

淋巴结转移乳腺癌患者中RARβ基因甲基化的预后判断价值



李少英^{1,2}, 李 荣¹, 麦慧芬², 王 维², 吴华聪², 陈 静², 罗荣城¹

RARβ Gene Methylation Could Be Used in Prognosis of Breast Cancer Patients with Lymphatic Metastasis

LI Shaoying^{1,2}, LI Rong¹, MAI Huifen², WANG Wei², WU Huacong², CHEN Jing², LUO Rongcheng¹

1. Cancer Research Center, Nanfang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; 2. Department of Breast Surgery, Bao'an Maternal and Child Health Hospital
Corresponding Author: LUO Rongcheng, E-mail: luorc01@163.com; ZHANG Jun, E-mail: zhangjy@163.com

Abstract: Objective To determine the roles of retinoic acid receptor β(RARβ) gene methylation in the occurrence and development of breast cancer. **Methods** We screened the primary human breast tumors and normal breast tissues for RARβ gene promoter methylation by methylation specific PCR(MSP), and the results were analyzed together with corresponding clinical pathological data. **Results** The frequency of RARβ gene methylation in 192 cases was 26% (50/192), however no RARβ gene methylation was found in normal breast tissues. RARβ methylation were associated with tumor histological type, staging and tumor size ($P<0.05$). Patients with lymph node metastasis, ER (-) and HER2 amplified had more RARβ methylation ($P>0.05$). Patients with RARβ methylation had low survival rate ($P=0.268$), particularly those combined with lymphatic metastasis ($P=0.04$). **Conclusion** RARβ gene promoter methylation may play an important role in the carcinogenesis and development of breast cancer. The relationship with poor differentiation, large tumor size and poor survival rate indicates that RARβ methylation could be used in the prognosis of breast cancer patients with lymphatic metastasis.

Key words: Retinoic acid receptorβ(RARβ); Methylaiton; Breast cancer; Prognosis

摘 要: 目的 探讨视黄醇受体 (RAR) β基因的DNA甲基化在乳腺癌发生发展过程中的意义。**方法** 采用特异性MSP方法, 检测乳腺癌和正常乳腺组织中RARβ基因的DNA甲基化状态, 并结合其临床病理特性和预后进行分析。**结果** 192例乳腺癌组织中RARβ基因甲基化者50例(26%), 而在正常乳腺组织中无一例甲基化, 甲基化率与患者的肿瘤组织学类型、分期和肿瘤大小有相关性($P<0.05$); 淋巴结转移、ER阴性及HER2过度表达的癌组织中RARβ基因甲基化率增高, 但无统计学意义。RARβ基因甲基化的乳腺癌患者的生存率低 ($P=0.268$), 尤其是淋巴结转移的乳腺癌患者 ($P=0.040$)。**结论** RARβ基因甲基化在乳腺癌的发生、发展中起着重要作用, 可能与乳腺癌的侵袭性密切相关, 可作为判断淋巴结转移的乳腺癌预后的分子生物学指标。

关键词: 视黄醇受体β(RARβ); 甲基化; 乳腺癌; 预后

中图分类号: R737.9; R730.7 **文献标识码:** A

0 引言

乳腺癌是当今全球女性发病率位居第一的恶性肿瘤, 约占女性恶性肿瘤的23%^[1]。乳腺癌的发生发展是环境与遗传两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]。近年来大量的研究表明, 视黄醇受体β (retinoic acid receptor β, RARβ) 基因作用于恶性肿瘤细胞系的反转录过程, 抑制肿瘤细胞的增殖; 如果失去了RARβ基因的调节作用就会诱发恶性肿瘤的发生^[3]。因此, RARβ作为乳腺癌抑制因子备受关注, 其甲基化与乳腺癌的发生发展具有重大的关系^[4]。然而, 多数研究存在样本量小或随访资料不全的缺点。本研究拟检测192例乳腺癌组织中RARβ基因甲基化情况, 结合临床病理及随访资料, 探讨RARβ基因甲基化与乳腺癌临床病理参数及预后的关系。

收稿日期: 2013-06-10; 修回日期: 2013-10-30
作者单位: 1. 510515 广州, 广州南方医科大学南方医院肿瘤科; 2. 深圳市宝安区妇幼保健院乳腺科
通信作者: 罗荣城, E-mail: luorc01@163.com; 张军, E-mail: zhangjy@163.com
作者简介: 李少英 (1980-), 女, 硕士, 主治医师, 研究方向为肿瘤学

1 资料与方法

1.1 资料

收集澳大利亚查尔斯爵士盖尔德纳医院手术并病理确诊的未经化疗和放疗的原发性浸润性乳腺癌及相应癌旁组织192例，平均年龄60（18~93）岁，随访时间（2~78）月，平均51月。其中乳腺浸润性导管癌共160例，浸润性小叶癌10例，浸润性髓样癌9例，浸润性黏液癌1例；高-中分化腺癌96例，低分化腺癌61例；有淋巴结转移者71例。39例淋巴结转移情况、35例分化级别、23例组织学分类、12例肿瘤组织学类型、15例肿瘤大小、5例雌激素受体（ER）、孕激素受体（PR）表达情况、77例倍数性及21例HER2表达情况数据缺乏，具体资料见表1。另取40例良性乳腺肿瘤患者的瘤旁正常乳腺组织作为对照组。经西澳大利亚人类研究伦理委员会批准研究。

1.2 方法

1.2.1 DNA亚硫酸氢钠修饰 用亚硫酸氢钠修饰DNA，MSP检测基因甲基化状态^[5-6]。1~2 μg DNA用15 μl水溶解后加入1.7 μl 2M NaOH，混匀。37℃水浴15 min。加入9 μl对苯二酚（1 mg/ml）和156 μl新鲜制备的亚硫酸氢钠溶液（380 mg/ml），混匀；最后加滴50 μl矿物油，55℃水浴16 h。重亚硫酸盐修饰后的DNA采用QIAquick PCR纯化试剂盒进行纯化（Qiagen公司），具体步骤按操作说明进行。经50 μl 10 mM Tris-HCl（pH=8.0）洗涤，和5.5 μl 3M NaOH脱磺基后，混匀室温下孵育15 min。然后再加入6 μl 3M醋酸钠（pH=5.2）、1 μl糖原（20 mg/ml）和180 μl无水冰乙醇进行沉淀。随后将样品离心30 min后，放置在-80℃30 min。小心吸去上清液，让管子在室温下晾干，之后再加入20 ml Milli-Q水溶解。这种亚硫酸氢钠修饰后的DNA随即直接用于PCR扩增。

1.2.2 引物设计 RARβ甲基化上游引物：5'-CGAGCGGGCGTAGGCGGAATATC-3'，下游引物：5'-CAAACAACGAACGCACAAACCGACG-3'，扩增产物为200 bp，退火温度为67℃，MgCl₂浓度为2.5 mM；RARβ非甲基化上游引物：5'-GGTGAGTGGGTGTAGGTGGAATATT-3'，下游引物：5'-AACAAACAACAACACACAAACCAACAT-3'，扩增产物为200 bp，退火温度为67℃，镁离子浓度为2.5 mM。

1.2.3 甲基化特异性PCR检测 Master mix 18 μl，包括：修饰后的DNA 2 μl，1×聚合缓冲液，1×Q液，2.5 mM MgCl₂，上下游引物各0.4 μM，和Taq酶0.1 μl（Qiagen公司）。PCR扩增条件：94℃预变性5 min，热循环94℃变性 30 s，67℃退火45 s，72℃延伸30 s，RARβ基因非甲基化循环35周期，RAR基因甲基化循环38周期后，最后72℃延

伸7 min。用经SSS1酶处理的和未处理的正常人外周血DNA作为甲基化及非甲基化的阳性对照。最后，用2.0%的琼脂糖凝胶电泳分析PCR产物，如甲基化引物扩增有条带则说明该样本发生了甲基化。

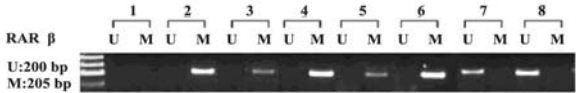
1.3 统计学方法

所有实验数据，均使用SPSS 17.0软件进行统计学处理分析。采用χ²检验分析RARβ基因甲基化和乳腺癌临床病理特点的关联性，Kaplan-Meier分析用来评估累积生存率，而差异使用Log rank检验进行了评估。

2 结果

2.1 RARβ基因的甲基化检测结果

40例正常乳腺组织中无一例检测到RARβ基因甲基化，192例乳腺癌组织中50例有RARβ基因甲基化（26%），差异有统计学意义（*P*<0.05）。运用MSP技术检测乳腺癌RARβ基因甲基化的结果，见图1。



Following bisulfite treatment all samples were firstly tested for DNA quality using primers for unmethylated RARβ. 1: blank control, no DNA;2: positive control;8: negative control;3-7: RARβ gene methylation of sample 1, 2, 3, and 4;U:unmethylation;M:methylation

图1 MSP分析法检测RARβ基因甲基化情况
Figure1 MSP analysis of RARβ gene methylation in primary breast carcinomas

2.2 RARβ基因甲基化与临床病理的关系

χ²检验统计结果显示，RARβ基因甲基化率与患者年龄、PR表达情况、倍数性及TP53突变无明显相关性（*P*>0.05）。淋巴结转移、ER阴性及HER2过度表达的癌组织中RARβ基因甲基化率增高，但无统计学意义。直径>20 mm、Ⅲ期乳腺癌及浸润性非导管型乳腺癌的RARβ基因甲基化率明显增高（*P*<0.05）。在浸润性非导管型乳腺癌类型中RARβ基因甲基化率最高（50%），见表1。RARβ基因甲基化的肿瘤PR平均值（ $\bar{x}\pm s$ ）为（154±262）fmol/μg，高于无RARβ基因甲基化肿瘤PR平均值（91±154）fmol/μg（*P*=0.04）。

2.3 RARβ基因甲基化与预后的关系

在本组乳腺癌患者，一些传统指标，如淋巴结转移（*P*<0.001）、肿瘤大小（*P*<0.001）、组织学分级（*P*<0.001）、TP53突变（*P*=0.002），均与预后显著相关。RARβ基因甲基化与预后亦显示类似的结果，生命曲线分析显示RARβ基因甲基化的乳腺癌患者平均生存65.53（59.21~71.85）月，低于无RARβ基因甲基化患者的69.06（65.84~72.28）月，然而经Log rank检验，两组生存率曲线的差别无统计学意义（χ²=1.23，*P*=0.268），见图2A。

在淋巴结转移的乳腺癌患者中，RARβ基因甲基

表1 RARβ基因甲基化与乳腺癌临床病理的关系[例数(%)]

Table1 Relationship between RARβgene promoter methylation and clinicopathological features of breast cancer [n(%)]

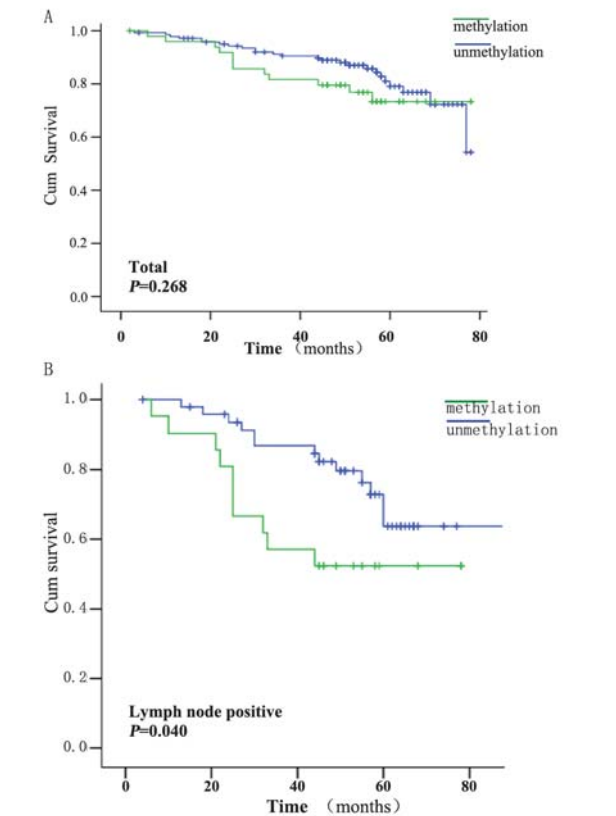
Features	n	RARβ gene methylation(%)	χ ²	P
Total	192	50 (26)		
Age(year)			0.69	0.407
< 59	94	27 (29)		
≥59	98	23 (23)		
Lymphatic metastasis			2.99	0.224
Negative	83	23 (28)		
Positive	71	21 (30)		
Stage			4.42	0.036
I / II stage	96	20 (21)		
III stage	61	22 (37)		
Histological type			6.66	0.010
Non-ductal	20	10 (50)		
Ductal	160	37 (23)		
Tumor size(mm)			6.33	0.012
≥20	96	17 (18)		
>20	82	28 (34)		
ER status			1.41	0.235
Negative	54	17 (32)		
Positive	134	31 (23)		
PR status			0.60	0.742
Negative	68	18 (27)		
Positive	120	30 (25)		
Ploidy			0.41	0.520
Diploid	60	14 (24)		
Aneuploid	56	16 (29)		
HER2 gene status			1.35	0.246
Normal	142	33 (23)		
Amplified	30	10 (33)		
TP53 gene status			0.02	0.892
Normal	164	43 (26)		
Mutant	28	7 (25)		

Notes: ER: estrogen receptor; PR: progesterin receptor

化的患者平均生存52.43（40.56~64.30）月，明显低于RARβ基因无甲基化的患者的73.13（65.12~81.14）月，经Log rank检验，两组生存率曲线的差别有统计学意义（χ²=4.230，P=0.040），见图2B。另外，在肿瘤直径>20 mm（χ²=3.353，P=0.067）和ER受体阳性（χ²=3.149，P=0.076）的乳腺癌，RARβ基因甲基化的患者均显示较差的预后结果，但无统计学意义。

3 讨论

本研究的目的是为了检测RARβ基因的甲基化是否与乳腺癌的某些特异性表型包括预后相关联。在大肠癌首次提出这种DNA甲基化特异性表型的发现，被称为CpG岛甲基化表型（CIMP+）的一类大肠癌^[7]。那么，在乳腺癌是否也存在这种表型呢？本实验用于检测RARβ基因甲基化的乳腺癌标本的临床病理资料完整，一些传统的预后指标，如淋巴结转移、组织学分级、肿瘤大小和TP53突变，均具有统计学意义^[8]。实验标本为新鲜冰冻的



A:overall group; B: breast cancer patients with lymphatic metastasis
图2 乳腺癌患者RARβ基因有无甲基化Kaplan–Meier分析生存率曲线图
Figure2 Kaplan–Meier survival analysis for breast cancer patients with and without RARβ methylation

乳腺癌组织，应用甲基化特异性PCR检测甲基化率可达99.4%（1 343/1 351）。据文献报道，乳腺癌的单个基因的甲基化率变化很大，可能与DNA的质量、PCR循环周期和扩增条件有关。而且在不同基因间甲基化特异性PCR的敏感度因PCR效率及其产物的大小不同存在差异。因此，在目前研究中，我们对每个肿瘤DNA标本采用相同的实验条件，以达到不同标本之间相对甲基化率的有效可比性。在一项RARβ基因功能性研究的实验中证实^[9]，RARβ基因具有与TP53基因一样抑制肿瘤生长的作用。近年来，一些研究阐述了在乳腺恶性组织细胞中RARβ基因mRNA的表达水平下降，而在正常乳腺上皮细胞RARβ基因有表达，这些发现都表明了RARβ基因mRNA表达的缺失可能是乳腺癌发生的一个重要因素，并且是早期阶段^[10]。RARβ基因位于3p24上，该区域存在着乳腺癌杂合性丢失（loss of heterozygosity, LOH）的高概率（45%）^[11]。但是，LOH不能作为一个独立的因素抑制RARβ基因的表达，因此，通过其进一步的研究证明，RARβ启动子5'端区域的甲基化与乳腺癌发生具有重大的关系^[12]。本实验结果表明，乳腺癌组织及其癌旁组织RARβ基因甲基化检出率差异有统计学意义，且乳

腺癌中RARβ基因甲基化与肿瘤分期($P=0.010$)、肿瘤大小($P=0.012$)呈正相关。这些发现把DNA甲基化和乳腺癌的组织学特性关联起来,因而显得重要。以往的研究结果亦有报道,基因CpG岛甲基化与恶性程度高的乳腺癌相关,如ER、E-cadherin、p16等基因^[13-14]。国外已有几个研究组报道了CIMP+型大肠癌与恶性程度的相关性^[15-17],这表明这种DNA甲基化特异性表型的出现可能广泛存在于人类癌症中。因此,我们认为RARβ基因甲基化与恶性程度高的乳腺癌相关。

本研究还发现在浸润性非导管型乳腺癌中RARβ基因甲基化率最高(50%),而Fackler等^[18]则认为RARβ基因甲基化对导管型乳腺癌和小叶型乳腺癌同样重要。由于标本量小,本研究无法确认RARβ基因甲基化与乳腺癌的某种组织分型是否存在CIMP+表型。淋巴结转移、ER阴性、PR阴性及HER2过度表达的癌组织中RARβ基因甲基化率增高,但无统计学意义。所有这些发现均需要更大的实验来研究,并且进一步明确乳腺癌的表型特征是否与甲基化所致的基因失表达或其他机制相关联。

鉴于RARβ基因甲基化与晚分期及直径>20 mm乳腺癌的相关性,即RARβ基因甲基化与恶性程度高的乳腺癌相关,可以推测此基因的甲基化提示预后差。而且在淋巴结转移的肿瘤中,RARβ基因甲基化的乳腺癌患者生存率显著下降($P=0.040$)。既往有研究报道CDH1和CCND2基因甲基化提示乳腺癌患者预后差^[19-20],Widschwendter等^[21]亦发现ER基因甲基化具有相似的预后价值,而且与内分泌治疗和化疗相关。因此与以往的研究结果一致,我们认同基因甲基化对乳腺癌的预后具有重要作用,虽然证据较薄弱,关于乳腺癌DNA甲基化特异性表型的存在与否需要更多的病例和其他基因加入研究来进一步明确。

总之,本研究证实,RARβ基因甲基化仅存在于乳腺癌组织中,正常乳腺组织中无一例。乳腺癌中RARβ基因甲基化与肿瘤分期和肿瘤大小的相关性,表明RARβ基因甲基化在判定肿瘤预后起重要作用。尤其是淋巴结转移的乳腺癌,RARβ基因甲基化提示预后差。RARβ基因甲基化的研究对于进一步明确乳腺癌的发病机制、早期诊断和预后,以及乳腺癌DNA甲基化特异性表型的存在与否具有重大的理论和临床意义。

参考文献:

[1] Anothaisintawee T, Teerawattananon Y, Wiratkapun C, *et al*. Risk prediction models of breast cancer: a systematic review of model performances[J]. Breast Cancer Res Treat,2012,133 (1):1-10.

[2] Zhu W, Qin W, Hewett JE, *et al*. Quantitative evaluation of DNA hypermethylation in malignant and benign breast tissue and fluids[J]. Int J Cancer,2010, 126(2):474-82.

[3] Cho KW, Kwon HJ, Shin JO, *et al*. Retinoic acid signaling and the initiation of mammary gland development[J]. Dev Biol,2012, 365

(1):259-66.

[4] Salazar MD, Ratnam M, Patki M, *et al*. During hormone depletion or tamoxifen treatment of breast cancer cells the estrogen receptor apoprotein supports cell cycling through the retinoic acid receptor alpha1 apoprotein[J]. Breast Cancer Res,2011,13(1):R18.

[5] Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, *et al*. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands[J]. Proc Natl Acad Sci U S A,1996,93 (18): 9821-6.

[6] Paulin R, Grigg GW, Davey MW, *et al*. Urea improves efficiency of bisulphate-mediated sequencing of 5'-methylcytosine in genomic DNA[J]. Nucleic Acids Res,1998, 26 (21): 5009-10.

[7] Zlobec I, Bihl M, Foerster A, *et al*. Comprehensive analysis of CpG island methylator phenotype (CIMP)-high, -low, and -negative colorectal cancers based on protein marker expression and molecular features[J]. J Pathol,2011, 225(3):336-43.

[8] Soong R, Iacopetta BJ, Harvey JM, *et al*. Detection of p53 gene mutation by rapid PCR-SSCP and its association with poor survival in breast cancer[J]. Int J Cancer,1997, 74 (6): 642-7.

[9] Lee X, Si SP, Tsou HC, *et al*. Cellular aging and transformation suppression: a role for retinoic acid receptor beta 2[J]. Exp Cell Res, 1995, 218 (1):296-304.

[10] Sun J, Xu X, Liu J, *et al*. Epigenetic regulation of retinoic acid receptorβ2 gene in the initiation of breast cancer[J]. Med Oncol, 2011, 28(4):1311-8.

[11] Lewis CM, Cler LR, Bu DW, *et al*. Promoter hypermethylation in benign breast epithelium in relation to predicted breast cancer risk[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(1):166-72.

[12] Yang Q, Mori I, Shan L, *et al*. Biallelic inactivation of retinoic acid receptor beta2 gene by epigenetic change in breast cancer[J]. Am J Pathol, 2001,158(1):299-303.

[13] Yan PS, Perry MR, Laux DE, *et al*. CpG island arrays: an application toward deciphering epigenetic signatures of breast cancer[J]. Clin Cancer Res, 2000, 6(4): 1432-8.

[14] Nass SJ, Herman JG, Gabrielson E, *et al*. Aberrant methylation of the estrogen receptor and E-cadherin 5'CpG islands increases with malignant progression in human breast cancer[J]. Cancer Res, 2000 ,60 (16): 4346-8.

[15] Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, *et al*. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, 96 (15): 8681-6.

[16] Hawkins N, Norrie M, Cheong K, *et al*. CpG island methylation in sporadic colorectal cancers and its relationship to microsatellite instability[J]. Gastroenterology, 2002, 122 (5): 1376-87.

[17] van Rijnsoever M, Grieu F, Elsaleh H, *et al*. Characterisation of colorectal cancers showing hypermethylation at multiple CpG islands[J]. Gut, 2002, 51 (6):797-802.

[18] Fackler MJ, McVeigh M, Evron E, *et al*. DNA methylation of RASSF1A, HIN-1, RAR-beta, Cyclin D2 and Twist in in situ and invasive lobular breast carcinoma[J]. Int J Cancer, 2003, 107(6): 970-5.

[19] Yang X, Yan L, Davidson NE. DNA methylation in breast cancer[J]. Endocr Relat Cancer, 2001, 8 (2): 115-27.

[20] Mehrotra J, Ganpat MM, Kanaan Y, *et al*. Estrogen receptor/ progesterone receptor-negative breast cancers of young African-American women have a higher frequency of methylation of multiple genes than those of Caucasian women[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10 (6): 2052-7.

[21] Widschwendter M, Siegmund KD, Müller HM, *et al*. Association of breast cancer DNA methylation profiles with hormone receptor status and response to tamoxifen[J]. Cancer Res,2004,64 (11):3807-13.