

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.08.003

EZH2 在人脂肪肉瘤的表达情况及 EZH2 抑制剂抗人脂肪肉瘤效果及机制研究 *

武晓慧^{1,2} 徐玉乔² 张东蕊³ 杨帆¹ Rajiv Kumar Jha^{4Δ}

(1 西安医学院临床医学院 陕西 西安 710021; 2 空军军医大学第一附属医院病理科 陕西 西安 710032;

3 西安医学院医学技术学院 陕西 西安 710021; 4 西安医学院中尼友好拉吉姆实验室 陕西 西安 710021)

摘要 目的:探索组蛋白 H3K27me3 甲基转移酶 EZH2 在人脂肪瘤、高分化脂肪肉瘤和去分化脂肪肉瘤的表达情况及 EZH2 酶活性小分子抑制剂 GSK126 对人脂肪肉瘤细胞系 SW872 的影响,并初步探索其可能机制。**方法:**筛选脂肪瘤、高分化脂肪肉瘤和去分化脂肪肉瘤患者术后活检标本共计 23 例,其中脂肪瘤 7 例,高分化脂肪肉瘤 9 例,去分化脂肪肉瘤 7 例,制成组织芯片,免疫组化染色检测 EZH2 的蛋白表达情况。体外培养 SW872 脂肪肉瘤细胞系,采用 CCK-8 法检测不同浓度 GSK126 对细胞生存的抑制作用,流式细胞技术检测细胞凋亡情况,Realtime PCR 法检测细胞的凋亡与抗凋亡(Caspase-1、Caspase-3、Caspase-7、Caspase-9、Bcl-2、Bag-3)、血管生成(VEGF- α)、干性(CD133、CD44、CD24)相关基因的表达,Western blot 检测内质网应激相关蛋白 Bip 和 ATF4 蛋白的表达量。**结果:**EZH2 在去分化脂肪肉瘤的表达高于高分化脂肪肉瘤,在良性脂肪瘤中的阳性表达少见(均 $P<0.05$)。EZH2 酶活性抑制剂 GSK126 对 SW872 细胞的存活有明显的抑制作用,给药后细胞凋亡率增加($P<0.05$),凋亡相关基因 Caspase-1、Caspase-3、Caspase-7、Caspase-9 均表达增强(均 $P<0.05$),血管生成基因 VEGF- α 表达降低($P<0.01$),干性基因 CD133 表达降低($P<0.01$),其余基因表达无明显差别。GSK126 组的内质网应激相关蛋白 Bip 和 ATF4 蛋白的表达增加。**结论:**EZH2 蛋白表达量与脂肪肉瘤细胞分化程度呈负相关,EZH2 有望成为脂肪肉瘤的生物学标志物及恶性程度标志物。EZH2 抑制剂可能成为脂肪肉瘤潜在的化疗药物,可能通过增强内质网应激发挥作用。

关键词:EZH2;H3K27me3;脂肪肉瘤;去分化

中图分类号:R-33;R739.9;R738.7 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2021)08-1414-06

Study on Expression of EZH2 in Human Liposarcoma and the Effect and Mechanism of EZH2 Inhibitor on Human Liposarcoma*

WU Xiao-hui^{1,2}, XU Yu-qiao², ZHANG Dong-rui³, YANG Fan¹, Rajiv Kumar Jha^{4Δ}

(1 Clinical Medical College, Xi'an Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710021, China; 2 Department of Pathology, First Affiliated Hospital, Air Force Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China; 3 School of medical technology, Xi'an Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710021, China; 4 China-Nepal Friendship Medical Research Center of Prof Rajiv Kumar Jha, Xi'an Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710021, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the expression of histone H3K27me3 methyltransferase EZH2 in human liposarcoma, well differentiated liposarcoma and dedifferentiated liposarcoma, and the effect of GSK126, an enzymatic activity inhibitor of EZH2, on human liposarcoma cell line SW872, and to explore the possible mechanism. **Methods:** A total of 23 biopsy specimens of patients with lipoma, well differentiated liposarcoma and dedifferentiated liposarcoma were selected, including 7 cases of lipoma, 9 cases of well differentiated liposarcoma and 7 cases of dedifferentiated liposarcoma. Tissue microarray was made and the expression of EZH2 protein was detected by immunohistochemistry. SW872 liposarcoma cell line was cultured in vitro. CCK-8 method was used to detect the inhibitory effect of different concentrations of GSK126 on cell survival. The apoptosis was detected by flow cytometry. The expressions of apoptosis and anti-apoptosis(Caspase-1, Caspase-3, Caspase-7, Caspase-9, Bcl-2, Bag-3), angiogenesis(VEGF- α), stemness (CD133, CD44, CD24) genes were detected by realtime RT-qPCR, and the expression of endoplasmic reticulum stress-related proteins Bip and ATF4 were detected by Western blot. **Results:** The expression of EZH2 in dedifferentiated liposarcoma was higher than that in well differentiated liposarcoma, and the positive expression in benign lipoma was rare (all $P<0.05$). The apoptosis rate increased ($P<0.05$), the expression of apoptosis related genes Caspase-1, Caspase-3, caspase-7 and Caspase-9 increased (all $P<0.05$), the expression of VEGF- α was decreased

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81550110256);西安医学院中尼友好拉吉姆医学实验室开放基金项目(18LJM02);

西安医学院 2019 年省级大学生创新创业训练计划项目(S201911840032);西安医学院 2019 年校级大学生创新创业训练计划项目(121519056);

西安医学院博士科研启动基金项目(2020DOC04)

作者简介:武晓慧(1984-),博士,副教授,研究方向:代谢性疾病与肿瘤,电话:18202957206, E-mail: wuxh5221170@126.com

Δ 通讯作者:Rajiv Kumar Jha, 博士,教授,研究方向:胰腺疾病与肿瘤,电话:13201514945, E-mail: rajiv12@hotmail.com

(收稿日期:2020-08-29 接受日期:2020-09-25)

($P<0.05$), the expression of CD133 was decreased ($P<0.05$). The expression of endoplasmic reticulum stress-related proteins Bip and ATF4 increased in GSK126 group. **Conclusion:** The expression of EZH2 protein is negatively correlated with the differentiation of liposarcoma cells, which is expected to be a biomarker of liposarcoma and malignant degree. EZH2 inhibitors may be potential chemotherapeutic agents for liposarcoma, which may play a role by enhancing endoplasmic reticulum stress.

Key words: EZH2; H3K27me3; Liposarcoma; Dedifferentiation

Chinese Library Classification (CLC): R-33; R739.9; R738.7 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2021)08-1414-06

前言

脂肪肉瘤(Liposarcoma)起源于间叶组织,是成年人最常见的软组织肉瘤之一^[1]。它包含一组异质性的肿瘤,在形态学上分为4个亚型:(1)高分化;(2)去分化;(3)黏液样;(4)多形性,在这四种亚型中,前两者最为常见^[2]。在脂肪肉瘤中,高分化脂肪肉瘤(Well Developed Liposarcoma)大多数发生于腹膜后,但也可发生在大腿、睾丸旁区和纵隔^[3,4],5年内局部复发率高达60%^[5]。重要的是,多达40%的复发性腹膜后高分化脂肪肉瘤表现出去分化现象^[6]。去分化脂肪肉瘤较高分化脂肪肉瘤具有更强的侵袭性,预后较差^[7]。临床上,去分化脂肪肉瘤转移率约为15-20%,且与高分化脂肪肉瘤90%的5年总体生存率相比,去分化脂肪肉瘤只有30%的5年总体生存率^[8]。目前临床上最常用的脂肪肉瘤治疗手段是手术切除^[9,10]。在此基础上,对于脂肪肉瘤复发或转移患者,化学治疗仍然是必需的^[11],但目前尚无疗效满意的药物。因此,深入探索脂肪肉瘤的发病机制,并寻找更加有效的治疗药物是研究的重点。

近年来有研究报道,表观遗传学中组蛋白H3位点的甲基化修饰可能与脂肪肉瘤的发生有密切联系,如一项研究发现在去分化脂肪肉瘤中组蛋白H3的Lys9(H3K9me3)位点三甲基化水平升高^[12]。近期的一项研究在粘液样脂肪肉瘤核裂解物中发现了组蛋白H3K27位点的甲基化酶PRC2等多种表观调节因子复合物升高^[13],这些证据均提示组蛋白甲基化异常可能在脂肪肉瘤发病中发挥重要作用,EZH2(Enhancer of zeste homolog 2)作为PRC2的核心催化亚单位,可能与人脂肪肉瘤之间也存在密切关系,但尚未见相关报道。目前的研究表明,EZH2在前列腺癌、乳腺癌、子宫内膜癌、胰腺癌等恶性肿瘤中过表达,与这些肿瘤的发生及进展密切相关^[14-17]。那么EZH2在人脂肪肉瘤的表达情况如何,有无可能成为治疗的潜在靶点?为解决这一问题,本实验选取良性脂肪瘤、高分化脂肪肉瘤和去分化脂肪肉瘤的组织学标本^[18],观察其中EZH2的表达情况。实验中发现EZH2在脂肪肉瘤中也出现高表达,继而体外培养脂肪肉瘤细胞系SW872,采用EZH2抑制剂GSK126进行处理^[19],观察GSK126的抗肿瘤效应,并初步探索可能机制。本研究将为脂肪肉瘤的发病机制研究和化疗药物选用提供新的理论基础。

1 材料与方法

1.1 病例筛选

选取空军军医大学第一附属医院(西京医院)病理科近3年来良性脂肪瘤及不同分化级别脂肪肉瘤患者手术切除瘤体蜡块标本共计23例,其中脂肪瘤7例,高分化脂肪肉瘤9例,

去分化脂肪肉瘤7例。男性16例,中位年龄62岁;女性7例,中位年龄55岁。肿瘤部位包括腹膜后12例,腿部7例,余分散在额部、肩颈部等其他部位。

1.2 组织芯片制作和染色

由两名病理医师读所选标本的HE切片,选取典型部位做标记,由组织芯片制片技师取蜡块对应部位,制成组织芯片。组织芯片切片后用于HE和免疫组化染色。标本制成组织芯片便于保持染色时间的一致性,利于更加准确地观察对比不同标本之间的染色结果。

1.2.1 HE染色 切片常规脱蜡至水,苏木素染核2 min,伊红染色5 min,过梯度酒精和二甲苯脱水透明,封片,拍照。

1.2.2 免疫组化染色 切片常规脱蜡至水,采用柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液高压修复抗原(pH6.0)2 min;PBS洗涤3 min×3次;组织用3% H₂O₂孵育10 min,5%山羊血清室温封闭15 min,组织上滴加1:300稀释的EZH2一抗(美国CST),4℃孵育过夜,加山羊抗兔IgG二抗,37℃孵育15 min;滴加辣根酶标记的链霉卵白素工作液,显微镜监控下进行DAB显色,苏木素复染核30 s;常规脱水透明,封片后拍照。

1.3 细胞实验

1.3.1 细胞培养 脂肪肉瘤细胞系SW872(American Type Culture Collection, ATCC)常规复苏后,使用25 cm培养瓶,含10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS, 四季青)的DMEM/F12培养基进行培养,加1%双抗(青霉素和链霉素),置于37℃,5%CO₂孵箱培养。培养基隔天换液,胰蛋白酶消化、扩增及传代、冻存保种。

1.3.2 GSK126的配制 GSK126(Y-13470, MCE)的分子量为526.6 g/mol。使用DMSO配制成5 mmol/L母液储存于-20℃或者4℃备用。

1.3.3 CCK-8法检测SW872细胞存活率 将SW872细胞接种于96孔板进行培养,设实验组和对照组。实验组采用终浓度分别为10、20、30、40、50、60、70 μmol/L的GSK126进行处理,对照组加入等体积的DMSO,每组设置3个复孔。药物处理48h后,每孔加10 μL CCK-8,37℃孵育3 h,酶标仪检测450 nm波长处吸光度。结果以细胞存活率表示:细胞存活率(%)=(实验组A450 nm-空白对照组A450 nm)/(对照组A450 nm-空白对照组A450 nm)×100%。

1.3.4 流式细胞技术分析细胞凋亡 细胞以2×10⁶个/孔的密度接种在6孔板中。细胞贴壁后,分别用20 μmol/L的GSK126或等体积DMSO处理48h。处理结束后收集细胞,根据说明书重新悬浮在200 μL的FITC结合缓冲液中,加入10 μL碘化丙啶(PI)和5 μL Annexin V-FITC。在室温下避光染色15 min,然后上机检测。在结果中,左下象限(AnnexinV/PI)为

正常细胞;右下象限 (Annexin V⁺/PI⁻)为早期凋亡细胞;右上象限 (Annexin V⁺/PI⁺),为晚期凋亡或坏死细胞;左上象限 (Annexin V⁻/PI⁺),可能是细胞收集过程中出现的损伤细胞。计算处于早期凋亡和晚期凋亡的细胞所占总细胞数的比例,获得细胞凋亡率 (apoptosis rate, AR)。

1.3.5 逆转录荧光定量聚合酶链式反应 (Realtime RT-qPCR) 法检测 mRNA 的表达

检测凋亡 (Caspase-1、Caspase-3、Caspase-7、Caspase-9)、抗凋亡 (Bcl-2、Bag-3)、干性 (CD133、CD44、CD24)、血管形成 (VEGF- α) 相关基因的表达。采用 20 μ mol/L GSK126 和等体积的 DMSO 处理细胞 48 小时后, Trizol 法提取总 RNA。反转录为 cDNA, SYBR Green master mix (日本 TaKaRa) 催化下, 在 Real-Time PCR 仪 (美国 Bio-Rad) 上进行扩增。待测基因的引物由大连宝生公司设计或参照文献, 并由该公司合成。序列信息见表 1。以小鼠 β -actin 为内参。

表 1 Realtime RT-qPCR 引物序列
Table 1 Primer sequences of Realtime RT-qPCR

Gene	Forward(5'-3')	Reverse(5'-3')
Caspase-1	GCCTGTTCTCTGTGATGTGGAG	TGCCCACAGACATTCATACAGTTTC
Caspase-3	GACTCTGGAATATCCCTGGACAACA	AGGTTTGCTGCATCGACATCTG
Caspase-7	ATGTCACCATGCGATCCATCA	TCCGTTTCGAACGCCCCATA
Caspase-9	CTTGAGACACTCGCTCAGCTTC	CTTGAGACACTCGCTCAGCTTC
Bcl-2	AACATCGCCCTGTGGATGAC	AGAGTCTTCAGAGACAGCCAGGAG
Bag-3	GAACCGATGTGTGCTTTAGGG	CCTTTTATTAGTGTTCCTCCAC
CD133	AGTGGCATCGTGCAAACCTG	CTCCGAATCCATTTCGACGATA
CD44	GAAATGGCACCCTGCTTATG	CTACTAGGAGTTGCCTGGATTG
CD24	CTCCTACCCACGCAGATTATT	GTGGTGGCATTAGTTGGATTG
VEGF- α ^[20]	AGGGCAGAATCATCACGAAGT	ACGGTAGGTTAGCTCTGGGA
β -actin	ATTGCCGACAGGATGCAGA	GAGTACTTGCGC TCAGGAGGA

1.3.6 Western blot 法检测蛋白表达量 采用 20 μ mol/L GSK126 和等体积的 DMSO 处理细胞 48 小时后, 裂解细胞, 提取总蛋白。采用 BCA 法测蛋白浓度 (碧云天, 上海), 样品上样量为 20 μ g/ 孔, 电泳结束后转至 PVDF 膜, 将膜用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 1 $\times$ PBST 洗膜 5 min $\times$ 3 次, 置于 1 抗中 4 $^{\circ}$ C 摇床孵育过夜 (兔 Bip 及 ATF4 抗体, 美国 CST; 鼠 β -Tubulin 抗体, 天津三箭)。1 $\times$ PBST 洗膜 5 min $\times$ 3 次, 将膜置于二抗 (中衫金桥羊抗兔或羊抗鼠 IgG, 浓度均为 1:5000) 中室温孵育 1 h, 再用 PBST 洗膜 3 次, ECL 发光液发光。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 20.0 统计软件进行数据分析, 计量数据以均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间比较采用独立样本均数 t 检验, 三组间比较采用单因素方差分析, 检验为双侧, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 患者标本免疫组化染色结果

光镜下观察脂肪瘤、高分化和去分化脂肪肉瘤 HE 染色切片。实验所见脂肪瘤由分化成熟的脂肪细胞组成, 细胞呈蜂窝状排列, 核位于周边。高分化脂肪肉瘤由梭形细胞及脂滴大小不等的脂肪细胞组成, 部分细胞核大深染, 可见脂肪母细胞。间质细胞核可深染, 呈异形性。去分化脂肪肉瘤细胞呈束状、编织状紧密排列, 细胞内胞浆丰富, 核异形性明显, 大而深染。可见瘤巨细胞, 间质内有炎细胞浸润 (图 1A)。

免疫组化染色结果显示, 去分化脂肪肉瘤组的核阳性率明显高于高分化组 (图 1B-C, $P < 0.001$), 而良性脂肪瘤中很少见

到阳性染色的核, 高分化脂肪肉瘤和去分化脂肪肉瘤中的核阳性率均明显高于脂肪瘤组 (图 1B-C, $P < 0.01$, $P < 0.001$)。这些结果提示, 肿瘤细胞分化程度越低, EZH2 表达量越高, 二者呈现反向趋势。

2.2 GSK126 可以抑制 SW872 脂肪肉瘤细胞系增殖、促进凋亡

体外实验中用不同浓度的 GSK126 (μ mol/L) 处理脂肪肉瘤细胞, 作用 48h 后测定细胞存活率。结果显示给予不同浓度的 GSK126 处理后, 细胞存活率下降, 并呈量-效依赖关系 (图 2A)。采用 20 μ mol/L GSK126 和等体积的 DMSO 处理细胞 48 小时后流式细胞技术检测凋亡情况, 结果显示 GSK126 组的凋亡率明显高于 DMSO 组 (对照组) (图 2B)。

2.3 GSK126 促进 SW872 脂肪肉瘤细胞系凋亡基因的表达, 抑制血管生成和干性相关基因的表达

采用 20 μ mol/L GSK126 和等体积的 DMSO 处理细胞 48 小时后, 经 Realtime RT-qPCR 检测, 脂肪肉瘤细胞的凋亡基因 Caspase-1, Caspase-3, Caspase-7, Caspase-9 基因表达有明显升高, 差异有统计意义 (图 3, 均 $P < 0.05$), 抗凋亡基因 Bcl-2、Bag-3 表达差异不大。血管生成基因 VEGF- α 表达降低 ($P < 0.01$)。干性基因 CD133 表达降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 其余干性基因 CD24, CD44 的表达无统计学差异 ($P > 0.05$)。

2.4 GSK126 可能通过增强内质网应激发挥促凋亡作用

采用 20 μ mol/L GSK126 和等体积的 DMSO 处理细胞 48 小时后, 经 Western blot 实验检测, 内质网应激相关蛋白 ATF4 和 Bip 表达增高, 可能通过增强内质网应激发挥抑制肿瘤细胞的作用 (图 4)。

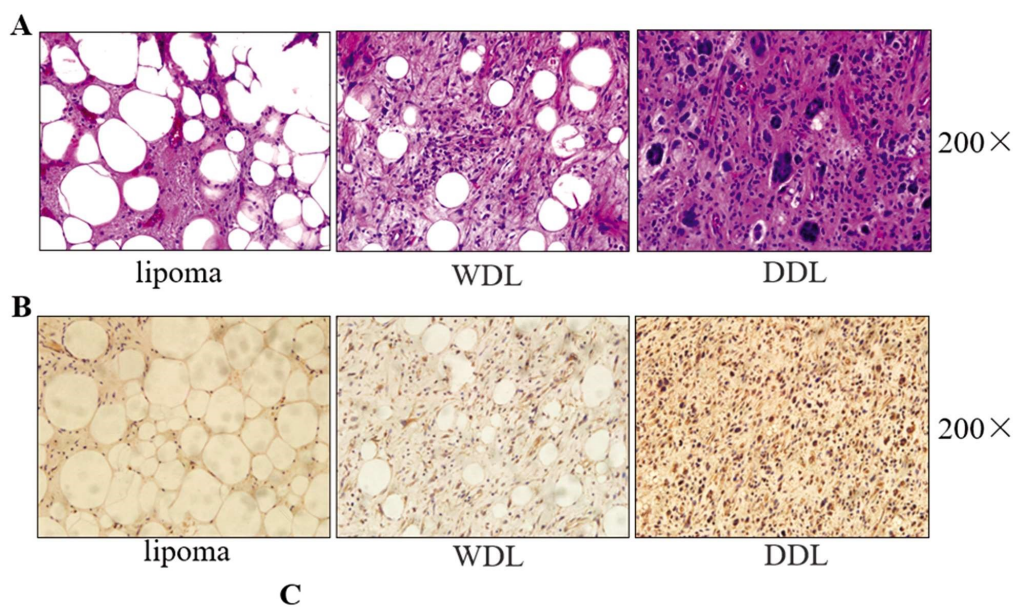


图1 人脂肪瘤,高分化脂肪肉瘤和去分化脂肪肉瘤组织切片HE染色及EZH2免疫组化染色结果

Fig.1 HE staining and EZH2 immunohistochemical staining results of human lipoma, well differentiated liposarcoma and dedifferentiated liposarcoma
 Note: (A): HE staining of lipoma, well differentiated liposarcoma and dedifferentiated liposarcoma. well differentiated liposarcoma:WDL; dedifferentiated liposarcoma:DDL; magnification: 200×. (B): EZH2 immunohistochemical(IHC) staining results of human lipoma, well differentiated liposarcoma and dedifferentiated liposarcoma. (C): EZH2 nuclear positive rate of IHC(n=7). **P<0.01; ***P<0.001.

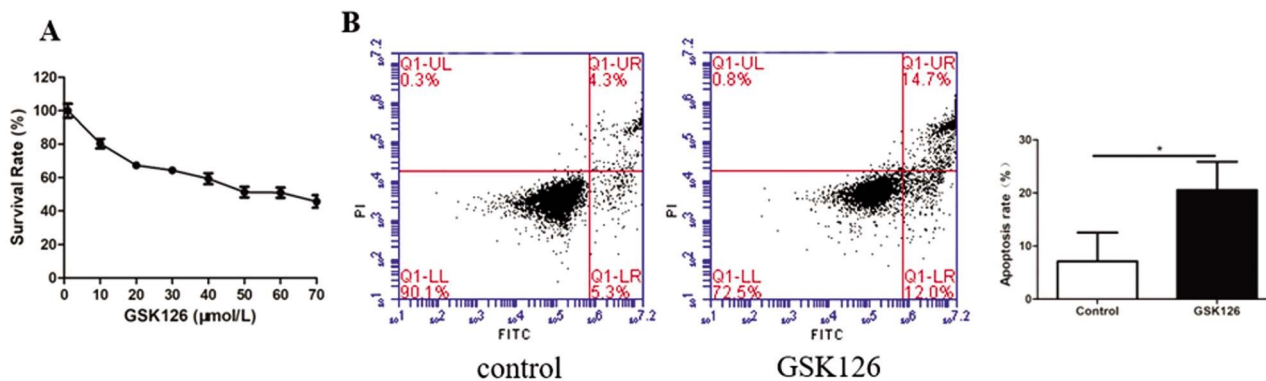


图2 GSK126处理后人脂肪肉瘤细胞系的存活率及凋亡情况

Fig.2 Survival rate and apoptosis rate of human liposarcoma cell line treated with GSK126

Note: (A): Survival rate tested by CCK8 (n=3). (B): Apoptosis rate after treatment (n=3). *P<0.05.

3 讨论

最近的研究表明 EZH2 作为 PcG 成员的基因活性调节因子,在人类多种恶性肿瘤中发挥重要作用,而 EZH2 在间叶组织来源的肿瘤例如脂肪肉瘤中的发病作用尚不清楚。本研究首次探索脂肪瘤、高分化脂肪肉瘤和去分化脂肪肉瘤中 EZH2 的表达情况。

脂肪瘤是间叶组织来源的良性肿瘤,发病率高,预后良好。

高分化脂肪肉瘤是一种分化良好的脂肪肉瘤,侵袭能力较弱,基本无转移。然而,高分化脂肪肉瘤可转化为去分化脂肪肉瘤,从而获得更强的侵袭能力,有可能局部复发和远处转移,提示二者可能具有相同的细胞和分子遗传学特性^[21,22]。去分化脂肪肉瘤恶性程度最高,易于复发及发生远处转移,预后较差^[23]。在本研究中,我们选取了这三种类型的脂肪组织肿瘤,检测 EZH2 的蛋白表达情况。结果显示,与其他多种恶性肿瘤疾病类似,EZH2 同样发生高表达,且表达量与肿瘤的分化程度负相关,即

分化越差,表达越高。这表明 EZH2 可能在脂肪肉瘤的发病机制中发挥重要作用。EZH2 可能作为脂肪肉瘤,尤其是去分化脂肪肉瘤潜在的肿瘤标志物及新的治疗靶点。

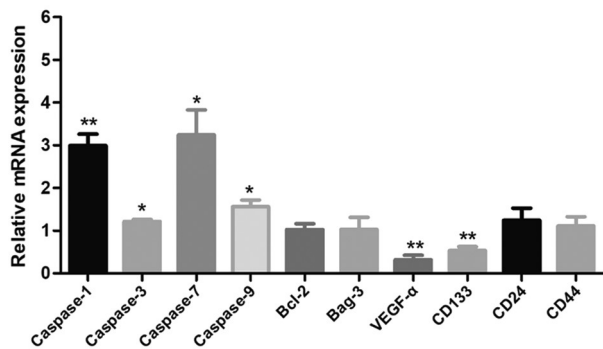


图3 GSK126 处理后人脂肪肉瘤细胞系的凋亡、血管生成、干性相关基因的表达式

Fig.3 Expression of apoptosis, angiogenesis, and stemness related genes in human liposarcoma cell line treated with GSK126. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

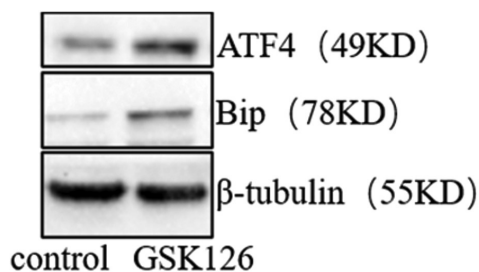


图4 GSK126 处理后人脂肪肉瘤细胞系内质网应激相关蛋白的表达式
Fig. 4 Expression of endoplasmic reticulum stress related proteins in human liposarcoma cell line treated with GSK126

在人体病理活检标本发现 EZH2 有过表达现象之后,我们使用 EZH2 高选择性抑制剂 GSK126^[24] 对人脂肪肉瘤细胞系 SW872^[25] 进行处理,观察抗肿瘤效果。结果显示,GSK126 可以抑制细胞的增殖,并呈一定的量-效依赖关系。而流式细胞技术检测结果也显示,GSK126 可以促进肿瘤细胞凋亡。Realtime RT-qPCR 结果显示,EZH2 抑制剂 GSK126 促进了凋亡相关基因 Caspase1,3,7,9 的表达,抑制了血管生成基因 VEGF-α 和干性基因 CD133 的表达。VEGF-α 是一种重要的调节血管生成的因子,可以促进肿瘤血管生成、肿瘤转移和增殖^[26-28],有望成为抗肿瘤化疗的重要治疗靶点。EZH2 可能通过抑制 VEGF-α 的这些作用抑制脂肪肉瘤细胞活性。癌症干细胞(Cancerstem-cells, CSCs)是导致肿瘤复发和播散的一类细胞群。CSCs 具有与正常干细胞一样的自我更新、分化和增殖能力,是化疗耐药的原因之一^[29]。本研究发现,GSK126 除了前述促进凋亡,抑制血管生成因子之外,还可以抑制肿瘤干细胞标志物 CD133 的表达,表明 GSK126 抑制脂肪肉瘤细胞的机制是多样化的。

肿瘤细胞的凋亡受到多种信号通路的调控,为了初步探索 GSK126 促进细胞凋亡的机制,我们选取了内质网应激(endoplasmic reticulum stress,ERS)^[30] 信号通路相关蛋白进行了检测。内质网应激是重要的细胞自我防御机制,在缺氧、药物、Ca²⁺ 稳态失衡等刺激下,内质网功能紊乱,大量错误折叠蛋白质堆积于内质网,促使其启动应急机制,可以启动细胞自噬或诱导凋亡。实验中我们选取了两个经典的内质网应激相关分子Bip

和 ATF4^[31] 进行了检测,发现在给予 GSK126 作用后,两种蛋白表达均是增高的,提示内质网应激可能在细胞的凋亡中发挥了作用,但更加深入和具体的机制尚有待进一步的研究。

综上所述,我们的研究首次发现 EZH2 在脂肪肉瘤中高表达,且与分化程度负相关;首次证明了 EZH2 酶活性抑制剂 GSK126 可以发挥有效的抗肿瘤作用,并初步研究了其机制,即 GSK126 可能通过触发内质网应激而实现抗肿瘤作用,这些发现为脂肪肉瘤的发病机制研究提供了新的理论基础,并可能促进其有效化疗药物的开发。EZH2 抑制剂与内质网应激之间的关系尚有待进一步深入的研究。

参考文献(References)

- [1] Rao RV, Hermel E, Castro-Obregon S, et al. Focus on the role of Caveolin and Cavin protein families in liposarcoma [J]. Differentiation, 2017, 94: 21-26
- [2] Crago AM, Dickson MA. Liposarcoma: Multimodality Management and Future Targeted Therapies [J]. Surg Oncol Clin N Am, 2016, 25 (4): 761-73
- [3] Keung EZ, Hornick JL, Bertagnolli MM, et al. Predictors of Outcomes in Patients with Primary Retroperitoneal Dedifferentiated Liposarcoma Undergoing Surgery[J]. J Am Coll Surg, 2014, 218(2): 206-217
- [4] Huang XD, Xiao FJ, Wang SX, et al. G protein pathway suppressor 2 (GPS2) acts as a tumor suppressor in liposarcoma [J]. Tumor Biol, 2016, 37(10): 13333-13343
- [5] Lahat G, Anaya DA, Wang X, et al. Resectable well-differentiated versus dedifferentiated liposarcomas: two different diseases possibly requiring different treatment approaches [J]. Ann Surg Oncol, 2008, 15 (6): 1585-1593
- [6] Fabre-Guillevin E, Coindre JM, Somerhausen Nde S, et al. Retroperitoneal liposarcomas: Follow-up analysis of dedifferentiation after clinicopathologic reexamination of 86 liposarcomas and malignant fibrous histiocytomas[J]. Cancer, 2006, 106(12): 2725-2733
- [7] Tseng WW, Madewell JE, Wei W, et al. Locoregional Disease Patterns in Well-Differentiated and Dedifferentiated Retroperitoneal Liposarcoma: Implications for the Extent of Resection?[J]. Ann Surg Oncol, 2014, 21(7): 2136-2143
- [8] Ghadimi MP, Al-Zaid T, Madewell J, et al. Diagnosis, Management, and Outcome of Patients with Dedifferentiated Liposarcoma Systemic Metastasis[J]. Ann Surg Oncol, 2011, 18(13): 3762-3770
- [9] Lin ZC, Chang XZ, Huang XF, et al. Giant liposarcoma of the esophagus: A case report [J]. World J. Gastroenterol, 2015, 21 (33): 9827-9832
- [10] Dowli A, Mattar A, Mashimo H, et al. A pedunculated giant esophageal liposarcoma: a case report and literature review[J]. J. Gastrointest. Surg, 2014, 18(12): 2208-2213
- [11] Xing Z, Mai W. Research progress on potential targets of liposarcoma [J]. Practical Oncology Journal, 2019, 33(1): 82-86
- [12] Keung EZ, Akdemir KC, Sannaa GAA, et al. Increased H3K9me3 drives dedifferentiated phenotype via KLF6 repression in liposarcoma [J]. J Clin Invest, 2015, 125(8): 2965-2978
- [13] Yu JSE, Colborne S, Hughes CS, et al. The FUS-DDIT3 Interactome in Myxoid Liposarcoma[J]. Neoplasia, 2019, 21(8): 740-751
- [14] Bryant RJ, Cross NA, Eaton CL, et al. EZH2 promotes proliferation

- and invasiveness of prostate cancer cells [J]. *Prostate*, 2010, 67(5): 547-556
- [15] Bae WK, 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
- [16] Gu Y, Zhang J, Guan H. Expression of EZH2 in endometrial carcinoma and its effects on proliferation and invasion of endometrial carcinoma cells[J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(6): 7191-7196
- [17] Yan KS, Lin CY, Liao TW, et al. EZH2 in Cancer Progression and Potential Application in Cancer Therapy: A Friend or Foe? [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(6): 1172-1194
- [18] Briski LM, Jorns JM. Primary Breast Atypical Lipomatous Tumor/Well-Differentiated Liposarcoma and Dedifferentiated Liposarcoma [J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2018, 142(2): 268-274
- [19] Zhou J, Nie D, Li J. PTEN Is Fundamental for Elimination of Leukemia Stem Cells Mediated by GSK126 Targeting EZH2 in Chronic Myelogenous Leukemia [J]. *Clin Cancer Res*, 2018, 24(1): 145-157
- [20] Chen YT, Zhu F, Lin WR. The novel EZH2 inhibitor, GSK126, suppresses cell migration and angiogenesis via down-regulating VEGF-A [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2016, 77(4): 757-765
- [21] Gahvari Z, Parkes A. Dedifferentiated Liposarcoma: Systemic Therapy Options[J]. *Curr Treat Options Oncol*, 2020, 21(2): 15
- [22] Conyers R, Young S, Thomas DM. Liposarcoma: molecular genetics and therapeutics[J]. *Sarcoma*, 2011, 2011: 1-13
- [23] Riva G, Sensini M, Corvino A, et al. Liposarcoma of Hypopharynx and Esophagus: a Unique Entity? [J]. *J Gastrointest Cancer*, 2016, 47(2): 135-142
- [24] Lue JK, Prabhu SA, Liu Y, et al. Precision Targeting with EZH2 and HDAC Inhibitors in Epigenetically Dysregulated Lymphomas[J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25(17): 5271-5283
- [25] Wassef H BL, Davignon J, Cohn JS. Synthesis and secretion of apoC-I and apoE during maturation of human SW872 liposarcoma cells[J]. *J Nutr*, 2004, 134(11): 2935-2941
- [26] Huang SP, Wu MS, Shun CT, et al. Interleukin-6 increases vascular endothelial growth factor and angiogenesis in gastric carcinoma [J]. *J Biomed Sci*, 2004, 11(4): 517-527
- [27] N F. Vascular endothelial growth factor[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29(6): 789-791
- [28] Eswarappa SM, Fox PL. Antiangiogenic VEGF-Ax: a new participant in tumor angiogenesis[J]. *Cancer Res*, 2015, 75(14): 2765-2769
- [29] Prasad S, Ramachandran S, Gupta N, et al. Cancer cells stemness: A doorstep to targeted therapy[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2020, 1866(4): 165424
- [30] Rao RV, Hermel E, Castro-Obregon S, et al. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program.Mechanism of caspase activation[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(36): 33869-33874
- [31] Siwecka N, Rozpedek W, Pytel D, et al. Dual role of Endoplasmic Reticulum Stress-Mediated Unfolded Protein Response Signaling Pathway in Carcinogenesis[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(18): 4354-4389

(上接第 1459 页)

- [20] Guo X, Hou L, Yin Y, et al. Negative interferences by calcium dobesilate in the detection of five serum analytes involving Trinder reaction-based assays[J]. *PLoS One*, 2018, 13(2): e0192440
- [21] Jafarey M, Changizi Ashtiyani S, Najafi H. Calcium dobesilate for prevention of gentamicin-induced nephrotoxicity in rats [J]. *Iran J Kidney Dis*, 2014, 8(1): 46-52
- [22] Ünal Y, Kitiçuk B, Tuncal S, et al. Assessment of the effect of calcium dobesilate in experimental liver ischemia-reperfusion injury [J]. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg*, 2018, 24(5): 391-397
- [23] 吴胜斌, 王应灯. 肾康注射液辅助治疗慢性肾功能衰竭临床疗效观察[J]. *中国药业*, 2019, 28(23): 58-60
- [24] 方锦颖, 杨悦, 吴宇, 等. 肾康注射液联合前列地尔治疗糖尿病肾病的荟萃分析[J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2020, 21(3): 207-212
- [25] 李莉, 孟晶, 黎姣. 肾康注射液治疗老年糖尿病肾病的临床观察[J]. *老年医学与保健*, 2019, 25(4): 511-513, 522
- [26] Li C, Yao Z, Zhu M, et al. Biopsy-Free Prediction of Pathologic Type of Primary Nephrotic Syndrome Using a Machine Learning Algorithm [J]. *Kidney Blood Press Res*, 2017, 42(6): 1045-1052
- [27] Huang L, Wang J, Yang J, et al. Impact of CYP3A4/5 and ABCB1 polymorphisms on tacrolimus exposure and response in pediatric primary nephrotic syndrome [J]. *Pharmacogenomics*, 2019, 20(15): 1071-1083
- [28] Su B, Zhang Q, Lv J. Cryptococcal meningitis in adult patients with primary nephrotic syndrome[J]. *Clin Nephrol*, 2018, 90(6): 390-395
- [29] 杨小杰, 李友芳, 王茜, 等. 肾康注射液联合还原型谷胱甘肽对梗阻性肾病患者肾功能、尿 L-FABP、NGAL 水平及预后的影响[J]. *疑难病杂志*, 2019, 18(11): 1113-1117
- [30] 廖效竹, 陈彤, 陈海, 等. 肾康注射液对维持性血液透析患者心功能的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2019, 39(16): 4002-4005