文章编号：1000-5404(2005)05-0395-04

论著

转录因子 CREB 激活介导吗啡依赖 SK-N-SH 细胞的 nNOS 及 *fosB* 基因表达的调控机制

苏彦君，丛　斌，张国忠，张　瑾，李淑瑾，姚玉霞，付丽红　（河北医科大学法医学教研室，石家庄 050017）

提　要：目的　探讨吗啡依赖的 SK-N-SH 细胞表达神经元型一氧化氮合酶（neuronal nitric oxide synthase，nNOS）及 *fosB* 基因的调控机制。**方法**　建立吗啡依赖及戒断细胞模型，体外合成含 cAMP 反应元件（cAMP response element，CRE）序列的寡核苷酸，经硫代磷酸化修饰，作为单链寡核苷酸（CRE-transcription factor decoy oligodeoxynucleotide，CRE-decoy ODN）。分别采用电泳迁移率改变分析（electrophoresis mobility shift assay，EMSA）及 RT-PCR 技术，检测 CRE-decoy ODN 对吗啡依赖及纳络酮急性戒断诱导的 CREB 的 DNA 结合活性、nNOS 及 *fosB* mRNA 表达的影响。**结果**　吗啡依赖及纳络酮急性戒断使 SK-N-SH 细胞的 CREB 的 DNA 结合活性、nNOS 及 *fosB* mRNA 明显升高，CRE-decoy ODN 可特异抑制上述指标升高。**结论**　CREB 的激活介导了吗啡依赖 SK-N-SH 细胞的 nNOS 及 *fosB* mRNA 表达上调。

关键词：吗啡；SK-N-SH 细胞；CREB；一氧化氮合酶；*fosB*
中图法分类号：R345.44；R394-33；R394.3　　**文献标识码：**A

Activation of transcription factor CREB mediates the upregulation of nNOS and *fosB* genes in morphine-dependent SK-N-SH cells

SU Yan-jun, CONG Bin, ZHANG Guo-zhong, ZHANG Jin, LI Shu-jin, YAO Yu-xia, FU Li-hong (Department of Forensic Science, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, Hebei Province, China)

Abstract: Objective　To investigate the mechanisms of morphine-dependent SK-N-SH cells in the regulation of the expressions of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) and *fosB* genes. **Methods**　Morphine-dependent and naloxone-precipitated cellular model systems were established. A synthetic single-stranded phosphorothioate oligodeoxynucleotide composed of the cAMP response element (CRE) sequence was used as CRE-transcription factor decoy oligodeoxynucleotide (CRE-decoy ODN) and was added to the culture medium. The effects of CRE-decoy ODN on the DNA-binding activity of CREB and the expressions of nNOS and *fosB* genes in morphine-dependent and naloxone-precipitated SK-N-SH cells were detected by electrophoresis mobility shift assay (EMSA) and RT-PCR, respectively. **Results**　Morphine dependence and naloxone-precipitated withdrawal significantly activated the DNA-binding activity of CREB and the expressions of nNOS and *fosB* genes. CRE-decoy ODN could penetrate into cells and specifically and stably downregulate these indexes. **Conclusion**　The activation of transcription factor CREB can mediate the upregulation of the expressions of nNOS and *fosB* genes in morphine-dependent SK-N-SH cells.

Key words: morphine; SK-N-SH cell; CREB; nitric oxide synthase; *fosB*

阿片类和其它成瘾药物依赖和耐受的形成具有共同的细胞和解剖通路。受体后的细胞、突触和神经网络的适应性改变，是依赖和耐受产生的关键和基础[1,2]。突触可塑性在其中的作用至关重要。吗啡和其它成瘾药物反复刺激神经元，引起胞浆内 cAMP 持续升高，导致蛋白激酶 A 激活，从而使转录因子 CREB 经磷酸化激活。磷酸化 CREB 形成二聚体与基因启动子内 cAMP 反应元件（cAMP response element，CRE；序列 TGACGTCA）结合而诱导靶基因表达上调，参与突触可塑性的长期改变[2]。突触传递效力增强或减弱被认为是形成学习和记忆的物理和生化基础。从低等动物蜗牛、果蝇、啮齿类到人，均是如此[1]。目前已知，神经元型一氧化氮合酶[3]（neuronal nitric oxide synthase，nNOS）和 *fosB*[4,5] 基因表达上调参与了药物依赖和耐受形成，其启动子内含 CRE 序列。对 nNOS 和 *fosB* 基因在药物依赖和耐受中的表达变化及调控机制的研

作者简介：苏彦君（1967－），女，河北省赵县人，博士研究生，讲师，主要从事吗啡依赖分子机制方面的研究。电话：(0311)6265602
通讯作者：丛　斌，E-mail：bincong@263.net
收稿日期：2004-09-20；修回日期：2004-12-11

究，尚少见报道。本研究以 CREB 为靶点，体外合成单链寡核苷酸（CRE-transcription factor decoy oligodeoxynucleotide，CRE-decoy ODN），导入人神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞株，检测其对吗啡依赖诱导的 CREB 的 DNA 结合活性、nNOS 及 *fosB* 基因表达的影响，为在分子水平探讨阿片类依赖的基因调控机制及寻找干预靶点提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

SK-N-SH 细胞株购自中国典型培养物保藏中心；盐酸吗啡（10 mg/ml，批号：020909）购自沈阳第一制药厂；盐酸纳络酮和 MEM 购自 Sigma；Gel-shift Assay System、AMV-RT 及 *Taq* DNA 聚合酶购自 Promega；CRE-decoy ODN、mismatch ODN、nonsense ODN、nNOS、*fosB* 及 β-actin 引物由上海 Sangon 合成；Trizol 购自 GIBCO BRL；γ-[^{32}P]ATP 购自北京市福瑞生物工程公司；抗 CREB 多克隆抗体购自 Santa Cruz Biotech；阳离子脂类 N-[1-(2, 3-dioleoyloxy) propyl]-N, N, N-trimethylammonium methylsulfate (DOTAP) 购自 Roche。

全硫代磷酸化修饰的 ODN 序列[6]：① CRE-decoy ODN：5′-TGACGTCA TGACGTCA TGACGTCA-3′，可自身杂交形成发夹结构；② mismatch ODN：5′-TGTGGTCA TGTGGTCA TGTGGTCA-3′；③ nonsense ODN：5′-CTAGCTAG CTAGCTAG CTAGCTAG-3′，也可自身杂交形成发夹结构。按说明书将 ODN 与 DOTAP 混合。

fosB[7] 上游引物：5′-GCTATTTATCCCTTTCCTG-3′；下游引物：5′-TGCTCACACTCTCACACTC-3′；扩增片断 461 bp。

nNOS[8] 上游引物：5′-CCTCCCGCCCTGCACCATCTT-3′；下游引物：5′-CTTGCCCCATTTCCATTCCTCGTA-3′；扩增片断 263 bp。

β-actin[7] 上游引物：5′-TACCACTGGCATCGTGATGGACT-3′；下游引物：5′-TCCTTCTGCATCCTGTCGGCAAT-3′；扩增片断 506 bp。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与加药处理　在含 2 mmol/L L-谷氨酰胺、0.1 mmol/ L 非必需氨基酸、10% 胎牛血清的 MEM 培养液中，于 37 ℃含 5% CO_2 孵育箱中单层细胞培养。实验分 12 组：生理盐水对照组（C）、吗啡依赖组（M）、吗啡 + 纳络酮组（M + N）、单纯 CRE-decoy ODN 组（D）、吗啡 + CRE-decoy ODN 组（M + D）、吗啡 + mismatch ODN 组（M + mis）、吗啡 + nonsense ODN 组（M + non）、吗啡 + DOTAP 组（M + DOTAP）、吗啡 + 纳络酮 + CRE-decoy ODN 组（M + N + D）、吗啡 + 纳络酮 + mismatch ODN 组（M + N + mis）、吗啡 + 纳络酮 + nonsense ODN 组（M + N + non）和吗啡 + 纳络酮 + DOTAP 组（M + N + DOTAP）。细胞融合到约 60% 时，加入吗啡，终浓度为 100 μmol/L，与细胞孵育 48 h 后，加入纳络酮，终浓度为 10 μmol/L，作用 15 min。DOTAP、各 ODN 与 DOTAP 的混合物分别在吗啡使用前 1 h 加入，其终浓度为 150 nmol/L。利用倒置显微镜观测各组细胞形态及数量。

1.2.2 提取细胞核蛋白　按文献[6]提取。

1.2.3 ^{32}P 标记 CREB 结合双链探针及 CRE-decoy ODN　使用 T4 多核苷酸激酶，分别进行 5′-末端标记。采用 LS 6500 液体闪烁计数仪（Beckman，USA）测定标记物的放射活性。CREB 结合双链探针的比活度为 9.25×10^{13} Bq/mmol，^{32}P 标记 CRE-decoy ODN 的比活度为 8.22×10^{13} Bq/mmol。

1.2.4 电泳迁移率改变分析（EMSA）　参考文献[6]，实验内容包括：① ^{32}P 标记 CREB 结合双链探针与 CREB 的结合反应：反应体系中加入 1 μl（17.5×10^{-15} mol）标记双链探针。② 抑制结合：特异性抑制结合，即在反应体系中分别加入 1 μl（1.75×10^{-12} mol）未标记 CREB 结合双链探针、CRE-decoy ODN；非特异性抑制结合，即在反应体系中分别加入 1 μl（1.75×10^{-12} pmol）未标记 AP-2 结合双链探针、mismatch ODN 及 nonsense ODN。③CREB 抗体结合抑制实验：反应体系中加入 2 μg 抗 CREB 多克隆抗体。④对照结合反应：即阴性对照（未加细胞核提取物）和阳性对照（加 HeLa 细胞核提取物）。⑤电泳：反应产物经 6% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳，电压 350 V，时间 45 min。电泳结束，将凝胶干燥，－70 ℃放射自显影 48 h。采用凝胶图像分析系统（Gel-Pro Analyzer Version 3.0，Media Cybernetics）对电泳谱带进行半定量分析，以相对吸光度单位（RDU）表示 CREB 的 DNA 结合活性。

1.2.5 细胞内 CRE-decoy ODN 的稳定性检测　按 2×10^5 细胞/孔将细胞接种至 24 孔板，每孔加入 3 ng ^{32}P 标记 CRE-decoy ODN 与 18 ng DOTAP 的混合物，CRE-decoy ODN 终浓度为 150 nmol/L。1 h 后，每孔内加入终浓度为 100 μmol/L 的吗啡。在 CRE-decoy ODN 与细胞作用 24 h，48 h 后，分别同时收集 2 孔细胞，加高渗裂解液（75 mmol/L NaCl，24 mmol/L EDTA）20 μl，用酚：氯仿法提取 DNA[6]。提取的 DNA、合成的 3 种 ODN 及 10 bp DNA step marker 在同一块 20% 非变性聚丙烯酰胺凝胶上同时进行电泳，电压 150 V，时间 2.5 h。上样时，提取的 DNA 与人工合成的 ODN 之间隔数个上样孔。上样量分别为 ^{32}P 标记 CRE-decoy ODN 3 ng，提取的 DNA 10 μl，每种 ODN 为 50 ng，Marker 为 1 μl。电泳结束，把凝胶从间隔处切开，将含提取 DNA 的凝胶烤干，－70 ℃放射自显影 48 h，含 Marker 及 3 种 ODN 的凝胶用银染色。

1.2.6 RT-PCR 检测 nNOS 及 *fosB* mRNA 表达　用 Trizol 提取细胞总 RNA。①反转录：反应体系为 25 μl，按试剂盒说明书操作。②PCR 扩增：取 4 μl cDNA，分别加入 50×10^{12} mol 的 *fosB* 或 nNOS 上游和下游引物，25×10^{12} mol 的 β-actin 上游和下游引物，2.5 U *Taq* DNA 聚合酶，组成 50 μl 反应体系。*fosB* 扩增条件为 94 ℃ 3 min，然后每个循环 94 ℃ 45 s，56 ℃ 45 s，72 ℃ 45 s，共循环 35 次；72 ℃ 延伸 5 min。nNOS 的退火温度为 60 ℃，其余条件同 *fosB*。③RT-PCR 产物半定量分析：取 15 μl PCR 反应产物经 1.8% 琼脂糖凝胶电泳，电压 100 V，时间 40 min。采用同样的凝胶图像分析系统对电泳谱带进行半定量分析，分别计算 *fosB*、nNOS 与 β-actin 的吸光度比值，以表示 mRNA 相对表达量。

1.3 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 11.0 软件进行单因素方差分析，两两比较用 S-N-K 法。

2 结果

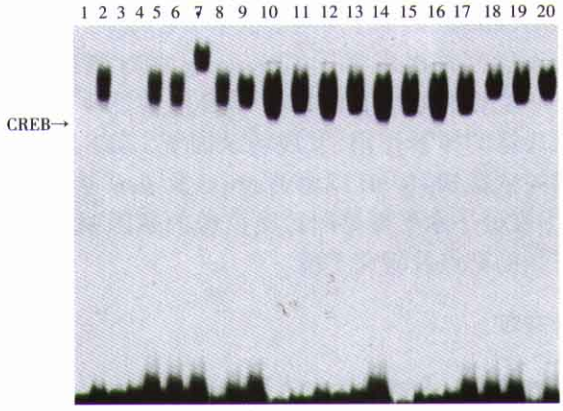
2.1 细胞形态及数量

倒置显微镜下见细胞为上皮样，形态一致，贴壁良好。培养液澄清，未见死细胞漂浮。各组细胞数量介于（1.01 ~ 1.03）

$\times 10^9$/L，统计学差异不显著（$F = 0.333$，$P = 0.729$）。

2.2　CRE-decoy ODN 对 CREB 的 DNA 结合活性的影响

吗啡依赖组和吗啡＋纳络酮组细胞 CREB 的 DNA 结合活性明显高于生理盐水对照组（$F = 2753.627$，$P = 0.000$），且纳络酮戒断组高于吗啡依赖组（$P < 0.01$）；CRE-decoy ODN 明显抑制吗啡依赖和纳络酮急性戒断细胞 CREB 的 DNA 结合活性升高（$P < 0.01$），抑制程度分别为 46.65% 和 45.92%；对未受吗啡和纳络酮刺激的细胞，抑制作用（$P < 0.01$）较小，抑制程度仅为 15.24%；mismatch ODN、nonsense ODN 和 DOTAP 对吗啡依赖及纳络酮戒断所诱导的上述指标升高均无抑制作用（$P > 0.05$）。为 ^{32}P 标记 CREB 结合双链探针浓度 100 倍的未标记 CREB 结合双链探针及 CRE-decoy ODN 分别特异抑制 CRE-蛋白复合物形成，不含 CRE 序列的相同浓度未标记 mismatch ODN、nonsense ODN 及 AP-2 结合双链探针均无抑制作用。抗 CREB 抗体引起 CRE-蛋白复合物的 supershift（图 1、表 1）。



1,2: Negative and positive controls; 3 – 8: Binding site specificity was tested with the ^{32}P-labeled double-stranded CREB consensus oligonucleotide and in the presence of 100-fold excess unlabeled cold competitors as CREB consensus double-stranded oligonucleotide, CRE-decoy ODN, mismatch ODN, nonsense ODN, 2 μg polyclonal antibody against CREB, and unlabeled AP-2 double-stranded consensus oligonucleotide, correspondingly; 9 – 11: saline-treated control cells, naloxone-precipitated cells, and morphine-dependent cells, respectively; 12, 13: Naloxone-precipitated and morphine-dependent cells treated with mismatched ODN, respectively; 14,15: Naloxone-precipitated and morphine-dependent cells treated with nonsense ODN, respectively; 16,17: Naloxone-precipitated and morphine-dependent cells treated with DOTAP, respectively; 18 – 20: Saline-treated control, naloxone-precipitated, and morphine-dependent cells treated with CRE-decoy ODN, respectively

图 1　CRE-decoy ODN 与 CREB 结合的特异性及对 CREB 的 DNA 结合活性的抑制作用

Fig 1　Binding site specificity and inhibitory effects of CRE-decoy ODN on the DNA-binding activity of CREB in morphine-dependent SK-N-SH cells

2.3　细胞内 CRE-decoy ODN 存在的稳定性

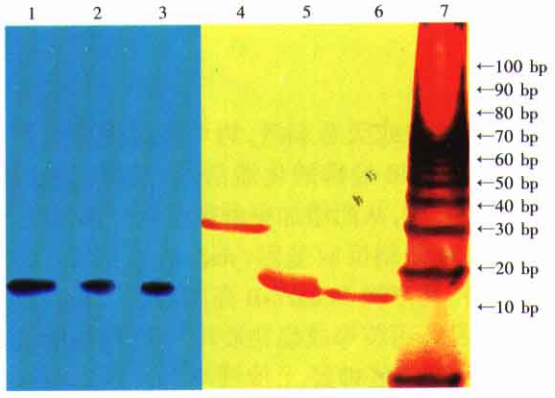
银染色显示 mismatch ODN 电泳谱带位于 30 bp，CRE-decoy ODN 与 nonsense ODN 电泳谱带均位于 18 bp。放射自显影结果提示，^{32}P 标记的 CRE-decoy ODN 未导入细胞时，电泳谱带位于 18 bp，当其与细胞作用 24、48 h 后，从细胞内提取的 DNA 在 18 bp 处有电泳谱带。提示 ^{32}P 标记的 CRE-decoy ODN 能在细胞内稳定存在（图 2）。

表 1　CRE-decoy ODN 对吗啡依赖 SK-N-SH 细胞 CREB 的 DNA 结合活性及 *fosB*、nNOS mRNA 表达的抑制作用（$n = 5$，$\bar{x} \pm s$）

Tab 1　Inhibitory effect of CRE-decoy ODN on the DNA-binding activity of CREB, *fosB*, and nNOS mRNA in morphine-dependent SK-N-SH cells（$n = 5$，$\bar{x} \pm s$）

Group	CREB	*fosB*（%）	nNOS（%）
C	191.60 ± 13.52	20.2 ± 1.4	21.9 ± 1.0
M	538.00 ± 11.51**	98.4 ± 0.5**	39.4 ± 0.5**
M + N	710.00 ± 11.60**##	28.3 ± 0.6**##	88.5 ± 0.5**##
D	162.40 ± 7.83**	15.9 ± 0.8**	19.7 ± 0.9**
M + D	287.00 ± 4.53##**	48.0 ± 0.7##**	26.2 ± 0.8##**
M + N + D	384.00 ± 12.51△△**	20.9 ± 1.0△△	34.7 ± 0.6△△**
M + mis	542.00 ± 6.01**	98.2 ± 1.0**	38.8 ± 1.0**
M + non	544.00 ± 7.91**	98.1 ± 0.8**	38.9 ± 0.9**
M + DOTAP	544.00 ± 5.61**	98.0 ± 1.0**	38.9 ± 0.7**
M + N + mis	716.80 ± 4.92**##	27.9 ± 1.0**##	88.4 ± 0.5**##
M + N + non	715.60 ± 6.73**##	27.8 ± 1.0**##	88.4 ± 0.6**##
M + N + DOTAP	715.60 ± 4.56**##	27.7 ± 0.8**##	88.0 ± 0.7**##

C: Saline-treated control; M: Morphine; N: Naloxone; D: CRE-decoy ODN; mis: mismatch ODN; non: nonsense ODN; **: $P < 0.01$, *vs* C; ##: $P < 0.01$, *vs* M; △△: $P < 0.01$, *vs* M + N



1: ^{32}P-labeled CRE-decoy ODN; 2,3: cell-incorporated ^{32}P-labeled CRE-decoy ODN over 24 h, 48 h; 4 – 6: mismatch, CRE-decoy and nonsense ODN; 7: 10 bp DNA step marker

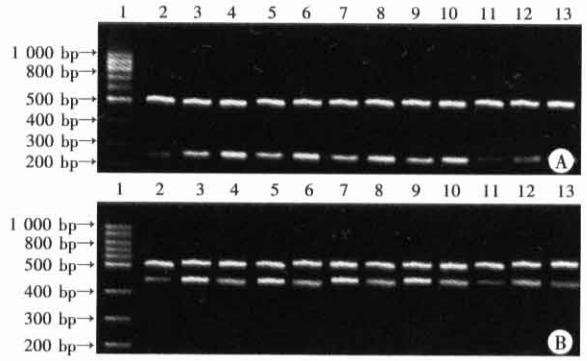
图 2　20%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳、放射自显影及银染色检测吗啡依赖 SK-N-SH 细胞内掺入的 CRE-decoy ODN 的稳定性

Fig 2　The stability of cell-incorporated CRE-decoy ODN in morphine-dependent SK-N-SH cells by 20% nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis, autoradiography and silver staining

2.4　CRE-decoy ODN 对 nNOS 及 *fosB* mRNA 表达的影响

RT-PCR 结果表明，生理盐水对照组细胞表达少量 nNOS 及 *fosB* mRNA，吗啡依赖和纳络酮急性戒断使其表达明显升高（nNOS：$F = 7\,836.793$，$P = 0.000$；*fosB*：$F = 8\,185.222$，$P = 0.000$）。CRE-decoy ODN 显著抑制吗啡依赖及纳络酮戒断所诱导的 nNOS 及 *fosB* 升高（$P < 0.01$），而对未受吗啡和纳络酮刺激的 SK-N-SH 细胞的抑制作用较弱（$P < 0.01$）；CRE-decoy

ODN 对 nNOS 的抑制程度依次为 33.72%、60.83% 和 10.13%，而对 *fosB* 的抑制程度依次为 51.24%、26.24% 和 16.86%。Mismatch ODN、nonsense ODN 和 DOTAP 对吗啡依赖诱导的 nNOS 及 *fosB* mRNA 均无抑制作用($P>0.05$)（图 3、表 1）。



1: Marker; 2: Saline-treated control; 3: Morphine(M); 4: M + Naloxone (N); 5: M + mismatch ODN; 6: M + N + mismatch ODN; 7: M + nonsense ODN; 8: M + N + nonsense ODN; 9: M + DOTAP; 10: M + N + DOTAP; 11: CRE-decoy ODN(D); 12: M + D; 13: M + N + D

图 3 CRE-decoy ODN 对吗啡依赖 SK-N-SH 细胞表达 nNOS/β-actin（A）及 *fosB*/β-actin（B）基因共扩增电泳结果

Fig 3 Electrophoretic results of CRE-decoy ODN on the expression for nNOS/β-actin (A) and *fosB*/β-actin (B) in morphine-dependent SK-N-SH cells

3 讨论

反复的欣快或厌恶刺激，均可通过受体后作用引起转录因子 CREB 经磷酸化激活，启动特定基因转录及新蛋白质合成，从而增加突触数目及传递强度[2]。

作为一种即刻反应基因，*fosB* 表达依赖 CREB 的磷酸化调节，其产物 DeltaFosB 高度稳定。慢性应用可卡因、吗啡及苯丙胺等成瘾物质均导致 DeltaFosB 在伏隔核和腹侧被盖区神经元持续增加。DeltaFosB 半衰期长，可稳定存在数周，能持续抑制伏隔核和腹侧被盖区神经元表达强啡肽和脑啡肽基因，从而参与药物奖赏效应的形成[4,5]。

生物体内有 3 种 NOS，均以 L-精氨酸为前提生成 NO，其中 nNOS 与阿片类药物滥用关系最为密切[3]。CREB 通过与其外显子 2 启动子内的 CRE 作用来调控 nNOS 基因表达[9]。NO 是中枢神经系统内一种可扩散的重要信号分子，参与突触可塑性、突触传递长时程增强及长时程抑制，其释放过量则产生神经毒性作用。在体内应用 NOS 拮抗剂或反义寡核苷酸，通过阻断 NO 产生，可有效缓解实验动物吗啡依赖及耐受，故 NO 被认为参与了吗啡依赖和耐受的形成[3,9]。

SK-N-SH 细胞来自人类大脑，具有神经元主要特性，以 1.5:1 的比例表达人 μ 及 δ 阿片受体。实验表明吗啡依赖 SK-N-SH 细胞 CREB 的 DNA 结合活性明显升高，体外合成回文结构的 CRE-decoy ODN，导入 SK-N-SH 细胞 48 h 后，仍以非整合形式稳定存在。150 nmol/L CRE-decoy ODN 显著抑制吗啡及纳络酮诱导的 CREB 的 DNA 结合活性、nNOS 及 *fosB* 表达活性升高，不含 CRE 序列的 nonsense 及 mismatch ODN 则无抑制作用，证实 CRE-decoy ODN 的抑制作用具有序列特异性；而抗 CREB 抗体与核蛋白提取物中的 CREB 特异结合后，再加入 ^{32}P 标记的 CREB 双链探针，形成了抗体-蛋白-CRE 复合物，该复合物的分子量及结构不同与 CRE-蛋白复合物，可导致电泳谱带的 supershift，证实 CRE-decoy ODN 对 CREB 的 DNA 结合活性、nNOS 及 *fosB* 基因的抑制作用具有结构特异性。CRE-decoy ODN 对未受吗啡及纳络酮刺激的 SK-N-SH 细胞的 CREB 的 DNA 结合活性、nNOS 及 *fosB* 基因表达也有抑制作用，但程度远低于对吗啡依赖细胞的抑制作用。

本研究首次观察了 CRE-decoy ODN 对吗啡依赖 SH-N-SH 细胞 CREB 的 DNA 结合活性、nNOS 及 *fosB* 基因表达的抑制作用，发现转录因子 CREB 激活介导了吗啡依赖 SK-N-SH 细胞的 nNOS 及 *fosB* 基因表达上调，为在分子水平探寻阿片类依赖的基因调控机制提供了新的靶点及研究手段。

参考文献：

[1] Johnston M V, Alemi L, Harum K H. Learning, memory, and transcription factors[J]. Pediatr Res, 2003, 53(3): 369 - 374.

[2] Williams J T, Christie M J, Manzoni O. Cellular and synaptic adaptations mediating opioid dependence[J]. Physiol Rev, 2001, 81(1): 299 - 343.

[3] Esplugues J V. NO as a signalling molecule in the nervous system[J]. Br J Pharamcol, 2002, 135(5): 1079 - 1095.

[4] Nestler E J, Barrot M, Self D W. DeltaFosB: A sustained molecular switch for addiction[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(20): 11042 - 11046.

[5] Chen J, Kelz M B, Hope B T, *et al*. Chronic Fos-related antigens: stable variants of DeltaFosB induced in brain by chronic treatments[J]. J Neurosci, 1997, 17(13): 4933 - 4941.

[6] 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. gene-specific inhibition of tumor growth [J]. J Biol Chem, 1999, 274(3): 1573 - 1580.

[7] Bernard K, Cambiaggi A, Guia S, *et al*. Engagement of natural cytotoxicity programs regulates AP-1 expression in the NKL human NK cell line[J]. J Immunol, 1999, 162(7): 4062 - 4068.

[8] Elizalde M, Ryden M, van Harmelen V, *et al*. Expression of nitric oxide synthases in subcutaneous adipose tissue of nonobese and obese humans[J]. J Lipid Res, 2000, 41(8): 1244 - 1251.

[9] Hall A V, Antoniou H, Wang Y, *et al*. Structural organization of the human neuronal nitric oxide synthase gene (NOS1)[J]. J Biol Chem, 1994, 269(52): 33082 - 33090.

（编辑 汪勤俭）