

人工诱骗子的入核分布对核因子- κ B 活性的调控作用

刘颖勋^{1,2}, 权富生¹, 王进科², 白学尧¹

1 西北农林科技大学动物医学院, 杨凌 712100

2 东南大学 生物电子学国家重点实验室, 南京 210096

摘要: 探讨了由核定位信号 (NLS) 多肽介导的核因子- κ B (NF- κ B) 寡核苷酸诱骗子 (ODNs decoy) 进入 HeLa 细胞核的效率, 以及对细胞核内 NF- κ B 活性的调控作用。利用双功能交联剂 (Sulfo-SMCC) 共价交联末端氨基修饰的 ODNs decoy 和末端巯基修饰的 NLS 多肽, 形成 NLS 多肽共价连接的 ODNs decoy。依靠 TransME 转染试剂的辅助转染 NLS-ODNs decoy 进入 HeLa 细胞, 用荧光显微镜观察荧光标记的 NLS-ODNs 在细胞内的分布。用 MTT 法检测 HeLa 细胞的活力, 以凝胶迁移实验 (EMSA) 检测 TNF- α 诱导的 HeLa 细胞核抽提物中 NF- κ B 的活性。结果表明, NLS 多肽成功地连接到 ODNs decoy 上, NLS-ODNs 可高效入核, 入核率达到 17.9%。转染 NLS-ODNs 进入 HeLa 细胞, 对细胞活力无明显影响, 而显著抑制核内 NF- κ B 的活性。结果表明 NLS 多肽可提高 ODNs decoy 的入核效率, 显著增强诱骗子对 NF- κ B 活性的抑制效果。

关键词: 核因子- κ B, 寡核苷酸诱骗子, Sulfo-SMCC 交联试剂, 核定位信号多肽

Nuclear localization of oligonucleotides decoy effect on nuclear factor- κ B activity

Yingxun Liu^{1,2}, Fusheng Quan¹, Jinke Wang², and Xueyao Bai¹

1 College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling 712100, China

2 State Key Laboratory of Bioelectronics, Southeast University, Nanjing 210096, China

Abstract: To investigate the effect of the localization of oligonucleotides decoy (ODNs decoy) on the activation of nuclear factor- κ B (NF- κ B) in TNF- α induced HeLa cells. The mercapto group-modified nuclear localization signal (NLS) peptide was covalently conjugated to amino group-modified NF- κ B ODNs decoy by Sulfo-SMCC cross-linker. The NLS-ODNs decoy was transfected into HeLa cells by TransME transfection reagent. The intracellular distribution of fluorescent labeled NLS-ODNs decoy was detected with a microscope. The cell viability was detected by MTT assay, and then the activity of NF- κ B in cell nuclear extract was assayed by electrophoretic mobility shift assay (EMSA). The results showed that NLS peptide was successfully conjugated to ODNs decoy by Sulfo-SMCC cross-linker. The NLS-ODNs decoy effectively entered into nucleus with high rate of 17.9%. It was observed that the cell viability of HeLa cell was not significantly affected by the transfection of NLS-ODNs decoy, while NLS-ODNs decoy significantly inhibited the activation of NF- κ B in TNF- α induced HeLa cells nuclear extracts. This experiment can provide a new covalent conjugation of NLS peptide to ODNs can effectively drive decoy into nucleus, and thus improve its inhibitory effects

Received: January 28, 2010; **Accepted:** August 6, 2010

Supported by: National Key Fundamental Research Project of China (No. 2006CB933205), National Natural Science Foundation of China (No. 60871014).

Corresponding author: Fusheng Quan. Tel: +86-29-87080092; Fax: +86-29-87091032; E-mail: quanfs@sohu.com

Jinke Wang. Tel/Fax: +86-25-83793620; E-mail: wangjinke@seu.edu.cn

国家重大科学研究计划 (No. 2006CB933205), 国家自然科学基金 (No. 60871014) 资助。

on the activation a transcription factor.

Keywords: NF- κ B, ODNs decoy, sulfo-SMCC cross-linker, NLS peptide

核因子- κ B (Nuclear factor- κ B, NF- κ B) 是一类重要的转录因子,参与正常细胞的多种生物学活动。NF- κ B 的异常活化与肿瘤、炎症、自身免疫以及胚胎畸形发育等众多疾病发生密切相关^[1-3]。NF- κ B 信号转导通路可能成为临床相关疾病基因治疗的一个新的作用靶点。寡核苷酸诱骗子 (ODNs decoy) 是一种能从转录水平对基因表达进行有效调控的新策略^[4-5]。寡核苷酸诱骗子调控基因表达的机理是将含有某个转录因子结合位点 (DNA-binding site) 的寡核苷酸导入细胞内,与核内具有 DNA 结合活性的转录因子结合,削弱转录因子与基因组 DNA 中其靶点的结合,从而抑制了转录因子对下游靶基因的转录活性。目前,使用脂质体、阳离子多聚物、纳米粒子携带寡核苷酸诱骗子进入细胞的效率已经很高^[6-8]。Griesenbach 等^[9]采用脂质体作载体转导 NF- κ B ODNs decoy,认为虽然 ODNs 很容易被细胞捕获,但由于聚集在细胞质中,并不能有效抑制核内 NF- κ B 的活性及其下游基因的表达。因此,ODNs decoy 导入细胞后是否进入细胞核,是其发挥调控转录因子活性的关键^[10]。近年来实验证实,核定位信号肽 (Nuclear localization signal, NLS) 能引导蛋白质、DNA、ODNs 和化学治疗药物等外源性生物大分子进入细胞核^[11-12]。Ludtke 等^[13]分别构建生物素 (Biotin) 修饰的 ODNs 和亲合素 (Streptavidin) 修饰的 NLS 多肽,利用 biotin-streptavidin 特异性结合反应将 NLS 与不同大小的 DNA 片段连接起来,通过显微注射将 NLS-DNA 连接物导入 HeLa 细胞中,增加了 DNA 片段的入核效率。Sakaguchi 等^[14]构建了“谷胱甘肽-S-转移酶 (GST)-7 个精氨酸残基-GAL4 DNA 结合域-NLS”组成的转导体系,在功能性蛋白质 GST 和多肽 NLS 介导下,携带 ODNs 穿越细胞质膜,进入细胞核。本研究采用 Sulfo-SMCC 异源双功能交联试剂将末端 NH₂ 修饰的诱骗子 ODNs 和末端巯基修饰 NLS 寡肽共价连接,形成 NLS-ODNs decoy;以脂质体包埋 NLS-ODNs decoy 转染 HeLa 细胞,观察 NLS 介导的 ODNs decoy 入核效率,考

察 NLS-ODNs decoy 对核内 NF- κ B 活性的抑制作用。

1 材料与方法

1.1 材料

宫颈癌 HeLa 细胞株,购自中国科学院上海细胞研究所。实验所用的 NF- κ B ODNs decoy 和 NLS 多肽均由上海英俊生物技术有限公司合成,序列及末端修饰见表 1。DMEM 培养基、TransME 脂质体转染试剂为美国 Gibco 产品。小牛血清由杭州四季青生物工程技术有限公司生产。肿瘤坏死因子 (TNF- α) 购自美国 Peprotech 公司。IllustraTM NICK 核酸纯化柱,美国 Amersham 公司产品。Sulfo-SMCC 交联试剂 (4-(N-maleimidomethyl)-cyclohexane-1-carboxylic acid N-hydroxysuccinimide ester, SMCC) 为美国 Sigma 公司产品。DNA 凝胶回收试剂盒购自 QIAGEN 公司。

表1 NLS多肽及ODNs的序列及末端修饰

Table 1 Sequences and modifications of the NLS peptide and ODNs

Name	Sequences and modifications
Decoy ODNs (DO)	5'-NH ₂ -AGTTGAGGGGACTTTC ^u CCAGGC-3' 3'-TCAACTCCCCTGAAAGGGTCCG-Cy3-5'
EMSA ODNs (EO)	5'-Bio-AGTTGAGGGGACTTTC ^u CCAGGC-3' 3'-TCAACTCCCCTGAAAGGGTCCG-Bio-5'
Competitive ODNs (CO)	5'-AGTTGAGGGGACTTTC ^u CCAGGC-3' 3'-TCAACTCCCCTGAAAGGGTCCG-5'
Nonspecific competitive ODNs (NO)	5'-CGCTTGATGAGTCAGCCCGAA-3' 3'-GCGAACTACTCAGTCGGGCCTT-5'
NLS peptide	N terminal-PKKKRKVEDPYC(SH ₂)-C terminal

The specific binding sites for NF- κ B included in the sequences are indicated by underlining

1.2 方法

1.2.1 双链寡核苷酸复性

将构成 ODNs decoy 及 EMSA ODNs 的两条序列互补寡核苷酸 (见表 1) 分别溶解在 TEN 缓冲液 (10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0; 1 mmol/L EDTA; 100 mmol/L NaCl) 中,再等摩尔混合,95℃水浴 5 min,然后缓慢降至室温,形成双链寡核苷酸

(ds-ODNs), 4℃保存备用。

1.2.2 NLS-ODNs 结合物的制备

复性后的 ODNs decoy 与 40 倍过量的 Sulfo-SMCC 交联试剂 (以二甲基甲酰胺制成 30 mmol/L 的储存液) 混合, 室温下反应 2 h; 未反应的 SMCC 通过 Nick 核酸纯化柱除去。回收的 ODNs decoy 与 NLS 多肽 (以无菌水制成 2.5 mmol/L 的储存液) 按照 1:10 摩尔数比例混匀, 室温下反应过夜^[13]。反应产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶, 回收纯化 NLS-ODNs decoy 连接物。纯化产物再次用琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.3 细胞培养

HeLa 细胞用含 10% (V/V) 小牛血清、100 U/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素的 DMEM 培养液培养, 培养箱温度为 37℃, CO₂ 浓度为 5%。当细胞融合度达到 90% 后, 弃原培养液, 再用磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤 2 次后, 0.25% 胰酶消化传代继续培养。

1.2.4 NF- κ B decoy ODNs 转染细胞

转染前 24 h, 取生长状况良好的 HeLa 细胞, 经胰酶消化制成细胞悬液, 调整细胞密度为 5×10^4 个/mL, 每孔 200 μ L 接种于 96 孔板, CO₂ 培养箱中培养过夜。NF- κ B decoy ODNs 转染细胞按照 TransME 转染试剂使用说明进行, 在无菌 Eppendorf 管中按 1:25 体积比混合 TransME 试剂和无血清 DMEM 培养液, 轻轻吹打混匀, 室温下放置 15 min; 再将 TransME 混合液加入 decoy ODNs 溶液至终浓度 0.5 μ g/ μ L, 室温放置 10 min, 即可用于细胞转染。细胞随机分成 6 组, 分别为: 不转染对照组、TransME 转染组 (无 ODNs)、decoy ODNs 转染组 (无 TransME)、TransME/decoy ODNs 转染组、TransME/NLS-decoy ODNs 转染组。

1.2.5 NLS-ODNs 连接物对细胞生长的影响

MTT 法检测各种转染对细胞生长的影响。细胞转染后 24 h 更换培养液, 每孔加入 180 μ L 无血清 DMEM 培养液和 20 μ L MTT (5 mg/mL), 继续培养 4 h。轻轻吸除孔内培养液, 每孔加入 150 μ L DMSO 溶解甲瓩盐。用酶标仪读取 570 nm 波长吸光度值 (OD)。

1.2.6 荧光显微镜观察 ODNs 细胞内分布

转染 ODNs 24 h 后, 将细胞用 4℃ 预冷 PBS 洗

涤 3 次, 经 4% 多聚甲醛固定后用 DAPI 染色显示细胞核。在荧光显微镜下分别用可见光、绿色光通道 (550 nm) 和紫外光通道 (358 nm) 观察细胞并拍照记录。随机选取若干个视野, 分别计算 ODNs 转染细胞和进入细胞核的效率。

1.2.7 HeLa 细胞的诱导、核蛋白提取

HeLa 细胞转染 24 h 后, 用 10 ng/mL 的 TNF- α 诱导 40 min, 0.25% 胰酶消化并收集各组细胞。以 4℃ 预冷 PBS 清洗 2 次, 将细胞团块重新悬浮于 400 μ L 4℃ 预冷溶液 A (10 mmol/L HEPES, pH 7.9, 10 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L DTT, 0.4 mmol/L PMSF) 中, 冰上肿胀 15 min, 再加入 20 μ L 10% NP-40, 高速振荡 10 s, 12 000 \times g 离心 30 s。弃上清, 沉淀重新悬浮于 4℃ 预冷溶液 B (20 mmol/L HEPES, pH 7.9, 420 mmol/L NaCl, 1.5 mmol/L MgCl₂, 0.2 mmol/L EDTA, 0.5 mmol/L PMSF, 25% Glycerol) 中, 冰浴振荡 30 min, 12 000 \times g 离心 15 min。转移上清, Bradford 法定定核蛋白浓度。

1.2.8 凝胶电泳迁移率变化分析 (EMSA)

10 μ g HeLa 细胞核蛋白与生物素 (Biotin) 标记的 dsDNA 探针 (见表 1 EMSA ODNs, EO) 在 5 倍 DNA 结合缓冲液 (50 mmol/L Tris·HCl, pH 7.5, 250 mmol/L NaCl, 2.5 mmol/L EDTA, 15 mmol/L MgCl₂, 5% Glycerol, 2.5 mg/mL BSA, 0.25% NP-40, 0.25 mmol/L DTT) 中, 室温孵育 1 h。竞争性实验中, HeLa 细胞核蛋白与所需数量的竞争性 dsDNA (表 1 Competitive ODNs, CO) 及非特异性竞争 dsDNA (表 1 Nonspecific competitive ODNs, NO) 混合, 室温孵育 30 min 后, 再加入生物素标记的 dsDNA 探针, 室温下继续孵育 1 h。反应产物上样于 6% 非变性聚丙烯酰胺凝胶, 100 V 电泳 2 h。凝胶 dsDNA 电转印到尼龙膜。尼龙膜经紫外交联、洗涤、封闭处理后, 使用过氧化物酶 (HRP) 标记的链霉亲合素 (Streptavidin) 及 HRP 化学发光底物 (ECL) 进行化学发光检测^[15]。X-光片显影结果经凝胶成像系统扫描后, 分析迁移带积分灰度值。

1.2.9 统计学方法

所有数据以均 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异采用方差分

析, 两组间均值比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果

2.1 NLS-ODNs 的连接反应

NLS-ODNs 连接物纯化前后的电泳结果见图 1。ODNs 由于共价结合了 NLS 多肽, 分子量增大, 改变了其在凝胶中的迁移率。通过 DNA 凝胶纯化试剂盒回收纯化滞后带, 可完全除去游离的 ODNs 和 NLS。

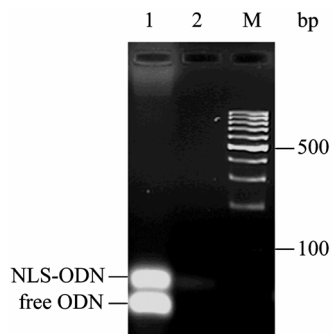


图 1 纯化前后的 NLS-ODNs 连接物的凝胶电泳检测
Fig. 1 Gel electrophoresis of the NLS-ODNs ligation products before and after purification. 1: ligation reaction of NLS peptide, decoy ODNs and Sulfo-SMCC; 2: purified NLS-ODNs conjugate.

2.2 NLS-ODNs 连接物对细胞生长的影响

以空白组调零后的各组 OD 值代表细胞的生长活力。MTT 比色实验结果显示 (图 2), 与对照组细胞相比, 各实验组的细胞生长活力无统计学显著性差异 ($P > 0.05$)。表明各种转染处理对细胞活力没有显著影响。

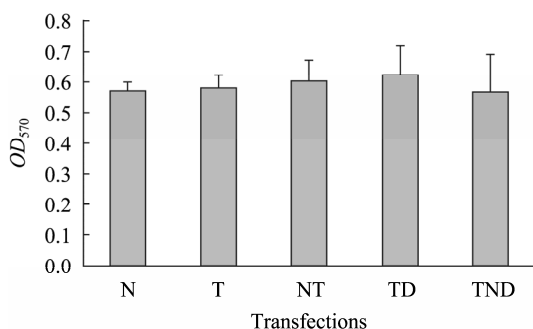


图 2 各转染组对 HeLa 细胞活力的影响

Fig. 2 Effect of transfection group on HeLa cell viability. N: negative; T: TransME; ND: naked DO; TD: TransME+DO; TND: TransME+NLS-DO.

2.3 NLS-ODNs 在细胞内的分布

不同转染组细胞的倒置荧光显微镜观察结果见图 3、图 4。实验结果表明裸 ODNs 组直接转染细胞的效率很低 (图 3B, 图 4B), ODNs 用脂质体 (TransME) 包埋后, 转染率显著提高, 但进入细胞的 ODNs 主要分布在细胞质中, 而细胞核中的分布不明显 (图 3F, 图 4F)。将 ODNs 共价连接 NLS 肽后, 再用脂质体包埋转染细胞时, NLS-ODNs 大量进入细胞, 在细胞质中呈现围核分布, 但同时细胞核中也出现明显的分布 (图 3J, 图 4J)。随机选取若干个视野, 统计约 100 个细胞 (表 2), TransME 和 TransME/NLS-ODNs 组细胞转染率分别高达 100% 和 97.2%, TransME/NLS-ODNs 组 ODNs 进入细胞核的百分率 (17.9%) 显著高于其他两组。结果显示用 NLS 修饰 decoy ODNs 可显著提高 decoy ODNs 进入细胞核的效率。

表 2 不同转染方式对 ODNs 进入 HeLa 细胞核效率的影响
Table 2 Effect of transfection group on rate of ODNs nuclear translocation in HeLa cells

Transfection groups	Number of cells (n)	Rate of transfection (%)	Rate of nuclear translocation (%)
ODNs	122	33.6 (41/122)	0 (0/41)
TransME/ODNs	138	100* (138/138)	2.12 (4/138)
TransME/NLS-ODNs	108	97.2* (105/108)	17.9* (19/105)

* $P < 0.05$

2.4 NF- κ B 活性的凝胶迁移实验分析

提取未转染处理及各种转染处理细胞的核抽提物 (核蛋白), 用凝胶迁移实验分析核抽提物中 NF- κ B 的活性, 电泳 EMSA 检测结果见图 5。图 6 为 3 次 EMSA 检测结果的积分灰度值统计结果。结果显示, NLS 修饰的 decoy ODNs 可显著抑制 TNF- α 诱导的 HeLa 细胞核内 NF- κ B 的活性。

3 讨论

转录因子诱骗子策略是利用人工合成的与转录因子具有高亲和力的寡核苷酸竞争性结合转录因子, 使其丧失与内源性基因结合的能力, 从转录水平调节基因表达^[4,16]。Decoy 技术不仅是研究转录调控机理的有力工具, 同时也为基因治疗的临床应用提供了新的途径^[5]。如何将 decoy ODNs 有效地

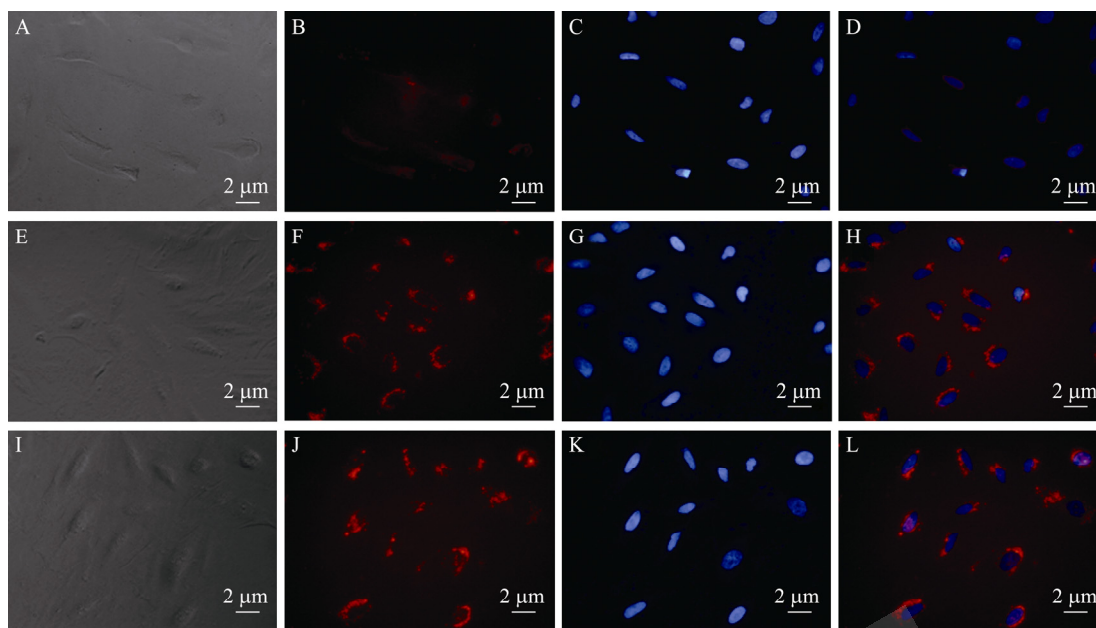


图 3 各转染组中 ODNs 转染 HeLa 细胞 24 h 后的荧光显微观察

Fig. 3 ODNs transfection efficiency on HeLa cells after 24 h. (A-D) Naked ODNs. (E-H) TransME/ODNs. (I-L) TransME/NLS-ODNs. (A, E, I) Cells under sunlight. (B, F, J) Fluorescence (exciting at 550 nm). (C, G, K) Fluorescence (exciting at 358 nm). (D, H, L) Combination of the Cy3 and DAPI fluorescence.

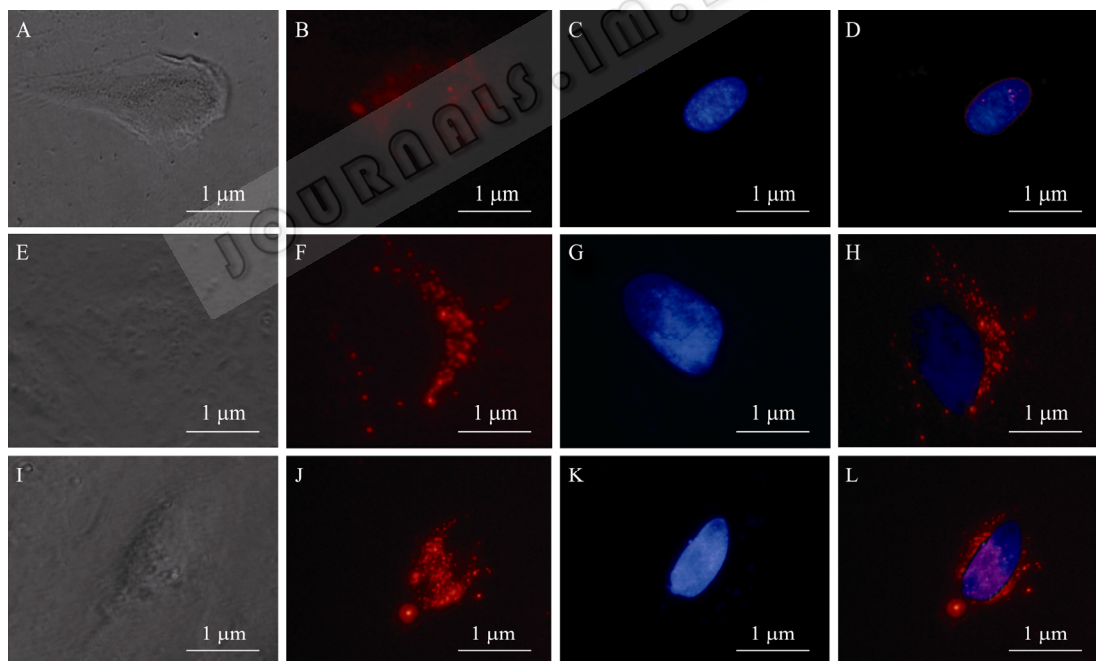


图 4 各转染组中 ODNs 转染 HeLa 细胞 24 h 后的单细胞荧光显微观察

Fig. 4 ODNs transfection efficiency on HeLa cells after 24 h with single-cell analysis. (A-D) naked ODNs. (E-H) TransME/ODNs. (I-L) TransME/NLS-ODNs. (A, E, I) Cells under sunlight. (B, F, J) Fluorescence (exciting at 550 nm). (C, G, K) Fluorescence (exciting at 358 nm). (D, H, L) Combination of the Cy3 and DAPI fluorescence.

转运到靶细胞中, 尤其是细胞核中, 发挥调控作用是 decoy 技术的关键问题。研究证实, 在载体中加入核定位信号多肽可以明显改善载体的入核效率。本研究采用异源双功能交联试剂 (Sulfo-SMCC) 共

价交联末端经氨基修饰的 ODNs 和经巯基修饰的 NLS 寡肽, 以脂质体转染 NLS-ODNs 连接物进入 HeLa 细胞, 在 NLS 介导下, 提高 ODNs 进入细胞核的效率, 增强其对核转录因子的调控作用。

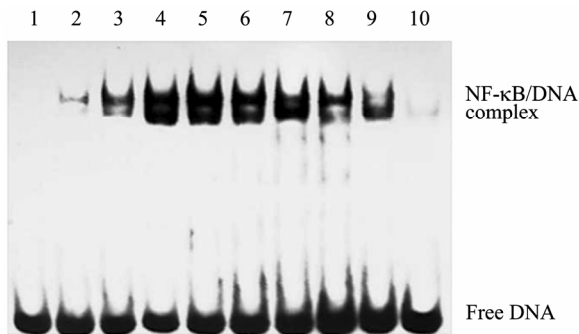


图5 各转染组对 TNF- α 诱导 HeLa 细胞核内 NF- κ B 活性调节分析

Fig. 5 Effect of transfection group on activity of NF- κ B in TNF- α inducing HeLa nucleus. 1: negative; 2-4: nuclear extract (NE) with 10 \times , 5 \times , 1 \times CO, respectively; 5: NE with 5 \times NO; 6: NE; 7-10: NE from cells transfected with TransME, DO, TransME/DO and TransME/NLS-DO, respectively.

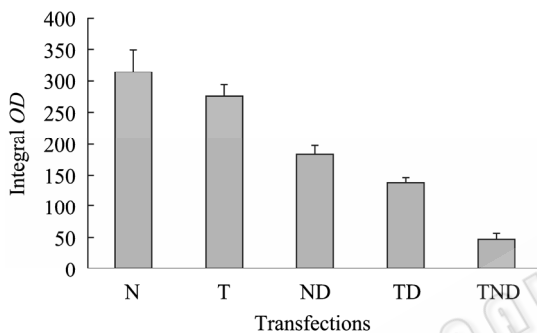


图6 各转染组对 TNF- α 诱导 HeLa 细胞核内 NF- κ B 活性调节分析

Fig. 6 Effect of transfection group on activity of NF- κ B in TNF- α inducing HeLa nucleus. N: negative; T: TransME; ND: naked DO; TD: TransME/DO; TND: TransME/NLS-DO.

Sulfo-SMCC 是目前较好的生物大分子交联试剂, 由于其拥有 2 个反应基团, 可以与标记有不同活性基团的生物大分子反应, 从而尽可能减少交联中不期望的同源多聚体或自身交联物的形成^[17]。同时, 细胞活力的 MTT 测定结果说明, 用于共价连接 NLS-ODNs 的 SMCC 对细胞生长未产生显著抑制, 因此, SMCC 可作为制备 NLS-ODNs 连接物的良好交联剂。

以往研究者多采用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离纯化 NLS-ODNs 连接物^[13,18], 本研究尝试利用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离纯化 NLS-ODNs 连接物。由于 NLS 多肽在 TBE 为电解质的琼脂糖凝胶中不发生迁移 (数据未显示), 因此游离的 NLS 和 NLS-ODNs 连接物在凝胶中可彻底分离。选用 DNA 凝胶回收试

剂盒, 经过简单的胶回收就可以纯化出 NLS-ODNs 连接物。

脂质体 TransME 转染试剂转染效率高, TransME/ODNs 组的 ODNs 聚集在细胞质, 进入细胞核的效率很低, 而 TransME/NLS-ODNs 组的 ODNs 在核内分布明显。但同时 TransME/NLS-ODNs 组在细胞质中存在着较多的分布, 其原因可能是 NLS-ODNs 连接物包裹在脂质体中, 未被核转运因子 (Importin α) 识别^[19]。如何进一步提高 NLS-ODNs 的入核效率, 仍是今后需要研究的问题。

REFERENCES

- [1] Baldwin AS Jr. Series introduction: the transcription factor NF- κ B and human disease. *J Clin Invest*, 2001, **107**(1): 3-6.
- [2] Torchinsky A, Toder V. To die or not to die: the function of the transcription factor NF- κ B in embryos exposed to stress. *Am J Reprod Immunol*, 2004, **51**(2): 138-143.
- [3] Tripathi P, Aggarwal A. NF- κ B transcription factor: a key player in the generation of immune response. *Curr Sci India*, 2006, **90**(4): 519-531.
- [4] Boizgatti M, Bezzeri V, Mancini I, *et al.* Silencing of genes coding for transcription factors: biological effects of decoy oligonucleotides on cystic fibrosis bronchial epithelial cells. *Minerva Biotechnol*, 2008, **20**(2): 79-83.
- [5] Mann MJ, Dzau VJ. Therapeutic applications of transcription factor decoy oligonucleotides. *J Clin Investig*, 2000, **106**(9): 1071-1075.
- [6] De Rosa G, Maiuri MC, Ungaro F, *et al.* Enhanced intracellular uptake and inhibition of NF- κ B activation by decoy oligonucleotide released from PLGA microspheres. *J Gene Med*, 2005, **7**(6): 771-781.
- [7] Hu Y, Wang HF, Sun WQ, *et al.* Regulation of tissue factor expression in brain microvascular endothelial cells by PLA nanoparticles coating NF- κ B decoy oligonucleotides. *Chin J Hematol*, 2005, **26**(9): 534-538.
胡豫, 王华芳, 孙望强, 等. 聚乳酸纳米粒介导 decoy 片段调控大鼠脑微血管内皮细胞组织因子表达的体外研究. *中华血液学杂志*, 2005, **26**(9): 534-538.
- [8] Zhong RD, Zhou J, Liao LQ, *et al.* Liposome mediated NF- κ B decoy ODN inhibits expression of inflammatory factor and injury of lungs in a rat model of severe acute pancreatitis. *Chin J Gen Surg*, 2007, **22**(6): 453-456.
钟荣德, 周杰, 廖柳清, 等. 脂质体介导 NF- κ B decoy ODN 对重症急性胰腺炎大鼠肺炎因子 mRNA 表达和

- 肺损伤的影响. 中华普通外科杂志, 2007, **22**(6): 453-456.
- [9] Griesenbach U, Cassady RL, Cain RJ, *et al.* Cytoplasmic deposition of NF- κ B decoy oligonucleotides is insufficient to inhibit bleomycin-induced pulmonary inflammation. *Gene Ther*, 2002, **9**(16): 1109-1115.
- [10] Bene A, Kurten RC, Chambers TC. Subcellular localization as a limiting factor for utilization of decoy oligonucleotides. *Nucleic Acids Res*, 2004, **32**(19): e142.
- [11] Eguchi A, Furusawa H, Yamamoto A, *et al.* Optimization of nuclear localization signal for nuclear transport of DNA-encapsulating particles. *J Control Release*, 2005, **104**(3): 507-519.
- [12] Opanasopit P, Rojanarata T, Apirakaramwong A, *et al.* Nuclear localization signal peptides enhance transfection efficiency of chitosan/DNA complexes. *Int J Pharm*, 2009, **382**(1/2): 291-295.
- [13] Ludtke JJ, Zhang GF, Sebestyen MG, *et al.* A nuclear localization signal can enhance both the nuclear transport and expression of 1 kb DNA. *J Cell Sci*, 1999, **112**(12): 2033-2041.
- [14] Sakaguchi M, Nukui T, Sonogawa H, *et al.* Targeted disruption of transcriptional regulatory function of p53 by a novel efficient method for introducing a decoy oligonucleotide into nuclei. *Nucleic Acids Res*, 2005, **33**(9): e88.
- [15] Hua D, Li ML, Wang JK. A comparison between two chemiluminescent electrophoresis mobility shift assay (EMSA) methods. *J Biomed Eng Res*, 2007, **26**(2): 111-115.
华东, 李敏俐, 王进科. 两种化学发光电泳迁移率变动分析技术的比较. 生物医学工程研究, 2007, **26**(2): 111-115.
- [16] Isomura I, Morita A. Regulation of NF- κ B signaling by decoy oligodeoxynucleotides. *Microbiol Immunol*, 2006, **50**(8): 559-563.
- [17] Chen P, Wang J, Hope K, *et al.* Nuclear localizing sequences promote nuclear translocation and enhance the radiotoxicity of the anti-CD33 monoclonal antibody HuM195 labeled with ^{111}In in human myeloid leukemia cells. *J Nucl Med*, 2006, **47**(5): 827-836.
- [18] Zanta MA, Belguise-Valladier P, Behr JP. Gene delivery: A single nuclear localization signal peptide is sufficient to carry DNA to the cell nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**(1): 91-96.
- [19] Fontes MRM, Teh T, Kobe B. Structural basis of recognition of monopartite and bipartite nuclear localization sequences by mammalian importin- α . *J Mol Biol*, 2000, **297**(5): 1183-1194.