

## 论著·基础研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2021.10.007

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20201127.1227.010.html\(2020-11-27\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20201127.1227.010.html(2020-11-27))

## siRNA 沉默 EZH2 对 HL-60 细胞迁移、增殖能力的影响及其机制\*

朱秋花,潘学谊,曾文彬,周兰兰,关则兵<sup>△</sup>

(广东药科大学附属第一医院血液内科,广州 510080)

**[摘要]** **目的** 探讨人类同源基因 2(EZH2)对人急性早幼粒细胞白血病细胞系 HL-60 细胞迁移、增殖能力的影响及其机制。**方法** 通过慢病毒转染技术用 siRNAs 沉默 HL-60 细胞的 EZH2 基因,用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)及 Western blot 验证 3 个不同序列的 siRNA 敲除 EZH2 的效果并筛选出最佳序列。随后用 CCK-8 和流式细胞术分别检测细胞增殖活性和凋亡,并用 Transwell 迁移小室试验检测细胞的迁移能力,用 Western blot 方法检测细胞迁移、增殖及凋亡相关蛋白的表达水平。**结果** 在 HL-60 细胞中用 siRNAs 敲除 EZH2 后其增殖能力下降( $P<0.05$ ),凋亡增加( $P<0.05$ )。Transwell 迁移小室试验结果显示,HL-60 细胞敲除 EZH2 组(siEZH2 组)的下室细胞比例比 HL-60 野生株细胞组(wild 组)和空病毒组(NC 组)明显降低;苏木素染色后发现 siEZH2 组膜上细胞基数明显低于 wild 组和 NC 组。Western blot 检测显示,siRNA 沉默 EZH2 后细胞迁移相关蛋白基质金属蛋白酶 2(MMP-2)表达下调,E-钙黏蛋白(E-cadherin)上调,增殖及凋亡相关蛋白 B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)基因下调,而半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3(caspase-3)上调。**结论** 在 HL-60 细胞中敲除 EZH2 基因后其增殖、迁移能力下降,凋亡增加。

**[关键词]** 急性早幼粒细胞白血病;HL-60;人类同源基因 2;细胞迁移;髓外浸润**[中图分类号]** R557+.3**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2021)10-1653-05

## Effect and mechanism of siRNA silencing EZH2 on migration and proliferation ability of HL-60 cells\*

ZHU Qiu-hua, PAN Xue-yi, ZENG Wen-bin, ZHOU Lan-lan, GUAN Ze-bing<sup>△</sup>

(Department of Hematology, First Affiliated Hospital of Guangdong

Pharmaceutical University, Guangzhou, Guangdong 510080, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effect and mechanism of EZH2 on the migration and proliferation ability of acute promyelocytic leukemia HL-60 cells. **Methods** siRNAs were used to silence the EZH2 gene in HL-60 cells by lentiviral transfection. The effect of three different sequences of siRNA knocking out EZH2 was confirmed by quantitative reverse transcriptase - polymerase chain reaction (QRT-PCR) and Western blot, moreover the optimal sequence was screened out. Subsequently, the cell proliferation activity and apoptosis were detected by cell counting kit-8 (CCK-8) and flow cytometry, the cell migration ability was detected by Transwell migration assay, and the expression levels of migration, proliferation and apoptosis associated proteins were detected by Western blot. **Results** After siRNAs knocking out EZH2 in HL-60 cells, the proliferation ability was decreased ( $P<0.05$ ) and apoptosis was increased ( $P<0.05$ ). The Transwell migration chamber test results showed that the ratio of migrated cells in the lower compartments in EZH2 group (siEZH2 group) was significantly decreased compared with that in the HL-60 wild cells group (wild group) and empty virus group (NC group), and the cells base number on the membrane in the siEZH2 group was significantly lower than that in the wild group and NC group after Hematoxylin staining. The Western blot detection found that after silencing EZH2 by siRNA, the expression of migration-related protein MMP-2 was down-regulated and E-cadherin was up-regulated; and the proliferation and apoptosis related protein B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) gene was down-regulated, while caspase-3 was up-regulated. **Conclusion** After EZH2 knocking out EZH3 gene in HL-60 cells, its proliferation and migration ability is decreased and apoptosis is increased.

\* 基金项目:广东省自然科学基金项目(2017A030313664);广州市越秀区科技计划项目(2017-W S-008)。 作者简介:朱秋花(1989—),住院医师,硕士,主要从事白血病及其髓外浸润的研究。 <sup>△</sup> 通信作者, E-mail: zebingguan@126.com。

**[Key words]** acute promyelocytic leukemia; HL-60; enhancer of zeste homolog 2; cellular migratory; extramedullary infiltration

初诊的急性髓系白血病(AML)患者中有 30%~40% 可伴有髓外浸润(EMI), EMI 主要表现为淋巴结肿大、皮肤结节、齿龈增生、中枢神经系统的侵犯及肝脾肿大等<sup>[1]</sup>。急性早幼粒细胞白血病(APL)占成人 AML 的 10%~15%, 具有特殊的生物学和遗传学特征。APL 常起病较凶险, 有 10%~20% 的患者死于早期出血。EMI 在 APL 中发生不少见, 且研究显示 EMI 与 AML 患者预后差相关<sup>[2]</sup>。作为多梳家族蛋白(PcG)中具有催化活性的亚基, 果蝇 zeste 基因增强子的人类同源基因 2(EZH2)是主要起组蛋白甲基转移酶的作用, 通过甲基化修饰核小体组蛋白 H3K27 位点赖氨酸调节细胞分化、增殖及肿瘤的形成<sup>[3-4]</sup>。有研究发现, EZH2 在多种恶性实体肿瘤如肾癌、肺癌及甲状腺癌转移及预后差相关<sup>[5-7]</sup>, 且有研究报道 EZH2 抑制剂在体外有抗白血病作用<sup>[8]</sup>。但是 EZH2 在白血病的作用及其参与 EMI 的机制研究较少。本课题前期研究证实人 APL 细胞系 HL-60 和 Kasumi-1 细胞均高表达 EZH2, 且已通过实验证实在 Kasumi-1 细胞株中 EZH2 促进其细胞迁移、增殖, 抑制其凋亡<sup>[9]</sup>。本研究旨在探究 EZH2 对 HL-60 细胞迁移、增殖能力的影响及可能的机制, 以为 APL 的表观遗传学治疗提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料及试剂

55 例初治 AML 患者骨髓单个核细胞标本来源于南方医院血液科。HL-60 细胞购自天津血液病研究所。细胞的培养基为含有 10% 新生牛血清(杭州四季青公司, 中国)的 RPIM-1640 培养基(Hyclone, USA), 并添加 100 U/L 青霉素、100 μg/L 链霉素; 在含有 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度条件下进行培养。RNA 提取试剂 Trizol 试剂盒及逆转录试剂盒均购自中国 TaRaRa 公司。EZH2 和 β-actin 基因引物均由上海英俊捷基公司设计并合成。核蛋白/胞浆蛋白试剂盒购自中国弗德生物公司, 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3(caspase-3)单抗、EZH2 单抗、基质金属蛋白酶 2(MMP-2)单抗、H3K27me3 单抗、E-钙黏蛋白(E-cadherin)单抗、B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)单抗、GAPDH 单抗均购自美国 Cell Signaling Technology(CST)公司, 二氨基联苯胺(DAB)显色液购自中国 DAKO 公司。能够敲除 EZH2 的 3 种不同序列小干扰 RNA(siRNA-1: AAC AGC TGC CTT AGC TTC A, siRNA-2: AAC AGC TCT AGA CAA CAA A, siRNA-3: GGA TAG AGA ATG TGG GTT T) 及对照组空病毒(NC: TTC TCC GAA CGT GTC ACG T)购自中国吉凯基因。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)方法检测 EZH2 表达

qRT-PCR 方法检测 AML 患者骨髓 EZH2 mRNA 的表达水平, 并分析其表达与临床特征的关系。

#### 1.2.2 建立敲除 EZH2 的 HL-60 细胞株

6 孔板接种对数生长期的 HL-60 细胞, 使每个孔细胞数为  $1 \times 10^5$  个, HL-60 细胞分别用 3 种不同序列 siRNA 的慢病毒(分别为 siRNA-1 组、siRNA-2 组、siRNA-3 组)及空载体慢病毒(为 NC 组, 而未转染的 HL-60 则为 wild 组)转染, 培养 72 h 后在荧光显微镜下拍照。随后流式细胞术用来检测细胞的绿色荧光蛋白(GFP)转染率, 并筛选出 GFP 阳性的细胞, 用 qRT-PCR 及 Western blot 验证 3 个不同序列的 siRNA 敲除 EZH2 的效果并筛选出最佳序列记为 siEZH2 组, 体外扩大培养。

#### 1.2.3 Transwell 实验检测细胞迁徙能力

细胞的迁移能力用 Transwell 迁移小室实验来检测, 小室基底膜的孔径为 8 μm。HL-60 的 3 个处理组细胞株(wild、NC 和 siEZH2 组), 用磷酸缓冲盐溶液(PBS)分别洗涤细胞 2 次, RPIM-1640 培养基重悬细胞使细胞浓度为  $3 \times 10^6$  个/L。分别取  $3 \times 10^5$  个细胞接种到 Transwell 小室的上室。下室加入 500 μL 各自细胞所需含有血清的正常培养基, 在含有 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度条件下培养 18 h 后, 对迁移到下室的细胞进行计数。同上处理各组细胞, 培养时间为 10 h。取出小室, 用苏木素对小室膜上细胞进行染色, 选择相同位置的 5 个视野进行计数并拍照。上述实验均重复 3 次。

#### 1.2.4 CCK8 检测细胞增殖活性

CCK8 实验用来检测细胞的增殖活性, 将 HL-60 的 wild、NC、siEZH2 3 组对数生长期的细胞接种于 96 孔板, 调整每孔细胞数为  $1 \times 10^4$  个, 各组设 3 个复孔。分别于 0、24、48、72、96 h 后加入 CCK8 试剂, 培养 3 h 后在酶标仪下测定各孔 450 nm 吸光度(A)值, 以上试验重复 3 次。

#### 1.2.5 流式细胞术检测细胞凋亡

细胞凋亡用细胞凋亡双标检测试剂盒膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素/碘化丙啶(Annexin V-APC/PI)检测, 用 PBS 液漂洗 wild、NC、siEZH2 3 组细胞,  $1 \times$  Binding Buffer 漂洗细胞 1 次离心弃上清液, 随后用 100 μL  $1 \times$  Binding Buffer 重悬 3 组细胞, 加 5 μL Annexin V-APC, 室温光孵育 15 min。  $1 \times$  Binding Buffer 漂洗细胞 1 次之后离心弃上清液, 在 200 μL  $1 \times$  Binding Buffer 重悬的 3 组细胞中加入 5 μL PI; 用流式细胞仪来检测细胞凋亡。

#### 1.2.6 qRT-PCR 及 Western blot 方法检测相关基

因及蛋白表达

采用 qRT-PCR 方法检测相关基因表达,具体方法同本课题组前期研究<sup>[10-11]</sup>。Western blot 方法来测定相关蛋白,取 HL-60 的 wild、NC、siEZH2 3 组细胞提取蛋白,蛋白浓度用二喹啉甲酸(BCA)法检测,行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)之后转膜,加入一抗在 4 °C 冰箱孵育过夜,次日洗膜之后加入二抗孵育 2 h。以 GAPDH 为内参,化学发光显色后拍照分析 EZH2、组蛋白 H3 第 27 位赖氨酸上三甲基化(H3K27me3)、MMP-2 及 E-cadherin 蛋白表达水平。

1.3 统计学处理

数据用 SPSS13.0 软件分析,用 2<sup>-ΔCT</sup> 表示 EZH2 mRNA 表达水平,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,符合正态分布的两组比较采用 *t* 检验(方差齐时)或校正 *t* 检验(方差不齐时);多组间比较采用 One-Way ANOVA 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 AML 患者 EZH2 表达水平与临床特征的关系

55 例 AML 患者 EZH2 表达与临床特征的关系,在 AML 中高表达 EZH2 患者 EMI 发生率明显升高

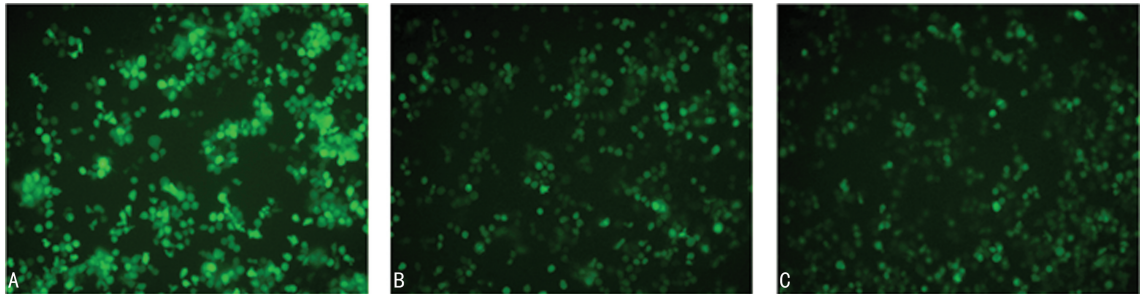
(*P* < 0.01),见表 1。

2.2 各组细胞 EZH2 的表达水平比较

在 HL-60 细胞中转染载有不同 siRNA 片段的慢病毒,培养 72 h,荧光显微镜下拍照,见图 1。qRT-PCR 及 Western blot 检测 EZH2 基因及蛋白表达均下调。siRNA-1 组 EZH2 mRNA(0.003 0 ± 0.000 2)明显低于 siRNA-3 组(0.004 3 ± 0.000 1)和 siRNA-2 组(0.006 4 ± 0.000 6),差异均有统计学意义(*P* < 0.001)。其中以 siRNA-1(序列 AAC AGC TGC CTT AGC TTC A)下调 HL-60 细胞的 EZH2 最明显,Western blot 检测结果与 PCR 结果一致,流式筛选 siRNA-1 组 GFP 阳性细胞体外扩大培养用于后续实验,随后检测 NC、siEZH2、wild 3 组细胞 EZH2 的表达,qRT-PCR 及 Western blot 结果均显示,siEZH2 组 EZH2 表达均明显低于 NC 组及 wild 组(*P* < 0.001),见图 2。

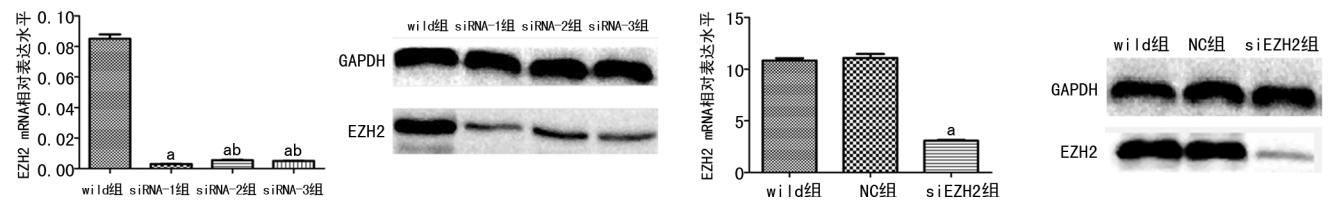
2.3 各组 HL-60 细胞增殖活性及凋亡率比较

CCK8 实验提示在 HL-60 细胞中敲除 EZH2 后 siEZH2 组的增殖能力明显下降(*P* < 0.05)。通过流式细胞术检测细胞凋亡,发现 siEZH2 组细胞凋亡明显增加(*P* < 0.05),见图 3。



A: siRNA-1 组; B: siRNA-2 组; C: siRNA-3 组。

图 1 荧光显微镜下拍照观察细胞 GFP 表达(×200)



a: *P* < 0.001, 与 wild 组比较; b: *P* < 0.001, 与 siRNA-1 组比较。

图 2 Western blot 和 qRT-PCR 检测 EZH2 的表达水平

表 1 AML 患者 EZH2 表达与临床特征关系

项目	n	低表达(n=23)	高表达(n=32)	χ <sup>2</sup> /Z	P
性别(男/女)	55	5/18	21/11	10.340	0.001
年龄 <sup>▲</sup>	55	31.09	25.78	1.213	0.225
BM% <sup>▲</sup>	55	26.39	29.16	-0.631	0.526
PB% <sup>▲</sup>	54	22.50	31.21	-2.012	0.044
WBC <sup>▲</sup>	55	22.11	32.23	-2.312	0.021
LDH(正常/升高)	47	8/12	3/24	3.859	0.049
EMI(无/有)	55	18/5	7/25	17.160	0.001
核型(正常/复杂)	38	12/2	23/1	0.242	0.623

续表 1 AML 患者 EZH2 表达与临床特征关系

项目	n	低表达(n=23)	高表达(n=32)	χ <sup>2</sup> /Z	P
预后(低/中/高)	47	2/15/2	4/22/2	0.278	0.870
诱导(DA/IA) <sup>#</sup>	55	10/13	18/14	0.873	0.350
巩固(a/b/c)	44	6/6/6	15/1/10	7.495	0.024

▲: 平均秩; #: 诱导方案中 8 例 HA 合并到 DA, 3 例 MA 合并到 IA; BM%: 骨髓原始细胞比例; PB%: 外周血原始细胞比例; a: 诱导方案联合小于 4 个疗程的中、大剂量阿糖胞苷(MD/HD-Ara-C); b: 诱导方案联合大于或等于 4 个疗程 MD/HD-Ara-C 或自体造血干细胞移植(auto-HSCT); c: 诱导方案联合异基因 HSCT(allo-HSCT)。

## 2.4 各组 HL-60 细胞敲除 EZH2 后细胞迁移能力比较

Transwell 迁移实验中 siEZH2 组的下室细胞比例[(4.50±0.26)%]明显低于 wild 组[(9.05±

0.30)%]和 NC 组[(9.03±0.27)%], 差异有统计学意义( $P<0.001$ ); 苏木素染色后发现 siEZH2 组小室膜上细胞基数比 wild 组和 NC 组明显降低, 差异有统计学意义( $P=0.001$ ), 见图 4。

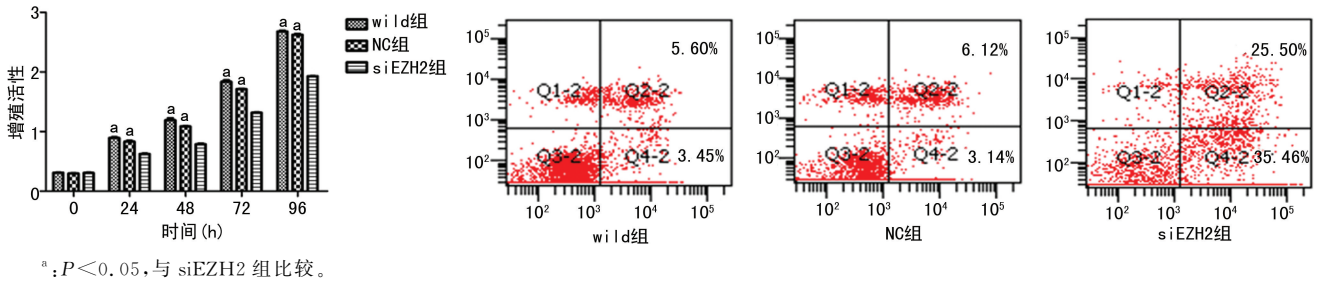


图3 CCK8及流式细胞术检测HL-60细胞增殖及凋亡

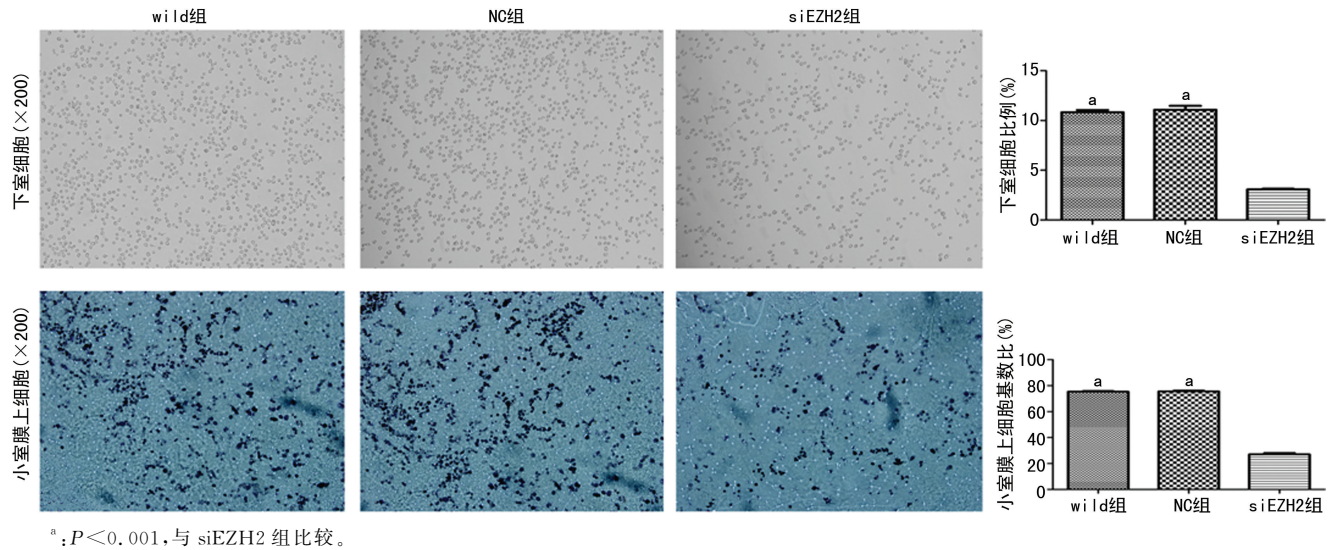


图4 Transwell实验检测HL-60细胞的迁移能力

## 2.5 各组 HL-60 细胞敲除 EZH2 后 H3K27me3 和 MMP-2 蛋白水平比较

在 HL-60 细胞中敲除 EZH2, H3K27me3 和 MMP-2 蛋白均明显下调( $P<0.05$ ), 而 E-cadherin 则上调( $P<0.05$ ), 同时发现 EZH2 下调后抗凋亡蛋白 Bcl-2 亦下调, 而细胞凋亡途径关键蛋白 caspase-3 上调, 见图 5。

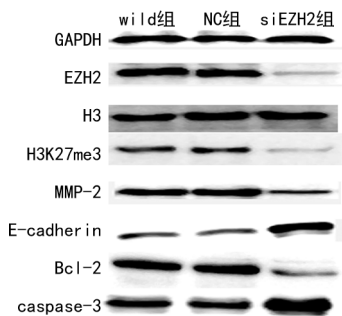


图5 Western blot检测相关蛋白表达

## 3 讨论

EZH2 作为 PcG 蛋白家族成员之一, 在多种肿瘤中起原癌基因作用。EZH2 参与调节细胞分化、增殖及肿瘤的形成<sup>[3]</sup>, 有研究显示 EZH2 与多种实体肿

瘤迁移能力相关<sup>[5-7]</sup>。APL 为白血病中一种特殊类型, EMI 发生率较高, EMI 中以中枢浸润较常见, 一旦发生中枢侵犯预后较差。目前国内外有关 APL 与 EZH2 的关系及其 EMI 机制研究极少。本课题组前期研究已证实 APL 细胞株 HL-60 及 Kasumi-1 存在 EZH2 高表达, 且在 Kasumi-1 细胞中证实敲除 EZH2 细胞凋亡增加, 增殖减慢, 机制研究显示 EZH2 通过调控 E-cadherin 蛋白及 p-ERK/p-cmyc/MMP-2 通路影响细胞迁移<sup>[9-10]</sup>。且 TANAKA 等<sup>[11]</sup> 研究显示, 在 HL-60 细胞中下调 EZH2 可抑制其增殖。因此, 本研究猜测 EZH2 与 APL 细胞增殖、凋亡及迁移相关。本研究旨在探究在 HL-60 中敲除 EZH2 对细胞的增殖、凋亡及迁移的影响及其可能的机制。

相对于实体肿瘤的迁移而言, 在白血病中则表现为 EMI, 白血病一旦发生 EMI 则预后较差。MMPs、黏附分子、趋化因子及 E-cadherin 异常表达均可影响白血病细胞 EMI。当骨髓中白血病细胞表面的黏附因子表达异常时其黏附能力下降促使细胞趋化黏附于血管内皮上, 进而分泌 MMPs 促使细胞外基质降解, 最终细胞迁移至骨髓外导致 EMI<sup>[12-14]</sup>。相关研究

表明,在 AML 中 EMI 的发生亦与 MMPs 表达增加密切相关<sup>[15-16]</sup>。EZH2 可通过甲基化肾癌、口腔癌细胞核小体组蛋白下调 E-cadherin 表达从而增强细胞的转移能力<sup>[5,17]</sup>。本研究结果显示,在 HL-60 细胞中敲除 EZH2 后 E-cadherin 表达上调,MMP-2 下调,细胞迁移能力减弱。因此,本研究认为 EZH2 可能通过上调 HL-60 细胞的 MMP-2 降解细胞外基质或通过下调 E-cadherin 来增强 APL 细胞迁移能力。

EZH2 主要通过甲基化周期蛋白、抑癌基因等靶基因参与调节细胞分化增殖及肿瘤的形成<sup>[4]</sup>。林璐慧等<sup>[18]</sup>研究发现,敲除 EZH2 后 HL-60 细胞中 H3K27me3 亦下调从而导致 Bcl-2 下调促进细胞凋亡。Bcl-2 是一种癌基因,具有抑制凋亡的作用。有研究报道,在 HL-60 细胞存在 Bcl-2 过表达,抑制 Bcl-2 的表达能够增加细胞凋亡关键基因 caspase-3 活性,进而抑制细胞增殖并促进其凋亡<sup>[19]</sup>。本研究发现,敲除 EZH2 后 HL-60 细胞的增殖减弱、凋亡增加。本研究认为,敲除 EZH2 后对组蛋白 H3K27 的甲基化作用减弱,进而其对靶基因抑制作用减弱,从而引起 Bcl-2 下调及 caspase-3 上调。

综上所述,EZH2 可能通过上调 Bcl-2 及下调 caspase-3 促进 HL-60 细胞增殖并抑制其凋亡。临床中使用去甲基化药物如地西他滨及阿扎胞苷治疗白血病可能基于表观遗传学调控,这为将来使用 EZH2 抑制剂或其他类型去甲基化药物治疗白血病提供一定理论基础,更深的机制研究仍需进一步探究。在 APL 细胞株(HL-60)中敲除 EZH2 能有效抑制其增殖和迁移能力,并促进其凋亡,且 EZH2 可能通过 MMP-2 及 E-cadherin 影响 HL-60 细胞的迁移能力,EZH2 可能通过调节 Bcl-2 及 caspase-3 影响 HL-60 细胞增殖凋亡,这将为 APL 表观遗传学治疗提供新靶点。

## 参考文献

- [1] HIÇSÖNMEZ G, ÇETİN M, TUNCER A M, et al. Children with acute myeloblastic leukemia presenting with extramedullary infiltration: the effects of high-dose steroid treatment[J]. *Leuk Res*, 2004, 28(1): 25-34.
- [2] KOBAYASHI R, TAWA A, HANADA R, et al. Extramedullary infiltration at diagnosis and prognosis in children with acute myelogenous leukemia[J]. *Pediatr Blood Cancer*, 2007, 48(4): 393-398.
- [3] CAO R, WANG L, WANG H, et al. Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing[J]. *Science*, 2002, 298(5595): 1039-1043.
- [4] NAKAGAWA S, OKABE H, SAKAMOTO Y, et al. Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) promotes progression of cholangiocarcinoma cells by regulating cell cycle and apoptosis[J]. *Ann Surg Oncol*, 2013, 20(S3): 667-675.
- [5] LIU L, XU Z, ZHONG L, et al. Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) promotes tumour cell migration and invasion via epigenetic repression of E-cadherin in renal cell carcinoma[J]. *BJU Int*, 2016, 117(2): 351-362.
- [6] XIA L, ZHU X, ZHANG L, et al. EZH2 enhances expression of CCL5 to promote recruitment of macrophages and invasion in lung cancer[J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2020, 67(6): 1011-1019.
- [7] XUE L, YAN H, CHEN Y, et al. EZH2 upregulation by ER $\alpha$  induces proliferation and migration of papillary thyroid carcinoma [J]. *BMC Cancer*, 2019, 19(1): 1094.
- [8] 常乃柏. DNA 甲基化靶向药物在急性髓系白血病中的应用[J]. *中国肿瘤临床*, 2017, 44(2): 64-67.
- [9] ZHU Q, ZHANG L, LI X, et al. Higher EZH2 expression is associated with extramedullary infiltration in acute myeloid leukemia[J]. *Tumor Biology*, 2016, 37(8): 11409-11420.
- [10] 张灵秀. 急性髓系白血病细胞 EZH2 的表达及其与临床关系的研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2014.
- [11] TANAKA S, MIYAGI S, SASHIDA G, et al. Ezh2 augments leukemogenicity by reinforcing differentiation blockage in acute myeloid leukemia[J]. *Blood*, 2012, 120(5): 1107-1117.
- [12] FAAIJ C M J M, WILLEMZE A J, RÉVÉSZ T, et al. Chemokine/chemokine receptor interactions in extramedullary leukaemia of the skin in childhood AML: Differential roles for CCR2, CCR5, CXCR4 and CXCR7[J]. *Pediatr Blood Cancer*, 2010, 55(2): 344-348.
- [13] JIANG L, YU G, MENG W, et al. Overexpression of amyloid precursor protein in acute myeloid leukemia enhances extramedullary infiltration by MMP-2 [J]. *Tumor Biology*, 2013, 34(2): 629-636.
- [14] WANG C, CHEN Z, LI Z, et al. The essential roles of matrix metalloproteinase-2, membrane type 1 metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in the invasive capacity of acute monocytic leukemia SHI-1 cells[J]. *Leuk Res*, 2010, 34(8): 1083-1090. (下转第 1662 页)

- Prevalence of hypothyroidism in patients with type 2 diabetes mellitus and hypertension in India: a cross-sectional observational study [J]. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2019, 3(12):369-376.
- [2] RAMIREZ A K, DANKEL S, CAI W, et al. Membrane metallo-endopeptidase (Neprilysin) regulates inflammatory response and insulin signaling in white preadipocytes [J]. *Mol Metab*, 2019, 4(22): 21-36.
- [3] RAO Z, ZHENG L, HUANG H, et al.  $\alpha$ -Klotho expression in mouse tissues following acute exhaustive exercise [J]. *Front Physiol*, 2019, 12(10):1498-1508.
- [4] 张校康, 李宝新, 李娜, 等. 血清 Adropin 蛋白和脑啡肽酶在 2 型糖尿病视网膜病变患者中的变化及影响因素 [J]. *国际眼科杂志*, 2020, 20(3): 504-508.
- [5] 张加生, 张丽丽, 周卫国, 等. 慢性病患者 10 年心脑血管疾病发病平均风险评估及其与眼底病变的关系研究 [J]. *中国全科医学*, 2019, 22(19): 2351-2355.
- [6] 苏馨. 高血压合并糖尿病血压控制的探讨 [J]. *重庆医学*, 2018, 47(16):2219-2222.
- [7] GUTTA S, GROBE N, KUMBAJI M, et al. Increased urinary angiotensin converting enzyme 2 and neprilysin in patients with type 2 diabetes [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2018, 315(2): 263-274.
- [8] SINGH P, VIJAYAKUMAR S, KALOGEROPOULOS A, et al. Multiple avenues of modulating the nitric oxide pathway in heart failure clinical trials [J]. *Curr Heart Fail Rep*, 2018, 15(2):44-52.
- [9] KIM J, HAN D, BYUN S H, et al. Neprilysin facilitates adipogenesis through potentiation of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) signaling pathway [J]. *Mol Cell Biochem*, 2017, 430(1/2):1-9.
- [10] JORDAN J, STINKENS R, JAX T, et al. Improved insulin sensitivity with angiotensin receptor neprilysin inhibition in individuals with obesity and hypertension [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2017, 101(2): 254-263.
- [11] UIJL E, HART D C, ROKSNOER L, et al. Angiotensin-neprilysin inhibition confers renoprotection in rats with diabetes and hypertension by limiting podocyte injury [J]. *J Hypertens*, 2020, 38(4):755-764.
- [12] SILVA A P, MENDES F, CARIAS E, et al. Plasma klotho and FGF23 levels as biomarkers of CKD-Associated cardiac disease in type 2 diabetic patients [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(7):1536-1548.
- [13] SAVVOULIDI P, KALOGEROPOULOS A P, RAPTIS V, et al. Calcification of coronary arteries and aortic valve and circulating a-klotho levels in patients with chronic kidney disease [J]. *J Thorac Dis*, 2020, 12(3):431-437.
- [14] GARTH J, EASTER M, SKYLAR H E, et al. The effects of the anti-aging protein klotho on mucociliary clearance [J]. *Front Med (Lausanne)*, 2020, 1(6):339-346.
- [15] CITTERIO L, DELLI C S, LUPOLI S, et al. Klotho gene in human salt-sensitive hypertension [J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2020, 15(3): 375-383.
- [16] JI B, WEI H, DING Y, et al. Protective potential of klotho protein on diabetic retinopathy: Evidence from clinical and in vitro studies [J]. *J Diabetes Investig*, 2020, 11(1):162-169.
- (收稿日期:2020-06-18 修回日期:2020-12-16)
- (上接第 1657 页)
- [15] JANOWSKA-WIECZOREK A, MARQUEZ L A, MATSUZAKI A, et al. Expression of matrix metalloproteinases (MMP-2 and -9) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1 and -2) in acute myelogenous leukaemia blasts: comparison with normal bone marrow cells [J]. *Br J Haematol*, 1999, 105(2):402-411.
- [16] 李晟, 陈子兴, 王玮, 等. 明胶酶 A 在急性白血病细胞中的表达及其临床意义 [J]. *中华内科杂志*, 2003, 42(10):684-687.
- [17] WANG C, LIU X, CHEN Z, et al. Polycomb group protein EZH2-mediated E-cadherin repression promotes metastasis of oral tongue squamous cell carcinoma [J]. *Mol Carcinog*, 2013, 52(3):229-236.
- [18] 林璐慧, 黄轶群, 马旭东. RNA 干扰沉默 EZH2 基因对 HL-60 细胞增殖、凋亡及组蛋白甲基化、乙酰化的影响 [J]. *中华血液学杂志*, 2017, 38(3):249-252.
- [19] LIU J, YAO Y, DING H, et al. Oxymatrine triggers apoptosis by regulating Bcl-2 family proteins and activating caspase-3/caspase-9 pathway in human leukemia HL-60 cells [J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(6):5409-5415.
- (收稿日期:2020-06-21 修回日期:2020-11-26)