

· 论 著 ·

# 甲状腺癌患者外周血中 OXTR 基因甲基化状态的研究

廖萍<sup>1</sup>, 贾明磊<sup>2</sup>, 刘茶珍<sup>1</sup>, 何欣<sup>1</sup>, 朱佩云<sup>1</sup>, 何悦<sup>3</sup>, 罗全勇<sup>4</sup>, 王文静<sup>1</sup>

1. 上海市预防医学研究院公共卫生分子生物学研究室, 上海 220336; 2. 华东医院消化科, 上海 200040;  
3. 上海市徐汇区中心医院老年病科, 上海 200031; 4. 上海交通大学附属第六人民医院核医学科, 上海 200233

**摘要:** **目的** 验证前期筛选到的甲状腺癌患者外周血 DNA 差异甲基化谱中的差异基因 OXTR 甲基化程度, 并探讨其作为甲状腺癌患者外周血分子诊断标志物的可能性。**方法** 以 2013 年 10 月至 2014 年 5 月上海市第六人民医院等三家医院诊治的甲状腺癌患者 14 例为病例组, 以同期健康体检者 14 例为正常对照组。提取外周血中小片段 DNA 并选取 OXTR 基因, 利用重组酶聚合酶扩增技术扩增甲基化(M)和非甲基化(U) OXTR 基因, 并比较两组甲基化程度差异。**结果** 病例组 14 例甲状腺癌病例中有 10 例皆有 OXTR-M 及 OXTR-U 基因甲基化条带扩增, 其余 4 例为 OXTR 非甲基化条带扩增, 甲基化率达到 71.4%; 14 例正常对照中仅 2 例呈现 OXTR 基因甲基化条带扩增, 其余 12 例皆为 OXTR 非甲基化条带扩增, 甲基化率仅为 14.3%。Fisher 精确检验示两组甲基化率比较差异有统计学意义( $P=0.006$ )。**结论** OXTR 为甲状腺癌患者外周血 DNA 差异甲基化谱中的一种基因, 其在甲状腺癌病例中呈现较高的甲基化率, 可能与甲状腺癌的发生发展有关, 并有可能成为甲状腺癌血液诊断的分子标志物之一。

**关键词:** 表观遗传学; 甲状腺癌; DNA 甲基化; 生物标志物; 重组酶聚合酶扩增技术

**中图分类号:** R 736.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2016)01-0013-04

## Study on OXTR gene methylation status in peripheral blood of thyroid cancer patients

LIAO Ping\*, JIA Ming-lei, LIU Cha-zhen, HE Xin, ZHU Pei-yun, HE Yue, LUO Quan-yong, WANG Wen-jing

\*Public Health Molecular Biology Research Laboratory, Shanghai Institute of Preventive Medicine, Shanghai 200336, China

Corresponding author: WANG Wen-jing, E-mail: wjwang@scdc.sh.cn

**Abstract: Objective** To verify methylation level of aberrant oxytocin receptor (OXTR) gene which is one of the previous screening aberrant DNA methylated genes spectrum in peripheral blood of thyroid carcinoma patients and explore the possibility that it serves as a diagnostic molecular marker of peripheral blood in thyroid cancer patients. **Methods** Fourteen thyroid cancer patients who visited to three hospitals including Shanghai No. 6 people's hospital and the others from October 2013 to May 2014 were selected as case group, and 14 healthy subjects in health examination during the same period were selected as control group. Extracting small fragment DNA from peripheral blood and choosing OXTR gene, the methylated (M) and un-methylated (U) OXTR genes were amplified by recombinase-acid amplification (RAA) technique in all participants, and OXTR gene methylation status between two groups was compared. **Results** In case group, 10 samples had both amplified OXTR-M gene and OXTR-U gene bands, and 4 samples had only amplified OXTR-U gene bands, so the methylation rate of OXTR gene was 71.4%. In control group, 2 samples had amplified OXTR-M bands only, and the remaining 12 samples had amplified OXTR-U bands, so the methylation rate of OXTR gene was 14.3% only. Fisher's exact test result showed that there was significant difference in methylation rates of OXTR gene between two groups ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** OXTR gene is one of aberrant DNA methylated genes spectrum in peripheral blood of thyroid carcinoma patients, and it presents a higher methylation rate in thyroid cancer patients. It may be associated with the occurrence and progress of thyroid cancer and might be served as one of the molecular markers for the blood diagnosis of thyroid cancer.

**Key words:** Epigenetics; Thyroid cancer; DNA methylation; Biomarker; Recombinase-acid amplification technique

甲状腺癌是近年来发病率上升最快的恶性肿瘤之一<sup>[1-3]</sup>。开展甲状腺癌相关外周血 DNA 甲基化研究,寻找其血液诊断的分子标志物,为临床早期诊断提供新途径,是目前研究的热点。本项目组前期利用高通量的 DNA 甲基化芯片检测甲状腺癌血液样本,得到甲状腺癌血 DNA 甲基化谱,筛选到 29 个有意义的差异甲基化基因( $P \leq 5 \times 10^{-4}$ )<sup>[4]</sup>,其中后叶催产素受体(OXTR)为甲基化谱中的差异基因之一。OXTR 基因与多种疾病的发生相关,但是与甲状腺癌的发病机制研究尚未有文献报道。本研究首次利用较新的核酸扩增技术重组酶聚合酶扩增法(RAA)扩增 OXTR 基因,观察它在甲状腺癌患者和正常人群血液样本中甲基化修饰的差异情况,并为其作为甲状腺癌患者外周血分子诊断标志物的可能性提供参考。

## 1 对象与方法

1.1 研究对象 以 2013 年 10 月至 2014 年 5 月在上海市第六人民医院等三家医院诊治的甲状腺癌患者 14 例为病例组,男 6 例,女 8 例;年龄 17~61 岁,中位年龄 36 岁;病理诊断:甲状腺乳头状癌 12 例,甲状腺滤泡性乳头状癌 1 例,双侧甲状腺癌、淋巴性甲状腺炎 1 例。以同期健康体检者 14 例为正常对照组,男 6 例,女 8 例;年龄 23~58 岁,中位年龄 36 岁。两组性别、年龄皆匹配( $P$  均  $> 0.05$ )。收集其临床 EDTA 抗凝全血样本。研究符合人体试验委员会所制定的伦理学规定。

1.2 主要试剂及仪器 DNA 提取试剂盒 D3024 (ZYMO RESEARCH 中国);DNA 甲基化试剂盒 D5005 (ZYMO RESEARCH 中国);重组酶介导扩增试剂盒(中国农业科学生物技术研究所);PCR 引物(PAGE 级纯化,上海生工生物工程有限公司);DNA 分子量标准 100bp (TaKaRa Biotechnology Co., Ltd, China);PCR 扩增仪,PCRExpress HYBAID(Thermo Electron Co, USA);电泳仪 Powerpac universall164-5070 (BIO-RAD Co, USA);凝胶成像系统 UNIVERSAL HOOD II (BIO-RAD Laboratories, Italy);微量分光光度计 K5500(北京凯奥科技发展有限公司)。

1.3 OXTR 基因的引物设计 根据参考文献<sup>[5]</sup>报道的 OXTR 基因甲基化和非甲基化引物,合成本次实验研究的两对引物如下:OXTR 基因甲基化上游引物(OXTR-MF):5'-GTT TTG GGA TTA ACG TTG GGC-3';OXTR 基因甲基化下游引物(OXTR-MR):5'-AAA TAC AAA AAA CGA ACG AAA AAC G-3';OXTR 基因非甲基化上游引物(OXTR-UF):5'-GTT TTG GGA TTA ATG TTG GGT GA-3';OXTR 基因非甲基化下游

引物(OXTR-UR):5'-ATA CAA AAA ACA AAC AAA AAA CAC C-3'。

## 1.4 研究方法

1.4.1 外周血小片段 DNA 提取及浓度测定 按照血液 DNA 提取试剂盒 D3024 步骤依次对全血样品进行裂解、吸附至分离柱、洗脱和解离 DNA。为了更好地分离出小片段 DNA,在裂解步骤中,在全血与裂解液的混合物中加入 0.3 倍体积的异丙醇。微量分光光度计波长 260 nm 处测定 DNA 的 OD 值,计算其浓度,最终 DNA 上样量在 200~500 ng,暂时不用的 DNA 样品可储存在  $-20^{\circ}\text{C}$  的低温冰箱中备用。

1.4.2 DNA 亚硫酸氢盐转化 按照 DNA 甲基化试剂盒 D5005 步骤制备好样品体系。将样品管放到 PCR 仪中,98  $^{\circ}\text{C}$  放置 10 min,64  $^{\circ}\text{C}$  放置 2.5 h 进行热循环。其间用试剂盒内的 M-Binding Buffer 活化吸附柱。将上述充分热循环后的样品添加到含有活化好的吸附柱中。颠倒数次以混合样品。10 000 rpm 离心 1 min,弃废液。添加洗脱缓冲液到柱中。添加 M-Desulphonation Buffer 到柱中并且在室温下放置 20 min。10 000 rpm 离心 1 min,弃废液。用洗脱液洗脱吸附柱两次。10 000 rpm 离心 1 min,弃废液。最后直接添加 10  $\mu\text{l}$  的解离缓冲液到柱基质中进行 DNA 解离。得到经亚硫酸氢盐转化好的 DNA 样品,用于后续扩增试验。

1.4.3 RAA 核酸扩增实验 (1)样品反应体系:在 PCR 管中依次加入 2.4  $\mu\text{l}$  上游引物、2.4  $\mu\text{l}$  下游引物、29.5  $\mu\text{l}$  Rehydration Buffer、3  $\mu\text{l}$  修饰好的 DNA 模板、10.2  $\mu\text{l}$  双蒸水( $\text{dH}_2\text{O}$ ),总体积 47.5  $\mu\text{l}$ 。轻拍混合并离心上述溶液。将混合好的上述样品反应体系加入装有干粉的反应管中,用移液枪吸打混匀。向每个反应管中加入 2.5  $\mu\text{l}$  280 mM 醋酸镁溶液并混合均匀。离心上述溶液。37  $^{\circ}\text{C}$  恒温培养箱中温浴 40 min。12 000 rpm 离心 1 min,后取上清 10  $\mu\text{l}$ ,2% 琼脂糖凝胶电泳检测。(2)正对照反应体系:正对照反应体系是试剂盒自带的用于质量控制的反应体系。在 PCR 管中依次加入 Primer mix 2  $\mu\text{l}$ , Rehydration Buffer 29.5  $\mu\text{l}$ , Control DNA 1  $\mu\text{l}$ ,  $\text{dH}_2\text{O}$  15  $\mu\text{l}$ 。轻拍混合并离心上述溶液。反应管在 37~39  $^{\circ}\text{C}$  恒温培养箱中温浴 20 min 即可。离心后取 10  $\mu\text{l}$  用 2% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。(3)水平式琼脂糖凝胶电泳实验:将制备好的含有 Gelred 染料的 2% 琼脂糖凝胶放于装有 1  $\times$  TBE 电泳缓冲液的电泳槽中。取 10  $\mu\text{l}$  样品与 2  $\mu\text{l}$  6  $\times$  Loading Buffer 混合,加入样品槽中。接通电源,设置工作电压为 150 V,电泳时间 30 min。凝胶电泳结束后,将凝胶取出放于凝胶成像系统上摄

片保存结果。

1.5 统计学处理 采用 Excel 表处理数据。两组对象外周血 DNA 差异甲基化率的比较采用确切概率法,性别、年龄比较采用秩和检验和  $\chi^2$  检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果与分析

2.1 OXTR 甲基化扩增实验结果的判定 OXTR 基因甲基化特异性引物扩增出的条带(OXTR-M),OXTR 基因非甲基化特异性引物扩增出的条带(OXTR-U),大小 180 bp 左右。实验正对照反应体系成功扩增出正对照条带,其产物大小 400 bp 左右,空白对照无条带扩增,表明该试剂盒试剂有效,核酸扩增实验在可控范围内;OXTR-M 有出现而 OXTR-U 无条带,或者两者皆有,判定为甲基化状态;OXTR-U 有出现而 OXTR-M 无条带,判定为非甲基化状态(图 1)。

### 2.2 样本核酸扩增电泳结果

2.2.1 甲状腺癌病例电泳结果 取 14 例甲状腺癌病例外周血 DNA,经亚硫酸氢盐转化,RAA 等温扩增后,14 个样品中 10 例 OXTR-M 和 OXTR-U 条带皆有扩增(200 bp 处),分别是 S3、S5-S10、S12-S14,4 例仅有 OXTR-U 条带扩增,分别是 S1、S2、S4、S11,甲基化率达到 71.4%。电泳结果见图 2。

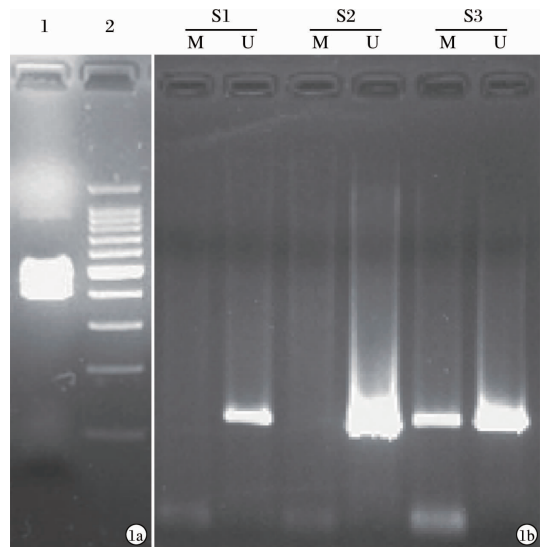
2.2.2 正常对照电泳结果 取 14 例正常对照外周血 DNA,经亚硫酸氢盐转化,RAA 等温扩增后,14 个样品中 12 例样品有 OXTR-U 条带扩增,分别是 C1-C3、C5-C7、C9-C14,2 例样品 OXTR-M 和 OXTR-U 条

带皆有扩增,分别是 C4、C8,正常对照组 OXTR 甲基化率仅为 14.3%。电泳结果见图 3。

2.3 统计分析结果 运用 Fisher 精确检验,两组甲基化发生率比较差异有统计学意义( $P = 0.006$ )。见表 1。

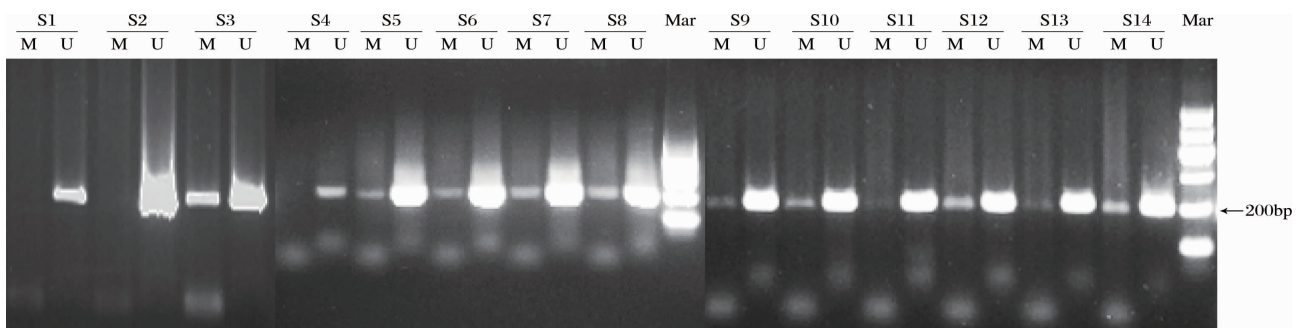
## 3 讨论

DNA 甲基化属于表观遗传学研究范畴,该功能异常是肿瘤中最常见的分子改变之一,是导致肿瘤发



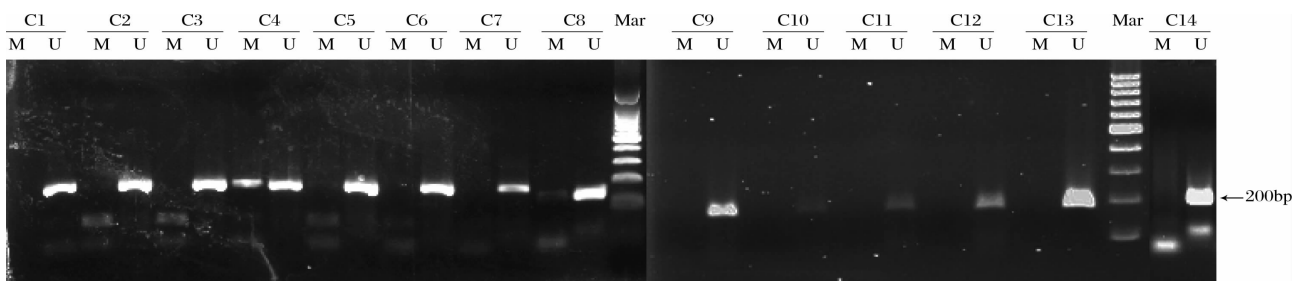
注:1a:正对照反应电泳图,1 为正对照电泳结果,2 为 DNA marker;1b:核酸扩增实验结果图,M 代表甲基化引物扩增,U 代表非甲基化引物扩增;图中可以判断 S1、S2 号样品该基因无甲基化修饰,S3 号样品该基因存在甲基化修饰。

图 1 OXTR 甲基化扩增实验结果判定图



注:S 为病例组样品;M 代表甲基化引物扩增;U 代表非甲基化引物扩增;Mar 为 DNA 分子 marker。

图 2 甲状腺癌病例电泳结果



注:C 为对照组样品;M 代表甲基化引物扩增;U 代表非甲基化引物扩增;Mar 为 DNA 分子 marker。

图 3 正常对照电泳结果图

表 1 OXTR 基因甲基化和非甲基化核酸扩增结果 例(%)

分组	例数	甲基化	非甲基化
病例组	14	10(71.4)	4(28.6)
对照组	14	2(14.3)	12(85.7)
P 值		0.006	

生发展的重要因素之一<sup>[6]</sup>。研究表明抑癌基因启动子的甲基化修饰能阻碍抑癌基因启动子区转录,导致该基因沉默,从而使抑癌基因抑制肿瘤细胞生长的功能丧失,这是目前研究最多的表观遗传修饰<sup>[7]</sup>,被认为是肿瘤发生的早期敏感指标,且能随肿瘤细胞进入血液系统,是最有前景的肿瘤分子生物标志物<sup>[8]</sup>。

本实验研究选择 OXTR 基因作为目的基因<sup>[9-11]</sup>,它在前期高通量的 DNA 甲基化芯片实验研究筛选得到甲状腺癌血 DNA 差异甲基化谱中属于 29 个有意义的差异甲基化基因之一<sup>[4]</sup>,且甲基化程度排在第 3 位,同时也是最佳疾病诊断预测能力的 8 个基因之一,其甲基化程度在甲状腺癌患者中显著增高;生物信息学分析显示 OXTR 基因参与了包括 G- $\alpha$ -Q 信号转导通路、钙离子信号转导通路、G 蛋白偶联受体(GPCR)配体结合通路等与细胞生长代谢调控密切相关的几大通路,一旦相关基因因高甲基化而失去表达,这些生物学通路就会发生异常,从而导致细胞生长的异常,并引发肿瘤的发生;此外 OXTR 基因在 NCI-60 肿瘤细胞系中的表达大多以低表达为主,因而它有可能是一种抑癌基因。OXTR 基因位于染色体 3p25<sup>[12]</sup>,表达产物是后叶催产素激素的受体 OXTR。其配体后叶催产素激素的增加能增进人类的情感,包括信任、宽容、共鸣和牺牲精神等,所有这些都倾向于使人类能够面对种种压力<sup>[13]</sup>,从而在一定程度上可拮抗肿瘤的发生。非小细胞肺癌药物抑制表观遗传修饰研究发现,组蛋白去乙酰化能引起 OXTR 基因表达的上调,而该基因在肺癌细胞系中的表达是降低的<sup>[5]</sup>。在自闭症患者的外周血和大脑皮层细胞中研究发现 OXTR 基因启动子 CpG 岛的甲基化导致其转录水平降低,表达下调<sup>[11]</sup>。这一系列的研究也表明 OXTR 基因表观遗传修饰的异常增加能使其表达产物 OXTR 下降,影响脑部以及其他重要器官,可能与许多疾病包括肿瘤的发生发展相关。因此,OXTR 基因可能是一个重要的抑癌基因。

RAA 技术是近年来逐渐兴起的新技术,其步骤简单,易于操作,扩增反应体系只需在 37~39℃ 的恒温水中浴 40~60 min 即可,反应速度快。更重要的是,对于特异性强的 DNA 甲基化检测这种引物设计特殊,模板序列已经过修饰的实验来说,RAA 技术利于引物与目的 DNA 片断的结合,尽可能减少外部条

件对于引物与 DNA 模板之间结合的影响,得到所需的目的片断。本文利用 RAA 法扩增甲状腺癌血 DNA 甲基化谱中差异甲基化基因之一 OXTR<sup>[14]</sup>,发现在甲状腺癌病例组中 OXTR 甲基化状态率达到 71.4%,而对照组 OXTR 甲基化率仅有 14.3%,因此该基因有可能和甲状腺癌的发生发展有关,并可能成为甲状腺癌诊断的早期血液分子标志物之一,但由于本研究的样本量不足,还需继续扩大样本量,进一步完善实验方法及分析手段。

## 参考文献

- [1] Hegedus L. Clinical practice. The thyroid nodule[J]. N Engl J Med, 2004, 351(17):1764-1771.
- [2] Enewold L, Zhu K, Ron E, et al. Rising thyroid cancer incidence in the United States by demographic and tumor characteristics, 1980-2005[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2009, 18(3):784.
- [3] Grodzki S, Delbridge L. An update on papillary microcarcinoma[J]. Curr Opin Oncol, 2009, 21(1):1-4.
- [4] 廖萍, 刘茶珍, 罗全勇, 等. 甲状腺癌患者血 DNA 甲基化分子标志物[J]. 环境与职业医学, 2012, 29(2):77-82.
- [5] Zhong S, Fields CR, Su N, et al. Pharmacologic inhibition of epigenetic modifications, coupled with gene expression profiling, reveals novel targets of aberrant DNA methylation and histone deacetylation in lung cancer[J]. Oncogene, 2007, 26(18):2621-2634.
- [6] Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer[J]. Nat Rev Genet, 2002, 3(6):415-428.
- [7] Das PM, Singal R. DNA methylation and cancer[J]. J Clin Oncol, 2004, 22(22):4632-4642.
- [8] Müller HM, Widschwendter M. Methylated DNA as a possible screening marker for neoplastic disease in several body fluids[J]. Expert Rev Mol Diagn, 2003, 3(4):443-458.
- [9] Kogan A, Saslow LR, Impett EA, et al. Thin-slicing study of the oxytocin receptor (OXTR) gene and the evaluation and expression of the prosocial disposition[J]. Proc Natl Acad Sci, 2011, 108(48):19189-19192.
- [10] Kusui C, Kimura T, Ogita K, et al. DNA methylation of the human oxytocin receptor gene promoter regulates tissue-specific gene suppression[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 289(3):681.
- [11] Gregory SG, Connelly JJ, Towers AJ, et al. Genomic and epigenetic evidence for oxytocin receptor deficiency in autism[J]. BMC Med, 2009, 7:62.
- [12] Inoue T, Kimura T, Azuma C, et al. Structural organization of the human oxytocin receptor gene [J]. J Biol Chem, 1994, 269(51):32451.
- [13] Taylor SE. Tend and Befriend: Biobehavioral bases of affiliation under stress[J]. Curr Dir Psychol Sci, 2006, 15(6):273-277.
- [14] 吕蓓, 程海荣, 严庆丰, 等. 用重组酶介导的扩增技术快速扩增核酸[J]. 中国科学:生命科学, 2010, 40(10):983-988.

收稿日期:2015-09-23 修回日期:2015-10-23 编辑:石嘉莹