

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2014.03.009

人脑胶质瘤细胞株中 *RIZ1* 基因启动子甲基化状态的研究

张晨冉¹, 吴小军^{1Δ}, 胡刘华², 贺华¹, 蒋磊¹, 胡国汉¹, 丁学华¹, 卢亦成¹(1. 第二军医大学附属长征医院 神经外科, 上海 200003; 2. 上海交通大学医学院附属仁济医院 心内科, 上海 200127)

[摘要] **目的:**检测4种人脑成胶质细胞瘤细胞株中成视网膜细胞瘤蛋白结合锌指结构基因1(retinoblastoma protein-interacting zinc finger gene1, *RIZ1*)基因启动子区的甲基化状态,进一步认识 *RIZ1* 在胶质瘤发病机制中的作用。**方法:**应用甲基化特异性PCR法(methylation specific PCR, MSP)检测4种人脑成胶质细胞瘤细胞株 U87、U251、A172 和 T98 中 *RIZ1* 基因启动子区的甲基化水平,其中 U87 细胞发生甲基化,被选为后续实验对象。RT-PCR 检测 U87 细胞经 5-Aza-CdR 处理前后 *RIZ1* mRNA 表达量的变化,MTT 检测 5-Aza-CdR 对 U87 细胞生长增殖的影响。**结果:**4 种人脑成胶质细胞瘤细胞株中 U87 和 U251 细胞中检测到 *RIZ1* 基因启动子区域发生甲基化;U87 细胞经 5-Aza-CdR 处理后其 *RIZ1* mRNA 的表达量上调;MTT 法检测显示 5-Aza-CdR 能抑制 U87 的生长增殖,且与 5-Aza-CdR 的浓度和作用时间呈负相关。**结论:***RIZ1* 基因启动子高甲基化是人脑成胶质细胞瘤细胞株中 *RIZ1* 基因表达下调的重要机制。

[关键词] 胶质瘤;成视网膜细胞瘤蛋白结合锌指结构基因1;甲基化

[中图分类号] R739.41; R730.231; R730.54 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2014)03-0288-05

Study on *RIZ1* gene promoter methylation status in human glioblastoma cell lines

Zhang Chenran¹, Wu Xiaojun^{1Δ}, Hu Liuhua², He Hua¹, Jiang Lei¹, Hu Guohan¹, Ding Xuehua¹, Lu Yicheng¹(1. Department of Neurosurgery, Changzheng Hospital of Second Military Medical University, Shanghai 200003, China; 2. Department of Cardiology, Renji Hospital of Shanghai Jiaotong University school of Medicine, Shanghai 200127, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the methylation status in the promoter region of the retinoblastoma protein-interacting zinc finger1 (*RIZ1*) gene in four human glioblastoma (GBM) cell lines as well as the influence of methyltransferase inhibitor 5-Aza-CdR on *RIZ1* gene transcription and proliferation in GBM cells with a hypermethylated *RIZ1* promoter. **Methods:** The methylation status in the promoter region of *RIZ1* in four human GBM cell lines, U87, U251, A172 and T98, were analyzed by methylation-specific polymerase chain reaction. The cell line with *RIZ1* promoter hypermethylation was treated with 5-Aza-CdR. In the treated cells, *RIZ1* mRNA was assessed by real-time PCR and viability by MTT assays. **Results:** Promoter methylation of the *RIZ1* gene was detected in GBM cell lines U87 and U251. The abundance of *RIZ1* mRNA was significantly increased in U87 after treatment with 5-Aza-CdR. Treatment of U87 cells with 5-Aza-CdR resulted in a time- and concentration-dependent proliferation inhibition. **Conclusions:** Promoter methylation may play an important role in the epigenetic silencing of *RIZ1* gene expression in human GBM cells.

[Key words] glioma; retinoblastoma protein-interacting zinc finger gene1 (*RIZ1*); methylation

[Chin J Cancer Biother, 2014, 21(3): 288-292]

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30930094),国家自然科学基金青年基金资助项目(No. 81001118),上海市卫生局局级课题(No. 2009120),上海长征医院青年启动基金(No. 2012CZQN05)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30930094), the National Natural Science Young Foundation of China (No. 81001118), the Foundation of Shanghai Municipal Health Bureau(No. 2009120), and the Foundation for Youths of Changzheng Hospital(No. 2012CZQN05)

[作者简介] 张晨冉(1982-),男,内蒙古呼和浩特市人,医学博士,主治医师,主要从事胶质瘤和垂体瘤的临床和相关基础研究, E-mail: christopher0708@163.com; 吴小军,男,博士,副教授,硕士生导师, E-mail: wuxiaojun1975@yahoo.com. Δ 共同第一作者

[通信作者] 卢亦成(Lu Yicheng, corresponding author), E-mail: luy305@163.com

成视网膜细胞瘤蛋白结合锌指结构基因 1(retinoblastoma protein-interacting zinc finger gene1, *RIZ1*)是目前肿瘤分子靶向治疗的一个新靶点,它在多种人类肿瘤中表达减少或缺失,与肿瘤发生进展等密切相关,被定义为一种抑癌基因,遗传机制和表观遗传学改变是 *RIZ1* 基因失活的主要原因^[1-5]。本课题组前期检测到 *RIZ1* 在不同级别脑胶质细胞瘤组织标本中均有表达,且随着肿瘤级别的增加其表达水平逐渐下降(结果尚未发表),但该基因的具体下调机制不详。本研究利用甲基化特异 PCR 法(methylation specific PCR, MSP)检测 4 种人脑成胶质细胞瘤细胞株中 *RIZ1* 基因启动子区的甲基化状态;对发生甲基化的细胞株用特异性 DNA 甲基转移酶抑制剂 5-Aza-CdR 处理,再利用 RT-PCR 法检测处理前后 *RIZ1* mRNA 表达量的变化,MTT 法检测 5-Aza-CdR 对该细胞生长增殖的影响,旨在初步探索 *RIZ1* 在胶质瘤发病过程中基因表达下调的机制,进一步了解 *RIZ1* 在胶质瘤发病机制中的作用。

1 材料与方法

1.1 细胞株和主要试剂

4 种 WHO IV 级的人脑成胶质细胞瘤细胞株 U251-MG、A172、U87-MG 和 T98G 均购自美国 ATCC 公司,H-DMEM、胎牛血清和胰蛋白酶均购自美国 Gibco 公司,二甲基亚砜(DMSO)、5-Aza-CdR 和 MTT 购自 Sigma 公司。血液/细胞/组织通用性 DNA 提取试剂盒购自 Biomiga 公司,逆转录 M-MLV1 试剂盒(RT-PCR)购自 TAKARA 公司,TRIzol Reagent 购自 Invitrogen 公司,Wizard DNA 净化系统购自 Promega 公司。

1.2 细胞培养和 5-Aza-CdR 药物干预

4 种胶质瘤细胞均采用 DMEM 培养基培养,再加 8% 的胎牛血清、青霉素 G(100 U/ml)和链霉素(100 μ g/ml),置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中进行培养,每 3 d 换药 1 次,细胞呈贴壁生长。筛选出 *RIZ1* 基因启动子发生甲基化的细胞系后,随机分为两组:药物干预组和对照组。药物干预组处理方法:将 2×10^5 个 U87 细胞接种于 6 孔板中,用 10 μ mol/L 5-Aza-CdR 作用 5 d,药液每天进行更换,然后分析 DNA 或 RNA 提取。对照组继续用常规 DMEM 完全培养基培养,所有实验至少重复 3 次。

1.3 基因组 DNA 的抽提、纯化和亚硫酸氢盐修饰

实验步骤按照试剂盒操作方法进行。所用抽提获得的基因组 DNA 经亚硫酸氢钠处理,步骤如下:2 μ g 的 DNA 经 5.5 μ l 3 mol/L 的氢氧化钠(终浓度为

0.3 mol/L)在 37 $^{\circ}$ C 下作用 10 min 进行变性处理。然后,在避光条件下再加入 30 μ l 10 mmol/L 的对苯二酚和 520 μ l 3 mol/L 的亚硫酸氢钠(pH=5.0)。将上述混合物倒置,加入 200 μ l 的液状石蜡中,以防止水分蒸发和试剂的氧化,然后在 50 $^{\circ}$ C 条件下孵育 16 h。修饰过的 DNA 用 Wizard DNA 净化系统进行纯化处理。纯化的 DNA 再用氢氧化钠处理后沉淀。2 μ l 纯化的 DNA 行甲基化聚合酶链反应分析。

1.4 MSP 法检测人脑成胶质细胞瘤细胞株中 *RIZ1* 基因启动子的甲基化水平

甲基化特异性引物的设计应包含 23 个 CpG 二核苷酸,分别为顺义序列 -124 ~ -103,反义序列 32 ~ 52。同理,非甲基化特异性设计也应包含 23 个 CpG 二核苷酸,分别为顺义序列 -123 ~ -103,反义序列 32 ~ 52。甲基化 DNA 的引物序列如下:(Forward 5'-GTGGTGGTTATTGGGCGACGGC-3'; Reverse 5'-GCTATTTCCGCGACCCCGACG-3'),非甲基化 DNA 的引物序列如下:(Forward 5'-TGGTGTTATTGGGTGATGGT-3' ; Reverse 5'-ACTATTTCAACCAACCCCAAGA-3'),产物大小分别为 177-bp 和 175-bp。PCR 的反应条件如下,变性:30 s、94 $^{\circ}$ C,40 个循环;退火:甲基化扩增 -68 $^{\circ}$ C,非甲基化扩增 -60 $^{\circ}$ C,45 s;延长:72 $^{\circ}$ C,60 s;最后 PCR 行测序处理。

1.5 RT-PCR 检测经 5-Aza-CdR 处理前后 U87 细胞中 *RIZ1* 基因的表达

TRIzol 法提取总 RNA,分光光度计测量 RNA 浓度和纯度。采用 M-MLV 合成第一链 cDNA。实时定量 PCR 操作方法和反应条件参考文献^[6]进行,引物序列如下:*RIZ1*: Forward 5'-GGGACCTCGGAACAAC-3'; Reverse 5'-TGTATCTGCCTGGGACTG-3'; β -actin: Forward 5'-ACCAACTGGGACGACATG-GAGAAA-3' Reverse 5'-TAGCACAGCCTGGATAG-CAACGTA-3',产物大小分别为 96-bp 和 192-bp。用公式 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算模板最初的拷贝数。

1.6 MTT 法检测 5-Aza-CdR 对 U87 细胞生长增殖的影响

密度为 1×10^3 个/ml 的细胞铺于 96 孔板的中央区域。24 h 后弃原培养液,加入含有终浓度 5、10、20 μ mol/L 5-Aza-CdR 的培养基 200 μ l,每个药物浓度设 5 个平行孔,以加不含有 5-Aza-CdR 的完全培养基作为阴性对照,以只加完全培养基不加细胞为空白对照孔。加药 24、48、72、96 h 后分别取 1 块 96 孔板进行检测,之后每孔细胞中加 20 μ l 15 mg/mL 的 MTT 溶液,再培养 4 h 后 2500 rpm 离心 10 min 以终止反应,弃上清,再加 150 μ l 二甲基亚

砒(DMSO)后于微量震荡器充分震荡 10 min 以溶解结晶;最后,置酶标仪于波长 540 nm 测 D_{540} 值。每孔设置 6 个复孔,所有实验重复 3 次。按照 D_{540} 值大小计算细胞增殖抑制率,细胞增殖抑制率(%) = $[(\text{对照组 } D_{540} - \text{空白组 } D_{540}) - (\text{实验组 } D_{540} - \text{空白组 } D_{540})] / (\text{对照组 } D_{540} - \text{空白组 } D_{540}) \times 100\%$ 。

1.7 统计学处理

采用 SPSS 21.0 统计软件,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素及多因素方差分析, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 U87 和 U251 细胞中 *RIZ1* 启动子区明显发生甲基化

为了明确 *RIZ1* 基因启动子的 DNA 超甲基化是否能抑制该基因的转录表达,以 MSP 法检测了 4 株人脑成胶质细胞瘤细胞 U87、U251、A172 和 T98 中 *RIZ1* 的 DNA 甲基化状态和 *RIZ1* 的表达情况,MSP 结果(图 1A)显示,正常脑组织(Normal Brain Tissue, NBT)中 *RIZ1* 基因的启动子未发生甲基化,而 U87 和 U251 细胞中 *RIZ1* 的 DNA 发生超甲基化,甲基化和非甲基化产物的大小分别为 177bp 和 175bp,而 T98 和 A172 细胞株中未检测到甲基化改变(图 1B);采用 RT-PCR 检测 U87 和 U251 细胞中 *RIZ1* 的表达情况,发现由于该两种肿瘤细胞中 *RIZ1* 基因的 DNA 发生超甲基化,因此 *RIZ1* 的转录水平受到抑制(图 1C)。

2.2 5-Aza-CdR 对胶质瘤细胞株中 *RIZ1* mRNA 表达的影响

为验证 U87 细胞中 *RIZ1* 的转录抑制是由 *RIZ1* 的 DNA 发生甲基化引起,应用 DNA 甲基化转移酶抑制剂 5-Aza-CdR 处理 U87 和 A172(非甲基化对照)细胞,然后在行 MSP 和 RT-PCR 分析,发现 U87 细胞经 5-Aza-CdR 处理后 *RIZ1* 基因恢复了 mRNA 表达;而 A172 细胞经 5-Aza-CdR 处理前后,*RIZ1* 的表达水平未发生改变(图 2)。

2.3 5-Aza-CdR 明显抑制 U87 细胞的增殖

用不同浓度(5、10 和 20 $\mu\text{mol/L}$)的 5-Aza-CdR 处理 U87 细胞不同时间(24 h、48 h、76 h 和 96 h), MTT 法检测 5-Aza-CdR 对 U87 细胞增殖活力的影响,发现细胞的生长增殖均受到不同程度的抑制,同一时间的不同药物浓度间的细胞增殖抑制率差异具有统计学意义($P < 0.01$);同一药物浓度的不同作用时间的细胞增殖抑制率差异具有统计学意义

($P < 0.01$)(图 3)。在一定浓度和时间范围内,5-Aza-CdR 对 U87 细胞生长增殖的抑制率呈浓度和时间依赖性。

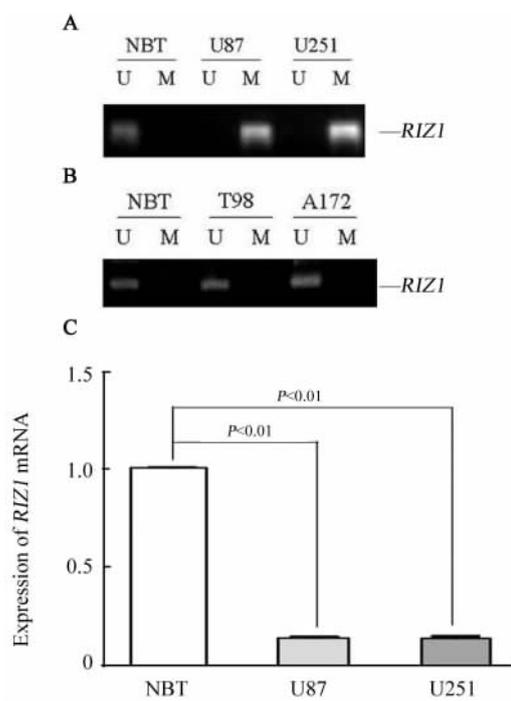


图 1 成胶质细胞瘤细胞株中 *RIZ1* 基因的 DNA 甲基化状态(A、B)和 mRNA 表达(C)
Fig.1 DNA methylation status(A、B) and mRNA expression(C) of *RIZ1* in human GBM cell lines

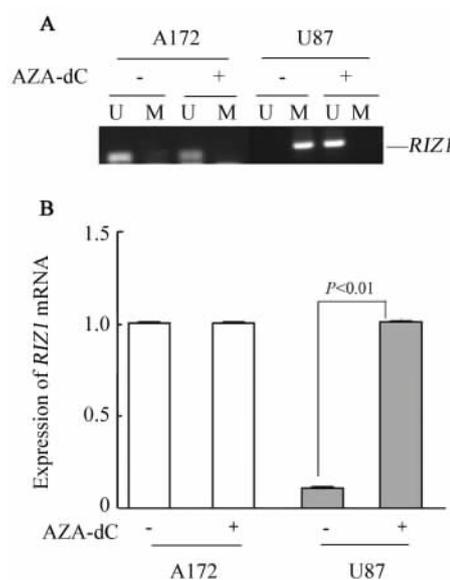


图 2 5-Aza-CdR 对 A172 和 U87 细胞中 *RIZ1* 基因甲基化(A)和 mRNA 表达(B)的影响
Fig.2 Effect of 5-Aza-CdR treatment on the methylation status(A) and mRNA expression(B) of *RIZ1* in A172 and U87 cell lines

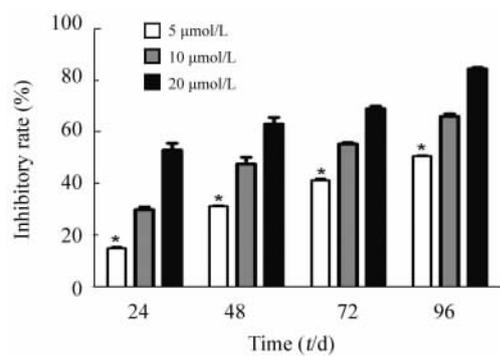


图3 MTT 法检测 5-Aza-CdR 对 U87 细胞增殖活力的影响

Fig. 3 Effect of 5-Aza-CdR on cell proliferation of U87 by MTT

* $P < 0.01$ vs 10 $\mu\text{mol/L}$ or 20 $\mu\text{mol/L}$

3 讨论

RIZ1 基因定位于 1 号染色体短臂 3 区 6 带 (1p36.23)^[7], 是新近发现的肿瘤抑制基因, 表达的 *RIZ1* 蛋白的主要功能由其特异性的 PR 结构域发挥^[8], 该结构域被认为是细胞增殖和瘤变的抑制因子, 其通过蛋白间相互作用对染色体结构的稳定性起重要作用, 同时可以调控其它抑癌基因的表达。进一步的研究表明, 多种人类肿瘤中可发生 *RIZ1* 基因的缺失, 如乳腺癌、肝癌、结直肠癌、恶性脑膜瘤等^[9-12]。但是 *RIZ1* 基因在胶质瘤中的表达情况及其与胶质瘤恶性度等的关系, 目前国内外尚无报道。

我们前期利用免疫组织化学方法发现 *RIZ1* 的表达水平与胶质瘤的肿瘤级别呈负相关, 且与肿瘤无进展生存期和总生存期正相关(结果尚未发表), 可能是胶质瘤发病过程中的潜在抑癌基因, 但 *RIZ1* 基因的沉默机制不详, *RIZ1* 基因启动子的甲基化是否是一个重要的因素? 为此本研究利用 MSP 方法检测了 4 种人成胶质细胞瘤细胞株中 *RIZ1* 基因启动子的甲基化状态, 发现 U87 和 U251 成胶质细胞瘤细胞株中 *RIZ1* 基因启动子区存在该现象, 利用甲基化转移酶抑制剂 5-Aza-CdR 抑制 *RIZ1* 甲基化的发生, 可使 *RIZ1* mRNA 表达量上调, 进而抑制了 U87 的生长增殖, 且抑制率与 5-Aza-CdR 的浓度和作用时间呈正相关。从这些研究结果我们可以初步得出结论, *RIZ1* 基因启动子高甲基化是人胶质瘤细胞株 U87 中可能的分子病理机制之一。

本研究在 4 株人成胶质细胞瘤细胞(均为 IV 级)中仅有 U87 和 U251 发生 *RIZ1* 启动子甲基化, 可见引起成胶质细胞瘤细胞株中 *RIZ1* 基因沉默的

机制比较复杂, 其他引起 *RIZ1* 基因沉默的机制尚待进一步研究。我们下一步将对人胶质瘤组织标本中 *RIZ1* 基因的启动子甲基化进行检测, 进一步明确在胶质瘤发生发展过程中 *RIZ1* 基因甲基化的发生率, 结合患者的临床病理资料, 分析 *RIZ1* 基因的甲基化与患者预后等的相关性; 利用基因测序等方法明确导致 *RIZ1* 基因沉默的其他机制; 检测 5-Aza-CdR 对胶质瘤细胞的细胞周期、细胞凋亡及放疗敏感性等的影响, 进一步完善 *RIZ1* 在胶质瘤发病机制的作用, 为胶质瘤的靶向治疗提供新思路。

5-Aza-CdR 是一种甲基化转移酶抑制剂, 其可通过逆转抑癌基因甲基化状态, 进而诱导基因重新表达, 恢复抑癌基因抑癌作用^[13-14]。目前已用于部分血液系统恶性肿瘤的 I 期、II 期临床试验, 具有一定的效果^[15]。我们发现 5-Aza-CdR 作用于 U87 后能使其生长增殖受到抑制, 初步认为其可能机制是恢复了抑癌基因 *RIZ1* 的表达, 提示我们可以利用 5-Aza-CdR 或者其他抑制甲基化的药物来减少 *RIZ1* 基因启动子甲基化, 进而促进肿瘤凋亡, 可望用于抗胶质瘤分子靶向治疗。但作为一种非特异的 DNA 甲基转移酶抑制剂, 5-Aza-CdR 同时可能也抑制了恶性成胶质细胞瘤中 *MGMT* 启动子甲基化, 导致 *MGMT* 高表达, 是否会导致 *MGMT* 启动子甲基化阳性的胶质瘤对烷化剂耐药? 以上这些问题都需要在胶质瘤靶向治疗中去深入思考, 这些也将是我们下一步研究的重点。

[参考文献]

- [1] Chappell G, Kutanzi K, Uehara T, et al. Genetic and epigenetic changes in fibrosis-associated hepatocarcinogenesis in mice [J]. *Int J Cancer*, 2014, 134(12): 2778-2788.
- [2] Dong SW, Cui YT, Zhong RR, et al. Decreased expression of retinoblastoma protein-interacting zinc-finger gene 1 in human esophageal squamous cell cancer by DNA methylation [J]. *Clin Lab*, 2012, 58(1/2): 41-51.
- [3] Shimura H, Mori N, Wang YH, et al. Aberrant methylation and decreased expression of the *RIZ1* gene are frequent in adult acute lymphoblastic leukemia of T-cell phenotype [J]. *Leukemia Lymphoma*, 2012, 53(8): 1599-1609.
- [4] Shimura H, Mori N, Wang YH, et al. Aberrant methylation and decreased expression of the *RIZ1* gene are frequent in adult acute lymphoblastic leukemia of T-cell phenotype [J]. *Leukemia Lymphoma*, 2012, 53(8): 1599-1609.
- [5] Cheng HY, Gao Y, Lou G. DNA methylation of the *RIZ1* tumor suppressor gene plays an important role in the tumorigenesis of cervical cancer [J]. *Eur J Med Res*, 2010, 15(1): 20-24.
- [6] 张晨冉, 孙青芳, 卞留贯, 等. HIF-1 α 在小鼠 ACTH 垂体腺瘤细胞 AtT-20 中的抗凋亡作用 [J]. *中华内分泌代谢杂志*,

- 2009, 25(5): 485-488.
- [7] Mori N, Morosetti R, Spira S, et al. Chromosome band 1p36 contains a putative tumor suppressor gene important in the evolution of chronic myelocytic leukemia [J]. *Blood*, 1998, 92(9): 3405-3409.
- [8] Congdon LM, Sims JK, Tuzon CT, et al. The PR-Set7 binding domain of Riz1 is required for the H4K20me1-H3K9me1 trans-tail histone code and Riz1 tumor suppressor function [J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(6): 3580-3589.
- [9] Chen Y, Zhang P, Wang Y, et al. Construction of PR domain eukaryotic expression vector and its inhibitory effect on esophageal cancer cells [J]. *Chin J Cancer Res*, 2013, 25(5): 493-499.
- [10] Yang CM, Shinkai Y. Prdm12 is induced by retinoic acid and exhibits anti-proliferative properties through the cell cycle modulation of P19 embryonic carcinoma cells [J]. *Cell Struct Funct*, 2013, 38(2): 195-204.
- [11] Liu ZY, Wang JY, Liu HH, et al. Retinoblastoma protein-interacting zinc-finger gene 1 (RIZ1) dysregulation in human malignant meningiomas [J]. *Oncogene*, 2013, 32(10): 1216-1222.
- [12] Geli J, Kiss N, Kogner P, et al. Suppression of RIZ in biologically unfavourable neuroblastomas [J]. *Int J Oncol*, 2010, 37(5): 1323-1330.
- [13] Natsume A, Wakabayashi T, Tsujimura K, et al. The DNA demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine activates NY-ESO-1 antigenicity in orthotopic human glioma [J]. *Int J Cancer*, 2008, 122(11): 2542-2553.
- [14] Chu SH, Ma YB, Feng DF, et al. Effect of 5-Aza-2'-deoxycytidine on SLC22A18 in glioma U251 cells [J]. *Mol Med Rep*, 2012, 5(1): 138-141.
- [15] Momparler RL. A perspective on the comparative antileukemic activity of 5-Aza-2'-deoxycytidine (decitabine) and 5-Azacytidine (Vidaza) [J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2012, 21: 5(8): 875-881.
- [收稿日期] 2014-03-26 [修回日期] 2014-05-25
[本文编辑] 阮芳铭

· 科技动态 ·

双顺反子的 MAVS 转录子揭示在抗病毒免疫中存在一类截短变异体

细菌和病毒的 mRNA 一般都是多顺反子,通过对多顺反子的 mRNA 进行选择性剪切或选择性翻译,从而选择性去除或增加功能性结构域,最终调控蛋白的多样性和基因的功能。但是在哺乳动物细胞中是否也广泛存在多顺反子的 mRNA,其是否能从单个 mRNA 表达多个蛋白并行行使多种功能,是正在探索的问题。

MAVS(mitochondrial antiviral signaling protein, MAVS)是 RIG-I 和 MDA5 下游调控 I 型干扰素产生的关键信号蛋白。首先作者在人的多种细胞系中发现 MAVS 存在相对分子质量分别为 72 kD(FL MAVS)和 50 kD(miniMAVS)的两种蛋白,分析发现 miniMAVS 并不是 MAVS 的转录异构体翻译的产物,也不是 FL MAVS 发生蛋白酶解的产物。核糖体谱实验发现,MAVS mRNA 存在 M1 和 M142 两个翻译起始位点,当突变了 M142 翻译起始位点后,miniMAVS 就不再表达,证明 FL MAVS 和 miniMAVS 是同一条 mRNA 上翻译出来的两个蛋白,即 MAVS 的 mRNA 是双顺反子。MiniMAVS 的表达是依赖于其翻译起始位点上游的顺式作用元件 uORF,即当核糖体扫描开始时,首先翻译 uORF,由于 uORF 与 FLMAVS 的起始位点重叠,核糖体就能绕过 FLMAVS 的起始位点,uORF 终止翻译后,核糖体继续扫描,当遇到 miniMAVS 的翻译起始位点后就开始翻译表达 miniMAVS。当核糖体发生遗漏扫描时,即越过 uORF 的翻译起始位点,遇到 FLMAVS 的翻译起始位点时就开始翻译 FLMAVS。但机体是如何平衡 FLMAVS 和 miniMAVS 表达的机制目前还不清楚。作者对 miniMAVS 的功能研究发现,miniMAVS 能干扰 FLMAVS 诱导的 I 型干扰素的产生,miniMAVS 不能干扰 FLMAVS 集聚的形成,但能跟下游的信号接头蛋白 TRAF6 和 TRAF2 相结合,然而其具体的干扰机制还不清楚。进一步发现,与 FLMAVS 功能类似,miniMAVS 能促进细胞死亡,使得细胞基因组 DNA 片段化和 PARP 的剪切,但其是以一种非依赖 I 型干扰素的方式进行的。最后作者通过核糖体谱实验发现,在人的 U937 细胞中有 8 893 个转录子,而翻译起始位点却有 14 336 个,通过分析转录子的翻译起始位点,发现许多基因能编码延长或截短的变异体,证明在真核细胞的 mRNA 中存在比过去想象的更多的双顺反子或多顺反子,当然这些预测的多顺反子的功能仍需要在后续实验中加以确证。

综上所述,真核生物中也存在许多双顺反子或多顺反子,翻译出来的截短体能稳定的存在并在许多生物学过程中行使重要的功能,特别是在抗病毒天然免疫中发挥作用。

[郑青亮 摘译,侯晋 审阅. Brubaker SW, Gauthier AE, Mills EW, et al. *Cell*, 2014, 156(4): 800-811.]