

甲状腺乳头状癌组织中 TSHR 基因启动子甲基化研究

唐建东 栗夏莲

摘要 **目的** 探讨甲状腺乳头状癌组织中促甲状腺激素受体基因(thyroid stimulating hormone receptor, TSHR)基因启动子区 5'端 CpE 岛甲基化改变的特点与临床特征的关系。**方法** 采用甲基化特异性 PCR(methylation-specific PCR, MSP)方法检测 TSHR 基因启动子甲基化情况。**结果** (1)甲状腺乳头状癌组织中 TSHR 基因启动子甲基化的发生率为 64.7% (22/34), 癌旁组织中 TSHR 基因启动子甲基化的发生率为 26.5% (9/34), 癌组织中 TSHR 基因启动子甲基化率显著高于癌旁组织($P < 0.05$)。(2)有淋巴结转移的甲状腺乳头状癌组织 TSHR 基因启动子甲基化的发生率为 83.3% (15/18), 高于无淋巴结转移组 43.8% (7/16) ($P < 0.05$)。**结论** TSHR 基因启动子异常甲基化是甲状腺乳头状癌发展过程中的分子事件之一, 可能影响了甲状腺乳头状癌细胞的摄碘的功能。

关键词 甲状腺乳头状癌 TSHR 基因 甲基化特异性 PCR

Methylation of TSHR Gene Promoter in Papillary Thyroid Carcinoma. Tang Jiandong, Li Xialian. Department of Endocrinology, Zhengzhou Central Hospital, Henan 450007, China

Abstract Objective To investigate the relationship between the characteristics of promoter methylation of thyroid stimulating hormone receptor(TSHR) gene in papillary thyroid Carcinomas(PTC) and the clinical manifestation of PTC. **Methods** The methylation status of TSHR gene was detected by methylation specific PCR technique(MSP). **Results** (1) The methylation rate of TSHR gene in PTC tissues was 64.7% (22/34), while the methylation rate of TSHR gene in adjacent thyroid tissues(ATT) was 26.5% (9/34), and the rate of methylation of TSHR promoter in PTC was significantly higher than of ATT ($P < 0.05$). (2) The rate of methylation in PTC patients with lymph nodes metastasis was 83.3% (15/18), which was significantly higher than that without lymph nodes metastasis 43.8% (7/16). ($P < 0.05$). **Conclusion** The methylation of promoter in TSHR Gene is a common molecule event and may play a role in iodide-uptake of human PTC.

Key words Papillary thyroid carcinomas (PTC); Thyroid stimulating hormone receptor gene (TSHR gene); Methylation-specific PCR(MSP)

甲状腺乳头状癌(papillary thyroid carcinomas, PTC)经手术治疗预后相对良好,但是近年来大多数人认为,在甲状腺全切除或次全切以后,应当采用 ^{131}I 去除残留甲状腺组织^[1]。放射性碘发挥杀伤肿瘤细胞效应的基础是肿瘤细胞必须具有摄取碘的能力。甲状腺内碘的主动转运是通过甲状腺滤泡细胞基膜上的钠碘转运体(sodium iodide symporter, NIS)介导^[2]。NIS是甲状腺滤泡细胞基膜上的一种糖蛋白,可被促甲状腺激素(thyroid stimulating hormone, TSH)激活^[3]。TSH通过与甲状腺滤泡细胞基膜上的促甲状腺激素受体(TSHR)结合刺激甲状腺聚集碘而全面调节甲状腺功能,TSH对NIS的影响主要表现在:①TSH可上调NIS mRNA和蛋白的表达^[4~6];②TSH

可调节NIS的亚细胞分布^[7~9]。研究发现,大多分化型甲状腺癌的摄碘率的降低与NIS蛋白表达位点的改变有关,也就是NIS蛋白常常表达在胞内而非表达在质膜上。质膜NIS的位点和表达,不但对甲状腺主动性转运碘起作用,而且对甲状腺癌的放射性 ^{131}I 治疗也起着至关重要的作用^[7~9]。我们应用甲基化特异性PCR(methylation-specific PCR, MSP)技术分别检测了甲状腺乳头状癌组织及其癌旁组织中TSHR基因启动子区甲基化的异常,并与患者的临床资料相联系,探讨TSHR基因启动子区甲基化在甲状腺乳头状癌发展过程中的作用和意义,希望能为甲状腺乳头状癌的早期诊断和放射性碘治疗提供有价值的实验资料。

材料与方法

1. 实验材料:(1)对象:取自2005年11月~2006年8月郑州大学第一附属医院甲状腺外科及郑州市中心医院普通外科手术切除的34例甲状腺乳头状癌及癌旁组织(距癌组织 $\geq 0.8\text{cm}$)。参照美国肿瘤协会制定的标准^[10]进行临床分期, I

作者单位:450007 河南省郑州市中心医院内分泌科(唐建东);
450052 郑州大学第一附属医院内分泌科(栗夏莲)

期 25 例,Ⅱ期 3 例,Ⅲ期 6 例,Ⅳ期 0 例,其中男性 5 例,女性 29 例,年龄 20~79 岁,平均 41 岁,有淋巴结转移的 18 例,无淋巴结转移的 16 例。术前均未放疗、化疗,术后所有标本均经病理检查证实。标本离体后 2h 内放置液氮罐中保存。

(2)主要试剂:CpGenome™ DNA Modification Kit 为 Chemicon 公司产品(S7820);SssI 甲基化酶、HS TaqDNA 聚合酶为大连宝生物工程技术有限公司产品(DR007A);引物设计根据 TSHR 基因序列(Genebank ID: AC010072)并参照 zhao 等^[11]由大连宝生物工程技术有限公司合成,甲基化引物[F(m)]序列:正义链为 5'-TG TAGAGTTGAGAATGAGGTGATTTC-3',反义链为 5'-CAACTACAACAAATCCGCCG-3',PCR 产物扩增长度为 88bp;非甲基化引物[F(u)]序列:正义链为 5'-TG TAGAGTTGAGAATGAGGTGATTTT-3',反义链为 5'-CACCAACTACAACAAATCCACCA-3',PCR 产物扩增长度为 91bp。

2. 方法:(1)组织 DNA 的提取:采用常规的蛋白酶 K 消化、酚/氯仿/异戊醇抽提和乙醇沉淀法,TE 溶解后用紫外分光光度计定量。 A_{260}/A_{280} 均介于 1.7~2.0 之间,-20℃ 保存备用。(2)DNA 的亚硫酸氢盐修饰:取 1μg DNA 按修饰试剂盒说明书操作步骤进行修饰,修饰好的 DNA,-20℃ 保存备用(≤2 个月)。(3)MSP:采用 Hot Start PCR 反应体系为 25μl,包括 10XBuffer 2.5μl、dNTPs 2μl、上游引物(20μm)0.3μl、下游引物(20μm)0.3μl、模板 4μl、HS TaqDNA 聚合酶 0.25μl、

加水至 25μl,混匀后,稍离心。反应条件为:95℃ 预变性 5min,94℃ 45s,56℃ 60s,72℃ 60s,40 个循环,最后 1 个循环 72℃ 延伸 7min,PCR 产物经 2% 含有溴化乙锭的琼脂糖凝胶电泳,紫外成像系统下观察并照相。

3. 统计学方法:实验结果采用 SPSS10.0 统计软件包进行统计分析。应用 χ^2 检验和 Fisher's 精确概率法, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 甲状腺乳头状癌组织与癌旁组织中 TSHR 基因甲基化状况:34 例甲状腺乳头状癌组织中有 22 例检测到 TSHR 基因甲基化,甲基化率为 64.7% (其中完全甲基化 12 例,部分甲基化为 10 例),34 例甲状腺乳头状癌癌旁组织中有 9 例检测到 TSHR 基因甲基化,甲基化率为 26.5% (其中完全甲基化 4 例,部分甲基化为 5 例)癌组织中 TSHR 基因启动子甲基化显著增高($\chi^2=10.019, P=0.002<0.05$)。有淋巴结转移的甲状腺乳头状癌组织 15/18 例 TSHR 基因启动子发生甲基化(其中完全甲基化 8 例,部分甲基化为 7 例)显著高于无淋巴结转移组(16 例有 7 例发生甲基化,其中完全甲基化 4 例,部分甲基化为 3 例)($\chi^2=5.812, P=0.016<0.05$)(表 1)。

表 1 TSHR 基因甲基化与甲状腺乳头状癌患者临床特征之间的关系[n(%)]

项目	n	甲基化		非甲基化	χ^2	P
		完全甲基化	部分甲基化	未发生甲基化		
年龄	≥45	8	4 (50)	1 (12.5)	3 (37.5)	1.0 ^b
	<45	26	8 (30.8)	9 (34.6)	14 (34.6)	
性别	男性	5	3 (60.0)	1 (20.0)	1 (20.0)	0.635 ^b
	女性	29	9 (31.0)	9 (31.0)	11 (38.0)	
临床分期	I 期	25	7 (28.0)	9 (36.0)	9 (36.0)	1.0 ^b
	Ⅱ~Ⅲ期	9	5 (55.6)	1 (11.1)	3 (33.3)	
组织	癌组织	34	12 (35.3)	10 (29.4)	12 (35.3)	10.019
	癌旁组织	34	4 (11.8)	5 (14.7)	25 (73.5)	0.002
淋巴结转移	转移	18	8 (44.4)	7 (38.9)	3 (16.7)	5.812
	无转移	16	4 (25.0)	3 (18.8)	9 (56.2)	0.016

^b 为 Fisher's 检验

2. TSHR 基因甲基化与甲状腺乳头状癌患者临床特征的关系:TSHR 基因甲基化与年龄、性别、临床分期均无相关性($P>0.05$)可能与病例数少有关(表 1)。

3. PCR 产物电泳图结果分析:见图 1。

讨 论

TSHR 是甲状腺细胞的一种特异性蛋白质,主要分布于甲状腺滤泡上皮细胞膜上。人的 TSHR 基因位于染色体 14q3.1,长度约为 60kb,^[12] 含有 10 个外

显子,9 个内含子,TSHR 蛋白含有 764 个氨基酸,分为膜外区、跨膜区和膜内区 3 个部分,膜外区有 418 个氨基酸,是 TSH 识别和结合的部位。TSHR 的主要功能是与 TSH 结合,通过刺激甲状腺聚集碘全面调节甲状腺功能。这种作用主要是通过信号转导途径 TSH-TSHR-cAMP-PKA 通路来实现的,TSH 和 TSHR 结合后激活腺苷酸环化酶(cAMP),使胞内的 cAMP 浓度迅速上升激活蛋白激酶 A (protein kinase A,PKA),PKA 激活核内的特异性转录因子或使之发

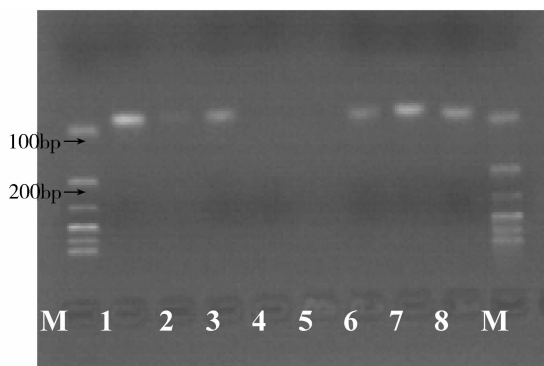


图 1 甲状腺乳头状癌组织中 TSHR 基因的 MSP 扩增状况

1 为甲基化阳性对照;2 为甲基化阴性对照;3、4 为癌组织;5、6、7、8 为癌旁组织;1、3、5、7 扩增甲基化引物;2、4、6、8 扩增非甲基化引物标记;100bp DNA 梯度;7、8 提示半甲基化;6 提示非甲基化

生磷酸化,全面调节甲状腺功能^[7]。另外,TSH 对 NIS 影响主要表现在:①TSH 可上调 NIS mRNA 和蛋白的表达^[4-6];②TSH 可调节 NIS 的亚细胞分布^[7-9]。研究发现,大多分化型甲状腺癌的摄碘率的降低与 NIS 蛋白表达位点的改变有关,也就是 NIS 蛋白常常表达在胞内而非表达在质膜上。质膜 NIS 的位点和表达,不但对甲状腺主动性转运碘起作用,而且对甲状腺癌的放射性¹³¹I 治疗也起着至关重要的作用^[7-9]。

本研究用 MSP 同时检测癌及其癌旁组织目的是为了便于同一个体比较,避免个体差异。结果发现甲状腺乳头状癌及癌旁组织中 TSHR 基因甲基化率分别为 64.7%、26.5%,启动子区 CpG 岛的异常甲基化可能会导致 TSHR 基因功能的失活或下降,因而 TSHR 基因甲基化可能会对人甲状腺乳头状癌的发展有一定的促进作用。Zhao 等^[11]报道 39 例甲状腺乳头状癌细胞株中有 23 例 TSHR 基因启动子区 CpG 岛发生甲基化,甲基化发生率为 59%,本实验结果与之相似。由此可见,TSHR 基因启动子区 CpG 岛发生的甲基化是 TSHR 基因功能的失活或下降,由于 TSH 对甲状腺细胞功能和 NIS 有重要影响,TSHR 基因启动子区 CpG 岛发生的甲基化可能是导致甲状腺细胞摄碘率下降的重要原因之一。

在部分癌及癌旁组织中,既有甲基化特异引物的扩增,同时也有非甲基化特异引物的扩增,部分甲基化也属于甲基化。可能的原因^[13]有:①癌组织、癌旁组织中混杂了炎性、正常或无异常甲基化的细胞;②可能是肿瘤细胞中两个等位基因本身为半甲基化状态,PCR 扩增后有较高表达;③癌细胞的甲基化存

在异质性,即同一例肿瘤组织中不同的细胞亚群有不同的甲基化状态。Fanx,Inda 等认为 CpG 岛的甲基化是一个渐进的过程,也就是说,每一个 CpG 岛上存在的胞嘧啶碱基是逐渐被甲基化的。Gonzalzo 等认为 5 - CpG 岛甲基化达到一定比率 (>60%)时才足以完全关闭基因表达,而低比例的甲基化只能降低基因的转录表达。不管 TSHR 基因 CpG 岛是部分甲基化还是完全甲基化,CpG 岛的逐渐异常的甲基化状态会导致 TSHR 基因的表达下降,TSHR 蛋白的功能也将逐渐下降,甚至完全消失,最终影响甲状腺乳头状癌细胞的摄碘功能。

参考文献

- 1 白耀. 甲状腺恶性肿瘤诊断和治疗的热点讨论. 中华内分泌代谢杂志,2004,20:283-286
- 2 Eskandari S, Loo D, Dai G, *et al.* Thyroid Na⁺/I⁻ symporter. Mechanism, stoichiometry, and specificity [J]. J Biol Chem, 1997,272: 27230-27238
- 3 白耀. 甲状腺病学 - 基础与临床. 北京:科学技术文献出版社, 2003:44-51
- 4 Carrasco N. Iodide transport in the thyroid gland. Biochim Biophys Acta,1993,1154:65-82
- 5 Saito T, Endo T, Kawaguchi A, *et al.* [J] Clin Endocrinol (oxf) 1998,49. (4):517-523
- 6 Kogai T, Curcio F, *et al.* Induction of follicle formation in long-term cultured normol human Thyroid Cells treated with thyrotropin stimulates iodide uptake but not sodium iodide symporter mRNA and protein expression. J Endocrinol,2000,167:125-135
- 7 Orsolya Dohan, Antonio De la Vieja, *et al.* The Sodium/Iodide Symporter: Characterization, Regulation, and Medical Significance. Endocrine Rev,2003,24(1):48-77
- 8 ohan O, Baloch Z, *et al.* Rapid communication: predominant intracellular overexpression of the Na⁺/I⁻ symporter in papillary thyroid carcinoma. J Clinical Endocrinol Metab, 2001,86(6):2697-2700
- 9 Tonacchera M, Viacava P, The sodium iodide symporter protein is always present at a low expression and confined to the cell membrane in nonfunctioning nonadenomatous nodules of toxic nodular goiter. Clin Endocrinol (Oxf) Jul,2004,61(1):40-45
- 10 吴在得,吴肇汉. 外科学. 6 版,北京:人民卫生出版社,2004:314
- 11 Mingzhao Xing, Hennning Usadel, Yoram Cohen *et al.* Methylation of the Thyroid-stimulating Hormone Receptor Gene in Epithelial Thyroid Tumors. Cancer Research,2003,63:2316-2321
- 12 Tomer Y, Barbesino G, Keddache M, *et al.* Mapping of a major susceptibility locus for Graves' disease (GD-1) to chromosome 14q13. J Clin Endocrinol Metab,1997,82:1645-1648
- 13 Orsolya Dohan, Antonio De la Vieja, *et al.* The sodium/Iodide Symporter(NIS):Characterization, Regulation, and Medical Significance. Endocrine Reviews,2003,24(1):48-77

(收稿:2009-11-23)

(修回:2010-01-14)