

· 论 著 ·

## 甲状腺乳头状癌中 DNA 修复基因 hMLH1 的甲基化与 BRAF 突变的关系

宝 荣<sup>1</sup>, 邵 华<sup>2</sup>, 成建新<sup>3△</sup>, 王 俭<sup>1</sup>

(1. 重庆市第九人民医院病理科 400700; 2. 中国医科大学附属盛京医院普外三科, 沈阳 110004; 3. 山东省滨州市人民医院病理科 256610)

**摘要:**目的 研究甲状腺乳头状癌(PTC)中 DNA 修复基因 hMLH1 的甲基化状况,分析其与 PTC 的 T1799A BRAF 基因突变的关系。方法 应用甲基化特异性 PCR(MSP)对 60 例 PTC 和 20 例癌对侧甲状腺正常组织进行 hMLH1 的甲基化检测。直接测序法检测上述标本中 T1799A BRAF 突变。结果 60 例 PTC 中, hMLH1 甲基化的发生率为 23%(14/60), T1799A BRAF 突变率为 65%(39/60)。在正常甲状腺组织中, 没有检测到 hMLH1 的甲基化或突变。基因的甲基化或突变与临床病理特征没有显著关联。携带 T1799A BRAF 突变的 PTC 较携带野生型 BRAF 基因的 PTC 更容易发生 DNA 修复基因的甲基化[13/39(33%) vs 1/21(5%),  $P=0.022$ ]。结论 PTC 中 DNA 修复基因 hMLH1 的甲基化较 T1799A BRAF 突变少见; 甲基化与 T1799A BRAF 突变有关联。

关键词: 甲基化; hMLH1 基因; BRAF 突变; 甲状腺癌

中图分类号: R736.1; R73-37

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2010)05-0519-03

### Hypermethylation of DNA repair genes hMLH1 in papillary thyroid cancer and its association with BRAF mutation

BAO Rong<sup>1</sup>, SHAO Hua<sup>2</sup>, CHENG Jian-xin<sup>3△</sup>, et al.

(1. Department of Pathology, No. 9 People's Hospital of Chongqing, Chongqing 400700, China; 2. Third Department of General Surgery, Shengjing Hospital Affiliated to China Medical University, Shenyang, Liaoning 110004, China; 3. Department of Pathology, People's Hospital of Binzhou City, Binzhou, Shandong 256610, China)

**Abstract: Objective** To investigate the aberrant hypermethylation of DNA repair genes hMLH1 in papillary thyroid cancer (PTC), and to analyze its association with T1799A BRAF gene mutation. **Methods** Promoter methylation status of DNA repair genes hMLH1 in 60 PTCs and 20 normal thyroid tissues was examined using methylation-specific PCR (MSP). The T1799A BRAF was determined by direct sequencing. **Results** Among the 60 PTC tumors examined, the hMLH1 gene was hypermethylated in 23% ( $n=14$ ) samples. The T1799A BRAF mutation was found in 65% ( $n=39$ ) samples. Neither methylation of DNA repairs genes nor BRAF mutation was seen in normal thyroid tissues. Methylation of the DNA repairs genes or BRAF mutation was not in relation to clinicopathological features of tumors. Methylation of the DNA repair genes was associated with the T1799A BRAF mutation in PTC[13/39(33%) for the BRAF mutation-positive group vs. 1/21 (5%) for the BRAF mutation-negative group,  $P=0.022$ ]. **Conclusion** Methylation of the hMLH1 gene is not as common as BRAF mutation in PTC. There seems to be a close relationship between methylation of DNA repair genes and the BRAF mutation.

Key words: methylation; hMLH1 gene; BRAF mutation; thyroid cancer

上皮细胞起源的甲状腺癌是最常见的内分泌系统恶性肿瘤,也是近年来发病率增加最快的恶性肿瘤之一<sup>[1]</sup>。组织学上,最常见的甲状腺癌是乳头状甲状腺癌(PTC),约占甲状腺癌的 80%。已有研究表明 PTC 中存在基因的甲基化现象,与 PTC 肿瘤腺外侵袭、淋巴结转移、多病灶等恶性病理特征关系密切,并且与 PTC 中另一个重要的遗传事件——T1799A BRAF 基因突变相关<sup>[2-4]</sup>。hMLH1 是重要的 DNA 修复基因,在维持基因组稳定上发挥着重要作用<sup>[5]</sup>。本研究拟探讨 PTC 中是否存在 hMLH1 基因的甲基化,以及甲基化是否与临床病理特征相关、是否与 BRAF 基因突变相关。

### 1 对象与方法

**1.1 研究对象** 研究病例来自 2005~2006 年在滨州人民医院行甲状腺全切术的 PTC 患者(60 例),其中男 12 例,女 48 例,年龄 26~66 岁,平均年龄 44 岁。获取肿瘤石蜡切片和临

床病理学资料,包括肿瘤的甲状腺外侵袭情况、淋巴结转移和肿瘤分期。肿瘤分期参照美国癌症联合委员会(AJCC)现行标准。另收集 20 例癌对侧甲状腺正常组织石蜡切片。

**1.2 提取 DNA** 从石蜡组织切片中提取 DNA。首先在室温下用二甲苯处理切片 8 h 以去除石蜡,然后在 48 °C 下用 1% 十二烷基硫酸钠(SDS)和 0.5 mg/mL 蛋白酶 K 消化 48 h,其间为加快消化过程分 2~3 次加入 20% SDS-蛋白酶 K 3~5  $\mu$ L。随后用标准酚-氯仿提取法和乙醇沉淀法将 DNA 从消化后的组织中进行分离。

**1.3 DNA 的重亚硫酸盐处理** 对 DNA 进行亚硫酸氢钠处理使胞嘧啶转化成尿嘧啶。首先将 2  $\mu$ g DNA 和 5  $\mu$ g 鲑鱼精子 DNA 与 0.3 M 氢氧化钠在 50 °C 进行孵育,接着加入 500  $\mu$ L 含有 3 M 亚硫酸氢钠和 10 mM 对苯二酚的新鲜混合液,在 70 °C 孵育 2~3 h。使用亲和层析柱对 DNA 标本进行提纯

△ 通讯作者,电话:(0543)3282981;E-mail: bzchengjianxin@163.com。

表 1 本研究中用到的 MSP 引物序列和 PCR 退火温度

基因	正向 (5' → 3')	反向 (5' → 3')	bp	Ta
hMLH1	U TTTTGATGTAGATGTTTATTAGGGTTGT	ACCACCTCATCATAACTACCCACA	124	56
	M ACGTAGACGTTTATTAGGGTCGC	CCTCATCGTAACTACCCGCG	115	56

U:非甲基化反应引物序列;M:甲基化反应引物序列。

表 2 hMLH1 基因甲基化与肿瘤临床病理特征及 BRAF 突变的关系[n(%)]

项目	甲基化阳性	甲基化阴性	P	BRAF 突变	野生型 BRAF	P
n	14	46		39	21	
诊断时年龄(岁)	44.4 ± 7.9	43.3 ± 10.2	0.71	43.3 ± 10.2	44.1 ± 8.8	0.74
男性/女性	3(21)/11(79)	9(20)/37(80)	0.88	7(18)/32(72)	5(24)/16(76)	0.84
甲状腺腺外侵袭	2(13)	3(7)	0.58	4(10)	1(5)	0.65
淋巴结转移	6(43)	13(28)	0.34	14(36)	5(24)	0.50
肿瘤分期						
I/II	9(64)	39(85)	0.13	31(79)	17(81)	0.84
III/IV	5(36)	7(15)	0.13	8(21)	4(19)	0.84
DNA 修复基因甲基化	—	—	—	13(33)	1(5)	0.022

—:未检测。

(Wizard<sup>®</sup> DNA Clean-Up System, Promega, 美国)。提纯后的标本经 0.3 M 氢氧化钠在室温下处理 10 min, 用乙醇析出。将重亚硫酸盐处理过的 DNA 干燥后再次混悬于 30 μL 水溶液中以备进行基因甲基化分析。

**1.4 T1799A BRAF 突变分析** BRAF 基因第 15 外显子的 T1799A 突变是 PTC 中占绝对比例的 BRAF 突变。本研究中, 应用聚合酶链反应(PCR)对标本 DNA BRAF 基因的第 15 外显子进行扩增, 引物序列: 5'-TCA TAA TGC TTG CTC TGA TAG GA-3' (正向) 和 5'-GGC CAA AAA TTT AAT CAG TGG A-3' (反向)。扩增后的产物经过 Big Dye 循环反应后进行直接测序(ABI PRISM 3730 基因测序仪, 加拿大)。

**1.5 甲基化特异性 PCR (MSP)** MSP 反应在 20 μL 含有重亚硫酸盐处理的 DNA 的反应混合液中进行。反应混合液包括约 50 ng 重亚硫酸盐处理的 DNA, 16.6 mM 硫酸铵, 67 mM Tris (pH 8.8), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 每种三磷酸脱氧核苷酸 200 μM (dATP, dCTP, dGTP 和 dTTP), 200 nM 正向引物和反向引物以及 0.5 单位 Platinum Taq DNA 聚合酶(Invitrogen 公司, 美国)。MSP 引物序列和 PCR 退火温度(表 1)。MSP 反应产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳, 应用溴化乙锭进行显色。以经体外甲基化酶处理的 DNA 样品作为 MSP 的阳性对照。

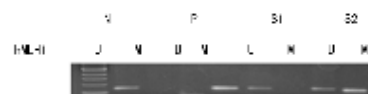
**1.6 统计学方法** 全部数据输入 Excel 数据库, 应用 SPSS 11.5 软件进行统计学分析。计数资料采用频率和百分数表示, 计量资料应用  $\bar{x} \pm s$  表示。计数资料的统计应用  $\chi^2$  检验, 计量资料的统计应用 *t* 检验。P 值采用双侧检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 标本中 DNA 修复基因 hMLH1 甲基化状况** 60 例 PTC 标本中, hMLH1 基因甲基化的发生率为 23% (14/60) (图 1)。hMLH1 基因的甲基化与某些临床病理特征有相关的趋势, 但没有统计学意义 ( $P > 0.05$ ) (表 2)。20 例正常甲状腺组织中, 未检出 hMLH1 基因甲基化。

**2.2 标本中 T1799A BRAF 突变状况** 60 例 PTC 标本中,

T1799A BRAF 突变率为 65% (39/60) (封 3 图 2)。突变与临床病理特征亦未见显著关联(表 2)。20 例正常甲状腺组织中, 未检出 BRAF 基因突变。



N: 正常组织; P: 阳性对照; S: 样品; U: 非甲基化反应条带; M: 甲基化反应条带。

图 1 MSP 结果示意图

**2.3 基因甲基化与 T1799A BRAF 突变的关系** 携带 T1799A BRAF 突变的 PTC 病例中, 33% (13/39) 发生了 DNA 修复基因 hMLH1 甲基化; 而携带野生型 BRAF 基因的 PTC 病例仅为 5% (1/21), 二者之间差异有统计学意义 ( $P = 0.022$ )。

## 3 讨 论

DNA 甲基化是重要的基因表达调节机制, 尤其在胚胎发育时更是如此。生理情况下, 甲基化存在于失活的 X 染色体和印记基因; 正常表达的基因如管家基因, 则不发生甲基化。肿瘤发生时, 肿瘤细胞基因组局部区域基因存在高甲基化, 包括肿瘤抑制基因、抑制肿瘤转移和浸润的基因和血管形成抑制基因等, 导致相应的基因沉默而致表达减少或完全丧失。与突变等基因学改变比较, DNA 甲基化常常是肿瘤发生的一个重要的早期事件<sup>[6]</sup>。

本研究中探讨的基因——hMLH1 是与 DNA 修复密切相关的基因, 它位于染色体 3p21.3 区, 参与了错配修复过程<sup>[5]</sup>。hMLH1 基因甲基化或突变是结肠癌的常见遗传事件<sup>[7-9]</sup>。在甲状腺癌中, hMLH1 基因的甲基化状况研究甚少。本研究结果表明, hMLH1 基因的甲基化在 PTC 中并不常见。研究中发现的甲基化病例, 其肿瘤有发生淋巴结转移及肿瘤分期较晚的趋势, 尽管没有统计学差异, 但仍提示甲基化可能参与了 PTC 的发生和发展。

BRAF 基因 T1799A 突变的发现是甲状腺癌发生、发展机

制研究历程中的突破性事件。这一突变导致 BRAF 蛋白第 600 位的氨基酸由 V 变为 E, 造成 Ras → Raf → MEK → ERK/MAP 激酶通路(MAP 激酶通路)的异常持续激活, 促进 PTC 发生、进展和侵袭转移。BRAF 基因突变发生于约 45% 的 PTC 和 25% 的甲状腺未分化癌(ATC)患者中, 大样本的研究显示该突变与肿瘤的高恶性度相关<sup>[10]</sup>。本研究中 BRAF 突变虽然与肿瘤的腺外侵袭和淋巴结转移有相关的趋势, 但差异无统计学意义( $P > 0.05$ ), 考虑是由于研究纳入的样本量较小。对 BRAF 基因突变导致甲状腺癌恶性程度增高的分子机制还没有令人信服的解释。最近的一些研究观察到甲状腺癌中 BRAF 基因 T1799A 突变与多种基因高甲基化的存在相关, 如 SLC5A8、TIMP3、DAPK 和 RAR $\beta_2$ <sup>[11]</sup>。本研究也提示 DNA 修复基因的甲基化与 BRAF 基因突变有关。因为这些基因发生甲基化也预示肿瘤具有更多的恶性病理特征, 推测 BRAF 基因突变可能是通过基因的甲基化改变导致肿瘤具有更高的侵袭性, 更容易发生转移。

总之, 本研究结果显示, PTC 中 DNA 修复基因 hMLH1 甲基化较 T1799A BRAF 突变少见; 甲基化的发生与肿瘤的临床病理特征差异无统计学意义( $P > 0.05$ ), 但在携带 T1799A BRAF 突变的 PTC 病例中更为常见。

#### 参考文献:

- [1] Davies L, Welch HG. Increasing incidence of thyroid cancer in the United States, 1973-2002[J]. JAMA, 2006, 295(18):2164.
- [2] Hu S, Liu D, Tufano RP, et al. Association of aberrant methylation of tumor suppressor genes with tumor aggressiveness and BRAF mutation in papillary thyroid cancer[J]. Int J Cancer, 2006, 119(10):2322.
- [3] Liu D, Hu S, Hou P, et al. Suppression of BRAF/MEK/MAP kinase pathway restores expression of iodide-metabolizing genes in thyroid cells expressing the V600E BRAF mutant[J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(4):1341.
- [4] Porra V, Ferraro-Peyret C, Durand C, et al. Silencing of the tumor suppressor gene SLC5A8 is associated with BRAF mutations in classical papillary thyroid carcinomas[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2005, 90(5):3028.
- [5] Friedberg EC. DNA damage and repair[J]. Nature, 2003, 421(6921):436.
- [6] Baylin SB, Ohm JE. Epigenetic gene silencing in cancer—a mechanism for early oncogenic pathway addiction? [J]. Nat Rev Cancer, 2006, 6(2):107.
- [7] Wang L, Cunningham JM, Winters JL, et al. BRAF mutations in colon cancer are not likely attributable to defective DNA mismatch repair[J]. Cancer Res, 2003, 63(17):5209.
- [8] Samowitz WS, Albertsen H, Sweeney C, et al. Association of smoking, CpG island methylator phenotype, and V600E BRAF mutations in colon cancer[J]. J Natl Cancer Inst, 2006, 98(23):1731.
- [9] Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M, et al. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer[J]. Nat Genet, 2006, 38(7):787.
- [10] Xing M. BRAF mutation in papillary thyroid cancer: pathogenic role, molecular bases, and clinical implications[J]. Endocr Rev, 2007, 28(7):742.
- [11] Xing M. Gene methylation in thyroid tumorigenesis[J]. Endocrinology, 2007, 148(3):948.

(收稿日期:2009-08-10 修回日期:2009-09-10)

(上接第 518 页)

- [2] Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface [J]. Science, 1985, 228(4705):1315.
- [3] Huse WD, Sastry L, Iverson SA, et al. Generation of a large combinatorial library of the immunoglobulin repertoire in phage lambda. 1989[J]. Biotechnology, 1992, 24:517.
- [4] Xu MY, Xu XH, Chen GZ, et al. Production of a human single-chain variable fragment antibody against esophageal carcinoma[J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(18):2619.
- [5] 何映谊, 何新荣, 叶铁真. 人类胚胎组织完整 RNA 的分离[J]. 中国实验血液学杂志, 2005, 13(6):1058.
- [6] Cummings PJ, Hooper NE, Rocolanel SS. Generation of a recombinant bacteriophage antibody library to mycobacterium tuberculosis[J]. Hybridoma, 1998, 17(2):151.
- [7] 杨清浩, 王祥卫, 金燕, 等. 噬菌体展示肽表位的免疫原性研究[J]. 重庆医学, 2005, 34(10):1480.
- [8] Yokota T, Milenic DE, Whidow M, et al. Rapid tumor penetration of a single-chain Fv and comparison with other immunoglobulin forms[J]. Cancer Res, 1992, 52(12):3402.
- [9] Saerens D, Kinne J, Bosmans E, et al. Single domain antibodies derived from dromedary lymph node and peripheral blood lymphocytes sensing conformational variants of prostate-specific antigen[J]. J Biol Chem, 2004, 279(50):51965.
- [10] 张青, 郝晓柯, 苏明权, 等. 噬菌体抗体库筛选方法的研究进展[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2005, 12(3):222.

(收稿日期:2009-07-21 修回日期:2009-09-10)