

· 基础研究 ·

EZH2 蛋白在非小细胞肺癌顺铂耐药中的作用及其机制研究

齐 慧, 呼 群, 苏乌云, 贾永峰, 陈连香, 曹冉华, 乌日罕

[摘要] 目的 探讨 Zeste 基因增强子同源物 2 (enhancer of zeste homolog 2, EZH2) 蛋白在非小细胞肺癌对顺铂耐药中的作用及其调控机制。方法 采用实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, qRT-PCR) 检测人肺腺癌细胞株 A549 及其顺铂耐药株 A549/DDP 中 EZH2、P21、Puma 和 Bad 的 mRNA 表达差异。采用 RNA 干扰技术抑制细胞中的 EZH2 蛋白表达。通过细胞毒性实验检测细胞耐药性的改变。qRT-PCR 检测抑制 EZH2 蛋白表达后 A549/DDP 细胞中 P21、Puma 和 Bad 的表达变化。流式细胞仪检测细胞周期的分布和变化。结果 EZH2 在 A549/DDP 中呈高表达。抑制 EZH2 蛋白表达后, 顺铂对 A549/DDP 的 IC₅₀ 由 (34.57 ± 3.70) μmol/L 降低至 (18.91 ± 2.07) μmol/L ($P < 0.05$); 抑制 EZH2 蛋白表达后, A549/DDP 中 P21、Puma 和 Bad 的 mRNA 表达均上调; 抑制 A549/DDP 细胞 EZH2 蛋白表达后, G₀/G₁ 期细胞比例下降, G₂/M 期细胞增多 ($P < 0.05$), 细胞发生 G₂/M 期阻滞。结论 EZH2 蛋白参与介导了 A549/DDP 对顺铂的耐药; EZH2 蛋白可能通过调控与细胞凋亡相关基因相关的凋亡通路诱导 A549/DDP 对顺铂的耐药; EZH2 蛋白可能通过抑制 P21 表达, 促进细胞周期进展及肿瘤增殖能力, 诱导非小细胞肺癌对顺铂产生耐药。

[关键词] Zeste 基因增强子同源物 2 蛋白; 肺癌; 耐药性; 细胞凋亡; 细胞周期

[中图分类号] R734.2

[文献标志码] A

[文章编号] 2095-3097(2020)05-0257-06

doi: 10.3969/j.issn.2095-3097.2020.05.001

Research on the role of EZH2 protein in mechanism of cisplatin resistance in non-small cell lung cancer

QI Hui¹, HU Qun², SU Wuyun², JIA Yongfeng³, CHEN Lianxiang¹, CAO Ranhua², WU Rihan²

(1. Department of Hematology, Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot Inner Mongolia 010050, China; 2. Department of Oncology, Affiliated Hospital of

Inner Mongolia Medical University, Hohhot Inner Mongolia 010050, China; 3. Department of Pathology, Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot Inner Mongolia 010050, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the role and regulatory mechanism of zeste homolog 2 (EZH2) protein in cisplatin resistance in non-small cell lung cancer. **Methods** The expression difference of EZH2, P21, Bad and Puma mRNA between A549 and A549/DDP was detected by real-time quantitative PCR. siRNA was used for silencing gene expression of EZH2. Assessment of chemoresistance to cisplatin in A549/DDP cells was performed evaluated by CCK-8 assay. The expression of P21, Bad and Puma mRNA in A549/DDP of EZH2 silenced was detected by real-time quantitative PCR. Cell cycle was analyzed by flow cytometry. **Results** Expression of EZH2 mRNA was over-expressed in A549/DDP compared with A549. Silencing EZH2 expression decreased IC₅₀ of A549/DDP from (34.57 ± 3.70) μmol/L to (18.91 ± 2.07) μmol/L ($P < 0.05$). Inhibiting EZH2 protein expression up-regulated expression of P21, Puma, Bad mRNA in A549/DDP. Inhibiting EZH2 protein expression caused percentage decline of G₀/G₁ phase, and a rise of G₂/M phase ($P < 0.05$). Cells was arrested in G₂/M phase. **Conclusion** EZH2 protein is involved in mediating the cisplatin resistance to A549/DDP. EZH2 protein may regulate the pathway of apoptosis to induce A549/DDP resistance to cisplatin. EZH2 protein can inhibit expression of P21, promote cell cycle progression of tumor proliferation and enhance resistance to cisplatin in non-small cell lung cancer.

[Key words] Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) protein; Lung cancer; Drug-resistance; Apoptosis; Cell cycle

[基金项目] 国家自然科学基金(81160253); 内蒙古自治区肿瘤生物治疗协同创新培育中心项目(1619002010); 内蒙古自然科学基金(2017MS0830)

[作者单位] 010050 内蒙古 呼和浩特, 内蒙古医科大学附属医院血液内科(齐 慧, 陈连香); 010050 内蒙古 呼和浩特, 内蒙古医科大学附属医院肿瘤内科(呼 群, 苏乌云, 曹冉华, 乌日罕); 010050 内蒙古 呼和浩特, 内蒙古医科大学附属医院病理科(贾永峰)

[通讯作者] 呼 群, E-mail: huqun2015@126.com

肺癌是目前我国发病率和死亡率最高的恶性肿瘤,其中非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)约占80%^[1],严重危害人类健康。虽然近年在肺癌化疗及分子靶向治疗方面取得了很大的进步,但总体治疗效果仍不理想,抗肿瘤药物耐药是导致肿瘤治疗失败的重要原因之一。探讨肺癌耐药的分子机制,有助于为治疗肺癌提供新的靶点和途径,在化疗药物选择方面为临床提供指导意见。Zeste基因增强子同源物2(enhancer of zeste homolog 2, EZH2)蛋白是多梳蛋白抑制复合体2(polycomb repressive complex 2, PRC2)的催化活性亚单位,是多聚梳群蛋白家族的主要成员,定位于人类染色体7q35位置,可对组蛋白H3第27位赖氨酸进行甲基化修饰,从而介导目的基因沉默和转录抑制作用^[2]。EZH2蛋白在促进细胞增殖、抑制细胞凋亡、改变细胞周期、促进肿瘤转移以及参与耐药等方面发挥重要作用^[3]。目前已发现EZH2蛋白在前列腺癌、乳腺癌、肝癌等多种肿瘤中高表达^[4-6]。近年研究显示EZH2蛋白在NSCLC中高表达,并与患者预后相关^[7],可能与NSCLC的发生发展密切相关^[8]。且EZH2蛋白的过表达促进了肺癌细胞的侵袭和转移^[9]。此外,EZH2蛋白在肿瘤耐药中也发挥作用,在卵巢癌细胞中抑制EZH2蛋白表达能有效逆转卵巢癌细胞对顺铂的耐药性^[10]。在肝癌细胞中沉默EZH2基因后可使其对氟尿嘧啶的耐药性降低^[11]。目前EZH2蛋白对NSCLC顺铂耐药的作用尚不明确,而且对其调控肺癌耐药的机制了解甚少。本研究采用RNA干扰技术抑制人肺腺癌细胞顺铂耐药株A549/DDP中EZH2的表达,研究EZH2蛋白与顺铂耐药的关系及其调控机制。

1 材料和方法

1.1 实验材料和试剂 人肺腺癌细胞株A549购自江阴康众康民生物医药技术有限公司,人肺腺癌细胞顺铂耐药株A549/DDP购自北京银紫晶生物医药技术有限公司(中国医学科学院肿瘤医院肿瘤研究所)。主要试剂:RPMI-1640培养基、胎牛血清均购于美国HyClone公司,DH5 α 感受态大肠杆菌菌株购自美国Invitrogen公司,质粒提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司,Lipofectamine 2000 reagent购自美国Invitrogen公司,总RNA提取试剂盒、反转录试剂盒及实时荧光定量PCR(real-time quantitative PCR, qRT-PCR)试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司,PCR引物由中美泰和生物有限公司合成,顺铂购自山东齐鲁制药厂,细胞增殖-毒性检测试剂盒购自日本株式会社同仁化学研究所。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 按照贴壁细胞培养方法常规培养A549及A549/DDP。使用含1%青霉素混合液及10%胎牛血清的改良型RPMI-1640培养基配制而成的完全培养基,置于37℃、5%CO₂细胞培养箱中培养。

1.2.2 质粒扩增及提取 取2种序列重组质粒piGene-shEZH2和空质粒piGene-shNega进行扩增,该重组质粒由本课题组呼群教授前期合成,具体序列为:piGene-shEZH2:5'-GGACGGCTCCTCTAACCA TGTTTACAACCT-3',piGene-shNega:5'-GTGCATGATG TGTACCCTTTGGTTCATAGA-3'。取重组质粒和空质粒导入感受态大肠杆菌菌株,于LB培养基中扩增,获得大量扩增的质粒,使用试剂盒进行质粒提取。

1.2.3 脂质体介导质粒转染 A549/DDP细胞 使用Lipofectamine2000试剂将重组质粒piGene-shEZH2与空质粒piGene-shNega转染到A549/DDP细胞中。将A549/DDP细胞接种于6孔细胞培养板中,常规培养24h。按照Lipofectamine2000试剂说明进行转染,转染24h后,加400μg/mL G418抗生素筛选14d,常规换液。14d后见具有抗药性的克隆形成,获得稳定表达的细胞A549/DDP-shEZH2、A549/DDP-shNega,后续以200μg/mL G418维持培养。qRT-PCR鉴定转染效率。

1.2.4 细胞毒性实验 细胞接种于96孔细胞培养板中,接种密度为5000个细胞/孔,细胞培养24h后加顺铂作用,顺铂浓度依次为0.1、1、10、50、100和150μmol/L。同时设置阴性对照组。加顺铂培养24h后,加入细胞毒性实验检测试剂。继续培养2~4h后,用酶标仪测定450nm处的光密度(optical density, OD)值,实验重复3次。分别检测A549与A549/DDP及转染前后的A549/DDP对顺铂的耐药性差异,计算公式:抑制率=(阴性对照组OD值-实验组OD值)/(阴性对照组OD值)×100%,计算半数抑制浓度(half-inhibitory concentration, IC50)值。

1.2.5 qRT-PCR检测 分别提取A549、转染前后的A549/DDP细胞总RNA,反转录获得cDNA,进行qRT-PCR,选择甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)作为内参照,引物序列为:EZH2-上游引物:5'-CAGGCTGGGGGATTTTT ATC-3',EZH2-下游引物:5'-CACTTTCCCTCTTCTGT CAGCTTC-3';P21-上游引物:5'-ACCTGTCAGTGTCTT GTACC-3',P21-下游引物:5'-GGCGTTTGGAGTGGTA GAA-3';Bad-上游引物:5'-CCAGCAGGAGCAGCCA

AC-3', Bad-下游引物: 5'-CCCATCCCTTCGTCGTCCT-3'; Puma-上游引物: 5'-CGACCTCAACGCACAGTAC-3', Puma-下游引物: 5'-CAGGCACCTAATTGGGCTC-3'; GAPDH-上游引物: 5'-CCTCAACGACCACTTTGTCA-3', GAPDH-下游引物: 5'-TTACTCCTTGGAGGCCATGT-3'。按照试剂盒说明书操作, 反应使用 ABI7300 qRT-PCR 仪。此实验重复3次。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算数据。

1.2.6 流式细胞术检测 采用碘化丙啶单染色法对 A549/DDP、A549/DDP-shEZH2、A549/DDP-shNega 进行流式细胞检测, 测定细胞周期。取对数生长期细胞, 加入 70% 乙醇于 4 °C 固定 1 h, 然后加入 RNA 酶 (终浓度 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 置于 37 °C 水浴中孵育 30 min, 加 500 μL 碘化丙啶 PI 染液, 置于 4 °C 冰箱, 避光孵育 30 min, 流式细胞仪检测细胞周期。

1.3 统计学处理 应用 SPSS 24.0 软件进行分析, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 两组间比较使用 t 检验, 多组间比较使用单因素方差分析; 计数资料采用率表示, 行 χ^2 检验; $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 A549/DDP 和 A549 对顺铂的敏感性 A549/DDP 的 IC₅₀ 值为 (34.57 \pm 3.70) $\mu\text{mol}/\text{L}$, A549 的 IC₅₀ 值为 (5.89 \pm 0.97) $\mu\text{mol}/\text{L}$, $P<0.05$ 为差异有统计学意义, A549 细胞对顺铂较敏感, 而 A549/DDP 则对顺铂敏感性差, 图 1。

2.2 A549 和 A549/DDP 中 EZH2 mRNA 的表达情况 qRT-PCR 检测结果显示, EZH2 的 mRNA 在 A549/

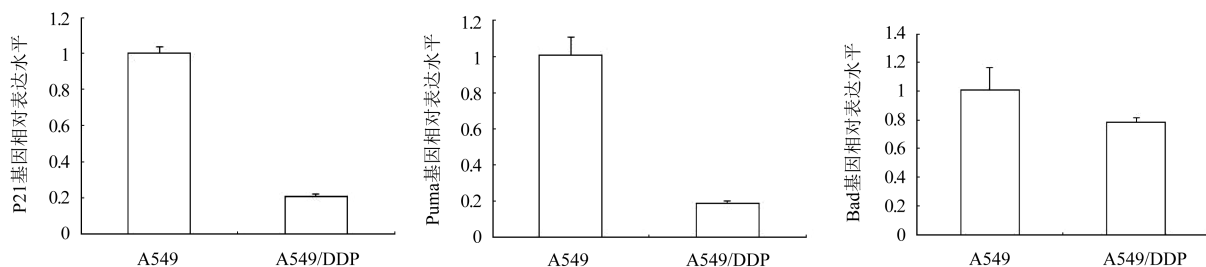


图3 A549 和 A549/DDP 中 P21、Puma、Bad 的 mRNA 的表达

2.4 A549/DDP 和转染后细胞中 EZH2 的 mRNA 的表达情况 A549/DDP-shEZH2 细胞相对表达量为 A549/DDP 的 (63.54 \pm 3.42)%, 抑制 EZH2 表达的效果明显, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 选择该组细胞继续培养进行后续实验。A549/DDP-shNega 组的相对表达量为 A549/DDP 的 (98.03 \pm 1.21)%, 差异无统计学意义 ($P>0.05$), 图 4。

DDP 中呈高表达, 其相对表达水平为 A549 的 (1.97 \pm 0.02) 倍, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 图 2。

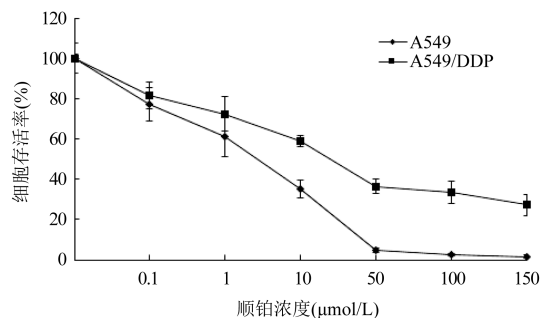


图1 顺铂作用后 A549 和 A549/DDP 的细胞存活率

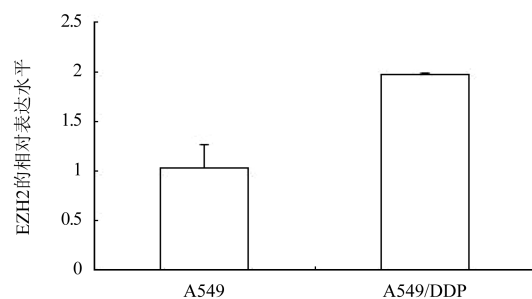


图2 A549/DDP 中 EZH2 的 mRNA 表达

2.3 A549 和 A549/DDP 中 P21、Puma、Bad mRNA 的表达情况 qRT-PCR 检测结果显示, 在 A549/DDP 中 P21、Puma 的 mRNA 表达水平明显低于 A549, P21 为 (0.20 \pm 0.02) 倍, Puma 为 (0.18 \pm 0.02) 倍, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); Bad 的 mRNA 在 A549/DDP 中也呈低表达, Bad 为 (0.78 \pm 0.04) 倍, 但差异无统计学意义 ($P>0.05$), 图 3。

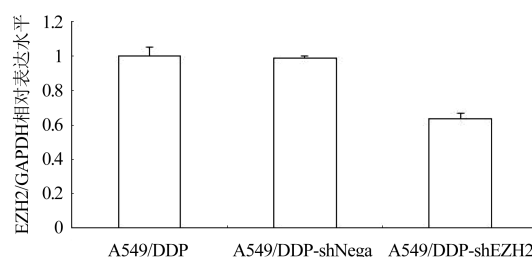


图4 A549/DDP 和转染后细胞中 EZH2 的 mRNA 的表达

2.5 顺铂作用后 A549/DDP 和转染后细胞存活率

细胞毒性实验检测转染前后细胞耐药性的变化, A549/DDP-shEZH2 的 IC50 为 (18.91±2.07) μmol/L, 与 A549/DDP 的 IC50 (34.57±3.70) μmol/L 比较, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); A549/DDP-shNega 的 IC50 为 (35.43±2.39) μmol/L, 与 A549/DDP 比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$), 图 5。

2.6 A549/DDP 和转染后细胞中 P21、Puma、Bad mRNA 的表达情况 qRT-PCR 检测转染前后细胞中 P21、Puma、Bad 表达的变化, 结果显示, 抑制 EZH2 基因表达后, P21、Puma、Bad 的 mRNA 表达均上调, P21 mRNA 相对表达量为 A549/DDP 的 (5.81±0.21) 倍, Puma 为 (3.12±0.04) 倍, Bad 为 (1.53±0.02) 倍, 差异有统计学意义 (三者均 $P<0.05$)。A549/DDP-shNega 组的表达量与 A549/DDP 比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$), 图 6。

2.7 抑制 EZH2 基因表达后 A549/DDP 细胞周期变化情况 流式细胞仪检测转染前后细胞的细胞周期, 结果显示, A549/DDP-shEZH2 组细胞 G0/G1 期

所占比例为 (58.85±5.67)%, S 期为 (16.95±4.84)%, G2/M 期为 (22.8±4.29)%; A549/DDP-shNega 组细胞 G0/G1 期所占比例为 (78.35±1.03)%, S 期为 (10.05±1.96)%, G2/M 期为 (12.55±1.56)%; A549/DDP 细胞 G0/G1 期所占比例为 (76.83±5.11)%, S 期为 (9.08±1.77)%, G2/M 期为 (14.13±3.58)%。抑制 EZH2 基因表达后 A549/DDP 细胞的 G0/G1 期细胞比例下降, 而 G2/M 期细胞比例增加, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); A549/DDP-shNega 与 A549/DDP 细胞周期的变化比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$), 图 7, 图 8。

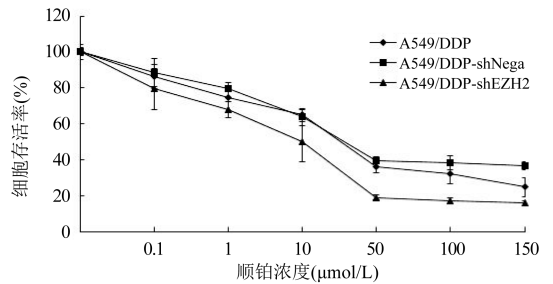


图 5 顺铂作用后 A549/DDP 和转染后细胞存活率

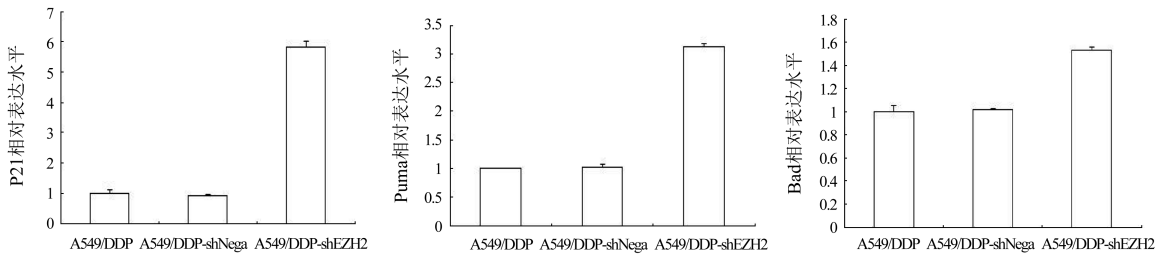


图 6 A549/DDP 和转染后细胞中 P21、Puma、Bad mRNA 的表达

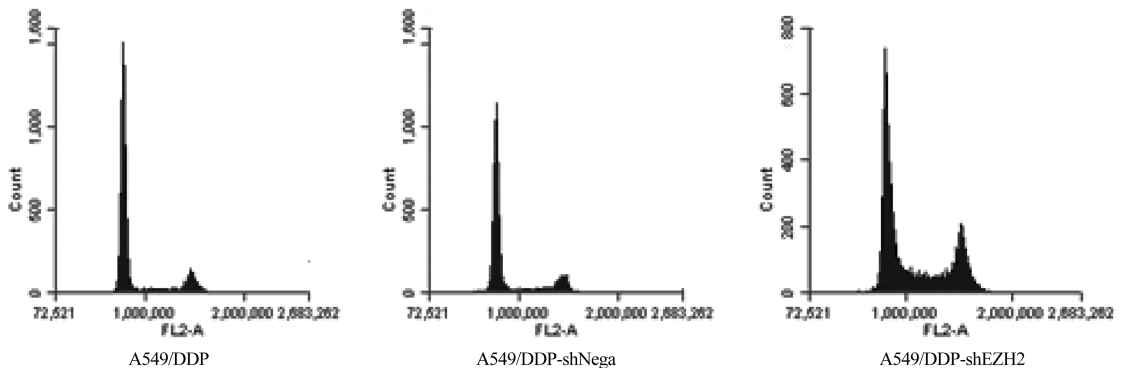


图 7 A549/DDP 和转染后细胞的细胞周期分布

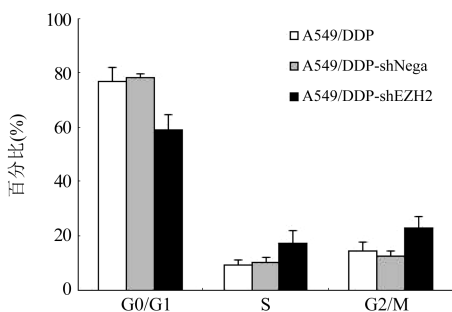


图 8 A549/DDP 和转染后细胞的细胞周期变化

3 讨论

肺癌耐药已经成为目前临床治疗中的一大难题, 而肺癌对顺铂形成耐药的机制十分复杂, 有多种耐药相关分子参与其中, 调控方式涉及到药物转运、药物代谢、DNA 损伤修复、血管生成、细胞凋亡以及细胞周期调节等方面。

恶性肿瘤中存在着广泛的表观遗传学改变, 如 DNA 甲基化和组蛋白修饰等, 其与恶性肿瘤的发生

发展密切相关。而 DNA 甲基化和组蛋白乙酰化在肿瘤化疗耐药中也起重要作用。在 DNA 形成染色质的过程中,组蛋白作为重要的组成部分调控基因的表达。研究表明^[12],DNA 甲基化转移酶抑制剂可逆转因 DNA 甲基化所致的化疗敏感基因抑制,使其表达恢复上调,从而使肿瘤对顺铂的敏感性恢复。而在组蛋白去乙酰化酶抑制剂的研究中也观察到类似的作用^[13]。

研究表明,EZH2 蛋白高表达与 NSCLC 预后不良有关^[7]。近年的文献报道 EZH2 蛋白可能参与肿瘤细胞的耐药。在卵巢癌细胞中抑制 EZH2 表达能有效逆转卵巢癌细胞对顺铂的耐药性^[10]。EZH2 蛋白在胰腺癌中高表达,其与胰腺癌恶性程度和细胞增殖密切相关,抑制 EZH2 基因表达可使肿瘤细胞对阿霉素和 2-脱氧-2,2-盐酸二氟脱氧胞苷的敏感性增加,引起细胞凋亡^[14]。

本研究选择 NSCLC 细胞株 A549 及其耐药株 A549/DDP 为研究对象,首先检测验证 A549 和 A549/DDP 中 EZH2 蛋白的表达和对顺铂的耐药性。结果显示耐药株 A549/DDP 中 EZH2 蛋白呈高表达,提示 EZH2 与 A549/DDP 的耐药性相关。为了进一步的研究 EZH2 蛋白与 NSCLC 耐药的关系,采用 RNA 干扰技术抑制 A549/DDP 中 EZH2 蛋白的表达,选择 EZH2 特异性的 shRNA 重组质粒转染 A549/DDP 细胞,获得稳定抑制 EZH2 蛋白表达的 A549/DDP 细胞。通过对该细胞的耐药性检测发现,A549/DDP 对顺铂的耐药性下降,提示抑制 EZH2 蛋白可以部分逆转 A549/DDP 对顺铂的耐药性。说明 EZH2 蛋白在 NSCLC 对顺铂的耐药中发挥作用。

为了进一步探讨 EZH2 蛋白是通过何种机制在 NSCLC 对顺铂的耐药中发挥作用,本课题组检测分析了 EZH2 对细胞凋亡相关基因和细胞周期相关基因的影响。首先,对细胞凋亡通路中的相关基因 Puma 和 Bad 进行了检测,结果显示,与 A549 相比,A549/DDP 中 Puma、Bad 的 mRNA 均呈低表达,虽然 Bad 无统计学差异,但仍有下降趋势。抑制 A549/DDP 中 EZH2 表达后,Puma、Bad 的 mRNA 表达上调,提示 EZH2 对凋亡基因 Puma、Bad 具有抑制作用。有研究发现^[15],在肺癌中抑制 EZH2 基因表达,可引起细胞增殖抑制,并促进细胞凋亡。EZH2 抑制剂 GSK343 与吉非替尼联合应用能够克服肺癌细胞 PC9/AB2 对吉非替尼的耐药作用,能够显著抑制耐药细胞的活性,降低细胞的迁移能力并诱导耐药细胞的凋亡^[16]。由此推测,EZH2 可能通过抑制凋亡基因 Puma、Bad 的表达参与对细胞凋亡通路的调控,使细胞凋亡减少,拮抗化疗药物引起的

细胞凋亡,从而诱导 NSCLC 产生耐药。然而细胞凋亡通路的调控非常复杂,各通路之间存在交叉作用,所以 EZH2 对 NSCLC 耐药中凋亡的调控机制仍有待进一步研究。

本研究对细胞周期素依赖性蛋白激酶抑制因子 P21 进行了检测,发现 P21 的 mRNA 在 A549/DDP 中呈低表达,通过 RNA 干扰使 EZH2 表达抑制后,P21 的 mRNA 表达上调,提示 EZH2 对 P21 具有抑制作用。采用流式细胞仪对转染前后的 A549/DDP 进行细胞周期检测,结果显示抑制 A549/DDP 中 EZH2 表达后,细胞周期中 G0/G1 期细胞减少,而 G2/M 期细胞比例增加,细胞发生了 G2/M 期阻滞,提示 EZH2 可能通过影响细胞周期在肺癌耐药细胞的增殖中发挥作用。研究报道^[17],在前列腺癌和乳腺癌中,抑制 EZH2 的表达同样可使细胞发生 G2/M 期阻滞。在对 pRB-E2F 生长调控通路的研究中发现^[17],抑制 EZH2 可使增殖相关基因 cyclinD1, cyclinE1 表达减少,说明 EZH2 可能通过调控增殖相关基因而对细胞周期产生影响,从而在肿瘤细胞增殖中发挥作用。因此,我们推测,EZH2 可能通过抑制 P21 表达而使其调控细胞周期、抑制细胞增殖的作用减弱,从而促进 NSCLC 细胞周期进展,使其恶性增殖能力增强,诱导 NSCLC 产生耐药。然而,也有文献报道,在肾癌细胞中抑制 EZH2 使细胞阻滞在 G1 期^[18],上调 EZH2 使 HeLa 细胞 S 期延长^[17],表明 EZH2 对不同细胞的细胞周期的影响存在差异。

综上所述,EZH2 蛋白在 NSCLC 对顺铂的耐药中发挥作用,抑制 EZH2 基因可以部分逆转 NSCLC 对顺铂的耐药性,其参与耐药的机制可能与抑制细胞凋亡、促进细胞周期进展、增强细胞增殖能力有关。

【参考文献】

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018 [J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(1): 7-30.
- [2] Deb G, Singh AK, Gupta S. EZH2: not EZHY (easy) to deal [J]. Mol Cancer Res, 2014, 12(5): 639-653.
- [3] Crea F, Paolicchi E, Marquez VE, et al. Polycomb genes and cancer: time for clinical application? [J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2012, 83(2): 184-193.
- [4] Xu K, Wu ZJ, Groner AC, et al. EZH2 oncogenic activity in castration-resistant prostate cancer cells is Polycomb-independent [J]. Science, 2012, 338(6113): 1465-1469.
- [5] Mu Z, Li H, Fernandez SV, et al. EZH2 knockdown suppresses the growth and invasion of human inflammatory breast cancer cells [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2013, 32(1): 70.

- [6] Dennis G Jr, Sherman BT, Hosack DA, et al. DAVID: Database for annotation, visualization, and integrated discovery [J]. *Genome Biol*, 2003, 4(5): P3.
- [7] Hoffmann R, Valencia A. A gene network for navigating the literature [J]. *Nat Genet*, 2004, 36(7): 664.
- [8] Wu L, Li M, Wang J, et al. CytoCtrlAnalyser: a Cytoscape app for biomolecular network controllability analysis [J]. *Bioinformatics*, 2018, 34(8): 1428-1430.
- [9] Hassan H, Shanak S. GOTrapper: a tool to navigate through branches of gene ontology hierarchy [J]. *BMC Bioinformatics*, 2019, 20(1): 20.
- [10] Kanehisa M, Goto S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes [J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(1): 27-30.
- [11] Koskinen A, Lehtoranta L, Laiho A, et al. Maternal diabetes induces changes in the umbilical cord gene expression [J]. *Placenta*, 2015, 36(7): 767-774.
- [12] Commander SJ, Jacques SJ, Lloyd MS, et al. Bioinformatics associated with conjoined twin separation [J]. *J Craniofac Surg*, 2018, 29(1): 109-111.
- [13] López-Fernández H, Duque P, Henriques S, et al. Bioinformatics protocols for quickly obtaining large-scale data sets for phylogenetic inferences [J]. *Interdiscip Sci*, 2019, 11(1): 1-9.
- [14] Zong HY, Wang EL, Han YM, et al. Effect of miR-29b on rats with gestational diabetes mellitus by targeting PI3K/Akt signal [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(6): 2325-2331.
- [15] Hu S, Ma S, Li X, et al. Relationships of SLC2A4, RBP4, PCK1, and PI3K gene polymorphisms with gestational diabetes mellitus in a Chinese population [J]. *Biomed Res Int*, 2019, 2019: 7398063.

(收稿日期: 2019-08-26 本文编辑: 张在文)

(上接第 261 页)

- [6] Yonemitsu Y, Imazeki F, Chiba T, et al. Distinct expression of polycomb group proteins EZH2 and BMI1 in hepatocellular carcinoma [J]. *Hum Pathol*, 2009, 40(9): 1304-1311.
- [7] Frankel AE, Liu X, Minna JD. Developing EZH2-targeted therapy for lung cancer [J]. *Cancer Discov*, 2016, 6(9): 949-952.
- [8] 张积广, 叶明凡. DAPK 和 EZH2 在非小细胞肺癌中的表达和相关性 [J]. *医学理论与实践*, 2017, 30(10): 1510-1512.
- [9] 杨大运, 邢亚威, 齐战, 等. RKIP 和 EZH2 在非小细胞肺癌中的表达及意义 [J]. *现代预防医学*, 2016, 43(10): 1910-1914.
- [10] Hu S, Yu L, Li Z, et al. Overexpression of EZH2 contributes to acquired cisplatin resistance in ovarian cancer cells in vitro and in vivo [J]. *Cancer Biol Ther*, 2010, 10(8): 788-795.
- [11] Zhang Y, Liu G, Lin C, et al. Silencing the EZH2 gene by RNA interference reverses the drug resistance of human hepatic multidrug-resistant cancer cells to 5-Fu [J]. *Life Sci*, 2013, 92(17-19): 896-902.
- [12] Segura-Pacheco B, Perez-Cardenas E, Taja-Chayeb L, et al. Global DNA hypermethylation-associated cancer chemotherapy resistance and its reversion with the demethylating agent hydralazine [J]. *J Transl Med*, 2006, 4: 32.
- [13] Plumb JA, Strathdee G, Sludden J, et al. Reversal of drug resistance in human tumor xenografts by 2'-deoxy-5-azacytidine-induced demethylation of the hMLH1 gene promoter [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(21): 6039-6044.
- [14] Ougolkov AV, Bilim VN, Billadeau DD. Regulation of pancreatic tumor cell proliferation and chemoresistance by the histone methyltransferase enhancer of zeste homologue 2 [J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(21): 6790-6796.
- [15] 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.
- [16] 宫颢, 袁茵, 李永文, 等. EZH2 抑制剂与吉非替尼联合应用在 EGFR-TKIs 耐药肺癌细胞中的作用研究 [J]. *中国肺癌杂志*, 2019, 22(5): 255-263.
- [17] Bracken AP, Pasini D, Capra M, et al. EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer [J]. *EMBO J*, 2003, 22(20): 5323-5335.
- [18] Wagener N, Holland D, Bulkescher J, et al. The enhancer of zeste homolog 2 gene contributes to cell proliferation and apoptosis resistance in renal cell carcinoma cells [J]. *Int J Cancer*, 2008, 123(7): 1545-1550.

(收稿日期: 2019-05-26 本文编辑: 李记文)