

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.06.010

PRMT5 调控三阴性乳腺癌对多西他赛敏感性的研究*

孔 静¹ 王 哲¹ 杨云舒² 吴 颖¹ 凌 瑞^{1Δ}

(1 空军军医大学西京医院甲乳血管外科 陕西 西安 710032; 2 空军军医大学研究生管理大队 陕西 西安 710032)

摘要 目的:探讨蛋白质精氨酸甲基转移酶 5(protein arginine methyltransferase 5, PRMT5)对三阴性乳腺癌对多西他赛敏感性的影响,为三阴性乳腺癌的治疗提供新的思路。**方法:**通过包装慢病毒构建 PRMT5 过表达稳转细胞系和 PRMT5 敲除细胞系。采用平板克隆测定不同浓度下多西他赛对于 MDA-MB-231 细胞和 PRMT5 过表达细胞增殖的影响。采用流式周期和凋亡检测不同浓度多西他赛对 PRMT5 过表达和 PRMT5 敲除以及 MDA-MB-231 亲本细胞的周期以及凋亡的影响。采用 Western Blot 方法检测 PARP 以及 p21、p27 及 LC3 等表达。**结果:**成功构建 PRMT5 过表达及敲除稳转系。与对应对照组(MDA-MB-231 细胞)比较,4nM 和 8nM 的多西他赛处理的 PRMT5 过表达细胞系(MDA-MB-231-PRMT5 细胞)形成克隆率明显降低($P<0.05$),细胞凋亡率明显增加($P<0.05$),细胞周期 p21 分子表达增多($P<0.05$),但未随浓度增加增高($P<0.05$),cycling D1、PARP 剪切体、LC3- II 的表达均明显增加 ($P<0.05$)。4nM 和 8nM 的多西他赛处理的 PRMT5 敲除稳转系 (MDA-MB-231-shPRMT5) 细胞凋亡率、p21、p27、cyclinD1、LC3- II 的表达均较对应对照组(MDA-MB-231 细胞)明显降低($P<0.05$),LC3- II 表达水平较亲本低($P<0.05$)。**结论:**PRMT5 高表达可增加 MDA-MB-231 细胞对多西他赛的敏感性,PRMT5 有望成为多西他赛临床治疗敏感性预测和方案选择的关键分子,并有望成为调控多西他赛等化疗药物耐药的新靶点。

关键词:三阴性乳腺癌;蛋白质精氨酸甲基转移酶 5;细胞周期;细胞凋亡**中图分类号:**R-33;R737.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)06-1050-05

Regulation of PRMT5 on the Sensitivity to Docetaxel of Triple Negative Breast Cancer*

KONG Jing¹, WANG Zhe¹, YANG Yun-shu², WU Ying¹, LING Rui^{1Δ}

(1 Department of Thyroid, Breast and Vascular Surgery, Xijing Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China; 2 Team of Graduate Management, The Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To explore the effect of protein arginine methyltransferase 5 (PRMT5) on the sensitivity of triple negative breast cancer (TNBC) to Docetaxel and find a novel method to treat TNBC. **Methods:** The stable PRMT5-overexpression and PRMT5-knock down cells were obtained through packaging slow virus. The effect of different doses of docetaxel on the proliferation of MDA-MB-231-PRMT5 and MDA-MB-231 cells were detected by flat plate clone formation test. The cell cycle and apoptosis were detected by flow cytometry. The expression of PARP, p21, p27 and LC3- II were examined by Western Blot. **Results:** The stable PRMT5-overexpression cells and PRMT5-knock down cells were successfully constructed. Compared to the MDA-MB-231 cell, the colony forming efficiency of MDA-MB-231-PRMT5 cells treated by 4nM and 8nM docetaxel were significantly lower ($P<0.05$), the apoptotic rates and p21, cycling D1, PARP and LC3- II expressions were obviously higher ($P<0.05$). However, the apoptotic rates and p21, cycling D1, PARP and LC3- II expressions of MDA-MB-231-shPRMT5 cells treated by 4nM and 8nM docetaxel were obviously lower ($P<0.05$). **Conclusions:** The overexpression of PRMT5 could increase the sensitivity of MDA-MB-231 cell to Docetaxel. PRMT5 might be the key point to predict the sensitivity of docetaxel treatment and the target of regulation of docetaxel drug resistance.

Key words: Triple-negative breast cancer; PRMT5; Cell-cycle; Apoptosis**Chinese Library Classification (CLC):** R-33; R737.9 **Document code:** A**Article ID:** 1673-6273(2018)06-1050-05

前言

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一^[1],其中 15%为不表达雌激素受体、孕激素受体及人表皮生长因子受体 2 的三阴性乳腺癌(Triple negative breast cancer, TNBC)^[2]。作为乳腺癌的一

种特殊亚型, TNBC 具有侵袭力强、复发早、进展快和预后差等特点^[3]。目前,化疗仍是 TNBC 其术后的主要治疗方法,蒽环类和紫杉类化疗药被证实是治疗 TNBC 的有效药物^[4]。

多西他赛(Docetaxel)作为一种可与纺锤体微管结合从而导致有丝分裂阻滞及细胞死亡的强效化疗药物,被广泛应用于一

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81572917)

作者简介:孔静(1991-),八年制,主要研究方向:乳腺癌,E-mail: kongjing1119@163.com

Δ 通讯作者:凌瑞(1964-),博士生导师,教授,主要研究方向:乳腺癌,E-mail: lingrui0105@163.com,电话:13909210575

(收稿日期:2017-11-08 接受日期:2017-12-05)

线 TNBC 的治疗^[9]。研究显示多西他赛治疗 TNBC 的效果有差异性, Dong Hu 等发现在乳腺癌中尤其是 TNBC 中, 蛋白质精氨酸甲基转移酶 5 (protein arginine methyltransferase 5, PRMT5) 都呈高表达^[9]。作为一种表观遗传酶, PRMT5 能对对称地甲基化组蛋白或者非组蛋白底物的精氨酸残基, 影响多个靶基因及多条信号通路途径, 且其表达水平与肿瘤的发生发展密切相关^[7,8]。本研究主要探讨了 PRMT5 对多西他赛对三阴性乳腺癌细胞敏感性的影响, 以期对三阴性乳腺癌的治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

MDA-MB-231、293T 细胞由第四军医大学生化教研室张健教授惠赠, DMEM 细胞购自 Hyclone 公司。胎牛血清购自于 Gibco 公司。兔抗人 PARP、LC3A/B、p21、p27 及 cyclin D1 抗体, 鼠抗人 β -actin 抗体, HRP 标记的羊抗兔 IgG 和羊抗鼠 IgG 抗体均购自 Cell Signaling Technology 公司。化学发光试剂盒购自 zeta 公司。多西他赛 (Docetaxel) 购自于 Selleckchem 公司。PRMT5、shPRMT5 及 scramble 质粒获赠于叶明翔博士。吉姆萨染液购自碧云天公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及稳转系细胞构建 MDA-MB-231 及 293T 细胞培养于含 10% 的胎牛血清及 1% 的双抗的 DMEM 培养基, 细胞在 5% 的 CO₂, 37℃ 孵育箱中常规培养。利用 PRMT5、shPRMT5 及 scramble 质粒及包装质粒按 1:3:4 加入无血清的培养基中, 按 1(μ g):2.5(μ L) 比例加入 lipo2000。6 小时候换为新鲜培养基, 48 h 收集病毒液储存于 -80℃。MDA-MB-231 以 60% 的密度接种于 6 cm 皿, 加入病毒液, 48 h 后加入 2.5 μ g/ μ L 的嘌呤霉素。筛选一个星期, 验证稳转系构建情况。

1.2.2 平板克隆 取 MDA-MB-231、MDA-MB-231-PRMT5 细胞各 500 个接种于六孔板中, 培养 3 天后, 对照度以 1‰ 的浓度加入 DMSO。实验组分别加入多西他赛 1 nM 及 5 nM, 处理 5 天后, 换为新鲜培养液培养 3 天, 后洗去培养液, 各孔加入固定液 2 mL, 固定 2 h 后加入吉姆萨染液各 2 mL, 1 h 后洗去染液拍照, 使用 Odyssey 扫描拍照, 利用 ImageJ 软件计数, 以对照组为参照, 分别计算实验组形成克隆数的百分比。

1.2.3 Annexin V-FITC/PI 凋亡、周期检测 将取细胞对数期对照组加入 1‰ 的 DMSO, 实验组分别加入 4 nM 及 8 nM 多西

他赛, 处理 24 h 后 0.25% 胰蛋白酶消化处理细胞, 800 r/min 离心 5 min 沉淀细胞, 弃上清, PBS 重悬细胞。取 100 μ L 细胞悬液于 5 mL 流式管中, 在加入 10 μ g/mL 的 PI, 混匀后避光孵育 15 min, 在反应管中加入 400 μ L 稀释好的结合缓冲液, 流式细胞仪检测细胞凋亡情况。同样处理细胞, 消化离心后, 4℃ 预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次, 800 r/min 离心后, 弃上清液。缓缓加入 75% 乙醇 1 mL 重悬细胞, -20℃ 固定过夜。800 r/min 离心 5 min 后收集细胞, PBS 洗涤。加入碘化丙啶 (PI) 染色, 避光孵育 30 min 后上机检测。

1.2.4 Western blot 实验 给予 MDA-MB-231、MDA-MB-231-PRMT5 及 MDA-MB-231-shPRMT5 细胞终浓度分别为 4 和 8 nM 的多西他赛、对照组给予 1% DMSO 各 24 h, 细胞样品收集于 1.5 mL EP 管中, 各管中加入 80 μ L 含有蛋白酶抑制剂 RIPA 裂解液, 冰上裂解 20 min, 收集裂解液上清。BCA 法测定蛋白浓度, 加入 1/4 体积的 5x loading buffer, 100℃ 煮沸 10 min。配置聚丙烯酰胺凝胶, 于各加样孔中加 5 μ L 蛋白 marker 及相应蛋白样品 20 μ g, 连接电极, 设置电泳电压 120 V, 2 h。300 mA 恒流冰水转膜 90 min。根据目的蛋白的分子量大小将 NC 膜裁剪至适宜大小。5% 的脱脂奶粉室温封闭 2 h。经 TBST 洗膜后, 加入配好的一抗缓冲液 4℃ 孵育过夜。TBST 洗膜 20 min, 二抗室温孵育 1 h, TBST 洗膜 2 min, 待发光检测。

1.3 统计学分析

每组实验至少重复 3 次, 每次实验至少 3 个复孔。采用 SPSS19.0 统计软件进行数据分析。计量资料用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 并进行两独立样本 t 检验, 以 $p < 0.05$ 表示有统计学意义。

2 结果

2.1 PRMT5 过表达及敲除的稳转系细胞的构建

Western blot 方法检测 MDA-MB-231 细胞中 PRMT5 的蛋白表达水平, 结果显示: MDA-MB-231-PRMT5 细胞中 PRMT5 表达明显上调 ($p < 0.01$), MDA-MB-231-shPRMT5 细胞中 PRMT5 表达明显下调 ($p < 0.01$) (图 1)。

2.2 不同浓度多西他赛对 MDA-MB-231 及 MDA-MB-231-PRMT5 细胞形成平板克隆能力的影响

平板克隆结果显示: MDA-MB-231-PRMT5 细胞及亲本细胞形成克隆数分别为 (402.8 \pm 10.4)、(160.9 \pm 8.7), 多西他赛 4

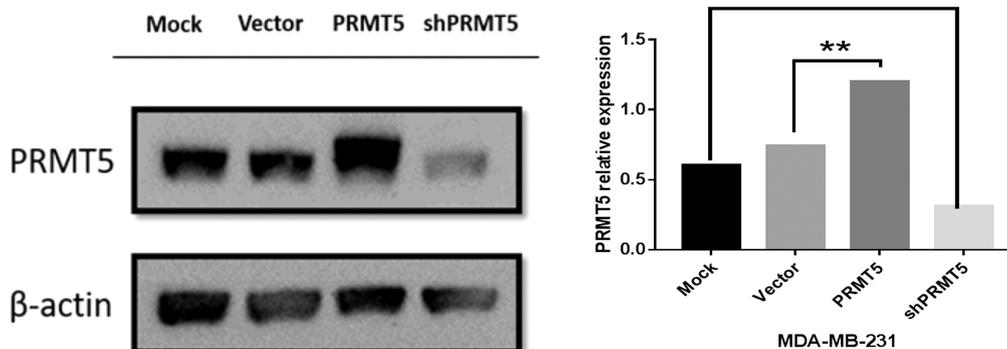


图 1 Western blot 检测 MDA-MB-231-PRMT5 和 MDA-MB-231-shPRMT5 细胞中 PRMT5 的表达情况

Fig.1 The expression levels of PRMT5 in MDA-MB-231-PRMT5 cells and MDA-MB-231-shPRMT5 cells were detected by western blot method ** $P < 0.01$

nM 组分别为(67.0± 9.0)、(157.7± 11.1),多西他赛 8 nM 组则分别为 (59.5± 14.5)、(33.4± 11.2)。与对照组相比,4nM 和 8nM 的多西他赛处理组克隆形成率: (0.336± 0.031)%、(0.432±

0.030)%、(0.168± 0.034)%、(0.311± 0.046)% ,组间差异有统计学意义 (p<0.05) ,表明 MDA-MB-231-PRMT5 对多西他赛更敏感。

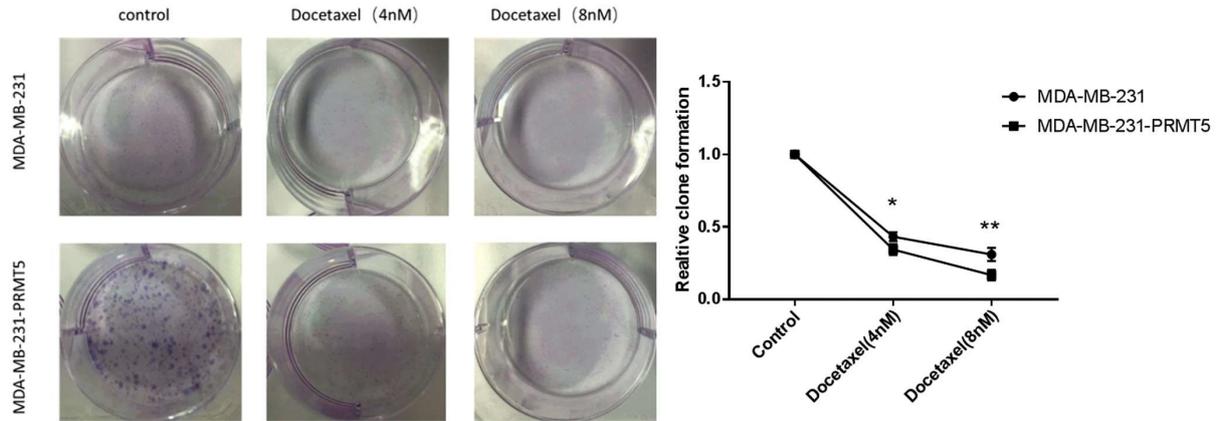


图 2 平板克隆实验检测 MDA-MB-231 和 MDA-MB-231-PRMT5 细胞在多西他赛作用下形成克隆能力

Fig.2 The ability of clone formation of MDA-MB-231 and MDA-MB-231-PRMT5 in different dose of docetaxel *P<0.05**P<0.01

2.3 不同浓度下的多西他赛对 MDA-MB-231、MDA-MB-231-PRMT5 及 MDA-MB-231-shPRMT5 细胞周期及凋亡的影响

流式细胞仪检测显示:4 nM 和 8 nM 的多西他赛处理 24h 后,相较于 MDA-MB-231 细胞 G2/M 期的百分比 (41.03± 3.99)%、(58.79± 6.57)% ,MDA-MB-231-PRMT5 细胞的 G2/M 期细胞的百分率分别为(55.40± 4.78)%、(70.01± 3.04)% ,组间周期有统计学差异 (P<0.01)。此外,多西他赛 8 nM 作用下,MDA-MB-231-PRMT5 凋亡率为 (24.58 ± 1.78)% ,MDA-MB-231 凋亡率为 (19.98 ± 2.31)% ,MDA-MB-231-shPRMT5 凋亡率则为(14.39± 3.17)% ,组间有统计学差异(p<0.01)(图 3)。

2.4 多西他赛对 MDA-MB-231、MDA-MB-231-PRMT5、MDA-MB-231-shPRMT5 相关蛋白表达的影响

与 MDA-MB-231 细胞相比,MDA-MB-231-PRMT5 细胞的 p21、cyclin D1、cleaved-PARP、LC3-II 的表达上调,且随浓度增加,差异有统计学意义 (P<0.05, P<0.01)。p27 表达下调,差异有统计学意义(P<0.01)。

而在 MDA-MB-231-shPRMT5 细胞中周期相关蛋白 p27、cyclinD1 及自噬标志蛋白 LC3-II 表达水平低于亲本细胞,差异有统计学意义(p<0.05)。凋亡分子 cleaved-PARP 表达水平差异不显著,无统计学差异。P21 表达增加,差异有统计学意义 (p<0.05)(图 4)。

3 讨论

TNBC 因缺乏有效的内分泌药物治疗和靶向治疗的靶点,后续通常只能进行常规的放化疗,但因仍存在易转移、预后差等问题成为临床治疗的难题。TNBC 术后常用的化疗药物多西他赛主要加强微管蛋白聚合和抑制微管解聚,致使形成稳定的非功能性微管束,从而破坏肿瘤细胞的有丝分裂,导致细胞死亡^[9]。研究表明,作为一种表观遗传酶,PRMT5 通过对组蛋白为主的蛋白底物的精氨酸残基进行对称性的甲基化来影响多条信号通路,从而发挥着多种生物学功能^[7]。在人类许多肿瘤如卵巢癌、肺癌、乳腺癌、结肠直肠癌、恶性胶质瘤及黑色素瘤中,

PRMT5 均呈高表达,且与肿瘤的进展及预后密切相关^[9-15]。Dong Hu 等发现在乳腺癌中 PRMT5 表达与乳腺癌恶性程度具有相关性,在三阴性乳腺癌中表达最高^[6]。因此在三阴性乳腺癌中研究 PRMT5 表达水平与多西他赛疗效的关系及相关分子机制具有重要的临床意义。

由于细胞周期调节破坏,肿瘤细胞得以快速增殖。Ibrahim R 等研究表明 PRMT5 表达的改变可影响肿瘤细胞细胞周期。PRMT5 过表达可促进细胞增殖及克隆生长,而 PRMT5 低表达后细胞增殖及克隆生长明显降低^[16,17]。Yang F 等发现在 MCF-7 和 HEK293T 细胞中,细胞周期中 G1 正调节因子如 cyclin D1、cyclin E1、CDK4 及 CDK6 等分子的含量在 PRMT5 过表达后表达量明显增加,而负调节因子 Rb 的表达则降低;将 PRMT5 敲低后,细胞阻滞在 G1 期比例增多^[18]。细胞周期中 p27 蛋白是一种周期素依赖性蛋白激酶抑制物分子,主要通过抑制细胞周期蛋白 E-CDK2 和 D-CDK4 等 G1 期激酶复合物影响 G1-S 期限位点的调控,导致细胞周期停滞,抑制了细胞的增殖^[19]。而 p21 作为细胞周期负性调控因子,可以抑制转录因子 E2F,抑制 CDK2 和 CDK4/6 的活性,去 p-Rb 表达水平升高,使得细胞停留在 G2 期。有文献报道,某些条件下 p21 可促进细胞的凋亡的发生。Yi T 等的研究发现古曲霉素 A 可通过上调 p21 可诱导破骨细胞凋亡^[20]。Zoli W 等研究发现乳腺癌的化疗过程中,阿霉素与紫杉醇联合 5- 氟尿嘧啶的使用可使 p21 的表达上调,且与细胞凋亡数量呈显著正相关^[21]。以上实验均说明 p21 对细胞凋亡的作用是非 p53 依赖型。与常见细胞凋亡引起的 I 型细胞死亡不同,细胞中还存在 II 型细胞死亡,即自噬型细胞死亡,自噬是细胞面对外界环境变化时所产生的的一种保护性反应,但当细胞自噬过多,胞浆内大量形成的自噬体则会诱导细胞死亡,形成自噬型细胞死亡。

本研究通过平板克隆实验发现,PRMT5 过表达后,细胞增殖能力明显增加,且细胞形成平板克隆能力与多西他赛浓度成负相关性。在相同剂量多西他赛的作用下,虽然 PRMT5 过表达后细胞形成平板克隆的能力仍大于亲本细胞,但相较于对照组,PRMT5 过表达后增殖能力受到多西他赛的影响更加明显。

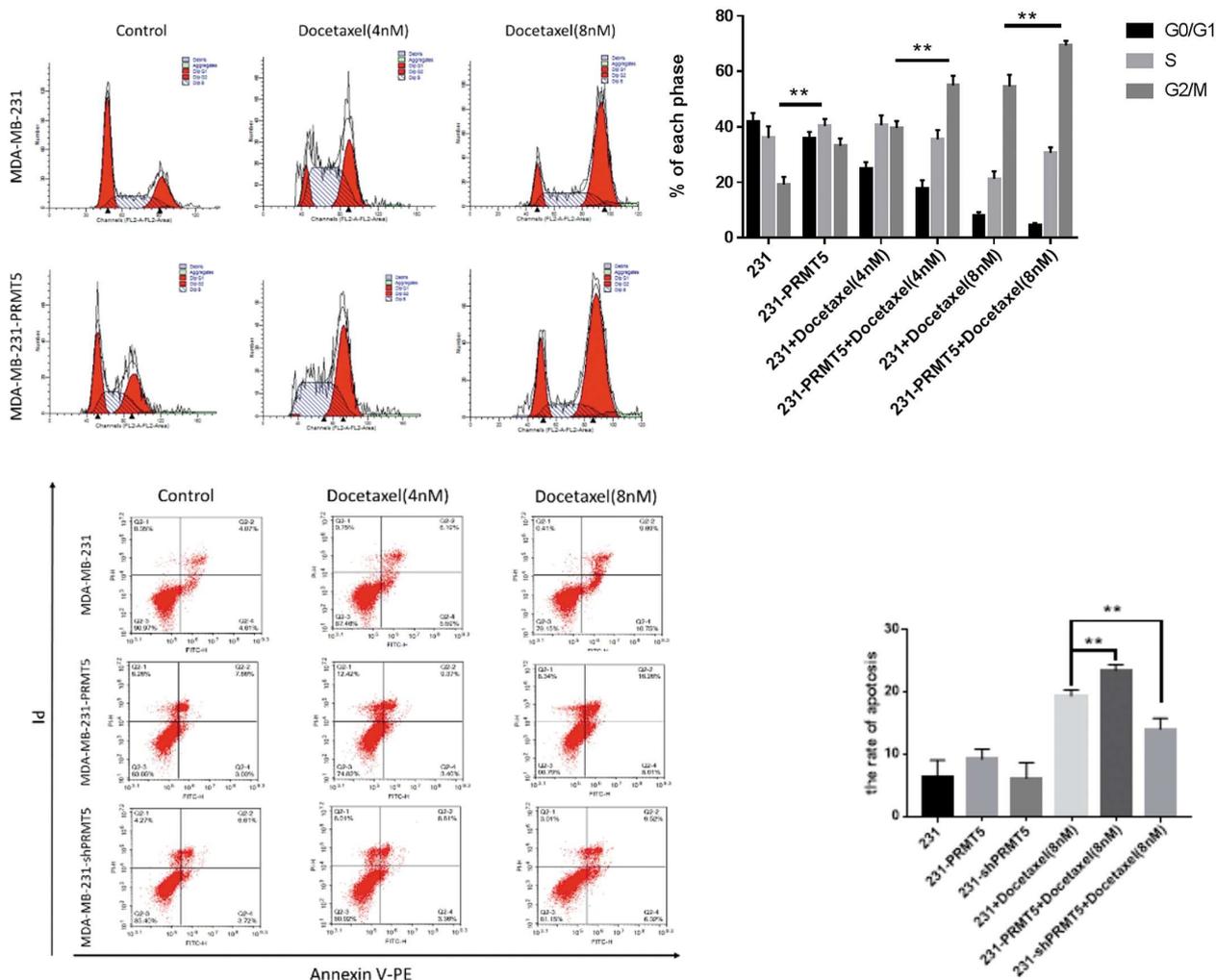


图 3 流式细胞仪检测多西他赛对 MDA-MB-231、MDA-MB-231-PRMT5 及 MDA-MB-231-shPRMT5 细胞的周期及凋亡影响

Fig.3 It was tested by flow cytometry that the cell cycle and apoptosis in MDA-MB-231, MDA-MB-231-PRMT5 and MDA-MB-231-shPRMT5 affected by docetaxel. **P<0.01

经流式细胞术检测，多西他赛可使细胞阻滞在 G2/M 期。PRMT5 过表达后，G2/M 期细胞所占百分比增加。且在同等浓度作用下，PRMT5 过表达细胞的凋亡率明显增多，与亲本及 PRMT5 敲除细胞相比差异具有统计学意义 (p<0.01)。这表明 PRMT5 可能通过加速细胞向 G2/M 期转变增加多西他赛对细胞的作用时间，从而增加细胞的凋亡率。通过 Western blot 我们检测了 p27、p21 及 cyclinD1 分子，PRMT5 过表达后可引起细胞快速通过 G1 期，向 S、G2/M 期转变。且 p21 与 PRMT5 的正相关表达也提示 PRMT5 过表达增加多西他赛诱导细胞凋亡的作用途径可能是非 p53 依赖的。此外，我们还检测了自噬标志分子 LC3-II，PRMT5 过表达其自噬水平明显增加。相应的，敲除 PRMT5 后，自噬的表达水平降低。这说明 PRMT5 增加多西他赛诱导 MDA-MB-231 的细胞死亡可能是通过增加其自噬型细胞死亡实现的。

综上所述，PRMT5 通过增加 G2/M 期细胞的百分比，增加了多西他赛的药物作用时间，提高了多西他赛治疗 MDA-MB-231 细胞的有效率，PRMT5 有望成为多西他赛临床治疗敏感性预测和方案选择的关键分子，并有望成为调控多西他赛等化疗药物耐药的新靶点。但在本实验中我们只选用了人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 为研究对象，而不同的细胞株之

间仍存在一定的差异，因此仍需在不同的细胞系中进行验证及更深入的研究。

参考文献(References)

- [1] Wanqing Chen, Rongshou Zheng, et al. Cancer Statistics in China, 2015[J]. Mph Ca Cancer J Clin, 2016, 115-132
- [2] Rakha EA, El-Rehim DA, Paish C, et al. Basal phenotype identifies a poor prognostic subgroup of breast cancer of clinical importance[J]. Eur J Cancer, 2006, 42(18): 3149-3156
- [3] Qiu J, Xue X, Hu C, et al. Comparison of Clinicopathological Features and Prognosis in Triple-Negative and Non-Triple Negative Breast Cancer[J]. J Cancer, 2016, 7(2): 167-173
- [4] Metzger-Filho O, Tutt A, de Azambuja E, et al. Dissecting the heterogeneity of triple-negative breast cancer [J]. J Clin Oncol, 2012, 30(15): 1879-1887
- [5] Nabholz JM, Reese DM, et al. Docetaxel in the treatment of breast cancer: an update on recent studies [J]. Semin Oncol, 2002, 29(3 Suppl 12): 28-34
- [6] Dong Hu, Mert Gur, Zhou Z, et al. Interplay between arginine methylation and ubiquitylation regulates KLF4-mediated genome stability and carcinogenesis[J]. Nat Commun, 2015, 6: 8419
- [7] Stopa N, Krebs JE, Shechter D. The PRMT5 arginine

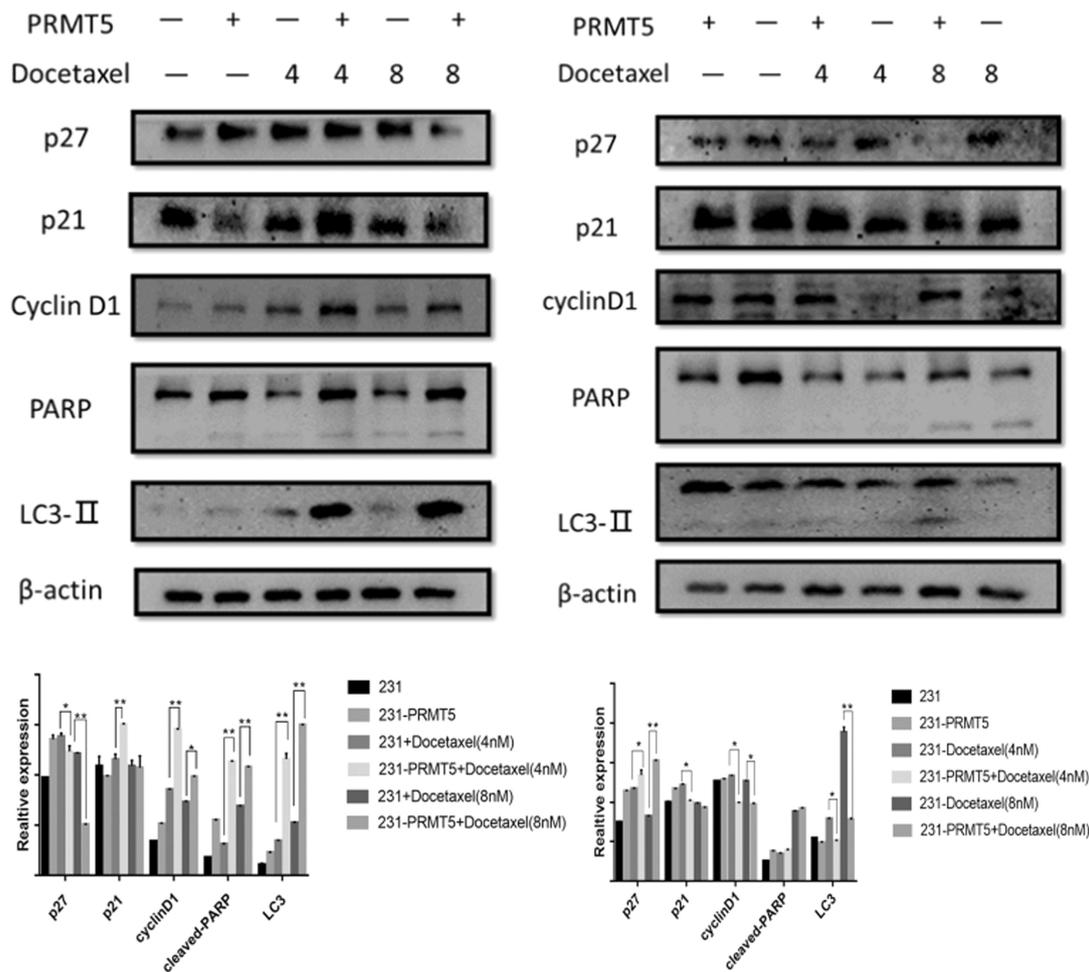


图4 Western blot 检测多西他赛处理 MDA-MB-231、MDA-MB-231-PRMT5 及 MDA-MB-231-shPRMT5 后相关分子的表达。

Fig.4 The expression of relative proteins in the treated MDA-MB-231, MDA-MB-231-PRMT5 and MDA-MB-231-shPRMT5 were detected by western blot method. *P<0.05**P<0.01

methyltransferase: many roles in development, cancer and beyond[J]. Cell Mol Life Sci, 2015, 72(11): 2041-2059

[8] Karkhanis V, Hu YJ, Baiocchi RA, et al. Versatility of PRMT5-induced methylation in growth control and development[J]. Trends Biochem Sci, 2011, 36(12): 633-641

[9] Koh CM, Bezzi M, et al. The where and the how of PRMT5[J]. Curr Mol Bio Rep, 2015, 1: 19-28

[10] Wei H, Wang B, Miyagi M, et al. PRMT5 dimethylates R30 of the p53 subunit to activate NF-κB[J]. Proc Natl Acad Sci, 2013, 110(33): 13516-13521

[11] Cho EC, Zheng S, Munro S, et al. Arginine methylation controls growth regulation by E2F-1[J]. Embo J, 2012, 31(7): 1785-1797

[12] Powers MA, Fay MM, Factor RE, et al. Protein arginine methyltransferase 5 accelerates tumor growth by arginine methylation of the tumor suppressor programmed cell death 4 [J]. Cancer Res, 2011, 71 (16): 5579-5587

[13] Hsu JM, Chen CT, Chou CK, et al. Crosstalk between Arg 1175 methylation and Tyr 1173 phosphorylation negatively modulates EGFR-mediated ERK activation [J]. Nat Cell Biol, 2011, 13 (2): 174-181

[14] Yan F, Alinari L, Lustberg ME, et al. Genetic validation of the protein arginine methyltransferase PRMT5 as a candidate therapeutic target in glioblastoma[J]. Cancer Res, 2014, 74(6): 1752-1765

[15] Zhang HT, Zhang D, Zha ZG, et al. Transcriptional activation of PRMT5 by NF-Y is required for cell growth and negatively regulated by the PKC/c-Fos signaling in prostate cancer cells [J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1839(11): 1330-1340

[16] Ibrahim R, Matsubara D, Osman W, et al. Expression of PRMT5 in lung adenocarcinoma and its significance in epithelial-mesenchymal transition[J]. Hum Pathol, 2014, 45(7): 1397-1405

[17] Gu Z, Gao S, Zhang F, et al. Protein arginine methyltransferase 5 is essential for growth of lung cancer cells [J]. Biochem J, 2012, 446(2): 235-241

[18] Yang F, Wang J, Ren HY, et al. Proliferative role of TRAF4 in breast cancer by upregulating PRMT5 nuclear expression [J]. Tumour Biol, 2015, 36(8): 5901-5911

[19] Polyak K, Lee MH, Erdjument-Bromage H, et al. Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals[J]. Cell, 1994, 78(1): 59-66

[20] Yi T, Baek JH, Kim HJ, et al. Trichostatin A-mediated upregulation of p21 (WAF1) contributes to osteoclast apoptosis[J]. Exp Mol Med, 2007, 39(2): 213-221

[21] Zoli W, Ulivi P, Tesei A, et al. Addition of 5-fluorouracil to doxorubicin-paclitaxel sequence increases caspase-dependent apoptosis in breast cancer cell lines[J]. Breast Cancer Res, 2005, 7(5): R681-689