

人乳腺癌中 p21^{WAF1} 组蛋白 H3、H4 乙酰化水平的表达变化

赵洁, 刘朝晖, 伍玲, 娄华英

(湖南省马王堆医院, 湖南长沙 410016)

摘要: [目的] 探讨人乳腺癌中 p21^{WAF1} 组蛋白 H3、H4 乙酰化水平的变化及其意义。[方法] 应用 HE 染色鉴定乳腺癌的病理形态变化, RT-PCR 检测 p21^{WAF1} mRNA 的表达, 染色质免疫沉淀法检测 p21^{WAF1} 组蛋白 H3、H4 乙酰化的状态。[结果] HE 染色可见, 与癌旁组织及正常乳腺组织相比, 乳腺癌组织结构及细胞形态有明显的异型性。RT-PCR 检测结果显示, 乳腺癌组织中 p21^{WAF1} mRNA 的表达水平明显低于癌旁组织及正常乳腺组织 ($P < 0.05$); p21^{WAF1} mRNA 在组蛋白 H3、H4 乙酰化水平降低乳腺癌中的表达明显低于组蛋白 H3、H4 乙酰化水平非降低乳腺癌中的表达 ($P < 0.05$); p21^{WAF1} mRNA 表达降低与人乳腺癌的临床分期、分化程度和淋巴结转移有关。染色质免疫沉淀法显示, 乳腺癌组织中 p21^{WAF1} 组蛋白 H3、H4 的乙酰化水平明显低于癌旁组织及正常乳腺组织; p21^{WAF1} 乙酰化水平降低与人乳腺癌的分化程度和淋巴结转移有关。[结论] p21^{WAF1} 组蛋白 H3、H4 乙酰化的表达变化与乳腺癌的发生发展密切相关。

关键词: 乳腺肿瘤; 组蛋白乙酰化; p21^{WAF1}

中图分类号: R737.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2014)02-0086-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2014.02.B002

The Expression Change of Histone H3 and H4 Acetylation on p21^{WAF1} in Human Breast Cancer

ZHAO Jie, LIU Zhao-hui, WU Ling, et al.

(Hunan Mawangdui Hospital, Changsha 410016, China)

Abstract: [Purpose] To explore the expression of histone H3, H4 acetylation of p21^{WAF1} on human breast cancer and its significance. [Methods] Pathological morphologic change of breast cancer was identified by HE-staining. The expression of p21^{WAF1} mRNA was analyzed by RT-PCR. The acetylation of histone H3 and H4 on p21^{WAF1} were detected by chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay. [Results] HE-staining discovered that the tissue structure and cell morphology of breast cancer had visible atypia, compared with para-carcinoma tissues and normal breast tissues. RT-PCR test showed that the expression of p21^{WAF1} mRNA was lower in breast cancer tissues than that in para-carcinoma tissues or normal breast tissues ($P < 0.05$). The expression of p21^{WAF1} mRNA was lower in low histone H3 and H4 breast cancer tissues than that in the no low histone H3 and H4 breast cancer tissues. The low expression of p21^{WAF1} mRNA correlated to the clinical stage, differentiation degree and lymph transfer of breast cancer. Chromatin immunoprecipitation assay displayed that the level of histone H3 and H4 acetylation on p21^{WAF1} was lower in breast cancer tissues than that in para-carcinoma tissues and normal breast tissues. The low acetylation level of p21^{WAF1} associated with the differentiation degree and lymph node metastasis of human breast cancer. [Conclusion] The expression change of histone acetylation of p21^{WAF1} may relate to the carcinogenesis and progress of breast cancer.

Subject words: breast neoplasms; histone acetylation; p21^{WAF1}

乳腺癌是女性常见的恶性肿瘤之一, 近 20 年来, 对于乳腺癌病因的研究有了迅速、深入的进展,

但真正的病因尚不清楚, 还有待进一步探讨。组蛋白的乙酰化与去乙酰化是基因表达过程中重要的调控方式, 通常认为组蛋白的高乙酰化是活跃转录的一个标志, 而低乙酰化则与转录抑制有关^[1,2]。组蛋白乙酰化/去乙酰化紊乱可造成细胞分化所需基

基金项目: 湖南省科技厅基金项目(2008FJ322)

通讯作者: 赵洁, 副主任医师, 硕士; 湖南省马王堆医院病理科, 湖南省长沙市古汉路 89 号(410016); E-mail: shehaihong970622@126.com

收稿日期: 2013-09-18; **修回日期:** 2013-10-31

因的异常,导致不成熟的细胞增殖失控,引起人类恶性肿瘤的发生^[3]。 $p21^{WAF1}$ 属于CK1的KIP家族,研究发现它与结肠癌^[4,5]、卵巢癌^[6]、脑胶质瘤^[7]等的发生、发展密切相关。 $p21^{WAF1}$ 组蛋白乙酰化与乳腺癌发生发展的关系目前研究尚未清楚。为此,我们检测了120例乳腺癌组织及其癌旁组织与120例正常乳腺组织中乙酰化的组蛋白H3、H4及 $p21^{WAF1}$ 的表达情况及其关系,探讨组蛋白乙酰化及 $p21^{WAF1}$ 与乳腺癌发生和发展的关系。

1 资料与方法

1.1 标本采集与处理

收集湖南省马王堆医院2010年3月至2012年3月手术切除的120例乳腺癌标本及其癌旁组织,120例正常乳腺组织取自乳腺腺瘤周围正常乳腺组织,所有患者手术前未经过任何治疗。标本离体后,一部分立即放入液氮冷冻,-80℃超低温冰箱贮存备用,用于RT-PCR等分析;一部分经4%中性甲醛固定,石蜡包埋。参考《WHO肿瘤病理学与遗传学分类/乳腺肿瘤分册》对乳腺癌进行病理分型与组织学分级。

1.2 $p21^{WAF1}$ mRNA 的检测

用RT-PCR检测三种不同组织的mRNA,总RNA抽提按照Trizol(Invitrogen, Carlsbad, USA)试剂盒的说明书进行,反转录合成cDNA,进行PCR扩增,以GAPDH为内参照。用1.5%琼脂糖凝胶电泳分离PCR产物,BioSpectrum AC凝胶成像分析系统扫描分析。用自动酶标仪测定吸光度值,以 $p21^{WAF1}$ 与GAPDH扩增条带测得的吸光度比值表示 $p21^{WAF1}$ mRNA的相对表达水平。PCR引物由上海生物公司设计及合成: $p21^{WAF1}$ 正向引物:5'-CAGGGGACAGCAGAGGAAGA-3';反向引物:5'-CGGCGGCCAGGTATGTAC-3'。GAPDH为内参照,正向引物:5'-CAAGGTCATCCATGACAACCTTTG-3';反向引物:5'-GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG-3'。PCR扩增条件:变性94℃ 15s,复性55℃ 20s及延伸72℃ 15s,共40个循环。

1.3 $p21^{WAF1}$ 组蛋白H3、H4乙酰化的检测

按照ChIP (P-2003, Epigentek)试剂盒说明书进行。步骤简述如下:称取各组组织约20mg,用眼科剪

剪碎,加入终浓度为1%的甲醛,固定15~20min,然后加入终浓度0.125mol/L的甘氨酸终止固定反应。固定后的组织经裂解液裂解后用超声波破碎仪断裂染色质,得到全细胞抽提物。抽提物稀释后,加入乙酰化组蛋白H3、H4抗体,4℃轻微摇动过夜,依次用低盐洗液、高盐洗液、氯化锂洗液及TE洗涤沉淀,弃上清。在沉淀中,加入ChIP提取液,在ChIP提取液和Input样品中,分别加入5mol/L NaCl及RNase A,混匀后,65℃温育5h。然后再加入LEDTA、Tris-HCl(pH6.5)、蛋白酶K,混匀后,45℃温育过夜。用等体积的酚:氯仿:异戊醇抽提后,在上清中加入糖元和无水乙醇,混匀,-20℃放置2h,4℃离心(12 000r/min, 15min),弃上清,用70%乙醇洗涤沉淀,晾干后,溶于灭菌水中,PCR分析。

1.4 统计学处理

应用SPSS 18.0统计软件对数据进行统计分析,采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 乳腺癌组织病理形态学检查

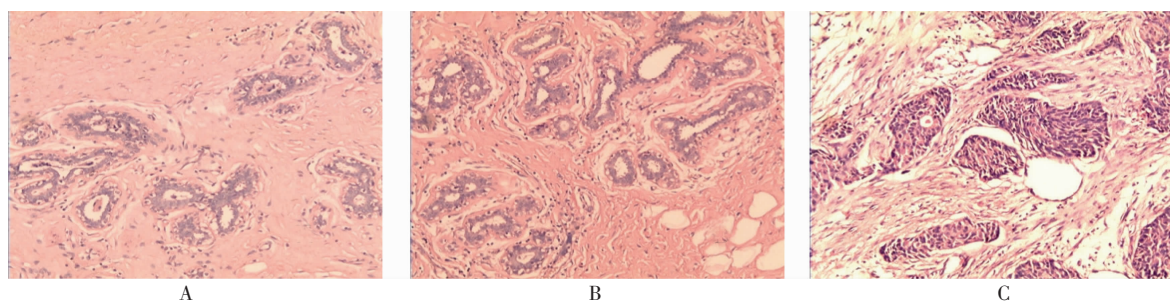
与正常乳腺组织相比,人乳腺癌细胞排列混乱,呈索状、簇状、小梁状排列,癌细胞大小形态各异,多形性明显,呈圆形、梭形等,胞质丰富,核大、深染,有明显核仁,核分裂相多见,癌间质有致密的纤维组织增生,癌细胞在纤维间质内呈浸润性生长;癌旁组织结构上有一定异型性,腺腔排列不规则,纤维间质稍有增生,但细胞无明显异型性(Figure 1)。120例乳腺癌组织中,非特殊浸润性导管癌93例,浸润性小叶癌15例,髓样癌7例,小管癌5例;中高分化79例,低分化41例。临床I、II期57例,III、IV期63例。病理证实有淋巴结转移68例,无淋巴结转移52例。

2.2 人乳腺癌组织、癌旁组织及正常乳腺组织中 $p21^{WAF1}$ mRNA 的表达

人乳腺癌组织中 $p21^{WAF1}$ mRNA的水平明显低于癌旁组织及正常乳腺组织,差异有统计学意义($P<0.01$)。然而,癌旁组织与正常乳腺组织中 $p21^{WAF1}$ mRNA的表达无明显差别($P>0.05$)(Figure 2)。

2.3 $p21^{WAF1}$ 在乳腺癌组织、癌旁组织及正常乳腺组织中组蛋白H3、H4的乙酰化状态

$p21^{WAF1}$ 组蛋白H3、H4的乙酰化水平在乳腺癌



A: normal breast tissue; B: para-carcinoma tissue; C: breast cancer tissue

Figure 1 The morphological changes of breast cancer (HE $\times 200$)

组织中的表达明显低于癌旁组织及正常乳腺组织 (P 均 < 0.05) (Figure 3)。

2.4 $p21^{WAF1}$ 乙酰化降低与非降低的乳腺癌组织中 $p21^{WAF1}$ mRNA 表达情况

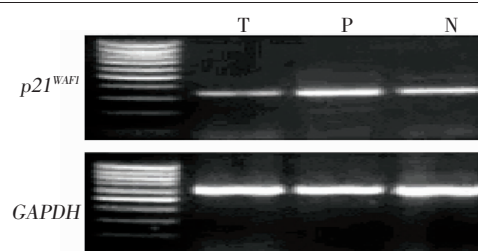
在 92 例组蛋白 H3 乙酰化水平降低的乳腺癌组织中, 66 例 $p21^{WAF1}$ mRNA 表达降低, 占 71.7%; 在 28 例组蛋白 H3 乙酰化水平非降低的乳腺癌组织中, 6 例 $p21^{WAF1}$ mRNA 表达降低, 占 21.4%; 在 88 例组蛋白 H4 乙酰化水平降低的乳腺癌组织中, 62 例 $p21^{WAF1}$ mRNA 表达降低, 占 70.5%; 在 32 例组蛋白 H4 乙酰化水平非降低的乳腺癌组织中, 10 例 $p21^{WAF1}$ mRNA 表达降低, 占 31.3%。 $p21^{WAF1}$ mRNA 在组蛋白 H3 乙酰化水平降低的乳腺癌组织中表达明显低于组蛋白 H3 乙酰化水平非降低的乳腺癌组织 ($P < 0.05$); $p21^{WAF1}$ mRNA 在组蛋白 H4 乙酰化水平降低的乳腺癌组织中表达明显低于组蛋白 H4 乙酰化水平非降低的人乳腺癌组织 ($P < 0.05$) (Table 1)。

2.5 $p21^{WAF1}$ 基因乙酰化降低和 $p21^{WAF1}$ mRNA 表达降低与乳腺癌患者临床病理特征的关系

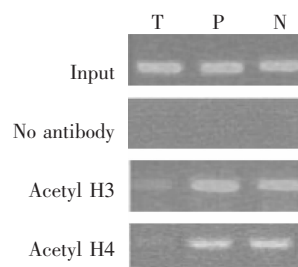
$p21^{WAF1}$ 基因乙酰化水平降低与乳腺癌患者的性别、临床分期、病理类型均无关 (P 均 > 0.05), 而与乳腺癌的分化程度和淋巴结转移有关 (P 均 < 0.05); $p21^{WAF1}$ mRNA 表达降低与乳腺癌患者的性别、病理类型均无关 (P 均 > 0.05), 而与乳腺癌的临床分期、分化程度和淋巴结转移有关 (P 均 < 0.05) (Table 2)。

3 讨 论

$p21^{WAF1}$ 是发现的第一个 CDK 抑制物 (CDK4 的抑制蛋白), 在细胞生物学行为方面有各种各样的重



T: breast cancer tissue; P: para-carcinoma tissue; N: normal breast tissue. Compared with breast cancer tissue, $P < 0.01$; Normal breast tissue compared with para-carcinoma tissue, $P > 0.05$.

Figure 2 The expression of $p21^{WAF1}$ mRNA in breast cancer tissue, para-carcinoma tissue and normal breast tissue

T: breast cancer tissue; P: para-carcinoma tissue; N: normal breast tissue. Compared with breast cancer tissue, $P < 0.01$; Normal breast tissue compared with para-carcinoma tissue, $P > 0.05$.

Figure 3 The expression of histone H3 and H4 acetylation of $p21^{WAF1}$ in breast cancer tissue, para-carcinoma tissue and normal breast tissue

Table 1 The expression of $p21^{WAF1}$ mRNA in low $p21^{WAF1}$ acetylation breast cancer tissue and no low $p21^{WAF1}$ acetylation breast cancer tissue

Groups	N	$p21^{WAF1}$ mRNA		χ^2	P
		Down	Not down		
Low histone H3 acetylation of $p21^{WAF1}$	92	66	26	22.64	<0.01
No low histone H3 acetylation of $p21^{WAF1}$	28	6	22		
Low histone H4 acetylation of $p21^{WAF1}$	88	62	26	15.03	<0.01
No low histone H4 acetylation of $p21^{WAF1}$	32	10	22		

Table 2 The relation of $p21^{WAF1}$ low acetylation and $p21^{WAF1}$ mRNA low expression and clinical pathology characteristic in breast cancer

Factors	Low histone H3 N acetylation of p21 ^{WAF1}				Low histone H4 acetylation of p21 ^{WAF1}				Low expression of p21 ^{WAF1} mRNA			
			χ^2	<i>P</i>				χ^2	<i>P</i>			
Gender												
Male	8	6	0.013	>0.05	7	0.880	>0.05	5	0.022	>0.05		
Femal	112	86			81			67				
Differentiation degree												
High and moderate	79	55	6.418	<0.05	52	6.670	<0.05	41	6.323	<0.05		
Low	41	37			36			31				
Clinical stage												
I , II	57	41	1.362	>0.05	39	1.340	>0.05	27	7.218	<0.01		
III, IV	63	51			49			45				
Lymphatic metastasis												
+	68	58	6.529	<0.05	55	4.573	<0.05	47	5.436	<0.05		
−	52	34			33			25				
Pathological type												
Infiltrating ductal carcinoma	93	71	0.237	>0.05	69	0.503	>0.05	56	0.260	>0.05		
Infiltrating lobular carcinoma	15	12			10			9				
Medullary carcinoma	7	5			5			4				
Tubular carcinoma	5	4			4			3				

要功能。许多实验证明 $p21^{WAF1}$ 在癌细胞中是一个重要的抑癌基因^[8,9]。本实验研究结果显示,乳腺癌组织中 $p21^{WAF1}$ mRNA 的表达明显低于癌旁组织及正常乳腺组织,而癌旁组织与正常乳腺组织中 $p21^{WAF1}$ mRNA 的表达无明显差别; $p21^{WAF1}$ mRNA 表达降低与人乳腺癌的临床分期、分化程度和淋巴结转移有关,临床分期及分化程度越低, $p21^{WAF1}$ mRNA 表达越低;有淋巴结转移的乳腺癌 $p21^{WAF1}$ mRNA 的表达明显低于无淋巴结转移的乳腺癌 $p21^{WAF1}$ mRNA 的表达,这表明 $p21^{WAF1}$ 表达降低与乳腺癌的发生发展密切相关。与 Gamboa-Dominguez 等^[10]研究 $p21^{WAF1}$ 表达与胃癌的发生发展有关的结果一致。染色体组蛋白乙酰化/去乙酰化的变化与细胞周期的变化相关,组蛋白乙酰化水平升高可以使细胞周期阻滞在 G₁ 或 G₂/M 检测点,从而抑制肿瘤细胞的增殖^[11]。组蛋白乙酰化的水平是由组蛋白乙酰转移酶(HATs)和

组蛋白去乙酰酶(HDACs)共同决定的,组蛋白去乙酰酶的抑制剂(DIAs)能抑制组蛋白去乙酰化,提高组蛋白乙酰化的水平。本研究结果显示,乳腺癌组织中 $p21^{WAF1}$ 乙酰化的组蛋白 H3、H4 水平明显低于癌旁组织及正常乳腺组织,且 $p21^{WAF1}$ 乙酰化水平降低与人乳腺癌的分化程度和淋巴结转移有关(P 均<0.05),分化程度越低 $p21^{WAF1}$ 乙酰化水平越低;有淋巴结转移的乳腺癌 $p21^{WAF1}$ 乙酰化水平明显低于无淋巴结转移的乳腺癌 $p21^{WAF1}$ 乙酰化水平。与以往报道的乙酰化组蛋白 H3、H4 在人结肠癌^[12]、前列腺癌^[13]、肺癌^[14]及乳腺癌细胞^[15]中的水平明显降低一致,提示乳腺癌的发生发展与 $p21^{WAF1}$ 组蛋白 H3、H4 的乙酰化水平降低有关。本研究中我们还发现, $p21^{WAF1}$ mRNA 在组蛋白 H3、H4 乙酰化水平降低乳腺癌组织中的表达明显低于其在组蛋白 H3、H4 乙酰化非降低人乳腺癌组织中的表达。以上结果提示, $p21^{WAF1}$

组蛋白 H3、H4 乙酰化水平降低可能引起 $p21^{WAF1}$ mRNA 的表达降低, 从而导致 $p21^{WAF1}$ 抑癌功能失活, 引起乳腺癌的发生发展。

综上所述, $p21^{WAF1}$ mRNA 及 $p21^{WAF1}$ 乙酰化的组蛋白 H3、H4 在乳腺癌组织中的表达均明显低于癌旁组织及正常乳腺组织, 于是我们推测 $p21^{WAF1}$ 基因乙酰化水平降低导致 $p21^{WAF1}$ mRNA 的降低是乳腺癌发生发展的重要因素之一。

参考文献:

- [1] Schlottmann S, Erkizan HV, Barber-Rotenberg JS, et al. Acetylation increases EWS-FLI1 DNA binding and transcriptional activity [J]. Front Oncology, 2012, 2(107): 1-12.
- [2] Halsall J, Gupta V, Oneill LP, et al. Genes are often sheltered from the global histone hyperacetylation induced by HDAC inhibitors [J]. PLoS One, 2012, 7(3): 1-7.
- [3] Fortson WS, Kayarthodi S, Fujimura Y, et al. Histone deacetylase inhibitors, valproic acid and trichostatin-A induced apoptosis and affect acetylation status of p53 in ERG-positive prostate cancer cells [J]. Int J Oncol, 2011, 39(1): 111-119.
- [4] Bauer J, Spom JC, Cabral J, et al. Effects of activin and TGF β on p21 in colon cancer [J]. PLoS One, 2012, 7(6): 1-11.
- [5] Walczak K, Turski WA, Rzeski W. Kynurenic acid enhances expression of p21 Waf1/Cip1 in colon cancer HT-29 cells [J]. Pharmacol Rep, 2012, 64(3): 745-750.
- [6] Xia X, Ma Q, Li X, et al. Cytoplasmic p21 is a potential predictor for cisplatin sensitivity in ovarian cancer [J]. BMC Cancer, 2011, 11(399): 1-9.
- [7] Zeng Y, Long XD, You C. MDM2, p53, p14ARF and $p21^{WAF1}$ protein expression in gliomas and its significance [J]. Journal of Chinese Oncology, 2009, 15(6): 541-544. [曾义, 龙晓东, 游潮. 脑胶质瘤组织中 MDM2、p53、p14ARF 和 $p21^{WAF1}$ 蛋白表达及意义 [J]. 肿瘤学杂志, 2009, 15(6): 541-544.]
- [8] Schaefer JS, Sabherwal Y, Shi HY, et al. Transcriptional regulation of p21/CIP1 cell cycle inhibitor by PDEF controls cell proliferation and mammary tumor progression [J]. J Biol Chem, 2010, 285(15): 11258-11269.
- [9] Fischer CA, Jung M, Zlobec I, et al. Co-overexpression of p21 and Ki-67 in head and neck squamous cell carcinoma relative to a significantly poor prognosis [J]. J Head Neck, 2011, 33(2): 267-273.
- [10] Gamboa-Dominguez A, Seidl S, Reyes-Gutierrez E, et al. Prognostic significance of p21WAF1/CIP1, p27Kip1, p53 and E-cadherin expression in gastric cancer [J]. J Clin Pathol, 2007, 60(7): 756-761.
- [11] Zhao J, Su Q. Research progress on histone acetylation/deacetylation and leukemia [J]. Journal of Chinese Oncology, 2004, 10(6): 436-439. [赵洁, 苏琦. 组蛋白乙酰化/去乙酰化与白血病的研究进展 [J]. 肿瘤学杂志, 2004, 10(6): 436-439.]
- [12] Ikehata M, Ueda K, Iwakawa S. Different involvement of DNA methylation and histone deacetylation in the expression of solute-carrier transporters in 4 colon cancer cell lines [J]. Biol Pharm Bull, 2012, 35(3): 301-307.
- [13] Bianco-Miotto T, Chiam K, Buchanan G, et al. Global levels of specific histone modifications and an epigenetic gene signature predict prostate cancer progression and development [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2010, 19(10): 2611-2622.
- [14] Zhang QC, Jiang SJ, Zhang S, et al. Histone deacetylase inhibitor trichostatin A enhances anti-tumor effects of docetaxel or erlotinib in A549 cell line [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2012, 13(7): 3471-3476.
- [15] Chatterjee N, Wang WL, Conklin T, et al. Histone deacetylase inhibitors modulate miRNA and mRNA expression, block metaphase, and induce apoptosis in inflammatory breast cancer cells [J]. Cancer Biol Ther, 2013, 14(7): 658-671.