

• 药理与临床 •

雷公藤内酯醇对多发性骨髓瘤 U266 细胞组蛋白去甲基化酶的调节作用

文璐¹, 陈燕^{1*}, 曾令兰², 杨立靖¹, 易莎¹, 张纯^{1*}

1. 华中科技大学同济医学院附属协和医院 血液科, 湖北 武汉 430022

2. 华中科技大学同济医学院附属协和医院 中心实验室, 湖北 武汉 430022

摘要:目的 研究雷公藤内酯醇对多发性骨髓瘤 U266 细胞组蛋白去甲基化酶的影响, 探讨其表观遗传调控作用。方法 采用 MTT 法检测细胞增殖活性; Annexin V-FITC/PI 双标法流式细胞术检测细胞凋亡; RT-PCR 法检测 U266 细胞组蛋白赖氨酸去甲基化酶 1 (LSD1) mRNA、组蛋白去甲基化酶 (JMJD2B) mRNA 表达的变化; 激光共聚焦显微技术观察 LSD1 亚细胞定位情况及蛋白量的变化; Western blotting 法检测在雷公藤内酯醇干预下 LSD1 和 JMJD2B 蛋白表达的变化。结果 雷公藤内酯醇以剂量、时间相关方式抑制 U266 细胞增殖, 与细胞培养 24 h 的 IC_{50} 为 153.2 nmol/L; 以剂量相关方式诱导 U266 细胞凋亡, 雷公藤内酯醇 80 nmol/L 作用 U266 细胞 24 h 后, 细胞出现典型的凋亡形态学改变, 总凋亡率达 32.9%; 以剂量相关方式抑制 JMJD2B 蛋白的表达, 同时促进 LSD1 蛋白表达。结论 雷公藤内酯醇在抑制 U266 细胞增殖、诱导其凋亡的同时, 明显改变 LSD1、JMJD2B 的表达, 其诱导 U266 细胞凋亡和抗肿瘤效应可能与其调节 LSD1、JMJD2B 表达有关。

关键词: 雷公藤内酯醇; 多发性骨髓瘤 U266 细胞; 细胞凋亡; 细胞增殖; 组蛋白去甲基化酶; 表观遗传

中图分类号: R282.710.5; R979.19 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)10-1975-06

Regulation of triptolide on histone demethylase in multiple myeloma U266 cells

WEN Lu¹, CHEN Yan¹, ZENG Ling-lan², YANG Li-jing¹, YI Sha¹, ZHANG Chun¹

1. Department of Hematology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China

2. Department of Central Laboratory, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China

Abstract: Objective To elucidate the effects of triptolide on histone demethylase in multiple myeloma U266 cell and to investigate its epigenetic regulation. **Methods** The inhibition of triptolide on U266 cell proliferation was studied by MTT assay. Apoptosis was evaluated by Annexin-V-FITC/PI-labeled flow cytometry. The changes of mRNA expression of histone lysine demethylase 1 (LSD1) and histone demethylase JMJD2B in U266 cells were verified by RT-PCR. Furthermore, laser confocal fluorescence microscopy (LCFM) was used to observe the subcellular localization and content of protein of LSD1; Changes of protein expression in LSD1 and JMJD2B interfered by triptolide were studied by Western blotting analysis. **Results** Triptolide inhibited U266 cell proliferation in a dose- and time-dependent manner and its IC_{50} of 24 h was 153.2 nmol/L. The triptolide-treated cells exhibited a significant apoptotic morphology with the total apoptosis rate of 32.9% after exposed to triptolide (80 nmol/L) for 24 h. JMJD2B was significantly depressed at protein expression, but LSD1 was upregulated at protein expression, both of them in a dose-dependent manner. **Conclusion** Triptolide could inhibit U266 cell proliferation, induce the apoptosis, meanwhile, significantly alter the expression of LSD1 and JMJD2B. The apoptosis induction and the antitumor effects of triptolide is probably related to the regulation of LSD1 and JMJD2B expression.

Key words: triptolide; multiple myeloma U266 cell; apoptosis; cell proliferation; histone demethylase; epigenetics

雷公藤内酯醇 (雷公藤内酯, triptolide) 是从卫矛科植物雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook. f. 根中

分离到的二萜内酯化合物, 具有免疫抑制、抗炎以及抗肿瘤等广泛的药理活性, 其抗肿瘤作用已在多种肿

收稿日期: 2012-01-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30700882)

作者简介: 文璐, 女, 博士研究生。E-mail: wenlu1985@yahoo.cn

*通讯作者 陈燕 E-mail: yanchen981@yahoo.cn

张纯 E-mail: zhangchun23@yahoo.com.cn

瘤细胞(白血病、淋巴瘤、乳腺癌、膀胱癌、胆管癌、黑色素瘤、胃癌、结肠癌等)实验中得到证实,对抗肿瘤机制也进行了广泛探讨^[1-6],但有关雷公藤内酯醇抗多发性骨髓瘤(multiple myeloma)的研究鲜见报道^[7]。本实验通过观察雷公藤内酯醇对多发性骨髓瘤细胞株 U266 增殖、凋亡的影响及其对组蛋白赖氨酸去甲基化酶 1(LSD1)、组蛋白去甲基化酶(JMJD2B)的调控作用,探讨雷公藤内酯醇抗多发性骨髓瘤的作用及其机制,为其临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 药品与试剂

雷公藤内酯醇,美国 Sigma 公司,质量分数>95%,用二甲基亚砜(DMSO)稀释成 1 mmol/L,等量分装,-20℃保存,临用前用 RPMI 1640 培养基稀释至终浓度。MTT、DMSO、碘化丙啶(PI)、Hoechst 33258 荧光染液、RNaseA,均为美国 Sigma 公司产品;Annexin-V FITC/PI 试剂盒,南京凯基生物科技发展有限公司;RNA 抽提试剂 Trizol、RPMI 1640 培养基,美国 Gibco 公司;胎牛血清(FCS),杭州四季青生物工程材料有限公司;逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒,日本 Toyobo 公司;引物由上海生物工程技术服务有限公司合成。兔抗人单克隆抗体 LSD1 和 JMJD2B,美国 Cell Signaling 公司;FITC、TRITC 标记的山羊抗兔二抗 IgG,北京中杉试剂公司。氯仿、异戊醇、乙醇为国产分析纯。

1.2 仪器

Bio-Rad M450 酶标仪、BD 流式细胞仪,美国 CA 公司;FV500 激光共聚焦显微镜,日本 Olympus 公司;ChemiDocXRS 蛋白条带密度分析软件,美国 Bio-Rad 公司。

2 方法

2.1 细胞培养

U266 细胞(华中科技大学同济医学院免疫教研室提供)用含 10%灭活 FCS、100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素的 RPMI 1640 培养基,在 37℃、5% CO₂、饱和湿度条件下培养,每 1~2 天换液传代 1 次,倍增时间约 24 h,取细胞活性>98%的对数生长期细胞用于以下各项实验。

2.2 MTT 比色法检测细胞增殖

将处于对数生长期的 U266 细胞(2×10^5 /mL)接种于 96 孔板,每孔体积 200 μ L,经不同浓度(10、20、40、80、160 nmol/L)雷公藤内酯醇和 DMSO 处理 24、48、72 h 后,加入 5 mg/mL 的 MTT 20 μ L,

空白组加入培养液,37℃孵育 4~6 h,离心弃上清,每孔加入 150 μ L DMSO,振荡 10 min,使结晶充分溶解,Bio-Rad M450 酶标仪测定 492 nm 波长处的吸光度(A)值,实验重复 3 次,计算细胞增殖抑制率。

抑制率=1-实验组 A 值/对照组 A 值

2.3 Annexin-V FITC/PI 双标法流式细胞术检测细胞凋亡

收集经雷公藤内酯醇 40、80、160 nmol/L 处理 24 h 后的 U266 细胞及阴性对照组细胞(DMSO 处理),用 4℃预冷的磷酸盐缓冲液(PBS)洗 2 次,然后以 1×10^6 /mL 的密度重悬于 100 μ L 的 1×结合缓冲液中,加入 Annexin-V FITC 5 μ L 和 PI 10 μ L 染色,混匀,室温避光反应 15 min,再加入 1×结合缓冲液 300 μ L,于 1 h 内上机检测。

2.4 RT-PCR 法检测 LSD1 和 JMJD2B mRNA 表达

按试剂盒说明书合成 cDNA。按以下条件进行逆转录反应:30℃、10 min,42℃、20 min,99℃、5 min,4℃、5 min,-20℃保存。以细胞 cDNA 为模板,制备 25 μ L。LSD1 引物序列:上游引物 5'-CAGCCACCAGCCGTTTCAGT-3',下游引物 5'-CAGCACGCCAACGAGACAC-3',扩增产物为 364 bp;JMJD2B 引物序列:上游引物 5'-GGGCCTC-TTCACGCAGTACAA-3',下游引物 5'-CAGGGTG-GCGAAGTTGGTAGAT-3',扩增产物为 594 bp; β -actin 引物序列:上游引物 5'-TGAGACCTTCAAC-ACCCCAG-3',下游引物 5'-GCCATCTCTTGCTCG-AAGTC-3',扩增产物为 206 bp,进行 LSD1 和 JMJD2B 的 PCR 扩增。取产物 5 μ L,经琼脂糖凝胶电泳、紫外线照相、Bandscan 软件进行扫描分析,以目的基因与 β -actin 灰度的比值进行目的基因表达水平的半定量分析。

2.5 激光共聚焦显微镜观察 LSD1 蛋白的亚细胞定位

分别收集 DMSO 处理组、80 nmol/L 雷公藤内酯醇处理 24 h 后的 U266 细胞,4%多聚甲醛固定 15 min,用含 0.2% TritonX-100 的 PBS 置冰上破膜 10 min,含 3% FCS 蛋白封闭 30 min,加一抗 LSD1(1:100),4℃孵育过夜,PBS 洗 3 次,加 TRITC 标记的荧光二抗(1:200),37℃孵育 60 min,PBS 洗 3 次,Hoechst 33258 染液染细胞核 30 min,PBS 洗 3 次,甘油封片后激光共聚焦显微镜($\times 1000$)观测。

2.6 Western blotting 检测 LSD1 和 JMJD2B 蛋白表达

收集各处理组细胞,加入冷细胞裂解液 50 μ L

(使用前加入苯甲基磺酰氟和蛋白酶抑制剂)提取细胞总蛋白。按 Bio-Rad 试剂盒说明书定量蛋白后,电泳,以 300 mA 电流转膜 150 min,脱脂奶粉封闭,立即加入抗靶蛋白抗体溶液与滤膜共同孵育,洗涤后再将滤膜与二抗——辣根过氧化物酶标记的抗免疫球蛋白抗体温育。洗涤后,曝光,扫描 X 光片,输入计算机,采用 Student-Newman-Kuels(SNK)方法进行分析。

2.7 统计学方法

应用软件 SPSS 17.0 进行统计学分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析 ANOVA 检验。

3 结果

3.1 对 U266 细胞增殖的影响

分别以雷公藤内酯醇 10、20、40、80、160 nmol/L 作用 U266 细胞 24、28、72 h 后,各浓度组细胞增殖活性明显低于 RPMI 1640 组和 DMSO 组,差异显著;而 RPMI 1640 组与 DMSO 组相比,无统计学意义。随着药物作用时间的延长和浓度的逐渐增加,雷公藤内酯醇对 U266 细胞增殖的抑制作用逐渐增强,作用 24、48、72 h 的 IC_{50} 值分别为 153.2、101.9、48.7 nmol/L。结果见图 1。

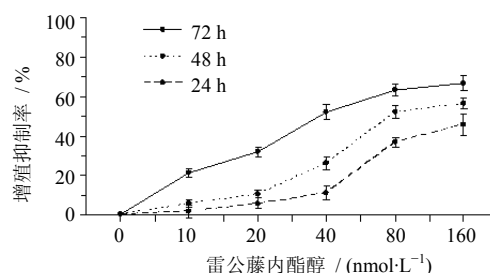


图 1 雷公藤内酯醇对 U266 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Effects of triptolide on U266 cell proliferation ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.2 对 U266 细胞凋亡的影响

随着雷公藤内酯醇作用浓度的增加, U266 细胞凋亡数目也增多,雷公藤内酯醇 40 nmol/L 作用 24 h, U266 细胞早、晚期的凋亡率分别为 $(19.4 \pm 1.3)\%$ 、 $(6.0 \pm 0.5)\%$;雷公藤内酯醇 80 nmol/L 时细胞早、晚期凋亡率分别为 $(22.3 \pm 4.7)\%$ 、 $(10.6 \pm 1.7)\%$;而雷公藤内酯醇浓度达 160 nmol/L 时,细胞早期凋亡率高达 $(26.2 \pm 3.9)\%$,晚期凋亡率升至 $(13.5 \pm 1.2)\%$;与对照组细胞早期凋亡率 $(0.9 \pm 0.1)\%$ 、晚期凋亡率 $(1.2 \pm 0.3)\%$ 相比差异显著 ($P < 0.05$)。结果见图 2。

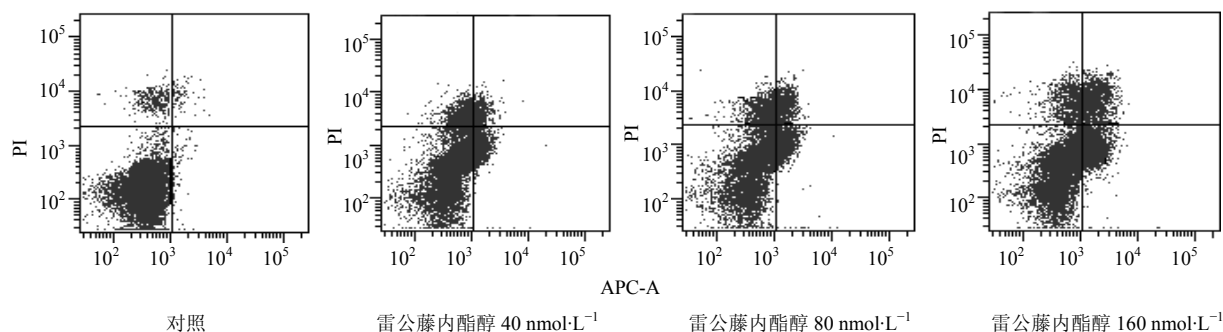


图 2 雷公藤内酯醇作用 24 h 对 U266 细胞凋亡的影响

Fig. 2 Effects of triptolide on apoptosis of U266 cell after treatment for 24 h

3.3 对 U266 细胞 LSD1 和 JMJD2B mRNA 表达的影响

U266 细胞经不同浓度的雷公藤内酯醇作用 24 h 后, LSD1 mRNA 表达无明显变化 ($P > 0.05$) (图 3-A)。雷公藤内酯醇 40 nmol/L 明显抑制 JMJD2B mRNA 表达 ($P < 0.05$),且随药物浓度的升高作用增强,160 nmol/L 时,作用最为明显,任两个浓度梯度间 JMJD2B mRNA 变化均有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 3-B)。

3.4 对 LSD1 在细胞分布的影响

激光共聚焦显微镜观察可见, LSD1 集中分布

在 U266 细胞核中,有明显荧光。经雷公藤内酯醇 80 nmol/L 作用 24 h 后, LSD1 在细胞中的分布仍主要集中在细胞核,但其荧光强度增强,少数细胞核中 LSD1 蛋白发生核外释放现象 (图 4 中白色箭头所指)。结果见图 4。

3.5 对 U266 细胞 LSD1 和 JMJD2B 蛋白表达的影响

U266 细胞经雷公藤内酯醇 80 nmol/L 作用 24 h 后,明显促进 LSD1 的蛋白表达,与对照组比较差异显著 ($P < 0.05$);且能明显抑制 JMJD2B 蛋白的表达,与对照组比较差异显著 ($P < 0.05$)。结果见图 5。

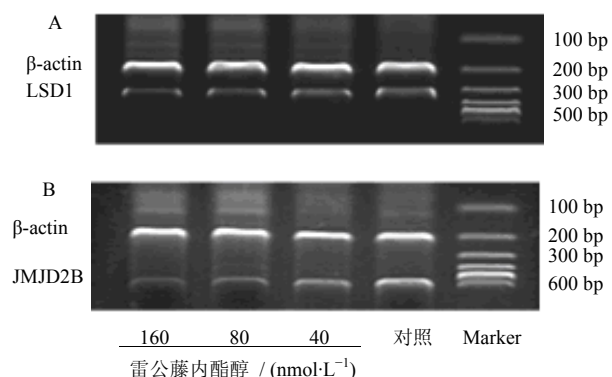


图 3 雷公藤内酯醇作用 24 h 对 U266 细胞 LSD1 (A) 和 JMJD2B (B) mRNA 表达的影响

Fig. 3 Effects of triptolide on mRNA expression of LSD1 (A) and JMJD2B (B) of U266 cell after treatment for 24 h

4 讨论

本实验观察了雷公藤内酯醇对多发性骨髓瘤 U266 细胞生长的抑制作用和诱导细胞凋亡作用。结果显示,雷公藤内酯醇能明显抑制 U266 细胞增殖,且与作用时间和浓度呈正相关。此外雷公藤内酯醇对 U266 细胞具有较强的凋亡诱导作用,尤其诱导 U266 细胞早期凋亡作用更强,在较低浓度 (40 nmol/L) 即能明显诱导 U266 细胞凋亡,细胞总凋亡率为 25.4%;浓度达 160 nmol/L 时, U266 细胞出现染色质浓缩、边缘化、分割成块状、核膜裂解、凋亡小体等凋亡形态的改变,作用最强。有研究表明,雷公藤内酯醇诱导细胞凋亡的作用与其活化半胱天冬蛋白酶、激活丝裂原激活蛋白激酶信号通路、抑制核因子 NF- κ B 反式激活作用、诱导 bcl-2 降解、活化 bax 和 p53 基因等表达有关,死亡受体途径和

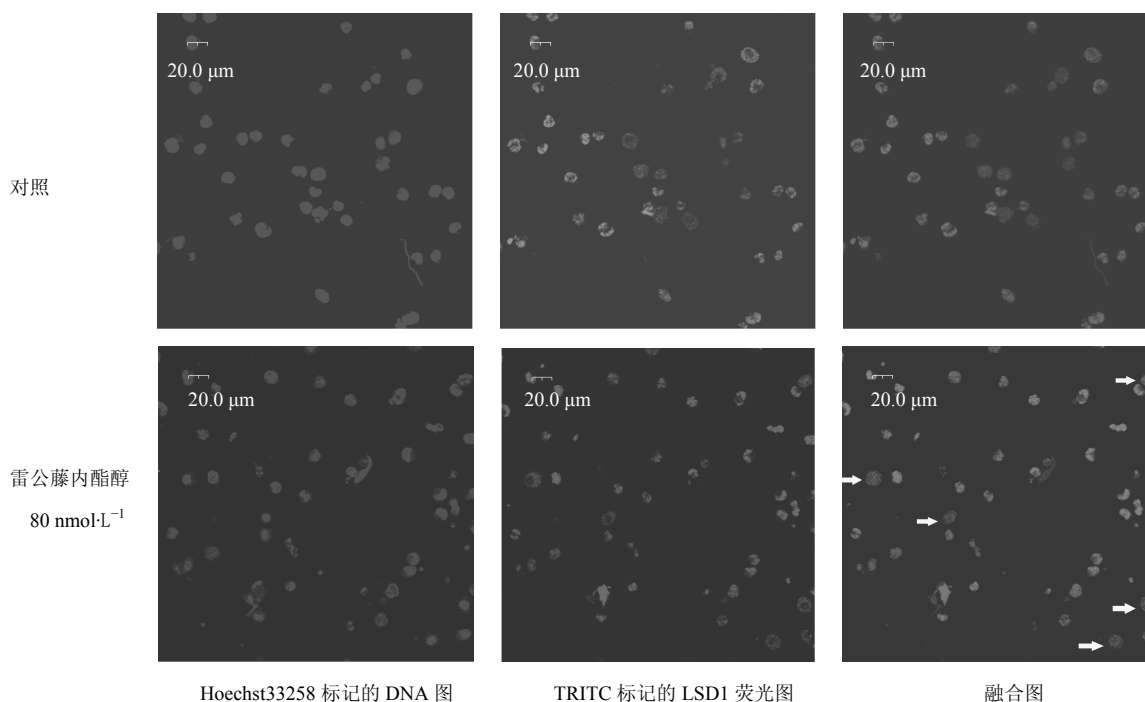


图 4 雷公藤内酯醇作用 24 h LSD1 蛋白在 U266 细胞中的分布

Fig. 4 Effect of triptolide on distribution of LSD1 protein in U266 cell after treatment for 24 h

线粒体途径也起到了重要作用^[8-12]。

组蛋白去甲基化酶(histone demethylase, HDM)是表观遗传学的重要内容,而表观遗传学在肿瘤发生、发展中作用堪比传统遗传学,表观遗传修饰的异常是所有人类肿瘤的共同特点。组蛋白甲基化模式是发挥表观遗传作用的重要方式之一^[13],机体通过组蛋白甲基化酶(histone methyltransferase, HMT)和 HDM 的共同作用动态调节组蛋白甲基化模式^[14],

调控细胞的增殖与分化,维持机体的稳定,在细胞周期、凋亡等生命过程中发挥重要作用^[15],其失衡则导致肿瘤的发生^[16]。本实验发现,雷公藤内酯醇明显抑制 HDM 的表达,这有可能是雷公藤发挥抗肿瘤活性的重要靶点。

LSD1 是发现的第一个 HDM,它的表达与肿瘤密切相关。到目前为止,已在多种肿瘤细胞系和原发的肿瘤(如前列腺癌、肾癌、乳腺癌、神经母细

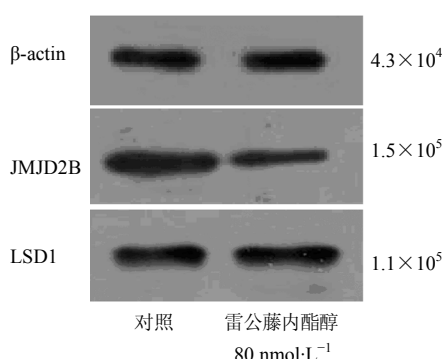


图 5 雷公藤内酯醇作用 24 h 对 U266 细胞 LSD1 和 JMJD2B 蛋白表达的影响

Fig. 5 Effects of triptolide on protein expression of LSD1 and JMJD2B in U266 cell after treatment for 24 h

胞瘤等) 组织中检测到 LSD1 表达异常^[17-18]。LSD1 可抑制癌基因 IκB 的蛋白活性, 同时在 E3 连接酶与 NF-κB 之间建立功能性连接^[19]; 还可使甲基化的 p53 基因发生去甲基化, 诱导 p53 信号途径的传递, 从而促进细胞凋亡, 抑制肿瘤发生^[20]。在 p53 缺失的肿瘤细胞中, LSD1 诱导 E2F1 第 185 位赖氨酸去甲基化, 稳定 E2F1 活性的同时, 促使其在 DNA 损伤部位聚集, 从而发生细胞凋亡^[21]。本实验结果显示, 在 U266 细胞中, LSD1 也呈相对低表达, 经不同浓度的雷公藤内酯醇处理后, 蛋白表达水平明显增加。U266 细胞中 LSD1 蛋白主要定位于细胞核, 经雷公藤内酯醇干预后, LSD1 的荧光强度明显增强, 部分细胞的 LSD1 蛋白弥散分布于胞浆内, 可能是由于核崩解所致。由此推测雷公藤内酯醇可通过直接调控 LSD1 的表达, 影响 LSD1 的下游作用靶点, 发挥其诱导细胞凋亡和抗肿瘤作用。LSD1 是组蛋白 H3K4 的单甲基化 (H3K4Me) 和双甲基化 (H3K4Me₂) 的特异性去甲基化酶, H3K4 在诸多肿瘤细胞中高表达, 尤其聚集表达于癌基因的启动子区域, 诱导癌基因转录激活, 肿瘤发生。根据本实验结果, 推测雷公藤内酯醇诱导 LSD1 的表达增高导致了 H3K4 去甲基化, 使得肿瘤细胞中癌基因启动子区域甲基化缺失, 基因转录激活抑制, 肿瘤细胞存活受到打击。因此 LSD1 很可能是雷公藤内酯醇抗多发性骨髓瘤的重要靶点之一。

JMJD 家族是继 LSD1 后发现的另一类重要的 HDM, 以包含 JMJC 域为共同点, 通过重塑染色质结构和调控基因表达在胚胎起源和肿瘤发生中起重要作用^[22], 是新一类缺氧诱导表达基因 (仅

JMJD1A、JMJD2B、JMJD2C 与缺氧有关), 可促进肿瘤细胞在低血流灌注、低氧环境中的存活^[23]。JMJD2B 高表达与肿瘤的发生密切相关。研究表明, 缺氧时, 肿瘤细胞同时调控 HTM 和 HDM 表达量和活性, 改变整体水平 H3K9 的甲基化模式, 以适应缺氧的环境。JMJD2B 是特异性的 H3K9 的去甲基化酶, 肿瘤细胞中 H3K9 甲基化模式可直接影响细胞的生存状态。本实验结果显示, 在 U266 细胞中, JMJD2B 也呈高表达, 经不同浓度的雷公藤内酯醇处理后, 其表达水平逐渐减弱, 当雷公藤内酯醇浓度达 160 nmol/L 时, JMJD2B 基因表达水平降至最低。推断雷公藤内酯醇通过 JMJD2B 间接调控 H3K9 的甲基化模式和 JMJD2B 的下游肿瘤相关基因, 提示 JMJD2B 很可能是雷公藤内酯醇抗多发性骨髓瘤的另外一个重要靶点。

综上所述, 雷公藤内酯醇对多发性骨髓瘤具有显著的抑制细胞增殖、诱导细胞凋亡的作用, 该作用可能与其调控组蛋白去甲基化酶 LSD1、JMJD2B 的表达, 调控组蛋白甲基化修饰密切相关。雷公藤内酯醇有望作为新型的治疗多发性骨髓瘤的候选药物。

参考文献

- [1] Carter B Z, Mak D H, Schober W D, *et al.* Triptolide induces caspase-dependent cell death mediated via the mitochondrial pathway in leukemic cells [J]. *Blood*, 2006, 108(2): 630-637.
- [2] Kiviharju T M, Lecane P S, Sellers R G, *et al.* Antiproliferative and proapoptotic activities of triptolide (PG490), a natural product entering clinical trials, on primary cultures of human prostatic epithelial cells [J]. *Clin Cancer Res*, 2002, 8(8): 2666-2674.
- [3] Pigneux A, Mahon F X, Uhalde M, *et al.* Triptolide cooperates with chemotherapy to induce apoptosis in acute myeloid leukemia cells [J]. *Exp Hematol*, 2008, 36(12): 1648-1659.
- [4] Yang S M, Chen J G, Guo Z, *et al.* Triptolide inhibits the growth and metastasis of solid tumors [J]. *Mol Cancer Ther*, 2003, 2(1): 65-72.
- [5] Zhang C, Cui G H, Liu F, *et al.* Inhibitory effect of triptolide on lymph node metastasis in patients with non-Hodgkin lymphoma by regulating SDF-1/CXCR4 axis *in vitro* [J]. *Acta Pharm Sin*, 2006, 27(11): 1438-1446.
- [6] Zhang C, Cui G H, Liu F, *et al.* Effects of triptolide on cell proliferation and CXCR4 expression in Burkitt's

- lymphoma Raji cells *in vitro* [J]. *Chin J Cancer Res*, 2007, 19(1): 27-31.
- [7] 刘媛, 陈燕, 赵菲, 等. 雷公藤内酯醇对多发性骨髓瘤 RPMI 8226 细胞周期及 P21^{wap1/cip1} 和 P27^{kip1} 表达的影响 [J]. *中草药*, 2010, 41(11): 1819-1823.
- [8] Choi Y J, Kim T G, Kim Y H, *et al.* Immunosuppressant PG490 (triptolide) induces apoptosis through the activation of caspase 3 and downregulation of XIAP in U937 cells [J]. *Biochem Pharmacol*, 2003, 66(2): 273-280.
- [9] Liu H, Liu Z H, Chen Z H, *et al.* Triptolide: A potent inhibitor of NF-kappa B in T-lymphocytes [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2000, 21(9): 782-786.
- [10] Jiang X H, Wong B C, Lin M C, *et al.* Functional p53 is required for triptolide-induced apoptosis and AP1 and nuclear factor-kappaB activation in gastric cancer cells [J]. *Oncogene*, 2001, 20(55): 8009-8018.
- [11] Kiviharju T M, Lecane P S, Sellers R G, *et al.* Antiproliferative and proapoptotic activities of triptolide (PG490), a natural product entering clinical trials, on primary cultures of human prostatic epithelial cells [J]. *Clin Cancer Res*, 2002, 8(8): 2666-2674.
- [12] Yin J L, Jie J, Yun G W. Triptolide inhibits transcription factor NF-kappaB and induces apoptosis of multiple myeloma cells [J]. *Leuk Res*, 2005, 29(1): 99-105.
- [13] Strahl B D, Allis C D. The language of covalent histone-modification [J]. *Nature*, 2000, 403(6765): 41-45.
- [14] Shi Y J, Lan F, Matson C, *et al.* Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1 [J]. *Cell*, 2004, 119(7): 941-953.
- [15] Tollefsbol T O. 表观遗传学实验手册 [M]. 吴超群, 译. 上海: 上海科学技术出版社, 2007.
- [16] Whetstine J R, Nottke A, Lan F, *et al.* Reversal of histone lysine trimethylation by the JMJD2 family of histone demethylases [J]. *Cell*, 2006, 125(3): 467-481.
- [17] Metzger E, Wissmann M, Yin N, *et al.* LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription [J]. *Nature*, 2005, 437(7057): 436-439.
- [18] Schulte J H, Lim S, Schramm A, *et al.* Lysine-specific demethylase 1 is strongly expressed in poorly differentiated neuroblastoma: Implications for therapy [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(5): 2065-2071.
- [19] Keutgens A, Shostak K, Close P, *et al.* The repressing function of the oncoprotein BCL-3 requires CtBP, while its polyubiquitination and degradation involve the E3 ligase TBLR1 [J]. *Mol Cell Biol*, 2010, 30(16): 4006-4021.
- [20] Scoumanne A, Chen X. Protein methylation: A new mechanism of p53 tumor suppressor regulation [J]. *Histol Histopathol*, 2008, 23(9): 1143-1149.
- [21] Haroula K, Lannis T. Lysine methylation regulates E2F1-induced cell death [J]. *Mol Cell*, 2010, 39: 152-160.
- [22] Li Q, Ke Q, Costa M. Alterations of histone modification by cobalt compounds [J]. *Carcinogenesis*, 2009, 30(7): 1243-1251.
- [23] Pollard P J, Loenarz C, Mole D R, *et al.* Regulation of Jumonji-domain-containing histone demethylases by hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α [J]. *Biochem J*, 2008, 416(3): 387-394.