DOI:10.16016/j.1000-5404.201907113

TAS102 选择性抑制 ATRX 缺失胶质瘤细胞的实验研究

王 龙[1],蒋 航[1],陈图南[2],李学刚[2],黄苏娜[2],穆 宁[2],冯 华[2],李 飞[2],张云东[1] 401120 重庆,重庆医科大学附属第三医院神经疾病中心[1];400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)第一附属医院神经外科[2]

[摘要] **目的** 探讨TAS102对α地中海贫血伴智力低下综合征X连锁基因(α-thalassemia mental retardation X-linked, ATRX)缺失U87胶质瘤细胞体外增殖的影响及机制。**方法** 选择ATRX野生型U87细胞和ATRX敲除的U87$^{ATRX-/-}$胶质瘤细胞为研究对象,设立U87对照组、U87药物组、U87$^{ATRX-/-}$对照组、U87$^{ATRX-/-}$药物组,采用CCK-8法检测细胞存活率,流式细胞术检测细胞周期的变化,β-半乳糖苷酶染色检测细胞老化情况,采用免疫荧光和Western blot检测DNA损伤识别反应通路活化及相关蛋白的表达情况。**结果** CCK-8检测结果显示,经不同浓度的TAS102培养72 h,U87$^{ATRX-/-}$药物组细胞存活率低于U87药物组,U87组细胞IC_{50}值为(10.50±1.52)mg/L,U87$^{ATRX-/-}$细胞IC_{50}为(4.72±0.48)mg/L,与U87组细胞相比,U87$^{ATRX-/-}$组IC_{50}更低($P<0.01$)。细胞周期检测示:U87对照组G_2期细胞百分比为(17.86±2.12)%,药物组G_2期细胞百分比为(23.04±3.57)%;U87$^{ATRX-/-}$对照组G_2期细胞百分比为(18.94±3.05)%,药物组为(61.67±1.13)%,与U87药物组相比,U87$^{ATRX-/-}$药物组G_2期细胞明显增多($P<0.01$)。β-半乳糖苷酶染色结果示:U87对照组染色阳性细胞百分比为(7.73±0.71)%,药物组为(29.55±4.12)%,U87$^{ATRX-/-}$对照组为(8.70±2.55)%,药物组为(53.64±7.03)%,与U87药物组相比,U87$^{ATRX-/-}$药物组染色阳性细胞增多($P<0.01$)。免疫荧光检测53BP1的表达显示,U87对照组染色阳性细胞百分比为(14.5±7.39)%,药物组为(21.19±3.68)%,U87$^{ATRX-/-}$对照组为(16.75±2.97)%,药物组为(54.27±8.38)%,U87$^{ATRX-/-}$药物组53BP1表达较U87药物组明显增多($P<0.05$)。Western blot检测不同时间点ATR、CHK1、ATM、CHK2的磷酸化水平,U87$^{ATRX-/-}$药物组ATM/CHK2的磷酸化水平增高。**结论** TAS102能够选择性抑制U87$^{ATRX-/-}$胶质瘤细胞增殖,通过诱导细胞衰老和活化ATM-CHK2损伤反应通路,引起细胞周期阻滞于G_2期,抑制细胞增殖。

[关键词] TAS102;α地中海贫血伴智力低下综合征X连锁基因;胶质瘤;DNA损伤
[中图法分类号] R730.264; R966; R979.1 [文献标志码] A

TAS102 selectively inhibits proliferation of α-thalassemia mental retardation X-linked gene-deficient glioma cells

WANG Long[1], JIANG Hang[1], CHEN Tunan[2], LI Xuegang[2], HUANG Suna[2], MU Ning[2], FENG Hua[2], LI Fei[2], ZHANG Yundong[1] [1]Department of Neurological Diseases, the Third Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 401120; [2]Department of Neurosurgery, First Affiliated Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of TAS102 on the proliferation of α-thalassemia mental retardation X-linked (ATRX)-deficient U87 glioma cells *in vitro* and explore the mechanism. **Methods** Wild-type glioma U87 cells and ATRX knockout U87 cells (U87$^{ATRX-/-}$) were both treated with TAS102, and the changes in the cell viability and cell cycle distribution were examined using CCK8 assay and flow cytometry, respectively. Beta-galactosidase staining was used to assess the cell senescence, and immunofluorescence staining and Western blotting were employed to detect the activation of DNA damage recognition reaction pathways and the expression of the related proteins. **Results** CCK-8 assay showed that

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81672783)
[通信作者] 李 飞,E-mail:feifly7887@126.com
张云东,E-mail:zhangyundong6688@163.com

TAS102 treatment for 72 h resulted in significantly lower cell viability in U87$^{ATRX-/-}$ cells than in wild-type U87 cells, and its IC_{50} value was significantly lower in U87$^{ATRX-/-}$ cells than in U87 cells (4.72±0.48 *vs* 10.50 ± 1.52 mg/L, $P<0.01$). TAS102 treatment resulted in more cells arrested in G_2 phase in U87 cells [(23.04± 3.57)% *vs* (17.86±2.12)%] and in U87$^{ATRX-/-}$ cells [(61.67±1.13)% *vs* (18.94±3.05)%], and the arrest was more obviously in the knockout cells than the wild-type ones($P<0.01$). Beta-galactosidase staining showed that the positive percentage was (7.73±0.71)% and (29.55±4.12)% in U87 cells and TAS102 treated cells, and (8.70±2.55)% and (53.69±7.03)% in control and treated knockout cells. There were more positive cells in the knockout than the wild-type cells ($P<0.01$). Immunofluorescence assay showed that TAS102 treatment increased the percentage of 53BPI-positive cells in both of the cells[control and treated U87 cells: (14.5±7.39)% and (21.19±3.68)%; control and treated U87$^{ATRK-/-}$ cells: (16.75±2.97)% and (54.27±8.38)%]. but the increment was significantly greater in U87$^{ATRX-/-}$ cells than in U87 cells ($P<0.05$). In the phosphorylation levels of ATR, CHK1, ATM and CHK2 at different time points following TAS102 treatment, significant increment was seen in ATM/CHK2 levels in U87$^{ATRX-/-}$cells. **Conclusion** TAS102 can selectively inhibit the proliferation of U87$^{ATRX-/-}$ cells by inducing cell senescence, activating ATM-CHK2 damage response pathways, and causing cell cycle arrest in G_2 phase.

[**Key words**] TAS102; α-thalassemia mental retardation X-linked genes; glioma; DNA damage

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81672783). Corresponding author: LI Fei, E-mail: feifly7887@126.com; ZHANG Yundong, E-mail: zhangyundong6688@163.com

在胶质瘤全基因组测序中,约30%的年轻患者有α地中海贫血伴智力低下综合征X连锁基因(α-thalassemia mental retardation X-linked, ATRX)突变[1]。ATRX突变多发生于低级别年轻胶质瘤患者中,在成人原发性胶质母细胞瘤中很少突变[2]。这部分胶质瘤虽然最初生长缓慢,但最终都会进展为胶质母细胞瘤[2,3]。替莫唑胺是目前胶质瘤的一线化疗药物,主要通过甲基化肿瘤细胞的鸟嘌呤残基,导致细胞周期阻滞和凋亡[4-5]。但是通过对复发肿瘤的研究发现,替莫唑胺治疗会诱导额外的基因突变,从而避免细胞周期停滞或凋亡。所以对于复发或是进展而来的胶质母细胞瘤,替莫唑胺治疗效果差,需要寻找新的治疗靶点和研究化疗药物。TAS102是2015年FDA批准的用于癌症的复方新药,由三氟胸苷(trifluorothymidine,FTD)和胸苷嘧啶磷酸化酶抑制剂(tipiracil hydroch-loride, TPI)组成,其抗癌机制是可以掺入DNA造成损伤、DNA功能障碍[6]。本研究探讨TAS102对ATRX缺失胶质瘤的作用,期望探寻ATRX缺失胶质瘤的治疗靶点。

1 材料与方法

1.1 主要材料

细胞培养基DMEM/F12、胎牛血清、胰酶购于美国Gibco公司。药物:FTD(货号T2255),TPI(货号SML1552),替莫唑胺(Temozolomide TMZ)(货号76899)购于美国Sigma公司。抗体ATRX(sc-55584)购于美国Santa Cruz公司,53BP1、ATM(D2E2)、p-ATM(Ser1981)、ATR、p-ATR、CHk2、p-Chk2、CHK1、p-CHK1购于美国Cell Signaling Technology公司,IDH1-R132H抗体购于美国Millipore公司,β-actin购于美国Affinity公司。细胞周期与细胞凋亡染色试剂盒、细胞衰老-β半乳糖苷酶染色试剂盒购于上海碧云天公司,CCK-8细胞增殖试剂盒购于武汉博士德公司。

1.2 细胞培养

细胞予含10%胎牛血清的DMEM/F12培养基培养,置于37 ℃、5%CO_2恒温培养箱内培养。

1.3 CCK-8检测细胞增殖活性

取对数生长期的细胞按每孔2 000接种于96孔板,次日更换新鲜含不同浓度的替莫唑胺(100、200、400、800、1 600 μmol/L)和TAS102(1、2、4、8、16 mg/L)培养液,每个浓度设3个复孔,同时设立不加药物的空白对照组,培养72 h后更换为含有10%CCK-8试剂的培养基,培养箱内继续孵育1.5 h后,酶标仪检测450 nm处光密度值[$D(450)$]。细胞存活率=[$D(450)_{实验孔}-D(450)_{空白孔}$]/[$D(450)_{对照孔}-D(450)_{空白孔}$]×100%。

1.4 细胞老化染色

取对数生长期的细胞接种于6孔板,次日更换培养液,对照组更换新鲜培养基,药物组更换为TAS102 2 mg/L的培养基。再培养72 h后进行β-半乳糖苷酶染色,吸出6孔板内细胞培养液,用PBS洗涤1次,每孔加入1 mL β-半乳糖苷酶染色固定液,室温固定15 min,吸除细胞固定液,用PBS洗涤细胞3次,每孔加入1 mL染色工作液,用parafilm膜封住6孔板防止蒸发,在无CO_2的培养箱37 ℃孵育过夜。普通光学显微镜下观察计数染色阳性细胞。

1.5 细胞周期检测

取对数生长期的细胞分别接种于6孔板,次日更换培养液及加药物处理,再培养48 h后收集细胞于EP管中,予70%的冰乙醇固定,4 ℃冰箱过夜。次日用PBS离心洗涤2遍后染色,每管细胞样品中加入0.5 mL碘化丙啶染色液,缓慢并充分重悬细胞沉淀,37 ℃避光孵育30 min后流式仪上机检测。

1.6 免疫荧光检测

取对数生长期细胞接种于共聚焦培养皿,次日更换培养液及加药处理,再培养48 h,吸出培养液,4%多聚甲醛固定15 min,0.5%TritonX-100室温通透20 min,PBS洗3遍,滴加山羊血清封闭30 min,吸干封闭液后加一抗冰箱4 ℃过夜,次日PBST洗3次,吸水纸吸干后加稀释好的二抗室温孵育1 h,PBS洗3次,DAPI染色5 min,PBS洗涤3次后滴加抗荧光淬灭剂封片。共聚焦采集图像。

1.7 Western blot检测

收集经TAS102 2 mg/L处理的不同时间点(0、24、48、72 h)的U87及U87$^{atrx-/-}$细胞,用含蛋白酶、磷酸酶抑制剂的RIPA裂解液裂解,经BCA法测定蛋白浓度。每孔上样30 μg,6%的预制胶电泳,蛋白转移至PVDF膜,快速封闭液封闭15 min,加一抗4度冰箱孵育过夜,次日TBST洗涤3遍,辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育2 h,ECL发光液显影,用图像分析系统扫描条带。

1.8 统计学分析

细胞增殖、细胞周期、细胞老化等实验均重复3次,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用SPSS 25.0统计软件分析数据,组间比较采用两独立样本 t 检验。

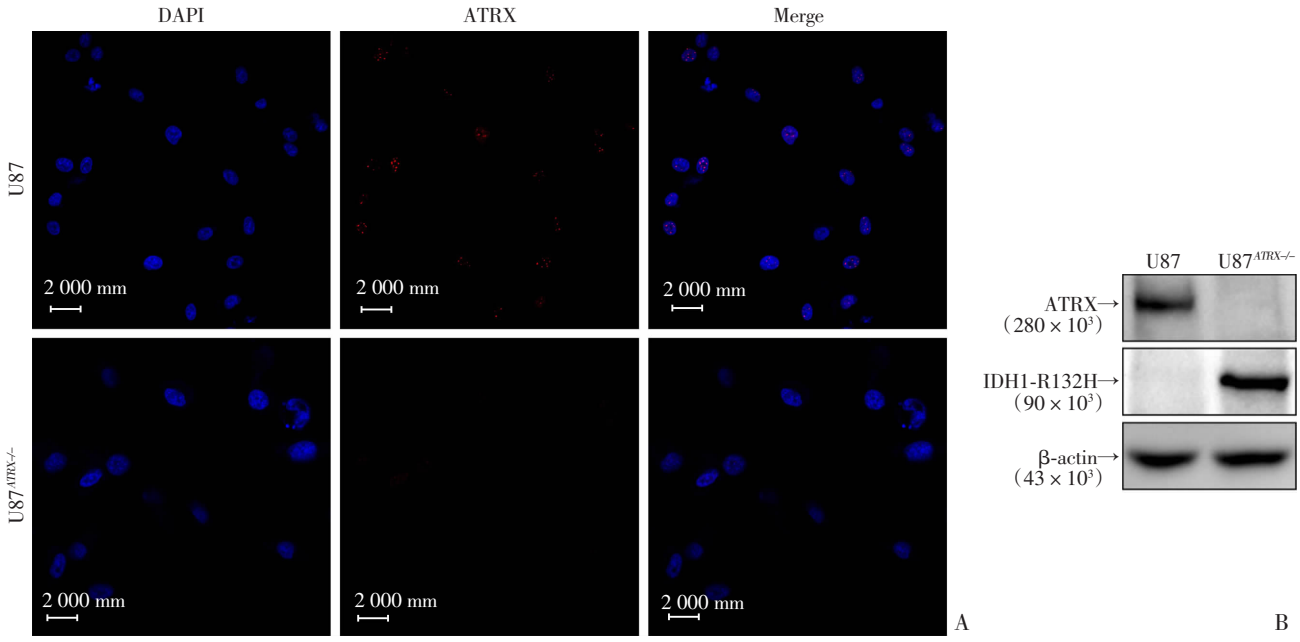
2 结果

2.1 ATRX缺失U87细胞模型的建立

采用CRISPR技术敲除U87胶质瘤细胞中ATRX基因表达,选择ATRX缺失单克隆细胞转染IDH1-R132H进行实验。免疫荧光及Western blot检测结果示:ATRX蛋白在U87细胞中正常表达,在ATRX基因敲除细胞中表达缺失(图1A、B),同时,IDH1-R132H在ATRX敲除细胞中表达(图1B)。

2.2 TAS102选择性抑制U87$^{ATRX-/-}$细胞增殖

不同浓度的替莫唑胺处理细胞72 h,随着浓度的增加,两组细胞的存活率都逐渐降低,下降趋势一致(图2A)。两组细胞存活率差别不显著,表明替莫唑胺对两组细胞的作用差别不大。但经不同浓度的TAS102处理72 h后,U87$^{ATRX-/-}$细胞存活率下降更明显(图2B)。采用Graphpad Prism软件计算两组细胞的TAS102 IC_{50} 值,U87细胞 IC_{50} 值为(10.50±1.52) mg/L,U87$^{ATRX-/-}$细胞 IC_{50} 值为(4.72±0.48) mg/L。U87$^{ATRX-/-}$细胞的 IC_{50} 值更低,差异有统计学意义($P<0.01$,图2C)。提示TAS102能选择性抑制ATRX缺失胶质瘤细胞的生长。



A:免疫荧光检测ATRX在U87细胞中的正常表达,在U87$^{ATRX-/-}$细胞中表达缺失;B:Western blot检测U87$^{ATRX-/-}$细胞中ATRX表达缺失及IDH1-R132H的表达

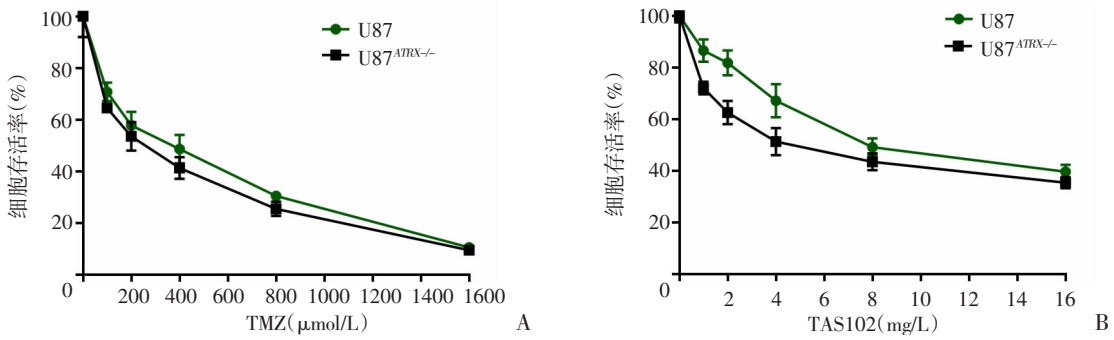
图1 U87$^{ATRX-/-}$细胞模型的鉴定

2.3 TAS102 导致 U87$^{ATRX-/-}$细胞周期 G_2 期阻滞

予 TAS102 2.0 mg/L 处理细胞 48 h 后作细胞周期检测,结果显示:U87 对照组 G_2 期细胞百分比为(17.86±2.12)%,U87 药物组细胞为(23.04±3.57)%;U87$^{ATRX-/-}$对照组 G_2 期细胞百分比为(18.94±3.05)%,U87$^{ATRX-/-}$药物组为(61.67±1.13)%。U87$^{ATRX-/-}$细胞经 TAS102 处理后 G_2 期细胞较 U87 细胞明显增多(图 3,$P<0.01$),提示 TAS102 可选择性诱导 U87$^{ATRX-/-}$细胞 G_2 期阻滞。

2.4 TAS102 诱导 U87$^{ATRX-/-}$细胞老化

经 TAS102 2 mg/L 处理 72 h 后进行 β-半乳糖苷酶染色,U87 对照组染色阳性细胞百分比为(7.73±0.71)%,U87 药物组为(29.55±4.12)%,U87$^{ATRX-/-}$对照组染色阳性细胞百分比为(8.70±2.55)%,U87$^{ATRX-/-}$药物组为(53.64±7.03)%。U87$^{ATRX-/-}$药物组细胞老化更多($P<0.01$),差异有统计学意义(图 4)。



A:不同浓度的替莫唑胺对细胞存活率的影响;B:不同浓度的 TAS102 对细胞存活率的影响

图 2 CCK-8 检测细胞存活率 ($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

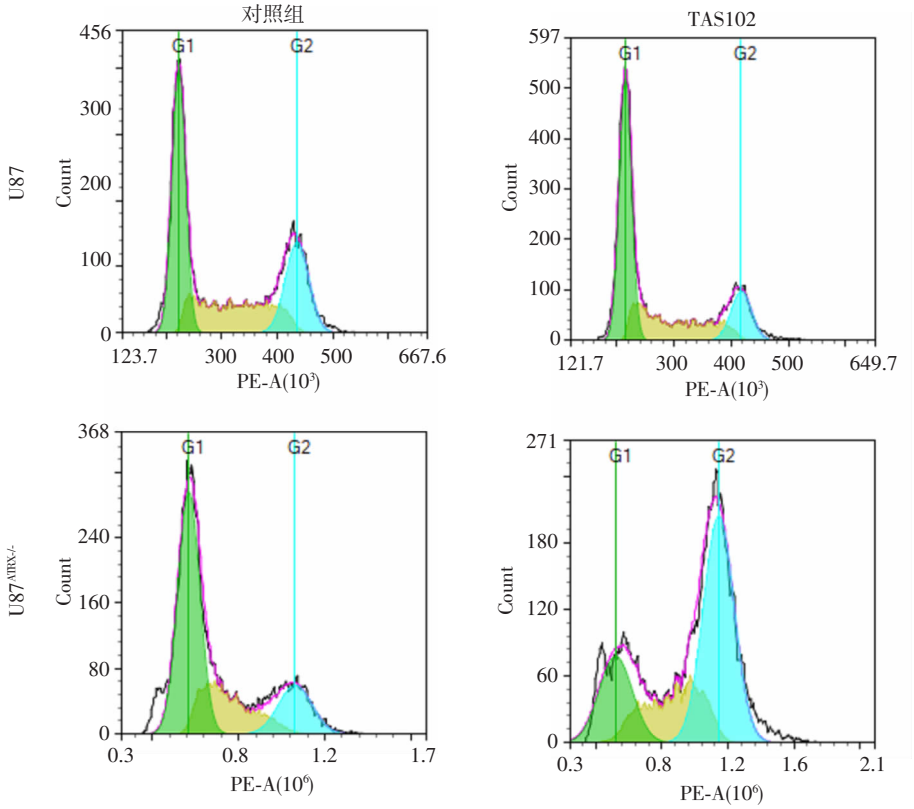


图 3 流式细胞仪检测各组细胞周期

2.5　TAS102 导致 U87$^{ATRX-/-}$细胞 DNA 损伤,活化 ATM-CHK2 损伤反应识别通路

经 TAS102 2 mg/L 处理 48 h 后用免疫荧光检测细胞 53BP1 的表达,U87 对照组染色阳性细胞百分比为(14.5±7.39)%,U87 药物组为(21.19±3.68)%,U87$^{ATRX-/-}$对照组染色阳性细胞百分比为(16.75±2.97)%,U87$^{ATRX-/-}$药物组为(54.27±8.38)%,与 U87 药物组相比,U87$^{ATRX-/-}$药物组 53BP1 表达增多($P<0.05$,图 5)。Western blot 检测经 TAS102 处理后不同时间段细胞 ATR、CHK1、ATM、CHK2 的磷酸化水平,两组细胞 ATR/CHK1 磷酸化水平无明显增加(图 6A),U87 细胞 ATM/CHK2 磷酸化水平增加不明显,而 U87$^{ATRX-/-}$组 ATM/CHK2 磷酸化水平明显增高(图 6B)。

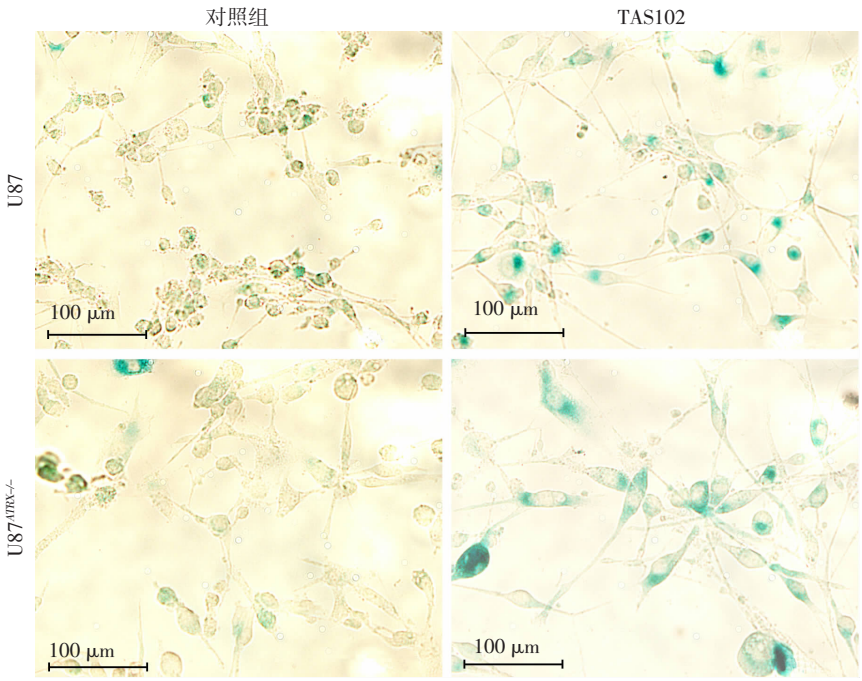


图 4　β-半乳糖苷酶染色检测细胞老化

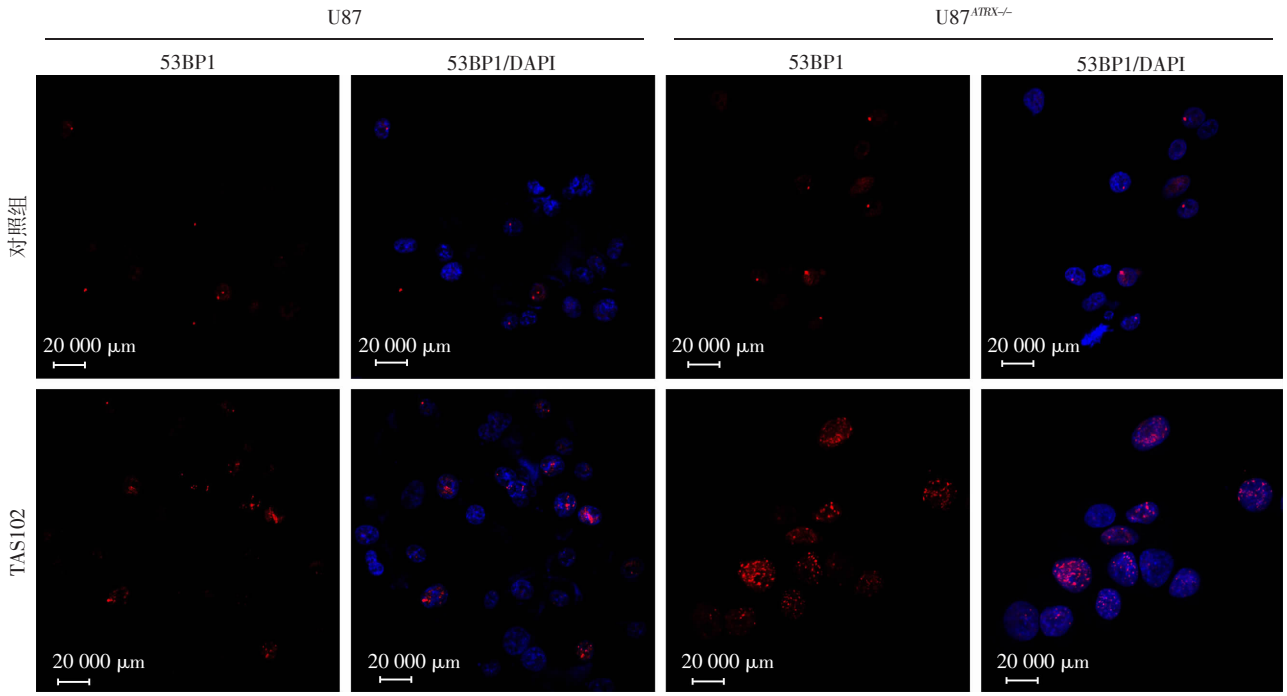
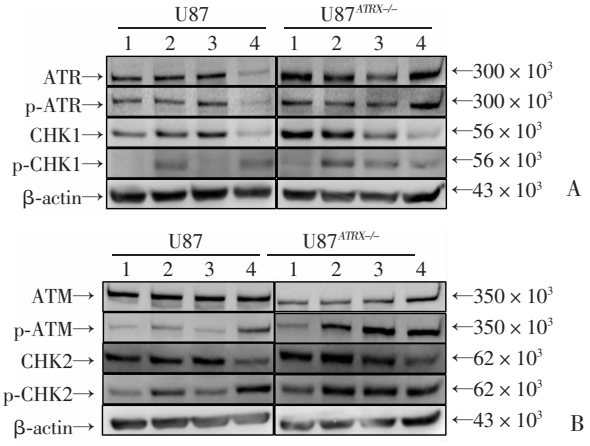


图 5　免疫荧光检测细胞中 53BP1 表达



1：0 h；2：24 h；3：48 h；4：72 h A：ATR、CHK1 磷酸化水平；B：ATM、CHK2 磷酸化水平

图 6 Western blot 检测 TAS102 处理后不同时间点细胞中 ATR、CHK1、ATM、CHK2 磷酸化水平

3 讨论

弥漫性胶质瘤是中枢神经系统最常见的原发恶性肿瘤。和人类身体其他部位恶性肿瘤一样，胶质瘤的发生是随着时间推移累积突变的结果。IDH1/2 突变通常被认为是弥漫性胶质瘤的起源事件，IDH 失调可能通过致癌代谢物 2-羟基戊二酸盐（2HG）引起基因组广泛的超甲基化，随机或者选择性的激活癌基因[7]。如果继续出现 P53 突变和 ATRX 缺失，则发展为星形细胞胶质瘤[8]。这类肿瘤经历最初数年的相对缓慢进展，几乎最终都会进展为继发胶质母细胞瘤。因此，从分子病理学角度可以将具有 IDH 突变、P53 突变、ATRX 缺失的胶质瘤定义为星形细胞来源的继发胶质母细胞瘤[9]。目前针对 ATRX 缺失胶质瘤的研究缺乏，部分原因是缺少理想的细胞和动物模型。在胶质瘤中，所有 ATRX 的突变都是失活的并且可以导致蛋白表达的缺失[10]。我们采用 CRISPR/CAS9 技术建立 ATRX 敲除的胶质瘤细胞模型，并采用慢病毒稳定转染 IDH1-R132H，建立了 IDH1 突变、ATRX 缺失的胶质瘤细胞模型，因此，本研究模拟了继发胶质母细胞瘤的细胞模型，符合胶质瘤的临床特征，研究更具临床意义。

TAS102 是胸腺嘧啶核苷酸类似物 FTD 和 TPI 按（1∶0.5）比例组成的复合物，FTD 是其抗肿瘤的主要活性成分，TPI 可抑制 FTD 在体内的降解[11]。核苷酸类似物是抗肿瘤治疗的一个重要手段，它可以掺入 DNA 取代正常的碱基造成 DNA 损伤。本研究通过 CCK8 检测细胞增殖实验发现 $U87^{ATRX-/-}$ 细胞对 TAS102 更敏感（图 2B）。接着通过流式仪进行周期检测，发现 TAS102 处理 48 h 后 G_2 期细胞增多，但 $U87^{ATRX-/-}$ 细胞 G_2 期细胞增多更明显，说明 TAS102 处理后引起细胞阻滞于 G_2 期。既往的研究也发现，FTD 导致细胞周期阻滞于 G_2 期[12]。本研究中细胞周期阻滞和细胞增殖抑制趋势相符合，进一步证实了 TA102 能选择性作用于 ATRX 缺失的胶质瘤细胞，抑制细胞增殖。

细胞周期阻滞是细胞老化的基本特征，老化是细胞因各种因素如 DNA 损伤，端粒长度过短、缺氧等使细胞失去分裂能力而发生不可逆的细胞周期阻滞的一种状态[13]。β-半乳糖苷酶染色是目前检测细胞老化最广泛的方法，我们采用此法染色见，经 TAS102 处理 72 h 后，$U87^{ATRX-/-}$ 细胞老化更明显，表现为细胞体积增大，形态扁平变长，胞质内呈深蓝色。衰老细胞分泌细胞因子，可促进免疫系统清除肿瘤，因此，诱导衰老可能是治疗癌症的一条途径[14]。ATRX 是促进静止细胞向衰老转化的关键调控因子[15]，ATRX 缺失通过抑制衰老途径为癌细胞生长提供有利条件，诱导衰老可以考虑作为 ATRX 缺失胶质瘤的一种治疗策略。因此，本研究发现 TAS102 能够诱导细胞衰老，也可能是其能选择性抑制 ATRX 缺失细胞的机制。

TAS102 主要的抗癌机制是掺入 DNA 造成 DNA 损伤，已经证实 FTD 与 DNA 结合会在细胞周期的 G_2/M 期诱导形成双链断裂损伤[16]。53BP1 是 DNA 损伤反应的主要介导因子之一，是针对 DNA 双链断裂损伤做出反应的重要调控因子，在调控 DNA 双链断裂损伤修复的途径中起着关键作用[17-18]。本研究采用免疫荧光检测了 TAS102 处理后 53BP1 的聚集情况，证实了 $U87^{ATRX-/-}$ 细胞 DNA 损伤更重。ATM 是 DNA 双链断裂损伤识别和修复的关键蛋白，ATM 是 CHK2 的上游调节因子，ATM 磷酸化后，引起 CHK2 的磷酸化，通过调节细胞周期检控点，引起细胞周期阻滞[19]。本研究发现两组细胞在识别 DNA 单链断裂损伤的 ATR-CHK1 通路的磷酸化水平差别不大，而在 ATM-CHK2 通路，ATRX 缺失组磷酸化水平明显增高，说明 TAS102 引起 $U87^{ATRX-/-}$ 细胞的双链断裂损伤，从而活化 ATM/ChK2 通路，引起细胞周期阻滞。综上所述，本研究结果表明，TAS102 可以选择性作用于 $U87^{ATRX-/-}$ 细胞，抑制细胞增殖，引起细胞周期 G_2 期阻滞，其机制是通过造成 DNA 双链断裂损伤，活化 ATM/CHK2 通路和诱导细胞老化。

DNA 损伤修复反应（DNA-damage response，DDR）触发细胞机制以保持基因组稳定性，包括 DNA 损伤感

知,细胞周期调节和 DNA 修复[20]。基因富集分析发现 ATRX 主要在细胞周期、DNA 损伤修复相关途径富集[21]。在 HeLa 细胞中进行的一项研究表明,siRNA 下调 ATRX 会导致有丝分裂过程中异常的染色体融合[22]。胶质瘤中 ATRX 的丢失诱导微卫星不稳定,微卫星是重复的单核苷酸或二核苷酸序列,以易错的方式复制,导致突变率增加[23]。这些研究说明 ATRX 在保持基因组稳定性中发挥重要作用,ATRX 缺失会导致 DDR 缺陷。所以,本研究发现 TAS102 能够选择性的作用于 $U87^{ATRX-/-}$ 缺失胶质瘤细胞,一方面可能是因为 ATRX 缺失后细胞存在 DDR 缺陷,对 DNA 损伤剂更敏感。另一方面,TAS102 主要的抗癌机制是诱导 DNA 双链断裂损伤,FTD 与 DNA 结合后主要通过同源重组(HR)途径诱导 DNA 双链断裂损伤[24],而 ATRX 缺失的肿瘤在修复外源性诱导的双链断裂损伤方面存在缺陷[25]。所以,本研究结果也说明了 ATRX 缺失的胶质瘤细胞对诱导 DNA 双链断裂的损伤因子更敏感,干扰 HR 修复通路可能是 ATRX 缺失胶质瘤的有效治疗策略。

参考文献:

[1] JIAO Y, KILLELA P J, REITMAN Z J, *et al*. Frequent ATRX, CIC, FUBP1 and IDH1 mutations refine the classification of malignant gliomas[J]. Oncotarget, 2012, 3(7): 709-722. DOI: 10.18632/oncotarget.588.

[2] SUZUKI H, AOKI K , CHIBA K, *et al*. Mutational landscape and clonal architecture in grade II and III gliomas[J]. Nat Genet, 2015, 47(5): 458-468. DOI: 10.1038/ng.3273.

[3] HU H M, MU Q H, ZHAO S B, *et al*. Mutational Landscape of Secondary Glioblastoma Guides MET-Targeted Trial in Brain Tumor[J]. Cell, 2018, 175(6): 1665-1678. e18. DOI: 10.1016/j.cell.2018.09.038.

[4] FERRIS S, HOFMANN J, SOLOMON D, *et al*. Characterization of gliomas: from morphology to molecules[J]. Virchows Arch, 2017, 471(2): 257-269. DOI: 10.1007/s00428-017-218 1-4.

[5] JOHNSON B E, MAZOR T, HONG C, *et al*. Mutational analysis reveals the origin and therapy driven evolution of recurrent glioma[J]. Science, 2014, 343(6167): 189-193. DOI: 10.1126/science.1239947.

[6] LENZ H J, STINTZING S, LOUPAKIS F. TAS-102, a novel antitumor agent: a review of the mechanism of action[J]. Cancer Treat Rev, 2015, 41(9): 777-783. DOI: 10.1016/j.ctrv.2015.06.001.

[7] FLORIS P B, PIETER W, ROEL G W. Reconstructing the molecular life history of gliomas[J]. Acta Neuropathol, 2018, 135(5): 649-670. DOI: 10.1007/s00401018-1842-y.

[8] KARSY M, GUAN J, COHEN A L, *et al*. New molecular considerations for glioma: IDH, ATRX, BRAF, TERT, H3K27M[J]. Curr Neurol Neurosci Rep, 2017, 17(2): 19. DOI: 10.1007/s11910-017-0722-5.

[9] 王天宇, 肖雄, 康鹏, 等. 继发胶质母细胞瘤的分子病理学及表观遗传学特征[J]. 中华神经外科杂志, 2015, 31(12): 1293-1296. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-2346.2015.12.027.
WANG T Y, XIAO X, KANG P, *et al*. Molecular pathology and epigenetic characteristics of secondary glioblastoma[J]. Chin J Neurosurg, 2015, 31(12): 1293-1296. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-2346.2015.12.027.

[10] LIU X Y, GERGES N, KORSHUNOV A, *et al*. Frequent ATRX mutations and loss of expression in adult diffuse astrocytic tumors carrying IDH1/IDH2 and TP53 mutations[J]. Acta Neuropathol, 2012, 124(5): 615-625. DOI: 10.1007/s00401-012-1031-3.

[11] UBOHA N, HOCHSTER H S. TAS-102: a novel antimetabolite for the 21st century[J]. Future Oncol, 2016, 12(2): 153-163. DOI: 10.2217/fon.15.276.

[12] MATSUOKA K, LIMORI M, NIIMI S, *et al*. Trifluridine induces p53-dependent sustained G_2 phase arrest with Its massive misincorporation into DNA and few DNA strand breaks[J]. Mol Cancer Ther, 2015, 14(4): 1004-1013. DOI: 10.1158/1535-7163.mct-14-0236.

[13] 张聚, 刘斯奇, 徐宁志. 细胞老化的基本特征和研究进展[J]. 中国细胞生物学学报, 2013, 35(1): 1-16.
ZHANG J, LIU S Q, XU N Z. Senescence: general features and current progress on the research[J]. Chin J Cell Biol, 2013, 35(1): 1-16.

[14] TIMOTHY N, LIU P Y, ZHANG R G. Epigenetic basis of cellular senescence and its implications in aging[J]. Genes, 2017, 8(12): E343. DOI: 10.3390/genes8120343.

[15] MARTA K, WILL L, MARY E K. ATRX is a regulator of therapy induced senescence in human cells[J]. Nat Commun. 2017, 8(1): 386. DOI: 10.1038/s41467-017-00540-5.

[16] NORIHIKO S, FUMIO N, MAMORU N, *et al*. Trifluorothymidine exhibits potent antitumor activity via the induction of DNA double-strand breaks[J]. Exp Ther Med. 2011, 2(3): 393-397. DOI: 10.3892/etm.2011.244.

[17] MIRZA-AGHAZADEH-ATTARI M, MOHAMMADZADEH A, YOUSEFI B. 53BP1: A key player of DNA damage response with critical functions in cancer[J]. DNA Repair. 2019, 73: 110-119. DOI: 10.1016/j.dnarep.2018.11.008.

[18] 张敏, 范久波, 邵金辉, 等. DNA 双链断裂修复过程中

的重要蛋白 53BP1[J]. 生命科学研究, 2016, 20(2): 162-165. DOI: 10.16605/j.cnki.1007-7847.2016.02.013.
ZHANG M, FAN J B, SHAO J H, *et al*. 53BP1: a key protein in repair of double-strand breaks[J]. Life Sci Res, 2016, 20(2): 162-165. DOI: 10.16605/j.cnki.1007-7847.2016.02.013.

[19] 朱虹, 缪泽鸿, 丁健. ATM、ATR 和 DNA 损伤介导的细胞周期阻滞[J]. 生命科学, 2007, 19(2): 139-139.
ZHU H, MIAO Z H, DING J. ATM, ATR and DNA damage-induced cell cycle arrest[J]. Life Sci Res, 2007, 19(2): 139-139.

[20] JACKSON S P, BARTEK J. The DNA-damage response in human biology and disease[J]. Nature, 2009, 461(7267): 1071-1078. DOI: 10.1038/nature08467.

[21] HAN B, CAI J Q, GAO W D, *et al*. Loss of ATRX suppresses ATM dependent DNA damage repair by modulating H3K9me3 to enhance temozolomide sensitivity in glioma [J]. Cancer Lett, 2018, 419: 280-290. DOI: 10.1016/j.canlet,2018.01.056.

[22] KIERAN R, CLAUDIA S, JANA M, *et al*. Loss of ATRX leads to chromosome cohesion and congression defects[J]. J Cell Biol, 2008, 180(2): 315-324. DOI: 10.2307/20475764.

[23] KOSCHMANN C, LOWENSTEIN P R, CASTRO M G. ATRX mutations and glioblastoma: Impaired DNA damage repair, alternative lengthening of telomeres, and genetic instability[J]. Mol Cell Oncol, 2016, 3(3): e1167158. DOI: 10.1080/23723556.2016.1167158.

[24] SUENAGA M, SCHIRRIPA M, CAO S, *et al*. Genetic variants of DNA repair-related genes predict efficacy of TAS-102 in patients with refractory metastatic colorectal cancer[J]. Ann Oncol, 2017, 28(5): 1015-1022. DOI: 10.1093/annonc/mdx035.

[25] SZILVIA J, AMIRA E, ARTHUR M, *et al*. ATRX Promotes DNA Repair Synthesis and Sister Chromatid Exchange during Homologous Recombination[J]. Mol Cell, 2018, 71(1): 11-24e17. DOI: 10.1016/j.molcel.2018.05.014.

(**收稿**:2019-07-15;**修回**:2019-08-29)

(编辑 吴培红)