

研究报告

以转录因子 AP-1 为靶的 decoy 核酸体
内外抗肿瘤研究

王雪根¹⁾ 叶青^{1)*} 陈武领¹⁾ 冯莹¹⁾ 韦策¹⁾ 刘晖¹⁾ 欧阳平凯²⁾

(¹⁾南京凯基生物科技发展有限公司, 南京 210009; ²⁾南京工业大学制药与生命科学学院, 南京 210009)

摘要 合成了双链寡聚核苷酸——decoy 核酸, 其与靶转录因子 AP-1 有高亲和性, 可进入细胞作为 decoy 顺式元件, 通过抑制特异的转录因子和调控区域的结合, 调控基因转录而改变基因的表达. 在体内外抗肿瘤试验中, decoy 核酸有显著抑制肿瘤细胞增殖的作用, 可以成为潜在性的肿瘤基因治疗药物.
关键词 转录因子 AP-1, decoy 核酸, 转录调控, 肿瘤
学科分类号 R7335

肿瘤细胞的重要特征之一是原癌基因的过度表达和抑癌基因的失活, 但这两类基因在正常细胞中也同时存在, 与肿瘤细胞相比只是表达水平存在显著差异, 此现象说明基因的调控出现异常. 如果能消除这种调控异常, 使基因表达恢复正常状态, 就可以达到治疗肿瘤的目的. 基因表达的调控包括转录水平调控、转录后调控 (mRNA 的剪接和编辑)、翻译水平的调控等. 目前一种基于转录调控水平的新型药物——decoy 核酸用于抗肿瘤研究在国外已有相关报道^[1,2]. 这种 decoy 核酸是合成的双链寡聚核苷酸 (decoy ODNs), 与靶转录因子具有高亲和性, 可进入细胞作为 decoy 顺式元件, 抑制特异的转录因子和调控区域的结合, 通过调控转录来改变基因的表达, 以达到治疗肿瘤的目的. 这是一类潜在性的基因治疗药物^[1].

本研究的 decoy 核酸是通过与转录因子 AP-1

特异结合, 从而抑制其与多种基因的启动子结合, 调控下游基因群表达, 抑制肿瘤细胞的增殖. 根据 AP-1 特异结合序列设计了 7 种 decoy 核酸, 体内及体外评价其对肿瘤细胞恶性增殖的抑制作用, 并研究了作用的特异性及抗癌谱. 相关的 decoy 核酸研究在国内尚未见报道.

1 材料与方法

1.1 decoy 核酸的设计和合成

从转录因子数据库 Transfac 及自建的凯基人类基因调控数据库中选取 AP-1 的结合序列. 并结合计算机辅助设计了 7 条 decoy 核酸, 其序列结构见表 1. 上述 decoy 寡聚核酸用 Applied Biosystem 391 DNA 合成仪合成并进行硫代化修饰, 用 90% 氨水于 55℃ 处理 15 h 脱去保护基, 经反相柱 (购自 Amersham Biosciences) 层析纯化而得.

Table 1 Sequence and characteristics of decoy ODNs¹⁾

No.	Length	Sequence (5'-3')	Characteristics
K101	40	5'-CGCTTCATGACTCAGCCGGA-3' 5'-TCCGGCTGACTCATGAAGCG-3'	Double-strand/linear
K102	23	5'-GTTACCTCAGCCCGTGAGGTAAC-3'	Single-strand/hairpin
K103	21	5'-TCAGTACTGACTCAGTACTGA-3'	Single-strand/hairpin
K104	24	5'-GTTACCTCAGCC-3' 5'-GGCTGAGGTAAC-3'	Double-strand/linear
K105	23	5'-TGAGTCAGTGACTCACTGACTCA-3'	Single-strand/hairpin
K106	21	5'-CTCCGGCTGACTCAGCCGGAG-3'	Single-strand/hairpin
K107	20	5'-CGCTTCATGACTCAGCCGGA-3'	Single-strand/linear
CRE	24	5'-TGACGTCATGACGTCATGACGTCA-3'	Single-strand/hairpin

¹⁾ Phosphorothioate oligonucleotides.

* 通讯联系人. Tel: 025-3111953, E-mail: yq3691@hotmail.com
收稿日期: 2003-05-22, 接受日期: 2003-06-30

1.2 主要试剂

RPMI 1640 培养基购自 Gibco 公司, 新生牛血清购自杭州四季青公司, LipofectAMINE™ 试剂购自 Invitrogen 公司, 噻唑蓝 (MTT) 购自 AMRESCO 公司.

1.3 细胞系

实验室所用的细胞系有: 肝癌细胞系 SMMC-7721 和 Bel-7402, 肺癌细胞系 NCI-H460 和 A549, 神经胶质瘤细胞系 U251, 乳腺癌细胞系 MCF-7, 鼻咽癌细胞系 CNE.

1.4 细胞增殖抑制活性的测定

用含 10% 的新生牛血清及 100 U/ml 青霉素、100 mg/L 链霉素的 RPMI 1640 培养液, 置 37℃、5% 的 CO₂ 培养箱培养, 将生长状态良好的细胞经过胰酶消化, 记数, 接种于 96 孔细胞培养板中, 每孔的细胞数量为 10 000 个, 细胞置于 37℃、5% CO₂ 的培养箱培养过夜, 在无血清的状态下, 采用 LipofectAMINE™, 并参照试剂盒说明书进行 decoy 寡核苷酸转染, decoy 寡核苷酸的浓度为 200 nmol/L, 每个浓度为 4 个孔, 每孔总体积为 100 μl, 并设置 4 个细胞对照孔, 细胞对照孔内加入含相同浓度 LipofectAMINE™ 的 RPMI 1640 培养液. 转染 5 h 后, 换含 10% 新生牛血清的 RPMI 1640 培养基培养 72 h, 然后用 MTT 的染色方法测定并计算细胞的增殖抑制率.

1.5 decoy 核酸对肿瘤细胞作用的特异性分析

分别合成设计的 decoy 寡核苷酸和与之相对应的错配系列, 按 1.4 方法进行抗肿瘤活性测定.

1.6 decoy 核酸抗瘤谱分析

在 96 孔板中培养肝癌细胞系 (SMMC-7721 和 Bel-7402), 肺癌细胞系 (NCI-H460 和 A549), 神经胶质瘤细胞系 (U251), 乳腺癌细胞系 (MCF-7), 鼻咽癌细胞系 (CNE). 按 1.4 方法进行细胞培养、脂质体转染并测定细胞增殖率.

1.7 decoy 核酸 K102 动物体内抑瘤率的测定

T 细胞免疫缺陷裸小鼠 (18 ~ 22 g, 6 周, 雌性) 购自中国药品生物制品检定所实验动物中心. 裸小鼠置于层流架中 SPF 条件饲养, 自由摄取食物和水. 将体外培养的肿瘤细胞接种于裸小鼠体内生长的第 3 代肿瘤作为瘤源进行试验, 无菌条件下取生长旺盛的瘤源, 以匀浆法制备成约 1×10^7 /ml 细胞悬液, 于裸小鼠皮下每鼠接种 0.2 ml. 接种 24 h 后, 将裸鼠分成四组, 每组 6 只, K102 + 生

理盐水组每日瘤周注射药物 0.1 ml, 剂量分别为 1.0 mg/kg, 5.0 mg/kg, 对照组为相应的生理盐水, K102 + 脂质体组每日瘤周注射药物 0.1 ml, 剂量为 1.0 mg/kg, 对照组为相应体积的空白脂质体. 待肿瘤可触及后, 动态观察各组肿瘤的生长情况, 每 3 天用游标卡尺测量各个肿瘤的大小, 按下式计算肿瘤的相对体积: $V = L \times W^2 \times 1/2$, 式中 V 为肿瘤的体积 (单位为 mm³), L 、 W 分别为瘤体最长和最短的两个径 (单位为 mm), 并称体重一次. 连续给药 20 天后, 处死各组动物, 剖取肿瘤称重.

1.8 凝胶阻抑分析

凝胶阻抑分析采用常规方法, 简述为: 采用 Dignam 等的方法^[3] 制备细胞核提取物, K102 用 [γ -³²P] ATP 和多核苷酸激酶进行 ³²P 标记, 细胞核提取物 (5 μg 蛋白质), 0.5 ng ³²P-K102, 2 μg poly dI-dC (抑制 K102 与核蛋白的非特异性结合) 和结合缓冲液 [10 mmol/L Tris (pH 7.5), 50 mmol/L NaCl, 1 mmol/L DTT, 1 mmol/L EDTA, 5% 甘油] 混合, 室温反应 20 min, 然后进行 4% 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 干胶后于 -70℃ 放射自显影.

2 实验结果

2.1 decoy 核酸的筛选

根据转录因子 AP-1 的特异结合序列, 设计出 7 种 decoy 核酸, 并对其体外抗肿瘤活性进行了评价 (图 1), 结果发现我们设计的 7 种 decoy 核酸中除 K107 外, 对 NCI-H460 肺癌细胞均有一定的抑制作用, 其中以 K102 抑制率最高, 达到 80% 以上, 进一步的实验以 K102 为实验对象.

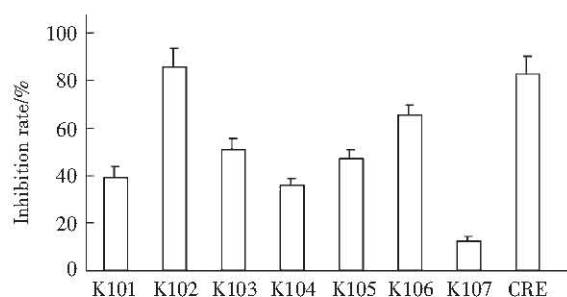


Fig. 1 Effect of decoy ODNs on NCI-H460 cells proliferation

2.2 decoy 核酸 K102 抗肿瘤作用的序列特异性

为了证明 decoy 核酸 K102 对细胞增殖抑制作用的特异性, 合成 decoy 核酸 K102 的错配序列 2 组 (C1 和 C2), C1 的序列为 5'-GACTTCACTGCCA-GCGTGGTAAC-3', C2 的序列为 5'-GTTACGCCAC-TCCGAGTGGTAAC-3', 设计时使错配序列与 K102 的碱基组成一样. 对这三组序列进行了体外抗肿瘤活性试验, 同时分别对正常肝细胞 L-02 进行了体外试验, 结果如图 2. 结果表明, 2 个错配序列对肿瘤细胞和正常细胞均无明显的抑制作用, 而 decoy 核酸 K102 对肿瘤细胞有明显的抑制作用, 而对正常细胞无明显的抑制作用, 这说明 decoy 核酸 K102 对肿瘤细胞的增殖抑制作用具有明显的序列特异性.

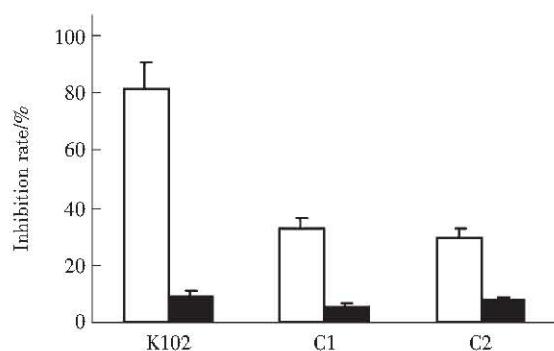


Fig. 2 Effect of decoy ODNs and its mismatch on NCI-H460 and L-02 cells proliferation

□: NCI-H460; ■: L-02.

2.3 decoy 核酸 K102 的抗瘤谱

肿瘤细胞的特征之一为恶性增殖, decoy 核酸是通过特异结合转录因子 AP-1, 改变下游基因表达状态, 从而抑制肿瘤细胞的恶性增殖, 因此测定了 K102 对不同肿瘤细胞增殖的抑制作用 (图 3). 结果显示, K102 对鼻咽癌细胞系 (CNE)、肺癌细胞系 (NCI-H460 和 A549)、神经胶质瘤细胞系 (U251)、乳腺癌细胞系 (MCF-7)、肝癌细胞系 (SMMC-7721 和 Bel-7402) 等细胞系均有不同程度的抑制作用, 其中对肺癌和神经胶质瘤的抑制作用最强, 抑制率达到 80%, 对鼻咽癌、乳腺癌和肝癌具有中等强度的抑制作用, 抑制率为 50% 左右. 这也说明 K102 在体外能抑制多种肿瘤细胞的生长, 是一种潜在的广谱抗肿瘤的新型药物, 具有一定的开发潜力. 图 4a 是生理盐水处理的 NCI-H460 细胞 (阴性对照), 而图 4b 是经 K102 药物脂质体转染 72 h 后的 NCI-H460 细胞; 图 4c 是生理盐水处

理的 U251 细胞, 而图 4d 是 K102 处理后的 U251. 从图 4 显示, 阴性对照组肿瘤细胞数量很多, 基本相连成片铺满底层, 说明生长旺盛, 而用 K102 处理后, 细胞数量显著减少, 仅存少量细胞无法连接成片, 还有许多细胞碎片, 说明 K102 能较明显地抑制肿瘤细胞的恶性增殖.

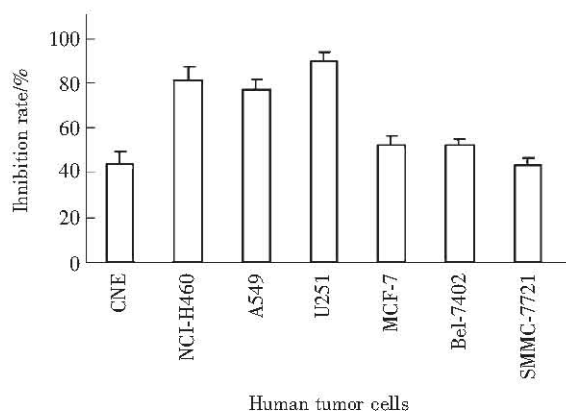


Fig. 3 Effect of decoy ODNs K102 on human tumor cells proliferation

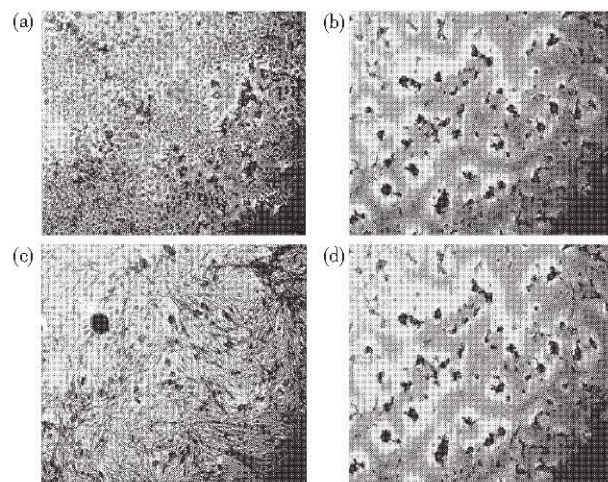


Fig. 4 Tumor cells treated by saline and decoy K102

(a) Saline-treated control NCI-H460 cells; (b) Decoy ODNs K102-treated NCI-H460 cells (200 nmol/L, 72h); (c) Saline-treated control U251 cells; (d) Decoy ODNs K102-treated U251 cells (200 nmol/L, 72 h).

2.4 decoy 核酸 K102 对裸鼠肿瘤生长的抑制

裸鼠在用药 7 天内, 给药组和阴性对照组相比, 肿瘤的体积并无差别, 从第 8 天开始就出现差异, 第 14 天两者就有明显的差异 (图 5). 从图 5 可以看出, 不论何种剂量的给药组, 瘤体积增长缓

慢,而阴性对照组瘤体积增长迅速. 1.0 mg/kg 组使瘤体积倍增 30 倍, 5.0 mg/kg 组使瘤体积倍增 24 倍, 1 mg/kg 药物脂质体组使瘤体积倍增 20 倍, 生理盐水阴性对照组使瘤体积倍增74倍. 而且给药期间, 所有裸鼠的体重都呈增长趋势, 随着肿瘤

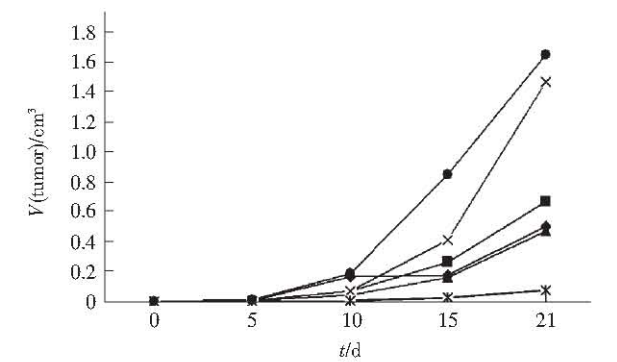


Fig. 5 Tumor growth inhibition *in vivo*
◆—◆: K102 + saline 5 mg/kg; ■—■: K102 + saline 1 mg/kg;
▲—▲: K102 + liposome 1 mg/kg; ×—×: Liposome control; *—*: CTX control; ●—●: Saline control.

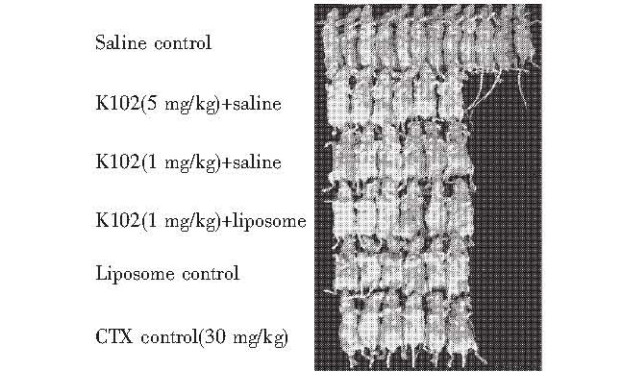


Fig. 6 NCI-H460 xenograft athymic nude mice

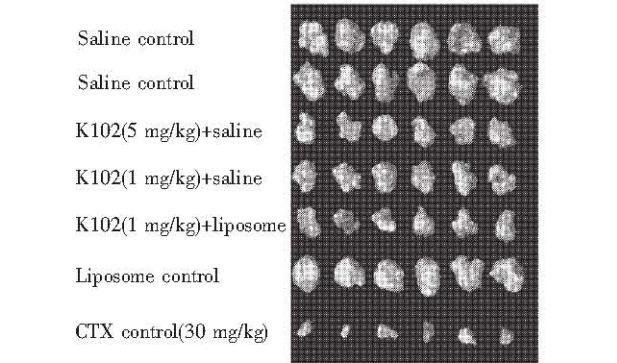


Fig. 7 NCI-H460 tumor after K102 treated under various concentration and control

体积的增大裸鼠的体重增加, 到了停止给药的时候, 给药组的裸鼠体重与生理盐水阴性对照组的裸鼠体重相差不大, 而且在给药期间给药组的裸鼠未见异常现象, 这说明药物的毒性非常小. 图 6 为各组给药 20 天后处死的荷瘤裸鼠, 图 7 为从处死的荷瘤裸鼠中剖取下来的肿瘤团块, 从中肉眼也可以观察到各组肿瘤的大小.

2.5 凝胶阻抑分析结果

按 1.8 方法, 电泳后放射自显影, 结果如图 8 所示: 1、3 泳道样品为³²P 标记的 K102 和核蛋白提取物结合复合物, 2、4 泳道样品为竞争性未标记的 K102 和³²P 标记的 K102 核蛋白提取物, 5 泳道样品仅³²P 标记的 K102 无核蛋白提取物, 结果说明 K102 与核蛋白产生了特异结合.

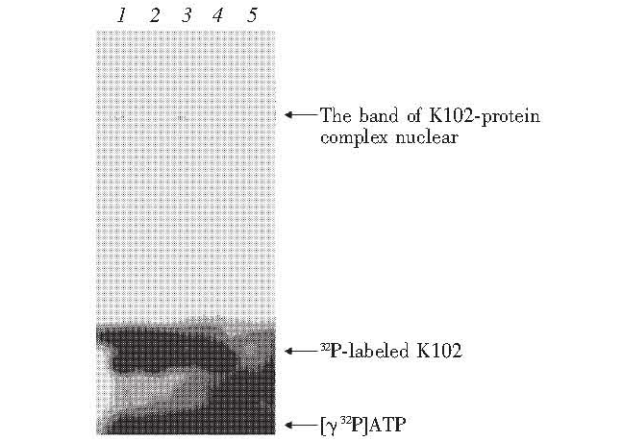


Fig. 8 Electrophoretic mobility shift of decoy ODNs K102
1, 3: ³²P-K102 + nuclear extract; 2, 4: K102 unlabeled + nuclear extract + ³²P-K102; 5: ³²P-K102.

3 讨 论

转录因子 AP-1 具有重要调控功能, 其由 JUN/FOS 或 JUN/JUN 二聚体组成, 而 C-JUN 和 C-FOS 是原癌基因, 在多种肿瘤中有异常表达. 如: C-JUN 在肺癌^[4]、结肠癌、直肠癌^[5]中过度表达, 在肿瘤发生时包括启动及促癌阶段伴随着 C-JUN 的高表达, C-JUN 和 C-FOS 在 RAS 信号传导途径下游的细胞核中起着重要的受体作用^[6]. 由 JUN 的同源二聚体和 JUN/FOS 的异源二聚体构成的 AP-1 转录因子, 是 C-MYC、MMP1、MMP3、GM-CSF、IL2、IL3、DPOLA、TGFβ1、TIMP1、CYCD1、MT2A、TNF、TSG6 等多种基因的转录调控因子. 调控上述多种基因的表达, 在肿瘤发生发展的基因活动网络中具有

关键作用, 对细胞的增殖、浸润转移、凋亡及转化、免疫调节、分化方面起着重要作用^[7,8]. 因此可将 AP-1 作为抗肿瘤的药物治疗靶点. 采用 decoy 核酸与 AP-1 产生特异结合, 抑制 AP-1 与其他下游基因启动子区域的结合, 从而改变基因异常的表达.

与 AP-1 结合的 decoy 核酸的设计是依据 Transfac 数据库及自建的凯基人类基因调控数据库. AP-1 是 bZIP 蛋白家族成员, 具有亮氨酸拉链结构, 可与含保守序列 TGASTCA 的基因启动子产生特异结合^[9]. 经参考分析对比上述数据库中 AP-1 结合的保守序列和自然序列, 结合 DNA 设计软件和转录因子结合位点搜索软件, 设计了 7 条 decoy 核酸序列. 其中 K101 是含 TGACTCA 保守序列的双链线性结构 (仅一个 AP-1 结合位点), 而 K103、K106 是含上述保守序列的发夹型结构. K105 是含 3 个 TGASTCA 的发夹型结构. K102 是含 TTACCTCA 的 JUN 结合位点^[10]的发夹型结构. K104 是含 TTACCTCA 的双链线性结构. K107 是含 TGACTCA 的单链线性结构. Control 阳性对照是 CRE 结合位点 decoy 核酸, 有报道其具有抑制肿瘤细胞生长作用^[11]. 从实验结果来分析, 上述 decoy 核酸除单链 K107 外, 对肿瘤细胞均有抑制活性, 其中以 K102 活性最高, 在保守序列基本相同条件下, 发夹型结构的活性高于双链线性结构的活性. 并证实 K102 对肿瘤的抑制具有序列特异性.

本研究通过 AP-1 的 decoy 核酸的设计、优化、体内外试验, 筛选出具有开发前景的新型肿瘤基因治疗潜在性药物, 并对 K102 药物的量效关系、毒

性反应进行了初步研究, 为进一步开发成药物提供基础依据.

参 考 文 献

- 1 Cho-Chung Y S, Park Y G, Nesterova M, *et al.* CRE-decoy oligonucleotide-inhibition of gene expression and tumor growth. *Mol Cell Biochem*, 2000, **212** (1~2): 29~34
- 2 Kawamura I, Morishita R, Tsujimoto S, *et al.* Intravenous injection of oligodeoxynucleotides to the NF-kappaB binding site inhibits hepatic metastasis of M5076 reticulosarcoma in mice. *Gene Therapy*, 2001, **8** (12): 905~912
- 3 Dignam J D, Lebovitz R M, Roeder R G. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res*, 1983, **11** (5): 1475~1489
- 4 Cook R, Miller Y, Bunn P J. Small cell lung cancer: etiology, clinical features, staging, and treatment. *Curr Probl Cancer*, 1993, **17** (2): 69~141
- 5 Magrisso I, Richmond R, Carter J, *et al.* Immunohistochemical detection of RAS, JUN, FOS, and p53 oncoprotein expression in human colorectal adenomas and carcinomas. *Lab Invest*, 1993, **69** (6): 674~681
- 6 Linardopoulos S, Papadakis E, Delakas D, *et al.* Human lung and bladder carcinoma tumors as compared to their adjacent normal tissue have elevated AP-1 activity associated with the retinoblastoma gene promoter. *Anticancer Res*, 1993, **13** (1): 257~262
- 7 Shaulian E, Karin M. AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene*, 2001, **20** (19): 2390~2400
- 8 Peter K V. Jun, the oncoprotein. *Oncogen*, 2001, **20** (19): 2365~2377
- 9 Lee W, Haslinger A, Karin M, *et al.* Activation of transcription by two factors that bind promoter and enhancer sequences of the human metallothionein gene and SV40. *Nature*, 1987, **325** (6102): 368~372
- 10 Muegge K, Vila M, Gusella G L, *et al.* Interleukin 1 induction of the c-jun promoter. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90** (15): 7054~7058

Antitumor Activity of Decoy Oligonucleotides Targeted to AP-1 *In vitro* and *In vivo*

WANG Xue-Gen¹⁾, YE Qing^{1)*}, CHEN Wu-Ling¹⁾,
FENG Ying¹⁾, WEI Ce¹⁾, LIU Hui¹⁾, OUYANG Ping-Kai²⁾

(¹⁾ Nanjing KeyGen Biotech. Inc., Nanjing 210002, China;

(²⁾ College of Chemistry and Chemical Engineering, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China)

Abstract Synthetic double-stranded oligonucleotides with high affinity for AP-1 transcription factor can be introduced into cells as decoy *cis*-elements to bind the factor and alter gene expression by competition with AP-1 element. This decoy oligonucleotide restrained tumor cell proliferation *in vitro* and *in vivo*, and has important cancer gene therapeutic potential.

Key words transcription factor AP-1, decoy oligonucleotide, transcription regulatory, tumor

* Corresponding author. Tel: 86-25-3111953, E-mail: yq3691@hotmail.com

Received: May 22, 2003 Accepted: June 30, 2003