

碘对大鼠甲状腺 BRAF 基因甲基化的影响

吴 翌, 许 敏, 夏同佳, 赵晓彤, 王佑民, 邓大同

摘要 目的 了解不同碘摄入量对大鼠甲状腺鼠类肉瘤滤过性毒菌(V-raf)致癌同源体 B1(BRAF)基因甲基化的影响,探讨碘是否通过 BRAF 基因甲基化影响 BRAF 表达。方法 40 只 SPF 级雌性 SD 大鼠,随机均分为 5 组,分别为低碘组(LI 组)、适碘组(NI 组)、5 倍高碘组(5HI 组)、10 倍高碘组(10HI 组)、20 倍高碘组(20HI 组),通过饮用不同碘含量的去离子水并喂养低碘饲料造模。期间收集大鼠 24 h 尿液测定尿碘,3 个月后处死大鼠,留取血标本和甲状腺组织,采用化学发光法测定大鼠血清游离三碘甲状腺原氨酸(FT3)、游离甲状腺素(FT4)、促甲状腺激素(TSH)水平,应用硫化测序 PCR(BSP)检测启动子区 CPG 岛基因甲基化情况,应用免疫组化技术测定 BRAF 蛋白表达。结果 ①与 NI 组比较,LI 组和各 HI 组血清 FT3 浓度均降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。②比较 5 组大鼠 BRAF 甲基化率,差异无统计学意义($P > 0.05$)。③LI 组、NI 组和各 HI 组甲状腺组织中 BRAF 表达逐渐增高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与 NI 组比较,LI 组甲状腺 BRAF 表达较低,各 HI 组表达较高,差异有统计学意义($P < 0.05$);与 5HI 组比较,10HI 组和 20HI 组表达较高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 碘影响大鼠甲状腺 BRAF 蛋白表达,但对 BRAF 基因甲基化没有明显影响,提示碘可能通过其他途径影响 BRAF 基因表达。

关键词 大鼠;碘;甲状腺;BRAF;甲基化

中图分类号 R 581.9

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)06-0870-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.06.010

碘是维持人体正常甲状腺功能的必需元素,与甲状腺功能异常、自身免疫性甲状腺炎、甲状腺肿大、甲状腺结节和甲状腺肿瘤的发生发展有关,已有文献^[1-2]证实甲状腺结节和甲状腺肿瘤的发生与鼠类肉瘤滤过性毒菌致癌同源体 B1(v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1, B-raf)基因密切相

关。甲状腺疾病是常见的内分泌疾病,2014 年我国有超过 2 亿的甲状腺疾病病人,并且其患病率呈现逐年上升的趋势^[3]。BRAF 作为癌基因,其基因定位于人常染色体 7q34 位点,对细胞周期有调控作用,与甲状腺肿瘤的发生、发展、侵袭、转移、复发和预后密切相关^[4-5]。碘作为环境因素,是否通过 DNA 甲基化机制影响 BRAF 基因表达尚不清楚。该研究通过建立不同碘营养状态的动物模型,探讨碘对大鼠 BRAF 基因甲基化和蛋白表达的影响。

1 材料与方法

1.1 不同碘营养水平大鼠模型构建 动物购于安徽医科大学实验动物中心(安徽省实验动物质量合格证: NO. 340000200001326)的远交封闭群 SPF 级 SD 大鼠,35~42 d 雌性,40 只,体重 150~170 g,随机均分为 5 组,分别为低碘组(LI 组)、适碘组(NI 组)、5 倍高碘组(5HI 组)、10 倍高碘组(10HI 组)、20 倍高碘组(20HI 组)。在安徽医科大学动物实验中心喂养,每笼 4 只,共 10 笼。实验室温度(22 ± 2)℃,12 h 昼夜交替,所有动物每日进食量限制 20 g/d、饮水量 20 ml/d。整个实验过程均遵循“安徽医科大学实验用动物管理和使用指南”。5 组大鼠均予以低碘饲料和混有碘化钾的去离子水喂养,每只大鼠每日的总摄碘量为: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 $123.00 \mu\text{g}$ 。5 组 SD 大鼠的每日摄碘量(见表 1)。每月使用代谢笼留取一次 SD 大鼠 24 h 尿液,由安徽省疾病预防控制中心使用 ICP-MS(电感耦合等离子体质谱法)测定尿碘水平,结果显示尿碘与给碘剂量呈正相关,提示造模成功。喂养 3 个月后处死大鼠,留取血液和甲状腺组织标本,甲状腺组织称干重后迅速置于液氮中保存备用。

1.2 方法

1.2.1 甲状腺激素测定 血清游离三碘甲状腺原氨酸(free triiodothyronine, FT3)、游离甲状腺素(free thyroxine, FT4)、促甲状腺激素(thyroid stimulating hormone, TSH)由安徽医科大学第一附属医院内分泌实验室采用化学发光技术的竞争免疫法(美国西

2020-02-17 接收

基金项目: 国家卫计委公益性行业专项基金(编号: 201402005); 安徽省自然科学基金(编号: 1608085MH207)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院内分泌科、安徽内分泌代谢病省级实验室,合肥 230022

作者简介: 吴 翌,女,硕士研究生;

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

门子公司试剂盒)测定,应用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)。

1.2.2 甲基化 采用 BSP 法检测,使用天根生化科技(北京)有限公司的组织 DNA 提取试剂盒,按照说明书的步骤提取甲状腺组织 DNA。按 DNA 亚硫酸氢盐修饰试剂盒使用说明书操作,进行 DNA 的亚硫酸氢钠修饰及纯化回收。DNA 亚硫酸氢盐修饰试剂盒购自德国 QIAGEN 公司;组织基因组提取试剂盒、凝胶回收试剂盒购自于天根生化科技(北京)有限公司。使用生物信息学在线网站 MethPrimer 对 BRAF 基因启动子区域 CpG 岛进行分析,经预测发现 BRAF 基因启动子区域具有 1 个 CpG 岛,长度为 444 bp。根据 BRAF 基因序列设计 CpG 岛引物, F: 5'-GAGGGTGGTTGGAGGAGAAG-GAATATTTT-3', R: 5'-CCATTAAACAAAACCTATC-CCTATT-3';引物由华大基因科技有限公司合成。扩增条件为 95 °C 预变性 10 min,40 个热循环(94 °C、30 s,退火 30 s,72 °C、40 s),72 °C 延伸 5 min。将目标片段割胶纯化。PCR 产物纯化后连接克隆载体,采用 Generay 的 PGH(Lot: GV0108)作为载体,XL10-Gold 感受态进行转化、复苏和涂板。挑取质粒送北京六合华大基因科技有限公司测序,使用 BiQ Analyzer v2.0 对测序的结果进行对比和甲基化分析。

1.2.3 免疫组化 免疫组化操作步骤如下:①烤片:65 °C、1 h;②脱蜡至水:依次将切片放入二甲苯 I 15 min-二甲苯 II 15 min-二甲苯 III 15 min-无水乙醇 I 5 min-无水乙醇 II 5 min-85% 酒精 5 min-75% 酒精 5 min;③抗原修复:组织切片置于枸橼酸缓冲液中进行微波修复;④阻断内源性过氧化物酶:切片放入 3% 双氧水溶液中孵育 30 min,PBS 冲洗 3 次,每次 3 min;⑤ 10% 山羊血清封闭:孵育 30 min;

⑥加一抗(1:100):切片平放于湿盒内 4 °C 孵育过夜;⑦室温复温 1 h;PBS 冲洗 3 次,每次 5 min;⑧加二抗:室温孵育 50 min,PBS 冲洗 3 次,每次 3 min;⑨滴加新鲜配制的 DAB 显色液,显微镜下控制显色时间、苏木精复染、脱水封片;⑩显微镜镜检,图像采集分析。石蜡切片免疫组化结果判读:苏木精染细胞核为蓝色,DAB 显出的阳性表达为棕黄色。使用 Image Pro Plus 图像软件分析,分别计算面积、累积吸光度(integrated optical density,IOD)、吸光度差值。

1.3 统计学处理 采用 SPSS21.0 统计软件分析,实验计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示;组间实验数据比较采用单因素方差分析及 χ^2 检验,进一步多重比较采用 LSD 检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 每日碘摄入量与尿碘 5 组大鼠尿碘中位数与碘摄入量呈正相关,提示造模成功,但是,与 NI 组相比,5HI、10HI、20HI 组尿碘中位数并未达到相应的倍数差。见表 1。

2.2 各组血清甲状腺激素和 TSH 水平 在 5 组大鼠中,NI 组的血清 FT3 最高,LI 组和各 HI 组血清 FT3 浓度较低,差异有统计学意义($P < 0.05$);但 LI 组与各 HI 组比较,血清 FT3 水平无明显差异。与 NI 组比较,LI 组和各 HI 组血清 FT4 略增高,但差异无统计学意义($P > 0.05$);大鼠血清 TSH 各组间比较 5 组的血清 TSH 水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 2。

2.3 甲基化分析 生物信息学在线网站 MethPrimer 对基因启动子区域 CpG 岛进行分析,经预测发现 BRAF 基因启动子区域具有 1 个 CpG 岛,长度为 444 bp。统计分析以低碘组甲基化频率及位点数为最高,但经单因素方差分析,非参数检验(K-W 检

表 1 5 组大鼠尿碘检测情况($n=8, \bar{x} \pm s$)

项目	LI 组	NI 组	5HI 组	10HI 组	20HI 组
尿碘($\mu\text{g/L}$)	337.30 $\pm$ 142.64	411.50 $\pm$ 121.06	495.03 $\pm$ 92.99	543.93 $\pm$ 32.29	561.63 $\pm$ 25.87
尿碘(中位数 $\mu\text{g/L}$)	337.3	411.5	495	543.9	561.6

表 2 各组大鼠血清甲状腺激素和 TSH 水平比较($n=8, \bar{x} \pm s$)

项目	LI 组	NI 组	5HI 组	10HI 组	20HI 组	F 值
FT3/(pmol/L)	5.22 $\pm$ 0.41*	5.90 $\pm$ 0.60	4.76 $\pm$ 0.50**	5.02 $\pm$ 0.67**	4.91 $\pm$ 0.61**	4.456
FT4/(pmol/L)	26.38 $\pm$ 6.82	25.88 $\pm$ 5.48	29.38 $\pm$ 4.36	29.71 $\pm$ 3.09	26.64 $\pm$ 6.87	0.664
TSH/($\mu\text{IU/L}$)	5.29 $\pm$ 1.28	5.13 $\pm$ 1.54	4.57 $\pm$ 0.90	5.86 $\pm$ 1.46	4.29 $\pm$ 0.88	1.469

与 NI 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

验)和卡方检验比较,5组大鼠甲基化差异均无统计学意义($P>0.05$)。见表3。

2.4 免疫组化分析 5组大鼠甲状腺 BRAF 免疫组化表达(图1)。经单因素方差分析,5组间 ARE-A、IOD、吸光度差值比较,LI 组、NI 组和各 HI 组甲状腺组织中 BRAF 表达逐渐增高,差异有统计学意义($P<0.05$) (表4、图2)。经两两比较(LSD 法),与 NI 组比较,LI 组甲状腺 BRAF 表达较低,各 HI 组表达较高,差异有统计学意义($P<0.05$);与 5HI 组比较,10NI 组和 20HI 组表达较高,差异有统计学意义

($P<0.05$) (见表5)。

3 讨论

全球除冰岛外,世界各国都有不同程度的缺碘。我国是世界上缺碘相对严重的国家之一,碘缺乏病流行范围广,发病人数多,而且病情较重。为控制这一现状,WHO 推荐在全球范围内推行以食盐加碘为主的策略。我国在 1996 年实行了全民食盐加碘的干预措施,经过 20 多年的实施,国民碘营养状况得到明显改善,人体碘储备增加,碘缺乏病得到了很

表3 5组发生甲基化位点比例比较($n=8$)

变量	分组	个案数	平均值	标准差	最小值	最大值	F 值	P 值
甲基化数	LI	30	0.67	0.758	0	2	0.464	0.762
	NI	30	0.63	0.718	0	2		
	5HI	30	0.63	0.85	0	3		
	10HI	30	0.43	0.626	0	2		
	20HI	30	0.57	0.774	0	2		
	总计	150	0.59	0.744	0	3		
60 位点甲基化率	LI	30	0.011 1	0.012 6	0	0.033	0.464	0.762
	NI	30	0.010 6	0.012 0	0	0.033		
	5HI	30	0.010 6	0.014 2	0	0.05		
	10HI	30	0.007 2	0.010 4	0	0.033		
	20HI	30	0.009 4	0.012 9	0	0.033		
	总计	150	0.009 8	0.012 4	0	0.05		

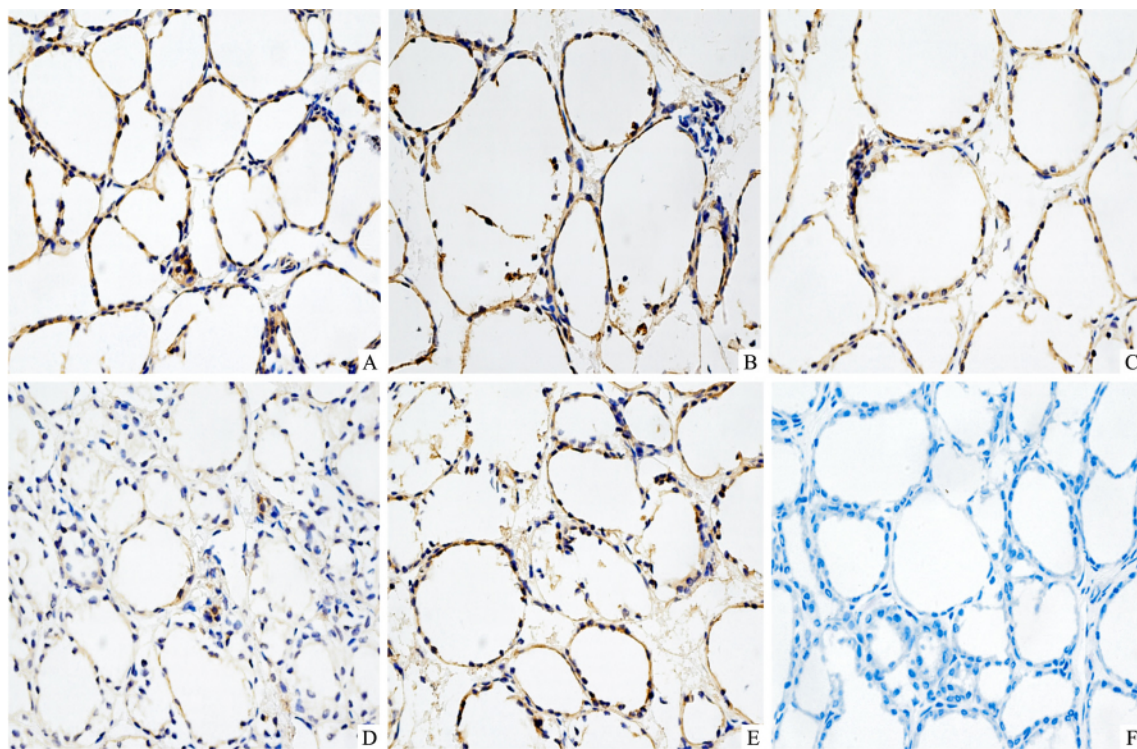


图1 5组大鼠甲状腺 BRAF 表达 DAB 染色 $\times 400$

A: LI 组; B: NI 组; C: 5HI 组; D: 10HI 组; E: 20HI 组; F: PBS 阴性对照组

表4 单因素方差分析5组间面积、IOD、吸光度差值($n=8$)

变量	分组	平均值	标准差	均值 $\pm$ 标准差	F 值	P 值
面积	LI	10.825 6	12.324 7	10.825 6 $\pm$ 12.324 7	16.641	0
	NI	31.366 8	16.833 9	31.366 8 $\pm$ 16.833 9		
	5HI	49.250 3	24.078 5	49.250 3 $\pm$ 24.078 5		
	10HI	70.450 8	32.739 1	70.450 8 $\pm$ 32.739 1		
	20HI	95.681 7	43.098 9	95.681 7 $\pm$ 43.098 9		
	总计	51.515 0	40.316 6	51.515 $\pm$ 40.316 6		
IOD	LI	3.210 2	2.926 0	3.210 2 $\pm$ 2.926 0	15.831	0
	NI	7.972 0	5.577 5	7.972 0 $\pm$ 5.577 5		
	5HI	14.337 4	8.292 8	14.337 4 $\pm$ 8.292 8		
	10HI	22.205 0	11.663 8	22.205 0 $\pm$ 11.663 8		
	20HI	31.908 9	15.825 4	31.908 9 $\pm$ 15.825 4		
	总计	15.926 7	14.089 6	15.926 7 $\pm$ 14.089 6		
吸光度	LI	0.0709 0	0.013 5	0.0709 0 $\pm$ 0.013 5	247.035	0
	NI	0.105 1	0.009 0	0.105 1 $\pm$ 0.009 0		
	5HI	0.132 9	0.009 5	0.132 9 $\pm$ 0.009 5		
	10HI	0.162 5	0.009 9	0.162 5 $\pm$ 0.009 9		
	20HI	0.194 2	0.010 5	0.194 2 $\pm$ 0.010 5		
	总计	0.133 1	0.044 6	0.133 1 $\pm$ 0.044 6		

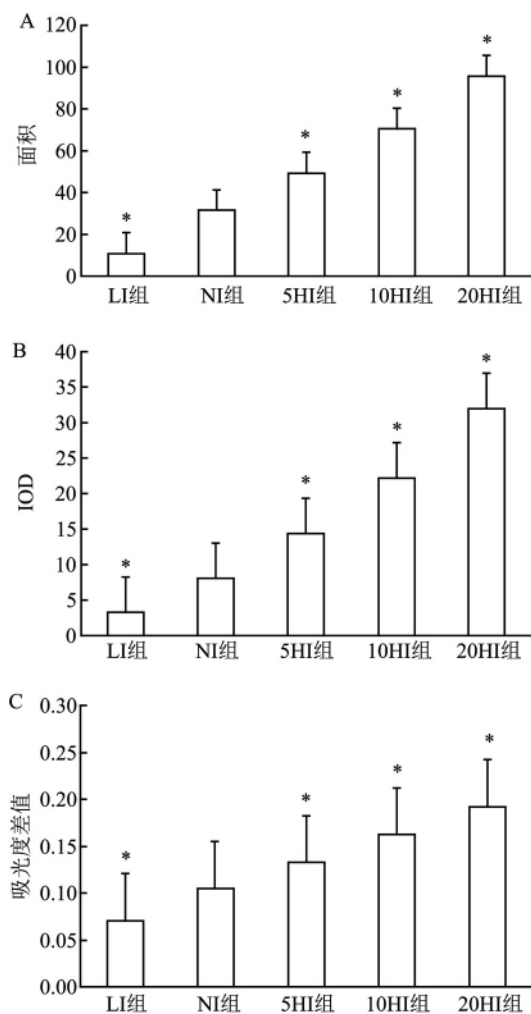


图2 5组大鼠甲状腺 BRAF 蛋白表达量

A: 免疫组化组间、面积比较; B: 免疫组化组间 IOD 比较; C: 免疫组化光密度差值比较; 与 NI 组比较: * $P < 0.05$

表5 5组间面积、IOD、吸光度两两比较($n=8$)

因变量	分组	平均值差 值(I-J)	标准 误差	显著 性	95% CI	
					下限	上限
AREA	LI vs NI	-20.541 0	11.466 5	0.079	-43.5205	2.4382
	5HI vs LI	-38.424 0	11.466 5	0.001	-61.4041	-15.4453
	10HI vs LI	-59.625 0	11.466 5	0	-82.6045	-36.645 8
	20HI vs LI	-84.856 0	11.466 5	0	-107.8355	-61.876 7
	NI vs LI	20.541 1	11.466 5	0.079	-2.4382	43.520 5
	5HI vs NI	-17.883 0	11.466 5	0.125	-40.8629	5.095 8
	10HI vs NI	-39.084 0	11.466 5	0.001	-62.0634	-16.104 6
	20HI vs NI	-64.314 0	11.466 5	0	-87.2943	-41.335 5
	5HI vs LI	38.424 7	11.466 5	0.001	15.4453	61.404 1
	NI vs LI	17.883 5	11.466 5	0.125	-5.0958	40.862 9
	10HI vs LI	-21.200 0	11.466 5	0.07	-44.1798	1.778 9
	20HI vs LI	-46.431 0	11.466 5	0	-69.4107	-23.452 0
	10HI vs NI	59.625 1	11.466 5	0	36.6458	82.604 5
	NI vs NI	39.084 0	11.466 5	0.001	16.1046	62.063 4
	5HI vs NI	21.200 4	11.466 5	0.07	-1.7789	44.179 8
IOD	20HI vs NI	-25.230 0	11.466 5	0.032	-48.2103	-2.251 5
	20HI vs LI	84.856 0	11.466 5	0	61.8767	107.835 5
	NI vs LI	64.314 9	11.466 5	0	41.3355	87.294 3
	5HI vs LI	46.431 3	11.466 5	0	23.452 0	69.410 7
	10HI vs LI	25.230 9	11.466 5	0.032	2.251 5	48.210 3
	LI vs NI	-4.761 8	4.061 7	0.246	-12.901 7	3.378 0
	5HI vs NI	-11.127 0	4.061 7	0.008	-19.267 0	-2.987 3
	10HI vs NI	-18.994 0	4.061 7	0	-27.134 6	-10.854 9
	20HI vs NI	-28.698 0	4.061 7	0	-36.838 5	-20.558 8
	NI vs LI	4.7618 5	4.061 7	0.246	-3.378 0	12.901 7
	5HI vs LI	-6.365 3	4.061 7	0.123	-14.505 2	1.774 5
	10HI vs LI	-14.232 0	4.061 7	0.001	-22.372 8	-6.093 1
	20HI vs LI	-23.936 0	4.061 7	0	-32.076 7	-15.797 0
	5HI vs LI	11.127 1	4.061 7	0.008	2.987 3	19.267 0
	NI vs NI	6.365 32	4.061 7	0.123	-1.774 5	14.505 2
	10HI vs NI	-7.867 6	4.061 7	0.058	-16.007 5	0.272 3
	20HI vs NI	-17.571 0	4.061 7	0	-25.711 4	-9.431 6

续表

因变量	分组	平均值差	标准	显著	95% CI	
		值(I-J)	误差	性	下限	上限
吸光度	10HI vs LI	18.994 7	4.061 7	0	10.854 9	27.134 6
	NI	14.232 9	4.061 7	0.001	6.093 1	22.372 8
	5HI	7.8676 0	4.061 7	0.058	-0.272 3	16.007 5
	20HI	-9.703 8	4.061 7	0.02	-17.843 8	-1.564 0
	20HI vs LI	28.698 6	4.061 7	0	20.558 8	36.838 5
	NI	23.936 8	4.061 7	0	15.797 0	32.076 7
	5HI	17.571 4	4.061 7	0	9.431 6	25.711 4
	10HI	9.703 89	4.061 7	0.02	1.564 0	17.843 8
	LI vs NI	-0.0342 8	0.004 3	0	-0.043 0	-0.025 6
	5HI	-0.062 0	0.004 3	0	-0.070 7	-0.053 3
	10HI	-0.091 66	0.004 3	0	-0.100 3	-0.083 0
	20HI	-0.123 34	0.004 3	0	-0.132 0	-0.114 7
	NI vs LI	0.0342 83	0.004 3	0	0.025 6	0.043 0
	5HI	-0.027 73	0.004 3	0	-0.036 4	-0.019 1
	10HI	-0.057 38	0.004 3	0	-0.066 1	-0.048 7
	20HI	-0.089 06	0.004 3	0	-0.097 7	-0.080 4
	5HI vs LI	0.062 019	0.004 3	0	0.053 3	0.070 7
	NI	0.0277 36	0.004 3	0	0.019 1	0.036 4
	10HI	-0.029 64	0.004 3	0	-0.038 3	-0.021 0
	20HI	-0.061 32	0.004 3	0	-0.070 0	-0.052 7
	10HI vs LI	0.091 667	0.004 3	0	0.083 0	0.100 3
	NI	0.057 384	0.004 3	0	0.048 7	0.066 1
	5HI	0.029 647	0.004 3	0	0.021 0	0.038 3
	20HI	-0.031 67	0.004 3	0	-0.040 4	-0.023 0
	20HI vs LI	0.123 347	0.004 3	0	0.114 7	0.132 0
	NI	0.089 064	0.004 3	0	0.080 4	0.097 7
	5HI	0.061 327	0.004 3	0	0.052 7	0.070 0
	10HI	0.031 679	0.004 3	0	0.023 0	0.040 4

好的控制^[5-6]。但目前我国随机人群甲状腺结节检出率高达 19% ~ 67%^[7]；食盐加碘前(1961 ~ 1994 年)甲状腺恶性肿瘤检出率为 0.46%，食盐加碘后(1995 ~ 2000 年)甲状腺恶性肿瘤检出率为 0.69%，其中甲状腺乳头状癌在食盐加碘后所占构成比高于加碘前^[8]。

BRAF 基因作为癌基因，与甲状腺肿瘤的发生、侵袭、转移和复发密切相关，其基因位于人体染色体 7q34，大小约 190 ku，含 18 个外显子，有 3 个保守区域，即 CR1、CR2 和 CR3。其中 CR1、CR2 位于氨基末端，并含有调节 RA 催化区域的部分，CR3 是激酶区域。该基因至少含有 7 个转录区，能编码多种蛋白质，其中包括全长约 94 ku，有 783 个氨基酸残基的 B 型有丝分裂原激活的蛋白激酶依赖性激酶，属丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶类^[9-10]。BRAF 基因突变位点大多位于第 1799 位点腺嘌呤替代了胸腺嘧啶，导致激酶活性片段第 15 位外显子上的 T1799A 点突变(V600E)，BRAF 中的缬氨酸(V)被谷氨酸(E)替代^[11]，从而持续激活 BRAF 激酶，造成 MAPK

通路持续活化，细胞不断分裂增殖，进而形成甲状腺肿瘤。

碘作为环境因素，其摄取量的多少可能参与了甲状腺疾病的发生。本实验通过不同碘含量饮用水成功构建不同碘营养水平的大鼠模型，结果显示 NI 组、LI 组和各 HI 组仅血清 FT3 水平有统计学差异。BRAF 是一种丝氨酸-苏氨酸激酶，在 MAP 激酶通路的信号转导中发挥作用，主要底物为 MEK1 和 MEK2，其致癌作用是通过 Ras-Raf-Mek-Erk 通路激活所介导的^[12-13]，BRAF 高表达可能参与甲状腺上皮细胞的过度增生。基因甲基化发生在 CpG 岛上，CpG 岛是围绕基因调控区聚集，从未影响基因自身的转录调控。本研究利用免疫组化技术发现随着碘摄入量的增多，LI 组到 HI 组面积、IOD、吸光度逐渐增高，差异有统计学意义，说明碘可以影响大鼠甲状腺 BRAF 蛋白的表达，但碘对甲状腺 BRAF 基因启动子区域 CpG 岛的影响在 5 组大鼠间未见异常。提示碘对甲状腺 BRAF 蛋白表达的影响可能不是通过 BRAF 基因的甲基化途径，而表观遗传学除 DNA 甲基化外，还有组蛋白修饰、非编码 RNA 等途径，所以，需进一步对其他途径进行探索。

参考文献

- [1] Kim S W, Lee J I, Kim J W, et al. BRAFV600E mutation analysis in fine needle aspiration cytology specimens for evaluation of thyroid nodule: a large series in a BRAFV600E-prevalent population[J]. J Clin Endocrinol Metab 2010, 95(8): 3693-700.
- [2] 周庚寅, 白艳花, 党道健. 甲状腺乳头状癌的病理诊断及遗传学特点[J]. 临床与实验病理学杂志 2010, 26(2): 131-8.
- [3] 中国甲状腺疾病诊治指南——甲状腺疾病的实验室及辅助检查[J]. 中华内科杂志 2007, 46(8): 697-702.
- [4] Xing M, Alzahrani A S, Carson K A, et al. Association between BRAFV600E mutation and mortality in patients with papillary thyroid cancer[J]. JAMA, 2013, 309(14): 1493-501.
- [5] 赵吉生, 盖宝东, 崔俊生, 等. 食盐碘化前后结节性甲状腺肿临床流行病学变化[J]. 中国地方病防治杂志, 2003, 5(18): 287-8.
- [6] 单忠艳, 滕卫平, 李玉珠, 等. 碘致甲状腺功能减退症的流行病学对比研究[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2001, 17(2): 71-4.
- [7] Burman K D, Wartofsky L. Thyroid nodule[J]. New Engl J Med, 2015, 373: 2347-56.
- [8] 崔俊生, 倪劲松, 孔庆扬, 等. 食盐加碘前后甲状腺恶性肿瘤检出率及组织学类型分析[J]. 吉林大学学报(医学版) 2008, 34(6): 1075-8.
- [9] 张博茗, 林元强, 隋国庆, 等. 细针穿刺细胞学联合 BRAF ~ (V600E) 基因突变检测在甲状腺结节诊断中的价值[J]. 肿瘤影像学 2015, 24(4): 259-63.

- [10] Choi J S , Kim J , Kwak J Y , et al. Preoperative staging of papillary thyroid carcinoma: comparison of ultrasound imaging and CT[J]. *AJR Am J Roentgenol* , 2009 , 193(3) : 871 - 8.
- [11] 李森朋 , 张岫美 , 张 芮. BRAF 基因突变与肿瘤耐药[J]. *药学研究* 2013 , 32(8) : 470 - 2.
- [12] Zhao L , Gong Y , Wang J , et al. Ultrasound guided fine-needle aspiration biopsy of thyroid bed lesions from patients with thyroidectomy for thyroid carcinomas [J]. *Cancer Cytopathol* , 2013 , 121(2) : 101 - 7.
- [13] Fukahori M , Yoshida A , Hayashi H , et al. The association between RAS gene mutations and clinical characteristics in follicular thyroid tumors: new insights from a single center and a large patient cohort [J]. *Thyroid* 2012 22(7) : 683 - 9.

Effect of iodine on methylation of thyroid BRAF gene in rats

Wu Yi , Xu Min , Xia Tongjia et al

(Dept of Endocrinology , The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University ,
Anhui Provincial Laboratory of Endocrinology and Metabolism , Hefei 230022)

Abstract Objective To study the effects of different iodine nutritional status on methylation of B1 gene of carcinogen B1(BRAF) of rat thyroid sarcoma filter toxic bacteria(V-raf) , and to explore whether iodine affects BRAF expression through methylation of BRAF gene. **Methods** 40 SPF female SD rats of different iodine nutritional status were randomly divided into 5 groups , namely low iodine group(LI) , iodine suitable group(NI) , and 5 times higher iodine group(5HI) , 10 times high iodine group(10HI) , 20 times high iodine group(20HI) , 8 rats in each group. The model was made by drinking deionized water with different iodine content and feeding low iodine feed. The urine of rats was collected for 24 h to measure urine iodine during the period , and rats were sacrificed after 3 months. Blood samples and thyroid tissues were collected , and the serum free triiodothyronine(FT3) and free thyroxine(FT4) and thyroid stimulating hormone(TSH) levels were determined by chemiluminescence. Bisulfite sequencing PCR(BSP) was used to determine the methylation of CPG island genes in the promoter region. Immunohistochemical technique was used to determine BRAF protein expression. **Results** ① Compared with NI group , the serum FT3 concentration in LI group and each HI group decreased , and the difference was statistically significant ($P < 0.05$) . ② Comparison of the methylation rate of BRAF in the five groups of rats was not statistically significant ($P > 0.05$) . ③ The expression of BRAF in thyroid tissues of LI group , NI group and HI group gradually increased , and the difference was statistically significant ($P < 0.05$) . Compared with the NI group , the expression of thyroid BRAF in LI group was lower , and the expression in each HI group was higher. Compared with 5HI group , the expressions of thyroid BRAF in 10HI and 20HI group were higher , and the difference was statistically significant ($P < 0.05$) . **Conclusion** Iodine affects the expression of BRAF protein in rats' thyroid gland , but has no obvious effect on the methylation of BRAF gene , suggesting that iodine may affect the function of BRAF gene through other ways.

Key words rat; iodine; thyroid; BRAF; methylation