

DNMT3a 通过提升基因内部甲基化介导紫杉醇诱导的 LINE-1 异常表达

王昕源^{1,2}, 张雨^{1,2}, 杨楠¹, 程禾^{1,2}, 孙玉洁^{1,2}

1. 南京医科大学, 江苏省人类功能基因组学重点实验室, 南京 211166

2. 南京医科大学细胞生物学系, 南京 211166

摘要: 药物诱导的长散在重复序列 LINE-1 异常激活可促进细胞基因组不稳定, 而基因组不稳定是促进肿瘤发生发展和耐药表型形成的重要因素。因此, 探索 LINE-1 异常激活的分子机制具有重要的理论和临床意义。DNA 甲基化是调控基因表达的重要方式, 已知 DNA 甲基转移酶家族成员 DNMT3a 不仅能通过促进基因启动子甲基化抑制基因表达, 还可通过增强基因内部甲基化上调基因表达。本实验室前期研究发现, 将乳腺癌细胞暴露于化疗药物可诱导 LINE-1 异常高表达, 但 LINE-1 启动子甲基化水平并无显著改变。本研究进一步探讨了在化疗药物压力下 DNMT3a 是否可通过增强 LINE-1 基因内部甲基化水平促进 LINE-1 在乳腺癌细胞中的异常高表达。ChIP 实验和甲基分析结果显示, 用化疗药物紫杉醇(PTX)处理乳腺癌细胞, 不仅可以诱导 DNMT3a 表达, 而且可以促进 DNMT3a 与 LINE-1 基因内部区域的结合, 提升其基因内部甲基化水平, 进而上调 LINE-1 的表达水平。利用表达载体增加细胞内 DNMT3a 的表达水平, 可显著上调 LINE-1 基因内部的甲基化及基因的表达水平, 而下调 DNMT3a 的表达可有效抑制 LINE-1 表达。上述研究结果表明, DNMT3a 介导的基因非启动子区甲基化在药物诱导的 LINE-1 异常激活中发挥重要作用, 为认识 LINE-1 在乳腺癌化疗耐药性形成过程中异常激活的机制提供了新思路。

关键词: 乳腺癌; LINE-1 异常激活; 基因内部 DNA 甲基化; DNMT3a

DNMT3a mediates paclitaxel-induced abnormal expression of LINE-1 by increasing the intragenic methylation

Xinyuan Wang^{1,2}, Yu Zhang^{1,2}, Nan Yang¹, He Cheng^{1,2}, Yujie Sun^{1,2}

1. Key Laboratory of Human Functional Genomics of Jiangsu Province, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China

2. Department of Cell Biology, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China

Abstract: The activation of long interspersed nuclear element-1 (LINE-1) leads to genomic instability, which promotes

收稿日期: 2019-10-29; 修回日期: 2019-12-27

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 81172091)资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China (No.81172091)]

作者简介: 王昕源, 硕士, 专业方向: LINE-1 的异常激活机制。E-mail: wangxinyuan2727@gmail.com

通讯作者: 孙玉洁, 博士, 教授, 研究方向: 增强子生物学功能、肿瘤耐药形成机制。E-mail: yujiesun@njmu.edu.cn

程禾, 博士, 讲师, 研究方向: 乳腺癌耐药形成机制。E-mail: chenghe@njmu.edu.cn

DOI: 10.16288/j.ycz.19-258

网络出版时间: 2020/1/3 13:48:20

URI: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20200103.0923.002.html>

carcinogenesis and drug resistant. Therefore, exploring the mechanism underlying LINE-1 abnormal activation has the theoretical and clinical significance. DNA methylation is an important way to regulate gene expression. DNMT3a, one member of the DNA methyltransferase family, not only inhibits gene expression by inducing promoter hypermethylation, but also activates gene expression by increasing the intragenic DNA methylation. Our previous studies found that the expression of LINE-1 did not increase significantly in the promoter methylation in breast cancer cells treated with paclitaxel (PTX), a first-line chemotherapeutic drug for breast cancer. Here we explored whether DNMT3a could directly mediate the drug-induced activation of LINE-1 in breast cancer cells through increasing the LINE-1 intragenic methylation. Our ChIP experiments and methyl analysis showed that treatment of breast cancer cells with PTX not only induced DNMT3a expression, but also promoted the binding of DNMT3a to the inner region of the *LINE-1* gene to increase its methylation, resulting in upregulation of LINE-1 expression. Using expression vectors or RNA interference to alter the DNMT3a expression levels in the cells significantly changed the intragenic methylation degree and LINE-1 expression. Moreover, down-regulation of DNMT3a expression effectively inhibited the expression of LINE-1. These results indicate that DNMT3a-mediated intragenic methylation plays an important role in drug-induced abnormal activation of LINE-1, which provides a new idea for understanding the mechanism of abnormal activation of Line-1 induced by chemotherapy drug stress in breast cancer cells.

Keywords: breast cancer; abnormal activation of LINE-1; intragenic DNA methylation; DNMT3a

乳腺癌作为女性最常见的恶性肿瘤之一,与结肠癌、肺癌并列为全世界发病率最高的三大癌症^[1]。在中国,乳腺癌已经成为女性患病率最高的癌症(17.1%),并且其发病率逐年上升^[2]。化学药物治疗(简称化疗)是乳腺癌系统性治疗中不可缺少的一部分,然而癌细胞对化疗药物产生耐受性是阻碍化疗成功的主要原因之一^[3-5]。

长散在重复序列 LINE-1(long interspersed nuclear element-1, LINE-1)是一种能够自主发生转座的“逆转录转座元件”^[6,7],约占人类基因组的 18%^[8,9]。完整的 LINE-1 主要包括 2 个开放阅读框,分别编码 Orf-1 和 Orf-2 两种蛋白。其中 Orf-1 具有 RNA 结合能力,Orf-2 具有核酸内切酶和逆转录酶活性。Orf-1 蛋白翻译后能够识别并结合编码他们的信使 RNA (message RNA, mRNA),与 Orf-2 形成核糖核蛋白复合体(ribonucleoprotein complex, RNP)进入细胞核,Orf-2 蛋白的核酸内切酶活性能够识别基因组 DNA 上的目标序列(AATTT)并对其进行切割,其逆转录酶活性能够利用暴露的 TTT 为引物,以 LINE-1 的 RNA 为模板逆转录产生新的 LINE-1 DNA 并拷贝整合入基因组,这一过程被称为“靶点引导的逆转录过程”(target-site primed reverse transcription, TPRT)^[10-12]。

LINE-1 的逆转录过程不仅可能会破坏基因或非编码功能区域的完整性,还可能会导致 DNA 双链断裂,进而使得细胞基因组发生更多的非等位基因同源重组以及对染色质重组的无效性修复^[10,13,14]。LINE-1 所表达的两个蛋白,亦能单独发挥其自身功能。例如 Orf-1 能够单独发挥其 RNA 结合能力,参与 mRNA 和小核 RNA (small nuclear RNA, snRNA)在内的多种 RNA 的活化^[15,16]。而 Orf-2 也能直接对基因组 DNA 双链进行切割从而导致 DNA 双链断裂^[14,17]。而这些现象最终都会导致细胞基因组不稳定性的形成。

基因组不稳定性是一种以遗传改变频率升高为主要特点的突发性的细胞状态^[18]。研究表明,基因组的不稳定会增进肿瘤异质性、促进肿瘤的克隆演变,从而使多种肿瘤产生原发性耐药或获得性耐药表型^[19-21]。LINE-1 在正常乳腺细胞中一般处于沉默状态,而在多种亚型的乳腺癌中均异常激活^[22,23]。有研究表明多种癌症中异常激活的 LINE-1 会加剧细胞基因组不稳定性从而增加肿瘤细胞的多样性,促进肿瘤的发生发展,并且还会导致肿瘤耐药性的形成^[10,11,20,24,25]。因此,深入探索 LINE-1 在乳腺癌中异常激活的机制,对于提升乳腺癌临床治疗效果,

以及改善患者预后均具有极为重要的现实意义。

DNA 甲基化是由 DNA 甲基转移酶介导形成的表观遗传修饰方式之一,其功能与修饰区域在基因组上的相对位置密切相关。发生于启动子区域的甲基化一般与基因沉默相关^[26],而发生于基因内部的甲基化被认为与基因表达激活和激活状态的维持相关^[26]。DNA 甲基转移酶家族(DNA methyltransferases, DNMTs)主要包括 DNMT1、DNMT3a 和 DNMT3b。其中, DNMT1 发挥“维持原有甲基化”的功能^[27],而 DNMT3a 和 DNMT3b 则发挥“从头合成甲基化”(de novo methylation)的功能^[28]。研究证明 3 种 DNMTs 均能作用于启动子甲基化^[27],通过抑制转录因子在启动子区域的结合,抑制转录聚合体形成等方式抑制基因的表达。此外, DNMT3a 还具有调控基因内部甲基化的功能,可通过直接提升基因内部甲基化水平,使得基因保持稳定持续的转录状态,从而促进基因的表达^[28-31]。并且 DNMT3a 还能够在多种保守染色质区域上发挥其“从头合成甲基化”功能,建立新的甲基化位点,使得这些原本处于沉默状态的保守染色质区域重新激活^[29-31]。但是目前为止, DNMT3a 通过基因内部甲基化维持基因的转录或直接激活基因转录的潜在的机制还未有深入而详细的报道。

目前认为 LINE-1 启动子高水平甲基化修饰对于 LINE-1 转录具有显著抑制作用^[32],但是关于基因内部甲基化能否调控 LINE-1 的转录依旧研究尚浅。本实验室前期研究结果也显示:当乳腺癌细胞暴露于化疗药物紫杉醇(paclitaxel, PTX)时, LINE-1 表达水平的改变与其启动子甲基化水平变化并不存在显著相关性,这一结果引发了我们后续对 LINE-1 基因内部甲基化改变与 LINE-1 异常激活的关系的思考和探究。与处于 LINE-1 启动子区域的、密集存在并且形成 CpG 岛的 CpG 二核苷相比, LINE-1 基因内部的 CpG 二核苷处于散在分布状态。但是在位于 LINE-1 转录起始位点之后, Orf-1 开放阅读框内大约 500 bp 长度的序列上,却发现了相对于 LINE-1 基因其他区域更密集的 CpG 二核苷。因此,本研究旨在探索在化疗药物 PTX 作用下乳腺癌细胞中的 DNMT3a 能否通过提升 LINE-1 基因内部甲基化水平促进 LINE-1 的表达,进而提高乳腺癌细胞对化疗

药物的耐受性。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

人乳腺癌 ZR-75-1 细胞系、MCF-7 细胞系、MDA-MB-468 细胞系、MDA-MB-453 细胞系、MDA-MB-231 细胞系均购于美国 ATCC 公司。

人乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 培养于含有 10% 小牛血清(NCBS)、200 U/mL 青霉素和 100 U/mL 链霉素的 L15 培养液中。人乳腺癌细胞系 MDA-MB-453、ZR-75-1 和 MDA-MB-468 均培养于含有 10% 胎牛血清(FBS)、200 U/mL 青霉素和 100 U/mL 链霉素的 L15 培养液中。人乳腺癌细胞系 MCF-7 培养与含有 10% 胎牛血清(FBS)、0.01 mg/mL 胰岛素、200 U/mL 青霉素和 100 U/mL 链霉素的 MEM 培养液中。上诉细胞均培养于 37℃、5% CO₂、饱和湿度的细胞培养箱中。所有实验均使用处于对数生长期的细胞。

1.2 脂质体介导的细胞转染

人乳腺癌细胞系以合适的密度(转染过表达质粒时细胞密度应为 70%~90%,而转染 si-RNA 时细胞密度应为 30%~50%)接种于相应的孔板中。接种 16 h 后,按使用说明书将适量的 Lipofectamine 3000(Thermo Fisher, 美国)均匀稀释于 50 倍体积的 L15 培养液中,之后将对应的 DNMT3a 过表达质粒或 si-RNA (质粒和 Lipo 的质量体积比为 2:1,而 si-RNA 和 Lipo 的体积比也为 2:1)分别均匀稀释于 50 倍体积的 L15 培养液中(如果稀释的是质粒,则需要加入和 Lipo 相同体积的 P3000,而如果稀释的是 si-RNA 则不用添加 P3000),室温静置 5 min。将稀释后的质粒或 si-RNA 和稀释后的 Lipofectamine 3000 混匀,室温孵育 5 min。吸弃孔板中的原培养液,分别将合适体积的 L15 培养液加入每个培养皿。最后将孵育好的混合液分别加入对应的培养皿中,轻晃混匀。将培养皿放置于培养箱中静置培养 4~6 h,之后更换细胞对应的完全培养液正常培养。转染后 24 h、36 h、48 h 后收样。

1.3 总 RNA 提取和 Real-time PCR

收集约 1×10^6 个细胞,使用 Trizol 法(Invitrogen, 美国)提取细胞全 RNA,采用微量紫外分光光度计测定 RNA 浓度以及纯度($D_{260/280}$ 在 1.8~2.0 之间为宜),500 ng RNA 使用逆转录试剂盒(南京诺唯赞生物科技有限公司)逆转录为 cDNA。以 cDNA 为模版,使用 SYBR Green I Master Mix (TaKaRa, 日本)在 Real-time PCR 仪器上检测 LINE-1 Orf-1 和 Orf-2 mRNA 的相对表达量。反应条件为:95 10 min, 95 10 s, 60 30 s, 72 20 s; 35 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 进行相对定量分析。所用引物序列见表 1。

1.4 Western blot 分析

RIPA 裂解法提取收集细胞总蛋白,采用 BCA 法检测蛋白浓度。Western blot 法检测乳腺癌细胞系中 DNMT3a 蛋白表达量。SDS-PAGE 进行蛋白分离,蛋白上样量为 30 μ g/孔,恒压电流,堆积胶 80 V,分离胶 120 V。湿转法进行蛋白转膜,冰浴中以 100V 恒压电转 60 min。质量分数 5%的脱脂奶粉室温封闭 2 h。按照体积比 1 2000 比例加入 TBST 稀释的 DNMT3a 抗体,4 轻摇过夜。次日取出聚偏氟乙烯膜, TBST 清洗 3 次,每次 15 min。按照体积比 1 5000 比例加入 TBST 稀释的二抗,室温轻摇 2 h。取出二抗孵育的聚偏氟乙烯膜, TBST 清洗 3 次,每次 15 min。辣根过氧化物酶化学发光法显色。最后使用 Image J 软件对曝光所得的蛋白条带进行灰度分析。

1.5 甲基化特异性 PCR (methylation specific PCR, MSP)

收集约 1×10^6 个细胞,使用基因组 DNA 提取试剂盒(Axygen, 美国)提取细胞基因组 DNA,采用微量紫外分光光度计测定 DNA 浓度以及纯度。500 ng

DNA 使用重亚硫酸盐修饰试剂盒(ZYMO, 美国)进行修饰。以修饰后的 DNA 作为模版,使用 SYBR Primix Ex Taq II (TaKaRa, 日本)在 Real-time PCR 仪器上检测 LINE-1 启动子区域和基因内部的甲基化修饰水平。LINE-1 启动子区段对应的引物为 LINE1-Promoter-MSP, 而 LINE-1 基因内部两个区段 S1 和 S2 分别对应的引物为 LINE1-GB1-MSP 和 LINE1-GB2-MSP。反应条件为:95 10 min, 95 10 s, 60 30 s; 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 进行相对定量分析。所用引物序列见表 2。

1.6 染色质免疫共沉淀(chromatin immunoprecipitation, ChIP)

收集约 1×10^7 个细胞,使用 ChIP 试剂盒(Magna, 美国)提取碎片化的基因组 DNA 片段,并将基因组 DNA 片段分装为 3 份。第一份基因组 DNA 片段和 20 μ L 磁珠、3 μ g DNMT3a 抗体(Santa-Cruz sc-20703, 美国)混匀孵育过夜,第二份基因组 DNA 片段和 20 μ L 磁珠、3 μ L 无免疫性 IgG 抗体混匀孵育过夜,第三份基因组 DNA 作为 Input。孵育过后,磁珠将按照操作手册进行清洗并解交联得到 DNA 片段。使用解交联得到的 DNA 片段作为模版,在 Real-time PCR 仪器上检测 LINE-1 和 DNMT3a 是否存在相互作用,并且确定 DNMT3a 在 LINE-1 上的具体结合位置。引物 LINE-1-SP 对应的片段为 LINE-1 启动子中的片段 SP,而引物 LINE-1-SGB1 所对应的片段为 SGB1,引物 LINE-1-SGB2 所对应的片段为 SGB2,以此类推。反应条件为:95 10 min, 95 10 s, 60 30 s, 72 20 s; 35 个循环。以 Input 的 Ct

表 2 甲基化特异性 PCR 所用引物

Table 2 The primers of methylation-specific PCR

引物名称	引物序列(5'→3')
LINE1-Promoter-MSP	F: GTCGAATAGGAATAGTTTCGG
	R: ACTCCCTAACCCCTTACGCT
LINE1-GB1-MSP	F: GTTTAGATTTAGGAAATATAGAGAAC
	R: CTAACCTATAAAATTCTACCGAA
LINE1-GB2-MSP	F: GTTGGATGGAGAATGATTTTGAC
	R: TTAATCACATCGACTCCTAAAAC
Actin-MSP	F: TGGTGATGGAGGAGGTTTAGTAAG
	R: AACCAATAAAACCTACTCTCCCTTAA

表 1 Real-time PCR 所用引物

Table 1 The primers of real-time PCR

引物名称	引物序列(5'→3')
L1-Orf-1	F: CCCCAATCTAGCAAGG
	R: AGAGATCCACTGTTAGT
L1-Orf-2	F: AAATGGTGCTGGGAAAACCTG
	R: GCCATTGCTTTTGGTGTTTT

值作为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 进行相对定量分析。所用引物序列见表 3。

1.7 统计学分析

实验数据以 3 次实验的平均值和标准误(mean \pm SEM)表示。组间比较用 t 检验, $P<0.05$ 时, 为差异具有统计学意义(用*表示), $P<0.01$ 时为差异显著(用**表示)。

2 结果与分析

2.1 PTX 处理促进 MDA-MB-231 乳腺癌细胞系中 DNMT3a 蛋白和 LINE-1 mRNA 的表达并提升 LINE-1 基因内部区域甲基化水平

利用 100 nmol/LPTX 处理 MDA-MB-231 乳腺癌细胞后, 结果发现细胞内 LINE-1 的 mRNA 表达水平显著升高(图 1A)。为探究该现象与 LINE-1 启动

子去甲基化是否存在相关性, 本研究使用 MSP 检测 LINE-1 启动子甲基化水平, 结果显示 PTX 处理前后 LINE-1 启动子甲基化水平并未发生显著性变化 ($P>0.05$) (图 1B)。

由于 LINE-1 转录起始位点后, Orf-1 开放阅读框中大约 500 bp 长度的区域内存在相对密集的 CpG 二核苷, 为检测该区段的甲基化水平, 设计了两对 MSP 引物(对应片段为 S1 和 S2)(图 1C), 通过甲基化特异性 PCR 扩增这两个片段。

MSP 实验结果显示: 与未处理的 MDA-MB-231 细胞相比, 经过 PTX 处理的细胞中片段 S1 和片段 S2 对应的 LINE-1 基因内部区段的甲基化水平显著上升(图 1D), 并且还伴随着细胞中 DNMT3a 蛋白表达上升(图 1E)。

以上结果提示 PTX 处理引起的乳腺癌细胞中 LINE-1mRNA 表达水平的上升可能是通过提升 LINE-1 基因内部甲基化水平而非降低其启动子甲基化水平完成的, 并且 DNMT3a 可能参与了该调节过程。

2.2 PTX 诱导乳腺癌细胞中 DNMT3a 的表达并促进其与 LINE-1 基因内部区域的结合

为了证实上述推论, 通过 ChIP 技术检测 MDA-MB-231 细胞中 DNMT3a 和 LINE-1 是否存在直接相互作用。实验选取 LINE-1 启动子区域和基因内部长度大约为 800 bp 的富含散在 CpG 二核苷的区域上分别设计引物, 以探索 DNMT3a 在 LINE-1 的具体结合位置(图 2A)。

结果显示: 在 MDA-MB-231 乳腺癌细胞中 DNMT3a 未与 LINE-1 启动子区域结合, 而是结合在 LINE-1 基因内部(图 2B), 并且检测到的 DNMT3a 结合区域与检测 LINE-1 基因内部甲基化时引物 LINE-1-GB1-MSP 和 LINE-1-GB2-MSP 所对应的区域(片段 S1 和 S2)相重合。使用 100 nmol/L PTX 处理细胞后, DNMT3a 和 LINE-1 基因内部的结合增加(图 2C)。

为进一步探究 DNMT3a 是否介导了 PTX 引起的 LINE-1 mRNA 表达水平上调, 经 PTX 处理 MDA-MB-231 细胞后使用 DNMT3asi-RNA 干扰 DNMT3a 蛋白表达, 并检测 LINE-1 的转录水平和其甲基化水平。结果表明: 干扰 DNMT3a 蛋白的表达(图 3A)可以部分逆转因 PTX 引起的 LINE-1 mRNA 上调

表 3 染色质免疫共沉淀所用引物

Table 3 The primers of chromatin immunoprecipitation assays

引物名称	引物序列(5'→3')
LINE-1-SP	F: TCACTAGGGAGTGCCAGACAG R: ATTTTCCAGGTGCGACCGTCA
LINE-1-SGB1	F: GTAGATAAAACCACAAAGATG R: TTGACGAGCTGAGAGAAGAAG
LINE-1-SGB2	F: GGAACGCAGTTCCTCACCAGC R: ATGTATAACTAGATAAACCAA
LINE-1-SGB3	F: GGCAAAGAAGTTGAAAACCTTG R: TCAGCTCCATCAGCTCCTTTA
LINE-1-SGB4	F: AAGGAGCTGATGGAGCTGAAA R: CTAAACTTCCCTTCTCGCTTCA
LINE-1-SGB5	F: CCGATGCGATCAACTGGAAGA R: TAAACTTCCCTTCTCGCTTCA
LINE-1-SGB6	F: CCAAGAAATATGGGACTATGT R: TAGATTGGGGAAGTTCTCCTG
LINE-1-SGB7	F: CAGGAGAACTTCCCAATCTA R: CTGGCTGCCCTTAACATTT
LINE-1-SGB8	F: CAGATTACCAAAGTTGAAATG R: CCACTCTCTTCTGGCTTGTA

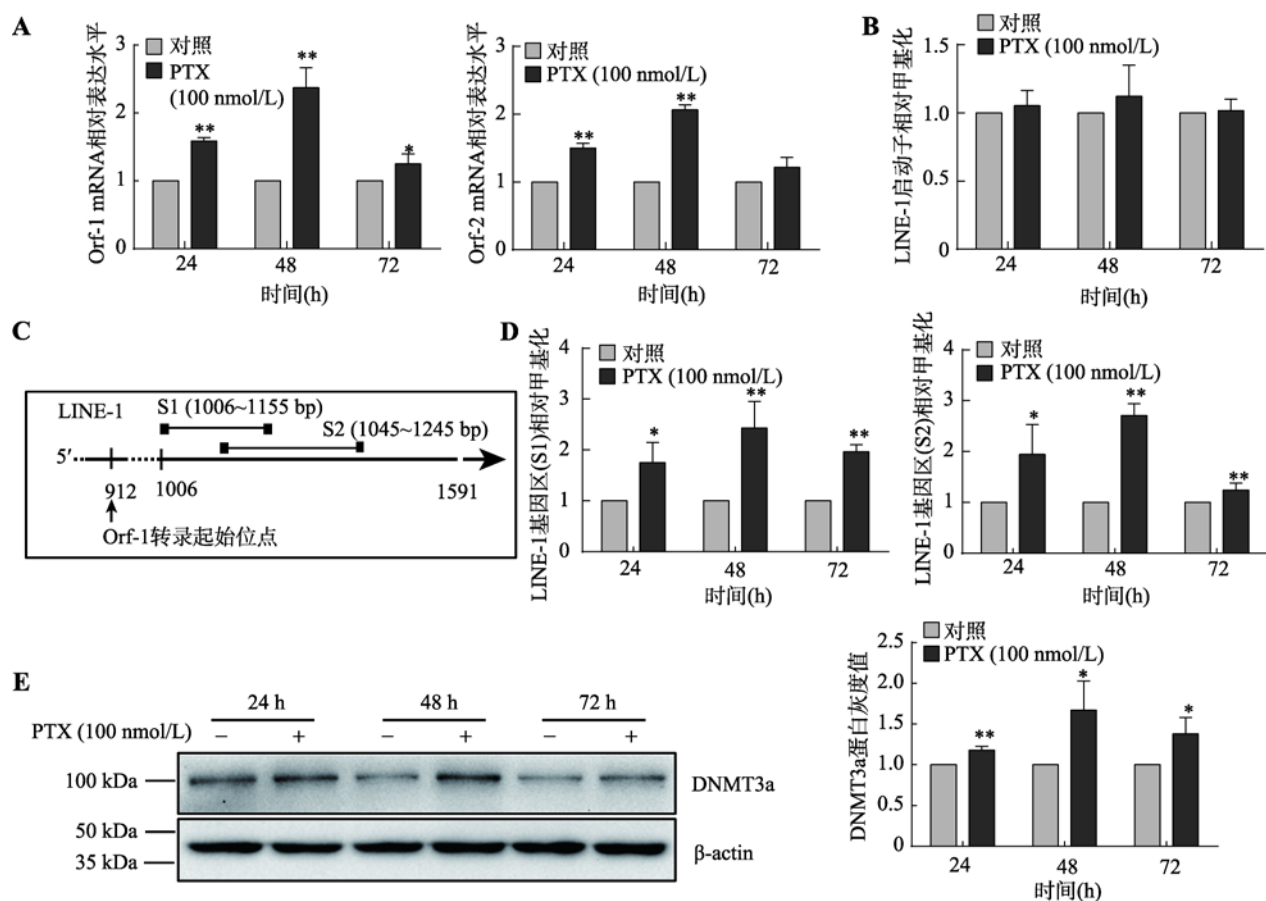


图 1 PTX 处理上调乳腺癌细胞中 DNMT3a 蛋白和 LINE-1 mRNA 表达并提升 LINE-1 基因内部而非启动子区的甲基化水平

Fig. 1 PTX treatment up-regulates the expression of DNMT3a proteins and LINE-1 mRNA in breast cancer cells and increases the methylation level of the LINE-1 gene body rather than the promoter region

A: Real-time PCR 检测 PTX 处理后 MDA-MB-231 乳腺癌细胞中 LINE-1 的 mRNA 水平; B: MSP 检测 PTX 处理后 MDA-MB-231 细胞中 LINE-1 启动子甲基化水平; C: 利用甲基化特异性 PCR 扩增的 LINE-1 基因内部相应片段(S1 和 S2)位置示意图, 片段位于 LINE-1 Orf-1 开放阅读框架中长度约 500 bp 富含 CpG 的区域; D: MSP 检测 PTX 处理后 MDA-MB-231 细胞中 LINE-1 基因内部甲基化水平; E: Western blot 检测 PTX 处理后 MDA-MB-231 细胞中 DNMT3a 蛋白的表达及相应的灰度分析结果。*: $P < 0.05$ 表示有差异; **: $P < 0.01$ 表示差异显著。

(图 3B)和基因内部甲基化水平的升高(图 3C), 且该过程中 LINE-1 启动子甲基化水平始终未发生显著性变化($P > 0.05$) (图 3C)。

以上结果表明: MDA-MB-231 细胞在 PTX 刺激作用下能够通过提高 DNMT3a 蛋白的表达, 使更多的 DNMT3a 蛋白和 LINE-1 基因区域结合, 提升 LINE-1 基因内部甲基化水平。

2.3 DNMT3a 通过提升 LINE-1 基因内部甲基化水平正向调控 LINE-1 的转录

为进一步探索乳腺癌细胞中 DNMT3a 与 LINE-1

mRNA 水平上调的关系, 本研究检测了 5 种乳腺癌细胞系中 DNMT3a 蛋白的表达水平和 LINE-1 的 mRNA 水平, 发现二者的表达呈现正相关性(图 4, A 和 B)。

随后选择在 MDA-MB-231 和 MDA-MB-453 两种乳腺癌细胞系中过表达 DNMT3a 蛋白, 以探索 LINE-1 mRNA 表达水平否发生相应的上升。结果显示: 在 MDA-MB-231 和 MDA-MB-453 两种乳腺癌细胞中过表达 DNMT3a 蛋白后(图 5A), 细胞中 LINE-1 mRNA 表达上调的同时(图 5B), 也促进了细胞内 DNMT3a 和 LINE-1 基因内部的结合(图 5C)。

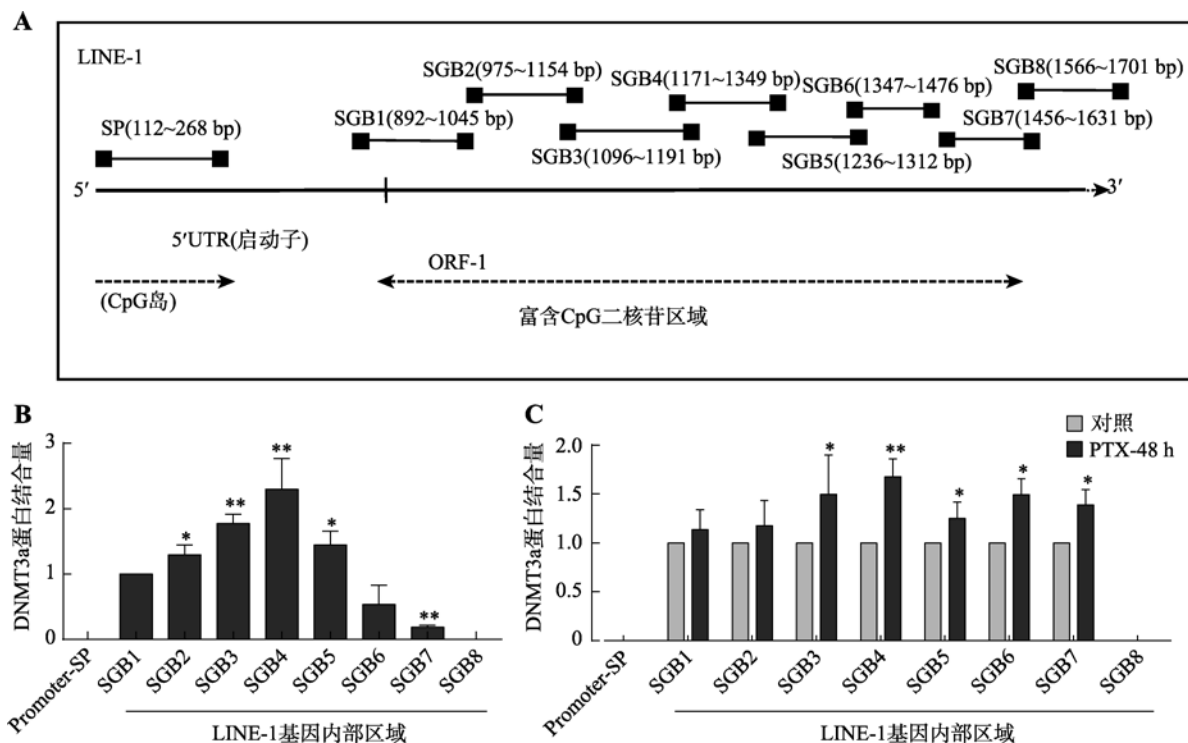


图 2 DNMT3a 结合在 LINE-1 基因内部

Fig. 2 DNMT3a protein binds inside the LINE-1 gene body region

A: LINE-1 启动子区域和基因内部 ChIP-PCR 检测区段位置示意图; B: ChIP 检测在 MDA-MB-231 乳腺癌细胞中 DNMT3a 蛋白与 LINE-1 启动子区和基因内部区域的结合情况; C: ChIP 检测 MDA-MB-231 细胞经 PTX 处理后 DNMT3a 在 LINE-1 基因不同区段的结合情况。*: $P < 0.05$ 表示有差异; **: $P < 0.01$ 表示差异显著。

与此同时两种乳腺癌细胞系中 LINE-1 启动子甲基化水平并未发生显著性变化($P > 0.05$), 但是 LINE-1 基因内部甲基化水平却发生了显著提升(图 5D)。

3 讨论

乳腺癌作为女性最为常见的恶性肿瘤, 其发病率和死亡率多年以来一直高居女性肿瘤的首位, 严重威胁着女性健康。随着医疗科技的发展, 目前已经发展出多种治疗乳腺癌的方式, 包括手术切除治疗、放疗、内分泌治疗、化疗以及生物靶向治疗。其中化疗仍是乳腺癌系统治疗的重要手段之一, 但是肿瘤细胞耐药性的普遍产生已经成为了阻碍化疗成功的主要原因。因此研究探索乳腺癌耐药性产生机制对于进一步的推进化疗的有效性具有重要意义。

长散在重复序列 LINE-1 的异常激活是影响细胞基因组不稳定性、增加细胞耐药性的因素之一。LINE-1 在正常细胞中不表达而在多种肿瘤细胞(包

括乳腺癌细胞)中异常激活^[7]。有研究表明乳腺癌细胞中异常激活的 LINE-1 能够通过自身靶点引导的逆转录过程插入多种抑癌基因的基因区域^[24], 从而抑制这些基因的表达或直接破坏基因的完整性; 或通过不同基因之间的同源重组概率、引起大片的基因重复或缺失等途径使肿瘤细胞基因组不稳定性增加^[14-17]。目前, 人们对于乳腺癌耐药性形成的机制已经有了一定的研究, 包括对药物造成的 DNA 损伤的精准修复^[33]、全基因组甲基化水平紊乱推动耐药基因的异常表达^[34]等。而基因组不稳定作为肿瘤的特征之一, 也能通过增进肿瘤异质性、促进肿瘤的克隆演变^[19-21]等方式促进肿瘤产生原发性耐药, 或获得性耐药表型。因此研究 LINE-1 在乳腺癌如何被异常激活, 对于了解乳腺癌细胞基因组不稳定性形成以及耐药性形成的原因具有重要的帮助作用。

多种肿瘤细胞中 LINE-1 的转录均受其启动子甲基化水平的负调控, 但是本研究结果却发现 MDA-MB-231 乳腺癌细胞系在面对 100 nmol/L PTX 刺激

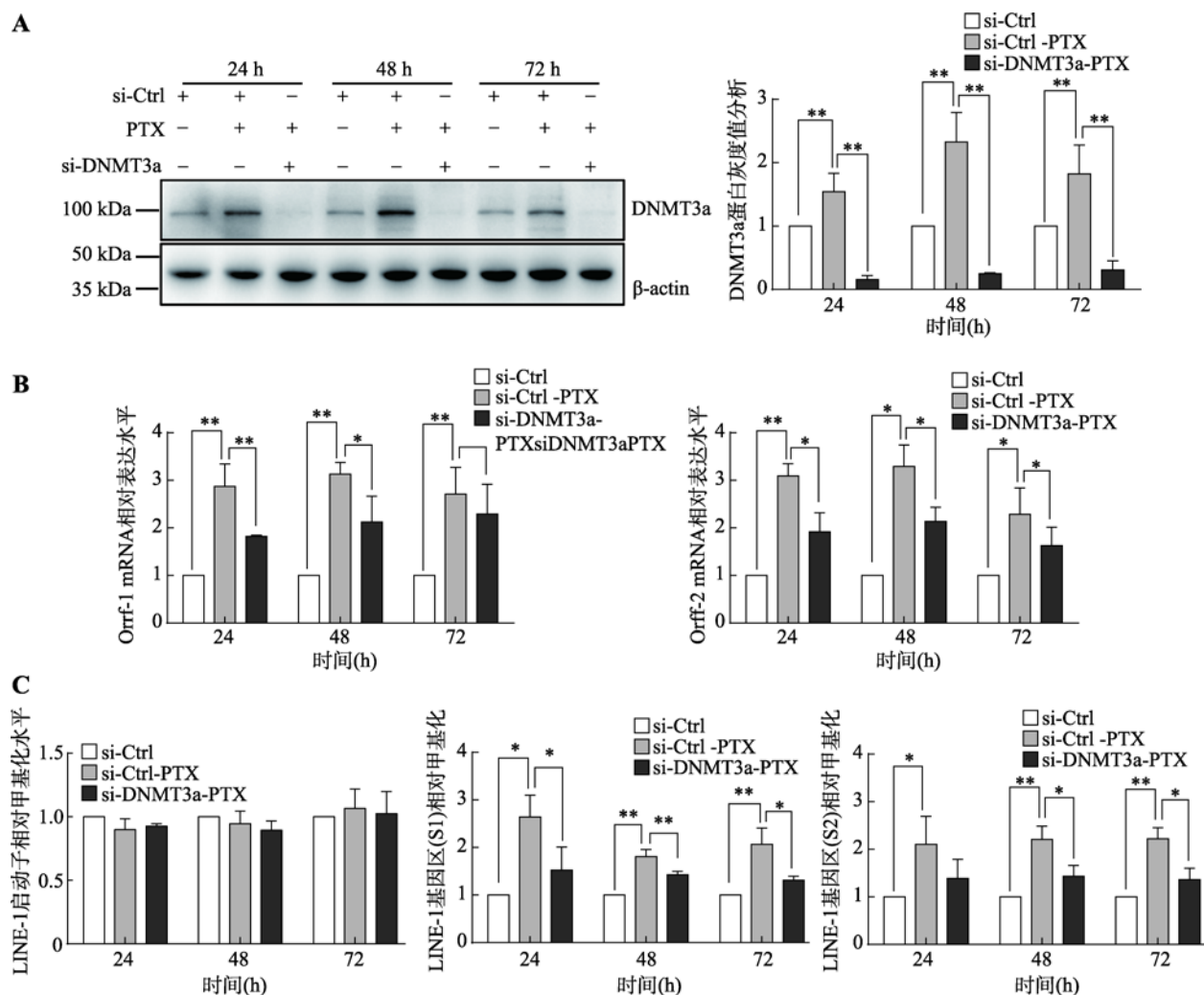


图 3 抑制 DNMT3a 蛋白的表达能部分逆转因 PTX 处理引起的 LINE-1 mRNA 表达水平的上升

Fig. 3 Inhibit the expression of DNMT3a could partly reverse the upregulation of LINE-1 mRNA induced by the PTX stimulation

A: Western blot 检测 MDA-MB-231 乳腺癌细胞中 si-DNMT3a 对 DNMT3a 蛋白表达的抑制情况及相应的灰度分析结果; B: Real-time PCR 检测抑制 DNMT3a 表达对 PTX 处理后 LINE-1 mRNA 表达情况的影响; C: MSP 检测抑制 DNMT3a 表达对 PTX 处理后 LINE-1 启动子区和基因内部区段甲基化水平的影响。*: $P < 0.05$ 表示有差异; **: $P < 0.01$ 表示差异显著。

时, LINE-1 可以在维持启动子甲基化水平不变的情况下提高自身转录水平, 与此同时 LINE-1 基因内部甲基化水平显著提升。与基因沉默相关联的启动子甲基化相比, 基因内部甲基化常与多种基因的高表达相关联^[35,36]。许多研究已经证明基因内部甲基化在多种生理学和疾病发生发展进程中通过转录调控、增强子活化、基因内部启动子沉默、反义链转录沉默等调控相应基因的表达和功能发挥^[35-37]。因此这些结果提示在乳腺癌细胞面对 PTX 刺激时, 细胞中 LINE-1 基因内部甲基化水平的升高可能导致 LINE-1

转录水平的提升。

在 DNA 甲基转移酶家族成员中, 目前认为具有“从头合成甲基化”活性的 DNMT3a 和 DNMT3b 能够参与到基因内部甲基化的修饰调控过程中^[30,31]。本研究结果显示: MDA-MB-231 乳腺癌细胞中 DNMT3a 不仅能够和 LINE-1 基因内部区域发生直接的相互作用, 并且在细胞面对 PTX 刺激时, 细胞也能通过上调 DNMT3a 蛋白的表达从而提升 LINE-1 基因内部的甲基化水平, 最终显著上调 LINE-1 的转录。且在两种 DNMT3a 和 LINE-1 均低表达的乳腺

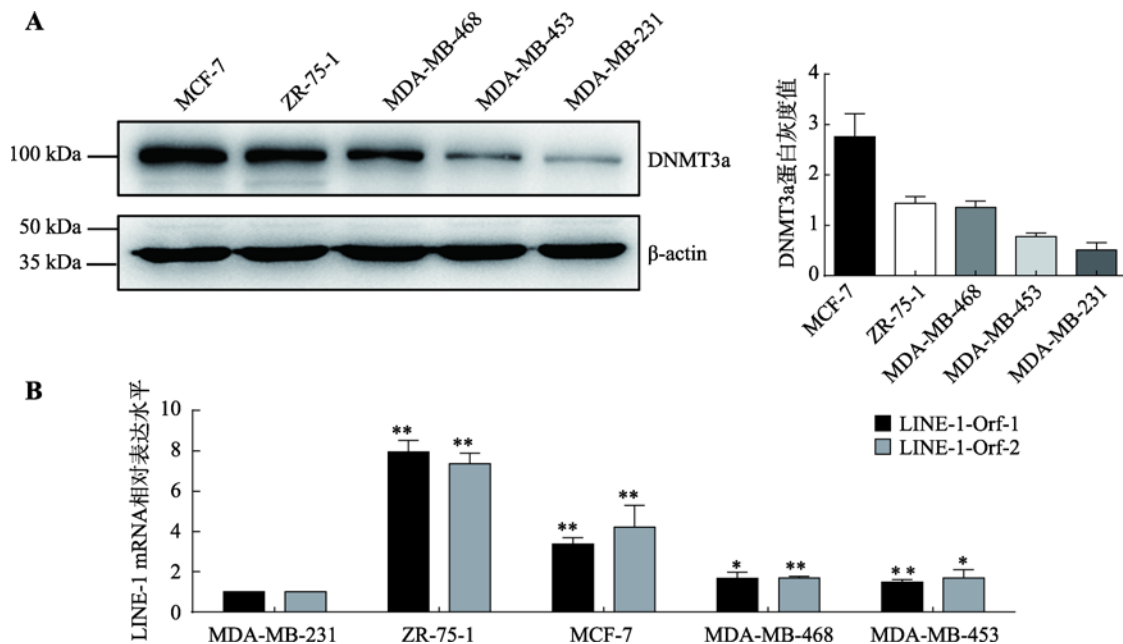


图 4 各个乳腺癌细胞系中 DNMT3a 蛋白表达和 LINE-1 mRNA 水平

Fig. 4 The expression of LINE-1 mRNA and DNMT3a protein levels in five breast cancer cells

A: Western blot 检测 5 种乳腺癌细胞系中 DNMT3a 蛋白的表达水平; B: Real-time PCR 检测 5 种乳腺癌细胞系中 LINE-1 mRNA 的表达水平。*: $P < 0.05$ 表示有差异; **: $P < 0.01$ 表示差异显著。

癌细胞(MDA-MB-231 和 MDA-MB-453)中直接过表达 DNMT3a 蛋白后发现, DNMT3a 蛋白能够在不改变 LINE-1 在其启动子甲基化水平的同时, 通过直接提升 LINE-1 基因内部甲基化水平从而正向调控 LINE-1 的转录。

但是基因内部甲基化上调 LINE-1 转录的机制还有待进一步的研究。有研究表明基因内部甲基化可能通过稳定转录单位(transcribed unit)的有序结构, 使得 RNA 聚合酶能够更加顺利的在转录单位中延伸, 提升转录单位获得参与转录的几率, 从而正向调控基因的转录^[36]。此外, 很多研究结果显示 DNA 甲基化的改变能够影响相应区域内组蛋白甲基化的形成, 并且反之亦然^[38-40]。某些处于激活状态的基因, 其启动子一般不存在 H3K36me3 而基因内部区域常带有高水平的 H3K36me3。并且这样的基因启动子区一般不存在甲基化或处于低甲基化水平, 而基因内部区域常常表现为高甲基化^[41,42]。这表明 H3K36me3 和基因内部甲基化的出现呈现一致性。并且因为 DNMT3a 能够作用于基因内部甲基化的同时, 其蛋白中的 PWWP 结构域与 H3K36me3 之间又存在直接相互作用^[43], 而 H3K36me3 作为转录激活

性的组蛋白标志物, 能够促进基因的转录。所以 DNMT3a 可能通过促进基因内部甲基化的形成从而招募转录激活性的 H3K36me3 组蛋白从而促进基因的转录^[44]。而这些仍需要进一步的探索和研究。

在乳腺癌细胞中 DNMT3a 蛋白的表达可以作为 LINE-1 异常激活的因素之一, 并且 LINE-1 的转录在受其启动子甲基化水平负调控的同时, 也会受到其基因内部甲基化水平的正向调控。虽然目前的研究对于 DNMT3a 和乳腺癌耐药性的相关研究还比较少, 但本研究结果显示, 化疗药物作用后 DNMT3a 在乳腺癌组织中的表达上调, 且正向调控 LINE-1 的转录, 促进乳腺癌耐药表型的形成。这提示在乳腺癌的化疗过程中, 在以 PTX 为主的化疗方案中同时抑制 DNMT3a 的表达可能会取得更好的化疗效果。但这一推测仍需要进一步的研究证实。

综上所述, 本研究发现在乳腺癌细胞系中 DNMT3a 能够直接结合到 LINE-1 基因内部, 通过提升 LINE-1 基因内部的散在分布的 CpG 二核苷的甲基化水平, 从而正向调控 LINE-1 mRNA 的表达水平。并且在细胞面对化疗药物刺激时, DNMT3a 也能通过相同的机制提升 LINE-1 mRNA 的表达水平。本研究结果为

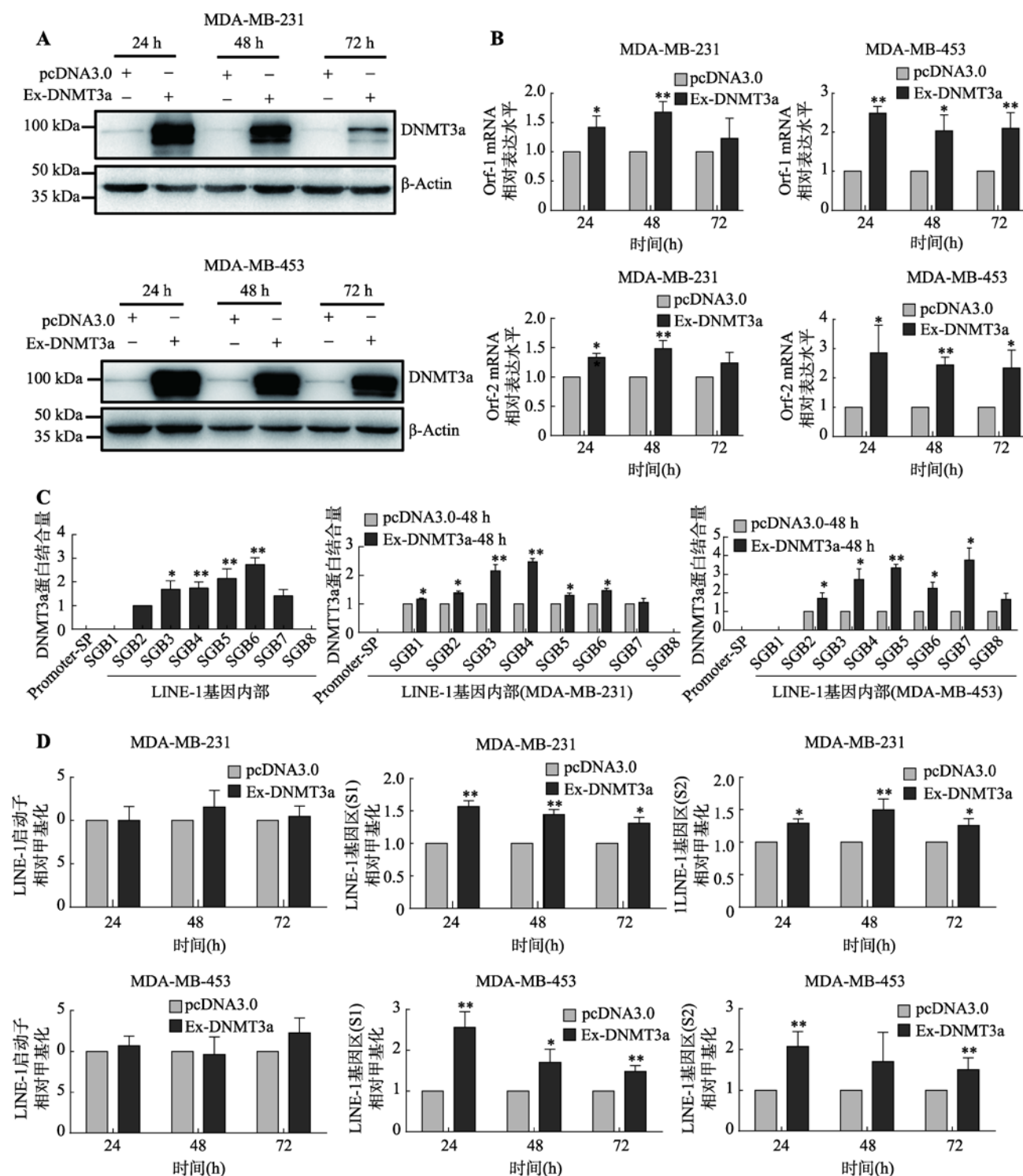


图 5 DNMT3a 在乳腺癌细胞系中通过提升 LINE-1 基因内部甲基化水平从而正向调控 LINE-1 的转录

Fig. 5 DNMT3a up-regulates the transcription of LINE-1 in breast cancer cells by enhancing the methylation of the LINE-1 gene body region

A: Western blot 检测 MDA-MB-231 和 MDA-MB-453 乳腺癌细胞中转染 DNMT3a 过表达质粒后 DNMT3a 蛋白的表达情况; B: Real-time PCR 检测在 MDA-MB-231 和 MDA-MB-453 乳腺癌细胞中过表达 DNMT3a 蛋白后 LINE-1 mRNA 的表达水平; C: ChIP 检测过表达 DNMT3a 对其与 LINE-1 基因启动子区和基因内部区域结合情况的影响; D: MSP 检测过表达 DNMT3a 对 LINE-1 启动子和基因内部甲基化水平的影响。*: $P < 0.05$ 表示有差异; **: $P < 0.01$ 表示差异显著。

探索 LINE-1 在乳腺癌化疗耐药过程中异常激活的原因提供了一定的新思路。

参考文献(References):

- [1] Wei R, Lau SSS, Cheung PSY. Breast carcinoma in chinese women: Does age affect treatment choice and outcome? *Asian J Surg*, 2010, 33(2): 97–102. [DOI]
- [2] Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*, 2010, 127(12): 2893–2917. [DOI]
- [3] Clarke R, Tyson JJ, Dixon JM. Endocrine resistance in breast cancer--An overview and update. *Mol Cell Endocrinol*, 2015, 418 Pt 3: 220–234. [DOI]
- [4] Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(12): 5925–5930. [DOI]
- [5] Rivera E. Management of metastatic breast cancer: monotherapy options for patients resistant to anthracyclines and taxanes. *Am J Clin Oncol*, 2010, 33(2): 176–185. [DOI]
- [6] Bao WD, Kojima KK, Kohany O. Repbase update, a database of repetitive elements in eukaryotic genomes. *Mob DNA*, 2015, 6: 11. [DOI]
- [7] Belancio VP, Hedges DJ, Deininger P. Mammalian non-LTR retrotransposons: for better or worse, in sickness and in health. *Genome Res*, 2008, 18(3): 343–358. [DOI]
- [8] Beck CR, Garcia-Perez JL, Badge RM, Moran JV. LINE-1 elements in structural variation and disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2011, 12: 187–215. [DOI]
- [9] Liu Q, Wang JH, Li XY, Cen S. The connection between LINE-1 retrotransposition and human tumorigenesis. *Hereditas(Beijing)*, 2016, 38(2): 93–102.
刘茜, 王瑾晖, 李晓宇, 岑山. 逆转录转座子 LINE-1 与肿瘤的发生和发展. *遗传*, 2016, 38(2): 93–102. [DOI]
- [10] Belgnaoui SM, Gosden RG, Semmes OJ, Haoudi A. Human LINE-1 retrotransposon induces DNA damage and apoptosis in cancer cells. *Cancer Cell Int*, 2006, 6: 13. [DOI]
- [11] Feng Q, Moran JV, Kazazian HH Jr, Boeke JD. Human L1 retrotransposon encodes a conserved endonuclease required for retrotransposition. *Cell*, 1996, 87(5): 905–916. [DOI]
- [12] Martin SL, Li J, Epperson LE, Lieberman B. Functional reverse transcriptases encoded by A-type mouse LINE-1: defining the minimal domain by deletion analysis. *Gene*, 1998, 215(1): 69–75. [DOI]
- [13] Farkash EA, Kao GD, Horman SR, Prak ET. Gamma radiation increases endonuclease-dependent L1 retrotransposition in a cultured cell assay. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(4): 1196–1204. [DOI]
- [14] Gasior SL, Wakeman TP, Xu B, Deininger PL. The human LINE-1 retrotransposon creates DNA double-strand breaks. *J Mol Biol*, 2006, 357(5): 1383–1393. [DOI]
- [15] Garcia-Perez JL, Doucet AJ, Bucheton A, Moran JV, Gilbert N. Distinct mechanisms for trans-mediated mobilization of cellular RNAs by the LINE-1 reverse transcriptase. *Genome Res*, 2007, 17(5): 602–611. [DOI]
- [16] Wei W, Gilbert N, Ooi SL, Lawler JF, Ostertag EM, Kazazian HH, Boeke JD, Moran JV. Human L1 retrotransposition: cis preference versus trans complementation. *Mol Cell Biol*, 2001, 21(4): 1429–1439. [DOI]
- [17] Kines KJ, Sokolowski M, deHaro DL, Christian CM, Baddoo M, Smither ME, Belancio VP. The endonuclease domain of the LINE-1 ORF2 protein can tolerate multiple mutations. *Mob DNA*, 2016, 7: 8. [DOI]
- [18] Okano M, Xie S, Li E. Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat Genet*, 1998, 19(3): 219–220. [DOI]
- [19] Brusa G, Benvenuti M, Mazzacurati L, Mancini M, Pattacini L, Martinelli G, Barbieri E, Greenberger JS, Baccarani M, Santucci MA. p53 loss of function enhances genomic instability and accelerates clonal evolution of murine myeloid progenitors expressing the p(210)BCR-ABL tyrosine kinase. *Haematologica*, 2003, 88(6): 622–630. [DOI]
- [20] Greaves M, Maley CC. Clonal evolution in cancer. *Nature*, 2012, 481(7381): 306–313. [DOI]
- [21] Ng CK, Pemberton HN, Reis-Filho JS. Breast cancer intratumor genetic heterogeneity: causes and implications. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2012, 12(8): 1021–1032. [DOI]
- [22] Chen L, Dahlstrom JE, Chandra A, Board P, Rangasamy D. Prognostic value of LINE-1 retrotransposon expression and its subcellular localization in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 2012, 136(1): 129–142. [DOI]
- [23] Park SY, Seo AN, Jung HY, Gwak JM, Jung N, Cho NY, Kang GH. Alu and LINE-1 hypomethylation is associated with HER2 enriched subtype of breast cancer. *PLoS One*, 2014, 9(6): e100429. [DOI]
- [24] Feng F, Lu YY, Zhang F, Gao XD, Zhang CF, Meredith A, Xu ZX, Yang YT, Chang XJ, Wang H, Qu JH, Zeng Z, Yang JL, Wang CP, Zhu YF, Cui JJ, Yang YP. Long interspersed nuclear element ORF-1 protein promotes proliferation and resistance to chemotherapy in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*, 2013, 19(7): 1068–1078. [DOI]
- [25] Chen Y, Zeng Q, Liu X, Fu J, Zeng Z, Zhao Z, Liu Z, Bai W, Dong Z, Liu H, Lu X, Zhu Y, Lu Y. LINE-1 ORF-1p enhances the transcription factor activity of pregnenolone X receptor and promotes sorafenib resistance in hepato-

- cellular carcinoma cells. *Cancer Manag Res*, 2018, 10: 4421–4438. [DOI]
- [26] Suzuki MM, Bird A. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nat Rev Genet*, 2008, 9(6): 465–476. [DOI]
- [27] Jin B, Robertson KD. DNA methyltransferases, DNA damage repair, and cancer. *Adv Exp Med Biol*, 2013, 754: 3–29. [DOI]
- [28] Yang L, Rau R, Goodell MA. DNMT3A in haematological malignancies. *Nat Rev Cancer*, 2015, 15(3): 152–165. [DOI]
- [29] Jeong M, Sun D, Luo M, Huang Y, Challen GA, Rodriguez B, Zhang X, Chavez L, Wang H, Hannah R, Kim SB, Yang L, Ko M, Chen R, Göttgens B, Lee JS, Gunaratne P, Godley LA, Darlington GJ, Rao A, Li W, Goodell MA. Large conserved domains of low DNA methylation maintained by Dnmt3a. *Nat Genet*, 2014, 46(1): 17–23. [DOI]
- [30] Wu H, Coskun V, Tao J, Xie W, Ge W, Yoshikawa K, Li E, Zhang Y, Sun YE. Dnmt3a-dependent nonpromoter DNA methylation facilitates transcription of neurogenic genes. *Science*, 2010, 329(5990): 444–448. [DOI]
- [31] Yang X, Han H, De Carvalho DD, Lay FD, Jones PA, Liang G. Gene body methylation can alter gene expression and is a therapeutic target in cancer. *Cancer Cell*, 2014, 26(4): 577–590. [DOI]
- [32] Yoder JA, Walsh CP, Bestor TH. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet*, 1997, 13(8): 335–340. [DOI]
- [33] Ray Chaudhuri A, Callen E, Ding X, Gogola E, Duarte AA, Lee JE, Wong N, Lafarga V, Calvo JA, Panzarino NJ, John S, Day A, Crespo AV, Shen B, Starnes LM, de Ruiter JR, Daniel JA, Konstantinopoulos PA, Cortez D, Cantor SB, Fernandez-Capetillo O, Ge K, Jonkers J, Rottenberg S, Sharan SK, Nussenzweig A. Replication fork stability confers chemoresistance in BRCA-deficient cells. *Nature*, 2016, 535(7612): 382–387. [DOI]
- [34] Du M, Su XM, Zhang T, Xing YJ. Aberrant promoter DNA methylation inhibits bone morphogenetic protein 2 expression and contributes to drug resistance in breast cancer. *Mol Med Rep*, 2014, 10(2): 1051–1055. [DOI]
- [35] Kulis M, Heath S, Bibikova M, Queirós AC, Navarro A, Clot G, Martínez-Trillos A, Castellano G, Brun-Heath I, Pinyol M, Barberán-Soler S, Papasaikas P, Jares P, Beà S, Rico D, Ecker S, Rubio M, Royo R, Ho V, Klotzle B, Hernández L, Conde L, López-Guerra M, Colomer D, Villamor N, Aymerich M, Rozman M, Bayes M, Gut M, Gelpí JL, Orozco M, Fan JB, Quesada V, Puente XS, Pisano DG, Valencia A, López-Guillermo A, Gut I, López-Otín C, Campo E, Martín-Subero JI. Epigenomic analysis detects widespread gene-body DNA hypomethylation in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet*, 2012, 44(11): 1236–1242. [DOI]
- [36] Maunakea AK, Nagarajan RP, Bilenky M, Ballinger TJ, D'Souza C, Fouse SD, Johnson BE, Hong C, Nielsen C, Zhao Y, Turecki G, Delaney A, Varhol R, Thiessen N, Shchors K, Heine VM, Rowitch DH, Xing X, Fiore C, Schillebeeckx M, Jones SJ, Haussler D, Marra MA, Hirst M, Wang T, Costello JF. Conserved role of intragenic DNA methylation in regulating alternative promoters. *Nature*, 2010, 466(7303): 253–257. [DOI]
- [37] Varley KE, Gertz J, Bowling KM, Parker SL, Reddy TE, Pauli-Behn F, Cross MK, Williams BA, Stamatoyannopoulos JA, Crawford GE, Absher DM, Wold BJ, Myers RM. Dynamic DNA methylation across diverse human cell lines and tissues. *Genome Res*, 2013, 23(3): 555–567. [DOI]
- [38] Sridhar VV, Kapoor A, Zhang K, Zhu J, Zhou T, Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu JK. Control of DNA methylation and heterochromatic silencing by histone H2B deubiquitination. *Nature*. 2007, 447(7145): 735–738. [DOI]
- [39] Schuettengruber B, Cavalli G. Recruitment of polycomb group complexes and their role in the dynamic regulation of cell fate choice. *Development*, 2009, 136(21): 3531–3542. [DOI]
- [40] Hawkins RD, Hon GC, Lee LK, Ngo Q, Lister R, Pelizzola M, Edsall LE, Kuan S, Luu Y, Klugman S, Antosiewicz-Bourget J, Ye Z, Espinoza C, Agarwahl S, Shen L, Ruotti V, Wang W, Stewart R, Thomson JA, Ecker JR, Ren B. Distinct epigenomic landscapes of pluripotent and lineage-committed human cells. *Cell Stem Cell*, 2010, 6(5): 479–491. [DOI]
- [41] Wagner EJ, Carpenter PB. Understanding the language of Lys36 methylation at histone H3. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012, 13(2): 115–126. [DOI]
- [42] Venkatesh S, Smolle M, Li H, Gogol MM, Saint M, Kumar S, Natarajan K, Workman JL. Set2 methylation of histone H3 lysine 36 suppresses histone exchange on transcribed genes. *Nature*, 2012, 489(7416): 452–455. [DOI]
- [43] Chen BF, Chan WY. The *de novo* DNA methyltransferase DNMT3A in development and cancer. *Epigenetics*, 2014, 9(5): 669–677. [DOI]
- [44] Deng DJ. DNA methylation and demethylation: current status and future perspective. *Hereditas(Beijing)*, 2014, 36(5): 403–410.
- 邓大君. DNA 甲基化和去甲基化的研究现状及思考. 遗传. 2014, 36(5): 403–410. [DOI]