

研究论文

DZNep通过上调miR-200c表达延缓MGC-803胃癌细胞侵袭和迁移过程

宁向红¹, 郭蓉¹, 韩磊², 张安玲², 刘茜¹, 李朝霞¹, 康春生², 张庆瑜^{1,*}

¹天津医科大学总医院消化科, 天津 300052; ²天津神经病研究所, 神经肿瘤实验室, 天津 300052

摘要: 本文旨在研究组蛋白甲基化修饰调控对胃癌细胞miR-200c的表达调节以及对癌细胞的侵袭和迁移的作用。组蛋白甲基转移酶抑制剂DZNep (2.5 $\mu\text{mol/L}$)处理MGC-803胃癌细胞系, 用实时定量PCR (qRT-PCR)检测细胞miR-200c的表达变化, 用Western blot检测上皮间质转化相关蛋白、EZH2、EED、SUZ12、H3K27me3及MMP9的蛋白表达变化, 用细胞划痕实验和Transwell法检测细胞迁移和侵袭。结果显示, 与对照(DMSO处理)组相比, DZNep (2.5 $\mu\text{mol/L}$)处理的MGC-803肿瘤细胞miR-200c基因的表达显著提高, ZEB1、ZEB2、N-cadherin的表达显著下调, E-cadherin的表达上调, EZH2、EED、SUZ12、H3K27me3及MMP9的表达均显著降低, 细胞迁移、侵袭能力均减弱。以上结果提示, DZNep通过上调miR-200c的表达延缓胃癌细胞侵袭、迁移过程, 其机制涉及对上皮间质转化相关蛋白和PRC2 (polycomb repressive complex 2)的表达调节。

关键词: 胃癌; miR-200c; DZNep; 表观遗传学

中图分类号: R33

DZNep raises miR-200c expression to delay the invasion and migration of MGC-803 gastric carcinoma cells

NING Xiang-Hong¹, GUO Rong¹, HAN Lei², ZHANG An-Ling², LIU Xi¹, LI Zhao-Xia¹, KANG Chun-Sheng², ZHANG Qing-Yu^{1,*}

¹Department of Gastroenterology, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China; ²Department of Neurosurgery, Tianjin Medical University General Hospital and Laboratory of Neuro-Oncology, Tianjin Neurological Institute, Tianjin 300052, China

Abstract: The aim of the present study was to investigate the regulatory effects of histone methylation modifications on the expression of miR-200c, as well as invasion and migration of gastric carcinoma cells. Gastric carcinoma cell line, MGC-803, were treated by 2.5 $\mu\text{mol/L}$ histone methyltransferase inhibitor, DZNep. The expression of miR-200c was detected by real-time quantitative PCR (qRT-PCR). The epithelial-mesenchymal transition (EMT) indicators (ZEB1/2 and E/N-cadherin), EZH2, EED, SUZ12 and H3K27me3 expressions were detected by Western blot. Cell migration and invasion abilities were detected by Transwell and scratch tests. The result showed that, compared with DMSO (control) group, DZNep significantly increased the expression of miR-200c to about 2.1 times, inhibited ZEB1, ZEB2, and N-cadherin expressions, and activated E-cadherin expression; Also, DZNep decreased the protein expressions of EZH2, EED, SUZ12 and H3K27me3; Moreover, DZNep could inhibit MGC-803 cell invasive and migrative abilities, as well as MMP9 expression. These results suggest DZNep raises miR-200c expression to delay the invasion and migration of gastric carcinoma cells, and the underlying mechanisms involve the regulations of EMT-related proteins and polycomb repressive complex 2.

Key words: gastric carcinoma; miR-200c; DZNep; epigenetics

Received 2014-08-21 Accepted 2014-11-24

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81172356) and Application of Basic and Advanced Technology Research Project, Science and Technology Commission of Tianjin Municipality, China (No.10JCZDJC18500).

*Corresponding author. Tel: +86-22-60361552; E-mail: zhangqy@tjmu.edu.cn

胃癌是最常见的消化道肿瘤^[1], 其发病机制和治疗方法一直是近年来重要的研究课题。近年来, 一些与肿瘤发病相关的重要 miRNA 相继被发现, 其中 miR-200 家族与胃癌的发生、发展关系密切, miR-200 的异常表达参与肿瘤细胞增殖、侵袭、转移等多个过程^[2]。miRNA 是具有调控作用的非编码小 RNA, 通过与互补的 mRNA 选择性的结合而抑制其特定目的基因的表达^[3]。与 mRNA 配对的 miRNA 主要通过两种机制负向调控基因表达: 当 miRNA 与目的 mRNA 完全互补或几乎完全互补时, 目的 mRNA 降解; 当不完全互补时, 则阻碍蛋白质翻译而对靶基因 mRNA 无影响。miRNA 与癌症的关系主要表现为: miRNA 基因定位于癌基因不稳定区域; miRNA 在正常细胞和肿瘤细胞中表达不同; miRNA 的异常表达与特定肿瘤相关, 参与肿瘤细胞增殖、侵袭、凋亡、转移和血管形成等多个过程。miR-200c 的异常表达已经在乳腺癌, 前列腺癌及恶性胶质瘤中报道^[4-6]。表观遗传学是指非 DNA 序列改变但导致可遗传基因表达的变化, 主要涉及 DNA 甲基化和染色质组蛋白的修饰, 包括组蛋白甲基化、乙酰化、磷酸化和泛素化。随着肿瘤研究的深入, 学者们发现表观遗传学信息的改变, 如抑癌基因启动子区甲基化水平的异常增加, 在肿瘤的发生和发展过程中也起到了不容忽视的作用^[7]。因为表观遗传修饰对于肿瘤形成和发展具有重要的推动作用^[8], 靶向表观遗传修饰药物, 包括 DNA 甲基转移酶抑制剂、组蛋白甲基转移酶抑制剂及甲基化组蛋白结合蛋白的抑制剂等对肿瘤的治疗越来越受到关注^[9,10]。

随着胃癌发病率逐年升高, 侵袭转移导致治疗失败引起的死亡越来越受到人们的重视^[11]。近年来上皮间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT), 成为肿瘤研究的热点, E-cadherin 表达的上调和间质标记物如 N-cadherin、波形蛋白表达下调诱导 EMT 的发生, 在肿瘤细胞侵袭和转移中发挥重要作用^[12]。人们对表观遗传学已有足够的认识, 然而靶向表观遗传学药物 DZNep 对于 miRNA 的调控进而对细胞 EMT 的影响研究甚少。因此, 本研究用组蛋白甲基转移酶抑制剂 DZNep 处理胃癌细胞, 研究其对 miR-200c 表达的调控作用, 并分析 miR-200c 对细胞 EMT 的影响。

1 材料和方法

1.1 实验材料 dNTP mixture、反转录酶 (MMLV)、

RNase 抑制剂购自大连 Takara 公司, DZNep 购自 Cayman Chemical 公司。兔抗人 EZH2、SUZ12 及 E-cadherin 抗体购自 CST 公司, 兔抗人 H3K27me3 抗体购自 Millipore 公司。兔抗人 EED 抗体购自 Abcam 公司。小鼠抗人 N-cadherin、ZEB1、ZEB2、MMP9 抗体购自 Santa Cruz 公司。小鼠抗人 GAPDH 抗体购自北京中杉金桥公司。TRIzol 试剂购自美国 Invitrogen 公司。荧光定量 miRNA PCR 试剂盒购自 Roche 公司。

1.2 细胞培养 人胃癌细胞系 MGC-803 和正常胃粘膜上皮细胞 GES-1 购自中国科学院上海生命科学研究院, 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) 培养基, 37 °C、5% CO₂ 的标准环境中培养。

1.3 MTT 法 确定 DZNep 作用于 MGC-803 的 IC₅₀。运用不同浓度梯度的 DZNep (0, 1.25, 2.5, 5, 10, 20 μmol/L) 作用于 MGC-803 细胞, 48 h 后 MTT 检测细胞存活率, 计算得 IC₅₀ 为 2.5 μmol/L。

1.4 实时定量 PCR (qRT-PCR) 应用 TRIzol 试剂, 按照 RNA 提取步骤将总的 RNA 从 MGC-803 胃癌细胞系和正常胃粘膜上皮细胞 GES-1 中提取出来, 应用 miR-200c 特异性逆转录、PCR 引物行 qRT-PCR 检测来比较两种细胞中 miR-200c 的表达水平。其中 U6 (内参)、miR-200c 的反转录及 qRT-PCR 使用的引物由苏州吉玛公司合成。miRNA 逆转录条件: 26 °C 30 min, 42 °C 30 min, 85 °C 5 min。所得逆转录产物 cDNA 行 qRT-PCR 检测。反应条件: 95 °C 10 min; 95 °C 15 s, 65 °C 30 s, 72 °C 30 s, 共 40 个循环。与 GES-1 相比较, MGC-803 胃癌细胞系中 miR-200c 表达量低, 因此用于后续实验。MGC-803 细胞分为 DZNep 组和 DMSO 组, 分别用 DZNep 和溶剂 (DMSO) 处理 24 h, 用 qRT-PCR 检测 miR-200c 的变化。

1.5 Western blot 检测 常规培养对数期 MGC-803 细胞, DZNep 或 DMSO 处理 24 h 后弃培养基。细胞裂解液 RIPA 裂解细胞以提取总蛋白, 蛋白质根据其各自分子量的大小在 SDS-PAGE 凝胶电泳时被分离, 转膜, 加一抗 (1:1 000 稀释), 4 °C 孵育过夜。PBST 洗涤, 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG-HRP、山羊抗小鼠 IgG-HRP 二抗 (北京中杉金桥公司) (1:1 000 稀释) 室温孵育 1 h, 将化学发光底物 (Pierce 公司) 加于 PVDF 膜上, 置凝胶于凝胶成像分析系统中采集成像。

1.6 Transwell 实验 两组细胞制备成单细胞悬

液, 取细胞悬液 100 μ L 加入有基质胶的 Transwell 小室 (Corning 公司), 常规培养 48 h, 用棉签擦去基质胶和上室内的细胞, 下室采用 0.1% 结晶紫染色, 采用荧光相差倒置显微镜 ($\times 100$) 进行观察和拍照, 随机选取 3 个视野, 统计穿过膜的细胞数。

1.7 细胞划痕实验 参照已发表文献^[13], 两组细胞接种于六孔板中过夜, 第二天用 200 μ L 微量移液枪头在 6 孔板内垂直及平行划痕, 用 PBS 洗细胞 3 次, 加入无血清培养基, 放入 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱培养。划痕后 0、12、24、48 h 在倒置显微镜下观察拍照。

1.8 统计学方法 计量资料采用 mean \pm SD 表示, 用 SPSS 18.0 统计软件对数据进行分析, 采用 *t* 检验分析实验结果。P < 0.05 时认为差异具有显著性。

2 结果

2.1 DZNep作用于MGC-803后miR-200c的表达

qRT-PCR 检测结果显示, DZNep 组的 MGC-803 细胞中 miR-200c 的表达升高至 DMSO 组的 2.1 倍, 两组之间的差异具有统计学意义 (P < 0.05)(图 1)。

2.2 DZNep抑制胃癌细胞EMT

Western blot 结果显示, 相对 DMSO 组, DZNep 组 ZEB1、ZEB2 和 N-cadherin 蛋白表达水平均显著降低 (均 P < 0.05), 而 E-cadherin 蛋白水平表达则显著提高 (P < 0.05)(图 2), 表明 DZNep 抑制胃癌细胞 EMT。

2.3 DZNep抑制胃癌细胞组蛋白甲基化相关蛋白的表达

Western blot 结果显示, 相对 DMSO 组, DZNep 组甲基化复合物 PRC2 (polycomb repressive complex 2, 包括 EZH2、SUZ12 和 EED) 和 H3K27me3 的蛋白

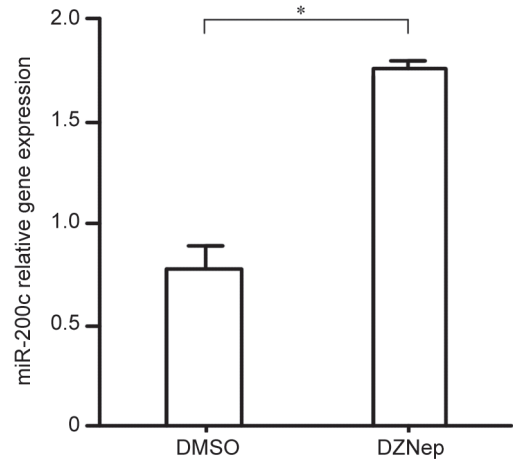


图 1. DZNep对MGC-803细胞系中miR-200c表达的作用
Fig. 1. Effect of DZNep on the expression of miR-200c in MGC-803 cells detected by qRT-PCR. Mean \pm SD, n = 3. *P < 0.05.

表达均显著降低 (均 P < 0.05)(图 3), 表明 DZNep 抑制胃癌细胞组蛋白甲基化相关蛋白的表达。

2.4 DZNep抑制MGC-803细胞系的侵袭和迁移能力

Transwell 和细胞划痕实验结果显示, 相对 DMSO 组, DZNep 组穿膜细胞数和 48 h 细胞迁移率均显著下降 (均 P < 0.05)(图 4, 表 1), 表明 DZNep 抑制 MGC-803 细胞系的侵袭和迁移能力。

Western blot 结果显示, 相对 DMSO 组, DZNep 组与侵袭、转移相关 MMP9 的蛋白表达水平也显著降低 (图 5)。

3 讨论

胃癌的发生、发展与抑癌基因的转录失活有着密切关系。最近研究证实 EMT 与肿瘤细胞的侵袭

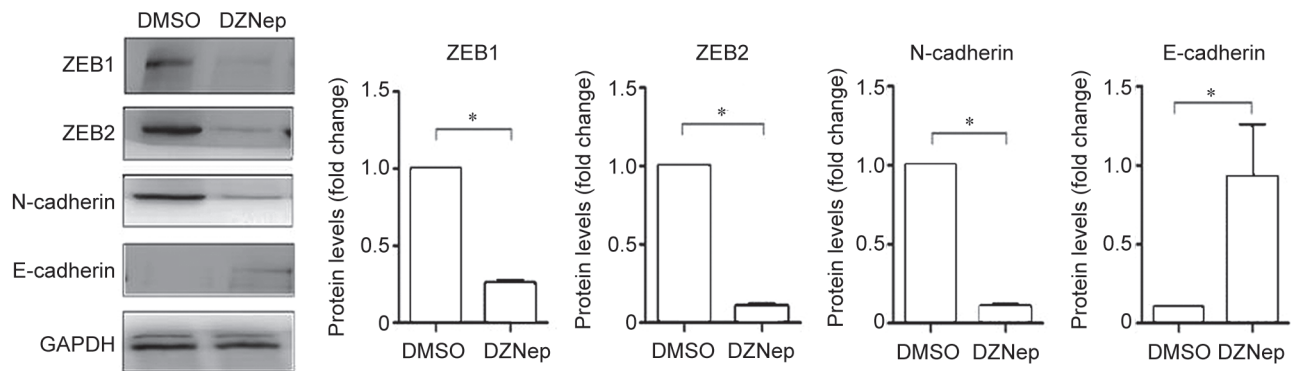


图 2. DZNep对MGC-803细胞上皮间质转化相关蛋白表达的影响
Fig. 2. Effects of DZNep on EMT-related protein expressions in MGC-803 cells detected by Western blot. Mean \pm SD, n = 3. *P < 0.05.

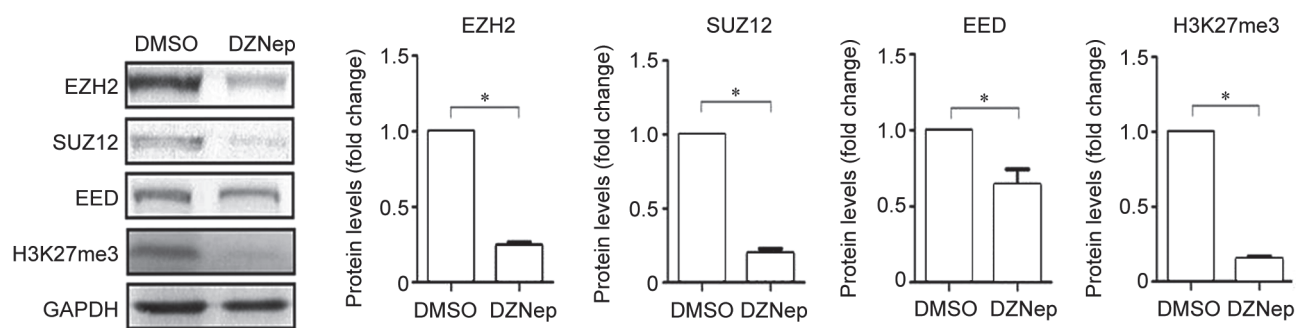


图 3. DZNep对MGC-803细胞甲基化水平相关蛋白表达的影响

Fig. 3. Effects of DZNep on methylation-related proteins expressions in MGC-803 cells detected by Western blot. Mean \pm SD, $n = 3$. * $P < 0.05$.

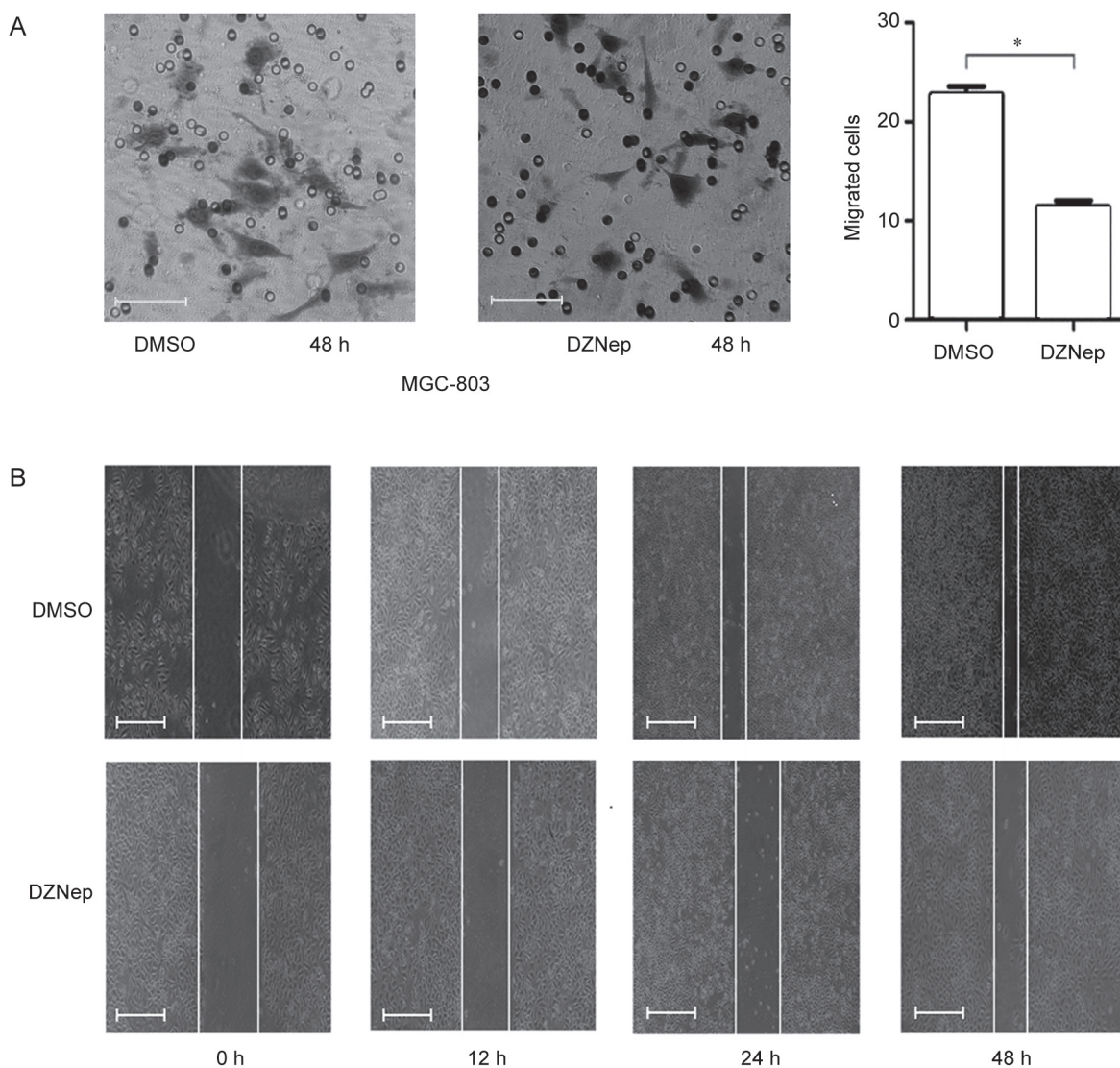


图 4. DZNep对MGC-803细胞侵袭、迁移能力的影响

Fig. 4. Effects of DZNep on migration and invasion abilities of MGC-803 cells detected by Transwell (A) and scratch (B) tests. Mean \pm SD, $n = 3$. * $P < 0.05$. Scale bars in A, 100 μm ; Scale bars in B, 50 μm .

表1. 两组细胞侵袭能力及迁移率比较

Table 1. Comparisons of the invasive capability and migrating rates in 48 h between DMSO and DZNep groups

Group	No. of migrated cells	Migrating rates (%)
DMSO	20.34 ± 5.67	41.67 ± 2.87
DZNep	12.84 ± 4.96*	16.67 ± 3.56*

Mean ± SD, n = 3. *P < 0.05 vs DMSO group.

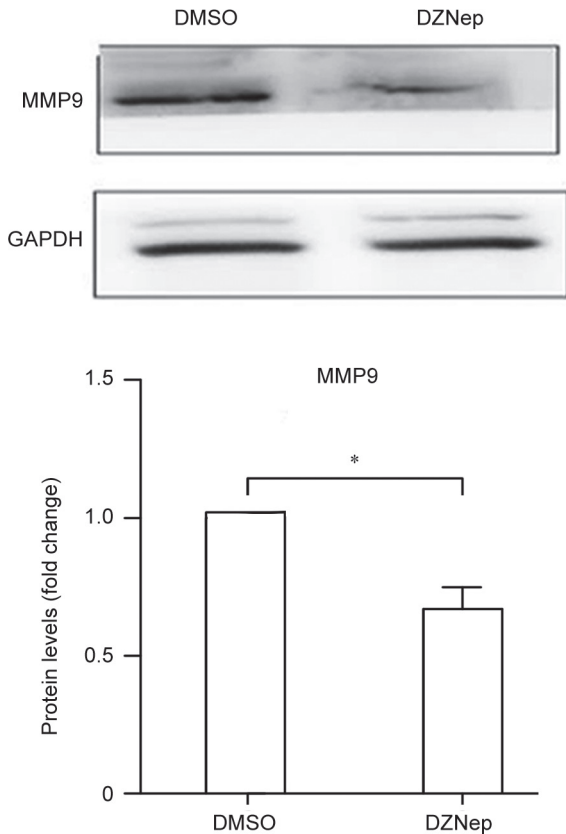


图 5. DZNep对MGC-803细胞MMP9蛋白表达的作用
Fig. 5. Effect of DZNep on the expression of MMP9 in MGC-803 cells detected by Western blot. Mean ± SD, n = 3. *P < 0.05.

和转移有着密切的关系。EMT 以上皮细胞极性的丧失获得间质特性为重要特点。ZEB1 和 ZEB2 基因抑制 miR-200 的表达而促进 EMT 过程，而过表达 miR-200 抑制 ZEB1/ZEB2 的表达从而抑制肿瘤细胞的侵袭、转移^[13,14]，导致 EMT 过程被延缓^[15-17]。本文研究显示 DZNep 显著下调 ZEB1 和 ZEB2 的表达水平。EMT 的一个重要标志是 E-cadherin 表达的下调，而 miR-200 家族已经证实通过调节 E-cadherin 的表达抑制 EMT^[4]。与正常组织相比，胃癌组织 E-cadherin 的表达显著降低^[18]。与此同时 miR-200 表达的变化降低了肿瘤侵袭、迁移能力^[19]。我们对 DZNep 抑制胃癌的 EMT 机制进行了初步研究，结

果显示，DZNep 可以上调 E-cadherin，同时 DZNep 可以下调 EMT 相关蛋白的表达，如 N-cadherin 的表达，此外本实验利用细胞划痕和 Transwell 实验检测细胞侵袭和迁移情况，证实 DZNep 可以降低胃癌细胞的迁移和侵袭能力。

为了进一步研究 DZNep 抑制 EMT 的机制，我们观察 DZNep 作用于胃癌细胞系 MGC-803 后 miR-200c 的变化情况，结果显示 DZNep 作用后 miR-200c 的表达显著上调，进而上调 E-cadherin 的表达。本文研究结果还显示 DZNep 抑制 EZH2、SUZ12 和 EED 的表达及 H3K27me3 的表达。PRC2 是一组通过染色体修饰调控基因表达介导基因转录抑制的蛋白复合体。PRC2 由 EZH2、SUZ12 和 EED 组成，作用于 H3K27 的甲基化调控过程影响调节相应基因的表达^[20]。EZH2 是 PRC2 的重要组成部分，具有组蛋白甲基转移酶的活性，在催化 H3 赖氨酸 27 位三甲基化中起重要作用。在多种人类恶性肿瘤中 EZH2 的表达显著增加，包括乳腺癌，前列腺癌，卵巢癌等，其异常表达与肿瘤的生长、转移以及预后密切相关^[21-23]。Guo 等^[24]在胃癌中也发现了 EZH2 的异常表达。DZNep 作为一种 S-腺苷-L-半胱氨酸水解酶抑制剂，是组蛋白甲基化酶抑制剂，能有效减少 EZH2、SUZ12 和 EED 的表达并且抑制 H3 赖氨酸 27 位三甲基化^[25]，以前的研究已经证实 EZH2 结合在抑癌基因的启动子区域，DZNep 可激活相应基因的表达。同时 DZNep 能上调 E-cadherin 的表达^[26]。PRC2 介导的组蛋白甲基化在肿瘤基因异常沉默中起到重要作用，成为癌症治疗的潜在靶点。而 DZNep 是一个崭新的作用于表观遗传调控的化合物，是潜在的抗肿瘤治疗药物。DZNep 导致的 EZH2 的沉默激活 E-cadherin 的表达，可抑制肿瘤的迁移和侵袭^[26]。EZH2 的抑制可增加 E-cadherin 的表达，从而抑制 EMT^[27]。miR-200c 通过与特定的靶基因 mRNA 结合，抑制 EMT，这些基因包括 E-cadherin、N-cadherin、ZEB1 和 ZEB2。miR-200c 的表达在多种肿瘤中普遍下调，提示其是重要的抑癌基因，是 EMT 的有效抑制因子^[28]。

综上所述，DZNep 可以上调 miR-200c 的表达，并进一步验证了 DZNep 对于 EMT 的调控作用是通过调节 miR-200c 的表达实现的。这为研究和治疗胃癌转移提供了新的思路。为了进一步明确 DZNep 在胃癌转移中的作用，还需要在动物体内得以验证。

参考文献

- Zhao Y, Feng F, Zhou YN. Stem cells in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2015; 21(1): 112–123.
- Minn YK, Lee da H, Hyung WJ, Kim JE, Choi J, Yang SH, Song H, Lim BJ, Kim SH. MicroRNA-200 family members and ZEB2 are associated with brain metastasis in gastric adenocarcinoma. *Int J Oncol* 2014; 45(6): 2403–2410.
- Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116(2): 281–297.
- Lu Y, Lu J, Li X, Zhu H, Fan X, Zhu S, Wang Y, Guo Q, Wang L, Huang Y, Zhu M, Wang Z. MiR-200a inhibits epithelial-mesenchymal transition of pancreatic cancer stem cell. *BMC Cancer* 2014. 14: 85.
- Men D, Liang Y, Chen L. Decreased expression of microRNA-200b is an independent unfavorable prognostic factor for glioma patients. *Cancer Epidemiol* 2014. 38(2): 152–156.
- Luo ML, Gong C, Chen CH, Lee DY, Hu H, Huang P, Yao Y, Guo W, Reinhardt F, Wulf G, Lieberman J, Zhou XZ, Song E, Lu KP. Prolyl isomerase Pin1 acts downstream of miR-200 to promote cancer stem-like cell traits in breast cancer. *Cancer Res* 2014; 74(13): 3603–3616.
- He M, Fan J, Jiang R, Tang WX, Wang ZW. Expression of DNMTs and genomic DNA methylation in gastric signet ring cell carcinoma. *Mol Med Rep* 2013; 8(3): 942–948.
- Ashktorab H, Brim H. DNA methylation and colorectal cancer. *Curr Colorectal Cancer Rep* 2014; 10(4): 425–430.
- Jiang X (蒋序). Effects of 5-aza-2-deoxycytidine on methylation status of RECK gene and cancer cell invasion in tongue cancer SCC-4 cells. *Shanghai J Stomatol (上海口腔医学)* 2014; 23(5): 571–574 (Chinese, English abstract).
- Girard N, Bazille C, Lhuissier E, Benateau H, Llobat-Bosch A, Boumediene K, Bauge C. 3-Deazaneplanocin A (DZNep), an inhibitor of the histone methyltransferase EZH2, induces apoptosis and reduces cell migration in chondrosarcoma cells. *PLoS One* 2014; 9(5): e98176.
- La Vecchia C, Negri E, Decarli A, Fasoli M, Cislaghi C. Cancer mortality in Italy: an overview of age-specific and age-standardised trends from 1955 to 1984. *Tumori* 1990; 76(2): 87–166.
- Grant CM, Kyprianou N. Epithelial mesenchymal transition (EMT) in prostate growth and tumor progression. *Transl Androl Urol* 2013; 2(3): 202–211.
- Kurashige J, Kamohara H, Watanabe M, Hiyoshi Y, Iwatsuki M, Tanaka Y, Kinoshita K, Saito S, Baba Y, Baba H. MicroRNA-200b regulates cell proliferation, invasion, and migration by directly targeting ZEB2 in gastric carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2012; 19 Suppl 3: S656–S664.
- Xiong M, Jiang L, Zhou Y, Qiu W, Fang L, Tan R, Wen P, Yang J. The miR-200 family regulates TGF-beta1-induced renal tubular epithelial to mesenchymal transition through Smad pathway by targeting ZEB1 and ZEB2 expression. *Am J Physiol Renal Physiol* 2012; 302(3): F369–F379.
- Cortez MA, Valdecanas D, Zhang X, Zhan Y, Bhardwaj V, Calin GA, Komaki R, Giri DK, Quini CC, Wolfe T, Peltier HJ, Bader AG, Heymach JV, Meyn RE, Welsh JW. Therapeutic delivery of miR-200c enhances radiosensitivity in lung cancer. *Mol Ther* 2014; 22(8): 1494–1503.
- Si L, Jiang F, Li Y, Ye X, Mu J, Wang X, Ning S, Hu C, Li Z. Induction of the mesenchymal to epithelial transition by demethylation-activated microRNA-200c is involved in the anti-migration/invasion effects of arsenic trioxide on human breast cancer cells. *Mol Carcinog* 2014; doi: 10.1002/mc.22157.
- Engelsvold DH, Utheim TP, Olstad OK, Gonzalez P, Eidet JR, Lyberg T, Trøseid AM, Dartt DA, Raeder S. miRNA and mRNA expression profiling identifies members of the miR-200 family as potential regulators of epithelial-mesenchymal transition in pterygium. *Exp Eye Res* 2013; 115: 189–198.
- Huang Z, Zhang N, Zha L, Mao HC, Chen X, Xiang JF, Zhang H, Wang ZW. Aberrant expression of the autocrine motility factor receptor correlates with poor prognosis and promotes metastasis in gastric carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014; 15(2): 989–997.
- Rao VH, Kansal V, Stoupa S, Agrawal DK. MMP-1 and MMP-9 regulate epidermal growth factor-dependent collagen loss in human carotid plaque smooth muscle cells. *Physiol Rep* 2014; 2(2): e00224.
- Whitcomb SJ, Basu A, Allis CD, Bernstein E. Polycomb Group proteins: an evolutionary perspective. *Trends Genet* 2007; 23(10): 494–502.
- Varambally S, Dhanasekaran SM, Zhou M, Barrette TR, Kumar-Sinha C, Sanda MG, Ghosh D, Pienta KJ, Sewalt RG, Otte AP, Rubin MA, Chinnaiyan AM. The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature* 2002; 419(6907): 624–629.
- Kleer CG, Cao Q, Varambally S, Shen R, Ota I, Tomlins SA, Ghosh D, Sewalt RG, Otte AP, Hayes DF, Sabel MS, Livant D, Weiss SJ, Rubin MA, Chinnaiyan AM. EZH2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(20): 11606–11611.
- Liu T, Hou L, Huang Y. EZH2-specific microRNA-98 inhibits human ovarian cancer stem cell proliferation via regulating the pRb-E2F pathway. *Tumour Biol* 2014; 35(7): 7239–7247.
- Guo L, Yang TF, Liang SC, Guo JX, Wang Q. Role of EZH2 protein expression in gastric carcinogenesis among Asians: a

- meta-analysis. *Tumour Biol* 2014; 35(7): 6649–6656.
- 25 Cheng LL, Itahana Y, Lei ZD, Chia NY, Wu Y, Yu Y, Zhang SL, Thike AA, Pandey A, Rozen S, Voorhoeve PM, Yu Q, Tan PH, Bay BH, Itahana K, Tan P. TP53 genomic status regulates sensitivity of gastric cancer cells to the histone methylation inhibitor 3-deazaneplanocin A (DZNep). *Clin Cancer Res* 2012; 18(15): 4201–4212.
- 26 Liu L, Xu Z, Zhong L, Wang H, Jiang S, Long Q, Xu J, Guo J. EZH2 promotes tumor cell migration and invasion via epigenetic repression of E-cadherin in renal cell carcinoma. *BJU Int* 2014; doi: 10.1111/bju.12702.
- 27 Malouf GG, Taube JH, Lu Y, Roysarkar T, Panjarian S, Estecio MR, Jelinek J, Yamazaki J, Raynal NJ, Long H, Tahara T, Tinnirello A, Ramachandran P, Zhang XY, Liang S, Mani SA, Issa JP. Architecture of epigenetic reprogramming following Twist1-mediated epithelial-mesenchymal transition. *Genome Biol* 2013; 14(12): R144.
- 28 Tamagawa S, Beder LB, Hotomi M, Gunduz M, Yata K, Grenman R, Yamanaka N. Role of miR-200c/miR-141 in the regulation of epithelial-mesenchymal transition and migration in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Mol Med* 2014; 33(4): 879–886.