

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.04.007

BIX-01294 对肝癌细胞周期、凋亡及移植瘤的影响 *

寇 丹¹ 杨兴祥² 刘 冰^{1,3Δ} 孙 宏³ 刘仁伟³ 林 剑³ 蒋 奕³ 彭思璐³

(1 西南医科大学临床医学院 四川 泸州 646000; 2 四川省医学科学院 / 四川省人民医院感染科 四川 成都 610000;

3 四川绵阳四〇四医院感染科 四川 绵阳 621000)

摘要 目的:探究组蛋白甲基转移酶 G9a 抑制剂(BIX-01294)对肝癌细胞周期、凋亡及移植瘤的影响。**方法:**将 SMMC-7721、BEL-7402、HL-7702 原始细胞株传代培养后,分为空白对照组和不同浓度(1 μ M、5 μ M、10 μ M、20 μ M)BIX-01294 处理组。应用 Western-blot 法检测 G9a 及肝癌细胞内凋亡蛋白 CC3、C-PARP、Bax、Bcl-2 表达水平;应用四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法检测不同浓度 BIX-01294 处理 SMMC-7721、BEL-7402 细胞 24、48、72、96 h 后的细胞增殖情况;应用流式细胞术检测不同浓度的 BIX-01294 处理肝癌细胞 96h 后细胞周期分布情况;移植瘤试验 21 d 后测量裸鼠体内肿瘤体积及重量,并检测瘤体内 H3K9me2 的蛋白水平。**结果:**G9a 在肝癌细胞 SMMC-7721、BEL-7402 中表达水平高于 HL-7702 细胞($P<0.05$)。不同浓度的 BIX-01294 对 SMMC-7721 细胞和 BEL-7402 细胞增殖具有抑制作用,且具有时间依赖性和剂量依赖性(均 $P<0.05$)。不同浓度 BIX-01294 处理细胞 96h 后, SMMC-7721 细胞和 BEL-7402 细胞 G_0/G_1 期细胞比例增加, S 和 G_2/M 期的细胞比例降低($P<0.05$)。5 μ M BIX-01294 处理细胞 96h 后能明显增加 CC3、Bax、C-PARP 表达水平,并降低 Bcl-2 的表达水平($P<0.05$),与空白对照组相比, BIX-01294 处理组裸鼠肿瘤体积减小,重量较低,且肿瘤组织内 H3K9me2 的表达水平下降 ($P<0.05$)。**结论:**BIX-01294 导致 SMMC-7721、BEL-7402 细胞发生周期阻滞和凋亡,且对肿瘤的生长具有明显的抑制作用,其可能是通过抑制 G9a 的表达从而降低 H3K9me2 的表达来抑制肿瘤的生长。

关键词:组蛋白甲基转移酶;肝癌;增殖;凋亡;BIX-01294

中图分类号:R-33;R735.7 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2021)04-634-05

Effect of BIX-01294 on Cell Cycle, Apoptosis and Transplanted Tumor of Hepatocarcinoma*

KOU Dan¹, YANG Xing-xiang², LIU Bing^{1,3Δ}, SUN Hong³, LIU Ren-wei³, LIN Jian³, JIANG Yi³, PENG Si-lu³

(1 School of Clinical Medicine, Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan, 646000, China;

2 Department of Infection, Sichuan Academy of Medical Sciences/Sichuan People's Hospital, Chengdu, Sichuan, 610000, China;

3 Department of Infection, Sichuan Mianyang 404 hospital, Mianyang, Sichuan, 621000, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of Inhibitors of protein methyltransferase G9a (BIX-01294) on the cell cycle, apoptosis and transplanted tumor. **Methods:** SMMC-7721, BEL-7402, HL-7702 cell lines were subcultured and divided into blank control group and BIX-01294 treatment group with different concentrations (1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M). Western blot was used to detect the expression level of G9a and apoptosis protein CC3, C-PARP, Bax, Bcl-2. The proliferation of SMMC-7721 and BEL-7402 cells treated with BIX-01294 at different concentrations for 24, 48, 72 and 96 hours was detected by Tetramethylazolum salt (MTT) colorimetry; the cell cycle distribution of hepatoma cells treated with different concentrations of BIX-01294 for 96 hours were examined by flow cytometry; the tumor volume, weight, the protein level of H3K9me2 were measured 21 days after tumor transplantation experiment in nude mice. **Results:** The expression level of G9a in SMMC-7721 and BEL-7402 cell were higher than HL-7702 cell ($P<0.05$). Various concentrations of BIX-01294 could inhibit SMMC-7721 cell and BEL-7402 cell proliferation in a time-dependent and dose-dependent manner ($P<0.05$). There is a significant difference in cell cycle distribution with increased G_0/G_1 phase cell percentage, reduced S and G_2/M phase cell percentage at 96h by BIX-01294 treated ($P<0.05$). The expression levels of CC3, Bax, C-PARP were significantly increased, and the Bcl-2 level were significantly reduced at 96 h by 5 μ M BIX-01294 treated ($P<0.05$). Compared with the blank control group, the tumor volume and weight of the bix-01294 treated group decreased, and the expression level of H3K9me2 in tumor tissue decreased ($P<0.05$). **Conclusion:** BIX-01294 leads to cell cycle arrest and apoptosis of SMMC-7721 and BEL-7402 cells, and has a significant inhibitory effect on tumor growth. It may be through inhibiting the expression of G9a to reduce the expression of H3K9me2 to inhibit tumor growth.

Key words: Histone methyl transferase; Liver cancer; Proliferation; Apoptosis; BIX-01294

* 基金项目:国家卫生计生委医药卫生科技发展研究中心项目(W2014HB240);四川省卫生和计划生育委员会基金项目(18PJ342)

作者简介:寇丹(1991-),女,硕士研究生,研究方向:肝炎与肝癌,E-mail: koudan18244364022@163.com

Δ 通讯作者:刘冰(1970-),男,硕士,主任医师,研究方向:肝炎与肝癌 E-mail: liubing19700729@126.com

(收稿日期:2020-09-06 接受日期:2020-09-30)

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R735.7 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2021)04-634-05

前言

肝癌是消化系统常见的恶性肿瘤之一,其死亡率仅次于胃癌、食管癌^[1]。目前,肝癌的治疗主要采取肝移植、外科手术切除和局部消融疗法,但术后复发率较高^[2],因此,寻找新的肝癌治疗靶点已刻不容缓。组蛋白甲基化是表观遗传学中一类重要的分子机制,在转录调控、细胞生长、细胞分化和细胞死亡方面发挥重要的作用,并与肿瘤的发生过程密切相关^[3,4]。G9a是一种组蛋白甲基转移酶,主要参与催化常染色体组蛋白 H3 第 9 位赖氨酸的单甲基化(H3K9me1)和双甲基化(H3K9me2)^[5,6]。众多的研究表明,G9a 在乳腺癌、肺癌、口腔癌中的表达水平增强^[7,9],但在肝癌中的表达尚少报道,因此本研究中检测了 G9a 在肝癌细胞中的表达情况,并初步探讨 G9a 的抑制剂 BIX-01294 对肝癌细胞周期、凋亡及移植瘤的影响,以期为肝癌的治疗提供新的方向以及一定的理论参考依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株来源、主要试剂及仪器

SMMC-7721、BEL-7402 肝癌细胞株及 BIX-01294 购于美国 Sciencell 公司,正常肝细胞 HL-7702 购于中国科学院上海细胞库,雄性裸鼠购自中科院上海实验动物中心,G9a 一抗、H3K9me2 一抗、caspase-3 一抗、Bcl-2 一抗、Bax 一抗、PARP 一抗、GAPDH 一抗、兔羊二抗、鼠兔二抗购自上海昕浩生物科技有限公司,DMEM 完全培养基、胎牛血清购自上海广锐生物科技有限公司,胰酶、四甲基偶氮唑盐(MTT)、BCA 蛋白试剂盒购自上海研生生化试剂有限公司,流式细胞仪、酶标仪购自山东博科科学仪器有限公司。

1.2 细胞培养及分型

将 HL-7702 肝细胞株、SMMC-7721 及 BEL-7402 肝癌细胞株接种于含有 100 U/mL 青霉素和 100 U/mL 链霉素的 DMEM 完全培养基中,培养条件:37℃、5% CO₂ 饱和湿度培养箱。实验分空白对照组(加入无菌去离子水,浓度为 0)和 BIX-01294 不同浓度处理组(加入 1 μM、5 μM、10 μM、20 μM 的 BIX-01294)。

1.3 Western-blot 检测空白对照组各细胞株 G9a 表达水平

取空白对照组的细胞株,以 1×10^4 mL 的浓度接种于 6 孔板中培养 24 h,然后加入胰酶制成细胞悬液,而后加入蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的裂解液,于冰上裂解 30 min,离心处理后收集上清,95℃处理 10 min 后变性后将蛋白样品(30 mg/样品)在 SDS 聚丙烯酰胺凝胶中电泳 1.5 小时,将蛋白转移到 PVDF 膜上,并用 5% 脱脂牛奶在 PBS 中室温封闭 1 h,加入 G9a 一抗(1:1000)于 4℃过夜孵育。TBST 清洗 3×5 min 后将膜与二抗(1:3000)室温孵育 1 h。再次以 TBST 清洗 3×5 min,加入 ECL 发光液,使用 ChemiDoc XRS+ 系统内的 Image Lab 软件(Bio-Rad)计算灰度值,以 GAPDH 为内参,计算相对表达量。

1.4 细胞增殖检测

取对数期生长良好的 HL-7702、SMMC-7721 和 BEL-7402

细胞,按 1×10^4 孔接种于 96 孔板内。BIX-01294 处理组培养 24 h 后加入不同浓度的 BIX-01294,空白对照组加入无菌去离子水,置于 37℃、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中。24、48、72、96 h 后,每孔加入 20 μL MTT (5 mg/mL)培养 4 h,使用酶标仪在 490 nm 波长下检测吸光度值(OD 值),并计算细胞增殖率,增殖率 = (1 - 目标组 OD 值) / 空白对照组 OD 值 × 100%。

1.5 细胞周期检测

将对数期生长的肝癌细胞以 4×10^5 孔接种 6 孔培养板中,加入 5 μM BIX-01294 在 37℃、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养 24 h。采用胰蛋白酶消化细胞,PBS 冲洗细胞 3 次,加入 2.5 μL Annexin V/FITC 和 5 μL PI 孵育 15 min,流式细胞仪分析细胞周期的分布情况。

1.6 Western-blot 检测 5 μM BIX-01294 处理的肝癌细胞凋亡蛋白表达

将用 5 μM BIX-01294 处理完毕的细胞以及对照组细胞弃去培养基,后续处理除将待测蛋白转移到 PVDF 膜上后加入对应的一抗外,其余操作及计算方式均同 1.3,检测 CC3、Bax、C-PARP 以及 Bcl-2 水平。

1.7 体内成瘤及 H3K9me2 的检测

胰酶消化并收集处于对数生长期的 SMMC-7721、BEL-7402 细胞,调整细胞密度为 5×10^6 mL,在裸鼠的右下肺部皮下注射 200 μL,每组 6 只。7 d 后,裸鼠接受腹腔注射 BIX (4 mg/kg)或生理盐水,1 次/d,共 7 次。每天测量肿瘤的长径以及短径,并计算体积(体积 = 长径 × 短径² × 0.5236),21 d 后处死裸鼠,取肿瘤组织,称重后将组织研磨匀浆后用胰酶消化制成细胞悬液,而后检测 H3K9me2 水平,除将待测蛋白转移到 PVDF 膜上后加入对应的一抗外,其余操作及计算方式同 1.3。

1.8 统计分析

采用 SPSS 17.0 进行统计分析。计量资料表示为均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$),均通过正态性检验。比较采用 t 检验或重复测量方差分析。当 $P < 0.05$ 时,认为有统计学差异。

2 结果

2.1 三种细胞中 G9a 表达水平的比较

与正常的肝细胞 HL-7702 的 G9a 表达水平 (0.26 ± 0.05) 相比,肝癌细胞 SMMC-7721 (0.39 ± 0.11) 和 BEL-7402 (0.59 ± 0.13) 中 G9a 的表达水平明显升高 ($t = 2.635, 5.803, P = 0.025, 0.000$),见图 1。

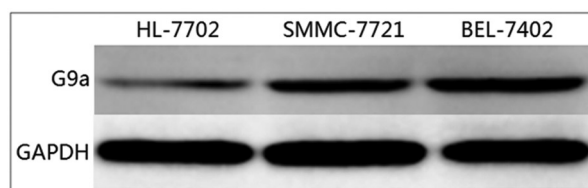


图 1 肝细胞以及肝癌细胞中 G9a 的表达

Fig.1 Expression of G9a in hepatocytes and hepatoma cells

2.2 BIX-01294 对肝癌细胞增殖的影响

MTT 法检测结果表明,不同浓度的 BIX-01294 对 BEL-7402 细胞和 SMMC-7721 细胞的增殖均有抑制作用,总体而言,随着时间延长和剂量的升高,BIX-01294 对细胞的增殖和抑制作用增强($P<0.05$),不同浓度的 BIX-01294 处理肝癌细胞 96 h 后肝癌细胞增殖的改变最为明显,见表 1。

表 1 不同浓度 BIX-01294 对肝癌细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s, \%$)

Table 1 Effects of different concentrations of bix-01294 on the proliferation of hepatoma cells($\bar{x} \pm s, \%$)

Groups	BEL-7402				SMMC-7721			
	24 h	48 h	72 h	96 h	24 h	48 h	72 h	96 h
Control group(n=6)	116.83±23.17	115.87±21.62	116.58±33.11	117.55±20.36	113.66±21.52	114.84±20.37	116.54±24.06	119.21±21.43
1 μ M group(n=6)	110.42±22.17	105.83±22.72	99.82±13.56	90.33±12.52	109.97±23.19	103.28±23.34	96.22±12.48	89.22±12.48
5 μ M group(n=6)	90.93±14.15*	86.36±12.98*	69.37±11.04**	57.37±11.04**	93.63±15.13*	85.76±19.68*	69.37±11.04**	59.32±14.22**
10 μ M group(n=6)	88.14±13.63*	82.97±12.16*	67.88±10.98**	54.82±7.93**	91.59±17.38*	82.19±11.08*	67.49±0.82**	56.32±9.28**
20 μ M group(n=6)	83.43±14.62*	78.54±15.24*	66.56±10.53**	52.33±9.47**	85.37±15.02*	79.28±11.53*	68.19±8.55**	54.08±8.93**
Holistic analysis	(HF coefficient:0.6952)				(HF coefficient:0.7341)			
Overall comparison(F,P)	19.032,0.000				31.706,0.000			
Overall comparison of time(F,P)	35.941,0.000				48.914,0.000			
Overall comparison of interaction(F,P)	9.068,0.011				8.746,0.017			

Notes: Compared with control group, * $P<0.05$; Compared with 24 h after processed, # $P<0.05$.

2.3 BIX-01294 对 BEL-7402, SMMC-7721 细胞周期的影响

本研究进一步探讨不同浓度的 BIX-01294 处理肝癌细胞 96 h 后肝癌细胞周期的改变。结果发现,BIX-01294 处理后,

G₀/G₁ 期细胞比例增加,S 和 G₂/M 期的细胞比例降低,差异具有统计学意义($P<0.05$),且具有剂量依赖性($P<0.05$)。见表 2。

表 2 BEL-7402 和 SMMC-7721 细胞周期($\bar{x} \pm s, \%$)

Table 2 Cell cycle of BEL-7402 and SMMC-7721($\bar{x} \pm s, \%$)

Groups	BEL-7402			SMMC-7721		
	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
Control group(n=6)	37.65±3.09	38.21±3.60	19.44±2.25	35.29±3.14	37.66±3.51	18.89±2.03
1 μ M group(n=6)	40.42±3.10	35.83±2.72	17.82±1.56	39.97±3.19	33.28±3.34	16.22±2.48
5 μ M group(n=6)	60.93±4.17**	26.36±2.98**	9.37±1.04**	59.84±3.34**	25.62±1.79**	9.12±1.19**
10 μ M group(n=6)	62.14±3.63**	24.97±2.16**	7.88±0.98**	61.59±4.38**	24.19±2.08**	7.49±0.82**
20 μ M group(n=6)	63.43±4.62**	23.54±1.94**	6.56±0.53**	62.37±5.02**	23.28±1.53**	6.19±0.55**

Notes: Compared with control group, * $P<0.05$; Compared with 1 μ M group, # $P<0.05$.

2.4 BIX-01294 对 BEL-7402、SMMC-7721 细胞凋亡蛋白的影响

由以上的结果可知,当 BIX-01294 浓度为 5 μ M 时,对肝癌细胞周期的改变最明显。本研究进一步通过 Western-blot 法探讨 5 μ M BIX-01294 处理肝癌细胞 96 h 后,肝癌细胞内凋亡蛋白水平的改变。本研究发现,5 μ M BIX-01294 处理后,BEL-7402、SMMC-7721 细胞内 CC3、Bax、C-PARP 表达水平升高,Bcl-2 的表达水平下降($P<0.05$),见图 2 和表 3。

2.5 BIX-01294 处理对裸鼠移植瘤及 H3K9me2 的影响

本研究进一步观察了 BIX-01294 对裸鼠移植瘤的影响,与对照组相比,BIX-01294 处理组裸鼠肿瘤体积缩小,肿瘤重量减轻,肿瘤组织中 H3K9me2 的表达水平降低,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 4。

3 讨论

众多的研究表明,组蛋白的异常修饰在疾病的发生过程中发挥重要作用,G9a 是一种组蛋白甲基转移酶,其在癌组织的高表达与肿瘤的预后密切相关^[10-12]。研究表明,BIX-01294 能引

起子宫内膜癌细胞和乳腺癌细胞发生自噬和凋亡^[13,14]。由此可见,BIX-01294 对肿瘤细胞的增殖凋亡具有紧密的联系,而其对肝癌细胞增殖、凋亡及移植瘤的影响的具体机制尚未有统一论。

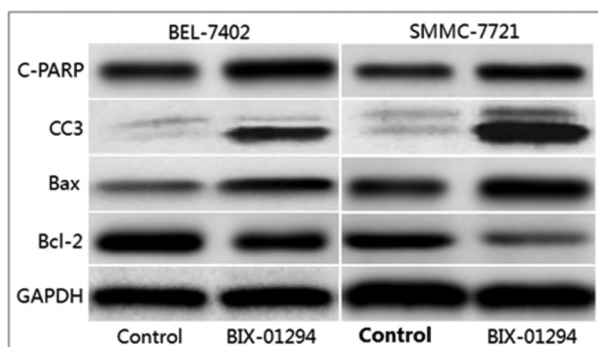


图2 BIX-01294 对 BEL-7402、SMMC-7721 细胞凋亡蛋白水平的影响
Fig.2 Effect of BIX-01294 on apoptotic protein level of BEL-7402 and SMMC-7721 cells

本研究中证实与正常的肝细胞相比,G9a 在两类肝癌细胞株中(BEL-7402 和 SMMC-7721)呈高表达状态,这说明肝癌的发生与 G9a 的异常表达密切相关,这是因为在正常生理条件

下,组蛋白的修饰水平在体内呈动态平衡,而组蛋白修饰水平的稳态主要依赖 G9a 的调节,G9a 介导的 H3K9me1 和 H3K9me2 行使对靶基因的转录抑制^[15-17],G9a 催化的 H3K9me1 和 H3K9me2 可通过影响下游基因的表达水平,导致细胞出现去分化和过度增殖,从而引起癌症的发生^[18,19]。恶性肿瘤的发生与细胞的过度增殖有关,细胞凋亡是细胞的一种程序性死亡方式,是维持机体内环境稳态的重要机制^[20,21]。本研究采用不同浓度的 BIX-01294 处理 BEL-7402 和 SMMC-7721 肝癌细胞后发现,随着时间的延长和处理剂量的升高,BIX-01294 对肝癌细胞增殖的抑制作用增强,既往研究表明,抗肿瘤药物主要依赖线粒体途径诱导肿瘤细胞凋亡^[22,23],在此过程中,药物引起肿瘤细胞内 DNA 损伤,细胞内 p53、p21 和 p16 的水平升高,通过蛋白水解作用和脱磷酸作用导致 Bax 的水平升高和 Bcl-2 的水平下降,引起 Bax/Bcl-2 的比例升高,细胞内线粒体膜的通透性升高,细胞色素 C 由线粒体释放至胞浆,导致 CC-3 激活,然后通过蛋白水解作用激活 PARP,导致其水平升高,进而引起细胞凋亡^[24-26],本研究发现 BIX-01294 处理后肝癌细胞中 CC-3、Bax 的表达水平升高,Bcl-2 的表达水平下降,说明 BIX-01294 也是通过这一机制实现诱导肝癌细胞凋亡的。

表 3 BIX-01294 对 BEL-7402、SMMC-7721 细胞凋亡蛋白的影响

Table 3 Effect of BIX-01294 on apoptosis protein of BEL-7402 and SMMC-7721 cells

Groups	Cells	C-PARP	CC3	Bax	Bcl-2
Control group(n=6)	BEL-7402	0.62± 0.12	0.12± 0.06	0.32± 0.13	0.92± 0.10
	SMMC-7721	0.38± 0.14	0.09± 0.04	0.46± 0.12	0.42± 0.13
BIX-01294 group (n=6)	BEL-7402	0.93± 0.26*	0.53± 0.12*	0.49± 0.11*	0.71± 0.09*
	SMMC-7721	0.63± 0.08*	0.95± 0.03*	0.82± 0.07*	0.25± 0.03*

Notes: Compared with control group, * $P < 0.05$.

表 4 BIX-01294 处理对裸鼠移植瘤及 H3K9me2 的影响

Table 4 Effect of BIX-01294 treatment on transplanted tumor and H3K9me2 in nude mice

Groups	BEL-7402			SMMC-7721		
	Tumor volume (mm ³)	Tumor weight(g)	H3K9me2	Tumor volume (mm ³)	Tumor weight(g)	H3K9me2
Control group(n=6)	2013.43± 220.37	1.54± 0.63	0.73± 0.18	2137.46± 139.54	1.66± 0.31	0.89± 0.09
BIX-01294 group (n=6)	976.79± 159.28	0.53± 0.22	0.51± 0.11	839.97± 143.19	0.48± 0.14	0.62± 0.06
t	9.339	3.707	2.555	15.896	8.497	6.114
P	0.000	0.004	0.029	0.000	0.000	0.000

临床中化疗药物主要通过影响肿瘤细胞周期来发挥抗肿瘤作用,阻滞细胞进入分裂期,从而抑制肿瘤的生长^[27,28],本研究发现不同浓度的 BIX-01294 处理 BEL-7402 和 SMMC-7721 后,细胞 G₀/G₁ 期细胞比例增加,S 和 G₂/M 期的细胞比例降低,说明 BIX-01294 是通过阻滞肝癌细胞周期来抑制肝癌细胞的增殖,这与既往研究中发现阻碍癌细胞的有丝分裂可抑制细胞增殖的结论相一致^[29,30]。为了进一步验证 BIX-01294 对肝癌的影响,本研究应用体内移植瘤实验,观察 BIX-01294 对肿瘤生长的影响。实验结果表明,与对照组相比,BIX-01294 处理组其

肿瘤体积增长缓慢,肿瘤重量明显小于对照组,且肿瘤组织内 H3K9me2 的表达水平下降,表明 BIX-01294 通过抑制 G9a 从而影响 H3K9me2 的表达进而抑制肿瘤的生长。

综上所述,G9a 在肝癌细胞中高度表达,通过使用 G9a 的抑制剂 BIX-01294 后,肝癌细胞出现细胞周期阻滞,其可能是通过影响凋亡蛋白 CC-3、Bax、C-PARP 及 Bcl-2 的表达而影响肝癌细胞凋亡,其可通过影响 H3K9me2 的表达抑制肿瘤的生长。

参考文献(References)

[1] Valery PC, Laversanne M, Clark PJ, et al. Projections of primary liver

- cancer to 2030 in 30 countries worldwide [J]. *Hepatology*, 2018, 67(2): 600-611
- [2] Sun Y, Wang Y, Li M, et al. Long-term trends of liver cancer mortality by gender in urban and rural areas in China: an age-period-cohort analysis[J]. *BMJ Open*, 2018, 8(2): e020490
- [3] Noberini R, Osti D, Miccolo C, et al. Extensive and systematic rewiring of histone post-translational modifications in cancer model systems[J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(8): 3817-3832
- [4] Liu S, Liu F, Huang W, et al. MAGE-A11 is activated through TFCEP2/ZEB1 binding sites de-methylation as well as histone modification and facilitates ESCC tumor growth[J]. *Oncotarget*, 2017, 9(3): 3365-3378
- [5] Li Y, Cheng C. Long noncoding RNA NEAT1 promotes the metastasis of osteosarcoma via interaction with the G9a-DNMT1-Snail complex [J]. *Am J Cancer Res*, 2018, 8(1): 81-90
- [6] Wang DY, Kosowan J, Samsom J, et al. Inhibition of the G9a/GLP histone methyltransferase complex modulates anxiety-related behavior in mice[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2018, 39(5): 866-874
- [7] Casciello F, Al-Ejeh F, Kelly G, et al. G9a drives hypoxia-mediated gene repression for breast cancer cell survival and tumorigenesis[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114(27): 7077-7082
- [8] Qi M, Tian Y, Li W, et al. ERK inhibition represses gefitinib resistance in non-small cell lung cancer cells [J]. *Oncotarget*, 2018, 9(15): 12020-12034
- [9] 董晓雨, 王立辉. G9a 在肿瘤发展中的作用及研究现状 [J]. *中南药学*, 2018, 16(6): 758-761
- [10] Dobson THW, Hatcher RJ, Swaminathan J, et al. Regulation of USP37 Expression by REST-associated G9a-dependent Histone Methylation[J]. *Mol Cancer Res*, 2017, 15(8): 1073-1084
- [11] Zhong X, Chen X, Guan X, et al. Overexpression of G9a and MCM7 in oesophageal squamous cell carcinoma is associated with poor prognosis[J]. *Histopathology*, 2015, 66(2): 192-200
- [12] Kai Y, Li Y, Sun T, et al. A medial prefrontal cortex-nucleus accumbens corticotropin-releasing factor circuitry for neuropathic pain-increased susceptibility to opioid reward [J]. *Transl Psychiatry*, 2018, 8(1): 100
- [13] Dong P, Ying X, Yue J, et al. miR-34a, miR-424 and miR-513 inhibit MMSET expression to repress endometrial cancer cell invasion and sphere formation[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(33): 23253-23263
- [14] Kim SY, Hong M, Heo SH, et al. Inhibition of euchromatin histone-lysine N-methyltransferase 2 sensitizes breast cancer cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand through reactive oxygen species-mediated activating transcription factor 4-C/EBP homologous protein-de[J]. *Mol Carcinog*, 2018, 57(11): 1492-1506
- [15] Chen WL, Sun HP, Li DD, et al. G9a - An Appealing Antineoplastic Target[J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2017, 17(6): 555-568
- [16] Deng M, Liu Z, Chen B, et al. Aberrant DNA and histone methylation during zygotic genome activation in goat cloned embryos [J]. *Theriogenology*, 2020, 148: 27-36
- [17] Zhu D, Barry E, Sankin AI, et al. Enhancing response to immunotherapy in urothelial carcinoma by targeted inhibition of the histone methyltransferase G9a pathway[J]. *Transl Androl Urol*, 2019, 8(Suppl 5): S469-S471
- [18] 袁芊芊, 贺鑫, 刘诗意, 等. 组蛋白甲基转移酶 G9a 的表观遗传调控在肿瘤发生中的作用[J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2017, 26(2): 191-196
- [19] Fukuda M, Sakaue-Sawano A, Shimura C, et al. G9a-dependent histone methylation can be induced in G1 phase of cell cycle[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 956
- [20] 冯茜, 周汝, 余沈桐, 等. 血管细胞黏附分子 -1 对卵巢癌细胞凋亡的影响及机制研究[J]. *现代生物医学进展*, 2018, 18(9): 1658-1663
- [21] Cai L, Chen Q, Fang S, et al. MicroRNA-329 inhibits cell proliferation and tumor growth while facilitates apoptosis via negative regulation of KDM1A in gastric cancer [J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(4): 1-10
- [22] 王东萍, 石玮, 葛万文, 等. 泰巴硒菇提取物 FA-2-b-β 诱导 CD34+CD38--KG1a 白血病干细胞凋亡及其相关机制 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2019, 27(6): 1761-1766
- [23] Dai H, Ge S, Guo J, et al. Development of novel bis-pyrazole derivatives as antitumor agents with potent apoptosis induction effects and DNA damage[J]. *Eur J Med Chem*, 2018, 143: 1066-1076
- [24] Losuwanarak N, Sritularak B, Chanvorachote P, et al. Cycloartobiloxanthone Induces Human Lung Cancer Cell Apoptosis via Mitochondria-dependent Apoptotic Pathway [J]. *In Vivo*, 2018, 32(1): 71-78
- [25] Kim EM, Jung CH, Song JY, et al. Pro-apoptotic Bax promotes mesenchymal-epithelial transition by binding to respiratory complex-I and antagonizing the malignant actions of pro-survival Bcl-2 proteins [J]. *Cancer Lett*, 2018, 424: 127-135
- [26] Huang Y, Zou Y, Lin L, et al. Effect of BIX-01294 on proliferation, apoptosis and histone methylation of acute T lymphoblastic leukemia cells[J]. *Leuk Res*, 2017, 62: 34-39
- [27] 李志华, 熊秋云, 涂剑宏, 等. 乳腺癌 miR-34a 表达及其对化疗耐药分子机制影响探讨 [J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2017, 24(17): 1195-1200
- [28] Qi C, Wang X, Shen Z, et al. Anti-mitotic chemotherapeutics promote apoptosis through TL1A-activated death receptor 3 in cancer cells[J]. *Cell Res*, 2018, 28(5): 544-555
- [29] 何悦, 颜道宇, 尤昕冉, 等. 去甲斑蝥素抑制紫杉醇诱导的 U-MUC-3 人膀胱癌细胞有丝分裂滑脱[J]. *暨南大学学报(自然科学与医学版)*, 2016, 37(4): 300-306
- [30] 杨建林, 李论, 曾子悦, 等. 抑制多胺调节因子 -1 表达增强地塞米松对宫颈癌细胞的抗肿瘤活性 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2018, 25(7): 711-715