

侵袭性乳腺癌 ASPH 基因表达与启动子甲基化的临床意义*

黎川¹, 李宏江², 陈 璇¹, 张雪梅¹, 李昌龙^{1△}

1. 四川大学华西基础医学院与法医学院 生物化学与分子生物学教研室(成都 610041);

2. 四川大学华西医院 甲状腺与乳腺外科(成都 610041)

【摘要】 目的 探讨侵袭性癌(IBC)癌组织中天冬氨酰-β-羟化酶基因(ASPH) mRNA 的表达和基因启动子区域甲基化与临床病理参数的关系。方法 收集 91 例 IBC 患者癌组织与配对的癌旁正常组织(MNT),使用逆转录实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)技术检测 ASPH 基因 mRNA 在组织中的表达,使用甲基化特异性 PCR(MSP)法检测 ASPH 基因启动子区 CpG 岛甲基化状态,进一步分别分析其表达与乳腺癌临床病理特征的关系。结果 在 IBC 中 ASPH mRNA 的表达量高于 MNT($P < 0.001$),ASPH mRNA 的表达与乳腺癌中的标志物 E-cadherin 阳性表达有关($r = 0.195, P = 0.041$)。ASPH 基因在癌组织与 MNT 中的启动子甲基化阳性率分别为 47.3%(43/91)和 89.0%(81/91),差异有统计学意义($P < 0.05$)。基因启动子甲基化率与 E-cadherin 和肿瘤大小相关($P < 0.05$)。结论 ASPH 基因的表达及启动子甲基化率可能参与了乳腺癌的发生发展。

【关键词】 侵袭性乳腺癌 甲基化 ASPH

Expression of ASPH Gene in Invasive Breast Cancer and Its Clinical Significance in Promoter Methylation LI

Chuan¹, LI Hong-jiang², CHEN Qu¹, ZHANG Xue-mei¹, LI Chang-long^{1△}. 1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, West China School of Preclinical and Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Department of Thyroid and Breast Surgery, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

△ Corresponding author, E-mail: changlongli@scu.edu.cn

【Abstract】 **Objective** To investigate the expression of mRNA of aspartyl/asparaginyl beta-hydroxylase (ASPH) gene in invasive breast cancer (IBC) and the relationship between methylation of gene promoter and clinicopathological parameters. **Methods** In 91 cases of breast cancer tissues and matched normal tissues (MNT), mRNA expression of the ASPH gene was detected by reverse transcription of real-time fluorescence quantification PCR and the methylation status of CpG island in the ASPH gene promoter region was detected by methylation specific PCR (MSP). And the relationship between the expression and the clinicopathological features of breast cancer was analyzed. **Results** The expression of ASPH gene mRNA in IBC was significantly higher than that in MNT ($P < 0.001$). The fold change of ASPH mRNA expression was related to whether E-cadherin was positive ($r = 0.195, P = 0.041$). The positive rate of methylation of ASPH gene promoter in breast cancer and MNT was 47.3% (43/91) and 89.0% (81/91). The methylation rate of gene promoter was correlated with E-cadherin and tumor size ($P < 0.05$). **Conclusion** The mRNA expression and promoter methylation rate of ASPH gene may play a role in the development and progression of breast cancer.

【Key words】 Invasive breast cancer Methylation ASPH

乳腺癌作为妇女的常见癌症,是世界上癌症相关死亡的第五大原因,每年被诊断出乳腺癌的患者超过 167 万人,死亡超过 522 000 例^[1]。乳腺癌在中国妇女中发生率为 37.86/100 000,其死亡率为 9.21/100 000^[2]。近几十年来,肥胖、运动减少、生殖行为的改变均可能影响乳腺癌的发生和死亡^[3],故研究乳腺癌的早期发生机制显得尤为重要。随着

对 DNA 甲基化研究的深入,已经发现很多基因在乳腺癌中呈现异常甲基化,如 P16、雌激素受体基因(ER)、孕激素受体基因(PR)、乳腺癌 1 号基因(BRCA1)、E-cadherin(CDH1)等^[4-8]。而这些异常的甲基化现象于恶性病变之前发生,这为乳腺癌的早期诊断提供了生物学标记。研究表明,天冬氨酰-β-羟化酶基因(ASPH)在钙稳态中扮演着极其重要的角色。在肝癌、胃癌、胰腺癌组织中 ASPH 基因表达异常明显,可能与肿瘤的发生发展关联密切^[4-6]。但是与乳腺癌早期发生的关系尚不清楚,

* 国家自然科学基金(No.81070452)资助

△ 通信作者, E-mail: changlongli@scu.edu.cn

为此,本研究以侵袭性乳腺癌(invasive breast cancer,IBC)患者作为研究对象,检测 IBC 标本中 ASPH mRNA 的表达及启动子甲基化状态,并与临床病理资料进行相关性分析,研究 ASPH 基因在乳腺癌机制中的作用,为早期诊断提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 组织标本 选取 2014 年 9 月至 2016 年 6 月在四川大学华西医院诊治的 91 例 IBC 患者为研究对象,获取癌组织及其配对的癌旁正常组织(matched normal tissues,MNT)标本^[7],获取的组织标本立即放入液氮中保存。91 例患者均为乳腺癌初次诊断,手术前均未接受过放疗和化疗。胎盘取自四川大学华西第二医院。本研究取得所有患者的知情与同意,且获得医学伦理委员会的批准。

1.1.2 主要试剂 RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒、荧光定量 PCR 试剂盒购自 ROCHE 公司;组织/细胞基因组 DNA 快速提取试剂盒(蛋白酶 K)购自北京博迈德公司(BIOMED);PCR 反应混合液(2×)购自 Thermo 公司;CpG 甲基转移酶购自 New England Biolabs(NEB);EZ DNA 甲基化试剂盒购自 Zymo Research 公司;琼脂糖购自 invitrogen 公司;基因引物由北京诺赛公司合成。

1.2 方法

1.2.1 样品 DNA 与 RNA 的提取 用 DNA 提取试剂盒提取所有标本的 DNA,凝胶电泳测定其纯度和浓度后,置于-80℃冰箱保存。用 RNA 提取试剂盒提取癌组织与癌旁组织的 RNA,凝胶电泳测定其纯度和浓度后,置于-80℃冰箱保存。

1.2.2 cDNA 的合成及荧光定量 PCR(qRT-PCR) 准确吸取 1 μg 总 RNA,使用试剂盒进行逆转录得到 cDNA。采用 qRT-PCR 方法,以 GAPDH 为内参

基因检测 ASPH 基因在癌组织与癌旁组织中的表达,其引物序列及产物大小见表 1。反应体系为 20 μL, Fast Start Essential DNA Green Master 10 μL,上、下游引物(10 μmol/L)各 0.5 μL,cDNA 5 μL 和灭菌超纯水 4 μL。扩增反应条件:95℃预变性 10 min,95℃ 10 s,59℃ 15 s,72℃ 15 s,39 个循环。反应结束后作熔解曲线。熔解条件:95℃ 10 s,65℃ 5 s,后以 0.5℃/s,升至 95℃终止。以 GAPDH 作为内参,2^{-ΔΔCt}法计算 ASPH 基因的相对表达量。

1.2.3 DNA 的甲基化修饰和甲基化特异性 PCR(MSP-PCR) 使用 CpG 甲基转移酶对胎盘 DNA 进行修饰作为甲基化的阳性对照。使用 EZ DNA 甲基化试剂盒对 500 ng 样品 DNA 及使用 CpG 甲基转移酶修饰的胎盘 DNA 进行修饰处理,纯化后放于-20℃备用。用亚硫酸氢盐处理基因组 DNA 的 PCR 程序为 98℃ 10 min,64℃ 2.5 h。设计的引物长度、退火温度及扩增产物大小见表 1。使用 PCR 反应混合物进行扩增,首先 95℃预变性 3 min,95℃变性 30 s,55℃退火 30 s,72℃延伸 1 min,进行 35 个循环后,72℃再次延伸 5 min 后结束反应。以超纯水代替 DNA 样品,其它成分不变作为阴性对照,使用经甲基转移酶孵育过的胎盘 DNA 作为甲基化阳性对照,未经甲基转移酶孵育过的胎盘 DNA 作为非甲基化阳性对照^[4]。MSP 产物用 25 g/L 琼脂糖电泳进行检测。

1.2.4 统计学方法 无序分类资料用构成比或率表示,率的比较采用卡方检验,当样本含量不足时,采用 Fisher 确切概率法。ASPH 基因的相对表达量采用中位数(极值)表示,运用 Wilcoxon 秩和检验法对样本之间的差异表达进行分析,基因表达和相关参数之间的关联性采用 Spearman 相关分析法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 基因引物及扩增产物片段大小

Table 1 Genes primer sequences, annealing temperature and amplified product fragment size

Gene	Sequence (5'-3')	Temperature/°C	Product fragment size/bp
MSP-PCR			
ASPH-M	F:AGGATCGAGATAAAATTGGAAAGTC R:CCGAAAACTAAATAACGACG	55.0	164
ASPH-U	U:AAGGATTGAGATAAAATTGGAAAGTT R:CCAAAACTAAATAACAACACC	53.0	164
qRT-PCR			
ASPH	F:CATGGAGGACACAAGAATGGG R:CCAAACGACAGCTACAGATGT	59.4	111
GAPDH	F:GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT R:GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG	58.0	197

2 结果

2.1 乳腺癌组织中 ASPH mRNA 的表达与临床病理特征的关系

在 MNT 中 ASPH mRNA 表达的平均值为 3.40, 中位数(极值)为 1.90(0~28.90); 在 IBC 中, ASPH mRNA 表达的平均值为 4.20, 中位数(极值)为 3.00(0~197.0)。秩和检验显示 IBC 中 ASPH mRNA 的表达高于 MNT($P < 0.001$)。91

例 IBC 患者癌组织 ASPH mRNA 的表达与临床病理特征的关系见表 2。结果显示, IBC 组织中, E-cadherin 阳性表达与 ASPH mRNA 的表达呈弱正相关($r=0.195, P=0.041$)。ASPH mRNA 表达、年龄、淋巴结转移、ER 表达、PR 表达、CK-56 表达、Ki-67 表达、Her-2 表达、TNM 分期、p63 表达、肿瘤大小、组织学分级等病理参数不相关。

2.2 乳腺癌中 ASPH 基因启动子区域甲基化与临床病理特征的关系

表 2 IBC 患者 ASPH mRNA 表达(倍数变化值)和基因启动子区域甲基化与临床病理特征的关系

Table 2 The association of ASPH mRNA expression (fold change) and promoter region methylation with pathologic parameters in IBC patients

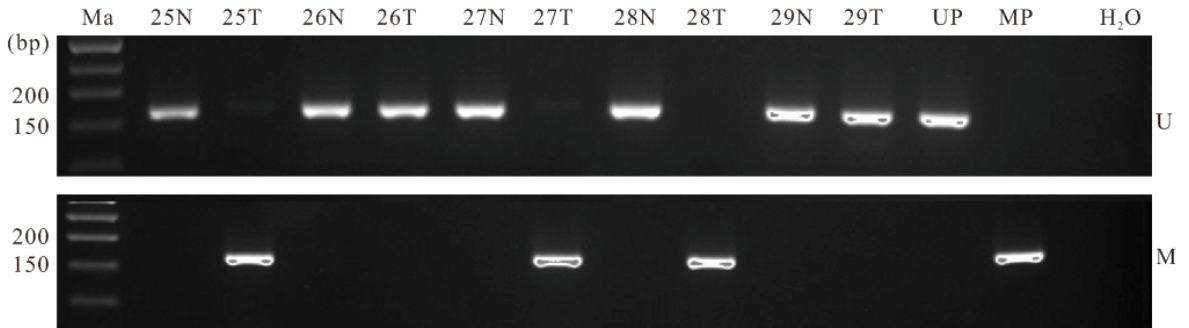
Characteristic	n	ASPH mRNA expression			ASPH methylation		
		Fold change/median (range)	r	P	U/case (%)	M/case (%)	χ^2/P
Age/yr.			-0.053	0.317			0.336/0.562
≤49	41	1.485 (-8.815-16.795)			23 (56.0)	18 (44.0)	
>49	50	1.395 (-5.579-25.634)			25 (50.0)	25 (50.0)	
Tumor diameter/mm			0.012	0.454			3.877/0.049
≤20	43	1.636 (-4.112-16.795)			18 (41.9)	25 (58.1)	
>20	48	1.315 (-8.815-25.634)			30 (62.5)	18 (37.5)	
Histology grade			-0.134	0.119			3.908/0.142
I	11	2.532 (-1.282-16.223)			5 (45.5)	6 (54.5)	
II	30	1.495 (-4.112-5.028)			12 (40.0)	18 (60.0)	
III	50	1.366 (-8.815-25.634)			31 (62.0)	19 (38.0)	
Lymph node metastasis			-0.099	0.176			0.033/0.856
No	52	1.444 (-8.815-21.407)			27 (51.9)	25 (48.1)	
Yes	39	1.347 (-1.705-25.634)			21 (53.8)	18 (46.2)	
ER status			0.075	0.241			2.984/0.084
Negative	27	1.455 (-5.579-21.407)			18 (66.7)	9 (33.3)	
Positive	64	1.404 (-8.815-25.634)			30 (46.9)	34 (53.1)	
PR status			0.054	0.307			0.121/0.727
Negative	26	1.366 (-4.563-11.632)			15 (55.6)	12 (44.4)	
Positive	65	1.505 (-8.815-25.634)			33 (51.6)	31 (48.4)	
CK56 status			-0.113	0.157			1.744/0.187
Negative	73	1.485 (-8.815-21.407)			36 (49.3)	37 (50.7)	
Positive	18	1.268 (-5.579-25.634)			12 (66.7)	6 (33.3)	
Ki-67 status			0.052	0.319			0.018/0.893
≤25%	43	1.636 (-4.112-16.795)			23 (53.5)	20 (46.5)	
>25%	48	1.315 (-8.815-25.634)			25 (52.1)	23 (47.9)	
Her-2 status			0.030	0.390			0.213/0.899
Negative	41	1.385 (-5.579-21.407)			21 (51.2)	20 (48.8)	
Equivocal	29	1.485 (-8.815-25.634)			15 (51.7)	14 (48.3)	
Positive	21	1.591 (-4.112-7.516)			12 (57.1)	9 (42.9)	
TNM stage			-0.096	0.197			0.299/0.960
I	15	1.505 (-8.815-9.318)			7 (46.7)	8 (53.3)	
II	44	1.385 (-4.563-25.634)			24 (54.5)	20 (45.5)	
III-IV	32	1.771 (-5.579-16.795)			17 (53.1)	15 (46.9)	
p63 gene status			-0.027	0.401			1.778/0.174
Negative	84	1.444 (-8.815-21.407)			46 (54.8)	38 (45.2)	
Positive	7	1.347 (-1.705-25.634)			2 (28.6)	5 (71.4)	
E-cadherin			0.195	0.041			6.232/0.013
Negative	40	1.455 (-5.579-21.407)			27 (67.5)	13 (32.5)	
Positive	51	1.404 (-8.815-25.634)			21 (41.2)	30 (58.8)	

ER: Estrogen receptor; PR: Progesterone receptor; Her-2: Human epidermal growth factor receptor; U: Unmethylation; M: Methylation

在 IBC 和 MNT 组织中, ASPH 基因启动子甲基化阳性率分别为 47.3% (43/91) 和 89.0% (81/91), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。IBC 和 MNT 中 ASPH 基因启动子甲基化的代表性样本见附图。所有样本中除了 1 例 62 岁的男性患者, 其余均为女

性。此例男性患者样本 ASPH 基因启动子在 IBC 组织中为甲基化, MNT 组织中为非甲基化。

由表 2 可见, 在 IBC 组中, 相比于 E-cadherin 阳性患者, ASPH 基因启动子甲基化率高于阴性患者 ($P < 0.05$), 并在肿瘤直径 ≤ 20 mm 的患者启动



附图 IBC 和 MNT 中 ASPH 基因启动子甲基化结果样图

Fig Expression of methylation of ASPH gene promoter in IBC and MNT

Ma: Marker; N: Matched normal tissue; T: Breast cancer tissue; UP: Positive control of unmethylation; MP: Positive control of methylation; H₂O: Negative control; U: Unmethylation; M: Methylation

子甲基化率高于 > 20 mm 的患者 ($P < 0.05$)。

3 讨论

乳腺癌是通过一系列肿瘤抑制基因和癌基因的改变从而使肿瘤微环境发生变化, 并激活癌细胞侵袭和转移。乳腺癌的高度浸润性极大地限制了手术的选择和早期阶段的检测。除了传统的手术、放疗之外, 随着科学的新发现, 生物治疗已经逐渐运用于乳腺癌的治疗^[8]。DNA 甲基化水平的改变与生物治疗的机理联系密切。乳腺癌中 DNA 甲基化水平的改变是反映细胞中 DNA 转录状态的重要的表观遗传学特征, 且可能与生活方式、化学品接触和微生物感染相关联。

ASPH 基因最早由 KORIOOTH 等^[9]报道, 位于 8 号染色体 q12, mRNA 全长 2 449 bp, 其 mRNA 的转录可变剪切可以产生 5 种亚型, 分别编码 ASPH、Junctate、Humbug、Junctin 和 Junctin-1 这 5 种蛋白。ASPH 作为一种依赖 α -酮戊二酸的脱氧酶, 在乳腺癌组织中的阳性表达率为 93.7%^[10]。Junctate、Junctin 和 Junctin-1 是钙离子瞬时释放相关的钙结合蛋白, 在蛋白质合成过程中具有修饰蛋白质的功能。Humbug 通过促进细胞内存储钙的释放来增加细胞内钙水平, 参与钙调节。Humbug 蛋白可以识别钙离子, 通过调节钙释放通道活性来调节钙离子转运到细胞质中, 改变癌细胞的运动性、侵袭性, 这可能说明 ASPH 基因与细胞钙稳态密切相关, 钙含量水平常常与多个信号通路联系, 由此改

变乳腺癌的发展进程。肝癌组织中 ASPH 基因和 Humbug 蛋白水平表达明显高于癌旁正常组织, 由此增加了癌细胞的运动性、侵袭性, 导致易复发, 生存率低^[4]。在多种侵袭能力强的胃癌细胞中, ASPH mRNA 往往过表达并促进了胃癌细胞的进化和转移^[5]。在胰腺癌中, ASPH 和生长因子信号关联以此激活 Notch 信号通路, ASPH 的小分子抑制剂能够下调 Notch 信号传导途径, 抑制胰腺癌细胞的生长^[6]。ASPH 在胶质母细胞瘤缺氧区域表达水平高, 在低缺氧区域表达水平低, 抑制 ASPH 的表达后则可以明显降低肿瘤细胞活力及定向运动能力^[11]。

本研究发现在 IBC 中 ASPH mRNA 的表达量高于 MNT, ASPH 基因启动子甲基化阳性率在 IBC 中为 47.3%, 低于 MNT 中的甲基化率。ASPH 基因参与四肢形态的发育和肌肉的组成, 这与早期发现 ASPH 基因在人类多种癌组织中表达增加, 在除了外滋养层细胞和肾上腺细胞以外的正常组织中表达较少相符合。ASPH 基因在肿瘤直径 ≤ 20 mm 的患者中启动子甲基化率高于肿瘤直径 > 20 mm 的患者, 这说明 ASPH 基因甲基化水平可能与肿瘤的生长相关, ASPH 基因在乳腺癌作用可能通过 Notch 信号传导途径, 也可能催化某些蛋白中表皮生长因子样结构域-天冬酰胺残基 β 碳原子的羟基化反应从而促进了癌细胞增殖。ASPH 基因的表达和启动子甲基化率, 均与乳腺癌标志物 E-cadherin 是否阳性相关。文献中 E-

cadherin 蛋白的低表达时患者生存率明显较低,与乳腺癌的组织学分级以及淋巴结转移相关,通常认为与细胞间黏附功能紊乱等分子事件相关联^[12]。我们发现 E-cadherin 蛋白阴性表达中的甲基化率为 32.5% (13/40),阳性表达中的甲基化率为 58.8% (30/51)。E-cadherin 蛋白的表达可能促进 ASPH 基因启动子甲基化。我们将继续研究 ASPH 基因在乳腺癌中的功能与机制以及钙稳态在乳腺癌发生发展中扮演的角色。对于钙离子在乳腺癌起源和进程中作用的深入了解,或许我们能够找到针对乳腺癌预防、早期诊断和治疗的有效方法。

综上所述,ASPH 基因启动子甲基化阳性率与 E-cadherin 阳性和肿瘤大小相关,这可能在乳腺癌的发生发展过程中发挥了不可低估的作用,或许可能作为乳腺癌潜在的分子标记物。

参 考 文 献

- [1] DOU QH, CHEN HN, WANG K, *et al.* Ivermectin induces cytotstatic autophagy by blocking the PAK1/Akt axis in breast cancer. *Cancer Res*, 2016, 76(15):4457-4469.
- [2] 张雪梅, 李宏江, 王 达, 等. 自噬相关基因 *ATG2B*、*ATG4D*、*ATG9B* 在浸润性乳腺癌中的表达及临床意义. *四川大学学报(医学版)*, 2016, 47(2):184-188.
- [3] CHEN W, ZHENG R, BAADA PD, *et al.* Cancer statistics in China 2015. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2):115-132.
- [4] XUE T, SU J, LI H, *et al.* Evaluation of HAAH/humbug quantitative detection in the diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep*, 2015, 33(1):329-337.
- [5] LEE JH. Overexpression of humbug promotes malignant progression in human gastric cancer cells. *Oncol Rep*, 2008, 19(3):795-800.
- [6] DONG X, LIN Q, AIHARA A, *et al.* Aspartate β -hydroxylase expression promotes a malignant pancreatic cellular phenotype. *Oncotarget*, 2015, 6(2):1231-1248.
- [7] 王 达, 刘秋均, 张雪梅, 等. 侵袭性乳腺癌 *GATA5* 基因启动子甲基化的临床意义. *基础医学与临床*, 2014, 34(6):753-756.
- [8] 魏于全, 吴 扬. 乳腺癌生物治疗进展. *中国普外基础与临床*, 2004, 11(1):3-5.
- [9] KORIOTH F, GIEFFERS C, FREY J. Cloning and characterization of the human gene encoding aspartyl beta-hydroxylase. *Gene*, 1994, 150(2):395-399.
- [10] 宋 凯, 薛小平, 王 伟, 等. *ASPH* 在肿瘤细胞和肿瘤组织中的分布及检测. *细胞与分子免疫学*, 2010, 26(2):141-144.
- [11] STURLA LM, TONG M, HEBDA N, *et al.* Aspartate β -hydroxylase (*ASPH*): a potential therapeutic target in human malignant gliomas. *Heliyon*, 2016, 2(12):e00203 [2016-11-21]. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2016.e00203>.
- [12] DEBIES MT, WELCH DR. Genetic basis of human breast cancer metastasis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2001, 6(4):441-451.
- (2017-07-29 收稿, 2017-10-12 修回)
编辑 沈 进
- ~~~~~
- (上接第 33 页)
- protein-1 by hypoxia: characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-1alpha. *Blood*, 1998, 92(7):2260-2268.
- [12] TIAN H, MCKNIGHT SL, RUSSELL DW. Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev*, 1997, 11(1):72-82.
- [13] IVAN M, KONDO K, YANG H, *et al.* HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science*, 2001, 292(5516):464-468.
- [14] MAXWELL PH, WIESENER MS, CHANG GW, *et al.* The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*, 1999, 399(6733):271-275.
- (2017-06-06 收稿, 2017-10-15 修回)
编辑 汤 洁