



Trichostatin A 在体内对鸡胚翅芽发生中 基因表达模式的作用

赵望泓^{①③} 戴方平^② Beate Brand-Saberi^② 王建林^{③*}

(① 兰州大学口腔医学院, 兰州 730000; ② Institute of Anatomy and Cell Biology, Department of Molecular Embryology, University of Freiburg, Freiburg 79104, Germany; ③ 兰州大学生命科学学院, 兰州 730000)

摘要 表观遗传和染色质重塑参与了胚胎形成及肿瘤发生, 乙酰化作用是调控基因转录的关键修饰之一, 组蛋白去乙酰基酶抑制剂被视为肿瘤治疗中最有前景的药物开发目标. 然而哪些基因在体内对乙酰化作用修饰更敏感? 这些基本问题仍未完全知晓. 以鸡胚翅芽作为实验模型, 用 HDAC 抑制剂 trichostatin A (TSA) 处理翅芽, 研究翅芽发生中一系列基因对 TSA 的反应. 结果显示, TSA (75 $\mu\text{mol/L}$) 能够改变某些对翅芽发育具有重要功能的基因的表达水平, 其中 *SF/HGF* 和 *Twist1* 基因的表达被上调; *FGF8*, *Shh*, *TCF4*, *Myf5* 及 *MyoD* 基因的表达被下调; 与此不同, *Pax3*, *Paraxis*, *CREB* 和 *PCNA* 基因的表达水平不受 TSA 作用的影响. 结果提示, 发育的鸡胚翅芽能够作为一个便利的、供体内研究 HDACs 抑制剂对基因表达作用的模型, 有助于提高对染色质重塑和表观遗传对基因表达的调控作用, 以及对正在开发的抗癌药物的认识.

关键词 去乙酰化酶抑制剂 基因表达 翅芽发育 Trichostatin A 鸡胚

染色质结构在调控编码于 DNA 的基因组信号的表达中发挥重要作用, 转录后修饰在基因调控中的重要性被越来越多的证据所证实. 抑癌基因失活、沉默的出现常常是肿瘤发生的重要步骤之一. 染色质结构重塑酶能够以高靶向性调节方式改变染色质的结构^[1]. 组蛋白乙酰化转移酶(histone acetyltransferases, HATs)和组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylases, HDACs)调控组蛋白的乙酰化, 组蛋白乙酰化和去乙酰化对真核细胞转录的调控具有显著作用^[2]. 我们对 HDACs 及 HDAC 抑制剂(HDAC inhibitors)在肿瘤发生中作用的认识日益深刻, HDAC 抑制剂被认为是最具前景的肿瘤治疗药物, 并且第 1 代 HDAC 抑制剂目前正处于 I / II 期临床试验阶段. 然而, 一些基本问题还未完全明了, 关于 HDAC 抑制剂在体内和体外的作用研究, 将

进一步有助于最佳临床治疗方案的设计.

发育中的鸟类胚胎肢芽可以作为一个良好的体内检测药物作用及副作用的动物模型. 2004 年, Tickle^[3]首次在鸡胚肢芽的极化区域模拟信号传输, 研究化学制剂, 将信号源定位于鸡胚翅芽前端, 形成了超数附指, 这提供了一个极好的对极化区域进行活性检测的例证, 并由此发现视黄酸、维生素 A 衍生物具有极化活性. 发育中的肢芽常被用于脊椎动物胚胎发生和基因表达调控机制的研究, 这不仅因为在体内, 肢芽便于操作, 也是由于鸡胚一系列基因组, 连同其他最近获得的新基因, 为深入探索基因和基因功能提供了新机遇. 适用于鸡胚肢芽发育的原则也适用于其他脊椎动物, 并且可延伸应用于临床遗传学及药物检验^[4].

胚胎附肢发生时,附肢域沿着动物身体的头尾轴,出现于适当的时间和位置,不久,肢芽便从仅覆盖着外胚层的间充质细胞群从外侧方向外突出、生长^[5].有几个信号中心协调肢芽向外生长及形成,发育的肢芽的特殊区域,如极化活动区(ZPA)、顶外胚层嵴(AER)以及无嵴外胚层,指导和协调肢芽沿前-后轴、背-腹轴及近-远轴逐渐发育为肌肉、腱和骨等组织^[6].具备独特功能的不同基因具有各自的表达模式,一些与肢芽发育相关的基因,包括它们的表达方式和功能已被揭示.其中一些基因限制性表达在肢芽的不同部位,如*Shh*表达于ZPA, *FGF8*表达于AER, *TCF4*表达在中央间充质, *Pax3*, *Paraxis*, *Myf5*和*MyoD*表达在肌肉前体细胞或肌肉细胞中, *SF/HGF*在肢芽最初形成时非限制性表达,以后逐渐局限于前远端区域间质细胞.其他基因,如*Twist1*, *CREB1*, *PCNA*几乎都非限制性地表达于发育中的肢芽中.

Trichostatin A (TSA)是HDAC抑制剂中的一种.近年来的研究结果表明, TSA能抑制癌细胞的增殖,调控细胞周期进程,诱导肿瘤细胞凋亡及分化^[7].在多细胞真核生物,用TSA拮抗组蛋白去乙酰化,能使沉默基因去阻遏^[8].在人类克隆癌细胞中, TSA增强组蛋白乙酰化(IC50 value of approximately 0.1~0.3 $\mu\text{mol/L}$),并诱导细胞凋亡^[9]. COX-1 启动子突变分析提示, TSA的反应部位在邻近Sp1 结合位点^[10]. TSA也导致胚胎组蛋白过度乙酰化^[11]. HATs促进而HDACs抑制骨骼肌基因表达, HDAC抑制剂具有调节骨骼肌生成的作用. HDAC仅在未分化的肌母细胞中对肌调节蛋白MyoD和MEF2C发挥作用^[12].然而,在体内器官发生中, HDAC抑制剂对与胚胎发育相关的其他基因,如*FGF8*, *Shh*, *SF/HGF*等是否产生影响?这些问题尚未见报道.为了探讨鸟类肢芽发育能否作为一个优良的、有效的体内检测如HDAC抑制剂这类药物的作用和副作用的动物模型,我们研究了HDAC抑制剂-TSA在这个体系中对基因表达的作用,以期认识染色质重塑和表观遗传对基因表达的调控作用,并对正在开发的抗癌药物的认识提供新的依据.

1 材料与方法

1.1 胚胎

受精鸡蛋(White Leghorn)来自当地饲养场,在

38℃和80%相对湿度的孵化箱内孵化3天以上,胚胎达HH16~20期.胚胎发育时期的判断依据Hamburger等人^[13]的分期标准.

1.2 TSA 及 TSA 念珠制备

Trichostatin A (TSA)是具有抗真菌特性的链霉菌发酵产物,是一种体内外可逆性的HDAC抑制剂.本实验所用 Trichostatin A(Sigma, USA)纯度>99%,溶解于二甲基亚砜(DMSO),分装备用.

丙烯酸胺念珠(Sigma, Germany)直径大约为80 μm 左右.由德国弗赖堡大学药物研究所 Manfred Jung 教授所在研究组检测该念珠吸收及释放 TSA 的能力,证实其能够吸收 TSA,吸收 TSA 的量为剂量依赖性,同时验证了 TSA 念珠在磷酸盐缓冲液(PBS)中能够稳定释放 TSA.

念珠经 PBS 缓冲处理,将实验组使用的念珠浸入 TSA 药液(75 $\mu\text{mol/L}$)中,同时将对照组使用的念珠浸入 PBS 缓冲液中,均于4℃下放置一夜,待用.

1.3 胚胎显微外科手术

将孵化至HH16~20期鸡胚的鸡蛋开窗,在显微镜下,用显微操作针撕裂卵黄膜和羊膜,暴露手术视野.

使用钨针在鸡胚右侧翅芽合适部位,通过外胚层向背侧间充质做一小切口,用钝头钨针将念珠由切口推至理想部位.手术切口的位置依据要检测的基因在翅芽表达的相应部位而定,如检测 *MyoD*, *Myf5*, *Pax3*, *Paraxis*, *CREB*, *PCNA*和*TCF4*基因表达胚胎,切口位于翅芽中央部位;检测 *FGF8*和*Twist1*基因表达的胚胎,切口靠近翅芽远端边缘;*Shh*则在翅芽后部ZPA区域;*SF/HGF*在翅芽前远端部位.

对于实验组胚胎,右侧翅芽分别植入 TSA 念珠.对照组胚胎(与实验组胚胎为相同发育时期),在其右侧翅芽,与实验组胚胎植入 TSA 念珠的相同部位,植入 PBS 念珠,植入方法与实验组相同.

术后,用医用胶布封闭蛋壳窗口,将其重新放入孵化箱内,根据需要再次孵化8~24 h后,检查鸡胚,将其处死,固定于4%多聚甲醛固定液中,于4℃条件下固定一夜.固定后的胚胎经系列甲醇梯度脱水,存放于-20℃条件下以备原位杂交.

1.4 胚胎原位杂交

依据Nieto等人^[14]描述的方法实施原位杂交实验.

收集实验胚胎,使用地高辛RNA标记试剂盒(Boehringer, Mannheim, Germany)标记检测基因的核糖核酸探针.杂交的RNA探针依据下列质粒模板预备,质粒分别含下列基因片段: *MyoD*, *Myf5*, *FGF8*, *Shh*, *TCF4*, *Twist1*, *SF/HGF*, *Pax3*, *Paraxis*, *PCNA*和*CREB1*.使用抗地高辛抗体处理胚胎,用NBT-BCIP显色.

1.5 组织切片

选择部分原位杂交染色后的胚胎,胚胎经 PBS 溶液冲洗后包埋于 3%琼脂内,使用莱卡振动切片机(Leica vibratome)制作切片,切片厚度为 60~80 μm ,振幅 6~7 档,速度为 3~4 档,观察切片并照像.

2 结果与分析

2.1 TSA 抑制与分化相关的转录因子基因 *MyoD*, *Myf5* 和 *TCF4* 在胚胎翅芽的表达

bHLH 转录因子 *MyoD*, *Myf5*, *Paraxis* 和同源盒蛋白 *Pax3* 均以其特殊的表达方式表达于发育的肢芽中. *MyoD* 和 *Myf5* 表达于成肌细胞,在体节和肢芽里

是肌肉细胞决定和分化所必需的.然而,在鸡胚肢芽发育时期,检测出 *Myf5* 的转录(自 HH20 期被检测到)要早于 *MyoD*(自 HH22 期被检测到)的转录, *MyoD* 基因在翅芽里的表达范围比 *Myf5* 的表达更加局限.我们观察到,在念珠所在的翅芽背侧区域, 75 $\mu\text{mol/L}$ TSA 能够强烈地抑制 *MyoD* 基因的表达(图 1(a), (c) 和(e)),对 *Myf5* 基因的表达也显示出抑制作用,但抑制的程度不如对 *MyoD* 基因抑制的强烈(图 2(b)和(c)).对照组胚胎,右侧翅芽内植入的 PBS 念珠,对翅芽 *MyoD* 和 *Myf5* 基因的表达无影响(图 1(f), (h), (j)); 图 2(e)和(g)).碱性螺旋-转角-螺旋转录因子 *TCF4* 编码的转录因子 4 也与肌肉的发育有关, *TCF4* 最早于 HH19~20 期表达于翅芽间充质,而且 75 $\mu\text{mol/L}$ TSA 对它的表达也起下调作用(图 3).

2.2 与肌肉祖细胞相关的转录因子基因的表达或非限制性表达基因的表达对 TSA 不敏感

Pax3 是 PAX 基因家族中的一员,是胚胎发育中神经前体细胞移行、增殖、分化及神经胚层发育的重

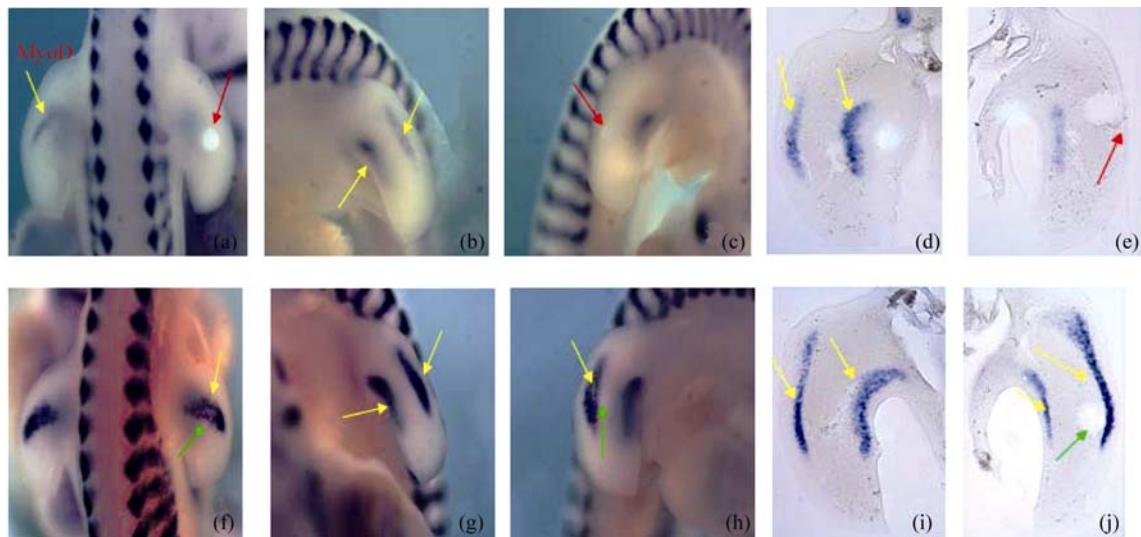


图1 右侧翅芽植入念珠后 *MyoD* 探针的原位杂交胚胎(HH24 期)及切片

(a)~(e)为翅芽植入 TSA 念珠的实验组胚胎及切片, (f)~(j)为翅芽植入 PBS 念珠的对照组胚胎及切片. 黄色箭头示翅芽 *MyoD* 基因表达, 绿色箭头示 PBS 念珠, 红色箭头示 TSA 念珠. (a) 胚胎背侧观, 黄色箭头示左侧翅芽 *MyoD* 基因正常表达, 红色箭头示右侧翅芽 TSA 念珠周围缺乏 *MyoD* 基因表达. (b) 头侧观无念珠的左侧翅芽, *MyoD* 基因正常表达于翅芽腹、背侧(黄色箭头). (c) 头侧观右侧翅芽, 红色箭头示 TSA 念珠抑制翅芽背侧 *MyoD* 基因表达. (d) (a)中胚胎未植入念珠的左侧翅芽横切片, 箭头指示 *MyoD* 基因正常表达于翅芽背侧和腹侧. (e) 植入 TSA 念珠的右侧翅芽横切片, 红色箭头指示 TSA 念珠周围, 翅芽背侧区域 *MyoD* 基因表达缺失. (f) 右侧翅芽植入 PBS 念珠的胚胎背侧观, 绿色箭头示 PBS 念珠位于翅芽内, 黄色箭头示 PBS 念珠不影响 *MyoD* 基因表达, 双侧翅芽 *MyoD* 基因表达无差别. (g) 头侧观无念珠的左侧翅芽, *MyoD* 基因正常表达于翅芽腹、背侧(黄色箭头). (h) 头侧观右侧翅芽, 绿色箭头示 PBS 念珠周围, *MyoD* 基因正常表达于翅芽背侧和腹侧. (j) 植入 PBS 念珠的右侧翅芽横切片. 与对侧翅芽切片(i) *MyoD* 基因正常表达相比, 绿色箭头指示 PBS 念珠不影响翅芽 *MyoD* 基因表达((a)~(c), (f)~(h)×4, (d), (e), (i), (j)×5)

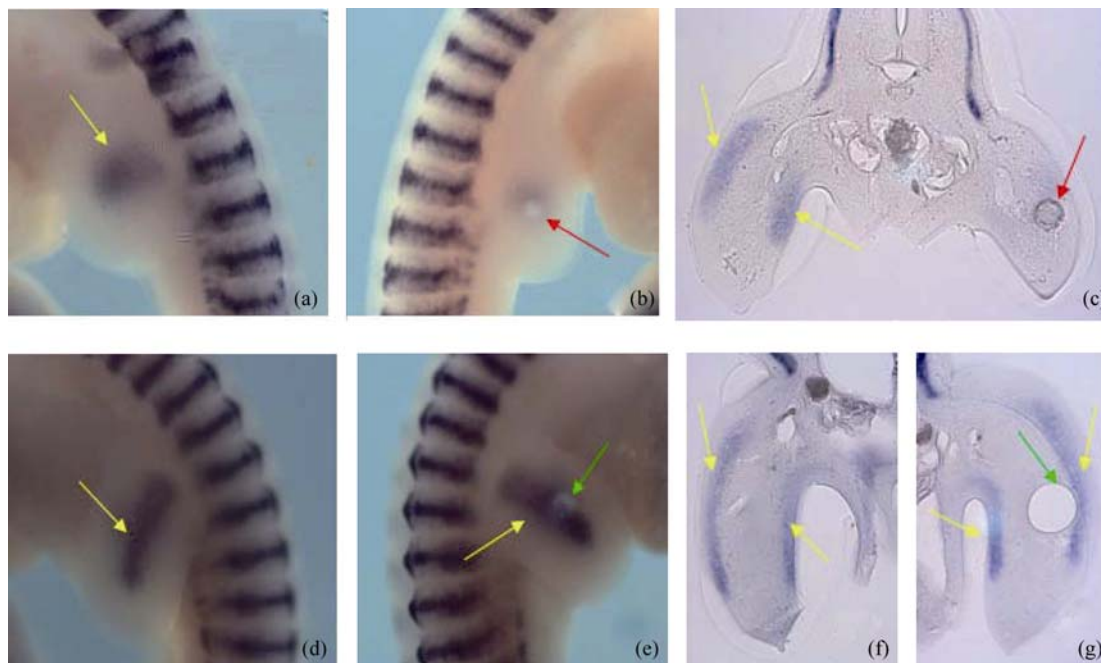


图 2 右侧翅芽植入念珠后 *Myf5* 探针的原位杂交胚胎(HH24 期)及切片

(a)~(c)为翅芽植入 TSA 念珠的实验组胚胎及切片, (d)~(g)为翅芽植入 PBS 念珠的对照组胚胎及切片. (a) 黄色箭头示无念珠的左侧(对侧)翅芽 *Myf5* 正常表达. (b) 红色箭头示右侧翅芽植入的 TSA 念珠区域, *Myf5* 基因的表达被下调. (c) 翅芽横切片, 黄色箭头示 *Myf5* 基因正常表达于左侧翅芽背、腹侧区域, 红色箭头示右侧翅芽 TSA 念珠下调 *Myf5* 基因表达. (d) 无念珠的对侧(左侧)翅芽 *Myf5* 基因正常表达. (e) 绿色箭头示 PBS 念珠对右侧翅芽 *Myf5* 基因表达无影响. (g) 植入 PBS 念珠的右侧翅芽横切片. 与对侧翅芽切片(f) *Myf5* 基因正常表达相比, 绿色箭头示 PBS 念珠不影响翅芽 *Myf5* 基因表达((a), (b), (d), (e) × 4, (c), (f), (g) × 5)

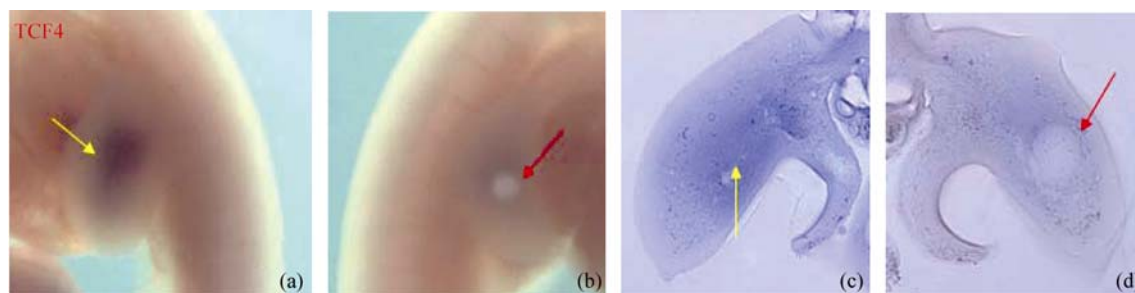


图 3 右侧翅芽植入 TSA 念珠后 *TCF4* 探针的原位杂交胚胎(HH24 期)及切片

(a) 箭头示胚胎无念珠的左侧翅芽上 *TCF4* 正常表达. (b) 红色箭头示右侧翅芽 TSA 念珠下调 *TCF4* 基因表达. (c) 左侧翅芽横切片, 黄色箭头示 *TCF4* 基因正常表达于翅芽. (d) 与对侧(c) 翅芽相比, TSA 念珠对翅芽 *TCF4* 基因表达具有下调作用. PBS 念珠对翅芽 *TCF4* 基因表达无作用, 图略((a)和(b) × 4, (c)和(d) × 5)

要调控因子, 它也参与中胚层形成早期转录调控. *Pax3* 表达于鸡胚翅芽间充质的腹侧和背侧. *Paraxis* 与 *Pax3* 基因具有几乎相似的表达模式, 但在翅芽的表达区域比 *Pax3* 更大, *Pax3* 和 *Paraxis* 基因在翅芽里的表达都早于 *Myf5* 和 *MyoD*. 用 75 $\mu\text{mol/L}$ TSA 处理胚胎翅芽后, *MyoD* 和 *Myf5* 基因的表达被下调, 与此形成对照, 用同样的方式处理胚胎, TSA 对 *Pax3* 和

Paraxis 基因的表达无影响(图 4(b), (d), (f), (h)). 进一步, 我们检测了 *PCNA*, *CREB1* 及 *Twist1* 基因对 TSA 处理的敏感性. *PCNA* 是 DNA 复制标志基因, 在肢芽发育时期广泛表达. *CREB1* 是亮氨酸拉链家族转录因子成员, 非限制性表达于鸡胚肢芽. *PCNA*, *CREB1* 基因在翅芽的表达对 TSA 药物处理均不敏感(图 4(j), (l), (n)和(p)).

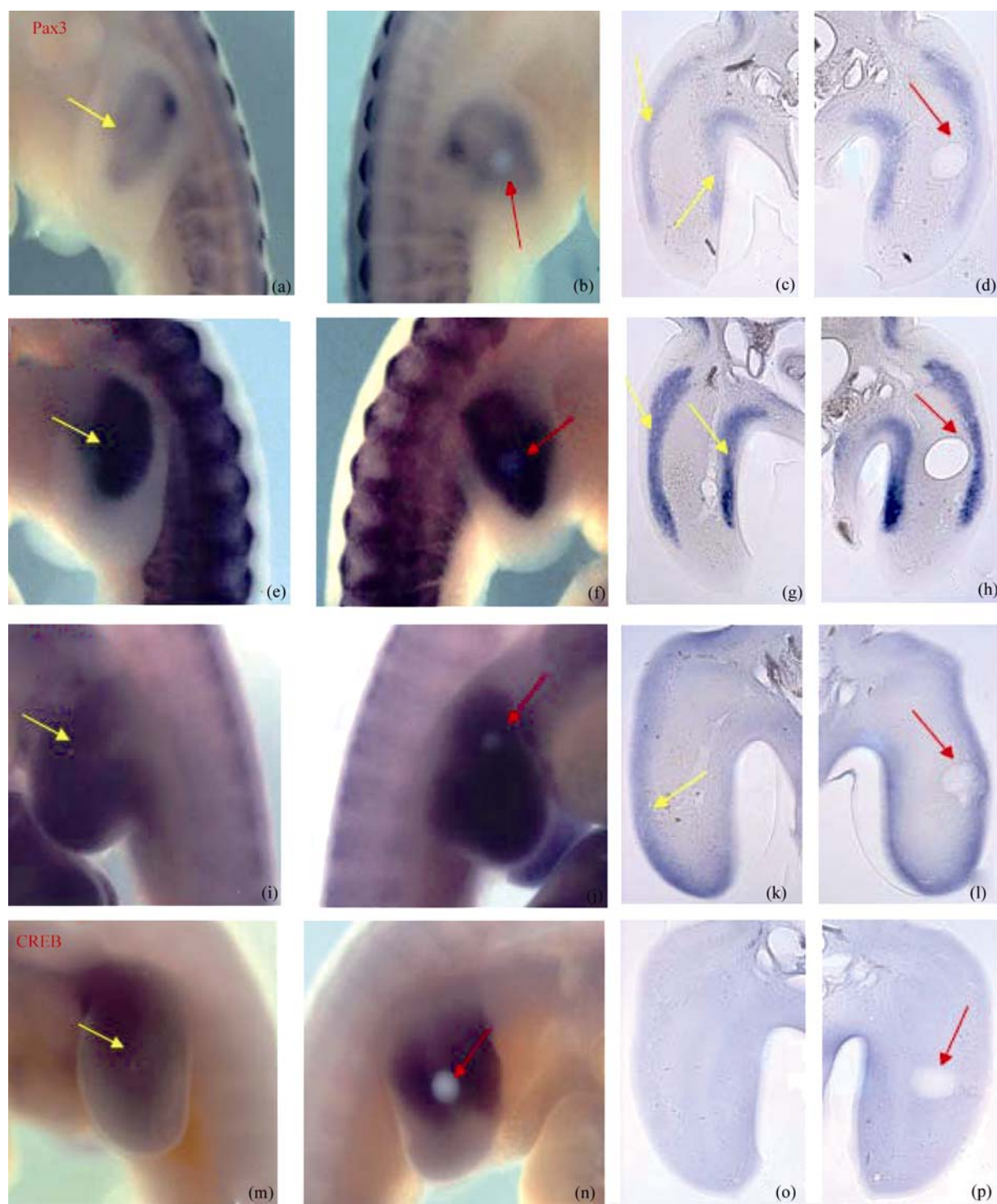


图 4 右侧翅芽植入 TSA 念珠后分别使用 *Pax3* (a)~(d), *Paraxis*(e)~(h), *PCNA*(i)~(l)和 *CREB*(m)~(p)探针的原位杂交胚胎 (HH24 期)及切片

黄色箭头示各基因表达, 红色箭头示 TSA 念珠. (a), (e), (i)和(m). 分别为胚胎 *Pax3*, *Paraxis*, *PCNA*, *CREB* 在未植入念珠的左侧翅芽正常表达. (b), (f), (j)和(n)红色箭头示右侧翅芽植入 TSA 念珠后, 各相关基因的表达不受影响. (d), (h), (l)和(p)与对侧(左侧)翅芽((c), (g), (k)和(o))比较, TSA 念珠对各相关基因表达无作用((a), (b), (e), (f), (i), (j), (m)和(n)×4, (c), (d), (g), (h), (k), (l), (o)和(p)×5)

2.3 TSA 抑制 *FGF8* 和 *Shh* 基因在翅芽的表达, 但 TSA 上调翅芽 *Twist1* 和 *SF/HGF* 基因的表达

分泌的信号蛋白对肢芽的发育和形成具有重要作用. 其中, *FGF8* 表达在鸡胚翅芽整个 AER 区域, 它的时空表达方式提示其在翅芽向外生长中发挥作用. 在移植了 75 $\mu\text{mol/L}$ TSA 念珠的翅芽, *FGF8* 基因的表达明显被抑制(图 5(a)); *Shh* 基因限制性地表达在翅芽后部边缘区域, 它的表达也被 75 $\mu\text{mol/L}$ TSA 强烈抑制(图 5(c)); 对照组胚胎翅芽中的 PBS 念珠不影响翅芽 *FGF8* 和 *Shh* 基因的表达(图 5(b)和(d)). 在刚形成的翅芽里, *SF/HGF* 的表达几乎遍及翅芽间充质, 随着翅芽向外生长和组织特化, *SF/HGF* 的表达逐渐局限于翅芽前远端间充质, 在 HH23~24 期, 它的表达接近翅芽前远端及前远端顶部. 我们惊讶地发现, 75 $\mu\text{mol/L}$ TSA 明显上调 *SF/HGF* 的表达(图 6(a)和(c)); 在翅芽中非限制性表达的 *Twist1*, 用 75

$\mu\text{mol/L}$ TSA 药物处理后, 能够上调翅芽间充质 *Twist1* 的表达(图 7).

2.4 在鸡胚翅芽, 检测基因对 TSA(75 $\mu\text{mol/L}$)的敏感性随基因的时空表达而不同

在鸡胚肢芽发育时期, *CREB1* 和 *Twist1* 非限制性表达; *PCNA* 表达于增殖细胞中. 在翅芽开始形成的 HH17 期, *SF/HGF* 非限制性表达, 在刚形成的翅芽里能检测到 *Pax3* 及 *Paraxis* 基因表达于未分化细胞. *FGF8* 特异性表达于 AER, 自 HH17~18 期开始, *Shh* 仅特异性表达于 ZPA. 与肌肉分化相关的基因 *Myf5*, *MyoD* 在大约 HH20~22 期表达增强. *TCF4* 与肌肉发育相关, 在 HH19~20 期表达于翅芽中胚层. 使用药物 TSA(75 $\mu\text{mol/L}$)处理鸡胚翅芽后, *SF/HGF* 及 *Twist1* 两个基因被上调; *FGF8*, *Shh*, *MyoD*, *Myf5* 及 *TCF4* 等 5 个基因被下调, 而其他检测基因 *PCNA*, *CREB*, *Pax3* 和 *Paraxis* 对 75 $\mu\text{mol/L}$ TSA 不敏感(表 1).

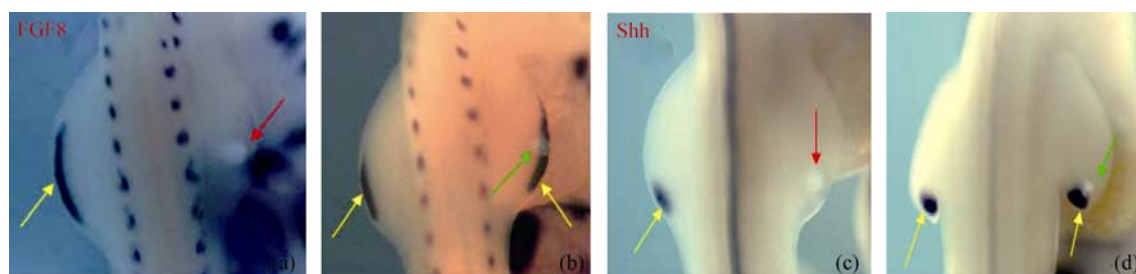


图 5 右侧翅芽植入念珠后, 分别使用 *FGF8*((a)和(b)), *Shh*((c)和(d))探针实施原位杂交的胚胎(HH20 期) 黄色箭头示基因表达, 绿色箭头示 PBS 念珠, 红色箭头示 TSA 念珠. (a) 黄色箭头示无念珠的左侧翅芽 *FGF8* 基因正常表达于 AER, 红色箭头示 TSA 念珠抑制右侧翅芽远端边缘 *FGF8* 基因表达. (b) 绿色箭头示 PBS 念珠对右侧翅芽 *FGF8* 基因表达无作用. (c) 红色箭头示 TSA 念珠完全抑制右侧翅芽后部 *Shh* 基因表达. (d) 绿色箭头示 PBS 念珠对右侧翅芽后端 *Shh* 基因表达无影响((a)~(d)×4)

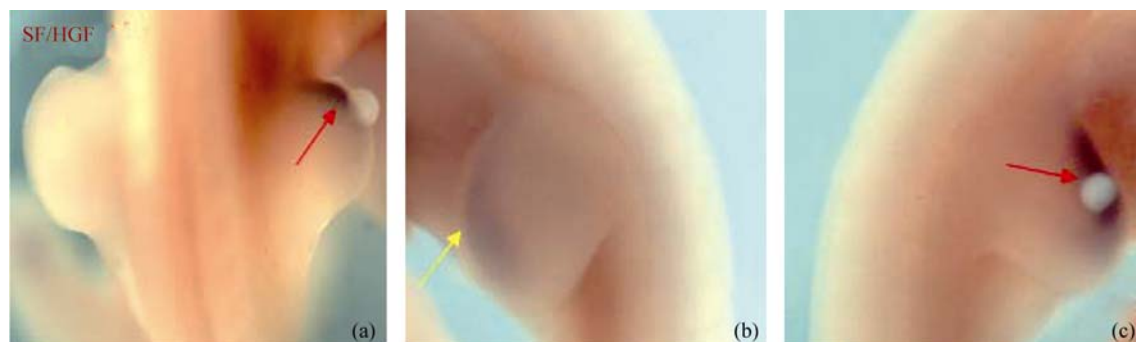


图 6 右侧翅芽植入 TSA 念珠后, 使用 *SF/HGF* 探针的原位杂交胚胎(HH23 期) (a) 胚胎背侧观, 注意红色箭头指示 TSA 念珠对右侧翅芽 *SF/HGF* 基因表达起上调作用. (b), (a)中胚胎左侧翅芽侧面观, 黄色箭头示未植入念珠的翅芽 *SF/HGF* 正常表达于翅芽前远端. (c), (a)中胚胎右侧翅芽侧面观, 箭头示 TSA 念珠明显上调翅芽 *SF/HGF* 基因表达, 对照组 PBS 念珠对翅芽 *SF/HGF* 基因表达无作用, 图((a)~(c), ×4)

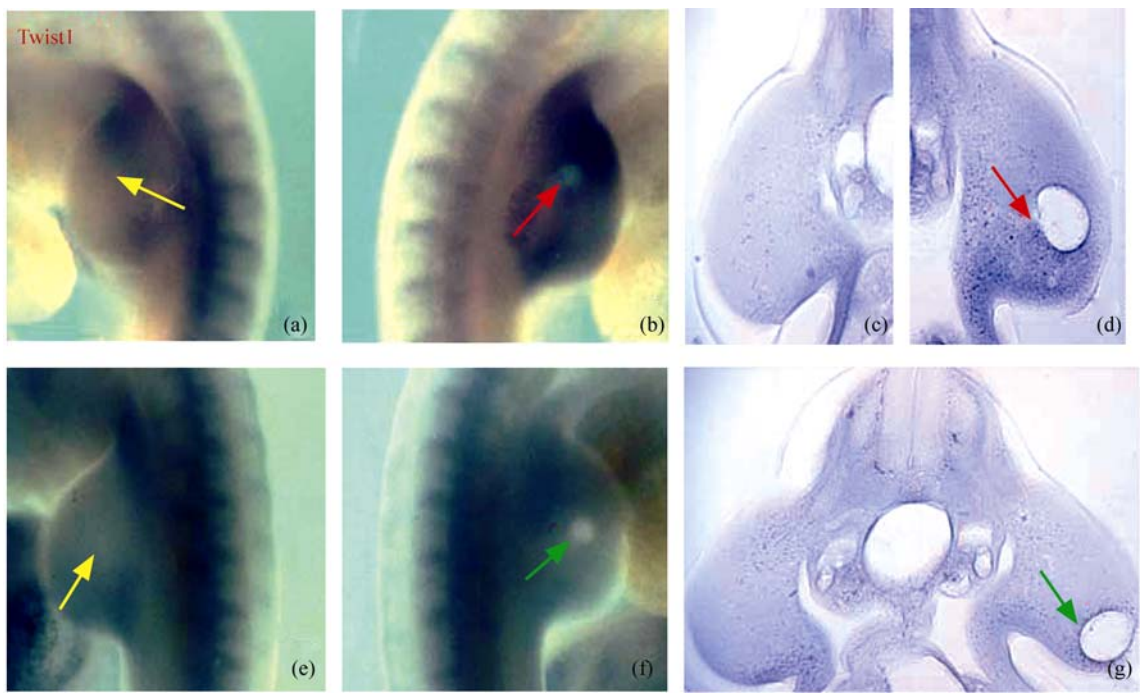


图 7 右侧翅芽植入念珠后, 使用 *Twist1* 探针的原位杂交胚胎(HH21 期)及切片
(a)~(d)为翅芽植入 TSA 念珠的实验组胚胎及切片, (e)~(g)为翅芽植入 PBS 念珠的对照组胚胎及切片. (a), (b)中同一胚胎未植入念珠的左侧翅芽 *Twist1* 正常表达. (b) 箭头示 TSA(75 $\mu\text{mol/L}$)念珠上调右侧翅芽 *Twist1* 基因表达. (d) 切片中红色箭头示 TSA 念珠周围, *Twist1* 基因表达与对侧(左侧)翅芽(c)比较被上调. (f) 绿色箭头示, 右侧翅芽内 PBS 念珠周围 *Twist1* 基因表达与对侧(左侧)翅芽(e)比较无差异. (g) 翅芽横切片, 绿色箭头示 PBS 念珠对 *Twist1* 基因表达无作用. ((a), (b), (e), (f) $\times 4$, (c), (d), (g) $\times 5$)

表 1 被检基因在鸡胚翅芽发育中的表达

基因 ID	基因	蛋白结构域	翅芽中的基因表达 ^{a)}			
			起始期	表达的部分(HH17~22 期)	TSA (75 $\mu\text{mol/L}$)	
1	395941	<i>SF/HGF</i>	PAN_APPLE, KRx4, Tryp_SPc	HH17 期	先是整个翅芽, 然后局限于翅芽前远端间充质	增强
2	395491	<i>Twist1</i>	bHLH	HH17 期	整个翅芽	增强
3	395099	<i>CREB</i>	pKID, bZIP	HH17 期	整个翅芽	无作用
4	373984	<i>PCNA</i>	PCNA_N, PCNA_C	HH17 期	几乎整个翅芽	无作用
5	374127	<i>Pax3</i>	PAX, Homeobox	HH17 期	背侧和腹侧	无作用
6	395788	<i>Paraxis</i>	HLH	HH17 期	背侧和腹侧	无作用
7	374004	<i>FGF8</i>	FGF	HH17 期	项外胚层嵴	抑制
8	395615	<i>Shh</i>	HH-signal, Hint_N, Hint_C	HH18 期	极化活性区	抑制
9	395508	<i>TCF4</i>	SOX-TCF, HMG-box	HH19 期	中央间充质	抑制
10	395633	<i>Myf5</i>	bHLH	HH20 期	背侧和腹侧	抑制
11	374048	<i>MyoD</i>	bHLH	HH22 期	背侧和腹侧	抑制

a) 鸡胚翅芽从 HH17 期开始发育

3 结论与讨论

具有不同表达模式的基因共同调节肢芽的发生, 在肢芽形成和发育时期, 许多基因参与细胞增殖、分

化、存活和凋亡的控制过程, 并进一步影响肢芽向外生长发育. PCNA是DNA复制机制中涉及DNA延伸、重组步骤的一个关键成分^[15]. 在肢芽发育时期, 当细

胞快速增殖时, *PCNA*广泛表达^[16]. 非限制性表达的基因最有可能参与细胞的生长和存活,但是要与其他基因相互作用才具有这一功能. *CREB1* 基因编码的转录因子非限制性表达于发育的肢芽,由于 *CREB1* 参与了肌发生决定基因 *Pax3*, *Myf5* 和 *MyoD*的诱导,因此是肌肉发育所必需的^[17]. *Twist1* 也是细胞存活、生长和分化所必需的,肢芽形成后, *Twist1* 基因功能缺失可短时间阻止肢芽生长. 在缺乏*Twist1* 表达的翅芽, *FGF8* 表达区域被改变,同时伴有*Shh*在极化活动区表达的中断、间充质内*Pax3* 活性丧失以及翅芽组织分化为生肌组织和成骨组织能力的降低^[18]. *SF/HGF*具有多重基因功能,是另一个对肢芽发生非常重要的基因,在成肌细胞迁移过程中, *SF/HGF*调控生肌前体细胞从体节分离的信号^[19]; *SF/HGF*对一些上皮器官的发育是必不可缺的, *SF/HGF*缺失的小鼠不能完成发育而死于母体子宫内^[20].

随着肢芽向外生长,肌肉的发育成为肢芽形态发生时期的重要事件. 肢芽内增殖的肌肉前体细胞最初表达*Pax3* 和*Paraxis*,随后开始*Myf5* 和*MyoD*的表达,并最终分化为肌纤维^[21]. *Myf5* 能够激活*MyoD*基因表达,如果使哺乳动物各类细胞株表达*Myf5* 或*MyoD*,就能诱导全部的生肌分化过程^[22]. 已经证实, *Shh*在肢芽发育时期能诱导或扩散肌特异基因^[23], *Myf5* 的表达通过*Shh*启动和激活^[24], *Shh*和*FGF8* 信号强有力地影响脊椎动物肢芽向外生长和肢芽发育模式,早期肢芽外胚层*FGF8* 失活,引起肢芽大小的实质性减小及延迟*Shh*表达^[25]. *Shh*在肢芽后部边缘局限性、极量化表达,释放影响肢芽前-后轴模式形成的物质,参与调控与AER间的信号通路,具有控制肢芽远端结构的功能^[26]. 体内*Shh*信号由沉默的microRNA分子miR-196 控制在理想的水平^[27]. *Shh*的保守顺式作用调节子序列缺失,导致肢芽*Shh*表达完全丧失和骨骼成分退化^[28]. 如果顶外胚层缺乏*FGF8*,可以改变*Shh*基因的表达.

表观遗传修饰是调节胚胎基因表达和早期发育所必需的,它对调控胚胎基因表达、细胞和特异组织的决定发挥作用,对其机制的认识至关重要^[29]. 组蛋白乙酰化作用或去乙酰化作用改变染色体结构,并且影响转录因子进入DNA. 组蛋白过度乙酰化作用

由转录因子通过HATs的募集成为激活基因启动子的靶点. 在肌肉形成过程中, *MyoD*能够募集HATs^[30], 组蛋白去乙酰化作用与转录抑制或转录调控具有功能性联系^[31]. 已经知道, TSA以*MyoD*的HLH域为靶点,通过某一未知的机制降低*MyoD*蛋白活性^[32]. 肌肉相关基因的表达由HATs和HDACs活性的相互拮抗和协调作用所控制, HDACs活性是早期爪蟾胚胎肌肉组织形成所必需的,它显著诱导*MyoD*依赖的肌细胞系, TSA选择性地阻断*MyoD*基因转录诱导,抑制肌分化^[33]. 本研究中, TSA抑制鸡胚翅芽*MyoD*基因的表达,这一结果与以往研究结果相一致. TSA不抑制爪蟾*Myf5* 表达^[33], 与我们的实验结果不同, TSA抑制鸡胚翅芽 *Myf5* 基因的表达. 虽然HDACs活性促使*MyoD*肌细胞系形成的机制目前尚不清楚,但我们的结果显示鸡胚*MyoD*和*Myf5* 基因与表观遗传信号的应答是类似的. HDAC抑制剂TSA不刺激细胞增殖^[34], 本实验结果支持这一论点. 本研究结果显示,不同的基因对TSA具有不同的敏感性, TSA对*Paraxis*和*Pax3* 的表达无作用. *Paraxis*和*Pax3* 在胚胎发生中,是前体细胞包括肌生成前体细胞,迁移至最终组织目的地所必需的,提示TSA对与肌肉祖细胞相关的转录因子基因的表达不敏感. 组蛋白乙酰化作用是细胞间期动态调控染色质的一个重要因子,在有丝分裂的染色体中,染色质不依赖于组蛋白乙酰化作用状态^[35]. 然而,我们的结果显示,细胞增殖标志基因*PCNA*和非限制性表达基因*CREB1* 对TSA均不敏感,提示TSA的确主要下调细胞特异性相关基因的表达. 有证据显示TSA直接结合于HDAC9 蛋白^[36], *HDAC9* 基因(gene source: HGNC:14065)位于染色体 7p21, 这个基因的蛋白编码序列与组蛋白去乙酰基酶家族同源. 有趣的是,在人类基因组, *Twist1* 基因直接定位于*HDAC9* 基因之后. 本研究结果显示TSA上调*Twist1*. TSA通过抑制HDAC活性,产生过度乙酰化作用,过度乙酰化作用可以增加局部某些因子的浓度,而这些因子能够增强与相关基因启动子的信息交流,进而调节特定基因的活性. HDAC抑制剂对 20%已知基因具有上调作用,基因被上调与被下调的比率接近 1:1^[37]. 本实验结果显示,在鸡胚翅芽发育时期,一些特异性表达于AER或ZPA区域的基因受TSA影响明显, *Shh*, *FGF8* 基因强烈地被TSA抑制,相反, *SF/HGF* 的表达部位接近AER区域,被TSA明显上调. 我们先前已发表的结果显示,肢芽AER缺失,则无*SF/HGF*

表达; 切除ZPA, 导致*SF/HGF*在肢芽后部间质异位、增强表达; *SF/HGF*过度表达, 可抑制*MyoD*表达^[38], 推测TSA对翅芽基因表达模式作用的结果可能类似于切除ZPA或*SF/HGF*过度表达产生的作用. 本研究结果还提示, TSA局部应用能够干扰ZPA或AER区域或临近部位细胞中基因表达的水平, 从而影响翅芽正常发育.

HDACs被视为最具前景的药物开发目标. 表观遗传调控参与胚胎早期发育和胎儿生长, 干扰表观遗传可以导致发育问题出现^[39]. 已经发现, 表观遗传异常是引起癌症、基因失调和小儿综合征的原因, 对自体免疫性疾病和衰老也起作用^[40]. 使用特异的宽带基因组甲基化数字染色体的显微照相, 在乳腺癌的基质细胞中能观察到明显的表遗传修饰改变^[41], 而且用宽带基因组图谱能显示出乙酰基岛^[42]. 癌症的发生和发展由遗传和表观遗传事件控制, 不同于遗传改变, 表观遗传异常具有潜在的可逆性, 允许恶性细胞群回复到正常状态. 随着众多涉及表观遗传调节基因表达的特异性、靶向性酶类药物的出现, 表观遗传靶向性利用作为一种有效、有价值的癌症化学治疗和化学性预防方法涌现出来^[43]. 一些HDAC抑制剂已经进入抗癌临床试验^[44], 临床实践表明, 这些制剂通常具有较好的耐受性, 而且在一些肿瘤临床试验中观察到具有抗癌活性^[45]. *TCF4* 在肝癌细胞内的表达要高于其在正常肝细胞中的表达, 抑制*TCF4* 能够阻止肝癌细胞生长^[46]. 鸡胚功能性实验证实, 在肢芽中胚层细胞中表达的*TCF4* 对肌形成有重要作用^[47], 我们的结果显示TSA能下调*TCF4* 表达.

HDACs影响组蛋白的乙酰化和去乙酰化作用, 改变染色质结构, 并强有力地影响转录调控. 有证据表明, 组蛋白乙酰化作用不足可导致肿瘤抑制基因表达的抑制, 在体外和癌症患者 I 和 II 期临床试验中, HDAC抑制剂有效上调肿瘤抑制基因表达、阻止肿瘤生长和诱导细胞凋亡. 由于组蛋白乙酰化作用不足与肿瘤发生有关, 因此, 对癌症高风险或癌症前期病人临床使用HDAC抑制剂^[48]. 关于HDAC抑制剂作用及其药效/药物动力学特性方面的研究, 将进一步改善最佳临床治疗方案的设计. TSA能调节与细胞存活、增殖、分化和凋亡有关的多种基因的活性, 以时间、剂量依赖性方式, 诱导人类卵巢癌细胞迁移和死亡^[49]. 在胚胎发育中, 包括肢芽发育, 表观遗传机

制发挥重要作用, 人类胚胎来源的局限性限制了实施研究的范围, 因而鸡胚肢芽是研究表观遗传调控的理想体内模型. 源自于胚胎肢芽发育时期的细胞群, 其快速增殖、迁移、分化和凋亡的潜能, 经HDAC抑制剂处理翅芽细胞后, 一些有趣的目标基因表达的敏感性或反应性能够方便地通过原位杂交实验检测. 本研究中, 我们使TSA在体内作用于鸡胚翅芽, 以探讨TSA对基因表达模式的影响.

将受TSA影响的基因与不受TSA影响的基因进行比较, 被下调的基因*MyoD*, *Myf5*, *TCF4*, *FGF8* 和 *Shh*在翅芽发育时期的表达相对较迟或更加局限于小的区域; 非限制性表达的基因*CREB*和与增殖有关的基因*PCNA*, 或前体细胞标志基因*Pax3* 及*Paraxis*对TSA更加具有抵抗力. TSA增强HDAC活动性, 用affymetrix microarrays分析显示, TSA参与了免疫识别、抗病毒、细胞凋亡和基因重组的复杂过程^[50]. *SF/HGF*诱导肿瘤细胞增殖、非限制性生长和细胞周期进程, 我们的结果清晰地显示, *SF/HGF* 明显被TSA上调, 说明局部TSA处理能够通过 *SF/HGF*的功能促使细胞迁移.

本研究结果提示, 作为癌症治疗方法, HDAC 抑制剂应与细胞迁移抑制剂联合使用. 结果也证明, 发育的鸡胚翅芽能够作为一个优良的体内部分药物检测模型. 这个模型能够用于检验一些候选药物对某些有意义的基因, 尤其是一些癌症相关基因或在癌症高表达基因的作用, 我们能够将它作为一个开发新型抗癌药物体内模型的补充, 为人类战胜疾病提供有力武器.

致谢 特别感谢德国弗赖堡大学解剖与细胞生物学研究所为本研究中涉及的检测基因提供探针, 同时感谢弗赖堡大学药物学研究所 Manfred Jung 教授所在研究组对丙烯酰胺念珠携带 TSA 能力的检测.

参 考 文 献

- 1 Eberharter A, Ferreira R, Becker P. Dynamic chromatin: concerted nucleosome remodelling and acetylation. *Biol Chem*, 2005, 386: 745—751 [\[DOI\]](#)
- 2 Ferres-Marco D, Gutierrez-Garcia I, Vallejo D M, et al. Epigenetic silencers and Notch collaborate to promote malignant tumours by Rb silencing. *Nature*, 2006, 439: 430—436 [\[DOI\]](#)
- 3 Tickle C. The contribution of chicken embryology to the understanding of vertebrate limb development. *Mech Dev*, 2004, 121: 1019—1029 [\[DOI\]](#)
- 4 Tickle C. Making digit patterns in the vertebrate limb. *Nat Rev*

- Mol Cell Biol, 2006, 7: 45—53 [\[DOI\]](#)
- 5 Koussoulakos S. Vertebrate limb development: From Harrison's limb disk transplantations to targeted disruption of *Hox* genes. *Anat Embryol (Berl)*, 2004, 209: 93—105
 - 6 Capdevila J, Izpisua Belmonte J C. Patterning mechanisms controlling vertebrate limb development. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2001, 17: 87—132 [\[DOI\]](#)
 - 7 Chiba T, Yokosuka O, Fukai K, et al. Cell growth inhibition and gene expression induced by the histone deacetylase inhibitor, trichostatin A, on human hepatoma cells. *Oncology*, 2004, 66: 481—491 [\[DOI\]](#)
 - 8 Chang S, Pikaard C S. Transcript profiling in *Arabidopsis* reveals complex responses to global inhibition of DNA methylation and histone deacetylation. *J Biol Chem*, 2005, 280: 796—804
 - 9 Hu E, Dul E, Sung C M, et al. Identification of novel isoform-selective inhibitors within class I histone deacetylases. *J Pharmacol Exp Ther*, 2003, 307: 720—728 [\[DOI\]](#)
 - 10 Taniura S, Kamitani H, Watanabe T, et al. Transcriptional regulation of cyclooxygenase-1 by histone deacetylase inhibitors in normal human astrocyte cells. *J Biol Chem*, 2002, 277: 16823—16830 [\[DOI\]](#)
 - 11 Almouzni G, Khochbin S, Dimitrov S, et al. Histone acetylation influences both gene expression and development of *Xenopus laevis*. *Dev Biol*, 1994, 165: 654—669 [\[DOI\]](#)
 - 12 Lezzi S, Cossu G, Nervi C, et al. Stage-specific modulation of skeletal myogenesis by inhibitors of nuclear deacetylases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 99: 7757—7762
 - 13 Hamburger V, Hamilton H L. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Dev Dyn*, 1992, 195(4): 231—272
 - 14 Nieto M A, Patel K, Wilkinson D G. *In situ* hybridization analysis of chick embryos in whole mount and tissue sections. *Methods Cell Biol*, 1996, 51: 219—235
 - 15 Hasan S, Hassa P O, Imhof R, et al. Transcription coactivator p300 binds PCNA and may have a role in DNA repair synthesis. *Nature*, 2001, 410: 387—391 [\[DOI\]](#)
 - 16 Kohler T, Prols F, Brand-Saberi B. PCNA *in situ* hybridization: A novel and reliable tool for detection of dynamic changes in proliferative activity. *Histochem Cell Biol*, 2005, 123: 315—327 [\[DOI\]](#)
 - 17 Chen A E, Ginty D D, Fan C M. Protein kinase a signalling via CREB controls myogenesis induced by Wnt proteins. *Nature*, 2005, 433: 317—322 [\[DOI\]](#)
 - 18 O'Rourke M P, Soo K, Behringer R R, et al. Twist plays an essential role in FGF and SHH signal transduction during mouse limb development. *Dev Biol*, 2002, 248: 143—156 [\[DOI\]](#)
 - 19 Brand-Saberi B, Muller T S, Wilting J, et al. Scatter factor/hepatocyte growth factor (SF/HGF) induces emigration of myogenic cells at interlimb level *in vivo*. *Dev Biol*, 1996, 179: 303—308 [\[DOI\]](#)
 - 20 Schmidt C, Bladt F, Goedecke S, et al. Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature*, 1995, 373: 699—702 [\[DOI\]](#)
 - 21 Brown C B, Engleka K A, Wenning J, et al. Identification of a hypaxial somite enhancer element regulating Pax3 expression in migrating myoblasts and characterization of hypaxial muscle Cre transgenic mice. *Genesis*, 2005, 41: 202—209 [\[DOI\]](#)
 - 22 Delfini M C, Duprez D. Ectopic *Myf5* or *MyoD* prevents the neuronal differentiation program in addition to inducing skeletal muscle differentiation, in the chick neural tube. *Development*, 2004, 131: 713—723 [\[DOI\]](#)
 - 23 Brand-Saberi B. Genetic and epigenetic control of skeletal muscle development. *Ann Anat*, 2005, 187: 199—207
 - 24 Buchberger A, Nomokonova N, Arnold H H. *Myf5* expression in somites and limb buds of mouse embryos is controlled by two distinct distal enhancer activities. *Development*, 2003, 130: 3297—3307 [\[DOI\]](#)
 - 25 Scherz P J, Harfe B D, McMahon A P, et al. The limb bud Shh-Fgf feedback loop is terminated by expansion of former ZPA cells. *Science*, 2004, 305: 396—399 [\[DOI\]](#)
 - 26 Dillon R, Gadgil C, Othmer H G. Short- and long-range effects of Sonic hedgehog in limb development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 10152—10157 [\[DOI\]](#)
 - 27 Hornstein E, Mansfield J H, Yekta S, et al. The microRNA miR-196 acts upstream of *Hoxb8* and *Shh* in limb development. *Nature*, 2005, 438: 671—674 [\[DOI\]](#)
 - 28 Sagai T, Hosoya M, Mizushima Y, et al. Elimination of a long-range *cis*-regulatory module causes complete loss of limb-specific *Shh* expression and truncation of the mouse limb. *Development*, 2005, 132: 797—803 [\[DOI\]](#)
 - 29 Morgan H D, Santos F, Green K, et al. Epigenetic reprogramming in mammals. *Hum Mol Genet*, 2005, 14(Spec 1): R47—R58 [\[DOI\]](#)
 - 30 Cao Y, Kumar R M, Penn B H, et al. Global and gene-specific analyses show distinct roles for Myod and Myog at a common set of promoters. *EMBO J*, 2006, 25: 502—511 [\[DOI\]](#)
 - 31 El Kharroubi A, Piras G, Stewart C L. DNA demethylation reactivates a subset of imprinted genes in uniparental mouse embryonic fibroblasts. *J Biol Chem*, 2001, 276: 8674—8680 [\[DOI\]](#)
 - 32 Johnston L A, Tapscott S J, Eisen H. Sodium butyrate inhibits myogenesis by interfering with the transcriptional activation function of *MyoD* and myogenin. *Mol Cell Biol*, 1992, 12: 5123—5130
 - 33 Oliver C, Steinbach, Alan P, et al. Histone deacetylase activity is required for the induction of the *MyoD* muscle cell lineage in *Xenopus*. *Biol Chem*, 2000, 381: 1013—1016 [\[DOI\]](#)
 - 34 Iezzi S, Di Padova M, Serra C, et al. Deacetylase inhibitors increase muscle cell size by promoting myoblast recruitment and fusion through induction of follistatin. *Dev Cell*, 2004, 6(5): 673—684 [\[DOI\]](#)
 - 35 Gorisch S M, Wachsmuth M, Toth K F, et al. Histone acetylation increases chromatin accessibility. *J Cell Sci*, 2005, 118(Pt 24): 5825—5834 [\[DOI\]](#)
 - 36 Finnin M S, Donigian J R, Cohen A, et al. Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. *Nature*, 1999, 401: 188—193 [\[DOI\]](#)
 - 37 Minucci S, Pelicci P G. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6: 38—51 [\[DOI\]](#)
 - 38 Scaal M, Bonafede A, Dathe V, et al. SF/HGF is a mediator between limb patterning and muscle development. *Development*,

- 1999, 126: 4885—4893
- 39 Jacob S, Moley K H. Gametes and embryo epigenetic reprogramming affect developmental outcome: implication for assisted reproductive technologies. *Pediatr Res*, 2005, 58: 437—446 [\[DOI\]](#)
- 40 Rodenhiser D, Mann M. Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. *CMAJ*, 2006, 174: 341—348
- 41 Hu M, Yao J, Cai L, et al. Distinct epigenetic changes in the stromal cells of breast cancers. *Nat Genet*, 2005, 37: 899—905 [\[DOI\]](#)
- 42 Roh T Y, Cuddapah S, Zhao K. Active chromatin domains are defined by acetylation islands revealed by genome-wide mapping. *Genes Dev*, 2005, 19: 542—552 [\[DOI\]](#)
- 43 Yoo C B, Jones P A. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov*, 2006, 5: 37—50 [\[DOI\]](#)
- 44 Carey N, La Thangue N B. Histone deacetylase inhibitors: gathering pace. *Curr Opin Pharmacol*, 2006, 6(4): 369—375 [\[DOI\]](#)
- 45 Kristeleit R, Fong P, Aherne G W, et al. Histone deacetylase inhibitors: emerging anticancer therapeutic agents? *Clin Lung Cancer*, 2005, 7(Suppl 1): S19—S30
- 46 Zhao D H, Hong J J, Guo S Y, et al. Aberrant expression and function of TCF4 in the proliferation of hepatocellular carcinoma cell line BEL-7402. *Cell Res*, 2004, 14: 74—80 [\[DOI\]](#)
- 47 Kardon G, Harfe B D, Tabin C J. A Tcf4-positive mesodermal population provides a prepattern for vertebrate limb muscle patterning. *Dev Cell*, 2003, 5: 937—944 [\[DOI\]](#)
- 48 Liu T, Kuljaca S, Tee A, et al. Histone deacetylase inhibitors: multifunctional anticancer agents. *Cancer Treat Rev*, 2006, 32: 157—165 [\[DOI\]](#)
- 49 Zhou C, Qiu L, Sun Y, et al. Inhibition of EGFR/PI3K/AKT cell survival pathway promotes TSA's effect on cell death and migration in human ovarian cancer cells. *Int J Oncol*, 2006, 29: 269—278
- 50 Gialitakis M, Kretsovali A, Spilianakis C, et al. Coordinated changes of histone modifications and HDAC mobilization regulate the induction of MHC class II genes by trichostatin A. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34: 765—772 [\[DOI\]](#)
- 51 Shimazu T, Komatsu Y, Nakayama K I, et al. Regulation of SV40 large T-antigen stability by reversible acetylation. *Oncogene*, 2006, 25(56): 7391—7400 [\[DOI\]](#)