

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.19.032

BRD4 在喉鳞状细胞癌病灶转移过程中的作用及机制研究 *

吴小秦 谭业农 唐旭霞 王 翔 符国庆 李淑芳

(海南省中医院 耳鼻喉科 海口 海南 570100)

摘要 目的:探讨溴样结构域蛋白 4 (Bromoid Domain Protein 4, BRD4)在喉鳞状细胞癌病灶转移过程中的作用及其机制。**方法:**收集本院 2016 年 4 月-2018 年 4 月收治的 87 例喉鳞状细胞癌患者手术标本。qRT-PCR、Western blot 和免疫组化染色检测患者肿瘤组织(Tumor Tissue)、癌旁组织(Adjacent Tissue)和正常组织(Normal Tissue)中 BRD4 表达;BRD4 拮抗剂 GSK525762A (500 nmoL/L) 处理喉鳞状细胞癌 Hep2 细胞,24、48 和 72 h 后 CCK-8 检测细胞增殖;Trans-well 细胞迁移实验和侵袭实验分别检测 GSK525762A 给药前后 Hep2 细胞迁移和侵袭能力;qRT-PCR 和 Western blot 检测 GSK525762A 给药前后 Hep2 细胞 BRD4、E-Cadherin、N-Cadherin 和 Twist 蛋白表达。**结果:**喉鳞状细胞癌肿瘤组织中 BRD4 表达高于癌旁组织和正常卵巢组织($P<0.05$);GSK525762A 给药处理后 Hep2 细胞增殖能力、迁移和侵袭能力及 BRD4 和上皮间质转化相关蛋白 N-Cadherin 和 Twist 表达均明显低于阴性对照组($P<0.05$),而 E-Cadherin 表达的表达明显升高($P<0.05$)。**结论:**BRD4 可能通过抑制 E-Cadherin 的表达,增加 N-Cadherin 和 Twist 的表达,进而激活上皮间质转化,促进喉鳞状细胞癌转移。

关键词:BRD4;喉鳞状细胞癌;转移;侵袭;上皮间质转化

中图分类号:R739.65 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)19-3738-06

Role and Mechanism of BRD4 in the Process of Focal Squamous Cell Carcinoma Metastasis*

WU Xiao-qin, TAN Ye-nong, TANG Xu-xia, WANG Xiang, FU Guo-qing, LI Shu-fang

(Hainan Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Haikou, Hainan, 570100, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the role and mechanism of BRD4 in the process of focal squamous cell carcinoma metastasis.

Methods: Eighty-six surgical specimens of patients with laryngeal squamous cell carcinoma admitted from April 2016 to April 2018 were enrolled. qRT-PCR, Western blot and immunohistochemical staining were used to detect BRD4 expression in tumor tissues, paracancerous tissues and normal tissues; BRD4 antagonist GSK525762A (500 nmoL/L) was used to treat laryngeal squamous cell carcinoma Hep2 cells, 24, 48 and 72 After C, CCK-8 was used to detect cell proliferation; Trans-well cell migration assay and invasion assay were used to detect the migration and invasion of Hep2 cells before and after GSK525762A administration; qRT-PCR and Western blot were used to detect E-Cadherin, N-Cadherin and Twist in Hep2 cells before and after GSK525762A administration. **Results:** The expression of BRD4 in laryngeal squamous cell carcinoma was higher than that in adjacent normal tissues and normal ovarian tissues ($P<0.05$). The proliferation, migration and invasion of Hep2 cells and the protein associated with epithelial-mesenchymal transition were regulated by GSK525762A. The expression of Cadherin and Twist was significantly lower than that of the negative control group ($P<0.05$), while the expression of E-Cadherin was significantly increased ($P<0.05$). **Conclusion:** BRD4 may increase the expression of N-Cadherin and Twist by inhibiting the expression of E-Cadherin, thereby activating epithelial-mesenchymal transition and promoting the metastasis of laryngeal squamous cell carcinoma.

Key words: BRD4; Laryngeal Squamous Cell Carcinoma; Metastasis; Invasion; EMT

Chinese Library Classification (CLC): R739.56 **Documen code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)19-3738-06

前言

喉癌是头颈部最常见的恶性肿瘤,主要临床病理分型为喉鳞状细胞癌(Laryngeal Squamous Cell Carcinoma, LSCC)^[1-3]。尽管随着医疗计数的发展,喉鳞状细胞癌的诊治方式有所提升,但是在过去的 30 年里喉癌患者的生存率仍处于较低水平^[4,5]。

深入研究和揭示喉鳞状细胞癌发病的分子机制,特别是其形成远端转移病灶的机制,有利于其早期的诊治和制定相应的临床治疗方法^[6-8]。上皮间充质转化(Epithelial Mesenchymal Transition, EMT) 机制是多种恶性肿瘤发生转移和侵袭的主要原因,在胃癌、肺癌和结肠癌等肿瘤研究中均发现^[9],EMT 的激活是肿瘤细胞远端转移并形成新的病灶的主要原因,但是不同肿瘤

* 基金项目:海南省自然科学基金面上项目(SQ2017SHFZ0093)

作者简介:吴小秦(1984-),硕士,主要研究方向:中西医耳鼻喉方向,E-mail: zxt3000@yeah.net,电话:13876218506

(收稿日期:2019-01-28 接受日期:2019-02-23)

组织中,激活 EMT 机制各不相同^[10]。EMT 机制在喉癌发生发展中同样发挥重要的作用,通过对激活喉鳞状细胞癌 EMT 发生相关蛋白的研究^[11],有望为喉癌的诊断和治疗提供新的策略,从而改善患者的生存率。

溴结构域蛋白 4 (Bromoid Domain Protein 4, BRD4) 是溴结构域和超末端结构(Bromodomain and Extraterminal Domain, BET)家族中的一员^[12,13],现有研究表明,其与喉鳞状细胞癌的发生发展密不可分。现有研究表明 BRD4 在肝癌、乳腺癌和胰腺癌发生、发展过程中起到重要作用^[14]。但关于 BRD4 在喉鳞状细胞癌中的作用仍不清楚。因此,本研究采用喉鳞状细胞癌患者肿瘤组织和细胞系 Hep2,探讨 BRD4 是否通过促进 EMT 相关蛋白表达从而对喉鳞状细胞癌形成转移产生影响。

1 材料和方法

1.1 患者来源

选取本院 2016 年 4 月-2018 年 4 月收治的 87 例喉鳞状细胞癌患者。纳入标准:①所有卵巢癌患者的临床表现和病理学检查结果均符合喉鳞状细胞癌的诊断;②喉鳞状细胞癌患者均于海南省中医院首诊,且术前未经任何放化疗;③病历资料完整。排除标准:①依从性差;②放化疗过敏;③有手术绝对禁忌证。87 例喉鳞状细胞癌患者的年龄为 31~63 岁,平均为 (39.82±7.35) 岁。实验方法和目的均告知患者和家属,并签署知情同意书,研究获的医院伦理委员会批准。

1.2 材料

喉鳞状细胞癌细胞 Hep2 购自中国院上海细胞库;PCR 引物由广州依科生物技术公司合成;蛋白定量试剂盒、SDS 凝胶试剂盒、细胞裂解液、结晶紫均购自海南创维生物有限公司;DMEM 培养基、胎牛血清、青链霉素混合液和胰蛋白酶消化液均购自美国 HyClone;4%多聚甲醛购自北京碧云天有限公司;BRD4 拮抗剂 GSK525762A 和 CCK-8 试剂盒购自美国罗氏;BRD4、E-Cadherin、N-Cadherin、Twist 和 Actin 抗体购自英国 Abcam,ECL 化学发光试剂盒购自英国 Zeta,兔二抗购自英国 Abcam。

1.3 方法

1.3.1 qRT-PCR 取患者肿瘤组织液氮冷冻,随后进行碾磨,严格按照产品说明书的步骤进行总 RNA 提取、逆转录和 PCR,取 1 μg RNA 反转录成 cDNA。GSK525762A 给药前后提取 Hep2 细胞 RNA,逆转录成 cDNA。设计 BRD4、E-Cadherin、N-Cadherin、Twist 和 β-ACTIN 上下游引物,PCR 循环条件:95℃ 30 s 预变性,95℃ 5 s,60℃ 30 s 共 40 个循环。

1.3.2 免疫组化染色 石蜡切块进行脱蜡和水化处理,抗原修复后滴加封闭液;1:500 稀释 BDR4 一抗孵育;孵育结束后用 PBS 进行冲洗,加生物素标记的二抗进行孵育;PBS 再次冲洗,滴加滴加链亲和素-过氧化酶溶液孵育。次日 DAB 显色液显色,苏木素染液复染,中性树脂胶固封;PBS 作为一抗阴性对照组,阳性细胞着色为棕黄色。

1.3.3 CCK-8 增殖实验 调整 Hep2 细胞数 5×10^5 个/孔,对照组 Hep2 细胞直接铺板,实验组 Hep2 细胞 37℃,5% CO₂ 培养箱内培养避光孵育 12 h 后 GSK525762A (500 nmol/L) 给药处理 12、24 和 36 h 后培养结束,每孔加入 20 μL 的 CCK-8,

室温于摇床震荡 10 min。酶标仪 490 nm 波长测 OD 值。

1.3.4 Trans-well 细胞迁移实验 对数生长期细胞,无血清 DMEM 培养液调整细胞数 5×10^4 /孔,接种至 24 孔板;Trans-well 下室加 10% 胎牛血清 DMEM 培养液 600 μL,上室 200 μL 无血清细胞悬液;24 h 后 PBS 洗涤,4%多聚甲醛固定 30 min。0.1%结晶紫染色 10 min,PBS 洗 3 遍,棉签擦去上层未迁移的细胞,30%乙酸脱色,酶标仪 570 nm 读数。

1.3.5 Trans-well 细胞侵袭实验 BD 胶和培养液(1:8)配制,在 37℃ 细胞培养箱孵育 6 h,水化基底膜 40 min。对数生长期细胞无血清 DMEM 培养液调整细胞数 5×10^4 /孔,接种至 24 孔板;Trans-well 下室正常 10% 胎牛血清 DMEM 培养液 600 μL,上室 200 μL 无血清细胞悬液。36 h 后 4%多聚甲醛固定 30 min。0.1%结晶紫染色 10 min, PBS 洗 3 遍,棉签擦去上层未迁移的细胞,30%乙酸脱色,酶标仪 570 nm 读数。

1.3.6 Western blot 细胞计数以 1×10^6 个细胞/mL 的细胞数种到 6 孔板中,设 3 个复孔。细胞贴壁取出 6 孔板,弃掉上清;PBS 清洗 1 min 后加含有蛋白酶抑制剂的裂解液并吹打细胞团,后放置冰上裂解,30 min 后用细胞刮将细胞刮下来转移至 1.5 mL 试管中,高速离心并抽取上清,即为所提蛋白。取患者肿瘤组织液氮冷冻,随后进行碾磨,裂解液裂解,低温离心取上清,即为组织蛋白。蛋白定量完成后加上样缓冲液,沸水煮 5 min,样品可冻于 -80℃ 保存。SDS-PAGE 电泳后进行转膜操作,转膜成功后用脱脂牛奶进行封闭,PBST 清洗,裁剪条带并分别加入相应抗体,均为 1:1000 稀释,室温孵育 1 小时后 4 度过夜。次日反复清洗条带,加二抗室温孵育 90 min,PBS 反复冲洗,然后加 ECL 发光液,化学发光仪检测并拍照。

1.4 统计学分析

所有数据应用 SPSS 17.0 软件进行统计,计量资料均以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较用 t 检验,多组间比较用 F 检验,以 $P < 0.05$ 为具有统计学差异。

2 结果

2.1 喉鳞状细胞癌患者肿瘤组织 BRD4 表达

首先免疫组化结果显示喉鳞状细胞癌患者肿瘤组织中 BRD4 表达显著高于癌旁组织和正常组织, $F=164.3$, $P < 0.0001$,差异具有统计学意义,图 1 A;qRT-PCR 和 Western blot 检测结果同免疫组化相一致(图 1 B, C),统计结果分别为:qRT-PCR $F=171.6$, $P < 0.0001$,Western blot 同组比较均 $P < 0.0001$ 。

2.2 BRD4 拮抗剂 GSK525762A 对 Hep2 细胞增殖能力的影响

CCK-8 实验结果显示:GSK525762A 给药处理后,12 h($P=0.0046$)、24 h($P < 0.0001$)、36 h($P < 0.0001$)Hep2 细胞增殖能力明显降低,差异具有统计学意义图 2。

2.3 BRD4 拮抗剂 GSK525762A 对 Hep2 细胞迁移能力的影响

Trans-well 迁移实验结果显示:GSK525762A 给药处理后,细胞迁移能力明显低于阴性对照细胞, $t=6.541$, $P < 0.0001$,差异具有统计学意义,图 3。

2.4 BRD4 拮抗剂 GSK525762A 对 Hep2 细胞侵袭能力影响

Trans-well 侵袭实验结果显示:GSK525762A 给药处理后,细胞侵袭能力明显低于阴性对照细胞, $t=6.063$, $P < 0.0001$,差异具有统计学意义,图 4。

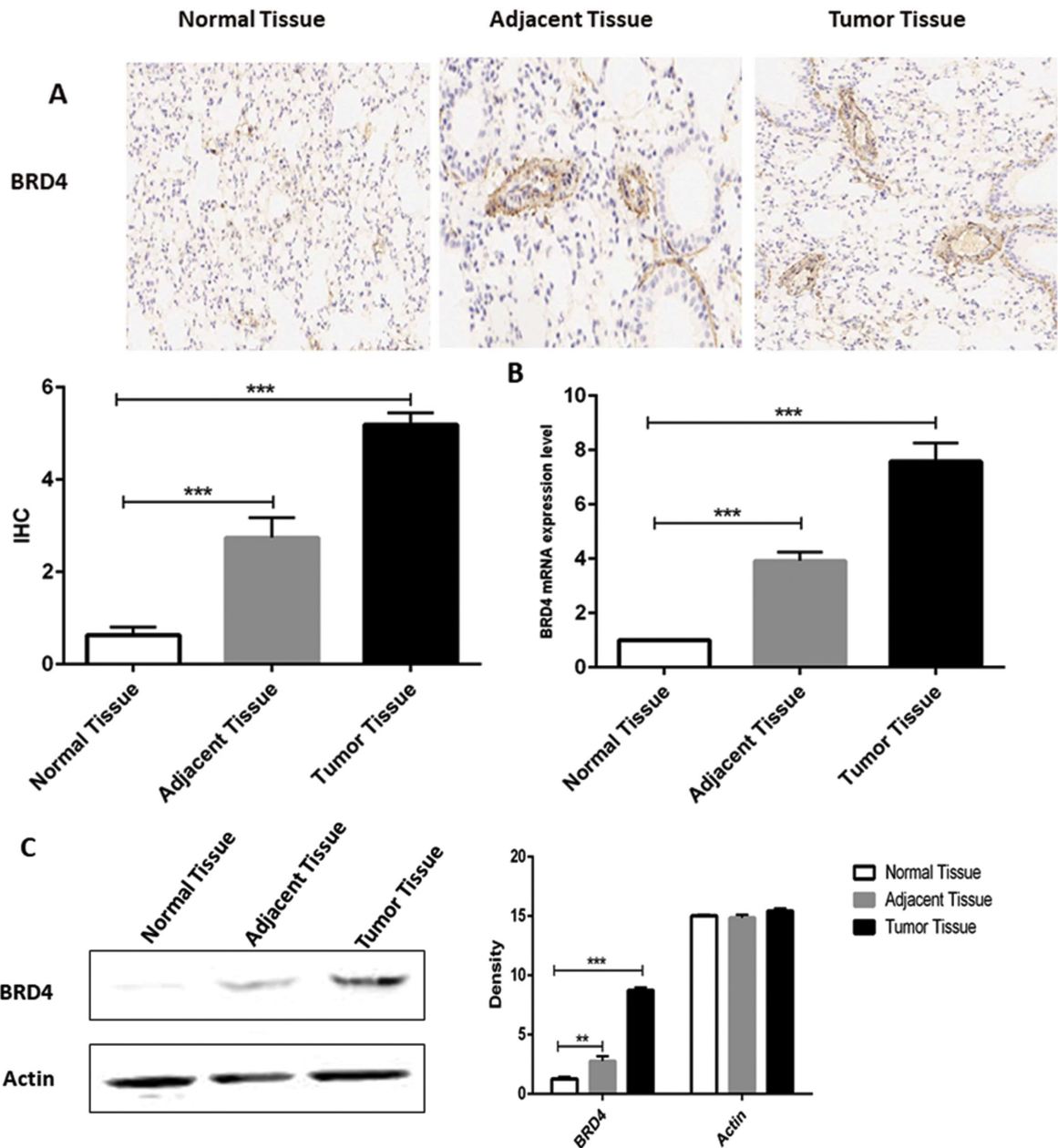


图 1 A: 免疫组化染色显示 BRD4 在喉鳞状细胞癌患者肿瘤组织、癌旁组织和正常组织中的表达; B: qRT-PCR 显示 BRD4 在肿瘤组织、癌旁组织和正常组织中的表达; C: Western blot 显示 BRD4 在肿瘤组织、癌旁组织和正常组织中的表达;

Fig.1 A: Immunohistochemical staining showed the expression of BRD4 in tumor tissues, paracancerous tissues and normal tissues of LSCC patients; B: qRT-PCR showed the expression of BRD4 in tumor tissues, paracancerous tissues and normal tissues; C: Western blot showed the expression of BRD4 in tumor tissues, paracancerous tissues and normal tissues;

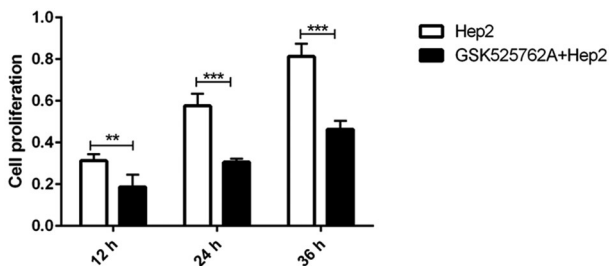


图 2 GSK525762A 给药处理后对 Hep2 细胞增殖能力的影响

Fig.2 A: Effect of GSK525762A on the proliferation of Hep2 cells after administration

2.5 BRD4 拮抗剂 GSK525762A 对 Hep2 细胞 EMT 相关蛋白表达的影响

qRT-PCR 和 Western blot 检测结果显示 GSK525762A 给药处理后, Hep2 细胞 BRD4、N-Cadherin 和 Twist 表达均明显低于阴性对照组, 而 E-Cadherin 表达的表达式明显升高, 各组均 $P < 0.0001$, 差异具有统计学意义, 见图 5。

3 讨论

喉鳞状细胞癌是喉癌中最常见的病理分型, 喉鳞状细胞癌具有恶性程度高, 早期检测难度大, 肿瘤细胞具有高转移和增殖能力等原因, 导致喉鳞状细胞癌的死亡率逐年增高, 喉癌患者术后的生存率仍然较低。研究和揭示喉鳞状细胞癌的发病机制特别是分子机制有利于其早期的诊断和治疗^[15-17]。喉鳞状细胞癌的发生发展是个多因素、多个分子机制参与的复杂的过程^[18]。

其中表观遗传学调控在喉鳞状细胞癌致病过程中发挥重要的作用,通过其表观遗传学的研究,有利于喉鳞状细胞癌的诊治,为临床提供新的治疗靶点和思路,从而提高喉鳞状细胞癌患者的生存期^[19]。表观遗传学(Epigenetic)又称为"表遗传学"、"外遗传学"和"后遗传学",是指在基因组DNA不发生序列变化的前提下,基因的表达发生改变,并且这种改变是可遗传的,同时是可以被逆转的^[20]。表观遗传学主要包括:DNA甲基化、组蛋白修饰、核小体定位和非编码RNA调控等。这些生物学变化

都会引起染色质重构,信使RNA的新定性发生变化,又或者引起活性蛋白发挥新的生物学功能。其中组蛋白修饰在多种肿瘤组织中被发现,例如针对溴样结构域蛋白4(Double Bromodomain-containing Protein 4, BRD4)的研究发现^[23],其作为溴结构域和超末端结构(Bromodomain and Extraterminal Tomain, BET)家族中的一员,在肝癌、白血病、乳腺癌、胰腺癌及恶性黑色素瘤的发生、发展中发挥了关键性的作用^[24]。

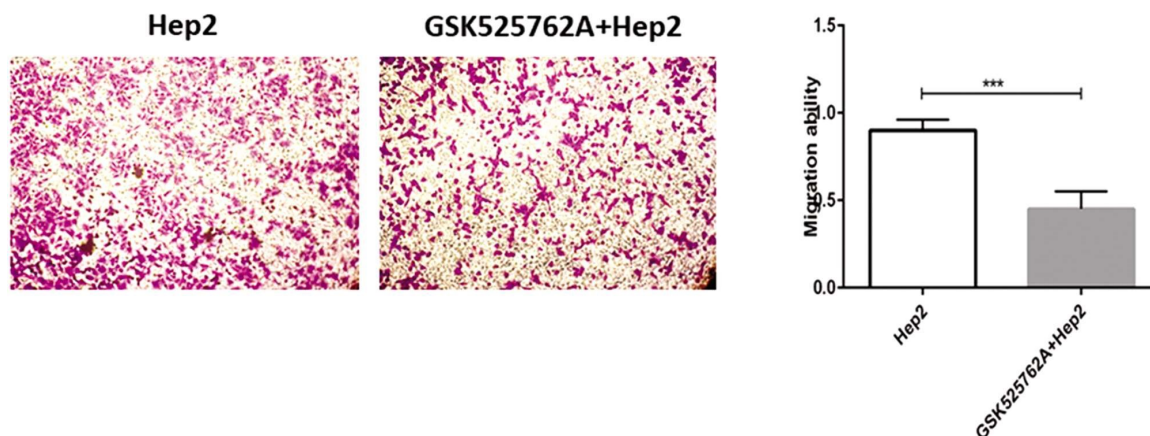


图3 GSK525762A 给药处理后对 Hep2 细胞迁移能力的影响

Fig.3 Effect of GSK525762A on the migration ability of Hep2 cells after administration

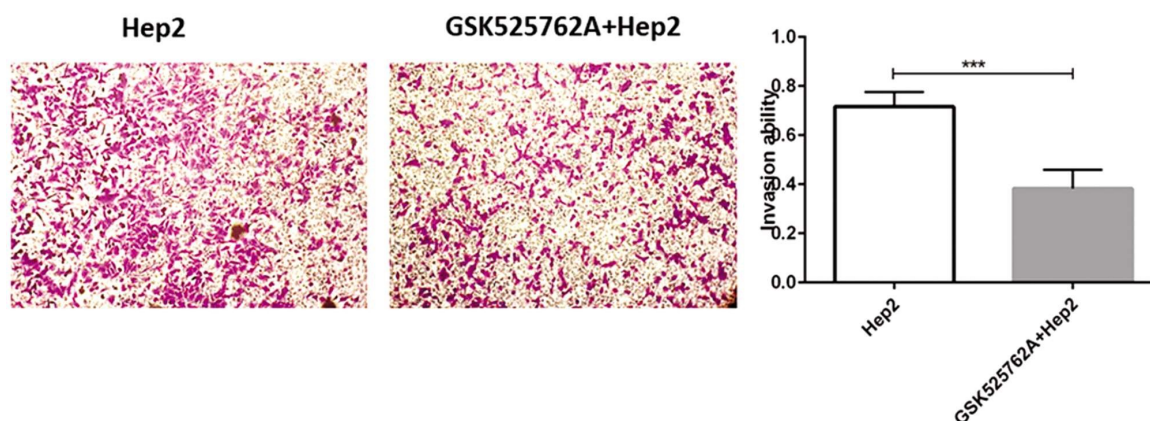


图4 GSK525762A 给药处理后对 Hep2 细胞侵袭能力的影响

Fig.4 Effect of GSK525762A on the invasive ability of Hep2 cells after administration

EMT 是肿瘤转移和形成远端病灶的主要原因。E- 钙黏蛋白(E-cadherin)是上皮细胞的主要黏附分子之一,肿瘤发生 EMT 时其表达量显著降低^[24]。E-cadherin 介导的细胞黏附结构丧失,使肿瘤细胞获得能动性,因而被认为是肿瘤进展中的关键步骤。EMT 相关的标志转录因子还包括 N-cadherin 和 Twist 等,其均可抑制 E-cadherin 的表达^[26]。E-cadherin 可以使肿瘤细胞之间的相互作用和极性丧失,从而让肿瘤细胞获得侵袭和迁移的能力,同时使得波形蛋白、纤维蛋白和 N- 钙粘蛋白(N-cadherin)在内的间质分子标记的表达增加。越来越多的研究证明 BET 家族可通过调控上皮-间质转化在肿瘤转移的过程中发挥重要作用,包括 BRD1、BRD3 和 BRD4 等,均可直接靶向降低 E-cadherin 表达,可促进 EMT 过程和肿瘤进展^[27]。Twist 是一种基本的螺旋-环-螺旋转录因子,通过直接抑 E-cadherin 等上皮标志物的表达促进 EMT 过程及肿瘤的侵袭和转移能力。最近的几项研究表明 Twist 可以被 microRNA 负

调控^[28]。有研究发现 microRNA-21 在结直肠癌中的表达下降,通过直接与 Twist 结合导致癌细胞迁移和侵袭能力的显著抑制。此外,BRD1 通过负性调控 Twist 表达来抑制癌症转移^[29]。有研究证明 BRD1 通过下调 N-cadherin 诱导人 p120 ctn 连环蛋白基因(Human p120 ctn Catenin Gene, CTNND1)和 E-cadherin 从细胞质转移至细胞膜来抑制胃癌细胞的侵袭,BRD1 通过抑制 N-cadherin 翻译间接下调其下游效应基质金属蛋白酶 9(Matrix Metalloproteinase 9, MMP9),从而抑制胃癌转移。所有这些研究表明 BET 家族在 EMT 发生发展过程中起重要的作用^[30]。

为了探索 BRD4 在肿瘤中的作用,有研究以结肠癌患者为研究对象,检测结肠癌患者组织中 BRD4 的表达,结果显示, BRD4 在结肠癌患者组织中高表达,表明 BRD4 在结肠癌的发展过程中可能发挥了致癌的作用,在调节结肠癌细胞生物学行为中发挥了重要的作用^[31]。已有研究证实,在肝癌和胰腺癌中,

BRD4 可通过调控 EMT 信号通路相关基因促进肿瘤进展^[4]。在肝癌细胞系中沉默 BRD4 后检测 EMT 相关蛋白的表达变化,结果显示,在肝癌细胞系 HepG2 细胞中抑制 BRD4 后,EMT 相关蛋白 N-Cadherin 和 Twist 蛋白表达明显降低,而 E-Cadherin 表达明显增高。表明在肝癌细胞中 BRD4 可能通过

下调 N-Cadherin 和 Twist 和促进 E-Cadherin 表达激活 EMT 机制促进其增殖、侵袭与转移^[5,24]。已有研究提示,抑制 BRD4 表达可以有效抑制乳腺癌、鼻咽癌及子宫内膜癌等多种恶性肿瘤的发展,但关于 BRD4 在喉鳞状细胞癌中的具体作用机制并不清楚。

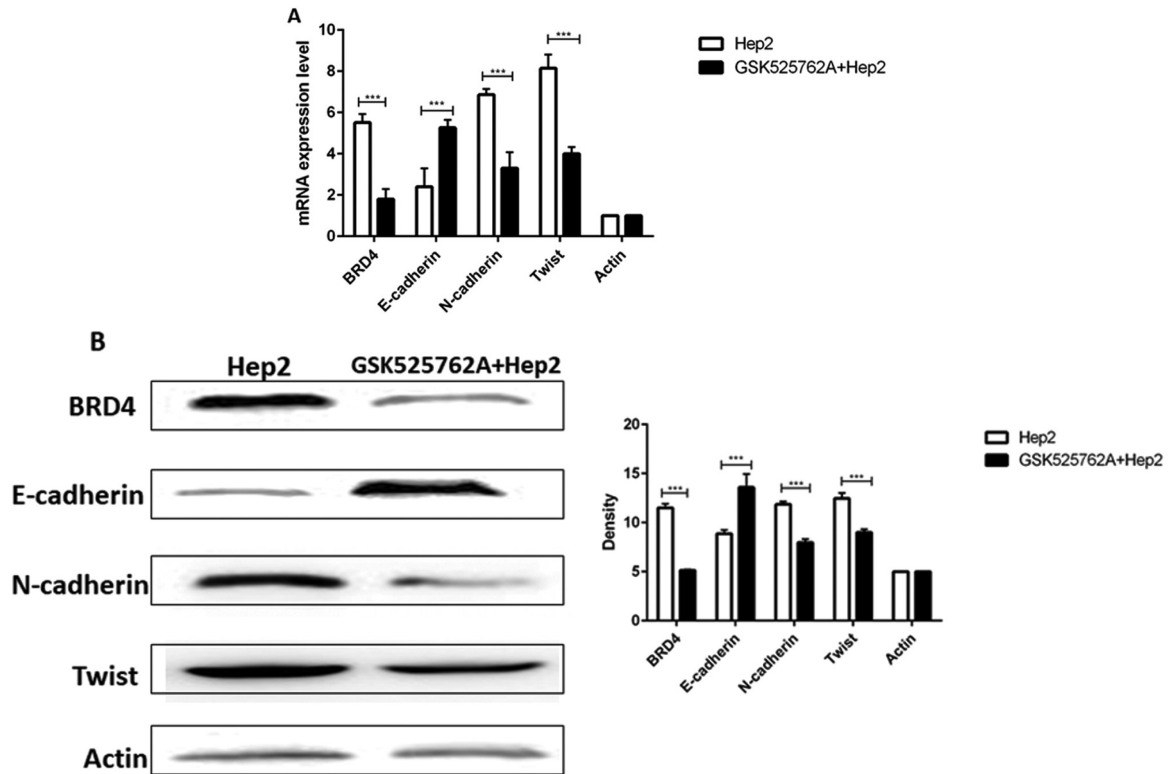


图 5 GSK525762A 给药处理后对 Hep2 细胞 EMT 相关蛋白表达的影响

Fig.5 Effect of GSK525762A on the expression of EMT-related protein in Hep2 cells after administration

本研究结果显示 BRD4 高表达在喉鳞状细胞癌患者肿瘤组织中,提示喉鳞状细胞癌转移形成转移病灶与 BRD4 表达有着密切的关系。体外细胞实验表明 BRD4 拮抗剂 GSK525762A 给药处理后抑制了 Hep2 细胞的增殖能力、细胞迁移和侵袭的能力,与肿瘤组织检测结果相同,说明 BRD4 促进了喉鳞状细胞癌的转移和形成远端病灶的能力。此外,BRD4 拮抗剂 GSK525762A 给药处理后,BRD4 和 EMT 相关蛋白 N-Cadherin 和 Twist 表达被抑制,而 E-Cadherin 表达明显增加,提示 BRD4 很可能通过促进 N-Cadherin 和 Twist 表达,抑制 E-Cadherin 表达,激活喉鳞状细胞癌 EMT 的发生,从而增强喉鳞状细胞癌的增殖、转移和形成远端病灶。

综上所述,BRD4 可能通过促进 N-Cadherin 和 Twist 表达,抑制 E-Cadherin 表达激活了喉鳞状细胞癌 EMT,从而促进喉鳞状细胞癌形成转移病灶。但是喉鳞状细胞癌患者体内 BRD4 来源何处,其上游调控因子通过何种途径调控 BRD4,在喉鳞状细胞癌的发生发展中又发挥何种生物学功能,均有待于进一步的研究揭示。

参考文献(References)

[1] 周俐达,崔颖,董闻.姜黄素联合白藜芦醇诱导人喉癌细胞Hep-2 凋亡的作用机制[J].沈阳药科大学学报,2018, 12(01): 67-72

[2] Baird B J, Sung C K, Beadle B M, et al. Treatment of early-stage laryngeal cancer: A comparison of treatment options [J]. Oral Oncol,

2018, 87(12): 8-16

[3] 孙吉凤,何海涛.黄芩素通过线粒体凋亡途径诱导体外培养喉癌细胞凋亡的机制[J].中国老年学杂志,2018, 21(08): 1947-1951

[4] 王馨,孙亚男.非编码 RNA 在喉鳞状细胞癌中的研究进展[J].中国肿瘤临床,2017, 15(23): 1204-1207

[5] Liu J, Duan Z, Guo W, et al. Targeting the BRD4/FOXO3a/CDK6 axis sensitizes AKT inhibition in luminal breast cancer [J].Nat Commun, 2018, 9(1): 5200

[6] 甘辉云,杜敬东,欧阳虹,等.苯乙基异硫氰酸酯对喉癌 Hep-2 细胞增殖、凋亡、周期和侵袭转移能力的影响及机制[J].中国老年学杂志,2018, 32(22): 5529-5533

[7] Wang L, Sun J, Cao H. MicroRNA-384 regulates cell proliferation and apoptosis through directly targeting WISP1 in laryngeal cancer [J]. J Cell Biochem, 2018, 21(18): 12-16

[8] Miyamaru S, Minoda R, Kodama N. Long-term changes in vocal function after supracricoid partial laryngectomy with cricohyoidopiglotomy for laryngeal cancer[J]. Head Neck, 2018, 56(12): 21-25

[9] 陈辉,于悦,孙艳霞,等. Id1 和 Id3 协同诱导结肠癌 SW620 细胞 EMT 并影响其侵袭与迁移 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志,2018, 21(10): 987-993

[10] 金武男,吉美瑛.丙戊酸通过上皮钙黏蛋白的核移位诱导结肠癌细胞 EMT 的作用 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志,2018, 25(10): 994-998

- [11] Duan Y, Guan Y, Qin W, et al. Targeting Brd4 for cancer therapy: inhibitors and degraders[J]. *Medchemcomm*, 2018, 9(11): 1779-1802
- [12] 胡剑萍, 李艳莲, 石奕钰, 等. BRD4 小分子抑制剂的设计、合成以及初步活性研究[J]. *药学报*, 2017, 15(10): 1568-1577
- [13] 孙晓霞, 马梁明, 王涛. BRD4 抑制剂 JQ1 对 Jurkat 细胞增殖抑制及凋亡诱导作用的研究 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2016, 24(04): 1019-1023
- [14] Luo Q, Deng W, Wang H, et al. BRD4 interacts with PML/RARalpha in acute promyelocytic leukemia[J]. *Front Med*, 2018, 12(6): 726-734
- [15] Tamaki A. HED-17-0417-AHNS series: Do you know your guidelines? A review of current knowledge on laryngeal cancer [J]. *Head Neck*, 2018, 31(21): 235-238
- [16] Marie I J, Chang H M, Levy D E. HDAC stimulates gene expression through BRD4 availability in response to IFN and in interferonopathies[J]. *J Exp Med*, 2018, 215(12): 3194-3212
- [17] Wang Q, Sun Y, Li T, et al. Function of BRD4 in the pathogenesis of high glucose-induced cardiac hypertrophy[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 54(23): 123-126
- [18] 赵娟霞, 龚勇, 杨淑梅, 等. miR-181d 靶向 LCRG1 调控喉癌细胞 Hep2 增殖与迁移的机制[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2018, 21(09): 948-952
- [19] 张再兴, 周尚清. PD-1/PD-L1 在喉癌中的表达及临床意义[J]. *重庆医学*, 2018, 21(05): 635-637
- [20] 吕海丽, 严波, 张秋航. Stat3 反义寡核苷酸对人喉癌 Hep-2 细胞 BALB/c 裸鼠皮下移植瘤生长的影响 [J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2018, 17(09): 661-664
- [21] 张芳, 杨博, 杜莉, 等. RNAi 介导的 CK2 α 基因沉默对喉癌细胞上皮间质转化过程的影响 [J]. *实用医学杂志*, 2018, 21(08): 1253-1257
- [22] 段传新. 白皮杉醇增强顺铂杀伤喉癌 Hep-2 细胞的作用及其机制 [J]. *肿瘤防治研究*, 2018, 41(06): 367-370
- [23] 王雪, 祁娜, 马莎, 等. BRD4 拮抗剂 GSK525762A 对 SUP-B15 细胞增殖与凋亡的影响及其可能的作用机制[J]. *中国实验血液学杂志*, 2016, 12(06): 1654-1658
- [24] Yang Y M, Shi R H, Xu C X, et al. BRD4 expression in patients with essential hypertension and its effect on blood pressure in spontaneously hypertensive rats[J]. *J Am Soc Hypertens*, 2018, 65(89): 3245-3247
- [25] Dong X, Luo Z, Liu T, et al. Identification of Integrin beta1 as a Novel PAG1-Interacting Protein Involved in the Inherent Radioresistance of Human Laryngeal Carcinoma[J]. *J Cancer*, 2018, 9(22): 4128-4138
- [26] Song S, Liu L, Yu Y, et al. Inhibition of BRD4 attenuates transverse aortic constriction- and TGF-beta-induced endothelial-mesenchymal transition and cardiac fibrosis [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2018, 32(18): 234-237
- [27] Wang Y T, Li Y Q, Yuan H Z. Effect of serum HGF and CK18 in patients with laryngeal cancer on postoperative prognosis[J]. *Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi*, 2018, 32(23): 1791-1794
- [28] 张芳, 杨博, 杜莉, 等. RNAi 介导的 CK2 α 基因沉默对喉癌细胞化疗耐药性的影响[J]. *第三军医大学学报*, 2018, 25(23): 1-7
- [29] 侯素平, 赵娟霞, 杨丽娟, 等. miR-1264 对喉癌 Hep2 细胞增殖和迁移的影响[J]. *医学研究生学报*, 2018, 12(03): 273-278
- [30] Cheng G, Wang Z, Yang J, et al. Design, synthesis and biological evaluation of novel indole derivatives as potential HDAC/BRD4 dual inhibitors and anti-leukemia agents [J]. *Bioorg Chem*, 2018, 84(21): 410-417
- [31] 冀凯伦, 刘琪, 牟作峰, 等. BRD4 通过 SHH 信号通路诱导甲状腺癌细胞增殖、侵袭与迁移[J]. *中国癌症杂志*, 2017, 31(11): 860-866

(上接第 3719 页)

- [22] Rowe IA. Too much medicine: overdiagnosis and overtreatment of non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2018, 3(1): 66-72
- [23] Foschi FG, Bedogni G, Domenicali M, et al. Prevalence of and risk factors for fatty liver in the general population of Northern Italy: the Bagnacavallo Study[J]. *BMC Gastroenterol*, 2018, 18(1): 177
- [24] Lin YC, Lian IB, Kor CT, et al. Association between soil heavy metals and fatty liver disease in men in Taiwan: a cross sectional study[J]. *BMJ Open*, 2017, 7(1): e014215
- [25] Jimenez-Rivera C, Hadjiyannakis S, Davila J, et al. Prevalence and risk factors for non-alcoholic fatty liver in children and youth with obesity[J]. *BMC Pediatr*, 2017, 17(1): 113
- [26] Tokita Y, Maejima Y, Shimomura K, et al. Non-alcoholic Fatty Liver Disease Is a Risk Factor for Type 2 Diabetes in Middle-aged Japanese Men and Women[J]. *Intern Med*, 2017, 56(7): 763-771
- [27] Lee SW, Lee TY, Yang SS, et al. The association of non-alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome in a Chinese population[J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2017, 16(2): 176-180
- [28] Yi M, Chen RP, Yang R, et al. Increased prevalence and risk of non-alcoholic fatty liver disease in overweight and obese patients with Type 2 diabetes in South China[J]. *Diabet Med*, 2017, 34(4): 505-513
- [29] Temple JL, Cordero P, Li J, et al. A Guide to Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Childhood and Adolescence [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(6): 947
- [30] Xiao G, Zhu S, Xiao X, et al. Comparison of laboratory tests, ultrasound, or magnetic resonance elastography to detect fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease: A meta-analysis[J]. *Hepatology*, 2017, 66(5): 1486-1501