

# Atrophin-1 全长基因稳定转染和瞬时转染真核细胞系的表达分析

张鑫 顾卫红 王国相

**【摘要】 目的** 建立正常(CAG重复次数为19次)和异常(CAG重复次数为82和66次)*atrophin-1* [齿状核红核苍白球路易体萎缩(DRPLA)致病基因]全长基因真核表达体系,通过观察细胞形态及蛋白质表达水平和分布情况,比较稳定转染和瞬时转染两种细胞表达体系,为进一步研究建立良好的细胞模型。**方法** 基于已构建的GFP-*atrophin-1*-Q19/Flp-In TREx293和GFP-*atrophin-1*-Q82/Flp-In TREx293两种稳定转染细胞株,利用四环素调控系统Tet-on诱导表达。正置荧光显微镜观察正常与异常*atrophin-1*融合蛋白在细胞中的表达定位,电子显微镜观察细胞超微结构的改变;脂质体介导法将重组真核表达质粒GFP-*atrophin-1*-Q19和GFP-*atrophin-1*-Q66瞬时转染293T和SH-SY5Y细胞,HE染色、倒置荧光显微镜和电子显微镜分别观察细胞形态结构、蛋白质表达定位和细胞超微结构,Western blotting检测*atrophin-1*融合蛋白表达水平。**结果** 在稳定转染体系中,绿色荧光信号大多位于细胞核内,异常蛋白质呈不均匀分布且有少数聚集现象;电子显微镜观察异常细胞胞核结构欠完整,核膜皱缩,核内结构紊乱。在瞬时转染293T细胞体系中,HE染色可见异常细胞核内形成粉紫色嗜酸性小体;大量*atrophin-1*融合蛋白在核内呈点状聚集现象;电子显微镜观察异常细胞核膜皱缩严重,核内大量电子致密物沉积且核仁消失;Western blotting检测均表达*atrophin-1*融合蛋白。在转染的SH-SY5Y细胞体系中,蛋白质表达定位及Western blotting检测结果与转染293T细胞基本一致。**结论** 包含异常扩增多聚谷氨酰胺链的*atrophin-1*融合蛋白在真核表达体系中可产生明显的核内聚集现象,并引起细胞形态改变,此为研究DRPLA核内包涵体的形成及其在发病中的作用,以及进一步的干预治疗奠定了理论基础。

**【关键词】** 脊髓小脑共济失调; 基因; 转染; 细胞,培养的; 显微镜检查,荧光

DOI:10.3969/j.issn.1672-6731.2011.01.016

**Analysis of the expression of normal and mutant full-length *atrophin-1* gene in stable and transient transfected eukaryotic cell line** ZHANG Xin, GU Weihong, WANG Guoxiang. Movement Disorder & Neurogenetics Research Center, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China  
Corresponding author: GU Weihong (Email: jane55.gu@vip.sina.com)

**【Abstract】 Objective** To establish eukaryotic expression system of full-length gene in normal [CAG repeats (Q19)] and abnormal [CAG repeats (Q82 and Q66)] *atrophin-1* [the pathogenic gene of dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA)]. To compare the expression system of stable and transient transfected cell line by observing the cellular appearance and *atrophin-1* fusion protein expression and its distribution for further research on the establishment of a fine cell model. **Methods** Based on the 2 established stable transfected green-fluorescent protein (GFP)-*atrophin-1*-Q19/Flp-In TREx293 and GFP-*atrophin-1*-Q82/Flp-In TREx293 cell lines, Tet-on system was used to induce the expression, which contained normal and abnormal *atrophin-1* full-length gene and GFP fusion proteins, respectively. Meanwhile, GFP-*atrophin-1*-Q19 and GFP-*atrophin-1*-Q66 recombinant plasmids were transiently transfected into 293T cells and SH-SY5Y cells respectively with Lipofectamine™ 2000. The expression and localization of normal and abnormal *atrophin-1* fusion proteins in the cells were detected by light

microscope with HE staining and fluorescence microscope; the ultrastructure of the cells were observed by electron microscope; the expression of GFP-*atrophin-1* fusion proteins were detected by Western blotting. **Results** In stable

基金项目:2007-2009年度卫生部部属(管)医院临床学科重点项目(项目编号:卫规财函[2007]353号)

作者单位:100029 北京,卫生部中日友好医院运动障碍与神经遗传病研究中心

通信作者:顾卫红(Email:jane55.gu@vip.sina.com)

transfected system, the green fluorescence signals were detected in the nucleus, and abnormal proteins were not uniformly distributed while some were aggregated. Electron microscope showed shrinkaged nuclear membrane and abnormal intranuclear structure in abnormal cells. In transient transfection of 293T, Q66 protein aggregated in the nucleus which was detected as acidophilic bodies by HE staining-light microscope and atrophin-1 fusion protein as punctuate pattern by fluorescence microscope. Under the observation of electron microscope, great quantity of electron-dense substance accumulation, distinct shrinkage nuclear membrane and nucleus disappearance were seen in abnormal cells. The expression of GFP-atrophin-1 fusion proteins were detected by Western blotting. The location of protein expression and Western blotting results in transient transfected SH-SY5Y cells system were essentially similar to those in transfected 293T cells. **Conclusion** In eukaryotic cell expression system, atrophin-1 with amplified polyglutamine chain may induce obvious aberrant aggregation in nucleus, and alteration of cellular appearance. The establishment of atrophin-1 expression eukaryotic cell model will provide the foundation for the research of pathogenesis of DRPLA, and therotic basis for further investigation of clinical intervention.

**【Key words】** Spinocerebellar ataxias; Genes; Transfection; Cells, cultured; Microscopy, fluorescence

齿状核红核苍白球路易体萎缩(DRPLA)是常染色体显性遗传性神经变性疾病,为遗传性脊髓小脑共济失调(SCA)的一种亚型。临床主要表现为不同程度痴呆、言语障碍、共济失调、癫痫和不由自主运动(包括舞蹈样动作、震颤和肌阵挛)等;病理改变则以齿状核、红核、苍白球、路易小体(LB)变性萎缩为主,因此而得名。迄今为止,文献报道的DRPLA家系大部分来自日本,致病基因定位于12p13.31,编码 atrophin-1 融合蛋白(ATN1),其第5号外显子存在胞嘧啶-腺嘌呤-鸟嘌呤(CAG)重复序列,正常重复范围为3~36次,异常重复范围为49~88次<sup>[1-2]</sup>。正常 atrophin-1 融合蛋白定位于胞质和胞核,参与基因调控与转录<sup>[3-4]</sup>,而异常重复的CAG则导致编码蛋白中的多聚谷氨酰胺(PolyQ)链延长而致病,为一种多聚谷氨酰胺疾病,突变蛋白在神经元内异常聚集形成包涵体为该类疾病的共同病理学特征之一,但包涵体的形成在发病过程中的作用尚存有争议,为目前国内外研究的热点。本研究基于人胚胎肾T细胞(293T细胞系)和人骨髓神经母细胞瘤(SH-SY5Y细胞系)已建立的 atrophin-1 全长基因的真核表达体系,对正常和异常重复的 atrophin-1 融合蛋白的表达和分布情况,以及其对细胞形态结构的影响进行观察分析。

## 材料与方 法

### 一、实验材料

1. 细胞株来源 稳定转染细胞株[绿色荧光蛋白(GFP)-atrophin-1-Q19/Flp-In TREx293(含19个多聚谷氨酰胺)和 GFP-atrophin-1-Q82/Flp-In

TREx293(含82个多聚谷氨酰胺)],由日本东京大学附属医院 Tsuji 教授惠赠。该细胞株是基于四环素调控系统 Tet-on 调控表达的 Flp-In TREx293 细胞系(美国 Invitrogen 公司)构建的,含正常和异常 atrophin-1 全长基因,以及绿色荧光蛋白融合蛋白。293T 细胞株和 SH-SY5Y 细胞株购自北京协和细胞资源中心。

2. 质粒载体 GFP-atrophin-1-Q66 和 GFP-atrophin-1-Q19 细胞株由日本东京大学附属医院 Tsuji 教授惠赠。

3. 试剂与仪器 (1)主要试剂:DMEM 高糖培养基[含 100 μg/ml 潮霉素 B (hygromycin B, 德国 Roche 公司)、15 μg/ml 杀稻瘟素(blasticidin, 美国 Invitrogen 公司)和体积分数为 10% 胎牛血清(美国 HyClone 公司)]由美国 Gibco 公司提供。盐酸四环素为美国 Amresco 公司产品。Lipofectamine™ 2000 (0.75 ml)由美国 Invitrogen 公司提供。免疫试剂中 I 抗工作液(1:1000)为兔抗绿色荧光蛋白单克隆抗体(anti-GFP, rabbit IgG fraction, 2 mg/ml)购自美国 Invitrogen 公司;红外荧光标记的 II 抗工作液(1:10 000)为羊抗兔多克隆抗体(IRDye800 conjugated antibodies, 1 mg/ml),由美国 Rockland 公司提供。荧光探针染料 Hoechst 33342 购自美国 Invitrogen 公司。抗淬灭剂(Fluoromount-G™, 25 ml)为美国 Southern Biotech 公司产品。(2)主要仪器:BX-51 正置荧光显微镜和 IX-71 倒置荧光显微镜均购自日本 Olympus 公司。H-600 电子显微镜由日本 Hitachi 公司提供。Odyssey 双色红外激光成像系统(700 nm/800 nm)为美国 LI-COR 公司产品。

## 二、实验方法

1. *Atrophin-1* 全长基因稳定转染和瞬时转染真核细胞系 (1) 稳定转染细胞系的诱导表达: 复苏 GFP-*atrophin-1*-Q19/Flp-In TREx293 细胞株和 GFP-*atrophin-1*-Q82/Flp-In TREx293 细胞株, 分别置于 25 cm<sup>2</sup> 培养瓶中, DMEM 高糖培养基、37 ℃、体积分数为 5% 二氧化碳培养箱孵育, 光学显微镜下观察细胞融合约达 95% 即以 1:3 比例传代。按照细胞密度 10<sup>6</sup> 个/孔接种于预先置入盖玻片的 6 孔板, 继续培养至细胞融合达 60%~70%, 以终浓度 1 μg/ml 盐酸四环素进行诱导, 24 h 后荧光显微镜下观察。(2) 瞬时转染细胞系的诱导表达: 复苏 293T 或 SH-SY5Y 细胞, 置于 25 cm<sup>2</sup> 培养瓶中, 含体积分数为 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基、37 ℃、体积分数为 5% 二氧化碳培养箱孵育, 显微镜下观察细胞融合约达 95% 即 1:3 比例传代。将 10<sup>6</sup> 个细胞接种于 60 mm 培养皿或 6 孔板, 当细胞融合达 80% 时采用 Lipofectamine™ 2000 进行转染。在不含胎牛血清的 DMEM 高糖培养基中加入 GFP-*atrophin-1*-Q66 或 GFP-*atrophin-1*-Q19 质粒与 Lipofectamine™ 2000 混合物 (1.00 μg : 2.50 μl), 37 ℃、体积分数为 5% 二氧化碳培养箱孵育 4~6 h, 含体积分数为 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基继续培养 24 h, 以备分析。

2. *Atrophin-1* 融合蛋白表达检测 (1) HE 染色: 瞬时转染后培养 24 h 的细胞经磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤 1 min (×1 次), 中性甲醛溶液固定, 苏木素染色 15 min, 稀盐酸乙醇分色 30 s, 伊红染色 10 min, 梯度乙醇脱色, 二甲苯透明 15 min (×2 次), 封片, 光学显微镜下观察并照相。(2) 荧光显微镜观察: 稳定转染的 GFP-*atrophin-1*-Q19/Flp-In TREx293 和 GFP-*atrophin-1*-Q82/Flp-In TREx293 细胞, 经盐酸四环素诱导 24 h 后, 正置荧光显微镜下观察正常或异常 *atrophin-1* 融合蛋白在细胞内的表达分布。瞬时转染后培养 24 h 的细胞以 Hoechst 33342 复染细胞核, 倒置荧光显微镜观察 *atrophin-1* 融合蛋白在 293T 或 SH-SY5Y 细胞的表达分布。(3) 电子显微镜观察: 经盐酸四环素诱导 24 h, 稳定转染细胞, 以及瞬时转染并培养 24 h 的 293T 和 SH-SY5Y 细胞, 经磷酸盐缓冲液洗涤 1 min (×1 次), 室温下以离心半径 8.27 cm、离心速度 1500 r/min 高速离心 5 min, 收集细胞, 4 ℃、体积分数为 2.5% 戊二醛溶液固定, 梯度丙酮脱水、浸透、包埋, 超薄切片。H-600 电子显微镜观察并摄像。(4) Western blotting 检测: 收集瞬时转染

并培养 24 h 的 293T 和 SH-SY5Y 细胞, 预冷磷酸盐缓冲液洗涤细胞 1 min, 收获细胞, 置 1.50 ml 离心管中, 每管 400 μl 细胞裂解液, 冰浴裂解 30 min, 离心半径 8.27 cm、12 000 r/min 高速离心 10 min, 取上清液, 二辛可宁酸 (BCA) 法进行蛋白定量检测。采集 20 μg 总蛋白上样, 以质量分数为 10% 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离蛋白质, 积层胶 60 V 电泳 30 min, 分离胶 110 V 电泳 2 h。半干法将蛋白质转移至硝酸纤维素 (NC) 膜 100 V 反应 1 h, 质量分数为 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h。弃封闭液, 加入兔抗绿色荧光蛋白 I 抗, 4 ℃ 孵育过夜, 磷酸盐缓冲液冲洗 15 min (×3 次), 加入经红外荧光标记的羊抗兔 II 抗, 室温孵育 1 h, 磷酸盐缓冲液冲洗 15 min (×3 次), 化学发光显色试剂盒显色, Odyssey 双色红外激光成像系统分析, 并与未转染组比较。

## 结 果

### 一、*Atrophin-1* 融合蛋白在细胞内的表达分布

1. 稳定转染 GFP-*atrophin-1*-Q19/Flp-In TREx293 和 GFP-*atrophin-1*-Q82/Flp-In TREx293 细胞经盐酸四环素诱导 24 h 后, 正置荧光显微镜观察显示, 仅不足 10% 细胞表达 *atrophin-1* 融合蛋白, 正常 *atrophin-1* 融合蛋白呈弥散性分布于整个细胞核内, 而异常 *atrophin-1* 融合蛋白则在细胞核内呈现少量聚集分布 (图 1)。

2. 瞬时转染 HE 染色显示, 瞬时转染 GFP-DRPLA-Q19 的 293T 细胞结构正常, 核仁清晰可见; 而转染 GFP-DRPLA-Q66 的 293T 细胞胞核内出现粉紫色嗜酸性小体, 似圆形, 无明显核仁 (图 2)。倒置荧光显微镜观察显示, 瞬时转染后培养 24 h 的 293T 和 SH-SY5Y 细胞表达 50%~60% *atrophin-1* 融合蛋白, 正常 *atrophin-1* 融合蛋白均匀分布于细胞核内, 异常 *atrophin-1* 融合蛋白在细胞核内呈现大量点状聚集分布 (图 3, 4)。

### 二、*Atrophin-1* 融合蛋白对细胞超微结构的影响

1. 稳定转染 电子显微镜观察 GFP-*atrophin-1*-Q19/Flp-In TREx293 和 GFP-*atrophin-1*-Q82/Flp-In TREx293 细胞形态, 前者细胞核结构完整、核膜光滑、核仁清晰且形态正常; 后者核膜严重皱缩, 核仁模糊 (图 5)。

2. 瞬时转染 电子显微镜观察显示, 大多数转染 GFP-*atrophin-1*-Q19 的 293T 细胞具有较为完整的

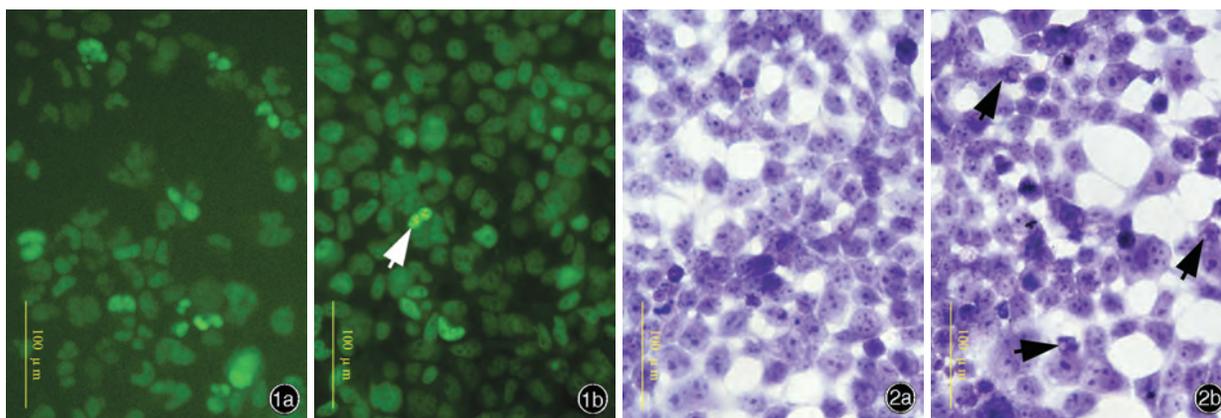


图1 正置荧光显微镜观察稳定转染细胞系 atrophin-1 融合蛋白表达水平及分布 ×400 1a GFP-atrophin-1-Q19/Flp-In TREx293 细胞中正常 atrophin-1 融合蛋白的绿色荧光信号弥散性分布于细胞核内 1b GFP-atrophin-1-Q82/Flp-In TREx293 细胞中异常 atrophin-1 融合蛋白的绿色荧光信号在细胞核内呈点状聚集分布(箭头所示) 图2 光学显微镜观察瞬时转染 293T 细胞所见 HE 染色 ×400 2a 转染 GFP-DRPLA-Q19 的 293T 细胞结构正常 2b 转染 GFP-DRPLA-Q66 的 293T 细胞核内可见粉紫色的嗜酸性小体(箭头所示)

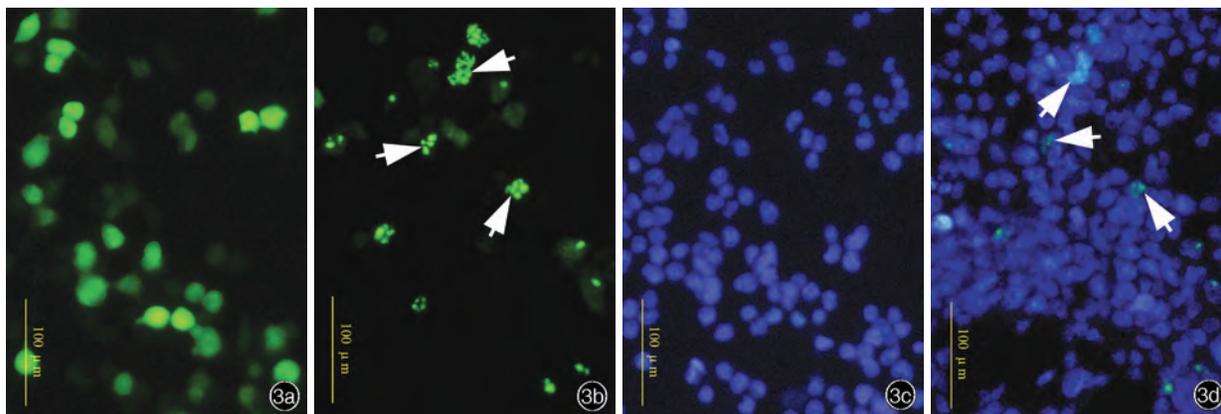


图3 倒置荧光显微镜观察瞬时转染 293T 细胞 atrophin-1 融合蛋白表达水平及分布 ×400 3a 正常 atrophin-1 融合蛋白的绿色荧光信号均匀分布于细胞核内 3b 异常 atrophin-1 融合蛋白的绿色荧光信号在细胞核内呈点状聚集分布(箭头所示) 3c 为图 3a 同一视野 Hoechst 33342 复染细胞核(蓝光荧光通道) 3d 为图 3b 同一视野 Hoechst 33342 复染细胞核(蓝光荧光通道, 箭头所示)

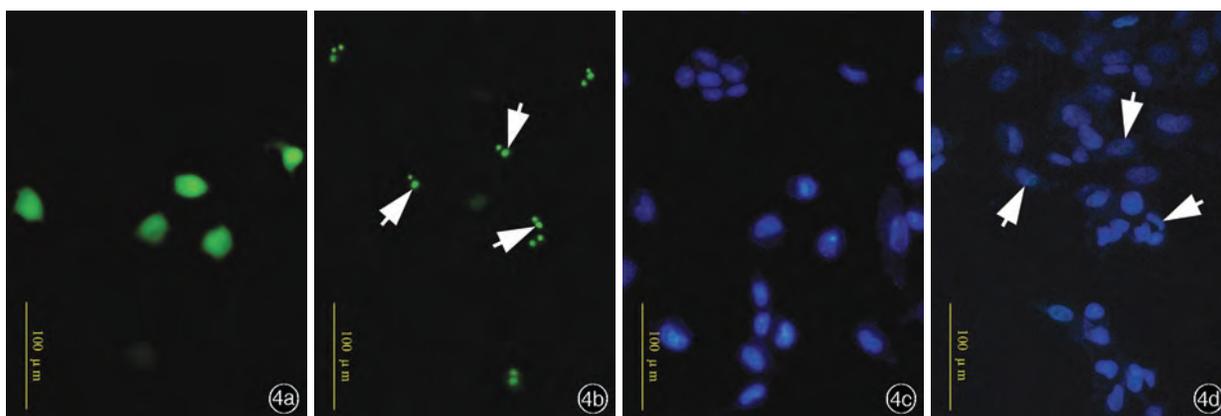
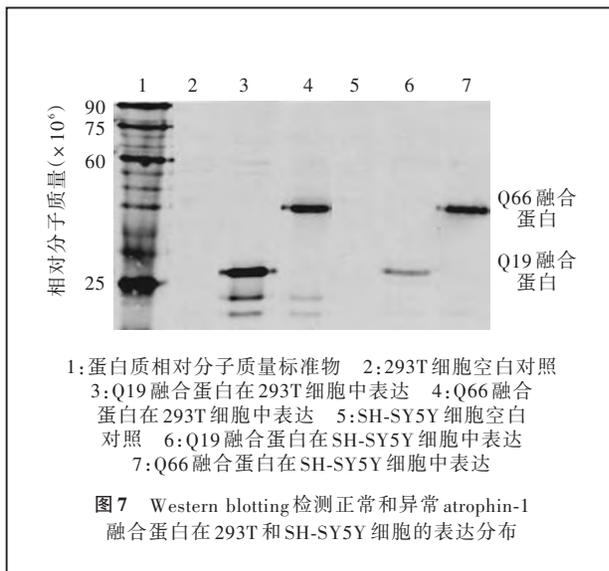
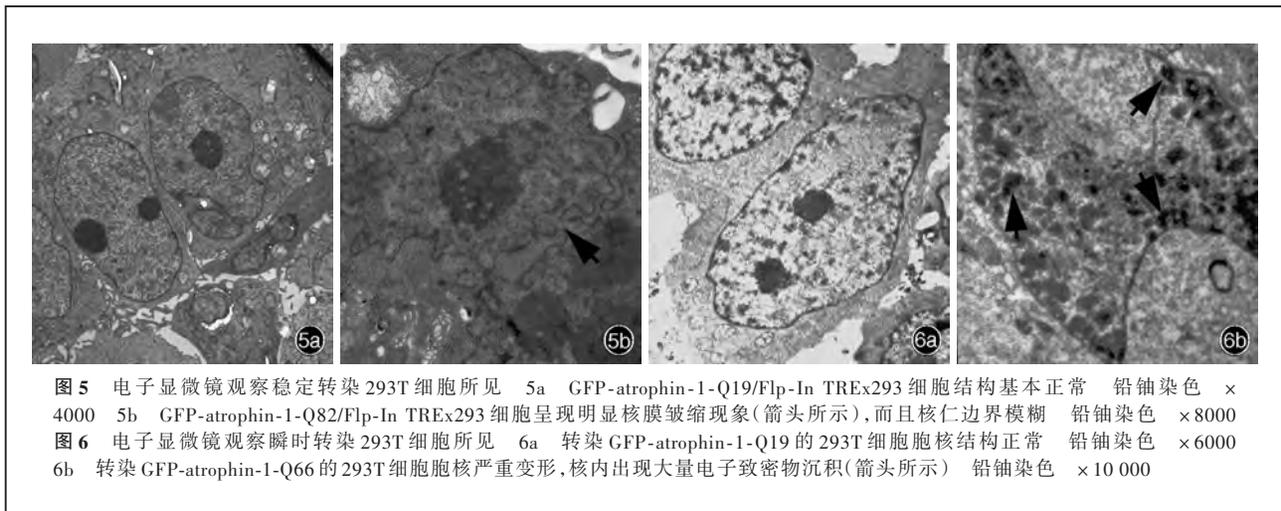


图4 倒置荧光显微镜观察瞬时转染 SH-SY5Y 细胞 atrophin-1 融合蛋白表达水平及分布 ×400 4a 正常 atrophin-1 融合蛋白绿色荧光信号均匀分布于细胞核内 4b 异常 atrophin-1 融合蛋白绿色荧光信号在细胞核内呈点状聚集分布(箭头所示) 4c 为图 4a 同一视野 Hoechst 33342 复染细胞核(蓝光荧光通道) 4d 为图 4b 同一视野 Hoechst 33342 复染细胞核(蓝光荧光通道, 箭头所示)

细胞核结构,且核仁清晰可见;而转染 GFP-atrophin-1-Q66 的 293T 细胞核严重变形,核膜扭曲,核内出

现大量电子致密物沉积,且核仁消失(图6)。提示:可能为异常蛋白质在细胞核内聚集形成包涵体。



### 三、Atrophin-1 融合蛋白的表达

Western blotting 检测显示,经瞬时转染并培养 24 h 的 293T 和 SH-SY5Y 细胞均表达 atrophin-1 融合蛋白(图 7)。由于稳定转染细胞 atrophin-1 融合蛋白表达水平极低,故未进行 Western blotting 检测。

### 讨 论

多聚谷氨酰胺疾病为遗传性神经退行性疾病,由基因编码区 CAG 重复序列异常扩增引起蛋白质中多聚谷氨酰胺链延长而致病。迄今为止,已发现 9 种此类疾病,包括脊髓小脑共济失调 1~3 型、6 型、7 型、17 型、DRPLA、亨廷顿病(HD)和脊髓延髓肌萎缩症(SBMA)<sup>[5-6]</sup>。由于此类疾病具有相似的基因突变特征,而且神经元内均可见包涵体,提示它们可能具有相同的发病机制。目前,多聚谷氨酰胺链延

长的突变蛋白质是通过何种途径导致神经元变性、死亡的问题,已成为研究热点。由于包涵体形成是多聚谷氨酰胺疾病的病理学特征,因此早期研究认为,包涵体对神经元具有毒性,是诱发该病发病的主要因素。但越来越多的研究显示,突变蛋白质形成的错误折叠单体或寡聚体的毒性很可能比包涵体更大,而包涵体作为复杂聚集过程的最终产物,可能是神经元的一种自我保护<sup>[7]</sup>。目前公认的观点是,异常蛋白质具有获得性毒性,而相关的发病机制有多种学说,包括异常蛋白质错误折叠和构象改变<sup>[8]</sup>,翻译后加工(蛋白水解切割<sup>[9]</sup>、磷酸化<sup>[10]</sup>和苏素化<sup>[11]</sup>),分子伴侣相互作用<sup>[12]</sup>,泛素-蛋白酶体系统(UPS)异常<sup>[13-14]</sup>,诱发凋亡,线粒体结构异常以及基因转录调节障碍等<sup>[15-20]</sup>。

目前对于多聚谷氨酰胺疾病发病机制的研究主要基于细胞模型和动物模型,而异常多聚谷氨酰胺蛋白毒性获得机制的细胞模型相对易于建立,且有利于进行高通量筛选及相应的干预实验。日本的 Tsuji 教授及其同事于 1994 年克隆出 atrophin-1 致病基因并一直致力于这方面的研究,在这一研究领域居国际领先水平。Atrophin-1 融合蛋白兼具氨基末端(N 末端)核定位信号(NLS)和羧基末端(C 末端)核输出信号(NES)<sup>[21]</sup>,同时可与膜受体、核受体和转录因子相互作用,在转录的调控中协助核受体及其他转录因子共同调节转录<sup>[3-4]</sup>。在本研究中,我们与 Tsuji 教授的研究组合作,共同建立了正常(Q19)和异常(Q66 和 Q82) atrophin-1 全长基因与绿色荧光蛋白融合蛋白的细胞表达体系,较单纯转染蛋白质中多聚谷氨酰胺片段更接近生理状态,为多聚谷氨酰胺疾病发病机制的研究建立了良好的细

胞模型。在本研究结果中,无论是光学显微镜、荧光显微镜还是电子显微镜均观察到异常 atrophin-1 融合蛋白在细胞核内呈明显聚集现象,细胞超微结构紊乱;Western blotting 检测正常和异常 atrophin-1 融合蛋白均呈阳性表达。稳定转染细胞株构建过程为:将含有 CAG 重复序列为 19 次(正常)和 82 次(异常)的 *atrophin-1* 全长基因序列片段插入 pcDNA5/FRT/TO 表达载体 TetO 调控元件(TetR 结合区)下游,通过同源重组,将质粒插入细胞系基因组 *LacZ-Zeocin* 融合基因的上游,从而改变其抗性,同时根据潮霉素 B 和杀稻瘟素筛选稳定转染细胞株,使其表达受四环素调控 (<http://products.invitrogen.com/ivgn/product/V652020>)。荧光显微镜观察稳定转染过程中均表达正常和异常 atrophin-1 融合蛋白,后者呈现蛋白质聚集现象,细胞超微结构改变,表现为核膜严重皱缩、核仁边界不清。稳定转染细胞中仅有不足 10% 的细胞表达 atrophin-1 融合蛋白,考虑可能与以下两个因素有关:目的基因整合至宿主细胞染色体,表达基于少量拷贝;或四环素诱导不完全。瞬时转染 GFP-*atrophin-1*-Q19 和 GFP-*atrophin-1*-Q66 至 293T 和 SH-SY5Y 细胞,50%~60% 细胞表达绿色荧光蛋白。由于表达基于宿主细胞内大量拷贝,明显高于稳定转染体系,则更为有利于观察正常和异常 atrophin-1 融合蛋白在细胞内的表达及定位。瞬时转染的 293T 细胞经过 HE 染色后,光学显微镜下观察可见转染 GFP-*atrophin-1*-Q66 的细胞核内出现嗜酸性小体,说明包涵体在形成过程中可能会募集一些其他蛋白质,相互结合后呈嗜酸性。荧光显微镜观察显示,正常 atrophin-1 融合蛋白均匀分布于细胞核内,而异常 atrophin-1 融合蛋白则在细胞核内呈现点状聚集分布;超微结构观察可见,转染 GFP-*atrophin-1*-Q66 的细胞核内有大量电子致密物沉积。为了更进一步观察正常和异常 atrophin-1 融合蛋白在神经元中的表达及定位情况,我们特别选择 SH-SY5Y 细胞作为研究的靶细胞,所得结果与 293T 细胞相似。

本研究首次在国内建立 *atrophin-1* 全长基因真核表达体系,初步观察到异常 atrophin-1 融合蛋白引起核内包涵体的形成,并对 293T 细胞形态产生明显影响。以此细胞模型为基础开展进一步的细胞毒性相关研究,并进行相应的干预实验,将有助于分析异常蛋白质的毒性作用环节,以探索多聚谷氨酰胺疾病的发病机制。

## 参 考 文 献

- [1] Schöls L, Bauer P, Schmidt T, et al. Autosomal dominant cerebellar ataxias: clinical features, genetics, and pathogenesis. *Lancet Neurol*, 2004, 3:291-304.
- [2] 郝莹, 顾卫红, 王国相, 等. 齿状核红核苍白球路易体萎缩一例: 临床表型与基因突变分析. *中国现代神经疾病杂志*, 2010, 10:637-641.
- [3] Wang L, Tsai CC. Atrophin proteins: an overview of a new class of nuclear receptor corepressors. *Nucl Recept Signal*, 2008, 6:E9.
- [4] Shen Y, Peterson AS. Atrophins' emerging roles in development and neurodegenerative disease. *Cell Mol Life Sci*, 2009, 66:437-446.
- [5] Zoghbi HY, Orr HT. Glutamine repeats and neurodegeneration. *Annu Rev Neurosci*, 2000, 23:217-247.
- [6] 顾卫红, 王国相, 王康, 等. 脊髓小脑共济失调 3 型临床变异型特征及突变分析. *中国现代神经疾病杂志*, 2008, 8:134-138.
- [7] Ross CA, Poirier MA. Opinion: what is the role of protein aggregation in neurodegeneration? *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, 6:891-898.
- [8] Takahashi T, Katada S, Onodera O. Polyglutamine diseases: where does toxicity come from? What is toxicity? Where are we going? *J Mol Cell Biol*, 2010, 2:180-191.
- [9] Ellerby LM, Andrusiak RL, Wellington CL, et al. Cleavage of atrophin-1 at caspase site aspartic acid 109 modulates cytotoxicity. *J Biol Chem*, 1999, 274:8730-8736.
- [10] Okamura-Oho Y, Miyashita T, Nagao K, et al. Dentatorubral-pallidolusian atrophy protein is phosphorylated by C-Jun NH2-terminal kinase. *Hum Mol Genet*, 2003, 12:1535-1542.
- [11] Terashima T, Kawai H, Fujitani M, et al. SUMO-1 co-localized with mutant atrophin-1 with expanded polyglutamines accelerates intranuclear aggregation and cell death. *Neuroreport*, 2002, 13:2359-2364.
- [12] Meriin AB, Sherman MY. Role of molecular chaperones in neurodegenerative disorders. *Int J Hyperthermia*, 2005, 21:403-419.
- [13] Li X, Li H, Li XJ. Intracellular degradation of misfolded proteins in polyglutamine neurodegenerative diseases. *Brain Res Rev*, 2008, 59:245-252.
- [14] Finkbeiner S, Mitra S. The ubiquitin-proteasome pathway in Huntington's disease. *Scientific World Journal*, 2008, 8:421-433.
- [15] Bauer PO, Nukina N. The pathogenic mechanisms of polyglutamine diseases and current therapeutic strategies. *J Neurochem*, 2009, 110:1737-1765.
- [16] Shao J, Diamond MI. Polyglutamine diseases: emerging concepts in pathogenesis and therapy. *Hum Mol Genet*, 2007, 16:R115-123.
- [17] Riley BE, Orr HT. Polyglutamine neurodegenerative diseases and regulation of transcription: assembling the puzzle. *Genes Dev*, 2006, 20:2183-2192.
- [18] Gatchel JR, Zoghbi HY. Diseases of unstable repeat expansion: mechanisms and common principles. *Nat Rev Genet*, 2005, 6:743-755.
- [19] Rouaux C, Loeffler JP, Boutillier AL. Targeting CREB-binding protein (CBP) loss of function as a therapeutic strategy in neurological disorders. *Biochem Pharmacol*, 2004, 68:1157-1164.
- [20] van Roon-Mom WM, Reid SJ, Faull RL, et al. TATA-binding protein in neurodegenerative disease. *Neuroscience*, 2005, 133:863-872.
- [21] Nucifora FC Jr, Ellerby LM, Wellington CL, et al. Nuclear localization of a non-caspase truncation product of atrophin-1, with an expanded polyglutamine repeat, increases cellular toxicity. *J Biol Chem*, 2003, 278:13047-13055.

(收稿日期:2010-12-20)