

## 展望即将到来的“分子农业”

焦瑞身\*

(中国科学院上海植物生理生态研究所 上海 200032)

**摘 要** 在过去 20 余年里 植物生物技术领域中最值得重视的是多种转基因植物的建成 ,并已在一些国家大面积种植。转基因植物另一方面的进展是合成有医疗价值的多肽、蛋白质、包括抗体、抗体表位、复杂蛋白质等。这里主要介绍转基因植物生产的医疗用多肽、蛋白质 ,特别是作为口服疫苗在动物和临床试验的成功 ,预示这种新的用药途径将对第三世界人民的健康起到重大作用。由于转基因口服疫苗不需通过常规发酵反应器 ,仅仅依赖于农业 ,因此有人提出“分子农业”一词 ,以显示其优越性。

**关键词** 分子农业 ,转基因植物 ,口服疫苗

中图分类号 S188 文献标识码 C 文章编号 1000-3061(2001)04-0361-04

在 20 世纪最后 20 年里 植物生物技术显示多方面的进展 其中最值得提出的是多种转基因作物的获得。远在 80 年代初期 ,学者们就致力于植物的遗传转化 ,至今己有多种转基因植物的报道。受体植物主要是粮食作物和经济作物 ,如水稻、玉米、棉花、番茄、辣椒、甜菜、大豆 ,以及杨树。所用转基因是抗病毒、抗细菌、抗虫、抗除草剂<sup>[1]</sup>。根据 1997 年的统计 ,全球己有 12 种作物的 48 个转基因作物获准商业化生产 ,转基因作物种植面积己达 1280 万公顷<sup>[2]</sup>。我国科学家首先成功的是抗病烟草 ,随后报道了抗细菌转基因水稻、抗虫转基因棉花、抗虫转基因欧洲黑杨<sup>[3]</sup>。

转基因植物另一方面的开拓是医用产物的生产。Hiatt 等人在 1989 年报道转基因烟草能将两个重组基因产物正确折叠和装配 ,产生具有与哺乳动物产物有相同功能的抗体<sup>[4]</sup>。这是从植物细胞生产具有医疗功能抗体的一个突破性工作。随后 ,在植物细胞中表达医疗和诊断有价值的多肽、蛋白质引起多人的重视。1996 年 Ann N Y Acad Sci 刊出这一方面的论文集<sup>[5]</sup>。利用转基因植物生产医用蛋白质 ,其成本低廉 ,容易形成规模生产等是这一技术的有利条件 ;另外 ,开发可食用疫苗则是一个新的用药途径 ,特别是在第三世界 植物叶子作为可食用疫苗有重大意义。最近 Fischer 等根据这一趋势 ,提出利用农业生产廉价诊断蛋白质和抗体 ,取代微生物发酵技术 ,特名“分子农业”(Molecular farming)<sup>[6-8]</sup>。本文着重介绍以转基因作物为反应器 ,生产医疗用多肽、蛋白质的研究进展。

### 1 转基因植物生产医疗用多肽、蛋白质

#### 1.1 抗体 抗体片段

转基因植物成功表达的异源蛋白质己有多种。Cramer

等罗列已经报道的转基因植物细胞表达的哺乳动物蛋白质有血清白蛋白、人型-干扰素、人型 EPO、Leu-脑啡肽、兔肝细胞色素 P-450、仓鼠 3-羟基-3-甲基-戊二酰还原酶、鼠 IgG。多种哺乳动物蛋白质在转基因植物细胞积累的量可接近于 1%(放大计算可达 13~22kg/亩)<sup>[9]</sup>。在这些蛋白质中抗体生产特别受到重视 ,到目前己有多种抗体报道 ,包括单链分子到亚基分泌抗体 ,见表 1<sup>[10]</sup>。

表 1 转基因植物生产的抗体和抗体片段

Table 1 Antibodies and antibody fragments produced in transgenic plants<sup>a</sup>

Antibody form	Valency	Antigen
Single domain (dAb)	1	Substance P (neuropeptide)
Single chain Fv	1	Phytochrome
Single chain Fv	1	Artichoke mottled crinkle virus coat protein
IgM (lambda)	2	NH(4-hydroxy-3-nitro-phenyl) acetyl hapten
Fab 2IgG (Kappa)	2	Human creatine kinase
IgG (kappa)	2	Transition state analog
IgG (kappa)	2	Fungal cutinase
IgG [kappa] and IgG/ahybrids	2	<i>S. mutans</i> adhesin
SIg A/G	4	<i>S. mutans</i> adhesin

a. 上表中除 Fab、人体肌酸激酶和 IgG 在拟南芥表达外 ,其余均在烟草表达。

转基因植物生产抗体外 ,还可通过植物病毒生产疫苗抗原表位 (Vaccine epitopes) 。最早的实验是将 TMV 外壳蛋白中插入外源抗原表位(脊髓灰质炎病毒外壳蛋白的 8 个氨基酸)在大肠杆菌中表达这一重组蛋白 ,将 TMV 蛋白注入小鼠 即有对脊髓灰质炎病毒抗原表位专一性抗体产生。后来的

报道包括用马铃薯为载体,进行异源抗原表位的表达。这些工作的目的是将植物病毒疫苗作为食品组分,所谓食用疫苗<sup>[1]</sup>。

### 1.2 食用疫苗

作为食用疫苗必须能诱导粘膜免疫系统,因为人体和动物致病菌开始感染,首先接触的是消化道、呼吸道、泌尿生殖道的粘膜。粘膜免疫反应的诱导起始于 M-细胞识别抗体,再经过复杂过程形成免疫球蛋白(IgA),经与膜上分泌组份结合,形成分泌 IgA(SIgA),输入到腔道,SiGA 与专一性抗体表位作用,从而中和入侵的病原体。

Curtiss 和 Cardineau 首先在 1990 证明烟草能表达变异链球菌表面蛋白抗原 A( Spa A ),而且转基因烟草配入小鼠饲料,能引起粘膜对 Spa A 蛋白免疫反应,诱导的抗体有生物活性<sup>[12]</sup>。随后,有多人报道烟草和莴苣表达肝炎抗体<sup>[13,44]</sup>,马铃薯表达狂犬病毒抗原<sup>[15]</sup>,马铃薯和烟草表达霍乱抗原<sup>[16,47]</sup>,马铃薯表达人体细胞巨大病毒抗原<sup>[18]</sup>。表 2 概括了最近发表的转基因植物产生的抗体。

表 2 最近报道的转基因植物产生的抗原<sup>[19]</sup>

Table 2 Important recent examples of antigens produced in transgenic plants

Antigen	Source	Plant
CT-B	<i>Vibrio cholerae</i>	Potato
LT-B	ETEC	Tobacco/Potato
LT-B	ETEC	Potato
Insulin linked to CT-B	Human/ETEC	Potato
Capsid protein	Norwalk virus	Tobacco/Potato
Surface antigen	Hepatitis B virus	Tobacco
Malaria epitope	<i>Plasmodium spp</i>	Tobacco
V <sub>3</sub> loop of HIV-1	HIV	Tobacco
Rabies virus Drg24 antigene	Rabies virus	Tobacco/Spinach

CT-B: 霍乱毒素 B 亚基; ETEC: 产肠毒素 *E. coli*; LT-B: 热不稳定肠毒素 B 亚基。

近来的研究已集中应用植物产生的疫苗于人体和动物保护上。下面试举有关 LT-B 和 CT-B 免疫反应的结果。

在 1995 年 Haq 等人报道小鼠饲喂表达 LT-B 的马铃薯(2 $\mu$ g/g)后,在血清和粘膜产生 LT-B 的抗体。由于抗体表达水平不高,作者合成具有植物中翻译起始序列和密码子优化等特点的 LT-B 基因,在转基因马铃薯获得高水平表达,LT-B 蛋白达到 7.3 ~ 17.2 $\mu$ g/g 马铃薯。饲喂小鼠(剂量 20 ~ 50 $\mu$ g),在血清中产生 LT-B IgG,在肠道粘膜产生 IgA,均高于对照小鼠(服用 5 $\mu$ g 纯 LT-B)。服用 25 $\mu$ g LT-B 的小鼠肠道失水受到部分保护<sup>[20,21]</sup>。

Arakawa 等报道马铃薯中 CT-B 在内网质的表达,CT-B 折叠成天然的 5 聚体结构,具有全部免疫性。饲喂小鼠能降低 60% 腹泻流质在小肠积累<sup>[22,23]</sup>。

1997 年美国 FDA 批准,转基因植物生产抗体用于人类临床试验<sup>[24]</sup>。

i) 转基因马铃薯表达的细菌腹泻疫苗原大肠杆菌热不

稳定毒素(LT-B),对志愿者进行口服临床试验,证明表达 LT-B 马铃薯块茎在粘膜和全身免疫反应,与接受 10<sup>9</sup> 个产肠毒素大肠杆菌志愿者的反应相似。这是食用疫苗第一个人体临床报道,结果证明植物产生的重组 LT-B 通过口服可防止消化作用,并能诱导人体免疫反应。

ii) 另外的临床试验是口服乙肝表面抗原(HBsAg)和马铃薯表达的 Norwalk 病毒的粒子(VLPs)。

上面几个人类临床试验,证明植物细胞具有保护疫苗原不受消化作用,疫苗原能诱导人身和粘膜免疫反应,佐剂也可不用。

### 1.3 转基因植物生产复杂的医疗蛋白质

Cramer 等报道在转基因烟草表达两种具有医疗价值的复杂蛋白质,人体蛋白  $\alpha$  (Human protein C, hPC),与人体葡糖脑苷酯酶(Glucocerebrosidase, hGC)。后者是治疗遗传病高歇病(Gaucher disease)的药物,来源困难,价格极为昂贵。高歇病是溶酶体缺陷葡糖脑苷酯酶,引起葡糖脑苷酯积累于骨髓、脾、肝、网状皮细胞中,导致骨髓肿大、内脏巨大的一种疾病,患高歇病严重的婴儿和幼儿,会影响到中枢神经系统和呼吸。临床治疗应用人胎盘提取的葡糖脑苷酯酶,可缓解症状,但须终生服用,因此这一疾病的医疗费是患者的极大负担。Cramer 等的转基因烟草叶片的粗提取物中 hGC 可达可溶性蛋白的 10%,按这一水平估算,一棵烟草即可提供一个治疗剂量。看来转基因烟草生产 hGC 是有前景的。Cramer 等报道中提出另一个转基因蛋白质 hPC 也可能成为人的医疗蛋白质。他们的初步研究结果指出烟草中合成的 hPC 经历了与动物体中相似的加工,如糖基化、二硫键形成<sup>[9]</sup>。

## 2 转基因植物表达系统与常规生物反应器比较

分子农业的发展关键是能否将重组蛋白质在转基因植物高水平表达。到目前为止,多方面的报道证明植物可以高水平表达具有功能的重组蛋白质,如重组抗体和疫苗、激素、细胞因子、血清蛋白。再者,植物生长条件是阳光、无机盐和水分,容易发展到农业生产规模,而且生产安全,成本低廉。和常规微生物生产技术相比,植物生产重组蛋白质具有诸多优点,如表 3 所示<sup>[6]</sup>。

转基因植物作为反应器,目标产物可导向到叶片、种子、和块茎(马铃薯),叶片包括细胞间区、叶绿体、内质网膜(ER)细胞质中,内质网膜和细胞间区已是成熟工艺。在种子表达,可长期保存,ScFr 可达到总可溶蛋白的 0.2%。

## 3 植物生产转基因蛋白质的下游处理

构建重组蛋白质在转基因植物表达,首先应考虑的是蛋白质定向于何种植物组织,如细胞间区、叶绿体、内质网、细胞质、叶片或种子,定向组织不同,下游处理随之而异。

关于转基因植物表达抗体的下游处理,Fischer 等认为从植物叶片和种子提取抗体和抗体片段,与从动物材料,如腹水、杂交瘤上清液,或动物细胞发酵液相似,如图 1 所示<sup>[6]</sup>。图中表示提取、纯化步骤,以及重组蛋白质的各种分析。

表 3 转基因植物生产重组蛋白质与常规技术的比较

Table 3 Comparison of features of recombinant protein production in plants yeast and conventional systems

	Transgenic plant	Plant virus	Yeast	Bacteria	Mammals cell	Transgenic animal
Risk*	Unknown	Unknown	Unknown	Yes	Yes	Yes
Production cost	Low	Low	Medium	Medium	High	High
Time effort	High	Low	Medium	Low	High	High
Scale-up cost	Low	Low	High <sup>+</sup>	High <sup>+</sup>	High <sup>+</sup>	High
Production yields	High	Very high	High	Medium	Medium-High	High
Gene size	Not limited	Limited	Unknown	Unknown	Limited	Limited
Glycosylation	Correct?	Correct?	Wrong	Missing	Correct	Correct
Storage	Room temperature	-20°C	-20°C	-20°C	Expensive/N <sub>2</sub>	?/N <sub>2</sub>

\* 残留的病毒序列 致癌基因和内毒素 ;+ 指大罐规模

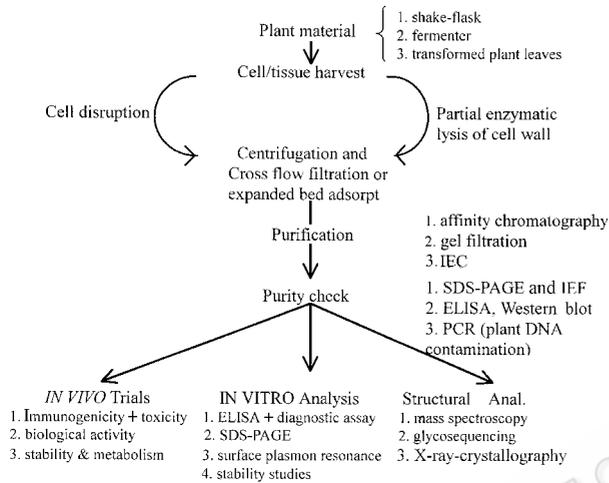


图 1 植物材料重组抗体的提取和分析

Fig.1 Downstream and analysis of recombinant antibodies from plants<sup>[6]</sup>

IEC: 离子交换层析; IEF: 等电聚焦

作为口服疫苗的转基因材料,不需经过上述纯化手续,但作为口服医疗药物,其生产、加工、储藏等都应按医疗卫生部门的要求,采用 GMP、GLP 类似的加工过程。

#### 4 转基因植物生产医疗蛋白质成本分析

如上所述,转基因植物生产的多种医疗蛋白质已有成功的动物试验和人体临床试验报道,对此人们似不再有所怀疑。但很少研究室或公司提供具体生产规模的成本分析。

Meristem Therapeutic 公司对基因玉米生产重组蛋白质进行 500kg 以上转基因玉米,生产公斤级规模,纯度达 99% 的重组蛋白质的中试的下游处理的经验。对多项技术指标进行了考察,如异源蛋白质表达水平(0.75、1.5、3、5mg 蛋白/g 谷粒),纯化产量(20%~60%),年产量(0.1、1、10 和 100 吨),蛋白质纯度(>99.9%),生产组织(GMP),下游步骤(抽提,中间物纯化,精制,超滤,冰冻干燥)等。

该公司转基因植物生产的经济指标与文献报道的其他生产重组医疗蛋白质作了比较,结果如表 4<sup>[25]</sup>。

如表 4 数字所示,转基因作物生产医疗蛋白质成本是最低的,这也是人们意料中的。

#### 5 结 语

本文介绍近年转基因植物合成有医疗价值的多肽、蛋白

表 4 重组医疗蛋白质生产成本的比较(年产约 1 吨的规模)

Table 4 Cost comparison of recombinant therapeutic proteins (at scale of annual one ton)

Production system	Cost range (US \$ / g)
Yeast	50 ~ 100
Transgenic animal	23 ~ 25 <sup>[26]</sup>
Transgenic animal	39 <sup>[27]</sup>
CHO	1000 ~ 5000 <sup>[28]</sup>
Transgenic plant	13 ~ 14

质,包括抗体、抗体表位,特别注意到口服疫苗的研制,以及人体临床试验的结果。另外,也扼要提及其他来源困难的复杂的医疗蛋白质的生产。文中对用转基因植物生产蛋白类物质的方法与常规生物反应器(发酵罐)工艺进行了比较,显示前者确有优势,特别是生产口服疫苗,成本将大幅度降低。有关植物材料中,重组蛋白质的提取、纯化也简略作了介绍。

即将到来的“分子农业”,即利用转基因植物合成医疗用蛋白质,特别是口服疫苗,不需常规微生物发酵工艺,只依赖农业技术即可完成,因此,分子农业的实现将为第三世界广大地区的人民健康带来福音。

#### REFERENCES(参考文献)

- [1] Xu Zhi-Hong(许智宏).《Plant Biotechnology》,Shanghai:Shanghai Science and Technology Publishing Co.(上海科学技术出版社),1998,pp.348~366
- [2] James C.《Global Status of Transgenic Crops in 1997》,ISAAA Briefs,1997
- [3] MANG K(Q 莽克强) et al.《Agricultural Biotechnology》,Beijing:Chemical Industry Publication Co.(化工出版社),1998,pp.1~13
- [4] Hiatt A,Cafferkey R,Bowdish K.Production of antibodies in transgenic plants. *Nature*,1989,342:76~78
- [5] Collins G B,Shepherd R J.Engineering plants for commercial products and applications. *Ann N Y Acad Sci*,1996,792:1~181
- [6] Fischer R,Drossard J,Commandeur U et al.Towards molecular farming in the future:moving from diagnostic protein and antibody production in microbes to plants. *Biotechnol Appl Biochem*,1999,30:101~108
- [7] Fischer R,Emans N,Schuster F et al.Towards molecular farming in the future:using plant-cell-suspension cultures as bioreactors. *Bio-*

- [ 8 ] Fischer R ,Vaquero-Martin C ,Sack M *et al.* Towards molecular farming in the future :transient protein expression in plants. *Biotechnol Appl Biochem* ,1999 ,**30** :113 ~ 116
- [ 9 ] Cramer C L ,Weissenborn D L ,Oishi K K *et al.* Bioproduction of human enzymes in transgenic tobacco. *Ann N Y Acad Sci* ,1996 **792** :62 ~ 71
- [ 10 ] Ma J K C ,Hei M B. Antibody production and engineering in plants. *Ann N Y Acad Sci* ,1996 **792** :72 ~ 86
- [ 11 ] Beachy R N ,Fitcher J H ,Hei M B. Use of plants viruses for delivery of vaccine epitopes. *Ann N Y Acad Sci* ,1996 **792** :43 ~ 49
- [ 12 ] Curtiss R ,Cardineau G A. World Intellectual Property Organization 1990 ,PCT/US89/03799
- [ 13 ] Herbers K ,Sonnewald U ,Production of new modified proteins in transgenic plants. *Current opinion in Biotechnology* . 1999 ,**10** :163 ~ 168
- [ 14 ] Arakawa T ,Yu J ,Chong D K X *et al.* A plant-based cholera toxin B subunitinsulin fusion protein pretects against the development of autoimmune diabetes. *Nat Biotechnol* ,1998 **16** :934 ~ 935
- [ 15 ] McGarvey P B ,Hammond J ,Dienelt M M *et al.* Expression of the rabies virus glycoprotein in transgenic tomatoes. *Biotechnology* ,1995 ,**13** :1484 ~ 1487
- [ 16 ] Hein M B ,Yeo T C ,Wang F *et al.* Expression of cholera toxin subunits in plants. *Ann N Y Acad Sci* ,1995 **792** :50 ~ 56
- [ 17 ] Walmsky A M ,Arntzen C J. Plants for delivery of edible vaccines. *Current Opinion in Biotechnology* 2000 **11** :126 ~ 129
- [ 18 ] Yusibov V ,Modelska A ,Steplewski K *et al.* Antigens produced in plants by infection with chimeric plant virus immunized against rabies virus and HIV-1. *Proc Natl Acad Sci USA* ,1997 **94** :5784 ~ 5786
- [ 19 ] Herbers K ,Sonnewald U. Production of new/modified proteins in transgenic plants. *Current Opinion in Biotechnology* ,1999 ,**10** :163 ~ 168
- [ 20 ] Haq T A ,Mason H S ,Clements J *et al.* Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants. *Science* , 1995 **268** :714 ~ 716
- [ 21 ] Mason H S ,Haq T A ,Clements J D *et al.* Edible vaccine protects mice against *E. coli* heat-labile enterotoxin ( LT ) :Potatoes expressing a synthetic LT-B gene. *Vaccine* ,1998 **16** :1336 ~ 1343
- [ 22 ] Arakawa T ,Chong D K X ,Lawrence M *et al.* Expression of cholera oral toxin B subunit in transgenic potato plants. *Transgenic Res* ,1997 ,**6** :403 ~ 413
- [ 23 ] Arakawa T ,Chong D K X ,Langridge W H R. Efficacy of a food plant-based oral cholera toxin B subunit vaccine. *Nat Biotechnol* ,1998 **16** :292 ~ 297
- [ 24 ] Tacket C O ,Mason H S ,Losonsky G *et al.* Immunogenicity in humans of a recombinant bacterial antigen delivered in a transgenic potato. *Nat Med* ,1998 **4** :607 ~ 609
- [ 25 ] Mison D ,Curling J. The industrial production cost of recombinant therapeutic proteins expressed in transgenic corn. *Biopharm* 2000 **13** ( 5 ) :48 ~ 54
- [ 26 ] Young M W *et al.* Transgenic go commercial. *Biopharm* ,1998 **11** ( 7 ) :24 ~ 28
- [ 27 ] Mckown R L. Construct manufacturing. *Gen Eng News* 1 Oct ,1998
- [ 28 ] Glacken M W. Economic analysis of a process to produce recombinant protein from transgenic plants , Abstract ,IBC Symposium Cost of Goods and Process Modeling Software( Washington D C ,1 Oct 1999 )

致 谢 感谢李金娣、马伟两位同志在本文写作过程中给予的帮助。

## Molecular Farming Has Come of Age

Jui-shen Chiao \*

( Shanghai Institute of Plant Physiology and Ecology ,Shanghai 200032 ,China )

**Abstract** Important development in plant biotechnology has been ushered in the 1990s ,the most astounding field is the establishment of various transgenic crops ,including cotton ,corn ,rice ,tomato *etc.* In addition ,utilization of transgenic plants for the generation of antibodies ,gene epitopes and complex proteins has drawn much attention recently. Among these results ,the use of plant parts with inducted antigens such as cholera toxin B subunit ,toxicogenic *E. coli* LT-B subunit as oral vaccines is attractive as a new route of medication. Considering their effectiveness as vaccines in animal and clinical tests ,and simple agricultural practice for large scale production it is anticipated that these antibodies are bound to offer impact to health care for people of the Third World. In this short review ,the laboratory and successful clinical test ,merits and demerits in comparison with the currently used bioreactors ,methods of extraction ,and cost estimation of transgenic plant products for medical purposes are briefly reviewed.

**Key words** molecular farming , transgenic plant , oral vaccine

Received :February 7 2001

\* Corresponding author. Tel 86-21-64042090 ,Fax 86-21-64042385

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>