

DOI: 10.13376/j.cblls/2019083

文章编号: 1004-0374(2019)07-0686-07

转录水平调控中的负调控元件——沉默子

胡朝阳*, 唐培培, 邓炎春, 孙伟娟, 姚 勤

(江苏大学生命科学研究院, 镇江 212013)

摘要: 在真核生物、原核生物及病毒的基因组中存在着调控基因表达的顺式元件, 沉默子是其中的一种负调控元件, 它能够同反式因子协同作用, 抑制靶基因的转录活性, 在基因表达调控中发挥重要作用。该文主要对沉默子的特性、结构组成及其分类进行简要总结, 对沉默子可能作用机制进行简要综述, 最后展望沉默子在遗传工程及人类疾病治疗等领域的应用前景。

关键词: 顺式元件; 沉默子; 负调控元件; 基因表达调控

中图分类号: Q28 **文献标志码:** A

Silencer, a negative regulatory element in transcriptional regulation

HU Zhao-Yang*, TANG Pei-Pei, DENG Yan-Chun, SUN Wei-Juan, YAO Qin

(Institute of Life Sciences, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract: Cis-elements regulating gene expression exist in eukaryotes, prokaryotes and viral genomes. Silencer is one of the negative regulatory elements, which can synergistically act with trans-factors to inhibit the transcriptional activity of target genes and play an important role in gene expression regulation. In this paper, the characteristics, structure and classification of silencer are briefly summarized. The possible mechanism by which silencer inhibits gene expression is briefly reviewed. Finally, the application prospect of silencer in the field of genetic engineering and human disease treatment is prospected.

Key words: cis-elements; silencer; negative regulatory elements; regulation of gene expression

基因表达在真核生物中是空间分隔的和多阶段的, 在不同的发育阶段和不同的组织中, 基因的表达被精确控制, 基因表达受到不同水平的调控, 其中最主要的是转录水平的调控。在转录水平上, 主要通过顺式调控元件与反式调节蛋白的相互作用控制着基因的表达。顺式调控元件是非编码的线性核苷酸片段, 包括启动子、增强子、沉默子和绝缘子, 以及转录后修饰形成的 5'cap、poly-A 尾、信号序列等^[1]。基因的表达可通过增强子来激活, 也能通过沉默子而被抑制。然而, 相对于增强子, 有关沉默子的研究较少, 人们对沉默子的认识远远落后于增强子, 对于沉默子与动植物性状和表型之间的关系还知之甚少^[2-3]。沉默子最初被定义为一段能抑制启动子活性的核酸序列, 它能招募转录因子到启动子, 影响转录因子的活性, 影响内含子拼接, 调节染色质结构, 影响 3' 非翻译信号识别, 阻断转录

起始复合物的装配等, 从而下调基因的表达^[4]。随着基因组测序的发展和对基因表达调控的深入研究, 越来越多的沉默子被发现, 丰富了我们关于分子生物学和细胞生物学方面的知识。这些沉默子既存在一定程度的相似性, 又具有一定的区别, 它们在遗传工程和癌症治疗等方面具有很大的应用前景。

1 沉默子的特性

生物体的基因组存在大量的调控序列, 它们参与调控基因表达的正确时空模式, 沉默子是其中一类抑制基因表达的调控元件。沉默子具有如下的特性: (1) 一些沉默子元件可以在远距离作用于顺式

收稿日期: 2019-01-16; 修回日期: 2019-02-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(31570150)

*通信作者: E-mail: sunnyhu163@163.com

连接的启动子; (2) 不同的沉默子具有不同的特点, 一部分沉默子对基因表达的阻遏作用没有方向和位置的限制, 即无论其以正向或反向序列形式插入启动子的上游或下游都可以阻遏基因的表达, 也有部分沉默子具有方向依赖性和位置依赖性, 还有一些沉默子只对特定的启动子产生抑制作用或在基因的特殊时期、特定组织中发挥作用^[5]; (3) 强沉默子元件富含 CT 的基序通常以多个拷贝的形式存在。对来自人 7 号染色体的 1.8 Mb 区域的 47 个序列的研究发现, 强沉默子元件包含 19 bp 的 CT 基序, 从其中已知的三个沉默子中删除这 19 bp 的基序显著降低了这些元件沉默基因表达的能力^[6]。

已经发现的沉默子中, 有的沉默子不具有启动子特异性和细胞特异性, 也不具有位置依赖性和方向依赖性。研究发现, 鼠 *B29* (*Igβ*) 基因启动子侧翼 5' 端 DNA 序列抑制 *B29* 启动子活性, 表明该区域可能含有沉默元件。进一步研究显示, 该区域存在两个相邻的沉默子元件, 两者以位置和方向不依赖的方式抑制鼠 *B29* 启动子的转录, 同时这两个沉默子也能在 B 细胞中抑制几种异源启动子的转录, 包括 *mb-1*、*c-fos* 和人类 *B29*, 也能够抑制 T 细胞中抑制 *c-fos* 启动子的转录, 表明它们不是 B 细胞特异性元件^[7]。

沉默子元件中大多数的作用方式与位置和方向无关, 但也有某些沉默子对位置与方向表现出不同程度的敏感性^[5]。*bcl-2* 基因产物是一种 25 kD 的线粒体膜蛋白, 可作为细胞凋亡的抑制因子。在 *bcl-2* 5'-非翻译区中鉴定出一个约 1.3 kb 的负调控元件 (negative regulatory element, NRE), 瞬时表达实验结果表明, 将这 1.3 kb NRE 的片段插入 P1 启动子下游约 2.4 kb 处, 不影响启动子的活性, 说明该 NRE 以位置依赖性方式降低 *bcl-2* P1 启动子的表达^[8]。有的沉默子的作用方式具有组织特异性, 如位于鸡 β-珠蛋白基因簇上游 ~4 kb 处的 0.2 kb DNA 片段是依赖于 CTCF 结合的沉默子序列, 具有多功能蛋白因子 CTCF 的结合位点, 该沉默子元件仅在 CTCF 识别位点未甲基化的红细胞中有活性, 在淋巴细胞和其他非红细胞中则不具有活性^[9]。

大多数沉默子的作用是非启动子特异性的, 有报道多巴胺转运蛋白基因 (human dopamine transporter gene, *hDAT*) 内含子含有一个 121 bp 的沉默元件, 它不仅能在体外下调 *hDAT* 启动子的活性, 还可以使异源性 SV40 (simian virus 40) 启动子活性下降 80%^[10]。在人的 *PiC* (phosphate carrier) 基因 5'

侧翼区域 (-1 017/-814) 中鉴定到一个沉默子。除抑制自身启动子活性外, *PiC* 沉默子区域赋予异源启动子铁蛋白启动子强烈的抑制作用^[11]。关于启动子特异性的沉默子鲜有报道, 鼠的胰腺炎相关蛋白基因 *PAP I* (pancreatitis associated protein) 启动子区域存在一个沉默子, 该沉默子能够抑制 *PAP I* 的启动子活性, 但是对异源启动子 SV40 和胸苷激酶 (thymidine kinase, TK) 启动子均没有抑制作用, 这类沉默子可能是通过结合启动子特异性蛋白因子阻止转录起始复合物的形成, 从而抑制转录过程^[12]。

2 沉默子的结构组成

目前的研究显示沉默子没有特有的结构或保守基序, 它们或者是一段短的核酸序列, 包含有特异性抑制蛋白的结合位点; 或者是一个包含多个调控元件的复杂区域, 如酵母 *HMR-E* (*hidden mating region-E*) 沉默子^[13]; 或者是一种特殊的 DNA 构象而不是特定序列, 如 G-四链体结构 (G-quadruplex, G4)^[14]。沉默子的特异性受到精准调控, 包括侧翼序列、其他顺式调控元件、启动子的结构等都会影响其功能^[4]。

在对酵母 *HMR-E* 沉默子进行突变体研究中发现, 在 *HML* 以及 *HMR* 区域基因沉默中, 沉默子扮演了极为重要的角色。该沉默子是由复制起点识别复合物 (origin recognition complex, ORC) 结合位点、阻抑激活蛋白 1 (repressor activator protein 1, Rap1p) 结合位点、自主复制序列结合因子 (autonomously replicating sequence binding factor 1, Abf1p) 结合位点中的两个或者三个组成^[13]。ORC 主要参与 DNA 复制过程, Rap1p 不仅在基因沉默中起作用并且在基因激活中扮演着重要角色, Abf1p 在 DNA 复制、基因沉默、染色质重组、核苷酸切除修复等过程中都起到一定的作用^[15]。研究发现, 这些位点单独存在时, 并不能对附近基因产生沉默作用, 三者之间协同作用能稳定基因沉默^[13]。

3 沉默子可能的作用机制

沉默子介导产生的沉默是一种染色质状态的变化, 在此过程中产生类似于异染色质的结构阻止转录因子与 DNA 的相互作用, 使转录被抑制。沉默子作为异染色质形成中的失活中心参与沉默状态的建立和扩散^[5]。当酵母 *HMR-E* 沉默子 ORC 结合位点单独存在时, 其主要参与 DNA 的复制相关过程, 而在沉默子中它起募集沉默信息调节蛋白 1 (silent

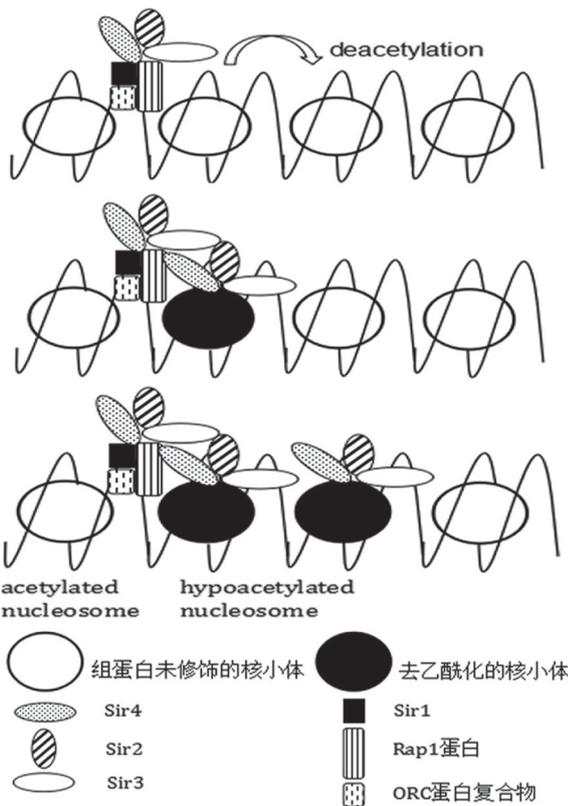
information regulator, Sir1) 的作用。Rap1 蛋白募集 Sir3 蛋白与之结合, Sir1 和 Sir3 蛋白共同募集 Sir2 和 Sir4 蛋白形成 Sir 复合物, 然后该复合物中的 Sir2 蛋白能将附近的核小体去乙酰化从而形成超去乙酰化的核小体, Sir3 蛋白与 Sir4 蛋白有优先结合到超去乙酰化核小体特性, Sir2 蛋白继续去乙酰化下一个邻近的核小体, 最终形成一个基因沉默异染色质区域^[16](图 1)。

类比增强子的作用机制, 有学者对沉默子发挥作用的原理提出了环出模型: 沉默子区域与相互作用的蛋白结合后, 形成类似 DNA 环状结构, 该结构可能与启动子作用破坏起始复合物而抑制转录; 另一种可能是产生的 DNA 环发生了拓扑结构的变化或者组蛋白的修饰, 这种变化使得关键性转录因子不能与特定的序列正确结合进而阻止转录过程的进行^[5](图 2)。

阻遏蛋白结合位点存在沉默子序列中, 阻遏蛋白和该位点结合后抑制了基因的转录。这种抑制作

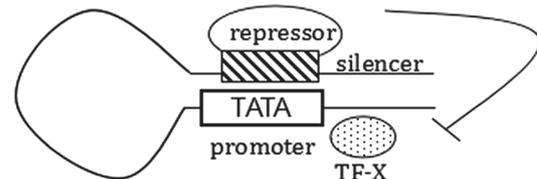
用可通过以下模型解释:(1) 直接性抑制作用(图 3), 沉默子结合蛋白与转录起始复合物中的成员相互作用, 使基础转录复合物无法形成; (2) 竞争作用(图 4), 在一些基因中沉默子与增强子等正调控元件相邻或相重叠, 阻遏蛋白与之结合后阻止激活蛋白与邻近正调控元件的结合进而抑制转录^[5]。T 细胞抗原识别受体基因 *CD4* 中存在一个沉默子 S4, 它能与 Runx 复合物相互作用抑制增强子的活性, 从而调控 *CD4* 的表达^[17]。

通过特殊 DNA 二级结构的形成与解除调控基因的表达, 被其他碱基间隔的连续几个鸟苷酸组成的重复核酸链能自发地形成一种称为 G- 四链体 (G4) 的四链螺旋结构, 4 个鸟苷酸通过 Hoogsteen 氢键形成 G- 四联体, 多个平面的 G- 四联体堆积形



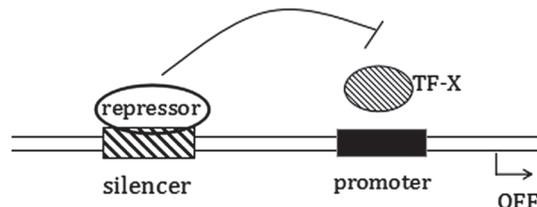
ORC 蛋白募集 Sir1 蛋白, Rap1 蛋白募集 Sir3 蛋白, Sir1 和 Sir3 蛋白募集 Sir2 和 Sir4 蛋白形成 Sir 复合物, 该复合物中的 Sir2 蛋白将附近的核小体去乙酰化后继续去乙酰化下一个邻近的核小体。

图1 酵母HMR-E沉默子介导异染色质形成示意图



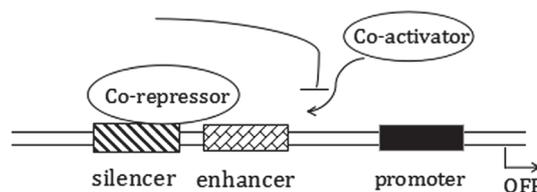
阻遏蛋白(repressor)结合沉默子后导致DNA扭曲, 形成DNA环状结构, 使阻遏蛋白靠近启动子, 与转录因子(TF-X)相互作用影响转录起始复合物的形成, 或导致重要的转录因子 TF-X无法结合到启动子特定序列。

图2 沉默子环出模型示意图



沉默子与阻遏蛋白(repressor)结合后, 与转录因子(TF-X)相互作用抑制转录起始复合物的形成。

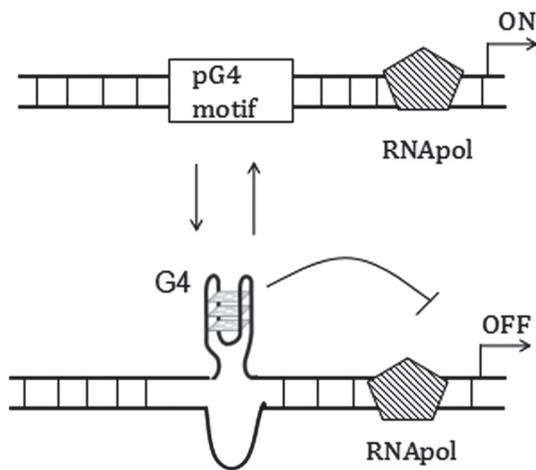
图3 沉默子直接性抑制作用示意图



阻遏蛋白(Co-repressor)与沉默子序列结合后形成空间位阻, 使临近的增强子无法结合激活蛋白(Co-activator), 进而不能发挥其正调控作用。

图4 沉默子竞争作用示意图

成 G- 四链体 (G4)。许多的基因组序列分析显示, 在人类、细菌和病毒的基因组中富含能形成 G4 结构的模序 (potential to form G-quadruplexes, pG4), pG4 主要定位于基因组中重要调控作用的位点, 比如端粒、DNA 复制原点、启动子等区域, 日益积累的证据显示, 在真实的细胞环境下能形成 G4 结构, 并且有特异的蛋白质与其相互作用, 说明 G4 结构参与 DNA 的复制、端粒的维持以及基因的表达调控等生物过程^[18]。位于启动子区域的 pG4 通过形成 G4 结构抑制基因的表达, 人类癌基因 *c-MYC* 的启动子上游富含鸟嘌呤的区域能形成 G4 结构, G4 核心结构区的鸟嘌呤突变能降低 G4 的稳定性, 并导致启动子活性的提高; 进一步研究表明, 阳离子卟啉 TMPyP4 能稳定 G4 结构, 并抑制启动子的活性, 说明 G4 是一个沉默子元件^[19], 通过 G4 结构的形成与解除调控基因的表达 (图 5)。



启动子区域中富含鸟苷酸的序列(pG4)能形成G-四链体(G4)结构, 抑制基因的表达。

图5 G-四链体抑制基因表达示意图

4 沉默子的分类

根据沉默机制, 沉默子可分为两种不同类型: 一种是相对短的, 与位置无关的基序, 通过它们结合的阻遏蛋白质积极干扰转录起始复合物 PIC (pre-initiation complex) 的组装, 这种被称为沉默子元件; 另一种在转录起始位点 TSS (transcription start site) 的上游和下游以及内含子和外显子内发现, 通过形成一定的空间位阻进而阻止转录因子与其各自的顺式调控基序的结合且具有位置依赖性, 被称为负调控元件 NRE^[4]。根据文献研究, 沉默子还可以细分为一些亚类, 例如内含子剪接沉默子 (intronic

splicing silencer, ISS)、外显子剪接沉默子 (exonic splicing silencer, ESS)、存在基因 3' 末端的沉默子, 还有研究相对透彻的神经元抑制性沉默元件 (repressor element-1/neuron-restrictive silencer element, RE-1/NRSE), 调节染色质构象的沉默子, 如 G- 四链体 (G4) 等。

典型沉默子具有位置非依赖性, 主要通过干扰转录起始复合物的组装这一主动抑制过程调控转录。人类基因 *ARHGAP6* 中具有一个组成型自主沉默子 T39, 它位于人类 X 染色体短臂 (p22.2) 上 *ARHGAP6* 基因的第一个内含子中, 该序列包含三个 CTCF 基序, 通过结合 CTCF 蛋白发挥抑制功能。T39 能够抑制三种来源不同的启动子活性, 人类 γ -珠蛋白基因 (human γ -globin gene, *HBG1*) 启动子、巨细胞病毒的组成型启动子 (cytomegalovirus, CMV) 和来自人磷酸甘油酸激酶 (phosphoglycerate kinase, *PGK*) 基因的组成型启动子, 沉默的程度几乎一致, 从 CMV 的 1.5 倍到 *HBG1* 的 1.9 倍不等, 且能在三种不同的细胞系 (erythroid K-562 细胞、Epithelial HeLa 细胞、HepG2 肝细胞) 中沉默基因表达^[20]。

负调控元件 NREs 通过抑制转录因子与其特异性 DNA 结合位点的结合, 或干扰控制各种转录事件的具体信号来调控基因的表达, 例如干扰 RNA 剪接、5' 多聚腺苷酸化信号、ATG 翻译起始位点或通过提前终止转录影响转录延伸^[4]。在人类 *$\alpha 1$ -chimaerin* 基因的第二个外显子的 5' 端非翻译区含有一个 NRE 元件, 含有该 NRE 的 70 bp 区的缺失使启动子活性提高 5~6 倍, 并且以方向无关但位置依赖的方式抑制异源 TK 启动子的活性^[21]。

存在于基因内含子中的沉默子元件可以以多种方式抑制转录。阻遏物可以与沉默子序列结合, 阻断转录延伸; 也可能阻止了内含子剪接位点的识别, 或者只是简单地破坏基础转录复合物。研究发现, 顺式调节元件与宿主 RNA 结合蛋白的相互作用可以调控人免疫缺陷病毒 1 型 (HIV-1) 的 RNA 剪接模式。HIV-1 3' 端受体位点 A7 的活性通过一个内含子剪接沉默子 (ISS)、一个二分外显子剪接沉默子 (ESS3a/b) 和一个外显子剪接增强子 (exonic splicing enhancer 3, ESE3) 组成的复合物网络严格调节。HIV-1 中 ISS 形成特殊的 RNA 茎环结构招募宿主 hnRNP (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein) A1 蛋白至受体位点 A7 上游, 阻断受体位点 A7 的功能性蛋白质-RNA 复合物的形成进而抑制 A7 的剪接^[22]。

在研究人乳头瘤病毒 18 (human papillomavirus

18, HPV18) 基因表达中发现核苷酸 612~639 区域中存在一个调节 HPV18 233 ^ 416 剪接的外显子剪接沉默子 (ESS), 该病毒 ESS 结合核不均一核糖核蛋白 A1 (hnRNP A1), 在 E7 开放阅读框处鉴定的 ESS 通过与宿主剪接因子 hnRNP A1 的相互作用来阻止 HPV18 233 ^ 416 在 E6 ORF 中的剪接^[23]。

已发现的沉默子大部分存在于基因的 5' 端, 有的存在于基因的 3' 末端。在鼠膜蛋白辅助因子 (murine membrane cofactor protein, CD46) 基因的 3' 侧翼区域中, 在终止密码子下游 0.6 kb 和 0.8 kb 之间的 0.2 kb 区域内鉴定出一种沉默子元件。该沉默子不仅可以抑制 CD46 基因启动子活性, 还对异源启动子 SV40 有抑制作用, 并且以方向依赖性但位置不依赖性的方式发挥作用^[24]。

神经元抑制性沉默元件 (RE-1/NRSE) 是位于神经元特异性终末分化基因启动子区域的一段由 21 个核苷酸组成的保守序列, krüppel 家族锌指蛋白 - 神经元限制性沉默因子 (repressor element silencing transcription factor/neuronal restrictive silencer factor, REST/NRSF) 能与该序列结合, 抑制含有 RE-1/NRSE 序列的神经元特异性终末分化基因的表达, 从而抑制干细胞及非神经细胞向神经细胞分化^[25]。色氨酸羟化酶 2 (tryptophan hydroxylase 2, TPH2) 是神经元 5-羟色胺合成中的关键酶。人类 TPH2 (rTPH2) 启动子区域内发现神经元限制性沉默元件 (NRSE/RE-1), 可与神经元限制性沉默因子 (NRSF/REST) 结合, 募集一类组蛋白去乙酰化酶 (class I HDAC) 并抑制 TPH2 启动子活性^[26]。

也有文献报道将 microRNA (miRNA) 归类为基因沉默子^[27]。miRNA 是一类非编码的内源性小分子 RNA, 大小为 19~24 nt, 它与靶 mRNA 互补, 可以通过降解 mRNA 或抑制蛋白质的翻译来调节基因表达^[28]。

5 沉默子的应用前景

近几十年来, 对顺式调控元件及其功能的深入研究积累了丰富的有关基因表达调控的知识, 为生产实践中利用顺式调控元件打下了坚实的基础。人们可以利用启动子、增强子、绝缘子等元件构建人工表达盒, 精确地调控目的基因的表达, 广泛地应用于重组蛋白表达、转基因以及基因治疗等方面^[29]。虽然对沉默子的研究相对滞后, 但近年来的研究表明, 沉默子作为一种基因表达的负调控元件在遗传工程及人类疾病治疗等领域具有广阔的应用前景。

水稻的卷曲穗基因 *FZP* (*FRIZZY PANICLE*) 能抑制腋分生组织的形成, 是控制小穗分化的关键基因。*FZP* 上游一个 18 bp 序列的重复导致水稻增产 15%, 进一步研究表明, 转录抑制蛋白 OsBZR1 结合这一序列抑制了 *FZP* 的表达, 说明这一 18 bp 的序列是一个沉默子元件^[3]。我们可以把这一沉默子序列作为一个分子标记, 用于水稻的分子标记辅助育种, 繁育高产的水稻品种。

人类的 β -珠蛋白 (β -globin) 基因的表达在发育和造血过程中受到严格的调控, β -珠蛋白基因簇由 5 个发育调控的基因组成 (5'- ϵ -G γ -A γ - δ - β -3')。在胎儿期主要表达胎儿 γ -珠蛋白, 随胎儿出生, β -珠蛋白表达被激活, γ -珠蛋白被抑制。地中海贫血症在成人期持续表达胎儿珠蛋白。研究表明, 位于 A γ -珠蛋白基因 3' 端的两个沉默子抑制胎儿 γ -珠蛋白在成人期的表达, 这种研究为通过操控地中海贫血症患者的造血干细胞中的这两个沉默子元件来治疗该疾病提供了理论的可能^[30]。在 HIV 的复制过程中必须通过可变剪接表达多种蛋白, 这种可变剪接是由特异的剪接位点以及剪接沉默子和剪接增强子序列来调控。这种剪接调控对病毒的复制和病毒粒子的成熟是关键, 因此靶向 HIV 可变剪接的药物治疗是可行的^[31], 剪接沉默子是一类潜在的靶向治疗位点。脊髓性肌肉萎缩症 (spinal muscular atrophy, SMA) 是一种严重的遗传疾病, 是由存活运动神经元基因 *SMN1* (survival motor neuron 1) 突变所引起的。在人类的基因组中还有一个 *SMN2* 基因, 但因为异常的 RNA 剪接, 导致外显子 7 的缺失, 表达不完整的 SMN 蛋白, 不足以补偿 *SMN1* 的突变。在外显子 7 下游存在一个强的剪接沉默子, 靶向这一沉默子的反义寡聚核苷酸能增加正常 SMN 蛋白的表达^[32]。2016 年, 美国 FDA 批准了一个靶向这一沉默子的反义核苷酸药物 Spinraza, 这是第一个用于治疗 SMA 的临床药物, 能改善 SMN 的表达和患者的运动功能^[33]。

pG4 序列在人类等基因组中广泛存在, 并能形成高度有序的 G4 结构。在人类基因组中, pG4 主要分布在端粒、启动子等具有重要调控功能的区域, 比如在癌基因启动子区域普遍存在, 这些调控区域与癌症等人类疾病相关, 靶向 G4 结构的疾病治疗正成为一种新的治疗途径, 能改变 G4 稳定性的小分子化合物及多肽可能是潜在治疗药物^[34]。*c-MYC* 基因的异常表达与多种人类肿瘤的形成和发展有关, TMPyP4 能与 *c-MYC* 基因启动子区域的 G4 相

互作用, 下调 *c-MYC* 的表达。四氟喹啉 (Quarfloxin) 对 G4 结构具有高度的选择性, 并更加偏好于 *c-MYC* 的 G4, Quarfloxin 能破坏 nucleolin 与 G4 的相互作用, 导致核糖体合成的抑制和肿瘤细胞的凋亡。作为治疗神经内分泌肿瘤的药物, Quarfloxin 已进入临床 II 期实验^[14]。pG4 也在病毒基因组中普遍存在, 定位在启动子等调控病毒复制的关键位置, 因此, G4 也是抗病毒治疗的靶标^[35]。Nucleolin 能稳定 HIV 长末端重复区域启动子的 G4 结构, 沉默 HIV 病毒基因的转录^[36]。3,6,9-三取代吡啶衍生物 (BRACO-19) 同样能稳定 HIV 长末端重复区域启动子的 G4 结构, 抑制病毒的反转录过程^[37]。

miRNA 可作为肿瘤抑制子或癌基因在肿瘤的发展过程中发挥重要作用, miRNA 的失调与多种人类疾病有关, 靶向 miRNA 的疾病治疗正成为一种新的治疗途径。miRNA-34 可发挥肿瘤抑制子的功能, 利用合成的 miRNA-34 模拟物治疗肝癌患者的研究已进入 I 期临床^[38]。miRNA-122 是一种高丰度的肝组织特异的 miRNA, 它对于 HCV 的基因组稳定性及其复制是关键。靶向 miRNA-122 的反义 RNA 制剂 LNA miravirsin 能长期抑制 HCV 且没有其他副作用, 目前对该制剂的研究已进入临床 II 期^[39]。

综上所述, 沉默子是一种具有特定功能的核酸序列或核酸结构, 它通过与细胞内转录因子相互作用或者干扰控制转录进程中的特殊信号发挥其负调控的作用, 可作为人类疾病治疗的靶点。然而, 相对于增强子等顺式元件, 对沉默子的认识及研究比较落后, 相关的知识积累较少。大多数的研究只是通过体外实验对沉默子进行简单描述, 有关沉默子在真实的时空条件下, 即在不同的细胞、不同的发育阶段里如何调控靶基因表达的研究很少见报道。进一步鉴定沉默子元件及其功能, 研究其在不同时空条件下的作用机制, 对深入了解基因的表达调控以及利用沉默子为人类服务具有重要的意义。

[参 考 文 献]

- [1] Vaughn JN, Ellingson SR, Mignone F, et al. Known and novel post-transcriptional regulatory sequences are conserved across plant families. *RNA*, 2012, 18: 368-84
- [2] Johnson WC, Ordway AJ, Watada M, et al. Genetic changes to a transcriptional silencer element confers phenotypic diversity within and between *Drosophila* species. *PLoS Genet*, 2015, 11: e1005279
- [3] Bai X, Huang Y, Hu Y, et al. Duplication of an upstream silencer of Fzp increases grain yield in rice. *Nat Plants*, 2017, 3: 885-93
- [4] Ogbourne S, Antalis TM. Transcriptional control and the role of silencers in transcriptional regulation in eukaryotes. *Biochem J*, 1998, 331: 1-14
- [5] 陈妍, 王金发. 负调控元件——沉默子. *遗传*, 1998, 20: 44-8
- [6] Petrykowska HM, Vockley CM, Elnitski L. Detection and characterization of silencers and enhancer-blockers in the greater Cfr locus. *Genome Res*, 2008, 18: 1238-46
- [7] Malone CS, Omori SA, Wall R. Silencer elements controlling the B29 (Ig β) promoter are neither promoter-nor cell-type-specific. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 12314-9
- [8] Young RL, Korsmeyer SJ. A negative regulatory element in the Bcl-2 5'-untranslated region inhibits expression from an upstream promoter. *Mol Cell Biol*, 1993, 13: 3686-97
- [9] Razin SV, Ioudinkova ES, Scherrer K. Extensive methylation of a part of the CpG island located 3.0-4.5 kbp upstream to the chicken α -globin gene cluster may contribute to silencing the globin genes in non-erythroid cells. *J Mol Biol*, 2000, 299: 845-52
- [10] Zhao Y, Zhou Y, Xiong N, et al. Identification of an intronic -acting element in the human dopamine transporter gene. *Mol Biol Rep*, 2012, 39: 5393-9
- [11] Vito I, Vittoria I, Paola C, et al. Functional analysis of the promoter of the mitochondrial phosphate carrier human gene: identification of activator and repressor elements and their transcription factors. *Biochem J*, 2005, 391: 613-21
- [12] Ortiz EM, Dusetti NJ, Dagorn JC, et al. Characterization of a silencer regulatory element in the rat Pap I gene which confers tissue-specific expression and is promoter-dependent. *Arch Biochem Biophys*, 1997, 340: 111-6
- [13] Chesnokov IN. Multiple functions of the origin recognition complex. *Int Rev Cytol*, 2007, 256: 69-109
- [14] Tarek S, Giulio F, Kazuo N, et al. G-quadruplexes as potential therapeutic targets for embryonal tumors. *Molecules*, 2013, 18: 12500-37
- [15] Zou YF, Yu Q, Chiu YH, et al. Position effect on the directionality of silencer function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 2006, 174: 203-13
- [16] 张新民. 原沉默子及染色质重构蛋白对基因沉默和异染色质结构的作用[D]. 长春: 吉林大学, 2011
- [17] Kojo S, Yasmin N, Muroi S, et al. Runx-dependent and silencer-independent repression of a maturation enhancer in the Cd4 gene. *Nat Commun*, 2018, 9: 3593
- [18] Daniela R, Lipps HJ. G-quadruplexes and their regulatory roles in biology. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43: 8627-37
- [19] Hurley LH, Hoff DDV, Siddiqui-Jain A, et al. Drug targeting of the c-Myc promoter to repress gene expression via a G-quadruplex silencer element. *Semin Oncol*, 2006, 33: 498-512
- [20] Qi H, Liu M, Emery DW, et al. Functional validation of a constitutive autonomous silencer element. *PLoS One*, 2015, 10: e0124588

- [21] Dong JM, Lim L. The human neuronal α 1-chimaerin gene contains a position-dependent negative regulatory element in the first exon. *Neurochem Res*, 1996, 21: 1023-30
- [22] Jain N, Morgan CE, Rife BD, et al. Solution structure of the HIV-1 intron splicing silencer and its interactions with the Up1 domain of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (Hnmp) A1. *J Biol Chem*, 2016, 291: 2331-44
- [23] Ajiro M, Tang S, Doorbar J, et al. Serine/arginine-rich splicing factor 3 and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 regulate alternative RNA splicing and gene expression of human papillomavirus 18 through two functionally distinguishable Cis elements. *J Virol*, 2016, 90: 9138-52
- [24] Nomura M, Tsujimura A, Begum NA, et al. Identification and characterization of a silencer regulatory element in the 3'-flanking region of the marine Cd46 gene. *Biochem J*, 2000, 351: 353-65
- [25] 刘庆斌, 李艳华, 裴雪涛. 不止是沉默——神经元限制性沉默因子及其作用元件的研究进展. *生理科学进展*, 2007, 38: 239-41
- [26] Nawa Y, Kaneko H, Oda M, et al. Functional characterization of the neuron-restrictive silencer element in the human tryptophan hydroxylase 2 gene expression. *J Neurochem*, 2017, 142: 827-40
- [27] Kolovos P, Knoch TA, Grosveld FG, et al. Enhancers and silencers: an integrated and simple model for their function. *Epigenetics Chromatin*, 2012, 5: 1
- [28] Ross JS, Carlson JA, Brock G. miRNA: the new gene silencer. *Am J Clin Pathol*, 2007, 128: 830-6
- [29] Biłas R, Szafran K, Hnatuszko-Konka K, et al. Cis-regulatory elements used to control gene expression in plants. *Plant Cell Tiss Org*, 2016, 127: 1-19
- [30] Gazouli M, Katsantoni E, Kosteas T, et al. Persistent fetal γ -globin expression in adult transgenic mice following deletion of two silencer elements located 3' to the human A γ -globin gene. *Mol Med*, 2009, 15: 415-24
- [31] Dlamini Z, Hull R. Can the HIV-1 splicing machinery be targeted for drug discovery? *HIV AIDS*, 2017, 9: 63-75
- [32] Zanetta C, Nizzardo M, Simone C, et al. Molecular therapeutic strategies for spinal muscular atrophies: current and future clinical trials. *Clin Ther*, 2014, 36: 128-40
- [33] Wan L, Dreyfuss G. Splicing-correcting therapy for SMA. *Cell*, 2017, 170: 5
- [34] Ohnmacht SA, Neidle S. Small-molecule quadruplex-targeted drug discovery. *Bioorg Med Chem Lett*, 2014, 24: 2602-12
- [35] Ruggiero E, Richter SN. G-quadruplexes and G-quadruplex ligands: targets and tools in antiviral therapy. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46: 3270-83
- [36] Tosoni E, Frasson I, Scalabrin M, et al. Nucleolin stabilizes G-quadruplex structures folded by the Ltr promoter and silences HIV-1 viral transcription. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43: 8884-97
- [37] Perrone R, Butovskaya E, Daelemans D, et al. Anti-Hiv-1 activity of the G-quadruplex ligand Braco-19. *J Antimicrob Chemother*, 2014, 69: 3248-58
- [38] Rupaimoole R, Slack FJ. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nat Rev Drug Discov*, 2017, 16: 203-22
- [39] Bernardo BC, Ooi JY, Lin RC, et al. MiRNA therapeutics: a new class of drugs with potential therapeutic applications in the heart. *Future Med Chem*, 2015, 7: 1771-92