

# 不同碘营养水平对大鼠 RASSF1A 基因甲基化的影响

汪靓婧<sup>1</sup> 董小婉<sup>2</sup> 吴翌<sup>3</sup> 许敏<sup>1</sup> 王佑民<sup>1</sup>

**摘要** 目的 探究 Ras 相关区域家族 1 A (RASSF1A) 基因甲基化与碘营养状态的关系。方法 将 40 只 SD 大鼠随机均分成低碘组、适碘组、5 倍高碘组、10 倍高碘组、20 倍高碘组, 每组 8 只。分别用 ICP-MS 法测定尿碘水平, 化学发光免疫分析方法测定血清中甲状腺激素水平, BSP 法测定 RASSF1A 基因的甲基化率。结果 不同碘浓度饲养 SD 大鼠 3 个月后: ① 各组大鼠的血清 FT3 值随着碘浓度升高而降低 ( $P < 0.05$ ), 但 FT4、TSH 值在各组间差异无统计学意义; ② 各组间 RASSF1A 基因启动子区域 CpG 岛 1 和 CpG 岛 2 的甲基化率差异无统计学意义。结论 3 个月碘诱导下, 各组间 RASSF1A 基因甲基化率无统计学差异, 碘可能对 RASSF1A 基因甲基化无影响或机体处于代偿期。

**关键词** 碘; 大鼠; 甲状腺; RASSF1A; 甲基化

**中图分类号** R 581.9; R 335.2

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2021)08-1218-04  
**doi:** 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.08.009

碘对维持正常的甲状腺功能起重要作用, 高碘和低碘都会增加甲状腺疾病的发生率。缺碘会造成碘缺乏病, 高碘会造成高碘性甲状腺肿、甲状腺功能亢进和自身免疫性甲状腺炎等疾病。目前, 碘的负效应成为内分泌学界和地方病学界共同关注的问题。Ras 相关区域家族 1 A (ras-association domain family 1A, RASSF1A) 是一个位于人类 3 号染色体短臂(3p21.3)上的抑癌基因。RASSF1A 基因几乎在所有组织中都有表达, 近年来, RASSF1A 基因甲基化在肝癌、肺癌、胃癌、乳腺癌、甲状腺癌等肿瘤疾病中的研究日益增多<sup>[1]</sup>。目前, 有关不同碘营养水平对 RASSF1A 基因甲基化影响尚未见报道。该研究采用动物实验方法, 对不同碘饲养状态的大鼠 RASSF1A 基因甲基化率进行了对比分析, 以探讨

RASSF1A 基因甲基化与碘营养状态的关系。

## 1 材料与方法

**1.1 主要试剂与仪器** 主要试剂: 碘化钾试剂(天津市凯通化学试剂有限公司), 血清游离三碘甲腺原氨酸(free 3,5,3'-L-triiodo-thyronine, FT3)、游离甲状腺激素(free 3,5,3',5'-L-tetraiodo-thyronine, FT4)、促甲状腺激素(thyroid stimulating hormone, TSH)检测试剂盒(德国西门子医学诊断股份有限公司), 基因组甲基化处理试剂(德国 Qiagen 生物公司)、组织基因组提取试剂盒和凝胶回收试剂盒(天根生化科技有限公司)。主要仪器: 纯水仪(杭州中灿科技有限公司), 德国西门子医学诊断有限公司化学免疫分析仪(型号: ADVIA centaur XP), 电泳仪(北京六一仪器公司), PCR 扩增仪(Eppendorf 公司)。

**1.2 动物分组与建模** 选取 40 只 SPF 级雌性 SD 大鼠(日龄 35~40 d, 体质量 150~170 g), 购自安徽医科大学动物实验中心, 合格证号: NO. 340000200001326。40 只大鼠随机均分为 5 组: 低碘(LI)组、正常碘(NI)组、5 倍高碘(5HI)组、10 倍高碘(10HI)组、20 倍高碘(20HI)组。均饲以低碘饲料(含碘量  $< 50 \mu\text{g}/\text{kg}$ )。根据国内学者<sup>[2]</sup>总结的经验, 完善大鼠碘过量及碘缺乏模型构建。LI 组饮用去离子水(含碘量  $0 \mu\text{g}/\text{L}$ ), 余各组饮用加 KI 的去离子水。以大鼠每日进食 20 g, 进水 20 ml 估计每只大鼠每日的总摄碘量, 分别为 LI 组  $< 1.00 \mu\text{g}$ ; NI 组  $6.15 \mu\text{g}$ ; 5HI 组  $30.75 \mu\text{g}$ ; 10HI 组  $61.50 \mu\text{g}$ ; 20HI 组  $123.00 \mu\text{g}$ 。每个月收集 1 次各组大鼠 24 h 尿样, 采用 ICP-MS(电感耦合等离子体质谱法)测定每组的尿碘水平, 评价各组的碘营养状态。饲养 3 个月后处死大鼠, 留取动脉血和甲状腺标本。血标本送至内分泌科实验室, 采用化学发光免疫分析方法测定血清 FT3、FT4、TSH 水平。

**1.3 甲基化率测定** 亚硫酸氢盐处理后测序法进行检测。在 Genbank 内检索出大鼠 RASSF1A 的基因序列(GenBank ID: 363140), 经 MethPrimer 软件检测, 大鼠 RASSF1A 基因启动子区域共有 2 个符合

2020-11-16 接收

基金项目: 公益性行业科研专项基金(编号: 201402005); 安徽医科大学第一附属医院博士课题基金(编号: BSKT2019002)

作者单位: <sup>1</sup> 安徽医科大学第一附属医院内分泌科, 合肥 230022

<sup>2</sup> 安徽医科大学附属阜阳医院风湿科, 阜阳 236000

<sup>3</sup> 中山市人民医院内分泌科, 中山 528400

作者信息: 汪靓婧, 女, 硕士研究生;

王佑民, 男, 博士, 主任医师, 责任作者, E-mail: youminwang@21cn.com

条件的 CpG 岛(见图 1) 分别记为 C1 和 C2。C1 的序列长度为 281 bp, 包含 11 个 CpG 位点, C2 的序列长度为 448 bp, 包含 44 个 CpG 位点。RASSF1A 的引物设计见表 1。PCR 反应体系 30  $\mu$ l, 上下游引物均各为 1  $\mu$ l, 扩增条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min, 94 $^{\circ}$ C、30 s, 55 $^{\circ}$ C、30 s, 72 $^{\circ}$ C、40 s, 40 循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。用 2% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。

表 1 引物信息

引物名称	引物序列(5'-3')	片段长度(bp)
S1-R	AACRTCCAACCTATAAATTCACCCACCTA	281
S1-F	ATTATATTTTTTAGATTTTAGAAATTTGGG	
S2-R	ACRACRCCCAAAATAAATCTCCACAAAAA	448
S2-F	GATTGGGAAGGGTTTTTGAAGGGTTTA	
对照-R	ACTCTCCACTCTCTCTCTCC	247
对照-F	AGGGAGGTGAAGTAGTGCTG	

**1.4 统计学处理** 结果用 SPSS 20.0 进行统计分析, 以  $\bar{x} \pm s$  表示。采用单因素方差分析的方法对各组数据进行比较, 方差齐时使用 LSD 检验, 方差不齐时, 使用 Tamhane's T2 检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 不同碘营养状态与尿碘的关系** Spearman 分析显示, 各组大鼠的平均尿碘与碘摄入量成正相关( $r = +0.598, P = 0.021$ )。但与 NI 组比较, 各高碘组平均尿碘并未达到相应的倍数差, 见表 2。

表 2 各组大鼠尿碘( $n = 8, \bar{x} \pm s$ )

组别	尿碘( $\mu$ g/L)
LI	337.300 $\pm$ 174.701
NI	411.667 $\pm$ 148.042
5HI	496.367 $\pm$ 114.591
10HI	543.933 $\pm$ 39.551
20HI	561.633 $\pm$ 31.682

**2.2 不同碘营养状态与血清甲状腺激素水平的关系** 饲养 3 个月后, FT3 与碘浓度呈负相关( $P <$

0.05)。而 FT4、FT3/FT4、TSH 与碘浓度差异均无统计学意义。但从总的变化趋势上看, 低碘组和高碘组 FT3 均较 NI 组降低, 结果差异有统计学意义。FT4 均较 NI 组升高, 但差异无统计学意义, TSH 各组间未见显著变化趋势, 见表 3。

表 3 大鼠血清甲状腺激素水平变化( $n = 8, \bar{x} \pm s$ )

组别	FT3(pmol/L)	FT4(pmol/L)	FT3/FT4	TSH( $\mu$ IU/ml)
LI	5.221 $\pm$ 0.440	26.384 $\pm$ 7.372	0.212 $\pm$ 0.068	5.286 $\pm$ 1.380
NI	5.903 $\pm$ 0.643	25.880 $\pm$ 5.853	0.237 $\pm$ 0.054	5.125 $\pm$ 1.642
5HI	4.760 $\pm$ 0.535	29.384 $\pm$ 4.704	0.163 $\pm$ 0.015	4.571 $\pm$ 0.976
10HI	5.016 $\pm$ 0.615	29.707 $\pm$ 3.334	0.170 $\pm$ 0.230	5.857 $\pm$ 1.574
20HI	4.908 $\pm$ 0.664	26.637 $\pm$ 7.416	0.208 $\pm$ 0.112	4.386 $\pm$ 0.951
F 值	4.456	0.644	1.711	1.469
P 值	0.006	0.622	0.173	0.236

**2.3 不同碘营养状态与 RASSF1A 基因启动子区甲基化的关系** 设定各 CpG 岛的平均甲基化率 = CpG 岛甲基化的 CpG 个数/该 CpG 岛总 CpG 个数; 总甲基化率 = (C1 甲基化的 CpG 个数 + C2 甲基化的 CpG 个数)/(C1 + C2 总 CpG 个数)。经不同碘营养处理 3 个月后, BSP 法检测显示, 无论实验组还是对照组, 在 C1 区域均呈现较高度度的甲基化, 在 C2 区域则呈现较低程度的甲基化。各碘浓度组与正常碘组对比, 无论 C1 启动子区域( $P = 0.630$ )、C2 启动子区域( $P = 0.401$ ) 还是总的启动子区域( $P = 0.398$ ) 甲基化率, 差异均无统计学意义, 见表 4。但通过绘制线型图, 从总体趋势上看, 无论低碘组还是高碘组, 各启动子区域的甲基化率均比正常组低, 且在 C1 区域甲基化率从 5 倍高碘到 20 倍高碘呈现先降低后升高的 U 型趋势, 见图 2。

## 3 讨论

碘对甲状腺激素合成的作用受碘摄入量及作用时间影响, 碘过量早期时机体存在一定代偿功能, 甲状腺上皮通过钠-碘转运体等自主调节方式减少对

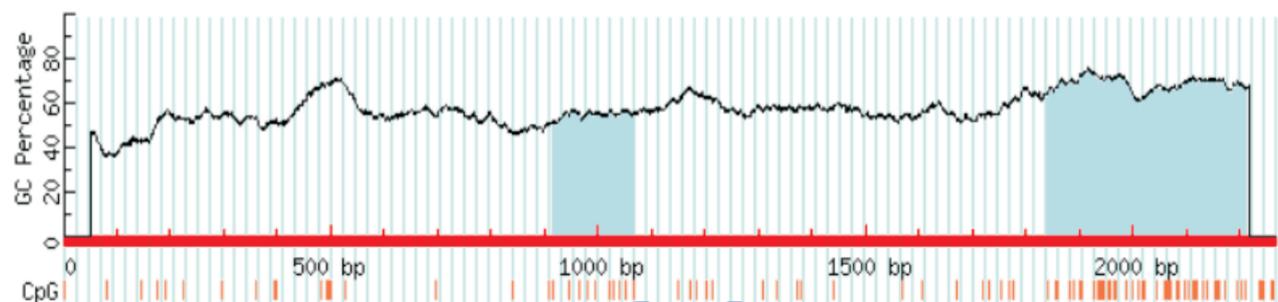


图 1 大鼠 RASSF1A 基因启动子区域的 BSP 分析结果

大鼠 RASSF1A 基因启动子 2 个 CpG 岛如图蓝色区域所示, 从左往右第 1 个 CpG 岛记为 C1, 第 2 个 CpG 岛记为 C2

表 4 各组基因甲基化比率( n = 3  $\bar{x} \pm s$ )

组别	C1 甲基化率	C2 甲基化率	总甲基化率
LI	0.776 ± 0.108	0.099 ± 0.013	0.234 ± 0.030
NI	0.830 ± 0.014	0.114 ± 0.023	0.257 ± 0.020
5HI	0.751 ± 0.112	0.076 ± 0.047	0.211 ± 0.044
10HI	0.715 ± 0.023	0.106 ± 0.013	0.228 ± 0.011
20HI	0.824 ± 0.169	0.068 ± 0.046	0.219 ± 0.027

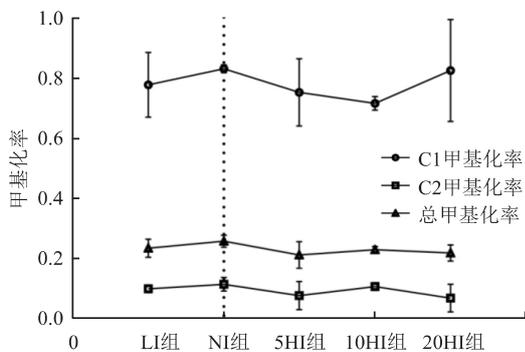


图 2 各组甲基化率均值线性图

碘的摄取,以调控激素的合成与释放,但长期碘过量也会出现失代偿<sup>[3]</sup>。碘缺乏早期,在组织脱碘酶的作用下 T4 会更多的转化为 T3,这种转化具有明显的适应代偿意义,但长期碘缺乏会使机体 T3 降低,最终出现甲减表现<sup>[4]</sup>。本研究中 LI 组 FT3 较 NI 组降低,FT4 比 FT3 升高,考虑存在早期的失代偿。而高碘的调控机制相对复杂,秦贵军等<sup>[5]</sup>对小鼠高碘饲养 5 个月后,本研究结果与之相似,高碘组的 FT3 低于正常组,而 FT4 高于正常组,作者认为这种现象可能与碘抑制 5'-脱碘酶,从而阻止 T4 向 T3 分解有关,且这种抑制超过了高碘对甲状腺激素释放的抑制,故未出现特征性 T3、T4 降低,反馈 TSH 升高的血清改变。

目前关于碘营养水平对基因甲基化影响的研究甚少,仅在近年略有增加趋势。Kim et al<sup>[6]</sup>通过对临床患者进行尿碘采集,将患者分成不同的碘营养状态组,发现低碘和高碘摄入都是导致 BRAF 基因突变的危险因素。Guo et al<sup>[7]</sup>尝试通过动物造模的方法去探究碘过量是否会影响小鼠甲状腺 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞 DNA 甲基转移酶(DNA Methyltransferases, DNMTs)的表达。结果在对比高碘和对照组后, DNMT 基因的甲基化率、mRNA 和蛋白表达水平均未见显著差异。但 Serrano-Nascimento et al<sup>[8]</sup>通过细胞实验得出了相反的观点,他们认为碘过量可以使 DNMTs 表达增加,且伴随组蛋白 H3 的高甲基化和低乙酰化。在有限的关于碘与基因甲基化的研究中,可知碘可能会对 BRAF 和组蛋白 H3 基

因甲基化造成影响。RASSF1A 是近年来研究较热门的一个抑癌基因,目前认为它的抑癌作用可能与导致细胞周期停滞、促进细胞凋亡和降低肿瘤细胞的致瘤相关<sup>[1]</sup>。RASSF1A 启动子区域甲基化与甲状腺癌的易感性和无病生存率密切相关,是甲状腺肿瘤发生的一个早期步骤<sup>[9]</sup>。现有的研究表明吸烟、病毒感染、过量雌二醇、氯乙烯和镍暴露等会对 RASSF1A 基因甲基化造成影响。但关于碘对 RASSF1A 基因甲基化的影响仍是未知的。

本实验结果存在 3 种可能:①碘与 RASSF1A 基因甲基化无关。既往已有研究<sup>[7]</sup>表明小鼠在 3 个月的高碘诱导下 DNMTs 表达组间无明显差异。DNMTs 是机体调节基因甲基化的重要途径,基因甲基化率增减可能伴随一定 DNMTs 改变。在此基础上可以推测,短期低或高碘与 RASSF1A 基因甲基化无关。但影响基因甲基化的因素不止 DNMTs,还包括 miR<sup>[10]</sup>和基因间相互影响<sup>[11]</sup>,故存在另一种可能。②碘可以影响 RASSF1A 基因甲基化,但目前处于代偿期。基因甲基化会受到感染物种、浓度和感染时间的影响。国内学者<sup>[12]</sup>在用氯乙烯染毒大鼠早期未发现阳性差异,延长染毒时间后,高剂量组 RASSF1A 基因才出现甲基化率升高,且呈先降后增的趋势。本实验在饲养 3 个月后,C1、C2 区域无论高碘还是低碘组,甲基化率都比正常组低,C2 区域高碘组甲基化率呈现先降后增的 U 型趋势。这与续志斌等<sup>[12]</sup>和张慧霞<sup>[13]</sup>的实验结果有类似之处。作者也对这种“反常”的降低做了推测,在染毒早期机体通过 DNMTs<sup>[14]</sup>、miR<sup>[10]</sup>等的异常表达,使启动子区甲基化水平下降,从而发挥基因的抑癌作用。故染毒早期不一定表现甲基化率升高,反而可以因为抑癌作用出现甲基化率下降。③其他因素:不同肿瘤存在不同的甲基化热点位点。Volodko et al<sup>[15]</sup>认为 RASSF1A 基因在乳腺癌中甲基化热点仅限于 11 个 CpG 位点,余与乳腺癌的发生无关。张杰兴<sup>[16]</sup>发现 RASSF1A 第 104 位 CpG 是促进人肝癌细胞增殖的关键点。碘是否仅对甲状腺特定 CpG 位点产生影响仍有待如焦磷酸测定等定量检测去进一步判断。

综上所述,在用不同碘浓度饲养 SD 大鼠 3 个月后,各组大鼠的血清 FT3 值随着碘浓度升高而降低,但 FT4、TSH 值在各组间无明显差异。3 个月的碘诱导,各组间 RASSF1A 基因甲基化率差异无统计学意义,碘可能对 RASSF1A 基因甲基化无影响或机体处于代偿期。

## 参考文献

- [1] 郑璐, 汤铜, 杜旺, 等. RASSF1A 基因对乳腺癌细胞恶性生物学特征的作用研究[J]. 安徽医科大学学报, 2019, 54(6): 882-6.
- [2] 陈祖培, 阎玉芹, 项建梅, 等. [J]. 中国地方病学杂志, 2005(3): 242-4.
- [3] Duan J, Kang J, Deng T, et al. Exposure to DBP and high iodine aggravates autoimmune thyroid disease through increasing the levels of IL-17 and thyroid-binding globulin in wistar rats[J]. *Toxicol Sci*, 2018, 163(1): 196-205.
- [4] Lavado-Autric R, Calvo R M, de Mena R M, et al. Deiodinase activities in thyroids and tissues of iodine-deficient female rats[J]. *Endocrinology*, 2013, 154(1): 529-36.
- [5] 秦贵军, 王庆祝, 欧阳安, 等. 不同浓度高碘水对小鼠甲状腺形态和功能影响的实验研究[J]. 中国地方病学杂志, 1997, 16(4): 35-8.
- [6] Kim H J, Park H K, Byun D W, et al. Iodine intake as a risk factor for BRAF mutations in papillary thyroid cancer patients from an iodine-replete area[J]. *Eur J Nutr*, 2018, 57(2): 809-15.
- [7] Guo Q, Wu D, Fan C, et al. Iodine excess did not affect the global DNA methylation status and DNA methyltransferase expression in T and B lymphocytes from NOD. H-2 h4 and Kunming mice[J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 55(2): 151-7.
- [8] Serrano-Nascimento C, Morillo-Bernal J, Rosa-Ribeiro R, et al. Impaired gene expression due to iodine excess in the development and differentiation of endoderm and thyroid is associated with epigenetic changes[J]. *Thyroid*, 2020, 30(4): 609-20.
- [9] Niu H, Yang J, Yang K, et al. The relationship between RASSF1A promoter methylation and thyroid carcinoma: A meta-analysis of 14 articles and a bioinformatics of 2 databases (PRISMA) [J]. *Medicine( Baltimore)*, 2017, 96(46): e8630.
- [10] Tan D, Cui Y, Bao J, et al. The expression levels of Mir-146b and Mir-221 in thyroid carcinoma tissues and their correlation with malignancy degree[J]. *Cell Mol Biol( Noisy-le-grand)*, 2020, 66(6): 142-7.
- [11] Brait M, Loyo M, Rosenbaum E, et al. Correlation between BRAF mutation and promoter methylation of TIMP3, RAR $\beta$ 2 and RASSF1A in thyroid cancer[J]. *Epigenetics*, 2012, 7(7): 710-9.
- [12] 续志斌, 梁洁, 张林, 等. 氯乙烯对大鼠肝细胞 RASSF1A 基因 DNA 甲基化的影响[J]. 毒理学杂志, 2017, 30(1): 20-4.
- [13] 张慧霞. 叶酸对 MNNG 诱导的哈族食管上皮细胞恶变的干预作用及表观遗传学机制研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2017.
- [14] Wongtrakongate P. Epigenetic therapy of cancer stem and progenitor cells by targeting DNA methylation machineries[J]. *World J Stem Cells*, 2015, 7(1): 137-48.
- [15] Volodko N, Salla M, Zare A, et al. RASSF1A site-specific methylation hotspots in cancer and correlation with RASSF1C and MOAP-1 [J]. *Cancers( Basel)*, 2016, 8(6): 55.
- [16] 张兴杰. 镉诱导抑癌基因启动子甲基化促 HepG2 细胞增殖研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2016.

## Effect of iodine on the methylation of the promoter region of RASSF1A gene in rats

Wang Jingjing<sup>1</sup>, Dong Xiaowan<sup>2</sup>, Wu Yi<sup>3</sup>, et al

<sup>1</sup>Dept of Endocrinology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

<sup>2</sup>Dept of Rheumatology, The Fuyang Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Fuyang 236000;

<sup>3</sup>Dept of Endocrinology, The First People's Hospital of Zhongshan City, Zhongshan 528400)

**Abstract Objective** To explore the relationship between methylation of ras-association domain family 1A (RASSF1A) gene and iodine nutrition status. **Methods** 40 SD rats were randomly divided into low iodine group, suitable iodine group, 5-fold high iodine group, 10-fold high iodine group and 20-fold high iodine group. Urine iodine level was determined by ICP-MS method, thyroid hormone level in serum was determined by chemiluminescence immunoassay method, and methylation rate of RASSF1A gene was determined by BSP method. **Results** After feeding SD rats with different iodine concentrations for 3 months: ① the serum FT3 value of rats in each group decreased with the increase of iodine concentration ( $P < 0.05$ ), but FT4 and TSH values had no significant difference among the groups; ② The methylation rates of CpG island 1 and CpG island 2 in the promoter region of RASSF1A gene were not significantly different among the groups. **Conclusion** There is no statistical difference in methylation rate of RASSF1A gene among groups under iodine induction for 3 months. Iodine may have no effect on methylation of RASSF1A gene or the body is in compensatory stage.

**Key words** iodine; rat; thyroid; RASSF1A; methylation