

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.00380

雷公藤甲素对乳腺癌细胞 P53、P73 基因甲基化的影响以及对细胞增殖的抑制作用

梅 怡¹, 史永照^{2*}, 冯 雯¹, 殷庆章², 李方明²

1. 上海中医药大学附属普陀医院普外科, 上海 200062

2. 复旦大学附属上海市第五人民医院普外科, 上海 200240

[摘要] **目的** 研究雷公藤甲素(triptolide, TP)对人乳腺癌 MCF-7 细胞系增殖的影响及其与 P53、P73 基因表达和甲基化状态的关系。**方法** 用不同浓度(10、20、40 ng/ml)TP 处理 MCF-7 细胞,采用 MTT 法检测 TP 对 MCF-7 细胞增殖的作用;RT-PCR 检测 MCF-7 细胞甲基转移酶 1(DNMT1)、DNMT3a、DNMT3b mRNA 的表达;甲基特异性 PCR 检测 TP 对 MCF-7 细胞 P53、P73 基因甲基化的影响;蛋白质印迹分析检测 MCF-7 细胞中 P53、P73 蛋白的表达。**结果** TP 剂量依赖性抑制 MCF-7 细胞的增殖($P < 0.05$, $P < 0.01$),其半数抑制浓度(IC₅₀)约为 20 ng/ml,高浓度(40 ng/ml)时抑制率达(70.1±3.52)%。TP 可明显抑制 MCF-7 细胞中 DNMT1、DNMT3a、DNMT3b mRNA 的表达($P < 0.05$, $P < 0.01$)。TP 处理 MCF-7 细胞后 P53 启动子区的甲基化降低,TP(20 ng/ml)处理后 P53 mRNA 的表达升高,而在高浓度(40 ng/ml) TP 作用下表达明显上调($P < 0.01$);TP 处理 MCF-7 细胞后 P73 基因启动子区的甲基化则明显降低,且 TP(10 ng/ml)处理后 P73 mRNA 的表达亦明显增强($P < 0.05$),并呈剂量依赖性。蛋白质印迹分析检测 TP(20 ng/ml)处理 MCF-7 细胞后,P53、P73 蛋白的表达均增强。**结论** TP 可通过抑制甲基转移酶活性和抑制 P53 特别是 P73 基因启动子区甲基化促进 P53、P73 的表达,并且能够抑制 MCF-7 细胞的增殖。

[关键词] 雷公藤内酯醇;甲基化;甲基转移酶类;P53 基因;P73 基因;乳腺肿瘤

[中图分类号] R 737.9

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2012)04-0380-05

Influence of triptolide on P53/P73 gene methylation and inhibition effect against proliferation of breast carcinoma MCF-7 cells

MEI Yi¹, SHI Yong-zhao^{2*}, FENG Wen¹, YIN Qing-zhang², LI Fang-ming²

1. Department of General Surgery, Putuo Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200062, China

2. Department of General Surgery, Shanghai Fifth People's Hospital Affiliated to Fudan University, Shanghai 200240, China

[Abstract] **Objective** To study the effect of triptolide (TP) on the proliferation of breast carcinoma cell line MCF-7 and its association with P53/P73 gene expression and methylation. **Methods** MCF-7 cells were treated with different concentrations of TP (10 ng/ml, 20 ng/ml, and 40 ng/ml), and the proliferation of MCF-7 cells was measured by MTT method. The expressions of methyltransferase DNMT1, DNMT3a and DNMT3b mRNA were measured by RT-PCR in MCF-7 cells, P53/P73 gene methylation was analyzed by methylation specific PCR, and the protein expression of p53/P73 in MCF-7 cells was examined by Western blotting assay. **Results** TP inhibited the proliferation of MCF-7 cells in a dose-dependent manner ($P < 0.05$, $P < 0.01$), with the inhibitory rate being (70.1±3.52)% at 40 ng/ml TP, and the IC₅₀ of TP was 20 ng/ml. TP significantly inhibited DNMT1, DNMT3a, and DNMT3b mRNA expression in MCF-7 cells ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and it also significantly inhibited methylation of P53 promoter region. TP increased P53 gene expression at 20 ng/ml and the increase was significant at 40 ng/ml ($P < 0.01$). TP reversed the hypermethylation of P73 gene in MCF-7 cells; it also significantly increased P73 mRNA expression at 10 ng/ml ($P < 0.05$), and the increase was in a dose-dependent manner. Western blotting analysis showed that TP (20 ng/ml) increased the protein expression of P53 and P73 in MCF-7 cells. **Conclusion** TP can promote the expression of P53 and P73 genes through inhibiting methyltransferase-dependent gene methylation, and further inhibit the proliferation of MCF-7 cells.

[收稿日期] 2012-02-02

[接受日期] 2012-03-15

[基金项目] 国家自然科学基金(81072956). Supported by National Natural Science Foundation of China (81072956).

[作者简介] 梅 怡, 硕士生, 主治医师. E-mail: meiyi76@yahoo.cn

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-62412588, E-mail: s3c2s3@yahoo.com.cn

[Key words] triptolide; methylation; methyltransferases; P53 gene; P73 gene; breast neoplasms

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(4): 380-384]

表观遗传修饰特别是 DNA 甲基化在细胞增殖、分化过程中发挥重要的作用^[1-2]。近年来发现,乳腺癌相关的抑癌基因启动子区域的 CpG 岛甲基化在乳腺癌的发生、发展过程中起着重要的作用^[3-5]。雷公藤甲素(triptolide, TP; 又称雷公藤内酯醇)是从雷公藤根中分离出的二萜类化合物,不但在抗炎和免疫抑制等方面具有较好的疗效^[6-7],也具有较强的抑制白血病等恶性肿瘤生长的作用,能与多种化疗药物协同增强化疗效果或逆转肿瘤细胞耐药^[7-10]。因此,雷公藤的抗炎、免疫抑制和抗肿瘤作用在乳腺癌发病后的临床治疗中具有重要的意义,备受医学界的关注,但 TP 对人乳腺癌 MCF-7 细胞的作用以及是否通过 DNA 甲基化发挥抗肿瘤作用,目前国内外鲜有报道。

本实验通过研究 TP 对 MCF-7 细胞生长的影响及其与 P53、P73 基因甲基化的关系,为临床乳腺癌的治疗及肿瘤复发的防治提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和细胞株 TP 购自美国 Sigma 公司(纯度 > 98%),以二甲亚砜配制成质量浓度为 1 mg/ml 的储存液, -20℃ 保存,使用时用培养液稀释并直接加入培养细胞中。胎牛血清(FBS)、RPMI 1640、DMEM 培养液均为美国 Gibco 公司产品; TRIzol RNA 提取试剂、DNA 抽提试剂盒、DNA 标准参照物和 PCR 试剂盒均为美国 Invitrogen 公司产品,反转录试剂盒为美国 Promega 公司产品, Bisulfite 试剂盒为美国 Qiagen 公司产品, DNA 甲基化试剂盒(EZ DNA Methylation Kit)为美国 ZYMO Research 公司产品。引物合成由上海生工生物工程技术服务有限公司完成。

人乳腺癌细胞株 MCF-7 由本实验室保存。MCF-7 细胞培养于含 10% FBS 的 DMEM 培养液中, 37℃、5% CO₂、饱和湿度条件下培养, 2~4 d 更换培养液一次, 常规传代培养, 取对数生长期细胞进行实验。

1.2 MTT 法检测 MCF-7 细胞的增殖 取对数生长期的 MCF-7 细胞, 按 2×10^5 /ml 密度接种于 96 孔培养板。实验设阴性对照组、TP 不同浓度(根据预实验结果, 选定 10、20、40 ng/ml)处理组, 另以培养液作为空白对照, 每组设 3 个平行孔。37℃、5% CO₂、饱和湿度条件下培养, 48 h 后, 每孔加入 10 μl MTT (5 mg/ml, Sigma 公司), 37℃ 条件下继续培

养 4 h, 每孔加入 100 μl DMSO, 酶标仪(Bio-Tek, 美国)检测每个实验组的光密度(D)值。细胞增殖抑制率(%) = (阴性对照组 D 值 - TP 处理组 D 值) / 阴性对照组 D 值 × 100%。

1.3 RT-PCR 检测甲基转移酶 mRNA 的表达 用 TRIzol 试剂盒提取不同质量浓度 TP 作用 48 h 后的 MCF-7 细胞以及正常淋巴细胞(本院血库提供)的 RNA。紫外分光光度计测定总 RNA 浓度与纯度, 于 -70℃ 保存备用。用反转录所得 cDNA 进行 PCR 扩增。PCR 引物序列: 甲基转移酶 1 [DNA-methyltransferase 1, DNMT1] 上游为 5'-AGG CGG CTC AAA GAT TTG GAA-3', 下游为 5'-GCA GAA ATT CGT GCA AGA GAT TC-3'; DNMT3a 上游为 5'-CCG ATG CTG GGG ACA AGA AT-3', 下游为 5'-CCC GTC ATC CAC CAA GAC AC-3'; DNMT3b 上游为 5'-AGG GAA GAC TCG ATC CTC GTC-3', 下游为 5'-GTG TGT AGC TTA GCA GAC TGG-3'。β-actin 上游为 5'-AAA GAC CTG TAC GCC AAC AC-3', 下游为 5'-GTC ATA CTC CTG CTT GC TGA T-3'。RT-PCR 参照 SYBR Green 说明书设定: 95℃ 10 s 变性, 95℃ 5 s, 60℃ 30 s, 40 个循环; 设定熔解曲线程序: 95℃ 1 min, 65℃ 15 s, 65℃ 10 s, 从 65℃ 缓慢升温至 95℃, 每升高 0.5℃ 检测一次荧光信号值, 反应结束后仪器自动生成 Ct 值(threshold cycles)以及熔解曲线图。

1.4 基因组 DNA 的提取、修饰与纯化 MCF-7 细胞系基因组 DNA 的提取: 按常规方法复苏人乳腺癌 MCF-7 细胞系, 使用含 10% FBS 的 DMEM 培养液培养, 0.25% 胰蛋白酶消化传代收集细胞, 并以酚-氯仿抽提法提取基因组 DNA。测定 D_{260}/D_{280} 比值并定量后, -80℃ 保存备用。

DNA 亚硫酸盐修饰与纯化: 肿瘤细胞的基因组 DNA 经过亚硫酸氢钠修饰, CpG 中未甲基化的胞嘧啶被转变为尿嘧啶, 而甲基化的胞嘧啶则不发生变化。用 DNA 甲基化试剂盒修饰与纯化已提取的基因组 DNA, 修饰后使用 Promega Wizard Cleanup DNA 纯化回收系统纯化修饰后的基因组 DNA。

1.5 巢式甲基化特异性 PCR 检测 P53、P73 基因甲基化水平 用甲基化特异性 PCR(methylation specific PCR, MSP)检测 P53、P73 基因甲基化水平^[11], 自行设计 3 对引物即 CpG 区扩增引物、甲基化引物(M)以及非甲基化引物(U), 序列见表 1。

表 1 CpG 区扩增引物、甲基化引物以及非甲基化引物
Tab 1 CpG amplification primer, methylation primer and unmethylation primer

Primer Name	Primer Sequence (5'→3')	Annealing temperature θ/°C	Product size (bp)
P73-C	Forward: GAA GGT CGA AGT AGG TGC TGT CTG G Reverse: ACA CTG AGT CCA TCT ACG ACG G	52°C	323
P73-M	Forward: GGA CGT AGC GAA ATC GGG GTT C Reverse: ACC CCG AAC ATC GAC GTC CG	60°C	151
P73-U	Forward: AGG GGA TGT AGT GAA ATT GGG GTT T Reverse: ATC ACA ACC CCA AAC ATC AAC ATC CA	60°C	159
P53-C	Forward: TTT GAA AGC ACT GTG TTC CT Reverse: GTT CAG ACT ACA ACT CCC AG	55°C	420
P53-M	Forward: CCA CCC TTC ATA TTT GAC AC Reverse: GCA AAG GAA ATG GAG TTG G	60°C	162
P53-U	Forward: GGG GTT ATT TTT TAT ATT TGA TAT Reverse: GTA AAG GAA ATG GAG TTG G	60°C	166

C: CpG amplification; M: Methylation; U: Unmethylation

反应步骤如下: 外侧 PCR 循环参数为 99°C 10 min, 1 个循环; 99°C 变性 30 s, 按表 1 中所注明温度退火 30 s, 72°C 延伸 1 min, 循环 35 次; 72°C 5 min。第二轮 PCR 用甲基化和非甲基化内侧引物分别扩增, 循环参数为 99°C 10 min, 1 个循环; 99°C 变性 30 s, 按表 1 中所注明温度退火 30 s, 72°C 延伸 45 s, 循环 35 次, 72°C 延伸 10 min。同时, 以正常人外周血淋巴细胞(本院血库提供)为阴性对照, 水作空白对照。最后, 取 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 在 Tanon 4200 凝胶图像分析仪(上海天能生物科技有限公司)上观察并照相。

1.6 蛋白质印迹法检测 MCF-7 细胞中 P53、P73 蛋白的表达 TP 作用 MCF-7 细胞后 48 h, 按 1×10⁶ 个细胞/100 μl 裂解液+1 μl 酶抑制剂的比例裂解细胞, 抽提蛋白, 并测定蛋白浓度, 行 10% SDS-PAGE 分离蛋白, 转膜, 分别加入 1:1 000 稀释的 anti-P53 或 P73 抗体(R&D 公司)孵育 2 h 后, 用 TBST 洗涤 2 次, 再加入 1:1 000 稀释的辣根过氧化物酶标记的二抗(R&D 公司)孵育 1 h, 最后显影并曝光。

1.7 统计学处理 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS 11.0 软件进行单因素方差分析, 检验水平(α) 为 0.05。

2 结果

2.1 TP 对 MCF-7 细胞增殖的抑制作用 MCF-7 细胞与不同剂量的 TP(10、20、40 ng/ml) 共同培养 48 h 后, 用 MTT 法检测细胞的增殖, 结果显示, 不同浓度 TP 对 MCF-7 细胞增殖有明显的抑制作用, 抑制率分别为 (28.9 ± 5.12)%、(49.7 ± 4.63)%、(70.1 ± 3.52)% ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。TP 处理组的细胞增殖抑制率随浓度增加而升高, 呈剂量依赖

性, 其半数抑制浓度(IC₅₀) 约为 20 ng/ml。

2.2 TP 对 MCF-7 细胞 DNMT1、DNMT3a 及 DNMT3b mRNA 表达的影响 TP 处理 MCF-7 细胞 48 h 后, 测定 MCF-7 细胞 DNMT1、DNMT3a 及 DNMT3b mRNA 的表达, 结果(图 1) 发现, MCF-7 细胞的 DNMT1、DNMT3a 及 DNMT3b mRNA 表达较正常淋巴细胞增高; 不同浓度 TP(10、20、40 ng/ml) 处理组 MCF-7 细胞的 DNMT1、DNMT3a 及 DNMT3b mRNA 表达均下调, 其中 DNMT3b 下调最显著, 且呈剂量依赖性($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

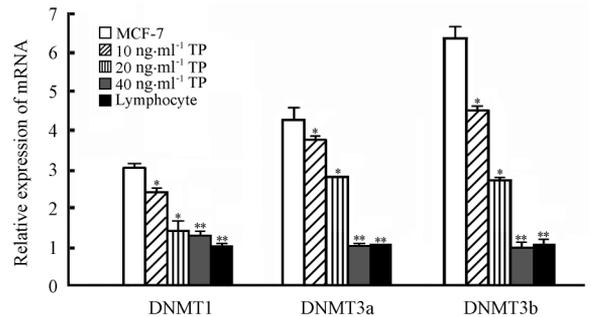


图 1 TP 处理 MCF-7 细胞后 DNMT mRNA 的表达
Fig 1 DNMT 1/3a/3b mRNA expression in MCF-7 cells after treatment with triptolide (TP)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control (MCF-7); $n = 6$, $\bar{x} \pm s$

2.3 TP 对 MCF-7 细胞 P53、P73 基因启动子区甲基化的作用 在 TP 未处理组中, P53-M、P53-U 和 P73-M、P73-U 均呈阳性, 而 P53-M 与 P73-M 在淋巴细胞中未出现扩增, 即在 MCF-7 乳腺癌细胞系中, P53 与 P73 启动子区皆出现了高甲基化。20 ng/ml 的 TP 明显抑制了 MCF-7 细胞中 P73-M 的表达, 且轻度抑制了 P53-M 的表达, 即 TP 处理后可抑制 MCF-7 细胞系 P53、P73 基因的甲基化。见图 2。

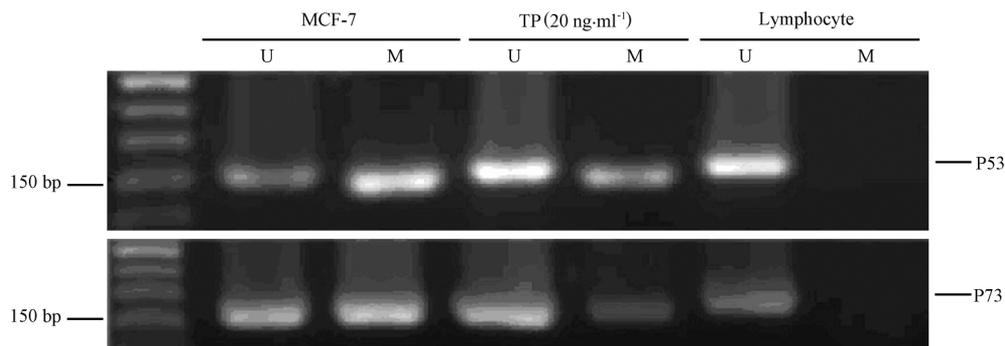


图2 TP对MCF-7细胞P53、P73基因甲基化的作用

Fig 2 Effect of triptolide (TP) on methylation of P53 and P73 gene in MCF-7 cells

U: Unmethylation; M: Methylation

2.4 TP对MCF-7细胞P53、P73 mRNA及蛋白表达的影响 进一步分析TP处理MCF-7细胞48 h后P53与P73 mRNA的表达。结果发现,正常淋巴细胞高表达P53 mRNA,未经TP处理的MCF-7细胞低表达P53 mRNA,但经高浓度(40 ng/ml)TP处理后MCF-7细胞P53 mRNA的表达明显上调

($P < 0.01$,图3A);未经TP处理的MCF-7细胞也低表达P73 mRNA,经TP(10 ng/ml)处理后P73 mRNA的表达明显增强,并随TP浓度增加而增强(图3B),可见TP能够促进MCF-7细胞P73 mRNA的表达。

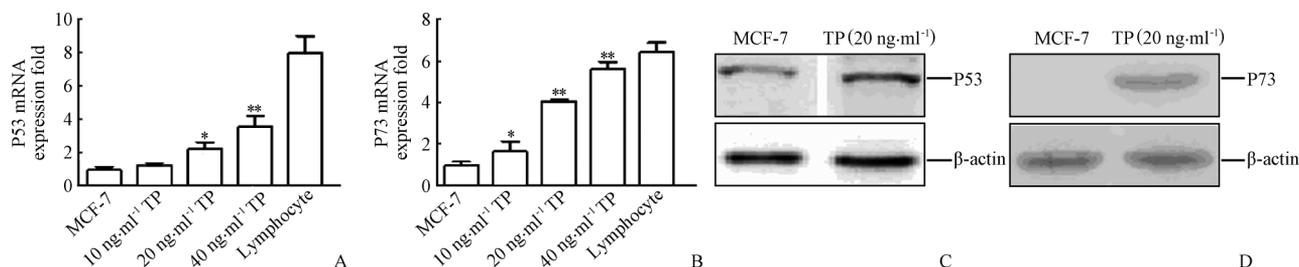


图3 TP处理MCF-7细胞后P53、P73 mRNA和蛋白的表达

Fig 3 Expressions of P53 and P73 mRNA and protein in MCF-7 cells after treatment with triptolide (TP)

A: P53 mRNA; B: P73 mRNA; C: P53 protein; D: P73 protein. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control (MCF-7); $n = 6$, $\bar{x} \pm s$

蛋白质印迹分析测定MCF-7细胞中P53、P73蛋白的表达水平,结果发现,TP未处理组MCF-7细胞中几乎不表达P73蛋白,P53蛋白呈低表达,而经TP(20 ng/ml)处理后P53、P73蛋白表达均增强(图3C、3D)。提示TP能促进P73、P53蛋白的表达。

3 讨论

雷公藤(*Tripterygium wifordii* Hook. f.)系卫矛科雷公藤属木质藤本植物,为我国传统驱风、杀虫、解毒中药。20世纪70年代从雷公藤中分离出TP、雷公藤内酯酮(triptonide)和雷公藤内酯二醇(tripdiolide)3个活性二萜类化合物^[9],其中TP的生物活性最强。近年来的研究证实,TP具有广谱抗肿瘤作用,对人T淋巴细胞瘤细胞株Jurkat及人前骨髓白血病细胞株HL-60均有明显的抑制作用^[12]。研究显示,TP除直接抑制肿瘤细胞的生长外,主要

通过诱导细胞凋亡发挥其抗肿瘤作用^[13]。其可能的机制是TP影响凋亡通路中重要的上游信号分子的功能,特别是TP可影响抑癌基因P53的表达,在调节细胞周期和引发细胞凋亡中发挥关键作用。Chang等^[14]的实验表明,TP可上调肝癌细胞内P53的表达,从而上调P53下游基因P21的表达,因此可阻断多柔比星引起的P21上调及P21介导的G₀/M期阻滞,引起肿瘤细胞凋亡,从而增强肿瘤细胞对多柔比星的敏感性。但TP是否抑制乳腺癌细胞的增殖以及通过何种机制发挥作用尚不清楚。

P73基因是近年来肿瘤学研究的热点之一,该基因作用于P53通路,是P53的稳定因子,可以与P53协同作用触发细胞凋亡,而且在多种恶性肿瘤中发现,P73基因由于启动子区超甲基化而导致该基因的表达受到抑制^[15-16],与肿瘤的发生发展密切相关。TP是否通过降低P53或P73启动子区甲基化发挥

抗肿瘤作用是值得研究的问题。本研究发现,TP可明显抑制MCF-7细胞的增殖,且呈剂量依赖性。采用甲基化特异性PCR检测P53、P73基因甲基化水平,发现TP处理MCF-7细胞后P53启动子区的甲基化降低,TP(20 ng/ml)处理后P53 mRNA的表达升高,在高浓度(40 ng/ml)TP作用下表达明显上调($P < 0.01$);TP处理MCF-7细胞后P73基因启动子区的甲基化降低较P53显著,且在20 ng/ml处理后P73 mRNA的表达亦明显增强($P < 0.01$);蛋白质印迹检测TP(20 ng/ml)处理MCF-7细胞后,P53、P73蛋白的表达明显增强。本研究结果提示TP可通过抑制P53特别是P73基因启动子区甲基化促进P53、P73的表达,并且能够抑制MCF-7细胞的增殖。

虽然乳腺癌细胞发生甲基化异常的模式目前仍不清楚,但DNMTs,包括DNMT1、DNMT3a和DNMT3b等已被证实在乳腺癌细胞内存在表达异常^[17-18]。其中DNMT1在正常细胞S期复制过程中具有维持甲基化的功能,多数表现为散在的C被甲基化,而CpG岛未被甲基化。DNMT1高表达是CpG岛甲基化紊乱的重要因素之一。本研究发现MCF-7细胞高表达DNMT1、DNMT3a及DNMT3b mRNA,不同浓度(10、20、40 ng/ml)TP处理后,MCF-7细胞中DNMT1、DNMT3a mRNA的表达均明显降低,提示抑制DNMTs表达可能是TP作用的机制之一。因此,雷公藤的抗肿瘤作用是否可作为乳腺癌发病后临床治疗以及防治肿瘤复发的待选药物,值得进一步的研究。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Huang K, Fan G. DNA methylation in cell differentiation and reprogramming: an emerging systematic view[J]. *Regen Med*, 2010, 5:531-544.
- [2] Dansranjav T, Krehl S, Mueller T, Mueller L P, Schmoll H J, Dammann R H. The role of promoter CpG methylation in the epigenetic control of stem cell related genes during differentiation[J]. *Cell Cycle*, 2009, 8:916-924.
- [3] Acosta D, Suzuki M, Connolly D, Thompson R F, Fazzari M J, Grelly J M, et al. DNA methylation changes in murine breast adenocarcinomas allow the identification of candidate genes for human breast carcinogenesis[J]. *Mamm Genome*, 2011, 22:249-259.
- [4] Bediaga N G, Acha-Sagredo A, Guerra I, Viguri A, Albaina C, Ruiz Diaz I, et al. DNA methylation epigenotypes in breast cancer molecular subtypes[J]. *Breast Cancer Res*, 2010, 12:R77.
- [5] Fernandez S V, Snider K E, Wu Y Z, Russo I H, Plass C, Russo J. DNA methylation changes in a human cell model of breast cancer progression[J]. *Mutat Res*, 2010, 688:28-35.
- [6] Chen X, Murakami T, Oppenheim J J, Howard O M. Triptolide, a constituent of immunosuppressive Chinese herbal medicine, is a potent suppressor of dendritic-cell maturation and trafficking[J]. *Blood*, 2005, 106:2409-2416.
- [7] Liu Q, Chen T, Chen G, Shu X, Sun A, Ma P, et al. Triptolide impairs dendritic cell migration by inhibiting CCR7 and COX-2 expression through PI3-K/Akt and NF-kappaB pathways[J]. *Mol Immunol*, 2007, 44:2686-2696.
- [8] Shamon L A, Pezzuto J M, Graves J M, Mehta R R, Wangcharoentrakul S, Sangsuwan R, et al. Evaluation of the mutagenic, cytotoxic, and antitumor potential of triptolide, a highly oxygenated diterpene isolated from *Tripterygium wilfordii*[J]. *Cancer Lett*, 1997, 112:113-117.
- [9] Lu L, Kanwar J, Schmitt S, Cui Q C, Zhang C, Zhao C, et al. Inhibition of tumor cellular proteasome activity by triptolide extracted from the Chinese medicinal plant 'thunder god vine'[J]. *Anticancer Res*, 2011, 31:1-10.
- [10] Yang S, Chen J, Guo Z, Xu X M, Wang L, Pei X F, et al. Triptolide inhibits the growth and metastasis of solid tumors[J]. *Mol Cancer Ther*, 2003, 2:65-72.
- [11] Ushiku T, Chong J M, Uozaki H, Hino R, Chang M S, Sudo M, et al. p73 gene promoter methylation in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma[J]. *Int J Cancer*, 2007, 120:60-66.
- [12] Chan E W, Cheng S C, Sin F W, Xie Y. Triptolide induced cytotoxic effects on human promyelocytic leukemia, T cell lymphoma and human hepatocellular carcinoma cell lines[J]. *Toxicol Lett*, 2001, 122:81-87.
- [13] Kiviharju T M, Lecane P S, Sellers R G, Peehl D M. Antiproliferative and proapoptotic activities of triptolide (PG490), a natural product entering clinical trials, on primary cultures of human prostatic epithelial cells[J]. *Clin Cancer Res*, 2002, 8:2666-2674.
- [14] Chang W T, Kang J J, Lee K Y, Wei K, Anderson E, Gotmare S, et al. Triptolide and chemotherapy cooperate in tumor cell apoptosis. A role for the p53 pathway[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276:2221-2227.
- [15] Wang P, Yu W, Hu Z, Jia L, Iyer V R, Sanders B G, et al. Involvement of JNK/p73/NOXA in vitamin E analog-induced apoptosis of human breast cancer cells[J]. *Mol Carcinog*, 2008, 47:436-445.
- [16] Tiwary R, Yu W, Sanders B G, Kline K. α -TEA cooperates with chemotherapeutic agents to induce apoptosis of p53 mutant, triple-negative human breast cancer cells via activating p73[J]. *Breast Cancer Res*, 2011, 13:R1.
- [17] Xiang G, Zhenkun F, Shuang C, Jie Z, Hua Z, Wei J, et al. Association of DNMT1 gene polymorphisms in exons with sporadic infiltrating ductal breast carcinoma among Chinese Han women in the Heilongjiang Province[J]. *Clin Breast Cancer*, 2010, 10:373-377.
- [18] Butcher D T, Rodenhiser D I. Epigenetic inactivation of BRCA1 is associated with aberrant expression of CTCF and DNA methyltransferase (DNMT3B) in some sporadic breast tumours[J]. *Eur J Cancer*, 2007, 43:210-219.

[本文编辑] 商素芳