

形成三螺旋 DNA 的寡核苷酸抑制内皮细胞组织因子基因的表达

李黔宁¹, 应大君², 戴光明¹, 郑健¹, 肖道虹¹, 邓志宽¹, 刘勇¹, 刘立杰¹, 周永琴¹, 任萍¹

(第三军医大学 1. 新桥医院神经内科; 2. 解剖学教研室, 重庆 400037)

[关键词] 寡核苷酸, 三螺旋型; 基因, 组织因子; 基因表达; 内皮, 血管

[摘要] 为探讨形成三螺旋 DNA 的寡核苷酸是否对切应力诱导内皮细胞组织因子基因表达有抑制作用, 针对内皮细胞组织因子基因启动子内切应力反应元件, 设计反向脱氧寡核苷酸序列 T21GTa, 采用固相亚磷酸胺三酯固相法合成脱氧寡核苷酸。在脱氧寡核苷酸的 3' 末端进行硫代磷酸酯修饰。应用电泳迁移分析观察寡核苷酸和硫代脱氧寡核苷酸的亲和性。在 ECV304 内皮细胞株观察 γ -³²P 标记硫代磷酸酯三螺旋 DNA 寡核苷酸的细胞摄取及其对组织因子基因表达的影响。结果发现, 硫代磷酸酯寡核苷酸 T21GTa-ps 与靶序列能形成三链 DNA, 其 Kd 值为 3.6×10^{10} mol/L。在内皮细胞株 ECV304 细胞, 三螺旋 DNA 寡核苷酸-ps (T21GTa-ps) 的细胞吸收率为 11.65%, 主要分布在核沉淀, 约占吸收总量的 77.25%, 显著降低内皮细胞组织因子基因 mRNA 表达及组织因子蛋白合成的平均吸光度值, 显著降低组织因子的促凝活性。此结果提示, 硫代磷酸酯寡核苷酸 T21GTa-ps 对内皮细胞组织因子基因表达具有较好的抑制作用。

[中图分类号] Q524

[文献标识码] A

The Inhibitory Effect of a Triple Helix-Forming Oligonucleotides on the Expression of Tissue Factor Gene in Endothelial Cells

LI Qian-Ning¹, YIN Da-Jun², DAI Guang-Ming¹, ZHENG Jian¹, XIAO Dao-Hong¹, DENG Zhi-Kuan¹, LIU Yong¹, LIU Li-Jie¹, ZHOU Yong-Qing¹, and RENG Ping¹

(1. The Department of Neurology, Xinqiao Hospital, 2. Department of Anatomy; The Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

[MeSH] Oligonucleotides, Triple Helix-Forming; Gene, Tissue Factor; Gene Expression; Endothelium, Vascular

[ABSTRACT] **Aim** The purpose of the present work was to study the inhibitory effect of a triple helix-forming oligonucleotides (TFO) on expression of tissue factor (TF) gene in endothelial cells. **Methods** Antiparallel oligonucleotides T21GTa sequence targeted to shear stress response element in promoter of TF gene were designed and synthesized by phosphoramidite method and decorated with all-PS alinkage. The affinity of TFO and TFO-ps were determined by electrophoretic mobility shift assays. Cellular uptake of γ -³²P labelled TFO-ps and the effect of TFO-ps on expression of TF gene were observed in ECV304 endothelial cell strain. **Results** TFO-ps (T21GTa-ps) formed a triplex binding in antiparallel orientation to the purine-rich target strand-SSRE, with the Kd 3.6×10^{10} mol/L. In endothelial cell strain ECV304 the cellular uptake rate of TFO-ps (T21GTa-ps) is about 11.65%, mainly localized within the nucleus sediment (77.25%), significantly lower the mRNA expression of and the protein synthesis of TF gene, strikingly decreased the coagulation activity of TF. **Conclusions** TFO-ps (T21GTa-ps) have significantly inhibited expression of TF gene in endothelial cell.

切应力诱导内皮细胞组织因子 (tissue factor, TF) 基因表达是血管分叉处血栓形成的主要启动因素之一^[1,2]。因此, 抑制切应力诱导内皮细胞 TF 基因表达对于预防血管分叉处的血栓形成具有重要意义。然而, 迄今尚未见到有效方法抑制内皮细胞切应力诱导性 TF 基因表达。反基因技术已经广泛用

于抗病毒和抗肿瘤的试验及二期临床研究, 具有潜在的临床应用价值^[3]。本文根据反基因技术设计合成的形成三螺旋 DNA 寡核苷酸 (a triple helix-forming oligonucleotides, TFO), 经硫代磷酸酯修饰后抑制内皮细胞切应力诱导性 TF 基因表达, 取得满意效果, 现予报道。

[收稿日期] 2001-10-08 修回日期 2002-03-20

[基金项目] 国家自然科学基金(39970269)资助。

[作者简介] 李黔宁, 男, 1959 年出生, 贵州省湄潭县人, 医学博士, 副教授, 副主任医师。应大君, 男, 1947 年出生, 浙江省宁波市人, 医学博士, 教授, 博士研究生导师。戴光明, 女, 1955 年出生, 山西省孟县人, 医学硕士, 主任医师, 硕士研究生导师。

1 材料与方法

1.1 标记靶序列的合成

选择人 TF 基因启动子内的切应力反应元件 (shear stress response element, SSRE) 序列 B21 作为靶

序列。按照靶序列的核苷酸序列,采用固相亚磷酸胺三酯固相法,在美国 PE 公司 391 型 DNA 自动合成仪上,合成 2 条两两互补的脱氧寡核苷酸。聚丙烯酰胺凝胶纯化,紫外分光光度仪 260 nm 处 UV 吸收光谱测定寡核苷酸浓度(上海基康生物技术公司)。取靶序列中的一条寡核苷酸,用 T4 多聚核苷酸激酶将 [γ - 32 P]ATP 标记其 5' 末端,然后与其互补的寡核苷酸杂交退火, G-50 柱纯化,即得标记靶序列。同时合成和标记 2 条寡核苷酸作为对照靶序列 B21c(表 1, Table 1)。

表 1. 组织因子基因靶、对照靶和三螺旋 DNA 寡核苷酸序列。
Table 1. Array of tissue factor gene target, control target and TFO

Name	Array
TF gene target	B21 -90 3'-CCCCTCTGcCCgCCCCgCCC-5' -69 5'-gggAggAgCggCgggggCggg-3'
Control target	B21c 3'-ATCgCCCACCTATCACTCATg-5' 5'-TagCgg gTgAATAgTgAgTAC-3'
TFO	T21GTa 3'-gggTggTgTggTgggggTggg-3' T21GTp 5'-gggTggTgTggTgggggTggg-3'

1.2 三螺旋 DNA 寡核苷酸的合成和修饰

按照设计的反向寡核苷酸 T21GTa 和顺向寡核苷酸 T21GTp 序列,采用固相亚磷酸胺三酯固相法,在美国 PE 公司 391 型 DNA 自动合成仪合成脱氧寡核苷酸。在脱氧寡核苷酸的 3' 末端进行硫代磷酸酯修饰获得硫代磷酸酯寡核苷酸。聚丙烯酰胺凝胶电泳纯化。寡核苷酸结构完整性和纯度,亦用 T4 多聚核苷酸激酶将 [γ - 32 P]ATP 标记 5' 末端,20% 聚丙烯酰胺凝胶电泳,放射自显影证实。

1.3 电泳迁移率漂移法(electrophoretic mobility shift assay, EMSA) 检测

使渐增浓度的 TFO 与定量 5' 末端 γ - 32 P 标记的靶 DNA,在缓冲液 90 mmol/L Tris、90 mmol/L borate (pH 7.4) 及 10 mmol/L MgCl₂ 中,37 °C 孵化 48 h。然后聚丙烯酰胺凝胶电泳,放射自显影。为稳定三链 DNA, PAGE 凝胶及电泳缓冲液均含有 90 mmol/L Tris、90 mmol/L borate (pH 7.4) 及 10 mmol/L MgCl₂。计算三链 DNA 的分离常数 Kd 值(Kd= [S][D]/[T], 当 [D] = [T] 时,即图像分析双链 DNA 条带的吸光度等于三链 DNA 条带的吸光度时,其 Kd 值等于[S] 的浓度)^[4],评估 TFO 与靶序列的亲合性。

1.4 细胞对硫代寡核苷酸的摄取^[5]

ECV304 细胞(第三军医大学新桥医院心血管研究所惠赠)(2×10^5 /孔)种植在六孔培养板,37 °C 培养 24 h 后弃培养基,重新加新鲜培养基 0.4 mL/孔,再加标记 TFO 5×10^4 cpm(count per minute, 每分钟计数)。24 h 后弃培养基,预冷 PBS 洗 3 次,胰蛋白酶消化,收集细胞,置于 1 mL PBS 中,离心 500 g, 5 min,细胞沉淀溶解在 1 mL NP-40 溶解缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl pH 7.4、10 mmol/L NaCl、3 mmol/L MgCl₂、0.5% NP-40, v/v)。将溶解物用 4 000 r/min 离心 5 min,上清作为胞浆成分。沉淀部分再溶解于 0.2 mL 1% SDS 溶解缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl pH 7.4、150 mmol/L NaCl 和 1% SDS),用 4 000 r/min 离心 5 min,收集上清作为核(蛋白)液,沉淀部分即为核沉淀物(以基因组 DNA 为主)。然后分别用 FH463A-自动定标器测 cpm 值(阈值 0.05,道宽 0.65,高压 600 V)。

1.5 硫代磷酸酯三螺旋 DNA 寡核苷酸的给予及切应力作用

ECV304 细胞在 100 mL 培养瓶中培养至 50% 融合时,用 Hank's 液洗两次,胰酶消化计数,用含有 10% 小牛血清的 M199 培养基,调节细胞密度至 10^9 /L,取 400 μ L,加入 10 μ L 含有硫代寡核苷酸 TE 缓冲液,使终浓度达到 0.2 μ mol/L,再置于 24 mm \times 24 mm 盖玻片上培养 24 h,然后将盖玻片贴于载玻片上,再置于平行板流动腔中,使细胞面与流动的培养基液体接触,进行切应力作用。切应力计算公式^[6]: $\tau = 6Q\mu/(wh^2)$, μ 为流体粘度, M199 培养基+5% 胎牛血清为 0.013, Q 流体速度 0.62 mL/s, w 为流室宽度=1.6 cm, h 为流室高度=0.05 cm, 其切应力=1.2 Pa。作用时间 6 h。

1.6 原位杂交染色方法及其结果图形分析

切应力作用 6 h 后,取出盖玻片, PBS 液洗 3 次,用 4% 多聚甲醛/0.1 PBS(含 1/1000 DEPC) 室温固定 20 min,自然风干后,-20 °C 保存备用。用检测 TF 基因 mRNA 表达的原位杂交试剂盒和 DAB 显色试剂盒(博士德公司)。进行原位杂交染色后,在 200 倍视野下,细胞浆出现蓝色颗粒为阳性。用 TIGER 920G 细胞图像分析仪(重庆大学泰格尔图形图像工程技术研究所),进行图像分析。测定时物镜放大 25 倍。测定 3 个样本,每个样本随机测定 100 个细胞,分别测出阳性反应细胞的平均吸光度值(A)。

1.7 免疫组织化学染色法分析

切应力作用 6 h 后,取出盖玻片, PBS 液洗 3 次,用丙酮室温固定 20 min,自然风干后,-20 °C 保存备用。用小鼠抗 TF 抗体(Calbiochem 公司,滴度 1:

100), 免疫细胞化学检测试剂盒和 DAB 显色试剂盒 (ED1022) (博士德公司) 进行免疫染色后, 在 200 倍视野下细胞浆呈现棕色细颗粒为阳性。图像分析同原位杂交。

1.8 组织因子促凝活性测定

切应力作用 6 h 后, 取出盖玻片, PBS 液洗 3 次, 刮下细胞收集在 EP 管内。然后将 EP 管放在液氮中冻 1 min, 取出在 37℃ 水浴融化 1 min, 反复 3~4 次。样本液氮中保存备用。然后采用裂解内皮细胞一步复钙凝块时间测定法 (one-step recalcification clotting time assay)^[7] 在 24 孔微量反应板, 细胞裂解物 80 μL, 加入正常人枸橼酸无血小板血浆 80 μL, 再加入 30 mmol/L CaCl₂ 80 μL 后立即用 GXM-203 型制酶标光度计, 540 nm 处测定凝块形成时间作为 TF 的促凝活性(单位为 mU)。

1.9 统计学处理

所有数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 并进行 *t* 检验。

2 结果

2.1 硫代寡核苷酸与组织因子基因启动子区切应力反应元件靶序列的亲合性

图 1 (Figure 1) 示 TF 基因启动子 SSRE 靶序列与我们设计的寡核苷酸形成三链 DNA 的情况。在图 1 (Figure 1) 中, A 或 B 分别为未修饰或硫代磷酸酯修饰的寡核苷酸形成三链 DNA。其中 1 道为反向 GT 寡核苷酸 T21Gta 或 T21GTa-ps (18 nmol) 与对照靶序列 B21c (0.0018 nmol) 结合, 未见三链 DNA 滞后带出现, 说明反向 GT 寡核苷酸与对照靶序列在分子比为 10 000: 1 内, 不管修饰与否, 均不能与对照靶结合成三螺旋 DNA。提示未修饰或硫代修饰的 T21Gta 均有较高的特异性, 无非特异性结合。2 道为顺向 GT 寡核苷酸 T21Gtp 或 T21GTp-ps (18 nmol) 与靶序列 B21 (0.0018 nmol) 结合, 未见三链 DNA 滞后带形成。说明顺向 GT 寡核苷酸与靶序列在分子比为 10 000: 1 时, 不管修饰与否, 均不能与靶序列形成三螺旋 DNA。提示靶序列只能反向 GT 寡核苷酸结合, 而不能顺向 GT 寡核苷酸, 具有高度特异性。3 道和 4 道分别为只有单链 T21Gta 或 T21GTa-ps 和靶序列 B21 做对照。5 道至 9 道分别为反向 GT 寡核苷酸 T21Gta 或 T21GTa-ps (0.0018~18 nmol) 与靶序列 B21 (0.0018 nmol) 结合。在 5 道便出现三螺旋 DNA 滞后带, 9 道形成的三螺旋 DNA 滞后带最多。说明反向 GT 寡核苷酸与靶序列在分子比 10 000: 1 内, 反向 GT 寡核苷酸与靶序列能够形成三螺旋

DNA, 而且随着反向 GT 寡核苷酸浓度增加, 三螺旋 DNA 形成越多。提示 T21Gta 或修饰后的 T21GTa-ps 对靶序列具有较高的亲和性。借助图像分析, 计算出 T21Gta 和 T21GTa-ps 的 K_d 值分别为 3.6×10^{-10} mol/L 和 2.3×10^{-9} mol/L, 硫代修饰寡核苷酸 T21GTa-ps 的亲活性比未修饰的寡核苷酸 T21Gta 明显下降(约 6.3 倍)。

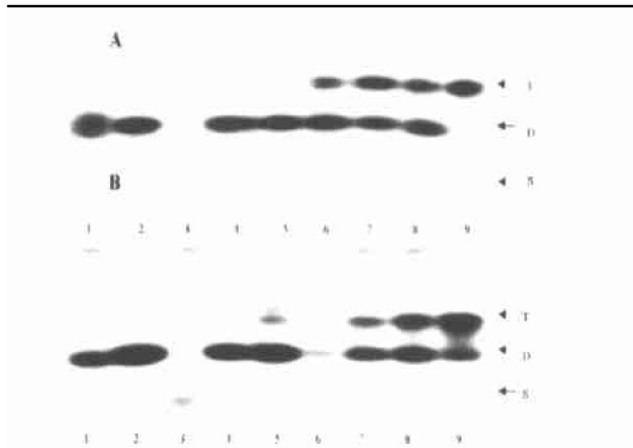


图 1. 电泳迁移率漂移法显示 T21Gta 和 T21GTa-ps 亲和性。

Figure 1. Affinity of T21Gta and T21GTa-ps shown by EMSA. A. T21Gta; B. T21GTa-ps

2.2 ECV304 细胞对硫代寡核苷酸的摄取

[γ -³²P]- 标记硫代寡核苷酸 T21Gta 50 000 c/min 与 ECV304 细胞孵育 24 h 后, 在 ECV304 细胞的胞浆、核液、核沉淀(以基因组 DNA 为主)中分别检测到 875 ± 326 、 450 ± 61 、 $4\ 500 \pm 935$ c/min 的标记硫代寡核苷酸。即硫代寡核苷酸 T21Gta 的自然吸收率为 11.65%, 其中分布构成为胞浆 15.02%、核液 7.73%、核沉淀 77.25%, 三者比较, 核沉淀中的标记硫代寡核苷酸最多($P < 0.05$)。

2.3 硫代寡核苷酸对内皮细胞组织因子基因 mRNA 表达的影响

原位杂交的图像分析结果见表 2 和图 2 (Table 2 and Figure 2)。可见切应力 (shear stress response element, SSRE) 组的 TF mRNA 的吸光度值显著高于静置细胞 (immobile cell, IC) 组 ($P < 0.05$); 反向硫代寡核苷酸 T21GTa-ps (phosphorothioate antiparallel GT oligonucleotides, paTFO) 组 TF mRNA 的吸光度值显著低于 SSRE 组。顺向硫代寡核苷酸 T21Gtp (phosphorothioate parallel GT oligonucleotides, ppTFO) 组 TF mRNA 的吸光度值与 SSRE 组比较无显著差异 ($P > 0.05$)。

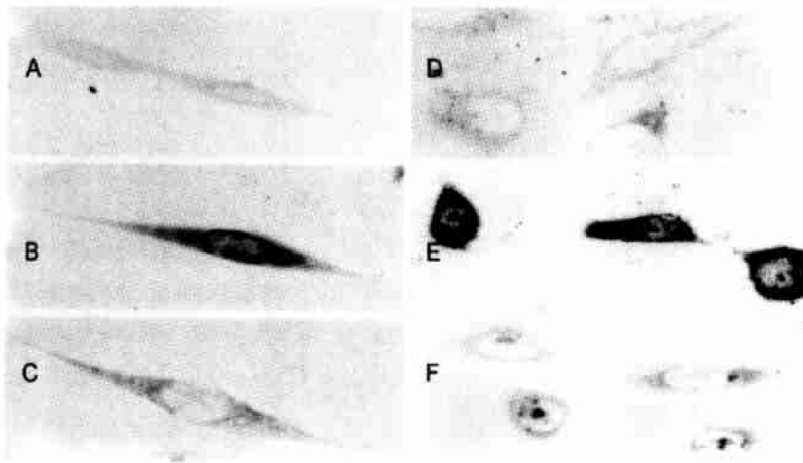


图 2. 切应力及硫代寡核苷酸对 ECV304 细胞组织因子 mRNA 表达和蛋白合成的影响。

Figure 2. Effect of shear stress and TFO-ops on mRNA expression and protein synthesis of TF gene in ECV304 cells. A is synthesis of TF protein in ECV304 cells, DAB $\times 200$. B is synthesis of TF protein under 1.2 Pa of shear stress at 6 h, DAB $\times 200$. C is synthesis of TF protein at 24 h after pretreatment with TFO-ops, DAB $\times 200$. D is Expression of TF mRNA in ECV304 cells, ISH $\times 200$. E is Expression of TF mRNA in under 1.2 Pa of shear stress, ISH $\times 200$. F is Expression of TF mRNA at 6 h after pretreatment with TFO-ops, ISH $\times 200$.

2.4 硫代寡核苷酸对内皮细胞组织因子基因蛋白合成的影响

免疫组织化学的图像分析发现, SSRE 组的 TF 蛋白合成的吸光度值显著高于 IC 组 ($P < 0.05$)。paTFO 组 TF 蛋白合成的吸光度值显著低于 SSRE 组。ppTFO 组 TF 蛋白合成的吸光度值与 SSRE 组比较无显著差异 ($P > 0.05$) (表 2 和图 2, Table 2 and Figure 2)。

表 2. 硫代寡核苷酸对组织因子 mRNA 表达(以吸光度值表示)、蛋白合成(以吸光度值表示)和促凝活性的影响

Table 2. Effect of TFO-ops on mRNA expression and protein synthesis of TF gene and coagulation activity of TF ($\bar{x} \pm s$).

Groups	n	mRNA expression	Protein synthesis	Coagulation activity (mU)
IC	4	0.178 \pm 0.041	0.172 \pm 0.036	949 \pm 86
SSRE	4	0.548 \pm 0.025 ^a	0.491 \pm 0.065 ^a	2660 \pm 228 ^a
ppTFO	4	0.525 \pm 0.032 ^a	0.484 \pm 0.025 ^a	2610 \pm 77 ^a
paTFO	4	0.239 \pm 0.063 ^{abc}	0.267 \pm 0.124 ^{abc}	1583 \pm 27 ^{abc}

IC group is immobile cell group, and SSRE group is shear stress response element group, ppTFO group is phosphorothioate parallel GT oligonucleotides group, and paTFO group is phosphorothioate aparallel GT oligonucleotides group. a: $P < 0.05$ compared with IC group; b: $P < 0.05$ compared with SSRE group; c: $P < 0.05$ compared with ppTFO group.

2.5 硫代寡核苷酸对内皮细胞组织因子促凝活性的影响

从表 2 (Table 2) 可见, SSRE 组 TF 促凝活性显著高于 IC 组, paTFO 组的 TF 促凝活性比 SSRE 组显

著下降 ($P < 0.05$), ppTFO 组的 TF 促凝活性与 SSRE 组比较无显著性差异 ($P > 0.05$)。

3 讨论

位于心脑血管相对狭窄、弯曲、分叉的动脉粥样硬化斑块的溪谷处常是血栓形成部位。研究表明, 切应力显著变化诱导内皮细胞 TF 表达是触发这些部位血栓形成的主要始发因素之一。内皮细胞 TF 基因启动子区 SSRE 与切应力诱导的转录因子 Sp1 和 Egr-1 结合, 激活 SSRE, 启动 TF 基因转录是切应力诱导内皮细胞 TF 基因表达的主要作用机制^[1,2]。可见, 阻止转录因子 Sp1 和 Egr-1 与 SSRE 结合, 阻断 SSRE 激活, 就能阻断切应力诱导的内皮细胞 TF 基因表达。阻止切应力诱导的 TF 表达对于预防动脉粥样硬化性血栓形成具有重要意义。

反基因技术能够形成三链 DNA 寡核苷酸 (triple helix-forming oligonucleotide, TFO), 在 DNA 双螺旋结构大沟中与靶序列中嘌呤链通过氢键结合形成三链 DNA, 阻止基因调节蛋白(如转录因子 Sp1 或 Egr-1) 结合, 抑制靶基因表达。这种技术目前已用于抗病毒和抗肿瘤的实验研究, 取得较好的实验结果^[3,5]。其中部分结果已进入 II 期临床试验。说明反基因技术是一个很有发展前途的基因治疗生物技术之一。根据反基因技术, 靶序列必须为多聚嘌呤序列, 其长度在 12~18 bp 左右较好。与靶序列形成三链 DNA 寡核苷酸, 必须与靶序列具有较高的特异性和亲合性, 具有较好的耐酶性、透膜性及稳定性, 才有

实用价值。研究表明, 硫代磷酸酯修饰的寡核苷酸具有较好的耐酶性、透膜性及稳定性, 对寡核苷酸的亲和性和特异性没有显著影响^[8]。因此, 硫代磷酸酯修饰是目前研究最多, 效果最好的修饰方法之一。内皮细胞 TF 基因启动子区 SSRE 有 3 个 Egr-1/Sp1 位点^[9]。本实验利用反基因技术, 选择含有内皮细胞 TF 基因启动子区 SSRE 的第二个 Egr-1/Sp1 位点的 21bp 多聚嘌呤序列作为靶序列, 按照 G* GC 和 T* CG 配对的反向 GT 寡核苷酸-T21GTa, 与靶序列在 1: 10 000 分子比范围内可以形成显著的三链 DNA, 其 Kd 值为 3.6×10^{-10} mol/L, 说明 T21GTa 具有较好的亲和性和特异性。进行硫代磷酸酯修饰后的 T21GTa, 与靶序列在 1: 10 000 分子比范围内也形成显著的三链 DNA, 其 Kd 值为 2.3×10^{-9} mol/L, 其亲活性下降 6.3 倍。说明本实验中的硫代磷酸酯修饰对寡核苷酸的亲和性有一定影响, 但仍能保证在 1: 10 000 分子比范围内形成三链 DNA。与文献[3]报道一致。本实验采用 [γ -³²P] 同位素标记硫代磷酸酯寡核苷酸, 直接给予内皮细胞, 检测同位素的放射活性, 研究内皮细胞对硫代磷酸酯寡核苷酸的吸收。结果表明, T21GTa 的自然吸收率为 11.65%, 吸收后主要分布于核沉淀(77.25%) (即基因组 DNA 为主要成分)。与文献[7]报道一致。说明硫代磷酸酯寡核苷酸 T21GTa 具有较好的透膜性、耐酶性及稳定性, 能够透过细胞膜和核膜, 抵抗核酸酶的作用, 进入内皮细胞与 TF 基因的靶序列部位结合。

本实验选择平行板流动腔系统^[6]作为内皮细胞切应力作用装置。预试验表明, 切应力在 12 dyn/cm² 时作用时间为 6 h, 内皮细胞 TF 基因表达最显著, 因此本实验选择切应力 12 dyn/cm², 作用 6 h 为观察时点。结果表明切应力 12 dyn/cm², 作用 6 h, 内皮细胞 TF 基因的 mRNA 表达、蛋白合成及促凝活性均显著高于对照组(细胞为静置培养, 无切应力作用), 说明切应力诱导了内皮细胞 TF 基因表达。与文献[2]报道的结果一致, 再次证明切应力作用是内皮细胞 TF 诱导性表达的重要因素。

本实验结果表明, 硫代磷酸酯寡核苷酸 T21GTa 作用后, 内皮细胞 TF mRNA 表达、TF 蛋白合成及 TF 促凝活性受到显著抑制, 而顺向硫代磷酸酯寡核苷酸 T21GTps 组和静置内皮细胞的 TF

mRNA 表达、TF 蛋白合成及 TF 促凝活性不受影响。说明硫代磷酸酯寡核苷酸 T21GTa 对内皮细胞 TF 基因表达具有抑制作用。本实验中的硫代寡核苷酸 T21GTa 只封闭内皮细胞 TF 基因启动子区 SSRE 上的第二个 Egr-1/Sp1 位点结合, 而 TF 基因启动子区 SSRE 包括 3 个 Egr-1/Sp1 位点, 为何只封闭其中第二个 Egr-1/Sp1 位点, 即可达到抑制切应力诱导的 TF 基因表达呢? 这是由于在 TF 基因 SSRE 的 3 个 Egr-1/Sp1 位点中, 第一和第三个 Egr-1/Sp1 位点为基础性核蛋白(Sp1)结合的主要部位, 而第二个 Egr-1/Sp1 位点为诱导性核蛋白(Egr-1)结合的主要部位。基础性核蛋白与 TF 基因的基础活性有关, 而诱导性核蛋白与 TF 基因的诱导性激活有关^[9]。可见封闭住第二个 Egr-1/Sp1 位点, 阻断了诱导性核蛋白(Egr-1)的结合位点, 进而使 TF 基因的切应力诱导性激活受到抑制, 便不难理解。

本实验首次利用反基因技术设计合成的寡核苷酸, 经硫代磷酸酯修饰后, 能与 TF 基因启动子 SSRE 靶序列结合成三链 DNA, 抑制切应力诱导的内皮细胞 TF 基因表达, 对于探讨利用反基因技术预防心脑血管血栓形成具有重要意义。

[参考文献]

- [1] Hademenos GJ, Massoud TF. Biophysical mechanisms of stroke. *Stroke*, 1997, **28** (10): 2 067
- [2] Houston P, Dickson MC, Ludbrook V, et al. Fluid shear stress induction of the tissue factor promoter in vitro and in vivo is mediated by Egr-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999, **19** (2): 281
- [3] Catapano CV, McGuffie EM, Pacheco D, et al. Inhibition of gene expression and cell proliferation by triple helix-forming oligonucleotides directed to the c-myc gene. *Biochemistry*, 2000, **39** (17): 5 126
- [4] Olivas WM, Maher J. Overcoming potassium-mediated triplex inhibition. *Nucleic Acids Res*, 1995, **23** (11): 1 936-941
- [5] Thomas RM, Thomas T, Wada M, et al. Facilitation of the cellular uptake of a triplex-forming oligonucleotide by novel polyamine analogues: structure-activity relationships. *Biochemistry*, 1999, **38** (40): 13 328
- [6] Chiu JJ, Wang DL, Chien S, et al. Effects of disturbed flow on endothelial cells. *J Biomech Eng*, 1998, **120** (1): 2
- [7] Lesnik P, Rouis M, Skarlatos S, et al. Uptake of exogenous free cholesterol induces upregulation of tissue factor expression in human monocyte-derived macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89** (21): 10 370
- [8] Patil SD, Rhodes DG. Influence of divalent cations on the conformation of phosphorothioate oligodeoxynucleotides: a circular dichroism study. *Nucleic Acids Res*, 2000, **28** (12): 2 439
- [9] Cui MZ, Parry GC, Edgington TS, et al. Regulation of tissue factor gene expression in epithelial cells. Induction by serum and phorbol 12-myristate 13-acetate. *Arterioscler Thromb*, 1994, **14** (5): 807

(此文编辑 胡必利)