

乳腺癌肿瘤抑制候选基因 5 基因启动子甲基化水平研究

楼婷婷¹, 柯孔亮², 张乐鸣^{2*}

(1. 宁波大学 医学院, 浙江 宁波 315211; 2. 宁波市第一医院, 浙江 宁波 315000)

摘要: 探讨人正常乳腺细胞株及不同乳腺癌细胞株肿瘤抑制候选基因 5 启动子甲基化状态, 并分析其与雌激素受体、孕激素受体、人类表皮生长因子受体 2 的表达相关性。运用焦磷酸测序分析 4 种乳腺癌细胞株和 1 种人类正常乳腺细胞株中 TUSC5 基因启动子甲基化状态, 以及实时荧光定量逆转录聚合酶反应和 Western 印迹来检测这些细胞株中 TUSC5 基因 mRNA 和蛋白的表达。结果表明: 正常人类乳腺细胞株存在 TUSC5 基因启动子低甲基化, 而 4 种乳腺癌细胞株存在不同程度高甲基化; 在 4 种乳腺癌细胞株中, 激素受体及 HER-2 表达阴性即三阴性乳腺癌细胞 TUSC5 基因启动子甲基化水平较非三阴性乳腺癌细胞低; 并且乳腺癌的发生可能与 TUSC5 基因启动子高甲基化有关, 乳腺癌 TUSC5 基因启动子甲基化水平与激素受体、HER-2 表达具有一定相关性, 其发生的机制需进一步研究探讨。

关键词: 乳腺癌; TUSC5 基因; 甲基化; 焦磷酸测序; qRT-PCR; 细胞株

中图分类号: R730.2; R737.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-5132 (2015) 03-0108-05

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一, 据最新统计数据表明, 我国女性乳腺癌发病率在所有肿瘤中排第 2 位, 死亡率排在第 4 位^[1]。肿瘤的发生一般被认为是基因变异累积的结果, 包括癌基因、抑癌基因突变以及染色体变异。但是与其他各种恶性肿瘤一样, 表观遗传学在乳腺癌发生发展中与体细胞突变理论具有同等重要地位^[2]。表观遗传修饰包括 DNA 基因甲基化、组蛋白修饰、染色质重塑等, 它并不改变 DNA 的序列^[3]。抑癌基因所产生的基因沉默一部分是通过启动子区高甲基化来实现的, 也是肿瘤发生中的常见和早期事件^[4]。肿瘤抑制候选基因 5(Tumor Suppressor Candidate, TUSC5)定位于人染色体 17p13.3 区域^[5], 并与多种肿瘤的发生相关^[6-8]。笔者采用焦磷酸测序法检测 4 种人乳腺癌不同细胞株以及 1 种人正常乳腺细胞株 TUSC5 基因启动子甲基化状态, 采用实时荧光定量逆转录聚合酶反应技术(Quantificational Real-time Polymerase Chain Reaction, qRT-PC), 利用 Sybr 染料法检测目标基因 TUSC5 表达水平, Western

Blot 检测其蛋白表达水平, 并分析其与激素受体(雌激素受体(Estrogen Receptor, ER)和孕激素受体(Progesterone Receptor, PR)、人类表皮生长因子受体 2(Human Epidermal Growth Factor Receptor 2, HER-2)的表达相关性, 目的在于探讨 TUSC5 基因启动子甲基化状态与乳腺癌发生之间的关系及其所起的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

4 种人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231、MDA-MB-453、BT-474、MCF-7 以及 1 种人正常乳腺细胞株 MCF-10A 购自中国科学院细胞库。其他材料及仪器: 胎牛血清(FCS), DMEM 培养基(Gibco), L-15 培养基(Corning 公司), RPMI1640 培养基(Hyclone 公司), Trizol 试剂(Invitrogen 公司), 引物合成(上海捷瑞生物工程有限公司), DNA 提取试剂盒(Omega 公司), 聚合酶链式反应(PCR)仪(Biorad 公司), 凝胶成像系统(Biorad 公司), 实时定量荧光

收稿日期: 2015-03-11.

宁波大学学报(理工版)网址: <http://journalg.nbu.edu.cn/>

第一作者: 楼婷婷 (1984—), 女, 浙江丽水人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 乳腺肿瘤疾病。E-mail: 77563078@qq.com

*通信作者: 张乐鸣 (1956—), 男, 浙江宁波人, 主任医师, 主要研究方向: 肿瘤疾病。E-mail: kekongliang1975@163.com

(PCR)仪(Applied Biosystems 公司), 低温超速离心机(Thermo 公司), PyroMarkQ96ID (Qiagen 公司); ABI9700PCR System (Applied Biosystems 公司).

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

人正常乳腺细胞株 MCF-10A 与人乳腺癌细胞株 MCF-7 用含体积百分比 10%胎牛血清(FCS)的 DMEM 培养基, BT-474 用含 10%胎牛血清(FCS)的 RPMI1640 培养基, 在体积百分比 5%CO₂, 37 °C, 饱和湿度的细胞培养箱内培养; MDA-MB-231 用含 10%胎牛血清(FCS)的 L-15 培养基; MDA-MB-453 用含 10%胎牛血清(FCS)的 RPMI1640 培养基, 在体积百分比 100%空气, 37 °C, 饱和湿度的细胞培养箱内培养; 各细胞株均 2~3 d 传代 1 次, 收集对数生长期细胞用于实验.

1.2.2 细胞株基因组 DNA 和 RNA 提取

按照 DNA 提取试剂盒(Omega 公司)说明书方法提取细胞 DNA; 用 Trizol(Trizol 试剂购于美国公司 Sigma 公司)提取细胞的总 RNA. 测定提取后的 DNA 和 RNA 浓度, 置于-80 °C保存备用.

1.2.3 实时定量荧光 PCR 反应检测

取 1 μg 样本 RNA、50 μmol·L⁻¹ 的 oligo dT 0.5 μL、随机引物 0.5 μL, 以 dNTP 为底物, DEPC-treated water 补足 12 μL 混合液, 加入到 20 μL 逆转录 PCR 体系内, 以 25 °C 5 min, 50 °C 60 min, 70 °C 15 min 进行反转录实验得到 cDNA. 并以 cDNA 为模板, 加入上下游引物(表 1)进行 Realtime PCR 扩增. 扩增体系为 20 μL, 反应条件如下: 95 °C, 2 min; 以 95 °C 10 s, 60 °C 30 s, 70 °C 45 s 进行 40 个循环,

再进行溶解曲线反应 70~95 °C 循环, 得到最终结果.

1.2.4 甲基化修饰引物设计

用 PyroMark Assay Design 2.0 软件设计引物, 设计的 PCR 引物与测序引物见表 2. 由 Invitrogen 公司合成引物.

1.2.5 DNA 亚硫酸盐及纯化

按照甲基化修饰试剂盒(Qiagen)说明书, 对基因组 DNA 进行亚硫酸盐处理. PCR 反应体系为 50 μL, 包括 ddH₂O 34.8 μL、dNTP 1 μL、每微升的 50 pmol·L⁻¹ 上下游引物 1 μL、5×bufferGC 10 μL、模板 DNA 2 μL、Taq 0.2 μL. 95 °C 预变性 3 min; 94 °C 30 s, 51 °C 30 s, 72 °C 1 min, 40 个循环; 72 °C 7 min; 4 °C 保存.

1.2.6 焦磷酸测序(Pyrosequencing)

取 PCR 产物 40 μL 进行结合混匀, 再进行变性反应, 单链 DNA 制备, 根据 Pyrosequencing 软件序列设计信息剂量, 并依次加入底物混合物、酶混合物及 4 种 dNTP(Qiagen), 用 Pyrosequencing 检测仪(PyroMarkQ96ID, Qiagen)进行反应, PyroQ CpG 软件自动分析每个位点甲基化状态.

1.2.7 Western 印迹

用 RIPA 细胞裂解液提取细胞总蛋白质, BCA 法测定蛋白浓度, SDS-PAGE 凝胶电泳, 转膜, 抗体孵育, 化学发光检测结果. 一抗为 TUSC5 兔多克隆抗体(购自 Abcam 公司), 1:500 稀释; β-tublin 1:2000 稀释作内对照.

1.2.8 统计分析

所有数据均来源于独立 3 次实验重复, 应用方差分析进行多组样本均数比较, 所得数据由 SPSS

表 1 Realtime PCR 引物信息

基因名	引物名称	序列(5'-3')
TUSC5	TUS5C-F	GCTTCCAGCCCAGCCCTATG
TUSC5	TUSC5-R	ACTCTCTGACCCACGCCCTT
Homo-actin	Homo-actin-F	AGCGAGCATCCCCCAAAGTT
Homo-actin	Homo-actin-R	GGGCACGAAGGCTCATCATT

表 2 甲基化修饰引物信息

引物名称	引物序列(5'-3')	修饰	纯化方式
TUSC5-F1	TTTAGTTTGGGTTGGGGAATGG	-	PAGE
TUSC5-R1	ACAAATTCAAAATCTTATCATCCTTATTC	5'Biotin	HPLC
TUSC5-S1	TGTTTTAGTTTGGAGTTGTA	-	PAGE

13.0 进行统计学分析.

2 结果

2.1 焦磷酸测序甲基化分析

实验针对 4 种乳腺癌细胞株及 1 种正常人乳腺细胞株的 TUSC5 基因启动子区域的 4 个 CpG 位点用 Pyro-CpG 软件自动分析每个位点甲基化状态, 从表 3 数据可见: 4 种乳腺癌细胞株及 1 种正常乳腺细胞株都存在不同程度的甲基化, 以 CpG1 位点甲基化水平最高. 正常乳腺细胞株(MCF-10A)平均甲基化水平最低 45%, 所有乳腺癌细胞株的甲基化水平均明显高于正常的乳腺细胞株, 而在乳腺癌细胞株中, MDA-MB-231 细胞株平均甲基化水平最低 66.50%, 乳腺癌细胞株 BT-474 平均甲基化水平最高, 为 90.50%.

表 3 5 种不同细胞株 TUSC5 启动子区域
焦磷酸测序甲基化结果

	TUSC5/				平均甲基化水平
	CpG1	CpG2	CpG3	CpG4	
BT-474	100	82	88	92	90.50
MDA-MB-453	100	76	97	71	86.00
MCF-7	100	79	84	79	85.50
MDA-MB-231	91	61	69	45	66.50
MCF-10A	60	38	44	38	45.00

2.2 qRT-PCR 分析 TUSC5 基因表达

对 5 个细胞株抽提总 RNA, 经过 RNA 电泳质检合格(图 1), 反转录得到 cDNA 后, 用 sybr 染料法相对定量目标基因 TUSC5 和内参 Homo-actin 的表达变化获得 PCR 正常扩增曲线. 如图 2 所示, 5

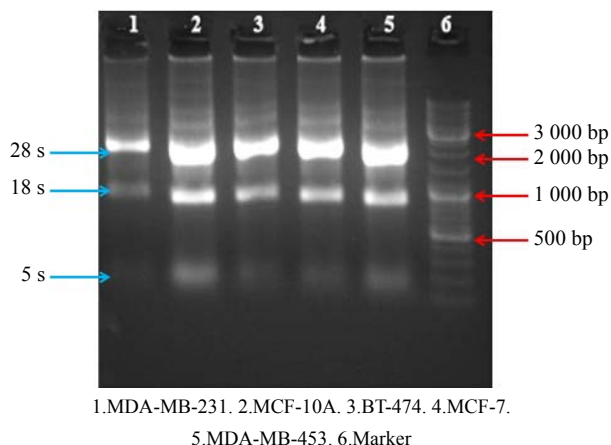


图 1 各 RNA 样品电泳质检情况

种细胞株均有不同程度 TUSC5 mRNA 表达. 与正常乳腺细胞株相比, 乳腺癌细胞株 BT-474 TUSC5 基因相对表达量较高, 其余乳腺癌细胞株 TUSC5 mRNA 表达量均低于正常乳腺细胞株.

2.3 Western 印迹分析

对 5 个细胞株样品提取总蛋白, Western Blot

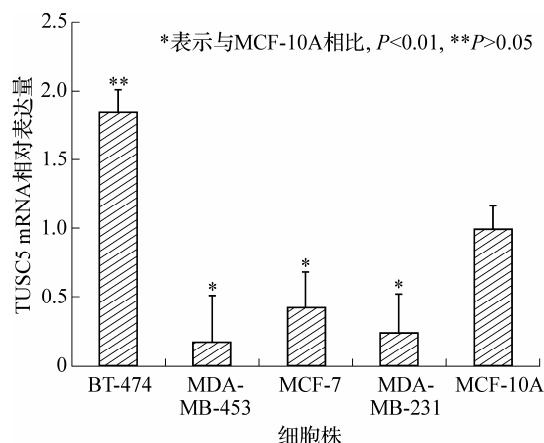


图 2 乳腺癌细胞株与正常乳腺细胞株
TUSC5 mRNA 相对表达量

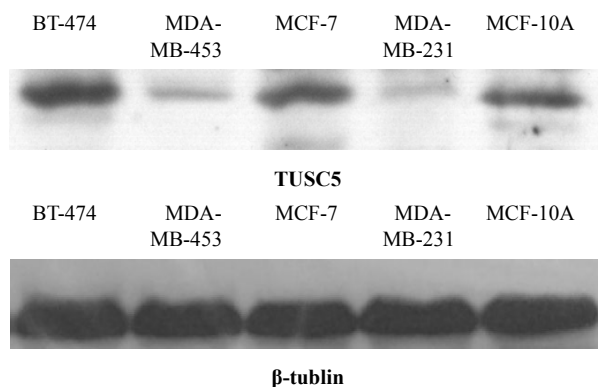


图 3 乳腺癌细胞株与正常乳腺细胞株 Western blot 结果

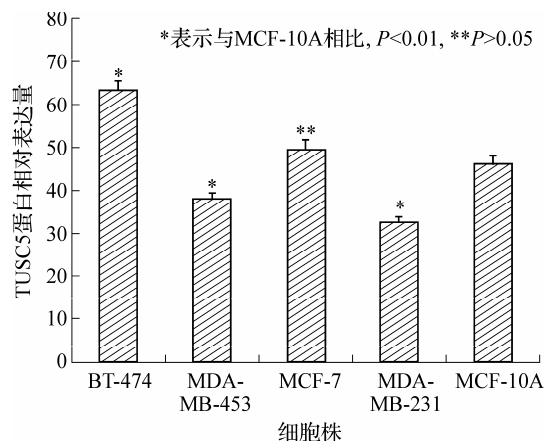


图 4 各细胞株 TUSC5 蛋白相对表达水平

检测蛋白样品 TUSC5 和内参 β -tublin 的表达水平,图3为各细胞株的蛋白显影图片,图4为各细胞株 TUSC5 蛋白相对表达水平。结果表明:各细胞株蛋白表达均阳性,相对表达水平 BT-474>MCF-7>MCF-10A>MDA-MB-453>MDA-MB-231。

2.4 TUSC5 基因启动子甲基化与 TUSC5 mRNA 和蛋白表达的关系

表4是 TUSC5 基因在各细胞株中启动子甲基化水平与 TUSC5 mRNA 和蛋白表达的关系,从表4的状态可见,正常乳腺细胞株 TUSC5 基因启动子存在甲基化,但水平相对较低,所有乳腺癌细胞株 TUSC5 基因启动子均呈高甲基化,各细胞株的 TUSC5 mRNA 及蛋白表达均阳性,说明乳腺癌的发生可能与 TUSC5 基因启动子高甲基化有关。

表4 TUSC5 基因在各细胞株中启动子甲基化与 TUSC5mRNA 和蛋白表达的关系

细胞株	甲基化状态	mRNA 表达	蛋白表达
BT-474	高	阳性	阳性
MDA-MB-453	高	阳性	阳性
MCF-7	高	阳性	阳性
MDA-MB-231	高	阳性	阳性
MCF-10A	低	阳性	阳性

3 讨论

近年来随着人们对乳腺癌研究的不断深入,基因表观遗传的改变越来越受到关注,由于 DNA 甲基化是最常见的表观遗传学之一,因此它也成为乳腺癌基础研究的热点之一。一般情况下,肿瘤细胞 DNA 中普遍存在低甲基化,但往往伴有区域性的启动子 CpG 岛的高甲基化。人们认为普遍性低甲基化参与肿瘤形成是通过增加染色体遗传不稳定性所致,而区域性启动子 CpG 岛高甲基化是通过改变或影响基因表达来参与肿瘤的形成^[9]。研究表明,正常情况下有超过 50%的基因 5'启动子区域以及第一外显子区域的 CpG 岛不发生甲基化,抑癌基因通过对启动子区 CpG 岛高甲基化而引起基因沉默导致了肿瘤的发生^[10]。

TUSC5 也称为 LOST1 或 BEC-1 基因,最先在研究某些肺癌缺失基因时被发现,并认为它的主要功能是抑制肿瘤细胞的增殖^[8]。目前的研究肯定了 TUSC5 的表达显著存在于啮齿类动物和人类特

定组织中,特别是在成熟的白色及棕色脂肪细胞及外周传入神经中有较高的表达^[11]。Bubnov 等^[7]采用基因芯片的方法对乳腺癌组织的基因高甲基化进行研究,发现有超过 2 300 个基因存在着异常表达。进一步研究发现, TUSC5 的外显子 1 的甲基化水平更高,而其在对照组的正常乳腺组织中基本不发生甲基化。

本文采用焦磷酸测序法对 4 种乳腺癌细胞株及 1 种正常人乳腺细胞株的 TUSC5 基因启动子区域的 4 个 CpG 位点进行甲基化检测,结果显示,4 种乳腺癌细胞株及 1 种正常乳腺细胞株都存在不同程度的甲基化,但正常乳腺细胞株(MCF-10A)呈低甲基化状态,4 种乳腺癌细胞株呈高甲基化状态。虽然 5 种细胞株 TUSC5 mRNA 及蛋白表达量不同,但均为阳性表达。这说明 TUSC5 基因启动子在正常乳腺细胞株是处于低甲基化状态的,而在乳腺癌细胞株是高甲基化的。表明在乳腺癌的发生中, TUSC5 基因是由于启动子区甲基化而失活或部分失活。至于 TUSC5 mRNA 及其蛋白表达存在不一致也属于实验常见现象,可能与下列因素有关:首先,基因表达分为转录和翻译层面——mRNA 水平和蛋白水平,而真核基因表达的转录和翻译发生的时间和位点存在时空间隔;其次在转录后,又会有转录后加工、转录产物的降解、翻译、翻译后加工及修饰好几个层面,所以从转录水平和翻译水平并不完全一致;第三,因为检测的时间点不同,可能在蛋白达到峰值时, mRNA 已经降解了或者在 mRNA 达到峰值的时候蛋白量还在增加中,故三者间并不存在严格的比例关系^[12]。

文中采用的乳腺癌细胞株存在不同雌孕激素受体及 Her2 受体状态,MDA-MB-231 表现为 ER、PR 及 Her2 受体阴性,即三阴性乳腺癌细胞株;其他乳腺癌细胞株 MCF-7 为 ER、PR 阳性, Her2 受体阴性;MDA-MB-453 细胞株为 ER、PR 阴性,而 Her2 受体阳性;BT-474 细胞株为 ER、PR 及 Her2 受体阳性均为阳性^[13]。从文中研究可看出,三阴性乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 的抑癌基因 TUSC5 启动子甲基化明显低于其他 3 个非三阴性乳腺癌细胞株。从表观遗传角度看,因为三阴性乳腺癌细胞的 TUSC5 启动子甲基化较非三阴性乳腺癌低,那么其去甲基化治疗效果也较非三阴性乳腺癌差,

这可能也是三阴性乳腺癌患者预后较差的原因之一,可为临床提供指导意义,其可能的发生机制有待进一步研究,且三阴性与非阴性乳腺癌的抑癌基因 TUSC5 启动子甲基化与 ER、PR 及 Her2 受体之间的关系有待临床大样本实验进一步证实。

参考文献:

- [1] 陈万青, 郑荣寿, 曾红梅, 等. 2011 年中国恶性肿瘤发病和死亡分析[J]. 中国肿瘤, 2015, 24(1):1-10.
- [2] Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease [J]. Nat Biotechnol, 2010, 28(10):1057-1068.
- [3] Pang K L, Sukumar S. Epigenomics and breast cancer[J]. Pharmacogenomics, 2008, 9(12):1879-1902.
- [4] Connolly R, Stearns V. Epigenetics as a Therapeutic Target in Breast Cancer[J]. Mammary Gland Biol Neoplasia, 2012, 17(3/4):191-204.
- [5] Konishi H, Sugiyama M, Mizuono K, et al. Detailed characterization of a homozygously deleted region corresponding to a candidate tumor suppressor locus at distal 17p13.3 in human lung cancer[J]. Oncogene, 2003, 22:1892-1905.
- [6] Aoki M, Seqawa H, Naito M, et al. Identification of possible downstream genes required for the extension of peripheral axons in primary sensory neurons[J]. Biochem Biophys Commun, 2014, 445(2):357-362.
- [7] Bubnov V, Moskalev E, Petrovskiy Y, et al. Hypermethylation of TUSC5 genes in breast cancer tissue[J]. Exp Oncol, 2012, 34(4):370-372.
- [8] Knotts T A, Lee H W, Kim J B, et al. Molecular characterization of the tumor suppressor candidate 5 gene: Regulation by PPAR γ and identification of TUSC5 coding variants in lean and obese humans[J]. PPAR Res, 2009, 2009:867678-867685.
- [9] Ouadidi A H, Rodat D L, Matifat F et al. DNA methylation of channel-related genes in cancers[J]. Biochim Biophys Acta, 2015, 2736(15):55-57.
- [10] Filetici P. Epigenetics: a novel tool for early diagnosis and tumor therapy[J]. Recent Prog Med, 2015, 106(1): 32-34.
- [11] Oort P J, Warden C H, Baumann T K, et al. Characterization of Tusc5, an adipocyte gene co-expressed in peripheral neurons[J]. Mol Cell Endocrinol, 2007, 276(1/2):24-35.
- [12] Raquel S A, Luiz O P, Edward M M, et al. Global signatures of protein and mRNA expression levels[J]. Mol Biosyst, 2009(5):1512-1526.
- [13] Lacroix M, Leclercq G. Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: An update[J]. Breast Cancer Res Treat, 2004, 83(3):249-289.

Study: Promoter Methylation Status of Tusc5 Gene in Breast Cancer

LOU Ting-ting¹, KE Kong-liang², ZHANG Le-ming^{2*}

(1. The Medical School, Ningbo University, Ningbo 315211, China; 2. Ningbo First Hospital, Ningbo 315000, China)

Abstract: To investigate the promoter methylation status of TUSC5 gene in human breast cell and human breast cancer cell lines, and the relationship between hormone receptor and HER-2 status of TUSC5 expression. Pyrosequencing is used to measure the promoter methylation status of TUSC5 gene in four human breast cancer cell lines and one human breast cell. qRT-PCR and Western blot are used to detect the mRNA and protein expressions of TUSC5 gene. It is found that the human breast cell line(MCF-10A) shows low-methylated status and 4 human breast cancer cell lines show high-methylated status. However, the high-methylated status of the breast cancer line with the negative expressions of ER /PR and HER-2(TNBC, triple-negative breast cancer) is lower than the non-triple-negative breast cancer cell lines. Pathogenesis of breast cancer may be connected with the promoter methylation status of TUSC5 gene in human breast cancer, and its high-methylated status is related to the expression of hormone receptor and HER-2, but the mechanism is currently unknown and needs being further studied.

Key words: breast cancer; TUSC5 gene; methylation; pyrosequencing; qRT-PCR; cell lines

(责任编辑 章践立)