

曲谷抑霉素 A 调控人干扰素调节因子 3 基因初步研究

张慧文,周国平*

(南京医科大学第一附属医院儿科,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:探讨组蛋白去乙酰化酶抑制剂(histone deacetylase inhibitor, HDACi)曲谷抑霉素 A(trichostatin A, TSA)对人干扰素调节因子 3(interferon regulatory factor 3, IRF3)基因表达的影响,初步分析 TSA 调控 IRF3 基因的乙酰化机制。方法:双荧光素酶活性分析法检测 TSA 和组蛋白乙酰化酶(histone acetylase, HAT)野生型 p300 对 IRF3 基因启动子活性的影响;实时荧光定量 PCR 检测 TSA 对 IRF-3 基因 mRNA 水平的影响;Western blot 检测 TSA 对 IRF3 蛋白水平的影响。结果:不同浓度 TSA 干预后 IRF3 基因启动子活性均增加,TSA 浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$ 时,PS1、PS6 相对荧光素酶活性分别增加 75%、155%;过表达野生型 p300 后 PS1 相对荧光素酶活性增加 267%;TSA(1、10 $\mu\text{mol/L}$)干预细胞 6 h 后,IRF3 基因 mRNA 水平增加 23%、39%,干预 24 h 后,mRNA 水平增加 17%、64%;TSA(0.1、1、5 $\mu\text{mol/L}$)干预细胞 24 h 后,蛋白表达量分别增加 15%、72%、191%。结论:TSA 上调 IRF3 基因 mRNA 和蛋白表达,TSA 和组蛋白乙酰化酶 p300 均可正向调控 IRF3 基因启动子活性,TSA 可能通过 IRF3 通路发挥治疗免疫性疾病和抗肿瘤作用。

[关键词] 曲谷抑霉素 A;人干扰素调节因子 3;乙酰化;p300;基因转录调控

[中图分类号] R756

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2017)01-0020-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20170104

Trichostatin A transcriptionally induces interferon regulatory factor 3 expression

Zhang Huiwen, Zhou Guoping*

(Department of Pediatrics, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the influence of histone deacetylase inhibitor (HDACi) trichostatin A (TSA) on the expression of interferon regulatory factor 3 (IRF3) and the preliminary epigenetic mechanism of transcriptional regulation. **Methods:** Luciferase assays were applied to detect IRF3 promoter activity after TSA incubation and histone acetyltransferases (HAT) p300 transfection. The IRF3 mRNA expression level was detected by Real-time fluorescence quantification-PCR, while the IRF3 protein expression level was detected by Western blot. **Results:** IRF3 gene promoter activity was increased after TSA intervention at different concentrations. TSA treatment (1 $\mu\text{mol/L}$) induced the relative luciferase activity (RLA) of IRF3 promoter PS1 and PS6 by 75% and 155%, respectively. Post-transfection with p300 increased the RLA of PS1 by 267%. At the 1 $\mu\text{mol/L}$ and the 10 $\mu\text{mol/L}$ TSA group, the IRF3 mRNA expression was increased by 23% and 39% after 6 h treatment, while increased by 7% and 64% after 24 h, respectively. The IRF3 protein expressions were increased by 15%, 72%, and 191% after TSA (0.1 $\mu\text{mol/L}$, 1 $\mu\text{mol/L}$, and 5 $\mu\text{mol/L}$) treatment, respectively. **Conclusion:** TSA can up-regulate the expression of IRF3 both on mRNA and protein levels, while TSA and p300 can increase transcription activity by targeting IRF3 promoter region, which suggests that HDAC and acetylation are positive regulation of IRF3 transcription or expression, and indicates the hypothesized role of TSA in the immunotherapy and antitumor effects through IRF3 pathway.

[Key words] trichostatin A; interferon regulatory factor 3; acetylation; p300; transcriptional regulation

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(01):0020-0024]

近年来表观遗传学正逐渐发展为研究热点之一,乙酰化修饰是一种重要的表观遗传调控机制,

[基金项目] 国家自然科学基金(81170661,81300023);南京市科技计划项目(201503003)

*通信作者(Corresponding author),E-mail:gpzhou2003@aliyun.com

包括组蛋白和非组蛋白乙酰化。核小体是构成染色质的基本单位,其核心结构为:DNA 链包绕组蛋白八聚体(H2A、H2B、H3、H4),组蛋白 H1 连接 DNA 链。组蛋白氨基酸残基 N-末端与甲基、乙酰基或其他基团共价结合影响染色质的空间结构,进而调控

相应区域的基因表达活性。组蛋白乙酰化酶(histone acetylase, HATs)和组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylases, HDACs)维持组蛋白乙酰化平衡, HDAC 移去组蛋白乙酰基团引起去乙酰化, 染色质聚集使转录相关因子与染色体结合减少, 抑制基因表达; 组蛋白去乙酰化酶抑制剂(histone deacetylase inhibitors, HDACi)抑制 HDAC 去乙酰化作用从而发挥正向或负向表达调控作用。在肿瘤细胞中 HDAC 与 HAT 失衡可导致癌基因增生, 而抑制 HDAC 可增加抑癌基因表达, 促进癌细胞凋亡, 抑制肿瘤相关因子生长、转录及分化。除作用于组蛋白, HDACi 还可作用于许多涉及基因表达调控、细胞增殖及凋亡的蛋白。目前有很多 HDACi 已经进入临床前期研究或临床肿瘤治疗^[1]。HDACi 在免疫方面的作用也受到越来越多的重视。TSA 是一种泛 HDACi, 能抑制大多数锌依赖性的 HDAC 并聚集 HAT, 从而引起组蛋白和非组蛋白乙酰化。

人干扰素调节因子 3(interferon regulatory factor 3, IRF3)是病毒感染后诱导干扰素表达的关键因子^[2], 主要调节 I 型干扰素(IFN- α/β)基因转录, 从而在病毒感染后固有免疫和获得性免疫调节以及抗肿瘤中发挥重要作用。目前, 关于 IRF3 基因乙酰化调控机制的研究较少, 本研究将初步探究泛 HDAC 抑制剂 TSA 对 IRF3 基因启动子转录调控和 mRNA 及蛋白表达的影响。

p300 是一种常见的 HAT, 在乙酰化动态平衡中作用类似于 HDACi。本实验室保存有野生型 p300 过表达质粒, 通过过表达 p300 模拟 HDACi(TSA)的乙酰化作用, 初步探究 p300 乙酰化作用对 IRF3 启动子活性的影响。本课题组前期已确定了人 IRF3 基因的核心启动子区, 并初步探讨了启动子区调控元件^[3], 结合本研究结果, 将对 TSA 调控 IRF3 基因的乙酰化机制提出猜想和假设。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂

双萤光素酶报告基因检测试剂盒(Dual-Luciferase Reporter Assay System, Promega 公司, 美国)。Lipofectamine™ 3000、TRIzol、Opti-MEM 无血清培养基(Invitrogen 公司, 美国)。改良杜氏伊格尔(DMEM)高糖培养基(Hyclone 公司, 美国)。实时定量 PCR 试剂盒(SYBR® Premix DimerEraser™ C Perferct Real Time, TaKaRa 公司, 日本)。胰酶消化液、

青霉素-链霉素溶液、二喹啉甲酸(BCA)蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒(上海碧云天)。胎牛血清(杭州四季青公司)。全蛋白提取试剂盒(南京凯基生物公司); 预染蛋白 Marker(Thermo 公司, 美国); 聚偏二氟乙烯膜(PVDF 膜, Millipore 公司, 美国); Anti-IRF3 抗体(ab25950, Abcom 公司, 美国); 兔抗人甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)单克隆抗体(Bioworld 公司, 美国); 生物素标记的羊抗小鼠 IgG、羊抗兔 IgG 抗体(Jackson Immuno Research 公司, 美国)。PCR 引物由上海英骏生物有限公司合成。

1.1.2 质粒、菌株、细胞系

双萤光素酶报告基因分析检测质粒(pGL3-Basic)和内参报告基因质粒(pRL-TK)购自美国 Promega 公司; 人 IRF3 基因全长启动子和核心启动子重组报告质粒(PS1、PS6)为本课题组构建保存^[3], PS1 为人 IRF3 基因 5'侧翼区-982~+18 bp 片段启动子重组报告质粒, PS6 为 5'侧翼区 TSS 上游-149~-93 bp 片段启动子重组报告质粒。人宫颈癌(HeLa)细胞系购自美国 ATCC。野生型 p300 过表达质粒(p300)和对照质粒(p300 突变)为本课题组保存。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

用含 10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素的高糖 DMEM 培养基, 置于 37°C、5% CO₂ 培养箱; 在细胞生长状态良好、生长对数期, 用含 10%胎牛血清的无双抗高糖 DMEM 培养基按(1.5~2.0) \times 10⁵个/mL 密度将细胞接种, 置于 37°C、5% CO₂ 培养箱培养。

1.2.2 瞬时转染

HeLa 细胞按(1.5~2.0) \times 10⁵个/mL 接种于 96 孔板, 生长至融合度约为 70%~90%时, 按 Lipofectamine™ 3000 说明书进行转染。TSA 对 IRF3 启动子活性影响: 共转染 IRF3 启动子报告质粒(PS1/PS6) 100 ng 和 pRL-TK 4 ng, 24 h 后以 DMSO 为对照, 以不同浓度 TSA 干预; 过表达 p300 对 IRF3 启动子活性影响: 共转 PS1 质粒 100 ng、pRL-TK 4 ng 和 p300 过表达质粒(p300 突变/p300)100 ng。24 h 后收集细胞行双萤光素酶活性分析。重复 3 次独立实验。

1.2.3 双萤光素酶活性分析

弃去 96 孔板孔内细胞培养基, 每孔用 PBS 洗涤 1~2 次。按照双萤光素酶报告基因检测试剂盒说明书每孔加入 20 μ L LB 裂解液, 室温震荡 15 min 使细胞充分裂解。每孔吸取 20 μ L 裂解液上清移入

1.5 mL EP 管中, 加入 20 μ L 的 substrate buffer, 混匀后测定萤火虫荧光素值(A 值); 加入 20 μ L stop buffer, 混匀后测定海肾肾腔萤光素值(B 值); A/B 值为相对萤光素酶活性 (relativity luciferase activities, RLU), 与报告基因启动子活性正相关。

1.2.4 实时定量 PCR

HeLa 细胞按 $(1.5\sim 2.0)\times 10^5$ 个/mL 接种于 12 孔板。以 DMSO 为对照组, TSA 干预细胞 24 h, 以终浓度 1 μ mol/L 为干预基础浓度, 按 TRIzol 说明书提取细胞总 RNA, 逆转录合成 cDNA, 置于 -80°C 保存待用。根据 GenBank 中人 IRF3 基因序列, 设计 RT-PCR 引物, 选取人 GAPDH 为内参。实时定量 PCR 反应条件: 94°C 预变性 5 min; 90°C 15 s, 60°C 15 s, 72°C 1 min, 40 个循环; 72°C 5 min 延伸。分析计算 IRF3 基因 mRNA 相对表达量 $= 2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$; $\Delta\Delta\text{CT} = [\text{C}_T(\text{TSA 干预组目的基因}) - \text{C}_T(\text{TSA 干预组内参})] - [\text{C}_T(\text{对照组目的基因}) - \text{C}_T(\text{对照组内参})]$ 。3 次独立实验。

表 1 IRF3 和 GAPDH 实时定量 PCR 引物

基因名称	基因序列(5'→3')
IRF3	F:GTCGATCAAAAAGAAAGCCCCAGC
	R:CATAATGCCGTAGGCCGTGCTTCC
GAPDH	F:CATAATGCCGTAGGCCGTGCTTCC
	R:TCCTGGAAGATGGTGATG

1.2.5 免疫印迹实验(Western blot)

HeLa 细胞按 $(1.5\sim 2.0)\times 10^5$ 个/mL 接种于 6 孔板。DMSO 为对照组, 以 TSA 干预 24 h, 按照试剂盒说明书提取细胞总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度, 取 40 μ g 总蛋白行 10%SDS-PAGE 凝胶电泳, 恒压 100 V 电泳 100 min, 恒流 250 mA 转 PVDF 膜 2 h, 5% 脱脂蛋白封闭 1 h, IRF3 一抗(1:1 000) 4°C 摇床封闭过夜, 洗膜 3 次, 每次 10 min, 羊抗兔 IgG 二抗

(1:8 000) 37°C 摇床封闭 1 h, 洗膜 3 次, 每次 10 min, ECL 液显影, 扫描仪成像, 测定灰度值。

1.3 统计学方法

应用 SPSS 20.0 软件进行统计分析, 实验结果以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 Bonfferoni(LSD)检验, $P\leq 0.05$ 表示差异有统计学意义。

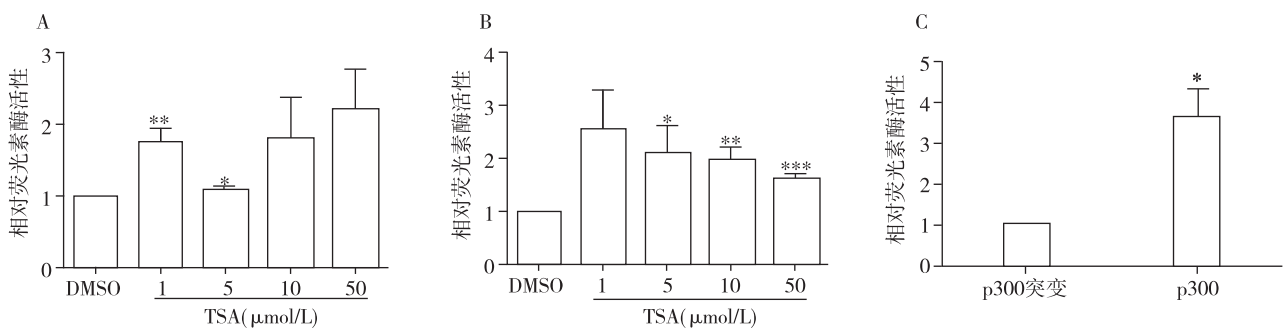
2 结果

2.1 TSA 和 p300 正向调控 IRF3 基因启动子转录

为研究 TSA 对 IRF3 启动子活性的影响, 在 HeLa 细胞系瞬转 IRF3 启动子报告质粒, 24 h 后以不同终浓度 TSA(1、5、10、50 μ mol/L) 干预, 检测萤光素酶活性。研究发现不同浓度 TSA 均可增强 IRF3 全长启动子相对萤光素酶活性(图 1A), 与对照组(DMSO)相比, TSA 干预组(1 μ mol/L)活性增强 75%; 不同浓度 TSA 也可增强 IRF3 核心启动子相对萤光素酶活性(图 1B), 与对照组(DMSO)相比, TSA 干预组(1 μ mol/L)活性增强 155%, 且随着浓度升高, 启动子萤光素酶活性增加的幅度逐渐减小。以上研究结果表明: TSA(终浓度为 1~50 μ mol/L) 可增强 IRF3 启动子活性, 且 TSA 对 IRF3 基因不同启动子区域活性的上调模式不完全相同, 提示 TSA 可通过 IRF3 启动子不同区域发挥不同正向转录调控作用。为研究 p300 对 IRF3 基因启动子的作用, 共转染 PS1 和 p300 过表达质粒, 与对照组(p300 突变)相比, 过表达组(p300)萤光素酶活性升高 267% (图 1C), 结果表明: 野生型 p300 可显著增强 IRF3 全长启动子活性, 发挥与 TSA 类似的上调作用。

2.2 TSA 上调 IRF3 基因 mRNA 表达

为检测 TSA 对 IRF3 基因 mRNA 表达的影响, 以 TSA 干预 HeLa 细胞系, 行实时定量 PCR 检测



A: 不同浓度 TSA 上调 IRF3 全长启动子(PS1)活性; B: 不同浓度 TSA 上调 IRF3 核心启动子(PS6)活性, 与对照组(DMSO)相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$; C: 野生型 p300 增强 IRF3 全长启动子(PS1)活性, 与对照组(p300 突变)相比, * $P<0.05$ 。

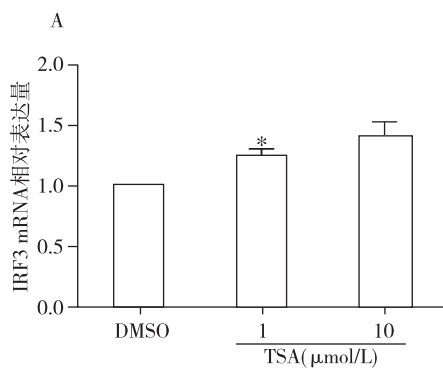
图 1 TSA 和野生型 p300 对 IRF3 基因启动子活性的影响

Figure 1 Effects of TSA and p300 on the activity of human IRF3 gene promoters

IRF3 基因 mRNA 水平(图 2)。TSA 干预细胞 6 h,与对照组(DMSO)相比,TSA 干预组(1、10 $\mu\text{mol/L}$) IRF3 基因 mRNA 相对表达量分别增加 23%、39%(图 2A);TSA 干预细胞 24 h,与对照组(DMSO)相比,TSA 干预组(1、10 $\mu\text{mol/L}$)IRF3 基因 mRNA 相对表达量分别增加 17%、64%(图 2B),TSA 干预 6 h 与干预 24 h 后 mRNA 水平变化趋势相同,呈浓度依赖方式。提示 TSA 可提高 IRF3 mRNA 表达水平,正向调控 IRF3 基因转录。

2.3 TSA 上调 IRF3 基因蛋白表达

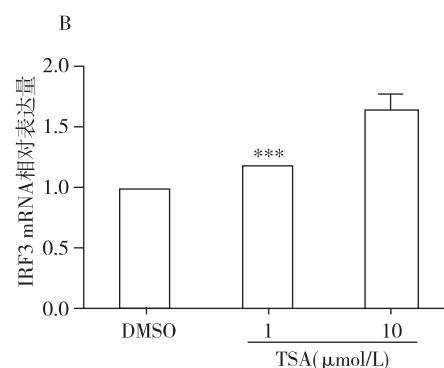
为进一步检测 TSA 对 IRF3 蛋白水平的影响,以



DMSO 为对照,不同终浓度(0.1、1.0、5.0 $\mu\text{mol/L}$)TSA 刺激 HeLa 细胞 24 h, Western blot 检测 IRF-3 蛋白表达水平(图 3),发现 TSA 干预 24 h 后 IRF3 蛋白表达量显著上调,且呈浓度依赖性;与对照组(DMSO)相比,0.1、1.0、5.0 $\mu\text{mol/L}$ TSA 分别升高 15%、71%和 191%。提示 TSA 可促进 IRF3 蛋白表达,且呈浓度依赖性方式。TSA 可正向调控 IRF3 蛋白水平表达。

3 讨论

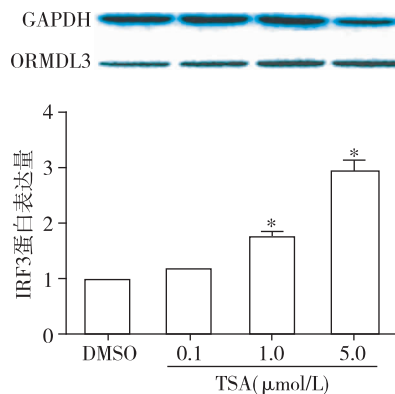
IRF3^[4]是调节 IFN- α/β 基因表达的关键转录因子,常见病毒如 EB 病毒、单纯性疱疹病毒^[5]、流感病



A:不同浓度 TSA(1、10 $\mu\text{mol/L}$)干预 HeLa 细胞系 6 h,实时定量 PCR 检测 IRF3 基因 mRNA 水平;B:不同浓度 TSA(1、10 $\mu\text{mol/L}$)干预 HeLa 细胞系 24 h,实时定量 PCR 检测 IRF3 基因 mRNA 水平,与对照组(DMSO)比,* $P<0.05$,*** $P<0.001$ 。

图 2 不同浓度 TSA 对 IRF3 基因 mRNA 水平的影响

Figure 2 Effects of TSA on the relative expression of human IRF3 gene mRNA



不同浓度 TSA 干预 HeLa 细胞系 24 h,Western blot 检测 IRF3 蛋白表达水平和半定量分析,与对照组(DMSO)比,* $P<0.05$ 。

图 3 TSA 对 IRF3 基因蛋白表达的影响

Figure 3 Effects of TSA on the relative expression of human IRF3 gene protein

毒、麻疹、乙型/丙型肝炎病毒^[6]感染后,IRF3 诱导干扰素表达、调节机体固有免疫和适应性免疫^[7];同时 IRF3 也是抗病毒性癌症的关键转录因子^[8]。本课题组前期初步研究了 IRF3 基因的转录调控机制:构建 IRF3 启动子荧光报告重组质粒,确定了 IRF3 基

因的核心启动子区域;初步证实 IRF3 基因启动子 -149~-93 bp 片段存在 E2F1 和 SP1/3 转录因子结合位点^[3]。在此基础上通过进一步研究发现 EB 病毒早期蛋白 Rta 可通过转录因子 E2F1 负向调控 IRF-3 基因转录^[9]。

本课题组前期研究发现泛 HDACi 丙戊酸钠可提高 H3、H4 的乙酰化水平并上调 IRF3 基因表达^[9]。有研究发现 IRF-3^{-/-}, HDAC6^{-/-}小鼠可以抵抗细菌性 LPS 诱导的败血症,该结果提示 IRF3 对细菌介导的免疫激活途径可发挥重要调节作用;且 HDAC6 是 IRF3 转录激活的重要调控因子^[10]。还有学者发现日本脑炎病毒(JEV)感染小鼠后 HDAC 上调组蛋白乙酰化水平作用被抑制,IRF3 介导的 I 型 IFN 的生成增加,同时 HAT 也参与生成 I 型 IFN,该研究提示抑制 HDAC 可通过 IRF3 通路发挥抗炎抗病毒作用^[11]。另外有一项研究发现,过表达 HDAC3 可通过 PI3K-IRF3 通路,诱导 IRF3 磷酸化从而促进 galectin-9 基因表达^[12]。以上实验均提示乙酰化机制在 IRF3 基因的转录调控中具有重要作用,然而到目前为止 IRF3 基因的乙酰化调控机制尚不清楚。

本研究选用泛 HDACi (TSA) 和 HAT (p300) 为研究对象, TSA 和 p300 均具有促乙酰化作用, 在细菌或病毒引起的炎症、自身免疫性疾病及肿瘤免疫^[13-14]领域的研究和应用越来越广泛^[15]。到目前为止, TSA 共有 5 项临床实验 (NCT02486965、NCT01954433、NCT01575106、NCT02762903、NCT00914173) 正在进行或已经完成 (<http://clinicaltrials.gov>)。p300 可参与调控细胞增殖、分化、凋亡以及器官发育^[17], 同时也在炎症和免疫反应中发挥重要作用。以宫颈癌 HeLa 细胞系为研究体系, TSA 可以增加人宫颈癌 HeLa 细胞中 IRF3 mRNA 和蛋白表达, 因此推测, 一定浓度的 HDACi 可通过上调 IRF3 表达从而参与免疫调节、抗病毒及抗肿瘤作用。

不同浓度 TSA 干预可增加 IRF3 全长启动子和核心启动子活性, TSA 终浓度增加, 全长启动子活性升高的幅度无明显改变, 而核心启动子活性增加幅度逐渐减小; TSA 终浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$ 时, PS6 活性较 PS1 升高幅度更明显; 提示启动子不同区域在 TSA 乙酰化调控中的作用不同, 启动子不同片段组蛋白乙酰化水平也可能不一致; 同时 IRF3 基因 5' 侧翼区转录起始位点上游 -982~-150 bp 片段可能存在其他顺式作用元件及反式作用因子参与 TSA 调控。本课题组前期发现: 在 IRF3 核心启动子区域, 转录因子 SP1/3 激活 IRF3 基因转录, E2F1 抑制转录。而 SP1/3 是组蛋白 H3 相关转录因子^[18-19], 因此进一步研究以验证猜想: ①TSA 可通过影响转录因子 SP1/3 和 E2F1 与 IRF3 基因的结合能力调控 IRF3 基因转录; ②TSA 可引起转录因子 SP1/3 和 E2F1 乙酰化, 从而作用于下游转录调控。过表达 p300 后, IRF3 全长启动子活性可显著上调, 进一步证明促进乙酰化可正向调控 IRF3 基因转录。但是尽管 p300 和 TSA 一样也具有促乙酰化、正向调控基因的作用, 但 p300 除了能够使组蛋白乙酰化, 也能使许多转录因子乙酰化; 此外, p300 还可与 Ets-1、CREB、p53、NFAT、激活蛋白-1 (AP-1) 成分: Fos 和 Jun 等转录因子形成转录复合物, 共同参与基因的转录调控^[16], 表观调控机制复杂错综, 为排除 p300 乙酰化机制以外其他表观或非表观调控因素的影响, 后续试验中还需检测 TSA 干预后蛋白乙酰化水平及 IRF3 基因启动子区组蛋白 (H3、H4) 乙酰化水平等以判断 p300 在上调 IRF3 启动子活性中以 HAT 作用为主还是与其他转录因子形成转录复合物发挥作用为主。

综上所述, 乙酰化调控为 IRF3 基因转录及转

录后调控的重要机制之一, HDACi 可能通过 IRF3 通路参与免疫调节、抗病毒及抗肿瘤作用。进一步深入研究调控机制有助于发现新的治疗靶点, 对研制新型特异性 HDACi 药物具有重要的指导意义。

[参考文献]

- [1] Carafa V, Miceli M, Altucci L, et al. Histone deacetylase inhibitors: a patent review (2009-2011)[J]. *Expert Opin Ther Pat*, 2013, 23(1):1-17
- [2] Chow EK, Castrillo A, Shahangian A, et al. A role for IRF3-dependent RXRalpha repression in hepatotoxicity associated with viral infections[J]. *J Exp Med*, 2006, 203(12):2589-2602
- [3] Xu HG, Jin R, Ren W, et al. Transcription factors Sp1 and Sp3 regulate basal transcription of the human IRF-3 gene[J]. *Biochimie*, 2012, 94(6):1390-1397
- [4] Taniguchi T, Ogasawara K, Takaoka A, et al. IRF family of transcription factors as regulators of host defense [J]. *Annu Rev Immunol*, 2001, 19:623-655
- [5] Kumari P, Narayanan S, Kumar H. Herpesviruses: interfering innate immunity by targeting viral sensing and interferon pathways [J]. *Rev Med Virol*, 2015, 25 (3):187-201
- [6] Dorner M, Horwitz JA, Donovan BM, et al. Completion of the entire hepatitis C virus life cycle in genetically humanized mice[J]. *Nature*, 2013, 501(7466):237-241
- [7] Tamura T, Yanai H, Savitsky D, et al. The IRF family transcription factors in immunity and oncogenesis [J]. *Annu Rev Immunol*, 2008, 26:535-584
- [8] Yanai H, Negishi H, Taniguchi T. The IRF family of transcription factors: Inception, impact and implications in oncogenesis [J]. *Oncoimmunology*, 2012, 1 (8):1376-1386
- [9] Zhu LH, Gao S, Jin R, et al. Repression of interferon regulatory factor 3 by the Epstein-Barr virus immediate-early protein Rta is mediated through E2F1 in HeLa cells [J]. *Mol Med Rep*, 2014, 9(4):1453-1459
- [10] Chattopadhyay S, Fensterl V, Zhang Y, et al. Inhibition of viral pathogenesis and promotion of the septic shock response to bacterial infection by IRF-3 are regulated by the acetylation and phosphorylation of its coactivators[J]. *MBio*, 2013, 4(2):49-52
- [11] Adhya D, Dutta K, Kundu K, et al. Histone deacetylase inhibition by Japanese encephalitis virus in monocyte/macrophages: A novel viral immune evasion strategy [J]. *Immunobiology*, 2013, 218(10):1235-1247
- [12] Alam S, Li H, Margariti A, et al. Galectin-9 protein expression in endothelial cells is positively regulated by histone deacetylase 3[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286 (51):

(下转第 120 页)

程存在差异。

综上所述,烧结次数的增加对于 Y-TZP 弯曲强度及断裂韧性无影响,也并未加速 Y-TZP 的低温老化过程的发生,说明反复烧结对 Y-TZP 的机械性能并没有明显的不利作用。但是作为体外实验并不能完全模拟口内情况,比如口腔环境中 pH 的变化,修复体承受咬合力的变化等。对于反复烧结的氧化锆材料在口内的远期表现,仍需要进一步的临床研究。

[参考文献]

[1] 李梦静,阳佳兴,蓝巧瑛,等.反复烧结对氧化锆支架与饰瓷结合强度的影响[J].中华口腔医学研究杂志(电子版),2010,4(6):583-589

[2] Nakamura K, Adolfsson E, Milleding P, et al. Influence of grain size and veneer firing process on the flexural strength of zirconia ceramics [J]. Eur J Oral Sci, 2012,120(3):249-254

[3] 伊元夫,王晨,温宁,等.牙科着色氧化钇稳定四方多晶氧化锆陶瓷的结构与性能[J].华西口腔医学杂志,2009,27(5):473-478

[4] 郭红,李波,张博.基于完全样本的两参数 Weibull 分布的参数估计[J].华中师范大学学报(自然科学版),2007,41(3):348-351

[5] Weibull W. A statistical distribution function of wide applicability[J]. J Appl Mech, 1951, 18: 293-297

[6] Lugh V, Sergio V. Low temperature degradation-aging-of zirconia: A critical review of the relevant aspects in dentistry[J]. Dent Mater, 2010,26(8):807-820

[7] Alghazzawi TF, Lemons J, Liu PR, et al. Influence of low-temperature environmental exposure on the mechanical properties and structural stability of dental zirconia

[J]. J Prosthodont, 2012,21(5):363-369

[8] Sevilla P, Sandino C, Arciniegas MA, et al. Evaluating mechanical properties and degradation of YTZP dental implants [J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2010,30(1):14-19

[9] Cavalcanti AN, Foxton RM, Watson TF, et al. Y-TZP ceramics: key concepts for clinical application[J]. Oper Dent, 2009,34(3):344-351

[10] ISO 13356:2008. Implants for surgery ceramic materials based on yttria stabilized tetragonal zirconia (Y-TZP) [S]. 2008

[11] Zhang F, Inokoshi M, Vanmeensel K, et al. Lifetime estimation of zirconia ceramics by linear ageing kinetics[J]. Acta Mater, 2015,92(15):290-298

[12] Vatali A, Kontonasaki E, Kavouras P, et al. Effect of heat treatment and in vitro aging on the microstructure and mechanical properties of cold isostatic-pressed zirconia ceramics for dental restorations [J]. Dent Mater, 2014,30(10):e272-e282

[13] Siarampi E, Kontonasaki E, Andrikopoulos KS, et al. Effect of in vitro aging on the flexural strength and probability to fracture of Y-TZP zirconia ceramics for all-ceramic restorations [J]. Dent Mater, 2014,30(12):e306-e316

[14] Xie H, Gu Y, Li Q, et al. Effects of multiple firings on the low-temperature degradation of dental yttria-stabilized tetragonal zirconia[J]. J Prosthet Dent, 2016,115(4):495-500

[15] Xie H, Shen S, Qian M, et al. Effects of acid treatment on dental zirconia: an in vitro study [J]. PLoS One, 2015,10(8):e0136263

[收稿日期] 2016-03-28

(上接第 24 页)

44211-44217

[13] Hsu DS, Wang HJ, Tai SK, et al. Acetylation of snail modulates the cytokinome of cancer cells to enhance the recruitment of macrophages [J]. Cancer Cell, 2014,26(4):534-548

[14] Scholz C, Weinert BT, Wagner SA, et al. Acetylation site specificities of lysine deacetylase inhibitors in human cells[J]. Nat Biotechnol, 2015,33(4):415-423

[15] Jeffries MA, Sawalha AH. Autoimmune disease in the epigenetic era: how has epigenetics changed our understanding of disease and how can we expect the field to evolve?[J].Expert Rev Clin Immu, 2015, 11(1):45-58

[16] Chan HM, La Thangue NB. p300/CBP proteins: HATs for transcriptional bridges and scaffolds[J]. J Cell Sci, 2001,

114(13):2363-2373

[17] Goodman RH, Smolik S. CBP/p300 in cell growth,transformation,and development [J]. Genes Dev,2000,14(13):1553-1577

[18] Schubeler D, Macalpine DM, Scalzo D, et al. The histone modification pattern of active genes revealed through genome-wide chromatin analysis of a higher eukaryote [J]. Genes Dev, 2004,18(11):1263-1271

[19] O'Neill LP, Turner BM. Histone H4 acetylation distinguishes coding regions of the human genome from heterochromatin in a differentiation-dependent but transcription-independent manner[J]. EMBO J, 1995, 14(16):3946-3957

[收稿日期] 2016-04-20