

HYAL2 基因 DNA 甲基化水平可用于甲状腺良恶性肿瘤的鉴别诊断

殷益飞^{1,2}, 李红¹, 杨春生¹, 张敏敏¹, 黄选东¹, 李梦夏², 杨蓉西², 张正东²

¹徐州医科大学附属淮安医院甲状腺乳腺外科, 江苏 淮安 223001; ²南京医科大学公共卫生学院, 江苏 南京 211166

摘要:目的 通过比较甲状腺良恶性肿瘤组织样本中 *HYAL2* 基因 CpG 位点甲基化水平的差异, 评估其作为甲状腺癌鉴别诊断分子标志物的潜在价值。方法 采用飞行时间质谱检测 190 对甲状腺乳头状癌(PTC)病例和年龄、性别配对的甲状腺腺瘤中 *HYAL2* 基因启动子区域 CpG 位点的甲基化水平。采用免疫组化检测另外 55 对匹配的甲状腺良恶性肿瘤患者的 *HYAL2* 蛋白表达水平。Logistic 回归分析用于评估甲基化水平每降低 10% 与早期 PTC 之间的关联并计算比值比(OR)。受试者工作特征曲线及曲线下面积(AUC)用于评估 *HYAL2* 基因特定 CpG 位点甲基化水平改变作为分子标志物的效能。结果 *HYAL2*_CpG_3 位点低甲基化与早期 PTC 显著相关(OR=1.51, $P=0.001$), 且该关联在 I 期 PTC 中依旧显著(OR=1.42, $P=0.007$)。年龄分层分析显示 *HYAL2*_CpG_3 甲基化水平降低与早期 PTC 关联在年龄小于 50 岁的人群中显著高于高年龄组(OR: 1.89 vs 1.37; $P<0.05$), 且低年龄组人群中 AUC 最高, 为 0.787。免疫组化结果显示早期 PTC 中 *HYAL2* 蛋白表达水平显著高于甲状腺良性肿瘤。结论 *HYAL2* 基因启动子区域甲基化水平改变与早期 PTC 的关联, 并为 DNA 甲基化改变作为甲状腺良恶性肿瘤鉴别诊断的标志物提供了新思路。

关键词: *HYAL2* 基因; DNA 甲基化; 甲状腺肿瘤; 鉴别诊断; 分子标志物

Detection of DNA methylation of *HYAL2* gene for differentiating malignant from benign thyroid tumors

YIN Yifei^{1,2}, LI Hong¹, YANG Chunsheng¹, ZHANG Minmin¹, HUANG Xuandong¹, LI Mengxia², YANG Rongxi², ZHANG Zhengdong²

¹Department of Thyroid and Breast Surgery, Affiliated Huai'an Hospital of Xuzhou Medical University, Huai'an 223001, China; ²School of Public Health, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China

Abstract: Objective To assess the value of DNA methylation level of *HYAL2* gene as a molecular marker for differential diagnosis of malignant and benign thyroid tumors. **Methods** DNA methylation of *HYAL2* gene in tissue specimens of 190 patients with papillary thyroid cancer (PTC) and 190 age- and gender-matched patients with benign thyroid tumors was examined by mass spectrometry, and the protein expression of *HYAL2* was detected immunohistochemically for another 55 pairs of patients. Logistic regression analysis was performed to calculate the odds ratio (OR) and evaluate the correlation of per 10% reduction in DNA methylation with PTC. Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis was performed and the area under curve (AUC) was calculated to assess the predictive value of alterations in *HYAL2* methylation. **Results** Hypomethylation of *HYAL2*_CpG_3 was significantly correlated with early-stage PTC (OR=1.51, $P=0.001$), even in stage I cancer (OR=1.42, $P=0.007$). Age-stratified analysis revealed a significantly stronger correlation between increased *HYAL2*_CpG_3 methylation and early-stage PTC in patients below 50 years than in those older than 50 years (OR: 1.89 vs 1.37, $P<0.05$); ROC analysis also showed a larger AUC of 0.787 in younger patients. The results of immunohistochemistry showed that patients with PTC had significantly higher protein expressions of *HYAL2* than patients with benign tumors. **Conclusion** The alterations of DNA methylation level of *HYAL2* gene is significantly correlated with early-stage PTC, suggesting the value of DNA methylation level as a potential biomarker for differentiation of malignant from benign thyroid tumors.

Keywords: *HYAL2* gene; DNA methylation; thyroid tumor; differential diagnosis; molecular marker

近年来甲状腺癌的发病率在全球范围迅速上升,位居内分泌系统恶性肿瘤的首位。其中甲状腺乳头状癌(PTC)是最常见的类型,约占甲状腺癌的80%以上^[1]。目前细针穿刺活检(FNAB)是临床上最常用的甲状腺结节诊断手段,可通过细胞形态学评估结节的良恶性^[2]。由

于甲状腺良恶性肿瘤的细胞学特征经常发生重叠,约有10%~30%的FNAB诊断为不明确的细胞学结果^[3]。因此急需探索新的标志物以提高甲状腺良恶性鉴别的准确性。

DNA甲基化是最常见的表观遗传学改变,它是指在DNA甲基转移酶的作用下,真核生物基因组CpG二核苷酸的胞嘧啶5号碳位共价键结合一个甲基基团,该过程不涉及基因序列的改变^[4]。DNA甲基化水平异常是癌症发生发展的早期事件和伴随事件,其在癌症诊断、治疗和预后方面具有重要价值^[5-6]。

透明质酸酶2(HYAL2)是一种广泛分布于人体组织中的透明质酸酶^[7]。其作用是将高相对分子质量透

收稿日期:2021-08-08

基金项目:国家自然科学基金(81803303)

Supported by National Natural Science Foundation of China (81803303).

作者简介:殷益飞,博士,主治医师,E-mail:lukeyinyifeiyin@163.com

通信作者:张正东,博士,教授,博士生导师,E-mail:drzdzhang@njmu.edu.cn;杨蓉西,博士,教授,博士生导师,E-mail:rongxiyang@njmu.edu.cn

明质酸(HA)降解为相对分子质量为20000的HA片段,并进一步被HYAL1降解为小分子HA片段,后者通过刺激癌症相关炎症、肿瘤血管生成和转移等促进癌症的发生发展^[8-9]。既往研究表明,HYAL2参与了癌症的发生发展^[10]、进展^[11]和预后^[12]等多个过程。此前,我们发现与乳腺良性肿瘤相比,乳腺癌恶性组织中HYAL2基因启动子区域cg27091787位点DNA高甲基化水平显著升高^[13]。然而,目前还没有HYAL2基因DNA甲基化改变与甲状腺癌的关联研究,也没有评估其作为甲状腺良恶性肿瘤鉴别诊断分子标志物价值的文献报道。

因此,本研究分析了190对甲状腺良恶性肿瘤组织中HYAL2基因DNA甲基化水平差异,同时检测了另外55对甲状腺良恶性肿瘤组织中HYAL2蛋白水平。研究结果有利于评估HYAL2基因DNA甲基化改变在甲状腺肿瘤鉴别诊断中的价值。

1 资料和方法

1.1 研究对象

本研究中所有福尔马林固定石蜡包埋(FFPE)的甲状腺组织均来自于徐州医科大学附属淮安医院病理科。甲状腺癌分期以2017年美国癌症联合会甲状腺癌分期系统(第八版)为依据。甲状腺癌纳入标准为:具有乳头状结构和典型核特征的早期(病理分期I~II期)甲状腺乳头状癌病例;尚未进行手术或相关治疗;无其他癌症或转移癌。排除标准为:滤泡变异型甲状腺乳头状癌(FVPTC);具有乳头状核特征的非侵袭性甲状腺滤泡型肿瘤(NIFTP)。良性肿瘤入组标准为与恶性肿瘤年龄、性别和住院年份匹配的甲状腺腺瘤。所有样本诊断均由两位有经验的病理科医师确认,且有完整的临床数据记录。最终,本研究选取于2019年1月~2020年6月收集的190对甲状腺乳头状癌和甲状腺腺瘤病例检测其HYAL2基因DNA甲基化水平,其中男性40对,女性150对。PTC病例中位(四分位数间距;IQR)年龄为51.00(44.00~57.00)岁;I期病例173人(91.05%),II期病例17人。甲状腺腺瘤病例中位(IQR)年龄为53.00(46.00~60.25)岁。

此外,本研究还收集了同一时期另外55对(34对女性)年龄、性别均衡可比的早期PTC和甲状腺腺瘤患者的FFPE组织切片并检测了HYAL2蛋白表达水平。良性和恶性甲状腺肿瘤病例的中位(IQR)年龄分别为47.00(36.00~52.00)和43.00(31.00~51.00)岁。

本研究得到南京医科大学和徐州医科大学附属淮安医院伦理委员会的批准[南医大伦审(2019)234号]。所有研究对象均签署知情同意书。

1.2 基因组DNA提取与重亚硫酸盐转化

采用FastPure FFPE DNA Isolation Kit试剂盒(诺

维赞)提取石蜡包埋组织切片的DNA。采用EZ-96 DNA Methylation Kit试剂盒(Zymo Research)对1 μg DNA进行重亚硫酸盐转化。

1.3 引物设计及目的片段扩增

基于前期研究,本研究围绕cg27091787位点进行引物设计,得到位于转录起始位点(TSS)1500 bp位置(启动子区域)处长度为220 bp的扩增片段,共包含4个CpG位点。正向引物:aggaagagTGGGGTTTATTTTAAATTTAGTAGGG;反向引物:cagtaatcagactcactatagggaaggctAACACATTATCCTATCACACAAAATA;扩增片段:TGGGGCCCATCCTCAAATCCAGTAGGGTGTGAGAGGATGGGGTCAGGTGGTGGTGCTTTTGGGAGTCAAATACTTGGGGGTCGTTCA GCTGATGGTCCCCAGAGCAGGTGCCAAGAA GGGAACTAGCCTTGGGGGAGGGTCGGGGGA CTTCCAGTAGCTGAGTCCGTTTTTTTCCACTGA GAGCTTCCGCATCCTGTGTGACAGGACAATGTG TT(大写字母表示特定于序列的区域,非特定标记以小写字母表示。引物和CpG位点上均不存在常见单核苷酸多态性)。采用聚合酶链式反应(PCR)扩增目的片段,反应体系包括经重亚硫酸盐处理的基因组DNA 1 μL,PCR CoralLoad缓冲液0.5 μL,DNA聚合酶0.05 μL,甲基化特异性上游引物0.5 μL,甲基化特异性下游引物0.5 μL,无酶水补齐至5 μL。190对样本PCR实验分为两个批次完成(批次1:95例PTC vs 95例甲状腺腺瘤;批次2:95例PTC vs 95例甲状腺腺瘤),每批次中良恶性肿瘤患者的年龄和性别均匹配。

1.4 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF)半定量检测甲基化水平

MALDI-TOF(Agena)用于半定量检测本研究中所有样本的甲基化水平。其操作流程已在前期研究中详述^[14]。在扩增产物中加入虾碱性磷酸盐孵育,再加入T-Cleavage反应体系37 °C孵育3 h,最后用树脂进行去离子化操作。产物离心后将微量上清上样到384SpectroCHIP进行飞行时间质谱分析。通过SpectroACQUIRE v3.3.1.3软件收集数据,并在MassArray EpiTyper v1.2软件上实现可视化。

1.5 甲状腺肿瘤组织免疫组化及其评估

将FFPE切片脱蜡并固定在硅烷涂层的载玻片上。将其与多克隆兔抗HYAL2抗体在4 °C摇床上缓慢摇动孵育过夜(ab68608)。随后,采用ultraView Universal DAB Detection Kit(Roche)进行检测。

HYAL2蛋白表达由两名合格的病理学家根据染色强度和阳性细胞百分比,使用半定量免疫反应评分进行独立评估^[15]。染色强度的细胞评分为0到3分:0=无,1=弱,2=中等,3=强。阳性细胞的百分比得分如

下:0(0%~10%),1(11%~30%),2(31%~50%),3(51%~70%)和4(71%~100%)。染色强度和阳性细胞百分比之和即为HYAL2表达水平的总分(0-7)。

本研究中所有的PTC病例和良性肿瘤均平行处理。

1.6 统计学方法

SPSS 25.0和GraphPad Prism 8对数据进行统计学分析。多因素校正的logistic回归用于评估HYAL2基因的CpG位点甲基化水平改变与PTC的关联,并计算其比值比(OR)和95%置信区间(CI)。批次效应校正是将批次变量值(1和2)作为名义变量纳入logistic回归分析。工作特征曲线(ROC曲线)用来评估其在甲状腺癌鉴别诊断中的诊断效能。统计检验均为双侧, $P < 0.05$ 被认为是差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HYAL2基因启动子区域DNA甲基化水平改变与甲状腺肿瘤的关联

Logistic回归结果提示,在校正年龄、性别和批次

效应后,HYAL2_CpG_3甲基化水平每降低10%,PTC患病风险增加51%(OR=1.51,95% CI:1.17-1.93, $P=0.001$;表1)。HYAL2_CpG_2甲基化水平降低及HYAL2_CpG_4水平增加也与PTC风险增加有关,但呈现边缘性显著(HYAL2_CpG_2:OR=1.18,95% CI:1.00-1.39, $P=0.054$;HYAL2_CpG_4:OR=0.83,95% CI:0.68-1.02, $P=0.075$;表1)。尚未观察到HYAL2_CpG_1与PTC的关联。

为探讨HYAL2基因特定位点甲基化水平改变与早期PTC的关联,我们进一步排除了17位II期PTC患者后进行logistic回归,并调整了年龄、性别和批次效应。与总人群中结果一致,HYAL2_CpG_3甲基化水平降低与I期PTC风险增加呈现稳健的正相关联(OR=1.42,95% CI:1.10-1.83, $P=0.007$;表2)。HYAL2_CpG_1甲基化水平降低和HYAL2_CpG_4水平增加则与I期PTC风险增加呈现边缘性关联(HYAL2_CpG_2:OR=1.19,95% CI:1.00-1.41, $P=0.050$;HYAL2_CpG_4:OR=0.80,95% CI:0.65-1.00, $P=0.048$;表2)。

表1 HYAL2基因甲基化与PTC的关联分析

Tab.1 Association between methylation of HYAL2 gene and PTC

| CpG sites | Thyroid adenoma (n=190) | Papillary thyroid cancer (n=190) | Odds ratio (95% CI) | P |
|-------------|------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|-------|
| | Median (interquartile range) | Median (interquartile range) | Per 10% reduction of methylation | |
| HYAL2_CpG_1 | 0.49 (0.44-0.53) | 0.49 (0.43-0.52) | 1.16(0.96-1.40) | 0.127 |
| HYAL2_CpG_2 | 0.52 (0.46-0.61) | 0.51 (0.45-0.59) | 1.18 (1.00-1.39) | 0.054 |
| HYAL2_CpG_3 | 0.65 (0.61-0.68) | 0.63 (0.58-0.65) | 1.51 (1.17-1.93) | 0.001 |
| HYAL2_CpG_4 | 0.73 (0.67-0.77) | 0.74 (0.70-0.78) | 0.83 (0.68-1.02) | 0.075 |

表2 HYAL2基因甲基化与I期PTC的关联分析

Tab.2 Association between methylation of HYAL2 gene and stage I PTC

| CpG sites | Thyroid adenoma (n=190) | Papillary thyroid cancer (n=173) | Odds ratio (95% CI) | P |
|-------------|------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|-------|
| | Median (interquartile range) | Median (interquartile range) | Per 10% reduction of methylation | |
| HYAL2_CpG_1 | 0.49 (0.44-0.53) | 0.49 (0.44-0.53) | 1.13 (0.93-1.37) | 0.214 |
| HYAL2_CpG_2 | 0.52 (0.46-0.61) | 0.50 (0.45-0.59) | 1.19 (1.00-1.41) | 0.050 |
| HYAL2_CpG_3 | 0.65 (0.61-0.68) | 0.63 (0.59-0.65) | 1.42 (1.10-1.83) | 0.007 |
| HYAL2_CpG_4 | 0.73 (0.67-0.77) | 0.75 (0.70-0.78) | 0.80 (0.65-1.00) | 0.048 |

2.2 年龄分层分析中HYAL2基因甲基化水平改变与甲状腺肿瘤的关联

为了消除年龄的混杂效应,我们以50岁为临界点对研究人群进行分组。在任一年龄组中,均观察到HYAL2_CpG_3甲基化水平降低的对象,其PTC风险升高。且HYAL2_CpG_3甲基化水平每降低10%,低年龄组对象的PTC风险显著高于高年龄组对象(<50岁:OR=

1.89,95% CI:1.20-2.98, $P=0.006$;≥50岁:OR=1.37,95% CI:1.02-1.84, $P=0.035$;表3)。此外,仅在年龄<50岁人群中良恶性甲状腺肿瘤组织中观察到HYAL2_CpG_4甲基化水平差异(OR=0.47,95% CI:0.30-0.75, $P=0.035$;表3)。尚未观察到其他位点甲基化水平改变与PTC事件的关联。

表3 年龄分层分析中 *HYAL2* 基因甲基化与 PTC 的关联

Tab.3 Age-stratified analysis of the association between methylation of *HYAL2* gene and PTC

| CpG sites | Thyroid adenoma | Papillary thyroid cancer | Odds ratio (95% CI) | P |
|---------------------|------------------------------|------------------------------|----------------------------------|-------|
| | Median (Interquartile range) | Median (Interquartile range) | Per 10% reduction of methylation | |
| Age<50 years | | | | |
| <i>HYAL2</i> _CpG_1 | 0.48 (0.43-0.53) | 0.49 (0.43-0.53) | 1.18 (0.89-1.56) | 0.258 |
| <i>HYAL2</i> _CpG_2 | 0.51 (0.45-0.63) | 0.50 (0.43-0.58) | 1.21 (0.92-1.58) | 0.171 |
| <i>HYAL2</i> _CpG_3 | 0.64 (0.61-0.66) | 0.63 (0.56-0.65) | 1.89 (1.20-2.98) | 0.006 |
| <i>HYAL2</i> _CpG_4 | 0.70 (0.65-0.76) | 0.75 (0.71-0.78) | 0.47 (0.30-0.75) | 0.002 |
| Age≥50 years | | | | |
| <i>HYAL2</i> _CpG_1 | 0.50 (0.44-0.54) | 0.49 (0.44-0.52) | 1.13 (0.87-1.47) | 0.347 |
| <i>HYAL2</i> _CpG_2 | 0.52 (0.46-0.60) | 0.52 (0.45-0.60) | 1.15 (0.93-1.43) | 0.207 |
| <i>HYAL2</i> _CpG_3 | 0.66 (0.62-0.69) | 0.63 (0.59-0.66) | 1.37 (1.02-1.84) | 0.035 |
| <i>HYAL2</i> _CpG_4 | 0.74 (0.69-0.78) | 0.74 (0.67-0.77) | 1.01 (0.80-1.27) | 0.951 |

2.3 *HYAL2* 基因甲基化改变作为甲状腺良恶性肿瘤鉴别诊断标志物的价值

校正年龄、性别、批次效应后,总人群中曲线下面积(AUC)为 0.671 (95% CI: 0.617-0.725, $P=9.518E-09$; 图 1A), 对应的灵敏度、特异度、阳性预测值(PPV)和阴性预测值(NPV)分别为 74.07%, 52.94%, 61.40% 和 66.90% (表 4)。排除 II 期 PTC 病例后, AUC 为 0.666 (95% CI: 0.611-0.722, $P=4.897E-08$; 图 1B), 对应的灵

敏度、特异度、PPV 和 NPV 分别为 50.29%, 74.87%, 64.90% 和 61.90% (表 4)。按照年龄分组后, 在年龄小于 50 岁的对象中, AUC 为 0.787 (95% CI: 0.712-0.862, $P=3.071E-09$; 图 1C), 灵敏度为 92.50%, 特异度为 52.31%, PPV 为 70.5%, NPV 为 85.0% (表 4)。然而, 在年龄 ≥ 50 岁的病例中, AUC 为显著降低, 为 0.614 (95% CI: 0.542-0.687, $P=0.003$; 图 1D), 灵敏度为 59.63%, 特异度为 60.66%, PPV 为 57.5%, NPV 为 62.7% (表 4)。

表4 *HYAL2* 基因甲基化鉴别甲状腺良恶性肿瘤的效能

Tab.4 Discriminatory power of *HYAL2* methylation to distinguish PTC from benign tumors

| Group | Area under the curve | Sensitivity | Specificity | Positive predictive value | Negative predictive value |
|------------------|----------------------|-------------|-------------|---------------------------|---------------------------|
| Total population | 0.671 | 74.07% | 52.94% | 61.4% | 66.9% |
| PTC of stage I | 0.666 | 50.29% | 74.87% | 64.9% | 61.9% |
| Age<50 years | 0.787 | 92.50% | 52.31% | 70.5% | 85.0% |
| Age≥50 years | 0.614 | 59.63% | 60.66% | 57.5% | 62.7% |

2.4 甲状腺良恶性肿瘤中 *HYAL2* 蛋白表达水平评估

在另一组 55 对年龄、性别匹配的甲状腺良恶性肿瘤人群中, 我们评估了其 *HYAL2* 蛋白的表达水平。免疫组化结果显示甲状腺腺瘤组织 (图 2A、B) 和早期 PTC (图 2C、D) 组织切片的染色强度和阳性细胞百分比呈现显著差异。经 Mann-Whitney *U* 检验分析, PTC 组织化学评分显著高于良性肿瘤组织 ($P=7.30E-05$; 图 2E)。

腺癌的相关研究十分有限^[20]。既往研究发现外周血 *HYAL2* 基因甲基化水平降低是早期头颈部肿瘤, 早期乳腺癌及早期胰腺癌的潜在分子标志物^[21-23]。此外, *HYAL2* 基因甲基化水平改变还与三阴性乳腺癌和结肠癌的预后相关^[24-25]。因此, 本研究基于 190 对年龄性别匹配的甲状腺良恶性肿瘤样本分析了 *HYAL2* 基因特定 CpG 位点甲基化水平的差异。本研究结果表明, *HYAL2* 基因甲基化水平降低与早期 PTC 之间存在显著关联, 且在 I 期 PTC 中, 该关联依旧稳健。类似地, 我们前期研究发现乳腺恶性肿瘤中 *HYAL2* 基因甲基化水平高于乳腺良性肿瘤。此外, 体外研究显示与非致癌乳腺细胞相比, 乳腺癌细胞呈现较高的 *HYAL2* 表达水平, 且经去甲基化试剂处理后, 其表达水平进一步增加^[26]。

3 讨论

DNA 甲基化改变因其在肿瘤发生发展中的重要作用受到广泛研究^[16-17]。尽管有研究提示 DNA 甲基化能较好地地区分甲状腺癌和癌旁正常组织、不同亚型甲状腺癌的组织学特征^[18-19], 然而目前关于 DNA 甲基化和甲状

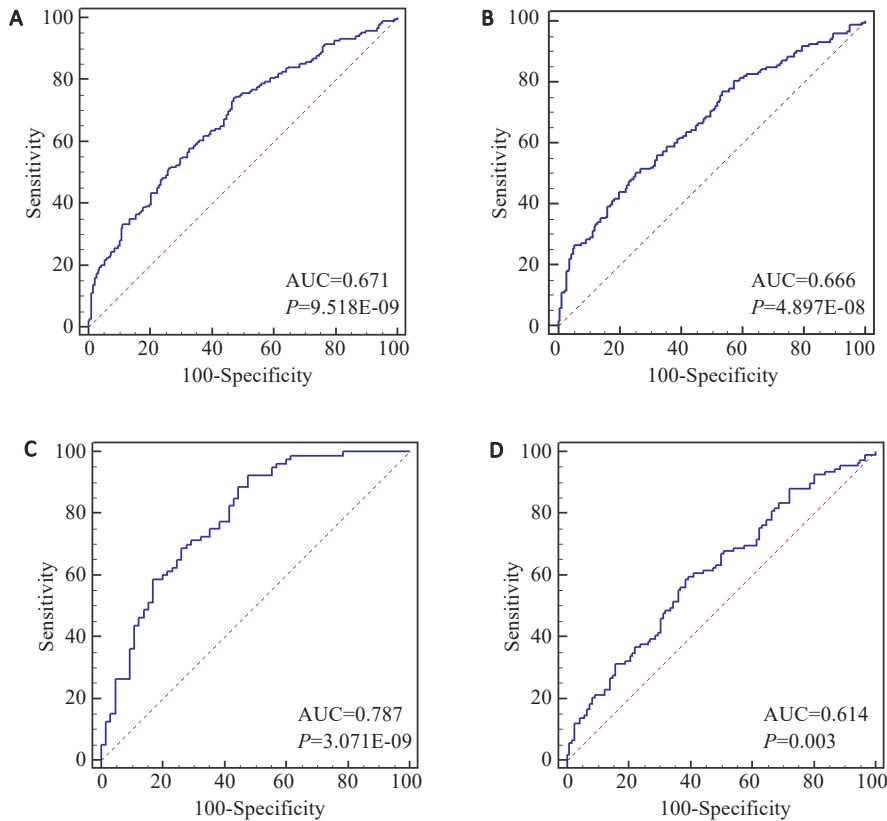


图1 *HYAL2* 基因甲基化鉴别PTC和甲状腺良性肿瘤的ROC曲线

Fig.1 ROC curve of *HYAL2* methylation to distinguish PTC from benign thyroid tumors. A: All PTC vs thyroid adenoma; B: Stage I PTC vs thyroid adenoma; C: PTC vs thyroid adenoma, age<50 years old; D: PTC vs thyroid adenoma, age≥50 years old.

研究表明DNA甲基化谱与年龄密切相关^[27]。甲状腺癌发病率自15岁开始升高,在50~54岁达到最大值,此外,2019年中国甲状腺癌疾病负担数据显示,50~54岁甲状腺癌患者占比最高^[28]。为了消除年龄的混杂效应,我们以50岁为临界点对研究人群进行分组。尽管本研究中年龄分层分析表明低年龄组和高年龄组中均观察到*HYAL2*基因甲基化改变与PTC的关联,但该关联在低年龄人群中显著强于高年龄组。ROC曲线下面积也支持*HYAL2*基因甲基化改变在低年龄组人群中具有更高的预测价值。本研究中,与≥50岁的人群相比,<50岁的低年龄人群的*HYAL2*基因低甲基化和甲状腺癌具有更强的关联。相应的研究表明,随着生活环境的改变,PTC疾病负担呈现年轻化趋势,尤其是在30~49岁女性人群中^[29]。此外,本研究中女性和男性患者人数为3.75:1。雌激素是甲状腺癌的重要危险因素之一^[30]。中国女性绝经的平均年龄是49岁^[31],即我们低年龄组(<50岁)的女性大多数尚未绝经。因此我们推测低年龄组患者PTC风险升高还受雌激素水平的影响。此外,随着年龄增加,促进甲状腺癌的危险因素不断堆积,弱化了*HYAL2*基因DNA甲基化改变与早期甲状腺

癌的关联^[32-33]。然而,由于本研究对象来自医院,缺乏相关的生活习惯等信息,且亚组中样本量有限,因此建立信息完整的前瞻性队列研究更能反映归因于*HYAL2*基因DNA甲基化改变的PTC风险。尽管年龄对于*HYAL2*基因DNA甲基化异常和PTC关联的影响尚未完全阐明,但这提示我们在研究DNA甲基化水平与PTC风险时,应校正年龄的影响。

此外,我们通过检测另外55对年龄、性别匹配的早期PTC和甲状腺腺瘤患者FFPE组织中*HYAL2*的蛋白表达水平,发现早期PTC病例中的*HYAL2*表达水平显著高于良性肿瘤。不同的是,*HYAL2*基因位于染色体3p21.3区域,该区域基因缺失常常导致癌症的发生^[34]。然而,有研究报道*HYAL2*是一种功能拮抗性基因^[35]。类比如于同样位于此区域的同家族基因*HYAL1*,*HYAL2*的促癌或抗癌作用也可能受其浓度及癌症种类影响,但尚无相关研究^[36-37]。此外,*HYAL2*还可能通过影响CD44前体可变剪接而发挥促纤维化或抗纤维化作用^[38]。因此,*HYAL2*表达与癌症的关联仍值得进一步探索。值得说明的是本研究中目的序列位于TSS1500区域(启动子区域),该区域DNA甲基化水平负向调控基因表

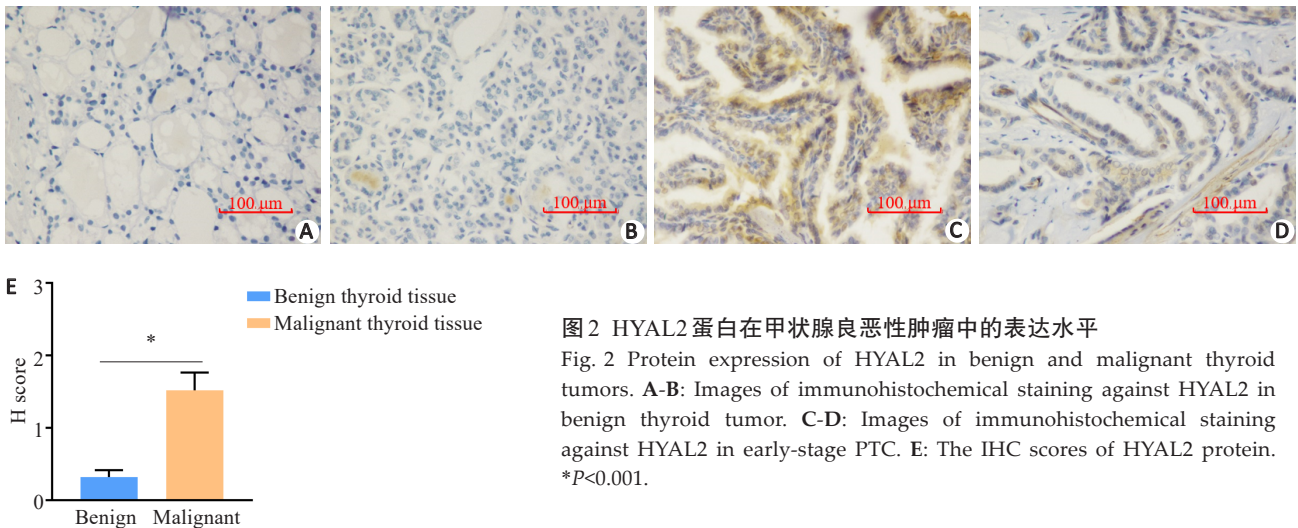


图2 HYAL2 蛋白在甲状腺良恶性肿瘤中的表达水平

Fig. 2 Protein expression of HYAL2 in benign and malignant thyroid tumors. A-B: Images of immunohistochemical staining against HYAL2 in benign thyroid tumor. C-D: Images of immunohistochemical staining against HYAL2 in early-stage PTC. E: The IHC scores of HYAL2 protein. *P<0.001.

达^[39]。我们推测 *HYAL2* 基因可能通过上调启动子区域特定位点甲基化水平而促进其蛋白表达,进而促进癌症的发生。因此,后续的功能实验将有利于阐明 *HYAL2* 基因 DNA 甲基化改变调控 PTC 发生的可能机制。

本研究是首个探讨 *HYAL2* 基因 DNA 甲基化水平改变与甲状腺良恶性肿瘤关联的研究。不同于多数基于癌症和癌旁组织的鉴别诊断,本研究聚焦于甲状腺良恶性肿瘤的鉴别,具有较高的临床应用价值。在 DNA 甲基化水平分析的基础上,我们还进一步补充下游蛋白质的表达水平。此外,基于质谱的 DNA 甲基化水平检测手段具有高分辨率、高灵敏度和高重复性等特点,增强了本研究结果的可靠性^[40]。另外,本研究中仍然存在一些局限性,首先本研究为单一中心来源的病例对照研究,仍需要多中心研究的数据进行验证。由于 FFPE 组织量不足, DNA 甲基化和蛋白质表达数据来自不同人群,是本研究另一主要不足之处,在一定程度上削弱了 DNA 甲基化改变与 PTC 关联的可解释性。

综上所述,我们的研究揭示了 *HYAL2* 基因启动子区域 DNA 甲基化水平改变与早期 PTC 之间存在显著关联,尤其是在年龄低于 50 岁的人群中。本研究支持了 DNA 甲基化改变在甲状腺良恶性肿瘤鉴别诊断中的价值,但仍需要大样本的前瞻性队列研究和功能试验进行验证。

参考文献:

[1] Huang FY, Wang LH, Jia HY. Research trends for papillary thyroid carcinoma from 2010 to 2019: a systematic review and bibliometrics analysis[J]. *Medicine*, 2021, 100(21): e26100.
 [2] Feldkamp J, Führer D, Luster M, et al. Fine needle aspiration in the investigation of thyroid nodules[J]. *Dtsch Arztebl Int*, 2016, 113(20): 353-9.
 [3] Cibas ES, Ali SZ. The 2017 Bethesda system for reporting thyroid cytopathology[J]. *Thyroid*, 2017, 27(11): 1341-6.

[4] Schmitz RJ, Lewis ZA, Goll MG. DNA methylation: shared and divergent features across eukaryotes[J]. *Trends Genet*, 2019, 35(11): 818-27.
 [5] Leal A, Sidransky D, Brait M. Tissue and cell-free DNA-based epigenomic approaches for cancer detection[J]. *Clin Chem*, 2020, 66(1): 105-16.
 [6] Ortiz-Barahona V, Joshi RS, Esteller M. Use of DNA methylation profiling in translational oncology[J]. *Semin Cancer Biol*, 2020: S1044-579X(20)30271-6.
 [7] Csoka AB, Frost GI, Stern R. The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes[J]. *Matrix Biol*, 2001, 20(8): 499-508.
 [8] Kobayashi T, Chanmee T, Itano N. Hyaluronan: metabolism and function[J]. *Biomolecules*, 2020, 10(11): 1525.
 [9] Kaul A, Short WD, Wang XY, et al. Hyaluronidases in human diseases[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(6): 3204.
 [10] Chen Y, Lu CY, Cheng TY, et al. WW domain-containing proteins YAP and TAZ in the hippo pathway as key regulators in stemness maintenance, tissue homeostasis, and tumorigenesis[J]. *Front Oncol*, 2019, 9: 60.
 [11] van der Heijden AG, Mengual L, Lozano JJ, et al. A five-gene expression signature to predict progression in T1G3 bladder cancer [J]. *Eur J Cancer*, 2016, 64: 127-36.
 [12] Xiao YC, Cui G, Ren XG, et al. A novel four-gene signature associated with immune checkpoint for predicting prognosis in lower-grade glioma[J]. *Front Oncol*, 2020, 10: 605737.
 [13] Yang RX, Pfützte K, Zucknick M, et al. DNA methylation array analyses identified breast cancer-associated *HYAL2* methylation in peripheral blood[J]. *Int J Cancer*, 2015, 136(8): 1845-55.
 [14] Yang RX, Stöcker S, Schott S, et al. The association between breast cancer and *S100P* methylation in peripheral blood by multicenter case-control studies[J]. *Carcinogenesis*, 2017, 38(3): 312-20.
 [15] Ralhan R, Veyhl J, Chaker S, et al. Immunohistochemical subcellular localization of protein biomarkers distinguishes benign from malignant thyroid nodules: potential for fine-needle aspiration biopsy clinical application[J]. *Thyroid*, 2015, 25(11): 1224-34.
 [16] Du LB, Zhao ZX, Zheng RS, et al. Epidemiology of thyroid cancer: incidence and mortality in China, 2015[J]. *Front Oncol*, 2020, 10:

- 1702.
- [17] Cheng F, Xiao J, Shao CC, et al. Burden of thyroid cancer from 1990 to 2019 and projections of incidence and mortality until 2039 in China: findings from global burden of disease study[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2021, 12: 738213.
- [18] Beltrami CM, dos Reis MB, Barros-Filho MC, et al. Integrated data analysis reveals potential drivers and pathways disrupted by DNA methylation in papillary thyroid carcinomas[J]. *Clin Epigenetics*, 2017, 9: 45.
- [19] Bisarro dos Reis M, Barros-Filho MC, Marchi FA, et al. Prognostic classifier based on genome-wide DNA methylation profiling in well-differentiated thyroid tumors[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2017, 102(11): 4089-99.
- [20] Zafon C, Gil J, Pérez-González B, et al. DNA methylation in thyroid cancer[J]. *Endocr Relat Cancer*, 2019, 26(7): R415-R439.
- [21] Langevin SM, Koestler DC, Christensen BC, et al. Peripheral blood DNA methylation profiles are indicative of head and neck squamous cell carcinoma: an epigenome-wide association study[J]. *Epigenetics*, 2012, 7(3): 291-9.
- [22] Guan Z, Yu HX, Cuk K, et al. Whole-blood DNA methylation markers in early detection of breast cancer: a systematic literature review[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2019, 28(3): 496-505.
- [23] Schott S, Yang RX, Stöcker S, et al. HYAL2 methylation in peripheral blood as a potential marker for the detection of pancreatic cancer: a case control study[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(40): 67614-25.
- [24] Maiertaler M, Kriegsmann M, Peng CK, et al. S100P and HYAL2 as prognostic markers for patients with triple-negative breast cancer[J]. *Exp Mol Pathol*, 2015, 99(1): 180-7.
- [25] Pfütze K, Benner A, Hoffmeister M, et al. Methylation status at HYAL2 predicts overall and progression-free survival of colon cancer patients under 5-FU chemotherapy[J]. *Genomics*, 2015, 106(6): 348-54.
- [26] da Costa Prando E, Cavalli LR, Rainho CA. Evidence of epigenetic regulation of the tumor suppressor gene cluster flanking RASSF1 in breast cancer cell lines[J]. *Epigenetics*, 2011, 6(12): 1413-24.
- [27] Stewart R, Leang YJ, Bhatt CR, et al. Quantifying the differences in surgical management of patients with definitive and indeterminate thyroid nodule cytology[J]. *Eur J Surg Oncol*, 2020, 46(2): 252-7.
- [28] Jones MJ, Goodman SJ, Kobor MS. DNA methylation and healthy human aging[J]. *Aging Cell*, 2015, 14(6): 924-32.
- [29] Li MM, Zheng RS, dal Maso L, et al. Mapping overdiagnosis of thyroid cancer in China[J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2021, 9(6): 330-2.
- [30] Liu J, Xu TM, Ma L, et al. Signal pathway of estrogen and estrogen receptor in the development of thyroid cancer[J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 593479.
- [31] Peng K, Yao P, Kartsonaki C, et al. Menopause and risk of hip fracture in middle-aged Chinese women: a 10-year follow-up of China Kadoorie Biobank[J]. *Menopause*, 2020, 27(3): 311-8.
- [32] Mitrou P, Raptis SA, Dimitriadis G. Thyroid disease in older people[J]. *Maturitas*, 2011, 70(1): 5-9.
- [33] Tidwell TR, Søreide K, Hagland HR. Aging, metabolism, and cancer development: from peto's paradox to the Warburg effect[J]. *Aging Dis*, 2017, 8(5): 662-76.
- [34] Hesson LB, Cooper WN, Latif F. Evaluation of the 3p21.3 tumour-suppressor gene cluster[J]. *Oncogene*, 2007, 26(52): 7283-301.
- [35] Stepanenko AA, Vassetzky YS, Kavsan VM. Antagonistic functional duality of cancer genes[J]. *Gene*, 2013, 529(2): 199-207.
- [36] Lokeshwar VB, Cerwinka WH, Isoyama T, et al. HYAL1 hyaluronidase in prostate cancer: a tumor promoter and suppressor[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(17): 7782-9.
- [37] Ness C, Katta K, Garred Ø, et al. Integrated differential DNA methylation and gene expression of formalin-fixed paraffin-embedded uveal melanoma specimens identifies genes associated with early metastasis and poor prognosis[J]. *Exp Eye Res*, 2021, 203: 108426.
- [38] Midgley AC, Oltean S, Hascall V, et al. Nuclear hyaluronidase 2 drives alternative splicing of CD44 pre-mRNA to determine profibrotic or antifibrotic cell phenotype[J]. *Sci Signal*, 2017, 10(506): eaao1822.
- [39] Rivas MP, Aguiar TFM, Maschietto M, et al. Hepatoblastomas exhibit marked NNMT downregulation driven by promoter DNA hypermethylation[J]. *Tumour Biol*, 2020, 42(12): 1010428320977124.
- [40] Ehrlich M, Nelson MR, Stanssens P, et al. Quantitative high-throughput analysis of DNA methylation patterns by base-specific cleavage and mass spectrometry[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(44): 15785-90.

(编辑:吴锦雅)