

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2022.22.014

SLC5A8 基因甲基化与甲状腺肿瘤临床特征及预后相关性的分析*

杨彦¹,徐斌^{2△},李玉霞²,唐运祥²,杨钱³

(重庆市急救医疗中心/重庆市第四人民医院:1.肿瘤血液科;2.核医学科;3.普通外科 400014)

[摘要] 目的 探讨 SLC5A8 基因甲基化与甲状腺肿瘤临床病例特征及预后的关系。方法 选取甲状腺癌、甲状腺腺瘤、癌旁组织及正常甲状腺组织标本各 100 例,采用甲基化特异性 PCR 检测组织中 SLC5A8 基因甲基化及 mRNA 转录水平,了解 SLC5A8 基因甲基化与甲状腺肿瘤临床病理特征的关系。采用 Kaplan-Meier 法绘制生存曲线并建立 Cox 比例风险回归模型,对术后 2 年复发风险进行评估。结果 甲状腺癌组织及甲状腺腺瘤组织 SLC5A8 基因甲基化阳性率分别为 79% 和 66%,均显著高于癌旁组织及正常组织,差异有统计学意义($P < 0.05$)。SLC5A8 基因甲基化与甲状腺肿瘤患者包膜侵犯、甲状腺结合球蛋白(TG)水平、胆固醇水平、术前甲状腺功能、淋巴结转移及 TNM 分级等因素有关,差异有统计学意义($P < 0.05$)。此外,SLC5A8 甲基化、包膜侵犯、TG 水平、淋巴结转移及 TNM 分级等因素为甲状腺肿瘤患者预后的影响因素。SLC5A8 基因甲基化阳性患者术后 2 年复发率(25.67%)显著高于阴性患者(10.20%),差异有统计学意义($P < 0.001$)。结论 SLC5A8 基因甲基化有望作为甲状腺肿瘤预后判断的生物标志物。

[关键词] 甲状腺肿瘤;SLC5A8 基因;甲基化;分子诊断学;预后

[中图分类号] R736.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2022)22-3854-05

Analysis on correlation between SLC5A8 gene methylation and clinical features and prognosis of thyroid tumors*

YANG Yan¹, XU Bin^{2△}, LI yuxia², TANG Yunxiang², YANG Qian³

(1. Department of Tumor Oncology; 2. Department of Nuclear Medicine; 3. Department of General Surgery, Chongqing Municipal Emergency Medical Center/the Forth People's Hospital of Chongqing, Chongqing 400014, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the relationship between SLC5A8 gene methylation and clinical characteristics and prognosis of thyroid tumors. **Methods** Each 100 specimens of thyroid cancer, thyroid adenoma, paracancerous tissue and normal thyroid tissue were selected. The methylation specific PCR was used to detect the SLC5A8 gene methylation and mRNA transcriptional level, and the relationship between SLC5A8 gene methylation and clinicopathological features of thyroid tumors was analyzed. The survival curve was drawn by the Kaplan-Meier method and the Cox proportional hazards regression model was established to evaluate the risk of recurrence in postoperative 2 years. **Results** The positive rates of SLC5A8 gene methylation in the thyroid cancer tissue and thyroid adenoma tissue were 79% and 66%, respectively, which were significantly higher than those in the paracancerous thyroid tissue and normal tissue, the difference were statistical significance ($P < 0.05$). The methylation of SLC5A8 gene was related to the factors of capsular invasion, TG level, cholesterol level, preoperative thyroid function, lymph node metastasis and TNM grade in the patients with thyroid tumor, the difference were statistical significance ($P < 0.05$). In addition, the SLC5A8 methylation, capsular invasion, TG level, lymph node metastasis and TNM grade were the influencing factors of the prognosis in the patients with thyroid tumor ($P < 0.05$). The 2-year recurrence rate in the patients with SLC5A8 gene methylation positive was 25.67%, which was significantly higher than 10.20% in the patients with SLC5A8 gene methylation negative, the difference was statistical significance ($P < 0.001$). **Conclusion** SLC5A8 gene methylation is expected to be a biomarker for judging the prognosis of thyroid tumors.

[Key words] thyroid tumors; SLC5A8 gene; methylation; molecular diagnosis; prognostic

* 基金项目:重庆市渝中区科学技术局基金项目(20200144)。 作者简介:杨彦(1984—),主治医师,硕士,主要从事恶性肿瘤治疗与研究。

△ 通信作者, E-mail: 536512319@qq.com。

作为内分泌系统中的常见肿瘤,甲状腺肿瘤发病率逐年攀升,严重影响居民的身心健康^[1-3]。如何提高甲状腺肿瘤诊断的准确性,识别肿瘤复发转移的风险是临床医生迫切需要思考的问题。随着分子诊断学的发展,DNA 甲基化已成为表观遗传学的重要研究机制,在肿瘤形成发展中起到了非常重要的调节作用^[4-5]。SLC5A8 基因于 2002 年在甲状腺中首次被发现,存在于人类染色体的 12q13-23,相关研究已证实具有促进肿瘤凋亡和抗肿瘤细胞增殖的作用^[6-8]。SLC5A8 基因在多种肿瘤组织中呈异常表达状态,大量研究分析发现,人类大部分肿瘤中均有 SLC5A8 基因,例如甲状腺癌^[9]、食管癌^[10]、宫颈癌^[11]等。目前关于 SLC5A8 基因甲基化检测对于甲状腺肿瘤的良恶性的早期诊断的研究不多,同时针对甲状腺肿瘤恶变监测及预后评估尚未见相关报道。本研究采用回顾性方法,探讨 SLC5A8 基因甲基化在甲状腺肿瘤的诊断及预后中的意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集 2017 年 10 月至 2019 年 9 月在本院行初次甲状腺手术的患者,其中男 126 例,女 274 例,平均年龄(49.24±4.76)岁。切下新鲜样本,获取甲状腺病灶组织(甲状腺癌或甲状腺腺瘤)、癌旁组织(与肿瘤边缘的间距<0.5 cm)、正常甲状腺组织(简称正常组织,与肿瘤边缘的间距>2.0 cm,并经病理证实无癌)。不同病理类型标本各取 100 例,共计 400 例。100 例甲状腺癌中有分化型甲状腺癌 89 例,其中乳头状癌 83 例,滤泡状癌 6 例;未分化癌 5 例;髓样癌 6

例。标本均由本院病理科给予确诊,切除后立刻放入液氮中保存。患者均签署知情同意书,符合医学伦理学规定。纳入标准:入组的所有病例均具备明确的手术适应证;具有完整的临床资料、实验室检查结果、病理诊断资料;所有患者否认甲状腺相关疾病临床治疗史,否认在接受手术治疗前有放化疗等抗癌治疗,否认合并其他类型恶性肿瘤及其他相关遗传病史;年龄 20~70 周岁。排除标准:合并有其他甲状腺疾病者,或有其他类型恶性肿瘤病史。

1.2 临床资料

收集患者性别、年龄、结节数目、结节大小、是否侵犯包膜、甲状腺结合球蛋白(TG)、胆固醇、甘油三酯、术前甲状腺功能、B 超特点(是否有钙化灶、边界是否清晰、是否有血流信号)、有无淋巴结转移、TNM 分级等信息。临床资料以患者手术时的住院病例为依据。

1.3 信息随访

通过查阅门诊病历、住院病例、打电话形式对患者进行随访,随访时间自术后起至 2021 年 9 月,平均随访时间 2 年。记录患者最后随访日期及疾病状态(无事件、疾病持续、复发、疾病特异性死亡),记录复发类型(局部复发、区域复发、远处复发)、复发日期等。

1.4 实验方法

1.4.1 引物设计

应用引物设计软件 Primer5 并参照 Gene Bank 自行设计 SLC5A8 基因引物,交由上海生工生物有限公司协助合成,引物的序列详见表 1。针对 SLC5A8 基因的 DNA 序列设计 2 对引物,进行 PCR 反应。

表 1 引物的序列及扩增片段

基因	正向(5'-3')	反向(5'-3')	产物大小(bp)
SLC5A8	ATCTACGGTGTCAACCAATCCC	GCGAGCCCACAAAACACTGAG	134
SLC5A8 非甲基化	TTGAATGTATTTTGAGGTG	TCAATTTTCCAAAATCCC	100
SLC5A8 甲基化	TCGAACGTATTTTCGAGGC	ACAACGAATCGATTTTCCG	108
β -actin	GTGGACATCCGCAAAGAC	AAAGGGTGTAACGCAACTAA	302

1.4.2 SLC5A8 基因甲基化检测

采用甲基化特异性 PCR(MSP)法检测,按照 DNA 提取试剂盒说明书步骤提取标本组织 DNA 并修饰,将对应引物进行亚硫酸氢盐修饰 DNA 样本的 PCR 扩增。PCR 反应条件:95℃ 预变性 10 min;95℃ 15 s;58℃ 20 s,72℃ 20 s,40 次循环;72℃ 延伸 10 min。扩增完毕后,120 V 电泳 30 min,电泳后对反应产物进行琼脂糖凝胶电泳照相,甲基化引物扩增后有阳性条带者发生基因甲基化,未出现条带的结果为实验中的阴性对照。

1.4.3 SLC5A8 基因转录水平检测

采用 RT-PCR 法检测 SLC5A8 基因 mRNA 转录

情况,按照 RNA 提取试剂盒说明书步骤提取样本组织总 RNA,随后进行反转录合成 cDNA。采用荧光定量 PCR 试剂盒对 cDNA 进行 PCR 反应。PCR 反应条件:95℃ 预变性 5 min;95℃ 15 s;60℃ 40 s,72℃ 30 s,40 次循环;72℃ 延伸 10 min。采集荧光信号 PCR 结束后,记录扩增循环数(CT 值)。对反应产物进行琼脂糖凝胶电泳照相。

1.5 统计学处理

采用 SPSS20.0 软件对数据进行统计分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析进行两两比较、Pearson 等级相关分析等。计数资料间两两比较利用 χ^2 检验。此外,采用 GraphPad Prism 软件进

行作图,并应用配对 Wilcoxon 检验分析配对资料。根据 Kaplan-Meier 法绘制生存曲线评估患者术后 2 年的复发率,并应用 log-rank 检验进行统计学比较,根据 Cox 比例风险回归模型进行复发风险评估。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 组织中 SLC5A8 基因甲基化情况

400 例标本中,4 组间 SLC5A8 基因甲基化阳性率差异有统计学意义($\chi^2 = 130.765, P < 0.001$)。进一步两两比较显示,癌组织 SLC5A8 基因甲基化阳性率均显著高于腺瘤组织($\chi^2 = 4.23, P < 0.05$)、癌旁组织($\chi^2 = 64.98, P < 0.05$)和正常组织($\chi^2 = 90.51, P < 0.05$);腺瘤组织高于癌旁组织($\chi^2 = 29.28, P < 0.05$)和正常组织($\chi^2 = 61.28, P < 0.05$)。癌旁组织与正常组织比较差异无统计学意义($\chi^2 = 3.54, P > 0.05$)。见表 2。

表 2 SLC5A8 基因甲基化阳性率分析[n(%), n=100]

组织类别	阳性	阴性
癌组织	79(79)	21(21)
腺瘤组织	66(66)	34(34)
癌旁组织	22(22)	78(78)
正常组织	12(12)	88(88)

2.2 组织中 SLC5A8 基因表达水平

对扩增循环数差值(ΔCT)进行统计分析,甲状腺癌组织、腺瘤组织、癌旁组织、正常组织 SLC5A8 基因表达水平分别为 9.54 ± 1.03 、 8.03 ± 0.99 、 6.85 ± 0.74 、 6.30 ± 1.03 ,组间差异有统计学意义($F = 6.324, P = 0.033$)。这表明 SLC5A8 基因在癌组织中表达水平较腺瘤组织、癌旁组织及正常组织明显降低。

2.3 SLC5A8 甲基化与甲状腺肿瘤临床病理特征的关系

SLC5A8 甲基化阳性组与阴性组比较,包膜侵犯、TG 水平、胆固醇水平、甘油三酯水平、术前甲状腺功能及淋巴结转移差异有统计学意义($P < 0.05$),而年龄、性别、结节数量、结节大小等差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 3。

2.4 甲状腺肿瘤患者复发率分析

在 2 年的随访中,甲状腺癌组及甲状腺腺瘤组中分别有 17 例及 21 例患者失访,甲状腺腺瘤组患者的

复发率(13.25%, 11/83)显著低于甲状腺腺瘤组(29.11%, 23/79),差异有统计学意义($\chi^2 = 9.428, P < 0.05$)。进一步分析显示,SLC5A8 甲基化阳性患者的复发率(25.67%, 20/113)高于甲基化阴性患者(10.20%, 5/49),差异有统计学意义($\chi^2 = 4.936, P < 0.001$)。见图 1。

2.5 甲状腺肿瘤预后分析

单因素分析显示,甲状腺肿瘤预后与 SLC5A8 甲基化、甲状腺结节数量、结节大小、包膜侵犯、TG 水平、胆固醇水平、术前甲状腺功能、淋巴结转移有关。进一步通过 Cox 回归分析模型显示,SLC5A8 甲基化、甲状腺结节数量、结节大小、包膜侵犯、TG 水平、术前甲状腺功能、淋巴结转移及 TNM 分级为甲状腺肿瘤患者预后的影响因素($P < 0.05$),见表 4。

表 3 SLC5A8 甲基化与临床特征的关系(n=200)

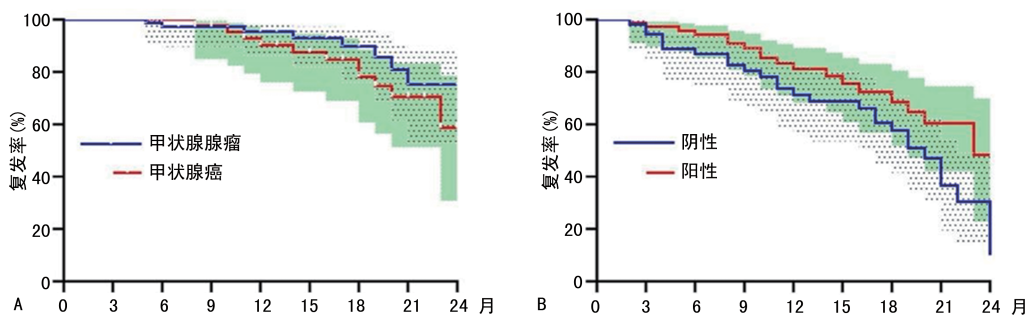
项目	n	阳性 (n=145)	阴性 (n=55)	χ^2	P
年龄				0.422	0.516
<50 岁	97	69(47.59)	29(52.73)		
≥50 岁	103	76(52.41)	26(47.27)		
性别				0.082	0.775
男	66	47(32.41)	19(34.55)		
女	134	98(67.59)	36(65.45)		
结节数量				0.003	0.954
<3 个	124	89(61.38)	34(61.82)		
>3 个	76	56(38.62)	21(38.18)		
结节大小				0.309	0.578
<1 cm	81	57(39.31)	24(43.64)		
≥1 cm	119	88(60.69)	31(56.36)		
包膜侵犯				8.463	0.003
是	80	49(33.79)	31(56.36)		
否	120	96(66.21)	24(43.64)		
TG				6.236	0.013
<40 μg/L	95	61(42.07)	34(61.82)		
≥40 μg/L	105	84(57.93)	21(38.18)		
胆固醇				5.327	0.021
<5.17 mmol/L	117	92(63.44)	25(45.45)		
≥5.17 mmol/L	83	53(36.56)	30(54.55)		
甘油三酯				7.431	0.006
<1.7 mmol/L	104	84(57.93)	20(36.36)		
≥1.7 mmol/L	96	61(42.07)	35(63.64)		
术前甲状腺功能				4.346	0.037
正常	82	53(36.55)	29(52.73)		
异常	118	92(63.45)	26(47.27)		
淋巴结转移				7.642	0.005
有	88	58(40.00)	34(61.82)		
无	112	87(60.00)	21(38.18)		

表 4 甲状腺肿瘤预后单因素和多因素分析

病理特征	单因素分析			多因素分析		
	HR	95%CI	P	HR	95%CI	P
SLC5A8 甲基化	0.633	(0.320, 0.688)	0.003	0.583	(0.296, 0.722)	0.007
年龄	3.315	(1.542, 4.822)	0.032			

续表 4 甲状腺肿瘤预后单因素和多因素分析

病理特征	单因素分析			多因素分析		
	HR	95%CI	P	HR	95%CI	P
性别	4.238	(1.601,6.202)	0.479			
结节数量	1.057	(0.821,2.033)	0.025	1.249	(0.731,1.707)	0.037
结节大小	1.233	(0.677,1.834)	0.043	1.576	(0.855,2.965)	0.041
包膜侵犯	0.873	(0.533,2.002)	0.033	1.032	(0.743,1.966)	0.040
TG	0.574	(0.202,1.382)	0.027	0.885	(0.703,2.589)	0.033
胆固醇	0.661	(0.303,1.678)	0.029	2.743	(1.300,4.611)	0.143
甘油三酯	1.039	(0.422,1.678)	0.061	4.364	(1.803,6.034)	0.432
术前甲状腺功能	0.477	(0.188,0.978)	0.039	0.672	(0.308,1.029)	0.043
淋巴结转移	0.582	(0.241,1.002)	0.042	0.711	(0.477,1.833)	0.032



A: 甲状腺腺瘤于甲状腺癌患者复发情况比较; B: SLC5A8 基因甲基化阳性及阴性患者复发情况比较。

图 1 甲状腺肿瘤患者术后复发情况

3 讨 论

现今,甲状腺癌已成为内分泌系统最常见的恶性肿瘤,其发病率正在逐年升高^[12-13]。鉴于目前对甲状腺肿瘤的过度诊断及其惰性生长的特性,不少学者反对开展甲状腺肿瘤的人群筛查,如何快速、准确诊断甲状腺肿瘤型别仍是当前的临床难点。目前,DNA 甲基化异常已经成为判定肿瘤分子的特异性生物标志物,在肿瘤的早期诊断、预后判断上具有指导性作用^[14-16]。既往研究表明,大部分肿瘤中都会发现 SLC5A8 基因,其表达明显降低或缺失,例如甲状腺癌、食管癌^[10]、乳腺癌^[17]等。同时,SLC5A8 基因能够和生物素起反应,可以抑制细胞癌变,杀死癌细胞,加快癌细胞凋亡速度。

本研究通过对不同甲状腺组织中 SLC5A8 基因甲基化的检测情况发现,其在癌组织及腺瘤组织中呈高表达状态,而其 mRNA 转录水平减弱,与张利红等^[18]研究结果一致,表明 SLC5A8 基因甲基化在甲状腺肿瘤中普遍存在。因常规病理检查中存在潜在性的可能,不能及时、准确地发现甲状腺组织恶变,而导致诊断的准确率有所差异,癌旁组织及正常组织中 SLC5A8 基因甲基化的检测,从分子水平上弥补了这一缺陷。

早期对甲状腺癌进行风险等级评定,对避免低危患者因不必要的过度治疗带来的不良反应和精准预测患者的预后情况都具有重要意义。经过为期 2 年

的随访发现,甲状腺腺瘤及甲状腺癌的复发率分别为 29.11% 和 13.25%,略高于国内相关研究(8.89%~23.53%)^[19-21],其原因在于本研究中行单侧切除术的患者较多,此外部分患者术后未行¹³¹I 清扫,从而导致复发率升高。既往已有研究表明,DNA 甲基化可用于结肠癌^[22]、肝癌^[16]的诊断与预后评测,本研究结果显示,SLC5A8 基因甲基化与甲状腺肿瘤患者包膜侵犯、TG 水平、胆固醇水平、甘油三酯含水平、术前甲状腺功能、淋巴结转移有关,差异有统计学意义($P < 0.05$),而与年龄、性别、结节数量、结节大小等因素无关。随访发现,SLC5A8 基因甲基化阳性患者术后 2 年复发率(25.67%)显著高于阴性患者(10.20%),且与疾病分级相关。COX 多因素分析结果显示,SLC5A8 基因甲基化为影响甲状腺肿瘤患者预后的危险因素之一,与王晓辉等^[9]的研究结果一致。

综上所述,通过对甲状腺肿瘤 SLC5A8 基因甲基化的检测,表明其在甲状腺肿瘤中普遍存在,可作为诊断、识别甲状腺肿瘤的辅助技术。同时,为进一步研究甲状腺肿瘤的发生发展及预后的表观遗传学变化机制提供了重要依据,并对甲状腺肿瘤的分子生物学治疗提供潜在帮助。

参考文献

[1] SUGA Y, ABE E. Patterns of surgically treated

- thyroid disease;a two years review at St. Paul hospital millennium medical college, Addis Ababa, Ethiopia[J]. *Ethiop J Health Sci*, 2020, 30(1): 31-36.
- [2] ZANELLA A B, SCHEFFEL R S, WEINERT L, et al. New insights into the management of differentiated thyroid carcinoma in children and adolescents[J]. *Int J Oncol*, 2021, 58(5): 1-10.
- [3] CHU Y H, SADOW P M. Noninvasive follicular thyroid neoplasm with papillary-like nuclear features (niftp): diagnostic updates and molecular advances[J]. *Semin Diagn Pathol*, 2020, 37(5): 213-218.
- [4] 薛伍君, 陈清江, 张旭东. DNA 甲基化相关肿瘤标志物临床研究进展[J]. *实用肿瘤杂志*, 2020, 35(2): 187-192.
- [5] 黄甜甜, 段碧晗, 叶迎春, 等. m-6A RNA 甲基化调控因子对甲状腺癌进展及预后的影响[J]. *疑难病杂志*, 2021, 20(5): 481-487.
- [6] PARK JY, KIM D, YANG M, et al. Gene silencing of SLC5A8 identified by genome-wide methylation profiling in lung cancer[J]. *Lung Cancer*, 2013, 79(3): 198-204.
- [7] COOTHAN-KANDASWAMY V, ELANGO VAN S, THANGARAJU M, et al. Abstract 1310: SLC5A8 functions as a tumor suppressor through redistribution and depletion of survivin[J]. *Cancer Res*, 2012, 72(8): 1310.
- [8] COOTHANKANDASWAMY V, ELANGO VAN S, GOPAL E, et al. Abstract 17: Tumor-suppressive function of SLC5A8 in renal cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2012, 72(8): 17.
- [9] 王晓辉. SLC5A8 基因与甲状腺癌相关性研究[D]. 石家庄: 河北大学, 2019.
- [10] 张欢. SLC5A8 基因转染对大肠癌细胞株 SW480 增殖和侵袭力影响的实验研究[D]. 石家庄: 河北大学, 2018.
- [11] 杨雅兰, 李斌, 柯丽娜, 等. 宫颈癌 SLC5A8 基因甲基化与高危型 HPV 的相关性研究[J]. *湖北医药学院学报*, 2021, 40(3): 234-237.
- [12] FILETTI S, DURANTE C, HARTL D, et al. Thyroid cancer; ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up dagger[J]. *Annals Oncol*, 2019, 30(12): 1856-1883.
- [13] SEIB C D, SOSA J A. Evolving understanding of the epidemiology of thyroid cancer[J]. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 2019, 48(1): 23-35.
- [14] 陈锐泽, 张勇. DNA 甲基化水平检测在胃癌早期诊断中的研究进展[J]. *检验医学与临床*, 2022, 19(3): 413-416.
- [15] 胡旭东, 刘林, 李伟. 长非编码 RNA 的表达调控机制[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2021, 37(12): 1584-1591.
- [16] 刘杰, 唐富天, 李玉民. DNA 甲基化生物标记物在恶性肿瘤中的转化应用[J]. *生物医学转化*, 2021, 2(3): 6-13, 28.
- [17] 刘岩, 刘雅涵, 谢天皓, 等. 乳腺癌中 SLC5A8 基因的甲基化及转录水平[J]. *医学研究与教育*, 2020, 37(1): 36-40.
- [18] 张利红, 石静, 郝文庆, 等. 甲状腺癌中 CYP1A1 和 CYP1B1 基因启动子区甲基化分析[J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2018, 34(8): 667-673.
- [19] 姜宁宁, 张丹. 腹腔镜辅助颈部小切口手术治疗甲状腺肿瘤的临床效果[J]. *临床医学研究与实践*, 2021, 6(24): 106-107, 132.
- [20] 许子志, 郑文添, 许东兴. 纳米炭负显影在甲状腺肿瘤手术中对甲状旁腺保护的效果[J]. *中外医学研究*, 2021, 19(5): 141-143.
- [21] 王洪波, 聂秉宇, 张景斌. 甲状腺肿瘤外科手术方式及疗效观察研究[J]. *世界复合医学*, 2020, 6(12): 92-94.
- [22] KANG B, LEE H S, JEON S W, et al. Progressive alteration of DNA methylation of Alu, MGMT, MINT2, and TFPI2 genes in colonic mucosa during colorectal cancer development[J]. *Cancer Biomark*, 2021; 32(2): 231-236.

(收稿日期: 2022-06-22 修回日期: 2022-08-16)