

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.001673

骨肉瘤细胞中 KDM5C 与有丝分裂期纺锤体 组装检查点关系的研究

戴 威,何衍信,李浩可,高彦飞,邓忠良
(重庆医科大学附属第二医院骨科,重庆 400010)

【摘要】目的:探讨赖氨酸特异性去甲基化酶 5C(lysine-specific demethylase 5C, KDM5C)在骨肉瘤细胞有丝分裂期的变化及其对有丝分裂期纺锤体组装检查点(spindle assembly checkpoint, SAC)的调控。**方法:**利用细胞周期同步化方法,收集不同骨肉瘤细胞系有丝分裂期各时间节点的细胞样品,利用 Western blot 检测各时间点 KDM5C 蛋白质含量的变化及其翻译后修饰与有丝分裂期进程的关系;并用特异性抑制剂 CPI-455 抑制 KDM5C 的去甲基化转移酶活性,利用 Western blot 检测有丝分裂期进程中抑制 KDM5C 的去甲基化酶活性对 SAC 相关标志蛋白细胞分裂周期蛋白-27(cell division cycle protein 27, cdc27)、周期蛋白 B1(Cyclin B1)的影响。**结果:**在有丝分裂进程中,与 SAC 相关的标志蛋白 cdc27 的磷酸化滞后条带的位移变化和 Cyclin B1 的蛋白降解均与文献报道相似,但 KDM5C 蛋白含量无明显变化;KDM5C 截短体表达未观察到明显的位移减慢或泛素化降解条带;抑制其去甲基化酶活性后,相较对照组,标志蛋白 cdc27 的去磷酸化曲线和 Cyclin B1 降解曲线未见明显变化。**结论:**在骨肉瘤细胞系有丝分裂期中, KDM5C 的蛋白质含量不随有丝分裂期进程而改变,抑制其去甲基化酶活性不影响对 SAC 的灭活。

【关键词】KDM5C;有丝分裂;骨肉瘤;纺锤体组装检查点

【中图分类号】R34

【文献标志码】A

【收稿日期】2017-11-24

Association of KDM5C with SAC on mitosis of osteosarcoma

Dai Wei, He Yanji, Li Haoke, Gao Yanfei, Deng Zhongliang

(Department of Orthopedic Surgery, The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the alteration of Lysine-specific demethylase 5C(KDM5C) protein level and the regulatory effect of KDM5C on spindle assembly checkpoint(SAC), related mitotic progression of osteosarcoma cell lines. **Methods:** The various osteosarcoma cells in prometaphase were collected by synchronization. The alteration of KDM5C protein level and its potential posttranslational modification in mitosis were determined by Western blot. The effect of inhibitor CPI-455 on mitosis process was detected using Western blot. **Results:** In mitosis, the alterations of SAC related markers, cell division cycle protein 27(cdc27) and Cyclin B1, were similar to previous literatures, but KDM5C protein level had no obvious change. The shift and ubiquitination of KDM5C truncations were not observed by Western bolt. When demethylase activity of KDM5C was inhibited by CPI-455, SAC related markers, cdc27 and Cyclin B1, had no obvious change. **Conclusion:** Mitotic process of osteosarcoma cell and the SAC is unaffected by KDM5C protein level and its demethylase activity.

【Key words】lysine-specific demethylase 5C; mitosis; osteosarcoma; spindle assembly checkpoint

骨肉瘤是骨科疾病中最常见的原发性恶性肿瘤,具有发病低龄化、易发生远处转移、进展迅速、恶性程度高等特点^[1]。选择针对细胞周期调控靶点

的化疗药物是治疗骨肉瘤原发灶和转移病变的重要手段^[2]。其中,针对有丝分裂期的长春碱类,因其外周神经毒性、骨髓抑制等副作用限制了这类药物的使用。因此,研究骨肉瘤细胞的有丝分裂期调控可为新药研发和骨肉瘤治疗提供理论基础。

纺锤体组装检查点(spindle assembly checkpoint, SAC)作为有丝分裂期的关键调控之一,受到许多研究者的关注。SAC 主要通过抑制后期促进复合物

作者介绍:戴 威, Email: 361716910@qq.com,

研究方向:骨肉瘤的研究和治疗。

通信作者:邓忠良, Email: zhongliang.deng@qq.com。

基金项目:国家自然科学基金青年基金资助项目(编号:C050201)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180503.1344.020.html>
(2018-05-03)

(anaphase promoting complex, cyclosome, APC/C) 的泛素 E3 酶活性, 控制姐妹染色单体分向 2 个子细胞的进程, 以确保染色体在亲代与子代之间稳定遗传。Schibler 等^[3]在酵母中发现着丝粒附近组蛋白 H3 第 4 位赖氨酸残基的甲基化(histone 3 lysine 4 mono-/di-/trimethylation, H3K4me/me2/me3)能够抑制 SAC 的活性, 促进有丝分裂期细胞从中期向后期转化。赖氨酸特异性去甲基化酶 5C(lysine-specific demethylase 5C, KDM5C) 又称 JARID1C 或 SMCX, 能够特异性催化 H3K4me3/me2 的去甲基化, 调节染色体上的 H3K4me3 水平。研究报道 KDM5C 与多种肿瘤相关^[4-5]。但 KDM5C 与骨肉瘤的关系, 尤其是对有丝分裂期的影响尚不清楚。Rondinelli 等^[6]发现宫颈癌细胞系 HeLa 中 KDM5C 蛋白含量在有丝分裂前中期开始降低至 G₁ 早期重新升高, 呈现有丝分裂期依赖的波动性变化。因此认为, KDM5C 可能参与了骨肉瘤细胞有丝分裂期调控。

本研究对多种骨肉瘤细胞系进行细胞周期同步化, 分析了 KDM5C 蛋白质含量在骨肉瘤细胞有丝分裂期进程中的表达情况, 并分析了 KDM5C 在有丝分裂进程中的潜在转录后修饰和其去甲基化转移酶活性对骨肉瘤细胞系有丝分裂期进程的影响。

1 材料和方法

1.1 主要材料

实验所用细胞来源于中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库, 稳定表达 H2B-GFP 的 MG-63 亚细胞系为本实验室构建; DMEM、MEM 培养基和胎牛血清分别来源于 Hyclone 和 Gibco 公司; 抑制剂 CPI-455 来源于 Selleck 公司。

1.2 细胞培养

HEK293T、SaoS2、U2OS 细胞在含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中培养; HeLa、MG-63 细胞在含有 10% 胎牛血清、1% 丙酮酸钠的 MEM 培养基中培养。所有培养细胞均置于 5% CO₂、37 °C 的恒温恒湿培养箱中培养。

1.3 Thymidine -Nocodazole 细胞同步化法

将 HeLa 或其他 3 种骨肉瘤细胞系(SaoS2、U2OS、MG-63)接种于培养皿中; 至细胞密度 40%~50% 时, 换为含终浓度 2.5 mmol/L Thymidine 的培养基同步化处理 22 h; 移除含 Thymidine 的培养基, 用预热的 PBS 洗 2 次, 加入含终浓度 100 ng/mL Nocodazole 新鲜培养基同步化处理 14 h(细胞同步化至有丝分裂前中期); 用移液管均匀力度吹落并收集变圆的有丝分裂期细胞(Shake-off 法), 随后将收集的细胞释放到新鲜培养基中, 继续培养并在相应时间节点收取细胞。

1.4 双 Thymidine 阻滞释放到 Nocodazole 的细胞同步化法

将 MG-63 细胞接种于 6 孔板中, 至细胞密度 40%~50%

时, 换为含终浓度 2.5 mmol/L Thymidine 的培养基同步化处理 19 h; 移除含 Thymidine 的培养基, 用预热的 PBS 洗 2 次, 加入新鲜培养基培养 6 h; 再次加入含终浓度 2.5 mmol/L Thymidine 的培养基同步化处理 20 h(细胞同步化至 S 前期), 随后释放到含有终浓度 100 ng/mL Nocodazole 的新鲜培养基中, 继续培养并在相应时间节点收取细胞。

1.5 Western blot 杂交

按细胞量加入适量体积 Lysis Buffer, 4 °C 裂解 20 min, 加入等体积 2×Loading Buffer, 100 °C 煮沸 10 min, 使蛋白充分变性; 蛋白样品经电泳、转膜至 PVDF 膜上; 5% 脱脂奶粉封闭 1 h; 室温孵育 1 h 或 4 °C 过夜孵育一抗; 室温孵育二抗 1 h; ECL 显影。

1.6 截短体 KDM5C 质粒构建

1.6.1 引物序列 用于构建截短体的引物分别为: KDM5C-N 上游: 5'-CGGAATTCATGGAGCCGGGGTCC-3'; 下游: 5'-GCTCTAGATCAATGGGAGAAGACGCAGTATCT-3'; KDM5C-M 上游: 5'-CGGAATTCGAGGAGCTTATCTGCAAGATGG-3'; 下游: 5'-GCTCTAGATCACTCCAGCAGCGTGTAGCAAG-3'; KDM5C-C 上游: 5'-CGGAATTCGTTCTCTGCCCATGTGCAGA-3'; 下游: 5'-GCTCTAGATCACAACTGTTGCTGAGGCG-3'。

1.6.2 目的片段的制备 以 MSCV-dGFP-KDM5C 质粒为模板, 用常规 PCR 方法扩增目的片段, 条件为: 95 °C, 2 min; 95 °C, 1 min; 55 °C, 1 min; 72 °C, 2.5 min, 40 个循环数; 72 °C, 2 min; 将 PCR 产物上样到琼脂糖凝胶孔内, 放入 120 V, 300 mA 的电场中跑胶 25 min; 切下目的条带, 用胶回收试剂盒回收 DNA 片段; 用 *EcoR* I 和 *Xba* I 限制性内切酶在 37 °C 条件下对目的片段进行酶切。

1.6.3 载体处理与连接 以 p3XFLAG-CMV-10 质粒为载体, 用 *EcoR* I 和 *Xba* I 限制性内切酶 37 °C 对载体进行酶切; 酶切产物上样到琼脂糖凝胶孔内, 放入 120 V, 300 mA 的电场中跑胶 25 min; 切下目的条带, 用胶回收试剂盒回收载体片段。将制备好的目的片段和载体片段用 T4 DNA 连接酶 16 °C, 连接过夜。

1.6.4 大肠杆菌转化与鉴定 大肠杆菌 DH5 α 感受态 30 μ L 冰上融化; 加入 2 μ L 连接产物, 混匀, 冰上放置 30 min; 42 °C 热激 90 s; 冰上放置 5 min; 加入 700 μ L LB 培养基, 37 °C, 180 r/min, 1 h; 选择含氨苄西林抗性的培养基平板, 37 °C 倒置培养 12~16 h; 挑单克隆测序。

1.7 活细胞实时荧光共聚焦显微镜观察

将稳定表达 H2B-GFP 的 MG-63 细胞株种于 4 孔的腔室盖玻片系统中, 扫描前细胞密度达 60%~70%, 图像每 10 min 采集一次, 共采集 7 h。488 nm 通道曝光时间为 0.1 s, 扫描宽度上下共 10 μ m, 采集 8 层。采用 60 倍物镜的 Leica SP8 双扫描模式激光共聚焦显微镜进行图像采集。腔室载玻片系统置于 37 °C、5% CO₂ 的恒温培养小室内。

1.8 统计学处理

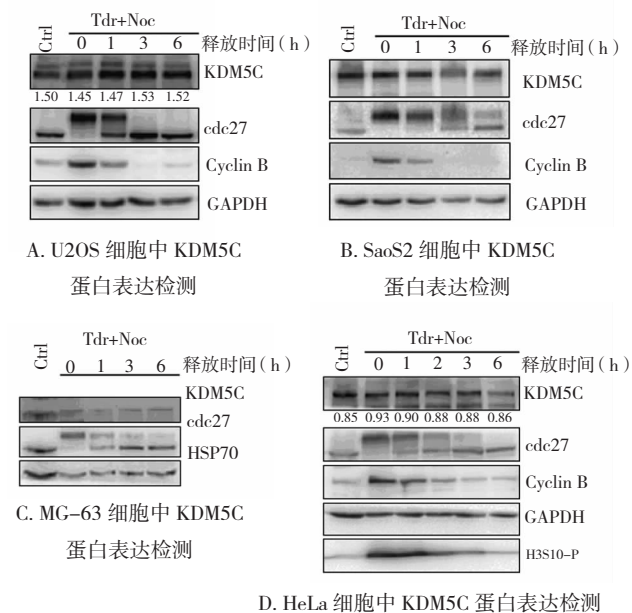
原始数据均录入 Excel 2007, 采用 SPSS 20.0 软件进行统

计分析。二分类变量资料采用卡方检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 观察有丝分裂前中期到 G₁ 早期 KDM5C 蛋白质含量的变化

经 Thymidine-Nocodazole 细胞同步化处理,激活 SAC 将细胞阻滞于有丝分裂前中期,观察从有丝分裂前中期到 G₁ 早期的细胞周期进程(出有丝分裂期)中 KDM5C 蛋白质含量的变化和 SAC 激活后 KDM5C 的蛋白表达水平。发现在 U2OS、SaoS2 和 MG-63 三种不同骨肉瘤细胞系中细胞分裂周期蛋白-27(cell division cycle protein 27,cdc27)在有丝分裂前中期因发生磷酸化而出现条带滞后上移,并伴随后期开始(SAC 灭活和 APC/C 激活)逐步发生去磷酸化,直至出有丝分裂期。Cyclin B1 的蛋白含量随着后期开始逐渐下降,呈现与文献报道相似的变化^[7-8],表明同步化释放后细胞周期能够正常进行,但 KDM5C 蛋白质表达水平无明显变化(图 1A、B、C)。Rondinelli 等^[9]报道,在宫颈癌细胞系 HeLa 中 KDM5C 蛋白水平呈有丝分裂期依赖的波动性变化。为验证文献报道本研究在 HeLa 细胞中重复相关实验,但并未观察到 KDM5C 蛋白水平的明显变化(图 1D)。



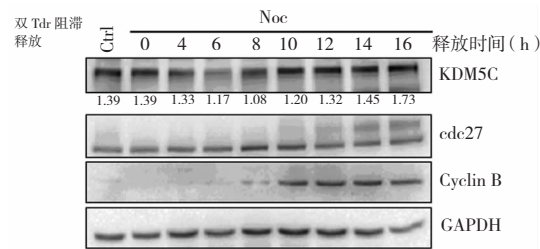
注:Tdr,Thymidine;Noc:Nocodazole;Ctrl,未经同步化的细胞;KDM5C条带下方数字为每组 KDM5C 与对应 GAPDH 灰度值之比

图 1 有丝分裂前中期到 G₁ 早期 KDM5C 蛋白质含量的变化情况

2.2 观察 G₂ 期到有丝分裂前中期 KDM5C 蛋白质含量的变化

2.1 中所采用的细胞同步化方法是为了激活 SAC 将细胞阻滞于有丝分裂前中期,观察周期继续进行的过程,即 SAC 激活之后的过程。此部分采用双 Thymidine 阻滞释放到

Nocodazole 的细胞同步化法,观察细胞从 G₂ 期进入有丝分裂期(SAC 激活之前)KDM5C 的蛋白质表达水平。Western blot 检测发现在 MG-63 骨肉瘤细胞中,Cyclin B1 在进入有丝分裂期前大量富集(8 h)并在随后持续增高,在此过程中 KDM5C 的蛋白质含量无明显变化(图 2)。

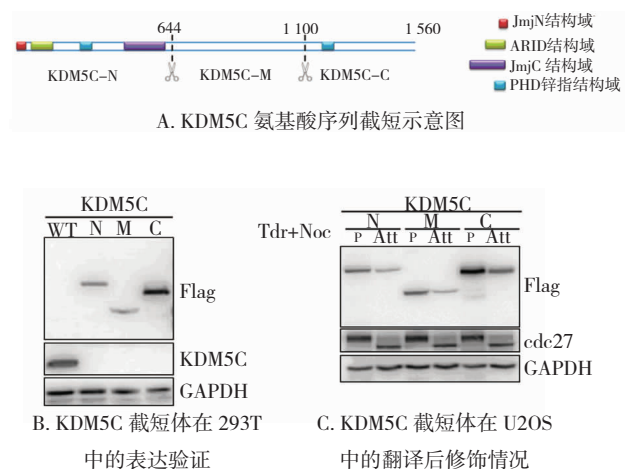


注:KDM5C 条带下方数字为每组 KDM5C 与对应 GAPDH 灰度值之比

图 2 G₂ 期到有丝分裂前中期 KDM5C 的蛋白质含量的变化情况

2.3 KDM5C 有丝分裂期依赖的翻译后修饰情况

Peng 等^[10]研究表明,H3K4me/me2 的去甲基化酶 LSD1 在有丝分裂期磷酸化后可观察到位移条带。因此猜测 KDM5C 在有丝分裂期可能也发生了磷酸化、泛素化等翻译后修饰。由于 KDM5C 本身的分子量较大,约 180 kD,超出 Western blot 的常规检测范围,于是采用外源转染 KDM5C 截短体的方法,分段验证这一假设。以 MSCV-dGFP-KDM5C 质粒为模板,构建包含不同结构域的截短体质粒(图 3A),并均能在 HEK293T 细胞中表达出相应截短体蛋白质(图 3B)。Thymidine-Nocodazole 细胞同步化处理后,采用 Shake-off 法收集悬浮细胞(有丝分裂前中期)及贴壁细胞(G₂ 期)。Western blot 检测骨肉瘤细胞系 U2OS 中 KDM5C 截短体的翻译后修饰情况,并未观察到明显的位移减慢或泛素化降解条带(图 3C)。



注:WT,野生型 KDM5C;N:截短体 KDM5C-N;M:截短体 KDM5C-M;C:截短体 KDM5C-C;P:有丝分裂前中期的细胞;Att,Nocodazole 阻滞释放收集的贴壁细胞

图 3 KDM5C 的有丝分裂期依赖性翻译后修饰情况

2.4 KDM5C 对 SAC 相关的有丝分裂期进程的影响

KDM5C 作为 H3K4me3 的特异性去甲基化酶,其酶活性对 SAC 的调控尚不明确。Schibler 等^[9]在酵母中发现着丝粒附近 H3K4 的甲基化能够抑制 SAC 的活性,所以推测过表达 KDM5C 时 H3K4 的甲基化减少进而促进 SAC 活性,减缓细胞从中期向后期的有丝分裂期进程,而抑制 KDM5C 的酶活性后,则应呈现相反的结果。为了验证这一假设,首先采用过表达野生型 KDM5C 的方法,观察 SAC 灭活的标志蛋白 cdc27 的去磷酸化变化和 Cyclin B1 蛋白的降解变化。发现在 U2OS 细胞中外源过表达野生型 KDM5C 组和同期对照组的 SAC 灭活的标志分子 cdc27、Cyclin B1 均呈现同步的变化趋势,即 cdc27 在有丝分裂前中期发生条带滞后上移现象(磷酸化),并伴随后期开始(SAC 灭活、APC/C 激活)上移条带渐恢复,直至出有丝分裂期;另一 SAC 灭活的标志分子 Cyclin B1 的蛋白含量也随着后期开始逐渐下降(图 4A、B)。此外,本研究还使用了 H3K4me2/me3 的去甲基化转移酶 KDM5C 的特异性抑制剂 CPI-455 抑制其去甲基化酶活性。结果发现使用终浓度为 15 $\mu\text{mol/L}$ 或 30 $\mu\text{mol/L}$ 的 CPI-455 抑制 KDM5C 酶活性 48 h 即可使其底物 H3K4me3 的蛋白质含量明显升高(图 4C)。在 Nocodazole 细胞同步化释放前 1 h 加入抑制剂 CPI-455 时,抑制剂 CPI-455 处理组相较 DMSO 处理组,骨肉瘤细胞 SAC 灭活的标志蛋白 cdc27 的去磷酸化曲线和 Cyclin B1 蛋白的降解曲线无明显差异(图 4D、E)。

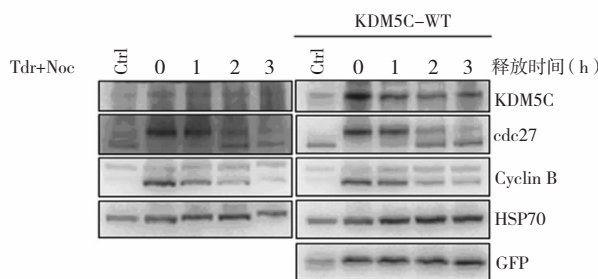
2.5 动态观察 KDM5C 酶活性对骨肉瘤细胞有丝分裂中期向后期进程的影响

为进一步动态观察 KDM5C 酶活性对细胞有丝分裂中期向后期进程,即 SAC 灭活和 APC/C 激活的影响,本研究利用慢病毒构建稳定表达 H2B-GFP 的骨肉瘤细胞系 MG-63,在

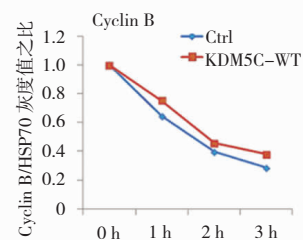
经 Thymidine 细胞同步化后释放到新鲜培养基中,观察有丝分裂期前 1 h 加入 CPI-455 或 DMSO 置于活细胞实时荧光共聚焦显微镜成像系统观察有丝分裂期进程。发现相较 DMSO 处理,抑制 KDM5C 酶活性后,骨肉瘤细胞有丝分裂中期到后期进程无明显变化(图 5A、B)。观察有丝分裂期染色体分离错误比例,发现在多种染色体分离错误中染色体滞后(chromosome lagging)占比最高(图 5C),Fisher 确切概率法统计分析发现 DMSO 处理组与 CPI-455 处理组染色体分离错误出现比例无明显统计学差异($P>0.05$;图 5D)。

3 讨论

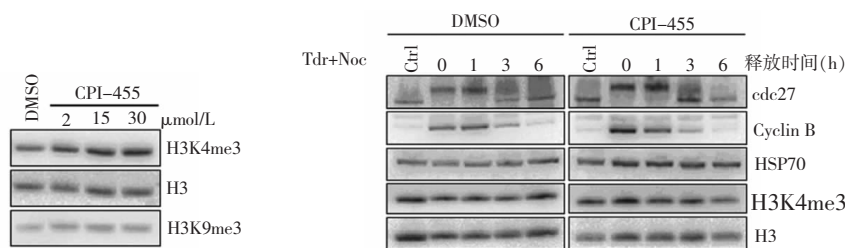
组蛋白赖氨酸的甲基化是重要的翻译后修饰之一,在基因表达调控中发挥重要作用。依据其不同位点的甲基化修饰,可呈现不同的生物学效应^[10-12]。H3K4 的三甲基化形式主要参与基因转录激活调控,其异常可与多种癌症的发生发展密切相关^[13-14]。目前认为,H3K4me3 修饰主要受甲基化酶 KMT2A^[15]和去甲基化酶 KDM5 家族的共同调控^[16-17]。KDM5C 是含 JmjC 结构域组蛋白去甲基化酶家族 KDM 成员之一,具有特异性催化 H3K4me3/me2 的去甲基化功能^[17]。Rondinelli 等^[6]研究发现,宫颈癌细胞系 HeLa 的 KDM5C 蛋白含量在有丝分裂前中期开始降低至 G₁ 早期重新升高,呈现有丝分裂期依赖的波动性变化,提示 KDM5C 可能参与了 HeLa 细胞有丝分裂期的调控。本研究通过研究多种骨肉瘤细胞



A. 过表达 KDM5C-WT 检测 cdc27、Cyclin B 的蛋白变化情况

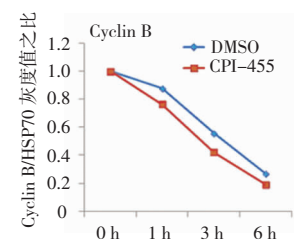


B. A 中 Cyclin B/HSP70 灰度值比的折线图



C. 抑制剂 CPI-455 的抑制效果

D. CPI-455 处理后检测 cdc27、Cyclin B 的蛋白变化情况



E. D 中 Cyclin B/HSP70 灰度值比的折线图

图 4 KDM5C 的酶活性对细胞有丝分裂期进程的影响

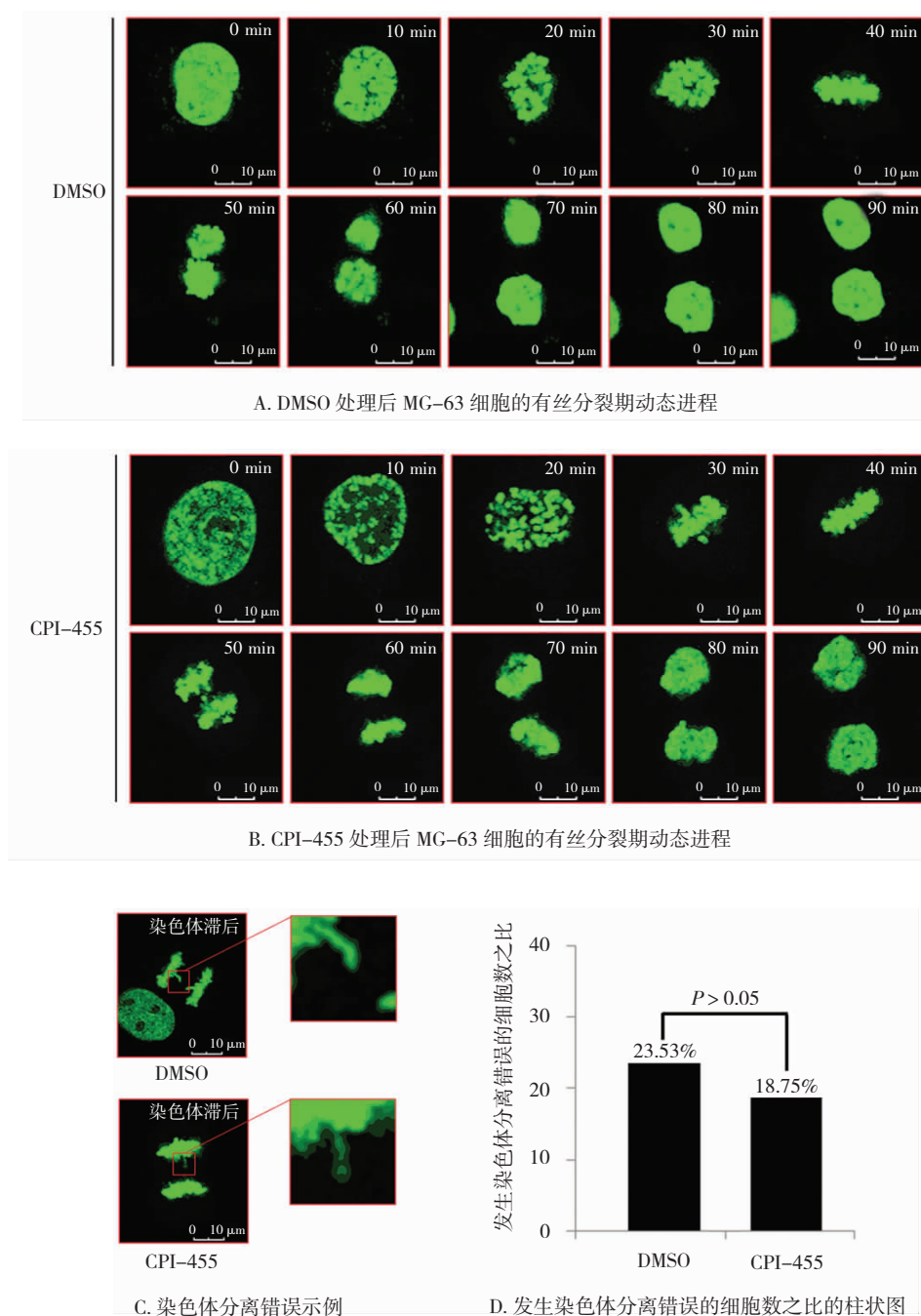


图5 活细胞实时荧光共聚焦显微镜成像观察 KDM5C 对有丝分裂中期向后期进程的影响

系有丝分裂期 KDM5C 的蛋白质含量,并重复了文献的相关研究,发现 KDM5C 的蛋白质含量并不随有丝分裂期进程而改变。导致这一结果的原因可能与 Rondinelli 等^[6] 细胞收集方法和有丝分裂前中期细胞纯度有关。本文试图通过 Western blot 检测 KDM5C 在有丝分裂期发生翻译后修饰的情况,结果发现未观察到明显的位移减慢或泛素化降解条带,但是并不排除其存在其他不引起分子量变化的

修饰,相关研究还需要进一步进行。

此外,本文还研究了 KDM5C 的酶活性对骨肉瘤细胞有丝分裂期中 SAC 灭活和 APC/C 激活的影响。通过 Western blot 检测各有丝分裂期进程中 SAC 灭活和 APC/C 激活的标志分子和活细胞实时荧光共聚焦显微镜成像观察骨肉瘤细胞有丝分裂中期到后期进程的动态变化,表明 KDM5C 的酶活性对有丝分裂期进程无明显影响。Schibler 等^[3]报道,在着丝粒

处 KDM5C 的底物 H3K4me3 能够与 closed-mitotic arrest deficient 2 (C-Mad2) 相互作用, 抑制 C-Mad2 与 cdc20 的相互作用, 使 APC/C 的抑制解除, 激活 APC/C, 通过泛素化 Cyclin B1 促使有丝分裂期由中期向后期转化, 即 H3K4me3 的高表达可以促进细胞有丝分裂中期向后期的进程, 从而加速有丝分裂进程。由此推论, 抑制 KDM5C 的去甲基化酶活性将导致 H3K4me3 高表达及 SAC 提前灭活, 细胞加速由中期向后期转化。过表达 KDM5C 或抑制 KDM5C 的去甲基化酶活性均不影响 SAC 的灭活过程, 这一结果与推论不同。本课题组认为, H3K4me3 蛋白质含量是甲基化酶和去甲基化酶共同作用的结果, 所以当底物 H3K4me3 变化时观察的结果, 将包含甲基化酶作用和 H3K4me3 自身对结果的综合影响, 不能认为是 KDM5C 去甲基化酶活性的影响。本研究结果是基于观察有丝分裂期前 1 h 加入 CPI-455, 以避免长时间加入抑制剂影响 H3K4 的甲基化状态, 进而对细胞周期的影响。这可能是导致研究结果不同于文献报道的原因。

综上所述, KDM5C 酶活性不影响骨肉瘤细胞有丝分裂进程, 但对于其他细胞周期的影响尚不清楚。其底物 H3K4me3 与骨肉瘤有丝分裂进程密切相关, 进一步探讨 H3K4me3 对骨肉瘤的发生发展的调控, 将有助于揭示其分子机制, 为临床诊疗提供依据。

参 考 文 献

- [1] Erin R, Gita S, Ambinder RF, et al. Cancer in People Living With HIV, Version 1.2018, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology[J]. Journal of the National Comprehensive Cancer Network, 2018, 16(8): 986-1017.
- [2] Group ESESNW. Bone sarcomas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up[J]. Ann Oncol, 2014, 25(S3): iii113-123.
- [3] Schibler A, Koutelou E, Tomida J, et al. Histone H3K4 methylation regulates deactivation of the spindle assembly checkpoint through direct binding of Mad2[J]. Genes Dev, 2016, 30(10): 1187-1197.
- [4] Wang Q, Wei J, Su P, et al. Histone demethylase JARID1C promotes breast cancer metastasis cells via down regulating BRMS1 expression[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 464(2): 659-666.
- [5] Xu L, Wu W, Cheng G, et al. Enhancement of proliferation and invasion of gastric cancer cell by KDM5C via decrease in p53 expression[J]. Technol Cancer Res Treat, 2017, 16(2): 141-149.
- [6] Rondinelli B, Schwerer H, Antonini E, et al. H3K4me3 demethylation by the histone demethylase KDM5C/JARID1C promotes DNA replication origin firing[J]. Nucleic Acids Res, 2015, 43(5): 2560-2574.
- [7] Ubersax JA, Woodbury EL, Quang PN, et al. Targets of the cyclin-dependent kinase Cdk1[J]. Nature, 2003, 425(6960): 859-864.
- [8] Peters JM. The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006, 7(9): 644-656.
- [9] Peng B, Shi R, Jiang W, et al. Phosphorylation of LSD1 by PLK1 promotes its chromatin release during mitosis[J]. Cell Biosci, 2017, 7: 15.
- [10] Shi X, Hong T, Walter KL, et al. ING2 PHD domain links histone H3 lysine 4 methylation to active gene repression[J]. Nature, 2006, 442(7098): 96-99.
- [11] Shi X, Kachirskaja I, Walter KL, et al. Proteome-wide analysis in *Saccharomyces cerevisiae* identifies several PHD fingers as novel direct and selective binding modules of histone H3 methylated at either lysine 4 or lysine 36[J]. J Biol Chem, 2007, 282(4): 2450-2455.
- [12] Wysocka J, Swigut T, Xiao H, et al. A PHD finger of NURF couples histone H3 lysine 4 trimethylation with chromatin remodelling[J]. Nature, 2006, 442(7098): 86-90.
- [13] Lu C, Paschall AV, Shi H, et al. The MLL1-H3K4me3 axis-mediated PD-L1 expression and pancreatic cancer immune evasion[J]. J Nat Cancer Inst, 2017, 109(6): djw283.
- [14] Dhimolea E, Wadia PR, Murray TJ, et al. Prenatal exposure to BPA alters the epigenome of the rat mammary gland and increases the propensity to neoplastic development[J]. PLoS One, 2014, 9(7): e99800.
- [15] Del Rizzo PA, Trievel RC. Substrate and product specificities of SET domain methyltransferases[J]. Epigenetics, 2011, 6(9): 1059-1067.
- [16] Ge W, Shi L, Zhou Y, et al. Inhibition of osteogenic differentiation of human adipose-derived stromal cells by retinoblastoma binding protein 2 repression of RUNX2-activated transcription[J]. Stem Cells, 2011, 29(7): 1112-1125.
- [17] Iwase S, Lan F, Bayliss P, et al. The X-linked mental retardation gene SMCX/JARID1C defines a family of histone H3 lysine 4 demethylases[J]. Cell, 2007, 128(6): 1077-1088.

(责任编辑: 张辉洁)