

- hyperthermia for cancer using magnetite cationic liposomes: an *in vivo* study. Japanese J Cancer Research, 1998, 89 (4): 463~469
- 4 Mitsumori M, Hiraoka M, Shibata T, *et al.* Targeted hyperthermia using dextran magnetite complex: a new treatment modality for liver tumors. Hepato Gastroenterology, 1996, (43): 1431~1437
- 5 奚念珠, 顾学裘. 药剂学. 北京: 人民卫生出版社, 1994. 147~153
Xi N Z, Gu X Q. Pharmaceutics. Beijing: People Health Press, 1994. 147~153
- 6 都有为, 陆怀先, 顾新运. Fe₃O₄ 生成过程的研究. 应用科学学报, 1985, 3 (3): 267~269
Du Y W, Lu H X, Gu X Y. J Appl Sci, 1985, 3 (3): 267~269
- 7 席宗翰, 王延平. 动脉栓塞用磁性流体材料制备的研究. 河南医学研究, 1997, 6 (3): 206~208
Xi Z H, Wang Y P. Henan Medical Research, 1997, 6 (3): 206~208

The Heat Effect of Magnetic Fluid Under an Alternating Magnetic Field. SHI Feng, WU Min (*The First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510080, China*).

Abstract Magnetic field was made of Fe₃O₄ particles and soybean lecithin which was only 20 nm in

diameter. The heat effect was studied under 10 kW, 100 kHz magnetic field. The temperature change was measured by a glass thermometer ($\pm 0.1^\circ\text{C}$) in agarose gel and distilled water with different Fe₃O₄ content respectively. The effect of magnetic intensity was discussed. This was an experimental basis for hyperthermia treatment tumors. The results indicated that the temperature raised quickly as the increase of Fe₃O₄ concentrations and the magnetic field intensity. The temperature finally remained constant due to the balance of heat generation and heat transfer to the surroundings. When Fe₃O₄ concentration were 1 g/L and 2 g/L, the balance temperature were respectively 41.9 °C and 47.5 °C as the magnetic field was 2.78×10^4 A/m. In 1 g/L Fe₃O₄ concentration, the magnetic field intensity were 2.78×10^4 A/m and 1.11×10^4 A/m, the temperature plateaus were at 41.9 °C and 30.7 °C respectively. The heat transfer faster in water than in agarose gel.

Key words magnetic fluid, alternating magnetic field, heat effect

抑制启动子的三链 DNA 的结构模建及稳定性研究*

杨洁 刘次全¹⁾

(中国科学院昆明动物研究所, 昆明 650223)

摘要 在 IRIS Indigo2 (SGI 公司) 工作站上, 利用 Insight II/MSI 软件包, 以 TAT 三链 DNA 为模板, 采用同源模建的方法, 分别建立起两个含 21nt 的脱氧寡核苷酸 CP1 (G3TG2TGT2G5TG2TGT) 和 CP3 (TGTG2TG5T2GTG2TG3) 的三维结构. 采用分子力学方法进行能量优化, 将得到的能量最低结构作为分子的优势构象. 研究结果显示, CP1 的能量低于 CP3 的能量, 即前者的结构较后者稳定. 从而证明了 CP1 与乙肝病毒 (HBV) 的核心启动子 (Cp) 片段之间能稳定地形成三链 DNA, 并能特异性地抑制 DNA 结合蛋白与 Cp 片段的结合. 这些结果表明, 三链 DNA 的形成有可能抑制 DNA 的转录.

关键词 三链 DNA, 反基因策略, 同源模建, 核心启动子, 乙肝病毒 (HBV)

学科分类号 Q71

三链 DNA 作为反基因策略的一种重要手段, 目前已成为分子生物学和基因工程的一个前沿领域. 它通过能形成三链 DNA 的寡核苷酸 (triplex-forming oligonucleotide, TFO) 与靶基因结合形成局部的三链结构, 从而达到抑制基因转录和复制的目的^[1,2]. 目前, 它已在治疗、诊断、生物技术等方面得到广泛的应用, 如它能有效地抑制肿瘤基因

(*c-myc*, *c-myb*, *ras* 家族)、HIV 病毒、乙肝病毒 (HBV) 以及抑瘤蛋白 P₅₃ 基因的转录, 有望获得实质性进展^[3~5].

* 国家自然科学基金资助项目 (39770418).

¹⁾ 通讯联系人.

Tel: (0871) 5195183, E-mail: tbrg@public.km.yn.cn

收稿日期: 1999-02-13, 修回日期: 1999-08-16

刘定燮等^[6]鉴于我国乙肝病毒感染率高、尚缺乏有效治疗的现状,设计并合成了两个含 21nt 的脱氧寡核苷酸 CP1 (G3TG2TGT2G5TG2TGT) 和 CP3 (TGTG2TG5T2GTG2TG3), 活性实验表明, CP1 与乙肝病毒 (HBV) 的核心启动子 (Cp) 片段之间能稳定地形成三链 DNA, 并能特异性地抑制 DNA 结合蛋白与 Cp 片段的结合; 即三链 DNA 的形成有可能抑制 DNA 的转录. 而 CP3 却无上述活性. CP1 和 CP3 在活性上的差异导致我们来探讨其三链 DNA 在结构上的不同. 本文将采用同源模建的方法分别建立起 CP1 和 CP3 三链 DNA 的三维结构, 并着重研究它们的结构稳定性以及两者间的结构差异对活性的影响.

1 材料与方法

1.1 材料

TAT 三链 DNA 的晶体结构数据取自 PDB 蛋白质晶体数据库^[7,8]. 利用 MSI/Biosym 公司的 Insight II 软件, 在 SGI 公司的 IRIS Indigo2 工作站上进行同源模建. 两个含 21nt 的脱氧寡核苷酸 CP1 (G3TG2TGT2G5TG2TGT) 和 CP3 (TGTG2TG5T2GTG2TG3) 的碱基序列取自刘定燮等的研究结果^[6].

1.2 分子模建

参照文献 [7~ 11], 通过代换由 X 衍射射线测定的 A 型 TAT 三螺旋 DNA 的碱基来构建两个分子间三螺旋. TCP1: 5'-d (G)₃dAd (G)₂dAdGd (T)₂d (G)₅dAd (G)₂dAdGdA-dTdCdTd (C)₂dtd (C)₅d (T)₂ dCdTd (C)₂dTd (C)₃-d (G)₃dTd (G)₂dTdGd (T)₂d (G)₅dTd (G)₂dTdGdT-3'. TCP3: 5'-d (G)₃dAd (G)₂dAdGd (T)₂ d (G)₅dAd (G)₂dAdGdA-dTdCdTd (C)₂dTd (C)₅d (T)₂dCdTd (C)₂dTd (C)₃-dTdGdTd (G)₂dTd (G)₅d (T)₂ dG dTd (G)₂dTd (G)₃-3' (图 1). 即从 X 射线晶体衍射中得到的三螺旋 TAT, 根据图 1 中三螺旋 TCP1 和 TCP3 的碱基序列, 用三碱基体 GGC、GCG 和 TTA 来替换三碱基体 TAT, 构建成两个由 21 个三碱基体组成的三螺旋 TCP1 和 TCP3 的初始模型. 每个三链 DNA 中都包括 Watson-Crick 和 Hoogsteen 氢键. 而且每一个三螺旋分子含有 63 个核苷酸且每个核苷酸带有一个负电荷 (-1). 在每个磷酸基团上加一个 K⁺ 离子从而保持整个体系的电中性. K⁺ 离子的最初位置是位于磷酸基团 O—P—O 形成的平面上并与两个氧

原子保持相同的距离. 最后将整个体系浸泡在厚度为 1 nm 的水溶液中^[12].

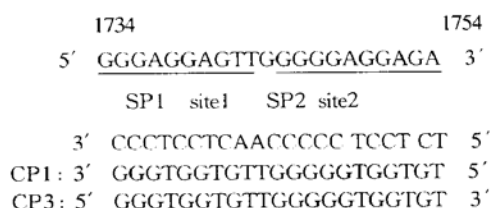


图 1 三链 DNA 的靶位点及寡核苷酸的序列

靶位点取自乙肝病毒核心启动子的一段序列 (1734~1954), 下划线表示肝细胞核因子 3 (HNF3) 和 SP1 的结合位点, 在靶位点下为寡核苷酸 CP1 和 CP3 的序列. 实际上, CP1 和 CP3 的碱基序列一致但方向相反.

1.3 能量优化

整个三螺旋体系的能量优化过程是在 Discover (MSI/Biosym) 软件中进行的. DNA 的介电常数随距离不同而变化, 而且理论研究结果表明介电常数与 Hoogsteen 氢键的形成密切相关^[8]. 在计算过程中, 均采用 AMBER 力场^[13]. 首先, 固定三螺旋的端部三碱基体, 分别用最陡下降法和共轭梯度法优化 100 步, 随后放开被固定的原子, 在没有任何限制的条件下用共轭梯度法优化 1 000 步. 然后, 在三螺旋中加入 K⁺ 离子, 并将整个体系浸泡在厚度为 1 nm 的水溶液中; 再固定体系中所有的重原子分别用最陡下降法和共轭梯度法优化 200 步, 接着去掉限制条件并对三螺旋/抗衡离子/水分子整个体系进一步优化到 RMSD 小于 21 kJ/mol·nm. 再对整个体系分别进行 5ps 的分子动力学计算. 键的伸缩函数采用简谐振动模型, 即键能采用谐振模型计算.

2 结果与讨论

乙肝病毒核心启动子 Cp 内 1734~ 1754 nt 间的序列近似于同聚嘌呤·同聚嘧啶序列, 它是肝细胞核因子 3 (HNF3) 和 SP1 的结合位点, 为乙肝病毒核心启动子 Cp 的重要反式激活元件^[14]. 刘定燮等^[6]以它为靶序列, 根据 R·RY 型的配对方式, 设计并合成了两个含 21 nt 的脱氧寡核苷酸 CP1 和 CP3 作为 TFO, 且 CP1 和 CP3 的碱基序列一致但方向相反 (图 1). 而且, CP1 能特异性地与乙肝病毒核心启动子 Cp 结合, 以致于抑制细胞核内因子与 Cp 的特异性结合, 表明通过局部三螺旋 DNA 的形成将可能抑制转录因子或 RNA 聚合酶与乙肝

病毒 (HBV) 转录调控区的结合, 从而阻断 HBV mRNA 的合成.

2.1 三螺旋 DNA 的结构

图 1 给出了两个脱氧寡核苷酸 CP1 和 CP3 的

核苷酸序列. 其中三螺旋 TCPK1 和 TCPK3 分别为 CP1 和 CP3 的三螺旋/抗衡离子复合物; 而 TCPKH1 和 TCPKH3 则分别为 CP1 和 CP3 的三螺旋/抗衡离子/水分子复合物 (表 1).

表 1 四个三螺旋 DNA 的优势构象的总能量

能量	kJ/mol					
	TCP1	TCPK1	TCPKH1	TCP3	TCPK3	TCPKH3
Elec	94389.526	2992.059	-18051.099	100230.288	2848.033	-16977.859
Vdw	-3160.297	1358.131	2991.774	-3464.816	1451.463	3129.905
Total	89590.742	6023.817	-13392.053	94087.595	6185.696	-12818.051

2.2 两个三螺旋 DNA 稳定性的比较

分子力学的计算结果表明两个三螺旋 TCPKH1 和 TCPKH3 的构象能分别为 -13392.053 kJ/mol 和 -12818.051 kJ/mol, 而且, 分子动力学的计算结果显示 TCPKH1 和 TCPKH3 的构象能分别为 3356.013 kJ/mol 和 3708.709 kJ/mol. 显然它们的稳定性是前者大于后者, 这说明碱基序列一致的脱氧寡核苷酸若方向不同则由它们形成的三螺旋 DNA 的稳定性也不同. 我们得到的 CP1 三螺旋体 (TCP1、TCPK1 和 TCPKH1) 稳定性的结果类似于刘定燮等研究结果, 即脱氧寡核苷酸 CP1 与靶 Cp 之间有较高的亲和力, 而 CP3 则未能与乙肝病毒核心启动子 Cp 结合, 表明在 R·RY 型结构中, 脱氧寡核苷酸与靶序列中嘌呤链间的排列关系为反平行^[6].

表 1 显示, 由三螺旋、三螺旋/抗衡离子 (钾离子) 复合物到三螺旋/抗衡离子 (钾离子) /水分子复合物, 其范德华能逐渐增大, 而静电能和总能量则逐渐减少. 由于钾离子能中和 DNA 主链上磷酸基团所带的负电荷, 水分子不仅能屏蔽磷酸基团之间的静电排斥作用, 而且也能与核苷酸形成氢键增加 DNA 结构的稳定性, 因此, 这些复合物的静电能和总能量递减. 我们在研究三重碱基体时发现, 同聚鸟嘌呤双螺旋既可以形成 GCG 三螺旋, 也可以形成 GCC 三螺旋, 而且前者的能量比后者低; 并且第三条鸟嘌呤链以反平行于靶序列中嘌呤链的方式与之形成三螺旋结构. 类似地, 同聚腺嘌呤双螺旋既可以形成 ATA 三螺旋, 也可以形成 ATT 三螺旋, 而且后者的能量低于前者; 并且第三条胸腺嘧啶链以平行于靶序列中嘌呤链的方式与之形成三螺旋结构. 这些研究结果进一步说明了脱氧寡核苷酸 CP1 (G3TG2TGT2G5TG2TGT) 和 CP3 (TGTG2TG5T2GTG2TG3) 的合理性, 并支

持了 CP1 三螺旋体的能量低于 CP3 三螺旋体的能量的结果. 从而证明了刘定燮等的研究结果, 即脱氧寡核苷酸 CP1 与乙肝病毒 (HBV) 的核心启动子 (Cp) 片段之间有较高的亲和力, 并能与 Cp 形成稳定的三链 DNA, 且特异性地抑制 DNA 结合蛋白与 Cp 片段的结合. 这些结果表明, 三链 DNA 的形成有可能抑制 DNA 的转录, 达到治疗乙型肝炎的目的.

参 考 文 献

- 1 刘定燮, 王昌才, 黄建生. 反基因策略及其靶序列的选择. 生命的化学, 1996, 16 (4): 6~8
Liu D X, Wang C C, Huang J S. Chemistry of Life, 1996, 16 (4): 6~8
- 2 孙雪光, 曹恩华. 三链核酸稳定性和生物学功能的研究进展. 生物化学与生物物理进展, 1998, 25 (4): 319~324
Sun X G, Chao E H. Prog Biochem Biophys, 1998, 25 (4): 319~324
- 3 乐敏, 曾玲晖, 魏尔清. 反义寡核苷酸药理的研究现状. 国外医药——合成药、生化药、制剂分册, 1998, 19 (5): 259~263
Yue M, Zeng L H, Wei E Q. World Pharmacy, 1998, 19 (5): 259~263
- 4 Postal E H, Flint S G, Hogan M E, et al. Evidence that a triple-forming oligodeoxyribo nucleotide binds to the c-myc promoter in HeLa cells, thereby reducing c-myc mRNA levels. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88 (18): 8227~8231
- 5 Frank M O, Douglas W T, Michael M, et al. Oligonucleotide inhibition of IL2Ra mRNA transcription by promoter region collinear triple formation in lymphocytes. Nucleic Acids Res, 1991, 19 (12): 3435~3441
- 6 刘定燮, 王昌才. 三链 DNA 的形成抑制 DNA 结合蛋白与启动子的结合. 生物化学与生物物理进展, 1998, 25 (3): 262~266
Liu D X, Wang C C. Prog Biochem Biophys, 1998, 25 (3): 262~266
- 7 Raghunathan G, Todd Miles H, Sasisekharan. Symmetry and molecular structure of a DNA triple helix: d (T) n·d (A) n·d (T) n. Biochemistry, 1993, 32 (2): 455~462
- 8 Howard F B, Todd M H, Liu K, et al. Structure of d (T) n·d (A) n·d (T) n: the DNA triple helix has B-form geometry with C2'-endo sugar pucker. Biochemistry, 1992, 31 (44): 10671~10677
- 9 杨林静, 白春礼, 李任植, 等. Loop 环对分子内三螺旋 DNA 稳定性的影响. 中国科学 (B 辑), 1998, 28 (1): 65~70

- Yang L J, Bai C L, Li R Z, *et al.* Science in China B, 1998, **28** (1): 65~ 70
- 10 Lee I, Bai C L, Wang C, *et al.* Computational analysis of triplex formation of oligonucleotides: protonated and 5'-methylated Py-Py-Py motif. Science in China B, 1997, **40** (2): 113~ 119
- 11 Yang J, Hua W Y. Basic pharmacophore for some antithrombotic agents with combined thromboxane receptor antagonists (TXRA) /thromboxane synthase inhibitor (TXSI) activities. Drug Dev Res, 1996, **39** (2): 197~ 200
- 12 Saenger W. Principles of Nucleic Acid Structure. New York: Academic Press, 1983. 376
- 13 Weiner S J, Kollman P A, Nguyen D T, *et al.* An all atom force-field for simulations of proteins and nucleic acid. J Comp Chem, 1986, **7** (3): 765
- 14 Zhang P, Raney K, McLachlan A. Characterization of functional SP1 transcription factor binding sites in the hepatitis B virus nucleocapsid promoter. J Virol, 1993, **67** (3): 1472~ 1481

Stability and Molecular Modeling of Triplex DNA Inhibiting DNA Binding Protein Binding to the Core Promoter of Hepatitis B Virus. YANG Jie, LIU Ci-Quan (*Kunming Institute of Zoology, The Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China*).

Abstract Two three dimensional structure models of the 21nt oligodeoxyribonucleotides, CP1 (G3TG-

2TGT2G5TG2TGT) and CP3 (TGTG2TG5T2-GTG2TG3), were constructed by InsightII (MSI) software in IRIS Indigo2 (SGI) workstation using the crystal structure of TAT triplex formation as the template. The initial structures subsequently were minimized by molecular mechanics. The final structures were believed as the dominant conformation. The results showed that the energy of CP1 is lower than that of CP3, and the former is more stable than the latter. Moreover, the results further proved that the 21nt oligodeoxyribonucleotide CP1 stably combines with the core promoter (Cp) fragment of hepatitis B virus (HBV) to form a triplex DNA, and CP1 specifically inhibits a specific cellular factor (DNA binding protein) binding to Cp fragment. These results indicated that specific repression of gene transcription of HBV DNA might be possible by triplex-formation DNA.

Key words triplex DNA, antigene strategy, homology modeling, core promoter, hepatitis B virus (HBV)

蛇毒 NGF 对 PC12 细胞 MAPK 表达的影响

秦丽雅¹⁾ 刘玉欣²⁾ 张 蕾 宋伶俐 崔肇春³⁾

(大连市医药科学研究所, 大连 116013)

摘要 有丝分裂原激活的蛋白激酶 (MAPK) 是磷酸化瀑布中涉及的一类重要蛋白激酶. 阐明各种胞外因素对 MAPK 的调节, 以及各种外界信息所经历的具体过程是摆在研究者面前的挑战性任务. 用含有长白眉蝮蛇 (*A. halys*) 蛇毒神经生长因子 (NGF) 的培养基培养 PC12 细胞, 观察 MAPK 和 MAPK 激酶 (MAPKK) 表达及 MAPK 的活性. 结果表明, *A. halys* 蛇毒 NGF 使 PC12 细胞的 MAPK 和 MAPKK 的表达及 MAPK 活性明显增加. 当蛇毒 NGF 浓度在 25~ 100 $\mu\text{g/L}$ 时, 随浓度的增加, 酶的表达和活性呈线性增加. 由 *A. halys* 蛇毒 NGF 诱导的 MAPK 和 MAPKK 表达的增加依赖于蛋白激酶 C (PKC).

关键词 有丝分裂原激活的蛋白激酶, 神经生长因子, 长白眉蝮蛇, 蛇毒, PC12 细胞

学科分类号 Q78

有丝分裂原激活的蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 是近年发现的一类蛋白激酶^[1], 其激活是一个由蛋白激酶组成的级联反应 (瀑布)^[2] 完成的. 该瀑布包括 MAPK、MAPK 激酶 (MAPKK) 及 MAPKK 激酶 (MAPKKK), 这个瀑布被认为是细胞增殖信息进入细胞核之前的一个共同通路. MAPK 介导细胞的生长与增殖^[3,4]. 已知神经生长因子 (NGF) 能促进大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤 PC12 细胞系的分化,

抑制增殖^[4~6]. 是否长白眉蝮蛇 (*Agkistrodon halys*) 来源的神经生长因子也具有同样的作用, 以及长白眉蝮蛇蛇毒神经生长因子对 MAPK 瀑布有什么影响, 这对于阐明 NGF 的促分化机制、某些疾病的发病机理及治疗有重要的理论意义; 也为我国长白眉蝮蛇蛇毒的深度开发提供了理论依

¹⁾ 本文为其博士论文的一部分. ²⁾ 通讯联系人.

³⁾ 大连医科大学生物化学教研室, 大连 116027.

Tel: (0411) 2683872, E-mail: dimps@mail.dlptt.ln.cn

收稿日期: 1999-03-15, 修回日期: 1999-07-16