

生明显的生物力学影响,以邻近上节段为主,且椎间植骨影响最大,横突间植骨次之,新型植骨最小。与此同时,奚春阳等^[2]构建了本植骨术式的动物模型,并证明本植骨术式成骨效果好,且该术式人为劈开了双侧上关节突和峡部,保留了附着于其上的肌肉组织,保障了腰椎的稳定性。目前该术式已经在临床中使用,短期随访疗效显著,尚缺乏长期随访。

4 参考文献

- [1] Bono CM, Lee CK. Critic Alanalysis of trends in fusion for degener-ative disc disease over the past 20 years: influence of technique on fusion rateand clinical outcome [J]. Spine (PhilaPa1976), 2004,29(4):455-463.
- [2] Xi C, Li Y, Chi Z, et al. The influence of orthotopic paraspinal muscle-pediculated bone flaps on posterior spinal fusion in a canine model [J]. Spine (Phila Pa 1976), 2011,36(1):417-422.
- [3] Li KH, Wang H, Huang XY, et al. Establish-ment of finite element model of lumbar motion segments and its biomechanical significance [J]. Chinese Journal of Clinical Rehabilitation, 2005,14(9):198-199.
- [4] Ahmad F, Koichi S, Goel V, et al. Biomechanical rationaleof ossification of the secondary ossification center on a-pophysal bony ring fracture: a biomechanical study [J]. Clin Biomech, 2007,22(10):1063-1067.
- [5] Zencica P, Chaloupka R, Hlad kov J, et al. Adjacent segment degeneration after lumbosacral fusion in spondylolisthesis a retrospective radiological and clinical analysis [J]. Acta Chir Orthop Traumatol Cech, 2010,77(2):124-130.
- [6] Lee CS, Hwang CJ, Lee SW, et al. Risk factors for adjacent segment disease after lumbar fusion [J]. Eur Spine J, 2009,18(11):1637-1643.
- [7] Knuar MN, Baklnaov A, Chopin D. Correlation between sagittal Plane changes and adjacent Segment degeneration following lumbar spine fusion [J]. Eur Spine J, 2001,10(4):314-319.
- [8] 黄晓川,康两期,沙漠,等. 相邻节段退行性变是自然过程还是融合相关的现象 [J]? 中国骨与关节损伤杂志, 2014,29(9): 891-893.
- [9] Cho KS, Kang SG, Yoo DS, et al. Risk factors and surgical treatment for symptomatic adjacent segment degeneration after lumbar spine fusion [J]. J Korean Neurosurg Soc, 2009,46(5): 425-430.
- [10] Videbaek TS, Egund N, Christensen FB. Adjacent segment degeneration after lumbar spinal fusion: the impact of anterior column support: a randomized clinical trial with an eight-to thirteen-year magnetic resonance imaging follow-up [J]. Spine, 2010,35(22):1955-1964.

(收稿:2014-08-29 编辑:杜冠辉)

同一患者中甲状腺良性瘤与癌组织 DNA 甲基化差异基因的炎症相关信号通路分析

顾龙 蔡良良 刘国彦 阮润生 曾骥孟

摘要 目的:研究同一患者体内甲状腺良性瘤与癌组织在 DNA 甲基化方面的差异,从而揭示 DNA 甲基化在肿瘤发生发展中的重要作用。方法:使用基因甲基化芯片技术对同一患者的并发甲状腺癌、甲状腺良性瘤组织样本的基因组甲基化水平进行检测,对筛选出的差异化显著的基因进行生物信息学分析得到功能基因的信号通路,并针对与甲状腺癌明显相关的信号通路进行分析讨论。结果:甲状腺的良性瘤与癌在 DNA 甲基化水平上存在显著差异;参与恶性肿瘤相关的信号通路包括 T 细胞受体的信号通路, Jak-STAT 信号通路, 细胞因子-细胞因子受体相互作用信号通路等炎症相关信号通路。结论:研究得出炎症的相关生物信息学通路,与甲状腺肿瘤的发生发展密切相关,为甲状腺恶性肿瘤的发生发展机制的阐明与潜在药物靶点的选择提供新的思路与方向。

关键词 甲状腺肿瘤; 甲状腺乳头状癌; 甲状腺良性瘤; DNA 甲基化; 信号通路; 炎症

Inflammation-related signaling pathways of differently-methylated DNA from benign and malignant thyroid tumors in one patient GU Long*, CAI Liang-liang, LIU Guo-yan, RUAN Run-sheng, TZENG Chi-meng. * Centre for Translational Medicine, School of Pharmaceutical Science, Xiamen University, China

doi:10.3969/j.issn.1006-5725.2015.06.012

基金项目:国家自然科学基金(编号:81272445);厦门市科技局国家对台科技合作项目(编号:350Z20121153)

作者单位:361005 厦门大学药学院制药与转化医学中心(顾龙,蔡良良,曾骥孟); 361004 厦门大学附属中山医院(刘国彦); 361004 厦门大学药学院安特诺细胞医药研发中心(阮润生)

通信作者:曾骥孟 E-mail: cmtzeng@xmu.edu.cn

Corresponding author: TZENG Chi-meng E-mail: cmtzeng@xmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To determine the possible differences in DNA methylation of benign and malignant thyroid tumors and its role in tumorigenesis and tumor progression. **Methods** Infinium human methylation 450 bead chip platform was utilized to screen the whole-genome of benign and malignant thyroid tumor tissues surgically removed from a patient for the determination of their DNA methylation levels. The genes with significant differences in methylation were analyzed for their functional pathways with bioinformatics. **Results** There were significant differences in DNA methylation between benign and malignant thyroid tumor. The inflammation-related pathways, such as T cell, Jak-STAT and cytokine-cytokine receptor signaling pathways involved in the biological process of tumorigenesis and tumor progression. **Conclusions** The differences in DNA methylation between benign and malignant reveal a close relationship between inflammation and tumorigenesis and tumor progression and provide a novel method for investigation of thyroid cancer development and target drug discovery.

【Key words】 Thyroid neoplasms; Papillary thyroid carcinoma; Thyroid benign tumor; DNA methylation; Signaling pathway; Inflammation

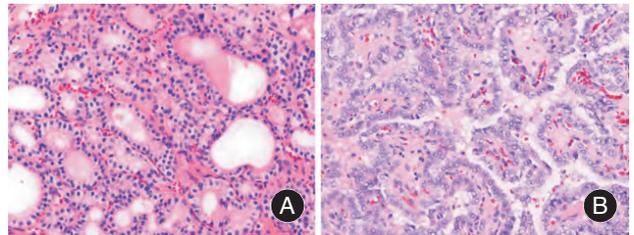
甲状腺癌是头颈部最为常见的肿瘤,其发病率呈逐渐上升趋势^[1]。甲状腺癌确切的发病机制尚难以确定,但有研究证实,甲状腺癌的发生与染色体的核型变化、端粒酶活性的改变,以及一些肿瘤相关基因的表达量异常密切相关。最近的研究表明,表观遗传学在癌症的发生发展中同样起着重要的作用^[2],可以通过调控某些癌症相关基因的表达来影响癌症的发生和发展。针对目前众多癌症的相关研究,主要是基于散在样本的研究结果,无法排除由于个体间年龄、性别、民族、地域的等的差异带来的对实验结果的影响,因此本研究选取同一患者的并发的甲状腺良性和恶性的病变组织样本进行表观遗传学研究,以排除个体与个体之间差异的干扰。

本研究使用基因甲基化芯片技术对同一患者并发的甲状腺癌、甲状腺良性瘤组织样本进行表观遗传学层面的研究,将涉及到的基因运用生物信息学来分析功能基因的信号通路,针对与甲状腺恶性肿瘤关系密切的生物学信号通路进行分析讨论,并为甲状腺癌潜在的发生发展机制给出线索与解释。

1 对象与方法

1.1 研究对象 患者女,20岁,病理诊断结果为甲状腺癌合并甲状腺乳头状癌(图1)。经甲状腺部分切除术后的样本通过石蜡包埋与H&E染色,后经病理确认,分为良性瘤和癌两组。其中,良性瘤细胞大小一致,聚集成团,核圆形,位于细胞中央;癌组织中的癌细胞成乳头状,核大,拥挤,毛玻璃状。组织样本于-80℃条件下保存以防DNA降解。

1.2 试剂及仪器 MagCore Genomic DNA Tissue Kit(Cat.No:MGT-01,芮宝生物,中国台湾);EpiTect Bisulfite Kits(Cat.No:59104,凯杰生物,德国);PCR



注:A,甲状腺良性瘤;B,乳头状甲状腺癌

图1 实验样本的H&E染色图

纯化试剂盒(Cat.No:SK8142,上海生工,中国);Illumina Infinium HumanMethylation450 BeadChip(Cat.No:WG-314-1003,Illumina公司,美国)。

1.3 方法

1.3.1 甲基化芯片实验 采用Illumina Infinium HumanMethylation450 BeadChip对基因组甲基化位点进行单核苷酸分辨率的检测。检测位点分布于基因启动子区、5'UTR区、第一外显子区、基因body区、3'UTR的甲基化的CpG位点。具体步骤为:(1)DNA提取和亚硫酸氢盐修饰:分别按照MagCore Genomic DNA Tissue Kit和EpiTect Bisulfite Kits说明书步骤进行。(2)碱变性-全基因组扩增(whole-genome amplified,WGA)、片段化以及纯化:亚硫酸盐处理后,样本依次进行WGA和酶切,片段化DNA为300~500bp大小,PCR纯化试剂盒进行纯化。(3)杂交:片段化的WGA-DNA分子与芯片微珠上的位点特异性的DNA探针进行退火。每个CpG位点对应两个微珠类型,一个对应甲基化(C)状态,另一个对应未甲基化(T)状态。利用DNP-和生物素标记的ddNTP进行单碱基延伸,以实现位点特异性的引物退火。延伸后,芯片进行荧光染色、扫描,检测。(4)甲基化状态数值的计算:芯片扫描数据导入GenomeStudio软件包进行进一步分析。依据Illumina公司所提供

的算法,对每一样本的背景信号进行均一化处理,后计算每一样本每一个 CpG 位点的甲基化状态,即 β 值。

1.3.2 芯片数据分析 (1)启动子区域甲基化位点筛选:首先筛选与基因表达关系最为密切的启动子区和第一个外显子区的甲基化位点。(2)甲基化状态差值比较:得到两种组织样品之间甲基化

状态(β 值)的差值,即 $\Delta\beta$ 值。随后,对 $\Delta\beta$ 值进行排序(表 1),排列出在良性肿瘤组/癌组织组对比中排在前 5 位的基因。(3)生物信息学分析:针对 ($|\Delta\beta| > 0.15$)的基因集进行生物信息学分析。使用基于 R 语言的聚类分析工具 clusterProfiler^[3]用于对基因集进行 KEGG 通路分析(表 2)和可视化处理(图 2)。

表 1 甲状腺良性瘤与恶性甲状腺癌组织 DNA 高/低甲基化差异分列前 5 位的基因列表

Target ID	$\Delta\beta$ value	UCSC REFGENE NAME	UCSC REFGENE GROUP	Approved Name	Location
cg00532474	-0.465 66	PSTPIP2	TSS1500	proline-serine-threonine phosphatase interacting protein 2	18q12
cg02192520	-0.44 301	RDH5	1stExon	retinol dehydrogenase 5 (11-cis/9-cis)	12q13-q14
cg01276497	-0.44 262	C11orf91	TSS1500	chromosome 11 open reading frame 91	11p13
cg04990202	-0.42 484	S100A16	5'UTR	S100 calcium binding protein A16	1q21
cg00842076	-0.42 407	FOXN3	5'UTR	forkhead box N3	14q32.11
cg00041575	0.39 712	TSPAN32	TSS1500	tetraspanin 32	11p15
cg00569276	0.41 124	PADI2	TSS1500	peptidyl arginine deiminase, type phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase,	1p35.2-p35.1
cg00231528	0.42 581	PIK3CD	5'UTR	catalytic subunit delta	1p36.2
cg00903584	0.42 853	PTPN7	5'UTR	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 7	1q32.1
cg00446123	0.50 588	LIME1	TSS200	Lck interacting transmembrane adaptor 1	20q13.33

表 2 甲基化差异基因的生物通路分析

通路 ID	通路名称	参与基因总数	参与基因差异数	P 值
hsa04080	Neuroactive ligand-receptor interaction	321	28	0.000 07
hsa04060	Cytokine-cytokine receptor interaction	271	25	0.000 64
hsa04630	Jak-STAT signaling pathway	156	17	0.000 93
hsa04660	T cell receptor signaling pathway	104	13	0.001 58
hsa04672	Intestinal immune network for IgA production	51	8	0.001 85
hsa04640	Hematopoietic cell lineage	88	11	0.002 65
hsa04620	Toll-like receptor signaling pathway	106	12	0.002 88
hsa05332	Graft-versus-host disease	45	7	0.003 60
hsa04670	Leukocyte transendothelial migration	118	12	0.008 73
hsa05146	Amoebiasis	109	11	0.010 87
hsa05323	Rheumatoid arthritis	93	10	0.010 91
hsa04664	Fc epsilon RI signaling pathway	70	9	0.011 51

2 结果

通过比较甲状腺良性与恶性肿瘤组织样本间对应基因的甲基化水平,显示两者在启动子与第一个外显子区域 DNA 甲基化水平上存在显著差异。生物信息学分析结果显示,在甲状腺良性瘤与癌组织中差异甲基化的基因参与的主要信号通路包括 T 细胞受体、JAK-STAT 与细胞因子-细胞因子受体等信号通路。其中,甲基化程度有显著差异的 *CD28/PIK3CA/MAPK14/LAT/CRAP2/ITK/PDCD1/CTLA4* 等基因参与 T 细胞受体信号通路; *PPBP/CXCL12/XCL1/XCL2/*

CCL15/CCL20/CCL22/CCL25/OSM/LEP/CSF2/IL24/IFNL1/TNFSF4/TNFSF13/GDF5 等基因与细胞因子-细胞因子受体信号通路有关; *JAK3/STAT2/CNTFR/PIK3CA/CREBBP/CBLB* 等基因涉及 JAK-STAT 信号通路,且这些基因与通路参与炎症反应的相关过程(图 3)。

3 讨论

甲状腺肿瘤作为一种高发的内分泌系统肿瘤,其发生发展与表观遗传学因素(尤其是基因甲基化)关系密切。在肿瘤发生发展的过程中,T 细胞是一种在肿瘤微环境中常见的细胞类型。增加癌

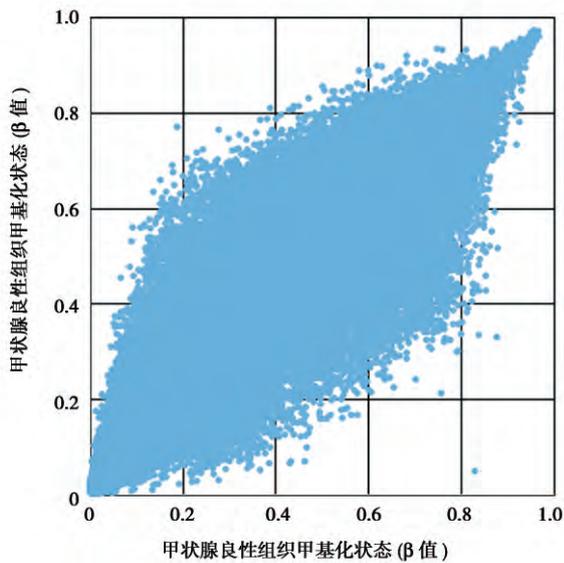


图 2 甲状腺良性瘤与癌的基因化状态分布图

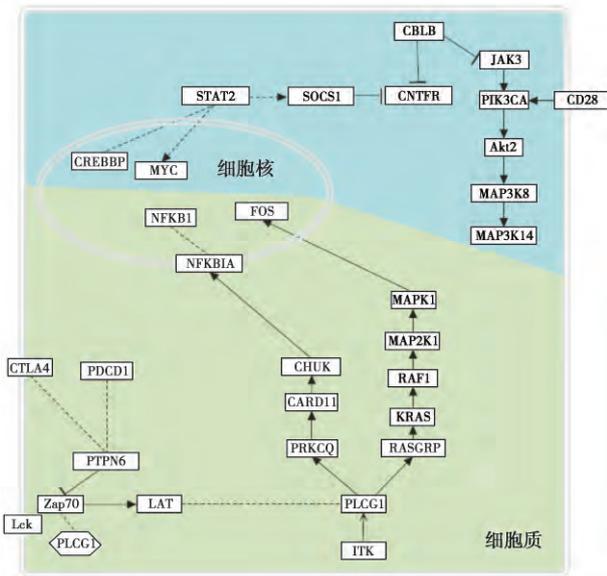


图 3 细胞内与炎症和癌症相关且甲基化差异显著的基因所涉及的生物学通路

症患者体内 T 细胞的数量 (尤其是 CTL 和 Th1 细胞) 可以提高胰腺癌在内的多种癌症患者的存活率^[4-5]。在炎症发生的过程中,细胞因子及其受体的相互作用参与到癌症发生的多种进程中^[6]。但在生物体内,细胞因子-细胞因子受体相互作用后所产生的信号需要在一系列下游信号通路的协助 (如 JAK-STAT 信号通路^[7]) 下才可以完成上述的诸多生物学功能。甲状腺癌、甲状腺良性瘤组织甲基化差异化基因参与的信号通路与炎症的发生发展有

很大的关系。在这个微环境中肿瘤细胞能够耐受癌基因 (如 *RET/PTC*) 的表达。反之,活化的 *RET/PTC/RAS/BRAF/MAPK* 信号通路诱导促炎过程,包括分泌肿瘤细胞因子和趋化因子。这些分子通过激活肿瘤细胞内关键信号通路而发挥增殖、生存、迁移及侵袭效应,有助于保持细胞的恶性表型,也可以在肿瘤微环境中招募免疫细胞,诱导新生血管形成及转移在肿瘤微环境中,免疫炎症因子 (如细胞因子和趋化因子) 还有助于癌症产生和进展过程中关键步骤的调控,特别是对肿瘤细胞增殖、凋亡、自噬、血管生成和转移的调控产生重要影响^[8]。

本研究表明,在甲状腺癌的发生与 DNA 甲基化的变化相关,其通过影响关键基因功能从而导致生物学机能的改变;甲基化程度差异显著的基因所涉及的信号通路同时参与了炎症反应。这为甲状腺肿瘤发病以及恶变机制的阐明与治疗靶点的选择提供了新的思路与方向,并对甲状腺癌的检测与治疗提出新的思路与观点。分析结果显示一些与甲状腺癌疾病发生发展密切相关的关键词,如 *CBLB* 与 *CREBBP*, 均与机体免疫进程相关。进一步对这些基因结构与功能的研究将对甲状腺癌发病与恶变机制的阐明具有重要意义。此外,本研究存在研究样本较少的不足,需要以后更大样本量的研究。

4 参考文献

- [1] 孙嘉伟,许晓君,蔡秋茂,等. 中国甲状腺癌发病趋势分析 [J]. 中国肿瘤, 2013, 22(9): 690-693.
- [2] DAS PM, SINGAL R. DNA methylation and cancer [J]. J Clin Oncol, 2004, 22(22): 4632-42.
- [3] Yu GC, Wang LG, Han YY, et al. Cluster profiler: anr package for comparing biological themes among gene clusters [J]. Omics, 2012, 16(5): 284-287.
- [4] Antonioli L, Blandizzi C, Pacher P, et al. Immunity, inflammation and cancer: a leading role for adenosine [J]. Nat Rev Cancer, 2013, 13(12): 842-57.
- [5] Roberts SJ, Ng BY, Filler RB, et al. Characterizing tumor-promoting T cells in chemically induced cutaneous carcinogenesis [J]. P Natl Acad Sci USA, 2007, 104(16): 6770-6775.
- [6] Jee SH, Chu CY, Chiu HC, et al. Interleukin-6 induced basic fibroblast growth factor-dependent angiogenesis in basal cell carcinoma cell line via JAK/STAT3 and P13-Kinase/Akt pathways [J]. J Invest Dermatol, 2004, 123(6): 1169-75.
- [7] 吴剑锋,沈佐君. JAK/STAT 信号通路及其与肿瘤侵袭、转移的关系 [J]. 生命的化学, 2009, 29(2): 176-179.
- [8] 王莹,张新杰,李乐晨,等. 慢性炎症与甲状腺癌关系的研究进展 [J]. 现代生物医学进展, 2013, 13(25): 4999-5000.

(收稿: 2014-08-29 编辑: 张倩)