

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.05.006

EZH2 和 *H3K27me3* 的表达对食管癌细胞迁移和侵袭能力的影响

刘飞, 尹丹静, 黄卫娜, 谷丽娜, 吴云艳, 刘世娜, 桑梅香(河北医科大学第四医院 科研中心, 河北 石家庄 050011)

[摘要] **目的:**通过转染 Zeste 同源物增强子 2(enhancer of zeste homolog 2, *EZH2*)过表达或者敲低载体,探讨 *EZH2* 和 Lys27 位点三甲基化组蛋白 H3(histone H3 methylated Lys27, *H3K27me3*)对食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell cancer, ESCC)细胞迁移和侵袭能力的影响。**方法:**应用实时荧光定量 PCR、Western blotting 法检测 ESCC 细胞株 KYSE30、KYSE170、TE1、Eca109 中 *EZH2* mRNA 水平,以及 ESCC 细胞过表达或者敲低 *EZH2* 对 *H3K27me3* 表达水平的影响。用划痕实验及 Transwell 侵袭实验分析过表达或者敲低 *EZH2* 后 ESCC 细胞的迁移侵袭能力。用实时荧光定量 PCR 法分析 ESCC 细胞过表达及敲低 *EZH2* 对 MMPs mRNA 水平的影响。**结果:**食管癌 Eca109 及 TE1 细胞中 *EZH2* 和 *H3K27me3* mRNA 和蛋白水平明显高于 KYSE30 及 KYSE170 细胞($P < 0.05$)。过表达 *EZH2* 的食管癌 KYSE30 及 KYSE170 细胞 *H3K27me3* 蛋白的表达水平显著升高($P < 0.05$)。敲低 *EZH2* 后 Eca109 及 TE1 细胞 *H3K27me3* 蛋白的表达水平明显降低($P < 0.05$)。过表达 *EZH2* 后, KYSE30 及 KYSE170 细胞的穿膜数目明显增多[(281.33 ± 4.10)、(241.67 ± 4.04) vs (132.00 ± 4.00)、(105.33 ± 3.51)个,均 $P < 0.05$]、迁移距离明显增大[(63.6 ± 1.2)、(62.5 ± 2.5) vs (23.0 ± 2.3)、(21.2 ± 1.0) μm , $P < 0.05$]。敲低 *EZH2* 后 Eca109 及 TE1 细胞的穿膜数目显著减少(均 $P < 0.05$)。转染 sh*EZH2* 后 Eca109 及 TE1 细胞迁移的距离明显减小(均 $P < 0.05$)。**结论:***EZH2* 可增加靶基因启动子上组蛋白 H3 第 27 位赖氨酸的三甲基化,并增强 ESCC 细胞的迁移和侵袭能力。

[关键词] Zeste 同源物增强子 2; Lys27 位点三甲基化组蛋白 H3; 食管鳞状细胞癌; 基质金属蛋白酶; 迁移; 侵袭

[中图分类号] R735.54; R735.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-385X(2017)05-0490-07

Effects of *EZH2* and *H3K27me3* expression on migration and invasion of esophageal carcinoma cells

LIU Fei, YIN Danjing, HUANG Weina, GU Lina, WU Yunyan, LIU Shina, SANG Meixiang(Scientific Research Center, the Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, Hebei, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of enhancer of zeste homolog 2 (*EZH2*) and histone H3 methylated Lys27 (*H3K27me3*) on the migration and invasion ability of esophageal squamous cell cancer (ESCC) cells by transfection of vectors expressing/knock down *EZH2*. **Methods:** Quantificational real-time PCR (qRT-PCR) and Western blotting were performed to evaluate the expression levels of *EZH2* in esophageal carcinoma cell lines (KYSE30, KYSE170, TE1, Eca109), as well as the effect of over-expression or knockdown of *EZH2* on *H3K27me3* expression in ESCC cell lines. Effect of *EZH2* over-expression or knockdown on migration and invasion abilities of ESCC cells were examined by wound healing assay and Transwell invasion test, respectively. The expression level of MMPs in ESCC cells after over-expression or knockdown of *EZH2* were detected by qRT-PCR. **Results:** The expressions of *EZH2* and *H3K27me3* in Eca109 and TE1 cells were significantly higher than those in KYSE30 and KYSE170 cells ($P < 0.05$). Over-expression of *EZH2* promoted the expression of *H3K27me3* in KYSE30 and KYSE170 cell lines ($P < 0.05$). Knockdown of *EZH2* inhibited the expression of *H3K27me3* in Eca109 and TE1 cell lines ($P < 0.05$). The trans-membrane number of KYSE30 and KYSE170 cells was significantly increased ([281.33 ± 4.10] vs [132.00 ± 4.00], $P < 0.05$; [241.67 ± 4.04] vs [105.33 ± 3.51], $P < 0.05$), and the migration distance of KYSE30 and KYSE170 cells was significantly increased

[基金项目] 河北省科技支撑计划资助项目(No. 14277732D, No. 152777184)。Project supported by the Science and Technology Supporting Program of Hebei Province(No. 14277732D, No. 152777184)

[作者简介] 刘飞(1986-),男,硕士生,主要从事肿瘤免疫的基础研究, E-mail: kyxlf@hotmail.com

[通信作者] 桑梅香(SANG Meixiang, corresponding author),博士,教授,硕士生导师,主要从事肿瘤防治的基础研究, E-mail: mxsang@hotmail.com

[优先发表] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20170509.1027.014.html>

([63.6 ± 1.2] vs [23.0 ± 2.3] μm , $P < 0.05$; [62.5 ± 2.5] vs [21.2 ± 1.0] μm , $P < 0.05$) after over-expression of *EZH2*. Knockdown of *EZH2* significantly decreased the trans-membrane number of Eca109 and TE1 cells (all $P < 0.05$), and the migration distance was also decreased after transfection with sh*EZH2* (all $P < 0.05$). **Conclusion:** *EZH2* can enhance trimethylation of lysine 27 on histone H3 (H3K27) of the target gene promoters, and promote the migration and invasion abilities of esophageal carcinoma cell lines.

[**Key words**] enhancer of zeste homolog 2 (*EZH2*); histone H3 methylated Lys27 (*H3K27me3*); esophageal squamous cell cancer (ESCC); matrix metalloproteinases (MMPs); migration; invasion

[Chin J Cancer Biother, 2017, 24(5): 490-496. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.05.006]

食管恶性肿瘤在全球癌症死亡中排名第六位^[1]。食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell cancer, ESCC)在亚洲中部和东部是最常见的组织学类型, 占有病理学类型的 90%^[2]。在中国, ESCC 是引起癌症死亡的主要原因之一^[3]。尽管 ESCC 的外科手术、放化疗已经取得了很大进步, 但是 ESCC 患者 5 年生存率仍不理想, 许多患者病情仍然迅速进展并且发生复发转移, 晚期 ESCC 患者预后较差并且生活质量低^[4]。ESCC 细胞发生远位转移是其导致死亡的主要原因, 而癌细胞的迁移和侵袭是促进恶性肿瘤转移的关键步骤。Zeste 同源物增强子 2 (enhancer of zeste homolog 2, *EZH2*) 是一种组蛋白甲基转移酶, 能使核小体组蛋白 H3 的第 27 位赖氨酸侧链上的 ϵ 氨基发生三甲基化, 三甲基化后的 H3K27 (H3K27me3) 可将核心蛋白复合体 2 (polycomb repressive complex 2, PRC2) 招募到特定的基因位点, 沉默靶基因的表达^[5]。*EZH2* 过表达与肿瘤的侵袭、转移和患者不良的临床预后密切相关^[6-9]。本课题通过检测 ESCC 细胞中 *EZH2* 和 H3K27me3 的表达水平, 探讨 *EZH2* 对 ESCC 细胞迁移、侵袭能力的影响, 为深入研究 *EZH2* 在 ESCC 细胞中的作用机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 细胞株及主要试剂

人 ESCC 细胞株 KYSE30、KYSE170、ECA109、TE1 均来自于本实验室。RPMI 1640 培养基、胰蛋白酶购自美国 Gibco 公司, 胎牛血清购自上海依科赛生物制品有限公司, RIPA 细胞裂解液购自上海贝博生物公司。TRIzol 购自美国 Invitrogen 公司, Platinum SYBR SuperMix 试剂、FuGENE HD 转染试剂及反转录试剂盒均购自美国 Promega 公司, PCR 引物购自英潍捷基贸易有限公司, pCMV6 Entry-EZH2-Myc-DDK、sh*EZH2* 质粒均购自 Origene 公司。兔抗人 *EZH2* 多克隆抗体和鼠抗人 β -actin 单克隆抗体购自美国 Invitrogen 公司, 兔抗人的 H3K27me3 多克隆抗体购自

美国 Cell Signaling 公司, 山羊抗兔二抗购自 Abcam 公司。Transwell 小室 (孔径 3.0 μm) 购自美国 Corning 公司, Matrigel 基质胶购自美国 BD 公司。

1.2 实时荧光定量 PCR 及 Western blotting 检测 ESCC 细胞中 *EZH2* 和 *H3K27me3* mRNA 的表达

用 TRIzol 试剂提取 ESCC KYSE30、KYSE170、ECA109、TE1 细胞的总 RNA, 用反转录试剂盒将 RNA 反转录成 cDNA, 并以 cDNA 为模板用 Platinum-SYBR SuperMix 进行 PCR 扩增, 引物由英潍捷基公司设计, 序列见表 1。以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值表示 *EZH2* mRNA 的相对表达水平。收集各组 ESCC 细胞, 裂解细胞、提总蛋白, Western blotting 检测 *EZH2* 和 H3K27me3 蛋白的表达。实验重复 3 次。

表 1 Real-time PCR 引物
Tab. 1 Primers of Real-time PCR

Gene	Primer
<i>EZH2</i>	
Sense	5'CGCTTTTCTGTAGGCCGATGT3'
Antisense	5'TGGGTGTTGCATGAAAAGAA3'
<i>MMP1</i>	
Sense	5'ATGATATCTTTTGTGTCAGGGGAGAT3'
Antisense	5'CCTGGTTGAAAAGCATGACG3'
<i>MMP2</i>	
Sense	5'TACAGGATCATTGGCTACACACC3'
Antisense	5'GGTCACATCGCTCCAGACT3'
<i>MMP7</i>	
Sense	5'GGAGATGCTCACTTCGATGA3'
Antisense	5'ATACCCAAAGAATGGCCAAG3'
<i>MMP9</i>	
Sense	5'TGTACCGCTATGGTTACTCTCG3'
Antisense	5'GGCAGGGACAGTTGCTTCT3'
<i>GAPDH</i>	
Sense	5'CGCTGAGTACGTCGTGGAGTC3'
Antisense	5'GCTGATGATCTTGAGGCTGTTGTC3'

1.3 细胞转染

人 ESCC 细胞均用含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 μg/ml 链霉素的 RPMI 1640 培养液,置于 37 °C、5% CO₂ 体积分数的培养箱中培养。按 FuGENE HD 转染试剂说明书方法将 pCMV6 Entry-EZH2-Myc-DDK 及 shEZH2 质粒分别转染至 KYSE30、KYSE170、Eca109 和 TE1 细胞中,并分别转染空载体做对照组。

1.4 实时荧光定量 PCR 和 Western blotting 检测转染效率及 H3K27me3 蛋白的表达水平

RNA 提取、逆转录、扩增方法与步骤按照试剂盒说明书操作。EZH2 引物序列见表 1,扩增条件为 95 °C 预变性 5 min,95 °C 15 s,60 °C 1 min,共 40 个循环。根据各目的基因 2^{-ΔΔct} 值计算相对表达水平。实验重复 3 次。

总蛋白的提取与浓度测定按照说明书操作,蛋白热变性后 -20 °C 冰箱保存,行 SDS-PEAG,每孔蛋白上样量为 30 μg,电泳时间约 2 h,根据目的蛋白预测分子量切胶 4 °C 条件下 330 mA 恒流湿转至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉封闭 1 h,加入一抗 (1:1 000) 4 °C 过夜,次晨复温 2 h,TBST 洗膜后加二抗 (1:5 000),37 °C 孵育 1 h,β-actin 为内参,ECL 化学发光,用 Image J 灰度分析软件进行分析。实验重复 3 次。

1.5 Transwell 小室法检测 pCMV6 Entry-EZH2-Myc-DDK 及 shEZH2 转染后 ESCC 细胞的侵袭能力

取对数期生长的转染组和未转染组细胞悬液,将两组细胞分别加入 Transwell 小室的上室(1.5 × 10⁵ 个/小室),下室中加入 600 μl 含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液,常规培养 48 h,用棉签擦净上室细胞,PBS 清洗后,姬姆萨染色,常规制片,于倒置相差显微镜下(×200)观察并拍照,随机观察 5 个视野,计数穿膜细胞数。实验重复 3 次。

1.6 划痕实验检测转染 pCMV6 Entry-EZH2-Myc-DDK 及 shEZH2 后 ESCC 细胞的迁移能力

收集对数期的 ESCC 细胞,调整细胞密度为 5 × 10⁵ 个细胞/ml,取 2 ml 接种于 6 孔板,并在 6 孔板背面划 5 条平行线做标记,24 h 后用 200 μl 枪头在细胞中划 2 条垂直于背面平行线的直线,PBS 冲洗 2 次,加入 2 ml 无胎牛血清的 RPMI 1640 培养液,于 0、24 h 在倒置显微镜下观察细胞向划痕中间迁移的距离并拍照,每组实验设 3 个平行孔。实验重复 3 次。

1.7 实时荧光定量 PCR 检测过表达及敲低 EZH2 对 MMPs mRNA 表达水平的影响

方法同 1.4。

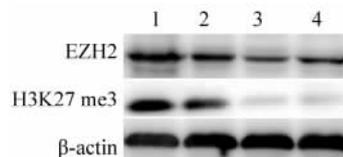
1.8 统计学处理

应用 SPSS13.0 统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间的均数比较采用 *t* 检验,多组间均数比较采用单因素方差分析,以 *P* < 0.05 或 *P* < 0.01 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EZH2 及 H3K27me3 mRNA 和蛋白在各 ESCC 细胞中的表达

实时荧光定量 PCR 检测结果显示,四组 ESCC 细胞中,Eca109 和 TE1 细胞 EZH2 mRNA 表达分别显著高于 KYSE30 和 KYSE170 细胞[(2.89 ± 0.18)、(8.78 ± 0.23) vs (1.01 ± 0.01)、(0.96 ± 0.01)],均 *P* < 0.05。Western blotting 检测结果(图 1,表 2)显示,Eca109 和 TE1 细胞 EZH2 及 H3K27me3 蛋白表达水平也分别高于 KYSE30 和 KYSE170 细胞(均 *P* < 0.05)。



1: Eca109; 2: TE1; 3: KYSE30; 4: KYSE170

图 1 食管癌细胞 EZH2 和 H3K27me3 蛋白的表达

Fig.1 Expressions of EZH2 and H3K27me3 proteins in the ESCC cell lines

表 2 食管癌细胞 EZH2 和 H3K27me3 蛋白的表达

Tab.2 Expressions of EZH2 and H3K27me3 in the ESCC cell lines

Protein	Eca109	TE1	KYSE170	KYSE30
EZH2	0.37 ± 0.01 *	0.36 ± 0.02 *	0.23 ± 0.01	0.24 ± 0.02
H3K27me3	0.65 ± 0.01 *	0.65 ± 0.05 *	0.13 ± 0.01	0.13 ± 0.01

* *P* < 0.05 vs KYSE170 or KYSE30 cell line

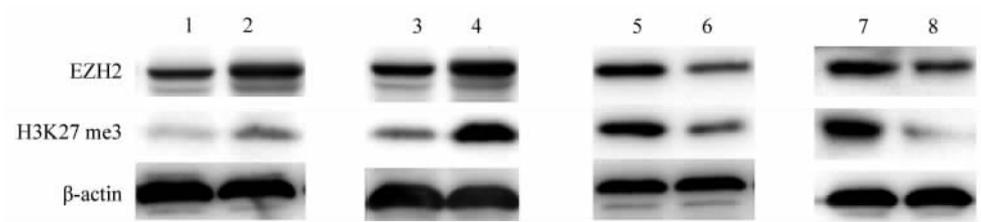
2.2 转染 EZH2 和 shEZH2 后各 ESCC 细胞中 EZH2 及 H3K27me3 mRNA 和蛋白的表达

实时荧光定量 PCR 检测结果显示,转染 EZH2 后,KYSE30 及 KYSE170 细胞中 EZH2 mRNA 表达水平分别显著高于对照组[(48.50 ± 3.41)、(14.60 ± 1.32) vs (1.01 ± 0.02)、(1.00 ± 0.04)],*t* = 24.121,20.214; 均 *P* < 0.05; 转染 shEZH2 后,Eca109 及 TE1 细胞中 EZH2 mRNA 表达水平分别

显著低于对照组[(0.14 ± 0.01)、(0.37 ± 0.02) vs (1.00 ± 0.02)、(1.00 ± 0.01) , $t = 66.615, 48.800$; 均 $P < 0.05$]。

Western blotting 检测结果(图 2)显示,转染 *EZH2* 后:(1) KYSE30 及 KYSE170 细胞中 EZH2 蛋白和 H3K27me3 蛋白表达水平均显著高于对照组 [EZH2 蛋白:(0.619 ± 0.013)、(0.537 ± 0.029) vs (0.508 ± 0.015)、(0.372 ± 0.001) , $t = 9.686, 9.849$; 均 $P < 0.05$; H3K27me3 蛋白:(0.501 ±

0.018)、(0.401 ± 0.003) vs (0.245 ± 0.001)、(0.219 ± 0.003) , $t = 24.596, 74.301$; 均 $P < 0.05$]; (2) Eca109 及 TE1 细胞中 EZH2 蛋白和 H3K27me3 蛋白表达水平分别显著低于对照组 [EZH2 蛋白:(0.301 ± 0.037)、(0.348 ± 0.007) vs (0.554 ± 0.002)、(0.667 ± 0.090) , $t = 11.826, 6.121$; 均 $P < 0.05$; H3K27me3 蛋白:(0.304 ± 0.009)、(0.193 ± 0.016) vs (0.591 ± 0.009)、(0.647 ± 0.043) , $t = 39.056, 17.139$; 均 $P < 0.05$]。



1: KYSE30 Ctrl; 2: KYSE30-EZH2; 3: KYSE170-Ctrl; 4: KYSE170-EZH2;
5: Eca109-Ctrl; 6: Eca109-shEZH2; 7: TE1-Ctrl; 8: TE1-shEZH2

图 2 食管癌细胞中过表达及敲低 *EZH2* 对 H3K27me3 表达水平的影响

Fig. 2 Effect of *EZH2* over-expression/knockdown on the expression of H3K27me3 in ESCC cells

2.3 *EZH2* 调控 ESCC 细胞的侵袭能力

Transwell 侵袭实验结果(图 3)显示, *EZH2* 过表达组 KYSE30 和 KYSE170 细胞的穿膜细胞数均显著多于对照组 [KYSE30 细胞:(281.33 ± 4.10) vs (132.00 ± 4.00) 个, $t = 31.758, P < 0.05$; KYSE170 细胞:(241.67 ± 4.04) vs (105.33 ± 3.51) 个, $t =$

44.104, $P < 0.05$]。 *EZH2* 低表达组 Eca109 和 TE1 细胞的穿膜细胞数均显著低于对照组 [Eca109 细胞:(32.33 ± 2.08) vs (117.67 ± 2.51) 个, $t = 45.255, P < 0.05$; TE1 细胞:(41.67 ± 3.05) vs (233.00 ± 8.18) 个, $t = 37.931, P < 0.05$]。

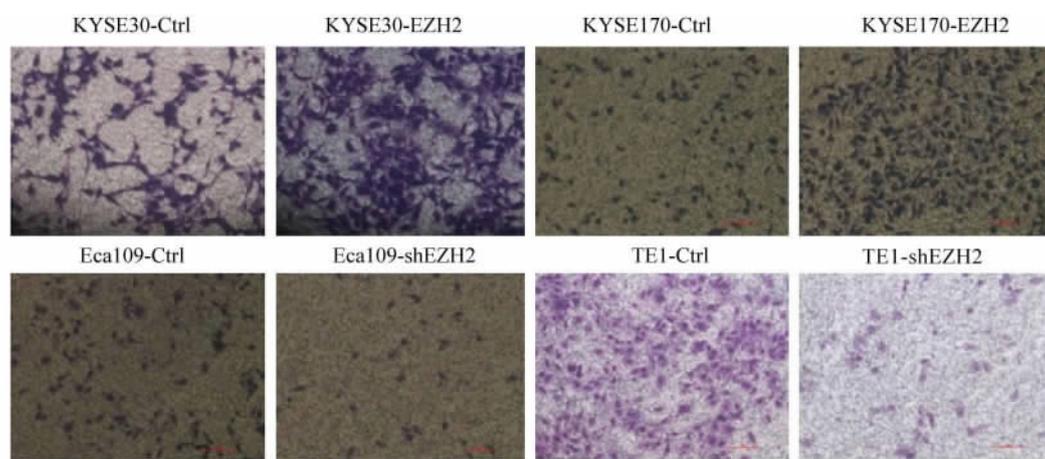


图 3 过表达或者敲低 *EZH2* 对食管癌细胞侵袭能力的影响(姬姆萨染色, ×200)

Fig. 3 Effect of *EZH2* over-expression/knockdown on invasion ability of ESCC cells(Giemsa staining, ×200)

2.4 *EZH2* 调控 ESCC 细胞的迁移能力

细胞划痕实验结果(图 4)显示,转染 *EZH2* 组

KYSE30 及 KYSE170 细胞向划痕中间迁移距离显著大于对照组 [(63.6 ± 1.2)、(62.5 ± 2.5) vs (23.0

± 2.3)、(21.2 ± 1.0) μm , $t = 26.955, 26.350$; 均 $P < 0.05$], 细胞迁移能力明显增强; 转染 shEZH2 组 Eca109 及 TE1 细胞向划痕中间迁移的距离显著小

于对照组[(52.2 ± 2.2)、(43.0 ± 2.3) vs (91.2 ± 1.2)、(82.7 ± 1.0) μm , $t = 28.614, 27.054$; 均 $P < 0.05$], 细胞迁移能力明显降低。

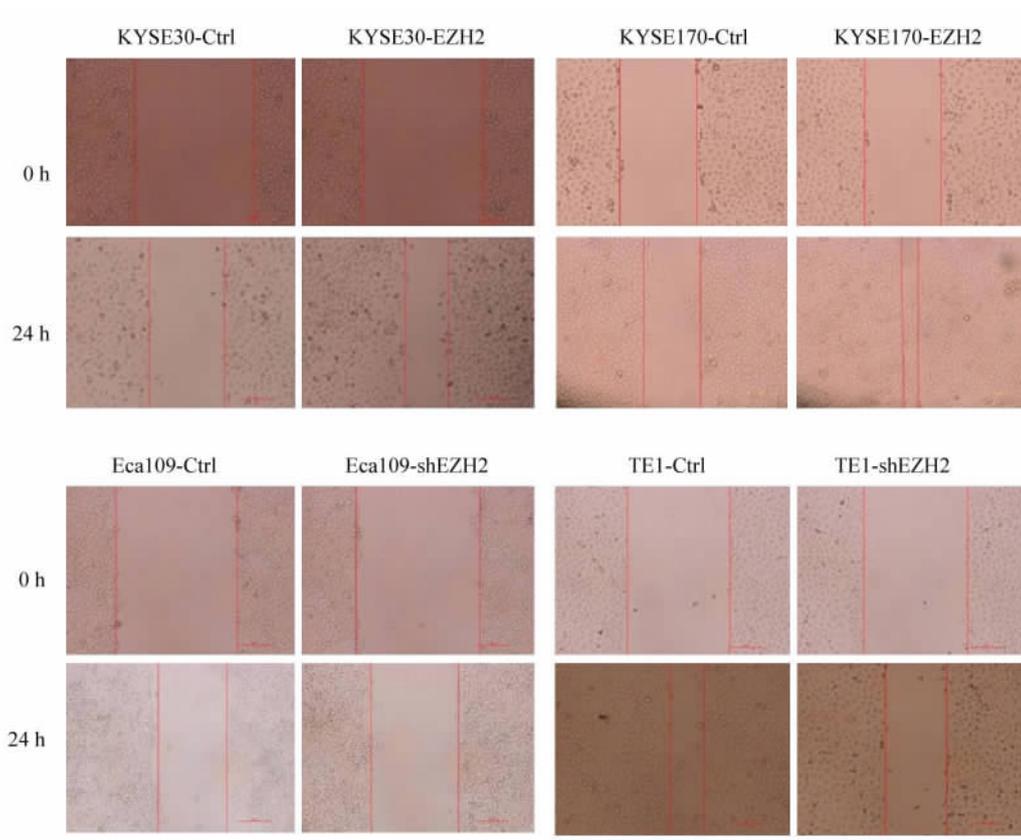


图 4 食管癌细胞中过表达或者敲低 EZH2 对细胞迁移的影响

Fig. 4 Effect of EZH2 over-expression/knockdown on migration of ESCC cells detected by wound healing assay

2.5 EZH2 调控 ESCC 细胞 MMPs 的表达水平

实时荧光定量 PCR 检测结果(图 5)显示,转染 EZH2 后 KYSE30 及 KYSE170 细胞中 MMP1、MMP2、MMP7、MMP9 mRNA 水平明显上调 ($P < 0.05$); 转染 shEZH2 后 Eca109 及 TE1 细胞细胞中 MMP1、MMP2、MMP7、MMP9 mRNA 水平明显下调 ($P < 0.05$)。

3 讨论

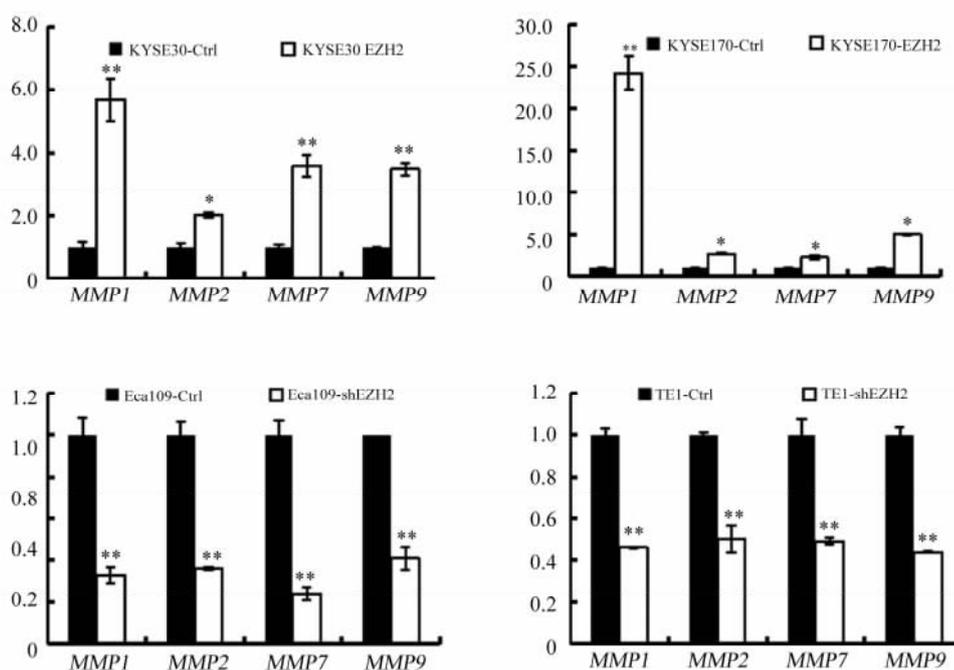
侵袭和转移是恶性肿瘤的主要特征,也是引起癌症死亡的主要原因。组蛋白甲基转移酶 EZH2 是位于染色质 7q35 能够编码多梳蛋白。EZH2 过表达与肿瘤的侵袭和疾病晚期转移阶段有联系,并且与患者不良的临床预后密切相关^[6-9]。在不同的体外癌细胞模型中也证明 EZH2 促进了细胞的增殖、迁移和侵袭^[10-13]。有研究^[14]表明,EZH2 表达升高可以导致组蛋白 H3 赖氨酸 27 发生三甲基化,导致

乳腺癌细胞增殖及迁移能力增加。Luo 等^[15]研究发现,在喉鳞状细胞癌中 EZH2 的表达与 H3K27me3 表达成正相关,并且通过上皮间质转化影响喉鳞状细胞癌的侵袭和迁移能力。此外,也有文献^[16-17]报道抑制 miR-98 及 miR-214 的表达能够增加 EZH2 的表达从而增加食管癌侵袭及迁移能力。但并未指出 EZH2 是通过典型的组蛋白甲基转移酶途径诱导组蛋白 H3 赖氨酸 k27 发生三甲基化,还是作为非典型的转录辅助激活因子途径来影响食管癌细胞侵袭及迁移能力。本研究通过过表达及敲低 EZH2 载体从正反两方面研究 ESCC 细胞系中 EZH2 与 H3K27me3 之间的关系,探讨 EZH2 与 ESCC 细胞侵袭及迁移能力的关系。

细胞发生侵袭和迁移在癌症转移过程中发挥了重要作用。MMPs 属于锌依赖肽链内切酶家族,可以降解细胞外基质(extracellular matrix, ECM)^[18]。MMPs 几乎能降解 ECM 中各种蛋白成分,破坏肿瘤

细胞侵袭的组织学屏障,在肿瘤侵袭转移中扮演关键作用,被认为是该过程中主要的蛋白水解酶。有研究^[19]表明,在前列腺癌细胞中 *EZH2* 对于调节 MMPs 的活性具有重要作用,*EZH2* 可以使前列腺癌细胞系中组织金属蛋白酶抑制剂 2(tissue inhibitor of metalloproteinase2, TIMP2)及 TIMP3 启动子上组蛋白 H3 第 27 位赖氨酸发生三甲基化,进而沉默其表达。TIMPs 是 MMPs 的抑制剂,机体内 TIMPs 与 MMPs 保持动态平衡,TIMPs 表达降低能提高 MMPs

表达升高^[19]。本课题通过使用 *EZH2* 过表达及敲低载体研究发现,过表达 *EZH2* 能够导致 ESCC 细胞 *MMP1*、*MMP2*、*MMP7* 及 *MMP9* 的表达水平增加,敲低 *EZH2* 能降低 ESCC 细胞 *MMP1*、*MMP2*、*MMP7* 及 *MMP9* 的表达。Transwell 侵袭实验和细胞划痕实验也进一步证明过表达 *EZH2* 可以增加 ESCC 细胞的侵袭及迁移能力,敲低 *EZH2* 可以降低食管癌细胞的侵袭及迁移能力。



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs KYSE30-Ctrl, KYSE170-Ctrl, Eca109-Ctrl or TE1-Ctrl cell line

图5 过表达或者敲低 *EZH2* 对食管癌细胞 *MMP1*、*MMP2*、*MMP7*、*MMP9* mRNA 的影响

Fig. 5 Effect of *EZH2* over-expression/knockdown on levels of *MMP1*, *MMP2*, *MMP7* and *MMP9* mRNA in ESCC cells

本研究通过转染 *EZH2* 过表达及敲低载体来研究 *EZH2* 与 *H3K27me3* 间的关系及其对 ESCC 细胞侵袭和迁移能力的影响,发现 ESCC 细胞中 *EZH2* 可以增加组蛋白 H3 第 27 位赖氨酸的三甲基化水平,并发现转染 *EZH2* 后可能通过破坏 TIMPs 与 MMPs 之间的平衡,进而增加 MMPs 的表达来破坏肿瘤细胞侵袭的组织学屏障,从而增加 ESCC 细胞的侵袭和迁移能力,为进一步研究 *EZH2* 在 ESCC 细胞侵袭转移及临床治疗中的作用奠定基础。

[参 考 文 献]

[1] PAIN A, FITZMAURICE C, DICKER D, et al. The global burden of cancer 2013[J]. JAMA Oncol, 2015, 1(4): 505-527. DOI:10. 1001/jamaoncol. 2015. 0735.

- [2] ARNOLD M, SOERJOMATARAM I, FERLAY J, et al. Global incidence of oesophageal cancer by histological subtype in 2012 [J]. Gut, 2015, 64(3): 381-387. DOI:10. 1136/gutjnl-2014-308124.
- [3] TORRE L A, BRAY F, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108. DOI: 10. 3322/caac. 21262.
- [4] GU H, QIU W, SHI Y, et al. Variant alleles of VEGF and risk of esophageal cancer and lymph node metastasis[J]. Biomarkers, 2014, 19(3): 252-258. DOI: 10. 3109/1354750X. 2014. 902997.
- [5] CAO R, WANG L, WANG H, et al. Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing[J]. Science, 2002, 298(5595): 1039-1043. DOI:10. 1126/science. 1076997.
- [6] VARAMBALLY S, DHANASEKARAN S M, ZHOU M, et al. The polycomb group protein *EZH2* is involved in progression of

prostate cancer[J]. Nature, 2002, 419(6907): 624-629. DOI: 10. 1038/nature01075.

[7] KLEER C G, CAO Q, VARAMBALLY S, et al. *EZH2* is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100 (20): 11606-11611. DOI: 10. 1073/pnas. 1933744100.

[8] COLLETT K, EIDE G E, ARNES J, et al. Expression of enhancer of zeste homologue 2 is significantly associated with increased tumor cell proliferation and is a marker of aggressive breast cancer [J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(4): 1168-1174. DOI: 10. 1158/1078-0432.CCR-05-1533.

[9] LIU F, GU L, CAO Y, et al. Aberrant overexpression of *EZH2* and H3K27me3 serves as poor prognostic biomarker for esophageal squamous cell carcinoma patients[J]. Biomarkers, 2016, 21(1): 80-90. DOI:10. 3109/1354750X.2015. 1118537.

[10] WEIKERT S, CHRISTOPH F, KOLLERMANN J, et al. Expression levels of the *EZH2* polycomb transcriptional repressor correlate with aggressiveness and invasive potential of bladder carcinomas [J]. Int J Mol Med, 2005, 16(2): 349-353. DOI: 10. 3892/ijmm. 16. 2. 349.

[11] MCHUGH J B, FULLEN D R, MA L, et al. Expression of polycomb group protein *EZH2* in nevi and melanoma[J]. J Cutan Pathol, 2007, 34(8): 597-600. DOI:10. 1111/j. 1600-0560. 2006. 00678. x.

[12] SMITS M, NILSSON J, MIR S E, et al. miR-101 is down-regulated in glioblastoma resulting in *EZH2*-induced proliferation, migration, and angiogenesis[J]. Oncotarget, 2010, 1(8): 710-720. DOI:10. 18632/oncotarget. 101207.

[13] TONG Z T, CAI MY, WANG X G, et al. *EZH2* supports nasopharyngeal carcinoma cell aggressiveness by forming a co-repressor complex with HDAC1/HDAC2 and Snail to inhibit E-cadherin[J]. Oncogene, 2012, 31(5): 583-594. DOI:10. 1038/onc. 2011. 254.

[14] KO H W, LEE H H, HUO L, et al. GSK3beta inactivation promotes the oncogenic functions of *EZH2* and enhances methylation of H3K27 in human breast cancers[J]. Oncotarget, 2016, 7(35): 57131-57144. DOI:10. 18632/oncotarget. 11008.

[15] LUO H, JIANG Y, MA S, et al. *EZH2* promotes invasion and metastasis of laryngeal squamous cells carcinoma via epithelial-mesenchymal transition through H3K27me3[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 479(2): 253-259. DOI:10. 1016/j. bbrc. 2016. 09. 055.

[16] HUANG S D, YUAN Y, ZHUANG C W, et al. MicroRNA-98 and microRNA-214 post-transcriptionally regulate enhancer of zeste homolog 2 and inhibit migration and invasion in human esophageal squamous cell carcinoma[J/OL]. Mol Cancer, 2012, 11: 51 [2016-11-15]. <http://www. mdpi. com/2218-273X/6/1/3>. DOI:10. 1186/1476-4598-11-51.

[17] BAE W K, HENNIGHAUSEN L. Canonical and non-canonical roles of the histone methyltransferase *EZH2* in mammary development and cancer[J]. Mol Cell Endocrinol, 2014, 382(1): 593-597. DOI:10. 1016/j. mce. 2013. 05. 002.

[18] FRIEDL P, WOLF K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms[J]. Nat Rev Cancer, 2003, 3(5): 362-374. DOI:10. 1038/nrc1075.

[19] SHIN Y J, KIM J H. The role of *EZH2* in the regulation of the activity of matrix metalloproteinases in prostate cancer cells[J/OL]. PLoS One, 2012, 7: e30393[2016-11-15]. <https://www. ncbi. nlm. nih. gov/pmc/articles/PMC3260297/>. DOI: 10. 1371/journal. pone. 0030393.

[收稿日期] 2016 - 12 - 18 [修回日期] 2017 - 03 - 05
[本文编辑] 党瑞山

• 读者 • 作者 • 编者 •

本刊对论文中实验动物描述的要求

根据国家科学技术部 1988 年颁布的《实验动物管理条例》和卫生部 1998 年颁布的《医学实验动物管理实施细则》，本刊对论文中有关实验动物的描述，要求写清楚以下事项：(1)品种、品系及亚系的确切名称；(2)遗传背景或其来源；(3)微生物检测状况；(4)性别、年龄、体质量；(5)质量等级及合格证书编号；(6)饲养环境和实验环境；(7)健康状况；(8)对动物实验的处理方式。

医学实验动物分为四级：一级为普通级；二级为清洁级；三级为无特定病原体(SPF)级；四级为无菌级(包括悉生动物)。省部级课题及研究生毕业论文等科研实验必须应用二级以上的实验动物。

(本刊编辑部)