



· 论 著 ·

甲状腺乳头状癌中异常甲基化基因筛查

曹一鸣, 朱永学

复旦大学附属肿瘤医院头颈外科, 复旦大学上海医学院肿瘤学系, 上海 200032

[摘要] **背景与目的:** DNA甲基化是一种重要表观遗传学改变, 在肿瘤的发生、诊断、预后评估乃至治疗上都具有重要的临床意义。甲状腺癌是临床最常见的内分泌系统恶性肿瘤, 目前国内外对甲状腺癌中DNA甲基化研究相对较少。筛查在甲状腺乳头状癌中存在异常甲基化的基因。**方法:** 收集2014年1月—2014年6月在复旦大学附属肿瘤医院头颈外科行甲状腺癌根治术的患者的甲状腺乳头状癌组织及癌旁的正常甲状腺组织88对。通过前期高通量甲基化DNA亲和纯化测序技术 (Methylcap-Seq) 初步建立甲状腺乳头状癌全基因组甲基化谱式。通过生物信息学手段及甲基化特异性PCR技术 (methylation specific PCR, MSP) 进行初筛和复筛。**结果:** 通过生物信息学手段分析初步选取46个基因位点进行检测, 最终发现*HOXD10*和*FOXD2*基因启动子区存在异常高甲基化改变。*HOXD10*基因在甲状腺癌组织中44.4%呈高甲基化, 而在癌旁组织中仅20.5% ($P<0.001$); *FOXD2*基因在甲状腺癌组织中54.5%呈高甲基化, 而在癌旁组织中仅38.6% ($P<0.001$)。其与甲状腺癌患者临床病理因素的多因素分析表明, *HOXD10*高甲基化改变与甲状腺癌病灶的多灶性相关 ($OR=3.71$); *FOXD2*高甲基化改变与甲状腺癌病灶外侵相关 ($OR=5.91$)。**结论:** *HOXD10*与*FOXD2*基因在甲状腺乳头状癌中存在高甲基化修饰。甲状腺乳头状癌的发生、发展可能受*HOXD10*与*FOXD2*基因的甲基化修饰调控。

[关键词] 甲状腺癌; 表观遗传学; 甲基化

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2019.10.004

中图分类号: R736.1 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2019)10-0780-09

Screening of aberrant DNA methylation in papillary thyroid cancer CAO Yiming, ZHU Yongxue (Department of Head and Neck Surgery, Fudan University Shanghai Cancer Center; Department of Oncology, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Correspondence to: ZHU Yongxue E-mail: zhuyongxue@sina.com

[Abstract] **Background and purpose:** DNA methylation is an important epigenetic modification. Evaluating the status of DNA methylation could be useful for diagnosis, prognostic evaluation and predicting the risk of cancer. Thyroid cancer is the most prevalent endocrine malignancy in humans. This study aimed to screen the aberrant methylated gene in papillary thyroid cancer. **Methods:** Human primary thyroid cancer tissues and adjacent non-tumor tissues were collected from patients initially surgically treated in the Department of Head and Neck Surgery, Fudan University Shanghai Cancer Center. A total of 95 patients were enrolled in the study. In previous studies, we performed MethylCap-seq and made up a database of genome-wide profiling of methylation in papillary thyroid cancer. Using bioinformatics tools and methylation specific PCR, we screened out the aberrant methylated genes. **Results:** Using bioinformatics tools, we screened 46 suspicious sites for further research. *HOXD10* and *FOXD2* were found to have aberrant hypermethylation in their promoter regions. The gene *HOXD10* was hypermethylated in 44.4% of cancer tissues and 20.5% of adjacent tissues ($P<0.001$). The gene *FOXD2* was hypermethylated in 54.5% of cancer tissues and 38.6% of adjacent tissues ($P<0.001$). The hypermethylation of *HOXD10* gene was associated with tumor multifocality ($OR=3.71$), and the hypermethylation of *FOXD2* gene was associated with tumor invasion ($OR=5.91$). **Conclusion:** The promoters of *HOXD10* and *FOXD2* may be hypermethylated in papillary thyroid cancer. And the epigenetic modification of *HOXD10* and *FOXD2* may play a role in tumorigenesis of thyroid cancer.

[Key words] Thyroid cancer; Epigenetics; Methylation

甲状腺癌是临床最常见的内分泌系统恶性肿瘤, 在全世界范围内约占全部恶性肿瘤的1%。

近年来甲状腺癌的发病率在全球范围内以每年接近4%的速度迅速升高, 已成为全球发病率

通信作者: 朱永学 E-mail: zhuyongxue@sina.com

增长最快的恶性肿瘤^[1-4]。起源于甲状腺滤泡上皮细胞的恶性肿瘤占全部甲状腺癌的95%以上,主要包括甲状腺乳头状癌(papillary thyroid cancer, PTC)、甲状腺滤泡状癌(follicular thyroid cancer, FTC)及甲状腺低分化/未分化癌(anaplastic thyroid cancer/undifferentiated thyroid cancer, ATC/UTC),甲状腺髓样癌(medullary thyroid cancer, MTC)则起源于甲状腺滤泡旁细胞(C细胞)。甲状腺癌的发病目前认为与颈部放射线接触史、女性雌激素分泌等相关^[5],临床诊断主要依赖医师的体格检查、甲状腺超声及细针抽吸细胞学检查,但良恶性肿瘤的术前鉴别仍存在一定困难。甲状腺癌的治疗以手术治疗和放射性¹³¹I治疗为主,辅以甲状腺激素抑制治疗,总体预后相对较好,其中最常见PTC术后10年生存率可达90%以上,但临床上仍有部分病例侵袭性较强,容易出现淋巴结转移和复发^[6-8]。目前临床上对甲状腺癌手术的范围、颈部淋巴结清扫的选择以及放射性¹³¹I治疗的适应证均存在争议。表观遗传学研究或许可以为我们提供甲状腺癌在早期诊断、治疗方案选择和预后评估方面的新思路。

近年来关于甲状腺癌的遗传学和表观遗传学研究逐渐增多,基因突变和甲基化改变在甲状腺癌发生、发展过程中可能发挥着重要作用。DNA甲基化是一种重要的表观遗传学的改变,它是指在DNA甲基转移酶作用下,将甲基添加到DNA分子CpG二核苷酸的胞嘧啶残基上,真核生物中CpG二核苷酸多存在于基因5'端启动子的CpG岛区域中,启动子CpG岛的甲基化改变具有调控基因表达、维持染色体完整性和调节DNA重组等作用^[9]。因此在肿瘤细胞中,抑癌基因启动子的高甲基化改变可以使其表达降低,癌基因启动子的低甲基化改变可以使其表达升高,进而调控肿瘤的生物行为,甚至可能直接导致肿瘤的发生。DNA甲基化是恶性肿瘤发生中的一种常见改变,反映了环境因素与遗传因素的相互作用,与遗传学改变不同的是DNA甲基化具有可逆性,通过药物治疗可以实现去甲基化,从而恢复抑癌基因表达,达到治疗肿瘤的作用,因此研究DNA

的甲基化在肿瘤的发病机制、早期诊断和预后评估方面均具有重要意义^[10]。

本研究致力于探索和发现在PTC中可能存在甲基化异常调控的基因,初步评估其在甲状腺癌发生、发展中可能发挥的作用,并且希望找到未来可用于早期诊断和预后评估的新的分子标志物。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 临床标本

收集2014年1月—2014年6月在复旦大学附属肿瘤医院头颈外科初治行甲状腺癌根治性手术的患者甲状腺癌组织及癌旁的相对正常甲状腺组织共88对,所有标本均经病理组织学检查确诊为PTC,所有标本收集后置于-80℃冰箱保存,所有患者的临床和病理学特征见表1。

表1 标本临床数据统计

Tab. 1 Clinicopathological features of PTC patients	
Clinicopathological feature	Number n(%)
Age/year	43.6±13.6
>45	41 (46.6)
≤45	47 (53.4)
Gender	
Male	20 (22.7)
Female	68 (77.3)
Tumor invasion	
Yes	17 (19.3)
No	71 (80.7)
Tumor size D/cm	1.57±0.96
>1	60 (68.2)
≤1	28 (31.8)
Multifocality	
Yes	30 (34.1)
No	58 (65.9)
Hashimoto's thyroiditis	
Yes	8 (9.1)
No	80 (90.9)
Central lymph node metastasis	
Yes	52 (59.1)
No	36 (40.9)
Lateral lymph node metastasis	
Yes	28 (31.8)
No	60 (68.2)

1.1.2 主要实验仪器和试剂

温度梯度PCR扩增仪购自美国Bio-Rad公司, 生物电泳图像分析仪购自上海复日科技有限公司, 紫外分光光度计购自美国NanoDrop公司, DNA提取试剂盒天根生化科技(北京)有限公司, DNA胶回收试剂盒购自美国Bio-Dev公司, PCR反应试剂盒JumpStart购自美国Sigma公司。

1.2 实验方法

1.2.1 DNA提取

取10 mg左右标本组织彻底剪碎, 放入1.5 mL离心管中, 加入180 μ L缓冲液GA, 在室温下放置使其充分混合。加入20 μ L蛋白酶K, 漩涡震荡混匀10 s。在56 $^{\circ}$ C环境下水浴2 h, 期间通过漩涡振荡混匀, 待组织碎片完全消化后简短离心以收集附着在管壁及管盖的液体。加入200 μ L的缓冲液GB和1 μ L Carrier RNA储存液, 充分颠倒混匀, 70 $^{\circ}$ C放置10 min, 期间每3 min涡旋混匀10 s, 简短离心以去除管盖内壁的液滴。加入200 μ L无水乙醇, 轻轻颠倒混匀样品, 室温放置5 min, 简短离心以去除管盖内壁的液滴。取上一步所得溶液全部转入吸附柱中, 12 000 r/min离心30 s, 弃上清液, 将吸附柱放回收集管中。向吸附柱中加入500 μ L缓冲液GD, 12 000 r/min离心30 s, 弃上清液, 将吸附柱放回收集管中。向吸附柱中加入600 μ L漂洗液PW, 12 000 r/min离心30 s, 弃上清液, 将吸附柱放回收集管中, 重复1次, 然后12 000 r/min离心2 min, 倒掉上清液。将吸附柱置于室温放置2~5 min。然后将吸附柱转入一个干净的1.5 mL离心管中, 向吸附膜中间位置悬空滴加50 μ L洗脱缓冲液TB, 室温放置5 min, 12 000 r/min离心2 min将溶液收集到离心管中。通过紫外分光光度计检测其含量和纯度。

1.2.2 亚硫酸盐处理

取1 μ g标本DNA加水至20 μ L, 加入3 mol/L的氢氧化钠溶液2.3 μ L, 充分混匀后置于37 $^{\circ}$ C温浴15 min。加入亚硫酸盐试剂230 μ L, 充分混匀, 置于90 $^{\circ}$ C避光温浴30 min, 简短离心以去除管盖内壁的液滴。将上一步所得溶液全部转入DNA胶回收试剂盒的吸附柱中, 将吸附柱放回收集管中。向吸附柱中加入500 μ L溶胶液, 9 000 r/min离心30 s, 弃上清液, 将吸附柱放回收集管中。向吸附柱中加入500 μ L漂洗液, 12 000 r/min离心30 s, 弃上清液, 将吸附柱放回收集管中。

加入0.3 mol/L的氢氧化钠溶液300 μ L, 室温静置15 min, 9 000 r/min离心30 s, 弃上清液, 将吸附柱放回收集管中。向吸附柱中加入500 μ L漂洗液, 12 000 r/min离心30 s, 弃上清液, 将吸附柱放回收集管中, 重复1次。将吸附柱置于室温放置5 min, 然后将吸附柱转入一个干净的1.5 mL离心管中, 向吸附膜中间位置悬空滴加75 μ L洗脱缓冲液TB, 室温放置5 min, 12 000 r/min离心3 min, 重复1次, 将DNA溶液收集到离心管中。

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

PCR反应体系: 加入亚硫酸盐处理过的DNA溶液4 μ L、10 \times PCR缓冲液2 μ L、10 mmol/L dNTP 0.5 μ L、上下游引物(5 pmol/L)各2 μ L、Taq DNA聚合酶(0.05 U/ μ L) 0.3 μ L, 最后补充ddH₂O至20 mL。

扩增条件: 94 $^{\circ}$ C预变性3 min, 94 $^{\circ}$ C变性20 s, 56~60 $^{\circ}$ C(根据不同PCR片段的T_m)退火20 s, 72 $^{\circ}$ C延伸20s, 循环35~36个周期, 最后72 $^{\circ}$ C延伸5 min。用2.5%琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物。

每组PCR反应均包含阳性对照与阴性对照, 阳性对照采用PTC组织提取的基因组DNA经5-氮杂胞苷甲基化处理再由亚硫酸盐处理制备而得, 阴性对照采用ddH₂O。RCP反应引物采用<http://www.urogene.org/methprimer/>的网上引物设计软件自行设计(MSP反应引物见表2)。

1.3 研究方法

1.3.1 PTC全基因组甲基化谱式建立

早期研究中通过对1株PTC细胞株、1例正常甲状腺组织和3对PTC组织及癌旁组织, 行高通量甲基化DNA亲和纯化测序(Methylcap-Seq技术)初步建立甲状腺癌全基因组甲基化谱式, 数据上传UCSC网站保存(<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/>), 通过生物信息学手段分析获得可能存在差异的基因位点。

1.3.2 可疑位点初筛

通过对UCSC网站上数据的主观分析, 初步筛选出可疑存在异常甲基化的基因位点46个(表3)。筛选原则包括: ①在基因启动子、增强子和第1外显子中; ②在CPG岛中或岛旁; ③与甲基化峰值区域吻合; ④癌组织甲基化程度与癌旁正常组织存在显著差异。

表2 MSP引物序列

Tab. 2 Primer sequences of MSP

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer(5'-3')
<i>NLRP6</i>	TTTAGAGGGCGAAGAATATTAAGAC	TCGTCTAAATCCATAAAATAACGAA
<i>HOXD10</i>	GTTTTAGCGCGTATTATCGC	CCCGTATAATTATAAATACCTCTACCG
<i>ETV7</i>	TATATAGGATAGGAAGGGTTTCGT	AAAAAATATCAATCGAAATCTCCG
<i>SLC4A11</i>	GGTTTTTTGAGAAAATTTTGTTC	GTAACGAAAATCGAAAAAATCTACG
<i>FNDC1</i>	TTATGAGGGAGAATTGATATAGCGT	TAACTAAACTCTAAAAAAACCGAA
<i>FLJ42875</i>	GGTTAGTGAGCGTTTTTTTTATTC	AACCTTCTACCTTAAATCCTCCG
<i>SPAG6</i>	GATTAGATTTTAAAATATCGAGACGT	CTCCACGAACAAAACAACGA
<i>CDHR1</i>	GTTTAGTAGTTGGGTTTGACGC	AACCATATTTCCGTTAATACTACCG
<i>MGMT</i>	TATAGGTTTTGGAGGTGTTTTTAC	TAATAAAAATCCCGATCCTACTCG
<i>FOXG1</i>	ATGAAGAATTTTTTTATTATCGCG	ATAATTACCCTTACCCGAATCGT
<i>LOC400456</i>	TAGCGTGTTTTTTACGTTTTAGTC	CGATACCTTATAAACCCTACGTT
<i>FAM65A</i>	GAGTTTTTCGGTTTTTAGTTCGTC	GTATACACCAAATCCAACCGC
<i>C16 or f48</i>	TTAGTAGGCGTAGTTTCGGAGTC	AACTTTCTCTTAAACCATAACGAA
<i>MTSS1L</i>	TATATATCGTATATAGTAGGGCGCG	CCAAAAAATCTAAAAAATCCGAA
<i>CHST8</i>	AATAAGGATTCGAATTTAGGGTTTC	ATACACACTCGAAAAACAACGTA
<i>CCDC140</i>	GTTTGTGCGTTGATAAAAAATCGTC	AAACAAAAAATCTACGAAATTACGTA
<i>TMPRSS2</i>	GGACGTTTAAAGATTTTTTTAGTTCG	ATACCCGAAAAACAACCACGT
<i>MFAP3L</i>	TATGGAGTTAAATGCGATAAATTC	AAAATCCGAAAAACGTAAATACG
<i>ZCWPW1</i>	TTTTTTTTATTTTTATTTTTGTGCGA	GCTACCAATCCTAACACCCG
<i>FGFR1</i>	TAGTTTTGAGGTTGTATTTGGTAGC	TATACGCTAAACCCTCGTTAACG
<i>ZFP41</i>	TTAGGATATTTAATTTGCGGTACGT	CCGAAATATACTCCCAACCG
<i>FOXD2</i>	CGTTTTTCGGGGAATATATTTTC	ATTAAACAACAAAATCTCAACGTT
<i>ERN2</i>	TTTTATTGTATAGTAGGTATAAGCGG	TAATAACCCACCGAAATCCG
<i>CDHR2</i>	GTTTTGTAAAGGGGGTAGGAATC	TTCGAATAAACTTATCTTCCTCGAT
<i>RHOC</i>	GAGGGGTTGGAGGTAGTTC	GATTCCGATTACAACAACGAT
<i>FGFR2</i>	TTAGTTTGTGGATTAATAAGGCG	TAAAAACTAAAACAAAAAATCGCT
<i>ATHL1</i>	TTTAGAGGGCGAAGAATATTAAGAC	TCGTCTAAATCCATAAAATAACGAA
<i>HOXC-AS5</i>	GGCGAGTATAATTTTTGAATTTTC	GCGACGTAAATAAAACAACGAA
<i>HOXC9/OXC-AS2</i>	GTAATTAATTTATTTTTTCGTCGG	AAAAAATTTAACTTTTATTACGAT
<i>ZIC2</i>	TCGTATTGTTTTATAAATTCGA	CTACCTCTAAAAATCCACAACG
<i>EXOC3L4</i>	TTTTTTGTGTTTTTCGTTGTTTC	CCCTCACCTAAACTATAATCCGAA
<i>C14 or f23</i>	ATGAAGAATTTTTTTATTATCGCG	ATAATTACCCTTACCCGAATCGT
<i>TRIM72</i>	TGTTTATTCGTTAGGATTTTTTCGT	ACCTACACTTTATAACCAACACCG
<i>MT1X</i>	GTTGTGTATAGGAGAAACGTGGTC	TAATAAAAACAAAAACACAACGAA
<i>CNGB1</i>	GGTTTTAGTTATAGGTAGGGGAACG	AAAAACGAATCTCTCCAAAAACG
<i>C16 or f96</i>	GAGAGTAGTAATTTGTTCCGGTATC	CTATCCCAATAAAAAAATTAACGAA
<i>ACD</i>	TTAGTAGGCGTAGTTTCGGAGTC	AACTTTCTCTTAAACCATAACGAA
<i>PPY</i>	GTACGAATATTATTGGGAAGGC	CCGATAACTAAACCTTAATCCGAT
<i>HOXD13</i>	GGTCGTTTTGAATAATGGTTC	ACTTTATTCAACCTACAACACACGA
<i>SIM2</i>	GCGTGTATGTTTACGAAAGGTC	TAAAACCGAAACCGTAACCG
<i>ZBED3-AS1</i>	GCGTGTATGTTTACGAAAGGTC	TAAAACCGAAACCGTAACCG
<i>IRX2</i>	GTGTTTGTGCGTTCGAGTTTC	TCGCTTAAATTTTATTAATAACCTCG
<i>TEAD3</i>	TTGAGGAATTTGGCGTAGATC	AATAAAAACCTATCTAAACCCCG
<i>GFOD1</i>	TTCGTTTCGATTTATTGGTGTC	AATTATTTTAAACTCTTACAAATATCACGT
<i>LOC401463</i>	TTTATTTTTATAGTAGGGAGGTCGA	CATACTAAAACAATCGAAAATCG
<i>AGPAT6</i>	TCGTTTTTATAGGTGGTGTGTC	ACCTCAACCTATCTATCTATACGCC

表 3 初筛所得基因位点

Tab. 3 Aberrant methylation loci from screening

Gene	Chromosome	Start-stop point	Translation direction	Region	Type
<i>FLJ42875</i>	chr1	2983289	2986289	-	Promoter
<i>RHOC</i>	chr1	113254025	113270025	-	Enhancer
<i>FOXD2</i>	chr1	47901688	47906363	+	Exon 1
<i>SPAG6</i>	chr10	22632373	22635373	+	Promotor
<i>MGMT</i>	chr10	131263453	131266453	+	Promotor
<i>CDHR1</i>	chr10	85952411	85955411	+	Promotor
<i>FGFR2</i>	chr10	123361972	123377972	-	Enhancer
<i>NLRP6</i>	chr11	276569	279569	+	Promotor
<i>ATHL1</i>	chr11	269137	285137	+	Enhancer
<i>HOXC-AS5</i>	chr12	54337427	54353427	-	Enhancer
<i>HOXC9</i>	chr12	54373876	54389876	+	Enhancer
<i>ZIC2</i>	chr13	100614025	100630025	+	Enhancer
<i>FOXP1</i>	chr14	29234277	29237277	+	Promotor
<i>EXOC3L4</i>	chr14	103546480	103562480	+	Enhancer
<i>C14 or f23</i>	chr14	29221909	29237909	+	Enhancer
<i>LOC400456</i>	chr15	95869329	95872329	-	Promotor
<i>TRIM72</i>	chr16	31205341	31221341	+	Enhancer
<i>MTLX</i>	chr16	56696381	56712381	+	Enhancer
<i>CNGB1</i>	chr16	58009020	58025020	-	Enhancer
<i>C16 or f96</i>	chr16	4586490	4602490	+	Enhancer
<i>ACD</i>	chr16	67698718	67714718	-	Enhancer
<i>ERN2</i>	chr16	23724415	23724821	-	Exon 1
<i>MTSS1L</i>	chr16	70718954	70721954	-	Promotor
<i>FAM65A</i>	chr16	67569364	67572364	+	Promotor
<i>C16 or f48</i>	chr16	67699628	67702628	-	Promotor
<i>PPY</i>	chr17	42023833	42039833	-	Enhancer
<i>CHST8</i>	chr19	34110860	34113860	+	Promotor
<i>HOXD10</i>	chr2	176979491	176982491	+	Promotor
<i>HOXD13</i>	chr2	176937531	176953531	+	Enhancer
<i>CCDC140</i>	chr2	223160865	223163865	+	Promotor
<i>SLC4A11</i>	chr20	3217835	3220835	-	Promotor
<i>SIM2</i>	chr21	38051990	38067990	+	Enhancer
<i>TMPRSS2</i>	chr21	42878992	42881992	-	Promotor
<i>MFAP3L</i>	chr4	170946429	170949429	-	Promotor
<i>ZBED3-AS1</i>	chr5	76362622	76378622	+	Enhancer
<i>IRX2</i>	chr5	2755769	2771769	-	Enhancer
<i>CDHR2</i>	chr5	175969511	175969770	+	Exon 1
<i>FNDC1</i>	chr6	159588428	159591428	+	Promotor
<i>ETV7</i>	chr6	36354577	36357577	-	Promotor
<i>TEAD3</i>	chr6	35468861	35484861	-	Enhancer
<i>GFOD1</i>	chr6	13476295	13492295	-	Enhancer
<i>ZCWPW1</i>	chr7	100025431	100028431	-	Promotor
<i>LOC401463</i>	chr8	65493820	65509820	-	Enhancer
<i>AGPAT6</i>	chr8	41415706	41431706	+	Enhancer
<i>ZFP41</i>	chr8	144326990	144329990	+	Promotor
<i>FGFR1</i>	chr8	38324363	38327363	-	Promotor

1.3.3 MSP筛查

针对初筛出的可疑基因位点分别设计MSP引物，用88对临床标本的DNA进行MSP反应检验，挑选癌和癌旁存在显著甲基化差异的基因位点，并分析基因甲基化与肿瘤临床特征的关系。

1.4 统计学处理

本研究使用SPSS 19.0软件进行统计学分析，采用 χ^2 检验、logistic回归分析等， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

根据前期工作Methylcap-Seq技术建立的甲状腺癌全基因组甲基化谱式（图1），通过生物信息学手段分析获得可能存在差异的基因位点1 856个，进一步根据主观数据分析，初步筛选出可疑存在异常甲基化的基因位点46个（表3）。

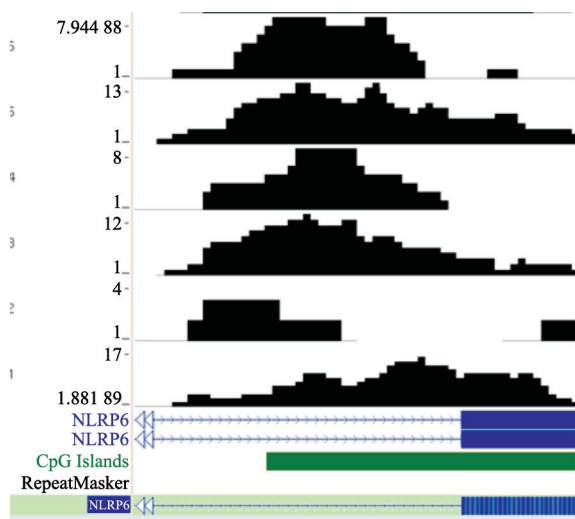


图1 甲状腺癌全基因组甲基化谱式图例

Fig. 1 The chromosome ideogram and methylation of *NLRP6* by Methylcap-Seq

The blue bar represents the *NLRP6* gene and the green bar represents the CpG island. The spectrum represents the methylation level from 3 pairs of PTC and its paracancerous tissues (from bottom to top were PTC 1, paraPTC 1, PTC 2, paraPTC 2, PTC 3, paraPTC 3)

MSP结果最终提示*HOXD10*基因与*FOXD2*基因启动子区存在高甲基化改变：*HOXD10*基因在甲状腺癌组织中44.4%存在高甲基化改变，而在癌旁组织中仅20.5%（ $P < 0.001$ ）；*FOXD2*基因在甲状腺癌组织中54.5%存在高甲基化改变，而在癌旁组织中仅38.6%（ $P < 0.001$ ）。其余基因位点MSP结果差异均无统计学意义（图2，表4）。



图2 MSP电泳图例

Fig. 2 Electrophoretogram of MSP

T: PTC tumor tissue; N: Adjacent tissue; P: Positive control; Negative: Negative control. The adjacent bands were from the same patient

表4 *HOXD10*和*FOXD2*基因在甲状腺癌与癌旁组织的甲基化差异

Tab. 4 Difference in *HOXD10* and *FOXD2* methylation between PTC and adjacent tissue

Gene	Adjacent tissue	PTC	[n(%)]
			<i>P</i> value (χ^2)
<i>HOXD10</i>			
Methylation	18 (20.5)	39 (44.3)	<0.001
Non-methylation	70 (79.5)	49 (55.7)	
<i>FOXD2</i>			
Methylation	34 (38.6)	48 (54.5)	<0.001
Non-methylation	54 (61.4)	40 (45.5)	

分析*HOXD10*基因和*FOXD2*基因启动子高甲基化改变与患者临床特征（年龄、性别、原发灶大小、是否外侵、是否多灶、是否伴有桥本甲状腺炎、是否伴随颈部淋巴结转移）的相关性。*HOXD10*基因高甲基化改变与甲状腺癌病灶的多灶性相关（ $P < 0.01$, $OR = 3.71$ ），*FOXD2*基因高甲基化改变与甲状腺癌病灶外侵相关（ $P < 0.01$, $OR = 5.91$, 表5）。

表5 *HOXD10*和*FOXD2*甲基化改变与患者临床病理学特征的相关性

Tab. 5 The relationship between methylation and clinicopathological features of PTC

Clinicopathological feature	<i>HOXD10</i>		<i>FOXD2</i>	
	<i>P</i> value	OR	<i>P</i> value	OR
Age > 45 years	0.913	0.947	0.843	1.105
Male	0.345	1.685	0.315	1.750
Tumor invasion	0.112	2.984	0.041	5.912
Tumor size > 1 cm	0.770	1.163	0.792	0.872
Multifocality	0.050	3.716	0.724	1.254
Hashimoto's thyroiditis	0.472	0.551	0.325	0.441
Central lymph node metastasis	0.657	1.271	0.518	0.705
Lateral lymph node metastasis	0.131	0.332	0.948	0.956

3 讨 论

近年来PTC发病率迅速上升, 成为人们关注的热点, 但由于其预后相对较好, 目前的研究方向多集中于甲状腺癌的早期诊断及预后评估^[6, 11]。甲状腺肿瘤的临床诊断主要依赖临床医师的体格检查和甲状腺超声, 但难以区分良性和恶性肿瘤, 细针抽吸细胞学检查是近年来开展的热门领域, 对甲状腺癌术前诊断的灵敏度和特异性可达85%以上^[12-13], 缺点为有创性检查。另一方面虽然PTC的总体预后较好, 但仍有部分患者出现反复复发, 局部广泛转移以及¹³¹I治疗抵抗, 临床上常称之为难治性PTC, 目前临床上对这部分患者的鉴别是一个重要的课题。因而寻求一种甲状腺癌特异性的分子标志物成为我们关注的焦点, 希望其可以在PTC的早期诊断、治疗方案选择和预后评估方面提供帮助。表观遗传学已成为研究恶性肿瘤发生、发展及其转归的一个新方向, 其中DNA甲基化更是最常见的表观遗传学改变, 在肿瘤学研究中占据重要位置。相对于遗传学研究, 表观遗传学指标作为分子标志物的研究起步相对较晚, 目前有研究表明, *Rassf1A*、*TSHR*、*RARB2*和*TIMP3*等抑癌基因和甲状腺特异性基因均在甲状腺癌中存在高甲基化改变和低表达调控, 这与肿瘤发生、发展密切相关^[14-16],

但这些基因均缺乏特异性, 难以作为分子标志物应用于诊断和预后评估。本研究希望通过筛查PTC中存在异常甲基化的基因来获取潜在的表观遗传学分子标志物。

本研究筛查1 856个可疑甲基化位点, 最终确定*HOXD10*与*FOXD2*两个基因启动子区存在异常甲基化改变。*HOXD10*基因以往被认为是一种特异性的转录因子, 主要在细胞分化和胚芽发育过程中发挥调控作用^[17], 几年来研究发现HOX家族基因在肿瘤形成和发展中发挥重要作用^[18-19], 部分基因(*HoxB13*、*HoxA5*、*HoxC6*等)已被证实存在肺癌、乳腺癌、结肠癌中存在甲基化调控^[20-22]。*HOXD10*基因也被证实存在乳腺癌和胃癌中存在高甲基化改变。在甲状腺癌中目前未见*HOXD10*功能及甲基化调控方面的研究报道, 本研究发现, *HOXD10*基因在PTC中存在高甲基化改变, 并且与肿瘤发病的多灶性相关, 推测该基因很有可能在PTC中同样发挥抑癌基因作用并受到甲基化调控, 具体有待进一步实验验证。*FOXD2*基因是FOX转录因子家族的一员, FOX家族基因在胚胎发育过程中起着关键性的调控作用, 与生长发育、免疫调控以及肿瘤的发生相关, *FOXE1*、*FOXP1*等被认为与基底细胞癌、乳腺癌和淋巴瘤发病密切相关^[23]。*FOXD2*基因目前相关研究较少, 有研究表明, 在T淋巴细胞中, *FOXD2*基因通过调控cAMP通路依赖的蛋白激酶进而调节cAMP通路的敏感性^[24], 而cAMP通路正是甲状腺癌中的重要信号通路, 与TSH的调控密切相关, 推测*FOXD2*基因甲基化有可能通过cAMP通路调控PTC的发生、发展, 具体有待进一步研究验证。

本研究旨在筛查出PTC中可能存在甲基化调控的基因位点。本研究的不足之处在于: 第一, 基因位点的选取上主观因素过多, 必然存在偏差; 第二, 标本量不足, 作为分子标志物的筛查应尽量具备更充足的标本量, 但限于时间和工作量只收集了88对样本进行检测, 基因位点的筛选有可能存在遗漏和误差; 第三, 仅有甲状腺癌患者的标本, 没有正常甲状腺组织对照, 且标本均为术中收集, 没有术前穿刺标本, 因而对DNA

甲基化的诊断预测价值难以做到客观评估；第四，标本收集过程中存在偏倚，由于大量甲状腺乳头状微癌病灶过小，难以取得足够的组织标本进行研究，因此研究对象中微癌患者比例较自然比例低；第五，MSP检验仅采用甲基化引物，而无非甲基化引物对照，由于本研究为筛查实验并非验证实验，因而仅关注其甲基化阳性结果而省略了非甲基化组的对照。

鉴于*HOXD10*与*FOXD2*基因在PTC中存在高甲基化改变，我们认为甲状腺癌的发生、发展可能受到*HOXD10*与*FOXD2*基因的甲基化修饰调控，*HOXD10*与*FOXD2*基因的甲基化修饰有望成为PTC特异性的分子标志物。

[参 考 文 献]

- [1] KILFOY B A, ZHENG T, HOLFORD T R, et al. International patterns and trends in thyroid cancer incidence, 1973–2002 [J] . *Cancer Causes Control*, 2009, 20(5): 525–531.
- [2] TORRE L A, BRAY F, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics, 2012 [J] . *CA Cancer J Clin*, 2015, 65(2): 87–108.
- [3] DAVIES L, WELCH H G. Increasing incidence of thyroid cancer in the United States, 1973–2002 [J] . *JAMA*, 2006, 295(18): 2164–2167.
- [4] SIEGEL R, MA J, ZOU Z, et al. Cancer statistics, 2014 [J] . *CA Cancer J Clin*, 2014, 64(1): 9–29.
- [5] NIKIFOROV Y E. Is ionizing radiation responsible for the increasing incidence of thyroid cancer? [J] . *Cancer*, 2010, 116(7): 1626–1628.
- [6] HUNDAHL S A, CADY B, CUNNINGHAM M P, et al. Initial results from a prospective cohort study of 5 583 cases of thyroid carcinoma treated in the United States during 1996. U.S. and German Thyroid Cancer Study Group. An American College of Surgeons Commission on Cancer Patient Care Evaluation study [J] . *Cancer*, 2000, 89(1): 202–217.
- [7] MAZZAFERRI E L, JHANG S M. Long-term impact of initial surgical and medical therapy on papillary and follicular thyroid cancer [J] . *Am J Med*, 1994, 97(5): 418–428.
- [8] NOGUCHI S, NOGUCHI A, MURAKAMI N. Papillary carcinoma of the thyroid. I. Developing pattern of metastasis [J] . *Cancer*, 1970, 26(5): 1053–1060.
- [9] JONES P A, BAYLIN S B. The epigenomics of cancer [J] . *Cell*, 2007, 128(4): 683–692.
- [10] XING M. Gene methylation in thyroid tumorigenesis [J] . *Endocrinology*, 2007, 148(3): 948–953.
- [11] PATRON V, BEDFERT C, LE CLECH G, et al. Pattern of lateral neck metastases in N_0 papillary thyroid carcinoma [J] . *BMC Cancer*, 2011, 11: 8.
- [12] 张永侠, 张 彬, 张智慧. 甲状腺结节细针穿刺细胞学检查评估 [J] . *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2011, 46(11): 892–896.
- [13] SHARMA C. Diagnostic accuracy of fine needle aspiration cytology of thyroid and evaluation of discordant cases [J] . *J Egypt Natl Canc Inst*, 2015, 27(3): 147–153.
- [14] HU S, EWERTZ M, TUFANO R P, et al. Detection of serum deoxyribonucleic acid methylation markers: a novel diagnostic tool for thyroid cancer [J] . *J Clin Endocrinol Metab*, 2006, 91(1): 98–104.
- [15] SMITH J A, FAN C Y, ZOU C, et al. Methylation status of genes in papillary thyroid carcinoma [J] . *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 2007, 133(10): 1006–1011.
- [16] HOQUE M O, ROSENBAUM E, WESTRA W H, et al. Quantitative assessment of promoter methylation profiles in thyroid neoplasms [J] . *J Clin Endocrinol Metab*, 2005, 90(7): 4011–4018.
- [17] LANCE-JONES C, OMELCHENKO N, BAILIS A, et al. *Hoxd10* induction and regionalization in the developing lumbosacral spinal cord [J] . *Development*, 2001, 128(12): 2255–2268.
- [18] SHAH N, SUKUMAR S. The *Hox* genes and their roles in oncogenesis [J] . *Nat Rev Cancer*, 2010, 10(5): 361–371.
- [19] BOTAS J. Control of morphogenesis and differentiation by *HOM/Hox* genes [J] . *Curr Opin Cell Biol*, 1993, 5(6): 1015–1022.
- [20] JUNG C, KIM R S, ZHANG H, et al. *HOXB13* is downregulated in colorectal cancer to confer TCF4-mediated transactivation [J] . *Br J Cancer*, 2005, 92(12): 2233–2239.
- [21] RAMAN V, MARTENSEN S A, REISMAN D, et al. Compromised *HOXA5* function can limit *p53* expression in human breast tumours [J] . *Nature*, 2000, 405(6789): 974–978.
- [22] SHIRAIISHI M, SEKIGUCHI A, OATES A J, et al. *HOX* gene clusters are hotspots of de novo methylation in CpG islands of human lung adenocarcinomas [J] . *Oncogene*, 2002, 21(22): 3659–3662.
- [23] EICHBERGER T, REGL G, IKRAM M S, et al. *FOXE1*, a new transcriptional target of *GLI2* is expressed in human epidermis and basal cell carcinoma [J] . *J Invest Dermatol*, 2004, 122(5): 1180–1187.
- [24] JOHANSSON C C, DAHLE M K, BLOMQVIST S R, et al. A winged helix forkhead (*FOXD2*) tunes sensitivity to cAMP in T lymphocytes through regulation of cAMP-dependent protein kinase $R1\alpha$ [J] . *J Biol Chem*, 2003, 278(19): 17573–17579.

(收稿日期: 2019-09-08 修回日期: 2019-10-02)