

转录因子圈套策略研究进展*

王付龙^{1,2)} 徐祥^{1)**} 梁华平¹⁾ 刘昕¹⁾

(¹⁾第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所, 重庆 400042; ²⁾中国人民解放军第 285 医院, 邯郸 056001)

摘要 转录因子圈套策略 (transcription factor “decoy” strategy) 是应用与顺式元件相一致的寡核苷酸双链转染细胞, 竞争结合转录因子, 从而抑制内源性基因表达。此策略为基因治疗和基因调控研究提供了一个新手段。

关键词 圈套策略, 转录因子, 基因治疗, 基因调控

学科分类号 Q74L, R365, R45

1 转录因子圈套策略作用原理

正确的基因表达调控为机体正常发育和器官组织功能正常发挥所必需, 其中在转录水平调控更为重要。转录水平调控是通过转录因子来完成。不同的转录因子作用于不同的 DNA 基序 (motif), 调控不同基因的表达; 同时单一转录因子又可调控多个基因表达。若调控失衡, 特定的基因表达即受影响, 进而导致各种疾病。转录因子圈套策略是应用人工合成与转录因子作用的顺式元件 (*cis*-element) 相一致的高亲和力的寡核苷酸 (ODNs) 作为圈套 ODNs (如 E2F 转录因子作用的顺式元件基序正链为 5'-TTTCCCGG-3', 设计合成的圈套 ODNs 正链可为 5'-TTTCCCGG-3'; NF- κ B 作用的 κ B 基序正链为 5'-CGGGAATTTC-3', 圈套 ODNs 正链可为 5'-CGGGAATTTCCGGAATTTC-3', 或 3 个 κ B 基序首尾相连), 竞争抑制转录因子的功能,

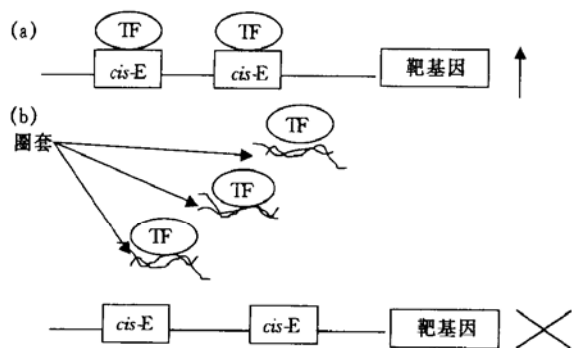


Fig. 1 Schematic diagram of decoy strategy

图 1 圈套策略示意图

(a) 基础状态下, 转录因子 (TF) 结合顺式元件 (*cis*-E), 靶基因进行表达; (b) TF 圈套结合 TF, 导致 TF 与 *cis*-E 不能结合, 靶基因的表达受到抑制。

使转录因子丧失与内源性基因作用的能力或从作用部位脱离, 导致基因表达抑制, 最终达到基因治疗和基因调控的目的 (图 1)^[1]。此策略简单有效, 成为基因治疗和调控内源性基因表达的研究热点。

2 基因治疗

2.1 转录因子 E2F 圈套与疾病

2.1.1 血管成形术后再狭窄: 血管成形术后约 40% 病人出现血管严重狭窄, 这是因为血管平滑肌细胞 (VSMC) 在多种活化的生长因子、细胞因子作用下, 穿过内弹力板窗迁移到内皮下间隙, 经活化的转录因子调节细胞周期相关基因的表达, 刺激有丝分裂导致内膜增殖。E2F 是调节细胞周期进程的主要转录因子, 上调早、晚期细胞周期基因如 *c-myc*、*c-myb*、TK、*cdc2*、PCNA 的表达。Mann^[2] 合成与内源基因顺式元件高度同源的 E2F 圈套 ODNs (5'-CTAGATTTCCCGCG-3', 划线区为 E2F DNA 基序), 于人体手术中转染移植的血管细胞, 发现: E2F 圈套组 PCNA 和 *c-myc* 的 mRNA 量分别下降 73%、70%, 杂合 ODNs (5'-TCCAGCTTCGTAGG-3') 组无明显改变 ($P < 0.0001$); E2F 圈套组较未用圈套组在移植血管的闭塞、变形、严重狭窄方面发生率显著降低。

2.1.2 肾小球肾炎: 肾小球的系膜细胞增殖和基质增生是肾小球疾患的重要特征。尽管许多生长因子和细胞因子, 如血小板生长因子 (PDGF)、血管紧张素 II、IL-1、IL-6 调节此发病过程, 但系膜

* 国家重点基础研究发展规划项目 (973) (G19990542) 和国家自然科学基金资助项目 (30080009)。

** 通讯联系人。

Tel: 023-68757431, E-mail: xuxiang75@cta.cq.cn

收稿日期: 2001-01-09, 接受日期: 2001-02-23

细胞增殖最终受细胞周期基因调控表达的影响,故应用 E2F 圈套治疗肾炎亦是行之有效的方案. Maeshima^[3]在体内外注射抗-THY1.1 抗体诱导鼠制成系膜增生模型后 36 h, 10 $\mu\text{mol/L}$ E2F ODNs 转染系膜细胞, 2 h 后, 发现系膜增殖受抑制达 71%, 增生细胞核抗原 (PCNA) mRNA 生成和蛋白质表达明显受抑.

2.1.3 眼科增生性疾病:增生性玻璃体视网膜病变、视网膜新生血管和小梁切除术后纤维化是目前眼科增生性疾病治疗的焦点. Akimoto 等^[4]应用 E2F 圈套体外转染白内障手术后获取培养的 Tenon's 成纤维细胞, 发现 *c-myc*、*cdc2*、PCNA mRNA 的水平明显受到抑制, 进入 S 期细胞较阳性对照组减少至 42.7%.

2.2 转录因子 NF- κ B 圈套与疾病

NF- κ B 能与免疫应答、炎症反应和细胞生长调控相关的许多细胞因子、粘附分子基因的启动子/增强子部位的 κ B 位点发生特异性结合, 启动和调节其转录, 成为相关疾病治疗的新靶点.

2.2.1 急性心肌梗塞:冠状动脉栓塞时应用的再灌注治疗可引起组织新的损害. 再灌注急性期和晚期多形核中性粒细胞 (PMN) 是介导内皮和心肌细胞损害的主要因素, 此过程中白细胞 $\beta 2$ 整合素和内皮细胞间粘附分子 (ICAM-1) 为 PMN 粘附血管提供受体是其发挥功能的前提. 研究表明, NF- κ B 是调节内皮细胞释放炎症因子、细胞间粘附分子的主要因子. Kupatt^[5]报道在离体鼠心脏缺血和再灌注 30 min 后, NF- κ B 出现活化, 60 min 后 ICAM-1 mRNA 水平增加. 应用 HVJ 脂质体转染 NF- κ B 圈套序列: 5'-AGTTGAGGGGACTTTCCAGGG-3' (划线区为 κ B 基序) 至离体心脏, 在灌注治疗 24 h 发现心肌损害明显改善; ICAM-1 与 PMN 的粘附作用受抑; TNF α 诱导的细胞因子 IL-6、IL-8 和静脉内皮细胞粘附分子 (VCAM)、细胞间粘附分子 (ICAM) 基因的表达受抑, 但其他因子的表达无明显影响. 杂合圈套或空载体对照组无此作用.

2.2.2 动脉粥样硬化:NF- κ B 促使炎症介质增加, 加快脂斑发展; 诱导促凝血酶活化、前列腺素和血小板活化因子合成, 下调血栓素抗凝血途径, 导致 VSMC 增殖, 加速斑块形成和再狭窄, 最终形成动脉硬化. Krzesz^[6]应用此圈套和 Stat-1 圈套共同抑制 VSMC 表达 CD40, 阻遏 CD40 与 T 细胞表达的 CD145 的作用, 进而使 VSMC 与 T 细胞作用减弱, 显著抑制粥样硬化的发展.

2.2.3 急性中风:急性缺血性中风本质是急性炎症过程, PMN 是主要参与者. Hess^[7]应用高渗甘露醇将含有 3 个 κ B 基序拷贝的 NF- κ B 圈套注入颈内动脉或大脑中动脉远端, 到达缺血梗塞灶. 在检测到脑血管内皮细胞内的 NF- κ B 圈套后取标本于体外模拟缺血/再灌注, 结果发现 ICAM-1 mRNA 水平较未用圈套组下降 70%, 细胞表面 ICAM-1 消失, 梗塞程度显著降低. Xu (1997 年) 应用此圈套抑制了中风大脑内皮细胞诱导型 NO 合酶基因的上调表达作用.

2.2.4 肿瘤:NF- κ B 特别是 RelA 亚基对肿瘤细胞的生长起重要作用, 它能上调 *c-myc*、*bcl-2* 等原癌基因的表达. 另外, 癌细胞表达较正常细胞更多的整合素受体分子分布于其表面, 使其易于与基底膜蛋白粘连发挥侵袭能力, 而整合素 αV 启动子区具有 κ B 基序, Sharma^[8]发现应用针对 RelA 的圈套显著抑制人 SW480 结肠癌和 K-BALB 鼠成纤维肉瘤细胞的生长, 整合素水平明显下降.

2.2.5 风湿病样骨关节炎:前炎症因子如 IL-1, TNF- α 过度表达是关节严重破坏的关键病理机制; 滑膜细胞是前炎症因子的主要来源, 特别是软骨盘连接处的细胞 IL-1 和 TNF α 的表达显著增多, 而 NF- κ B 活化是调控 IL-1 和 TNF α 基因表达的决定因素. Tomita 等^[9]制备关节炎模型 14 d 后, 将 NF- κ B 圈套注入鼠肿胀后爪关节腔, 7 d 后, IL-1 和 TNF α 水平明显降低; 63 d 发现, 杂合圈套组发生不规则骨增生覆盖关节面, 滑膜组织有大量细胞浸润, 关节软骨和次级软骨破坏, κ B 圈套组则显著改善关节的损害程度.

2.3 转录因子 AP-1 圈套与疾病

AP-1 与 DNA 序列 TGAGTCA 作用, 调控胶原蛋白酶、IL-2、TGF β 等基因表达, 其活性与细胞增殖密切相关; cAMP 反应元件 (CRE) 序列为 TGACGTCA, 与 AP-1 作用序列同源, 故 AP-1 转录因子与 CRE 存在相互作用. Park^[10]于体内应用 CRE 圈套腹腔内转染荷 HCT-15 人 MDR 结肠癌裸鼠, 4 周后肿瘤体积减少 85%. 体外试验发现其可抑制乳腺癌 MCF-7、肺癌 A549、前列腺癌 LN-CaP、结肠癌 LS174T 和 SW480、表皮样肿瘤等多种肿瘤细胞生长; CRE 圈套主要是阻断 AP-1-PKC 途径, 抑制 *c-myc* 原癌基因表达, 抑制肿瘤生长, 而对正常细胞无影响.

2.4 其他圈套策略

表达于 APC 细胞表面的 CD28 分子是抗原介

导 TCR 活化 T 细胞必需的协同刺激信号分子. 新近发现在体内抑制 CD28 表达会导致免疫抑制, 使 CD28 成为治疗自身免疫性疾病、器官移植、过敏性疾患的有效靶点. Tam (1999 年) 根据 CD28 基因调控区命名为 GR 的富集区序列 G4N4G4, 人工合成圈套 ODNs 体外转染 Jurkat 细胞, 阻断转录因子作用 CD28 序列, 抑制 CD28 的表达.

3 基因调控

圈套策略为体内基因调控和基因功能的研究亦提供重要手段. 作为“基因功能缺失”策略, 反义 RNA 策略是在转录后和翻译水平, 而圈套策略是在转录前和转录水平调控基因, 具有 ODNs 结构简单、易合成, 研究基因调控及病理生理作用和鉴别特异顺式元件等重要作用.

3.1 NF- κ B 圈套与基因调控

应用 NF- κ B 圈套研究肿瘤生长抑制明确了转录因子 NF- κ B 各亚基的功能. 文献报道在体内外应用反义 RNA 抑制 RelA 和其他亚基形成的同源或异源二聚体可使多种肿瘤生长受抑, 粘附作用丧失, 证明 RelA 调节多个不同基因, 但经典 NF- κ B₁/RelA 二聚体却无此作用. 为阐明同源或异源二聚体调节肿瘤生长作用, Sharma 等^[8]设计了经典 κ B 圈套, κ B 突变圈套, CK-1 (序列: 5'-GAGATTCAC-3', 与 RelA 作用位点同源) 圈套, CK-1 突变圈套, 反义 RelA RNA, 分别转染肿瘤细胞, “俘获”体内二聚体, 结果表明, 反义 RelA RNA 抑制肿瘤生长并阻断其粘附作用, 抑制 NF- κ B 活性; κ B 圈套: 不抑制肿瘤生长, 不阻断粘附作用, 抑制 NF- κ B 活性; CK-1 圈套: 抑制肿瘤生长, 抑制 NF- κ B 活性, 不阻断粘附作用. 由此表明 RelA 与其他亚基 (而非 NF- κ B₁) 形成的二聚体为肿瘤基因治疗的靶点.

NF- κ B 圈套也广泛应用于细胞凋亡方面的研究. Glazner^[11]在鼠海马和皮层神经中应用 κ B 圈套阻断 NF- κ B 来间接证明了三个不同的营养性保护因子——脑源神经营养因子、活化依赖神经营养因子和 TNF α 的减轻毒性因子的作用, 并证明 TNF α 通过神经酰胺活化 NF- κ B 来抑制氧化和兴奋毒物质的损害作用, 防止海马神经元凋亡, 为治疗早老性痴呆提供理论依据. Adderley^[12]应用 NF- κ B₁, NF- κ B₂, AP-1 圈套发现 NF- κ B₂, AP-1 圈套抑制心梗区、扩张型心肌病病变区心肌细胞的环氧化酶-2 (COX-2) 表达, 表明 COX-2 的表达受 NF-

κ B₂ 和 AP-1 的调控, 且 AP-1 基序是 COX-2 基因主要启动子元件. von Knethen (1999 年) 用非毒性剂量环 2, 3-二甲基-1, 4-萘醌对 RAW264.7 细胞预处理, 结果 S-亚硝基谷胱甘肽引起的凋亡受到抑制, p53 表达下调, COX-2 上调; NF- κ B₂, AP-1 圈套则取消上述效应, 导致凋亡.

3.2 SP1, SP3 圈套与基因调控

SP1、SP3 可调控与血液动力学相关的基因. 心房促尿钠肽受体 (NPR-A) 是心血管 VSMC 表达传递血管舒张信号的特异性肽, 但调节此基因的转录因子特性却不清楚. Liang 等^[13]应用 NPR-A 基因的调控序列中三个 GC 富集区相对应的圈套 ODNs 转染细胞, 出现 NPR-A 活性减弱, 证明圈套 ODNs 结合了激活内源性基因表达的由 SP1、SP3 组成的复合物, 从而运用圈套策略筛选出未知的转录因子. 同样, Yu (1999 年) 为研究目前仍不甚明了的生长激素 (GH) 受体基因调控因子, 应用圈套策略证明 SP1, SP3 介导 GH 受体基因表达, 且 SP3 作用更重要.

3.3 其他圈套策略与基因调控

血小板生长因子 β 受体 (PDGF β R) 启动子 C67 为公认基础启动子, 而 R30 亦为一调控序列, 但作用不详. Takata (1999 年) 应用 C67、R30 圈套转染 VSMC, PDGF β R 转录表达下降, 证明 C67 和 R30 两元件协同或相互作用调控 PDGF β R 的表达, 且 R30 是主要调控组织特异性基因表达的元件. Chen^[14]采用 α 胶原蛋白基因 (ColiA₂) 启动子-272 至-249 区碱基序列合成圈套, 明确内源性 Smad3 转录因子与启动子区 CAGACA 基序的作用介导 TGF β 诱导的 ColiA₂ 转录表达.

4 展 望

在人类基因组工作草图已初步勘定之际, 后基因组计划的任务将是功能基因的遴选和基因治疗的拓展, 反义策略特别是圈套策略的涌现为其提供了强大工具. 1996 年, E2F 圈套防治血管移植术后内膜增生于美国获 FDA 批准进入临床应用, 极大鼓舞圈套策略的发展. 但临床应用此策略仍存在一些尚未解决的问题, a. 圈套 ODNs 的非特异效应, 即针对某一靶基因的圈套 ODNs 也可导致其他无关基因的转录受抑或激活, 产生一些不良的病理生理反应; b. 含鸟嘌呤、胞嘧啶核苷的 ODNs 具有一定的免疫原性, 可导致机体发生免疫反应; c. 大剂量应用圈套可引起肝肾损害, 低血压及延长出血

时间; d. 圈套 ODNs 进入体内, 易被溶酶体酶降解, 导致其效用降低. 另外, 将报道基因和圈套策略联合运用, 可为研究评价转录因子对靶基因调控的能力以及基因的功能提供更大的帮助.

参 考 文 献

- 1 Morishita R, Higaki J, Tomita N, *et al.* Application of transcription factor "decoy" strategy as means of gene therapy and study of gene expression in cardiovascular disease. *Circ Res*, 1998, **82** (10): 1023~ 1028
- 2 Mann M J, Whittlemore A D, Donaldson M C, *et al.* Ex-vivo gene therapy of human vascular bypass grafts with E2F decoy: the prevent single-center, randomised, controlled trial. *The Lancet*, 1999, **354** (9189): 1493~ 1498
- 3 Maeshima Y, Kashiwara N, Yasuda T, *et al.* Inhibition of mesangial cell proliferation by E2F decoy oligodeoxynucleotide *in vitro* and *in vivo*. *J Clin Invest*, 1998, **101** (11): 2589~ 2597
- 4 Akimoto M, Hangai M, Okazaki K, *et al.* Growth inhibition of cultured human Tenon's fibroblastic cells by targeting the E2F transcription factor. *Exp Eye Res*, 1998, **67** (4): 395~ 401
- 5 Kupatt C, Habazettl H, Goedecke A, *et al.* Tumor necrosis factor- α contributes to ischemia and reperfusion-induced endothelial activation in isolated hearts. *Circ Res*, 1999, **84** (4): 392~ 400
- 6 Krzesz R, Wagner A H, Cattaruzza M, *et al.* Cytokine inducible CD40 gene expression in vascular smooth muscle cells is mediated by nuclear factor κ B and signal transducer and activator of transcription-1. *FEBS Lett*, 1999, **453** (1-2): 191~ 196
- 7 Hess D C, Honard E, Cheng C, *et al.* Hypertonic mannitol loading of NF- κ B transcription factor decoys in human brain microvascular endothelial cells blocks upregulation of ICAM-1. *Stroke*, 2000, **31** (5): 1179~ 1186
- 8 Sharma H W, Perez J R, Higgins Sochaski K, *et al.* Transcription factor decoy approach to decipher the role of NF- κ B in oncogenesis. *Anticancer Res*, 1996, **16** (1): 61~ 70
- 9 Tomita T, Takeuchi E, Tomita N, *et al.* Suppressed severity of collagen-induced arthritis by *in vivo* transcription of nuclear factor κ B decoy oligodeoxynucleotides as a gene therapy. *Arthritis Rheum*, 1999, **42** (12): 2532~ 2542
- 10 Park Y G, Nesterova M, Agrawal S, *et al.* Dual blockade of cyclic AMP response element- (CRE) and AP-1-directed transcription by CRE-transcription factor decoy oligonucleotide. *J Biol Chem*, 1999, **274** (3): 1573~ 1580
- 11 Glazner G W, Mattson M P. Differential effects of BDNF, ADNF9, and TNF α on levels of NMDA receptor subunits, calcium homeostasis and neuronal vulnerability to excitotoxicity. *Exp Neurol*, 2000, **161** (2): 442~ 452
- 12 Adderley S R, Fitzgerald D J. Oxidative damage of cardiomyocytes is limited by extracellular regulated kinases1/2-mediated induction of cyclooxygenase-2. *J Biol Chem*, 1999, **274** (8): 5038~ 5046
- 13 Liang F, Schaufele F, Gardner D G, *et al.* Sp1 dependence of natriuretic peptide receptor gene transcription in rat aortic smooth muscle cells. *Endocrinology*, 1999, **140** (4): 1695~ 1701
- 14 Chen S, Yuan W, Lo S, *et al.* Interaction of smad 3 with a proximal smad-binding element of the human α 2(I) procollagen gene promoter required for transcriptional activation by TGF- β . *J Cell Physiol*, 2000, **183** (3): 381~ 392

Progress in the Transcription Factor "Decoy" Strategy*

WANG Fu-Long^{1,2)}, XU Xiang^{1)**}, LIANG Hua-Ping¹⁾, LIU Xin¹⁾

⁽¹⁾ Research Institute of Surgery, Daping Hospital, the Third Military Medical College, Chongqing 400042, China;

⁽²⁾ The 285th Hospital, The People's Liberation Army of China, Handan 056001, China)

Abstract The transcription factor "decoy" strategy had been reported that applying double-strands oligodeoxynucleotides (ODNs) transfect target cells and compete with the sequence of endogenous *cis*-element for binding to transcription factor, thus leading to prevention of the endogenous gene expression. "Decoy" strategy was not only a novel strategy for gene therapy but also a powerful tool for the study endogenous gene regulation.

Key words "decoy" strategy, transcription factor, gene therapy, gene regulation

* This work was supported by grants from the Special Funds for Major State Basic Research of China (G19990542) and the National Natural Sciences Foundation of China (30080009).

** Corresponding author. Tel: 86-23-68757431, E-mail: xuxiang75@cta.cq.cn

Received: January 9, 2001 Accepted: February 23, 2001