

甲状腺乳头状癌组织中 *TSHR* 基因启动子甲基化及其临床意义

郑传铭¹, 陆晓筱², 凌志强², 葛明华¹

(1. 浙江省肿瘤医院, 浙江 杭州 310022; 2. 浙江省肿瘤研究所, 浙江 杭州 310022)

摘要: [目的] 探讨甲状腺乳头状癌(papillary thyroid cancer, PTC)组织中 *TSHR* 基因启动子区甲基化程度及其临床意义。[方法] 采用甲基化特异性聚合酶链反应(Methylation-Specific Polymerase chain reaction, MSP)法检测 100 例 PTC 组织及其癌旁组织中 *TSHR* 基因启动子甲基化状态, 并结合患者的临床病理特征和随访信息分析 *TSHR* 与 PTC 进展及预后的关系。[结果] 100 例 PTC 组织中 *TSHR* 基因启动子甲基化率为 77%, 明显高于癌旁组织的 7% ($P=0.002$)。 *TSHR* 基因甲基化程度与患者初诊年龄、原发灶大小、数量、腺外侵犯、淋巴转移、TNM 分期呈正相关 ($P<0.05$); 而与患者性别、T 分期无关 ($P>0.05$)。单因素生存分析显示 *TSHR* 基因甲基化预示更短的无病生存时间, 而多因素生存分析显示 *TSHR* 基因甲基化不是 PTC 患者无病生存的独立影响因素。[结论] *TSHR* 基因启动子区甲基化是 PTC 组织中频发的分子事件, 与肿瘤的进展相关并提示 PTC 患者的不良预后。

主题词: 甲状腺乳头状癌; *TSHR* 基因; 甲基化; 甲基化特异性实时聚合酶链反应

中图分类号: R736.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2017)04-0257-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2017.04.B001

Methylation of *TSHR* Gene Promoter in Papillary Thyroid Carcinoma and its Clinical Significance

ZHENG Chuan-ming¹, LU Xiao-xiao², LING Zhi-qiang², et al.

(1. Zhejiang Cancer Hospital, Hangzhou 310022, China; 2. Zhejiang Cancer Research Institute, Hangzhou 310022, China)

Abstract: [Objective] To investigate the methylation status of *TSHR* gene promoter region in thyroid papillary thyroid carcinoma (PTC) and its clinical significance. [Methods] The methylation status of *TSHR* gene promoter was detected by methylation-specific polymerase chain reaction (MSP) in 100 cases of PTC tissue and the paired adjacent normal tissues. The correlation of *TSHR* methylation with the tumor progression and prognosis was analyzed. [Results] The methylation rate of *TSHR* gene promoter in PTC was 77%, which was significantly higher than that in matched normal tissue ($P=0.002$). There was a positive correlation of the methylation of *TSHR* gene with the age, the size of primary tumor, the number of primary tumor, the tumor invasion, lymphatic metastasis and TNM stage ($P<0.05$), but not with gender and T stage ($P>0.05$). Univariate survival analysis showed that *TSHR* gene methylation was associated with shorter disease-free survival time. Multivariate survival analysis showed that *TSHR* gene methylation was not associated with the survival of patients. [Conclusion] The methylation of *TSHR* gene promoter region is a frequent molecular event in PTC tissue, which is associated with the tumor progression and may suggest a poor prognosis in PTC patients.

Subject words: thyroid papillary carcinoma; *TSHR* gene; methylation; methylation-specific real-time polymerase chain reaction

甲状腺癌是最常见的一种内分泌恶性肿瘤, 近

年来发病率不断上升^[1-3]。甲状腺癌分乳头状癌、滤泡癌、未分化癌和髓样癌等四种主要类型。其中甲状腺乳头状癌(papillary thyroid cancer, PTC)是最常见的一种组织类型, 占总发病率的 59.9%~89.0%^[1,4]。尽管总体预后良好, 但仍有部分 PTC 在术后早期复发

基金项目: 浙江省自然科学基金项目(LY17H280003); 浙江省医药卫生科技计划项目(2010KYA031; 2016KYA054)

通讯作者: 葛明华, 副院长, 主任医师, 硕士; 浙江省肿瘤医院头颈外科, 杭州市拱墅区半山东路 1 号(310022), E-mail: gemingh@163.com

收稿日期: 2016-11-28; **修回日期:** 2017-01-08

并迅速进展, PTC 的发病及进展机制目前还不明确, 目前已知 PTC 的发病与基因改变、激素作用、环境因素相关^[5]。

TSHR 基因调控了甲状腺细胞碘代谢的几个关键步骤, 维持着甲状腺的基本功能^[6,7]。有部分基于细胞系、转基因动物的研究发现 *TSHR* 的缺失可能会促进 PTC 的增殖、侵袭能力^[7-10]。而启动子区的异常甲基化是导致特定基因低表达或不表达的主要原因之一。目前有相当多的研究显示, 与正常甲状腺组织、良性甲状腺肿瘤相比, 甲状腺癌组织中存在 *TSHR* 启动子的异常甲基化^[9,11], 并且较多见于 PTC 早期^[12]。但目前 *TSHR* 基因甲基化与 PTC 之间尚缺乏大样本量的临床病例相关性研究。

本研究利用甲基化特异性 PCR (methylation specific PCR, MSP) 检测 100 例 PTC 及癌旁正常组织中 *TSHR* 基因启动子区 5'-CpG 岛的甲基化情况, 分析癌组织中 *TSHR* 基因甲基化水平与 PTC 临床病理因素之间的关系, 并结合患者的预后信息, 分析患者 *TSHR* 基因甲基化对患者预后的影响。

1 资料与方法

1.1 病例资料

本研究选取 2009~2010 年间于浙江省肿瘤医院行甲状腺全切术的原发性 PTC 病例, 共计 100 例, 均经病理证实, 排除严重心肺脑肾疾病, 排除术前放化疗史。获取这些病例癌及癌旁组织的石蜡切片和临床病理资料。入组病例中男性 11 例, 女性 89 例; 肿瘤最大径 ≤ 2 cm 者 37 例, > 2 cm 者 63 例; 单发病灶 27 例, 多发病灶 73 例; 局限腺内型 36 例, 腺外侵犯型 64 例; 伴颈部淋巴转移 70 例, 不伴颈部淋巴转移 30 例; 参照第 7 版美国癌症联合委员会 (AJCC) 标准分期: I/II 期 64 例, III/IV 期 36 例。

1.2 目标细胞获取及基因组 DNA 抽提、纯化

选取 2~3 张连续, 厚度约 7 μ m 的石蜡切片。经脱蜡及苏木精、伊红染色后, 在光学显微镜辅助下辨认 PTC 细胞及癌旁正常细胞, 并用 27G 号注射针挑取约 3000~5000 个目标细胞。将采用上述方法获取的目标细胞置于蛋白酶 K 提取缓冲液中, 采用 QIAamp DNA 抽提试剂盒 (德国 Qiagen 公司), 严格按试剂盒提供的操作说明提取和纯化微量 DNA。

1.3 甲基化特异性聚合酶链反应

按照 EpiTect Bisulfite Kit 操作手册提供的步骤进行亚硫酸氢盐修饰及纯化基因组 DNA。参考 *TSHR* 基因序列 (GenBank ID: AC010072) 设计 *TSHR* 基因 CpG 岛特异的甲基化 (M) 和非甲基化 (U) 引物如下: *TSHR*-M (F): 5'-TG TAGAGTTGAGAATGAGGC-GATTTTC-3', (R): 5'-CCAACTACAACAAATCCGCCG-3', PCR 扩增产物长度为 88 bp; *TSHR*-U (F): 5'-TG TAGAGTTGAGAATGAGGTGATTTT-3', (R): 5'-CAC-CAACTACAACAAATCCACCA-3', PCR 扩增产物长度为 91 bp。在 ABI 7500 PCR 仪 (美国 ABI system 公司产品) 上用 SYBR® Premix Ex Taq™ 对亚硫酸氢钠法修饰 DNA 进行 qMSP 法分析, 操作步骤按照试剂盒说明书进行。各样品分别使用甲基化、非甲基化引物进行定量分析, 根据所测 ct 值及样品的上样量, 通过标准曲线计算在每纳克 (ng) 样品 DNA 中甲基化的拷贝数。其甲基化百分率计算公式如下: 甲基化率 (M%) = 甲基化 DNA 拷贝数 / (甲基化 DNA 拷贝数 + 非甲基化 DNA 拷贝数) $\times 100\%$ 。甲基化与非甲基化 DNA 拷贝数的总和和用作靶基因 DNA 总拷贝数。最终以甲基化率 $< 20\%$, $\geq 20\%$ 分别视为甲基化和非甲基化。

1.4 随访及统计学处理

随访截止日期为 2016 年 9 月 30 日或患者诊断复发日期, 随访时间 17~75 个月, 中位随访 40 个月。失访按复发计算。

使用 SPSS 22.0 统计学软件, 采用 χ^2 检验或 Fisher 精确检验法对 PTC 组织中 *TSHR* 基因甲基化情况及其与临床病理参数之间的关系进行统计学分析; 采用 Kaplan-Meier 法计算生存率, Log-rank 对数秩检验进行组间比较, Cox 比例风险模型进行多因素分析; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PTC 组织中 *TSHR* 基因启动子高甲基化情况

利用 MSP 技术检测了 PTC 及癌旁正常组织中 *TSHR* 基因的甲基化状况。100 例 PTC 组织中 *TSHR* 基因甲基化率为 77% (77/100), 而癌旁正常甲状腺组织中 *TSHR* 甲基化率为 7% (7/100), 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 10.039$, $P = 0.002$)。

2.2 TSHR 基因甲基化与 PTC 临床病理特征关系

TSHR 基因分别在较大年龄(≥ 45 岁)、较大原发灶($>2\text{cm}$)、多发癌灶、腺外侵犯、淋巴结转移、较晚分期组中表现出显著的高甲基化($P<0.05$)。而在不同性别、不同 T 分期组间 TSHR 基因甲基化率差异无统计学意义($P>0.05$)。见 Table 1。

Table 1 Association between clinicopathological features and TSHR gene promoter methylation in PTC patients

Clinicopathological features	n	TSHR gene promoter methylation		χ^2	P
		$<20\%$	$\geq 20\%$		
Gender					
Male	11	4	7	1.246	0.264*
Female	89	19	70		
Age(years)					
<45	56	18	38	6.007	0.014
≥ 45	44	5	39		
Tumor size(cm)					
≤ 2	37	13	24	4.884	0.027
>2	63	10	53		
Tumor number					
Single	27	12	15	9.604	0.002
Multiple	73	11	62		
Extra-thyroid invasion					
Negative	36	13	23	5.460	0.019
Positive	64	10	54		
T stage					
T ₁ /T ₂	70	16	54	0.003	0.959
T ₃ /T ₄	30	7	23		
N stage					
N ₀	30	18	12	33.129	<0.001
N ₁	70	5	65		
TNM stage					
I / II	64	23	41	16.802	<0.001
III/IV	36	0	36		

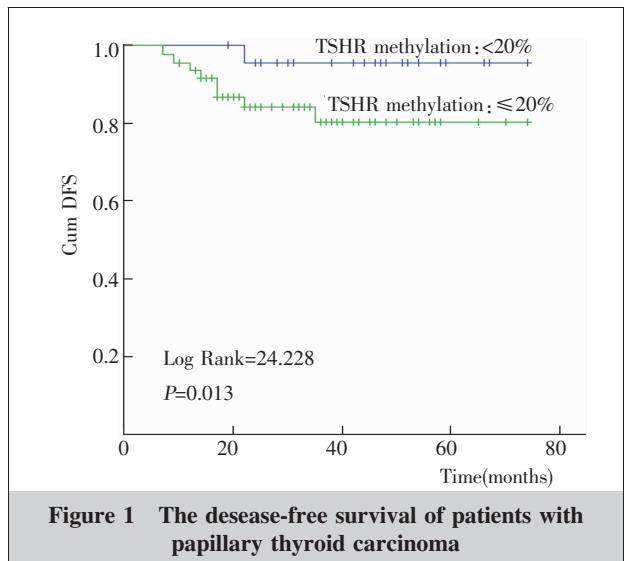
Note: *: Fisher's exact test

2.3 TSHR 基因甲基化与预后的关系

进一步结合本组患者的随访信息进行单因素生存分析。分析结果显示:较大的初诊年龄、多发灶、淋巴结转移、较晚的临床分期、TSHR 高甲基化预示着更短的无病生存时间;性别、原发灶大小、腺外侵犯、T 分期与患者的无病生存时间无关($P<0.05$),见 Table 2, Figure 1。将单因素分析中有统计学意义的因素纳入条件步进法 Cox 回归模型,结果显示仅有 TNM 分期对患者无病生存有影响,TSHR 基因甲基化、腺外侵犯、原发灶数量等因素都被剔除模型,提示 TSHR 基

Table 2 Univariate analysis of disease-free survival in 100 PTC patients

Clinicopathological features	Median survival time(months)	χ^2	P
Gender			
Male	64.235	1.318	0.251
Female	66.342		
Age			
<45	72.562	6.070	0.014
≥ 45	60.386		
Tumor size(cm)			
≤ 2	69.365	0.253	0.615
>2	62.865		
Tumor number			
Single	NA	3.977	0.046
Multiple	NA		
Extra-thyroid invasion			
Negative	72.487	3.472	0.062
Positive	64.395		
T stage			
T ₁ /T ₂	66.115	1.930	0.165
T ₃ /T ₄	64.865		
N stage			
N ₀	NA	5.063	0.024
N ₁	NA		
TNM stage			
I / II	74.519	16.159	5.823E-05
III/IV	56.563		
TSHR methylation			
$<20\%$	71.352	24.228	0.013
$\geq 20\%$	67.234		



因甲基化是 PTC 患者较短无病生存时间的风险因素,但不是的独立预后因素。

3 讨论

DNA 甲基化是基因组 DNA 在甲基转移酶的作用下,将 S-腺苷甲硫氨酸的甲基基团转移到胞嘧啶和鸟嘌呤二核苷酸的胞嘧啶中第 5 位碳原子上。发生在基因启动子区附近的 DNA 甲基化可导致基因转录失活,是生物体表观遗传调节的重要途径之一。DNA 甲基化亦是肿瘤发生发展的重要机制之一。

生理状态下, *TSHR* 基因的基本功能是调节 NIS 基因的表达和甲状腺细胞的摄碘^[13]。 *TSHR* 的沉默突变可导致甲状腺功能减退^[14]。而某些造成 *TSHR* 持续激活的点突变,可以持续激活下游的 cAMP 通路并造成甲亢^[15],或导致患者甲状腺摄碘率提高^[16]。利用基因转染技术人为提高细胞系中 *TSHR* 基因表达后甲状腺相关基因如 *TSHR*、*NIS*、*TPO*、*TG* 的表达都会升高,同时甲状腺细胞的摄碘率也会相应升高^[13,17]。本项研究在 100 例 PTC 组织中发现 *TSHR* 基因甲基化率占 70%,与其他研究者的报道的 34%~87%^[6,7,18]相近。本组癌旁正常组织 *TSHR* 基因甲基化率为 7%,其他中心报道在正常甲状腺组织或良性病变中几乎不存在甲基化^[6,7]。本项研究在更大的样本量基础上进一步证实了先前报道的研究结果。

由于既往相关研究中样本量或样本种类的局限,关于 *TSHR* 基因甲基化与临床病理特征的相关性几乎没有报道,仅有 Kartal 等^[11]发现:伴有淋巴转移的 9 例 PTC 组织中均存在甲基化,但是由于样本数量较少,差异无统计学意义^[11]。我们在分析了 100 例 PTC 组织中 *TSHR* 基因的甲基化状态与临床病理特征后发现, *TSHR* 基因的甲基化不但与 PTC 淋巴结转移有关,而且与更大的患者初诊年龄、更大的原发灶大小、更多的原发灶数量、肿瘤腺外侵犯、更晚的 TNM 分期相关,从而为 *TSHR* 基因失活促进 PTC 的进展这一假说提供了更丰富有力的临床证据。

依照现有的理论, *TSHR* 基因甲基化可能通过抑制 *TSHR* 的蛋白表达来促进 PTC 的进展。34 例存在 *TSHR* 基因甲基化的 PTC 病例中 14 例 *TSHR* mRNA 不表达,而在 16 例 *TSHR* 无甲基化的病例中仅 4 例 *TSHR* 基因 mRNA 不表达^[18]。基于细胞系的功验证试验发现 *TSHR* 基因甲基化会导致 *TSHR* 基因低表达^[7,8]。以 5-氮杂-2'-脱氧胞苷处理存在 *TSHR* 甲基化的甲状腺癌细胞系,使 *TSHR* 基因去甲基化

后,细胞系的增殖和迁徙能力被抑制,进一步的皮下移植瘤成瘤实验也发现肿瘤的生长被抑制^[8]。这一研究结果与我们在临床病例中发现的 *TSHR* 基因甲基化与肿瘤进展的相关性相互印证,提示 *TSHR* 基因的失活可能会促进 PTC 的增殖和侵袭。另有研究发现 *TSHR* 基因甲基化与 BRAF V600E 突变存在较强的相关性,提示 *TSHR* 基因与 MAPK 通路之间可能存在一定的联系^[9]。基于基因敲除老鼠的动物实验发现:与 *TSHR* 缺失伴随 BRAF 野生型 PTC 相比, *TSHR* 缺失伴随 BRAF 突变所形成的 PTC 侵袭性更高,肿瘤组织中基因组不稳定性程度更高^[10]。在抑制 BRAF 突变以后 *TSHR* 基因的表达水平提高了 2.8 倍,细胞系摄碘率升高了 7.5 倍^[19]。BRAF 突变是 PTC 发生、发展过程中非常关键的分子事件,它与 *TSHR* 基因失活之间的联系以及对 PTC 生物学行为的交互作用进一步印证了 *TSHR* 基因对 PTC 的促进作用。此外,我们进一步探讨了 *TSHR* 基因甲基化和 PTC 患者无病生存率之间的关系,发现 *TSHR* 基因启动子区的高甲基化的患者无病生存时间更短。这一结果提示 *TSHR* 基因在 PTC 的转移复发过程中发挥了一定的作用。

本研究利用 MSP 技术检测了 100 例 PTC 组织及其配对癌旁正常组织中 *TSHR* 基因启动子区的甲基化情况。我们发现,与癌旁正常组织相比,PTC 中甲基化程度明显升高,同时 *TSHR* 甲基化与年龄、原发灶大小、原发灶数量、腺外侵犯、淋巴转移、TNM 分期有关,并预示了不良预后。因此 *TSHR* 基因的甲基化失活可能促进 PTC 进展和复发。同时,该基因的甲基化与 BRAF V600E 突变之间的关系值得大样本临床研究进一步深入探讨。

参考文献:

- [1] Chen AY, Jemal A, Ward EM. Increasing incidence of differentiated thyroid cancer in the United States, 1988 – 2005[J]. Cancer, 2009, 115(16):3801–3807.
- [2] Aschebrook-Kilfoy B, Ward MH, Sabra MM, et al. Thyroid cancer incidence patterns in the United States by histologic type, 1992–2006[J]. Thyroid, 2011, 21(2):125–134.
- [3] Rego-Iraeta A, Perez-Mendez LF, Mantinan B, et al. Time trends for thyroid cancer in northwestern Spain: true rise in the incidence of micro and larger forms of papillary thyroid carcinoma[J]. Thyroid, 2009, 19(4):333–340.

- [4] Hundahl SA, Fleming ID, Fremgen AM, et al. A National Cancer Data Base report on 53,856 cases of thyroid carcinoma treated in the U.S., 1985–1995[J]. *Cancer*, 1998, 83(12):2638–2648.
- [5] Hemminki K, Li X. Familial risk of cancer by site and histopathology[J]. *Int J Cancer*, 2003, 103(1):105–109.
- [6] Smith JA, Fan CY, Zou C, et al. Methylation status of genes in papillary thyroid carcinoma [J]. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 2007, 133(10):1006–1011.
- [7] Xing M, Usadel H, Cohen Y, et al. Methylation of the thyroid-stimulating hormone receptor gene in epithelial thyroid tumors; a marker of malignancy and a cause of gene silencing[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(9):2316–2321.
- [8] Kim WG, Zhu X, Kim DW, et al. Reactivation of the silenced thyroid hormone receptor beta gene expression delays thyroid tumor progression[J]. *Endocrinology*, 2013, 154(1):25–35.
- [9] Khan MS, Pandith AA, Masoodi SR, et al. Epigenetic silencing of TSHR gene in thyroid cancer patients in relation to their BRAF V600E mutation status [J]. *Endocrine*, 2014, 47(2):449–455.
- [10] Orim F, Bychkov A, Shimamura M, et al. Thyrotropin signaling confers more aggressive features with higher genomic instability on BRAF(V600E)-induced thyroid tumors in a mouse model[J]. *Thyroid*, 2014, 24(3):502–510.
- [11] Kartal K, Onder S, Kosemehmetoglu K, et al. Methylation status of TSHr in well-differentiated thyroid cancer by using cytologic material[J]. *BMC Cancer*, 2015, 15(1):1–6.
- [12] Mohammadi-asl J, Larijani B, Khorgami Z, et al. Qualitative and quantitative promoter hypermethylation patterns of the P16, TSHR, RASSF1A and RARBeta2 genes in papillary thyroid carcinoma [J]. *Med Oncol*, 2011, 28(4):1123–1128.
- [13] Cheng W, Fu H, Feng F, et al. Efficacy of lentiviral-mediated transfection of hTSHR in poorly differentiated thyroid carcinoma cell line[J]. *Nucl Med Biol*, 2013, 40(4):576–580.
- [14] De Marco G, Agretti P, Camilot M, et al. Functional studies of new TSH receptor (TSHr) mutations identified in patients affected by hypothyroidism or isolated hyperthyrotrophinaemia[J]. *Clin Endocrinol*, 2009, 70(2):335–338.
- [15] Nishihara E, Chen CR, Higashiyama T, et al. Subclinical nonautoimmune hyperthyroidism in a family segregates with a thyrotropin receptor mutation with weakly increased constitutive activity[J]. *Thyroid*, 2010, 20(11):1307–1314.
- [16] Nishihara E, Amino N, Maekawa K, et al. Prevalence of TSH receptor and Gsalpha mutations in 45 autonomously functioning thyroid nodules in Japan[J]. *Endocr J*, 2009, 56(6):791–798.
- [17] Feng F, Wang H, Hou S, et al. Re-induction of cell differentiation and (131)I uptake in dedifferentiated FTC-133 cell line by TSHR gene transfection[J]. *Nucl Med Biol*, 2012, 39(8):1261–1265.
- [18] Dai YL, Cai DH, Chen H, et al. Transcription and promoter hypermethylation of thyroid stimulating hormone receptor gene in human papillary thyroid carcinoma [J]. *Journal of Southern Medical University*, 2010, 30(30):114–117.
- [19] Kleiman DA, Buitrago D, Crowley MJ, et al. Thyroid stimulating hormone increases iodine uptake by thyroid cancer cells during BRAF silencing[J]. *J Surg Res*, 2013, 182(1):85–93.

《肿瘤学杂志》关于提交“作者投稿无学术不端行为承诺书”的申明

本刊已开通网上在线投稿系统(<http://www.chinaoncology.cn>), 作者登录网站后, 请在左上角选择《肿瘤学杂志》, 选中后进入首页, 首次投稿作者请先注册, 在完成稿件上传、作者信息填写等程序后, 请您在网站首页(<http://www.chinaoncology.cn>)“下载中心”栏中下载《肿瘤学杂志》的“作者投稿无学术不端行为承诺书文档”, 填写后1周内连同单位介绍信、基金证明复印件快递寄至本刊编辑部, 本刊确认收到上述材料后, 该文稿才能进入审稿编辑流程。