肝脏.日本学者设计抗 HCV 核酶,使用唾液粘蛋白定向等^[22].

目前核酶在体内应用研究已取得了很大的进展,但多数研究仍处于实验阶段,要使核酶真正用于疾病的防治,仍有很长的一段路要走.包括核酶如何导入细胞与表达,核酶引入细胞后的稳定性,核酶结构的设计,底物的选择以及如何提高核酶的活力及调控等方面均有待于进一步探索和解决.从基因水平探索治疗肝病有效途径是寻找新一代高效无毒药物的根本出路.研究根据靶基因模板序列,设计出高度特异的“基因封条”封闭病毒基因表达的特定部位,对细胞代谢无影响,是一个值得重视的探索方向.

3 RNA 干扰

从基因的分子生物学角度,病毒性肝炎也是一种基因病,相对于正常肝细胞来说,肝炎患者的肝细胞中获得了肝炎病毒的基因,因此,病毒性肝炎的治疗也可以采取像遗传病那样的基因治疗(gene therapy)策略^[23].与遗传病的基因治疗策略不同,遗传病往往是因为某一或某些基因发生缺陷,利用基因治疗技术进行补充或者校正;而病毒性肝炎的基因治疗,往往是需要采取另外的策略,即阻断有害的病毒的基因表达的策略.因为病毒性肝炎的发病机制,主要是进入肝细胞的肝炎病毒基因编码产生相应的肝炎病毒蛋白,作为靶抗原激活机体的免疫应答机制,这种原本是要清除肝细胞中肝炎病毒的正常的免疫应答机制,却造成了持续的肝细胞的免疫损伤,引起各种类型的肝脏疾病.特别是 HBV、HCV 感染引起的慢性病毒性肝炎,迁延不愈,释放的各种炎症因子导致肝脏内贮脂细胞(stellate cell)细胞的激活、转化、增生,分泌过量的细胞外基质(ECM),并造成肝脏纤维化的形成,某些情况下通过复杂的生物学机制导致肝细胞的恶性转化,引起肝细胞癌的发生^[24].因此,从肝炎病毒引起的一系列肝脏疾病谱来看,主要的源头就是肝细胞中肝炎病毒基因的存在,因此采用基因治疗技术阻断肝炎病毒基因在肝细胞中的复制和表达,是我们应该考虑的主要治疗靶点.最近研究表明, RNA 干扰(RNA interference)可能是进行抗肝炎病毒基因治疗的新的策略^[25].

3.1 RNA 干扰的机制与策略 1995 年 Guo 和 Kemphues *et al* 在研究美丽隐杆线虫(*C. elegans*)的 *par1* 基因功能时,将 *par1* 基因的反义 RNA 表达载体导入到美丽隐杆线虫中,引起 *par1* 基因的缺陷现象,同时发现导入 *par1* 基因的有义链基因进行表达时,也产生了 *par1* 基因的缺陷现象,表明反义和有义 RNA 的表达都有类似的抑制效应,但是机制却明显不同. Fire *et al* 对这一现象的

机制进行了细致深入的研究, 比较了反义 RNA、有义 RNA 和双链 RNA(dsRNA)在美丽隐杆线虫中的抑制效应, 发现 dsRNA 产生至少是 10 倍以上的抑制靶基因表达的效果, 并将 dsRNA 抑制同源基因的表达的现象称为 RNA 干扰, 从此 RNA 干扰现象得到了空前的重视, 并在各种病原微生物的基因表达抑制方面进行了许多有益的尝试^[26].

3.2 RNA 干扰与病原微生物基因表达的抑制 首先在美丽隐杆线虫中发现 RNA 干扰现象之后, 很快发现在许多类型的病原微生物中都存在同样的 RNA 干扰现象. 22–25 nt 大小 dsRNA 产生抑制或降解靶 RNA 分子的作用, 统称为小干扰 RNA(small interference RNA, siRNA), 根据其发挥 RNA 干扰现象的 dsRNA 的具体长度又可以分成 2 类: 24–25 nt 的长 siRNA 和 21–23 nt 的短 siRNA. 这两种类型的 siRNA 都可以通过与靶 mRNA 分子进行序列特异性的结合、抑制与降解, 阻断或破坏靶基因的表达. 另外一种可能作用的机制就是 dsRNA 诱导同源基因的甲基化, 从而使目的基因表达关闭. 另外, 小分子的 dsRNA 同时也是很强的干扰素诱导酶如 PKR、RNase L 的激活剂, 可以产生类似干扰素的抗病毒效应^[27].

3.3 RNA 干扰与抗肝炎病毒治疗的应用前景 RNA 干扰策略在抗肝炎病毒治疗中首先在 HCV 的研究中获得了成功. McCaffrey *et al* 设计合成了针对 HCV NS5B 基因区的 dsRNA, 当与 NS5B 表达载体进行共转染时, 在鼠肝细胞中观察到 dsRNA 对于 NS5B 基因的表达水平抑制率达到 75%, 如果 dsRNA 与 NS5B 的表达载体进行共转染, 抑制率可以达到 98%. 说明 siRNA 策略在抗 HCV 基因治疗中的应用前景. 多年来由于缺乏合适的 HCV 感染/转染细胞模型, 因此对于抑制 HCV 的研究进展缓慢. 近年来关于 HCV 复制子(replicon)的建立, 使得在细胞系水平上研究 siRNA 的效果成为可能. Randall *et al* 就利用 HCV 的复制子细胞模型对于 dsRNA 抑制 HCV RNA 复制的效果进行了研究. 在 Huh-7 细胞系中, dsRNA 对于 HCV RNA 的复制水平具有显著的抑制作用, 而且是剂量依赖性的. 对于 dsRNA 作用的序列依赖性的特点进行研究, 2 株 HCV 变异株仅有 3 nt 的序列差别, 只有 dsRNA 与作用的靶 HCV RNA 序列完全同源时才具有抑制作用, 因此, dsRNA 对于靶基因的表达抑制是严格的序列特异性的特点. dsRNA 对于 HCV RNA 抑制的作用效果是指数性的, 在 4 d 之内, 就可以降低 HCV RNA 的复制水平达 80 倍. 导入 siRNA 之后, 可以使 98% 以上的有 HCV RNA 复制的细胞不再有 HCV RNA 的复制, 这些细胞中再也检测不到 HCV 的抗原表达和 HCV RNA 的复制. 这些研究结果表明, 基于 siRNA 的抗 HCV 治疗是十分有希望的^[28].

当然, 由于肝炎病毒 RNA 分子在体内的二级结构特点, 针对不同基因区段的 siRNA 的抑制作用效果也肯定有所差别, 因此针对 HBV、HCV 基因序列的特点,

还需要进行优化, 寻找最为有效的抑制靶点. 作为一种新型的抗肝炎病毒的可能的策略, siRNA 也具有其相当明显的局限性. 例如 HBV 和 HCV 基因序列高度变异, 存在明显的基因准种(quasispecies)群, 而 siRNA 对于靶 RNA 分子的识别, 又是以碱基配对方式进行的, 因此要向全面控制 HBV、HCV 的复制, 我们就需要无数种序列不同的 siRNA 分子, 显然是很难做到的. 因此, 我们还必须针对这一特点进行深入细致的研究, 克服这一困难, 使得 siRNA 抑制靶基因的表达的策略, 更能切合临床抗肝炎病毒治疗的需要^[29–33].

4 基因敲除

基因敲除(gene knock-out)模型是目前功能研究策略中的主要技术途径之一. 建立基因敲除的动物模型, 基本上通过 2 种策略: 一种是体外构建同源重组或基因打靶(gene targeting)的表达载体, 利用受精卵细胞核微注射的方法, 依靠受精卵细胞内的基因同源重组, 实现基因敲除. 这一策略的缺点就是效率太低. 随着体细胞核移植技术即克隆动物模型技术的研究进展, 目前采用体外构建同源重组或基因打靶载体, 在体外条件下对于实现同源重组的细胞系进行选择鉴定, 然后进行体细胞核移植, 将是基因敲除模型发展的主流技术方向^[34].

基因敲除是指对一个结构已知但功能未知的基因, 从分子水平上设计实验, 将该基因去除, 或用其他顺序相近基因取代, 然后从整体观察实验动物, 推测相应基因的功能. 这与早期生理学研究常用的切除部分—观察整体—推测功能的三部曲思想相似. 基因敲除除可中止某一基因的表达外, 还包括引入新基因及引入定点突变. 既可以用突变基因或其他基因敲除相应的正常基因, 也可以用正常基因敲除相应的突变基因^[35].

基因敲除是 1980 年代后半期应用 DNA 同源重组原理发展起来的一门新技术. 1980 年代初, 胚胎干细胞(ES 细胞)分离和体外培养的成功奠定了基因敲除的技术基础. 1985 年, 首次证实的哺乳动物细胞中同源重组的存在奠定了基因敲除的理论基础. 到 1987 年, Thompson *et al* 首次建立了完整的 ES 细胞基因敲除的小鼠模型. 此后的几年中, 基因敲除技术得到了进一步的发展和完善. 基因敲除的技术路线如下: (1) 构建重组基因载体; (2) 用电穿孔、显微注射等方法把重组 DNA 转入受体细胞核内; (3) 用选择培养基筛选已击中的细胞; 将击中细胞转入胚胎使其生长成为转基因动物, 对转基因动物进行形态观察及分子生物学检测^[36].

基因敲除的靶细胞目前最常用的是小鼠 ES 细胞. 基因敲除的技术路线虽不复杂, 但由于高等真核细胞内外源 DNA 与靶细胞 DNA 序列自然发生同源重组的机率非常低, 约为百万分之一, 要把基因敲除成功的细胞筛选出来是一件非常困难的工作. 因此, 同源重组的筛选和检测就成了基因敲除技术所要解决的关键问题. 目前已有多种筛选方法, 其中 1988 年犹他大学的 Capecchi

*et al*教授的研究组发展的"正负双向选择系统"适用范围宽且效率较高. ES细胞基因敲除途径建立转基因小鼠技术的成熟, 首次使体外精细的基因操作与小鼠的整个生长发育和生命过程得到了直接的结合, 为探讨高等动物基因组结构和功能提供了有效的方法. 由基因敲除技术产生出的特殊小鼠已经对哺乳类生物学的各领域, 包括发育生物学、癌生物学、免疫学、神经生物学和人类遗传学产生了极大影响. 理论上, 基因敲除可适用于任何能产生ES细胞的物种, 将来可在小鼠基因敲除成熟的基础上开展其他实验动物的基因敲除工作^[37].

基因敲除的应用领域主要有: (1) 建立人类疾病的转基因动物模型, 为医学研究提供材料. 基因敲除小鼠是研究疾病的发生机制、分子基础及诊断治疗的重要实验材料. 如1989年囊性纤维化病(CF)的致病基因(CFTR)被成功地克隆, 1992年成功建立了CFTR基因的基因敲除的CF小鼠模型, 为CF基因治疗提供了很好的动物模型, 得以顺利通过了通过了基因治疗的动物试验, 于1993年开始临床试验并获得成功. (2) 改造动物基因型, 鉴定新基因和/或其新功能, 研究发育生物学深入研究基因敲除小鼠在胚胎发育及生命各期的表现, 可以得到详细的有关该基因在生长发育中的作用, 为研究基因的功能和生物效应提供模式. 例如, 目前人类基因组研究多由新基因序列的筛选检测入手, 进而用基因敲除法在小鼠上观察该基因缺失引起的表型变化. 目前已报道了多种学习、记忆以及有缺陷的基因敲除动物, 发现多种基因在学习、记忆的形成过程中必不可少. (3) 治疗遗传病. 这包括去除多余基因或修饰改造原有异常基因以达到治疗的目的. (4) 改造生物、培育新的生物品种. 细菌的基因工程技术是本世纪分子生物学史上的一个重大突破, 而基因敲除技术则可能是遗传工程中的另一重大飞跃. 这项新技术在基础理论研究及实际应用中都将是有着广阔的应用前景^[38-42].

基因敲除技术在国外已是成熟技术, 国内还仅仅是刚刚开始. 但是, 国内已有几家单位在这一领域开展了一些工作. 例如, 利用基因敲除系统, 国内研究了Smad3基因的功能, 成功地鉴定了3个与骨骼发育有关的新基因, 探讨了肿瘤坏死因子受体II在郎格罕细胞迁移中的作用、CD45蛋白酪氨酸磷酸酶与小鼠表皮 $\gamma\delta$ T细胞发育的关系, 研究了极低密度脂蛋白和中间密度脂蛋白与动脉硬化的关系, 将小鼠胚胎干细胞中凝血因子IX(mF IX)基因定向敲除, 为建立血友病B的转基因小鼠模型奠定了基础^[43-44].

5 显负性突变体策略

蛋白以及蛋白之间的相互作用决定了蛋白的生物学功能及细胞的表型. 一种结构发生变化而失去其正常的生物学功能的蛋白质分子, 往往与其相应的野生型蛋白进行竞争性的抑制, 从而阻断野生型蛋白的生物学功能. 这种具有竞争性抑制野生型蛋白分子生物学功能的

突变体称为显负性突变体(dominant negative mutant). 显负性突变体在生物学的研究中具有广泛的应用前景^[45-47].

HBV基因组编码2种反式激活因子: HBxAg和羧基末端截短型的表面抗原中蛋白(MHBst). 这2种反式激活蛋白都激活c-Raf-1/MEK激酶信号转导链. HBxAg信号转导需要蛋白激酶C(PKC)和Ras的共同参与, 但是MHBst仅需要PKC, 而不需要Ras. 单独阻断HBxAg或MHBst的信号转导途径, 并不能减少转染的HepG2细胞中的病毒的产量, 但是利用c-Raf-1-或MEK显负性突变体抑制剂将2种反式激活因子的共同信号转导通路进行阻断, 则可以阻断HBV的基因表达.

持续的HCV复制说明HCV具有抑制机体的防御体系的功能. 研究表明HCV NS3/4A蛋白酶可以阻断干扰素调节因子-3(IRF-3)这种抗病毒关键效应分子的磷酸化修饰和生物学功能. IRF-3显负性突变体的表达可以提高肝癌细胞中的HCV RNA的复制水平. HCV NS5A蛋白是一种具有催化多种蛋白磷酸化修饰的蛋白, 因而参与不同的细胞信号转导系统. 在其羧基末端高度保守的II型多脯氨酸结构位点SH3位点与Src蛋白酪氨酸激酶族以及有丝分裂原接头蛋白Grb2的结合, 产生多种生物学调节作用.

TNF α 可以诱导肝细胞的细胞凋亡, 也可以诱导肝脏的再生过程, 但是具体机制不清. 应用基因芯片技术对于TNF α 有道德基因类型进行研究, 发现对白细胞素-8(IL-8)是诱导水平是最高的. 但是应用一种显负性突变体I κ B、没有激酶活性的Akt突变体阻断NF- κ B和PI3K/Akt信号转导通路, 或应用LY 294002特一行阻断PI3K时, TNF α 对IL-8的上调作用消失. 提示负显性突变体的构建是研究信号转导的重要技术手段.

6 参考文献

- 1 Pierce EA, Liu Q, Igoucheva O, Omarrudin R, Ma H, Diamond SL, Yoon K. Oligonucleotide-directed single-base DNA alterations in mouse embryonic stem cells. *Gene Ther* 2003;10: 24-33
- 2 Gleason M. Targeting anti-apoptotic genes with antisense oligodeoxy-nucleotides to delay progression to androgen independence. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 1999;2(S3):S15
- 3 Karle J. Antisense studies of brain GABAA receptors. *Dan Med Bull* 2002;49:130-144
- 4 Efferth T, Fabry U, Osieka R. Damage of the kinesin heavy chain gene contributes to the antagonism of cisplatin and paclitaxel. *Anticancer Res* 2000;20:3211-3219
- 5 Saeki T, Takashima S, Tachibana M, Koga M, Hiyama E, Salomon DS, Holland JF, Ohnuma T. Inhibitory effect of telomere-mimic phosphorothioate oligodeoxy nucleotides (S-ODNS) on human tumor cell lines. *Oncology* 1999;57(Suppl 2):27-36
- 6 Fearon KL, Hirschbein BL, Nelson JS, Foy MF, Nguyen MQ, Okruszek A, McCurdy SN, Frediani JE, DeDionisio LA, Raible AM, Cagle EN, Boyd V. An improved synthesis of oligodeoxynucleotide N3'-->P5' phosphoramidates and their chimera using hindered phosphoramidite monomers and a novel handle for reverse phase purification. *Nucleic Acids Res* 1998;26:3813-3824
- 7 Liedtke CM, Cole T. Antisense oligodeoxynucleotide to PKC-delta blocks alpha 1-adrenergic activation of Na-K-2Cl cotransport. *Am J Physiol* 1997;273:C1632-1640
- 8 Cleek RL, Rege AA, Denner LA, Eskin SG, Mikos AG. Inhibi-

- tion of smooth muscle cell growth in vitro by an antisense oligodeoxynucleotide released from poly(DL-lactic-co-glycolic acid) microparticles. *J Biomed Mater Res* 1997;35:525-530
- 9 Salas PJ, Rodriguez ML, Viciano AL, Vega-Salas DE, Hauri HP. The apical submembrane cytoskeleton participates in the organization of the apical pole in epithelial cells. *J Cell Biol* 1997;137:359-375
- 10 Soldatenkov VA, Dritschilo A, Wang FH, Olah Z, Anderson WB, Kasid U. Inhibition of Raf-1 protein kinase by antisense phosphorothioate oligodeoxyribonucleotide is associated with sensitization of human laryngeal squamous carcinoma cells to gamma radiation. *Cancer J Sci Am* 1997;3:13-20
- 11 Robinson CJ, Scott PH, Allan AB, Jess T, Gould GW, Plevin R. Treatment of vascular smooth muscle cells with antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides directed against p42 and p44 mitogen-activated protein kinases abolishes DNA synthesis in response to platelet-derived growth factor. *Biochem J* 1996;320:123-127
- 12 Nadal A, Robertson HD, Guardia J, Gomez J. Characterization of the structure and variability of an internal region of hepatitis C virus RNA for M1 RNA guide sequence ribozyme targeting. *J Gen Virol* 2003;84:1545-1548
- 13 De Francesco R, Rice CM. New therapies on the horizon for hepatitis C: are we close? *Clin Liver Dis* 2003;7:211-242
- 14 Deschenes P, Ouellet J, Perreault J, Perreault JP. Formation of the P1.1 pseudoknot is critical for both the cleavage activity and substrate specificity of an antigenomic trans-acting hepatitis delta ribozyme. *Nucleic Acids Res* 2003;31:2087-2096
- 15 Ryu KJ, Kim JH, Lee SW. Ribozyme-mediated selective induction of new gene activity in hepatitis C virus internal ribosome entry site-expressing cells by targeted trans-splicing. *Mol Ther* 2003;7:386-395
- 16 Nishikawa F, Kakiuchi N, Funaji K, Fukuda K, Sekiya S, Nishikawa S. Inhibition of HCV NS3 protease by RNA aptamers in cells. *Nucleic Acids Res* 2003;31:1935-1943
- 17 Circle DA, Lyons AJ, Neel OD, Robertson HD. Recurring features of local tertiary structural elements in RNA molecules exemplified by hepatitis D virus RNA. *RNA* 2003;9:280-286
- 18 Inoue K, Shoji Y, Kurane I, Iijima T, Sakai T, Morimoto K. An improved method for recovering rabies virus from cloned cDNA. *J Virol Methods* 2003;107:229-236
- 19 Krishna NK, Marshall D, Schneemann A. Analysis of RNA packaging in wild-type and mosaic protein capsids of flock house virus using recombinant baculovirus vectors. *Virology* 2003;305:10-24
- 20 Huang ZS, Su WH, Wang JL, Wu HN. Selective strand annealing and selective strand exchange promoted by the N-terminal domain of hepatitis delta antigen. *J Biol Chem* 2003;278:5685-5693
- 21 Nishikawa F, Shirai M, Nishikawa S. Site-specific modification of functional groups in genomic hepatitis delta virus (HDV) ribozyme. *Eur J Biochem* 2002;269:5792-5803
- 22 Morrissey DV, Lee PA, Johnson DA, Overly SL, McSwiggen JA, Beigelman L, Mokler VR, Maloney L, Vargeese C, Bowman K, O'Brien JT, Shaffer CS, Conrad A, Schmid P, Morrey JD, Macejak DG, Pavco PA, Blatt LM. Characterization of nuclease-resistant ribozymes directed against hepatitis B virus RNA. *J Viral Hepat* 2002;9:411-418
- 23 Hamasaki K, Nakao K, Matsumoto K, Ichikawa T, Ishikawa H, Eguchi K. Short interfering RNA-directed inhibition of hepatitis B virus replication. *FEBS Lett* 2003;543:51-54
- 24 Yokota T, Sakamoto N, Enomoto N, Tanabe Y, Miyagishi M, Maekawa S, Yi L, Kurosaki M, Taira K, Watanabe M, Mizusawa H. Inhibition of intracellular hepatitis C virus replication by synthetic and vector-derived small interfering RNAs. *EMBO Rep* 2003;4:602-608
- 25 McCaffrey AP, Nakai H, Pandkey K, Huang Z, Salazar FH, Xu H, Wieland SF, Marion PL, Kay MA. Inhibition of hepatitis B virus in mice by RNA interference. *Nat Biotechnol* 2003;21:639-644
- 26 Stephenson J. Giving HIV the silent treatment and other strategies examined at conference. *JAMA* 2003;289:1494-1495
- 27 Shlomai A, Shaul Y. Inhibition of hepatitis B virus expression and replication by RNA interference. *Hepatology* 2003;37:764-770
- 28 Zamore PD, Aronin N. siRNAs knock down hepatitis. *Nat Med* 2003;9:266-267
- 29 Wilson JA, Jayasena S, Khvorovova A, Sabatinos S, Rodrigue-Gervais IG, Arya S, Sarangi F, Harris-Brandts M, Beaulieu S, Richardson CD. RNA interference blocks gene expression and RNA synthesis from hepatitis C replicons propagated in human liver cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:2783-2788
- 30 Couzin J. RNA interference. Mini RNA molecules shield mouse liver from hepatitis. *Science* 2003;299:995
- 31 Song E, Lee SK, Wang J, Ince N, Ouyang N, Min J, Chen J, Shankar P, Lieberman J. RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nat Med* 2003;9:347-351
- 32 Kapadia SB, Brideau-Andersen A, Chisari FV. Interference of hepatitis C virus RNA replication by short interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:2014-2018
- 33 Randall G, Grakoui A, Rice CM. Clearance of replicating hepatitis C virus replicon RNAs in cell culture by small interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:235-240
- 34 Santoro N. Mechanisms of premature ovarian failure. *Ann Endocrinol (Paris)* 2003;64:87-92
- 35 Bettaieb A, Dubrez-Daloz L, Launay S, Plenchette S, Rebe C, Cathelin S, Solary E. Bcl-2 proteins: targets and tools for chemosensitisation of tumor cells. *Curr Med Chem Anti-Canc Agents* 2003;3:307-318
- 36 Champiaux N, Changeux JP. Knock-out and knock-in mice to investigate the role of nicotinic receptors in the central nervous system. *Curr Drug Target CNS Neurol Disord* 2002;1:319-330
- 37 Berr SS, Roche JK, El-Rifai W, Smith MF Jr, Powell SM. Magnetic resonance imaging of gastric cancer in Tff1 knock-out mice. *Magn Reson Med* 2003;49:1033-1036
- 38 Reuter H, Henderson SA, Han T, Mottino GA, Frank JS, Ross RS, Goldhaber JJ, Philipson KD. Cardiac excitation-contraction coupling in the absence of Na(+)-Ca(2+) exchange. *Cell Calcium* 2003;34:19-26
- 39 Balakrishnan V, Becker M, Lohrke S, Nothwang HG, Guresir E, Friauf E. Expression and Function of Chloride Transporters during Development of Inhibitory Neurotransmission in the Auditory Brainstem. *J Neurosci* 2003;23:4134-4145
- 40 Chaperon F, Tricklebank MD, Unger L, Neijt HC. Evidence for regulation of body temperature in rats by dopamine D(2) receptor and possible influence of D(1) but not D(3) and D(4) receptors. *Neuropharmacology* 2003;44:1047-1053
- 41 Belvisi MG, Bottomley KM. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in the pathophysiology of chronic obstructive pulmonary disease (COPD): a therapeutic role for inhibitors of MMPs? *Inflamm Res* 2003;52:95-100
- 42 Cho CH, Lee SY, Shin HS, Philipson KD, Lee CO. Partial rescue of the Na⁺-Ca²⁺ exchanger (NCX1) knock-out mouse by transgenic expression of NCX1. *Exp Mol Med* 2003;35:125-135
- 43 Tsukahara K, Hata K, Nakamoto K, Sagane K, Watanabe NA, Kuromitsu J, Kai J, Tsuchiya M, Ohba F, Jigami Y, Yoshimatsu K, Nagasu T. Medicinal genetics approach towards identifying the molecular target of a novel inhibitor of fungal cell wall assembly. *Mol Microbiol* 2003;48:1029-1042
- 44 Jefferson KK, Cramton SE, Gotz F, Pier GB. Identification of a 5-nucleotide sequence that controls expression of the ica locus in *Staphylococcus aureus* and characterization of the DNA-binding properties of IcaR. *Mol Microbiol* 2003;48:889-899
- 45 McKay TR, Bell S, Tenev T, Stoll V, Lopes R, Lemoine NR, McNeish IA. Procaspase 3 expression in ovarian carcinoma cells increases survivin transcription which can be countered with a dominant-negative mutant, survivin T34A; a combination gene therapy strategy. *Oncogene* 2003;22:3539-3547
- 46 Sartorato P, Lapeyraque AL, Armanini D, Kuhnle U, Khaldi Y, Salomon R, Abadie V, Di Battista E, Naselli A, Racine A, Bosio M, Caprio M, Poulet-Young V, Chabrolle JP, Naudet P, De Gennes C, Lecornec MH, Poisson E, Fusco AM, Loli P, Lombes M, Zennaro MC. Different inactivating mutations of the mineralocorticoid receptor in fourteen families affected by type I pseudohypoaldosteronism. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:2508-2517
- 47 Kwon SH, Pimentel DR, Remondino A, Sawyer DB, Colucci WS. H(2)O(2) regulates cardiac myocyte phenotype via concentration-dependent activation of distinct kinase pathways. *J Mol Cell Cardiol* 2003;35:615-622