

转基因植物生产药用蛋白的研究进展

康杰芳 王喆之

(陕西师范大学生命科学学院,药用植物资源与天然药物化学教育部重点实验室 陕西 西安 710062)

摘要:利用转基因植物作为生物反应器生产具有重要价值的多肽和蛋白质,包括抗体、疫苗、药用蛋白等较之其他生产系统具有很多优越性,已成为当前植物医药基因工程和药物生物技术领域中的研究热点,本文着重就这一领域近年来国内外的研究现状、发展趋势以及目前存在的问题及对策进行综述。

关键词:转基因植物;药用蛋白;生物反应器

中图分类号:Q946.1 文献标识码:A

Progress in Transgenic Plants Producing Pharmaceutical Proteins

KANG Jie - fang, WANG Zhe - zhi

(College of Life Sciences, Shaanxi Normal University, Key Laboratory of Ministry of Education

for Medicinal Plant Resource and Natural Pharmaceutical Chemistry, Xi'an, Shaanxi 710062, China

ABSTRACT: The application of transgenic plants as bioreactors in the production of highly valued medical polypeptides and proteins, such as antibodies, vaccines and pharmaceutical proteins, has many advantages over other production systems, and has become a hot point in the plant genetic engineering and pharmaceutical biotechnology in recent years. The progress, existing problems and the new strategies in this field were reviewed in this article.

Key words: Transgenic plants; Pharmaceutical protein; Bioreactor

近年来随着生物技术的迅猛发展,植物生物技术、医学和制药工业紧密结合,开创了医药产业的新起点,利用转基因植物作为生物反应器生产具有重要经济价值的异源蛋白(特别是药用蛋白),正在成为当前该领域中研究最活跃、产业发展最迅速、效益最显著的热点之一,它为人类提供了一个更加安全和廉价的生产体系。

1 转基因植物生产药用蛋白的优点

转基因植物是指运用重组 DNA 技术将外源基因整合于受体植物基因组,改变其遗传组成后产生的植物及其后代。转基因植物作为生产药用蛋白的生物反应器,具有常规的微生物发酵、动物细胞和转基因动物等生产系统不可比拟的潜在优越性:如生产成本较低;利于大规模工业化生产;表达产物可糖基化、酰胺化、磷酸化;精确的切割、折叠及亚基的正确装配等翻译后加工过程;表达产物具有与高等动物细胞一样的免疫原性和生物活性^[1];安全性好,不存在对人体健康有害的病原体等。

2 转基因植物生产药用蛋白的表达系统

植物基因工程生产药用蛋白的过程一般包括目的基因的克隆、高效表达载体的构建、植物细胞的遗传转化、受体细胞的组织培养和植株再生、转化植株栽培、目标产品的分离纯化及纯度鉴定等,其中载体表达系统主要有两种:稳定的整合表达系统和瞬时表达系统。

2.1 稳定的整合表达系统

外源基因导入宿主细胞并整合到宿主基因组中,且能够稳定表达目的蛋白的转基因植株称为稳定表达系统。例如用根瘤农杆菌介导外源 DNA 或直接导入法将外源基因导入植物受体细胞,并整合在核 DNA 上,该表达系统的优越性在于易获得大量稳定表达和生产多价复合疫苗的植株,可通过特异性表达启动子使抗原基因在器官或组织中特异性表达。Ponstein 等^[2]将来源于 *A. niger* 植酸酶 *phyA* 基因转移到油菜籽中,用种子特异性启动子 *CruA* 控制 *phyA*,并在植酸酶成熟肽前加上十字花科信号肽序列,结果发现 95% 的油菜籽实中检测到了植酸酶的活性,此酶对胃蛋白酶具有抗性。

2.2 瞬时表达系统

瞬时表达系统是利用可在植物中自行复制的植物病毒为载体表达异源蛋白。植物病毒具有广寄主性,能够感染多种植物,且基因组小,易于进行遗传操作。以植物病毒为载体将目的基因插入病毒基因组中,并置于强启动子的控制下,然后用重组病毒感染植物,外源基因则随病毒的复制而高水平表达(接种后 1-2 周),从已感染病毒的叶片中提取病毒蛋白,酶解后即可获得目标蛋白,一般病毒蛋白可以占到感染病毒叶片总蛋白含量的 50%。外源蛋白产生的形式或是独立的多肽,或与病毒基因产物融合。大多数植物病毒可借助快速的机械接种感染植物,适合于大规模的商业化生产,利用这类方法有望获得高产量的药用蛋白,实现生产蛋白质的“绿色工厂”。目前已有十种植物病毒被改造成不同类型的外源蛋白表达载体,包括花椰菜花叶病毒(CaMV)、烟草花叶病毒(TMV)和豇豆花叶病毒(CPMV)等,其中超过 150 多种的蛋白多肽在 TMV 载体中成功表达。

作者简介:康杰芳,(1971-),女,在读博士

主要从事生物技术研究。

(收稿日期:2006-06-26 接受日期:2006-07-30)

3 转基因植物生产药用蛋白的应用研究

最早的转基因植物药物是1988年比利时PGS公司在烟草中研制出的一种神经肽。1989年美国Scripps研究所分别克隆抗体的重链和轻链基因并转入烟草中,然后使两种转基因烟草杂交,在子代烟草叶片中产生了大量的抗体蛋白,开创了利用转基因植物生产药用蛋白的新时代。目前,世界范围内估计已有100多种药用蛋白质和多肽在植物中得到成功表达,它主要集中在疫苗、抗体及其片段、细胞因子及生物活性肽。

3.1 转基因植物在疫苗中的应用研究

表1 转基因植物生产的疫苗

Table 1 The vaccines produced by transgenic plants

类别	疫苗	表达系统	
细菌疫苗	大肠杆菌热不稳定毒素B亚单位疫苗(LT-B) ^[4-5]	马铃薯、烟草	
	霍乱毒素B亚单位疫苗(CT-B) ^[6-8]	马铃薯、烟草、番茄	
病毒疫苗	肺结核疫苗 ^[9]	胡萝卜	
	乙型肝炎表面抗原(HBsAg) ^[10-13]	烟草、大豆、马铃薯、莴苣、羽扇豆	
	丙型肝炎抗原 ^[14]	烟草	
	人巨细胞病毒(HCMV)糖蛋白B(UL55) ^[15]	马铃薯	
	兔出血症病毒(RHDV)结构蛋白VP60 ^[16]	马铃薯	
	口蹄疫病毒(FMDV) ^[17]	苜蓿、拟南芥	
	传染性胃肠炎病毒S糖蛋白(TGEV-S) ^[18-19]	烟草、马铃薯	
	狂犬病(Rabies)病毒疫苗 ^[20-21]	烟草、菠菜	
	诺沃克(norwalk)病毒疫苗 ^[22-23]	马铃薯	
	传染性胃肠炎冠状病毒(TGEV) ^[24]	番茄、菠菜	
	麻疹病毒血凝素蛋白(MVH) ^[25]	烟草	
	寄生虫疫苗	禽流感病毒血凝素疫苗 ^[26]	马铃薯
		疟疾B细胞表位 ^[27]	烟草
V霍乱CtxA,CtxB亚基 ^[28]		烟草	
其它	避孕疫苗、糖尿病疫苗 ^[29]	烟草	

目前,转基因植物疫苗以其独具的特色-可食(饲)性正在成为当前基因工程疫苗研究的热点之一。植物细胞壁作为天然生物胶囊可使疫苗不会被酶破坏,通过机体肠道黏膜分泌IgA,激发特异性免疫应答,使人体获得持久的抗病能力。番茄、胡萝卜、香蕉等食用植物被认为是理想的疫苗传递系统,通过食用这些植物果实来达到防病的目的。对于那些不宜直接食用的植物疫苗来说,注射疫苗的可行性研究则是转基因植物疫苗的另一主要研究方向。转基因植物疫苗不仅保持了重组蛋白的理化特性和生物活性,而且改变了传统的生产方式和接种手段,疫苗重组蛋白基因可长期贮存在种子中,无需经过加工提纯和冷藏保存,大幅度降低了疫苗的生产成本,具有潜在的巨大社会意义和经济效益。

3.2 转基因植物在抗体及其片段中的应用研究

“植物抗体”(plantibody)是指人或动物抗体基因或基因片段在转基因植物中表达的免疫性产物,它的一大优势是能将全长重链和轻链组装成带有Fc区域的全抗体^[30],这些抗体能功能性地识别抗原并结合抗原,而大肠杆菌能组装的最大抗体片段为单价Fab片段,酵母表达体系则由于酵母对多肽的糖基化作用与哺乳动物细胞的修饰情况不同而影响了抗体的ACDC(依赖抗体的补体介导的细胞毒性)效力。自1989年美国医学生物学家Hiatt等首次证明转基因植物中可以生产功能

转基因植物疫苗(transgenic plant vaccine)或植物疫苗(plant-based vaccine)是把植物基因工程技术与机体免疫机理相结合,生产出能使机体获得特异抗病能力的疫苗。动物实验表明,转基因植物疫苗具有口服免疫原性,可以直接食用,所表达的抗原呈递到动物肠道淋巴相关组织(gut-associated lymphoid tissues, GALT),能被其表面特异受体特别是M细胞所识别,产生粘膜和体液免疫反应^[3]。转基因植物表达的抗原蛋白经纯化后仍保留免疫学活性,注射入动物体内能产生特异性抗体。已报道的转基因植物疫苗大致可分为4类:即细菌疫苗、病毒疫苗、寄生虫疫苗、其他疫苗等(见表1)。

性抗体以来,已有不同类型的抗体如IgG、IgA、IgG/IgA嵌合抗体、Fab和scFv等抗体功能片段在烟草、马铃薯、玉米、大豆、水稻、小麦或拟南芥的叶片、根、块茎和种子等器官中表达,其中一些已运用于人和动物(表2)。Ma等^[31]用烟草表达识别变异链球菌细胞表面蛋白的植物抗体分泌型二聚体IgA/G(sIgA/G),用于治疗龋病,防止变异链球菌定居口腔,目前已被作为牙膏的一种成分,进入二期临床试验。

表2 转基因植物生产的抗体

Table 2 The antibodies produced by transgenic plants

抗体	抗原	表达系统
IgG	结肠癌表面抗原 ^[32]	烟草
IgG	疱疹单型病毒 ^[33]	大豆
IgG	抗人IgG ^[34]	苜蓿
scFvIgG	淋巴瘤B细胞 ^[35]	烟草
分泌型IgA/G(sIgA/G)	链球菌齿斑粘附素 ^[31]	烟草
抗癌胚抗原scFv184.66	癌胚抗原 ^[36]	小麦、水稻

3.3 转基因植物在蛋白质多肽药物中的应用研究

目前,转基因植物或重组病毒在植物中表达可以生产的药用蛋白有人胰岛素、免疫球蛋白、红细胞生长素、干扰素、尿激酶、人生长激素脑啡肽、人表皮生长因子、人红细胞生成素、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子、人血红蛋白等^[37-38](表3)。

葡萄糖脑苷脂酶(hGC)是治疗遗传病高歇斯症(Gaucher disease)的特效药,是当今世界最昂贵的药物之一,美国 Virginia Polytechnic Institute(VPI)已把克隆出 hGC 的基因经改造后成功地导入烟草并得到表达,一株转基因植株的产酶量相当于 2000-8000 个胎盘生产出的药物^[37]。抗生物素蛋白(avidin)是一种应用广泛的诊断试剂,Hood 等^[39]在转基因玉米中成功表达了重组抗生物素蛋白,其表达量占总可溶性蛋白的 2%,与从鸡蛋清中提取的比较具有相同的功效,而成本却降低了 10 倍,现在已经成为 Sigma-Aldrich 的商品。水蛭素是迄今发现的最强的凝血酶天然抑制剂,用于治疗血栓的形成。现在已经在油菜、烟草、拟南芥中表达成功,为了降低提取和纯化成本,加拿大学者将种子的油脂体作为在植物中表达蛋白的载体,然后利用油脂体中所含的油脂蛋白的亲脂性简化下游的纯化过程^[38]。这一方法使得水蛭素在植物成熟收获时才具有活性,也限制了它在环境中的暴露。

表 3 转基因植物生产的蛋白质多肽

Table 3 The polypeptides and proteins produced by transgenic plants

蛋白质多肽	植物种类	用途
人葡萄糖脑苷脂酶	烟草	治疗高歇斯症
人血清白蛋白	马铃薯、烟草	治疗肝硬化
人血红蛋白	烟草	血液代用品
人表皮生长因子	烟草	烧伤修复
人粒细胞-巨噬细胞	烟草	治疗中性粒细胞减少症
人-β干扰素	烟草	治疗乙、丙型肝炎
人α-1抗胰蛋白酶	烟草	治疗抗α-1胰蛋白酶缺陷(A1AD)性肺气肿
人乳汁蛋白	马铃薯	乳汁蛋白
水蛭素	油菜、拟南芥	凝血酶抑制剂
α天花粉蛋白	栝楼	治疗艾滋病

3.4 生长因子在转基因植物中的表达及其应用

生长因子是一类刺激细胞增殖的多肽类物质,它通过与特异的、高亲和性的细胞膜上的受体结合而起作用。生长因子存在于血小板和各种不同的成体和胚胎组织中。生长因子受体普遍存在,许多细胞表面同时存在一种以上的生长因子受体。生长因子受体具有蛋白激酶活性,当生长因子作用于细胞时,通过一系列的信号转导,最终引起细胞内有关增殖基因的表达,从而发挥其刺激作用。生长因子被用于治疗创伤、烧伤、骨折愈合、传染病防治及癌症等多种疾病。Gans 等在转基因烟草种子中表达了鼠粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF),基因表达和蛋白分析表明 GM-CSF 具有种子特异性,植物源 GM-CSF 可引起免疫反应,它的生物活性与人的白介素-2(IL-2)、IL-4 和人表皮生长因子(HEGF)、促红细胞生成素(EPO)等已在植物表达系统中得到了表达。

4 存在的问题及对策

虽然利用转基因植物生产药用蛋白的研究已取得了丰硕的成果,但是要发展成为一个廉价、高效、大规模的成熟的生物反应系统,还需解决一系列问题,同时植物生物反应器引起的生物安全性问题也需要认真对待。

4.1 安全性问题

转基因植物引起的生物安全性问题主要包括转基因后引

发植物致病的可能性,基因漂流至相关物种的可能性,演变成杂草的可能性以及对非靶生物和生态环境的影响。另外,转基因植物中外源基因编码蛋白是否含有过敏源,是否会发生转移,非目的基因如启动子,载体骨架序列和基因标记等方面引起的安全性也引起了人们的广泛重视。

4.2 蛋白表达量低

如何提高药用蛋白在转基因植物中的产量已成为该项技术的关键,研究表明可以通过以下几个方面来提高外源蛋白在植物体内的表达:(1)对密码子进行优化。采用定点诱变法降低保守序列的 AT 含量,增加植物偏爱密码子的含量,去除原序列中影响 mRNA 稳定的元件。(2)在构建载体过程中,使外源基因带上合适的 5'端先导序列和 3'端 URT 区,如 5'端的 Ω 序列、kozak 序列和 3'的 poly(A)序列、切割序列和加工序列等,以提高转基因表达效率和稳定性。(3)将外源基因与植物的特异蛋白基因及其调控序列连接,使重组蛋白在植物中的表达具有器官或组织特异性以提高外源蛋白的表达量,同时可以简化蛋白的提取纯化过程。(4)将核基质结合区(MAR)序列置于目的基因的两侧,构建成 MAR-gene-MAR 结构,在转基因植物的染色质中形成独立的区域,而不受周围宿主染色质顺式调控元件的影响,既可避免外源基因表达的位置效应影响,又可提高外源基因在转化细胞中的稳定性和表达水平。

总之,如何提高外源蛋白在植物体内的表达量,直接影响到植物生物产品的纯化等下游加工成本和转基因植物药物的商业化及产业化进程。虽然目前利用转基因植物生产药用蛋白还存在诸多亟待解决的技术问题,但随着医药生物技术和植物基因工程的有机结合和不断深入,转基因植物必将为药用蛋白的生产提供一条安全、廉价、高效的生物反应途径,加快“分子药田”的实现。

参考文献

- [1] Daniell H, Streatfield SJ, Wycoff K. Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants[J]. Trends Plant Sci, 2001,6:219-226
- [2] Ponstein AS, Bade JB, Verwoerd TC, et al. Stable expression of Phytase (phyA) in canola (Brassica napus) seeds: towards a commercial product [J]. Molecular Breeding, 2002,10:31-44
- [3] Arakawa T, Chong DK, Langridge WH, et al. Efficacy of a food plant-derived oral cholera toxin B subunit vaccine [J]. Nature Biotechnology, 1998,16:292-297
- [4] Tacket CO, Mason HS. A review of oral vaccination with transgenic vegetables[J]. Microbes Infect, 1999,1(10):777-783
- [5] Mason HS, Lam DM, Arntzen CJ. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plant [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992,89(24):11745-11749
- [6] Tacket CO, Mason HS, Losonsky G, et al. Immunogenicity in humans of a recombinant bacterial antigen delivered in a transgenic potato[J]. Nat Med, 1998,4(5):607-609
- [7] Daniell H, Lee SB, Panchai T, et al. Expression of the native cholera toxin B subunit gene and assembly of functional oligomers in transgenic tobacco chloroplasts[J]. Mol. Biol, 2001,311:1001-1009
- [8] Jani D, Singh ML, Mohammad Ruzwan-ul-Haq Q, et al. Expression of cholera toxin B subunit in transgenic tomato plants[J]. Transgenic

- Res, 2002,11:447 ~ 454
- [9] 王凌健,倪迪安,陈永宁,等.利用转基因胡萝卜表达肺结核疫苗[J].植物学报,2001,43(2):132 ~ 137
- [10] Smith ML, Keegan ME, Mason HS, et al. Factors important in the extraction, stability and in vitro assembly of the hepatitis B surface antigen derived from recombinant plant systems[J]. *Biotechnology Progress*, 2002,18:538 ~ 550
- [11] Smith ML, Mason HS, Shuler ML. Hepatitis B surface antigen (HbsAg) expression in plant cell culture: kinetics of antigen accumulation in batch culture and its intracellular form[J]. *Biotechnol. Bioeng*, 2002,80:812 ~ 822
- [12] Richter LJ, Thanavala Y, Arntzen CJ, et al. Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization[J]. *Nat. Biotechnology*, 2000,18:1167 ~ 1171
- [13] Kapusta J, Modelska A, Figlerowicz M, et al. A plant - derived edible vaccine against hepatitis B virus[J]. *FASEB J*, 1999,13:1796 ~ 1799
- [14] Nemchinov LG, Liang TJ, Rifaat MM, et al. Development of a plant - derived subunit vaccine candidate against hepatitis C virus[J]. *Arch Virol*, 2000,145:2557 ~ 2573
- [15] Tackaberry ES, Dudani AK, Prior F, et al. Development of biopharmaceutical in plant expression systems: cloning, expression and immunological reactivity of human cytomegalovirus glycoprotein B(UL55) in seeds of transgenic tobacco[J]. *Vaccine*, 1999,17:3020 ~ 3029
- [16] Castanon S, Marin MS, Martin - Alonso JM, et al. Immunization with potato plants expressing VP60 protein protects against rabbit hemorrhagic disease virus[J]. *Virol*, 1999,73:4452 ~ 4455
- [17] Dus Santos MJ, Wigdorovitz A, Trono K, et al. A novel methodology to develop a foot and mouth disease virus (FMDV) peptide - based vaccine in transgenic plants[J]. *Vaccine*, 2002,20:1141 ~ 1147
- [18] Tuboly T, Yu W, Bailey A, et al. Immunogenicity of porcine transmissible gastroenteritis virus spike protein expressed in plants[J]. *Vaccine*, 2000,18:2023 ~ 2028
- [19] Lamphear BJ, Streatfield SJ, Jilka JM, et al. Delivery of subunit vaccines in maize seed[J]. *Controlled Release*, 2002,85:169 ~ 180
- [20] Ashraf S, Singh PK, Yadav DK, et al. High level expression of surface glycoprotein of rabies virus in tobacco leaves and its immunoprotective activity in mice[J]. *J Biotechnol*. 2005,119(1):1 ~ 14
- [21] Yusibov V, Hooper DC, Spitsin SV, et al. Expression in plants and immunogenicity of plant virus - based experimental rabies vaccine[J]. *Vaccine*, 2002,20:3155 ~ 3164
- [22] Tacket CO, Mason HS, Losonsky, G, et al. Human immune responses to a novel Norwalk virus vaccine delivered in transgenic potatoes[J]. *Infect. Dis*, 2000,182:302 ~ 305
- [23] Mason HS, Ball JM, Shi JJ, et al. Expression of Norwalk virus capsid protein in transgenic tobacco and potato and its oral immunogenicity in mice[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996,93:5335 ~ 5340
- [24] Tuboly T, Yu W, Bailey A, et al. Immunogenicity of porcine transmissible gastroenteritis virus spike protein expressed in plants[J]. *Vaccine*, 2000,18:2023 ~ 2028
- [25] Huang Z, Dry I, Webster D, et al. Plant - derived measles virus hemagglutinin protein induces neutralizing antibodies in mice[J]. *Vaccine*, 2001,19:2163 ~ 2171
- [26] 宋长征, Hugh S Mason. 禽流感病毒血凝素疫苗在转基因马铃薯中的表达[J]. *生物技术*, 2001,11(5):4 ~ 5
- [27] Turpen TH, Reindl SJ, Charoenvit Y, et al. Malarial epitopes expressed on the surface of recombinant tobacco mosaic virus[J]. *Biotechnology*, 1995,13:53 ~ 57
- [28] Wang XG, Zhang GH, Liu CX, et al. Purified cholera toxin B subunit from transgenic tobacco plants possesses authentic antigenicity [J]. *Biotechnol. Bioeng.*, 2001,72(4):490 ~ 494
- [29] 任志强,刘惠民,李润植,等.转基因植物作为生物反应器在疫苗生产中的应用[J]. *中国生物工程杂志*, 2003,23(6):31 ~ 35
- [30] Majk C, Hiatt A, Hein MB, et al. Generation and assembly of secretory antibodies in plant[J]. *Science*, 1995,268:716 ~ 719
- [31] Ma JK, Hikmat BY, Wycoff K, et al. Characterization of a recombinant plant monoclonal secretory antibody and preventive immunotherapy in humans[J]. *Nat Med*, 1998,4:601 ~ 606
- [32] Verch T, Yusibov V, Koprowski H. Expression and assembly of a full - length monoclonal antibody in plants using a plant virus vector[J]. *J Immunol. Methods*, 1998,220:69 ~ 75
- [33] Wigdorovitz A, Carrillo C, Dus Santos MJ, et al. Induction of a protective antibody response to foot and mouth disease in mice following oral or parenteral immunization with alfalfa transgenic plants expressing the viral structural protein VP1[J]. *Virology*, 1999,255:347 ~ 353
- [34] Khoudi H, Laberge S, Ferullo J M, et al. Production of a diagnostic monoclonal antibody in perennial alfalfa plants[J]. *Biotechnol. Bioeng.*, 1999,64:135 ~ 143
- [35] McCormick AA, Kumagai MH, Hanley K, et al. Rapid production of specific vaccines for lymphoma by expression of the tumor - derived single - chain Fv epitopes in tobacco plants[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999,96:703 ~ 708
- [36] Stoger E, Vaquero C, Torres E, et al. Cereal crops as viable production and storage systems for pharmaceutical scFv antibodies[J]. *Plant Mol Biol*, 2000,42:583 ~ 590
- [37] Gidding G, Allison G, Brooks D, et al. Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals[J]. *Nat Biotechnol*, 2000,18:1151 ~ 1155
- [38] Sharp JM, Doran PM. Characterization of monoclonal antibody fragments produced by plant cells[J]. *Biotechnol. Bioeng.*, 2001,(73):338 ~ 346
- [39] Hood E, Witcher D, Maddock S, et al. Commercial production of Avidin from transgenic maize: characterization of transformant, production, processing, extraction, and purification[J]. *Mol Breed*, 1997,3:291 ~ 306