

乳腺癌组织 CCNA1 启动子区甲基化与肿瘤转移的相关性

宋美华¹ 唐金海^{2△} 吴建中³ 张晓梅³ 曹海霞³

(1 南京医科大学附属第一临床医学院 江苏 南京 210029 2 江苏省肿瘤医院普外科 江苏 南京 210009 ;

3 江苏省肿瘤医院科研科 江苏 南京 210009)

摘要 目的 探讨 CCNA1 基因甲基化在乳腺癌发生发展中的作用。方法 采用 Qiagen-FFPE 的步骤提取 95 例石蜡包埋乳腺癌组织的基因组 DNA ,应用限制性酶切 -PCR 对所提 DNA 进行 CCNA1 甲基化检测。结果 乳腺癌组织中 CCNA1 基因启动子甲基化的阳性率为 90.9%(86/95)。结论 CCNA1 基因甲基化参与乳腺癌的发生、发展,有淋巴结转移多见的特征,CCNA1 基因甲基化与乳腺癌转移有关。

关键词 乳腺癌 ;Cyclin A1 基因 ;甲基化 ;预后

中图分类号 R737.9 文献标识码 A 文章编号 :1673-6273(2011)07-1321-03

Correlation of Cyclin A1 Gene Hypermethylation in Promoter Region and Metastasis of Breast Carcinoma

SONG Mei-hua¹, TAN Jin-hai^{2△}, WU Jian-zhong³, ZHANG Xiao-mei³, CAO Hai-xia³

(1 Department of the first clinical medical college Affiliated Nanjing Medical University, Jiangsu Nanjing, China, 210029;

2 Department of Surgery, the Affiliated Jiangsu cancer hospital of Nanjing medical university, Jiangsu Nanjing, China, 210009;

3 Department of scientific research, Jiangsu cancer hospital, Jiangsu Nanjing, China, 210009)

ABSTRACT Objective: To investigate the methylation pattern of CCNA1 in breast carcinoma and explore the role of these epigenetic changes in tumorigenesis. **Methods:** 95 specimens of breast cancer were used, and the DNA was extracted by Qiagen procedure. Methylation change in the promoter region of CCNA1 was determined by using restricted enzyme cut-PCR. **Results:** The positive rate of gene promoter hypermethylation of CCNA1 was 90.9% (86/95). **Conclusions:** CCNA1 hypermethylation was correlated with lymph node metastasis, which may play an important role in pathogenesis of breast cancer.

Key words: Breast cancer; Cyclin A1; Methylation; Prognosis

Chinese Library Classification(CLC): R737.9 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2011)07-1321-03

前言

恶性肿瘤的发生是一个多阶段,涉及遗传学及表遗传学的复杂过程。近年来,DNA 甲基化在恶性肿瘤发生、发展中的作用越来越受到重视,CpG 岛高度甲基化被认为是抑癌基因失活的一个新机制^[1]。细胞周期素 A1(Cyclin A1,CCNA1)在多种恶性肿瘤中发现存在较高的甲基化率。乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一^[2,19],并且是女性因癌症死亡的第二位死因(15%),仅次于肺癌。近年来,其发病率呈逐年上升。因此,国内外关于乳腺癌的研究已经成为女性恶性肿瘤领域的热点。CCNA1 即细胞周期素 A1,参与细胞周期调控,调节 DNA 合成和促进细胞进入分裂期,与 CDK2 特异相互作用,可结合重要的细胞周期因子,如 Rb 家族蛋白、转录因子 E2F-1、P21 家族蛋白等^[3]。研究证实 CCNA1 在前列腺癌侵袭和转移中起了很重要的作用,主要通过增强 MMPs、UpA、VEGF 的表达而促进肿瘤侵袭和转移^[4]。因在乳腺癌中研究较少,本文旨在对乳腺癌组织中 CCNA1 基因启动子甲基化检测。以探讨其与乳腺癌转移的相

关性。

1 材料和方法

1.1 研究对象

95 例乳腺癌组织石蜡标本来自 2006 年~2007 年期间在南京医科大学附属江苏省肿瘤医院普外科手术切除的标本。所有病例均为初治患者,术前均未行放化疗,有完整的临床和病理资料。

1.2 主要试剂与仪器

PCR 扩增仪(ABI 型,USA),蛋白酶 K,TaKaRa Taq TM(产品编号:DR100AM,宝生物工程(大连)有限公司),PrimerSTAR polymerase(QIAGEN),引物两对有宝生物工程(大连)有限公司合成^[5]。MSP,Sma DNA Ladder Marker(宝生物工程(大连)有限公司),水浴锅,离心机,恒温箱,移液器。

1.3 方法

1.3.1 DNA 提取 采用 Qiagen-FFPE 的步骤从石蜡包埋组织中提取总 DNA,步骤按 Qiagen,FFPE 说明书进行。

1.3.2 引物的设计与合成 primer-1 和 primer-2 上下游引物参照文献^[5]。引物由宝生物(大连)有限公司合成。引物序列、退火温度和片段大小见表 1。

作者简介 宋美华(1984-),女,硕士,研究方向:乳腺癌表观遗传学。

电话:15951610732, Email:Alicehua11@163.com

△通讯作者 唐金海 博士生导师 教授 Email:Tangjinhai369@163.com

(收稿日期 2011-01-21 接受日期 2011-02-15)

表 1 引物信息

Table 1 Primer Information

Gene	Primers	Fragment size(bp)	Anneal temperature(°C)
CCNA1	P1 GCAGGAGACGTTAGAGGGGGTTGTTAG	715	68
	CCCCAATAAAAGATCCAGGGTACATGATTG		
	P2 GATTCAACAGACGCGGGTGGGCAGCTCAGC	301	68
	ATCCCAAGTGACGAGCAGGGTGCTGC		

1.3.3 甲基化检测 按照表 2、3 酶切反应体系 利用 Msp ,Hpa

对所提取 DNA 进行酶切 2 小时,后行限制性酶切-PCR 扩增酶切产物,用 2 %琼脂糖凝胶电泳,用 EB 染色并在紫外灯下观察结果。PCR 反应条件:95℃预变性 5 min;94℃变性 40 s;68℃退火 1 min,共 35 个循环,最后 72℃延伸 5 min 后 4℃结束。PCR 反应体系为 50 uL,2× GC buffer 25 uL, dNTPs 4uL,上、下游引物各 2 uL,PrimerSTAR DNA 多聚酶 0.5 uL,DNA 模板 3 uL, ddH₂O 13.5 uL,扩增出大片段产物,再以大片段产物为模板,扩增出目的片段,用 1.5 %琼脂糖凝胶电泳,30 min 后在紫外灯下分析结果。结果判断:电泳出现条带,该样本计为甲基化;未出现条带,计为未甲基化;条带模糊,计为部分去甲基化。

表 2 MSP 酶切体系(uL)

Table 2 MSP enzyme cutting system (uL)

试剂(Reagent)	体积(Volume)(uL)
10× buffer	2
10× 0.5% BSA	2
MSP	2
灭菌水(Sterilization water)	4
DNA	10

表 3 Hpa 酶切体系(uL)

Table 3 Hpa enzyme cutting system (uL)

试剂(Reagent)	体积(Volume)(uL)
NE buffer	2
Hpa	0.5
灭菌水(Sterilization water)	8
DNA	10

1.4 统计处理

采用 SPSS 11.5 软件进行分析。率的比较采用 Fish 精确概率法。均为双侧检验 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 巢式 PCR 扩增产物

PCR 产物进行 1.5 %的琼脂糖凝胶电泳,在紫外灯下观察,可看到与目的片段大小一致的电泳条带,未见非特异性扩增带出现(图 1)

2.2 酶切-PCR 扩增产物电泳结果

采用 MSP 及 Hpa 对所提取的 DNA 双酶切,按照巢式

扩增目的片段的步骤扩增产物,进行 1.5%的琼脂糖凝胶电泳,在紫外灯下观察结果(图 2),从图中可以看出 CCNA1 基因甲基化程度高,95 例标本中,86 例存在甲基化,其中 9 例完全去甲基化,6 例部分去甲基化。并与 18s-RNA(内参)做对照,甲基化情况不变(图 3)。

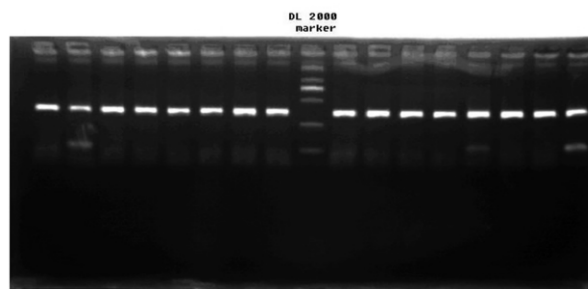


图 1 PCR 扩增产物电泳图(301bp)

Fig 1 PCR amplification product electrophoresis figure

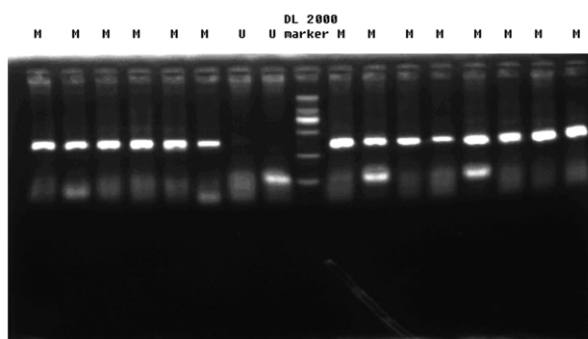


图 2 限制性酶切-PCR 产物电泳图(301bp)

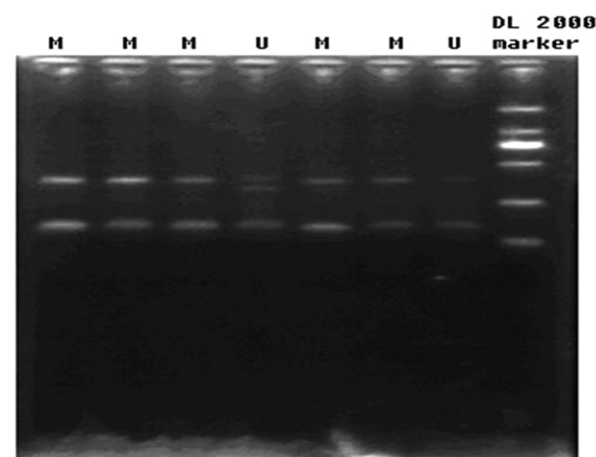
Fig 2 Restricted enzyme cutting-PCR product electrophoresis figure
M 代表甲基化, U 代表未甲基化(M: Methylation, U: Unmethylation)

图 3 酶切产物与 18s-RNA 对照结果:M 代表甲基化, U 代表未甲基化

Fig 3 Enzyme cutting system and 18s-RNA compare result: M: Methylation, U: Unmethylation

3 讨论

Cyclin A1 是细胞周期中重要的调控因子,它与细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)和细胞周期依赖性激酶抑制因子(CDI)共同参与细胞周期检测点的调控,在维持细胞有序的增殖和分裂活动中起作用,而且参与细胞凋亡,在不同的组织细胞或不同来源的肿瘤细胞中表达水平和生物学功能不同,与肿瘤的发生发展有密切联系^[6]。调控的主要方式是不同的 cyclin 和 CDK, CDC 结合后形成有活性的复合物,对重要的转录调节物进行磷酸化后,改变了那些分子的构象而引起细胞周期的改变,它们所激活的酶不同,前者发生在 S 期,后者发生在 G2 期,因此调节各自的功能^[7,15]。CCNA1 可以与重要的细胞循环途径因子,比如 Rb 家族蛋白、转录因子 E2F-1、P21 家族蛋白结合^[3]。1997 年, Rong Y 等人分离并根据该基因特征命名为 CCNA1,并于 1999 年克隆了 CCNA1 的基因结构,同时对其启动子区域进行了分析。人类 CCNA1 基因位于染色体 13q12.3-13,全长 13kb,包含 9 个外显子和 8 个内含子,编码 465 个氨基酸,它的表达具有组织特异性^[8]。在睾丸减数分裂细胞、急性髓系白血病细胞、早期胚胎、卵巢高表达^[9]-190~+145 具有高转录活性,它可结合重要的细胞周期调节因子如 Rb 家族蛋白、转录因子 E2F-1、P21 家族蛋白,在 S 期或 G2/M 期, CCNA1 与 CDK2 形成复合物,可使 Rb、E2F-1 磷酸化,控制细胞周期进展。而细胞周期调控失控导致细胞异常增殖,最终导致肿瘤的发生^[10]。

目前,研究表明, CCNA1 在前列腺癌侵袭和转移中起了很重要的作用。它通过与 VEGF、MMP2 结合,增强二者表达而促进肿瘤侵袭和转移。CCNA1 可能是肿瘤侵袭和转移的关键控制因素^[4,20]。研究证明,在鼻咽癌细胞中, CCNA1 启动子区域甲基化,而非在正常鼻咽上皮组织中,不存在甲基化,证明 CCNA1 在鼻咽癌中起到了抑癌基因的作用^[11]。在头颈部鳞癌中, CCNA1 的表达下调且高甲基化^[12,16],还有文献报道在宫颈癌中存在高甲基化^[13]。在结直肠癌、食管癌、肺癌、乳腺癌、睾丸癌和白血病等多种肿瘤中都存在表达异常的情况,有报道称可能通过与 Ku70 相互作用,参与 DNA 双链断裂修复^[14]。

本研究检出乳腺癌的 CCNA1 基因甲基化率高达 90.9%,至今文献报道较少,增加乳腺癌的病例数,进一步检测 CCNA1 基因甲基化的情况,并且设定对照组比如乳腺良性病变组织的甲基化情况,还有待进一步研究。由于本研究是从石蜡中提取的 DNA,可能因为所提取 DNA 的纯度较低会影响结果。其次,所用到的甲基化检测方法是经典的甲基化研究方法,方法相对简单,甲基化位点明确,但是有可能因为酶不完全消化而引起假阳性的问题,对实验结果产生影响^[17,18]。目前,对于 CCNA1 在乳腺肿瘤中研究的很少,通过本研究可以对乳腺癌早期发生、发展以及针对乳腺癌的后续治疗成为可能,同时可以对其相关抑癌基因异常甲基化谱的检测,有助于对乳腺癌的早期诊断及治疗。

参考文献(References)

[1] Luczak MW, Jagodzinski PP. The role of DNA methylation in cancer development[J]. Folia Histochem Cytobiol, 2006, 44(3):143-154

- [2] Parkin DM. International variation [J]. Oncogene, 2004, 23 (38): 6329-6340
- [3] Yang R, Muller C, Huynh V, et al. Functions of cyclin A1 in the cell cycle and its interactions with transcription factor E2F-1 and the Rb family of proteins[J]. Mol Cell Biol, 1999, 19 (3):2400 - 2407
- [4] Barbara W, Anders B, Johanna T, et al. Multiple Cellular Mechanisms Related to Cyclin A1 in Prostate Cancer Invasion and Metastasis [J]. Natl Cancer Inst, 2008, 100: 1022 -1036
- [5] Muller C, Readhead C, Diederichs S, et al. Methylation of the cyclin A1 promote correlates with gene silencing in somatic cell lines, while tissue-specific expression of cyclin A1 is methylation independent[J]. Mol Cell Biol, 2000, 20:3316-3329
- [6] Henglein B, Chenivresse X, Wang J, et al. Structure and cell cycle-regulated transcription of the human cyclin A gene [J]. PNAS, 1994, 91 5490-5494
- [7] Rivera A, Mavila A, Bayless KJ, et al. Cyclin A1 is a p53-induced gene that mediates apoptosis, G2/M arrest, and mitotic catastrophe in renal, ovarian, and lung carcinoma cells [J]. Cell Mol Life Sci, 2006, 63(12):1425-1439
- [8] Muller C, Yang R, Beck-von-Peacock L, et al. Cloning of the cyclin A1 genomic structure and characterization of the promoter region. GC boxes are essential for cell cycle-regulated transcription of the cyclin A1 gene[J]. J Biol Chem, 1999, 274:11220-11228
- [9] Yang R, Morosetti R, Koeffler HP. Characterization of a second human cyclin A that is highly expressed in testis and in several leukemic cell lines[J]. Cancer Res, 1997, 57:913-920
- [10] 于卉影,史承广,朱继红,等. 细胞周期素 A 的表达与非小细胞肺癌增殖及预后的关系[J]. 癌症, 2001, 20(1): 38-40
- Yu Hui-ying, Shi Cheng-guang, Zhu Ji-hong, et al. The relationship of expression of Cyclin A1 and non-small cell lung cancer proliferation prognosis[J]. Cancer, 2001, 20(1): 38-40
- [11] Pattamawadee Y, Thep C, Veerachai K, et al. Promoter hypermethylation of CCNA1, RARRES1 and HRASLS3 in nasopharyngeal carcinoma[J]. Oral Oncology, 2008, 44, 400- 406
- [12] Tokumaru Y, Yamashita K, Osada Met al. Inverse correlation between cyclin A1 hypermethylation and p53 mutation in head and neck cancer identified by reversal of epigenetic silencing [J]. Cancer Res, 2004(17):5982-5987
- [13] Kitkumthorn N, Yanatsanajit P, Kiatpongson S, Phokaew C, Triratanachai S, Trivijitsilp P, et al. Cyclin A1 promoter hypermethylation in human papillomavirus-associated cervical cancer [J]. BMC Cancer, 2006, 6(55):33-35
- [14] Muller TC, Ji P, Diederichs S, et al. The cyclin A1-CDK2 complex regulates DNA double-strand break repair[J]. Mol Cell Biol, 2004, 24 (20):8917-8928
- [15] Ji P, Agrawal S, Diederichs S, et al. Cyclin A1, the alternative A-type cyclin, contributes to G1/S cell cycle progression in somatic cells[J]. Oncogene, 2005, 24(16):2739-44
- [16] Sanchez-Cespedes M, Esteller M, Wu L, Nawroz-Danish H, Yoo GH, Koch WM, Jen J, Herman JG, Sidransky D (2000) Gene promoter hypermethylation in tumors and serum of head and neck cancer patients [J]. Cancer Res, 60: 892-895

(下转第 1326 页)

传、讲座、电视广告、传播等方式推广高血压知识明显不足,健康教育的开展缺乏技术保障和环境支持。农村居民高血压患者在高血压防治上通过门诊治疗这个单一途径,生活方式的干预较差,普遍存在重治疗轻预防的思想,对高血压危险因素、高血压常见并发症、高血压治疗基本原则或措施的知晓比例均较低,特别是对药物抵抗型高血压更是知之甚少。因此今后在城乡都要加强药物抵抗型高血压的预防与治疗,让更多的人避免或治愈药物抵抗型高血压。

参考文献(References)

- [1] 中国高血压防治指南修订委员会.中国高血压防治指南(2005年修订版)[J].Chin J Hypertension, 2005, 13(Suppl): 1-53
National Revision Committee for Prevention and treatment of hypertension guide. Chinese Hypertension Prevention Guide (Revision 2005)[J]. Chin J Hypertension, 2005,13(Suppl):1-53
- [2] 张玉萍,任延平,黄若文,等. 高血压会员制在农村高血压管理中的应用[J]. 中国社区医师:医学专业, 2008, 10(5): 3-4
Zhang Yuping, Ren Yanping, Huang Ruowen, et al. A study on application of hypertension membership system in management of village hypertension patients [J]. Chinese Community Doctors, 2008,10(5): 3-4
- [3] 卢跃棣,任潮芬,郑冬雅,等. 社区抗高血压药物使用调查分析[J]. 浙江临床医学, 2008,10(3): 431-432
Lu Yueti, Ren Chaofen, Zheng Dongya et al. Community Analysis of antihypertensive drug use [J]. Zhejiang Clinical Medical Journal, 2008,10(3): 431-432
- [4] Calhoun DA, Jones D, Textor S, et al. Resistant hypertension: diagnosis, evaluation, and treatment. A scientific statement from the American Heart Association Professional Education Committee of the Council for High Blood Pressure Research [J]. Hypertension. 2008;51(6): 1403-19
- [5] 陈文彬,潘祥林主编. 诊断学第七版[M]. 北京:人民卫生出版, 2008: 149
Chen Wenbin, Pan Xianglin editor. Diagnosis Seventh Edition [M]. Beijing: people's medical publishing house, 2008: 149
- [6] Mancia G, De Backer G, Dominiczak A, et al. 2007 Guidelines for the management of arterial hypertension: the task force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology(ESC)[J]. J Hypertens, 2007, 25(6): 1105-1187
- [7] 尹来,王伯忠,郑凯航. 老年顽固性高血压的原因及诊治[J]. 中国预防医学杂志, 2005,6(4): 361-362
Yin Lai, Wang Bozhong, Zheng Kaihang. Senile hypertension causes and treatment[J]. China Preventive Medicine, 2005, 6(4): 361-362
- [8] 卢敏,曹建湘. 顽固性高血压 60 例临床分析[J]. 中国医刊, 2002, 37(10): 29
Lu Min, Cao Jianxiang. Refractory hypertension analysis of 60 cases [J]. Chinese Journal of Medicine, 2002, 37(10): 29
- [9] 刘会敏,张海河. 高血压病的药物治疗进展[J]. 临床合理用药, 2009, 2(18): 125-126
Liu Huimin, Zhang Haihe. Advances in drug treatment of hypertension[J]. Rational drug use, 2009, 2(18): 125-126
- [10] Psaty BM, Manolio TA, Smith NL, et al. Time trends in high blood pressure control and the use of antihypertensive medications in older adults [J]. Arch Intern Med, 2002, 162: 2325-2332
- (上接第 1323 页)
- [17] Muller-Tidow C, Bornemann C, Diederichs S, Westermann A, Klumpen S, Zuo P, Wang W, Berdel WE, Serve H (2001) Analyses of the genomic methylation status of the human cyclin A1 promoter by a novel real-time PCR-based methodology[J]. FEBS Lett 490: 75-78
- [18] Singer-Sam J, LeBon JM, Tanguay RL, Riggs AD (1990) A quantitative HpaII-PCR assay to measure methylation of DNA from a small number of cells[J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18: 687
- [19] Husemann Y, Geigl JB, Schubert F, et al. Systemic spread is an early step in breast cancer[J]. Cancer Cell, 2008, 13(1): 58-68
- [20] Santini V, Kantarjian HM, Issa JP: Changes in DNA methylation in neoplasia: pathophysiology and therapeutic implications [J]. Ann Intern Med, 2001, 134(7): 573-586