

文章编号 1006-8147(2017)06-0485-04

论 著

二氢嘧啶脱氢酶基因 T85C 位点突变与乳腺癌细胞 5-氟尿嘧啶敏感性的关系

黄勇¹, 吕欣², 王伟², 马勇杰¹

(1.天津医科大学肿瘤医院肿瘤研究所, 国家肿瘤临床医学研究中心, 乳腺癌防治教育部重点实验室, 天津市“肿瘤防治”重点实验室, 天津市恶性肿瘤临床医学研究中心, 天津 300060; 2.天津医科大学公共卫生学院营养与食品卫生学系, 天津 300070)

摘要 目的:探讨二氢嘧啶脱氢酶基因(DPYD)T85C 位点突变对乳腺癌细胞 5-氟尿嘧啶(5-FU)敏感性的影响。方法:从肝脏组织中提取 mRNA,扩增得到野生型 DPYD 编码序列。利用定点突变技术,获得 T85C 定点突变的 DPYD 编码序列。将 GFP、野生型和突变型 DPYD 序列,连入 PCDH-CMV-MCS-EF1-Puro 载体。转染上述 3 种质粒到 MDA-MB-231 细胞中,获得稳定表达的细胞株。MTT 法检测不同浓度 5-FU(0、1、5、10、50 $\mu\text{g/mL}$)处理 24 h 后,细胞存活情况。结果:酶切验证 3 种重组质粒,观察到目的序列。测序验证定点突变质粒,突变位点发生 T 到 C 的改变。相比对照组,突变型细胞的存活率显著增高($P<0.01$),且突变型细胞存活率高于野生型($P<0.05$)。结论:DPYD 基因突变影响乳腺癌细胞对 5-FU 敏感性,T85C 突变型 DPYD 细胞对 5-FU 的敏感性显著降低。

关键词 乳腺癌;二氢嘧啶脱氢酶;突变;5-氟尿嘧啶;药物敏感性

中图分类号 R737.9

文献标志码 A

Relationship between T85C mutation in dihydropyrimidine dehydrogenase gene and sensitivity of breast cancer cell to 5-fluorouracil

HUANG Yong¹, LÜ Xin², WANG Wei², MA Yong-jie¹

(1.Cancer Institute and Hospital, Tianjin Medical University, National Clinical Research Center for Cancer, Key Laboratory of Breast Cancer Prevention and Therapy, Tianjin Medical University, Ministry of Education, Tianjin Key Laboratory of Cancer Prevention and Therapy, Tianjin's Clinical Research Center for Cancer, Tianjin 300060, China; 2.Department of Nutrition and Food Hygiene, School of Public Health, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract **Objective:** To explore the relationship between T85C mutation in dihydropyrimidine dehydrogenase gene (DPYD) and sensitivity of breast cancer cell to 5-fluorouracil(5-FU). **Methods:** Genomic mRNA was isolated from human liver tissue. DPYD coding sequence was amplified as wild type DPYD. The T was transformed into C by site-directed mutagenesis technique at nucleotide position 85 in DPYD. Then the sequences of GFP, wild type and mutation DPYD were inserted into PCDH-CMV-MCS-EF1-Puro vector respectively. The recombinant plasmids were transfected into MDA-MB-231 to obtain stable cells. After 24 hours of exposure to 5-FU at different concentrations (0, 1, 5, 10, 50 $\mu\text{g/mL}$), the cell viability was tested using the MTT colorimetric method. **Results:** The GFP, wild type and mutation DPYD were observed by restricting double enzyme digestion. The nucleotide of mutation DPYD transformed from T to C at 85 in DPYD coding sequence. Compared with control group, the mutation group cell survival rate was significantly increased ($P<0.01$), and the mutation group cell survival rate was higher than that of wild type group ($P<0.05$). **Conclusion:** The mutation of DPYD influences the sensitivity of breast cancer cell to 5-FU, and the sensitivity of T85C mutation phenotype cell to 5-FU could be significantly reduced.

Key words breast cancer; dihydropyrimidine dehydrogenase; mutation; 5-fluorouracil; drug sensitivity

乳腺癌是女性发病率最高的恶性肿瘤,根据我国癌症中心 2016 年发布的数据显示,我国 2013 年乳腺癌新发病例 28 万人次,死亡病例 6.5 万人次,且乳腺癌的发病率呈持续上升的趋势^[1]。术后化疗是乳腺癌辅助治疗的重要组成部分,可以显著延长

患者生存时间^[2],5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil,5-FU)通过影响细胞内核酸的合成,达到抑制细胞生长的效果,广泛用于乳腺癌、胃癌、结直肠癌、头颈癌等实体肿瘤的治疗^[3-4]。值得注意的是,80%以上的 5-FU 在肝脏内被代谢失活,二氢嘧啶脱氢酶基因(DPYD)编码的 DPD 蛋白是 5-FU 代谢失活的起始和限速酶^[5]。研究发现 DPYD 基因的 T85C 位点突变可能影响 DPD 酶活性^[6],DPD 的酶活性增高可加速细

基金项目 国家自然科学基金资助项目(81572851)

作者简介 黄勇(1991-),男,硕士在读,研究方向:乳腺癌的发生发展与化疗耐药机制;通信作者:马勇杰,E-mail:yongjiemagu@aliyun.com。

胞内 5-FU 的代谢失活,导致 5-FU 化疗耐药。本研究探究了 DPYD 基因 T85C 位点突变与乳腺癌细胞 5-FU 敏感性的关系,旨在探讨乳腺癌细胞 5-FU 耐药的分子机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和细胞系 人乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 购自美国 ATCC (American Type Culture Collection),胎牛血清(Hyclone 公司),细胞培养基 RPRI 1640、转染试剂 Lipofectamine 2000、TRIzol 试剂盒 (Invitrogen 公司),MTT、0.25% 胰蛋白酶 (Sigma 公司),PCR 引物购自华大基因公司,RNA 反转录试剂盒 (TaKaRa 公司),质粒提取试剂盒 (Qiagen 公司),限制性内切酶 *Xba* I、*Nhe* I、*Eco*R I 和 *Not* I 购自 NEB 公司,硝酸纤维素膜(Pierce 公司),GFP 抗体(三箭生物公司),5-Fu 购自山东齐鲁制药厂。

1.2 方法

1.2.1 肝组织总 RNA 的提取 将冻存于-80℃冰箱的正常人肝脏组织放于研钵中,小心把液氮倒入研钵,碎裂组织后,将 Trizol 试剂加入研钵中,充分溶解组织细胞。随后,将液体转入 EP 管中,加入相应比例的氯仿抽提 RNA,12 000×g,4℃离心 20 min,将上清转入新的 EP 管中分离 RNA。向上述液体中加入异丙醇,充分混匀后,12 000×g,4℃离心 10 min,沉淀 RNA。用 75%乙醇洗涤 RNA,12 000×g,4℃离心 10 min 后,冰上静置以彻底晾干 RNA 样品,之后加入 DEPC 水溶解 RNA,紫外分光光度计检测 RNA 样本浓度。最后将 RNA 样品逆转录得到肝脏组织 cDNA 样品,-80℃保存备用。

1.2.2 重组质粒的构建 首先利用 PCR 法扩增 GFP 标签序列,将标签序列连接到慢病毒载体质粒 PCDH-CMV-MCS-EF1-Puro 的多克隆位点的 *Xba* I 和 *Nhe* I 酶切位点区,得到带 GFP 标签的重组慢病毒表达质粒 PCDH-p-GFP-Vector 作为对照组。利用 PCR 法以肝脏组织 cDNA 为模板,扩增 DPYD 编码序列(扩增引物见表 1)。用限制性内切酶 *Eco*R I 和 *Not* I 分别双酶切 DPYD 基因扩增序列及重组慢病毒表达质粒 PCDH-p-GFP-Vector,回收纯化,将纯化产物连接后转化 DH5 α 感受态宿主菌,涂布于含氨苄青霉素的固体 LB 培养板上,37℃过夜培养,挑取单克隆菌落扩增并提取质粒,获得 DPYD 基因野生型重组慢病毒表达质粒 PCDH-p-GFP-DPYD。

利用大引物 PCR 定点突变法构建含 DPYD 基因 T85C 定点突变的重组表达质粒。首先,以构建成功的重组慢病毒表达质粒 PCDH-p-GFP-DPYD 为

模板,分别扩增 T85C 定点突变的两个核苷酸片段(扩增引物见表 2),纯化回收两个核苷酸片段。然后,以纯化回收的两个片段为模板,扩增 T85C 定点突变的 DPYD 基因编码序列(扩增引物见表 1)。同样地,用限制性内切酶 *Eco*R I 和 *Not* I 分别双酶切扩增序列及重组慢病毒表达质粒 PCDH-p-GFP-Vector,回收纯化,将扩增片段连接到载体序列中,得到 DPYD 基因突变型重组慢病毒表达质粒 PCDH-p-GFP-DPYD-Mutation。重组质粒进行双酶切鉴定,DPYD 基因突变型和野生型重组质粒进行测序鉴定。

表 1 DPYD 基因全长引物

Tab 1 Primers sequence of DPYD

引物名称	引物序列
Forward primer	5'-AAGAATTGCGCCACCATGGCCCTGTGCTCAGT-3'
Reverse primer	5'-TTAAGCGGCGCCTTAACACACCGGATTAC-3'

表 2 DPYD 基因突变引物序列

Tab 2 Mutation primers sequence of DPYD

引物名称	引物序列
Forward primer-1	5'-AAGAATTGCGCCACCATGGCCCTGTGCTCAGT-3'
Reverse primer-1	5'-GCAACTCTGCGTTCCACTT-3'
Forward primer-2	5'-AAGTGGAAACACAGAGTTGC-3'
Reverse primer-2	5'-TTAAGCGGCGCCTTAACACACCGGATTAC-3'

1.2.3 细胞培养 按照 ATCC 所推荐的标准进行培养。MDA-MB-231 细胞使用 10%胎牛血清的 RPRI 1640 培养液(含青霉素、链霉素各 100 U/mL),在含 5% CO₂ 的 37℃恒温培养箱中培养。

1.2.4 细胞转染 培养 MDA-MB-231 细胞,充分贴壁且覆盖率达到 70%左右时转染。用 Lipofectamine 2000 进行质粒转染,按照试剂说明书步骤进行操作。使用荧光显微镜观察 24 h 的转染效率,48 h 后用嘌呤霉素药筛(2 μ g/mL),获得稳定表达 GFP 的 Vector 细胞系、GFP 和野生型 DPYD 基因融合表达的 Wild type DPYD 细胞系、GFP 和突变型 DPYD 基因融合表达的 Mutation DPYD 细胞系。用 Western blotting 检测目的蛋白的表达效果。

1.2.5 Western blotting 检测 将细胞培养液弃去,用 PBS 缓冲液洗去残余的培养液,用细胞裂解液在冰上裂解细胞,提取细胞总蛋白。蛋白定量后,使用 SDS-PAGE 法分离细胞蛋白,随后,将蛋白转移到硝酸纤维滤膜上,在室温条件下,5%的脱脂奶粉封闭 1 h,加入一抗 GFP(1:8 000),4℃过夜孵育,荧光二抗孵育 50 min,用双色红外激光成像系统进行图像采集。

1.2.6 MTT 法检测细胞生存 将 vector、wild type DPYD、mutation DPYD 3 种细胞系的细胞以 1×10^4 孔,种入 96 孔培养板,12 h 后,每种细胞系分别加入终浓度为 0、1、5、10、50 $\mu\text{g/mL}$ 的 5-FU 培养 24 h 后,加入 MTT 溶液(5 $\text{mg}/\mu\text{L}$),37 $^{\circ}\text{C}$ 继续孵育 4 h,弃去培养孔内培养液,每孔加入 150 μL DMSO,振荡 10 min。用酶联免疫检测仪测定 490 nm 处吸光度。

1.3 统计学分析 所有实验数据均来自 3 次独立重复实验的结果,使用 SPSS13.0 统计软件进行数据分析,不同分组之间细胞存活的差异使用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 重组质粒的双酶切鉴定和测序鉴定结果 用 *Xba* I 和 *Nhe* I 双酶切重组质粒 PCDH-GFP-Vector (Vector), 用 *Eco*R I 和 *Not* I 双酶切重组质粒 PCDH-p-GFP-DPYD(wild type DPYD)和 PCDH-p-GFP-DPYD-mutation(mutation DPYD),琼脂糖凝胶电泳分析 3 种重组质粒的酶切产物,从结果可以看出,产物大小符合理论预测值(图 1);DPYD 基因突变型和野生型重组质粒测序结果见图 2,测序结果显示,DPYD 基因 T85C 位点定点突变成功。

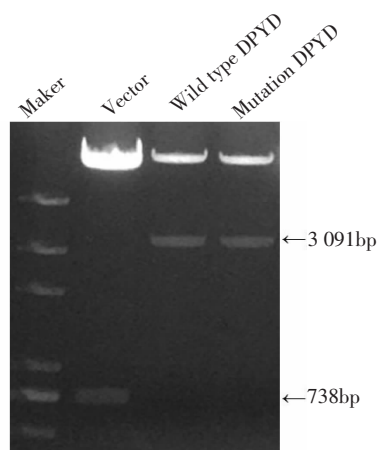


图 1 3 种质粒的双酶切鉴定结果

Fig 1 Three recombinant plasmids confirmed by double enzyme digestion

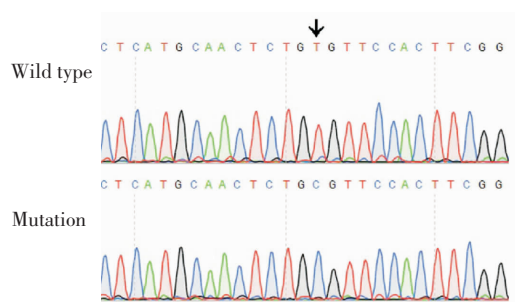


图 2 DPYD 基因 T85C 野生型和突变型质粒的测序结果

Fig 2 Sequence traces of wild type and mutation DPYD T85C plasmids

2.2 Western blotting 检测乳腺癌细胞系中 DPD 蛋白表达水平 将 3 种重组慢病毒质粒分别转染到 MDA-MB-231 细胞中,并用 2 $\mu\text{g/mL}$ 的嘌呤霉素筛选出稳定表达目的蛋白的细胞系:Vector、wild type DPYD、mutation DPYD。通过 Western blotting 检测各个细胞系中重组质粒的表达情况,从结果可以看出,GFP、GFP 和野生型 DPD 融合蛋白、GFP 和突变型 DPD 融合蛋白在 MDA-MB-231 细胞中都能够稳定表达(图 3)。

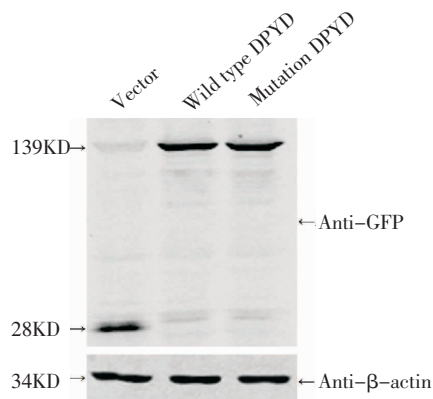
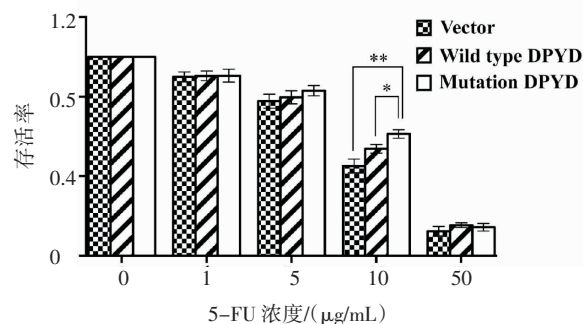


图 3 Western blotting 检测 Vector、Wild type 和 Mutation DPYD 重组质粒在 MDA-MB-231 细胞中的表达

Fig 3 Vector, wild type and mutation DPYD in MDA-MB-231 cells were identified by western blotting

2.3 不同 DPYD 基因表现型的 MDA-MB-231 细胞对 5-FU 敏感性的变化 GFP、GFP 和野生型 DPD 融合蛋白、GFP 和突变型 DPD 融合蛋白稳定表达的 3 种细胞系:vector、wild type DPYD、mutation DPYD, 分别使用 0、1、5、10、50 $\mu\text{g/mL}$ 的 5-FU 处理,24 h 后采用 MTT 法检测细胞存活。在 5-FU 浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 时,稳定表达突变型 DPD 的细胞系存活率显著高于对照组细胞系($P = 0.002$,图 4),且突变型细胞系存活率显著高于野生型细胞系($P = 0.013$,图 4)。结果说明,突变型 DPD 对 5-FU 的敏感性显著降低。



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图 4 不同 DPYD 基因表型的 MDA-MB-231 细胞对 5-FU 敏感性的变化

Fig 4 The sensitivity changes of different DPYD phenotypes MDA-MB-231 cell to 5-FU

3 讨论

5-FU 在乳腺癌、胃癌、结肠癌等恶性肿瘤的化学治疗中被广泛应用^[7]。5-FU 进入细胞后,被催化修饰为 FdUMP、FdUTP 和 FUTP 从而发挥其抗癌效应,FdUMP 能结合到胸腺嘧啶合成酶上抑制其酶活性,阻碍胸腺嘧啶核苷酸的从头合成,造成细胞核酸代谢紊乱;FdUTP 和 FUTP 可以参入到 DNA 或 RNA 分子中,阻碍 DNA 和 RNA 的合成过程,抑制细胞的生长^[8]。DPYD 基因位于染色体 1p21-1p22 区域,全长约 950 kb,包含 23 个外显子,编码 1 025 个氨基酸^[9]。DPYD 基因编码的 DPD 蛋白在体内主要参与嘧啶核苷酸的分解代谢,DPD 蛋白还参与 5-FU 的分解代谢,是 5-FU 代谢失活的起始和限速酶,因此,DPYD 基因作为药物代谢相关基因被广泛关注^[10]。已有明确的研究表明:DPD 酶缺陷的病人使用 5-FU 后,毒副反应的发生率明显增高。氟尿嘧啶类药物用药后,约有 15%~30%的病人会出现严重的毒副作用,约 50%~80%的 DPD 酶缺陷的患者发生Ⅲ级或Ⅲ级以上的毒副反应^[11]。美国食品药品监督管理局(FDA)和欧洲药品管理局(EMA)在氟尿嘧啶类药物禁忌中有明确性说明,DPD 酶缺陷的患者应慎用用药。

基因组中遗传变异的存在,导致一些抗肿瘤药物的代谢途径以及目标基因的功能受到影响,进而影响药物疗效和患者预后^[12]。最近,有研究报道 DPYD 基因的单核苷酸多态性影响 5-FU 化疗患者的治疗效果^[13],Zeng 等^[14]的研究结果显示,DPYD 基因的单核苷酸多态性与氟尿嘧啶类药物化疗患者的预后相关。DPYD 基因 T85C 位点突变导致基因编码区第 85 位的胸腺嘧啶被胞嘧啶取代,这种核苷酸改变使得 DPD 蛋白第 27 位的半胱氨酸(Cys)转变为精氨酸(Arg),Steven 等的研究表明,T85C 位点突变型 DPD 酶活性显著高于野生型,导致细胞代谢 5-FU 的速率改变。

本研究首次探究了乳腺癌细胞株 DPYD 基因 T85C 突变对 5-FU 药物敏感性的影响,我们从人肝脏组织中获得 DPYD 基因的编码序列,使用定点突变技术对 DPYD 基因的 T85C 位点进行定点突变,得到野生型 DPYD 基因和突变型 DPYD 基因,将 2 种重组质粒转染 MDA-MB-231 细胞得到 2 种 DPD 蛋白表现型的细胞株,并比较了不同表现型细胞株对 5-FU 的敏感性,结果显示,5-FU 对 DPD 蛋白突变型细胞系生长抑制能力减弱。由此,我们得出结论:DPYD 基因 T85C 与 5-FU 敏感性相关,T85C 位点基因型具有指导乳腺癌临床个体化用药的潜能。但

是,DPYD 基因存在广泛的多态性^[15],不同多态性位点之间可能会相互影响,DPYD 基因 T85C 多态性位点对临床 5-FU 用药的评估价值有待进一步探讨。

参考文献:

- [1] 陈万青,郑荣寿,张思维,等. 2013 年中国恶性肿瘤发病和死亡分析[J]. 中国肿瘤, 2017, 26(1):1
- [2] Early Breast Cancer Trialists Collaborative, Peto R, Davies C, et al. Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: meta-analyses of long-term outcome among 100,000 women in 123 randomised trials[J]. Lancet, 2012,379(9814):432
- [3] Tecza K, Pamula-Pilat J, Lanuszevska J, et al. Genetic polymorphisms and response to 5-fluorouracil, doxorubicin and cyclophosphamide chemotherapy in breast cancer patients[J]. Oncotarget, 2016, 7(41):66790
- [4] Lee A M, Shi Q, Pavey E, et al. DPYD variants as predictors of 5-fluorouracil toxicity in adjuvant colon cancer treatment (NCCTG N0147)[J]. J Natl Cancer Inst, 2014,106(12): dju298
- [5] Heggie G D, Sommadossi J P, Cross D S, et al. Clinical pharmacokinetics of 5-fluorouracil and its metabolites in plasma, urine, and bile[J]. Cancer Res, 1987,47(8):2203
- [6] Offer S M, Lee A M, Mattison L K, et al. A DPYD variant (Y186C) in individuals of african ancestry is associated with reduced DPD enzyme activity[J]. Clin Pharmacol Therapeut, 2013,94(1):158
- [7] Boige V, Vincent M, Alexandre P, et al. DPYD Genotyping to predict adverse events following treatment with fluorouracil-based adjuvant chemotherapy in patients with stage III colon cancer: A secondary analysis of the PETACC-8 randomized clinical trial[J]. JAMA Oncol, 2016, [Epub ahead of print]
- [8] Glazer R I, Lloyd L S. Association of cell lethality with incorporation of 5-fluorouracil and 5-fluorouridine into nuclear RNA in human colon carcinoma cells in culture[J]. Mol Pharmacol, 1982,21(2):468
- [9] Lu Z H, Zhang R, Diasio R B. Purification and characterization of dihydropyrimidine dehydrogenase from human liver[J]. J Biol Chem, 1992, 267(24):17102
- [10] Yen J L, McLeod H L. Should DPD analysis be required prior to prescribing fluoropyrimidines[J]. Eur J Cancer, 2007,43(6):1011
- [11] Lunenburg C A, Henricks L M, Guchelaar H J, et al. Prospective DPYD genotyping to reduce the risk of fluoropyrimidine-induced severe toxicity: Ready for prime time[J]. Eur J Cancer, 2016,54:40
- [12] Bosch T M, Meijerman I, Beijnen J H, et al. Genetic polymorphisms of drug-metabolising enzymes and drug transporters in the chemotherapeutic treatment of cancer[J]. Clin Pharm, 2006,45(3):253
- [13] Zhang X P, Bai Z B, Chen B A, et al. Polymorphisms of dihydropyrimidine dehydrogenase gene and clinical outcomes of gastric cancer patients treated with fluorouracil-based adjuvant chemotherapy in Chinese population[J]. Chin Med J, 2012,125(5):741
- [14] Zeng H, Yu H, Lu L, et al. Genetic effects and modifiers of radiotherapy and chemotherapy on survival in pancreatic cancer[J]. Pancreas, 2011,40(5):657
- [15] Joerger M, Huitema A D, Boot H, et al. Germline TYMS genotype is highly predictive in patients with metastatic gastrointestinal malignancies receiving capecitabine-based chemotherapy[J]. Cancer Chemotherapy Pharmacol, 2015,75(4):763

(2017-04-10 收稿)