维普资讯 http://www.cqvip.com

综 述 文章编号:0253-3626(2007)05-0554-04

分子影像学中的肿瘤反义基因显像

文 明[1],柏 玮[2] 综述,李少林[2] 审校

(1.重庆医科大学附属第一医院放射科;2.重庆医科大学基础医学院放射医学教研室,重庆 400016)

【中国图书分类法分类号】R817.4 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-12-11

分子影像学是在分子水平针对活体特征和生物进程的一种成像技术,相对于传统的影像学,它偏向于了解疾病的基础变化、基因分子水平的异常,而不是对由这些分子改变所构成的最终结果进行成像。所以,它最突出的特点,就是用影像手段非创伤性地对活体内参与生理和病理过程的分子进行定性或定量的可视化观察。在分子成像中,制备特异性高亲和力的靶向探针是显像的关键因素,也是进行分子影像学研究的先决条件。研究显示,采用反义基因技术制备的癌基因特异性探针,能够提高探针在肿瘤组织内的靶/非靶比值,经相应的成像系统扫描,可从影像上实现对基因表达的有效检测,从而对肿瘤作出早期、特异性的诊断,因此成为生命科学关注的一个焦点[1,2]。

1 反义基因技术[3~5]

上世纪 70 年代,约翰·霍普金斯医学院和哈佛大学医学院的研究者用寡聚核苷酸特异性抑制 Rous 肉瘤病毒的复制,发现基因的表达能够被 mRNA-DNA 双倍体特异性阻断,并在世界上首次提出了反义寡核苷酸理论(Antisense oligonucleotides,ASON)。经过学者们的大量研究,在该理论基础上形成了一门全新的基因工程技术—反义基因技术。

反义基因技术是继基因克隆和重组技术后分子生物学领域兴起的又一门新技术。它是根据碱基互补原理,利用 ASON 与细胞内的 DNA 或 mRNA 特异结合,封闭它们的转录、翻译,达到调节基因表达的目的。

ASON 的来源可分为二类:①生物体自身表达的反义载体,即利用基因重组技术在适宜的启动子和转录终止子之间反向插入一个靶基因,转录后产生的 ASON,可与靶 mRNA 特异结合;②利用基因合成技术,人工合成一段 ASON,与靶基因 mRNA 互补结合,干扰基因信息的转录、翻译和表达。

反义基因技术最初研究的重点是反义治疗,人们已能人工合成不同化学修饰的 ASON 作为核酸类药物,用于肿瘤、病毒感染、炎症性疾病、遗传性疾病和高血压等的治疗。近年来,该技术发展很快,将反义基因技术用于分子影像学,如与核医学有机结合,形成了一种新的诊断方法,即反义基因显像,扩大了反义技术的应用范围,使得人们对疾病的诊断进入分子水平。

2 肿瘤反义基因显像技术中的若干问题

反义基因显像是以反义基因技术为基础,合成与靶基因互补的 ASON,根据碱基互补结合的原则,对靶基因进行显像,能从分子水平显示癌基因的过度表达,达到对肿瘤病变早期、特异性的诊断[6]。ASON 的许多特性,如体内稳定性、较高的细胞膜转运效率等是反义治疗和反义基因显像的共同要求,除此之外,用于反义显像的 ASON 还应具备一些独特的特性,如快速定位、非靶位快速清除、靶位滞留的时间足够长、血浆蛋白结合率低等。

2.1 ASON 的设计原则

ASON 的设计通常需要从以下几个方面加以考虑[7,8]:①应该避免含 4 个或 4 个以上的连续鸟嘌呤碱基,因为它们可通过 Hoog-steen 碱基配对形成 G-四聚体,导致非反义效应。为了克服此问题,可对鸟苷酸进行修饰,如变为 7-脱氮鸟苷,则避免了形成 Hoog-steen 配对。②在设计体内实验时,应避免含鸟嘌呤核苷酸(Cytosine-phospho-guanine,CpG)序列的 ASON。因为碱基序列大多遵循 5'-PurPurCG-PyrPyr-3'这一规律,即 5'端为 2 个嘌呤,3'端为 2 个嘧啶。这种序列可激活多种免疫活性细胞,引起非反义效应。③避免与靶基因外的 mRNA 杂交,可在网上进行 BLAST 匹配。④设计严格对照的 ASON,常采用随机序列对照(与 ASON 碱基组成相同,但随机排列)、正义对照、颠倒序列对照、错配对照(与 ASON 在个别位点上碱基不同)等。

研究表明[4],反义抑制作用的特异性还取决于 ASON 的长度,这是由于 ASON 的长度直接影响到与靶基因结合的特异性、可接近性和稳定性、能否被 RNase-H 酶识别,以及对细胞膜的渗透性等。另外,ASON 的长短还与反义探针成本高低成正相关。众所周知,细胞中每条核苷酸均含有 4 种不同的碱基,单倍体人基因组约含 3×10^9 个碱基。从统计学计算,17~18 个碱基序列长度将有一次出现的机会,并能较好地接近基因靶位,故当 ASON 的长度少于 15 个碱基对时则不显示反义活性。但考虑到 ASON 越短,越容易进入细胞;过

作者介绍:文 明(1964-),男,副主任医师,博士,主要研究方向:分子影像学。

基金项目:本课题受国家自然科学基金(30070230)、重庆市卫生局科研基金(062025)及重庆医科大学优秀博士基金(重医大文 2006-182)资助。

维普资讯 http://www.cqvip.com

长则易扭曲或形成二级结构,影响与靶 mRNA 的结合。所以,设计时一般控制 ASON 的长度为 15~20 碱基对,这样在统计学上可保证其专一性。

2.2 ASON 的分子修饰

天然的寡核苷酸 (Oligonucleotide,ON) 又称为第一代 DNA,由磷酸二酯键组成,带负电荷,类似多聚阴离子,而通常状况下细胞膜也带负电荷, 导致 ON 的细胞摄取率很低;此外,它还对血中和细胞内的核酸酶特别敏感,容易被降解。特别是血浆中的核酸外切酶,能使进入机体内的 ON 半衰期缩短到几秒到几分钟,很难在靶位聚集足够的浓度,故在制备 ASON 时,必须对其结构进行各种形式的修饰。ON 经修饰后的结构,称为第二代或第三代 DNA。修饰的目的除了提高 ASON 对核酸酶的稳定性外,还能增加与靶基因杂交的专一性和亲和性[3]。

针对 ON 的结构,修饰可定位在其骨架、核糖或碱基,也可在核酸片段的末端进行偶联修饰[9]。考虑到核酸酶的作用位点主要是 ON 的磷酸二酯键,因此修饰主要针对磷酸二酯键来进行。对磷酸二酯键的修饰包括:①对 P-O 键的修饰;②C 取代 P;③S 取代 P;④将含 N 衍生物引入核苷酸骨架,如对戊糖 2'位点的修饰、对碱基的修饰、对戊糖 1'位点的 α 和 β 修饰。

所有化学修饰方法, 以硫代化的研究比较成熟, 即用 P-S 键代替 P-O 键[10]。这种修饰保留了原 ON 骨架的负电荷,有良好的杂交性及对核酸酶的抗性, 能水解并切除杂交体 (RNA/PS-ON)中的 RNA 链,使 mRNA 断裂;并易于自动合成,修饰后在细胞内的半衰期比未修饰者显著延长。另外,此类物质属水溶性, 与靶 mRNA 结合形成的复合物能被 RNase-H 所水解,因而在反义技术中广为应用并已发展至临床试验。但硫代化修饰后会因为引入了一个手性磷原子而产生立体异构体,可表现出不同的稳定性和活性。对此,学者们建议对 ON 的硫代化修饰仅限于在其末端进行。此外,ON 主要依靠胞饮作用进入细胞,常态下进入细胞速度缓慢。研究表明[11],若在 ON 末端连上某些特殊功能基团如 L—多聚赖氨酸,可大大增强其进入细胞的能力,这是因为 L—多聚赖氨酸为多价阳离子,与细胞膜表面阴离子相结合产生的静电吸引可促进与其相连的 ON 进入细胞;此外,在 ON 末端连上疏水性物质如胆固醇,同样也有利于细胞吸收。

在 ON 硫代化修饰的基础上,近年来学者们又设计了一种嵌合性的 ON, 或称之为混合性骨架寡核苷酸(Mixture bone oligonucleotides,MBON)。即在硫代化修饰的 ON 5'端和 3' 端加上一些保护性基团, 以增强 ON 对核酸酶的稳定性,延长半衰期[4,12]。常用的修饰是加上核酸保护帽,如对 ON 的核糖部分 2'-O- 烷化, 由于 2'-O- 烷化链所提供的空间微扰和旋转限制, 阻碍了核酸酶进入到相邻的核苷酸连接区,故具有较好的核酸酶抗性,而且与互补的 RNA 有很强的亲和力;缺点是加上核酸保护帽的 ON 不能作为 RNase-H 的底物。另一种常用的修饰是在硫代化修饰的 ON 中间掺入 8~12 个碱基,被认为是第二代 ON 的最佳结构。其典型的结构通常包含位于中间的硫代化修饰 ON 片段 (含 8~10 个碱基) 和两端含有 4~6 个碱基的 2'-O- 甲基化或甲氧乙基化的 ON 组成,其 Tm 可以增加 10℃之多,而 Tm 发生 5℃的变化则相当于 ON 与 RNA 的结合力增加大约 10 倍。所以,这种修饰除了能明显提高 MBON 与 RNA 的亲和力外, 更为显著的是在它们在体内对核酸酶的稳定性增强,同时保留激活 RNase-H 酶降解靶位 RNA 的能力。

第三代 DNA 称为肽核酸 (Pep-tide nucleic acid,PNA)[4,13],是由 N-(2- 氨乙基)- 甘氨酸(聚酰胺)组成肽键的骨架取代普通核酸中磷酸二酯键骨架后,所构成的一类中性非手性分子。PNA 与靶目标 DNA 或 RNA 杂交,可形成双螺旋或三螺旋结构,能有效抵制核酸酶和蛋白酶的降解,在血清及细胞中的稳定性很高。此外,PNA 不介导 RNase-H 酶活性,PNA-RNA 复合物中的 RNA 不易被 RNase-H 酶降解, 其反义作用机制是立体阻断 RNA 的加工及向细胞的运输或翻译过程。但是,PNA 通常在生理盐水中不易溶解,因而不能很好地被细胞吸收。鉴于此,人们研制出另外一种 ASON,称为锁核酸(Locked nucleic acid,LNA)[14,15],它是一种特殊的双环状核苷酸衍生物,结构中含有一个或多个 2'-O 及 4'-C- 亚甲基 -β-D- 呋喃核糖核酸单体,核糖的 2'-O 位和 4'-C 通过不同的缩水作用形成氧亚甲基桥、硫亚甲基桥或胺亚甲基桥,并连接成环形,这个环形桥锁定了呋喃糖 C3'- 内型的 N 构型,不但降低了核糖结构的柔韧性,还增加了磷酸盐骨架局部结构的稳定性。由于 LNA 与 DNA/RNA 在结构上具有相同的磷酸盐骨架,故对 DNA、RNA 有很好的识别能力和强大的亲和力。LNA 有很多优点:①和 DNA、RNA 互补的双链有很强的热稳定性; ②抗 3' 脱氧核苷酸酶降解的稳定性;③LNA-DNA 杂交物能激活 RNase-H;④水溶性好,自由穿入细胞膜,易被机体吸收;⑤体内无毒性作用;⑥具有高效的自动寡聚化作用,合成方法相对简单。

2.3 ASON 在靶细胞的选择性摄取

ASON 进入细胞的途径有胞吞 (endocytosis)、胞饮 (pinocytosis)、经脂质体或受体介导等方式。但是 ASON 为多聚阴离子,不能通过细胞膜,胞吞、胞饮的摄取率较低,人们常选择脂质体包裹或受体介导等,增加细胞摄取率。

受体介导的 ASON[3,6]:利用配体与相应细胞表面受体结合的高特异性、高选择性及高亲和等特性,将 ASON 与配体相连接,形成相应的介导复合物,复合物通过配基与受体结合所介导的内化途径进入细胞。目前,常用的靶向性受体有表皮生长因子受体(EGFR)、叶酸受体(FAR)、血管活性肠肽受体(VIPR)和转铁蛋白受体(HTfR)等。受体介导的优点有:①具有细胞、组织或器官专一性;②配体进入细胞的转移效率很高; ③被介导的 ASON 与周围环境之间存在保护层,可以抵抗环境中核酸酶的降解作用。

免疫脂质体介导的 ASON[4,5,11,16]:脂质体是由脂质双分子层组成的环形封闭囊泡,低毒、无免疫原性,可携载各种

维普资讯 http://www.cqvip.com

ASON 而不被核酸酶降解。制备脂质体的方法有多种，主要有反相蒸发(revers phase evaporation，REV)和去污剂控制透析制备的负电荷脂质体，以及阳离子脂质体{N-[1-(2,3-dioleyloxy)-propy-N,N,N K-trimethy]-ammonium chloride}(DOTMA)和二油酸磷脂酸乙醇脂(DOPE)或超声制作的脂质体即 Lipofectin。目前人们已能根据需要，制备出不同大小(0.03~50μm)、不同电荷、不同流动性以及对 pH 和热敏感的脂质体，亦可将归巢装置(homing devices)如抗体、糖脂等连于脂质体，以提高脂质体的靶向性。已证实，阴离子和阳离子脂质体都可提高 ASON 与细胞的结合能力，增强其生物活性。在脂质体介导下，血液循环中的 ASON 至少在 24h 内保持完整，而单纯的 ASON 5min 后将不能被检测到。由于 ASON 与脂质体结合后主要集中在细胞核，而单纯 ASON 则主要位于细胞质中，因而脂质体改变了其在细胞内的分布，使 ASON 在细胞核内的作用时间延长。应当指出，在有血清或血浆存在时，脂质体的作用将受到抑制；此外，脂质体浓度高于 20μmol/L 时，具有细胞毒性。

2.4 ASON 的标记

用于核医学显像的标记物有 ^{111}In、^{99m}Tc 等，^{111}In 因具有合适的半衰期和能峰而适于显像，但需要加速器产生，价格昂贵；^{99m}Tc 具有理想的物理半衰期(约 6h)，适于显像的能峰约 140keV，容易获取，价格便宜，能在短时间内(<24h)对肿瘤进行显像，目前被广泛用于显像研究[1,6]。

最初 ^{99m}Tc 标记的 ASON 方法与 ^{111}In 相同[18-20]，也是以 DTPA(二乙三胺五醋酸)作螯合剂，但发现获得的标记物极不稳定；若用 SHNH(联肼尼克酰胺衍生物)代替 DTPA 作为螯合剂标记后，形成的标记物性质很稳定，标记率为 30%~60%，^{99m}Tc 的解离量很少，只有 4%。但是，^{99m}Tc -SHNH-ASON 较 ^{111}In -DTPA-ASON 的血清蛋白结合率高，容易造成图像背景的噪音加大，干扰观察。有学者用 S-acetyl(硫代乙酰基)代替苯甲酰基，合成了 S-acetyl-MAG_3 并用于 ASON 的偶联和标记，结果发现，在不增加温度(室温)及标记时间(15min)的情况下，标记率可达 84%，比活度达 216MBq/μg。采用用同样方法，对 PNA 进行 ^{99m}Tc 标记，标记率为 30%~70%，比活度则高达 317MB/μg。可见，S-acetyl-MAG_3 是一种很有希望的双功能螯合剂[21]。

3 肿瘤反义基因显像的研究进展

3.1 反义基因显像的优点[12,22]

1984 年，Izant JG 和 Weintraub H 等利用重组 DNA 技术设计和制备出了反义单纯疱疹病毒胸苷激酶(Herpes simplex virus-thymide kinase，HSV-tK)mRNA 的表达载体，开创了通过体外转录得到 ASON 的先河。由于 ASON 只作用于特异的 mRNA 分子，不引入外源 DNA，故不存在外源 DNA 整合到靶细胞 DNA 上的问题。另一方面，ASON 多是一种 RNA 分子，无论怎样修饰，它还是无法抵抗细胞内 RNA 酶的水解作用，最终都将被降解，即不留“残渣”，即使出现了一些未预料到的副作用，也可以通过停止用药来终止副作用，所以具有较高的安全性。ASON 及其配体复合物免疫原性低，这是因为ASON 分子一般很小(<1kb)，自身没有抗体。临床研究也发现，即使同一核酸复合物的掺入剂量很大，也从未检测到体内存在多肽或核酸的抗体。

3.2 常见癌基因的反义显像

c-myc 基因在白血病、Burkitt 淋巴肉瘤、小细胞肺癌及乳腺癌等恶性肿瘤中有高表达，它编码一种 DNA 结合蛋白转录因子，其亮氨酸拉链结构能结合一种称之为 max 的蛋白，形成的复合物可结合到许多基因的 5'末端(CACGTG)。这样，c-myc 基因的开启和过度表达就导致了一系列的基因表达，产生细胞恶性增殖。有学者以 DTPA 为螯合剂制备 ^{111}In 标记的反义探针，成功地进行了荷乳腺癌小鼠模型 c-myc 癌基因的 mRNA 显像，T/NT(瘤/非瘤)比值在注射后 0.5h 达 21.48，第 24h 为 18.38，这是反义显像成功的例子之一[23]。

不少研究已经证明[6,23-25]，c-erbB2 癌基因在多数肿瘤中均存在扩增和过度表达，其表达产物是生长因子受体，具有酪氨酸激酶活性，能够增强转录和增殖信号，对肿瘤的预后、临床治疗方案具有重要的意义。一项研究以 ^{111}In 标记 c-erbB2 反义 mRNA 的两种 DNA(磷酸二酯键 DNA 和磷硫键 DNA)，对荷乳腺癌小鼠模型 c-erbB2 癌基因显像，注射后 1hT/B(瘤/血)比值分别为 3.7±0.2 和 4.2±0.5，T/M(瘤/肌肉)比值分别为 22.5±2.6 和 23.1±2.5。本课题组在导师李少林教授的带领下，以 c-erbB2 为靶基因，设计一段与目的基因 mRNA 互补的 15 个碱基对 ASON，用放射性核素 ^{99m}Tc 标记，再与表皮生长因子连接，得到反义探针。探针注入荷乳腺癌裸鼠体内显像，在肿瘤部位可见到明显的放射性浓聚[6,20]。

4 肿瘤反义基因显像的前景[1,3,5,12,23]

反义基因显像存在着 ASON 不能有效地进入肿瘤细胞这一难题，必须采用脂质体包裹和受体介导等手段，脂质体本身对细胞膜有毒性，对受体配基大分子复合物须考虑稳定性和透过性等，而所形成复合物的药代动力学特性、半衰期和血浆清除率也是研究中十分关心的问题。另外，由于 ASON 可能的非特异性基因封闭效果，有可能在体内产生非靶细胞毒性；ASON 是带电荷的阴离子，能非特异性结合生长因子，可对正常细胞产生毒性。

此外，用于核医学显像的标记物均存在放射性辐射，对实验细胞、动物及实验者有不同程度的损伤；所获得的图像空间分辨率和组织分辨率有待提高。当前，本课题组尝试用超顺磁性氧化铁(Superparamagnetic iron oxide，SPIO)代替放射性核素标记 ASON，制备反义探针，经过 MRI 扫描，初步研究发现，所获得的 MRI 图像空间分辨率较高，解剖结构清晰，可望拓展反义基因显像在分子影像学中的应用范围。

参 考 文 献

[1] Cherry SR.In vivo molecular and genomic imaging:new chal-

维普资讯 http://www.cqvip.com

lenges for imaging physics[J].Phys Med Biol,2004;49(1):13-48.

[2] 文 明,李少林.磁共振成像用于分子影像学研究[J].中国医学影像技术,2007;23(1):147-150.

[3] Avitian TB.In vivo antisense imaging[J].Q J Nucl Med,2000;44(1):236-255.

[4] 孟 博,朱大海.反义 RNA 技术的应用与进展[J].国外医学遗传学分册,2001;24(6):289-292.

[5] 吴永忠,任庆兰,李少林.脂质体 -c-erbB2 反义寡核苷酸对人卵巢癌裸鼠皮下移植瘤的治疗作用[J].实用癌症杂志,2003;18(1):6-8.

[6] 谢 娟,李少林,张玉诺,等.99mTc 标记 c-erbB2 反义寡脱氧核苷酸对乳腺癌显像的实验研究 [J]. 中华医学杂志,2005;85(41):2940-2942.

[7] Allawi HT,Fang D,Ip SH,et al.Mapping of RNA accessible sites by extension of random oligonuctide libraries with reverse transcriptase[J].RNA,2001;7(2):314-327.

[8] Zhang HY,Mao JP,Zhou DX,et al.mRNA accessible sites tagging (MAST):a novel high throughput method for selecting effective antisense oligonucleotides[J]. Nucleic acides Res,2003;31(1):72-80.

[9] Tamm I,Dobrken B, Hartmann G. Antisense therapy in oncology:new hope for an old idea[J].Lancet,2001;358(9280):489-497.

[10] Wang RF,Qiu F,Zhang CL.Labeling of antisense oligonucleotides with ^{125}I and the experimental research of identification of the lymphoma cell by using ^{125}I-FR-ASON[J].J Nucl Med,2003;44(5):369.

[11] Asaoka K,Tadam, Sawamura Y,et al.Dependence of efficient adenviral gene delivery in malignant glioma cells on the expression levels of the coxsackievirus and adenovirus recepter[J].J Neursurg,2000;92(8):1002-1008.

[12] 郑素军,任 红,王升启.反义寡核苷酸研究进展[J].国外医学临床生物化学与检验学分册,2004;25(6):506-509.

[13] Braasch DA,Corey DR.Novel antisense and peptide nucleic acid strategies for controlling gene expression[J].Biochemistry,2002;41(14):4503-4510.

[14] Morita K,Hasegawa C,Kaneko M,et al.2'-O,4'-C-ethylene-bridged nucleic acids (ENA):highly nuclease-resistant and thermodynamically stable oligonucleoides for antisense drug[J].Bioorg Med Chem Lett,2002;12 (1):73-76.

[15] Kurreck J,Wyszko E,Gillen C,et al.Design of antisense oligonucleotides stabilized by locked nucleicacids[J].Nucleic Acids Res,2002;30(9):1911-1918.

[16] Lubrich B,Calker D,Peschka SR. Inhibition of inositol uptake in astrocytes by antisense oligonucleotides delivered by pH-sensitive liposomes[J]. Eur J Biochem,2000;267(8):2432-2438.

[17] Zhang YM,Wang Y,Liu N,et al.In vitro investigations of tumor targeting with 99mTc -labeled antisense DNA[J].J Nucl Med, ^{99m}Tc 2001;42(11):1660-1669.

[18] Zhang YM,Liu N,Zhu ZH,et al.Influence of different chelators (HYNIC, MAG3 and DTPA)on tumor cell accumulation and mouse biodistribution of technetium-99m labeled to antisense DNA[J].Eur J Nucl Med,2000;27(11):1700-1707.

[19] 黄家君,谢 娟,李少林,等.^{99m}Tc-MAG3-ASON 药代动力学研究[J].重庆医科大学学报,2006;31(3):366-368.

[20] Wang Y,Chang F,Zhang Y,et al.Pretargeting with amplification using polymeric peptide nucleic acid[J]. Bioconjugate Chem,2001;12(5):807-816.

[21] Hnatowich D.Antisense imaging:Where are we now Cancer Biother[J].Radiopharm,2000;15:447-457.

[22] Myers KJ,Dean NM.Sensible use of antisense:how to use oligonucleotides as research tools[J].Trends Phimacol Sci,2000;21(1):19-23.

[23] 秦光明.肿瘤核素反义显像技术的研究现状与展望[J].国外医学放射医学核医学分册,2001;25(5):213-216.

[24] Van de Vijver MJ.Assessment of the need and appropriate method for testing for the human epidermal growth factor receptor-2 (HER-2)[J].Eur J Cancer,2001;37(supp 11):11-17.

[25] Sutsui T,Ohno S,Murakami S,et al.Prognostic value of c-erbB2 expression in breast cancer[J].J Surgical Oncology,2002;79:216-223.

(上接第 553 页)

[4] Kanayama A,Seth RB,Sun L,et al.TAB2 and TAB3 activate the NF-kappaB pathway through binding to polyubiquitin chains[J].Mol Cell,2004;15(4):535-548.

[5] Meylan E,Burns K,Hofmann K,et al.RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor3- induced NF-kappa B activation[J].Nat Immunol,2004;5(5):503-507.

[6] Sun L,Chen ZJ.The novel functions of ubiquitination in signaling[J].Curr Opin Cell Biol, 2004;16(2):119-126.

[7] Evans PC,Ovaa H,Hamon M,et al.Zinc-finger protein A20,a regulator of inflammation and cell survival, has de-ubiquitinating activity[J].Biochem J,2004;378(Pt3):727-734.

[8] Ea CK,Deng L,Xia ZP,et al.Activation of IKK by TNFalpha requires site-specific ubiquitination of RIP1 and polyubiquitin binding by NEMO[J].Mol Cell,2006;22(2):245-257.

[9] Lakhani SR. Putting the brakes on cylindromatosis [J].N Engl J Med,2004;350(2):87-188.

[10] Mauro C,Pacifico F,Lavorqna A,et al.ABIN-1 binds to NEMO/IKKgamma and co-operates with A20 in inhibiting NF-kappaB[J]. J Biol Chem,2006;281(27):18482-18488.

[11] Wu CJ,Conze DB,Li T,et al.Sensing of Lys 63-linked polyubiquitination by NEMO is a key event in NF-kappaB activation [J].Nat Cell Biol,2006;8(4):398-406.