

• 论 著 •

DNA 甲基转移酶 2 在乳腺癌患者中的表达及意义*

潘小平¹,洪晓绿²,孟 萍³,裴德翠⁴,程延东⁵,姚明媚¹,王 蓉¹

(花都区人民医院:1. 检验科;2. 感染科;3. 中心实验室;4. 输血科;5. 乳腺外科,广东广州 510800)

摘 要:目的 检测 DNA 甲基转移酶 2(DNMT 2)基因在乳腺癌患者外周血中的表达情况,并分析其临床意义。方法 采用实时荧光定量 PCR 检测 60 例乳腺癌患者(实验组)及 50 例体检健康女性(对照组)外周血中 DNMT 2 的表达情况,蛋白质印迹法(Western blot)检测两组间 DNMT 2 蛋白表达,并分析 DNMT 2 与各临床特征之间的关系。结果 实验组 DNMT 2 mRNA 在外周血中的表达(5.785 ± 3.956)与对照组(4.739 ± 2.359)比较,差异无统计学意义($t=1.642, P=0.103$),DNMT 2 蛋白表达在两组间差异亦无统计学意义($P>0.05$)。结论 DNMT 2 基因和蛋白在乳腺癌患者外周血中表达不明显。

关键词:DNA 甲基转移酶 2; 乳腺癌

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2020.03.007 **中图法分类号:**R737.9

文章编号:1673-4130(2020)03-0282-04 **文献标识码:**A

Expression and significance of DNA methyltransferase 2 in breast cancer patients*

PAN Xiaoping¹, HONG Xiaolv², MENG Ping³, PEI Decui⁴,
CHENG Yandong⁵, YAO Mingmei¹, WANG Rong¹

(1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Infection; 3. Department of Central Laboratory; 4. Department of Blood Transfusion; 5. Department of Breast Surgery, Huadu District People's Hospital, Guangzhou, Guangdong 510800, China)

Abstract: **Objective** To detect the expression of DNA methyltransferase 2 (DNMT2) gene in the peripheral blood of breast cancer patients and analyze its clinical significance. **Methods** The expression of DNMT 2 in the peripheral blood of 60 breast cancer patients (experimental group) and 50 healthy women (control group) was detected by real-time fluorescent quantitative PCR, and the expression of DNMT 2 protein was detected by Western blot, and the relationship between DNMT 2 and clinical features was analyzed. **Results** The expression of DNMT 2 mRNA in peripheral blood was not significantly different between the experimental group (5.785 ± 3.956) and the control group ($4.739 \pm 2.359, t=1.642, P=0.103$), and there was no significant difference in the expression of DNMT 2 protein between the two groups. **Conclusion** The expression of DNMT 2 gene and protein in the peripheral blood of breast cancer patients is not obvious.

Key words: DNA methyltransferase 2; breast cancer

在课题组以前的研究中证实:内皮素-3 基因在乳腺癌患者中表达显著减少^[1],原因是该基因 DNA 启动子发生了甲基化^[2],而 DNA 甲基化过程是由 DNA 甲基转移酶(DNMT)催化完成。目前研究发现的 DNMT 家族(DNMTs)成员至少包括 DNMT 1、DNMT 2、DNMT 3A、DNMT 3B 和 DNMT 3L,本文就 DNMT 2 在乳腺癌患者中的表达及意义进行研究,报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2018 年 4—11 月在本院接受

手术的乳腺癌患者 60 例作为实验组,年龄 36~85 岁,平均(54.3 ± 12.0)岁,其中>50 岁患者 36 例,≤50 岁患者 24 例,另选同期体检健康女性 50 例作为对照组,年龄 23~74 岁,平均(43.8 ± 14.0)岁,两组年龄间差异无统计学意义($t=1.542, P=0.726$)。病理 TNM 分期按照世界卫生组织 2005 乳腺癌分类标准^[3],肿瘤大小:T1 15 例,T2 17 例,T3 17 例,T4 11 例;淋巴结转移:N0 19 例,N1 18 例,N2 15 例,N3 8 例;远处转移:无远处转移(M0)47 例,远处转移(M1)

* 基金项目:广州市卫生计生科技一般引导项目(20181A011111)。
作者简介:潘小平,男,副主任技师,主要从事临床分子诊断方面的研究。
本文引用格式:潘小平,洪晓绿,孟萍,等. DNA 甲基转移酶 2 在乳腺癌患者中的表达及意义[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(3): 282-284.

13 例。其他临床病理特征,ER 受体:阴性 28 例,阳性 32 例;PR 受体:阴性 28 例,阳性 32 例;组织学等级:G1 10 例,G2 25 例,G3 25 例。采集标本前均经患者知情同意并签署知情同意书,所有测试者清晨空腹采集外周血 2 mL 贮存于乙二胺四乙酸二钠抗凝管中,临床资料完善且术前均未经任何治疗。

1.2 仪器及试剂 荧光定量 PCR 仪、Mini 型蛋白电泳系统购自美国 Bio-Rad 公司;Trizol 购自美国 Invitrogen 公司;DNase I 购自美国 Promega 公司,实时荧光定量 PCR 试剂盒、逆转录试剂盒均购自日本 Takara 公司。

1.3 方法

1.3.1 外周血单个核细胞提取 取外周血 1.5 mL 置于离心管中,加入等体积平衡盐溶液,混合均匀。取 1.5 mL 淋巴细胞分离液置于另一离心管中,将稀释的血液沿管壁缓慢加入离心管中,2 000 r/min 离心 20 min,吸取上、中层乳白色浑浊液体置于小型离心管中,2 000 r/min 离心 5 min 去血浆,加 1 mL 平衡盐溶液,2 000 r/min 离心 5 min,弃上清,提纯单个核细胞。

1.3.2 实时荧光定量 PCR 实验组和对照组已分离提纯的单个核细胞,采 Trizol 试剂盒分别提取其总 RNA,使用 DNase I 试剂提纯;紫外分光光度计测定 A_{260}/A_{280} 值;琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像系统观察总 RNA 条带;采用逆转录试剂盒获得 cDNA,−80 °C 保存备用;DNMT 2 上游引物:5'-CCC ACT TGT AGA AGG TCC GTG-3',下游引物:5'-TTC TCA ACC TGC ACA TCC TCT G-3',以 GAPDH 作为对照,上游引物:5'-GAT TCC ACC CAT GGC AAA TT-3',下游引物:5'-GAT TCC ACC CAT GGC AAA TT-3',反应条件:95 °C 3 min,95 °C 5 s,60 °C 30 s,共 40 循环。设定溶解曲线程序:95 °C 15 s,60 °C 30 s,95 °C 15 s,反应结束仪器自动生成溶解曲线图。以倍比稀释的 cDNA 作为模板,检测循环阈值(Ct)可采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算其相对表达量,其中 $\Delta Ct = Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{内参基因}}$, $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct - \Delta Ct_{\text{对照组最大值}}$,每个样品重复 3 次,取平均 Ct 值。

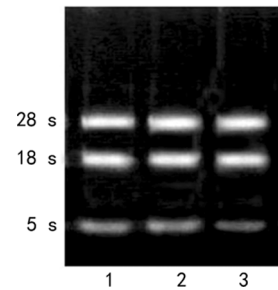
1.3.3 蛋白质印迹法(Western blot) 随机选取实验组和对照组外周血标本各 4 份,1 500 r/min 离心 15 min,分离血浆,按照蛋白提取试剂盒说明书提取血浆总蛋白,根据 BCA 蛋白定量试剂盒对总蛋白进行定量分析,取 10~100 μg 蛋白进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(浓缩胶:60~100 V,30 min,分离胶:100~200 V,60 min),切下含有目的蛋白的胶条转至聚偏二氟乙烯膜(300 mA,60 min),室温封闭 1~2 h, TBST 洗膜后加 DNMT 2 IgG 抗体(1:2 000);内参

加入 GAPDH 抗体(1:2 000),4 °C 孵育过夜后,分别加入二抗(1:4 000)室温孵育 2 h,显色 1~5 min 后洗片,显影。为验证实验过程的完整性以及抗体的有效性,本实验选取兔肌肉组织,捣碎后加入裂解液,充分裂解后,12 000 r/min 离心 3~5 min,取上清,按照上述相同的步骤,在相同的条件下检测 DNMT 2 和 GAPDH。

1.4 统计学处理 所有数据均经正态性检验和方差齐性检验,相对表达量采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较,方差齐时采用 *t* 检验,方差不齐,采用近似 *t* 检验;多组间比较,方差齐时采用单向方差分析,方差不齐采用 LSD 多重比较,所有数据采用 SPSS 13.0 进行统计分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RNA 纯度及抽提质量检测 提纯的 RNA A_{260}/A_{280} 的比值均在 1.8~2.0,证明提取的 RNA 无污染,纯度较高。3 份随机抽的样本,凝胶成像系统观察总 RNA 的 5 s rRNA,18 s rRNA 和 28 s rRNA 条带清晰可见,证明总 RNA 抽提比较完整,见图 1。

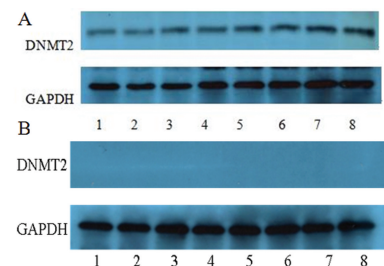


注:1 表示 17 号标本;2 表示 24 号标本;3 表示 57 号标本。

图 1 3 份标本总 RNA 的 5 s rRNA,18 s rRNA 和 28 s rRNA 电泳图

2.2 DNMT 2 mRNA 在两组间的表达比较 实验组 DNMT 2 mRNA 相对表达量(5.785 ± 3.956)和对照组(4.739 ± 2.359)比较,差异无统计学意义($t = 1.642, P = 0.103$)。

2.3 DNMT 2 蛋白在两组间的比较 从检测结果看,实验过程完整,无污染,抗体有效,DNMT 2 蛋白在实验组和对照组中均无表达,见图 2。



注:A 表示兔肌肉组织中 DNMT 2 和 GAPDH 蛋白的表达;B 表示两组随机挑选的标本 DNMT 2 和 GAPDH 蛋白的表达;1~4 号位置为实验组随机挑选标本,5~8 号位置为对照组随机挑选标本。

图 2 免疫印迹试验验证 DNMT 2 蛋白

3 讨 论

乳腺癌是常见的恶性肿瘤,发病率逐年递增^[4],严重危害女性身心健康。乳腺癌的发生与多种因素有关,某些基因的 DNA 甲基化改变,可能是乳腺癌易感因素之一,包括 NR3C1、PITX2、RB1 基因等^[5-8],在本课题组以前的研究中也证实了内皮素-3 基因 DNA 的甲基化与乳腺癌的发生、发展密切相关^[2]。

DNA 甲基化在细胞增殖、分化、肿瘤基因及抑癌基因表达调控等方面起重要作用,与肿瘤的进展密切相关,如肺癌、肠癌、膀胱癌、乳腺癌等^[9-12]。DNA 甲基化过程是由 DNMT 催化 S-腺苷蛋氨酸上的甲基转移至胞嘧啶含氮杂环 5' 位上的修饰反应,是负责将甲基基团添加至 CpG 二核苷酸的酶^[13],该酶与肿瘤的发生密切相关^[14]。

DNMT 2 存在于胞质和核内,其结合于核基质处,在有丝分裂前期进入细胞核内,呈现类纺锤体式定位,并在细胞分裂过程中与 DNA 结合^[15],它在发育中的胚胎内脏、肌肉组织、卵巢囊肿以及增殖中的睾丸细胞等组织中广泛表达^[16]。

DNMT 2 在乳腺癌中的研究国内外少见报道,而课题组研究了 60 例乳腺癌患者外周血中 DNMT 2 mRNA 的表达情况,结果表明,实验组与对照组间差异无统计学意义($t=1.642, P=0.103$),Western blot 在两组间均未检测到 DNMT 2 蛋白的表达,这些结果表明 DNMT 2 基因和蛋白在乳腺癌患者外周血中的表达差异无统计学意义,原因可能是 DNMT 2 仅具有微弱的酶活性,被认为是一种 RNA 甲基转移酶^[17],其功能主要与转运 RNA、非编码 RNA 以及 miRNA 等相关^[18-20]。因此,它在乳腺癌患者外周血中表达不明显,然而它是否具有 DNA 甲基化功能,有待更加深入的研究。另外, DNMT 2 基因和蛋白在乳腺癌组织中的表达是否有差异,亟待本课题组下一步研究。

4 结 论

DNMT 2 在乳腺癌中的研究报道较少,本研究明确了 DNMT 2 基因和蛋白在乳腺癌患者外周血中表达不明显,因此, DNMT 2 基因和蛋白对乳腺癌的诊断、病情监测等临床指导意义不大。

参考文献

- [1] 潘小平,洪晓绿. 内皮素-3 基因在乳腺癌患者中的表达及意义[J]. 广东医学,2015,36(2):211-214.
- [2] 潘小平,洪晓绿,吴锋,等. 内皮素-3 基因表达和启动子甲基化与乳腺癌的相关性研究[J]. 微循环学杂志,2014,24(4):35-39.
- [3] VAJPEYI R. WHO classification of tumours: pathology and genetics of tumours of the breast and female genital

- organs[J]. J Clinial Patho,2005,58(6):670-672.
- [4] SHAH R,ROSSO K,NATHANSON S D. Pathogenesis, prevention,diagnosis and treatment of breast cancer[J]. World J Clin Oncol,2014,5 (3):283-298.
- [5] MUECK A O,RUAN X,SEEGER H,et al. Genomic and non-genomic actions of progestogens in the breast[J]. J Steroid Biochem Mol Biol,2014,142(7):62-67.
- [6] TAKAHASHI Y,KUBO R,SANO R,et al. DNA methylation of the NR3C1 promoter region in brains of pediatric victims of physical abuse[J]. Neurocase,2018,24(6):269-275.
- [7] SCHMITT M,WILHELM O G,NOSKE A,et al. Clinical validation of PITX2 DNA methylation to predict outcome in high-risk breast cancer patients treated with anthracycline-based chemotherapy[J]. Breast Care (Basel),2018,13(6):425-433.
- [8] ZHOU J,SHI J,FU X,et al. Linc00441 interacts with DNMT1 to regulate RB1 gene methylation and expression in gastric cancer[J]. Oncotarget,2018,9 (101):37471-37479.
- [9] JING P,XIE N,ZHU X,et al. The methylation induced by protein arginine methyltransferase 5 promotes tumorigenesis and progression of lung cancer[J]. J Thorac Dis,2018,10(12):7014-7019.
- [10] KOJIMA K,NAKAMURA T,OOIZUMI Y,et al. Clinical significance of cancer specific methylation of the CDO1 gene in small bowel cancer[J]. PLoS One,2019,14(1):e0211108.
- [11] CHEN Y,LIU L,GUO Z,et al. Lost expression of cell adhesion molecule 1 is associated with bladder cancer progression and recurrence and its overexpression inhibited tumor cell malignant behaviors[J]. Oncol Lett,2019,17(2):2047-2056.
- [12] COLLIN L J,MCCULLOUGH L E,CONWAY K,et al. Reproductive characteristics modify the association between global DNA methylation and breast cancer risk in a population-based sample of women[J]. PLoS One,2019,14(2):e0210884.
- [13] KURUPPU S,RAJAPAKSE N W,SMITH A I,et al. Endothelin-converting enzyme-1 inhibition and renoprotection in end-stage renal disease[J]. Pflugers Arch,2013,465(7):929-934.
- [14] ESTELLER M. Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome[J]. Hum Mol Genet,2007,16(1):50-59.
- [15] 王志刚,吴建新. DNA 甲基转移酶分类、功能及其研究进展[J]. 遗传,2009,31(9):903-912.
- [16] MYTYCH J,LEWINSKA A,BIELAK-ZMIJEWSKA A,et al. Nanodiamond-mediated impairment of nucleolar activity is accompanied by oxidative stress and DNMT2 up-regulation in human cervical carcinoma cells[J]. Chem Biol Interact,2014,220:51-63.

- (6):418-420.
- [5] WINTERS A, TAYLOR J C, REN M, et al. Transient focal cerebral ischemia induces long-term cerebral vasculature dysfunction in a rodent experimental stroke model [J]. *Transl Stroke Res*, 2012, 3(2):279-285.
- [6] 张丽. 问:大鼠脑脊液抽取方法[J]. *中国比较医学杂志*, 2017, 27(7):12.
- [7] 张亚敏, 徐虹, 孙华, 等. 线栓法制作大鼠局灶性脑缺血再灌注模型的研究及体会[J]. *医学研究杂志*, 2014, 43(1):27-30.
- [8] GERMANO I M, BARTKOWSKI H M, CASSEL M E, et al. The therapeutic value of nimodipine in experimental focal cerebral ischemia. Neurological outcome and histopathological findings[J]. *J Neurosurg*, 1987, 67(1):81-87.
- [9] ASHWAL S, TONE B, TIAN H R, et al. Core and penumbral nitric oxide synthase activity during cerebral ischemia and reperfusion. *Stroke* [J]. 1998, 29(5):1037-1046.
- [10] TANG Q, HAN R, XIAO H, et al. Role of suture diameter and vessel insertion position in the establishment of the middle cerebral artery occlusion rat model[J]. *Exp Ther Med*, 2013, 5(6):1603-1608.
- [11] SEDAGHAT F, NOTOPOULOS A. S100 protein family and its application in clinical practice[J]. *Hippokratia*, 2008, 12(4):198-204.
- [12] MOORE B W. A soluble protein characteristic of the nervous system [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1965, 19(6):739-744.
- [13] ZIMMER D B, CORNWALL E H, LANDAR A, et al. The S100 protein family: history, function, and expression [J]. *Brain Res Bull*, 1995, 37(4):417-429.
- [14] FRITZ G, BOTELHO H M, MOROZOVA-ROCHE LA, et al. Natural and amyloid self-assembly of S100 proteins: structural basis of functional diversity [J]. *FEBS J*, 2010, 277(22):4578-4590.
- [15] NYGAARD O, LANGBAKK B, ROMNER B. Age- and sex-related changes of S-100 protein concentrations in cerebrospinal fluid and serum in patients with no previous history of neurological disorder[J]. *Clin Chem*, 1997, 43(3):541-543.
- [16] GONZÁLEZ-QUEVEDO A, GARCÍA S G, CONCEPCIÓN O F, et al. Increased serum S-100B and neuron specific enolase-Potential markers of early nervous system involvement in essential hypertension [J]. *Clin Biochem*, 2011, 44(2):154-159.
- [17] 郑声浩, 董显平, 卓盛林. 脑出血继发癫痫患者血清 NSE 和炎症细胞因子浓度测定对病情的预测价值[J]. *心脑血管病防治*, 2009, 9(3):175-176.
- [18] CATA J P, ABDELMALAK B, FARAG E. Neurological biomarkers in the perioperative period[J]. *Br J Anaesth*, 2011, 107(6):844-858.
- [19] SØRENSEN S S, NYGAARD A B, CARLSEN A L, et al. Elevation of brain-enriched miRNAs in cerebrospinal fluid of patients with acute ischemic stroke[J]. *Biomark Res*, 2017, 5:24.
- [20] 马雪. 脑脊液 NSE、S-100B、MBP 在动脉瘤性蛛网膜下腔出血中的表达及临床应用研究[D]. 新疆:新疆医科大学, 2017.
- [21] MARTHA S R, COLLIER L A, DAVIS S M, et al. Translational evaluation of acid/base and electrolyte alterations in rodent model of focal ischemia[J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2018, 27(10):2746-2754.
- [22] MARTINEZ-MAJANDER N, AARNIO K, PIRINEN J, et al. Embolic strokes of undetermined source in young adults: baseline characteristics and long-term outcome[J]. *Eur J Neurol*, 2018, 25(3):535-541.
- [23] 李建明, 王丽, 牛莉莉. 大脑中动脉线栓法脑缺血模型制作的研究进展[J]. *新疆医学*, 2018, 48(7):709-711.
- [24] MARENHOLZ I, HEIZMANN C W, FRITZ G. S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature) [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 322(4):1111-1122.
- [25] 牛莉莉, 马红萍, 李建明. 急性脑梗死与血清 S-100B 蛋白的动态变化相关性探讨[J]. *新疆医学*, 2018, 48(7):698-700.

(收稿日期:2019-08-18 修回日期:2019-12-25)

(上接第 284 页)

- [17] JELTSCH A, EHRENHOFER-MURRAY A, JURKOWSKI T P, et al. Mechanism and biological role of Dnmt2 in Nucleic Acid Methylation[J]. *RNA Biol*, 2017, 14(9):1108-1123.
- [18] JOHANNSSON S, NEUMANN P, WULF A, et al. Structural insights into the stimulation of *S. pombe* DNMT 2 catalytic efficiency by the tRNA nucleoside queuosine[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1):8880
- [19] ZHANG Y, ZHANG X, SHI J, et al. DAMT 2 mediates intergenerational transmission of paternally acquired metabolic disorders through sperm small non-coding RNAs [J]. *Nat Cell Biol*, 2018, 20(5):535-540.
- [20] LEWINSKA A, ADAMCZYK-GROCHALA J, KWAS NIEWICZ E, et al. Reduced levels of methyltransferase DNMT2 sensitize human fibroblasts to oxidative stress and DNA damage that is accompanied by changes in proliferation-related miRNA expression [J]. *Redox Biol*, 2018, 14:20-34.

(收稿日期:2019-06-24 修回日期:2019-10-15)