

甲状腺乳头状癌雌激素受体 β 表达及其5'非翻译区甲基化

苟茜, 许琳婉, 刘智敏

(重庆医科大学分子医学与肿瘤研究中心, 重庆 400016)

摘要:【目的】研究甲状腺乳头状癌(PTC)中雌激素受体 β 基因($ER\beta$)表达及5'非翻译区甲基化状态,探讨 $ER\beta$ 在PTC中低表达的原因。【方法】应用Western blot和免疫组织化学染色法检测正常甲状腺细胞Nthy-ori3-1、PTC细胞BCPAP以及正常甲状腺组织、甲状腺结节性增生组织和PTC组织 $ER\beta$ 蛋白表达;应用qRT-PCR检测各细胞和组织中 $ER\beta$ mRNA(OK-1)、 $ER\beta$ mRNA(ON-1)和总 $ER\beta$ mRNA表达水平;亚硫酸氢盐测序分析各细胞和组织中 $ER\beta$ 基因启动子OK、启动子ON和外显子ON的CpG岛甲基化状态;DNA甲基化转移酶抑制剂5-aza-2'-deoxycytidine(5-aza-dC)处理Nthy-ori3-1细胞和BCPAP细胞后,qRT-PCR检测 $ER\beta$ mRNA(OK-1)、 $ER\beta$ mRNA(ON-1)和总 $ER\beta$ mRNA表达水平。【结果】与正常甲状腺细胞相比, $ER\beta$ 蛋白表达水平在PTC细胞中明显下降($P<0.01$); $ER\beta$ 在正常甲状腺组织、结节性增生组织和PTC组织中阳性表达数分别为5/10例、3/10例、0,与正常甲状腺组织相比, $ER\beta$ 在PTC组织中的蛋白表达水平显著降低($P<0.05$);与正常甲状腺细胞和组织相比, $ER\beta$ mRNA(ON-1)和总 $ER\beta$ mRNA在PTC中的表达水平明显降低($P<0.01$),而 $ER\beta$ mRNA(OK-1)差异无统计学意义($P>0.05$); $ER\beta$ 基因启动子ON和外显子ON甲基化程度在PTC进程中逐渐增加,而启动子OK在正常甲状腺、结节性增生和PTC组织和细胞中均未甲基化或低甲基化;5-aza-dC使BCPAP细胞中 $ER\beta$ mRNA(ON-1)和总 $ER\beta$ mRNA重新表达,但对 $ER\beta$ mRNA(OK-1)的表达无影响。【结论】 $ER\beta$ 基因5'非翻译区甲基化使PTC中 $ER\beta$ 基因表达降低,尤其是启动子ON和外显子ON异常甲基化。

关键词: 甲状腺乳头状癌;DNA甲基化;CpG岛;雌激素受体 β

中图分类号: R736.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2020)05-0697-10

ER β Expression and Methylation of 5'-Untranslated Region in Papillary Thyroid Carcinoma

GOU Xi, XU Lin-wan, LIU Zhi-min

(Institute of Molecular Medicine and Cancer, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Correspondence to: Liu Zhi-min; E-mail: liuzm9999@aliyun.com

Abstract: 【Objective】 To investigate the expression of estrogen receptor beta ($ER\beta$) and methylation status of 5'-untranslated region in papillary thyroid carcinoma (PTC) and explore the reason for the low expression of $ER\beta$ in PTC. 【Methods】 Western blot and immunohistochemical staining were used to analyze the protein expression of $ER\beta$ in human normal thyroid Nthy-ori3-1 cells, thyroid papillary carcinoma BCPAP cells and tissues of normal thyroid, nodular hyperplasia and PTC. qRT-PCR was employed to detect the expression levels of $ER\beta$ mRNA (OK-1), $ER\beta$ mRNA (ON-1) and total $ER\beta$ mRNA in cells and tissues. Bisulfite genomic sequencing was performed to evaluate the methylation status of CpG islands in promoter OK, promoter ON and exon ON in cells and tissues. After Nthy-ori3-1 cells and BCPAP cells were treated with 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC), a DNA methyltransferase (DNMT) inhibitor, qRT-PCR was used to examine the expression levels of $ER\beta$ mRNA (OK-1), $ER\beta$ mRNA (ON-1) and total $ER\beta$ mRNA in the treated cells.

收稿日期: 2020-04-21

基金项目: 国家自然科学基金(81272937)

作者简介: 苟茜, 硕士研究生, E-mail: gx02160000@163.com; 刘智敏, 通信作者, 教授, 研究方向: 甲状腺乳头状癌分子机制, E-mail: liuzm9999@aliyun.com

【Results】The protein expression of ER β in PTC cells was significantly lower than that in normal thyroid cells ($P<0.01$). The cases with positive ER β expression in tissues of normal thyroid, nodular hyperplasia and PTC were 5, 3 and 0, respectively (all $n=10$). The protein expression of ER β in PTC tissues was significantly lower than that in normal thyroid tissues ($P<0.05$). Compared with those in normal thyroid cells and tissues, the expression levels of ER β mRNA (ON-1) and total ER β mRNA in PTC were significantly reduced ($P<0.01$), while ER β mRNA (OK-1) expression showed no significant difference ($P>0.05$). The methylation degrees of *ER β* promoter ON and exon ON were gradually increased in the development of PTC, while promoter OK was unmethylated or hypomethylated in normal thyroid, nodular hyperplasia and PTC cells and tissues. 5-aza-dC treatment resulted in reexpression of ER β mRNA (ON-1) and total ER β mRNA in BCPAP cells but brought no change in ER β mRNA (OK-1) expression. 【Conclusions】Methylation in *ER β* 5'-untranslated region is correlated to the low expression of *ER β* gene in PTC, especially aberrant methylation of promoter ON and exon ON.

Key words: papillary thyroid carcinoma (PTC); DNA methylation; CpG island; ER β

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2020, 41(5): 697-706]

甲状腺乳头状癌(papillary thyroid carcinoma, PTC)是一种常见的内分泌恶性肿瘤,占甲状腺癌的85%~90%^[1-4]。流行病学研究发现,PTC的发病率逐年增加,女性发病率约为男性的3倍,这表明雌激素与PTC的发生发展密切相关^[5-6]。雌激素受体 β (estrogen receptor β , ER β)属于类固醇受体,可介导雌激素的生理功能^[7]。我们前期研究发现,ER β 对PTC细胞增殖、侵袭和迁移有抑制作用,但与正常甲状腺相比,ER β 在PTC中表达水平较低^[8],因此我们将进一步探讨ER β 在PTC中低表达的原因及其机制。*ER β* 基因存在两种不同的启动子(启动子OK和启动子ON),可转录生成两种含有不同5'非翻译区的异构体,即ER β mRNA(OK-1)和ER β mRNA(ON-1),由外显子OK和外显子ON可变剪接至外显子1产生^[9]。在启动子OK中,大小为295(-137~+158)bp的区域,包含15个CpG位点。在启动子ON和外显子ON中,大小为509(-211~+298)bp的区域,包含45个CpG位点^[10]。在癌症发生发展过程中,CpG岛甲基化可引起基因沉默,抑癌基因启动子超甲基化则会促进肿瘤发展^[11]。已有研究证实,*ER β* 作为抑癌基因,可在PTC中抑制肿瘤细胞增殖、诱导肿瘤细胞凋亡,进而抑制肿瘤发生发展^[12]。但*ER β* 在PTC中的甲基化状态研究仍未见报道,因此,我们将进一步分析*ER β* 5'非翻译区CpG岛在PTC中的甲基化状态。本实验拟通过检测正常甲状腺、结节性增生以及PTC组织与细胞中ER β 蛋白表达、ER β 及其异构体mRNA表达与*ER β* 基因5'非翻译区甲基化状态,并使用DNA甲基化转移酶抑制剂5-aza-2'-deoxycytidine(5-aza-dC)处理细

胞,进一步观察ER β 及其异构体mRNA表达的变化。探讨*ER β* 在PTC中低表达的原因及机制,有助于对PTC的病理机制、临床诊断及治疗预后提供新思路。

1 材料与方法

1.1 细胞株与组织标本

研究使用人PTC细胞株BCPAP和正常甲状腺细胞株Nthy-ori3-1由本实验室保存。培养于含10 g/L胎牛血清、100 μ g/mL青霉素-链霉素的RPMI-1640培养基中,置于含有体积分数5% CO₂、温度为37 $^{\circ}$ C的细胞培养箱。常规培养,选取对数生长期细胞进行后续实验。收集2018年6月至2018年12月在重庆医科大学附属第二医院普外科进行手术后经病理诊断为PTC的10例PTC肿瘤组织、取自甲状腺良性疾病患者的10例结节性增生组织和10例癌旁正常甲状腺组织。将所有组织标本包裹在铝箔中,并立即在液氮中冷冻直至后续实验分析。本研究标本收集经重庆医科大学伦理委员会批准,并征得患者知情同意。

1.2 主要试剂与仪器

1.2.1 主要试剂 胎牛血清、RPMI-1640培养基、胰蛋白酶购自美国Gibco公司;兔抗人ER β 和 β -actin多克隆抗体和羊抗兔二抗购自美国Bioworld公司;RIPA裂解缓冲液、SDS-PAGE配胶试剂盒和BCA试剂盒购自上海碧云天公司;免疫组化(S-P)法试剂盒、DAB显色试剂盒购自北京中杉金桥公司;冷冻切片包埋剂购自美国Sakura公司;HE染色试剂盒购自上海碧云天公司;乙烯乙酸乙

烯酯膜帽、RNA提取试剂盒及逆转录试剂盒购自美国Invitrogen公司;qRT-PCR试剂盒购自美国ABI公司;DNA提取试剂盒、亚硫酸氢盐修饰试剂盒、多重PCR试剂盒与凝胶回收试剂盒购自德国Qiagen公司;DNA甲基转移酶抑制剂购自美国Sigma公司;DMSO购自北京Solarbio公司;PCR引物由上海生工公司合成。

1.2.2 仪器设备 冷冻切片机购自德国Leica公司;LCM仪器和实时荧光定量PCR仪购自美国ABI公司。

1.3 Western Blot

收集细胞,使用RIPA提取细胞总蛋白。聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离总细胞蛋白,并将其转移至PVDF膜。5%脱脂奶粉封闭2h,PBST洗膜3次,每次10min。按比例稀释ER β 和 β -actin一抗,4℃孵育过夜。PBST洗膜3次后,放入稀释后的二抗,孵育2h。PBST洗膜3次,每次10min。ECL化学发光显影,采集图像。采用quantity one分析软件分析目的蛋白条带相对表达水平。

1.4 免疫组织化学染色与评分标准

使用链霉亲和素-过氧化物酶法(sreptavidin-peroxidase, SP)测定ER β 的表达。标本经10%甲醛固定,石蜡包埋,4 μ m连续切片。放入二甲苯于烘箱脱蜡1h,水化,抗原热修复,体积分数3% H₂O₂覆盖整个组织切片,轻轻摇晃,孵育30min。山羊血清室温封闭30min。加入ER β 一抗,4℃孵育过夜。室温复温30min后,PBS洗3次,每次5min。滴加生物素标记的兔抗人IgG,37℃孵育30min。PBS洗3次,每次5min。加入辣根酶标记链霉卵白素工作液37℃孵育30min。DAB显色,苏木精复染,脱水,二甲苯透明30min,中性树脂封片。用PBS替代一抗,作阴性对照。由两位病理科医师进行判定。每张切片在200倍光镜下选取5个视野。阳性细胞<5%为0、6%~25%为1、26%~50%为2、51%~75%为3、>75%为4。不显色为0、浅棕色为1、棕色为2、深棕色为3。采用Remmele半定量评分(阳性细胞百分率 \times 显色强度等级)。评分<6为阴性, \geq 6为阳性。

1.5 激光捕获显微切割

将冷冻的组织标本使用组织包埋剂包埋,在-16℃冷冻切片机中切片,切片厚度10 μ m,轻轻转移至PEN膜载玻片上。将含有组织切片的载玻片在低温恒温器中干燥2min后,在冰盒中进行

苏木精-伊红(HE)染色,以最大限度地降低RNase活性。将HE染色后的载玻片放在激光捕获显微切割(laser capture microdissection, LCM)仪器的模块化平台上,调整照明对比度和放大倍数以获得最佳可视化效果。使用绘图工具选择正常、增生性和PTC组织标本中的滤泡上皮细胞进行显微切割。在显微镜下检查捕获的所需细胞并转移到乙烯乙酸乙烯酯膜帽上,以进行再次确认。

1.6 RNA提取、逆转录和qRT-PCR

使用RNA提取试剂盒提取Nthy-ori3-1细胞、BCPAP细胞和从组织获得的滤泡上皮细胞中的RNA,逆转录成cDNA后利用qRT-PCR检测ER β mRNA(OK-1)、ER β mRNA(ON-1)和总ER β mRNA表达水平。引物序列如下:ER β mRNA(OK-1)上游引物:5'-AGTTACTGAGTCCGATGAATGTGCTTG-3',下游引物:5'-CTCAAAGATTCGTGGGCAAGTATAATG-3';ER β mRNA(ON-1)上游引物:5'-CGGGAGACCCCCCTAATGC-3',下游引物:5'-CTCAAAGATTCGTGGGCAAGTATAATG-3';总ER β mRNA上游引物:5'-TGGTCCATCGCCAGTATCA-3',下游引物:5'-AGGTGTGTTCTAGCGATCTTGCTT-3';GAPDH上游引物:5'-GAAGGTGAAGGTCGGAG-T-3',下游引物:5'-GAAGATGGTGATGGGATTTTC-3'。以GAPDH作为内参进行qRT-PCR,反应条件为50℃2min,95℃10min;95℃15s,60℃1min(40个循环)。使用公式 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算相对表达量。

1.7 DNA提取和亚硫酸氢盐基因组测序

使用DNA提取试剂盒提取Nthy-ori3-1细胞、BCPAP细胞以及从组织获得的滤泡上皮细胞中的DNA。使用DNA修饰试剂盒对DNA(1 μ g)进行亚硫酸氢盐修饰后,行PCR扩增,使用引物如下:启动子OK上游引物:5'-GTTGGGGTTATTT-CGGGGTTGTT-3',下游引物:5'-CCTCCAACAAA-ACAAACACATTCA-3';启动子ON和外显子ON上游引物:5'-GTTATTATTTTTGTGGGTGGATTGG-3',下游引物:5'-ACCTTACCTTCTCTAAAATAC-3'。PCR产物行1.5%琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下观察后,从凝胶上切下条带,纯化。对纯化的DNA进行测序。甲基化状态判断标准:CpG岛中0% CpG位点发生甲基化为未甲基化(-);1%~20%为低甲基化(+);20%~60%为中度甲基化(++);60%~100%为广泛甲基化(+++)。

1.8 DNA 甲基转移酶抑制剂处理

将 Nthy-ori3-1 细胞和 BCPAP 细胞以每孔 5.0×10^5 细胞 (2.0 mL/孔) 的密度接种在 6 孔培养板上。培养过夜后,以 $1 \mu\text{mol/L}$ 的终浓度加入 DNA 甲基转移酶 (DNA methyltransferases, DNMT) 抑制剂 5-aza-dC。每 2 d 添加 1 次含有 5-aza-dC 的新鲜培养基。培养至第 8 天,提取 RNA。使用 qRT-PCR 检测 5-aza-dC 处理后 Nthy-ori3-1 细胞和 BCPAP 细胞中 ER β mRNA (OK-1)、ER β mRNA (ON-1) 和总 ER β mRNA 表达水平。使用 DMSO 载体处理对照组细胞。

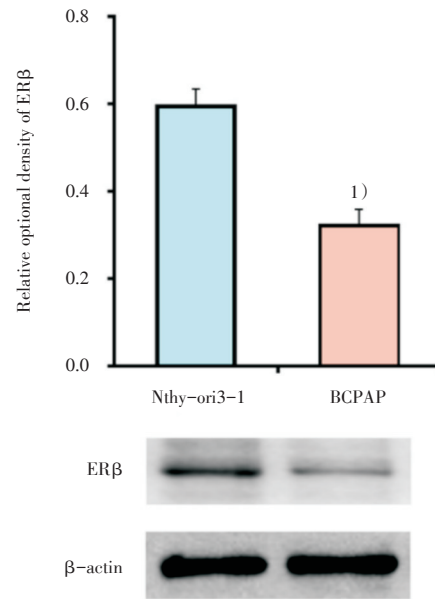
1.9 统计分析

使用 SPSS 18.0 统计软件和 GraphPad prism 8 软件进行分析,呈正态分布的计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。各项实验均重复 3 次。两组均数间比较,数据呈正态分布且方差齐性采用 *t* 检验;多组间比较,数据呈正态分布且方差齐性采用单因素方差分析,两两比较采用 Bonferroni 法,非正态分布或方差不齐采用 Kruskal Wallis *H* 检验;计数资料采用例数的形式描述,采用 Fisher 确切概率法进行数据分析。检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ER β 在正常甲状腺细胞和 PTC 细胞中的表达

Western blot 检测正常甲状腺细胞 Nthy-ori3-1 和 PTC 细胞 BCPAP 中 ER β 的蛋白表达。与 Nthy-ori3-1 细胞相比,ER β 在 BCPAP 细胞中的表达水平显著降低,差异有统计学意义 ($t=10.020$, $P=0.001$;图 1)。

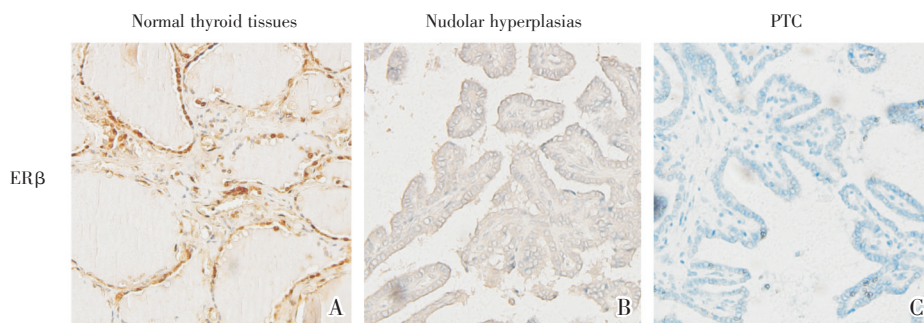


The protein expression of ER β in human normal thyroid cells and PTC cells was detected by western blot. ¹⁾ $P=0.001$, compared with Nthy-ori3-1 cells. $n=3$.

图1 ER β 在正常甲状腺细胞和 PTC 细胞中的表达
Fig.1 The protein expression of ER β in human normal thyroid cells and PTC cells

2.2 ER β 在正常甲状腺组织、结节性增生组织和 PTC 组织中的表达

免疫组化染色观察 ER β 在正常甲状腺组织、结节性增生组织和 PTC 组织的表达,结果显示,ER β 阳性表达数分别为 5/10 例、3/10 例、0 例 (图 2A~C)。与正常甲状腺组织相比,ER β 在 PTC 组织中的蛋白表达水平显著降低 (Fisher's exact, $P=0.033$)。ER β 蛋白表达水平从正常甲状腺组织、结节性增生组织到 PTC 组织逐渐降低。



Immunohistochemical staining for ER β in tissue specimens of normal thyroid, nodular hyperplasia and PTC. A: normal thyroid tissues. $n=10$. B: nodular hyperplasias. $n=10$. C: PTC. $n=10$. (S-P, $\times 200$)

图2 ER β 在正常甲状腺组织、结节性增生组织和 PTC 组织中的表达
Fig.2 The expression of ER β in tissue specimens of normal thyroid, nodular hyperplasia and PTC

2.3 ER β mRNA 及其异构体在正常甲状腺细胞和 PTC 细胞中的表达

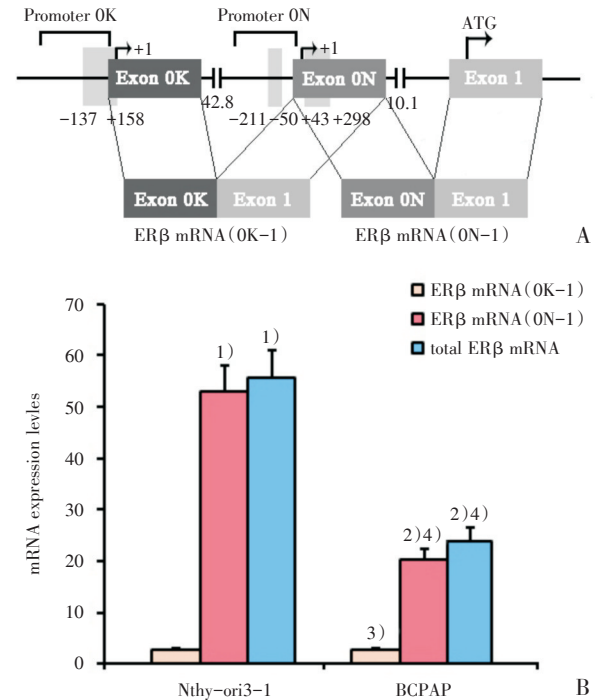
如图 3A 所示, ER β 5'非翻译区外显子 0K 和外显子 0N 可变剪接至外显子 1 形成 ER β 的两个异构体, 即 ER β mRNA(OK-1) 和 ER β mRNA(ON-1)^[7]。qRT-PCR 检测正常甲状腺细胞 Nthy-ori3-1 和 PTC 细胞 BCPAP 中 ER β mRNA(OK-1)、ER β mRNA(ON-1) 和总 ER β mRNA 的表达水平。结果显示, 在 Nthy-ori3-1 细胞和 BCPAP 细胞中, ER β mRNA(ON-1) 与总 ER β mRNA 的表达水平都显著高于 ER β mRNA(OK-1) ($F=132.510, P=0.000; F=75.056, P=0.000$; 图 3B); ER β mRNA(OK-1) 在 Nthy-ori3-1 细胞和 BCPAP 细胞中的表达水平差异无统计学意义 ($t=0.568, P=0.600$; 图 3B)。BCPAP 细胞中 ER β mRNA(ON-1) 和总 ER β mRNA 的表达水平显著低于 Nthy-ori3-1 细胞 ($t=9.056, 9.815, P=0.001, 0.001$; 图 3B)。结果说明, 总 ER β mRNA 主要由 ER β mRNA(ON-1) 构成, 与正常甲状腺细胞相比, ER β mRNA(ON-1) 与总 ER β mRNA 在 PTC 细胞中的表达水平下调。

2.4 ER β mRNA 及其异构体在正常甲状腺组织、结节性增生组织和 PTC 组织中的表达

qRT-PCR 检测在从正常甲状腺组织、结节性增生组织和 PTC 组织中提取的滤泡上皮细胞中 ER β mRNA(OK-1)、ER β mRNA(ON-1) 和总 ER β mRNA 的表达水平。如表 1 所示, ER β mRNA(OK-1) 的表达水平在正常甲状腺组织与结节性增生组织间以及结节性增生组织与 PTC 组织间比较, 差异均无统计学意义 ($F=0.045, P=0.956$; 表 1)。与正常甲状腺组织相比, ER β mRNA(ON-1) 和总 ER β mRNA 在结节性增生组织中表达水平显著降低 ($H=25.806, P=0.000$; 表 1); 与结节性增生组织相比, ER β mRNA(ON-1) 和总 ER β mRNA 在 PTC 组织中的表达水平显著降低 ($F=25.812, P=0.000$; 表 1)。以上结果表明 ER β mRNA(ON-1) 在总 ER β mRNA 中发挥主要作用, 且 ER β mRNA(ON-1) 和总 ER β mRNA 的表达水平从正常甲状腺组织、结节性增生组织到 PTC 组织逐渐降低。

2.5 ER β 5'非翻译区在正常甲状腺细胞和 PTC 细胞中的甲基化状态

亚硫酸氢盐测序检测 Nthy-ori3-1 细胞和 BCPAP 细胞中 ER β 基因启动子 0K、启动子 0N 和外显子 0N 的甲基化状态。如图 4 和表 2 所示, 启动子



A: Schematic drawing of the ER β 5'-untranslated region. Promoter OK, promoter ON, exon OK and exon ON of ER β gene are shown. Translation start site is indicated by ATG. The A of the first codon ATG is assigned to nucleotide number +1. B: The expression levels of ER β mRNA(OK-1), ER β mRNA(ON-1) and total ER β mRNA were detected by qRT-PCR in Nthy-ori3-1 and BCPAP cells. $F=132.510, P=0.000; F=75.056, P=0.000$. 1) $P=0.000$, compared with ER β mRNA(OK-1). $n=3$. 2) $P=0.000$, compared with ER β mRNA(OK-1). $n=3$. 3) $P=0.600$, compared with the Nthy-ori3-1 cells [ER β mRNA(OK-1)]. $n=3$. 4) $P=0.001$, compared with the Nthy-ori3-1 cells [ER β mRNA(ON-1) and total ER β mRNA]. $n=3$.

图 3 ER β mRNA 及其异构体在正常甲状腺细胞和甲状腺乳头状癌细胞中的表达水平

Fig.3 The expression levels of ER β mRNA and ER β mRNA isoforms in human normal thyroid cells and PTC cells

OK CpG 岛在 Nthy-ori3-1 细胞和 BCPAP 细胞中未甲基化或低甲基化。启动子 0N 和外显子 0N CpG 岛在 Nthy-ori3-1 细胞中未甲基化或低甲基化, 而在 BCPAP 细胞中呈现中度甲基化状态。

2.6 ER β 5'非翻译区在正常甲状腺组织、结节性增生组织和 PTC 组织中的甲基化状态

亚硫酸氢盐测序检测从正常甲状腺组织、结节性增生组织和 PTC 组织中提取的滤泡上皮细胞中 ER β 基因启动子 0K、启动子 0N 和外显子 0N 的甲基化状态。如图 5 所示, 在所有组织中, 启动子 0K CpG 岛甲基化程度都较低, 而启动子 0N 和

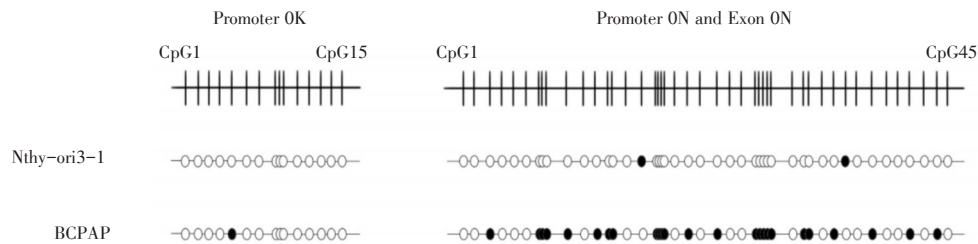
表1 ERβ mRNA 及其异构体在各组中的表达

Table 1 The expression levels of ERβ mRNA and ERβ mRNA isforms in tissue specimens of each groups

[n=10, M(P₂₅~P₇₅)]

Groups	Normal thyroid tissues	Thyroid nodular hyperplasia tissues	PTC tissues	F/H	P
ERβ mRNA (OK-1)	2.72±0.23	2.76±0.31 ¹⁾	2.74±0.30 ²⁾	0.045	0.956
ERβ mRNA (ON-1)	50.68(45.47~59.50)	34.12(32.07~36.94) ³⁾	16.12(14.59~17.45) ⁴⁾	25.806	0.000
Total ERβ mRNA	51.30(50.18~56.53)	38.74(33.97~41.74) ³⁾	21.17(19.59~23.75) ⁴⁾	25.812	0.000

The expression levels of ERβ mRNA(OK-1), ERβ mRNA(ON-1) and total ERβ mRNA in tissue specimens of normal thyroid, nodular hyperplasia and PTC were presented as ($\bar{x} \pm s$)/M(P₂₅~P₇₅) after normalization to GAPDH. ¹⁾P=1.000, compared with normal thyroid tissues. n=10. ²⁾P=1.000, compared with thyroid nodular hyperplasia tissues. n=10. ³⁾P=0.000, compared with normal thyroid tissues. n=10. ⁴⁾P=0.000, compared with thyroid nodular hyperplasia tissues. n=10.



DNA methylation status of Promoter OK, Promoter ON and Exon ON of *ERβ* gene were evaluated by bisulfite genomic sequencing in Nthy-ori3-1 and BCPAP cells. The 15 CpG sites in Promoter OK and the 45 CpG sites in Promoter ON and Exon ON were shown. Open and filled circles indicate unmethylated and methylated CpG sites, respectively.

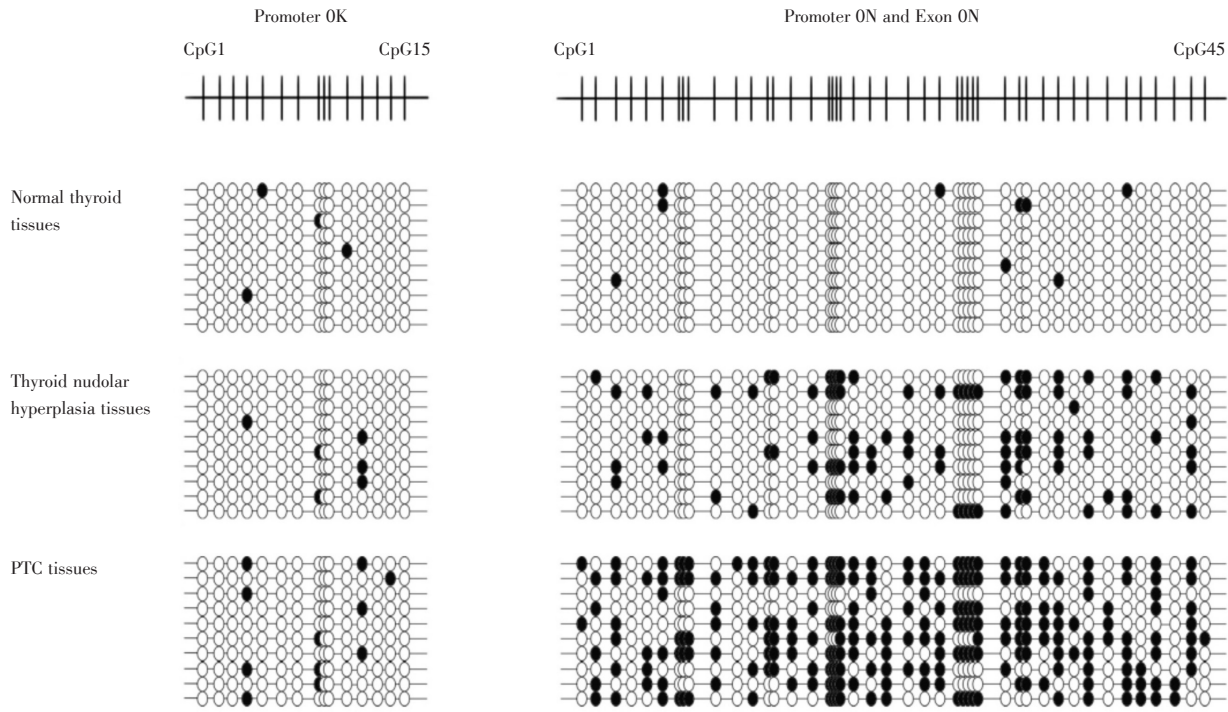
图4 *ERβ* 5'非翻译区在正常甲状腺细胞和甲状腺乳头状癌细胞中的DNA甲基化状态Fig.4 DNA Methylation status of *ERβ* 5'-untranslated region in human normal thyroid cells and PTC cells表2 *ERβ* 5'非翻译区在正常甲状腺细胞和甲状腺乳头状癌细胞中的DNA甲基化状态Table 2 DNA Methylation status of *ERβ* 5'-untranslated region in human normal thyroid cells and PTC cells

Cell lines	-	+	++	+++
Promoter OK	Nthy-ori3-1	1	0	0
	BCPAP	0	1	0
Promoter ON and exon ON	Nthy-ori3-1	1	0	0
	BCPAP	0	0	1

DNA methylation status of Promoter OK, Promoter ON and exon ON in Nthy-ori3-1 cells and BCPAP cells were detected by bisulfite genomic sequencing in Nthy-ori3-1 cell line and BCPAP cell line. -: unmethylation (0% of CpG sites are methylated). +: hypomethylation (1%~20% of CpG sites are methylated). ++: moderate methylation (20%~60% of CpG sites are methylated). +++: extensive methylation (60%~100% of CpG sites are methylated).

外显子ON的CpG岛甲基化程度较高。如表3所示,在正常甲状腺组织中,启动子OK、启动子ON和外显子ON CpG岛未甲基化(6/10, 6/10)或低甲基化(4/10, 4/10),无中度甲基化和高甲基化;在结节性增生组织中,启动子OK CpG岛无中度甲基化和高甲基化,而启动子ON和外显子ON CpG岛有6/10例中度甲基化和1/10例高甲基化;在PTC

组织中,启动子OK CpG岛无中度甲基化和高甲基化,而启动子ON和外显子ON CpG岛有4/10例显示中度甲基化,以及5/10例显示高甲基化。以上结果显示,启动子ON和外显子ON在*ERβ*基因CpG岛甲基化中占主导地位,且启动子ON和外显子ON CpG岛甲基化状态从正常甲状腺组织、结节性增生组织到PTC组织逐渐增加。



DNA methylation status of Promoter 0K, Promoter 0N and Exon 0N of ERβ gene were evaluated by bisulfite genomic sequencing in tissue specimens of normal thyroid, nodular hyperplasia and PTC. $n=10$. The 15 CpG sites in Promoter 0K and the 45 CpG sites in Promoter 0N and Exon 0N were shown. Open and filled circles indicate unmethylated and methylated CpG sites, respectively.

图5 ERβ5'非翻译区在正常甲状腺组织、结节性增生组织和PTC组织中的DNA甲基化状态

Fig.5 DNA Methylation status of ERβ 5'-untranslated region in tissue specimens of normal thyroid, nodular hyperplasia and PTC

表3 ERβ5'非翻译区在各组中的甲基化状态

Table 3 DNA Methylation status of ERβ 5'-untranslated region in tissue specimens of each groups

Groups($n=10$)		-	+	++	+++
Promoter 0K	Normal thyroid tissues	6	4	0	0
	Thyroid nodular hyperplasia tissues	4	6	0	0
	PTC tissues	1	9	0	0
Promoter 0N and exon 0N	Normal thyroid tissues	6	4	0	0
	Thyroid nodular hyperplasia tissues	0	3	6	1
	PTC tissues	0	1	4	5

DNA methylation status of Promoter 0K, Promoter 0N and exon 0N in tissue specimens of normal thyroid, nodular hyperplasia and PTC normal were evaluated by bisulfite genomic sequencing in Nthy-ori3-1 cell line and BCPAP cell line. $n=10$. -: unmethylation (0% of CpG sites are methylated). +: hypomethylation (1%~20% of CpG sites are methylated). ++: moderate methylation (20%~60% of CpG sites are methylated). +++: extensive methylation (60%~100% of CpG sites are methylated).

2.7 DNA去甲基化对ERβ mRNA及其异构体表达水平的影响

应用DNA甲基化转移酶抑制剂5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC)处理Nthy-ori3-1细胞和

BCPAP细胞后,qRT-PCR结果显示,在Nthy-ori3-1细胞中,ERβ mRNA(OK-1)、ERβ mRNA(ON-1)和总ERβ mRNA在两组间的表达水平差异均无统计学意义($t=0.998, 0.160, 0.159, P=0.374$,

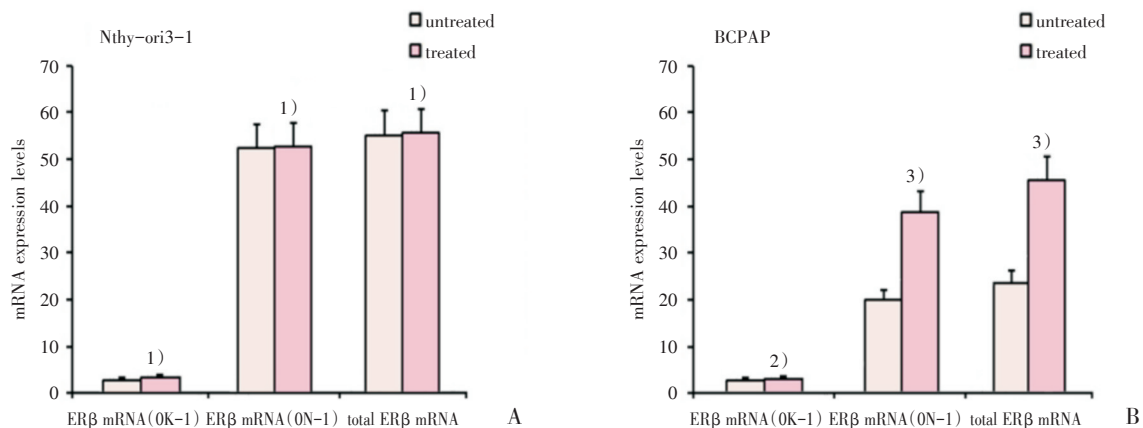
0.880, 0.881; 图 6A)。在 BCPAP 细胞中, ER β mRNA (OK-1) 处理前后的表达水平差异无统计学意义 ($t=1.054, P=0.351$; 图 6B), 而 5-aza-dC 处理后的 ER β mRNA (ON-1) 和总 ER β mRNA 表达水平显著高于未处理组 ($t=7.722, 6.573, P=0.002, 0.003$; 图 6B)。结果说明, 5-aza-dC 处理重新激活了 BCPAP 细胞中 ER β mRNA (ON-1) 与 ER β mRNA 的表达, 而对 ER β mRNA (OK-1) 无影响。

3 讨论

已有研究表明雌激素对 PTC 的发生发展具有刺激作用, 其生物学作用主要由 ER α 和 ER β 介导^[13]。ER α 可促进肿瘤细胞增殖和生长, 与之相反的是, ER β 可抑制肿瘤细胞生长, 并在 PTC 中具有保护作用^[14]。多项研究表明 ER β 可作为肿瘤治疗的潜在靶标, 因其对肿瘤细胞增殖有负调控作用, ER β 还可调节控制细胞进程与凋亡的基因来介导肿瘤发生发展, 其丢失可能与癌变、预后不良以及对内分泌治疗抵抗相关^[15-16]。我们课题组前期研究^[8]发现, ER β 可抑制 PTC 细胞增殖、侵袭和转移, 而肿瘤较大、存在甲状腺外扩散、淋巴结转移以及 TNM 分期高 (III-IV) 的甲状腺乳头状癌患者的 ER β 蛋白表达水平较低。本研究实验结果表明, 与正常甲状腺细胞及组织相比, ER β

蛋白表达水平以及 ER β mRNA (ON-1) 和总 ER β mRNA 的表达水平在 PTC 中明显下调, 且从正常甲状腺组织到结节性增生组织再到 PTC 组织逐渐降低, 我们将进一步探讨这是否与其 5' 非翻译区 CpG 岛甲基化相关。

DNA 甲基化通常发生在胞嘧啶-鸟嘌呤 (CpG) 二核苷酸的胞嘧啶上, CpG 二核苷酸簇即 CpG 岛, 一般位于基因转录起始位点附近的启动子区域^[17]。在肿瘤研究中常认为 DNA 甲基化是一种阻止基因表达的表观遗传机制, DNA 高甲基化可抑制基因表达^[18-19]。在正常细胞组织中未甲基化的 CpG 岛常在癌变过程中发生高甲基化, 因此许多对 DNA 甲基化的研究都聚焦于 CpG 岛的甲基化状态^[20]。例如, 研究发现, 腺瘤性结肠息肉病 (adenomatous polyposis coli, APC) 基因启动子 CpG 岛在结肠癌^[21]、乳腺癌^[22] 等肿瘤中发生高甲基化。E-cadherin 基因在乳腺癌^[23]、卵巢癌^[24] 等肿瘤中转录沉默与其 CpG 岛甲基化相关。本研究通过亚硫酸氢盐测序发现, ER β 启动子 ON 和外显子 ON CpG 岛在 PTC 细胞和组织中的甲基化程度明显高于正常甲状腺, 且其甲基化状态从正常甲状腺组织、结节性增生组织到 PTC 组织逐渐增强, 在 PTC 组织中最为广泛。由此可见, ER β 基因 CpG 岛甲基化可能是引起 ER β 表达在 PTC 形成过程中逐渐降低的原因。



A: The expression levels of ER β mRNA (OK-1), ER β mRNA (ON-1) and total ER β mRNA were detected by qRT-PCR in Nthy-ori3-1 cells untreated and treated with 5-aza-dC. ¹⁾ $P=0.374, 0.880, 0.881$, compared with untreated group. $n=3$. B: The expression levels of ER β mRNA (OK-1), ER β mRNA (ON-1) and total ER β mRNA were detected by qRT-PCR in BCPAP cells untreated and treated with 5-aza-dC. ²⁾ $P=0.351$, compared with untreated group. $n=3$. ³⁾ $P=0.002, 0.003$, compared with untreated group. $n=3$.

图 6 DNA 去甲基化对正常甲状腺细胞和甲状腺乳头状癌细胞中 ER β mRNA 及其异构体的影响

Fig.6 Effects of DNA demethylation on the expression levels of ER β mRNA and ER β mRNA isoforms in human normal thyroid cells and PTC cells

Suzuki 等^[10]研究发现,在卵巢癌中,*ER β* 启动子0N和外显子0N高甲基化与*ER β 1*,*ER β 2*和*ER β 4* mRNA表达缺失之间存在着显著的相关性。Al-Nakhle H等^[9]研究认为位于*ER β* 基因5'非翻译区的启动子0N和外显子0N异常DNA甲基化可能参与乳腺癌的发生发展。与以上研究结果相似的是,本研究结果发现,启动子0N和外显子0N CpG岛在PTC中广泛甲基化,而启动子0K CpG岛未甲基化或呈现低甲基化状态。应用DNA甲基化转移酶抑制剂5-aza-dC处理细胞后发现,5-Aza-dC可恢复*ER β* mRNA(0N-1)在PTC细胞中的表达,但不能恢复*ER β* mRNA(0K-1)的表达。这表明启动子0N和外显子0N CpG岛甲基化在*ER β* 基因低表达中占主导地位。DNA甲基化过

程主要由三种DNA甲基转移酶(DNA Methyltransferase, DNMT)(DNMT1、DNMT3a和DNMT3b)介导, DNMTs可催化甲基从S-腺苷甲硫氨酸转移至CpG岛中的胞嘧啶^[25-27],而PTC中*ER β* 是否存在特异的DNMTs和去甲基化酶目前尚无文献报道,需进一步研究探讨。

综上所述,*ER β* 常在甲状腺乳头状癌中低表达可能是其5'非翻译区CpG岛甲基化引起的,尤其是启动子0N和外显子0N CpG岛广泛甲基化。DNA甲基化转移酶抑制剂5-Aza-dC可逆转*ER β* CpG岛甲基化,这可为PTC的基础研究与治疗预后提供新的研究方向。但*ER β* 发生DNA甲基化的原因及机制仍不清楚,需要进一步深入研究。

参考文献:

- [1] Roman BR, Morris LG, Davies L. The thyroid cancer epidemic, 2017 perspective[J]. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 2017, 24(5): 332-336.
- [2] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 甲状腺癌诊疗规范(2018年版)[J/CD]. 中华普通外科学文献(电子版), 2019, 13(1): 1-15.
National Health Commission, PRC. Specification for diagnosis and treatment of thyroid cancer (2018 version)[J/CD]. *Chin Arch Gen Surg (Electronic Edition)*, 2019, 13(1): 1-15.
- [3] 李征毅, 赵永胜, 李锋, 等. 甲状腺乳头状癌BRAF基因突变与超声及病理特征相关性研究[J]. *新医学*, 2018, 49(11): 828-833.
Li ZY, Zhao YS, Li F, et al. Correlation between BRAF gene mutation and ultrasonic and pathological features in papillary thyroid carcinoma[J]. *J New Med*, 2018, 49(11): 828-833.
- [4] 瞿佳丽, 朱妙平, 韩志江. 各种CT征象联合应用在甲状腺微小乳头状癌诊断中的价值[J]. *影像诊断与介入放射学*, 2015, 24(2): 151-155.
Qu JL, Zhu MP, Han ZJ. The value of combined application of various CT signs in the diagnosis of papillary thyroid carcinoma[J]. *J Diagn Imag Intervent Radiol*, 2015, 24(2): 151-155.
- [5] Seib CD, Sosa JA. Evolving understanding of the epidemiology of thyroid cancer[J]. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 2019, 48(1): 23-35.
- [6] Derwahl M, Nicula D. Estrogen and its role in thyroid cancer[J]. *Endocr Relat Cancer*, 2014, 21(5): T273-283.
- [7] Jia M, Dahlman-Wright K, Gustafsson JA. Estrogen receptor alpha and beta in health and disease[J]. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2015, 29(4): 557-568.
- [8] Qiu YB, Liao LY, Jiang R, et al. PEST1 promotes the occurrence and development of papillary thyroid cancer by upregulating the ER α /ER β protein ratio[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 1032.
- [9] Al-Nakhle H, Smith L, Bell SM, et al. Regulation of estrogen receptor β 1 expression in breast cancer by epigenetic modification of the 5' regulatory region[J]. *Int J Oncol*, 2013, 43(6): 2039-2045.
- [10] Suzuki F, Akahira J, Miura I, et al. Loss of estrogen receptor beta isoform expression and its correlation with aberrant DNA methylation of the 5'-untranslated region in human epithelial ovarian carcinoma[J]. *Cancer Sci*, 2008, 99(9): 2365-2372.
- [11] Botezatu A, Iancu I, Plesa A, et al. Methylation of tumour suppressor genes associated with thyroid cancer[J]. *Cancer Biomark*, 2019, 25: 53-65.

- [12] Huang Y, Dong W, Li J, et al. Differential expression patterns and clinical significance of estrogen receptor- α and β in papillary thyroid carcinoma [J]. *BMC Cancer*, 2014, 14: 383.
- [13] Rahbari R, Zhang L, Kebebew E. Thyroid cancer gender disparity [J]. *Future Oncol*, 2010, 6: 1771-1779.
- [14] Shanle EK, Xu W. Selectively targeting estrogen receptors for cancer treatment [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2010, 62: 1265-1276.
- [15] Pearce ST, Jordan VC. The biological role of estrogen receptors α and β in cancer [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2004, 50(1): 3-22.
- [16] Paterni I, Granchi C, Katzenellenbogen JA, et al. Estrogen receptors alpha (ER α) and beta (ER β): subtype-selective ligands and clinical potential [J]. *Steroids*, 2014, 90: 13-29.
- [17] Meng H, Cao Y, Qin J, et al. DNA methylation, its mediators and genome integrity [J]. *Int J Biol Sci*, 2015, 11: 604-617.
- [18] Pan Y, Liu G, Zhou F, et al. DNA methylation profiles in cancer diagnosis and therapeutics [J]. *Clin Exp Med*, 2018, 18(1): 1-14.
- [19] Skvortsova K, Stirzaker C, Taberlay P. The DNA methylation landscape in cancer [J]. *Essays Biochem*, 2019, 63(6): 797-811.
- [20] 温焯秀, 戎祯祥, 梁峰吉, 等. 外周血细胞 RPS24 基因甲基化与结直肠癌的关系 [J]. *广东医学*, 2018, 39(21): 3224-3228.
- Wen ZX, Rong ZX, Liang FJ, et al. The relationship between RPS24 gene methylation in peripheral blood cells and colorectal cancer [J]. *Guangdong Med J*, 2018, 39(21): 3224-3228.
- [21] Ding Z, Jiang T, Piao Y, et al. Meta-analysis of the association between APC promoter methylation and colorectal cancer [J]. *Onco Targets Ther*, 2015, 8: 211-222.
- [22] Swellam M, Abdelmaksoud MD, Sayed Mahmoud M, et al. Aberrant methylation of APC and RARbeta2 genes in breast cancer patients [J]. *IUBMB Life*, 2015, 67(1): 61-68.
- [23] van Horsen R, Hollestelle A, Rens JA, et al. E-cadherin promoter methylation and mutation are inversely related to motility capacity of breast cancer cells [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2012, 136(2): 365-377.
- [24] Moselhy SS, Kumosani TA, Kamal IH, et al. Hypermethylation of P15, P16, and E-cadherin genes in ovarian cancer [J]. *Toxicol Ind Health*, 2015, 31(10): 924-930.
- [25] Edwards JR, Yarychivska O, Boulard M, et al. DNA methylation and DNA methyltransferases [J]. *Epigenetics Chromatin*, 2017, 10: 23.
- [26] Bouras E, Karakioulaki M, Bougioukas KI, et al. Gene promoter methylation and cancer: An umbrella review [J]. *Gene*, 2019, 710: 333-340.
- [27] Subramaniam D, Thombre R, Dhar A, et al. DNA methyltransferases: a novel target for prevention and therapy [J]. *Front Oncol*, 2014, 4: 80.

(编辑 余 菁)