

人参皂苷 Rd 对组蛋白 H3 乙酰化的调控机制研究

张佳舒, 孟 雪, 赵书涵, 邱智东, 刘 达*

长春中医药大学药学院, 吉林 长春 130117

摘要:目的 基于定量蛋白组学分析和分子生物学实验验证, 阐明人参皂苷 Rd 调控组蛋白 H3 乙酰化水平的作用机制。方法 利用氨基酸稳定同位素标记(SILAC)技术和液相色谱-质谱联用技术(LC-MS/MS)检测人参皂苷 Rd 作用下人胚肾 HEK293T 细胞蛋白质组的动态变化; 通过对定量蛋白组学数据库分析监测组蛋白乙酰转移酶(HATs)和组蛋白去乙酰转移酶(HDACs)表达水平的变化, 并通过 Western blotting 和实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)实验验证相关蛋白质表达和转录水平的变化; 利用 siRNA 进行基因敲除实验以明确人参皂苷 Rd 对组蛋白 H3K9 和 H3K18 位点乙酰基修饰水平的调控作用。结果 人参皂苷 Rd 处理 HEK293T 细胞后, 组蛋白 H3K9ac、H3K18ac 表达水平降低, 但催化修饰这 2 个位点的 P300 没有明显变化; 同时人参皂苷 Rd 可上调 HDAC2 的转录和表达水平, siHDAC2 处理 HEK293T 细胞后, 逆转了人参皂苷 Rd 对 H3K9ac、H3K18ac 的下调作用。结论 人参皂苷 Rd 通过上调 HDAC2, 下调组蛋白 H3K9 和 H3K18 位赖氨酸位点的乙酰化水平, 从而影响下游基因的转录激活。

关键词: 人参皂苷 Rd; 组蛋白乙酰化; 组蛋白去乙酰转移酶 2; H3K9ac; H3K18ac

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)12-2931-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.12.030

Regulatory mechanism of ginsenoside Rd on histone H3 acetylation

ZHANG Jia-shu, MENG Xue, ZHAO Shu-han, QIU Zhi-dong, LIU Da

School of Pharmaceutical Science, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China

Abstract: **Objective** Based on quantitative proteomics analysis and molecular biology experimental verification, the regulatory mechanism of ginsenoside Rd on histone H3 acetylation levels was elucidated. **Methods** The effects of ginsenoside Rd on the dynamic changes of proteome of HEK293T cells were detected by stable isotope labeling with amino acid (SILAC) technique and LC-MS/MS; Quantitative proteomics database analysis was used to monitor the changes in histone acetyltransferase HATs and histone deacetylase HDACs expression levels. Western blotting and qRT-PCR were used to verify the changes of related protein expression and transcriptional level. Gene knockdown experiments were performed using siRNAs to determine the role of ginsenoside Rd in regulating the level of acetyl modifications at histone H3K9 and K18 sites. **Results** The histone H3K9ac, H3K18ac expression levels in HEK293T cells decreased after ginsenoside Rd treatment, but the P300 catalytic modification of these two sites did not change significantly; At the same time, ginsenoside Rd up-regulated the transcription and expression of HDAC2, and siHDAC2 treatment reversed the down-regulation effects of ginsenoside Rd on H3K9ac and H3K18ac in HEK293T cells. **Conclusion** Ginsenoside Rd down-regulates the acetylation level of lysine at histone H3K9 and K18 sites by up-regulating HDAC2, thereby affecting transcriptional activation of downstream genes.

Key words: ginsenoside Rd; histone acetylation; HDAC2; H3K9ac; H3K18ac

人参 *Panax ginseng* C. A. Meyer 具有悠久的药用历史^[1]。人参皂苷 Rd 是人参皂苷中主要的活性单体成分, 属于原人参二醇型皂苷, 主要表现为神经和心脏保护作用^[2-4]。已有文献报道^[5-8], 人参皂苷

Rd 能抗胃癌、乳腺癌、结肠癌、卵巢癌等癌症, 通过抑制肿瘤细胞的增殖和转移、诱导细胞凋亡、阻滞细胞周期从而控制肿瘤的快速生长。

组蛋白翻译后修饰是调控染色质结构的重要表

收稿日期: 2018-05-20

基金项目: 吉林省重大科技攻关项目(20160201001YY); 吉林省科技厅重点科技成果转化项目(20170307031YY); 吉林省科技厅优秀青年人才基金项目(20180520050JH)

作者简介: 张佳舒(1994—), 女, 在读硕士, 研究方向为中药药剂。Tel: 15258676213 E-mail: zjscczyy@163.com

*通信作者 刘 达 E-mail: liuda_1986@163.com

观遗传调控方式之一,主要发生在裸露于核小体外的组蛋白N端尾巴上^[9]。目前已鉴定和研究出乙酰化、甲基化、磷酸化等多种组蛋白翻译后修饰方式。组蛋白的乙酰化修饰是可逆的,其动态平衡由组蛋白乙酰基转移酶(histone acetyltransferases, HATs)和组蛋白去乙酰基转移酶(histone deacetylases, HDACs)共同调控。HATs将乙酰辅酶A的乙酰基转移至底物的赖氨酸残基上,起到“书写”的作用^[10]。相反,HDACs催化乙酰化反应中赖氨酸残基上乙酰基的去除,释放乙酸酯分子,扮演着“擦除”的作用。此外HATs和HDACs还能修饰大量非组蛋白,如转录因子、分子伴侣蛋白、信号转导介质、结构蛋白等^[11]。本实验以组蛋白H3乙酰基修饰水平为指标,以HATs和HDACs为检测对象,利用氨基酸稳定同位素标记(SILAC)定量蛋白质组学检测人参皂苷Rd处理人胚肾HEK293T细胞后HATs和HDACs的动态变化,从而揭示人参皂苷Rd对HEK293T细胞中组蛋白H3乙酰化调控的分子机制。

1 材料与方法

1.1 细胞

HEK293T细胞(ATCC®CRL-3216™)由吉林大学生命科学院惠赠,用含10%胎牛血清(FBS)的DMEM培养基培养。

1.2 试剂

人参皂苷Rd(批号MUST-17010503,质量分数≥98%)购自成都曼思特生物科技有限公司;DMEM、Opti-MEM培养基(Gibco公司);FBS、小牛血清(Hyclone公司);PrimeScript逆转录试剂盒(Takara公司);聚醚酰亚胺(PEI, Polysciences公司);二甲基亚砜(DMSO, Sigma公司);Lipofectamine RNAiMAX(Invitrogen公司);non-targeting siRNA(siNT, Dharmacon公司);HDAC2 siRNA(siHDAC2, Abbexa公司);P300、HDAC1、HDAC2、HDAC5、HDAC6、HDAC8、GAPDH抗体(Sigma公司);H3K9ac、H3K18ac抗体(PTM公司)。ECL试剂盒(Thermo Fisher Scientific公司);其他试剂为常规化学试剂。

1.3 仪器

MCO-20AIC CO₂细胞培养箱(Sanyo公司);Synergy H4 Hybrid酶标仪(BioTek公司);ZHJH-C1214B超净工作台(上海智城公司);AE21倒置显微镜(Motic公司);BX40F Microscope荧光显微镜(Olympus公司);微量移液器(Gilson公司);

蛋白纯化系统AKTApurifier(GE Healthcare公司);DW-HL668-80℃冰箱(中科美菱低温科技有限责任公司);5145R台式离心机(Eppendorf公司)。iBright FL 1000智能成像系统(Thermo Fisher Scientific公司)。

2 方法

2.1 MTT细胞毒性实验

取HEK293T细胞,以每孔 2×10^4 个接种于96孔板中,每组4个复孔,每孔加入2 mL含10% FBS的DMEM完全培养基。设对照组、溶剂对照组(PBS缓冲液)及药物组。药物组人参皂苷Rd质量浓度分别为50、100、150、200、250、300、350 μg/mL。孵育24 h,每孔加入0.5%的MTT溶液20 μL,终止培养并移除培养基。每孔加DMSO溶液150 μL,低速震荡10 min,使用酶标仪测量570 nm处的吸光度(A)值。按照公式计算细胞活力。

$$\text{细胞活力} = (A_{\text{给药}} - A_{\text{对照}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{溶剂}})$$

2.2 液相色谱-质谱联用技术(LC-MS/MS)检测人参皂苷Rd对HEK293T细胞蛋白质组的影响

2.2.1 SILAC标记 根据SILAC Protein Quantitation Kit说明书标记HEK293T细胞,分别使用含“重型”的[13C6]-L-lysine/[13C615N4]-L-Arginine和“轻型”的[12C6]-L-lysine/[12C614N4]的DMEM培养基培养HEK293T细胞7代以上,使其标记率达到97%以上。细胞在15 cm的培养瓶中扩增到定量蛋白质组检测所需的细胞数(5×10^8)。“轻型”标记的HEK293T细胞使用200 μg/mL的人参皂苷Rd处理,而“重型”标记的HEK293T细胞使用等体积含等量聚山梨酯-80的PBS处理。细胞在SILAC培养基中继续孵育48 h, PBS清洗2次并收集细胞,液氮速冻储存在-80℃冰箱备用。

2.2.2 蛋白提取 “轻型”和“重型”标记的HEK293T细胞使用2×NETN buffer(200 mmol/L NaCl, 100 mmol/L Tris-Cl, 2 mmol/L EDTA, 1.0% NP-40, pH 7.2)裂解,分别加入0.5%的Triton X-100冰浴30 min, 4℃、15 000 r/min离心10 min。收集上清液,测量浓度后,等量混合“轻型”和“重型”标记细胞的上清液,用5倍体积15%的三氯乙酸(TCA)于-20℃沉淀2 h,并用-20℃的丙酮清洗沉淀2次,除去丙酮,100 mmol/L的NH₄HCO₃(pH 8.0)溶解,胰酶酶解。将剩余的沉淀用8 mol/L的尿素溶解,以便提取染色质结合蛋白,测量浓度后,等量混合“轻型”和“重型”标记的染色质结

合蛋白,用5倍体积15%的TCA于-20℃沉淀2h,-20℃的丙酮清洗沉淀2次,除去丙酮,用100 mmol/L的 NH_4HCO_3 (pH 8.0)溶解,胰酶酶解。

2.2.3 LC-MS/MS 测定 将酶解后的肽段溶解在0.1%甲酸水中,载入反相预柱(Acclaim PepMap 100, Thermo Scientific 公司),通过反相分析柱(Acclaim PepMap RSLC, Thermo Scientific)洗脱。使用EASY-nLC 1000超高效液相系统,流动相A为0.1%甲酸水-2%乙腈;流动相B为0.1%甲酸水-98%乙腈。梯度洗脱程序:0~24 min, 7%~20% B; 24~32 min, 20%~35% B; 32~37 min, 35%~80% B; 37~40 min, 80% B。体积流量300 nL/min。分离所得的肽段通过Thermo Scientific™ Q Exactive™ Plus进行检测和分析。肽段由超高效液相分离系统被注入到纳升电喷雾源中进行串联质谱分析。电喷雾电压为2.0 kV,完整肽段及其二级碎片通过高分辨分析器Orbitrap进行检测。一级质谱扫描范围设置350~1 800,二级质谱扫描范围起点固定为 m/z 100。肽段检测的分辨率设置为70 000,二级碎片的分辨率设置为17 500。数据依赖型扫描(DDA)程序设置为每个一级扫描跟着20个二级扫描。为了最优化二级质谱的质量,母离子必须能累积超过 5×10^3 的强度才能进行二级分析,同时应用阈值为 5×10^4 的自动增益控制以防止分析器中电荷过载。碎裂能量设置为30,动态排除依据色谱分离情况设置为15 s以降低肽段的重复鉴定次数。

2.3 Western blotting 及实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)法检测人参皂苷 Rd 对 HDACs 和 HATs 转录和表达的影响

2.3.1 细胞培养及分组 以6孔板培养HEK293T细胞,每孔接种 3×10^5 个,分为对照组和人参皂苷Rd(0、10、50、100 $\mu\text{g/mL}$)组,每组设3个复孔。待细胞贴壁生长至30%~40%各给药组加入含相应质量浓度人参皂苷Rd处理48 h,收集细胞用于Western blotting和qRT-PCR检测。

2.3.2 Western blotting 检测相关蛋白表达 药物处理后的细胞经PBS洗涤后,RIPA裂解液处理,3 000 r/min离心10 min,吸取上清液进行检测。BCA法进行蛋白定量,确定蛋白上样量为40 μg 。蛋白样品采用10% SDS聚丙烯酰胺分离后转移至PVDF膜上,5%脱脂奶粉的TBS-T溶液封闭1.5 h。加入HDAC1、HDAC2、HDAC6、HDAC8、P300、H3k9ac、H3K18ac和GAPDH一抗(1:5 000),4℃孵育过

夜,TBS-T洗涤3次,每次20 min。加入HRP标记的二抗(1:5 000),37℃孵育2 h,TBS-T洗涤3次。使用ECL发光试剂盒显色,全自动凝胶成像系统进行分析,并用Image J软件进行吸光度分析。

2.3.3 qRT-PCR 法检测相关基因表达 参照Invitrogen Trizol说明书和PrimeScript Reverse Transcriptase试剂盒说明书分别对HEK293T细胞总RNA进行提取和转录,每个样品取1 μg 总RNA,作为反转录cDNA的模板,使用Prime Script Reverse Transcriptase试剂盒反转录,对HDAC1、HDAC2、HDAC4、HDAC5、HDAC6、HDAC8和GAPDH的mRNA进行qRT-PCR检测。PCR反应程序:95℃预变性3 min;95℃变性5 s,退火加延伸60℃、30 s,40个循环;72℃终延伸10 min。GAPDH作为内参, $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行数据分析。

2.4 HDAC2 基因敲除实验

以6孔板培养HEK293T细胞,每孔接种 3×10^5 个,转染时细胞密度达到30%~40%。接种前将20 nmol/L的siHDAC2或siNT加入到250 μL 的Opti-MEM培养基中,轻柔混匀;同时将4 μL 的Lipofectamine RNAiMAX加入到250 μL Opti-MEM培养基中,轻柔混匀,室温孵育5 min。将混合液滴加至6孔板,混匀,置于CO₂培养箱37℃培养3~4 h,添加10% FBS,在转染了siNT和siHDAC2的细胞中分别加入含不同质量浓度(0、10、50、100 $\mu\text{g/mL}$)人参皂苷Rd的培养基,每个质量浓度设3个复孔。48 h后收取细胞用于Western blotting检测。

2.5 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用Quantity One分析软件分析。计量资料采用 t 检验。

3 结果

3.1 人参皂苷 Rd 对 HEK293T 细胞活力的影响

MTT实验结果(图1)显示,当人参皂苷Rd的质量浓度小于200 $\mu\text{g/mL}$ 时,其对HEK293T细胞的细胞活力基本没有影响;当质量浓度高于250 $\mu\text{g/mL}$ 时,具有明显的细胞毒性,半数抑制浓度(IC₅₀)为300 $\mu\text{g/mL}$;超过350 $\mu\text{g/mL}$ 时HEK293T细胞大量死亡。另外,在显微镜下监测人参皂苷Rd作用下HEK293T细胞的生长状况并进行计数,当人参皂苷Rd的质量浓度小于200 $\mu\text{g/mL}$ 时,对细胞生长基本无影响,甚至有一定的促进作用,处理后的细胞存活数量明显增多(图2)。因此选取0~200 $\mu\text{g/mL}$ 为人参皂苷Rd处理HEK293T细胞的最适质量浓度区间。

3.2 人参皂苷 Rd 对 HEK293T 细胞蛋白质组的影响

使用 SILAC 标记技术和 LC-MS/MS 检测人参皂苷 Rd 作用 48 h 后 HEK293T 细胞蛋白质组的动态变化,对 HDACs 和 HATs 表达水平的变化进行总结,结果如表 1 所示,HDAC1、HDAC2、HDAC5、HDAC6、HDAC8 表达水平升高,其中 HDAC2 变化幅度较大,P300 变化不明显。

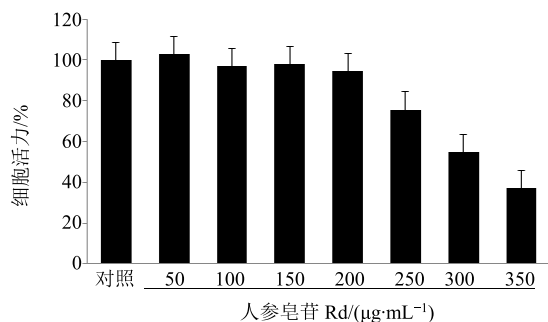


图 1 人参皂苷 Rd 对 HEK293T 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

Fig. 1 Effects of ginsenoside Rd on viability of HEK293T cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

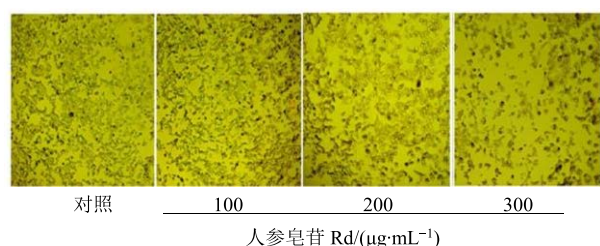


图 2 人参皂苷 Rd 对 HEK293T 细胞生长的影响

Fig. 2 Effect of ginsenoside Rd on proliferation of HEK293T cells

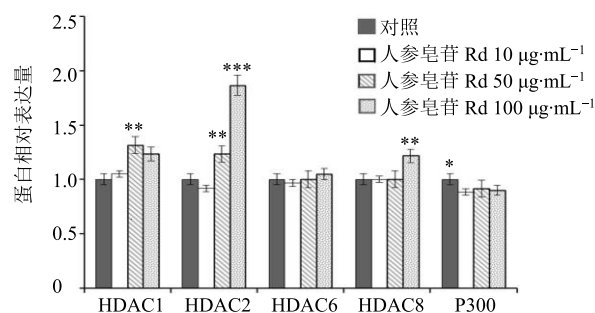
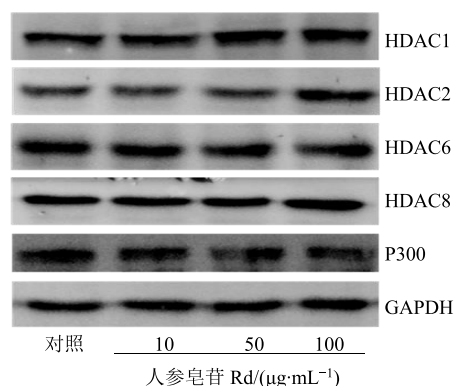
表 1 人参皂苷 Rd 对 HEK293T 细胞蛋白质组动态变化的影响
Table 1 Effects of ginsenoside Rd on dynamic changes of proteome of HEK293T cells

基因	蛋白	轻重链比
HDAC1	histone deacetylase 1	1.100
HDAC2	histone deacetylase 2	1.290
HDAC5	histone deacetylase 5	1.160
HDAC6	histone deacetylase 6	1.080
HDAC8	histone deacetylase 8	1.095
P300	histone acetyltransferase p300	1.087

3.3 人参皂苷 Rd 对 HDACs 和 HATs 转录和表达的影响

基于人参皂苷 Rd 作用于 HEK293T 细胞的定量蛋白质组学数据库,筛选出蛋白质表达量发生变化的 HDACs,并进一步通过分子生物学实验进行验证。

如图 3 所示,使用不同质量浓度(0、10、50、100 μg/mL)的人参皂苷 Rd 处理 HEK293T 细胞 48 h,Western blotting 检测结果表明,与对照组比较,人参皂苷 Rd 50、100 μg/mL 组细胞 HDAC2 蛋白表达水平显著上升 ($P < 0.01$ 、 0.001)。qRT-PCR 实验结果显示,人参皂苷 Rd 50、100 μg/mL 组细胞 HDAC2 mRNA 水平也显著上升 ($P < 0.01$ 、 0.001 ,图 4),说明人参



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$, 下同
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group, same as below

图 3 人参皂苷 Rd 对 HEK293T 细胞 HDACs 和 P300 蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 3 Effects of ginsenoside Rd on protein expression of HDACs and P300 in HEK293T cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

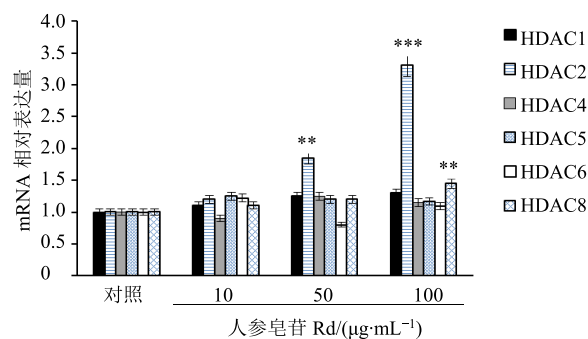


图 4 人参皂苷 Rd 对 HEK293T 细胞 HDACs mRNA 变化的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 4 Effects of ginsenoside Rd on mRNA levels of HDACs in HEK293T cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

皂苷 Rd 能够促进 HDAC2 的表达,而这种调控作用可能会导致组蛋白乙酰化修饰的改变。

3.4 人参皂苷 Rd 对组蛋白 H3K9ac 和 H3K18ac 表达的影响

细胞内的组蛋白 H3K9ac 和 H3K18ac 由组蛋白乙酰转移酶 P300 和 HDAC2 等多个 HDACs 共同调控。使用不同质量浓度的人参皂苷 Rd 处理 HEK293T 细胞 48 h, 通过 Western blotting 检测细胞内的相关蛋白表达。结果表明, 与对照组比较, 各给药组 H3K9ac、H3K18ac 蛋白水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), HDAC2 表达量显著升高 ($P < 0.01$ 、 0.001), 而 P300 没有明显变化 (图 5)。

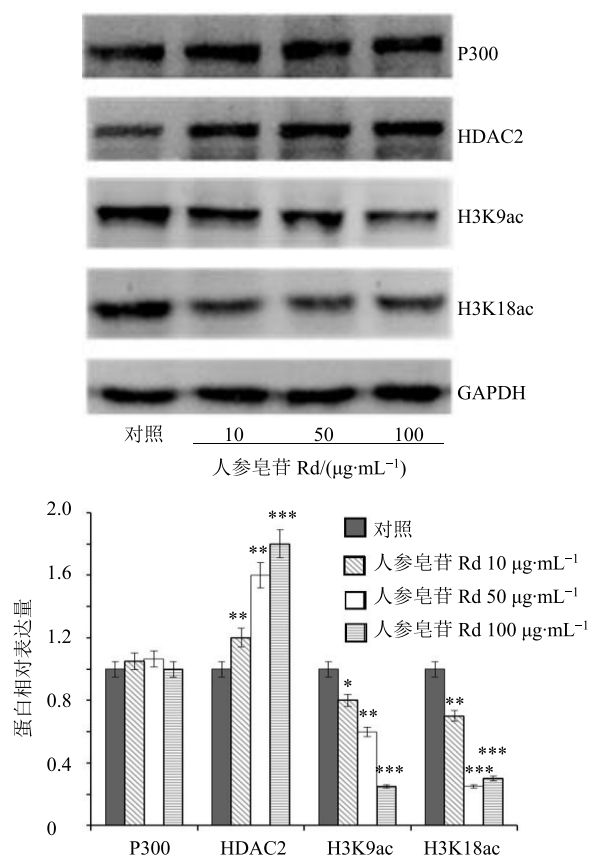


图 5 人参皂苷 Rd 对 H3K9ac 和 H3K18ac 蛋白水平的调节作用 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 5 Effects of ginsenoside Rd on protein levels of H3K9ac and H3K18ac ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

3.5 敲除 HDAC2 蛋白对人参皂苷 Rd 下调 H3K9ac 和 H3K18ac 蛋白表达作用的影响

基因敲除实验结果 (图 6) 表明, 与对照组 siNT 处理的 HEK293T 细胞相比, 敲除 HDAC2 后, 人参皂苷 Rd 对组蛋白 H3K9ac 和 H3K18ac 的下调作用被逆转, 说明人参皂苷 Rd 降低 H3K9ac 和 H3K18ac

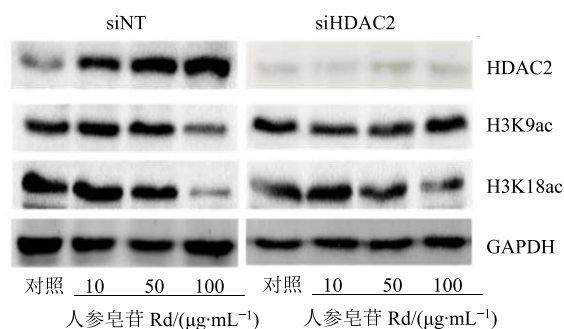


图 6 敲除 HDAC2 蛋白对人参皂苷 Rd 下调 H3K9ac 和 H3K18ac 蛋白表达作用的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 6 Down-regulation effects of ginsenoside Rd on H3K9ac and H3K18ac effected by knockdown HDAC2 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

的过程中, HDAC2 表达量的升高起到了关键作用。

4 讨论

本实验以人参皂苷 Rd 为研究对象, 通过 MTT 毒性实验及对细胞生长状态的观测, 确定了人参皂苷 Rd 处理 HEK293T 细胞的质量浓度范围为 $0 \sim 200 \mu\text{g}/\text{mL}$ ^[12]; 又进一步采用 SILAC 标记技术, 通过 LC-MS/MS 定量分析人参皂苷 Rd 处理 HEK293T 细胞后的蛋白质组^[13-14]。在人参皂苷 Rd 处理 HEK293T 细胞的定量蛋白组学数据库中, 发现 HDAC2 表达水平变化幅度较大, 为了验证人参皂苷 Rd 对 HDAC2 表达的影响, 通过 Western blotting 和 qRT-PCR 实验, 证实人参皂苷 Rd 能够提高 HDAC2 的表达和转录水平^[15]。HDAC2 主要负责调控组蛋白 H3 的去乙酰化修饰, 因此, 本实验检测了人参皂苷 Rd 作用于 HEK293T 细胞后对 H3K9 和 H3K18 位点乙酰基修饰水平的调控作用。结果表明 H3K9ac 和 H3K18ac 的表达水平在人参皂苷 Rd 的作用下发生下调, 而这 2 个组蛋白乙酰化修饰位点是 HDAC2 的调控位点, 所以人参皂苷 Rd 可能通过促进 HDAC2 的表达进一步完成对于组蛋白 H3K9ac 和 H3K18ac 的调控。而本实验结果证明, 人参皂苷 Rd 并不直接影响组蛋白乙酰转移酶 P300 的表达, 因此推测人参皂苷 Rd 对组蛋白 H3 乙酰化的调控是通过调控 HDAC2 等 HDACs 来实现的。进一步设计了 HDAC2 的基因敲除实验, 实验结果表明敲低 HDAC2 有效逆转了人参皂苷 Rd 对 HEK293T 细胞中 H3K9ac、H3K18ac 水平的下调作用, 进一步证实人参皂苷 Rd 通过上调 HDAC2 的表达降低 H3K9ac、H3K18ac 水平^[16-17]。

人参皂苷 Rd 对心血管系统、免疫系统、肾脏

功能的保护以及显著的抗肿瘤作用已受到国内外学者的广泛关注,然而其具体的分子作用机制至今尚不完全清楚^[18]。本实验利用稀有人参皂苷 Rd 处理 HEK293T 细胞,基于 SILAC 标记技术并通过 LC-MS/MS,定量分析了人参皂苷 Rd 处理 HEK293T 细胞后的差异蛋白质组,共鉴定到 5 994 个蛋白质,其中 4 791 个蛋白质包含定量信息,共筛选到 195 个蛋白质发生上调,29 个蛋白质发生下调,其中 HDAC2 等 HDACs 表达量明显升高,为此后人参皂苷 Rd 的蛋白质组学研究提供大量的数据基础;同时,率先提出人参皂苷 Rd 能够整体下调细胞中蛋白质的乙酰化水平,其中 H3K9ac 和 H3K18ac 水平明显降低。

综上所述,人参皂苷 Rd 能够上调 HDAC2 等 HDACs 的表达,从而下调组蛋白 H3 上 K9、K18 等多个赖氨酸位点的乙酰化水平。

参考文献

- [1] Zhang Y, Zhang Y, Taha A A, *et al.* Subcritical water extraction of bioactive components from ginseng roots (*Panax ginseng* C. A. Mey) [J]. *Ind Crop Prod*, 2018, doi: 10.1016/j.indcrop.2018.02.079.
- [2] 张 彩, 史 磊. 人参化学成分和药理作用研究进展 [J]. *食品与药品*, 2016, 18(4): 300-304.
- [3] Chen Z, Fang D, Ming S, *et al.* Ginsenoside Rd protects neurons against glutamate-induced excitotoxicity by inhibiting Ca^{2+} influx [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2012, 32(1): 121-128.
- [4] Li L, Liu J, Yan X, *et al.* Protective effects of ginsenoside Rd against okadaic acid-induced neurotoxicity *in vivo* and *in vitro* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 138(1): 135-141.
- [5] Wang P, Du X, Xiong M, *et al.* Ginsenoside Rd attenuates breast cancer metastasis implicating derepressing microRNA-18a-regulated Smad2 expression [J]. *Sci Rep*, 2016, doi: 10.1038/srep33709.
- [6] Gum S I, Rahman M K, Won J S, *et al.* A distinctive pattern of beauveria bassiana-biotransformed ginsenoside products triggers mitochondria/FasL-mediated apoptosis in colon cancer cells [J]. *Phytother Res*, 2015, 30(1): 136-143.
- [7] Fu Y, Yin Z, Wu L, *et al.* Fermentation of ginseng extracts by *Penicillium simplicissimum* GS33 and anti-ovarian cancer activity of fermented products [J]. *World J Microb Biot*, 2014, 30(3): 1019-1025.
- [8] Kim B J. Involvement of melastatin type transient receptor potential 7 channels in ginsenoside Rd-induced apoptosis in gastric and breast cancer cells [J]. *J Ginseng Res*, 2013, 37(2): 201-209.
- [9] Wang R, Xin M, Li Y, *et al.* The functions of histone modification enzymes in cancer [J]. *Curr Protein Pept Sci*, 2016, 17(5): 438-445.
- [10] Tsai Y J, Tsai T, Peng P C, *et al.* Histone acetyltransferase p300 is induced by p38MAPK after photodynamic therapy: The therapeutic response is increased by the p300HAT inhibitor anacardic acid [J]. *Free Rad Biol Med*, 2015, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.05.009.
- [11] Wang Z, Cao H, Chen F, *et al.* The roles of histone acetylation in seed performance and plant development [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2014, 84(20): 125-133.
- [12] Soltan-Dallal M M, Validi M, Douraghi M, *et al.* Evaluation the cytotoxic effect of cytotoxin-producing *Klebsiella oxytoca* isolates on the HEP-2 cell line by MTT assay [J]. *Microb Pathog*, 2017, doi: org/10.1016/j.micpath.2017.11.003.
- [13] Zhang P, Culver-Cochran A E, Stevens S M, *et al.* Characterization of a SILAC method for proteomic analysis of primary rat microglia [J]. *Proteomics*, 2016, 16(9): 1341-1346.
- [14] Cuomo A, Sanfilippo R, Vaccari T, *et al.* Proteomics meets genetics: SILAC labeling of drosophila melanogaster larvae and cells for *in vivo* functional studies [J]. *Methods Mol Biol*, 2014, 1188: 293-331.
- [15] Zhou X, Zhang T, Song D, *et al.* Comparison and evaluation of conventional RT-PCR, SYBR green I and TaqMan real-time RT-PCR assays for the detection of porcine epidemic diarrhea virus [J]. *Mol Cell Probe*, 2017, doi: 10.1016/j.mcp.2017.02.002.
- [16] Shu X Z, Zhang L N, Zhang R, *et al.* Histone acetyltransferase p300 promotes MRTF-A-mediates transactivation of VE-cadherin gene in human umbilical vein endothelial cells [J]. *Gene*, 2015, 563(1): 17-23.
- [17] Hu C, Liu M, Zhang W, *et al.* Upregulation of KLF4 by methylseleninic acid in human esophageal squamous cell carcinoma cells: Modification of histone H3 acetylation through HAT/HDAC interplay [J]. *Mol Carcinogen*, 2015, 54(10): 1051-1059.
- [18] Hou J, Xue J, Lee M, *et al.* Ginsenoside Rd as a potential neuroprotective agent prevents trimethyltin injury [J]. *Biomed Rep*, 2017, 6(4): 435-440.