

流式细胞术检测组蛋白乙酰化水平方法的建立与应用

李建辉, 汪春付, 白帆, 庄严, 毛卓君, 孙永涛

第四军医大学附属唐都医院传染科, 西安 710038

摘要: 组蛋白去乙酰化酶抑制剂是近年来出现的一类新的抗肿瘤药物, 在艾滋病等其他疾病中同样也受到关注。但是在基础和临床研究中, 目前还缺乏统一可靠的组蛋白乙酰化水平的检测手段。本文利用全血和外周血单个核细胞, 通过一系列的对比实验, 比较了不同样品处理温度(冰上和室温)、破膜方法(细胞内因子染色破膜和核内因子染色破膜)、抗体剂量(抗体滴定)和抗体孵育时间(时间梯度)等实验条件对流式细胞术检测的影响, 最终建立了一套基于流式细胞术的组蛋白乙酰化水平检测手段。同时, 将优化后的流式细胞检测技术应用于西达本胺(目前国内唯一上市的组蛋白去乙酰化酶抑制剂)的体外实验和临床试验, 结果均证明本文建立的组蛋白乙酰化流式细胞检测方法可以作为基础和临床研究中一个可靠、快速、便捷的检测手段。

关键词: 流式细胞术; 组蛋白乙酰化; 组蛋白去乙酰化酶抑制剂

Establishment and application of a flow cytometry-based method for detecting histone acetylation levels

Jianhui Li, Chunfu Wang, Fan Bai, Yan Zhuang, Zhuojun Mao, Yongtao Sun

Department of Infectious Diseases, Tang-du Hospital affiliated to Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China

Abstract: Histone deacetylase inhibitors, which have also received attention in AIDS and other diseases, are a new class of anticancer drugs developed in recent years. However, there is still a lack of a unified and reliable method for detecting histone acetylation levels in basic and clinical research. In this study, we developed a flow cytometry-based method to detect histone acetylation levels by comparing different sample processing temperature (on ice vs. room temperature), permeabilization method (intracellular vs. nuclear), antibody dose (antibody titration) and antibody incubation time (time gradient) using whole blood and peripheral blood mononuclear cells. In addition, we applied this optimized method in in vitro experiment and clinical trial of Chidamide (the only China FDA approved HDACi), the result of which confirmed that the flow cytometry-based method for detecting histone acetylation levels is a reliable, fast and convenient method which can be used in basic and clinical research.

Keywords: flow cytometry; histone acetylation; histone deacetylation inhibitor

收稿日期: 2016-02-24; 修回日期: 2016-05-13

基金项目: 国家科技重大专项-艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治(编号: 2014ZX10001002) [Supported by the National Science and Technology Major Project (No. 2014ZX10001002)]

作者简介: 李建辉, 硕士研究生, 专业方向: 艾滋病功能性治愈。E-mail: lijianhui0403@outlook.com

通讯作者: 孙永涛, 博士, 教授, 研究方向: 艾滋病的基础与临床。E-mail: yongtaos@hotmail.com

DOI: 10.16288/j.yczs.16-065

网络出版时间: 2016/5/26 9:42:56

URI: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20160526.0942.004.html>

组蛋白乙酰化是表观遗传学研究的重要内容之一。组蛋白乙酰转移酶(Histone acetyltransferases, HATs)和组蛋白去乙酰化酶(Histone deacetylases, HDACs)可选择性使组蛋白 N-末端赖氨酸残基的 ϵ -氨基发生乙酰化或去乙酰化而影响基因转录^[1]。通常, HATs 使组蛋白乙酰化, 促进染色质的开放, 使染色质向活化的常染色质转变, 而 HDACs 使组蛋白去乙酰化, 降低核小体中 DNA 和转录因子间的可接近性, 使染色质向抑制的异染色质转变^[2]。此外, 乙酰化的组蛋白可招募含 Bromodomain 结构域的蛋白分子, 如染色质重塑复合体和转录因子等, 进而调控基因的表达。

组蛋白去乙酰化酶抑制剂(Histone deacetylase inhibitor, HDACi)可抑制 HDAC 活性, 增加组蛋白乙酰化水平, 从而影响基因的表达。目前研究发现 HDACi 在癌症和艾滋病等多种疾病中具有潜在应用价值^[3,4]。在相关药物的临床试验中, 组蛋白乙酰化水平的变化是药物作用效果的一个重要反映^[5]。在既往大多数研究中, 组蛋白乙酰化水平检测常采用酶联免疫吸附试验(ELISA), 但该方法需要提取组蛋白, 再进行乙酰化检测, 操作繁琐、影响因素较多、敏感度不足。为了简化操作、提升敏感度, Rigby 等^[6]建立了使用间接标记抗体进行流式细胞术检测的方法, 但未对实验条件进行优化。目前已有抗乙酰化组蛋白 H3 和 H4 直接标记流式抗体问世, 但缺少对实验条件的论证和说明。本研究采用全血和外周血单个核细胞(Peripheral blood mononuclear cell, PBMC)两种标本, 针对不同的样品处理温度、破膜方法、抗体剂量和抗体孵育时间等 4 个条件分别设计了对比实验, 最终确立了流式细胞检测组蛋白乙酰化水平的最佳实验条件, 并将优化后的流式细胞检测技术应用于体外实验和临床试验进行了验证。

1 材料和方法

1.1 标本来源和试剂

全血标本来自临床试验受试者。所有涉及药物干预和标本采集的事项均已获得第四军医大学唐都医院伦理委员会的批准和受试者本人的书面知情同意。

主要试剂包括: 西达本胺(Chidamide)分子式 $C_{22}H_{19}FN_4O_2$, 分子量 390.4 Da。体外实验用西达本

胺购自美国 Cayman Chemical 公司, 临床试验用西达本胺由深圳微芯生物提供。核内因子染色破膜套装, 固定液, 细胞内因子染色破膜液等试剂购自美国 Biolegend 公司。抗乙酰化组蛋白 H3 抗体 Milli-Mark™ Anti-Acetyl-Histone H3-PE 和抗乙酰化组蛋白 H4 抗体 Milli-Mark™ Anti-acetyl-Histone H4-PE 购自美国 Millipore 公司。抗乙酰化组蛋白 H3 抗体针对 9、14 位点乙酰化赖氨酸, 抗乙酰化组蛋白 H4 抗体针对 5、8、12、16 位点乙酰化赖氨酸。

1.2 方法

1.2.1 标本获取和外周血单个核细胞的分离

使用 EDTA 抗凝采血管采集受试者适量静脉血, 密度梯度离心法分离 PBMC。使用人淋巴细胞分离管(深圳达科为)分离 PBMC, 步骤如下: (1)RPMI 1640(美国 Cellgro 公司)与全血按照 1:1 混匀稀释, 将稀释后的血液倒入分离管中。分离液被筛板隔离, 不会与血液混合。(2)室温, $1000\times g$ 离心 20 min。加速与减速调整到第一档。(3)收集 PBMC。用移液器吸取上层血浆和 RPMI1640 混合液, 丢弃, 直接将剩余云雾层倒入新的离心管。红细胞和分离液被筛板隔离, 不会被倒出。(4)加入足量 RPMI1640 洗涤 2 次(室温, $485\times g$ 离心 10 min), 重悬到适当体积, 计数, 用于下一步实验。

1.2.2 细胞培养和西达本胺处理

体外实验使用 3 名受试者的 PBMC 500 nmol/L 浓度西达本胺刺激, 分别在 0 h、6 h、12 h、24 h、48 h、72 h 检测组蛋白乙酰化水平。6 孔板(美国 NUNC 公司)培养细胞, 每孔加入 2 mL R10(90% RPMI 1640、10% FBS、100 U/mL Penicillin、100 $\mu\text{g/mL}$ Streptomycin、10 mmol/L Hepes), 每孔细胞数为 1×10^7 。实验孔加入西达本胺, 对照孔加入 0.1% DMSO。37℃、5% CO_2 孵箱中孵育 6 h、12 h、24 h、48 h、72 h 后获取细胞进行流式细胞术检测。

1.2.3 流式细胞术检测

全血和 PBMC 两种标本在处理上有所不同, 分述如下: (1)全血标本: 新鲜全血取 50 μL , 有核细胞数在 $2\sim 3\times 10^5$, 按 2 $\mu\text{L}/\text{test}$ 分别加入 APC anti human CD3、APC/Cy7 anti-human CD8、FITC anti-human

CD4(以上抗体均购自美国 Biolegend 公司, 并已进行滴定), 避光孵育 20 min。采用 BD FACSTM Lysing Solution(10 \times , 美国 BD 公司)裂解红细胞, 步骤如下: 将裂红液用双蒸水按 1:10 稀释到 1 \times , 每一份标本加入 1 mL 裂红液, 裂解 20 min, 485 \times g 离心 5 min, PBS 洗涤 2 次, 再 485 \times g 离心 5 min。在最后一次洗涤细胞后加入固定液 1 mL/test, 避光孵育 20 min, 离心后弃固定液加入破膜液 1 mL/test, 离心后弃破膜液再加入破膜液 1 mL/test, 避光孵育 20 min, 离心后弃破膜液加入 Milli-MarkTM Anti-Acetyl-Histone H3-PE 或 Milli-MarkTM Anti-acetyl-Histone H4-PE, 避光孵育, PBS 洗涤后上机检测。(2)PBMC: PBMC 重悬至 100 μ L 流式管中, 细胞数在 2~3 \times 10⁵。PBMC 无红细胞裂解步骤, 其余操作方法和步骤与全血标本处理类似。条件优化实验中样品处理温度按照室温和冰上分组, 破膜方法按照胞内因子染色和核内因子染色破膜方法分组, 抗乙酰化组蛋白抗体剂量按照 0.5 μ L、1 μ L、1.5 μ L、2 μ L、2.5 μ L、3 μ L、4 μ L 分组; 抗乙酰化抗体孵育时间按照 20 min、40 min、60 min、90 min、120 min 分组。每组 3 份标本, 每份标本重复检测。西达本胺体外实验和临床试验按优化后的实验条件分别使用 PBMC 和全血进行流式细胞术检测。

1.2.4 流式细胞术分析

采用 BD FACSAriaTM II(美国 BD 公司)流式细胞仪进行上样, 对淋巴细胞设门, 按 10000 events/test 获取淋巴细胞, FlowJo X.0.7r2(美国 Tree Star 公司)软件分析。组蛋白乙酰化水平用 PE 通道的平均荧光强度(Mean fluorescence intensity, MFI)表示, 分别采集淋巴细胞、CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞的 PE MFI。

1.3 统计学分析

各组所得计量数据采用均数 \pm 标准差($\bar{X} \pm SD$)表示; GraphPad Prism Version 6.01(美国 GraphPad software 公司)作图分析。

2 结果与分析

2.1 样品处理温度对组蛋白乙酰化水平检测的影响

图 1A 和图 1B 分别为冰上和室温处理样品时获取的流式图, 结果显示室温处理样品细胞分群更明

显, 相对冰上处理样品分群更好。图 1C 和图 1D 分别为冰上和室温处理样品时 H3 和 H4 乙酰化水平数据, 室温处理样品时得到的 H3-PE 和 H4-PE 的 MFI 是冰上处理样品时得到的 MFI 约 4 倍。图 1E 和图 1F 分别为 H3 和 H4 乙酰化数据分析示例, 从流式直方图中可见 H4-PE 的 MFI 明显高于 H3-PE 的 MFI, H4-PE MFI 是 H3-PE MFI 的 4 倍左右。因全血标本和 PBMC 标本中得到的结果一致, 因此后续结果如无特别提及, 本文将仅列出全血标本的实验数据。

2.2 破膜方法对组蛋白乙酰化水平检测的影响

图 2 为胞内因子染色和核内因子染色两种不同破膜方法下 H3 和 H4 乙酰化水平数据, 结果显示两种破膜方法对 H3-PE MFI 影响不明显, 但核内因子染色破膜可明显提高 H4-PE MFI, MFI 是胞内因子染色破膜的 2 倍以上, 可见选择核内因子染色破膜对 H4 组蛋白乙酰化的检测更好。

2.3 抗体剂量对组蛋白乙酰化水平检测的影响

抗乙酰化组蛋白抗体按照 0.5 μ L、1.0 μ L、1.5 μ L、2.0 μ L、2.5 μ L、3.0 μ L、4.0 μ L/test 进行滴定, 细胞数为 2~3 \times 10⁵ cells/test。图 3 为不同抗体剂量下乙酰化水平数据, 结果表明当抗体剂量为 2 μ L/test 时达到饱和, H3-PE 和 H4-PE 的 MFI 都达到峰值, 再增加抗体剂量 MFI 也不再升高。

2.4 抗体孵育时间对组蛋白乙酰化水平检测的影响

本研究分别考察了 20 min、40 min、60 min、90 min、120 min 抗体孵育时间对组蛋白乙酰化检测的影响。图 4 为不同抗体孵育时间 H3 和 H4 乙酰化水平数据, 结果显示两种抗体都应至少孵育 60 min 才能达到最佳结合状态, 其中 H3-PE 抗体对孵育时间的依赖更明显, 孵育时间不足检测出的 MFI 明显降低, 仅为峰值的 1/3 左右。

2.5 西达本胺体外刺激 PBMC 后组蛋白乙酰化水平的变化

图 5 为西达本胺体外刺激 PBMC 后不同时间点 H3 和 H4 乙酰化数据。0 h 为基线组蛋白乙酰化水平, 西达本胺刺激后, 组蛋白乙酰化水平迅速升高, 12 h 达到峰值, 随后开始缓慢下降, 72 h 仍较基线水平高。

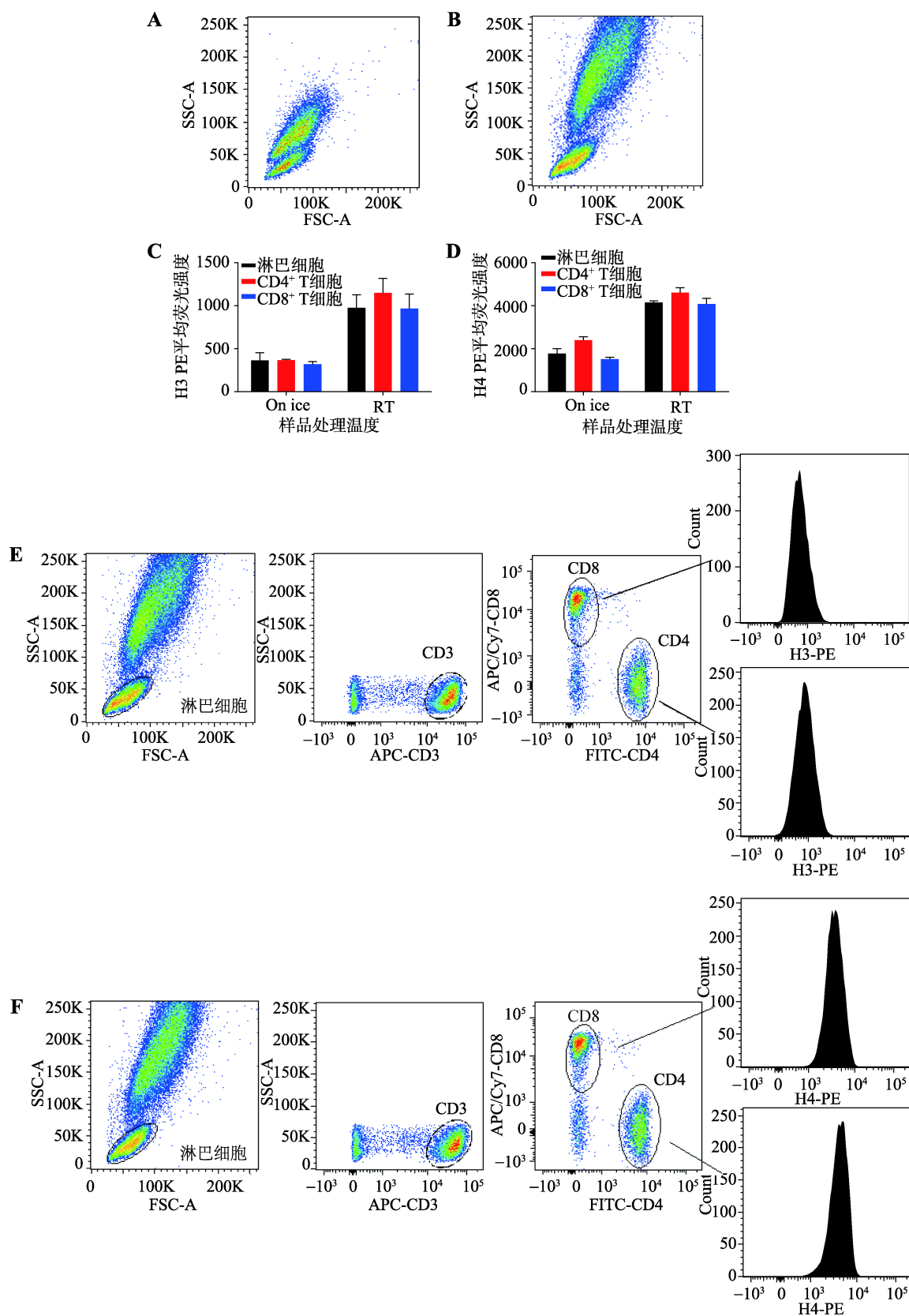


图 1 不同样品处理温度对组蛋白乙酰化水平检测的影响

Fig. 1 Effect of different sample processing temperature on histone acetylation level

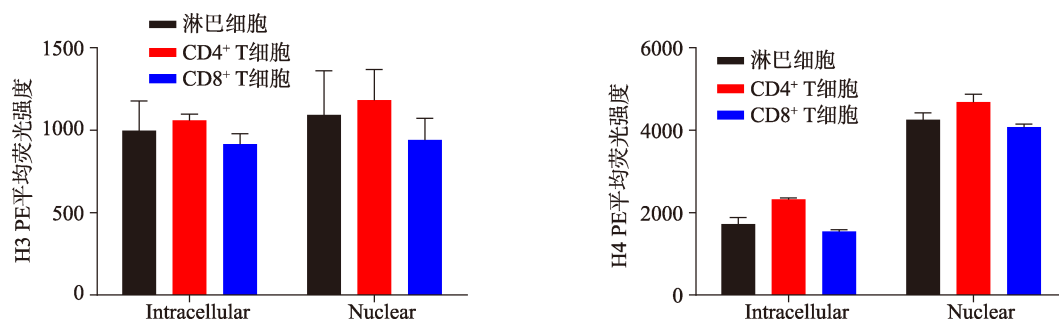


图 2 不同破膜方法对组蛋白乙酰化水平检测的影响

Fig. 2 Effect of different permeabilization method on histone acetylation level

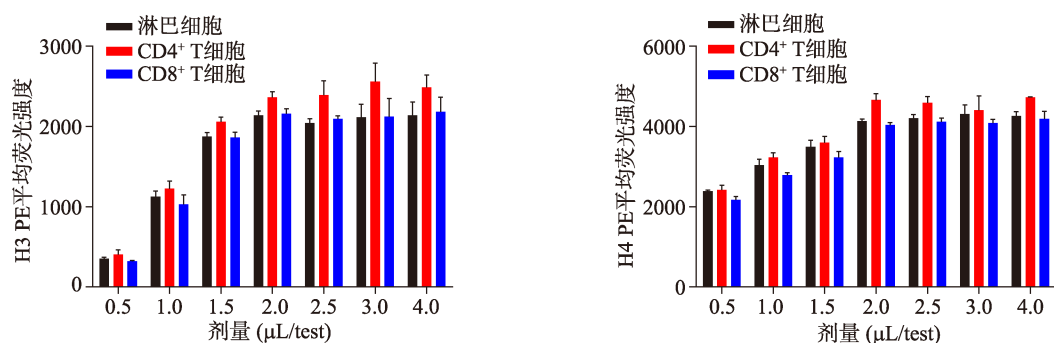


图 3 不同抗体剂量对组蛋白乙酰化水平检测的影响

Fig. 3 Effect of different antibody doses on histone acetylation level

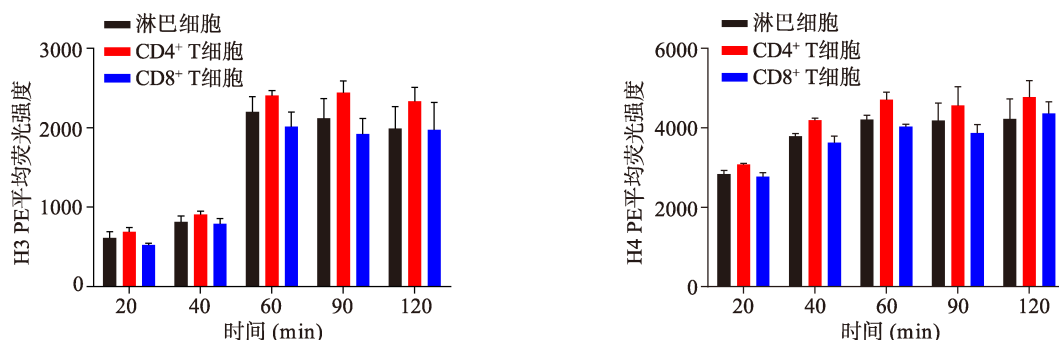


图 4 不同抗体孵育时间对组蛋白乙酰化水平检测的影响

Fig. 4 Effect of different antibody incubation time on histone acetylation level

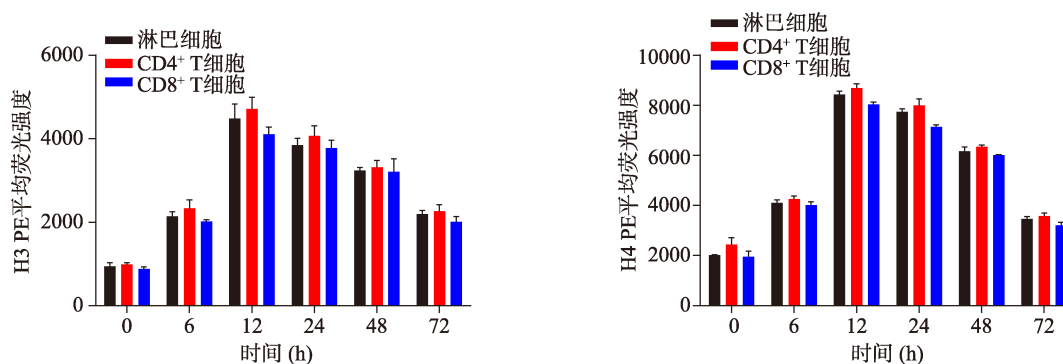


图 5 西达本胺体外刺激 PBMC 后组蛋白乙酰化水平随时间的变化

Fig. 5 Histone acetylation levels of PBMC after *in vitro* stimulation of Chidamide

2.6 流式检测方法在临床试验中的应用

在流式检测方法优化的基础上,进一步应用于临床试验组蛋白乙酰化水平随时间变化的检测(图 6)。4 名受试者口服 30 mg 西达本胺,分别在用药前 0 h(基线),用药后 1 h、2 h、6 h、12 h、24 h、48 h、72 h 采静脉血进行组蛋白乙酰化水平检测。用药后组蛋白乙酰化水平迅速升高,12 h 达到峰值,随后开始缓慢下降,72 h 与基线基本持平。结果表明流式细胞检测方法能很好的观察到体内西达本胺对组蛋白乙酰化水平的改变。

3 讨论

许多研究表明在肿瘤的发生、发展、迁移等过程中都存在组蛋白乙酰化修饰异常的现象,主要表现为特定位点赖氨酸低乙酰化,如 H2AK5、H3K9、H3K14、H3K18、H3K56、H4K12、H4K16 等^[7]。HDACi 可选择性抑制 HDAC 活性,增加组蛋白乙酰化水平,近年来在肿瘤治疗中受到重视。目前美国食品与药品监督管理局(FDA)已批准 4 个该类药物用于相关肿瘤的治疗,包括伏立诺他(Vorinostat)、罗米地辛(Romidepsin)、Belinostat、帕比司他(Panobinostat)。西达本胺(Chidamide)是目前中国 FDA 唯一批准的具有自主知识产权的 HDACi 药物。2012 年 Nature 报道了伏立诺他用于艾滋病的临床研究^[8],随后罗米地辛、帕比司他相继在艾滋病中进行了临床试验^[9,10]。研究表明 HDAC1、HDAC2、HDAC3 可被招募到 HIV-1 启动子 5' 长末端重复序列(Long terminal repeat, LTR),在 HIV-1 的潜伏中扮演了重要角色^[11,12]。HDACi 可打破 HIV-1 的潜伏状态,激活前病毒的转录表达,在艾滋病的“激活再杀死”(Shock and kill)策略中具有重要价值^[13]。在 HDACi 的艾滋病研究中,组蛋白乙酰化水平大多使用间接标记抗体进行流式检测,但相关实验条件未在文献中详细说明,也未对实验条件进行对比优化。本研究小组率先开展了西达本胺在艾滋病中的临床试验(ClinicalTrials.gov 注册号 NCT02513901),其中涉及了组蛋白乙酰化水平的检测。在检测方法的选择上借鉴已有的临床试验,采用了流式细胞术并对检测的各项条件进行了对比优化。

在标本类型的选择上本研究不单使用了 PBMC,更有意义的是建立了全血标本的检测方法。这一点对患者有直接的益处,因为全血需要的标本量很少,可以减少患者的采血量或留下更多的标本用于其他研究。已有研究报道从全血分离淋巴细胞的操作会影响组蛋白乙酰化水平,而且 PBMC 的冻存与融解对组蛋白乙酰化也有影响^[6]。此外,实验中使用的红细胞裂解液含有多聚甲醛,能固定全血中的有核细胞,有“定格”组蛋白的作用,使组蛋白乙酰化状态得到更好的保持。既往乙酰化流式检测多选择在冰上处理样本,但本研究发现冰上处理样本对全血标本的组蛋白乙酰化检测不利,表现为细胞在散点图上分群不佳、与室温处理有明显区别、检测结果明显偏低。核心组蛋白与 DNA 组装成核小体,位于细胞核内,因此破膜方法更应优先选择核内因子染色破膜,这一点在实验中也得到进一步印证。流式细胞检测时应常规进行抗体剂量滴定,抗体用量过少不能充分结合抗原,但用量太大也可能会增加非特异性结合,同时增加实验成本。本研究滴定了抗乙酰化组蛋白抗体用量为 2 $\mu\text{L}/2\sim 3\times 10^5$ 细胞。另外,实验中还观察到中性粒细胞的组蛋白乙酰化水平较淋巴细胞更高,因此全血标本相对 PBMC 在细

在标本类型的选择上本研究不单使用了 PBMC,更有意义的是建立了全血标本的检测方法。这一点对患者有直接的益处,因为全血需要的标本量很少,可以减少患者的采血量或留下更多的标本用于其他研究。已有研究报道从全血分离淋巴细胞的操作会影响组蛋白乙酰化水平,而且 PBMC 的冻存与融解对组蛋白乙酰化也有影响^[6]。此外,实验中使用的红细胞裂解液含有多聚甲醛,能固定全血中的有核细胞,有“定格”组蛋白的作用,使组蛋白乙酰化状态得到更好的保持。既往乙酰化流式检测多选择在冰上处理样本,但本研究发现冰上处理样本对全血标本的组蛋白乙酰化检测不利,表现为细胞在散点图上分群不佳、与室温处理有明显区别、检测结果明显偏低。核心组蛋白与 DNA 组装成核小体,位于细胞核内,因此破膜方法更应优先选择核内因子染色破膜,这一点在实验中也得到进一步印证。流式细胞检测时应常规进行抗体剂量滴定,抗体用量过少不能充分结合抗原,但用量太大也可能会增加非特异性结合,同时增加实验成本。本研究滴定了抗乙酰化组蛋白抗体用量为 2 $\mu\text{L}/2\sim 3\times 10^5$ 细胞。另外,实验中还观察到中性粒细胞的组蛋白乙酰化水平较淋巴细胞更高,因此全血标本相对 PBMC 在细

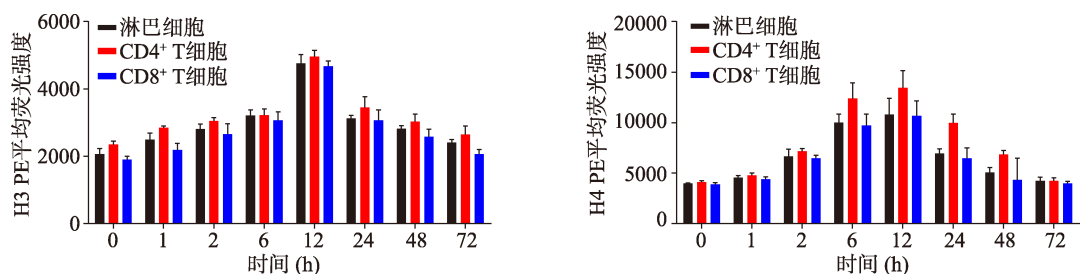


图 6 受试者口服 30 mg 西达本胺后组蛋白乙酰化水平随时间的变化

Fig. 6 Changes of histone acetylation levels in patients following oral administration of 30 mg Chidamide

胞数相同的条件下需要的抗体更多。抗体孵育时间对组蛋白乙酰化水平检测有明显影响, 孵育时间不足检测结果明显偏低, H3 尤为明显。常规细胞表面标志染色只需孵育 20~30 min, 而抗乙酰化组蛋白抗体应至少孵育 60 min。

本研究还结合了细胞表面标志染色, 可分析特定细胞亚群的组蛋白乙酰化水平, 不论在肿瘤还是在艾滋病的研究中都有一定实用价值。在肿瘤中, 可结合特定的肿瘤表面标志观察肿瘤细胞的组蛋白乙酰化水平改变。在艾滋病中, 由于 HIV-1 主要潜伏于 CD4⁺ T 淋巴细胞, 因此成为研究的重点。同时, 本研究也证明了 CD4⁺ T 淋巴细胞的组蛋白乙酰化水平较整体淋巴细胞和 CD8⁺ T 淋巴细胞更高。

综上所述, 本研究通过一系列对比优化实验建立的组蛋白乙酰化流式细胞检测技术为基础和临床研究提供了一个可靠、快速、便捷的检测手段。

参考文献(References):

- [1] Li XX, Lu J, Luo DH, Huang BQ. The histone deacetylase activity of SIR2 and chromatin silencing. *Hereditas (Beijing)*, 2003, 25(4): 484–488.
李晓雪, 陆军, 罗巖辉, 黄百渠. 组蛋白去乙酰化酶 SIR2 与染色质沉默. *遗传*, 2003, 25(4): 484–488. [DOI]
- [2] Yang XJ, Seto E. HATs and HDACs: from structure, function and regulation to novel strategies for therapy and prevention. *Oncogene*, 2007, 26(37): 5310–5318. [DOI]
- [3] Lakshmaiah KC, Jacob LA, Aparna S, Lokanatha D, Saldanha SC. Epigenetic therapy of cancer with histone deacetylase inhibitors. *J Cancer Res Ther*, 2014, 10(3): 469–478. [DOI]
- [4] Das GK, Shakespear MR, Iyer A, Fairlie DP, Sweet MJ. Histone deacetylases in monocyte/macrophage development, activation and metabolism: refining HDAC targets for inflammatory and infectious diseases. *Clin Transl Immunol*, 2016, 5(1): e62. [DOI]
- [5] Dong M, Ning ZQ, Xing PY, Xu JL, Cao HX, Dou GF, Meng ZY, Shi YK, Lu XP, Feng FY. Phase I study of chidamide (CS055/HBI-8000), a new histone deacetylase inhibitor, in patients with advanced solid tumors and lymphomas. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2012, 69(6): 1413–1422. [DOI]
- [6] Rigby L, Muscat A, Ashley D, Algar E. Methods for the analysis of histone H3 and H4 acetylation in blood. *Epi-genetics*, 2012, 7(8): 875–882. [DOI]
- [7] Kaypee S, Sudarshan D, Shanmugam MK, Mukherjee D, Sethi G, Kundu TK. Aberrant lysine acetylation in tumorigenesis: Implications in the development of therapeutics. *Pharmacol Ther*, 2016, doi: 10.1016/j.pharmthera.2016.01.011. [DOI]
- [8] Archin NM, Liberty AL, Kashuba AD, Choudhary, SK, Kuruc JD, Crooks AM, Parker DC, Anderson EM, Kearney MF, Strain MC, Richman DD, Hudgens MG, Bosch RJ, Coffin JM, Eron JJ, Hazuda DJ, Margolis DM. Administration of vorinostat disrupts HIV-1 latency in patients on antiretroviral therapy. *Nature*, 2012, 487(7408): 482–485. [DOI]
- [9] Rasmussen TA, Tolstrup M, Brinkmann CR, Olesen R, Erikstrup C, Solomon A, Winkelmann A, Palmer S, Dinarello C, Buzon M, Lichterfeld M, Lewin SR, Østergaard L, Sogaard OS. Panobinostat, a histone deacetylase inhibitor, for latent-virus reactivation in HIV-infected patients on suppressive antiretroviral therapy: a phase 1/2, single group, clinical trial. *Lancet HIV*, 2014, 1(1): e13–e21. [DOI]
- [10] Sogaard OS, Graversen ME, Leth S, Olesen R, Brinkmann CR, Nissen SK, Kjaer AS, Schleimann MH, Denton PW, Hey-Cunningham WJ, Koelsch KK, Pantaleo G, Krosgaard K, Sommerfelt M, Fromentin R, Chomont N, Rasmussen TA, Østergaard L, Tolstrup M, Siliciano RF. The depsipeptide romidepsin reverses HIV-1 latency *in vivo*. *PLoS Pathog*, 2015, 11(9): e1005142. [DOI]
- [11] Keedy KS, Archin NM, Gates AT, Espeseth A, Hazuda DJ, Margolis DM. A limited group of class I histone deacetylases acts to repress human immunodeficiency virus type 1 expression. *J Virol*, 2009, 83(10): 4749–4756. [DOI]
- [12] Williams SA, Chen LF, Kwon H, Ruiz-Jarabo CM, Verdin E, Greene WC. NF-κB p50 promotes HIV latency through HDAC recruitment and repression of transcriptional initiation. *EMBO J*, 2006, 25(1): 139–149. [DOI]
- [13] Deeks SG. HIV: Shock and kill. *Nature*, 2012, 487(7408): 439–440. [DOI]

(责任编辑: 朱卫国)