

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2011.02.004

· 基础研究 ·

## CHFR 基因 CpG 岛甲基化对食管癌 Eca109 细胞增殖和凋亡的影响

朱应超, 田辉, 岳韦名, 高存, 亓磊, 司立博(山东大学齐鲁医院胸外科 山东 济南 250012)

[摘要] 目的:研究 *CHFR* 基因启动子甲基化状态与食管癌 Eca109 细胞增殖和凋亡的关系。方法:分别用不同浓度(2、5、10  $\mu\text{mol/L}$ )5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-Aza-2'-deoxycytidine, 5-Aza-CdR)处理 Eca109 细胞,未经药物处理的细胞为对照组。甲基化特异性 PCR(methylation-specific PCR, MSP)检测 *CHFR* 基因 CpG 岛的甲基化状态,RT-PCR 检测 *CHFR* mRNA 的表达情况,MTT 法及流式细胞术检测不同浓度 5-Aza-CdR 处理对 Eca109 细胞增殖及凋亡的影响。结果:对照组 Eca109 细胞 *CHFR* CpG 岛处于高甲基化状态,5-Aza-CdR 处理后 *CHFR* CpG 岛可发生不同程度的剂量依赖性的去甲基化。对照组 Eca109 细胞无 *CHFR* mRNA 表达,5-Aza-CdR 处理组(2、5、10  $\mu\text{mol/L}$ )*CHFR* mRNA 相对表达量显著增加( $0.174 \pm 0.010$ 、 $0.221 \pm 0.013$ 、 $0.356 \pm 0.014$ )。不同浓度 5-Aza-CdR 处理后,Eca109 细胞增殖受到抑制[作用 72 h 时的抑制率分别为( $30.87 \pm 0.74$ )%、( $44.60 \pm 0.79$ )%、( $56.67 \pm 0.35$ )%],细胞凋亡显著增加[( $7.46 \pm 1.46$ )%、( $16.27 \pm 1.61$ )%、( $25.29 \pm 2.25$ )% vs ( $1.83 \pm 0.41$ )%,  $P < 0.01$ ]。结论:食管癌 Eca109 细胞经 5-Aza-CdR 处理后,*CHFR* 基因 CpG 岛发生部分去甲基化,出现 *CHFR* mRNA 表达,并抑制 Eca109 细胞增殖和促进细胞凋亡。

[关键词] *CHFR* 基因;甲基化;食管癌;Eca109 细胞;增殖;凋亡

[中图分类号] R735.1;R730.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2011)02-0139-05

## Effect of *CHFR* CpG island methylation status on proliferation and apoptosis of esophageal cancer Eca109 cells

ZHU Ying-chao, TIAN Hui, YUE Wei-ming, GAO Cun, QI Lei, SI Li-bo (Department of Thoracic Surgery, Qilu Hospital, Shandong University, Ji'nan 250012, Shandong, China)

[Abstract] **Objective:** To study the relationship of *CHFR* CpG island methylation status on proliferation and apoptosis of esophageal cancer Eca109 cells. **Methods:** Eca109 cells were treated with different concentrations (2, 5, and 10  $\mu\text{mol/L}$ ) of 5-Aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-CdR), and untreated Eca109 cells were used as control. Methylation-specific PCR (MSP) analysis was used to evaluate the CpG island methylation status of *CHFR* gene, and RT-PCR was used to detect the *CHFR* mRNA expression in Eca109 cells. MTT and flow cytometry were used to determine the proliferation and apoptosis of Eca109 cells treated with different concentrations of 5-Aza-CdR. **Results:** *CHFR* CpG island was hypermethylated in the untreated Eca109 cells, and methylated *CHFR* CpG was demethylated to different degrees in 5-Aza-CdR treatment groups. No expression of *CHFR* mRNA was found in untreated Eca109 cells, but the relative expression of *CHFR* mRNA was remarkably increased in 5-Aza-CdR (2, 5, and 10  $\mu\text{mol/L}$ ) treatment groups ( $0.174 \pm 0.010$ ,  $0.221 \pm 0.013$ , and  $0.356 \pm 0.014$ ). Different concentrations of 5-Aza-CdR inhibited the proliferation ([ $30.87 \pm 0.74$ ]%, [ $44.60 \pm 0.79$ ]%, and [ $56.67 \pm 0.35$ ]%), and promoted apoptosis of Eca109 cells ([ $7.46 \pm 1.46$ ]%, [ $16.27 \pm 1.61$ ]%, [ $25.29 \pm 2.25$ ]%) vs [ $1.83 \pm 0.41$ ]%,  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** 5-Aza-CdR can partly demethylate *CHFR* CpG island in esophageal cancer Eca109 cells, inducing *CHFR* mRNA expression, inhibiting proliferation and promoting apoptosis of Eca109 cells.

[Key words] *CHFR*; methylation; esophageal cancer Eca109 cell; proliferation; apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2011, 18(2): 139-143]

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30571844);山东省科技攻关项目(No. 2009GG10002007);山东省自然科学基金项目(No. ZR2009CM090)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30571844), the Science and Technology Development Foundation of Shandong Province (No. 2009GG10002007), and the Natural Science Foundation of Shandong Province (No. ZR2009CM090)

[作者简介] 朱应超(1985-),男,山东省莱芜市人,硕士研究生,主要从事胸部肿瘤分子生物学方面的研究。E-mail: xrechx@163.com

[通信作者] 田辉(TIAN Hui, corresponding author), E-mail: tianhuiy@sohu.com

[网络出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20110412.1826.010.html

细胞周期检查点( cell cycle checkpoint)是保证细胞周期演进的关键过渡点, CHFR( checkpoint with FHA and ring finger)是第一个被发现的有丝分裂前期的检测点。当有丝分裂应激时, CHFR 表达能够延迟染色体的聚集, 阻止细胞于有丝分裂前期。CHFR 在正常组织中广泛表达, 其结构和功能都十分保守。研究表明, 在结肠癌<sup>[1-2]</sup>、白血病<sup>[3]</sup>、胃癌<sup>[4-5]</sup>、乳腺癌<sup>[6]</sup>等多种肿瘤组织中 CHFR 表达缺失, CpG 岛的甲基化是导致 CHFR 表达缺失或沉默的重要机制。5-氮杂-2'-脱氧胞苷( 5-Aza-2'-deoxycytidine, 5-Aza-CdR)作为 5-氮杂胞苷的衍生物, 是一种特异性的 DNA 甲基转移酶抑制剂。DNA 复制的过程中, 5-Aza-CdR 在复制叉上作用于甲基转移酶并使之失活; DNA 在无甲基转移酶情况下复制时, 使原来甲基化的基团发生去甲基化。食管癌是常见的恶性肿瘤之一, 我国是食管癌的高发地区, 以鳞癌为主; 在西方国家, 食管腺癌发病率呈逐年上升趋势<sup>[7]</sup>。在食管癌中, CHFR 基因的相关研究鲜有报道。本研究探讨 CHFR 基因 CpG 岛甲基化状态对食管癌 Eca109 细胞增殖、凋亡的影响, 研究食管癌与 CHFR 基因的关系, 为探讨食管癌的发病机制寻找新的思路, 为食管癌的治疗寻找新的靶点。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

食管癌 Eca109 细胞由本实验室保存。胎牛血清购自杭州四季青生物公司, Wizard DNA Clean-Up 纯化试剂盒、TRIzol 购自 Promega 公司, 逆转录试剂盒、RT-PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司, 碘化丙啶( PI)、Annexin-V 购自晶美生物公司, 5-Aza-CdR、MTT、亚硫酸氢钠、氢醌购自美国 Sigma 公司。

### 1.2 Eca109 细胞的培养及 5-Aza-CdR 对其的处理

食管癌 Eca109 细胞于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基( 37 °C、5% CO<sub>2</sub>) 中培养, 每隔 2 ~ 3 d 传代 1 次。取对数生长期的 Eca109 细胞接种培养 24 h 后, 更换分别加有 2、5、10 μmol/L 5-Aza-CdR 的培养液, 对照组只更换培养液( 无 5-Aza-CdR ), 分别于 24 h 及 48 h 更换含 5-Aza-CdR 的培养液, 72 h 后更换不含 5-Aza-CdR 的培养液, 再过 24 h 后收集细胞, 分别提取细胞的 DNA 和总 RNA。

### 1.3 甲基化特异性 PCR( methylation-specific PCR, MSP)检测 Eca109 细胞 CpG 岛的甲基化状态

基因组 DNA 模板用分光光度计测定, 纯度要求  $D_{260}/D_{280}$  在 1.8 ~ 2.0 之间。将 2 μg DNA 稀释至 50 μl, 加入 0.3 mol/L NaOH 溶液 37 °C 孵育 20 min; 加

入新鲜配置的 3 mol/L 亚硫酸氢钠( pH 值用 NaOH 精确调至 5.0 ) 0.2 μl 以及 10 mmol/L 的氢醌 30 μl; 轻轻混匀, 200 μl 矿物质油覆盖, 53 °C 保温 16 h。用 Wizard DNA Clean-Up system 脱盐、纯化回收, 洗脱进 50 μl 去离子水中, 加入 3 mol/L 的 NaOH 5 μl 孵育 15 min, 加入 50 μl 3 mol/L 醋酸氨、1 μl 糖原及 250 μl 95% 预冷乙醇沉淀, 离心洗涤后溶于 50 μl 双蒸馏水中, -20 °C 保存。CHFR 甲基化( M) 和非甲基化( UM) 特异引物序列及退火温度参考文献<sup>[8]</sup>: M 的上游引物为 5'-TTTCGTGATTCGTAGCGCGAC-3', 下游引物为 5'-GCGATTAAC TACGACGACG-3'; UM 的上游引物为 5'-TTTTGTGATTTGTAGGTGAT-3', 下游引物为 5'-ACAATTA ACTAACAACAACA-3'。MSP 体系扩增反应条件为 95 °C 变性 10 min, 接着 94 °C 变性 25 s, 分别 58 °C ( M) 和 53 °C ( UM) 退火 25 s, 72 °C 延伸 25 s, 35 个循环后 72 °C 延伸 10 min。产物行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外线下观察并照相。

### 1.4 RT-PCR 检测 Eca109 细胞 CHFR mRNA 表达

CHFR 基因序列设计相应引物: 上游引物为 5'-GTGTCGCCCTCAGCAGTGTG-3', 下游引物为 5'-CAGTAGCAGTCAGGACGGGAT-3', 扩增片段长度预期为 400 bp。同步扩增 GAPDH 作为内对照, 上游引物为 5'-TGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAG-3', 下游引物为 5'-TCCTTGGAGGCCATGTGGGCCAT-3', 扩增片段长度预期为 240 bp。引物用 Primer 5.0 软件设计, 由济南博尚公司合成。提取 RNA, 按照 RT 试剂盒的操作步骤合成 cDNA, 以此为模板, 用上述引物 PCR 扩增 CHFR 基因片段。PCR 条件为 94 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 40 s, 循环 30 次, 72 °C 延伸 7 min。产物行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶图像分析系统扫描电泳条带积分光密度, 计算 CHFR mRNA 基因相对表达强度。

### 1.5 MTT 法检测 Eca109 细胞的增殖

将对数增长的 Eca109 细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化, 用培养液配成单细胞悬液, 以每孔  $5 \times 10^4$  /ml 细胞接种于 96 孔培养板中, 培养 24 h。空白组只加培养液; 实验组更换含有 5-Aza-CdR 的 RPMI 1640 培养液, 使药物浓度分别为 2、5、10 μmol/L, 每种浓度接种 5 孔; 阴性对照组只换液, 不加 5-Aza-CdR, 置于培养箱继续培养。分别于 12、24、48、72 h 后每孔加入 MTT 溶液( 5 mg/ml ) 20 μl, 继续培养 4 h, 终止培养, 弃培养液。每孔加入二甲基亚砜 150 μl 溶解紫蓝色沉淀。选择 570 nm 波长, 以空白孔调零, 应用酶标仪测定各孔光密度( D) 值, 计算细胞生长

抑制率。细胞生长抑制率(%)=(对照组 D - 实验组 D)/(对照组 D - 空白组 D) × 100%。

1.6 流式细胞术检测 Eca109 细胞的凋亡

取对数生长期的 Eca109 细胞接种于 6 孔板中, 接种 24 h 后分别用 2、5、10 μmol/L 的 5-Aza-CdR 处理, 阴性对照组只更换培养液(不加 5-Aza-CdR), 作用 24 h 后用 0.25% 胰蛋白酶消化, PBS 洗涤 2 次, 然后加 1 ml 的 PBS 液充分振荡成单细胞悬液, 调细胞密度为 1 × 10<sup>6</sup>/L, 加入 FITC 标记的 Annexin-V 5 μl, 室温避光 30 min, 再加入 PI(50 μg/ml) 5 μl, 避光反应 5 min, 加入 400 μl PBS 液, 在流式细胞仪上检测细胞凋亡。

1.7 统计学处理

所有实验均重复 3 次。数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 用 SPSS Version 17.0 软件对数据进行处理, 组间的比较用单因素 ANOVA 检验, 均数间的两两比较用 *t* 检验, *P* < 0.05 或 *P* < 0.01 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 5-Aza-CdR 作用后 Eca109 细胞 CHFR 基因 CpG 岛的甲基化状态

MSP 检测结果(图 1)显示, 对照组的 Eca109 细胞 CHFR 基因 CpG 岛处于甲基化状态, 处理组出现不同程度的甲基化与非甲基化共存状态, 而且随着 5-Aza-CdR 作用剂量的加大, CHFR 基因 CpG 岛去甲基化的程度逐步加大。

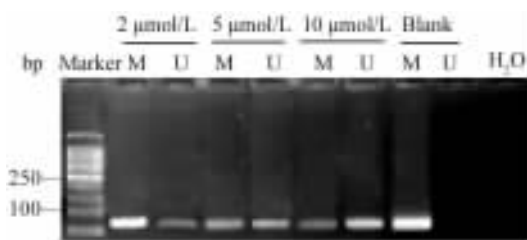


图 1 5-Aza-CdR 作用后 Eca109 细胞 CHFR 基因 CpG 岛的甲基化状态

Fig. 1 CpG island methylation status of CHFR gene after treatment with 5-Aza-CdR

Marker: DNA Marker; M: Methylated; U: Unmethylated; Blank: Untreated control group; H<sub>2</sub>O: Distilled water control group

2.2 5-Aza-CdR 上调 Eca109 细胞 CHFR mRNA 的表达

RT-PCR 检测结果(图 2)显示, 对照组 Eca109 细胞未见 CHFR mRNA 的表达, 经 2、5、10 μmol/L 的 5-Aza-CdR 作用后的处理组, CHFR mRNA 相对

表达含量分别为 0.174 ± 0.010、0.221 ± 0.013、0.356 ± 0.014。统计分析结果提示, 在一定范围内 CHFR mRNA 的表达随 5-Aza-CdR 作用剂量增高而增加(*P* < 0.05)。

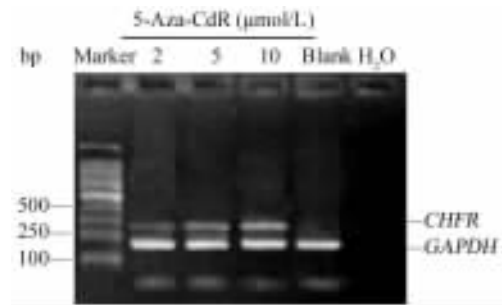


图 2 5-Aza-CdR 作用后 Eca109 细胞 CHFR mRNA 的表达

Fig. 2 Expression of CHFR mRNA after treatment with 5-Aza-CdR

Marker: DNA Marker; Blank: Untreated control group; H<sub>2</sub>O: Distilled water control group

2.3 5-Aza-CdR 抑制 Eca109 细胞增殖

不同浓度 5-Aza-CdR 作用不同时间对 Eca109 细胞生长抑制情况如图 3 所示, 10 μmol/L 的 5-Aza-CdR 处理 48 h 可达到半数抑制率。统计分析结果显示, 在一定范围内 5-Aza-CdR 对 Eca109 细胞生长抑制随药物浓度的增高及时间延长而作用越明显(*P* < 0.05)。

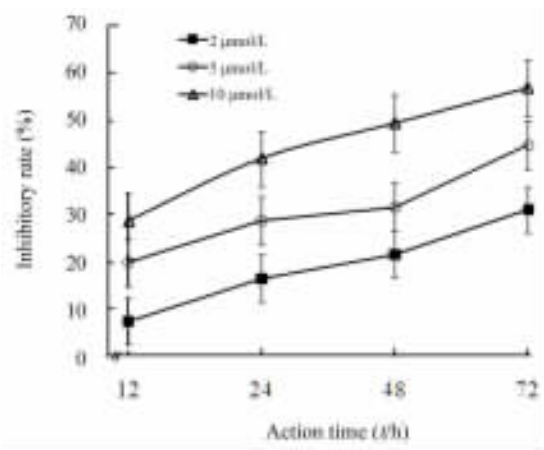


图 3 5-Aza-CdR 时间和剂量依赖性抑制 Eca109 细胞增殖

Fig. 3 5-Aza-CdR time- and dose-dependently inhibited proliferation of Eca109 cells

2.4 5-Aza-CdR 促进 Eca109 细胞凋亡

流式细胞术检测 Eca109 细胞凋亡的结果(图 4)显示, 对照组凋亡率为 (1.83 ± 0.41)% , 经 2、5、10 μmol/L 的 5-Aza-CdR 处理 24 h 后的 Eca109

细胞凋亡率分别为(7.46 ± 1.46)%、(16.27 ± 1.61)%、(25.29 ± 2.25)%。统计分析显示,不同浓度5-Aza-CdR处理后 Eca109 细胞的凋亡差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ),在一定范围内,随5-Aza-CdR浓度的增高其促细胞凋亡的作用更明显。

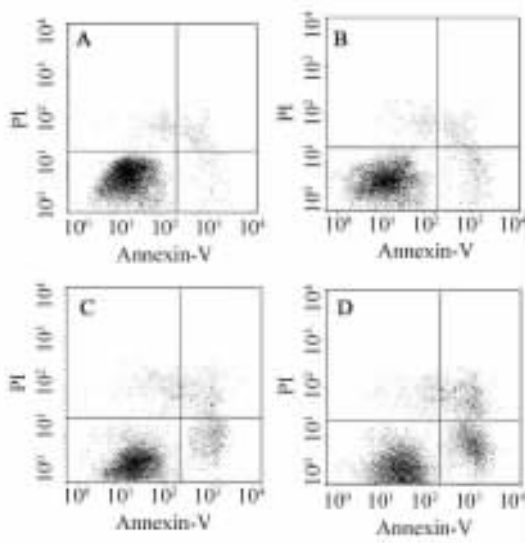


图4 5-Aza-CdR 促进 Eca109 细胞凋亡

Fig.4 5-Aza-CdR promoted apoptosis of Eca109 cells

A: Untreated control group; B: 2 μmol/L 5-Aza-CdR;  
C: 5 μmol/L 5-Aza-CdR; D: 10 μmol/L 5-Aza-CdR

### 3 讨论

表观遗传学调控是指影响基因转录活性而不涉及到DNA序列改变的表达调控方式,其在疾病发生与发展过程中的作用逐渐被人们认识到。大量临床和基础研究都表明,环境因素在肿瘤的发生和发展过程中起到了巨大的作用,而在遗传因素和环境因素的相互作用中,表观遗传学调控起到了桥梁的作用。DNA甲基化作为一种表观遗传学调控方式,在肿瘤的发生、发展过程中起着重要的作用<sup>[9]</sup>,并且已证实某些情况下DNA甲基化是抑癌基因失活的唯一机制<sup>[10-11]</sup>。与其他抑癌基因失活途径不同的是,启动子区甲基化使基因失活是一个可逆的过程,应用去甲基化剂能使基因的高甲基化状态发生去甲基化,激活抑癌基因,从而达到治疗肿瘤的目的。目前用于肿瘤治疗的去甲基化剂主要是甲基转移酶抑制剂,包括5-氮杂胞苷及其衍生物5-Aza-CdR。Shibata等<sup>[8]</sup>研究表明,食管癌与CHFR的表达有一定相关性,CHFR CpG岛异常甲基化是CHFR mRNA表达下降的机制。Soutto等<sup>[12]</sup>研究表明,CHFR与食管腺癌密切相关。因此,去甲基化剂

可作为食管癌治疗的新靶点。

本实验发现 Eca109 细胞中,CHFR CpG 岛处于高甲基化状态,无CHFR mRNA表达;而经不同浓度5-Aza-CdR处理后,Eca109 细胞CHFR CpG 岛发生部分去甲基化,出现CHFR mRNA表达,并且在一定范围内随浓度的增高其表达也增加,说明5-Aza-CdR能使CHFR CpG 岛发生去甲基化,CHFR CpG 岛的去甲基化可以促进CHFR mRNA的表达。进一步论证了CHFR基因启动子的高甲基化状态是基因失活的主要机制。从理论上讲,5-Aza-CdR可通过CHFR抑制食管癌 Eca109 细胞的生长,诱导凋亡。本实验证明,不同浓度5-Aza-CdR处理能够抑制 Eca109 细胞的增殖,并促进细胞的凋亡。表明CHFR CpG 岛的去甲基化,即CHFR的表达可以抑制细胞增殖并促进凋亡。本实验在体外细胞学水平证实了CHFR基因与食管癌的相关性,两者在体内的相关关系有待于进一步证实。

近年来,表观遗传学调控方式DNA甲基化及CHFR基因的作用机制成为国内外研究的热点。研究表明,DNA的高甲基化异常状态可以增加某些恶性肿瘤细胞对烷化剂等化疗药物的抵抗性,降低化疗疗效<sup>[13]</sup>。甲基化酶抑制剂对复发性、顽固性急性白血病和慢性髓性白血病危象具有显著的疗效<sup>[14-16]</sup>,然而在抗肿瘤治疗的临床试验中,都显示了与其他抗肿瘤药类似的毒性反应。近期研究表明CHFR可能与USP7<sup>[17]</sup>、NF-κB<sup>[18]</sup>、IL-8<sup>[19]</sup>、HLTF<sup>[20]</sup>等发生相互作用,在细胞周期进程及抑制肿瘤生成方面发挥着重要作用。在阐释DNA甲基化、CHFR基因表达的调控机制,明确其下游靶点等方面的研究取得的进步,为肿瘤的早期诊断、有效治疗及评估预后提供了新的思路。但是由于检测技术要求较高、去甲基化试剂毒性作用较大等原因,将以CHFR作为靶点的去甲基化剂应用于肿瘤的防治有待进一步研究。

### [参考文献]

[1] Kang HC, Kim IJ, Jang SG, et al. Coding region polymorphisms in the CHFR mitotic stress checkpoint gene are associated with colorectal cancer risk [J]. Cancer Lett, 2008, 260(1/2): 170-179.

[2] Hibi K, Nakao A. Highly-methylated colorectal cancers show poorly-differentiated phenotype [J]. Anticancer Res, 2006, 26(6B): 4263-4266.

[3] Daniels MJ, Marson A, Venkitaraman AR. PML bodies control the nuclear dynamics and function of the CHFR mitotic checkpoint protein [J]. Nat Struct Mol Biol, 2004, 11(11): 1114-1121.

[4] Gao YJ, Xin Y, Zhang JJ, et al. Mechanism and pathobiologic

- implications of CHFR promoter methylation in gastric carcinoma [ J ]. *World J Gastroenterol*, 2008, 14( 32 ): 5000-5007.
- [ 5 ] Koga Y, Kitajima Y, Miyoshi A, et al. The significance of aberrant CHFR methylation for clinical response to microtubule inhibitors in gastric cancer [ J ]. *J Gastroenterol*, 2006, 41( 2 ): 133-139.
- [ 6 ] Privette LM, González ME, Ding L, et al. Altered expression of the early mitotic checkpoint protein, CHFR, in breast cancers: implications for tumor suppression [ J ]. *Cancer Res*, 2007, 67( 13 ): 6064-6074.
- [ 7 ] Daly JM, Fry WA, Little AG, et al. Esophageal cancer: Results of an American College of Surgeons patient care evaluation study [ J ]. *J Am Coll Surg*, 2000, 190( 5 ): 562-573.
- [ 8 ] Shibata Y, Haruki N, Kuwabara Y, et al. Chfr expression is downregulated by CpG island hypermethylation in esophageal cancer [ J ]. *Carcinogenesis*, 2002, 23( 10 ): 1695-1700.
- [ 9 ] Ehrlich M. DNA methylation in cancer: Too much, but also too little [ J ]. *Oncogene*, 2002, 21( 35 ): 5400-5413.
- [ 10 ] Chan SL, Cui Y, van Hasselt A, et al. The tumor suppressor Wnt inhibitory factor 1 is frequently methylated in nasopharyngeal and esophageal carcinomas [ J ]. *Lab Invest*, 2007, 87( 7 ): 644-650.
- [ 11 ] Pali SS, Robertson KD. Epigenetic control of tumor suppression [ J ]. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 2007, 17( 4 ): 295-316.
- [ 12 ] Robert MF, Morin S, Beaulieu N, et al. DNMT1 is required to maintain CpG methylation and aberrant gene silencing in human cancer cells [ J ]. *Nat Genet*, 2003, 33( 1 ): 61-65.
- [ 13 ] Christman JK. 5-Azacytidine and 5-Aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: Mechanistic studies and their implications for cancer therapy [ J ]. *Oncogene*, 2002, 21( 35 ): 5483-5495.
- [ 14 ] Ku JL, Kang SB, Shin YK, et al. Promoter hypermethylation downregulates RUNX3 gene expression in colorectal cancer cell lines [ J ]. *Oncogene*, 2004, 23( 40 ): 6736-6742.
- [ 15 ] Hennessy BT, Garcia-Manero G, Kantarjian HM, et al. DNA methylation in haematological malignancies: The role of decitabine [ J ]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2003, 12( 12 ): 1985-1993.
- [ 16 ] Soutto M, Peng D, Razvi M, et al. Epigenetic and genetic silencing of CHFR in esophageal adenocarcinomas [ J ]. *Cancer*, 2010, 116( 17 ): 4033-4042.
- [ 17 ] Oh YM, Yoo SJ, Seol JH. Deubiquitination of Chfr, a checkpoint protein, by USP7/HAUSP regulates its stability and activity [ J ]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 357( 3 ): 615-619.
- [ 18 ] Tomita M, Toyota Mi, Ishikawa C, et al. Overexpression of Aurora A by loss of CHFR gene expression increases the growth and survival of HTLV-1-infected T cells through enhanced NF- $\kappa$ B activity [ J ]. *Int J Cancer*, 2009, 124( 11 ): 2607-2615.
- [ 19 ] Kashima L, Toyota M, Mita H, et al. CHFR, a potential tumor suppressor, downregulates interleukin-8 through the inhibition of NF-kappaB [ J ]. *Oncogene*, 2009, 28( 29 ): 2643-2653.
- [ 20 ] Kim JM, Cho EN, Kwon YE, et al. CHFR functions as a ubiquitin ligase for HLTF to regulate its stability and functions [ J ]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 395( 4 ): 515-520.
- [ 收稿日期 ] 2010 - 11 - 20 [ 修回日期 ] 2011 - 01 - 30
- [ 本文编辑 ] 韩 丹

· 科技动态 ·

## 长的基因内非编码 RNA 充当组蛋白修饰复合体的模式脚手架

长的基因内非编码 RNA (lincRNAs) 能通过染色体修饰的模式来调控剂量补偿作用、印记和发育基因表达, 但是该功能的分子机制还并不清楚。lincRNA HOTAIR 是由 HOXC 基因座转录的, 并且靶向于抑制性复合体 2 (polycomb repressive complex 2, PRC2; 包含 EZH2、SUZ12 和 EED) 来沉默 HOXD 基因座的转录, 同时 HOXD 基因座的侧翼基因组区域能结合另外一个 CoREST/REST (包含 LSD1) 抑制性复合体。研究表明, 包皮成纤维细胞中 HOTAIR 的 5' 端结构域能与 PRC2 复合体结合, 3' 端结构域能与 LSD1/CoREST/REST 复合体结合。通过 HOTAIR 的敲除和过表达实验表明, HOTAIR 对 EZH2 和 LSD1 的相互作用是必须的。通过 ChIP-Chip 实验对 HOX 基因座和人的全基因组启动子区的 PRC2 和 LSD1 的占据情况进行分析, 发现 HOTAIR 敲除后 HOXD 基因座的转录明显上调, 并且伴随 H3K4me2 的占据上调和 H3K27me3、LSD1 和 SUZ12 的占据下调, 全基因组的启动子中发现有 721 个启动子同时结合 LSD1 和 SUZ12。通过信息学分析, 发现 HOTAIR 能介导 LSD1 复合体结合到 CpG 岛上, 而 SUZ12 复合体能结合到标准的 REST 基序上, 当 HOTAIR 同时结合该两个复合体时, 能介导特异性的靶向富含 GC 的基因位点上: CCAGC。综上所述, HOTAIR 能同时结合 PRC2 和 LSD1 两个复合体, 并且介导该两复合物到特异性的基因组位点, 使该处染色体上的 H3K27 发生三甲基化和 H3K4 去甲基化, 从而使染色体处于封闭状态而使其基因沉默。

[ 郑青亮 摘译, 刘秋燕 审阅. Tsai MC, Manor O, Wan Y, et al. *Science*, 2010, 329( 5992 ): 689-693. ]