

· 论著 ·

受体型蛋白酪氨酸磷酸酶 O 基因甲基化与乳腺癌细胞株化疗敏感性的关系

李少英 吴华聪 王辉林 王维 陈静

【摘要】 目的 探讨受体型蛋白酪氨酸磷酸酶 O (PTPRO) 基因不同甲基化状态的乳腺癌细胞株对紫杉醇的敏感性。**方法** 应用甲基化特异性 PCR, 检测 MCF-7、MDA-MB-231 和 Hs578t 乳腺癌细胞株中 PTPRO 基因启动子 CpG 岛甲基化状态, 并用 RT-PCR 法检测 PTPRO mRNA 表达。采用 MTT 法检测 MCF-7、MDA-MB-231 和 Hs578t 乳腺癌细胞株对 0.000 6、0.003 0、0.015 0、0.075 0、0.375 0、1.875 0、9.350 0、46.750 0、234.000 0 mmol/L 紫杉醇的敏感性, 以及对细胞株进行去甲基化实验后紫杉醇抑制率的改变。两组间均数比较采用配对 *t* 检验; 在检验方差齐性的前提下, 多组间均数比较用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD 检验。**结果** 乳腺癌 MCF-7、MDA-MB-231 细胞株中 PTPRO 基因甲基化, 而乳腺癌 Hs578t 细胞株中 PTPRO 基因无甲基化。用紫杉醇处理细胞株后再检测 PTPRO 启动子甲基化情况, 结果显示 MCF-7、MDA-MB-231 细胞株 PTPRO 基因甲基化率明显降低[(0.861±0.109)比(0.037±0.019), *t*=23.326, *P*=0.000; (0.758±0.114)比(0.086±0.010), *t*=16.109, *P*=0.000]。并且, MCF-7、MDA-MB-231 细胞株经 5-杂氮脱氧胞嘧啶(DAC)处理后, PTPRO mRNA 表达水平明显高于 DAC 处理前[(0.033±0.006)比(0.166±0.016), *t*=28.338, *P*=0.000; (0.052±0.006)比(0.587±0.087), *t*=17.257, *P*=0.000], 其表达水平与启动子 CpG 岛甲基化状态有关。紫杉醇对 MDA-MB-231、MCF-7 及 Hs578t 细胞株的半数抑制浓度(IC₅₀)分别为 8.52、5.87 和 4.52 mmol/L。不同浓度紫杉醇对 Hs578t 细胞株的抑制率均比 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞株高(*F*=129.93、182.40、46.26、49.26、33.60、80.31、160.05、69.96、79.98, *P*均=0.000)。去甲基化实验显示: DAC 处理 MCF-7 和 MDA-MB-231 乳腺癌细胞株后, 不同浓度紫杉醇对细胞株的抑制率与处理前相比, 差异均有统计学意义(MCF-7: *t*=14.195、8.328、7.042、6.385、5.450、8.557、4.788、13.351、11.887, *P*均<0.050; MDA-MB-231: *t*=16.324、30.443、9.177、12.694、9.528、11.912、10.260、18.109、3.754, *P*均<0.050)。**结论** PTPRO 基因甲基化是乳腺癌发生、发展过程中的常见现象; 紫杉醇可影响 PTPRO 基因启动子 CpG 岛的甲基化状态, 并且对无 PTPRO 基因甲基化的乳腺癌细胞株杀伤率更高; PTPRO 基因甲基化状态的改变影响乳腺癌细胞株对紫杉醇的敏感性。

【关键词】 编码膜结合受体型蛋白酪氨酸磷酸酶 O; 甲基化; 乳腺肿瘤; 化疗敏感性

【中图法分类号】 R737.9

【文献标志码】 A

Correlation of methylation of protein tyrosine phosphatase receptor-type O gene with the chemosensitivity in breast cancer cells Li Shaoying, Wu Huacong, Wang Huilin, Wang Wei, Chen Jing.

Department of Breast Diseases, Bao'an Maternal and Child Health Hospital, Shenzhen 518133, China

Corresponding author: Li Shaoying, Email: 273334556@qq.com

【Abstract】 Objective To determine the role of protein tyrosine phosphatase receptor-type O (PTPRO) gene methylation as a potential molecular biomarker in the treatment of breast cancer and its association with the sensitivity to paclitaxel in the breast cancer cell lines. **Methods** Methylation-specific PCR was used to detect the methylation status of PTPRO gene promoter CpG island in three breast cancer cell lines MCF-7, MDA-MB-231 and Hs578t. RT-PCR was used to measure PTPRO mRNA expression. MTT assay was applied to evaluate the sensitivity of MCF-7, MDA-MB-231 and Hs578 cells to paclitaxel under different concentrations, i. e.,

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0807.2014.05.007

作者单位: 518133 深圳市宝安区妇幼保健院乳腺科

通信作者: 李少英, Email: 273334556@qq.com

0.000 6, 0.003 0, 0.015 0, 0.075 0, 0.375 0, 1.875 0, 9.350 0, 46.750 0, 234.000 0 mmol/L. The changes of inhibition rate of paclitaxel in cell lines after demethylation were analyzed as well. The mean comparison between two groups was performed using paired *t* test; after determining the homogeneity of variance, mean comparison among multiple groups were performed using One-Way ANOVA; pairwise comparison using LSD test. **Results** PTPRO gene was methylated in MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines, but unmethylated in Hs578t cell lines. After treated with paclitaxel, the methylation rate of PTPRO in MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines was significantly decreased [(0.861 ± 0.109) vs (0.037 ± 0.019) , $t = 23.326$, $P = 0.000$; (0.758 ± 0.114) vs (0.086 ± 0.010) , $t = 16.109$, $P = 0.000$]. Moreover, PTPRO mRNA expression level in MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines was significantly higher after DAC treatment [(0.033 ± 0.006) vs (0.166 ± 0.016) , $t = 28.338$, $P = 0.000$; (0.052 ± 0.006) vs (0.587 ± 0.087) , $t = 17.257$, $P = 0.000$], which was correlated with the methylation status of CpG islands. IC_{50} of paclitaxel on MCF-7, MDA-MB-231 and Hs578 breast cell lines was 8.52, 5.87 and 4.52 mmol/L, respectively. Hs578t cell line was significantly more sensitive to paclitaxel at different concentrations compared with the other two cell lines ($F = 129.93, 182.40, 46.26, 49.26, 33.60, 80.31, 160.05, 69.96, 79.98$, all $P = 0.000$). The demethylation experiment showed that after DAC treatment, the inhibition rate of paclitaxel at different concentrations presented a significant difference in MCF-7 and MDA-MB-231 cells (MCF-7: $t = 14.195, 8.328, 7.042, 6.385, 5.450, 8.557, 4.788, 13.351, 11.887$, all $P < 0.050$; MDA-MB-231: $t = 16.324, 30.443, 9.177, 12.694, 9.528, 11.912, 10.260, 18.109, 3.754$, all $P < 0.050$). **Conclusions** PTPRO methylation is a common phenomenon in the development of breast cancer. Promoter CpG island methylation status of PTPRO gene could be influenced by paclitaxel and breast cancer cell lines with unmethylated PTPRO are more sensitive to paclitaxel. The changes of methylation status of PTPRO gene significantly affect the sensitivity of breast cancer cells to paclitaxel.

【Key words】 Protein tyrosine phosphatase receptor-type O; Methylation; Breast neoplasms; Chemosensitivity

乳腺癌是中国女性发病率第一位的恶性肿瘤,病死率也已上升到 4.71/10 万^[1],其发生、发展是环境与遗传两种因素共同作用的结果,其中 CpG 岛启动子甲基化所致的抑癌基因失活被认为是主要途径之一^[2]。化疗是降低患者复发率和提高生存率的主要治疗方法之一^[3-5],然而目前尚缺乏指导选择化学药物治疗的分子生物学水平的基因检测。研究表明,某些基因启动子的异常甲基化所介导的转录异常,与临床化疗耐药性密切相关,如药物转运相关基因^[6]、DNA 错配修复基因^[7]、谷胱甘肽巯基转移酶 P1^[8]等。编码膜结合受体型蛋白酪氨酸磷酸酶 O 基因(protein tyrosine phosphatase receptor-type O, PTPRO),作为蛋白酪氨酸磷酸酶(protein tyrosine phosphatases, PTPs)家族成员之一,是新近发现的一个潜在抑癌基因^[9-10],参与细胞生长、分化、分裂周期和癌基因转化等多种过程^[11]。其在癌症发生机制中的作用是目前研究的热点。然而,其启动子甲基化状态与化疗药物敏感性是否相关,文献报道较少。本研究通过测定乳腺癌细胞株对紫杉醇的半数抑制浓度(IC_{50}),验证乳腺癌细胞株甲基化状态与

化疗药物敏感性的关系,从而指导个体化治疗。

1 材料与方法

1.1 细胞株及细胞培养

乳腺癌 MCF-7、MDA-MB-231 和 Hs578t 细胞株以及正常人乳腺上皮细胞株 HMEC 48R 购自上海博谷生物科技有限公司,在含 5% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液和 37 ℃、5% CO₂ 条件下培养,用 0.25% 胰蛋白酶消化传代,取对数生长期细胞进行药物敏感性实验。

1.2 细胞处理

将乳腺癌 MCF-7、MDA-MB-231 和 Hs578t 细胞重悬,分别接种于 6 孔板中培养,待细胞处于对数生长期时,各取出部分细胞分别加入去甲基化剂 5-杂氮脱氧胞嘧啶(5-aza-2'-deoxycytidine, DAC),作为去甲基化乳腺癌细胞株进行去甲基化实验,终浓度为 10 μmol/L,隔天更换含相同药物浓度的新鲜 RPMI-1640 培养液,培养 3 d 后收集细胞备用。对照组细胞采用相同体积的 D-Hanks 液处理。

1.3 甲基化特异性 PCR(methylation specific PCR, MSP)检测基因 CpG 岛的甲基化(简称 PTPRO 基因甲基化)状态

1.3.1 基因组 DNA 的提取 将细胞清洗后移入离心管,1500×g 离心 2 min。去上清液后加入 400 μl 1×细胞裂解液摇匀,再加入 20 mg/ml 蛋白酶 K 4 μl,50 °C 培养 2 h,用酚-氯仿抽提,乙醇沉淀、溶解,-20 °C 保存备用。

1.3.2 亚硫酸氢盐处理 DNA 取 1 μg 模板 DNA,采用 EpiTect fast 96 bisulfite conversion kits(德国 Qiagen 公司)对 DNA 进行亚硫酸氢钠修饰,具体步骤按操作说明进行。纯化后 DNA 加入 20 ml Milli-Q 处理后的水溶解。如前所述,这种亚硫酸氢钠修饰后的 DNA 随即直接用于 MSP 法扩增,检测 PTPRO 基因甲基化状态^[12]。

1.3.3 甲基化特异性 PCR 检测 PTPRO 基因甲基化状态 根据 PTPRO 基因启动子 DNA 片段设计引物,甲基化上游引物 5'-CGTTTTTGGAGGATTTCGGGC-3',下游引物 5'-AAAACACGACTACGCTAACG-3';非甲基化上游引物 5'-ATGTTTTTGGAGGATTTTGGGT-3',下游引物 5'-ATACCCCATCAC TACACAAACA-3'。采用 EpiTect MSP Kits(德国 Qiagen 公司产品)进行 PCR 扩增,PCR 反应体系为 50 μl,包括:修饰后的 DNA 样品 3 μl、EpiTectonic Master Mix 25 μl、上下引物各 0.4 μl、Taq 酶 0.1 μl 和 RNase-free ddH₂O 21.1 μl,检测步骤按说明书进行。PCR 扩增条件:第一步 95 °C 预变性 10 min,第二步 95 °C 变性 15 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,共 35 个循环,最后 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物电泳后,切胶回收,进行 T-A 克隆,挑取阳性克隆进行测序。并取未经处理的正常人外周血 DNA 作为阴性对照;而经甲基化 SssI 酶处理的外周血 DNA 作为阳性对照。

1.4 研究设计

根据 MSP 检测结果,将乳腺癌细胞株(MCF-7、MDA-MB-231 和 Hs578t 细胞株)分为 PTPRO 基因甲基化细胞株(MCF-7、MDA-MB-231)和 PTPRO 基因无甲基化细胞株(Hs578t),而将正常人乳腺上皮细胞株 HMEC 48R(无甲基化细胞株)作为正常对照,分析 PTPRO 基因甲基化状态与 PTPRO mRNA 表达水平的关系,然后比较各种细胞株对紫杉醇的敏感性是否存在差异。

1.5 RT-PCR 检测乳腺癌细胞株中 PTPRO 基因的 mRNA 表达

1.5.1 RNA 的抽提 用美国 Invitrogen 公司

的 Trizol 试剂盒,按照说明分别提取乳腺癌 MCF-7、MDA-MB-231 和 Hs578t 细胞株以及正常人乳腺上皮细胞株 HMEC 48R 的总 RNA。

1.5.2 RT-PCR 检测 根据 PTPRO 基因片段设计引物,上游引物 5'-CTCCACCCAAATCACTCTTCGCAG-3',下游引物 5'-ACCATTGTTGAGACGGCTATGAACG-3',内参照 β-actin 由上海生工生物工程股份有限公司合成,上游引物 5'-GAACCCCAAGGCCAACCGCGAGA-3',下游引物 5'-TGACCCCGTCACCGAGTCCATC-3'。按照 QuantiTect reverse transcription kit(德国 Qiagen 公司)操作说明进行 RT-PCR。PCR 反应体系 25 μl,包括:1 μg 总 RNA 反转录成的 cDNA(5 μl)、1×聚合缓冲液 2 μl,2 mmol/L MgCl₂ 1.5 μl,上下游引物各 0.2 mmol/L(0.4 μl),Taq 酶 1.5 U(0.5 μl)和焦碳酸二乙酯(DEPC)水 15.2 μl。PCR 扩增条件:94 °C 预变性 5 min,热循环 94 °C 变性 30 s,54.5 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 45 s,循环 35 个周期。

1.6 四甲基偶氮唑盐(MTT)法检测乳腺癌细胞株对紫杉醇的敏感性

将 1×10⁴/ml 的乳腺癌细胞接种于 96 孔板,24 h 后分别加入 0.000 6、0.003 0、0.015 0、0.075 0、0.375 0、1.875 0、9.350 0、46.750 0、234.000 0 mmol/L 的紫杉醇,同时设阴性对照组和空白组,每个浓度设 8 个复孔。72 h 后,每孔加入 MTT 150 μl。4 h 后以 1000 r/min 离心 5 min(离心机半径为 6 cm),弃去孔中液体,每孔再加入二甲基亚砷 100 μl。10 min 后,应用全自动酶标仪,于 570 nm 波长处测定吸光度(D)值,计算细胞抑制率,绘制细胞生长抑制曲线,确定乳腺癌细胞株的化疗药物半效抑制浓度(IC₅₀)。细胞抑制率(%)=(对照组 D 值-实验组 D 值)/(对照组 D 值-空白组 D 值)×100%。

1.7 统计学处理

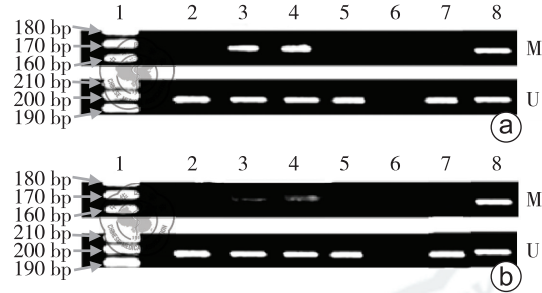
各组数据使用 SPSS 13.0 软件统计分析。定量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间均数比较采用配对 t 检验;在检验方差齐性的条件下,多组间均数比较用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 检验。采用线性相关分析检测不同浓度紫杉醇与抑制率的关系。 $P < 0.050$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 乳腺癌细胞株中 PTPRO 启动子甲基化状态 MSP 法扩增显示,乳腺癌 MCF-7、MDA-MB-

231 细胞株 PTPRO 基因部分甲基化,而乳腺癌 Hs578t 细胞株和正常人乳腺上皮 HMEC 48R 细胞株 PTPRO 基因无甲基化(图 1a)。

用紫杉醇处理 MCF-7、MDA-MB-231 细胞株后,PTPRO 基因甲基化条带较处理前显著减弱(图 1b、表 1)。



a: 紫杉醇处理细胞前;b: 紫杉醇处理细胞后
M: 甲基化条带;U: 无甲基化条带;1: 标记条带;2: HMEC 48R 细胞株;3: MCF-7 细胞株;4: MDA-MB-231 细胞株;5: Hs578t 细胞株;6: H₂O;7: 阴性对照(未经处理的正常人外周血 DNA);8: 阳性对照(经甲基化 SssI 酶处理的外周血 DNA)

图 1 甲基化特异性 PCR 检测细胞株 PTPRO 基因甲基化情况

表 1 紫杉醇处理前后细胞株甲基化的相对程度比较($\bar{x} \pm s$)

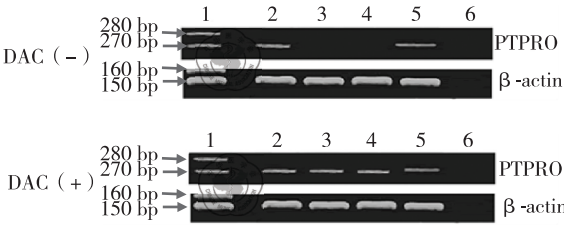
细胞处理	MCF-7 细胞株	MDA-MB-231 细胞株
紫杉醇处理前	0.861±0.109	0.758±0.114
紫杉醇处理后	0.037±0.019	0.086±0.010
t 值	23.326	16.109
P 值	0.000	0.000

每组 n=8

2.2 乳腺癌细胞株 PTPRO mRNA 转录水平

未经 DAC 处理的乳腺癌 Hs578t 细胞株和正常人乳腺上皮 HMEC 48R 细胞株中 PTPRO mRNA 呈高表达,MCF-7、MDA-MB-231 细胞株中 PTPRO mRNA 几乎无表达;经 DAC 处理后,Hs578t、HMEC 48R 细胞株中 PTPRO mRNA 表达水平与 DAC 处理前差异无统计学意义,而 MCF-7、MDA-MB-231 细胞株中 PTPRO mRNA 表达水平

明显高于 DAC 处理前(图 2、表 2)。



DAC(-): 去甲基化前;DAC(+): 去甲基化后
1: 标记条带;2: HMEC 48R 细胞株;3: MCF-7 细胞株;4: MDA-MB-231 细胞株;5: Hs578t 细胞株;6: H₂O

图 2 RT-PCR 检测 5-杂氮脱氧胞嘧啶(DAC)处理细胞株前后 PTPRO mRNA 表达水平的变化

2.3 乳腺癌细胞株对紫杉醇的敏感性

2.3.1 紫杉醇对乳腺癌细胞生长抑制曲线的影响 MDA-MB-231、MCF-7 及 Hs578t 细胞的 IC₅₀ 分别为 8.52、5.87、4.52 mmol/L。经线性相关分析发现,紫杉醇浓度越高,其对 MCF-7、MDA-MB-231 及 Hs578t 乳腺癌细胞株的抑制率越高($r=0.7299、0.7358、0.7371, P$ 均=0.000)。不同浓度紫杉醇对 Hs578t 细胞株(PTPRO 基因无甲基化)较 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞株(PTPRO 基因甲基化)的抑制率高(表 3)。

2.3.2 乳腺癌细胞株去甲基化作用后对紫杉醇的敏感性 紫杉醇对 DAC 去甲基化处理后的 MCF-7 和 MDA-MB-231 乳腺癌细胞株的抑制率与 DAC 处理前相比,差异均有统计学意义(表 4、5)。

3 讨论

80% 致癌基因的编码产物由蛋白质酪氨酸激酶构成^[13],而 PTPs 可作为肿瘤抑制因子催化其反转录作用,为抗癌治疗提供分子生物学标志^[14]。目前有关蛋白质酪氨酸磷酸酶与乳腺癌关系的研究尚不多见,PTPRO 基因作为 PTPs 家族成员之一,其与乳腺癌的关系值得关注。

表 2 各细胞株 PTPRO 去甲基化前后 mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

细胞处理	PTPRO 甲基化细胞		PTPRO 无甲基化细胞	
	MCF-7	MDA-MB-231	Hs578t	HMEC 48R
DAC(-)	0.033±0.006	0.052±0.006	0.186±0.010	0.258±0.019
DAC(+)	0.166±0.016	0.587±0.087	0.189±0.007	0.255±0.011
t 值	28.338	17.257	1.397	0.438
P 值	0.000	0.000	0.205	0.674

每组 n=8;DAC:5-杂氮脱氧胞嘧啶;DAC(-): 去甲基化前;DAC(+): 去甲基化后

表 3 3 种乳腺癌细胞株在不同浓度紫杉醇作用下的细胞抑制率比较

(% , $\bar{x} \pm s$)

细胞株	0.000 6 mmol/L	0.003 0 mmol/L	0.015 0 mmol/L	0.075 0 mmol/L	0.375 0 mmol/L	1.875 0 mmol/L	9.350 0 mmol/L	46.750 0 mmol/L	234.000 0 mmol/L
MCF-7	2.00±0.18 ^a	9.26±0.10 ^a	13.82±0.52 ^a	25.76±0.61 ^a	27.58±1.24 ^a	41.14±0.84 ^a	52.39±0.40 ^a	65.29±0.71 ^a	78.99±0.70 ^a
MDA-MB-231	1.25±0.09 ^b	6.63±0.20 ^b	11.99±0.89 ^b	23.90±0.70 ^b	26.24±0.85 ^b	38.94±0.80 ^b	49.45±0.71 ^b	61.67±0.86	76.32±0.73 ^b
Hs578t	2.27±0.10 ^c	10.23±0.64 ^c	15.61±0.79 ^c	26.98±0.56 ^c	30.50±1.06 ^c	43.60±0.53 ^c	54.83±0.65 ^c	65.63±0.64 ^c	80.97±0.78 ^c
F 值	129.93	182.40	46.26	49.26	33.60	80.31	160.05	69.92	79.98
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

每组 $n=8$; a: $P<0.050$, 与 Hs578t 细胞株比较; b: $P<0.050$, 与 MCF-7 细胞株比较; c: $P<0.050$, 与 MDA-MB-231 细胞株比较

表 4 去甲基化前后 MCF-7 乳腺癌细胞株在不同浓度紫杉醇作用下的细胞抑制率比较

(% , $\bar{x} \pm s$)

细胞处理	0.000 6 mmol/L	0.003 0 mmol/L	0.015 0 mmol/L	0.075 0 mmol/L	0.375 0 mmol/L	1.875 0 mmol/L	9.350 0 mmol/L	46.750 0 mmol/L	234.000 0 mmol/L
DAC(-)	1.91±0.12	9.07±0.66	13.64±0.65	25.89±0.82	28.21±0.78	41.34±0.98	52.17±1.76	64.44±1.13	79.13±0.82
DAC(+)	2.57±0.15	10.64±0.65	15.81±0.68	28.09±0.83	30.39±0.83	45.47±1.01	55.84±1.46	69.81±0.93	82.31±0.90
t 值	14.195	8.328	7.042	6.385	5.450	8.557	4.788	13.351	11.887
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000	0.002	0.000	0.000

每组 $n=8$; DAC, 5-杂氮脱氧胞嘧啶; DAC(-): 去甲基化前; DAC(+): 去甲基化后

表 5 去甲基化前后 MDA-MB-231 乳腺癌细胞株在不同浓度紫杉醇作用下的细胞抑制率比较

(% , $\bar{x} \pm s$)

细胞处理	0.000 6 mmol/L	0.003 0 mmol/L	0.015 0 mmol/L	0.075 0 mmol/L	0.375 0 mmol/L	1.875 0 mmol/L	9.350 0 mmol/L	46.750 0 mmol/L	234.000 0 mmol/L
DAC(-)	1.24±0.11	6.44±0.12	11.67±0.58	23.35±0.53	26.72±0.50	39.18±0.57	49.43±0.60	61.15±0.46	76.27±0.59
DAC(+)	2.08±0.12	8.29±0.09	14.15±0.39	26.14±0.54	28.74±0.54	43.103±0.55	52.87±0.63	66.04±0.69	78.05±1.19
t 值	16.324	30.443	9.177	12.694	9.528	11.912	10.260	18.109	3.754
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.007

每组 $n=8$; DAC, 5-杂氮脱氧胞嘧啶; DAC(-): 去甲基化前; DAC(+): 去甲基化后

本实验组在前期工作中应用甲基化特异性 PCR 检测新鲜冰冻的乳腺癌组织,发现 PTPRO 基因启动子甲基化率为 55%^[15],而对照组正常乳腺组织中无一例有 PTPRO 基因启动子甲基化。与 Motiwala 等^[16]关于肺癌 PTPRO 基因甲基化的研究结果基本一致。继而,本实验组利用人乳腺癌组织进行研究,发现 PTPRO 基因异常甲基化可用于预测乳腺癌患者,尤其是 HER-2 阳性者的预后^[17],与 Huang 等^[18]的研究结果相似。本研究利用乳腺癌细胞株和正常乳腺上皮细胞进一步验证前期工作,发现乳腺癌 MCF-7、MDA-MB-231 细胞 PTPRO 基因部分甲基化,而乳腺癌 Hs578t 细胞和正常人乳腺上皮 HMEC 48R 细胞 PTPRO 基因无甲基化,提示 PTPRO 基因甲基化是肿瘤形成过程中的常见现象。接着,本研究检测乳腺癌细胞株经紫杉醇处理后 PTPRO 基因 CpG 岛启动子甲基化情况,结果发现甲基化条带较处理前显著减弱,提示紫杉醇可降低 PTPRO 基因甲基化率,

由此推测紫杉醇可能提高 PTPRO 基因甲基化乳腺癌患者的治疗效果或生存率,但需要进一步研究证实。以往有文献报道,PTPRO 基因失表达可能降低慢性淋巴细胞白血病患者对氟达拉滨治疗的敏感性^[19]。并且, Motiwala^[19]和 Hogan 等^[20]都认为 PTPRO 基因甲基化与化疗抵抗性相关,而且这类患者更易出现白血病复发。这种 PTPRO 基因对化疗疗效的影响开启了一个新的治疗途径,有利于探索表观遗传药物的联合治疗。因此,研究者认为 PTPRO 基因有望作为肿瘤预警、早期诊断、判断预后或治疗效果的潜在分子生物学标志物,亦可作为临床治疗靶点,评价辅助治疗的敏感性^[19-22]。

启动子是基因中与 RNA 聚合酶结合并启动转录的 DNA 序列,决定着转录起始位点、控制着 mRNA 转录水平与转录的组织特异性。抑癌基因失活与其启动子高甲基化有关;启动子高甲基化可使抑癌基因沉默,阻碍该基因转录与表达^[23]。

本实验应用 RT-PCR 检测 DAC 处理前后乳腺癌细胞株 PTPRO 基因 mRNA 表达水平的变化, 结果发现 DAC 处理后 PTPRO mRNA 表达水平明显增高。与近期多种癌症研究报道一致, 包括肝癌、结肠癌、原发性肺癌和慢性淋巴细胞白血病等, 均得出类似结果^[9,14,16,19], 而且利用 5-氮杂-2-脱氧胞苷对动物模型进行去甲基化实验, 发现 PTPRO 基因重新表达, 肿瘤体积缩小^[24], 提示 CpG 岛启动子甲基化是 PTPRO 基因失活的主要机制。另外, 有研究者将 PTPRO 基因转染人肺癌细胞株 A-549, 发现 PTPRO 的异位表达可以抑制细胞生长、阻断细胞周期和增加细胞凋亡易感性^[25]。这些数据表明 PTPRO 基因在肿瘤形成过程中发挥着抑癌基因的作用, 而且其启动子甲基化导致了 PTPRO 基因失表达。因此, 表观遗传药物因可诱导基因再表达而迅速受到关注, 并有望应用于临床各种癌症的治疗。

此外, 为探讨 PTPRO 启动子高甲基化与化疗疗效的关系, 笔者在前期研究的基础上, 就其对化疗药物紫杉醇的敏感性进行了研究。结果显示, 紫杉醇对 MDA-MB-231、MCF-7 及 Hs578t 细胞株的 IC₅₀ 分别为 8.52、5.87、4.52 mmol/L, MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞株对紫杉醇的敏感性较差, Hs578t 细胞株对紫杉醇相对较敏感, 且不同浓度紫杉醇对 Hs578t 细胞株 (PTPRO 无甲基化) 较 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞株 (PTPRO 异常甲基化) 的杀伤率更高, 提示 PTPRO 基因甲基化及其失表达可能与化疗抵抗性相关。这与 Motiwala 等^[19] 和 Hogan 等^[20] 的研究结果一致。而且, 经去甲基化实验发现, 紫杉醇对 DAC 去甲基化处理的 MCF-7 和 MDA-MB-231 乳腺癌细胞株的抑制率均较 DAC 处理前增高, 且差异有统计学意义。这些结果提示, PTPRO 基因甲基化状态的改变可能影响乳腺癌细胞株对紫杉醇的敏感性。另外, 在前期工作中, 笔者发现 PTPRO 基因甲基化与 ER(-) 呈正相关^[17]。以往也有类似文献报道, PTPRO 基因表达可增强乳腺癌内分泌治疗的效果, 雌激素介导的 PTPRO 基因失活可能是雌激素诱导乳腺癌形成的早期事件^[22]。因此, PTPRO 基因甲基化及其表达与辅助治疗的相关性可能与受体状态有关。但是, 需要相应的患者参与进一步研究。

总而言之, 本研究结果证实乳腺癌中 PTPRO

基因甲基化率高, 是乳腺癌发生、发展过程中的常见现象, 紫杉醇可影响 PTPRO 基因启动子 CpG 岛的甲基化状态, 且紫杉醇对无 PTPRO 甲基化的乳腺癌细胞株杀伤率更高, 将来也许可能用于预测化疗疗效或协助更好地选择敏感的化疗药物, 甚至有望联合表观遗传药物使用, 以提高乳腺癌患者的生存率和生存质量。但是, 这一切仍需要通过大样本人乳腺癌组织 PTPRO 基因甲基化状态的深入研究来进行验证。

参 考 文 献

- [1] 张思维, 雷正龙, 李光琳, 等. 中国肿瘤登记地区 2006 年肿瘤发病和死亡资料[J]. 中国肿瘤, 2010, 19(6): 356-365.
- [2] Li L, Ying J, Tong X, et al. Epigenetic identification of receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2 as a functional tumor suppressor inhibiting beta-catenin and AKT signaling but frequently methylated in common carcinomas[J]. Cell Mol Life Sci, 2014, 71(11): 2179-2192.
- [3] Lehmann B, Pietsenpol JA. Identification and use of biomarkers in treatment strategies for triple-negative breast cancer subtypes[J]. J Pathol, 2014, 232(2): 142-150.
- [4] Mayer IA, Abramson VG, Lehmann BD, et al. New strategies for triple-negative breast cancer-deciphering the heterogeneity[J]. Clin Cancer Res, 2014, 20(4): 782-790.
- [5] 廖仕翀, 喻莉, 李金蕊, 等. 三阴性乳腺癌的临床特点及治疗进展[J/CD]. 中华乳腺病杂志: 电子版, 2012, 6(1): 91-97.
- [6] Plumb JA, Steele N, Finn PW, et al. Epigenetic approaches to cancer therapy[J]. Biochem Soc Trans, 2004, 32(Pt 6): 1095-1097.
- [7] Worm J, Kirkin AF, Dzhandzhugazyan KN, et al. Methylation-dependent silencing of the reduced folate carrier gene in inherently methotrexate-resistant human breast cancer cells[J]. J Biol Chem, 2001, 276(43): 39 990-40 000.
- [8] Ishii T, Fujishiro M, Masuda M, et al. A methylated oligonucleotide induced methylation of GSTP1 promoter and suppressed its expression in A549 lung adenocarcinoma cells[J]. Cancer Lett, 2004, 212(2): 211-223.
- [9] Hsu SH, Motiwala T, Roy S, et al. Methylation of the PTPRO gene in human hepatocellular carcinoma and identification of VCP as its substrate[J]. J Cell Biochem, 2013, 114(8): 1810-1818.
- [10] Hou J, Xu J, Jiang R, et al. Estrogen-sensitive PTPRO expression represses hepatocellular carcinoma progression by control of STAT3[J]. Hepatology, 2013, 57(2): 678-688.
- [11] Yu M, Lin G, Arshadi N, et al. Expression profiling during mammary epithelial cell three-dimensional morphogenesis identifies PTPRO as a novel regulator of morphogenesis and ErbB2-mediated transformation[J]. Mol Cell Biol, 2012, 32(19): 3913-3924.

- [12] Paulin R, Grigg GW, Davey MW, et al. Urea improves efficiency of bisulphate-mediated sequencing of 50 methylcytosine in genomic DNA [J]. *Nucleic Acids Res*, 1998, 26 (21): 5009-5010.
- [13] Fischer EH. Cell signaling by protein tyrosine phosphorylation [J]. *Adv Enzyme Regul*, 1999, 39:359-369.
- [14] Laczmanska I, Sasiadek MM. Tyrosine phosphatases as a superfamily of tumor suppressors in colorectal cancer[J]. *Acta Biochim Pol*, 2011, 58(4):467-470.
- [15] 李少英,李荣,荣磊,等. 乳腺癌患者外周血 DNA 中 PTPRO 基因甲基化异常的检测及其临床意义[J]. *肿瘤*, 2013, 33(12):1087-1094.
- [16] Motiwala T, Kutay H, Ghoshal K, et al. Protein tyrosine phosphatase receptor-type O (PTPRO) exhibits characteristics of a candidate tumor suppressor in human lung cancer[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2004, 101(38): 13 844-13 849.
- [17] Li SY, Li R, Chen YL, et al. Aberrant PTPRO methylation in tumor tissues as a potential biomarker that predicts clinical outcomes in breast cancer patients[J]. *BMC Genet*, 2014, 15: 67.
- [18] Huang YT, Li FF, Ke C, et al. PTPRO promoter methylation is predictive of poorer outcome for HER2-positive breast cancer: indication for personalized therapy [J]. *J Transl Med*, 2013, 11:245.
- [19] Motiwala T, Majumder S, Kutay H, et al. Methylation and silencing of protein tyrosine phosphatase receptor type O in chronic lymphocytic leukemia[J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13 (11):3174-3181.
- [20] Hogan LE, Meyer JA, Yang J, et al. Integrated genomic analysis of relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia reveals therapeutic strategies [J]. *Blood*, 2011, 118 (19): 5218-5226.
- [21] You YJ, Chen YP, Zheng XX, et al. Aberrant methylation of the PTPRO gene in peripheral blood as a potential biomarker in esophageal squamous cell carcinoma patients [J]. *Cancer Lett*, 2012, 315(2):138-144.
- [22] Ramaswamy B, Majumder S, Roy S, et al. Estrogen-mediated suppression of the gene encoding protein tyrosine phosphatase PTPRO in human breast cancer: mechanism and role in tamoxifen sensitivity [J]. *Mol Endocrinol*, 2009, 23 (2): 176-187.
- [23] 汤铜,李佳,钱波. DNA 甲基化与乳腺癌的早期诊断 [J/CD]. *中华乳腺病杂志:电子版*, 2013, 8(4):275-278.
- [24] Motiwala T, Ghoshal K, Das A, et al. Suppression of the protein tyrosine phosphatase receptor type O gene (PTPRO) by methylation in hepatocellular carcinomas [J]. *Oncogene*, 2003, 22(41): 6319-6331.
- [25] Berthois Y, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS. Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1986, 83(8): 2496-2500.

(收稿日期:2014-01-22)

(本文编辑:罗承丽)

李少英,吴华聪,王辉林,等. 受体型蛋白酪氨酸磷酸酶 O 基因甲基化与乳腺癌细胞株化疗敏感性的关系 [J/CD]. *中华乳腺病杂志:电子版*, 2014, 8(5):334-340.

中华医学会