

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2017.09.011

· 基础研究 ·

EZH2 基因对人食管癌细胞增殖的影响

黄卫娜, 古丽娜, 刘飞, 桑梅香(河北医科大学第四医院肿瘤研究所 免疫学实验室, 河北 石家庄 050011)

[摘要] **目的:** 探讨过表达或沉默果蝇 *Zeste* 基因增强子人类同源物 2(enhancer of zeste homolog 2, *EZH2*) 基因对食管癌细胞增殖的影响。**方法:** 选用人食管癌细胞株 ECA109、TE1、KYSE30、KYSE170 作为研究对象, 采用实时荧光定量 PCR(qPCR)、Western blotting 法分别检测食管癌细胞 *EZH2* mRNA 和蛋白的表达水平, 然后采用 qPCR 检测过表达和沉默 *EZH2* 基因后对 4 株食管癌细胞 *EZH2* mRNA 的表达变化; CCK-8 增殖实验、克隆形成实验检测过表达和沉默 *EZH2* 基因及 *EZH2* 抑制剂 DZNep(3-deazaneplanocin A) 处理对食管癌细胞增殖能力和克隆形成率的影响。**结果:** 食管癌 ECA109、TE1 细胞中 *EZH2* mRNA 和蛋白水平明显高于 KYSE30、KYSE170 细胞 ($P < 0.05$)。食管癌 TE1、ECA109 细胞转染 *EZH2*-ShRNA 后 *EZH2* 表达水平下调(均 $P < 0.05$)、细胞增殖能力降低(1.07 ± 0.08 vs 1.59 ± 0.09 , $P < 0.05$; 0.88 ± 0.08 vs 1.05 ± 0.11 , $P < 0.05$)、克隆形成数下调[(200.00 ± 11.43) vs (480.00 ± 13.10)个, $P < 0.05$; (88.00 ± 8.16) vs (220.00 ± 14.69)个, $P < 0.05$]。KYSE30、KYSE170 细胞转染 *EZH2* 过表达质粒后 *EZH2* 表达水平升高(均 $P < 0.05$)、细胞增殖能力显著增强 (1.06 ± 0.07 vs 0.76 ± 0.06 , $P < 0.05$; 3.36 ± 0.30 vs 1.50 ± 0.08 , $P < 0.05$)、克隆形成数显著升高 [(45.00 ± 3.27) vs (18.00 ± 1.63)个, $P < 0.05$; (65.00 ± 4.08) vs (23.00 ± 2.45)个, $P < 0.05$]; DZNep 处理后, ECA109 和 TE1 细胞增殖能力降低(均 $P < 0.05$)、克隆形成数下降(均 $P < 0.05$)。**结论:** *EZH2* 基因能有效促进食管癌细胞的增殖和克隆形成能力, 为深入研究 *EZH2* 作为食管癌治疗的新靶点提供了研究实验基础。

[关键词] 食管癌; 果蝇 *Zeste* 基因增强子人类同源物 2; DZNep; 细胞增殖

[中图分类号] R735.1; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2017)09-0851-06

Effect of *EZH2* gene on proliferation of human esophageal cancer cells

HUANG Weina, GU Lina, LIU Fei, SANG Meixiang (Immunology Laboratory, Tumor Research Institute, Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of *EZH2* (enhancer of zeste homolog 2) overexpression or knockdown on the proliferation of esophageal cancer cells. **Methods:** Human esophageal cancer cell lines ECA109, TE1, KYSE30 and KYSE170 were selected as the research objects. The expression of *EZH2* mRNA and protein in esophageal carcinoma cells were detected by quantitative real-time PCR and Western blotting, respectively. The mRNA expression of four esophageal cancer cells after over expression or knockdown of *EZH2* was detected by quantitative real-time PCR. The effects of *EZH2* over-expression or knockdown as well as *EZH2* inhibitor DZNep (3-deazaneplanocin A) on the proliferation and clone growth rate of esophageal cancer cells were observed by CCK-8 proliferation assay and clone formation assay. **Results:** The expression of *EZH2* mRNA and protein in ECA109 and TE1 cells were significantly higher than those in KYSE30 and KYSE170 cells ($P < 0.05$). The expression of *EZH2* in esophageal cancer TE1 and ECA109 cells was down-regulated after transfection with *EZH2*-ShRNA, and the cell proliferation was decreased (1.07 ± 0.08 vs 1.59 ± 0.09 , $P < 0.05$; 1.05 ± 0.11 vs 0.88 ± 0.08 , $P < 0.05$), and the clone formation was also down-regulated (200.00 ± 11.43 vs 480.00 ± 13.10 , $P < 0.05$; 88.00 ± 8.16 vs 220.00 ± 14.69 , $P < 0.05$). The expression of *EZH2* was increased in esophageal cancer KYSE30 and KYSE170 cells after transfection of *EZH2*

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

[作者简介] 黄卫娜(1992-), 女, 硕士生, 主要从事肿瘤免疫学基础的研究工作, E-mail: H137rose@163.com

[通信作者] 桑梅香(SANG Meixiang, corresponding author), 博士, 副教授, 研究生导师, 主要从事肿瘤分子生物学及免疫学研究, E-mail: mxsang@hotmail.com

[优先发表]

overexpression plasmid, and the proliferation ability (1.06 ± 0.07 vs 0.76 ± 0.06 , $P < 0.05$; 3.36 ± 0.30 vs 1.50 ± 0.08 , $P < 0.05$) and colony formation (45.00 ± 3.27 vs 18.00 ± 1.63 , $P < 0.05$; 65.00 ± 4.08 vs 23.00 ± 2.45 , $P < 0.05$) were significantly increased. After DZNep treatment, proliferation (all $P < 0.05$) and colony formation (all $P < 0.05$) in ECA109 and TE1 cells were decreased. **Conclusion:** *EZH2* gene can effectively promote the proliferation and cloning ability of esophageal cancer cells, which provides a basis for further study on the mechanism of *EZH2* as a target in the treatment of esophageal cancer.

[Key words] esophageal cancer; *EZH2*; DZNep; cell proliferation

[Chin J Cancer Biother, 2017, 24(9): 913-925. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2017.09.006]

果蝇 *Zeste* 基因增强子人类同源物 2 (enhancer of *zeste* homolog 2, *EZH2*) 基因是表观遗传调控因子 Polycomb group (PcG) 蛋白家族重要成员^[1], 其与 SUZ12 和 EED 共同组成 PRC2 蛋白复合物(核心催化亚基), 具有高度保守的甲基转移酶活性, 通过调节核小体组蛋白第 27 位赖氨酸 (H3K27) 三甲基化作用诱导沉默具有分化能力的 *PRC2* 靶基因, 从而参与表观遗传学和基因表达的调控^[2-4]。*EZH2* 已被证明在多种恶性肿瘤中呈现异常表达, 促进了肿瘤的发生、发展、侵袭和转移, 并且与前列腺癌、乳腺癌、胃癌、卵巢癌等肿瘤的不良预后有关, 因此 *EZH2* 表达水平可作为判断肿瘤患者预后的重要标志物^[5], 越来越多的研究着重于以 *EZH2* 作为肿瘤治疗的新靶点。3-dazaneplanocin A (DZNep) 最初作为一种 S-腺苷高半胱氨酸水解酶 (S-adenosylhomo-cysteine hydrolase, SAHH) 抑制剂, 可以抑制包括 *EZH2* 在内的 PRC2 蛋白的表达, 阻断 *EZH2* 介导的甲基化作用^[6]。本研究通过 CCK-8 增殖实验和克隆形成实验检测过表达或敲低 *EZH2* 后, 对食管癌细胞增殖和克隆形成能力的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞株及主要试剂

人食管癌细胞株 ECA109、TE1、KYSE30、KYSE170 由河北医科大学第四医院肿瘤研究所细胞库提供。*EZH2* 过表达质粒 pCMV6 Entry-EZH2-Myc-DDK 及 *EZH2* 沉默质粒 ShRNA (美国 OriGene 公司), FuGENE HD 转染试剂 (美国 Promega 公司), DZNep 试剂 (美国 Calbiochen 公司), DMSO (北京北化精细化学品公司), 胎牛血清 (美国 Biotech 公司), RPMI1640、DMEM 高糖培养基 (美国 Gibco 公司)。鼠抗人 *EZH2* 单克隆抗体 (美国 Invitrogen 公司), 兔抗人 H3K27 抗体 (美国 Cell signaling 公司), β -actin 内参 (美国 Invitrogen 公司), HRP 标记抗鼠和兔的二抗 (购于美国 Rockland 公司), TRIzol RNA 逆转录试剂盒 (美国 Promega 公司), CCK-8 增殖试剂 [DOJINDO 东仁化学科技 (上海) 有限公司], 姬姆萨染色液 (珠海贝索生物技术有限公司)。

1.2 质粒构建、细胞培养与转染

将 *EZH2* 过表达和沉默质粒分别转化到感受态大肠杆菌 *DH5 α* 中, 挑取阳性克隆, 摇菌过夜, 提取质粒, 测序鉴定。人食管癌 ECA109、TE1、KYSE30、KYSE170 细胞用含 10% 胎牛血清 1640 完全培养基, 置于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱内培养。取对数生长期的细胞接种于 6 孔板中, 每孔 2×10^5 个细胞, 待 70% 汇合时, 分别用 *EZH2* 过表达质粒 pCMV6 Entry-EZH2-Myc-DDK 转染 KYSE30、KYSE170 细胞 24 h; *EZH2* 沉默质粒 ShRNA 转染 ECA109、TE1 细胞 24 h, 并采用荧光倒置显微镜观察各组转染效率。

1.3 DZNep 处理食管癌 ECA109、TE1 细胞

将 DZNep 溶解于无菌的 DMSO 中, 按终浓度为 5 μ mol/L 加入到 ECA109、TE1 细胞中, 处理 48 h, 实验分为加药组和未加药组 (对照组)。

1.4 实时荧光定量 PCR (qPCR) 检测食管癌细胞 *EZH2* mRNA 表达水平

收集转染 24 h 后的上述食管癌细胞, 加入 1 ml TRIzol 提取总的 RNA。取 2 μ g RNA 根据 RNA 逆转录试剂盒逆转录成 cDNA, 以此为模板进行 PCR 扩增, *EZH2* 上游引物为 5'-CGCTTTTCTGTAGGCGATGT-3', 下游引物为 5'-TGGGTGTTGCATGAAAAGAA-3'; 内参照 *GAPDH* 上游引物为 5'-CGCTGAGTACGTC-GTGGAGTC-3', 下游引物为 5'-GCTGATGATCTT-GAGGCTGTTGTC-3'。qPCR 反应条件: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火 1 min, 共 40 个循环; 95 °C 延伸 30 s, 60 °C 延伸 15 s 终止。以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值表示 *EZH2* mRNA 的相对表达水平。实验重复 3 次。

1.5 Western blotting 检测食管癌细胞 *EZH2* 蛋白表达水平

用蛋白裂解液 (RIPA: PMSF=100:1) 提取 4 种食管癌细胞总蛋白质, 应用 BCA 法测定蛋白水平。10% SDS-PAGE 后用 PVDF 膜进行转膜, TBST 洗膜后用 5% 牛奶封闭非特异性结合位点, TBST 洗膜后孵育一抗 *EZH2*、 β -actin (1:1 000) 4 °C 过夜, TBST 洗膜后加入 HRP 标记的山羊抗小鼠或抗兔二抗 (1:10 000), 37 °C 孵育 1 h, TBST 洗膜, 加入 ECL 发光剂反应 20 s,

电脑显影成像,用Image J灰度分析软件进行分析。实验重复3次。

1.6 CCK-8细胞增殖实验检测食管癌细胞的增殖能力

食管癌ECA109、TE1、KYSE30、KYSE170细胞分组同上,待转染24 h和加药48 h处理后,用0.25%胰蛋白酶消化制成单细胞悬液,细胞计数,将细胞种植到96孔板中,每孔 1×10^4 个细胞/100 μ l培养基。待细胞贴壁后分别检测0、24、48、72和96 h细胞增殖能力。每孔加入10 μ l CCK-8试剂,2 h后用酶标仪检测波长450 nm处光密度(D)值。每组实验设6个复孔,实验重复3次。

1.7 细胞克隆形成实验检测食管癌细胞的克隆形成率

细胞分组与处理同上,用0.25%胰蛋白酶消化制成单细胞悬液,细胞计数,将细胞种植到6孔板中,每孔 2×10^3 个细胞/2 ml培养基,7 d后4%甲醛固定,姬姆萨染液染色。克隆形成率(%)=克隆数/接种细胞数 $\times 100\%$ 。每组实验设3个复孔,实验重复3次。

1.8 统计学处理

采用SPSS 13.0软件,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验,多组间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 4株食管癌细胞EZH2 mRNA和蛋白水平的表达变化

qPCR检测结果(图1A)显示,食管癌ECA109、TE1细胞中表达EZH2 mRNA显著高于KYSE30、KYSE170细胞($t = 21.14, 28.79$;均 $P < 0.05$)。Western blotting检测结果(图1B)印证了qPCR的结果。

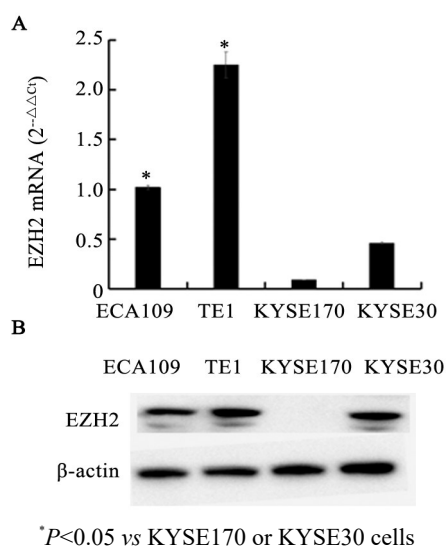


图1 各种食管癌细胞中EZH2 mRNA和蛋白的表达

Fig.1 Expression of EZH2 mRNA and protein in esophageal cancer TE1, Eca109, KYSE30 and KYSE170 cell lines

2.2 EZH2过表达质粒及沉默质粒在4株食管癌细胞中的转染效率

qPCR结果显示,转染EZH2-ShRNA 24 h后,食管癌ECA109、TE1细胞EZH2 mRNA水平表达显著降低(0.002 ± 0.000 vs 1.001 ± 0.061 , $t = 15.171$, $P < 0.01$; 0.006 ± 0.000 vs 1.013 ± 0.052 , $t = 16.470$, $P < 0.01$);转染EZH2过表达质粒24 h后,KYSE30、KYSE170细胞EZH2 mRNA水平表达显著增高(246.48 ± 28.86 vs 1.02 ± 0.06 , $t = 39.382$, $P < 0.01$; 710.71 ± 51.63 vs 1.01 ± 0.02 ; $t = 122.709$, $P < 0.01$)。

2.3 过表达和沉默EZH2后对4株食管癌细胞的增殖能力的影响

CCK-8检测结果(图2)显示:转染EZH2-ShRNA后,食管癌细胞的增殖能力低于未转染组细胞($t = 45.03, 3.77$;均 $P < 0.05$),表明敲低EZH2能抑制细胞的增殖能力;转染EZH2后,KYSE30、KYSE170细胞的增殖能力增强($t = 14.70, 42.30$;均 $P < 0.05$;图3),表明过表达EZH2能促进食管癌细胞的增殖。

2.4 DZNep抑制食管癌ECA109、TE1细胞的增殖能力

CCK-8检测结果(图4)显示,DZNep处理高表达EZH2的食管癌ECA109、TE1细胞48 h后,显著抑制细胞的增殖($t = 21.29, 16.83$,均 $P < 0.05$),表明DZNep可抑制食管癌细胞的增殖能力。

2.5 过表达或沉默EZH2对食管癌细胞克隆形成率的影响

克隆形成实验结果显示,转染EZH2-ShRNA后,食管癌TE1、ECA109细胞的克隆形成数目显著降低[(200.00 ± 11.43) vs (480.00 ± 13.10)个, $t = 22.81$, $P < 0.05$; (88.00 ± 8.16) vs (220.00 ± 14.69)个, $t = 11.10$, $P < 0.05$;图5A];转染EZH2后,食管癌KYSE30、KYSE170细胞的克隆形成数目显著增加[(45.00 ± 3.27) vs (18.00 ± 1.63)个, $t = 10.46$, $P < 0.05$; (65.00 ± 4.08) vs (23.00 ± 2.45)个, $t = 12.48$, $P < 0.05$;图5B]。

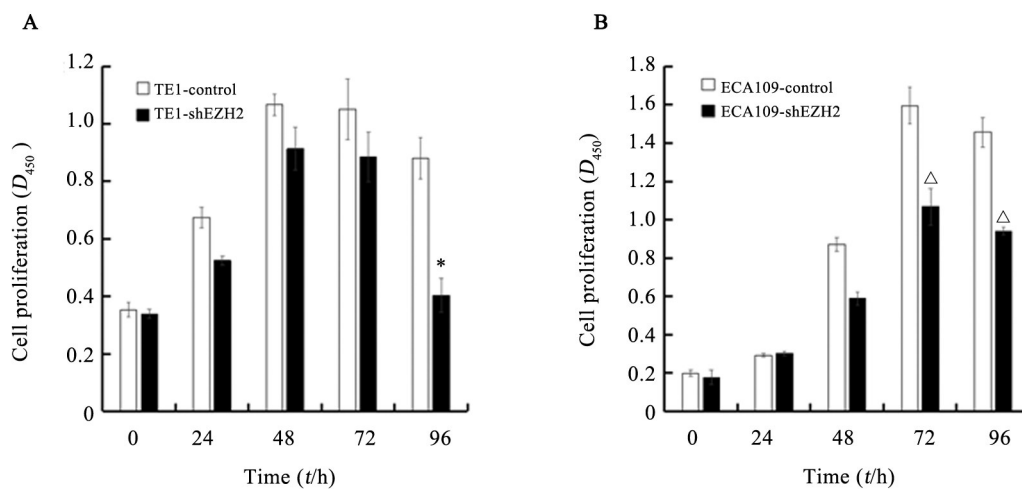
2.6 DZNep可抑制食管癌细胞的克隆形成能力

克隆形成实验结果(图6)显示,DZNep处理后,食管癌ECA109、TE1细胞的克隆形成数目显著降低[(200.00 ± 6.53) vs (500.00 ± 16.33)个, $t = 24.12$, $P < 0.05$; (80.00 ± 10.88) vs (480.00 ± 8.98)个, $t = 34.22$, $P < 0.05$]。

3 讨论

恶性肿瘤严重威胁着人类健康和社会发展,食管癌是中国最常见的消化道恶性肿瘤之一,在恶性肿瘤发病率和病死率中排名第4^[7],其中90%为鳞状细胞癌^[8-9]。由于食管癌早期临床症状不明显,多数患者诊治时已进入食管癌的中晚期,且预后较差。因此,对食管癌相关分子标志物的深入研究,有助于癌症的早

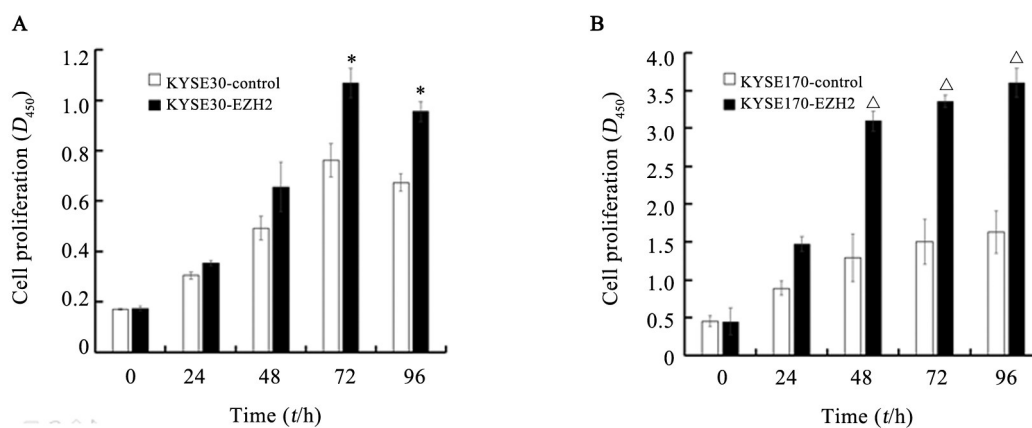
诊和早治,并对提高患者的生存率起着关键作用。



* $P < 0.05$ vs TE1-control group, [△] $P < 0.05$ vs Eca109-control group

图2 敲低 *EZH2* 对食管癌 TE1、Eca109 细胞增殖能力的影响

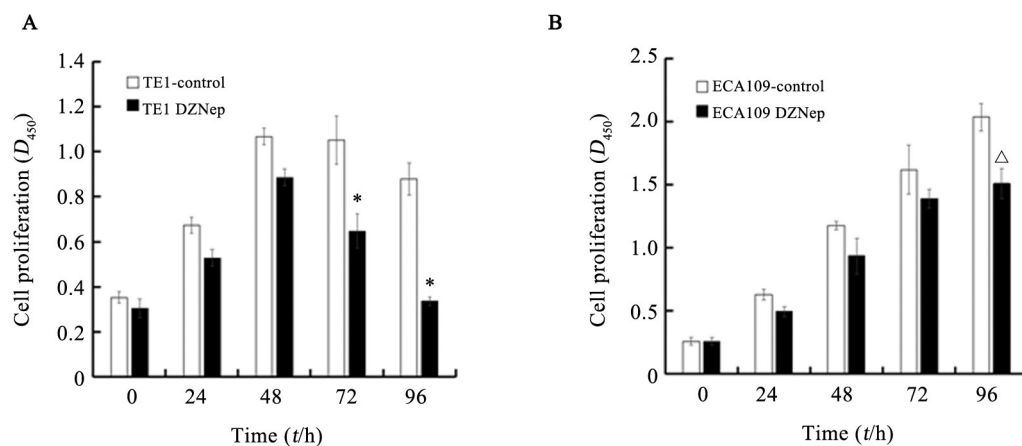
Fig.2 Effect of *EZH2* knockdown on proliferation of esophageal cancer TE1 and Eca109 cells



* $P < 0.05$ vs KYSE30-control group, [△] $P < 0.05$ vs KYSE170-control group

图3 过表达 *EZH2* 对食管癌 KYSE30 和 KYSE170 细胞增殖能力的影响

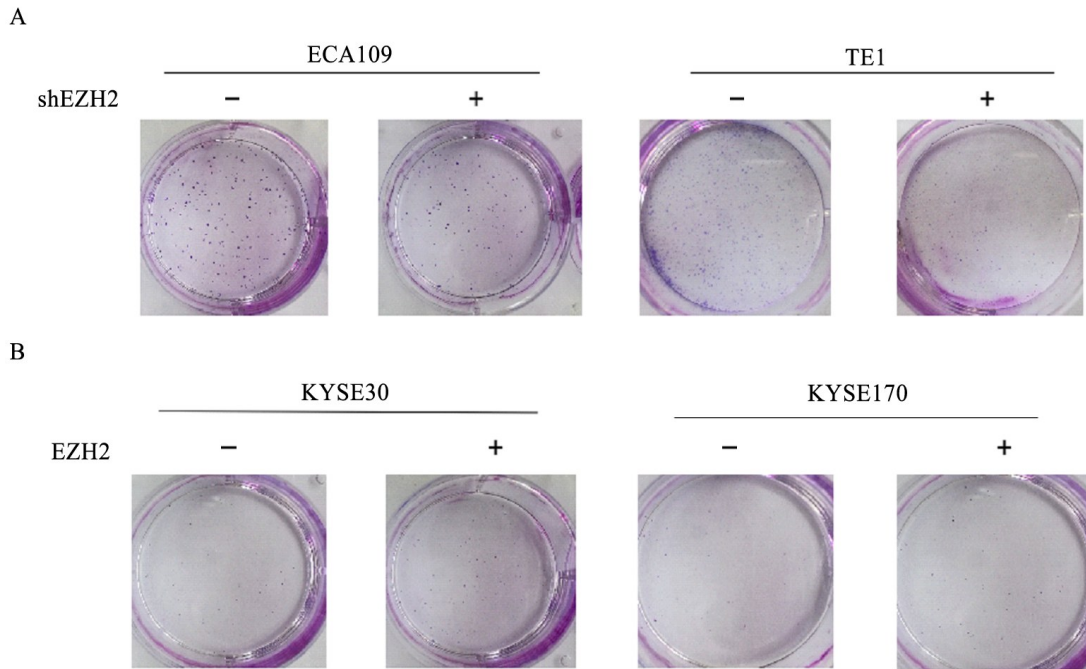
Fig.3 Effects of *EZH2* overexpression on cell viability of esophageal cancer KYSE30 and KYSE170 cells



* $P < 0.05$ vs TE1-control group, [△] $P < 0.05$ vs Eca109-control group

图4 *EZH2* 抑制剂 DZNep 对 TE1、Eca109 细胞增殖能力的影响

Fig.4 Effects of *EZH2* inhibitor DZNep on proliferation of TE1 and Eca109 cells



A: Silencing *EZH2*; B: Overexpression of *EZH2*

图5 沉默或过表达 *EZH2* 对食管癌细胞克隆形成能力的影响

Fig.5 Effects of *EZH2* knockdown or overexpression on colony ability of esophageal cancer cells

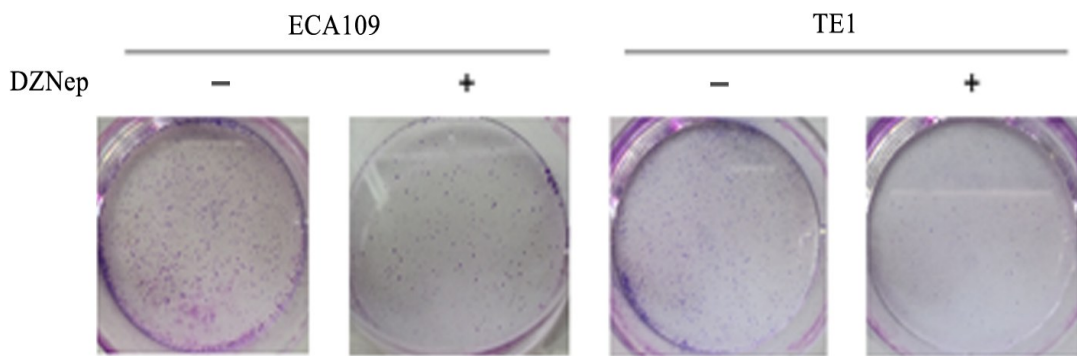


图6 DZNep可抑制食管癌 TE1、Eca109 细胞的克隆形成能力

Fig.6 DZNep inhibits the clone formation of esophageal cancer TE1 and Eca109 cells

近年来研究^[10-14]表明,人类癌症不仅包括遗传改变,也包括异常的表现改变。*EZH2*是表观遗传调控因子PcG蛋白家族的成员之一,位于人类7号染色体的q35区域上,该基因在基因组结构中覆盖了近40 kb,包含20个外显子,开放读码框分布在19个外显子上^[1],编码746个氨基酸的多肽,含有高度保守的SET区域,参与介导肿瘤的转录抑制作用^[15]。*DZNep*是组蛋白甲基转移酶*EZH2*抑制剂,并能抑制S-腺苷高半胱氨酸水解酶的活性^[16]。研究表明*DZNep*通过使PRC2和相关组蛋白基因沉默,抑制乳腺癌^[17]、非小细胞肺癌^[9]等癌细胞的增殖能力,并诱导细胞凋亡的增加。

为了明确*EZH2*表达在食管癌细胞增殖和克隆

形成过程中的作用,本研究通过构建靶向*EZH2*基因的ShRNA表达载体,转染ECA109和TE1食管癌细胞;并同时构建*EZH2*过表达质粒(pCMV6 Entry-*EZH2*-Myc-DDK),转染KYSE30、KYSE170食管癌细胞,从mRNA水平证实了ShRNA和pCMV6 Entry-*EZH2*-Myc-DDK的有效性及其特异性。肿瘤细胞的无限增殖能力是肿瘤恶性程度的重要标志,故本研究通过细胞增殖实验和克隆形成实验分析改变*EZH2*表达后4种食管癌细胞增殖能力的变化,结果显示降低食管癌细胞*EZH2*表达可显著抑制细胞的增殖和克隆形成能力;而过表达*EZH2*,能诱导食管癌细胞的增殖和克隆形成率,说明*EZH2*对食管癌细胞的增殖活性具有促进作用。对*EZH2*高表达细胞ECA109和

TE1 进行 DZNep 处理后发现, DZNep 通过降低 *EZH2* 表达抑制了食管癌细胞的增殖能力。

尽管目前有许多癌基因和抑癌基因可作为食管癌发生发展的预测因子, 然而并没有一种分子标志物能明确作为食管癌诊疗和不良预后的指标。本研究通过降低 *EZH2* 的表达, 导致食管癌细胞的增殖能力被抑制, 同时克隆形成数量显著减少。因此, 笔者认为以 *EZH2* 为靶点治疗食管癌可能成为一种新的治疗方向, 但这还需要进一步地深入研究。

[参考文献]

- [1] CARDOSO C, MIGNON C, HETET G, et al. The human *EZH2* gene: genomic organisation and revised mapping in 7q35 within the critical region for malignant myeloid disorders[J]. *Eur J Hum Genet*, 2000, 8(3): 174-180. DOI: 10.1038/sj.ejhg.5200439.
- [2] SIMON J A, LANGE C A. Roles of the *EZH2* histone methyltransferase in cancer epigenetics[J]. *Mutat Res*, 2008, 647(1/2): 21-29. DOI:10.1016/j.mrfmmm.2008.07.010.
- [3] TAKASHINA T, KINOSHITA I, KIKUCHI J, et al. Combined inhibition of *EZH2* and histone deacetylases as a potential epigenetic therapy for non-small-cell lung cancer cells[J]. *Cancer Sci*, 2016, 107(7): 955-962. DOI: 10.1111/cas.12957.
- [4] GALL TROSELJ K, NOVAK KUJUNDZIC R, UGARKOVIC D. Polycomb repressive complex's evolutionary conserved function: the role of *EZH2* status and cellular background[J/OL]. *Clin Epigenetics*, 2016, 8: 55[2017-04-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4882774/>. DOI: 10.1186/s13148-016-0226-1.
- [5] SAUVAGEAU M, SAUVAGEAU G. Polycomb group proteins: multi-faceted regulators of somatic stem cells and cancer[J]. *Cell Stem Cell*, 2010, 7(3): 299-313. DOI:10.1016/j.stem.2010.08.002.
- [6] KIKUCHI J, TAKASHINA T, KINOSHITA I, et al. Epigenetic therapy with 3-deazaneplanocin A, an inhibitor of the histone methyltransferase *EZH2*, inhibits growth of non-small cell lung cancer cells[J]. *Lung Cancer*, 2012, 78(2): 138-143. DOI: 10.1016/j.lungcan.2012.08.003.
- [7] LIN Y, TOTSUKA Y, HE Y, et al. Epidemiology of esophageal cancer in Japan and China[J]. *J Epidemiol*, 2013, 23(4): 233-242. DOI: 10.2188/jea.JE20120162.
- [8] SONG Y M, LIN L, OU Y W, et al. Identification of genomic alterations in esophageal squamous cell cancer[J]. *Nature*, 2014, 509(7398): 91-95. DOI: 10.1038/nature13176.
- [9] XU Y, YU X M, CHEN Q X, et al. Neoadjuvant versus adjuvant treatment: which one is better for resectable esophageal squamous cell carcinoma[J/OL]. *World J Surg Oncol*, 2012, 10(1): 173.[2017-04-10] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3495900/>. DOI: 10.1186/1477-7819-10-173.
- [10] AHRENDT S A, CHOW J T, XU L H, et al. Molecular detection of tumor cells in bronchoalveolar lavage fluid from patients with early stage lung cancer[J]. *Natl Cancer Inst*, 1999, 91(4): 332-339. DOI: 10.1093/jnci/91.4.332.
- [11] TAO H, HUANG C, YANG J J, et al. Experimental study of proliferation and activation of HSC-T6 cells through RNA interference targeting MeCP2[J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2012, 28(3): 333-336. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1978.
- [12] BIAN E B, HUANG C, WANG H, et al. Repression of Smad7 mediated by DNMT1 determines hepatic stellate cell activation and liver fibrosis in rats[J]. *Toxicol Lett*, 2014, 224 (2): 175-185. DOI:10.1016/j.toxlet.2013.10.038.
- [13] HE Y, HUANG C, SUN X, et al. MicroRNA-146a modulates TGF-beta1-induced hepatic stellate cell proliferation by targeting SMAD4 [J]. *Cell Signal*, 2012, 24(10): 1923-1930. DOI:10.1016/j.cellsig.2012.06.003.
- [14] MANNAERTS I, EYSACKERS N, ONYEMA O O, et al. Class II HDAC inhibition hampers hepatic stellate cell activation by induction of microRNA-29[J/OL]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e55786 [2013-01-31]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3561334/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0055786.
- [15] CARDOSO C, TIMSIT S, VILLARD L, et al. Specific interaction between the XNP/ATR-X gene product and the SET domain of the human *EZH2* protein[J]. *Hum Mol Genet*, 1998, 7(4): 679-684. DOI: 10.1093/hmg/7.4.679.
- [16] GLAZER R I, HARTMAN K D, KNOBE M C, et al. 3-Deazaneplanocin: a new and potent inhibitor of S-adenosylhomocysteine hydrolase and its effects on human promyelocytic leukemia cell line HL-60[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1986, 135(2): 688-694. DOI: 10.1016/0006-291X(86)90048-3.
- [17] PUPPE J L, DROST R, LIU X L, et al. BRCA1-deficient mammary tumor cells are dependent on *EZH2* expression and sensitive to polycomb repressive complex 2-inhibitor 3-deazaneplanocin A[J/OL]. *Breast Cancer Res*, 2009, 11(4): R63[2009-08-26]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2750125/>. DOI: 10.1186/bcr2354.

[收稿日期] 2017-04-05

[修回日期] 2017-06-01

[本文编辑] 党瑞山