

基础研究

DOI: 10.11699/cyxb20130308

乳腺导管内增生性病变及乳腺浸润性导管癌中 TR β 1 基因甲基化的研究

令亚琴¹, 李 青¹, 郝 杰², 许小英³, 令晓玲³

(1. 兰州大学基础医学院病理生理学研究所, 兰州 730020; 2. 甘肃省人民医院乳腺科, 兰州 730020;
3. 兰州大学第一医院乳腺科, 兰州 730020)

【摘要】目的:了解乳腺浸润性导管癌及乳腺导管增生性病变组织甲状腺素受体 β 1 (thyroid hormone receptor β 1, TR β 1) 基因启动子区甲基化状态, 探讨其与乳腺癌发生的关系。**方法:**采用甲基化特异性 PCR (methylation-specific polymerase chain reaction, MSP) 技术, 研究 40 例乳腺浸润性导管癌 (infiltrating ductal carcinoma, IDC)、12 例普通型导管增生 (usual ductal hyperplasia, UDH)、8 例乳腺不典型性导管增生 (atypical ductal hyperplasia, ADH)、24 例导管原位癌 (ductal carcinoma in situ, DCIS) 组织及 10 例健康成人女性乳腺组织中 TR β 1 基因启动子区甲基化状态。**结果:**正常乳腺组织、UDH、ADH、DCIS 和 IDC 中, TR β 1 基因甲基化率分别为 0.0% (0/10)、16.7% (2/12)、37.5% (3/8)、62.5% (15/24) 和 80.0% (32/40), 正常组织 TR β 1 基因甲基化率与 DCIS 和 IDC 相比差异有统计学意义 ($P_{\text{正常组对 DCIS}}=0.001$, $P_{\text{正常组对 IDC}}=0.000$); UDH 与 DCIS 相比, 差异无统计学意义 ($P=0.009$); UDH 与 IDC 相比差异有统计学意义 ($P=0.000$)。**结论:**TR β 1 基因启动子区 CpG 岛甲基化是乳腺癌发生过程中的早期事件, 可能在乳腺癌发生和乳腺增生性病变过程中起重要生物学作用。

【关键词】甲状腺素受体 β 1 基因; 甲基化; 乳腺肿瘤; 乳腺导管增生

【中国图书分类法分类号】R781.5

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-04-20

Methylation status of TR β 1 gene in intraductal proliferative lesions and invasive ductal carcinoma of breast

LING Yaqin¹, LI Qing¹, HAO Jie², XU Xiaoying³, LING Xiaoling³

(1. Department of Pathophysiology, College of Basic Medicine, Lanzhou University;
2. Department of Galactophore, People Hospital in Gansu Province;
3. Department of Galactophore, the First Hospital in Lanzhou University)

【Abstract】Objective: To understand promoter methylation status of thyroid hormone receptor β 1 (TR β 1) gene in intraductal proliferative lesions and invasive ductal carcinoma of breast and to discuss its relationship with breast cancer. **Methods:** By methylation-specific polymerase chain reaction (MSP), we detected promoter methylation status of TR β 1 gene in mammary tissues of 40 cases of infiltrating ductal carcinoma (IDC), 12 cases of usual ductal hyperplasia (UDH), 8 cases of atypical ductal hyperplasia (ADH), 24 cases of ductal carcinoma in situ (DCIS) and 10 cases of healthy adult women. **Results:** Methylation rates of TR β 1 gene were 0.0% (0/10), 16.7% (2/12), 37.5% (3/8), 62.5% (15/24) and 80.0% (32/40) in healthy breast, UDH, ADH, DCIS, and IDC respectively. There were significant differences in methylation rate of TR β 1 gene between healthy breast and DCIS, IDC ($P=0.001$, $P=0.000$). There was no statistical difference in methylation rate of TR β 1 gene between UDH and DCIS ($P=0.009$). There were statistical differences in methylation rate of TR β 1 gene between UDH and IDC ($P=0.000$). **Conclusions:** Promoter methylation of TR β 1 gene is an early event in the development of breast carcinoma and may play an important biological role in breast carcinogenesis.

【Key words】 thyroid hormone receptor β 1 gene; methylation; breast neoplasm; intraductal proliferation of breast

乳腺癌的发生与内分泌的调节有关, 是一种典型的激素依赖性肿瘤。甾体类激素受体在乳腺癌的发生发展中起到了重要的作用, 这其中就包括了

甲状腺素受体 β 1 (thyroid hormone receptor β 1, TR β 1) 基因。TR β 1 是核受体超家族成员, 配体依赖型转录因子, 该基因位于 3p22-3p 24.1, 其分子量大小为 52 kD。多项研究表明该基因在多种肿瘤中的表达有改变并认为 TR β 1 在肿瘤的发生和发展过程中扮演着抑癌基因的角色^[1-4]。研究发现乳腺癌组织中存在 TR β 1 基因启动子区的甲基化, 而正常乳腺上皮未

作者介绍: 令亚琴, Email: lingyq@lzu.edu.cn,

研究方向: 肿瘤基础研究。

基金项目: 甘肃省科技厅资助项目 (编号: 090NKCA126); 甘肃省国际科技合作资助项目 (编号: 1011WCGA166)。

检测到,证实该基因的甲基化与乳腺癌有一定的相关性。但是该基因的甲基化究竟是发生在细胞癌变以后还是在癌前的某一阶段就已经存在,目前国内外还未见相关报道。因此本实验通过甲基化特异性聚合酶链反应(methylation-specific polymerase chain reaction, MSP)法检测乳腺普通型导管增生(usual ductal hyperplasia, UDH)、不典型性导管增生(atypical ductal hyperplasia, ADH)、导管原位癌(ductal carcinoma in situ, DCIS)及浸润性导管癌(infiltrating ductal carcinoma, IDC)中该基因甲基化状态,比较不同组织中 TRβ1 基因的甲基化率,观察其在乳腺癌发生发展过程中的变化,探讨该基因的甲基化与乳腺癌发生与演进的相关性,以期发掘其在乳腺癌早期诊断中的应用价值,并为乳腺癌的早期预防和治疗提供一个思路。

1 材料与方法

1.1 临床资料

标本来自甘肃省人民医院、兰州大学第一医院 2007 年 12 月~2009 年 3 月手术切除标本。其中 IDC 40 例,年龄 31~75 岁,平均(44.0±5.8)岁;UDH 12 例,年龄 28~44 岁,平均(34.0±5.4)岁;ADH 8 例,年龄 28~45 岁,平均(32.0±7.2)岁;DCIS 24 例,年龄 33~54 岁,平均(45.0±5.1)岁。另取 10 例因隆胸手术获取的乳腺组织作为对照组,平均年龄(35.2±1.6)岁。所取标本立即液氮冷冻,置于-70℃冰箱保存。所有病例术后经病理学检查确诊。

1.2 实验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 从液氮罐中取出组织,置离心管中,将组织样品尽量剪碎,采用 DNA 提取试剂盒(promega, USA)提取各组织标本的 DNA。紫外分光光度计定量后,于-20℃保存。

1.2.2 DNA 甲基化修饰和纯化 基因组 DNA 的甲基化修饰使用 Methylamp DNA Modification Kit(epigentek, USA)试剂盒,用 DNA 纯化试剂盒(Promega A7280)对 DNA 过柱纯化,过柱后 DNA 溶于 50 μl 灭菌去离子水,加入 5 μl 3 mol/L NaOH 脱硫,1 μl 的 20 mg/ml 的糖原、乙醇沉淀,重新溶解于 20 μl TE 溶液中,于-20℃保存备用。

1.2.3 MSP 扩增 为有效地提高甲基化检出率,根据巢式 PCR 原理,设计了 A 和 B 2 组引物(每组均包括 1 对甲基化特异引物和 1 对非甲基化特异性引物),引物由上海生物工程公司合成。A 组为外引物,甲基化引物序列上游:5'-GGTAATTTGTTAGAGGATCGCGC-3',下游:5'-CACCTCCGATTCTTACGACG-3',扩增片段为 307 bp。非甲基化特异性引物序列上游:5'-ATTGTAATTTGTTAGAGGATTGTGT-3',下游:5'-CACACCCCTCCAATTCTTACAACA-3',扩增片段为 310 bp。B 组为内引物,甲基化引物序列上游:5'-GGTAATTTGTTAGAGGATCGCGC-3',下游:5'-CACCCC-

TCCGATTCTTACGACG-3',扩增片段为 119 bp。非甲基化引物序列上游:5'-ATTGTAATTTGTTAGAGGATTGTGT-3',下游:5'-CACACCCCTCCAATTCTTACAACA-3',扩增片段为 125 bp。PCR 反应体系为 50 μl,其中包括修饰后的模板 DNA 4 μl,10×buffer 5 μl,dNTP 2.5 μl,上下游引物各 0.5 μl, Taq 酶 0.5 μl,并加水补至 50 μl。经 95℃预变性 10 min,94℃60 s,58℃(甲基化引物)或 54℃(非甲基化引物)退火 30 s,72℃60 s,35 个循环后 72℃延伸 10 min,扩增产物 5 μl 于 1.8% 的琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像仪下观察照相。以正常人外周血淋巴细胞基因组 DNA 经 SssI 甲基化酶(Sigma, USA)处理使其甲基化后作为阳性对照,以去离子水替代模板作为空白对照。

1.2.4 结果判定 先用 A 组引物扩增,如果甲基化引物有扩增条带,则不管非甲基化引物有无扩增条带均认为启动子区存在甲基化。如果非甲基化引物有扩增条带而甲基化引物无条带或条带弱不能确认,则加用 B 组引物作巢式扩增。如果 B 组的甲基化引物出现扩增条带则认为启动子区存在甲基化;如果 B 组的甲基化引物无扩增条带而非甲基化引物出现扩增条带则认为启动子区存在非甲基化。

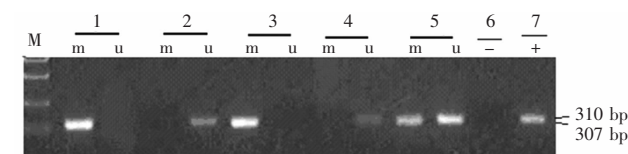
1.3 统计学处理

运用 SPSS 15.0 软件对结果进行分析。以 χ^2 检验分析不同组间 TRβ1 基因甲基化检出率及 IBC 组织中 TRβ1 基因甲基化与临床病理参数的关系。检验水准 $\alpha=0.05$,表 1 中数据校正后的检验水准是 $\alpha=0.005$ 。

2 结果

2.1 MSP 结果

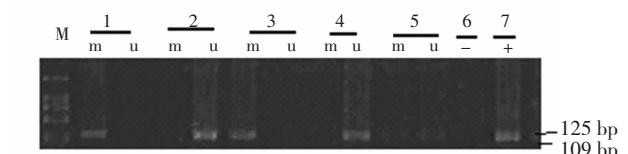
扩增产物长度出现 307 bp 和 119 bp 表示 TRβ1 基因异常甲基化;扩增产物长度为 310 bp 和 125 bp 表示 TRβ1 基因未出现异常甲基化(图 1、2)。



M. marker; 1. IDC 组织; 2. 正常组织; 3. DCIS 组织; 4. ADH 组织; 5. UDH 组织; 6. 阴性对照; 7. 阳性对照; m. 甲基化 DNA; u. 非甲基化 DNA

图 1 使用 A 引物扩增的产物

Fig.1 Results of TRβ1 gene promoter methylation using group A primer



M. marker; 1. IDC 组织; 2. 正常组织; 3. DCIS 组织; 4. ADH 组织; 5. UDH 组织; 6. 阴性对照; 7. 阳性对照; m. 甲基化 DNA; u. 非甲基化 DNA

图 2 使用 B 引物扩增的产物

Fig.2 Results of TRβ1 gene promoter methylation using group B primer

表 1 乳腺正常组织、UDH、ADH、DCIS 和 IDC 中 TRβ1 的甲基化
Tab.1 Methylation status of TRβ1 in normal tissue,UDH,ADH,DCIS and IDC

组别	例数 (n)	TRβ1 基因			χ^2 值	P_a 值	χ^2_b 值	P_b 值
		m (n)	u (n)	甲基化率 (%)				
正常组织	10	0	10	0.0				
UDH组织	12	2	10	16.7				
ADH组织	8	3	5	37.5				
DCIS组织	24	15	9	62.5	11.184	0.001 ^a	6.743	0.009 ^b
IDC组织	40	32	8	80.0	22.222	0.000 ^a	16.359	0.000 ^b

注:a,指该组与正常组比较;b,指该组与 UDH 组比较;m,甲基化 DNA;u,非甲基化 DNA

2.2 TRβ1 基因在不同组织中甲基化状态的分析

结果显示,正常乳腺组织、UDH、ADH、DCIS 和 IDC 中,TRβ1 基因甲基化率分别为 0.0%(0/10)、16.7%(2/12)、37.5%(3/8)、62.5%(15/24)和 80.0%(32/40),正常组织 TRβ1 基因甲基化率与 DCIS 和 IDC 相比差异有统计学意义($P_{\text{正常组对 DCIS}}=0.001$, $P_{\text{正常组对 IDC}}=0.000$);UDH 与 DCIS 相比,差异无统计学意义($P=0.009$);UDH 与 IDC 相比差异有统计学意义($P=0.000$) (表 1)。

2.3 TRβ1 基因甲基化状态与 IDC 患者临床特征的关系

TRβ1 基因启动子甲基化与患者的年龄、有无淋巴结转移及不同肿瘤大小差异无统计学意义(P 值分别为 0.393、0.438、0.063);但在 32 例阳性标本中,在不同临床分期差异有统计学意义($P=0.024$) (表 2)。

表 2 TRβ1 启动子甲基化与 IDC 患者临床特征的关系
Tab.2 Relationship between methylation of TRβ1 and IDC clinical features

临床特征	例数 (n)	TRβ1 基因			χ^2 值	P 值
		m	u			
年龄	≤50	14	12	2	0.729	0.393
	>50	26	20	6		
淋巴结转移	有	28	21	7	0.603	0.438
	无	12	11	1		
肿瘤大小	>2 cm	14	10	6	3.444	0.063
	≤2 cm	26	22	2		
临床分期	I	7	3	4	7.485	0.024
	II	21	18	3		
	III	12	11	1		

注:m,甲基化 DNA;u,非甲基化 DNA

3 讨 论

1996年,有学者报道在乳腺癌中发现染色体 3p 杂合子丢失,特别在 3p21-25 区域,提示该处存在肿瘤抑癌基因^[5-6]。有文献^[7]已分析甲状腺素受体 TRβ1 基因就位于该区域。该基因共有 10 个外显子和 9 个内含子,其 mRNA 存在 1 个编码 519 个氨基酸残基的可读框,长度为 6 341 bp。TRβ1 是配体依

赖性转录因子,它可与三碘甲状腺原氨酸(triiodothyronine, T_3)结合后使其构象发生改变,与具有甲状腺激素反应元件的靶基因结合,调节它的转录。国外资料表明,TRβ1 可能在肿瘤的发生发展中扮演了一个很重要的角色,目前对其研究结果说法不一。

Lin 等^[8]研究发现 TRβ1 基因在肝癌细胞中呈现高表达,并且与抑制肿瘤转移的 nm23 基因表达呈负相关提出 T_3 可能下调该基因的表达。Bronnegard 等^[9]研究显示 TRβ1mRNA 在甲状腺癌组织中的表达明显低于正常组织,并且发现 TRβ1mRNA 表达与甲状腺癌的进展有关。Puzianowska-Kuznicka 等^[12]报道在肾癌组织中 TRβ1mRNA 30%是高表达,70%呈现低表达。Silva 等^[13]在 70 例乳腺癌患者中检测 TRβ1mRNA 表达,发现 12 例 TRβ1mRNA 的表达异常。Garcla-Silva 等^[14]也展示了 TRβ1mRNA 在乳腺癌中的低表达。前期的研究也发现乳腺癌组织中 TRβ1mRNA 的表达明显低于正常组织^[10],但其表达低下的机制目前还不完全清楚。

2002 年美国学者首次报道了乳腺癌中 TRβ1 启动子区甲基化与其转录减少之间的关系。他们研究了 11 例早期乳腺癌患者的组织,发现 TRβ1 启动子区发生了各种程度的甲基化,之后他又用 5-氮-2-脱氧胞苷对 TRβ1 启动子区已经发生甲基化的乳腺癌细胞进行去甲基化处理,发现部分 TRβ1 表达得到恢复,他们认为该基因的变化参与了乳腺癌的发生发展^[11]。本实验结果显示 40 例乳腺癌组织中有 32 例 TRβ1 基因启动子甲基化,检出率是 80.0%,而正常乳腺组织无甲基化出现,两者之间差别有统计学意义,这说明该基因启动子区甲基化可能是乳腺癌组织中 TRβ1 基因表达抑制的机理之一。

通常认为乳腺癌的发生是一个连续发展的过程。包括从正常上皮到普通增生到非典型增生再到原位癌以及最终发展为浸润性癌的一系列步骤。愈来愈多的研究表明:ADH 和 DCIS 是 IDC 的前驱病

变,因为他们在组织学上具有连续性^[12],UDH 虽然不把它看为乳腺癌的前驱病变,但长期随访发现,UDH 患者以后发生浸润性乳腺癌的危险性轻度增高。由于乳腺癌已成为严重威胁妇女健康的疾病,而且治疗上有一定的困难,所以越来越多的学者把研究转移到癌前病变上。已有人报道雌激素受体启动子区甲基化状态在乳腺癌前病变及浸润性导管乳腺癌中有不同的表达,作为同样甾体类受体的TRβ1 基因在不同的癌前病变检测目前还未见相关报道。

本实验在设计引物时从 NCBI 数据库中调取 TRβ1 全基因序列,将序列导入 EMBL-EBI 数据库的 CpG 岛在线分析网站 <http://www.ebi.ac.uk/emboss/cpgplot> 中进行分析。结果发现该基因中有 11 个 CpG 岛,其中第 2 个 CpG 岛位于基因转录起始位点附近,有可能影响基因表达,因此实验选择该片段作为甲基化检测的靶序列。为了获得 PCR 产物和避免 PCR 扩增的随机性,又以偏重亚硫酸氢盐处理后的 DNA 为模板,同时进行了 2 个独立的巢式 PCR。结果发现 TRβ1 基因不只在乳腺癌组织中发生高甲基化,在乳腺导管内增生性病变组织中也有一定程度的甲基化出现,UDH、ADH、DCIS 和 IDC 中,TRβ1 基因甲基化率分别为 16.7% (2/12)、37.5% (3/8)、62.5% (15/24) 和 80.0% (32/40),正常组织 TRβ1 基因甲基化率与 DCIS 和 IDC 相比差异有统计学意义,UDH 与 IDC 相比差异有统计学意义。说明 TRβ1 启动子甲基化不仅见于 IDC,而且很可能是乳腺癌发生过程中的早发事件。此外,还发现在 IDC 中,肿瘤组织临床分期越后,TRβ1 基因甲基化程度越高,提示 TRβ1 基因甲基化可能与乳腺癌的恶性转化相关,其蓄积对乳腺癌的发生可能有一定的促进作用。UDH、ADH、DCIS 中 TRβ1 基因甲基化的患者以后患乳腺癌风险可能较大,这需要今后做进一步的随访研究加以证实。

总之,TRβ1 基因启动子区 CpG 岛甲基化是乳腺癌发生过程中的早期事件,在乳腺癌癌前病变期可能起重要作用。TRβ1 基因启动子区甲基化对乳

腺癌的发生具有一定的预测价值。对于乳腺癌患病风险评估、早期诊断及治疗具有重要的临床意义。

参 考 文 献

- [1] Bassett J H, Harvey C B, Williams G R. Mechanisms of thyroid hormone receptor-specific nuclear and extra nuclear actions[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2003, 213(1): 1-11.
- [2] Puzianowska-Kuznicka M, Nauman A, Madej A, et al. Expression of thyroid hormone receptors is disturbed in human renal clear cell carcinoma[J]. *Cancer Lett*, 2000, 155(2): 145-152.
- [3] Silva J M, Dominguez G, Gonzalez-Sancho J M, et al. Expression of thyroid hormone receptor/erbA genes is altered in human breast cancer[J]. *Oncogene*, 2002, 21(27): 4307-4316.
- [4] Garcla-Silva S, Aranda A. The thyroid hormone receptor is a suppressor of ras-mediated transcription, proliferation, and transformation[J]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(17): 7523-7514.
- [5] Cheng S Y. Multiple mechanisms for regulation of the transcriptional activity of thyroid hormone receptors[J]. *Rev Endocr Metab Disord*, 2000, 1(1): 9-18.
- [6] Nowell P C. Foundations in cancer research. chromosomes and cancer: the evolution of an idea[J]. *Adv Cancer Res*, 1993, 62(12): 1-17.
- [7] Yen P M. Molecular basis of resistance to thyroid hormone[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2003, 14(7): 327-333.
- [8] Lin K H, Lin Y W, Lee H F, et al. Increased invasive activity of human hepatocellular carcinoma cells is associated with an overexpression of thyroid hormone b1 nuclear receptor and low expression of the anti-metastatic nm23 gene[J]. *Cancer Lett*, 1995, 98(1): 89-95.
- [9] Bronnegard M, Topping O, Boos J, et al. Expression of thyrotropin receptor and thyroid hormone receptor messenger ribonucleic acid in normal, hyperplastic, and neoplastic human thyroid tissue[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1994, 79(2): 384-389.
- [10] Ling Y, Xu X, Hao J, et al. Aberrant methylation of the TRβ1 gene in tissue and plasma of breast cancer patients[J]. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 2010, 196(2): 140-145.
- [11] Li Z, Meng Z H, Chandrasekaran R, et al. Biallelic inactivation of the thyroid hormone receptorβ1 gene in early stage breast cancer[J]. *Cancer Res*, 2002, 62(7): 1943-1939.
- [12] Wellings S R, Jensen H M, Marcum R G. An atlas of subgross pathology of the human breast with special reference to possible pre-cancerous lesion[J]. *J Natl Cancer Inst*, 1975, 55(2): 231-273.

(责任编辑:冉明会)