

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.09.007

BRCA1 基因在散发性乳腺癌中的表达及异常甲基化*

韦薇,李秋云,唐玮,蒋奕,姬逸男,杨华伟,刘剑仑[△]

(广西医科大学附属肿瘤医院乳腺外科,南宁 530021)

[摘要] **目的** 通过检测乳腺癌易感基因 1(BRCA1)基因在散发性乳腺癌中的表达情况及其启动子甲基化状态,探讨 BRCA1 基因与散发性乳腺癌的关系。**方法** 应用实时荧光定量 PCR 的方法和免疫组织化学方法分别检测 BRCA1 mRNA 和蛋白在 60 例散发性乳腺癌组织、癌旁正常乳腺组织及 30 例乳腺良性病变组织中的表达情况;应用重亚硫酸盐测序 PCR(BSP)联合 TA 克隆测序方法检测上述组织中 BRCA1 启动子 CpG 岛的甲基化状态,分析 BRCA1 基因表达和启动子甲基化相关性。**结果** BRCA1 mRNA 和蛋白在散发性乳腺癌组织中的相对表达水平分别低于癌旁正常组织及乳腺良性病变组织,差异有统计学意义($P<0.001$)。乳腺癌组织中 BRCA1 蛋白的表达率为 51.7%(31/60),明显低于癌旁正常乳腺组织的 71.7%(43/60)及乳腺良性病变组织的 66.7%(20/30),差异有统计学意义($P<0.001$);散发性乳腺癌组织中 BRCA1 启动子甲基化率为 31.7%(19/60),癌旁正常乳腺组织及乳腺良性病变组织均未检测出甲基化,差异有统计学意义($P=0.000$);BRCA1 蛋白表达与其启动子甲基化呈负相关($r=-0.345, P=0.007$)。**结论** 乳腺癌易感基因 BRCA1 启动子区 CpG 岛甲基化导致 BRCA1 基因表达显著下调,可能参与散发性乳腺癌的发生、发展。

[关键词] 乳腺肿瘤;BRCA1;基因;甲基化**[中图分类号]** R730.2**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2015)09-1174-03

Expression and abnormal methylation BRCA1 in sporadic breast cancer*

Wei Wei, Li Qiuyun, Tang Wei, Jiang Yi, Ji Yinan, Yang HuaWei, Liu Jianlun[△]

(Department of Breast Surgery, Cancer Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

[Abstract] **Objective** To investigate expression and promoter methylation status of BRCA1 in sporadic breast cancer. **Methods** The expression of BRCA1 mRNA and protein were detected in 60 cases of sporadic breast cancer, the adjacent breast tissues, and 30 cases of breast benign lesion tissue by RT-PCR and immunohistochemical staining respectively. The methylation status of BRCA1 promoter in those tissues were detected using bisulfite genomic sequencing PCR (BSP) combined with TA clone for sequencing. The relation between BRCA1 expression in sporadic breast cancer and promoter methylation status was analyzed. **Results**

The expression level of BRCA1 mRNA and protein were down-regulated in sporadic breast cancer tissues compared to the corresponding adjacent breast tissues and breast benign lesion tissue($P<0.001$). The positive rates of BRCA1 protein was 51.7%(31/60) in sporadic breast tissue, which were significantly lower than those of in the adjacent breast tissues 71.7%(43/60) and breast benign lesion tissue 66.7%(20/30)($P<0.001$). The methylation rate of BRCA1 promoter CpG was 31.7%(19/60) in sporadic breast, while it wasn't found in adjacent breast tissues and breast benign lesion tissue($P=0.000$). The statistical analysis showed the expression of BRCA1 had significant negative correlation with promoter methylation($r=-0.345, P=0.007$). **Conclusion** The hypermethylation of BRCA1 promoter could induce BRCA1 down-regulating, which may be involved in the occurrence and development of sporadic breast cancer.

[Key words] breast neoplasms; BRCA1; gene; methylation

乳腺癌易感基因 1(breast cancer susceptibility gene 1, BRCA1)是最早发现的与家族遗传性乳腺癌发生关系密切的抑癌基因^[1]。有文献报道,大约 45%的家族性乳腺癌和 90%的遗传性乳腺癌中可以检测出 BRCA1 基因的突变^[2-3]。而在散发性乳腺癌中很少发现 BRCA1 的突变。但约有 30%~40%的散发性乳腺癌中 BRCA1 mRNA 和蛋白表达降低或缺失^[4],表明 BRCA1 也是参与散发性乳腺癌发生、发展的重要基因。目前,BRCA1 在散发性乳腺癌中的具体功能和作用机制尚不清楚,本研究拟从 BRCA1 基因表达和甲基化 2 个方面研究散发性乳腺癌与 BRCA1 基因的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集广西医科大学附属肿瘤医院乳腺外科

2010 年 9 月至 2012 年 12 月乳腺手术切除标本,包括 60 例散发性乳腺癌组织及配对的距癌组织阴性切缘 5 cm 以上的正常乳腺组织。乳腺良性病变 30 例,其中,乳腺纤维瘤 20 例,乳腺囊性增生症 10 例,患者均为女性。乳腺癌患者年龄 31~76 岁,平均 50.3 岁。乳腺良性病变患者年龄 18~42 岁,中位年龄 31 岁。所有患者均无乳腺癌家族史,术前未接受化疗、放疗和其他抗肿瘤治疗。术后所有标本均经病理科医师确诊。本实验经医院伦理委员会批准,患者知情同意。

1.2 标本处理 术中取材后一部分标本予生理盐水冲洗后立即放入液氮中,然后置于-80℃冰箱中冻存。另一部分标本予中性甲醛溶液固定 24 h,石蜡包埋保存。

1.3 实时荧光定量 PCR 检测 LOX mRNA Trizol 法提取各

* 基金项目:广西自然科学基金资助项目(2011GXNSFB018102)。 作者简介:韦薇(1978-),副主任医师,博士,主要从事乳腺癌的基础与临床研究。 [△] 通讯作者, Tel:(0771)5308635; E-mail:gxzlwxwk@126.com。

组细胞总 RNA,取 2 μg 总 RNA 逆转录合成 cDNA。引物序列:BRCA1 Forward: TGT GAG GCA CCT GTG GTG AC, Reverse: GTG GCT GGC TGC AGT CAG TAG(125 bp);β-actin Forward: AGT TGC GTT ACA CCC TTT CTT G, Reverse: CAC CTT CAC CGT TCC AGT TTT(148 bp)。实时荧光定量 PCR 按 Quant SYBR Green PCR 试剂盒说明书操作,实时荧光定量基因扩增仪上扩增。反应条件:95 ℃ 预变性 2 min,95 ℃ 变性 10 s,60 ℃ 退火 30 s,70 ℃ 延伸 30 s,40 个循环。读取 Ct 值,按公式“ $\Delta CT = CT_{\text{平均值}}(\text{BRCA1}) - CT_{\text{平均值}}(\beta\text{-actin})$ ”分别计算各组的 ΔCT ,用 $2^{-\Delta CT}$ 代表 BRCA1 mRNA 的表达量。

1.4 免疫组织化学染色 石蜡包埋组织,以 5 μm 连续切片,免疫组织化学染色 SP 法操作步骤按说明书进行。用已知阳性切片作为阳性对照,PBS 代替一抗作为阴性对照。BRCA1 染色以细胞核和(或)细胞质内出现棕黄色颗粒为阳性,无着色为阴性细胞。每批染色的阳性对照片应显示为阳性、阴性对照片应显示为阴性,否则整批切片重染。

1.5 免疫组织化学染色结果分析 (1)定性分析:每张切片随机选择 5 个 200 倍镜视野。计算阳性细胞率=(阳性细胞数/计数肿瘤细胞总数)×100%。以阳性细胞大于或等于 10% 为阳性,小于 10% 为阴性^[5]。(2)定量分析:每张切片随机选取 5 个 200 倍视野,用 Image Pro Plus 6.0 软件测得每个视野阳性表达区域面积(area SUM)和累计光密度(IOD SUM)值,通过 IOD SUM/area SUM 计算平均光密度(IOD AVE),取 5 个视野光密度平均值代表该切片 BRCA1 蛋白的表达量。

1.6 重亚硫酸盐测序 PCR(BSP)检测 BRCA1 基因启动子甲基化状态 应用 ABI 公司的 Methyl Primer Express v1.0 软件对 BRCA1 mRNA 转录体转录起始位点上游 -2 000 bp 和下游 +1 000 bp 进行 CpG 岛分析,发现存在 2 个 CpG 岛,分别为长度 244 bp(-1 279 bp~-1 036 bp)和长度 221 bp(-937 bp~-717 bp),以 -937 bp~-717 bp 为检测目标,测序分析甲基化情况。采用 Methprimer 针对 CpG 岛设计 BSP 引物,引物序列如下。上游引物:5'-GAT TGG GTG GTT AAT TTA GAG T-3';下游引物:5'-AAT TAT CTA AAA AAC CCC ACA A-3',扩增产物长度为 234 bp。按 DNA 提取试剂盒说明书提取乳腺癌、癌旁乳腺组织及乳腺良性肿瘤组织中的 DNA,用 Invitrogen 的 MethylCode™ Bisulfite Conversion Kit 对样本基因组 DNA 进行处理。BSP 总反应体系为 25 μL,其中,上、下游引物各为 0.5 μL,甲基化修饰后的 DNA 为 1.0 μL,反应条件:95 ℃ 预变性 5 min,95 ℃ 变性 30 s,56 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 60 s,循环 35 个周期后,最后 72 ℃ 延伸 5 min 结束。产物经凝胶电泳后回收纯化,与 TA 载体链接,转化至 DH5A 感受态细胞后,挑选 5 个阳性克隆测序,测序结果采用 BiQ Analyzer 软件分析。

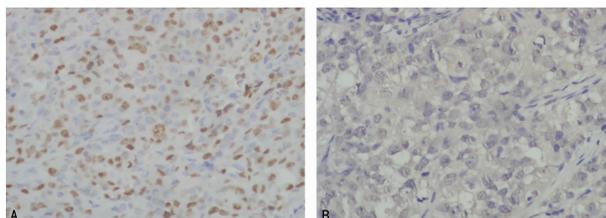
1.7 统计学处理 采用 SPSS 15.0 统计软件进行分析处理,结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用成组设计和配对设计两样本均数比较的 *t* 检验、 χ^2 检验和 Spearman 等级相关分析进行数据分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 乳腺组织中 BRCA1 mRNA 表达水平的检测 实时荧光定量 PCR 结果显示,乳腺癌组织、癌旁正常乳腺组织及乳腺良性病变组织中 BRCA1 mRNA 的相对表达水平为(0.14 ± 0.06)、(0.31 ± 0.12)和(0.29 ± 0.09),BRCA1 mRNA 在散发

性乳腺癌组织中的表达明显低于癌旁组织及乳腺良性病变组织($P < 0.05$),而乳腺良性病变组织与癌旁组织间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

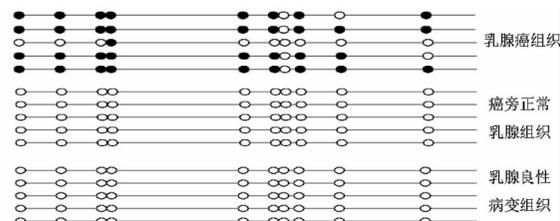
2.2 乳腺组织中 BRCA1 蛋白表达水平的检测 BRCA1 蛋白主要分布在细胞核,少数出现在细胞质(图 1)。60 例乳腺癌组织中 BRCA1 蛋白的表达率为 51.7%(31/60),明显低于癌旁正常乳腺组织的 71.7%(43/60)及乳腺良性病变组织的 66.7%(20/30)。根据 Image Pro Plus6.0 软件测得,BRCA1 蛋白在乳腺癌组织、癌旁组织及乳腺良性病变组织中的平均光密度值分别为(0.237 ± 0.084)、(0.762 ± 0.255)和(0.684 ± 0.272)。乳腺癌组织中 BRCA1 蛋白表达率及表达量明显低于癌旁正常乳腺组织及乳腺良性病变组织($P < 0.05$),后两者间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。



A:BRCA1 阳性表达;B:BRCA1 阴性表达。

图 1 免疫组织化学染色检测 BRCA1 蛋白在乳腺癌组织中的表达情况(SP,×400)

2.3 乳腺组织中 BRCA1 甲基化的检测 对乳腺癌和癌旁正常组织及乳腺良性病变组织中的 BRCA1 基因 5' 调控序列 -937 bp~-717 bp 区段内的 CpG 位点甲基化状态的 BSP 测序分析,结果显示乳腺癌组织中 BRCA1 启动子甲基化率为 31.7%(19/60),而在癌旁正常乳腺组织及乳腺良性病变组织均未检测出 BRCA1 启动子甲基化,差异有统计学意义($P = 0.000$)。见图 2。



●:发生甲基化的 CG 位点;○:未发生甲基化的 CG 位点。

图 2 BSP 方法检测 3 种乳腺组织中 BRCA1 基因启动子区甲基化黑白点图

2.4 乳腺癌组织中 BRCA1 蛋白表达与启动子甲基化相关性 60 例乳腺癌组织中有 31 例 BRCA1 蛋白阳性表达,其中启动子甲基化的为 5 例,而 29 例 BRCA1 阴性表达的乳腺癌组织中 BRCA1 基因的甲基化的为 14 例。用 Spearman 相关分析,BRCA1 蛋白表达与甲基化之间为负相关($r = -0.345, P = 0.007$),证明 BRCA1 基因启动子的甲基化与其转录和翻译水平呈负相关。

3 讨 论

与其他肿瘤抑制基因一样,BRCA1 参与了许多重要的细胞进程,它能防止细胞失去控制地生长和分化,在调节细胞进程、DNA 损伤修复、细胞生长与凋亡及转录活化和抑制多种生物学途径中发挥重要作用^[6-7]。BRCA1 功能的缺陷,可能会导致基因组不稳定性,从而增加肿瘤发生的风险^[8]。BRCA1 基因突变在家族性乳腺癌中的作用已得到广泛认同,而在散发性

乳腺癌中 BRCA1 基因的突变非常罕见,但有研究发现在散发性乳腺癌中 BRCA1 mRNA 和蛋白表达水平的下降或缺失。这些结果表明,有突变之外的其他机制参与了散发性乳腺癌中 BRCA1 基因在转录水平和(或)转录后水平的抑制。

近年来研究发现 DNA 启动子甲基化模式的改变,尤其是某些抑癌基因局部甲基化水平的异常增高,在肿瘤的发生和发展的过程中起到了不容忽视的作用^[9]。启动子异常甲基化是肿瘤发生的早期事件,主要发生在启动子 CpG 岛内 5'-端胞嘧啶碱基上,这些位点在正常情况下处于未甲基化状态。发生异常甲基化往往会改变基因的表达模式,导致抑癌基因的转录抑制或沉默,失活的抑癌基因不能负调控细胞周期增殖,从而导致细胞恶性改变^[10]。P16、NOEY2、TIMP3、RASSF1A 等基因是目前已经得到证实的发生 DNA 甲基化的乳腺癌相关基因^[11-13]。

乳腺癌易感基因 BRCA1 启动子甲基化近年来在散发性乳腺癌中也受到广泛关注。Rice 等^[14]检测 6 个散发性乳腺癌细胞系的 BRCA1 启动子的甲基化水平及 mRNA 表达水平,发现有 1 个细胞系的 BRCA1 的 CpG 位点 60% 以上发生甲基化,其 mRNA 表达水平仅为正常乳腺上皮细胞水平的 1/8。其他 5 个细胞系的 BRCA1 mRNA 表达也有不同程度的下降,但均未检测到甲基化。说明 BRCA1 mRNA 的表达水平与乳腺癌发生有关,mRNA 表达水平可能受启动子甲基化水平调控。本研究检测了 60 例散发性乳腺癌组织、与之配对癌旁组织以及 30 例乳腺良性病变组织中 BRCA1 基因表达水平及启动子甲基化情况。结果显示 BRCA1 mRNA 和蛋白在乳腺癌组织中表达水平明显低于癌旁组织及乳腺良性病变组织。这表明乳腺癌中 BRCA1 基因在转录水平发生了下调。根据亚硫酸盐测序结果显示 BRCA1 启动子在部分乳腺癌组织中发生了甲基化,而癌旁正常乳腺组织和乳腺良性病变组织中均未发生甲基化。进一步分析发现,在乳腺癌组织中 BRCA1 蛋白的表达与其启动子 CpG 岛甲基化状态呈负相关。发生启动子甲基化的 BRCA1 蛋白在乳腺癌组织中多为阴性表达,而未发生启动子甲基化的 BRCA1 蛋白多呈阳性表达。因此,推测在散发性乳腺癌中,BRCA1 基因启动子的甲基化是导致其表达显著下调的主要机制。

参考文献

- [1] Zakhartseva LM, Gorovenko NG, Podolskaya SV, et al. Breast cancer immunohistochemical features in young women with BRCA 1/2 mutations[J]. *Exp Oncol*, 2009, 31(3):174-178.
- [2] King MC, Marks JH, Mandell JB, et al. Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2[J]. *Science*, 2003, 302(5645):643-646.
- [3] Chenevix-Trench G, Healey S, Lakhani S, et al. Genetic and histopathologic evaluation of BRCA1 and BRCA2 DNA sequence variants of a known clinical significance [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(4):2019-2027.
- [4] Bonatti F, Pepe C, Tancredi M, et al. RNA-based analysis of BRCA1 and BRCA2 gene alterations[J]. *Cancer Genet Cytogenet*, 2006, 170(2):93-101.
- [5] 任婕,魏敏杰,金峰,等.散发性乳腺癌中影响 BRCA1 蛋白失表达的参数分析[J]. *中国肿瘤临床*, 2008, 35(2):99-103.
- [6] De Siervi A, De Luca P, Byun JS, et al. Transcriptional autoregulation by BRCA1[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(2):532-542.
- [7] Morris JR, Boutell C, Keppler M, et al. The SUMO modification pathway is involved in the BRCA1 response to genotoxic stress[J]. *Nature*, 2009, 462(7275):886-890.
- [8] Milne RL, Antoniou AC. Genetic modifiers of cancer risk for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers[J]. *Ann Oncol*, 2011, 22 Suppl 1:i11-7.
- [9] Fulan D, Sahnane N, Bernasconi B, et al. APC alterations are frequently involved in the pathogenesis of acinar cell carcinoma of the pancreas, mainly through gene loss and promoter hypermethylation[J]. *Virchows Arch*, 2014, 464(5):553-564.
- [10] Fiolka R, Zubor P, Janusicova V, et al. Promoter hypermethylation of the tumor-suppressor genes RASSF1A, GSTP1 and CDH1 in endometrial cancer[J]. *Oncol Rep*, 2013, 30(6):2878-2886.
- [11] Lee JJ, Ko E, Cho J, et al. Methylation and Immunoeexpression of p16(INK4a) Tumor Suppressor Gene in Primary Breast Cancer Tissue and Their Quantitative p16(INK4a) Hypermethylation in Plasma by Real-Time PCR [J]. *Korean J Pathol*, 2012, 46(6):554-561.
- [12] Yu Y, Luo R, Lu Z, et al. Biochemistry and biology of ARHI(DIRAS3), an imprinted tumor suppressor gene whose expression is lost in ovarian and breast cancers [J]. *Methods Enzymol*, 2006, 407:455-468.
- [13] Kajabova V, Smolkova B, Zmetakova I, et al. RASSF1A Promoter Methylation Levels Positively Correlate with Estrogen Receptor Expression in Breast Cancer Patients [J]. *Transl Oncol*, 2013, 6(3):297-304.
- [14] Rice JC, Ozcelik H, Maxeiner P, et al. Methylation of the BRCA1 promoter is associated with decreased BRCA1 mRNA levels in clinical breast cancer specimens[J]. *Carcinogenesis*, 2000, 21(9):1761-1767.

(收稿日期:2014-10-08 修回日期:2014-12-15)

(上接第 1173 页)

- [13] 黄世勇,陶泽璋,肖伯奎.连翘酯苷对顺铂耳毒性防护作用的实验研究[J]. *听力学及言语疾病杂志*, 2011, 19(2):152-156.
- [14] 蒋利和,马博,谢正轶.二十二碳六烯酸对老年大鼠脑组

织抗氧化和脂肪酸的影响[J]. *食品科学*, 2011, 32(13):284-287.

(收稿日期:2014-10-08 修回日期:2014-12-10)