

乳腺癌组织中 YY1 表达与 E-cadherin 甲基化状态的关系*

王静萱 张清媛 刘姝伶 武海燕 赵文辉 卢康平

摘要 目的:探讨乳腺癌组织中 YY1(Yin Yang-1,YY1)的表达与 E-cadherin 甲基化状态之间的关系。**方法:**采用免疫组织化学法检测 42 例乳腺癌原发病灶以及 18 例正常乳腺组织中 YY1 的表达情况,采用甲基化特异性聚合酶链反应法(MSP)进行 E-cadherin 基因甲基化检测。**结果:**乳腺癌中 E-cadherin 甲基化率为 57.1%(24/42),显著高于正常乳腺组织的 11.1%(2/18),差异有统计学意义($P < 0.05$)。乳腺癌组织中阳性 YY1 的表达(22/42,52.3%)显著高于正常乳腺组织(2/18,16.7%),差异有统计学意义($P < 0.05$),YY1 阳性乳腺癌组中 E-cadherin 甲基化者为 20/22(90.9%),而 YY1 阴性组的乳腺癌 E-cadherin 甲基化者为 4/16(25%),YY1 与 E-cadherin 甲基化状态之间呈正相关($P < 0.05$)。**结论:**乳腺癌患者 E-cadherin 基因启动子甲基化发生率显著高于正常乳腺组织,乳腺癌组织中 YY1 的高表达有可能是 E-cadherin 甲基化失活的主要原因。

关键词 乳腺癌 YY1 E-cadherin 甲基化

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2012.16.009

Association between YY1 Methylation of E-cadherin in Breast Cancer

Jingxuan WANG, Qingyuan ZHANG, Shuling LIU, Haiyan WU, Wenhui ZHAO, Kangping LU

Correspondence to: Qingyuan ZHANG; E-mail:zqywsci@163.com

No. 3 Medical Department, The Third Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150081, China

This work was supported by National Natural Science Foundation of China (30970806), Ministry of Education Doctoral Funds (200802260011), Heilongjiang Provincial Projects of Science and Technology (WB08B03), Foundation of China Postdoctoral Science (20110491112)

Abstract Objectives: To determine the relationship between the methylation of the E-cadherin promoter region and YY1 expression in breast cancer. **Methods:** YY1 expression was detected in the primary cancer tissues of 42 breast cancer patients and the normal breast tissues of 18 patients with benign breast tissues through immunohistochemical staining. E-cadherin gene methylation was examined using methylation-specific polymerase chain reaction (MSP). **Results:** The rate of E-cadherin gene hypermethylation was 57.1% (24/42), which is significantly higher than that in normal breast tissues (11.1%; 2/18) ($P < 0.05$). The rate of positive YY1 expression in breast cancer lesions (52.3%; 22/42) was significantly higher than in normal breast tissues (16.7%; 2/18) ($P < 0.05$). Hypermethylation of E-cadherin gene promoter was detected in 88% (22/25) of YY1-positive cases and in 11.4% (4/35) of YY1-negative cases. The difference in the methylation of the E-cadherin promoter was significantly higher among YY1-positive patients than among YY1-negative patients ($P < 0.05$). **Conclusion:** Methylation of E-cadherin gene promoter is a common molecular event in breast cancer and YY1 may be involved in the methylated regulation of E-cadherin.

Keywords Breast cancer; YY1; E-cadherin; Methylation

肿瘤表观遗传学是一门新兴科学,主要包括 DNA 甲基化、组蛋白修饰、染色质重塑、基因组印迹和非编码 RNA 调控等几个方面。其中 DNA 甲基化与肿瘤的关系是研究的热点。近年来,日益增多的研究表明肿瘤的发生、进展和转移与 DNA 甲基化密切相关。YY1 是一个多功能的转录调节因子,可直接作用于启动子,也可与结合蛋白协同发挥作用。YY1 可以作用于 H3-K27 甲基转移酶 Ezh2,发挥甲基化调节作用。E-cadherin 是一种广泛分布于上皮细胞的

钙依赖性糖蛋白,调节细胞与细胞间、细胞与基质间的黏附反应,使癌细胞间保持密切接触,难以脱离原发灶进入周围组织和脉管,是一个重要的肿瘤抑制基因,其启动子区异常甲基化在很多肿瘤的发生中已有报道^[1-2],E-cadherin 基因启动子的甲基化与 YY1 表达是否有关,目前尚不清楚。本研究采用免疫组化检测 YY1 的表达和甲基化特异性 PCR (methylation specific PCR, MSP) E-cadherin 基因启动子的甲基化状态,对乳腺癌及对照组织进行研究,以探讨

作者单位:哈尔滨医科大学附属第三医院(哈尔滨市 150081)

*本文课题受国家自然科学基金资助项目(编号:30970806);教育部博士点基金项目(编号:200802260011);黑龙江省科技计划项目(编号:WB08B03);中国博士后基金项目(编号:20110491112)资助

通信作者:张清媛 zqywsci@163.com

YY1 表达与 E-cadherin 基因启动子区甲基化之间的关系。

1 材料与方法

1.1 研究对象

18 例正常乳腺组织、42 例乳腺癌原发病灶组织标本均取自哈尔滨医科大学附属第三医院 2009 年 1 月~2011 年 7 月手术切除的病理存档蜡块, 诊断均经常规病理切片证实, 均为女性, 年龄 22~68 岁, 中位年龄 43.7 岁。所有乳腺癌患者手术前均未接受过化疗、放疗及内分泌治疗, 病理类型均为浸润性导管癌。

1.2 试剂

鼠抗人 YY1 多克隆抗体, 购自 Santa Cruz 公司, 工作浓度 1:100; 通用型 SP 免疫组化染色试剂盒, 购自武汉博士德公司; 浓缩型 DAB 显色试剂盒, 购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3 方法

1.3.1 免疫组化 采用免疫组化 S-P 法检测 42 例乳腺癌组织, 以及 18 例正常乳腺组织中 YY1 的表达情况。将石蜡切片经常规二甲苯脱蜡, 梯度乙醇水化; 用含 3% H₂O₂ 的去离子水于室温孵育 10 min 以去除内源性过氧化物酶; 柠檬酸缓冲液高温高压修复抗原, PBS 冲洗后加血清封闭, 室温下放置 10 min; 滴加相应一抗, 4℃冰箱孵育过夜, PBS 冲洗; 滴加生物素标记的二抗, 室温孵育 30 min, PBS 冲洗; DAB 显色, 冲洗, 苏木精对比染色, 封片, 显微镜观察。阳性对照采用已知阳性切片, 用 PBS 代替一抗做阴性对照。YY1 阳性表达主要位于胞质, 阳性细胞胞质呈棕黄色细颗粒状。两人双盲观察切片, 阳性细胞数 >20% 为阳性 (+), <20% 为阴性 (-)。

1.3.2 甲基化特异性 PCR 法 (MSP) 1) 组织 DNA 提取 按照 TIANamp Genomic DNA kit 试剂盒 (DP304 TIAN GEN 公司) 说明书进行操作, 将 20~50 mg 组织打碎处理为细胞悬液, 10 000 rpm 离心 1 min, 倒净上清, 加 200 μL 缓冲液 GA, 震荡至彻底悬浮, 再加入蛋白酶 K 混匀后, 在 56 μL 放置, 直至组织溶解, 加入 200 μL 缓冲液 GB, 充分颠倒混匀, 70 μL 放置 10 min, 加入 200 μL 无水乙醇, 充分震荡混匀, 将所得产物加入吸附柱 CB3 中, 12 000 rpm 离心 30 s, 将吸附柱 CB3 放入收集管中, 加入 500 μL 缓冲液 GD, 12 000 rpm 离心 30 s, 倒掉废液, 用 600 μL 漂洗液 PW 洗涤两次, 将吸附柱 CB3 放回收集管中, 12 000 rpm 离心 2 min, 倒掉废液, 将吸附柱 CB3 置于室温放置数 min, 并转入一个干净的离心管中, 加 50~200 μL 洗脱缓冲液 TE, 室温放置 2~5 min, 12 000 rpm 离心 2 min, 将溶液收集到离心管中。用紫外分光光度计检测其含量和纯度。2) 根据 E-cadherin 启动子区甲基化扩增引

物序列和非甲基化扩增引物序列, 116-bp 片段的 E-cadherin 甲基化启动子区 (-205): 正链: TTAGGTTAGAGGGTTATCGCGT; 反链: TAACTAAAAATTCACTACCGAC. 97-bp 片段的 E-cadherin 无甲基化启动子区 (-210): 正链: TAATTTTAGGTTAGAGGGTTATTGT; 反链: CACAACCAATCAACAACACA。用甲基化 PCR 扩增甲基化 E-cadherin (M) 和非甲基化 E-cadherin (U) 片段, 在 95℃ 变性 30 s, 在 60℃ (非甲基化) 和 62℃ (甲基化) 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 共 38 个周期。并将扩增产物在含溴乙锭的 2% 琼脂糖凝胶上电泳, 紫外检测仪下观察。

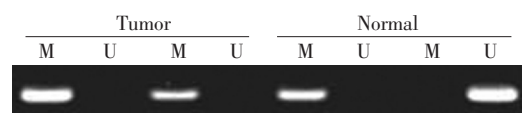
1.4 统计学分析

所有实验数据采用 SPSS 13.0 统计软件包进行统计学处理。计数资料以率表示, 应用 χ^2 检验; YY1 表达与 E-cadherin 甲基化状态关系采用 Spearman 等级相关性分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 乳腺癌组织及正常乳腺组织中 E-cadherin 甲基化状态分析

42 例散发性乳腺浸润性导管癌中, 有 24 例检测到 E-cadherin 基因启动子甲基化, 甲基化率为 57.1%; 18 例乳腺良性组织中检测到 2 例甲基化, 甲基化率为 11.1%。经统计学分析, E-cadherin 基因启动子的甲基化率乳腺癌组与非癌组比较差异有显著性 ($\chi^2 = 10.873, P < 0.05$, 图 1)。



Tumor: 肿瘤组织; Normal: 正常组织; M: 甲基化产物; U: 非甲基化产物
图 1 E-cadherin 甲基化状态分析

Figure 1 Methylation Patterns of E-cadherin

2.2 YY1 表达和 E-cadherin 甲基化状态相互之间的关系

如图 2 所示, 正常乳腺组织中 YY1 呈阴性表达, 而乳腺癌组织中 YY1 的表达为阳性。如表 1 所示, YY1 在乳腺癌组织中的表达显著高于正常乳腺组织 (52.3% vs. 16.7%, $P < 0.05$), 差异有统计学意义。

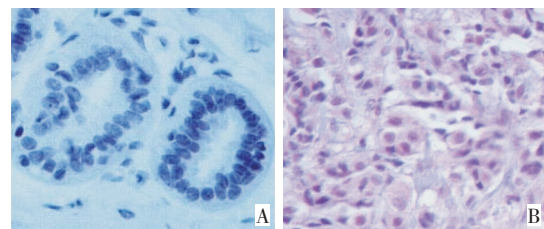


图 2 正常乳腺组织 (A) 和乳腺癌组织 (B) 中 YY1 的表达情况

Figure 2 The expression of YY1 in normal breast tissues (A) and breast cancer (B)

表1 YY1在正常乳腺组织、乳腺癌中的表达 例(%)

Table 1 The expression of YY1 in normal breast tissues and breast cancer

组织类型	例数	YY1阳性表达	χ^2	P
正常乳腺组织	18	3(16.7)	6.613	<0.05
乳腺癌原发灶	42	22(52.3)		

如表2所示,在YY1阳性表达的22例乳腺癌中同时有20例E-cadherin甲基化,YY1阴性表达的20例乳腺癌中仅有4例E-cadherin甲基化。Spearman等级相关检验表明:YY1与E-cadherin甲基化状态之间呈正相关($P<0.05$)。

表2 乳腺癌中YY1的表达与E-cadherin甲基化状态的关系 例

Table 2 Correlation of YY1 expression with E-cadherin methylation in breast cancer

YY1表达情况	例数	E-cadherin甲基化		P
		+	-	
+	22	20	2	<0.05
-	20	4	16	

3 讨论

以DNA甲基化为代表的表观遗传修饰在肿瘤细胞中经常发生改变^[2]。通过对DNA甲基化模式的研究,人们发现肿瘤细胞中存在异常的DNA甲基化状态:基因组整体甲基化水平降低,导致遗传不稳定性增加;组织特异性基因的启动子区域出现从头甲基化;癌基因多为不充分甲基化,导致重新开放或异常表达;抑癌基因多为过度甲基化,从而表达受抑制^[3]。迄今为止,关于肿瘤抑癌基因的失活与该基因的启动子区域(CpG岛)的过度甲基化的直接关系有大量的报道。许多与细胞生长增殖相关的基因,如与细胞周期相关的基因pRB、p16、p15、p14ARF和p73,以及与DNA损伤修复有关的基因,如O6-MGMT、BRCA1和hMLH1等,它们启动子区域的异常甲基化都与该基因的失活有关^[4]。

YY1是1991年Seto等^[5]在研究真核细胞DNA转录调控中发现的,命名为阴阳因子-1(YinYang-1, YY1),由于它是一种具有双重转录活性的核转录因子,是根据启动子结构的不同,YY1能分别担当转录抑制子,增强子或启动子的角色。YY1作为一个多功能的转录调节因子,可直接作用于启动子,也可与结合蛋白协同发挥作用,参与基因的泛素化、乙酰化和甲基化调节过程。

YY1是抑癌基因p53的负向调控因子^[6],YY1通过抑制p300介导的p53乙酰化,控制p53的转录活性,并且破坏p53的稳定性,使得p53失活。YY1也可以与Mdm2发挥相互作用,促进Mdm2-介导的p53泛

素化和降解。因此,无论是促进p53泛素化,还是抑制p53乙酰化,均导致一个共同的结果:YY1具有拮抗p53的作用,YY1阻止p53清除癌前细胞,导致肿瘤的发生。YY1-Mdm2复合物是YY1-调节p53泛素化和降解所必需的。YY1能增强Mdm2与p53间的相互作用,当YY1的Mdm2结合位点缺失时(沉默区201~295氨基酸区域),YY1对p53的调节作用消失^[6]。实际上,Mdm2结合位点也是YY1调节Ezh2参与组蛋白H3-K27甲基化的关键^[7]。

乳腺癌的发生是多步骤、多因素相互作用的复杂过程,包括癌基因和抑癌基因的失衡、黏附分子的介导、肿瘤血管的形成、细胞外基质和基底膜的降解等^[8]。E-cadherin是一种钙依赖性的介导同种亲和性上皮细胞相互黏附的跨膜糖蛋白,广泛分布在胚胎和成熟组织的上皮细胞中,除具有调节胚胎组织的发育、组织形成,参与细胞与细胞间信息传递交流等作用外,对促进细胞黏附聚集、维持上皮形态结构的完整性至关重要,并具有介导正常细胞接触抑制。在病理情况下,E-cadherin丢失或功能缺失与恶性肿瘤的发生、侵袭和转移过程密切相关。Droufakou等^[9]在乳腺小叶癌中的研究发现E-cadherin基因沉默是甲基化、基因突变和等位基因缺失综合的结果,其中甲基化是E-cadherin基因沉默的重要途径。Nass等^[2]分析了111例乳腺癌患者E-cadherin 5'CpG岛的甲基化情况,乳腺癌原位灶E-cadherin甲基化率为31%,而远处转移灶的甲基化率为61%。

最近研究发现,YY1在乳腺癌中高表达,参与原癌基因erbb2的激活^[10];YY1可与CXCR4启动子结合^[11];YY1还可以调节VEGF、CXCR4,促进肿瘤血管生成等。我们使用免疫组织化学法和甲基化特异性聚合酶链反应法分别检测42例乳腺癌原发灶以及18例正常乳腺组织中YY1的表达和E-cadherin基因甲基化情况。发现了E-cadherin基因启动子在乳腺癌中的甲基化频率明显高于对照组,两者差异具有统计学意义($P<0.05$);乳腺癌组织中YY1的阳性率52.3%,正常乳腺组织中YY1的阳性率为16.7%,进一步分析,乳腺癌中YY1阳性组E-cadherin甲基化频率显著高于YY1阴性组E-cadherin的甲基化频率(20/22 vs. 4/16, $P<0.05$),YY1的阳性率和E-cadherin甲基化成正比,乳腺癌中异常的DNA甲基化可能是E-cadherin基因沉寂的一个重要机制,YY1可能是E-cadherin基因甲基化的主要原因。

我们在乳腺癌的研究展示了E-cadherin基因异常的甲基化可能是多功能转录调节因子YY1高表达的结果。虽然YY1在肿瘤中的作用是复杂的,还有