

蜂胶黄酮 Pinobanksin-3-acetate 对人胃癌 SGC-7901 细胞中 *HSPA6*、*GEM*、*FOS*、*RGS2*、*GADD45G* 基因表达的影响

阿依努尔·玉苏普, 胡尼其古丽·阿巴克, 其曼古丽·吐尔洪,
吾热娅提·克维尔, 依米提·热合慢*
新疆大学生命科学与技术学院, 乌鲁木齐 830046

摘要: 考察蜂胶黄酮 Pinobanksin-3-acetate (PB3A) 对人胃癌 SGC-7901 细胞中相关基因表达的影响, 用不同浓度 (0, 40, 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 PB3A 处理胃癌 SGC-7901 细胞 24 h 后提取总 RNA, 采用实时荧光定量 PCR 技术检测 *GEM*、*GADD45G*、*HSPA6*、*RGS2* 及 *FOS* 基因 mRNA 表达量, 各个基因的 DMSO 对照组与 40、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PB3A 处理组的 ΔCt 值进行比较。结果显示 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PB3A 处理组与对照组比较 *HSPA6*、*GEM*、*FOS* 基因 mRNA 表达量明显提高 ($P < 0.05$), 差异倍数分别为 0.12 (*HSPA6*)、2.17 (*GEM*)、2.1 (*FOS*), 反而 *GADD45G*、*RGS2* 基因 ΔCt 无显著变化 ($P > 0.05$); 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PB3A 处理组与对照组比较 *HSPA6* 基因 mRNA 表达量明显提高 ($P < 0.05$), 其差异倍数为 0.5, 而其他基因 mRNA 表达水平无显著变化 ($P > 0.05$)。上述试验结果说明 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PB3A 对人胃癌 SGC-7901 细胞中基因表达的影响比较明显; PB3A 可能通过上调 *HSPA6*、*GEM*、*FOS* 基因表达而影响人胃癌 SGC-7901 细胞增殖。该研究结果为 PB3A 肿瘤治疗中的分子调控机制提供基础资料。

关键词: PB3A; 胃癌 SGC-7901 细胞; 基因表达

中图分类号: R735.2

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.3.021

Effects of Propolis Flavonoids Pinobanksin-3-acetate on the Expression of *HSPA6*, *GEM*, *FOS*, *RGS2* and *GADD45G* Gene in Human Gastric Cancer Cell Line SGC-7901

YUSUPU · Ayinuer, ABAKE · Wenqiemu, TUERHONG · Chimenguli, KEWEIER · Wuriyati, REHEMEN · Yimiti*

College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Wulumuqi 830046, China

Abstract: In order to investigate the effects of Propolis Flavonoids Pinobanksin-3-acetate (PB3A) on gene expression changes in human gastric cancer cell line SGC-7901, the cell line was treated with different concentrations of PB3A (0, 40, 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$), and their mRNA expression of *HSPA6*, *GEM*, *FOS*, *RGS2* and *GADD45G* genes was detected by real-time quantitative PCR. The result showed that after treated the cell line with 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of PB3A, the expression of *HSPA6*, *GEM* and *FOS* genes were significantly increased ($P < 0.05$). The differential expression rates were 0.12 (*HSPA6*), 2.17 (*GEM*) and 2.1 (*FOS*) respectively. However, the expression of *GADD45G* and *RGS2* were not significantly increased ($P > 0.05$) in comparison with untreated control group; After treated the cell line with 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of PB3A, the expression of *HSPA6* gene was significantly ($P < 0.05$) increased, the differential expression rate of *HSPA6* gene was 0.5, and the expression of *GEM*, *FOS*, *RGS2* and *GADD45G* genes were not significantly increased ($P > 0.05$) by comparing to the control group. In conclusion, it was deduced that PB3A affected gastric cancer cell proliferation through regulating the expression of *HSPA6*, *GEM* and *FOS* genes.

Key words: pinobanksin-3-acetate; gastric cancer cell line SGC-7901; gene expression

蜂胶是蜜蜂从花苞树芽处采集的树胶, 结合蜜蜂的上颚腺分泌物及蜂蜡等形成的具有特殊芳香气

味的胶状固体物^[1]。其主要的活性成分为黄酮类、有机酸类、萜烯类、芳香类、醛类、酯类及多种氨基酸、维生素、矿物质等^[2]。黄酮类化合物作为蜂胶中主要活性成分, 具有抑菌、抗病毒、抗氧化、抗肿瘤、调节免疫力、保护肝脏、心脏、神经等生理活

性^[3]。蜂胶中黄酮类化合物主要包括黄酮、黄酮醇、黄烷醇、查尔酮、二氢查尔酮、异黄酮等^[4]。蜂胶中的很多活性成分诸如黄酮、咖啡酸苯乙酯(*caffeic acid phenethyl ester*, CAPE)等均具有较强的抑制肿瘤活性。其中,CAPE 具有特定的肿瘤细胞杀伤力和靶细胞杀伤效应^[5]。黄酮类化合物能够抑制细胞增殖,其基本原理主要是使细胞周期停止,对肿瘤细胞产生细胞毒作用^[6]。Fang^[7]等人首次报道蜂胶黄酮(Pinobanksin-3-acetate, PB3A),发现该物质是多种抗肿瘤药用植物、蜂蜜和蜂胶的主要活性成分,具有一定的抗氧化活性,蜂胶中含量较丰富。本研究前期工作中研究证明 PB3A 对人大肠癌细胞 HCT-116 和 SW480 具有明显的增殖抑制和诱导细胞凋亡作用^[8],并用人类全基因组芯片证明 PB3A 作用 SW480 细胞 24 h 后引起 *HSPA6*、*GEM*、*FOS* 等 34 条基因的表达水平显著变化^[9]。其曼古丽^[10]通过 40、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 PB3A 干预胃癌 SGC-7901 细胞通过 MTT 比色法和流式细胞仪检测药物对细胞增殖以及凋亡影响,结果发现 PB3A 对胃癌 SGC-7901 细胞具有明显的增殖抑制作用并诱导细胞凋亡。目前 PB3A 对体外培养的人胃癌细胞的作用机制尚不明确,本研究参照文献^[9,10]报道的结果选择 *GEM*、*GADD45G*、*HSPA6*、*RGS2* 及 *FOS* 基因采用实时荧光定量 PCR 技术检测 PB3A 对上述基因表达的影响,以分子水平上探讨 PB3A 对人胃癌细胞作用的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

蜂胶黄酮 PB3A(质量分数 $\geq 99\%$)由 Yasuyuki T 和依米提·热合曼提供。胃癌 SGC-7901 细胞,购自上海细胞生物研究所细胞库;二甲基亚砜(DMSO)购自美国 Sigma 公司;RPMI1640 培养基购自美国 Hyclone 公司;胎牛血清美国 Gibco 公司;TRNzol 总 RNA 提取试剂购自北京天根生化科技公司;RevertAid™ 第一链 cDNA Synthesis 试剂盒与 Maxima SYBR Green/ROX qPCR Mester Mix 购自美国 Thermo 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

胃癌 SGC-7901 置孵箱(37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2)内培养,给予含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 完全培养基(含有 100 mL/L 的胎牛血清,100 U/mL 青霉素和

链霉素,调 pH 至 7.2)。根据细胞生长状况,每隔 2~3 d 进行换液,细胞进入指数生长期时取生长状态良好的细胞用于实验。

1.2.2 细胞总 RNA 的提取及质量鉴定

取对数生长期的细胞经 2.5 g/L 胰蛋白酶消化后,以每孔 1×10^7 个细胞接种于 6 孔培养板培养 24 h 后吸除原培养液。用 DMSO 溶解配成浓度分别为 40、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 PB3A 母液与 RPMI-1640 培养液混合(培养液中 DMSO 浓度 $\leq 0.5\%$),每孔加入 2 mL 上述含 PB3A 的培养液,设培养液中不加药物(加相同浓度的 DMSO)为对照组,继续培养 24 h 后收集细胞,采用 Trizol 试剂提取总 RNA,用 Nano-Drop2000 超微量分光光度计(Thermo,美国)检测 RNA 浓度及纯度并以 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测完整性。

1.2.3 cDNA 合成

通过质量鉴定的总 RNA 用 RevertAid™ 第一链 cDNA Synthesis 试剂盒反转录合成 cDNA。第一步反应:10 μL 反应体系,含 Oligo(dT)₁₈ primer 1.0 μL 、细胞总 RNA(可达 1 μg),RNase Free ddH₂O 至 10 μL 。混合短暂离心,65 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 5 min 后在冰块中放置 30 sec。在冰块上进行第二步反应:上述混合液 10 μL ,5x Reaction Buffer 4.0 μL ,RiboLock RNase Inhibitor (20 u/ μL) 1.0 μL ,10 mM dNTP Mix 2.0 μL ,RevertAidM-MuLVReverseTranscriptase (200 u/ μL) 1.0 μL ,RNase Free ddH₂O 至 20 μL 。加完所有试剂后,混匀,短暂离心,在 PCR 仪上进行反应,条件为:42 $^{\circ}\text{C}$ 60 min;70 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;4 $^{\circ}\text{C}$ ∞ ,存放-20 $^{\circ}\text{C}$ 备用。操作均在冰上按试剂盒说明书进行。

1.2.4 引物设计与合成

本实验用的所有基因与内参照 β -actin 引物均由 TaKaRa 公司设计合成,引物序列如表 1 所示。

1.2.5 实时荧光定量 PCR 扩增

利用 Bio-Rad iQ5 实时荧光定量 PCR 仪(美国)按 Maxima SYBR Green/ROX qPCR Mester Mix (Thermo) 试剂盒说明书进行实时荧光定量 PCR。25 μL 反应体系含 1 μL cDNA 模板;12.5 μL Maxima SYBR GreenROX qPCR Mester Mix (2x);0.6 μL 上游引物;0.6 μL 下游引物;10.3 μL ddH₂O。PCR 扩增程序:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变形 3 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变形 10 s,65 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,40 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s,共 61 个循环,末次延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。每次扩增均设置实验组与对照组 3 个重复以及 2 管空白对照组(以 ddH₂O 代替

表 1 实时荧光定量 PCR 扩增引物名称及序列

Table 1 Real-time fluorescent quantitative PCR amplification primer names and sequence

引物名称 Primer names	引物序列 Primer sequence	扩增片段 Amplified fragments (bp)
β -actin	F:5'-CATCCGTAAGACCTCTATGCCAAC-3' R:5'-ATGGAGCCACCGATCCACA-3'	171bp
<i>HSPA6</i>	F:5'-CTGGACAAGGCCAGATTCA-3' R:5'-CATAGGCCACAGCCTCATCA-3'	139 bp
<i>GEM</i>	F:5'-CAAGTCCACTCTGGCCAACATC-3' R:5'-ATCAACCATCAGGGTTCGTTC-3'	103 bp
<i>RGS2</i>	F:5'-CAGAAGCATTGACGAGCTGCTA-3' R:5'-ACAGGCCAGCCAGAATTCAATA-3'	107 bp
<i>FOS</i>	F:5'-AAAGCATCCATGTGTGGACTCAA-3' R:5'-TCTCTGAAGTGTCACTGGGAACAA-3'	92 bp
<i>GADD45G</i>	F:5'-CGACTCGCCAAGTTGATGA-3' R:5'-ACCCGCACGATGTTGATGTC-3'	153 bp

模板)。以 β -actin 为内参。扩增完成后,收集各组的 Ct 值,用于数据分析。对照组与处理组 Δ Ct 之间进行比较,Ct 值与基因 mRNA 的表达水平呈负相关,即 Ct 值越小表示基因起始拷贝数越多,基因表达量越高;Ct 值越大表示起始拷贝数越少,基因表达量越低。

1.2.6 数据处理

实验数据的统计学分析采用 SPSS19.0 统计分析软件。相对 mRNA 表达量以 Δ Ct (Δ Ct = 样品 Ct 均值-内参照 Ct 均值)平均值 $\bar{x} \pm s$ 表示。对基因的 Δ Ct 值进行单因素 ANOVA 分析, $P < 0.05$ 认为具有显著差异。

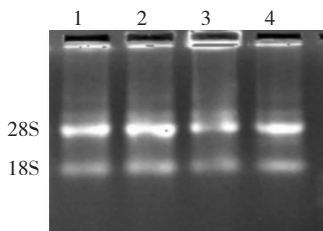


图 1 总 RNA 琼脂糖凝胶电泳检测结果

Fig. 1 Total RNA agarose gel electrophoresis detection result

注:图中 1、2 号泳道表示 DMSO 对照组;3、4 号泳道分别表示 40 μ g/mL 和 80 μ g/mL PB3A 处理组

Note: No. 1, 2 lane was DMSO control and 3, 4 were 40 μ g/mL and 80 μ g/mL PB3A treatment group respectively.

2 结果与分析

2.1 总 RNA 浓度及纯度测定结果

利用 Trizol 试剂提取的细胞总 RNA,经浓度纯

度测定的结果显示 A260/280 比值均在 2.0 ~ 1.8 之间,说明纯度好;经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后结果如图 1 所示,28S 和 18S 两条 rRNA 条带明显,可用于后续实验。

2.2 不同浓度 PB3A 对 *HSPA6*、*GEM*、*RGS2*、*FOS* 及 *GADD45G* 基因 mRNA 表达的影响

根据特异性引物对每个候选基因进行实时荧光定量 PCR 扩增。扩增完成后观察内参基因以及每个候选基因的融解曲线。在融解曲线峰图中单一并较锐利的峰表示、扩增的产物为目的片段以及产物特异性较好,说明实时荧光定量 PCR 结果可靠。

经 40 μ g/mL 及 80 μ g/mL PB3A 干预 SGC-7901 细胞 24 h 后实时荧光定量 PCR 结果(表 2)所示,药物干预组与 DMSO 对照组各个基因的 Δ Ct 比较,40 μ g/mL PB3A 处理胃癌 SGC-7901 细胞以后 *HSPA6*、*GEM*、*FOS* 基因 mRNA 水平表达明显提高 ($P < 0.05$),分别为 0.12 (*HSPA6*)、2.17 (*GEM*)、2.1 (*FOS*)而 *GADD45G*、*RGS2* 基因 mRNA 水平无显著性变化 ($P > 0.05$),80 μ g/mL PB3A 处理组与相应的对照组比较 *HSPA6* 基因 mRNA 水平表达明显提高 ($P < 0.05$),其差异倍数为 0.5,而其他基因无显著变化 ($P > 0.05$),见图 2、表 2。

3 讨论

胃癌作为当今世界范围内常见的恶性肿瘤,其发病率占消化道肿瘤的 40% ~ 50%,在我国胃癌死亡率为各种癌症之首,其侵袭性强且易于转移,目前

表2 PB3A 干预 SGC-7901 细胞 24 h 后相关基因的 ΔCt 值 ($n=3, \bar{x} \pm s$)Table 2 Variation of delta Ct values of related genes in cell line SGC-7901 after treated with PB3A for 24h ($n=3, \bar{x} \pm s$)

基因名称 Gene name	DMSO 对照组 DMSO Control	PB3A 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$	PB3A 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$
<i>HSPA6</i>	3.77 \pm 0.99	0.12 \pm 0.20 *	0.5 \pm 0.33 *
<i>GEM</i>	4.44 \pm 0.35	2.17 \pm 0.62 *	4.16 \pm 0.38
<i>RGS2</i>	2.23 \pm 0.39	2.81 \pm 0.51	2.73 \pm 0.59
<i>FOS</i>	0.68 \pm 0.20	2.1 \pm 0.39 *	0.08 \pm 0.91
<i>GADD45G</i>	2.29 \pm 0.41	2.26 \pm 0.41	2.61 \pm 0.27

注:不同浓度的 PB3A 处理组(40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$)与对照组(培养液中 DMSO 浓度为 $\leq 0.5\%$)比较 ΔCt 值具有显著差异, * $P < 0.05$ 。

Note: Compared with DMSO control group, 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PB3A treatment group had a significant difference, * $P < 0.05$.

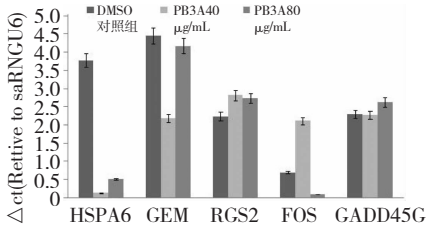


图2 不同浓度的 PB3A 对 SGC-7901 细胞相关基因 mRNA 表达水平的影响

Fig. 2 Effects of different concentrations of PB3A on mRNA expression levels of SGC-7901 cell related genes

除手术治疗外尚无其他好的治疗方法^[11,12]。常规化疗药物由于毒副作用较大,在临床上应用受到限制。开发植物来源生物活性天然药物并找出药物作用的靶点及其分子机制是对有效控制恶性肿瘤具有重大意义。

热休克蛋白(HSPs)是一组与细胞修复与保护有关的高度保守的蛋白质。当细胞受到胁迫刺激时会表现出热激反应从而诱导 HSPs 的产生^[13]。热休克蛋白家族中 *HSPA6* (heat shock 70kDa protein 6) 也称为 HSP70B, 具有分子伴侣的细胞保护作用^[14]。*FOS* (FBJ osteosarcoma oncogene) 基因是一类参与细胞生长和分化的高度保守的原癌基因^[15]。近期研究显示 *FOS* 基因编码的 c-fos 蛋白通过调控 DNA 胞嘧啶-5-甲基转移酶基因 (DNMT1), 从而改变 DNA 甲基化并调控肿瘤抑制基因表达, 胃癌细胞中 c-fos 蛋白表达发挥肿瘤抑制作用^[16]。*GEM* (mitogens induced GTP binding protein) 基因编码一种小分子量的 Ras 相关 GTP 结合蛋白^[17], 高表达于非胰岛素依赖型糖尿病患者的骨骼肌细胞膜上, 参与信号转导, 炎性细胞因子可诱导其表达, 并通过减少钙离子通道 α_1 亚基在细胞膜表面的表达而抑制电压依赖型钙离子通道的开放。研究显示, 5-AZA-CDR

和 SAHA 处理人乳腺癌细胞 MCF-7 后, *GEM* 等基因上调表达, 抑制肿瘤细胞增殖^[18]。*GADD45G* (growth arrest and DNA damage inducible protein 45) 是生长阻滞和 DNA 损伤诱导蛋白 45 基因家族成员, 可参与 DNA 损伤修复, 在细胞凋亡, 细胞生存以及信号转导等方面发挥重要作用^[19]。*GADD45G* 通过激活一系列细胞生长停滞有关的下游因子而发挥肿瘤抑制作用^[20]。*RGS2* (Regulator of G protein signaling 2) 基因属于调节 G-蛋白信号转导蛋白 (RGS) 家族, 介导血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 等缩血管因子相关的信号通路^[21]。在 *RGS2* 表达下调时, 可以刺激苯肾上腺素 (phenylephrine) 和内皮素 (endothelin) 的分泌, 导致心肌细胞的 PLC- β 通路激活, 从而增强促心肌肥大作用^[22]。

本研究中, 以 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处理胃癌 SGC-7901 细胞 24 h 后与对照组比较, *HSPA6*、*FOS*、*GEM* 基因表达量明显提高 ($P < 0.05$), 而 *GADD45G*、*RGS2* 基因的表达情况未发生显著变化 ($P > 0.05$)。80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PB3A 处理胃癌 SGC-7901 细胞 24 h 后与对照组比较只有 *HSPA6* 基因表达量明显提高 ($P < 0.05$), 而 *FOS*、*GEM*、*GADD45G*、*RGS2* 基因的表达情况未发生显著变化 ($P > 0.05$)。故我们认为细胞受到 PB3A 药物干预后, 以激活 *HSPA6* 起细胞保护作用而对药物的作用产生一定的耐性, 在一定程度上限制药物的抗癌作用。*FOS* 基因表达上调可能抑制 SGC-7901 细胞的增生并且促进凋亡, 这与 *FOS* 基因肿瘤抑制活性密切相关。根据上述讨论, 我们推测 *GEM* 基因的上调表达可能与 PB3A 抑制肿瘤细胞增殖作用有关。此外本研究结果显示 PB3A 人对胃癌 SGC-7901 细胞中 *GADD45G*、*RGS2* 基因的表达无显著影响; 根据不同浓度下基因表达情况的不同, 我们认为 PB3A 浓度为 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 其对胃癌 SGC-

7901 细胞中基因表达的影响比较明显。

参考文献

- Cao XY(曹小燕), Yang HT(杨海涛). Study on extraction of flavonoids from propolis and the activity of scavenging free radicals. *Sci Technol Cereals Oils Foods* (粮油食品科技), 2015, 23(5): 45-49.
- Huang S(黄帅), Zhang CP(张翠平), Hu FL(胡福良). Research progress in chemical composition of propolis between 2008 and 2012. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2013, 25: 1146-1153.
- Farooqui T, Akhlaq A. Farooqui. Beneficial effects of propolis on human health and neurological diseases. *Frontiers Biosci*, 2012, 1: 779-793.
- Huang S, Zhang CP, Wang K, et al. Recent advances in the chemical composition of propolis. *Molecules*, 2014, 19: 19610-19632.
- Xuan HZ(玄红专), Hu FL(胡福良), Gu ME(顾美儿). Advance in the research of caffeic acid phenethyl ester in propolis. *Food Res Dev* (食品研究与开发), 2006, 27(5): 14-15.
- Chen K(陈凯), Chen Q(陈钱), Huang CR(黄成然). The research progress on antitumor mechanism of plant flavonoids. *J Jilin Med Coll* (吉林医药学院学报), 2015, 36: 293-296.
- Fang JM, Su WC, Cheng YS. Flavonoids and stilbenes from armand pine. *Phytochemistry*, 1988, 27: 1395-1397.
- Amet M(木塔力甫·艾买提), Sheng L(盛磊), Abudula A, et al. Effects of propolis flavonoid Pinobanksin-3-acetate on cell proliferation and apoptosis of human colon cancer cell line HCT116. *Sci Technol Rev* (科技导报), 2015, 33(9): 69-73.
- Amet M, Abudula A, Akela A, et al. Anticancer activity of propolis flavonoid pinobanksin-3-acetate against human colon cancer *in vitro*. *Int J Biosci*, 2015, 7(2): 45-55.
- Turhun C(其曼古丽·吐尔洪). The study of propolis flavonoid pinobanksin-3-acetate on variety of human cancer *in vitro*. Xinjiang: Xinjiang University(新疆大学), MSc. 2015.
- Cheung TK, Wong BC. Treatment of helicobacter pylori and prevention of gastric cancer. *J Dig Dis*, 2008, 9(1): 8-13.
- Yang D(杨丹), Wang L(王丽), Li Z(李珠), et al. Inhibitory effect of gossypol on migration of gastric carcinoma cell-lines through Akt/ β -catenin passway. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2015, 31: 860-864.
- Khalouei S, Chow AM, Brown IR. Localization of heat shock protein *HSPA6* (HSP70B') to sites of transcription in cultured differentiated human neuronal cells following thermal stress. *J Neurochem*, 2014, 131: 743-754.
- Noonan E, Giardina C, Hightower L. HSP70B' and Hsp72 form a complex in stressed human colon cells and each contributes to cytoprotection. *Exp Cell Res*, 2008, 314: 2468-2476.
- Jin SP, Kim JH, Kim MA, et al. Prognostic significance of loss of c-Fos protein in gastric carcinoma. *Pathol Oncol Res*, 2007, 13: 284-288.
- Kalra N, Kumar V. c-FOS is a mediator of the c-myc-induced apoptotic signaling in serum-deprived hepatoma cells via the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem*, 2004, 279: 25313-25319.
- Liu Y(刘勇), Guo XR(郭锡熔), Pan XQ(潘晓勤), et al. Changes of *GEM* gene expression during 3T3-L1 preadipocyte differentiation. *Mod Diagn Treat* (现代诊断与治疗), 2005, 16: 265-268.
- Wolf I, Bose S, Julian C, et al. Unmasking of epigenetically silenced genes reveals DNA promoter methylation and reduced expression of PTCH in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 2007, 105: 139-155.
- Xu GQ, Zhang L, Ma AH, et al. SIP1 is a downstream effector of *GADD45G* in senescence induction and growth inhibition of liver tumor cells. *Oncol Target*, 2015, 32: 33636-33647.
- Guo W(郭炜), Zhu TN(朱铁年), Dong ZM(董稚明). Aberrant methylation and expression of growth arrest and DNA-Damage-Inducible 45G gene in esophageal squamous-cell carcinoma. *Tumor* (肿瘤), 2013, 33: 74-80.
- Eusemann TN, Willmroth F, Fiebich B, et al. Adenosine receptors differentially regulate the expression of regulators of G-protein signalling (RGS) 2, 3 and 4 in astrocyte-like cells. *PLoS One*, 2015, 10(8): e0134934.
- Osei-Owusu P, Owens EA, Jie L, et al. Regulation of renal hemodynamics and function by RGS2. *PLoS One*, 2015, 10(7): e0132594.