论著

文章编号:1000-5404(2014)01-0020-05

二氢杨梅素通过抑制甲基转移酶诱导人乳腺癌MCF-7细胞PTEN基因去甲基化

白 倩,谢 琦,彭晓莉,常 徽,朱俊东,糜漫天 (400038 重庆,第三军医大学军事预防医学院营养与食品安全研究中心,重庆市营养与食品安全重点实验室)

[摘要] **目的** 观察二氢杨梅素对人乳腺癌MCF-7细胞中第10号染色体缺失的磷酸酶和张力蛋白同源基因(phosphatase and tensin homology deleted on chromosome ten,PTEN)甲基化及其表达的影响,并探讨相关作用机制。**方法** 以CCK-8法检测细胞活力,qRT-PCR检测PTEN和DNA甲基转移酶(DNA methyltransferase,DNMT)DNMT1、DNMT3a、DNMT3b的mRNA表达,Western blot法检测PTEN的蛋白表达,荧光法检测细胞DNA甲基转移酶总活性,甲基化特异性PCR法(methylation-specific PCR,MSP)检测PTEN基因甲基化水平。**结果** 细胞活力检测结果表明,二氢杨梅素可剂量依赖性降低乳腺癌MCF-7细胞活力($P<0.05$);qRT-PCR和Western blot检测结果表明,二氢杨梅素可显著上调PTEN的表达($P<0.05$),并呈现剂量-效应关系;MSP检测结果显示,二氢杨梅素可显著诱导MCF-7细胞PTEN基因去甲基化;qRT-PCR和荧光法检测结果显示,二氢杨梅素可显著降低MCF-7细胞DNMT1表达和DNMT活性($P<0.05$)。**结论** 二氢杨梅素显著诱导乳腺癌细胞PTEN基因去甲基化,促进其表达,其机制可能主要涉及对DNMT1表达和活性的抑制。

[关键词] 二氢杨梅素;乳腺癌细胞;PTEN;去甲基化;DNA甲基转移酶

[中图法分类号] R282.71;R73-361;R737.9 [文献标志码] A

Dihydromyricetin induces PTEN demethylation by down-regulating DNA methyltransferases in human MCF-7 breast cancer cells

Bai Qian, Xie Qi, Peng Xiaoli, Chang Hui, Zhu Jundong, Mi Mantian (Center for Nutrition and Food Safety, Chongqing Key Labortary of Nutrition and Food Safety, College of Military Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effects of dihydromyricetin on methylation status and expression of phosphatase and tensin homology deleted on chromosome ten (PTEN) gene in human MCF-7 breast cancer cells and explore the relevant mechanisms. **Methods** Cells viability was assessed by CCK-8 assay in MCF-7 cells after the treatment of dihydromyricetin at 10, 20, 40 and 80 μmol/L for 48 h. The expression of DNA methyltransferases (DNMT, including DNMT1, DNMT3a, and DNMT3b) and PTEN was measured by quantitative real-time PCR and Western blotting. DNMT activity was detected by DNMT activity/inhibition assay kit (fluorometrics). Modified methylation specific PCR (MSP) was used to screen the methylation level of PTEN. **Results** Dihydromyricetin significantly decreased the viability of MCF-7 cells in a dose-dependent manner. The qRT-PCR analysis and Western blotting showed that dihydromyricetin dose-dependently increased the expression of PTEN in MCF-7 cells. MSP showed that dihydromyricetin markedly induced PTEN demethylation in MCF-7 cells. Further studies indicated that dihydromyricetin decreased the expression of DNMT1 and inhibited the activity of DNMT. **Conclusion** Dihydromyricetin significantly induces PTEN demethylation and promotes its expression in breast cancer MCF-7 cells, and this effect may be mainly correlated with inhibition of DNMT1 expression and activity.

[**Key words**] dihydromyricetin; breast cancer cells; phosphatase and tensin homology deleted on chromosome ten; demethylation; DNA methyltransferase

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81372974). Corresponding author: Zhu Jundong, E-mail:zjdnfs@126.com

[基金项目] 国家自然科学基金(81372974)

[通信作者] 朱俊东,E-mail:zjdnfs@126.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20131121.1717.003.html(2013-11-21)

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,发病率占各种恶性肿瘤的7% ~10%,每年约 50 万人死于乳腺癌[1]。乳腺癌与膳食因素密切相关,积极探讨从天然膳食成分中寻找抑癌活性化合物具有重要的意义[2]。植物黄酮是一大类天然多酚化合物,广泛分布于蔬菜、水果、谷类等各种植物性食物中,具有抗氧化、抗炎症等生物学活性,特别是对于肿瘤及心血管疾病的防治作用一直备受关注[3]。二氢杨梅素(dihydromyricetin, DMY)是从藤茶等植物茎叶中提取的一种二氢黄酮醇类化合物[4],具有抗氧化、保肝、抗肿瘤等多种生物活性,但其抗癌作用机制尚不明确,尤其是对乳腺癌的作用尚少见研究报道。乳腺癌中抑癌基因 PTEN 表达异常较为常见,PTEN 基因失活与乳腺癌的发病,浸润转移,恶性转化,无限制生长及临床预后均有密切关系。本研究旨在观察二氢杨梅素对人乳腺癌 MCF-7 细胞抑癌基因 PTEN 甲基化及其表达的影响,并探讨其相关作用机制。

1 材料与方法

1.1 细胞与试剂

人乳腺癌细胞系 MCF-7 细胞购于上海细胞库。DMEM 培养基、胎牛血清购自美国 Hyclone 公司。二氢杨梅素购自成都曼斯特生物科技公司(纯度为 98%)。RNA 提取用 Biozol 购于日本 Bioflux 公司。cDNA 转录试剂盒、实时定量 PCR 试剂盒均购于日本博日科技公司。组织/细胞基因组 DNA 提取试剂盒购自 Aidlab 公司。甲基化修饰试剂盒购于美国 ZYMO 公司。细胞核蛋白提取试剂盒购于美国 Pierce 公司。DNMT 酶活性检测试剂盒购于美国 Epigentek 公司。琼脂糖购于美国 Introvigen 公司。PTEN 一抗为羊抗单克隆抗体,购自 Cell Signaling 公司。辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗购自 Sigma 公司。化学发光试剂盒购自 Millipore 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及处理 人乳腺癌 MCF-7 细胞置于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中,于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养。待细胞至对数生长期,采用不同浓度(10、20、40、80 μmol/L)的二氢杨梅素处理 48 h,以 DMSO 代替二氢杨梅素处理细胞作为空白对照组。

1.2.2 CCK-8 比色法检测细胞增殖 取对数生长期的细胞,以 5×10^4/mL 接种于 96 孔板,每孔 90 μL。待细胞贴壁(10 h 以上)后,以不同浓度 0、10、20、40、80 μmol/L 二氢杨梅素处理细胞 48 h,每孔终体积为 100 μL,每组 3 个平行。干预结束后,于每孔加入 CCK-8 试剂 10 μL,继续培养 1 h,待孔内液体颜色变黄,取出在 490 nm 波长处测定光密度值[D(490)]。以对照组(0 μmol/L 二氢杨梅素处理组)细胞活力为 100%,各处理组细胞活力按公式计算。

细胞活力 = [处理组 D(490)/对照组 D(490)] ×100%

1.2.3 MSP 法检测 PTEN 基因甲基化水平 取 1 μg 基因组 DNA,用亚硫酸氢钠试剂盒 EZ DNA Methylation-Gold Kit,按照操作手册进行亚硫酸氢钠的转化。其原理是亚硫酸氢盐通过两次加热变性反应使未甲基化的胞嘧啶发生脱氨基反应而转化为尿嘧啶,通过柱层析完成 DNA 的纯化和脱硫。配制 PCR 反应体系:模板 DNA 1.5 μL,上下游引物(表 1)各 1.5 μL,*Taq* 酶 Mix 12.5 μL,水 8 μL 。先将 PCR 仪预热至 94 ℃,然后把 PCR 管放进预热的 PCR 仪,按以下条件进行循环反应:94 ℃ 5 min;94 ℃ 30 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,共 35 个循环;72 ℃延伸 5 min。PCR 反应结束后,取 5 μL 反应产物、1 μL 的 6 × 上样缓冲液和 0.5 μL 染料于 2.0% 琼脂糖凝胶上电泳 80 V,60 min,凝胶成像系统分析仪进行摄像分析。

表 1 甲基化特异性 PCR 基因引物序列

基因	引物序列	产物大小(bp)	退火温度(℃)
PTEN-M	上游:5′-GTTTGGGGATTTTTTTTTCGC-3′ 下游:5′-AACCCTTCCTACGCCGCG-3′	178	60
PTEN-U	上游:5′-ATTAGTTTGGGGATTTTTTTTTTGT-3′ 下游:5′-CCCAACCCTTCCTACACCACA-3′	186	60

1.2.4 qRT-PCR 检测 mRNA 表达水平 以不同浓度(10、20、40、80 μmol/L)的二氢杨梅素处理人乳腺癌细胞 MCF-7 细胞 48 h 后,收集细胞,用 Trizol 提取各组细胞总 RNA,核酸蛋白仪测定总 RNA 的浓度及纯度。分别取总 RNA 2 μg,按反转录试剂盒说明书操作,逆转录反应合成 cDNA。以反应所得cDNA 在 MyiQ 实时定量 PCR 仪上进行 PCR 反应,每个基因各做 3 个平行组。分别绘制目的基因和内参照基因 GAPDH、β-actin 的溶解曲线和标准曲线,检测各基因的反应特异性和扩增效率。以 IQ 5.0 软件对 PCR 数据进行统计学分析,以各组的目的基因表达水平与内参的比值为该基因的校正表达水平(Normalized Fold Expression)。引物序列见表 2。

表 2 Real-time PCR 各基因引物序列

基因	引物序列
DNMT1	上游:5′-GGAGGGCTACCTGGCTAA-3′ 下游:5′-CGGGCTTCACTTCTTGCT-3′
DNMT3a	上游:5′-TATTGATGAGCGCACAAGAGAGC-3′ 下游:5′-GGGTGTTCCAGGGTAACATTGAG-3′
DNMT3b	上游:5′-CGGTTCCTGGAGTGTAAT-3′ 下游:5′-GAAAGCCAAAGATCCTGTT-3′
PTEN	上游:5′-CAATGTTCAGTGGCGGAACTTG-3′ 下游:5′-GAACTTGTCTTCCCGTCGTGTG-3′
β-actin	上游:5′-ACCAACTGGGACGATATGGAGAAGA-3′ 下游:5′-ACGACCAGAGGCATACAGGGACAA-3′
GAPDH	上游:5′-TGCACCACCAACTGCTTAG-3′ 下游:5′-GATGCAGGGATGATGTTC-3′

1.2.5 DNMT 酶活性检测 收集不同浓度二氢杨梅素处理后的细胞,按照 Pierce 核蛋白提取试剂盒操作手册提取细胞核

蛋白。根据 EpiQuik DNMT 酶活性/抑制检测试剂盒说明,被甲基化的 DNA 通过类酶联免疫吸附反应被 5-甲基胞嘧啶抗体所识别,甲基化 DNA 的生成量与酶活性呈线性关系,然后通过荧光检测法测定。

1.2.6 Western blot 检测 PTEN 蛋白表达 收集二氢杨梅素处理后的细胞,按每 1×10^6 个细胞加入裂解液 100 μL 和酶抑制剂 1 μL 的比例冰上裂解 15 min,1 000 r/min 于 4 ℃离心 15 min,收集上清液,Bradford 法进行蛋白定量。加上样缓冲液混匀,90 ℃ 5 min 使蛋白变性。于 SDS-PAGE 胶中以 80 V/20 min,120 V/90 min 进行电泳分离。湿式转膜法 220 mA 恒流电 2 h 将蛋白转移至聚偏二氟乙烯膜(polyvinylidene fluoride,PVDF)。室温下摇床封闭 1 h,加入用 TBS 1∶1 000 稀释的 PTEN 抗体,4 ℃ 过夜,TBST 洗膜后分别加入用 TBS 按 1∶10 000 稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗,室温下摇床作用 1 h,TBST 洗膜后化学发光法显色,Vilber 多功能成像仪成像,以 β-actin 为内参照。成像图片用 Quality one 对各条带进行灰度值分析。

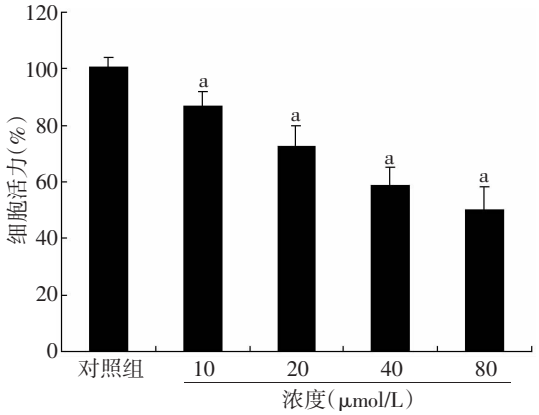
1.3 统计学分析

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 18.0 统计软件分析。常规进行方差齐性检验和正态性检验。多组资料之间的比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 二氢杨梅素对乳腺癌 MCF-7 细胞活力的影响

以 10、20、40、80 μmol/L 的二氢杨梅素作用于乳腺癌 MCF-7 细胞 48 h,采用 CCK-8 法检测细胞活力,结果显示(图 1),随着二氢杨梅素处理浓度的增高,MCF-7 细胞活力显著降低($P<0.05$),表明二氢杨梅素具有体外抗乳腺癌作用。

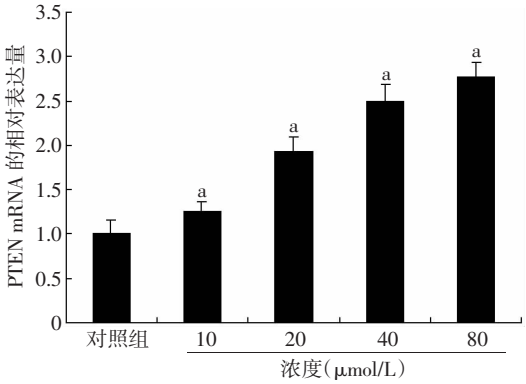


a: $P<0.05$,与对照组比较

图 1 不同浓度二氢杨梅素对乳腺癌 MCF-7 细胞活力的影响

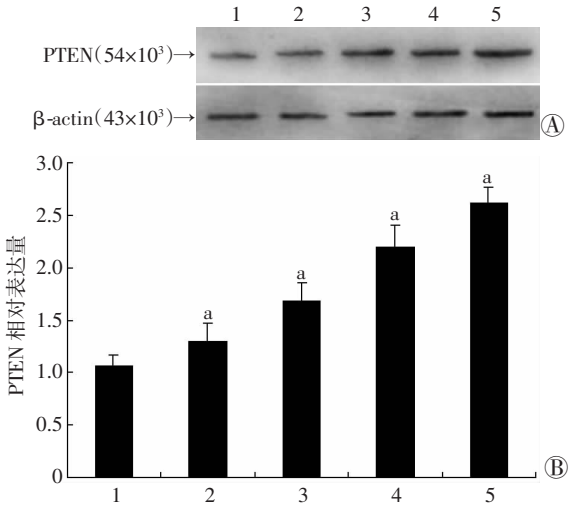
2.2 二氢杨梅素对乳腺癌 MCF-7 细胞 PTEN 基因表达的影响

qRT-PCR 结果(图 2)显示,经 10、20、40、80 μmol/L 的二氢杨梅素处理 48 h 后,PTEN 基因 mRNA 的表达水平呈剂量依赖性显著升高。同时,Western blot 检测结果证实(图 3),二氢杨梅素可显著上调 MCF-7 细胞 PTEN 基因的蛋白表达水平。



a: $P<0.05$,与对照组比较

图 2 不同浓度二氢杨梅素对 MCF-7 细胞 PTEN mRNA 表达的影响



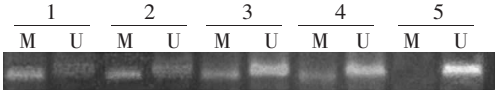
1:对照组;2:10 μmol/L;3:20 μmol/L;4:40 μmol/L;5:80 μmol/L

A:Western blot 检测结果;B:半定量分析结果 a: $P<0.05$,与对照组比较

图 3 Western blot 检测不同浓度二氢杨梅素对 MCF-7 细胞 PTEN 蛋白表达的影响

2.3 二氢杨梅素对 MCF-7 细胞 PTEN 基因甲基化的影响

采用 MSP 检测二氢杨梅素对 MCF-7 细胞 PTEN 基因甲基化的影响,结果见图 4。对照组 PCR 扩增后可见高亮度甲基化条带(M 条带),而非甲基化基因扩增条带(U 条带)较暗,提示 MCF-7 细胞 PTEN 基因有一定程度的甲基化。二氢杨梅素作用 48 h 后,随着作用剂量的增加,PTEN 基因甲基化 M 条带亮度逐渐减弱,而非甲基化 U 条带亮度逐渐增强。结果表明,二氢杨梅素可显著诱导 MCF-7 细胞 PTEN 基因去甲基化。

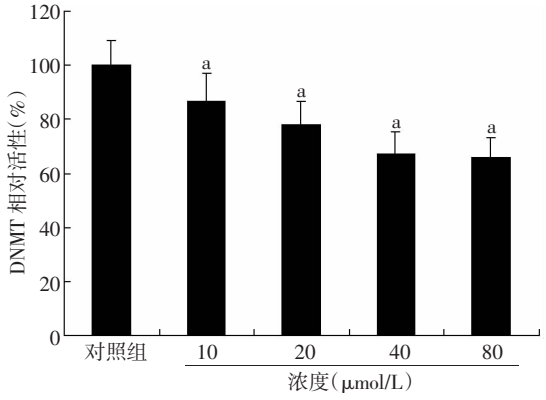


U:PTEN 基因非甲基化条带(186 bp); M:PTEN 基因甲基化条带(178 bp);1:对照组;2:10 μmol/L;3:20 μmol/L;4:40 μmol/L;5:80 μmol/L

图 4 不同浓度二氢杨梅素对 PTEN 基因甲基化的影响

2.4 二氢杨梅素对 DNMT 活性的影响

采用类酶联免疫吸附反应的 DNMT 活性检测结果见图 5，二氢杨梅素可显著抑制 DNMT 的活性，并显示出剂量依赖性效应关系。



a：$P<0.05$，与对照组比较

图 5 不同浓度二氢杨梅素对 MCF-7 细胞 DNMT 活性的影响

2.5 二氢杨梅素对 DNMT1、DNMT3a、DNMT3b 表达的影响

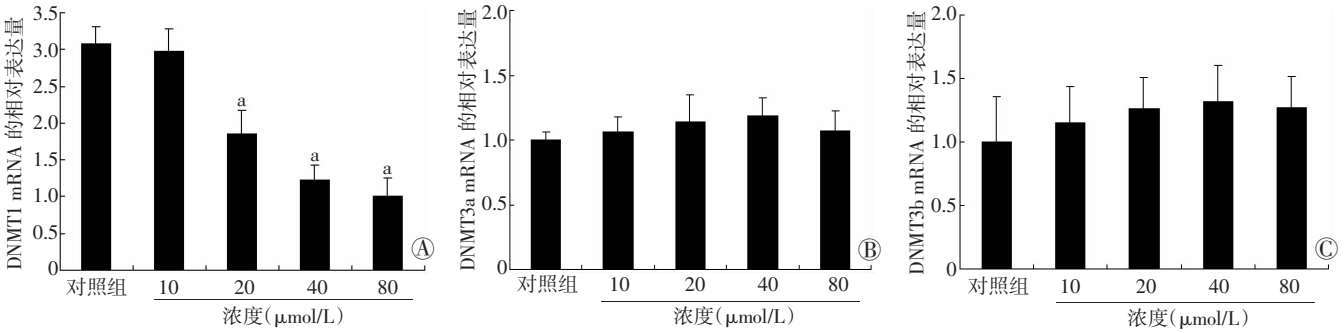
qRT-PCR 检测结果显示（图 6），20、40、80 μmol/L 二氢杨梅素作用于 MCF-7 细胞 48 h 后，DNMT1mRNA 的表达水平明显下降（$P<0.05$），而 DNMT3a、DNMT3b mRNA 的相对表达量在不同浓度二氢杨梅素的作用下均无明显改变。

3 讨论

DNA 甲基化是指生物体在 DNMT 的催化下，以 S-腺苷甲硫氨酸（SAM）作为甲基供体，将 CpG 二核苷酸胞嘧啶 5 位碳原子甲基化[5]。CpG 岛是幼体突变及肿瘤抑制基因失活性突变中非常重要的发生位点。基因启动子区的 CpG 岛高甲基化导致的抑癌基因转录沉默与肿瘤的发生发展有着密切的关系[6-7]。通过对 DNA 甲基化模式的研究，人们发现肿瘤细胞中存在异常的 DNA 甲基化状态：基因组整体甲基化水平降低，导致遗传不稳定性增加；组织特异性基因的启动子区域出现从头甲基化；癌基因多为不充分甲基化，导致重新开放或异常表达[8-9]；而抑癌基因多为过度甲基化，导致表达受抑制[10]，这些作用共同调控着癌症的发生发展。PTEN 基因是继 p53 之后，另一个在多种肿瘤细胞中突变与缺失较为常见，并与细胞的生长及凋亡关系密切的重要抑癌基因。基因失活除了突变、缺失的原因外，异常甲基化是其又一重要机制[11]。国内外研究结果显示，PTEN 基因 5′CpG 岛甲基化是乳腺癌等肿瘤患者常见的分子事件[12-14]。因此，调控乳腺癌细胞中包括 PTEN 在内的抑癌基因甲基化状态，增加其表达水平可能对抑制乳腺癌生长具有重要意义。

在过去的几年中，膳食植物化学物通过表观遗传学机制发挥抗肿瘤作用已经成为营养与肿瘤防治研究的一个新领域[15-16]。二氢杨梅素作为一种具有抗肿瘤作用的植物化合物，在体外内研究中发现该化合物可以通过抑制肿瘤血管生长、调节增强细胞免疫功能等作用达到抑制肿瘤的效果，在白血病、鼻咽癌和胃癌等肿瘤模型实验研究中都显示有明显的抑瘤作用[17-18]。但是，关于二氢杨梅素诱导抑癌基因去甲基化作用还少见报道。近年有研究显示，儿茶素、染料木素、番茄红素等植物化学物可以通过抑制 DNA 甲基转移酶的活性改变癌细胞中 DNA 甲基化状态，从而使甲基化沉默的肿瘤抑制基因恢复表达[19-22]。由此推测同样具有黄酮类生物活性的二氢杨梅素可能也有类似的抗癌作用机制。

本研究使用不同浓度的二氢杨梅素处理乳腺癌 MCF-7 细胞，发现其对 MCF-7 细胞的活力有明显抑制作用，并具有剂量-效应关系。抑癌基因 PTEN 的 mRNA 和蛋白表达水平也随二氢杨梅素作用剂量的增加而显著升高。与上述结果相对应，MSP 结果显示二氢杨梅素作用于 MCF-7 细胞 48 h 后，PTEN 基因呈剂量依赖性去甲基化，提示二氢杨梅素诱导乳腺癌 MCF-7 细胞 PTEN 基因表达增加的机制可能是通过影响 PTEN 基因甲基化的程度。甲基化程度往往与基因表达水平呈负相关，肿瘤的发生过程中常伴有抑癌基因



A：DNMT1；B：DNMT3a；C：DNMT3b a：$P<0.05$，与对照组比较

图 6 qRT-PCR 检测不同浓度二氢杨梅素对 MCF-7 细胞 DNMT1、DNMT3a、DNMT3b mRNA 表达的影响

的高甲基化或癌基因的低甲基化,这种异常的甲基化状态进而引起抑癌基因的表达减弱或缺失及癌基因的表达增强。DNA甲基化过程中发挥重要作用DNMTs的转录表达增加和活性增强是导致抑癌基因高甲基化而引发肿瘤发生的重要机制,也是肿瘤的重要生物学特征之一。为探讨二氢杨梅素诱导PTEN基因去甲基化的机制,我们进一步研究了DNMTs的活性及表达变化,结果显示二氢杨梅素能够在一定程度上降低DNMT1 mRNA的表达水平,并抑制DNMT的活性。国内外大量研究发现,各种去甲基化药物可通过与DNMTs共价结合,抑制酶的生物活性,使DNA的甲基化程度随着细胞分裂进行性减低,从而逆转甲基化效应,重新激活因异常甲基化而沉默的基因[23]。本研究结果表明二氢杨梅素可通过抑制DNMT(主要是DNMT1)的转录表达及其活性,介导PTEN基因去甲基化作用的发生。

综上所述,本研究结果表明二氢杨梅素可以通过去甲基化作用增加抑癌基因PTEN的表达,从而发挥体外抗乳腺癌的作用。但二氢杨梅素是否还能够改变其他抑癌基因或癌基因的甲基化状态,还有待于进一步深入研究。

参考文献:

[1] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013[J]. CA Cancer J Clin, 2013, 63(1): 11-30.

[2] Wang L, Lee I M, Zhang S M, *et al*. Dietary intake of selected flavonols, flavones, and flavonoid-rich foods and risk of cancer in middle-aged and older women[J]. Am J Clin Nutr, 2009, 89(3): 905-912.

[3] Link A, Balaguer F, Goel A. Cancer chemoprevention by dietary polyphenols: promising role for epigenetics[J]. Biochem Pharmacol, 2010, 80(12): 1771-1192.

[4] 周防震, 张晓元, 孙奋勇, 等. 二氢杨梅素对人乳腺癌细胞MDA-MB-231的体外抗增殖作用[J]. 肿瘤防治研究, 2012, 39(1): 95-97.

[5] Li Y, Chen H, Hardy T M, *et al*. Epigenetic regulation of multiple tumor-related genes leads to suppression of breast tumorigenesis by dietary genistein[J]. PLoS One, 2013, 8(1): e54369.

[6] Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease[J]. Nat Biotechnol, 2010, 28(10): 1057-1068.

[7] 胡华梅,杨晓亚,熊刚,等. 食管鳞状细胞癌survivin表达与其CpG岛甲基化的研究[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(1): 13-15.

[8] Rodriguez-Paredes M, Esteller M. Cancer epigenetics reaches mainstream oncology[J]. Nat Med, 2011, 17(3): 330-339.

[9] Brait M, Sidransky D. Cancer epigenetics: above and beyond[J]. Toxicol Mech Methods, 2011, 21(4): 275-288.

[10] Jones P A, Baylin S B. The epigenomics of cancer[J]. Cell, 2007, 128(4): 683-692.

[11] 张艳, 陈彬, 李渝萍, 等. 乳腺癌细胞中PNRC基因启动子区CpG岛甲基化状态的研究[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(4): 299-302.

[12] 延敏博, 孙华宾, 刘燕, 等. PTEN甲基化及其异常表达与膀胱移行细胞癌的关系[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(12): 1249-1251.

[13] Cidado J, Park B H. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway for breast cancer therapy[J]. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2012, 17(3/4): 205-216.

[14] Zhang H Y, Liang F, Jia Z L, *et al*. PTEN mutation, methylation and expression in breast cancer patients[J]. Oncol Lett, 2013, 6(1): 161-168.

[15] Gerhauser C. Cancer chemoprevention and nutri-epigenetics: state of the art and future challenges[J]. Top Curr Chem, 2013, 392: 73-132.

[16] Hui C, Yujie F, Lijia Y, *et al*. MicroRNA-34a and microRNA-21 play roles in the chemopreventive effects of 3, 6-dihydroxyflavone on 1-methyl-1-nitrosourea-induced breast carcinogenesis[J]. Breast Cancer Res, 2012, 14(3): R80.

[17] Huang H, Hu M, Zhao R, *et al*. Dihydromyricetin suppresses the proliferation of hepatocellular carcinoma cells by inducing G_2/M arrest through the Chk1/Chk2/Cdc25C pathway[J]. Oncol Rep, 2013, 30(5): 2467-2475.

[18] Ni F, Gong Y, Li L, *et al*. Flavonoid ampelopsin inhibits the growth and metastasis of prostate cancer *in vitro* and in mice[J]. PLoS One, 2012, 7(6): e38802.

[19] Hui C, Qi X, Qianyong Z, *et al*. Flavonoids, flavonoid subclasses and breast cancer risk: a meta-analysis of epidemiologic studies[J]. PLoS One, 2013, 8(1): e54318.

[20] Xie Q, Chen M L, Qin Y, *et al*. Isoflavone consumption and risk of breast cancer: a dose-response meta-analysis of observational studies[J]. Asia Pac J Clin Nutr, 2013, 22(1): 118-127.

[21] Fang M Z, Wang Y, Ai N, *et al*. Tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits DNA methyltransferase and reactivates methylation-silenced genes in cancer cell lines[J]. Cancer Res, 2003, 63(22): 7563-7570.

[22] King-Batoon A, Leszczynska J M, Klein C B. Modulation of gene methylation by genistein or lycopene in breast cancer cells[J]. Environ Mol Mutagen, 2008, 49(1): 36-45.

[23] Leppert S, Matarazzo M R. De Novo DNMTs and DNA Methylation: Novel Insights into Disease Pathogenesis and Therapy from Epigenomics[J]. Curr Pharm Des, 2013, [Epub ahead of print].

(**收稿**:2013-07-19;**修回**:2013-10-28)

(编辑 汪勤俭)