

参考文献

- 1 黄建国, 孙钦立. 两种手术方法行右半结肠癌根治术对机体免疫指标的影响[J]. 海军医学杂志, 2015, 36(5):419-420,469.
- 2 陈中建. 腹腔镜结肠癌手术应用于结肠癌不同分期的合理性[J]. 当代医学, 2014, 20(8):115.
- 3 白洪祥, 刘现立. 腹腔镜下结肠癌根治术安全性及对患者术后胃肠道功能的影响[J]. 中国老年学杂志, 2014, 34(14):4039-4040.
- 4 中华人民共和国卫生和计划生育委员会医政医管局, 中华医学会肿瘤学分会. 中国结直肠癌诊疗规范(2017年版)[J]. 中华外科杂志, 2018, 56(4):241-258.
- 5 中华医学会外科学分会腹腔镜与内镜外科学组, 中国抗癌协会大肠癌专业委员会腹腔镜外科学组. 腹腔镜结直肠癌根治手术操作指南(2008版)[J]. 中华胃肠外科杂志, 2009, 12(3):310-312.
- 6 Liu H, Antony S, Roy K, et al. Interleukin-4 and interleukin-13 increase NADPH oxidase 1-related proliferation of human colon cancer cells[J]. Oncotarget, 2017, 8(24):38113-38135.
- 7 肖毅, 徐徕, 陆君阳. 根治性右半结肠癌淋巴清扫范围的探讨[J]. 中华外科杂志, 2016, 54(6):408-412.
- 8 李勇, 王俊江, 吴德庆, 等. 腹腔镜横结肠癌根治术的技术要点和操作技巧[J]. 中华消化外科杂志, 2013, 12(12):948-951.
- 9 韩丁培, 陆爱国, 冯浩, 等. 腹腔镜辅助与开腹手术行右半结肠切除术疗效比较[J]. 中国实用外科杂志, 2013, 33(1):77-80.
- 10 苏纯洁, 张松柏. 腹腔镜与开腹右半结肠癌完整结肠系膜切除术的临床对比研究[J]. 重庆医学, 2014, 43(26):3512-3514.
- 11 林国乐, 肖毅, 邱辉忠. 腹腔镜右半结肠癌根治术的应用解剖[J]. 中华胃肠外科杂志, 2015, 23(6):525-528.
- 12 赵高平, 贾贵清, 黎熊, 等. 腹腔镜辅助与常规开腹手术治疗胃癌近期疗效分析[J]. 中国临床研究, 2016, 29(7):888-891.
- 13 王宁, 张晓青, 李永章. 七氟烷和丙泊酚对后腹腔镜手术患者凝血功能影响比较[J]. 现代仪器与医疗, 2016, 22(5):62-63,58.
- 14 刘家麒, 杨少军, 陈洁清, 等. 腹腔镜胃癌根治术围术期患者凝血功能、细胞因子及免疫功能的变化[J]. 海南医学院学报, 2017, 23(1):96-99,103.
- 15 叶大才, 范显文, 黄振宇, 等. 不同手术方式对胃癌根治术患者炎症因子及凝血功能的影响[J]. 海南医学, 2013, 24(14):2063-2065.
- 16 钟广芝, 胡鹏飞. 高通量透析对透析患者微炎症因子、凝血功能及预后的影响[J]. 临床内科杂志, 2016, 33(5):337-338.
- 17 高峡, 张波. 腹腔镜与开腹术右半结肠癌根治术对患者免疫指标的影响[J]. 实用临床医药杂志, 2016, 20(13):67-69.
- 18 闫军, 李亮, 陈曦. 腹腔镜直结肠癌根治术与开腹手术近期疗效及对机体免疫的影响[J]. 中国现代普通外科进展, 2016, 19(8):592-595.

[收稿日期 2018-10-07][本文编辑 余军 吕文娟]

课题研究·论著

甲状腺癌 PCDH8 基因的转录调控及临床意义

朱明章, 梁伟新, 赖勇强, 彭和平, 黄尚书, 冯伟兆, 谷小玉, 李林株, 李志宏

基金项目: 广东省医学科学技术研究基金项目(编号:B2016140); 佛山市医学重点专科培育项目(编号:fspsy3-2015040)

作者单位: 528500 广东, 佛山市高明区人民医院普外科(朱明章, 梁伟新, 赖勇强, 黄尚书, 冯伟兆, 谷小玉, 李志宏), 病理科(李林株); 510260 广东, 广州医科大学附属第二医院普外科(彭和平)

作者简介: 朱明章(1986-), 男, 医学硕士, 主治医师, 研究方向: 甲状腺、乳腺肿瘤及腹壁疝的诊治。E-mail:358767716@qq.com

[摘要] **目的** 研究甲状腺乳头状癌、甲状腺滤泡状腺瘤、结节性甲状腺肿和正常甲状腺组织中原钙黏蛋白8(PCDH8)基因转录调控表达水平, 分析PCDH8基因表达与甲状腺乳头状癌患者临床病理特征的关联性。**方法** 选择该院2013~2015年的甲状腺组织标本118例, 根据病理结果分为甲状腺乳头状癌组36例、甲状腺滤泡状腺瘤组30例、结节性甲状腺肿组31例和正常甲状腺组织组21例。采用荧光定量PCR法检测各组标本PCDH8基因的表达情况, 分析PCDH8基因的表达情况与甲状腺乳头状癌患者临床病理特征的关联性。**结果** 荧光定量PCR的结果显示, 正常甲状腺组织组的PCDH8阴性表达率为28.57%, 低于甲状腺乳头状癌组(63.89%)和甲状腺滤泡状腺瘤组(60.00%), 差异有统计学意义($P < 0.05$); 但与结节性甲状腺肿组(54.84%)比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。PCDH8基因mRNA转录表达情况与肿瘤大小有显著关联($P < 0.05$)。**结论** 甲状腺乳头状癌中PCDH8基因表达下调, 并与肿瘤大小存在关联, 在甲状腺乳头状癌的诊断与治疗中有可能成为一种有潜在价值的生物学肿瘤标志物。

[关键词] 甲状腺癌; 原钙黏蛋白8基因; 转录调控

[中图分类号] R 736.1 [文献标识码] A [文章编号] 1674-3806(2019)09-0963-04
doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2019.09.08

Transcriptional regulation of PCDH8 gene in thyroid carcinoma and its clinical significance ZHU Ming-zhang, LIANG Wei-xin, LAI Yong-qiang, et al. Department of General Surgery, the People's Hospital of Gaoming District of Foshan City, Guangdong 528500, China

[Abstract] **Objective** To investigate the expression levels of transcriptional regulation of protocadherin 8(PCDH8) gene in thyroid papillary carcinoma, thyroid follicular adenoma, nodular goiter and normal thyroid tissues and to analyze the relationship between the PCDH8 gene expression and the clinicopathological feature in the patients with thyroid papillary carcinoma. **Methods** One hundred and eighteen thyroid tissue specimens were selected in our hospital from 2013 to 2015 and were divided into papillary thyroid carcinoma group($n=36$), follicular thyroid adenoma group($n=30$), nodular goiter group($n=31$) and normal thyroid tissue group($n=21$) according to the pathological results. The expression of PCDH8 gene in each group was detected by fluorescence quantitative polymerase chain reaction assay(FQ-PCR). The relationship between the PCDH8 gene expression and the clinicopathological feature in the patients with thyroid papillary carcinoma was analyzed. **Results** The results of FQ-PCR showed that the negative expression rate of PCDH8 gene in the normal thyroid group(28.57%) was lower than that in the papillary thyroid cancer group(63.89%) and the thyroid follicle group(60.00%) ($P<0.05$), but there was no significant difference in the negative expression rate between the normal thyroid group and the nodular goiter group(54.84%) ($P>0.05$). The transcriptional expression of PCDH8 gene was significantly correlated with the size of the tumors ($P<0.05$). **Conclusion** The expression of PCDH8 gene in papillary thyroid cancer is down-regulated, which is associated with the size of the tumor. PCDH8 gene may be a potential biomarker for the diagnosis and treatment of papillary thyroid carcinoma.

[Key words] Thyroid carcinoma; Protocadherin 8(PCDH8) gene; Transcriptional regulation

甲状腺癌是临床上内分泌系统中最常见的恶性肿瘤之一,近年来其发病率在全球范围内迅速攀升^[1]。甲状腺癌中最常见的亚型是甲状腺乳头状癌,经治疗后其预后相对良好,但临床中发现部分有较强浸润性,具有早期淋巴结转移、远处转移及易复发的特点^[2]。因此,进一步探讨甲状腺乳头状癌的发生机制,寻找特异性肿瘤标志物,应用于甲状腺乳头状癌的早期诊断、基因靶向治疗和判断预后成为近年来研究的热点之一。甲状腺癌相关的肿瘤标志物有34 β E12、TPO、CK19等,部分已应用于术后免疫组化检测,但仍具有一定局限性^[3]。而越来越多的研究发现,基因突变和表观遗传学改变参与到甲状腺癌的发生、发展过程中^[4]。原钙黏蛋白8(protocadherin 8, PCDH8)是黏附素蛋白家族中最大的亚家族——原钙黏附素的家族成员之一,其功能涉及细胞增殖、黏附、分化和迁移等多方面^[5]。目前PCDH8已被证实是一个候选的抑癌基因,其突变和表观遗传学导致的基因失活与不同类型恶性肿瘤发生和发展密切相关^[6-15]。国内学者以及我们的前期研究^[16,17]均发现某些胰腺癌细胞株PCDH8基因发生甲基化及mRNA转录水平下调或消失。而关于PCDH8基因的转录表达情况在甲状腺癌的研究仍鲜见报道,因此我们对甲状腺乳头状癌、甲状腺滤泡状腺瘤、结节

性甲状腺肿及正常甲状腺组织的PCDH8基因转录表达情况进行检测,了解其与甲状腺癌的临床病理特征关系。

1 材料与方法

1.1 标本组织来源 收集我院2013~2015年甲状腺组织手术切除标本118例,其中36例甲状腺乳头状癌组织、30例甲状腺滤泡状腺瘤组织、31例结节性甲状腺肿组织和21例正常甲状腺组织。所有标本均经病理检查诊断,切除前均未行放化疗。

1.2 实验试剂 RNA提取试剂盒Rneasy FFPE Kit(QIAGEN,德国),RNA逆转录试剂盒RevertAid First Stand cDNA Synthesis Kit(Thermo,美国),自配引物体系定量采用Premix Ex Taq(Probe qPCR)(TAKARA,日本),所有引物采用Primer5软件设计,由上海英潍捷基公司合成并进行预实验验证。

1.3 荧光定量PCR 按照Rneasy FFPE Kit说明书提取标本RNA。配制逆转录合成cDNA反应体系:总RNA 10 μ L(1.5 μ g),5xReaction Buffer 4 μ L,RiboLockRnase Inhibitor 1 μ L,10 mM dNTP Mix 2 μ L,RevertAid M-MuLV Reverse Transcriptase 1 μ L,Random primer 1 μ L,Oligo(dT)18 1 μ L,体系总量20 μ L。设置条件:25 $^{\circ}$ C,5 min;42 $^{\circ}$ C,60 min;70 $^{\circ}$ C,5 min;反应生成cDNA。PCR扩增反应,目标基因PCDH8引

物: F: 5'-GAAGTTCAGCGGCAAAGACAG-3', R: 5'-GCACGCCACAGTCCACTCT-3', 探针: FAM-ACGACAGCGATTCCGACA-MGB; 内参基因 GAPDH 引物 F: 5'-CCAAGGAGTAAGACCCCTGG-3', R: 5'-AGGGGAGATTCACTGTGGTG-3', 探针: FAM-GAGACCCTCAC-TGCT-MGB; 配制 PCR 反应体系, Premix Ex Taq (2X) 10 μ L, Primer Forward 0.4 μ L, Primer Reverse 0.4 μ L, MGB-FAM Probe 0.2 μ L, cDNA 2 μ L, Q-Solution 4 μ L, ddH₂O 3 μ L, 总共 20 μ L。按以下条件 PCR 扩增: 95 $^{\circ}$ C, 2 min; 95 $^{\circ}$ C, 25 s; 62 $^{\circ}$ C, 30 s; 72 $^{\circ}$ C, 30 s; 45 个循环; 37 $^{\circ}$ C 1 s。结束后, 分析仪读取 Ct 值, 统计定量结果。检测反应设置 PCDH8 孔, PCDH8 复孔, 以 GAPDH 孔, 阴性质控孔, GAPDH 作为内参 (Ct \leq 36), PCDH8 表达量 Ct 值为两复孔的平均值。

1.4 统计学方法 应用 SPSS21.0 统计软件进行数据分析, 计数资料以百分率 (%) 表示, 组间比较采用 χ^2 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

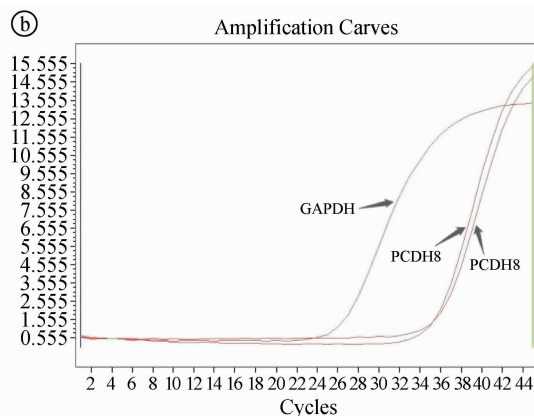
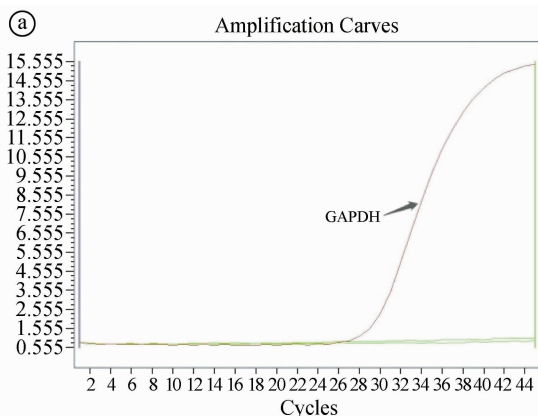
2.1 甲状腺癌 PCDH8 基因转录调控失活频率 荧光定量 PCR 检测结果显示, 正常甲状腺组织组中

PCDH8 基因水平大部分能检测出, 仅 6 例呈阴性, 阴性率为 28.57%; PCDH8 基因表达缺失率在甲状腺乳头状癌、甲状腺滤泡状腺瘤及结节性甲状腺肿较高, 分别为 63.89% (23 例)、60.00% (18 例) 和 54.84% (17 例)。正常甲状腺组织组与甲状腺乳头状癌组、甲状腺滤泡状腺瘤组 PCDH8 阴性率比较差异有统计学意义 (P < 0.05); 而正常甲状腺组织组 PCDH8 阴性率与结节性甲状腺肿组比较差异无统计学意义 (P > 0.05)。见表 1、图 1。

表 1 不同甲状腺病变组与正常甲状腺组织组 PCDH8 基因 mRNA 表达阴性率比较 [n(%)]

组别	例数	阴性
甲状腺乳头状癌组	36	23 (63.89) *
甲状腺滤泡状腺瘤组	30	18 (60.00) #
结节性甲状腺肿组	31	17 (54.84) Δ
正常甲状腺组织组	21	6 (28.57)
χ^2	-	7.330
P	-	0.062

注: PCDH8 基因 mRNA 表达 Ct 值 \geq 45 为阴性; 与正常甲状腺组织组比较: * $\chi^2 = 6.619, P = 0.010$; # $\chi^2 = 4.897, P = 0.027$; $\Delta \chi^2 = 3.502, P = 0.061$



①PCDH8 基因 mRNA 表达阴性; ②PCDH8 基因 mRNA 表达阳性

图 1 PCDH8 基因 mRNA 荧光定量 PCR 检测图谱

2.2 甲状腺乳头状癌 PCDH8 基因 mRNA 转录调控与临床病理特征关联性 以 PCDH8 的表达情况分为阳性组与阴性组。两组在性别、年龄、血清促甲状腺激素 (TSH) 水平、血清抗甲状腺球蛋白抗体 (TGAb)

水平、淋巴结转移和肿瘤发生部位方面比较差异无统计学意义 (P > 0.05)。阳性组在“肿瘤大小 \geq 2 cm”分类中的比例大于阴性组, 差异有统计学意义 (P < 0.05)。见表 2。

表 2 甲状腺乳头状癌 PCDH8 基因 mRNA 转录调控与临床病理特征关联性 (n)

组别	例数	性别		年龄 (岁)		TSH (μ IU/ml)		TGAb (U/ml)		淋巴结转移		肿瘤发生部位		肿瘤大小 (cm)	
		男	女	\geq 45	<45	<5.0	\geq 5.0	\geq 60	<60	有	无	单侧甲状腺	双侧甲状腺	\geq 2	<2
阴性组	23	5	18	13	10	16	7	17	6	10	13	17	6	9	14
阳性组	13	3	10	3	10	8	5	9	4	3	10	11	2	10	3
χ^2	-	0.009		3.763		0.241		0.091		1.498		0.550		4.760	
P	-	0.926		0.052		0.624		0.763		0.291		0.458		0.029	

3 讨论

3.1 恶性肿瘤的发生、发展与基因分子致病机制密切相关,而抑癌基因的失活是其中重要的发生机制之一。基因的表达下降或消失引起的转录调控异常是导致抑癌基因失活的常见分子事件。因此,研究抑癌基因的转录表达对恶性肿瘤的临床诊断、基因靶向治疗和预后监测有着重要的意义。PCDH8 是黏附素蛋白家族中最大的亚家族——原钙黏附素的家族成员,位于人类染色体 13q14.3 上,被证实是一个候选抑癌基因,并发现在不同的恶性肿瘤中存在发生突变或表观遗传学改变而失活的情况^[5~8,11~15,18]。许多研究发现 PCDH8 基因在恶性肿瘤都是发生转录表达的下调或消失,包括我们先前在胰腺癌的体外研究^[6,7,9,10,14~17]。但也有报道^[19]指出在某些高转移的胰腺癌细胞株,PCDH8 基因的表达是上调的,这可能与胰腺微环境早期的改变相关。

3.2 本研究采用荧光定量 PCR 分别检测甲状腺乳头状癌、甲状腺滤泡状腺瘤、结节性甲状腺肿及正常甲状腺组织中 PCDH8 基因的转录表达情况。结果发现甲状腺乳头状癌的 mRNA 表达丢失更为常见,基因转录水平阴性率为 63.89%;而 PCDH8 基因 mRNA 转录水平在大部分的正常甲状腺组织中表达,基因转录水平阴性率仅为 28.57%。本研究结果与其他关于 PCDH8 基因在乳腺癌、胰腺癌、肾癌、胃癌、膀胱癌及前列腺癌等疾病的研究报道^[6,7,10,11,14,16,17]相似。这表明 PCDH8 基因的转录调控异常可能在甲状腺乳头状癌的发生、发展中有重要的作用。另外,PCDH8 基因的失活与肿瘤的甲胎蛋白水平、预后、肿瘤大小、组织分型、转移、复发、临床分期等临床病理特征具有相关性的研究报道也有不少^[13~15,18]。本研究发现,PCDH8 基因的 mRNA 转录水平消失与甲状腺乳头状癌的肿瘤大小具有关联。

综上所述,PCDH8 基因在甲状腺乳头状癌 mRNA 表达消失,转录失活,这可能与甲状腺乳头状癌的发生、发展有关。PCDH8 基因转录调控失活与甲状腺乳头状癌的肿瘤大小具有关联性,提示其具有成为生物学肿瘤标志物的潜在价值。

参考文献

- O'Grady TJ, Gates MA, Boscoe FP. Thyroid cancer incidence attributable to overdiagnosis in the United States 1981 - 2011 [J]. *Int J Cancer*, 2015, 137(11): 2664 - 2673.
- Cho BY, Choi HS, Park YJ, et al. Changes in the clinicopathological characteristics and outcomes of thyroid cancer in Korea over the past four decades [J]. *Thyroid*, 2013, 23(7): 797 - 804.

- 周祥祯,莫祥兰,黄振录,等. 高分子量角蛋白、CK19 和 TPO 在甲状腺乳头状癌和良性病变中的表达及意义 [J]. *中国临床新医学*, 2010, 3(1): 9 - 12.
- Vu-Phan D, Koenig RJ. Genetics and epigenetics of sporadic thyroid cancer [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2014, 386(1 - 2): 55 - 66.
- Etzrodt J, Krishna-K K, Redies C. Expression of classic cadherins and delta-protocadherins in the developing ferret retina [J]. *BMC Neurosci*, 2009, 10: 153.
- Yu JS, Koujak S, Nagase S, et al. PCDH8, the human homolog of PAPC, is a candidate tumor suppressor of breast cancer [J]. *Oncogene*, 2008, 27(34): 4657 - 4665.
- Morris MR, Ricketts CJ, Gentle D, et al. Genome-wide methylation analysis identifies epigenetically inactivated candidate tumour suppressor genes in renal cell carcinoma [J]. *Oncogene*, 2010, 30(12): 1390 - 1401.
- He D, Zeng Q, Ren Q, et al. Protocadherin8 is a functional tumor suppressor frequently inactivated by promoter methylation in nasopharyngeal carcinoma [J]. *Eur J Cancer Prev*, 2012, 21(6): 569 - 575.
- Zhang D, Zhao W, Liao X, et al. Frequent silencing of protocadherin 8 by promoter methylation, a candidate tumor suppressor for human gastric cancer [J]. *Oncol Rep*, 2012, 28(5): 1785 - 1791.
- Lin YL, Ma JH, Luo XL, et al. Clinical significance of protocadherin-8 (PCDH8) promoter methylation in bladder cancer [J]. *J Int Med Res*, 2013, 41(1): 48 - 54.
- Lin YL, Wang YL, Fu XL, et al. Aberrant methylation of PCDH8 is a potential prognostic biomarker for patients with clear cell renal cell carcinoma [J]. *Med Sci Monit*, 2014, 20: 2380 - 2385.
- Niu WB, Gui SL, Lin YL, et al. Promoter methylation of protocadherin-8 is an independent prognostic factor for biochemical recurrence of early-stage prostate cancer [J]. *Med Sci Monit*, 2014, 20: 2584 - 2589.
- Zhang C, Peng Y, Yang F, et al. PCDH8 is Frequently Inactivated by Promoter Hypermethylation in Liver Cancer: Diagnostic and Clinical Significance [J]. *J Cancer*, 2016, 7(4): 446 - 452.
- Zhang P, Wang H, Wang J, et al. Association between protocadherin 8 promoter hypermethylation and the pathological status of prostate cancer [J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(2): 1657 - 1664.
- Cao Y, Yan Y, Chen X, et al. Low Expression of Protocadherin-8 Promotes the Progression of Ovarian Cancer [J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2018, 28(2): 346 - 354.
- 吕顺莉,高军,杜奔奇,等. 胰腺癌细胞株原钙黏附蛋白 8 基因的甲基化状态 [J]. *中华胰腺病杂志*, 2010, 10(3): 190 - 192.
- 朱明章,彭和平,刘启才. 5-杂氮脱氧胞嘧啶核苷联合吉西他滨对胰腺癌细胞株原钙黏蛋白 8 基因表达的影响 [J]. *中华肝胆外科杂志*, 2012, 18(7): 543 - 547.
- Strehl S, Glatt K, Liu QM, et al. Characterization of two novel protocadherins (PCDH8 and PCDH9) localized on human chromosome 13 and mouse chromosome 14 [J]. *Genomics*, 1998, 53(1): 81 - 89.
- Nakamura T, Fidler IJ, Coombes KR. Gene expression profile of metastatic human pancreatic cancer cells depends on the organ microenvironment [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(1): 139 - 148.