

文章编号 1006-8147(2015)06-0461-05

论 著

EZH2 抑制剂 DZNEP 影响人头颈部鳞癌增殖与凋亡的体内外研究

孔令平,周旋,孙姗姗,黄媛媛,张 仑

(天津医科大学肿瘤医院颌面部耳鼻喉科,国家肿瘤临床医学研究中心,天津市“肿瘤防治”重点实验室,天津 300060)

摘要 目的:探讨 Zeste 同源序列 2 的增强子(EZH2)的小分子抑制剂 DZNEP 抑制人头颈部鳞状细胞癌细胞 Tb3.1 增殖、诱导凋亡的效果与机制。方法:甲基噻唑基四唑(MTT)法测细胞对 DZNEP 的半数致死量(IC₅₀)、细胞的增殖能力;流式细胞术检测细胞凋亡;平板克隆法检测细胞形成克隆能力;JC-1 荧光探针染色法检测细胞线粒体膜电位;蛋白质印迹法(WB)检测 EZH2、细胞增殖核抗原(Ki-67)、B 细胞淋巴瘤 2(Bcl-2、BAX)、活化型含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 3(CCASP-3)的表达。体内实验裸鼠皮下荷瘤模型,通过免疫组织化学染色及原位末端标记(TUNEL)法检测 DZNEP 对细胞增殖、凋亡的作用。结果:经 DZNEP 处理后,EZH2 蛋白表达降低;MTT 法检测 DZNEP 明显抑制鳞癌细胞 Tb3.1 的增殖,且具有浓度和时间依赖性;流式细胞术显示 DZNEP 可诱导细胞凋亡;平板克隆实验表明 DZNEP 能够明显抑制克隆形成能力,抑制细胞增殖;JC-1 荧光探针染色法显示 DZNEP 可以改变细胞的线粒体膜电位;WB 显示,DZNEP 可增加促凋亡基因(CCASP-3、BAX)的表达,抑制 Ki-67、Bcl-2 的表达水平。体内实验观察结束时,DZNEP 处理组肿瘤体积较对照组明显减小。免疫组织化学染色结果示,DZNEP 组中 BAX、CCASP-3 表达增加,Ki-67、Bcl-2 表达减少;TUNEL 结果显示,DZNEP 组比 DMSO 组肿瘤细胞凋亡指数上升。结论: DZNEP 通过抑制 EZH2 表达在体外抑制 Tb3.1 细胞增殖并诱导凋亡;为进一步探讨 EZH2 参与人头颈部鳞状细胞癌发生发展的分子机制提供科学实验依据。

关键词 头颈部鳞状细胞癌;EZH2;细胞凋亡;细胞增殖

中图分类号 R739.91

文献标志码 A

DZNEP inhibits cell proliferation and induces apoptosis by targeting EZH2 in human head and neck squamous cell carcinoma *in vitro* and *vivo*

KONG Ling-ping, ZHOU Xuan, SUN Shan-shan, HUANG Yuan-yuan, ZHANG Lun

(Department of Maxillofacial & Ear, Nose, and Throat oncology, Cancer Institute and Hospital, Tianjin Medical University, National Clinical Research Center for Cancer, Tianjin Key Laboratory of Cancer Prevention and Therapy, Tianjin 300060, China)

Abstract Objective: To investigate the anti-tumour molecular mechanism of DZNEP in human head and neck squamous cell carcinoma.

Methods: Tb3.1 human head and neck squamous cell carcinoma cell lines were employed. DZNEP was used to suppress the expression of EZH2. Methyl thiazolyl tetrozolium (MTT) assay was applied to determine IC₅₀ and cell survival. Flow cytometry (FCM) was used to measure cell apoptosis. JC-1 fluorescence was employed to determine MMP. The expression level of EZH2, antigen 67(Ki-67), B cell lymphoma 2 (Bcl-2, BAX) and cleaved cysteinyl aspartate specific proteinase-3(CCASP-3) were examined by Western blotting. **Results:** Compared with control and normal control cells, DZNEP inhibited EZH2 expression and affected cell proliferation. Apoptosis rate was elevated by DZNEP. Clone formation assay suggested that cell clone numbers were significantly reduced by DZNEP. BAX and CCASP-3 expression were enhanced by DZNEP treatment, while Ki-67 and Bcl-2 expression were suppressed. *In vivo*, the tumor volume after treatment with DZNEP was significantly smaller than control groups. Immunological histological chemistry suggested that BAX and CCASP-3 protein expression was up-regulated while Ki-67 and Bcl-2 protein of tumor tissue was down-regulated after treated DZNEP as compared to control groups. TUNEL assay indicated that apoptosis index was increased after treatment with DZNEP compared with control groups. **Conclusion:** DZNEP modulates proliferation and apoptosis of Tb3.1 cancer cell by inhibiting EZH2, which might promote further research in head and neck squamous cell carcinoma treatment.

Key words head and neck squamous cell carcinoma; EZH2; apoptosis; proliferation

头颈部鳞状细胞癌是头颈部癌中最常见的病

理类型。目前研究认为,表观遗传调控紊乱是头颈部鳞癌的重要特征。组蛋白甲基转移酶 EZH2 是表观遗传调控蛋白 PRC2 复合物的的重要组成部分,它可以作为联系 DNA 甲基化与组蛋白乙酰化、甲基

基金项目 国家自然科学基金资助项目(81172573)

作者简介 孔令平(1988-),女,硕士在读,研究方向:头颈部鳞癌的基础研究;通信作者:张仑,E-mail:zhanglun@tjmuch.com。

化等其他表观遗传修饰的桥梁^[1]。EZH2 特异性的使组蛋白 H3 的第 27 位点的赖氨酸三甲基化 (H3K27me3) 从而使下游靶基因沉默^[2]。在头颈部鳞癌中针对 EZH2 靶向治疗的研究尚属空白, 据此, 选用 EZH2 小分子抑制剂 DZNEP 作为抑制头颈部鳞癌细胞系 Tb3.1 中 EZH2 的药物, 开展了以下实验研究。

1 材料与方法

1.1 材料 人头颈部鳞状细胞癌细胞株 Tb3.1 (上海交通大学第九人民医院惠赠)。DZNEP 购于 Cayman 公司。DMSO、MTT 购于 Sigma 公司。凋亡试剂盒购于南京凯基生物科技发展有限公司。线粒体膜电位试剂盒购于碧云天生物技术有限公司。RIPA 裂解液购于 Millipore 公司。EZH2、CCASP-3 购于 CST 公司, Bcl-2、BAX、Ki-67、GAPDH 及辣根过氧化物酶标记的二抗购于中杉金桥生物技术有限公司。组化用生物素标记的二抗及辣根过氧化物酶标记的三抗购于中杉金桥生物技术有限公司。裸鼠购自北京维通利华。TUNEL 原位凋亡试剂盒购自 Roche 公司。0.25% 胰蛋白酶购自 Gibco 公司, 胎牛血清购自 Hyclone 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 用含 10% 胎牛血清 (Hyclone, 美国) 的 1640 (Gibco, 美国) 完全培养基, 置于 37 °C, 5% CO₂ 细胞培养箱内湿润培养。

1.2.2 实验分组 空白对照组; DMSO 组: 在细胞培养液中加入与 DZNEP 组等剂量的 DMSO; 实验组 (DZNEP 组): 将 DZNEP (溶于 DMSO) 加入细胞培养基内, 使其终浓度为 3 μmol/L。

1.2.3 MTT 法检测 DZNEP 对头颈部鳞癌细胞株的抑制作用 取 10⁴ 个对数生长期的细胞接种至 96 孔板, 设有空白对照 (不含细胞, 只加相应培养液), 阴性对照 (只有细胞悬液), 每组重复 5 次; 实验组 (DZNEP 浓度分别为 0.1、0.5、1、2、4、6、8、10 μmol/L) 每种浓度重复 5 次。培养 24 h 后加入 20 μL (5 mg/mL) MTT (公司, 美国), 继续培养 4 h, 每孔加 200 μL DMSO, 用紫外分光光度计 490 nm 波长测定各孔的吸光度 (A 值), 取每组 5 孔的均值。根据结果制作生长曲线, 并计算 IC₅₀。

1.2.4 MTT 法检测 DZNEP 对头颈部鳞癌细胞株随时间的抑制作用 取对数生长期 Tb3.1 细胞以 10⁴ 个细胞/孔接种于 96 孔板, 待细胞贴壁后, 按 1.2.2 所述处理细胞, 每组设 5 个复孔; 分别于实验 0、1、2、3、4、5 d 行 MTT 检测, 用 490 nm 波长测定各孔的吸光度, 取每组 5 孔的均值。按照公式计算各组细胞生存率 = (处理组细胞吸光度值/空白对照组细胞

吸光度值) × 100%, 并绘制生长曲线。

1.2.5 膜联蛋白 5-碘化丙啶法检测细胞凋亡

DZNEP 处理细胞 48 h 后, 将细胞制备成单细胞悬液, 按照试剂盒说明先后加入膜联蛋白 5、碘化丙啶后使用荧光激活细胞分选仪 (fluorescence-activated cell sorting Calibar, FACS Calibar) (BD, 美国) 检测细胞凋亡。实验重复 3 次。

1.2.6 平板克隆实验检测细胞增殖克隆能力 制备单细胞悬液。用吸管反复吹打细胞悬液, 使细胞充分分散至单细胞百分率 >95%, 细胞计数板计数活细胞数; 分别按细胞为 1 000/孔接种于 6 孔板中摇匀; 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度培养 14 d, 倒置相差显微镜下网格目镜随机选择 3 个 100× 视野下大网格内计算细胞克隆数。实验重复 3 次。

1.2.7 Western blot 检测 DZNEP 对头颈部鳞癌细胞相关蛋白表达的影响 分别按 1.2.2 所述处理 Tb3.1 细胞 48 h 后, 加入 RIPA 裂解液冰上裂解 30 min, 加入 1/3 体积的 4×SDS 上样缓冲液混匀并煮沸变性。EZH2、Bcl-2、BAX、Ki-67、CCASP-3、GAPDH 一抗 (1:1 000 稀释) 4 °C 摇床孵育过夜, 加入辣根过氧化物酶标记的二抗 (1:2 000 稀释) 室温孵育 1 h, 洗去二抗, 凝胶成像系统 (Bio-Rad, 美国) 采集图像。实验重复 3 次。

1.2.8 线粒体膜电位试剂盒 (JC-1) 检测 DZNEP 对线粒体膜电位的影响 常规对数生长期 Tb3.1 接种在共聚焦小皿中, 用 1.2.2 所述方法处理细胞 48 h, 吸除培养液后加入 500 μL 培养液及 500 μL JC-1 染色工作液, 放入 37 °C 培养箱中孵育 20 min。孵育结束后吸除上清, 再用 JC-1 染色缓冲液 (1×) 洗涤 2 次, 在激光共聚焦显微镜下观察。实验重复 3 次。

1.2.9 动物实验 实验所用动物为 4 周龄雌性裸鼠, 饲养于中国协和医科大学血液学研究所实验动物中心。制备细胞密度为 5×10⁶ 个/L 的 Tb3.1 单细胞悬液 200 μL, 分别接种于 15 只裸鼠左侧腹股沟皮下。成瘤后, 随机分为 3 组, 每组 5 只。分别用 20 μL DZNEP 和 DMSO 瘤内注射。3 d 治疗 1 次并测量肿瘤的长径 (a) 及宽径 (b), 肿瘤体积计算公式: $V = (ab^2)/2$, 绘制肿瘤生长曲线。于最后一次肿瘤测量结束后, 处死裸鼠, 取出裸鼠皮下荷瘤, 固定, 石蜡包埋, 制备切片。

1.2.10 免疫组化检测及结果判断 石蜡切片脱蜡水化, 抗原修复, 3% H₂O₂ 孵育 15 min, 山羊血清封闭, 分别滴加 BAX、CCASP-3、Bcl-2、Ki-67 一抗 (1:100 稀释) 4 °C 孵育过夜; 加入生物素标记的二抗 (1:100 稀释) 37 °C 孵育 40 min; 加入辣根过氧化物酶标

记的三抗(1:100 稀释)37 ℃孵育 40 min;DAB 显色,苏木素复染 10 min,脱水,封片;DP-70 倒置显微镜(Olympus, 日本)采集图像。

1.2.11 TUNEL 法检测细胞凋亡 切片脱蜡水化,按照 TUNEL 原位凋亡试剂盒说明书实验。激光扫描共聚焦显微镜(Olympus, 日本)采集图像。

1.3 统计学方法 使用 SPSS 18.0 统计软件处理实验数据,采用单因素方差分析进行统计学分析,以双侧 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MTT 法测定头颈部鳞癌细胞株 DZNEP 的半数抑制浓度 (IC_{50}) MTT 结果显示:DZNEP 的浓度越高,Tb3.1 的吸光度值越小,活细胞数量也就越小,说明具有浓度依赖性。经 SPSS 软件计算分析头颈部鳞癌细胞株 Tb3.1 的 IC_{50} 为 $3 \mu\text{mol/L}$ 。

2.2 WB 检测 DZNEP 对 Tb3.1 细胞中 EZH2 蛋白表达的影响 WB 结果显示:DZNEP 处理后,Tb3.1 细胞株的 EZH2 蛋白表达降低,空白对照组、DMSO 组、DZNEP 组的相对表达量分别为 0.97 ± 0.11 、 0.94 ± 0.11 、 0.28 ± 0.03 ,且 DZNEP 组与 DMSO 和空白对照组相比差异具有统计学意义($P < 0.05$)(图 1),说明 DZNEP 具有抑制 EZH2 表达的作用。

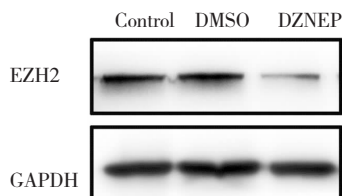


图 1 DZNEP 处理 Tb3.1 后 EZH2 蛋白的表达

Fig 1 DZNEP affects the expression of EZH2 in Tb3.1

2.3 MTT 法检测 Tb3.1 细胞生存率 MTT 结果显示:MTT 第 4 天,DZNEP 组细胞存活率最低[(33 ± 5)%],低于空白对照组(100%)、DMSO 组[(90 ± 2)%]($P < 0.05$)(表 1),说明 DZNEP 处理后,Tb3.1 的增殖能力明显减弱,且具有时间依赖性。

表 1 不同时间细胞生存率(% , $\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Cell viability at different times(% , $\bar{x} \pm s$)

分组	样本数	细胞生存率					
		第 0 天	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天
空白对照组	5	100	100	100	100	100	100
DMSO 组	5	99 \pm 2	97 \pm 2	94 \pm 1	93 \pm 2	90 \pm 2	89 \pm 5
DZNEP 组	5	97 \pm 1	70 \pm 3*	57 \pm 13*	47 \pm 10*	33 \pm 5*	37 \pm 4*
F		2.761	148.889	26.336	73.669	475.459	266.664
P		0.141	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000

* 代表差异具有统计学意义

2.4 流式细胞术检测细胞凋亡 流式结果显示:DZNEP 组 [(20.67 ± 4.61)%]较空白对照组 [($1.33 \pm$

0.24)%]和 DMSO 组[(1.51 ± 0.33)%]凋亡率升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)(图 2),说明 DZNEP 可诱导 Tb3.1 发生凋亡。

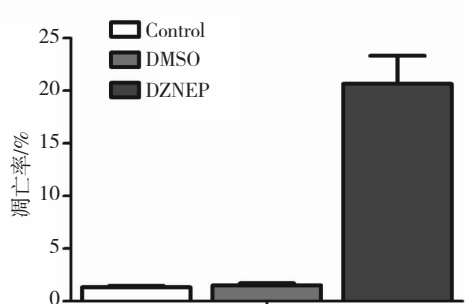


图 2 DZNEP 处理后 Tb3.1 细胞凋亡比例柱形图

Fig 2 DZNEP induces cell apoptosis

2.5 平板克隆实验检测 DZNEP 处理后 Tb3.1 的克隆形成能力 结果显示:每 100 mm² 视野中,DZNEP 处理组克隆形成数目(1 ± 1)明显低于空白对照组(12 ± 3)及 DMSO 组(10 ± 2),差异具有统计学意义($P < 0.05$)(图 3)。

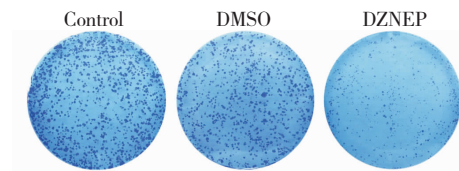


图 3 平板克隆实验检测 DZNEP 处理后克隆形成

Fig 3 Clone formation ability reduced after DZNEP treatment

2.6 JC-1 荧光法检测 DZNEP 对线粒体膜电位的影响 当线粒体膜电位较高时,JC-1 聚集在线粒体的基质内,形成聚合物,可以产生红色荧光;在线粒体膜电位较低时,JC-1 不能聚集在线粒体的基质内,此时为 JC-1 单体,可以产生绿色荧光。结果显示:DZNEP 处理后 Tb3.1 细胞线粒体膜电位明显处于较低水平,导致细胞发生凋亡(图 4)。

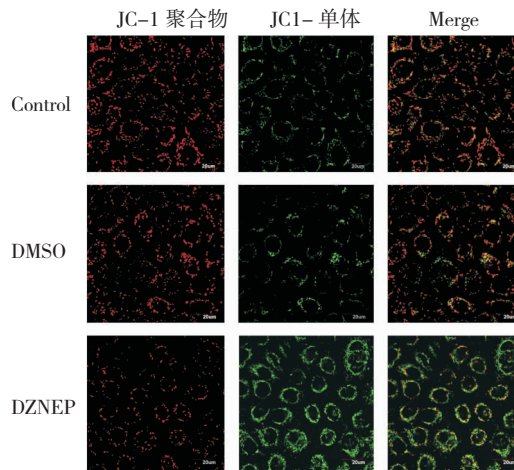


图 4 JC-1 荧光探针检测线粒体膜电位情况

Fig 4 Mitochondrial membrane potentials reduced by DZNEP

2.7 WB 检测 DZNEP 对 Tb3.1 生长相关蛋白表达的影响 结果显示:促增殖因子 Ki-67 及抑制凋亡

因子 Bcl-2 的表达明显被 DZNEP 抑制,而DZNEP 可以增加促凋亡因子 CCASP-3、BAX 的表达,并且 DZNEP 组与 DMSO 组和空白对照组相比均具有统计学意义($P<0.05$)(表 2)。提示 DZNEP 处理后,细胞增殖能力降低,并且诱导促凋亡蛋白增加,促进凋亡。

表 2 DZNEP 处理后 Tb3.1 凋亡相关蛋白相对表达量($\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Relative expression of apoptosis -related protein after DZNEP treatme($\bar{x}\pm s$)

细胞系	蛋白	蛋白相对表达量			F	P
		空白对照组	DMSO 组	DZNEP 组		
Tb3.1	Ki-67	0.44±0.02	0.44±0.03	0.05±0.002	429.829	0.000
	CCASP-3	0.45±0.02	0.42±0.03	1.13±0.06	357.773	0.000
	Bcl-2	0.60±0.03	0.63±0.02	0.13±0.004	547.480	0.000
	BAX	0.06±0.002	0.05±0.002	0.47±0.02	951.621	0.000

2.8 裸鼠皮下荷瘤生长曲线 DZNEP 组裸鼠皮下荷瘤体积 ($1\,047.6\pm397.7$)mm³ 小于空白对照组 ($2\,708.8\pm859.9$)mm³ 和 DMSO 组($2\,384.2\pm873.3$)mm³ (图 5)。说明 DZNEP 可以抑制肿瘤的生长。

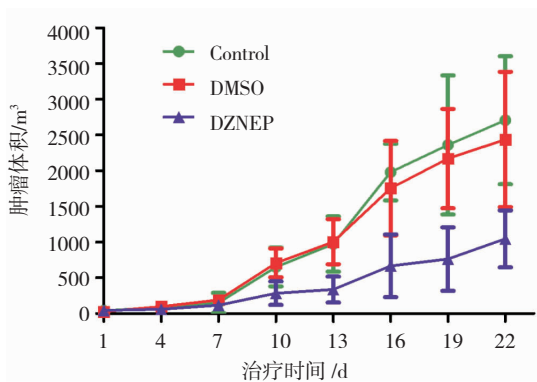


图 5 裸鼠皮下荷瘤生长曲线

Fig 5 Subcutaneously tumor-burdened growth curve

2.9 TUNEL 实验 图 6 示 DAPI 蓝色荧光标记细胞核,Fluorescein-dUTP 标记:断裂 DNA 的 3'-OH 末端,488 nm 激发波长下可在共聚焦显微镜下看到细胞内的绿色荧光。显微镜下,每张切片随机选取 5 个视野($\times 400$)统计凋亡指数。DZNEP 处理组凋亡指数为[(34.8±3.2)%]多于空白对照组凋亡指数[(5.9±1.7)%]和 DMSO 组凋亡指数[(8.3±1.9)%],且差别有统计学意义($P<0.05$)。说明 DZNEP 组细胞凋亡数较 DMSO 组和空白对照组明显增加。

2.10 免疫组化染色检测裸鼠皮下荷瘤生长相关蛋白的表达 EZH2 及 Ki-67 阳性信号定位于细胞核,DZNEP 处理组两种蛋白均呈弱阳性表达;而促凋亡基因 BAX 和 CCAP-3 的阳性信号定位于细胞质中,DZNEP 处理组两种蛋白均呈强阳性表达;抗凋亡基因 Bcl-2 阳性信号定位于细胞浆中,DZNEP 组阳性信号显著减弱(图 7)。

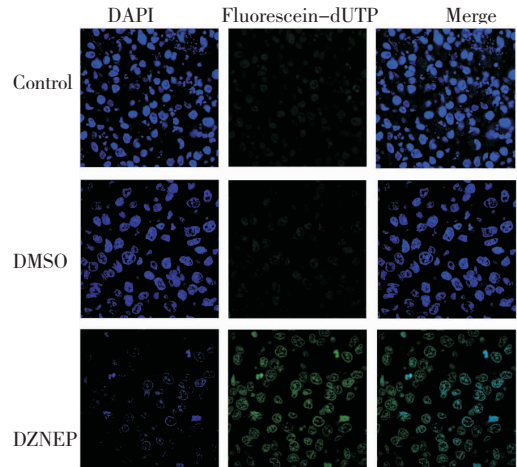


图 6 DZNEP 处理后肿瘤组织细胞的凋亡情况(SP ×1 000)

Fig 6 Apoptotic nucleus in DZNEP-treated tumors detected by TUNEL assay(SP ×1 000)

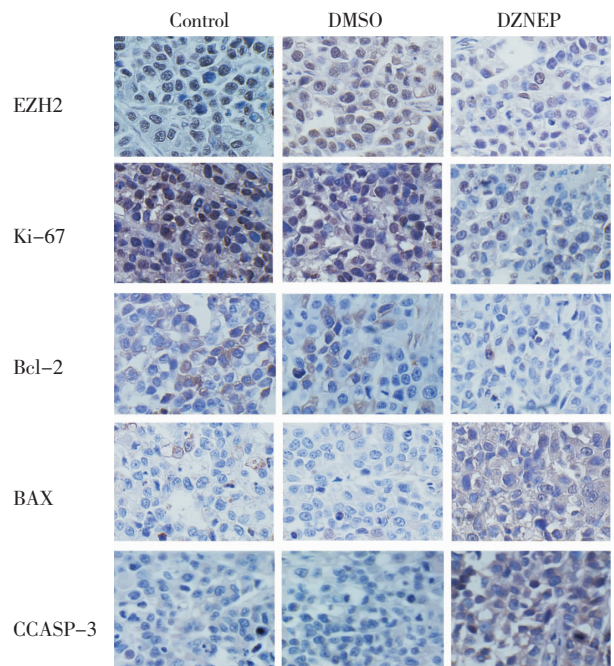


图 7 DZNEP 处理后裸鼠皮下荷瘤生长相关蛋白的表达(SP ×200)

Fig 7 IHC staining of tumor growth-related protein expression (SP ×200)

3 讨论

在过去 10 年里,尽管手术、化疗以及放射治疗等多种治疗头颈部癌的方法取得了巨大的进展,但头颈部鳞癌的 5 年生存率仍然不令人满意^[3-4]。因此寻找头颈部鳞癌有效的靶向治疗成为研究热点。研究表明细胞凋亡与肿瘤的发生密切相关,多数肿瘤中细胞凋亡受阻,凋亡信号通路紊乱导致细胞程序性死亡减少,进而发生异常增殖^[5]。因此,诱导肿瘤细胞发生凋亡可作为治疗肿瘤的新靶点。

组蛋白甲基转移酶 EZH2 在多种肿瘤中异常高表达,它可以使多个抑癌基因表达沉默,其中包括

促凋亡基因及抑制细胞增殖的基因,从而促进肿瘤的生长^[6]。目前 EZH2 在头颈部鳞癌中的研究较为广泛,据报道 EZH2 的高表达与肿瘤的生长、淋巴结转移、临床分期以及不良预后均有密切联系^[7];EZH2 还具有促进口腔黏膜白斑恶化、上皮间质转化以及保证癌症干细胞状态的作用^[8]。然而 EZH2 与头颈部肿瘤细胞凋亡的关系尚不明确,因此我们选用 EZH2 小分子抑制剂 DZNEP (3-deazaneplanocin A) 进行了实验研究。

DZNEP 是一种竞争性的 S-腺苷同型半胱氨酸水解酶抑制剂,它可以抑制瘤细胞中 EZH2 的表达来实现抗肿瘤作用。近来在肺癌、胃癌、骨髓瘤、急性髓性白血病以及淋巴瘤等癌症的实验研究中,DZNEP 均有希望成为抑制肿瘤生长的药物^[9-13]。研究发现在多种恶性血液病中,DZNEP 具有诱导癌细胞凋亡的作用^[14]。该研究主要对头颈部鳞癌细胞系进行了增殖和凋亡的检测。Chiba 等^[15]研究发现用干扰 RNA 或者 DZNEP 抑制 EZH2 的表达均可使肝癌细胞系细胞增殖速度、克隆形成数量明显低于对照组。本实验中 DZNEP 组 Tb3.1 细胞增殖及克隆形成的数量明显较对照组低,说明 DZNEP 抑制头颈部鳞癌细胞增殖及克隆形成。在多发性骨髓瘤中,DZNEP 可抑制抗凋亡基因 Bcl-2、Bcl-xl 的表达,使促凋亡基因 Caspase-3 活化,流式细胞术检测凋亡率较对照组升高^[10]。本实验结果显示早期凋亡率明显增高,DZNEP 抑制 Tb3.1 细胞 Bcl-2 表达,减少其与 BAX 结合,使 BAX 表达增多,促进促凋亡基因 Caspase-3 的活化,诱导凋亡的发生。另外,线粒体跨膜电位的破坏被广泛地认为细胞凋亡过程中最早发生的事件,实验中 DZNEP 可使线粒体跨膜电位破坏增多诱导细胞凋亡。在裸鼠荷瘤模型实验中,DZNEP 处理组促凋亡基因 BAX 及 CCASP-3 表达水平明显上调,而拮抗凋亡基因 Bcl-2 及促增殖基因 Ki-67 表达明显下调;Tunel 实验证明了 DZNEP 在体内仍可诱导肿瘤细胞凋亡。

尽管目前有许多促癌及抑癌基因可作为头颈部鳞癌发生发展的预测因子,然而还没有一种可作为病人诊断、治疗及预后等综合处理的理想因子。越来越多的实验研究证明异常高表达的 EZH2 可拮抗多种癌症的化疗作用^[16]。如上所述,通过 DZNEP 的作用,头颈部鳞癌细胞 Tb3.1 的增殖能力被抑制,同时凋亡能力明显增高。因此,我们认为以 EZH2 为靶点治疗头颈部鳞状细胞癌可能成为一种新的治疗方向,这还需要进一步地探讨及体内实验的研究为 DZNEP 的临床应用研究提供实验依据。

参考文献:

- [1] Ezhkova E, Pasolli H A, Parker J S, et al. Ezh2 orchestrates gene expression for the stepwise differentiation of tissue-specific stem cells[J]. *Cell*, 2009, 136(6): 1122
- [2] Vire E, Brenner C, Deplus R, et al. The polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation[J]. *Nature*, 2006, 439(7078): 871
- [3] Strojan P, Vermorken J B, Beitler J J, et al. Cumulative cisplatin dose in concurrent chemoradiotherapy for head and neck cancer: A systematic review[J]. *Head Neck*, 2015, [Epub ahead of print]
- [4] Safdari Y, Khalili M, Farajnia S A, et al. Recent advances in head and neck squamous cell carcinoma - A review[J]. *Clin Biochem*, 2014, 47(13/14): 1195
- [5] Burz C, Berindan-Neagoe I, Balacescu O, et al. Apoptosis in cancer: key molecular signaling pathways and therapy targets [J]. *Acta Oncol*, 2009, 48(6): 811
- [6] Nakagawa S, Sakamoto Y, Okabe H, et al. Epigenetic therapy with the histone methyltransferase EZH2 inhibitor 3-deazaneplanocin A inhibits the growth of cholangiocarcinoma cells[J]. *Oncol Rep*, 2014, 31(2): 983
- [7] Wang C, Liu X Q, Chen Z J, et al. Polycomb group protein EZH2-mediated E-cadherin repression promotes metastasis of oral tongue squamous cell carcinoma[J]. *Mol Carcinog*, 2013, 52(3): 229
- [8] Cao W, Feng Z, Cui Z B, et al. Up-regulation of enhancer of zeste homolog 2 is associated positively with cyclin D1 overexpression and poor clinical outcome in head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Cancer*, 2012, 118(11): 2858
- [9] Fiskus W, Rao R, Balusu R, et al. Superior efficacy of a combined epigenetic therapy against human mantle cell lymphoma cells [J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(22): 6227
- [10] Xie Z G, Bi C L, Cheong L L, et al. Determinants of sensitivity to DZNep induced apoptosis in multiple myeloma cells[J]. *PLoS One*, 2011, 6(6): e21583
- [11] 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
- [12] Fiskus W, Wang Y C, Sreekumar A, et al. Combined epigenetic therapy with the histone methyltransferase EZH2 inhibitor 3-deazaneplanocin A and the histone deacetylase inhibitor panobinostat against human AML cells[J]. *Blood*, 2009, 114(13): 2733
- [13] Cheng L L, Itahana Y, Lei Z D, et al. TP53 genomic status regulates sensitivity of gastric cancer cells to the histone methylation inhibitor 3-Deazaneplanocin A (DZNep)[J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(15): 4201
- [14] Fujiwara T, Saitoh H, Inoue A, et al. 3-Deazaneplanocin A (DZNep), an inhibitor of S-Adenosylmethionine-dependent methyltransferase, promotes erythroid differentiation[J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(12): 8121
- [15] Chiba T, Suzuki E, Negishi M, et al. 3-Deazaneplanocin A is a promising therapeutic agent for the eradication of tumor-initiating hepatocellular carcinoma cells[J]. *Int J Cancer*, 2012, 130(11): 2557
- [16] Zhang Y, Liu G P, Lin C W, 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