

知識天地

基因治療和去氧核酸三螺旋研究的展望

甘魯生（化學研究所研究員）

1953 年 2 月 28 日克瑞克 (F.H.C. Crick) 帶著幾乎要飛躍起來的興奮走進了位於開文迪須 (Cavendish) 實驗室附近的老鷹酒吧 (Eagle Pub)。逢人就說他和華森 (J.D. Watson) 發現了「生命的秘密」。他所指的就是後來發表的「核酸分子結構：去氧核酸 (DNA) 的構造」和「核酸結構在遺傳上的含義」(註一、二)。前篇論文述敘了 DNA 是由兩股方向相反的核酸鏈藉由互補的鹼基對連接而成。後篇解釋了遺傳物質代代相傳而不失真的秘密，正如克瑞克所期望的。他們發現的秘密不但為他們帶來了諾貝爾獎的榮譽 (註三)，也開啓了我們對 DNA 的研究一個正確的途徑。不過科學家們很快就發現 DNA 的結構不止雙螺旋 (duplex) 一種。它還有三螺旋 (triplex)、四螺旋 (quadruplex) 等。DNA 鏈本身也非一根硬梆梆的棍子般，它可以彎曲 (bending) 形成超級捲圈 (supercoil)，它也可以捲成一個圈 (loop) 成十字形 (cruciform) 結構。科學家也發現核酸在水溶液中的結構和它的環境因素如酸鹼度、正離子的種類和濃度、聚合胺的濃度以及自身的鹼基順序 (base sequence) 和濃度有密切關係。而且同一條核酸鏈可因環境因素之變化由一種結構轉換成另外一種結構。總之，核酸在生物體內的結構可以千變萬化的。

本文要討論之 DNA 三螺旋是以瑞奇 (Alexandra Rich) 為首的三人研究小組在 1957 年發表在美國化學會會誌上 (註四)。不過當時實驗的對象是 RNA 而非 DNA。瑞奇將一份聚合腺嘌呤 (polyA) 及二份子聚合尿嘧啶 (polyU) 混合，在紫外吸收光譜 (UV spectroscopy) 出現了減色 (hypochromicity) 效應，他認為是形成了 polyU:polyA:polyU，也就是核酸三螺旋。之後又發現聚合胞嘧啶 (polyC) 和寡鳥糞嘌呤 (oligoG) 混合，在 C 和 G 之比例為 1:2 時，也能產生三螺旋。後來也發現 DNA 也有相同的現象。核酸三螺旋的結構於焉產生。

DNA 三螺旋之結構

瑞奇認為在 polyU:polyA:polyU 三螺旋的結構如圖一：其中 polyU:polyA 部份是形成了華森和克瑞克所發現之雙螺旋，而第二條 polyU 的尿嘧啶隱身於雙螺旋大溝 (major groove) 之中和 polyA 上的腺嘌呤也有二個氫鍵形成所謂之 Hoogsteen 鹼基對 (圖二上)。這個結構在 20 世紀的末期由其他物理方法 (如核磁共振) 証明了瑞奇的推測是對的。三螺旋和雙螺旋中的鹼基對都有嚴格的專一性。若以 Hoogsteen 氫鍵連接的三螺旋是 T 對 AT 及 C 對 GC (圖二上)。若以反 Hoogsteen 式氫鍵連接除了 T 對 AT 及 C 對 GC 外，也可以 A 對 AT，G 對 GC (圖二下)。早期科學家猜想 DNA 三螺旋的結構是 A-RNA 型式，只因為 A-RNA 結構的大溝較 B-DNA 為大，第三條較容易進入，不過經研究之後發現在雙螺旋部份還是 B-DNA 結構，而第三條核酸鏈是 A-RNA 及 B-DNA 之混合。

DNA 三螺旋之特性

DNA 三螺旋和雙螺旋一樣有它的獨特性。比如說由三條鹼基數相同的 DNA 單鏈組成的三螺旋會直接分解成三條單鏈，而不是先分解成一條雙螺旋和一條單鏈。所以我們不能將三螺旋視為雙螺旋的衍生物 (註五)。更值得一提的是為了形成三螺旋，DNA 鏈能作 180 度折疊，我們稱之為 tight-turn (註六)。這是雙螺旋所沒有的，因為基於兩核酸鹼基之間化學鍵的應力，180 度折疊成信是不可能的。如今我們不但證明其為可能，而且能夠普遍存在。至於此種特異結構有沒有生物的意義目前尚不得而知，但是一個重要的研究課題。

DNA 三螺旋和基因治療

統而言之 DNA 三螺旋的形成提供了一個干涉 DNA 雙螺旋 (包括基因) 的方法和可能的應用。加州理工學院的德爾文 (Peter Dervan) 教授曾發表一篇論文說明以一條 18 個 DNA 鹼基鏈將一個 lamdaDNA 基因切成兩段 (註七)。也就是說用一段寡 DNA 鏈 (通常在 20 個鹼基左右，名之為『探針』) 來和雙螺旋的基因形成三螺旋之後，探針就可以和基因作用。由於氫鍵形成具有高度的專一性，所以作用點也是非常專一的。德爾文曾用不同鹼基順序的寡 DNA 鏈重複上述實驗則對 lamdaDNA 基因沒有作用。由此可以看出經由 DNA 三螺旋的形成可以直接和基因作用，且作用點是非常專一的，稱之為『由鹼基順序引導』(sequence directed)。這些是構成『基因治療』(gene therapy) 非常有利的條件。

DNA 三螺旋之作用方式

探針對基因的作用可分物理和化學二種。由於探針和部份基因結合而成三螺旋，所以也改變了這部份的物理結構和性能，影響了蛋白質（如限制酶、甲基酶、DNA 複製酶、m-RNA 合成酶等等）本來對基因該有的功能。如果作用的對象是癌細胞的基因，就可能達到了去除或抑制這些細胞的效果。在休士頓附近的安德遜癌症中心（Anderson Cancer Research Center）的研究團隊研究了用 DNA 三螺旋來治療乳癌（註八）。他們合成一段具有 23 個鹼基的探針：5'-AGGGAGGGAGGTAAGAAAAGGG-3'。它作用的地方是人類乳癌細胞（SK-BR-3）致癌基因 c-myc 的促進子（promoter）。實驗結果顯示在加入探針 4 小時之後 SK-BR-3 細胞之分裂被抑制了約 40%。若用鹼基順序不相干的探針則完全沒有抑制作用。可見 c-myc 促進子被三螺旋的形成而抑制了。可是在 24 小時之後 SK-BR-3 細胞的分裂又恢復到 75% 左右。這很可能是因為三螺旋又被分解的關係。若將探針和化學治療藥物 gemcitabine 一起使用，24 小時後 SK-BR-3 細胞的增生率可減至未加藥的 20%。若單獨用化療 SK-BR-3 細胞的增生率則為未加藥的 57%。顯然 DNA 三螺旋的形成有加成作用，也可延長藥效。這是一個利用 DNA 三螺旋消滅乳癌細胞一個相當有效的例子。

探針對基因第二種作用是化學方法。這方法是將化學基預先接在探針上。比如說前文所提的德爾文教授，他是將 EDTA 接在探針上，當它和 lamdaDNA 基因結合之後再啟動氧化作用，EDTA 氧化之後產生不穩定的自由基（free radical），它和附近的 DNA 作用如散彈槍一般將 DNA 的鏈打斷，自然妨礙了 DNA 該有的功能。可用的化學基的範圍很廣。有的像上述的切斷劑，也有嵌入劑。只要是要能達到破壞 DNA 正常功能之目的都可以考慮。

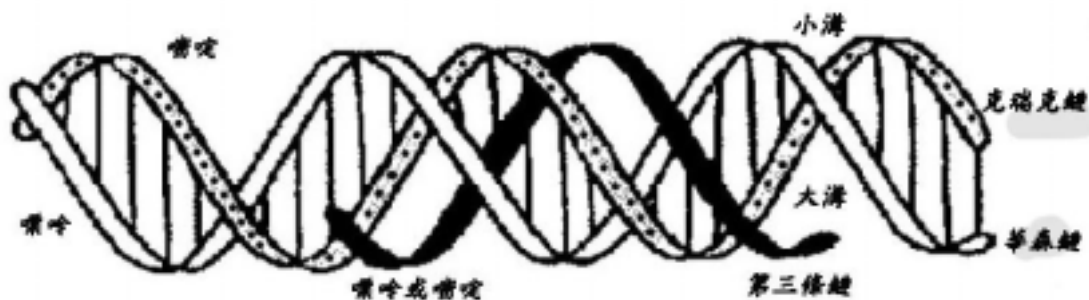
探針也可以用來做載具，可以在單鏈的探針上接一段雙螺旋，利用鹼基順序引導將雙螺旋送到特定位置就可以做基因重組。由以上的諸例可看出三螺旋對基因的作用是有很大的想像空間。所以 DNA 三螺旋作為基因治療的前景是很好的。到網站上搜尋就可以看許多相關的論文。可見這是一個相當熱門的研究領域。

DNA 三螺旋基礎研究的課題

應用研究必須要有紮實的基礎研究才能順利發展，當前的第一個課題是發展穩定度高的 DNA 三螺旋，原則上探針的核酸核苷的數目愈多，形成的三螺旋也就愈穩定。但是不能無限加長，因為長鏈可能其他的結構而橫生枝節，如此就會增加研究的困難，也不經濟。但也不能太短，太短則缺乏選擇性，不一定到達預定的目的位置。接在探針上的化學基也要穩定，不能在到目的地之前被分解了。第二個課題是發展不受基因鹼基順序的三螺旋，鹼基順序引導固然是個優點，但目前所知的限制太嚴。基因中一條鏈必須全是嘌呤才行（圖一）。比如上述治乳癌的探針 23 個鹼基中有 22 個是嘌呤。而基因中有大量的嘌呤在重要位置聚在一起並不多見。這樣的順序在基因中不易得到，所以就大大限制了 DNA 三螺旋在基因治療上的應用。第三是要將第三條鏈運送到細胞中，因為核酸鏈帶負電價，不能自由通過細胞膜。這些領域在過去十多年來多多少少都有些進展，但目前還沒有大的突破，所以

自由通過細胞膜。這些領域在過去十多年來多多少少都有些進展，但目前還沒有大的突破，所以

DNA 三螺旋的研究是很有發展空間的，大專院校或研究機構是理想的研究所在。



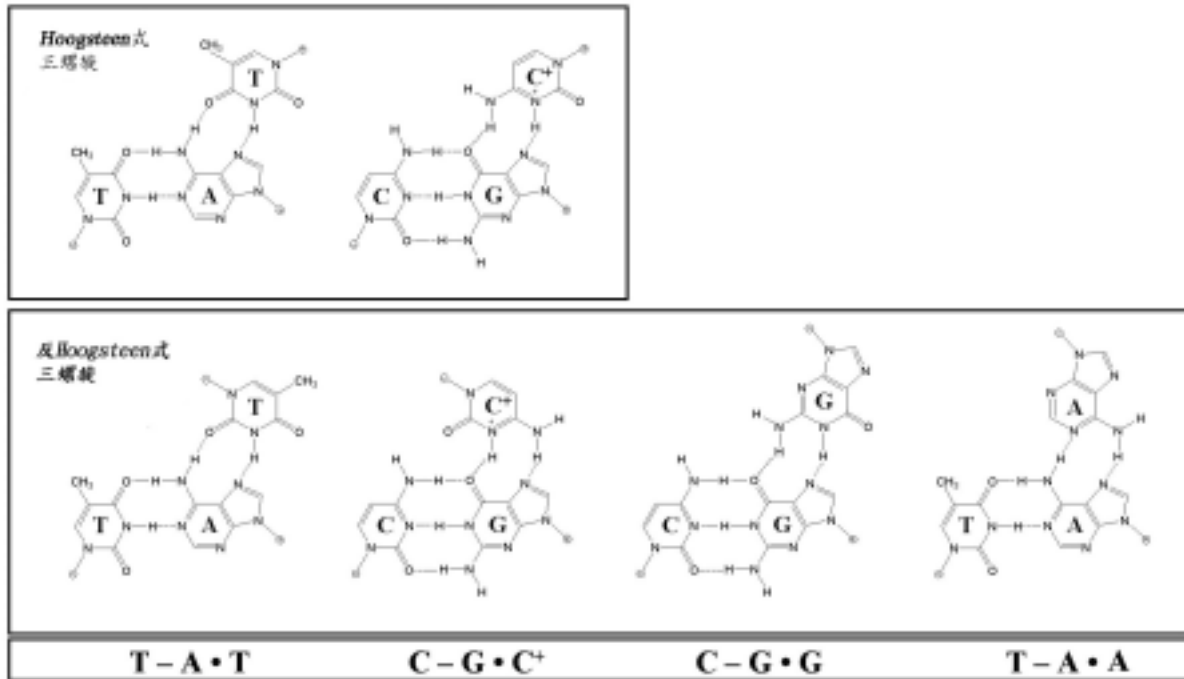
圖一：DNA 三螺旋示意圖。緞帶部份表示核酸骨架。白色及帶斑點為華森—克瑞克雙螺旋鏈。黑色為第三條鏈，它在雙螺旋大溝中。形成三螺旋要依下列條件：如華森鏈是嘌呤鹼基，克瑞克鏈則為嘔啶鹼基，第三條鏈則兩者皆可但不能混合存在。緞帶之間直線表鹼基，鹼基之間氫鍵如圖二。

展望

中醫和西醫最大的不同是中醫的用藥的種類和份量因人而異，而西醫則是一藥治所有人同樣的病。不過自人類基因解碼之後西醫也開始有藥物個人化的趨勢。西醫逐漸瞭解每個人對藥有不同的反應，它的依據就是各人的

基因不完全一樣。無可諱言，基因治療是將來醫療的趨向，因此 DNA 三螺旋的基礎和應用研究日漸重要，且需齊頭並進才是。

註一：Nature 1953; 171: 737；註二：Nature 1953; 171: 964；註三：1962 年諾貝爾醫學獎，一同得獎的還有維爾肯斯 (Maurice Wilkens)；註四：J. Amer. Chem. Soc. 1957; 79: 2023；註五：J. Biomol. Str. Dyn., 1991; 8: 911；註六：Biochemistry 2000; 39: 12457; Biophys. J. 2002; 3170; Biophys. J. 2006; in press (or BioFAST: July 7, 2006)；註七：J. Amer. Chem. Soc. 1988; 110: 7927；註八：Cancer Res. 2006; 66: 4089.



圖二：鹼基之間氫鍵示意圖。三螺旋有 Hoogsteen 及反 Hoogsteen 兩種。第三條鏈皆可和華森鏈形成兩條氫鍵。