

NRAGE 基因甲基化调控其在乳腺癌细胞中的表达

黄银华, 黄修伦, 温传俊

(南京师范大学生命科学学院分子细胞生物学研究所, 江苏 南京 210046)

[摘要] 目的: 探讨人 NRAGE(Neurotrophin receptor-interacting MAGE homologue) 基因启动子区 CpG 岛甲基化状态及其在乳腺癌细胞中的表达调控. 方法: 用 Real-time PCR 检测 NRAGE 在乳腺癌细胞 MDA-MB-231 和 MCF-7 中的表达; 软件分析 NRAGE 启动子区是否存在 CpG 岛; 脱甲基化药物 5-Aza-CdR 处理 MDA-MB-231 细胞和 MCF-7 细胞, 半定量 RT-PCR 法及 Western blot 法检测用药前后细胞中 NRAGE 的 mRNA 及蛋白表达的变化; MSP 法检测 MDA-MB-231 细胞和 MCF-7 细胞中 NRAGE 基因的甲基化状态. 结果: NRAGE 启动子区存在 CpG 岛; MDA-MB-231 细胞中 NRAGE 启动子区 CpG 岛高甲基化, mRNA 本底表达水平较低, 脱甲基化药物 5-Aza-CdR 处理后 mRNA 及蛋白表达水平明显上升; MCF-7 细胞中 NRAGE 启动子区 CpG 岛未发生甲基化, mRNA 本底表达水平比 MDA-MB-231 细胞高, 5-Aza-CdR 处理后 mRNA 及蛋白表达无明显变化. 结论: NRAGE 基因甲基化可以对其在乳腺癌细胞中的表达进行调控.

[关键词] NRAGE 表达调控, DNA 甲基化

[中图分类号] Q75 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2011)04-0089-07

Methylation of NRAGE Regulates Its Expression in the Breast Cancer Cell Lines

Huang Yinhua, Huang Xiulun, Wen Chuanjun

(Institute of Molecular Cell Biology, School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China)

Abstract: Objective: To detect the methylation status of the 5pCpG island located in the promoter region of hNRAGE gene and its regulation of the expressions of NRAGE in the breast cancer cells. Methods: The Real-time PCR method was used to detect the mRNA levels of NRAGE gene in the breast cancer cell lines of MDA-MB-231 and MCF-7. The existence of CpG island of hNRAGE gene was analysed by the Methyl Primer Express[®] Software(Applied Biosystems). Human breast cancer cell lines of MDA-MB-231 and MCF-7 were treated with 5-Aza-CdR. The expression of NRAGE was then detected by the semi-quantitative polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot analysis. The methylation of NRAGE gene in the two kinds of cell lines was detected by the methylation-specific polymerase chain reaction (MSP). Results: CpG island existed in the promoter region of NRAGE gene. The CpG island of NRAGE was methylated in MDA-MB-231 cells and unmethylated in MCF-7 cells. The expression of mRNA level in MDA-MB-231 cells was higher than in MCF-7 cells. The RT-PCR and Western blot analysis showed that NRAGE expression was increased significantly in MDA-MB-231 cells but remained the same in MCF-7 cells after exposing to the demethylating agent 5-Aza-CdR. Conclusion: The methylation status of NRAGE gene can regulate its expression in the breast cancer cell lines.

Key words: NRAGE gene, gene regulation, DNA methylation

NRAGE(Neurotrophin receptor-interacting MAGE homolog) 基因, 属于人类黑色素瘤相关抗原 MAGE (Melanoma antigen gene) 家族成员, 又可称为 MAGE-D1^[1]. 这个家族的绝大多数基因编码肿瘤特异性抗原, 除了在正常的成人组织睾丸中不表达. NRAGE 的表达模式与 MAGE 家族的其他成员明显不同, 几乎在所有正常组织中广泛表达. NRAGE 在不同的肿瘤组织中表达显著上调或下调也提示它可能具有一定的

收稿日期: 2011-03-03.

基金项目: 国家自然科学基金(30771066).

通讯联系人: 黄银华, 硕士研究生, 研究方向: NRAGE 基因在生长发育及疾病发生中的作用. E-mail: huangyinhua1986@163.com

临床意义. 目前研究发现, NRAGE 与细胞的生长、凋亡、发育等有密切关系.

作为表观遗传学的重要组成部分^[2], DNA 甲基化在基因表达调控、发育调节、基因组印迹等方面发挥重要的作用^[3]. 人类 DNA 甲基化几乎只发生在二核苷酸 CpG 中胞嘧啶的 C5 上. 很多基因在 RNA 转录的启动子调节区域都含有高度密集的二核苷酸, 这些区域被称为 CpG 岛. 抑癌基因启动子区 CpG 岛的异常甲基化导致其失活, 是癌症发生的一个重要机制. 在几乎所有的癌症类型中 DNA 甲基化在癌症的发展过程中都起到了关键的作用^[4].

乳腺癌作为最常见的女性恶性肿瘤, 它的发生、发展与原癌基因的激活和抑癌基因的失活有关, 而抑癌基因的异常甲基化在肿瘤形成中扮演了重要的角色^[5]. Mirza 等^[6]发现多种抑癌基因在浸润性乳腺癌患者癌组织与外周血血清中均存在异常甲基化现象.

本研究是首次报道 NRAGE 基因启动子区存在 CpG 岛, 并采用甲基化特异性 PCR 法(methylation-specific polymerase chain reaction, MSP)^[7]检验转移能力不同的两种乳腺癌细胞中 NRAGE 启动子区 CpG 岛的甲基化状态, 探讨 NRAGE 的甲基化状态对其在乳腺癌细胞中的表达调控.

1 材料与方法

1.1 材料

人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 和 MCF-7 来源于本实验室, RPMI1640、DMEM 高糖培养基及胎牛血清为 GIBCO 产品, 5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-aza-2'-deoxycytidine, 5-Aza-CdR)、亚硫酸氢钠(Sodium Bisulfite) 及氢醌(Hydroquinone) 购自 Sigma Aldrich, 总 RNA 抽提试剂 Trizol 购自 Invitrogen 公司, NRAGE 鼠抗人抗体为 R&D 产品, GAPDH 鼠抗人抗体购自上海康成生物, 二抗羊抗鼠 IgG-AP 购自 Santa Cruz 公司. PrimeSTAR HS DNA 聚合酶、dNTP、RT-PCR 试剂盒、SYBR Premix EX Taq(Perfect Real Time) 试剂均为 TAKARA 公司产品, 基因组 DNA 提取试剂盒 Wizard Genomic DNA Purification Kit 及 Wizard DNA Clean-Up 试剂盒购自 Promega 公司.

1.2 细胞及培养

乳腺癌细胞 MDA-MB-231 和 MCF-7 的培养条件分别为含 10% 胎牛血清的 RPMI1640、DMEM 高糖培养液, 于 37℃、5% 的 CO₂ 培养箱培养.

1.3 NRAGE 基因的 mRNA 表达检测

1.3.1 细胞总 RNA 的提取和 cDNA 的合成

收集 MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞, 采用 Trizol 一步法提取细胞总 RNA, 具体方法参照说明(Invitrogen 公司), 所得 RNA 溶于 0.1% DEPC 水中. Nanodrop 光度计测定 RNA 的浓度及纯度. 取 MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞 RNA 各 1 μg, 参照 PrimeScript RT reagent Kit 试剂盒说明操作合成 cDNA, 所得 cDNA -20℃ 保存备用.

1.3.2 SYBR Green 实时定量 RT-PCR

人 NRAGE、内参 β-actin 基因序列源自 GenBank, 以 Primer 5 软件设计引物, 引物见表 1, 由上海英骏生物技术有限公司合成. 反应体系为 20 μL, 模板 cDNA 在稀释 10 倍后取 1.6 μL, 上下游引物(10 μmol/L) 0.8 μL, 双蒸水定容至 20 μL. 反应条件为: 95℃ 变性 1 min, 95℃ 30 s, 60℃ 1 min, 40 个循环, 循环结束后从 55℃ 开始每 10 s 上升 0.5℃. 取荧光值绘制溶解曲线, 确定扩增产物的特异性. 用 2^{-ΔΔC_t} 定量法分析数据结果.

表 1 实时荧光定量 PCR 的引物

Table 1 Primers for fluorescent quantification PCR			
Genes	Names	Sequence	Product length
NRAGE	Primer-F	5'-GCTCGGTCTCCTTGGT-3'	202 bp
	Primer-R	5'-GTTGCTGTTGGGCACTCG-3'	
β-actin	Primer-F	5'-AGCGAGCATCCCCAAAGTT-3'	285 bp
	Primer-R	5'-GGGCACGAAGGCTCATCATT-3'	

1.4 NRAGE 基因启动子序列分析及 5-Aza-CdR 药物处理

1.4.1 NRAGE 启动子区 CpG 岛分析

使用美国应用生物系统公司(Applied Biosystems) 的软件 Methyl Primer Express[®] Software 去分析

NRAGE 基因的启动子区.按照产品说明书分析启动子区序列,寻找 CpG 岛的主要参数:根据 Takai 和 Jones^[8]提出的 CpG 岛定义,DNA 序列长度超过 500 bp,GC 含量大于 55%,实际观察值/预期值 CpG 频率大于 0.65.

1.4.2 5-Aza-CdR 药物处理

在 MCF-7 细胞传代 24 h 后,将 5-Aza-CdR(终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$)加入培养基,每 24 h 更换新的培养基,分别处理 0 h、24 h、48 h,提取细胞总 RNA 和蛋白.在 MDA-MB-231 细胞传代 24 h 后,将 5-Aza-CdR(终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$)加入培养基,每 24 h 更换新的培养液,分别处理 0 h、24 h、48 h,提取细胞总 RNA 和蛋白,继续处理 72 h、96 h,提取细胞总 RNA.

1.4.3 半定量 RT-PCR 检测 NRAGE 的表达变化

细胞总 RNA 的提取和 cDNA 的合成方法如上,以人的 $\beta\text{-actin}$ 为内参,引物见表 1,两对引物均加入 20 μL 反应体系中,PCR 反应条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,28 个循环,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min,10 $^{\circ}\text{C}$ 保存.RT-PCR 产物经 2% 琼脂糖胶分离.

1.4.4 Western blot 分析各组细胞 NRAGE 蛋白表达情况

提取总蛋白,定量.取 100 mg 总蛋白变性 10 min 后,以聚丙烯酰胺凝胶电泳,蛋白电泳分离后移至 PVDF 膜.50 g/L 脱脂奶粉室温封闭 1 h,PVDF 膜置于 1:200 稀释的 NRAGE 一抗(鼠抗人,R&D 公司)和 1:5 000 稀释的 GAPDH(鼠抗人,上海康成生物)稀释液中,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,再置于 1:1 000 稀释的二抗(牛抗鼠,IgG-AP,Santa Cruz 公司)稀释液中,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h.置于 AP 显色液(AP1023,武汉博士德生物工程有限公司)中,室温孵育 20 min 显色.

1.5 MSP 方法检测 MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞 NRAGE 的甲基化状态

1.5.1 基因组 DNA 的提取

DNA 的提取使用试剂盒 Wizard Genomic DNA Purification Kit(Promega 公司):按产品说明书提供的方法和步骤提取 MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞的基因组 DNA,并溶于 TE 缓冲液中(pH 8.0),Nanodrop 光度计测定 DNA 的浓度及纯度,所得基因组 DNA -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用.

1.5.2 亚硫酸氢钠修饰基因组 DNA

基因组 DNA 的亚硫酸氢钠修饰参照文献方法^[9].

避光配制新鲜的 5M 亚硫酸氢钠/氢醌溶液(pH5.0):称取 1.9 g 的亚硫酸氢钠粉末溶于 2.5 mL 双蒸水中,加入 0.7 mL 2 M 的 NaOH 溶液,再加入 0.5 mL 的 1 M 氢醌(0.11 g 溶于 1 mL 双蒸水),定容至 4 mL.50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴,反复颠倒直至完全溶解.

1) DNA 变性:分别取 2 μg MDA-MB-231、MCF-7 细胞基因组 DNA,加双蒸水至终体积为 18 μL ,95 $^{\circ}\text{C}$ 加热 20 min,立即置于冰上.加入 2 μL 的 3 M NaOH 溶液使 DNA 变性,42 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min.2) 碱基修饰:加入 380 μL 的 5M 亚硫酸氢钠/氢醌溶液,混合均匀.逐滴加入 200 μL 的矿物油覆盖样品防止蒸发.在 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中避光孵育 12 h.3) 脱盐回收:经过碱基修饰的 DNA 用 Wizard DNA Clean-Up System 试剂盒(Promega 公司)脱盐、纯化回收,洗脱于 45 μL 双蒸水中.4) 脱去磺化基团:加入 5 μL 的 3 M NaOH 溶液,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min 脱磺化.加入 75 μL 的 5M 醋酸铵溶液,混合均匀.加入 2.5 倍体积的预冷无水乙醇,-70 $^{\circ}\text{C}$ 沉降 1 h.离心后,70% 乙醇清洗,干燥后重新溶于 20 μL 双蒸水中,-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存.

1.5.3 甲基化特异性 PCR(MSP)

甲基化特异性 PCR 引物,详细序列见表 2.引物 M、U 的设计均用于经亚硫酸氢钠修饰试剂处理后的 DNA 模板扩增,其中 M 引物用于扩增甲基化 DNA,引物 U 用于扩增未甲基化 DNA.反应体系:10 \times PrimeSTAR buffer 2 μL (Mg^{2+} plus) 2.5mM dNTP mixture 2 μL ,10 $\mu\text{mol/L}$ Forward Primer 2 μL ,10 $\mu\text{mol/L}$ Reverse Primer 2 μL ,模板 DNA 2 μL ,PrimeSTAR HS DNA Polymerase(2.5U/ μL) 0.2 μL ,加双蒸水定容至 20 μL .PCR 反应条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,5 个循环,95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,57 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,5 个循环,95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,54 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,5 个循环,95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,51 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,30 个循环,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min,10 $^{\circ}\text{C}$ 保存.MSP 产物经 2% 琼脂糖胶分离.

表 2 NRAGE 基因的甲基化特异性 PCR 引物

Table 2 Primers of NRAGE gene for methylation-specific PCR			
Genes	Names	Sequence	Product length
hNRG-M	Forward	5'-GTTTTTACTGTTTGGCTATGC-3'	162 bp
	Reverse	5'-CGACTCAAAAAATCGAAATTACT-3'	
hNRG-U	Forward	5'-TTGGTTTTTACTGTTTGTGTATGT-3'	168 bp
	Reverse	5'-TCACAACTCAAAAAATCAAAATTACT-3'	

2 结果

2.1 NRAGE 在 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞中 mRNA 的相对定量

文献报道,与非转化的永生性乳腺上皮细胞系相比, NRAGE 在部分乳腺癌细胞(HCC70、HCC1143、HCC1806 等) 的蛋白表达水平显著降低^[10]. 乳腺癌 MDA-MB-231 细胞相对 MCF-7 细胞转移能力更强,恶性程度更高. 我们以 β -actin 基因作为内参,用 SYBR Green 实时定量 RT-PCR 检测 NRAGE 在这两种乳腺癌细胞的表达情况, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 定量法分析数据结果. 图 1 显示, MCF-7 细胞中 NRAGE 的 mRNA 表达量比 MDA-MB-231 细胞高 40%,相似的实验重复了 3 次,具有明显的统计学意义($P < 0.05$). 实验结果表明, NRAGE 在高转移乳腺癌细胞 MDA-MB-231 中的表达量明显低于相对低转移乳腺癌细胞 MCF-7.

2.2 NRAGE 启动子区 CpG 岛分析

如图 2 所示, Methyl Primer Express[®] Software 软件(美国应用生物系统公司 Applied Biosystems) 分析 NRAGE 基因启动子区发现存在 1 个 CpG 岛, DNA 序列长度超过 500 bp, C + G/Total bases 大于 55%, CpG observed/CpG expected 大于 0.65,符合 Takai 和 Jones^[8] 对 CpG 岛的定义.

NRAGE 启动子区 CpG 岛具体序列为:

```
CTACTACTACTTTGTAGTCCAATAGTGTATCCTCTCAGGCCATTCCGTTTCTCAGCAGAGGTCTAACACTTGTGTGCAA
TTAGAGACCCCAACAGAGACCTAAGCATGCTGGACAAAGGGGTGGAGATGCAAGCCGGCCTGACAGGAGGGGCTTGAAT
AGGGGAGGGACGGAATAGAGACGCATTGCGGAAAGGTAGGGGGCGGTGTGTGGGCAAGGGGTGGGACCAAGAGGCACA
GCGCATCTGTGGGGGAGGGGGCGTAGAGGAAGGGGAGGTGCTGTTGTATAGTGTGACCTGGTTGGTGGTGGGGTGGTGTG
TTGGCAAAGGGGGCGGGACCGCTTCCAGCGCACATGCGCATCATGGTCTCCAGGACGAAGCTTTTGTGGGAAAGCAGGC
GGGACTGACTTTGGCTCTTCAGTGTTTGCGCATGCGCGTAACGTCCTGAGGCGGTGGTGGTATATTAGGCGAAGAGGCGG
GGTCGCCCCAAGCTGCCGCGCTGGCATTTTCTCTGGACAAAGGAGAGAGTGGCGCTGTGAGAGCCGAGCCAGCAATCCCG
ATCCTCTGAGTCGTGAAGAAGGAGGCAGCGAGGGGTTGGGGTTGGGGCTGAGGCAAGGTGAGAATTAGCCCCAGACT
GGGCATCTGCCCTTGGTGGCGGGCCCCATTTTTTTTATCCCGATCCCTTACCCCTGGATTCTGAATCCCCCTCCACCCC
CCAAACCCCAATTCAATGCCCTCCCGATCCTTCTGATTCAAAACCCCTGTCCGATCCCTCCCATCGTTGGAATCCTCA
GATTCTTGACCTCGATCTGTACTGTTAGATGATTCTCTGACTCAAAACCTCCATGCAACTTCCAAATGCGAATCCCA
ACCCAAACCGCACCCCGCTCCGAATTCAGAACTCATCTGCTTCCCGATCCCCATTGAAAGCTTCCGCTGTCAGTAGCTTC
TCGGGGTTCAGAACCTCCATCTGGACGCCATTCACTTTTACCGCTCCGATCCGTTCTCTCACATTCACCTTATCCGCC
CGCACAGTCAGACCACAGTCACCCCTCCCAATTAGGTCTTCGTATTTGCCCTCTGTAGTATAACGCCCTGCCCTCTC
CCACAGCCCCAGGCTCCGCTCTTGGCCAGAGGGACAGGAGCCATGGCTCAGAAATGGACTGTGGTGGGGCTCTCTCGGC
TTCCAGGTGAGATCTCCACTCCCCACCCCACTTTCCCAAGCCGACAGTCACCCCTCCCGCGGGGCTCTTTGGTCTCCC
AAACGCCGGATCCGGTTTGACCTATTTAGTGACTAGACTCCGTGGGCTTTTCGAATTCCTATCGTTTATCGAAGGGGG
GAGGGGCGTCTCTTTTCAGCCATCAGTCCCTGCTCAGAGAGAGGGGAGACCTT
```

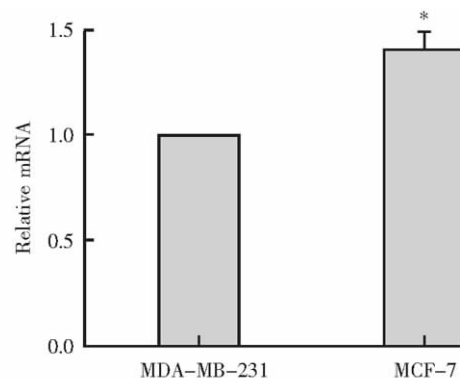


图 1 NRAGE 在 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞中 mRNA 的相对表达量

Fig.1 The relative expressions of NRAGE mRNA in MCF-7 and MDA-MB-231 cells

*, The result was statistically significant. ($P < 0.05$)

NRAGE 启动子区 CpG 岛的具体位置是: -473 bp 至 +957 bp.

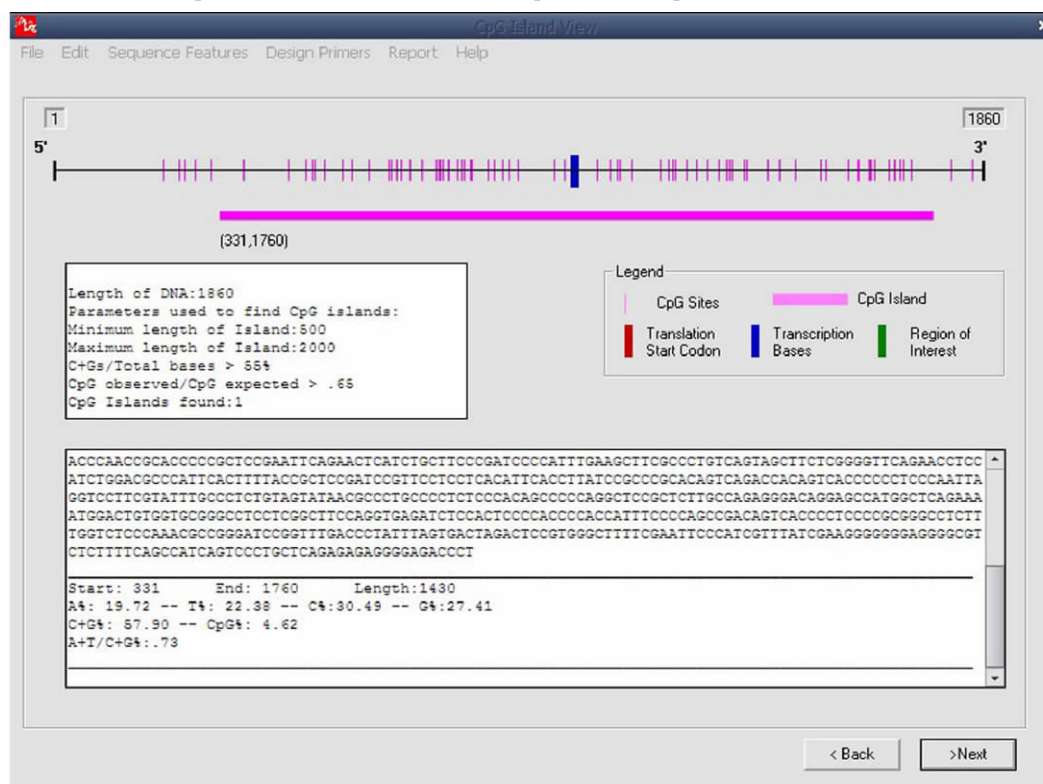


图2 NRAGE 基因 CpG 岛软件分析

Fig.2 Analysis of CpG island of NRAGE gene promoter by Methyl Primer Express® Software(Applied Biosystems)

2.3 5-Aza-CdR 作用后半定量 RT-PCR 检测 NRAGE 的表达变化

DNA 甲基转移酶抑制剂 5-Aza-CdR 能在体内、体外使 DNA 去甲基化,使异常甲基化导致失活的基因重新表达,该药物已在临床上用于白血病的治疗.由图 3 看出,以 β -actin 基因的 mRNA 表达作为内参,经过 10 μ mol/L 5-Aza-CdR 处理 24 h、48 h,与对照组相比,MCF-7 细胞 NRAGE 基因 mRNA 表达量没有明显差异;而 MDA-MB-231 细胞在用药 24 h、48 h、72 h、96 h 后 NRAGE 基因 mRNA 表达量明显上升,96 h 最为显著.

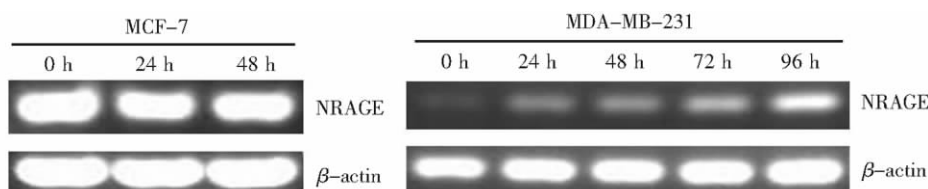


图3 5-Aza-CdR 作用 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞前后 NRAGE 和 β -actin 的 mRNA 表达水平

Fig.3 Detection of NRAGE mRNA expressions in MCF-7 and MDA-MB-231 cells treated with 10 μ M 5-Aza-CdR

2.4 5-Aza-CdR 作用后 Western blot 分析 NRAGE 蛋白表达情况

图 4 显示,以 GAPDH 蛋白表达作为内参,5-Aza-CdR 处理 24 h、48 h 后,与对照组相比,MCF-7 细胞 NRAGE 的蛋白表达无明显变化,而 MDA-MB-231 细胞 NRAGE 的蛋白表达明显增加.5-Aza-CdR 处理前后,MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞 NRAGE 基因的蛋白表达与 mRNA 表达的趋势一致.

2.5 MSP 检测 NRAGE 的甲基化状态

使用重亚硫酸盐处理 DNA,将未甲基化的胞嘧啶(C)脱去氨基转化为尿嘧啶(U),而保持甲基化的胞嘧啶(C)不变.甲基化在经过 PCR 或全基因组等扩增过程后不会被保留.在 PCR 过程中,U 转化为 T,而甲基化的 C 转化为一般的 C. MSP 针对特定 CpG 的甲基化状态设计甲基化引物和非甲基化引物. CpG 位点包含在引物设计中,扩增后通过电泳进行片段分析来提供 yes/no 的结果.

如图5显示,经过亚硫酸氢钠修饰基因组DNA,在用MSP特异扩增之后,MCF-7细胞的非甲基化引物扩增有条带,长度为168 bp,甲基化引物扩增没有条带,说明MCF-7细胞的NRAGE基因启动子区未发生甲基化;MDA-MB-231细胞的非甲基化引物扩增没有条带,甲基化引物扩增有条带,长度为162 bp,说明MDA-MB-231细胞的NRAGE基因启动子区发生甲基化。

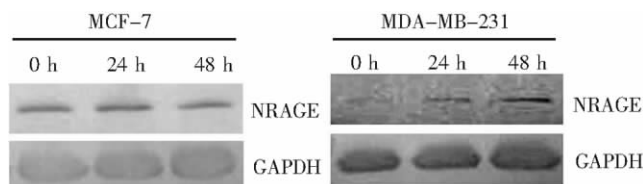


图4 MCF-7和MDA-MB-231细胞在5-Aza-CdR作用前后蛋白表达情况

Fig.4 Detection of NRAGE protein expressions in MCF-7 and MDA-MB-231 cells treated with 10 μ M 5-Aza-CdR

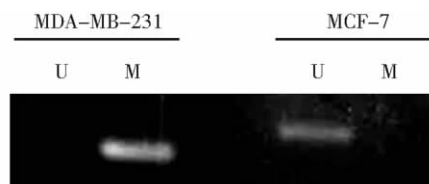


图5 MSP法检测NRAGE基因甲基化状态。U:非甲基化引物扩增 M:甲基化引物扩增

Fig.5 MSP for NRAGE promoter methylation in MCF-7 and MDA-MB-231 cells, U: unmethylated; M: methylated

3 讨论

本实验第一次报道了NRAGE基因的甲基化可以调控其在乳腺癌细胞系中的蛋白表达。NRAGE在高转移乳腺癌细胞MDA-MB-231的表达量明显低于相对低转移乳腺癌细胞MCF-7。我们在探索NRAGE在这两种乳腺癌细胞中的表达调控机制时,发现NRAGE基因启动子区存在CpG岛。CpG岛中CpG二核苷酸的胞嘧啶是人类DNA甲基化的唯一位点。DNA甲基化能够调控基因表达,在癌症的发生发展过程中使抑癌基因失活。脱甲基化药物5-Aza-CdR处理这两种细胞后,MCF-7细胞中NRAGE的mRNA和蛋白表达无明显变化,而MDA-MB-231细胞中NRAGE的mRNA和蛋白表达明显增加。甲基化特异性PCR法检测发现MCF-7细胞中NRAGE未发生甲基化,而在MDA-MB-231细胞中NRAGE高甲基化。综上所述,在高转移乳腺癌细胞系MDA-MB-231中NRAGE的启动子区高甲基化,蛋白表达量很低;在低转移乳腺癌细胞系MCF-7中NRAGE的启动子未发生甲基化,蛋白表达量较高,表明NRAGE基因的甲基化状态调控了其在乳腺癌细胞中的表达。

据Xue等^[11]的研究,NRAGE基因通过破坏E-cadherin/ β -catenin复合物抑制U2OS的细胞粘附作用。Xue等^[12]进一步报道了NRAGE在体内和体外均能抑制黑色素瘤和胰腺癌的转移。2009年Du等^[13]还发现NRAGE能够抑制乳腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力。以上的研究成果和前期的研究工作都可以说明NRAGE基因具有抑制肿瘤转移的能力。本研究显示乳腺癌细胞的转移能力与NRAGE的甲基化相关。因此,在临床上可以通过检测NRAGE的甲基化状态和其他病理特征来判断乳腺癌的恶性程度,并为乳腺癌的诊断和预后提供依据。

本研究结果表明,在高转移乳腺癌细胞中NRAGE基因高甲基化,这是导致该蛋白表达较低的一个原因。但是,NRAGE在这两种乳腺癌细胞中mRNA转录水平差异并没有蛋白水平差异那么明显,同时,脱甲基化药物处理后,MDA-MB-231细胞中NRAGE的蛋白表达虽然增加,但幅度并不大,这两项结果提示了在转录水平的甲基化调控可能是NRAGE基因调控的一个方面,还存在转录后等其他调控方式。另外,确定具体的CpG岛甲基化位点和检测乳腺癌病患组织样本的NRAGE甲基化状态是我们进一步要完成的研究工作。

总之,我们在高转移乳腺癌细胞中发现NRAGE基因表达下调,并且证明了DNA甲基化是NRAGE在乳腺癌细胞中的一种基因表达调控方式。由于NRAGE与肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭密切相关,它的表观遗传学研究也将为肿瘤基因治疗提供新的靶点。

【参考文献】

- [1] Pold M, Zhou J, Chen G L, et al. Identification of a new, unorthodox member of the MAGE gene family [J]. Genomics, 1999, 59(2): 161-167.
- [2] Wu C, Morris J R. Genes, genetics, and epigenetics: a correspondence [J]. Science, 2001, 293(5532): 1103-1105.

- [3] Monk M. Epigenetic programming of differential gene expression in development and evolution [J]. *Dev Genet* ,1995 ,17 (3) : 188-197.
- [4] Jaenisch R ,Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals [R]. *Nat Genet* ,2003 ,33 Suppl: 245-254.
- [5] Munot K ,Bell S M ,Lane S ,et al. Pattern of expression of genes linked to epigenetic silencing in human breast cancer [J]. *Hum Pathol* ,2006 ,37(8) : 989-999.
- [6] Mirza S ,Sharma G ,Prasad C P ,et al. Promoter hypermethylation of TMS1 ,BRCA1 ,ERalpha and PRB in serum and tumor DNA of invasive ductal breast carcinoma patients [J]. *Life Sci* ,2007 ,81(4) : 280-287.
- [7] Herman J G ,Graff J R S ,Myohanen B D ,et al. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands [J]. *Proc Natl Acad Sci USA* ,1996 ,93(18) : 9 821-9 826.
- [8] Takai D ,Jones P A. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA* ,2002 ,99(6) : 3 740-3 745.
- [9] Mills K I ,Ramsahoye B H. DNA methylation protocols [M]. New York: Humana Press ,2002.
- [10] Tian X X ,Rai D ,Li J ,et al. BRCA2 suppresses cell proliferation via stabilizing MAGE-D1 [J]. *Cancer Res* ,2005 ,65 (11) : 4 747-4 753.
- [11] Xue B ,Wen C ,Shi Y ,et al. Human NRAGE disrupts E-cadherin/beta-catenin regulated homotypic cell-cell adhesion [J]. *Biochem Biophys Res Commun* ,2005 ,336(1) : 247-251.
- [12] Chu C S ,Xue B ,Tu C ,et al. NRAGE suppresses metastasis of melanoma and pancreatic cancer in vitro and in vivo [J]. *Cancer Lett* ,2007 ,250(2) : 268-275.
- [13] Du Q ,Zhang Y ,Tian X X ,et al. MAGE-D1 inhibits proliferation ,migration and invasion of human breast cancer cells [J]. *Oncol Rep* ,2009 ,22(3) : 659-665.

[责任编辑:黄 敏]