

乳腺癌中 GRP BPAG1 和 SFRP2 间相关性的初步研究*

倪春生^{①②} 孙保存^{①②③} 赵秀兰^{①②} 车娜^{①②} 吉茹^① 古强^① 李静^①
池嘉栋^①

摘要 目的:对通过生物、数学、信息学等多学科合作初步提出的 GRP 基因、BPAG1 基因、SFRP2 基因间的乳腺癌转移相关调控通路存在的假设,应用相关生物学方法加以验证。**方法:**以石蜡包埋组织切片,免疫组化二步法染色分别检测 70 例浸润性导管癌的原发灶及其相应淋巴结转移灶中 GRP、BPAG1、SFRP2 的表达情况;体外培养乳腺癌 MCF-7 细胞系并转染 GRP 增强质粒和 GRPshRNA 质粒,通过实时定量 PCR 及 Western-blotting 检测细胞中 BPAG1 和 SFRP2 的变化。**结果:**在人体乳腺癌组织与相应的淋巴结转移灶中,GRP 基因、BPAG1 基因、SFRP2 基因间存在相同的变化趋势;转染 GRP 增强质粒和 GRPshRNA 质粒后,BPAG1 和 SFRP2 基因的相对含量也同时分别增高和下降,转染 GRP 增强质粒后 BPAG1 在蛋白水平的表达量增高。**结论:**GRP 基因、BPAG1 基因、SFRP2 基因间可能存在与乳腺癌转移相关的调控通路。

关键词 GRP BPAG1 SFRP2 乳腺癌 转移

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2012.13.006

GRP BPAG1 and SFRP2 Expression in Breast Cancer: A Pilot Study

Chunsheng NI^{1,2}, Baocun SUN^{1,2,3}, Xiulan ZHAO^{1,2}, Na CHE^{1,2}, Ru JI¹, Qiang GU¹, Jing LI¹, Jiadong CHI¹

Correspondence to: Baocun SUN; E-mail: baocunsun@gmail.com; baocunsun@eyou.com

¹Department of Pathology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

²Department of Pathology, General Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China

³Department of Pathology, Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital, Tianjin 300060, China

This work was supported by grants from the Key Project of the National Natural Science Foundation of China (No. 30830049), the Project of the National Natural Science Foundation of China (No. 81173091), and the Project of the Natural Science Foundation of Tianjin (No. 09JCYBJC10700)

Abstract Objective: To verify the existence of a regulatory pathway for breast cancer metastasis that included the genes GRP, BPAG1, and SFRP2 using biological methods and to propose the pathway based on previous research involving a multidisciplinary approach that involved biology, mathematics, and informatics. **Methods:** Paraffin-embedded tissue sections were obtained to determine the expressions of GRP, BPAG1, and SFRP2 genes in metastatic lesions in the lymph nodes of 70 patients with primary breast cancer using immunohistochemistry. Breast cancer MCF-7 cells were cultured. Real-time polymerase chain reaction and Western blot were used to determine the mRNA and the protein levels, respectively, of both BPAG1 and SFRP2, following the up-regulation or down-regulation of GRP expression caused by the transfection of GRP or GRP-shRNA (small hairpin RNA), respectively, into the MCF-7 cells. **Results:** The expressions of the GRP, BPAG1, and SFRP2 genes were significantly higher in the lymph node tissues than in the corresponding primary breast cancer tissues. The mRNA levels and protein expression of BPAG1 in MCF-7 cells where GRP was either up-regulated or down-regulated were higher and lower, respectively, compared with the untreated controls. Moreover, the mRNA levels of SFRP2 followed a trend similar to that of GRP. **Conclusion:** A possible signal transduction pathway regulated by the GRP, BPAG1, and SFRP2 genes may play an important role in the metastasis of breast cancer.

Keywords GRP; BPAG1; SFRP2; Breast cancer; Metastasis

乳腺癌的发病率在妇女恶性肿瘤中占第一位。GRP(gastrin-releasing peptide)^[1-2]基因是一种有丝分裂原,对肿瘤细胞的增殖和分化起到重要作用。GRP及其受体在神经母细胞瘤、前列腺癌等多种肿瘤转移灶中呈高表达;BPAG1(bullous pemphigoid anti-

gen)^[3-4]是肌动蛋白家族的一员,有研究证实 BPAG1 与乳腺癌的侵袭能力相关;在乳腺癌、间质瘤、肺癌等多种肿瘤组织中,SFRP2(secreted frizzled-related protein 2)^[5-6]基因的下调与肿瘤生成和转移相关。SFRP^[7-8]作为 Wnt 信号通路的负性调控因子对预示肿

作者单位:①天津医科大学病理教研室(天津市300070);②天津医科大学总医院病理科;③天津医科大学附属肿瘤医院病理科

*本文课题受国家自然科学基金重点项目(编号:30830049);国家自然科学基金面上项目(编号:81173091);天津市自然科学基金面上项目(编号:09JCYBJC10700)资助

通信作者:孙保存 baocunsun@eyou.com

瘤生成和转移有重要作用。本课题组前期研究应用数学线性微分方程方法初步构建乳腺癌转移相关基因表达调控网络的线性微分方程模型,而GRP, BPAG1, SFRP2这三个基因在调控网络的数学模型中属于重要的节点基因,与乳腺癌的转移密切相关^[9]。本研究旨在通过对通过生物、数学、信息学等多学科合作初步提出的GRP基因、BPAG1基因、SFRP2基因间的乳腺癌转移相关调控通路存在的假设,应用相关生物学方法加以验证,探索乳腺癌转移中多基因调控关系和相关机制;并应用此调控通路同时对乳腺癌细胞中转移相关的基因进行研究和分析,找出乳腺癌转移密切相关的基因,为抗乳腺癌转移的治疗提供新靶标。

1 材料与方法

1.1 组织标本

选取天津医科大学总医院1997年1月至2004年12月共70例临床资料完整的人乳腺癌及相应转移灶组织标本,利用免疫组织化学染色技术检测原发癌组和转移癌对照组中GRP, BPAG1和SFRP2基因的表达情况。

1.2 免疫组化染色

山羊抗人GRP、BPAG1、SFRP2多克隆抗体购自Santa-Cruz公司, PV9003山羊抗人二步法免疫组化试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。实验步骤:5 μm 连续切片常规脱蜡水化,3%过氧化氢灭活内源性过氧化物酶30 min, 0.01 mol/L枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0)微波热修复20 min, 正常山羊血清室温下封闭20 min, 滴加一抗4℃冰箱过夜, 次日晨恢复至室温, PBS冲洗, 滴加相应的二抗, DAB显色, 苏木素浅染细胞核, 脱水透明, 中性树胶封片。

1.3 细胞系和培养条件

MCF-7乳腺癌细胞系按常规培养模式进行:培养基为Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), 添加10%胎牛血清(FBS), 均购自Invitrogen公司。培养条件为37℃, 5% CO₂恒湿环境。

1.4 细胞转染

1.4.1 表达质粒构建 GRP基因CDS全长通过RT-PCR和全基因合成两种方法获得, 亚克隆入pcDNA3后测序, 与Genebank序列比对确定正确开放阅读框用于后续实验。其中cDNA采用全基因合成的方法。全基因合成酶切位点为:XbaI/BamHI, 由GeneScript公司完成。

1.4.2 shRNA质粒构建 采用pGP载体(GenePharm公司, 上海)构建GRP shRNA质粒, 靶序列为5'-AAGCTGAGCAAGATTGAGACC-3', 设计并合成带有9个碱基loop的发卡状双链DNA, 以BamHI/BbsI

连入pGP, 启动子为U6, neo筛选基因和EGFP报告基因(pGPU6/GFP/Neo-shRNA)。阴性对照质粒选择(pGPU6/GFP/Neo)(GenePharm公司提供)。

1.4.3 质粒提取与细胞转染 以DH5 α 超级感受态细菌扩增穿梭质粒, 常规转化大肠杆菌, 氨苄青霉素抗性筛选单克隆, 质粒大提, 以TritonX114抽提法去除内毒素。

细胞转染采用新型转染试剂:聚乙酰亚胺(percutaneous ethanol injection, PEI, Polyscience公司)。细胞培养至70%~80%接触汇合, 以1:4比例混匀质粒和转染试剂, 加入无血清、无抗生素培养基, 次日更换为条件培养液。24h~48h后进行转染效果评价或其他实验。

1.5 RT-PCR

采用Trizol法提取细胞总RNA, 进行浓度和纯度鉴定后进行逆转录反应(逆转录酶为Tiagen公司Quantum酶), 逆转录步骤参照说明书完成。使用Invitrogen公司的Platinum SYBR Green qPCR Supermix-UDG试剂盒。引物序列如下:GRP:上游引物:AGGGACCGTGCTGACCA; 下游引物:GCTTCTTCCCACCTGATGTACTCT; BPAG1:上游引物:GAACGGGACCTTGATTTTGA; 下游引物:CCTGCTGGATCCAATCATCT; SFRP2:上游引物:TCGGTGTGTGGCTCAAAG; 下游引物:GCTCCCCACCTGTTTCTGT。50 μL 反应体系如下:2(SYBR GREEN MIX 25 μL ; 上下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各2 μL ; cDNA 4 μL ; 补ddH₂O至50 μL ; 反应条件:50℃ 2 min; 95℃ 10 min; 之后95℃ 15 s; 退火温度30 s; 72℃ 30 s, 共35个循环。四种基因的退火温度分别为: β -actin 50℃; GRP 52℃; BPAG1 61℃; SFRP2 52℃。本实验中得到的数值为Ct(threshold cycle)值, 利用公式 $2^{-\Delta\text{Ct}}$ 计算得到的值表示起始模板浓度, 并以此值作为实验观察值进行统计学分析。($\Delta\text{Ct}=\text{Ct1}-\text{Ct2}$; Ct1:样品待测基因的临界循环数, Ct2:样品管家基因的临界循环数。)

1.6 Western blot

细胞转染后48h使用RIPA-SDS裂解液提取细胞总蛋白, 10%SDS-PAGE凝胶电泳, PVDF膜转膜1.5 h, 5%脱脂奶粉封闭室温1 h, 相应一抗(1:200; Santa-Cruz)4℃孵育过夜, 山羊二抗室温1 h。化学发光试剂盒购自Pierce公司, X片曝光并分析灰度值。

1.7 统计学方法

全部数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 利用统计学软件SPSS13.0进行One-Way ANOVA分析, 组间比较用SNK-q检验。

2 结果

2.1 人体样本回顾性实验

在人体乳腺癌组织与相应的淋巴结转移灶中, GRP基因、BPAG1基因、SFRP2基因间存在相同的变

化趋势(表1)。

表1 原发性癌和转移癌中 GRP, BPAG1 和 SFRP2 的表达情况

Table 1 Expression of GRP, BPAG1, and SFRP2 genes in primary and metastasized tumors

组别	GRP		BPAG1		SFRP2	
	低表达	高表达	低表达	高表达	低表达	高表达
原发性癌	39	31	50	20	44	26
转移癌*	19	51	22	48	9	21

*: 与原发癌相比, GRP, BPAG1 和 SFRP2 在转移癌灶中的表达率均较高 ($P < 0.001$; $P = 0.001$; $P < 0.001$)

2.2 体外细胞学实验(一)

转染 GRP 增强质粒和 shRNA 质粒分别有效的上调和下调了 GRP 基因的相对 mRNA 含量。

2.3 体外细胞学实验(二)

上调 GRP 的表达后乳腺癌细胞中 BPAG1 和 SFRP2 的 mRNA 含量也分别增高; 下调 GRP 的表达后, BPAG1 和 SFRP2 的 mRNA 含量也分别降低, 提示 BPAG1 和 SFRP2 具有与 GRP 相同的变化趋势(表2)。

表2 不同组别 GRP, BPAG1 和 SFRP2 基因的相对含量

Table 2 Relative mRNA levels of GRP, BPAG1, and SFRP2 in different treatment groups

组别	GRP 相对含量*	BPAG1 相对含量**	SFRP2 相对含量***
对照组	0.037 3 ± 0.022 0	0.002 9 ± 0.000 7	0.000 5 ± 0.000 1
过表达组	1.546 0 ± 0.323 0	0.018 0 ± 0.007 0	0.005 5 ± 0.001 8
干扰组	0.007 0 ± 0.005 0	0.000 6 ± 0.000 2	0.000 2 ± 0.000 0

*: 与对照组相比, 转染增强质粒(pGPU6/GFP/Neo-GRP)和 shRNA 质粒(pGPU6/GFP/Neo-shRNA)分别有效的上调和下调了 GRP 基因的转录, 差异有统计学意义; **: 过表达 GRP 基因或下调 GRP 基因的表达后, BPAG1 的 mRNA 相对含量也明显增高或降低, 差异有统计学意义; ***: 过表达 GRP 基因或下调 GRP 基因的表达后, SFRP2 的 mRNA 相对含量也明显增高或降低, 差异有统计学意义

2.4 体外细胞学实验(三)

转染 GRP 增强质粒和 shRNA 质粒后, BPAG1 基因在蛋白水平上的含量分别增高和降低, 与上述 RT-PCR 的趋势一致; 转染 GRP shRNA 质粒后 SFRP2 基因在蛋白水平上也明显下降, 但当转染 GRP 增强质粒后, SFRP2 的含量并无明显差异(图1)。

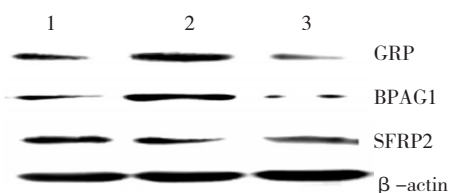


图1 与对照组(1)相比, 转染 GRP 增强质粒(2)和 shRNA 质粒(3)后 BPAG1 和 SFRP2 在蛋白水平的变化情况

Figure 1 Expression of BPAG1 and SFRP2 proteins in tumor cells transfected with GRP (2) or GRP-shRNA (3), compared with the control group (1)

3 讨论

乳腺癌转移的发生是由多基因改变引起多条传导通路异常, 致使细胞恶性转化的结果^[7]。因此, 需要同时对乳腺癌细胞多条基因通路进行研究, 找出转移相关基因, 从而探索出乳腺癌的发生转移机制及防治方法。

有学者通过对表达差异基因的比对和聚类分析, 发现散在的、孤立的、可能与乳腺癌转移相关的基因^[8]。但如果能了解基因功能的本质, 就必须以整体的方式而不是个体的方式来研究基因的行为。数学和信息学的方法被发展用来建立有效的基因间相互联系的模型, 包括线性微分方程模型^[9], 非线性微分方程模型^[10], 布尔网络模型^[11], 贝叶斯判决规则网络^[12]和许多分子水平的猜测组件模型。本课题组在前期研究中收集了部分人乳腺癌及转移灶表达谱基因芯片数据, 通过比较伴有淋巴结转移的乳腺癌组织和其相应淋巴结转移癌组织, 分析筛选了 27 个表达差异基因, 通过应用数学线性微分方程方法初步构建乳腺癌转移相关基因表达调控网络的线性微分方程模型, 并进一步通过 k-means 聚类等方法做进一步分析, 结果显示在聚类图中 GRP 基因 (geneID: NM_002091), BPAG1 基因 (geneID: NM_001723), SFRP2 基因 (geneID: AF311912) 处在同一类中, 表明三者具有基因表达量变化趋势上的相近性和表达量变化在时间上的统一性。结合模型中重要节点基因的生物学意义, 提出 GRP 基因、BPAG1 基因、SFRP2 基因间的乳腺癌转移相关调控通路存在的假设^[13-15]。

本研究实验结果表明, 在人体乳腺癌组织标本中, GRP 基因在乳腺癌淋巴结转移灶的表达水平明显高于其原发灶, 表明 GRP 在乳腺癌转移过程中具有重要作用。与此同时, 通路中的 BPAG1 和 SFRP2 基因在原发癌与转移灶同样具有相同的变化趋势, 表明 GRP 基因、BPAG1 基因、SFRP2 基因之间可能存在调控途径而在乳腺癌转移过程中共同发挥作用。此外, 我们通过对人乳腺癌细胞系 MCF-7 中的 GRP 基因分别进行过表达和下调表达, 结果表明, 无论 mRNA 水平或蛋白水平, BPAG1 基因与 GRP 基因的变化趋势一致; 而 SFRP2 基因仅在 mRNA 水平与 GRP 基因的变化趋势一致, 在蛋白水平, GRP 过表达组的 SFRP2 表达量与对照组并无明显差异。说明 GRP 只能影响 SFRP2 基因的转录, 而对其翻译并无作用。其确切机制还有待于进一步研究。

综上所述, GRP, BPAG1 和 SFRP2 均与人体乳腺癌转移具有一定相关性, 对其调控通路的深入研究可能为乳腺癌治疗提供新靶点。

参考文献

- 1 Li X, Lv Y, Yuan A, et al. Gastrin-releasing peptide promotes the growth of HepG2 cells via EGFR-independent ERK1/2 activation [J]. *Oncol Rep*, 2010, 24(2): 441-448.
- 2 Czepielewski RS, Porto BN, Rizzo LB, et al. Gastrin-releasing peptide receptor (GRPR) mediates chemotaxis in neutrophils [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2012, 109(2): 547-552.
- 3 Steiner-Champliand MF, Schneider Y, Favre B, et al. BPAG1 isoform-b: complex distribution pattern in striated and heart muscle and association with plectin and alpha-actinin [J]. *Exp Cell Res*, 2010, 316(3): 297-313.
- 4 Minoshima S, Amagai M, Kudoh J, et al. Localization of the human gene for 230-kDal bullous pemphigoid autoantigen (BPAG1) to chromosome 6pter-q15 [J]. *Cytogenet Cell Genet*, 1991, 57(1): 30-32.
- 5 Levin JM, Andalousi El, Dainat J, et al. SFRP2 expression in rabbit myogenic progenitor cells and in adult skeletal muscles [J]. *J Muscle Res Cell Moti*, 2001, 22(4): 361-369.
- 6 Lee CS, Buttitta LA., May NR., et al. SHH-N upregulates Sfrp2 to mediate its competitive interaction with WNT1 and WNT4 in the somitic mesoderm [J]. *Development*, 2000 127(1): 109-118.
- 7 Zhang Y, Chen H. Genistein attenuates WNT signaling by up-regulating sFRP2 in a human colon cancer cell line [J]. *Exp Biol Med*, 2011, 236(6): 714-722.
- 8 Deb A, Davis BH, Guo J, et al. SFRP2 regulates cardiomyogenic differentiation by inhibiting a positive transcriptional autofeedback loop of Wnt3a [J]. *Stem Cells*, 2008, 26(1): 35-44.
- 9 Gennadi A, Bocharov, Fathalla A Rihan, Numerical modelling in biosciences using delay differential equations [J]. *Journal of Computational and Applied Mathematics*, 2000, 125(1-2): 183-199.
- 10 Bellomo N, Firmani B, Guerri L. Bifurcation analysis for a nonlinear system of integro-differential equations modelling tumor-immune cells competition [J]. *Applied Mathematics Letters*, 1999, 12(2): 39-44.
- 11 Cheng D, Qi H, Li Z. Model Construction of Boolean Network via Observed Data [J]. *IEEE Transactions on Neural Networks*, 2011, 22(4): 525-536.
- 12 van Gerven MA, Taal BG, Lucas PJ, Dynamic Bayesian networks as prognostic models for clinical patient management [J]. *Journal of Biomedical Informatics*, 2008, 41(4): 515-529.
- 13 孙保存,倪春生,冯玉梅,等.基于线性微分方程模型和k-means聚类研究乳腺癌转移相关基因调控通路 [J]. *中华医学杂志*, 2006, 86(26): 1808-1812.
- 14 董骝焕,袁媛,沈世镒,等.基因芯片表达在乳腺癌转移过程中的聚类分析 [J]. *生物数学学报*, 2007, 22(3): 527-532.
- 15 董骝焕,袁媛,沈世镒,等.使用线性微分方程构建初步的乳腺癌转移相关基因网络模型 [J]. *生物数学学报*, 2007, 22(1): 46-52.

(2012-03-15 收稿)

(2012-04-22 修回)

(本文编辑:贾树明)

关于参加第二十二届世界抗癌大会的通知

由国际抗癌联盟(UICC)主办,加拿大麦吉尔大学、蒙特利尔大学、魁北克省癌症基金会承办的第二十二届世界抗癌大会将于2012年8月27~30日在加拿大蒙特利尔市隆重召开。本届大会主题为“携手世界,共同抗癌(Connecting for Global Impact)”。

世界抗癌大会作为国际抗癌联盟的最主要学术活动,每四年举办一届(自2006年起大会改为每两年举办一届),至今已举办21届。第二十一届世界抗癌大会由中国抗癌协会、中华医学会联合承办,于2010年8月在中国深圳成功召开。会议吸引了世界3000余名代表参会,充分展示了我国肿瘤防治水平,同时更好地学习和借鉴国外先进的抗癌知识和理念,加强国内外交流与合作,为进一步提升我国肿瘤防治的国际学术地位,提高我国医学整体水平起到了积极的推动作用。

为进一步提升我国肿瘤防治的国际学术地位,更好地学习和借鉴国外先进的抗癌知识和理念,中国抗癌协会将组团参加第二十二届世界抗癌大会。会议期间将设置展台,并举办中国专场。

目前第二十二届世界抗癌大会正面向全球征集论文,遴选出的优秀论文将分别被推荐作大会发言、自由发言或壁报交流。同时,大会设旅费资助奖,予以奖励最佳优秀论文获得者。请有意报名参加会议人员自行进行大会投稿和注册交费。详情请见大会网站:www.worldcancercongress.org

——中国抗癌协会