

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2011.05.006

· 基础研究 ·

曲古抑菌素 A 联合多西他赛促进肺腺癌细胞的凋亡及其可能的分子机制

张嵩, 张群成, 马晓斌, 郭宏琳, 姜淑娟(山东大学附属省立医院 呼吸科, 山东 济南 250021)

[摘要] 目的: 研究曲古抑菌素 A (trichostatin A, TSA) 联合多西他赛 (docetaxel, Doc) 对肺腺癌细胞 A549 凋亡的影响及其分子机制。方法: TSA 单独或联合 Doc 处理 A549 细胞, MTT 法检测 A549 细胞的增殖, 光学显微镜下观察 A549 细胞的形态学变化, Hoechst 33258 染色及流式细胞术检测 A549 细胞的凋亡, 流式细胞术检测细胞周期的变化, Western blotting 检测乙酰化- α -微管蛋白 (acetyl- α -tubulin)、survivin 蛋白的表达及 caspase-3 的活化。结果: 10 μ g/ml Doc、250 nmol/L TSA 单独或联合作用均能时间依赖性地抑制 A549 细胞的增殖, 联合作用的抑制率显著高于 Doc 或 TSA 单独作用 [(65.6 \pm 3.1)% vs (30.6 \pm 2.1)%、(23.3 \pm 1.9)% , $P < 0.05$]。TSA、Doc 单独或联合用药均可使 A549 细胞凋亡率增加, 联合作用的凋亡率显著高于单独作用 [(58 \pm 3.6)% vs (17 \pm 2.2)%、(14 \pm 1.6)% , $P < 0.05$]。联合作用比单独作用使 A549 细胞更明显地阻滞于 G₂/M 期 [(32.4 \pm 3.1)% vs (23.5 \pm 2.3)%、(10.5 \pm 1.5)% , $P < 0.05$]。TSA 联合 Doc 可进一步增加 acetyl- α -tubulin 表达、减少 survivin 蛋白的表达, 并促进 caspase-3 的活化 (均 $P < 0.05$)。结论: TSA 联合 Doc 能够抑制 A549 细胞的增殖、促进细胞的凋亡, 其机制可能与上调 acetyl- α -tubulin 的表达、抑制 survivin 的表达以及促进 caspase-3 活化有关。

[关键词] 曲古抑菌素 A; 多西他赛; 肺癌; 微管蛋白; 生存素

[中图分类号] R734.2; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2011)05-0496-06

Trichostatin A combined with docetaxel promote apoptosis of lung adenocarcinoma cells and the possible molecular mechanisms

ZHANG Song, ZHANG Qun-cheng, MA Xiao-bin, GUO Hong-lin, JIANG Shu-juan (Department of Respiratory, Provincial Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan 250021, Shandong, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effects of trichostatin A (TSA) and docetaxel (Doc) on apoptosis of lung adenocarcinoma A549 cells and the possible molecular mechanisms. **Methods:** A549 cells were treated with TSA alone or in combination with Doc, MTT assay was used to measure the proliferation of A549 cells; cell morphological changes were observed under light microscope; apoptosis was assessed using Hoechst 33258 staining and flow cytometry; cell cycle was analyzed by flow cytometry; the expression of acetyl- α -tubulin and survivin protein and activation of caspase-3 were detected by Western blotting. **Results:** 10 μ g/ml Doc and 250 nmol/L TSA alone or in combination significantly inhibited the growth of A549 cells in a time-dependent manner, and the combined treatment induced even higher inhibitory rate [(65.6 \pm 3.1)% vs (30.6 \pm 2.1)% , (23.3 \pm 1.9)% , $P < 0.05$]. In addition, TSA or Doc alone or in combination increased the apoptosis rate of A549 cells, and the combined treatment also induced higher apoptosis rate [(58 \pm 3.6)% vs (17 \pm 2.2)% , (14 \pm 1.6)% , $P < 0.05$]. The cell cycle was more markedly arrested in G₂/M phase in combination treatment group [(32.4 \pm 3.1)% vs (23.5 \pm 2.3)% , (10.5 \pm 1.5)% , $P < 0.05$], TSA combined with Doc increased the expression of acetyl- α -tubulin, reduced the expression of survivin and promoted the activation of caspase-3 ($P < 0.05$). **Conclusion:** TSA combined with Doc can inhibit proliferation and induce apoptosis of A549 cells, which is related to the up-regulation of acetyl- α -tubulin, down-regulation of survivin and increased activation of caspase-3.

[基金项目] 山东省卫生厅科研发基金资助项目 (No. 32009); 山东省科技发展计划资助项目 (No. 2010G0020227)。Project supported by the Foundation from Health Department of Shandong Province (No. 32009), and the Science and Technology Development Foundation of Shandong Province (No. 2010G0020227)

[作者简介] 张嵩 (1973 -), 辽宁省大连市人, 博士, 副主任医师, 主要从事肿瘤分子生物学方面的研究。E-mail: zhangsong1973@hotmail.com

[通信作者] 姜淑娟 (JIANG Shu-juan, corresponding author), E-mail: shujuan-jiang@163.com

[网络出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20110929.1619.005.html>

[**Key words**] trichostatin A; docetaxel; lung cancer; tubulin; survivin

[Chin J Cancer Biother, 2011, 18(5): 496-501]

组蛋白去乙酰化酶抑制剂可以通过抑制多种基因和蛋白介导的信号转导功能,影响细胞的增殖,增强肿瘤细胞对某些药物的敏感性^[1-3]。曲古抑菌素 A(trichostatin A, TSA)可以特异性地抑制组蛋白去乙酰化酶,使高度乙酰化的组蛋白积累,激活沉默基因的表达,促进细胞的凋亡与分化^[4-5]。微管蛋白对于保持细胞形状、运动、胞内物质运输是不可缺少的一种蛋白质,主要由 α -tubulin 和 β -tubulin 组成。微管蛋白乙酰化为表观遗传学的重要组成部分^[6], Blagosklonny 等^[7]发现, α -tubulin 是组蛋白去乙酰化酶的作用底物,组蛋白去乙酰化酶抑制剂可以使乙酰化- α -微管蛋白(acetyl- α -tubulin)表达增加,抑制微管解聚,增加微管的稳定性,从而导致细胞凋亡^[8-9]。目前,肺癌的发病率在很多国家有明显上升趋势。非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)占肺癌的 80% 以上。多数肺癌患者就诊时已到病情的晚期,失去了手术的机会,只能进行放射治疗和化学药物治疗。尽管手术和化疗技术不断提高,但肺癌患者的预后仍然很差,5 年生存率仍小于 20%。寻找高效低毒的靶向药物已成为晚期 NSCLC 一线治疗的紧迫需求。本研究旨在探索组蛋白去乙酰化酶抑制剂 TSA 与多西他赛(docetaxel, Doc)联合应用对肺腺癌细胞株增殖和凋亡的影响以及其分子机制,为临床联合用药提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株和材料

人肺癌细胞株 A549 来自山东大学附属省立医院中心实验室,培养于含 10% 胎牛血清、100 μ g/ml 链霉素、100 IU/ml 青霉素的 RPMI 1640 培养基中,置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养,细胞贴壁生长覆盖全瓶 80% 时,胰酶消化传代,按 1:3 比例分瓶后继续培养。

TSA 购于 Bio Vision 公司(批号为 1606-1),Doc 购于齐鲁制药有限公司(批号为 H20031244)。TSA 及 Doc 溶解于 DMSO 中,储存浓度分别为 3 mmol/L 和 10 mg/ml,均在 -20 $^{\circ}$ C 保存,每次实验前用新鲜培养基稀释至所需浓度,使作用细胞的 DMSO 不超过 0.1%。Hoechst 33258 染液为美国 Sigma 公司产品,acetyl- α -tubulin 兔抗人单克隆抗体、caspase-3 抗体购于 Cell Signaling Technology 公司(批号为 5335),Survivin(FL-142)抗体购于 Santa Cruz 公司

(批号为 sc-10811)。BU-Annexin V-FITC 凋亡试剂盒购于 Biouniquer 公司,细胞周期试剂盒购于 Beckman Coulter 公司。

1.2 MTT 法检测 A549 细胞的增殖

取对数生长期 A549 细胞以每孔 100 μ l (6 \times 10⁴/ml)接种于 96 孔培养板中。实验设 250 nmol/L TSA、10 μ g/ml Doc 单独处理和两药联合处理组,另设空白对照组,每组设置 3 个复孔。放置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的培养箱中,分别于 6、12、24、48 h 处理细胞,每孔加 MTT 20 μ l (5 mg/ml),混匀,37 $^{\circ}$ C 孵育 4 h;然后去除上清液,每孔加 150 μ l 的 DMSO,低速振荡 10 min,在波长 490 nm 处测定光密度值(*D*),根据 *D* 值计算细胞增殖抑制率。抑制率(%) = (1 - 实验组 *D* / 对照组 *D*) \times 100 %。实验重复 3 次。

1.3 光镜观察 TSA 和 Doc 对 A549 细胞形态学的影响

TSA 250 nmol/L、10 μ g/ml Doc 单独或联合处理 A549 细胞 24 h,光镜下观察细胞形态学的改变。

1.4 Hoechst 33258 染色法检测 A549 细胞的凋亡

将无菌盖玻片置于 6 孔板中培养过夜,制备 A549 细胞爬片。按空白对照、TSA 250 nmol/L、Doc 10 μ g/ml 及 TSA 250 nmol/L + Doc 10 μ g/ml 处理 A549 细胞 24 h。吸尽培养液,加固定液固定 10 min,吸尽固定液,用 PBS 冲洗 3 遍,每次 5 min,加 0.5 ml Hoechst 33258 染色 5 min,盖上贴有细胞的盖玻片,荧光显微镜下观察 A549 细胞凋亡情况。

1.5 流式细胞术检测 A549 细胞凋亡及细胞周期的变化

取对数生长期肺癌 A549 细胞以每孔 100 μ l (6 \times 10⁴/ml)接种于培养瓶中,孵育过夜。按空白对照、TSA 250 nmol/L、Doc 10 μ g/ml 及 TSA 250 nmol/L + Doc 10 μ g/ml 处理细胞 24 h 后,胰酶消化收集 A549 细胞,1 000 \times *g* 离心 5 min,PBS 洗 2 次,每次 2 min。按照细胞凋亡及细胞周期检测试剂盒说明书操作,应用 Muticycle for windows 软件分析细胞凋亡及细胞周期的变化。

1.6 Western blotting 检测 acetyl- α -tubulin、caspase-3 及 survivin 蛋白的变化

各组分别以药物处理 A549 细胞 24 h 后,用蛋白提取试剂盒提取总蛋白,用 Bradford 法测定蛋白质浓度,等量蛋白质分别采用 SDS-PAGE 进行分离,然后转至 PVDF 膜上。10% 牛奶 TBST 室温下摇动

封闭后加入一抗(acetyl- α -tubulin、caspase-3 和 survivin 的稀释度都为 1:1 000), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 室温下洗膜后加入二抗[辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG (H + L), 稀释浓度为 1:4 000], 孵育 1 h。TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min。然后进行显影, 观察相应蛋白的表达情况。

1.7 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析, 组间均数的差异采用 *t* 检验和 One-way ANOVA 检验。 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TSA 和 Doc 处理抑制 A549 细胞的增殖

MTT 结果(图 1)显示, TSA、Doc 单独及联合作用对 A549 细胞增殖的抑制作用均有时间依赖性, 随着药物浓度的增加, 对 A549 细胞抑制作用逐渐增强。并且联合用药组抑制作用明显强于对照组及单独用药组[TSA + Doc vs TSA 为 (65.6 \pm 3.1)% vs (23.3 \pm 1.9)%; TSA + Doc vs Doc 为 (65.6 \pm 3.1)% vs (30.6 \pm 2.1)%, $P < 0.05$]。

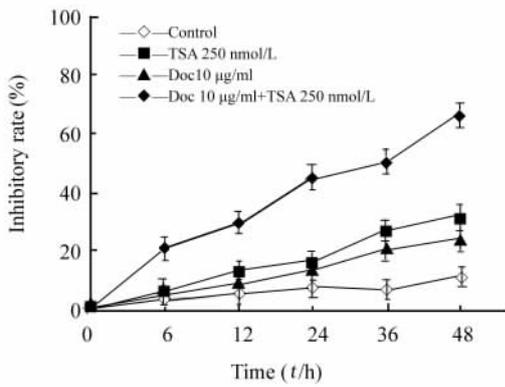


图 1 TSA 单独或联合 Doc 对 A549 细胞增殖的抑制作用
Fig.1 Inhibitory effects of TSA alone or in combination with Doc on proliferation of A549 cells

2.2 TSA 与 Doc 联合作用下 A549 细胞形态的变化

250 nmol/L TSA、10 μ g/ml Doc 单独或联合处理 A549 细胞 24 h 后, 与对照组 A549 细胞相比, TSA 处理后 A549 细胞体积变大或有星状改变, Doc 处理后 A549 细胞体积变小、皱缩; 且两者都可见悬浮死亡的细胞。TSA 与 Doc 联合作用后可见 A549 细胞密度降低, 出现大量的悬浮死亡细胞(图 2)。由此可见, TSA 联合 Doc 能够促进 A549 细胞死亡, 两者有协同作用。

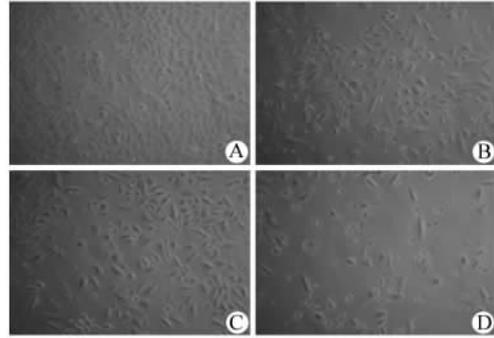


图 2 TSA 与 Doc 诱导下 A549 细胞形态的变化($\times 200$)
Fig.2 Morphological change of A549 cells induced by TSA and Doc ($\times 200$)
A: Control; B: TSA; C: Doc; D: TSA + Doc

2.3 TSA、Doc 处理促进 A549 细胞的凋亡

Hoechst 33258 染色检测结果(图 3)显示, 250 nmol/L TSA、10 μ g/ml Doc 单独或联合处理 A549 细胞后, 细胞出现染色质凝集, 荧光染色增强, 染色质呈致密浓染的块状或颗粒状荧光以及凋亡小体形成。与对照组 A549 细胞相比, TSA 与 Doc 联合用药后细胞凋亡率明显增加[TSA + Doc vs TSA: (58 \pm 3.6)% vs (14 \pm 1.6)%; TSA + Doc vs Doc: (58 \pm 3.6)% vs (17 \pm 2.2)%], 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

药物联合处理 A549 细胞 24 h 后, Annexin V-FITC 标记凋亡细胞, PI 标记死亡细胞, 流式分析结果显示, 与对照组相比, TSA 与 Doc 处理后 A549 细胞发生明显的凋亡, 联合用药后凋亡率进一步增加 ($P < 0.05$, 图 4)。

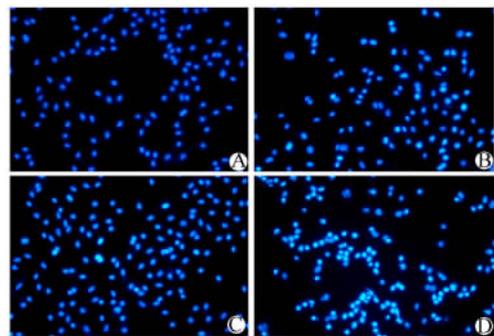


图 3 Hoechst 33258 染色法检测 TSA 与 Doc 处理后 A549 细胞的凋亡($\times 200$)
Fig.3 Apoptosis of A549 cells after TSA and Doc treatment as detected by Hoechst 33258 staining ($\times 200$)
A: Control; B: Doc 250 mol/L; C: Doc 10 μ g/ml; D: TSA 250 nmol/L + Doc 10 μ g/ml

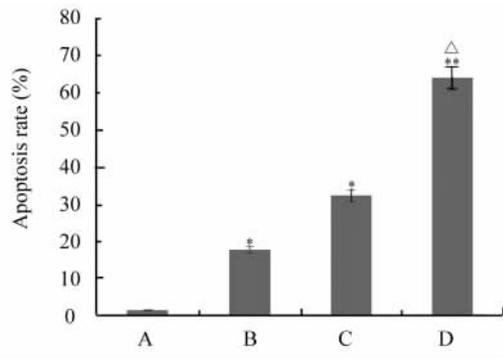


图4 TSA 联合 Doc 作用 24 h 后 A549 细胞的凋亡率

Fig. 4 Apoptosis rate of A549 cells after TSA and Doc treatment for 24 h

A: Control; B: TSA; C: Doc; D: TSA + Doc

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control; $^{\Delta} P < 0.05$ vs TSA or Doc

2.4 TSA 与 Doc 处理对 A549 细胞周期的阻滞

与空白对照组 A549 细胞相比, 250 nmol/L TSA、10 $\mu\text{g/ml}$ Doc 单独作用后 A549 细胞发生明显的 G_2/M 期阻滞, 联合用药后 G_2/M 期阻滞更加明显, TSA + Doc vs TSA 为 $(32.4 \pm 3.1)\%$ vs $(16.1 \pm 2.2)\%$; TSA + Doc vs Doc 为 $(32.4 \pm 3.1)\%$ vs $(10.5 \pm 1.5)\%$, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

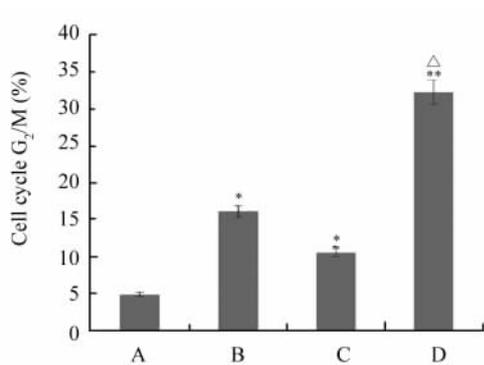


图5 TSA 和 Doc 作用 24 h 后 A549 细胞 G_2/M 期分布的变化

Fig. 5 G_2/M change of A549 cells after TSA and Doc treatment for 24 h

A: Control; B: TSA; C: Doc; D: TSA + Doc

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group;

$^{\Delta} P < 0.05$ vs TSA or Doc group

2.5 TSA 与 Doc 作用促进 A549 细胞 acetyl- α -tubulin 蛋白的表达

250 nmol/L TSA、10 $\mu\text{g/ml}$ Doc 处理 A549 细胞后, 与对照组 A549 细胞相比, TSA、Doc 都能够增加

细胞中 acetyl- α -tubulin 蛋白的表达, 联合用药后 acetyl- α -tubulin 蛋白的表达量明显增加(图 6)。

2.6 TSA 与 Doc 联合作用对 A549 细胞 caspase-3 活化和 survivin 表达的影响

TSA 250 nmol/L 与 Doc 10 $\mu\text{g/ml}$ 单独或联合处理 A549 细胞 24 h 后, 与对照组相比, 单独和联合用药组 A549 细胞 survivin 表达均明显减少(图 7A)。为进一步检测 survivin 与 caspase-3 的关系, 同样剂量处理 A549 细胞, 单独药物处理组活化型 caspase-3 的表达没有明显变化, 但联合用药后 A549 细胞中活化型 caspase-3 明显增加, 而 survivin 几乎无表达(图 7B)。

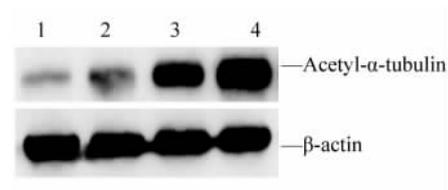


图6 Western blotting 检测 TSA 和 Doc 对 A549 细胞 acetyl- α -tubulin 表达的影响

Fig. 6 Effect of TSA and Doc treatment on Acetyl- α -tubulin expression in A549 cells as detected by Western blotting

1: Control; 2: TSA; 3: Doc; 4: TSA + Doc

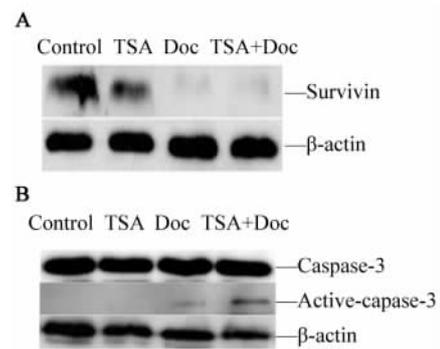


图7 Western blotting 检测 TSA 和 Doc 对 A549 细胞中 survivin 蛋白(A)及 caspase-3 活化(B)的影响

Fig. 7 Effects of TSA and Doc on survivin expression (A) and caspase-3 activation (B) in A549 cells as detected by Western blotting

3 讨论

肺癌是最常见的恶性肿瘤之一, 近年来发病率和病死率都呈现明显增高的趋势, 许多肺癌患者在确诊后就失去了手术的机会^[10]。因此, 寻求杀伤肺癌细胞的新途径及探讨其作用机制是目前研究的热

点之一。TSA 为组蛋白乙酰化酶抑制剂的一种, 可以通过改变细胞周期进程, 改变细胞信号转导中许多重要基因的表达; 同时还可通过 caspase 凋亡通路促使细胞凋亡, 此点在卵巢癌中已得到证实^[11]。TSA 能够增加 p21WAF1/Cip1 的转录, 减少 *cyclin B1*、*Plk1* 及 *survivin* 基因的转录, 将细胞阻滞在 G₂/M 期, 促进细胞的凋亡^[12-13]。

微管蛋白为细胞内骨架, 参与细胞内的物质运输、有丝分裂等。Doc 是紫杉醇类抗肿瘤药物, 通过干扰细胞有丝分裂和分裂间期细胞功能所必须的微管网络而发挥抗肿瘤作用^[14], 其抗肿瘤机制主要与抑制肿瘤细胞微管解聚、增加微管的稳定性、抑制肿瘤细胞有丝分裂、促使细胞周期停滞及促进细胞凋亡等有关^[15]。以往研究^[16]证实, TSA 联合紫杉醇能够增加微管的稳定性, 促进子宫内膜癌细胞的凋亡。本研究表明, TSA 能够增强 Doc 对 A549 细胞的杀伤作用, 联合用药后对 A549 细胞增殖的抑制作用明显增加。流式细胞术结果表明, 与对照组相比, TSA 或 Doc 组 A549 细胞凋亡率增加, 联合用药后 A549 细胞凋亡率明显增加, 且细胞周期阻滞在 G₂/M 期。Western blotting 检测微管蛋白乙酰化水平的变化, 发现 TSA 与 Doc 都能增加 A549 细胞中 acetyl- α -tubulin 蛋白的表达, 且联合用药后表达量明显增加。

细胞凋亡的途径主要有两条, 一条是通过胞外信号激活细胞内的凋亡酶 caspase, 一条是通过线粒体释放凋亡酶激活因子激活 caspase; 活化型 caspase-3 为两者的共同通道。本实验证实, TSA 与 Doc 联合用药后, A549 细胞中活化型 caspase-3 明显增加, 其可活化下游信号通路, 促进细胞凋亡。

Survivin 是目前作用最强的凋亡抑制因子之一, 它除能够阻断线粒体细胞色素 C 的释放以及与下游凋亡效应因子 caspase-3 和 caspase-7 结合, 对其活性产生直接抑制效应之外^[17-18], 还通过与纺锤体纤维结合间接抑制 caspase 对纺锤体的水解作用, 有利于保护有丝分裂细胞器的完整性, 抑制细胞凋亡^[19]。正常细胞不表达 survivin 蛋白, 但肿瘤细胞过表达 survivin 蛋白。研究^[20-21]还发现, survivin 高表达与肿瘤患者预后不良及肿瘤对化疗耐药有关。本研究结果表明, TSA 和 Doc 单独作用都能够使 A549 细胞 survivin 的表达减少, 且联合用药对 survivin 表达的抑制作用更加明显。同时两者联合用药后活化型 caspase-3 也明显增加, 其可能机制为消除了 survivin 蛋白对 caspase-3 和 caspase-7 结合的抑制作用, 增加了活化型 caspase-3。上述结果与

Nassar A^[17]等的研究相一致。

总之, TSA 与 Doc 联合作用能促进 A549 细胞的凋亡, 使细胞阻滞在 G₂/M 期, 其可能的分子机制一方面为通过增加 acetyl- α -tubulin 蛋白的表达, 影响细胞的有丝分裂, 促使细胞发生凋亡; 另一方面两者联合作用能够增加活化型 caspase-3 蛋白的表达, 减少 survivin 蛋白的表达, 从而促进细胞凋亡。

[参考文献]

- [1] Owonikoko TK, Ramalingam SS, Kanterewicz B, et al. Vorinostat increases carboplatin and paclitaxel activity in non-small cell lung cancer cells [J]. *Int J Cancer*, 2010, 126(3): 743-755.
- [2] Giommarelli C, Zuco V, Favini E, et al. The enhancement of anti-proliferative and proapoptotic activity of HDAC inhibitors by curcumin is mediated by Hsp90 inhibition [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2010, 67(6): 995-1004.
- [3] Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma [J]. *Nat Med*, 1997, 3(8): 917-921.
- [4] Ceconi D, Donadelli M, Dalla PE, et al. Synergistic effect of trichostatin A and 5-aza-2-deoxycytidine on growth inhibition of pancreatic endocrine tumour cell lines: A proteomic study [J]. *Proteomics*, 2009, 9(7): 1952-1966.
- [5] Chakravarty G, Rider B, Mondal D. Cytoplasmic compartmentalization of SOX9 abrogates the growth arrest response of breast cancer cells that can be rescued by trichostatin A treatment [J]. *Cancer Biol Ther*, 2011, 11(1): 71-83.
- [6] Chu CW, Hou F, Zhang J, et al. A novel acetylation of β -tubulin by San modulates microtubule polymerization via down-regulating tubulin incorporation [J]. *Mol Biol Cell*, 2011, 22(4): 448-456.
- [7] Blagosklonny MV, Robey R, Sackett DL, et al. Histone deacetylase inhibitors all induce p21 but differentially cause tubulin acetylation, mitotic arrest, and cytotoxicity [J]. *Mol Cancer Ther*, 2002, 1(11): 937-941.
- [8] Dowdy SC, Jiang S, Zhou XC, et al. Histone deacetylase inhibitors and paclitaxel cause synergistic effects on apoptosis and microtubule stabilization in papillary serous endometrial cancer cells [J]. *Mol Cancer Ther*, 2006, 5(11): 2767-2776.
- [9] Kamemura K, Ito A, Shimazu T, et al. Effects of downregulated HDAC6 expression on the proliferation of lung cancer cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 374(1): 84-89.
- [10] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2009 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2009, 59(4): 225-249.
- [11] Park SJ, Kim MJ, Kim HB, et al. Trichostatin A sensitizes human ovarian cancer cells to TRAIL-induced apoptosis by down-regulation of c-FLIPL via inhibition of EGFR pathway [J]. *Biochem Pharmacol*, 2009, 77(8): 1328-1336.
- [12] Noh EJ, Lim DS, Jeong G, et al. An HDAC inhibitor, trichostatin A, induces a delay at G₂/M transition, slippage of spindle checkpoint, and cell death in a transcription-dependent manner [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 378(3): 326-331.

- [13] Strait KA, Dabbas B, Hammond EH, et al. Cell cycle blockade and differentiation of ovarian cancer cells by the histone deacetylase inhibitor trichostatin A are associated with changes in p21, Rb, and Id proteins [J]. *Mol Cancer Ther*, 2002, 1(13): 1181-1190.
- [14] Zhang L, Dermawan K, Jin M, et al. Differential impairment of regulatory T cells rather than effector T cells by paclitaxel-based chemotherapy [J]. *Clin Immunol*, 2008, 129(2): 219-229.
- [15] Ichite N, Chougule MB, Jackson T, et al. Enhancement of docetaxel anticancer activity by a novel diindolylmethane compound in human non-small cell lung cancer [J]. *Cancer Res*, 2009, 15(2): 543-552.
- [16] 张嵩,张焱,李胜,等. 曲古抑素 A 和紫杉醇对子宫内膜癌细胞的增殖和凋亡的影响 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2008, 15(6): 516-521.
- [17] Nassar A, Lawson D, Cotsonis G, et al. Survivin and caspase-3 expression in breast cancer: Correlation with prognostic parameters, proliferation, angiogenesis, and outcome [J]. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2008, 16(2): 113-120.
- [18] Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma [J]. *Nat Med*, 1997, 3(8): 917-921.
- [19] Li F, Ambrosini G, Chu EY, et al. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin [J]. *Nature*, 1998, 396(6711): 580-584.
- [20] Preusser M, Wolfsberger S, Czech T, et al. Survivin expression in intracranial ependymomas and its correlation with tumor cell proliferation and patient outcome [J]. *Am J Clin Pathol*, 2005, 124(4): 543-549.
- [21] Tirrò E, Consoli ML, Massimino M, et al. Altered expression of c-IAP1, survivin, and Smac contributes to chemotherapy resistance in thyroid cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(8): 4263-4272.
- [收稿日期] 2011-07-30 [修回日期] 2011-09-06
[本文编辑] 韩丹

· 科技动态 ·

调控 X 染色体失活中的长链非编码 RNA——JPX

在哺乳动物中,可以通过 X 染色体失活(X chromosome inactivation,XCI)抑制一条 X 染色体的转录,达到基因数量在不同性别间的平衡。控制 XCI 的区域称为 X 染色体去活化中心(X-inactivation center,Xic),分布着大量的非编码 RNA。控制 XCI 的一个经典的非编码 RNA 为 Xist,其转录产物可以在 X 染色体上招募形成大量的抑制性复合体,以顺式作用方式促进 X 染色体失活。目前对于 Xist 是如何被调控的仍然不是很清楚。Xist 的反义 RNA-Tsix,是一个已知的 Xist 的抑制子。Tian 等最近的研究发现,Xic 区编码的 JPX 可以作为 Xist 的激活子。JPX 在 XCI 过程中表达上调,敲除 JPX 会阻断 XCI 的发生,转录后干扰 JPX 同样也会抑制 XCI。同时敲除 Tsix 可以恢复 JPX 缺陷引起的 XCI 抑制,说明这两者之间存在着拮抗作用。

该研究在小鼠的胚胎干细胞(embryonic stem cell,ES)中发现,随着 ES 细胞的不断分化,其中 JPX 的表达水平有 10~20 倍的上调。通过同源重组定点敲除 ES 细胞中一条染色体上的 JPX 后,通过 FISH 检测发现伴有 Xist 的缺失;同时对于雌性来源的 ES 细胞敲除 JPX 会有致死性的后果,但对于雄性来源的 ES 细胞并没有明显的作用。有意思的是,JPX 不仅顺式作用于被敲除的染色体本身,还反式作用于未被敲除的 X 染色体,表现为两条 X 染色体上 Xist 的表达均被抑制。常染色体异位表达 JPX 可以挽救 JPX 敲除的影响,通过 shRNA 干扰掉 JPX 的作用后,可以导致和 JPX 敲除同样的作用,说明 JPX 是作为一种非编码 RNA 起作用的。在 JPX 敲除的 ES 细胞中同时敲除 Tsix,可以使细胞 Xist 的表达恢复正常,但 Tsix 和 JPX 双缺陷的 ES 细胞在分化发育的早期与正常细胞相比还是有较高的细胞死亡比例。

该研究认为,Tsix 和 JPX 通过相互平行的机制分别作用于 Xist,当 Tsix 被敲除时,Xist 处于一个更易于被活化的状态,所以仅通过残存 Tsix 的表达即可诱导 Xist 的上调。总的来说,Xist 最终的表达被一系列 Xic 编码的非编码长 RNA 所调控,进一步支持了非编码长链 RNA 可以参与到等位基因或位点特异性调控的观点。

[吴聪摘译,刘秋燕 审阅. Tian D, Sun S, Lee JT. *Cell*, 2010, 143(2): 390-403]