

miR-155 在甲状腺乳头状癌组织及血浆中的表达

金 臻,斯 岩,陆 婉,吴兆书,沈美萍*

(南京医科大学第一附属医院甲状腺外科,普外科实验室,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:检测 miR-155 在甲状腺乳头状癌(papillary thyroid cancer,PTC)组织及血浆中的表达差异,评价其对 PTC 的诊断价值。方法:应用实时荧光定量聚合酶链式反应(real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction,RT-PCR)检测 52 例 PTC、32 例结节性甲状腺肿患者组织中 miR-155 的表达水平及对应患者血浆、30 例同期于本院行体检健康者血浆 miR-155 表达水平。应用受试者工作曲线(ROC)分析血浆 miR-155 的诊断价值,并分析其在 PTC 血浆与癌组织中表达的相关性。结果:miR-155 在 PTC 与结节性甲状腺肿组织中的相对表达量分别为 8.43 ± 6.14 和 1.14 ± 0.41 ,PTC 组高于结节性甲状腺肿组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。PTC 组、结节性甲状腺肿组、对照组血浆 miR-155 表达量分别为 3.35 ± 1.85 、 1.30 ± 0.30 和 1.41 ± 0.24 ,PTC 组高于结节性甲状腺肿组及对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。PTC 组与对照组区分的 ROC 曲线下面积(AUC)为 0.932 (95%CI:0.851~0.970, $P < 0.001$),PTC 组与结节性甲状腺肿组区分的 AUC 为 0.887 (95%CI:0.811~0.961, $P < 0.001$)。miR-155 在 PTC 组织表达与血浆中的表达呈正相关($r=0.589$, $P < 0.000 1$)。其表达量与患者临床病理参数无相关性($P > 0.05$)。结论:PTC 患者血浆中 miR-155 表达量升高,有可能成为一种新的血液学标志物用于 PTC 的诊断。

[关键词] 甲状腺乳头状癌;miRNA;血浆;生物标志物

[中图分类号] R736.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)07-999-05

doi:10.7655/NYDXBNS20150719

The expression of miR-155 in carcinoma tissues and plasma of patients with papillary thyroid cancer

Jin Zhen,Si Yan,Lu Wan,Wu Zhaoshu,Shen Meiping*

(Department of Thyroid Surgery,Laboratory of General Surgery,the First Affiliated Hospital of NJMU,Nanjing 210029,China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression of miR-155 in papillary thyroid cancer(PTC) tissue and plasma, and to evaluate the significance of plasma miR-155 level as a biomarker for PTC patients. **Methods:** Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction was used to detect the change of miR-155 in tumor tissues and plasma of 52 PTC cases and 32 nodular goiter cases, as well as in plasma of 30 controls. Receiver operating characteristic (ROC) curves were drawn to evaluate the diagnostic threshold as well as the correlation between plasma miR-155 expression and tumorous tissue in PTC patients. **Results:** The average of miR-155 expression in PTC tumorous tissues and nodular goiter tissues was 8.43 ± 6.14 and 1.14 ± 0.41 respectively. The relative level of miR-155 in plasma of PTC and nodular goiter was 3.35 ± 1.85 and 1.41 ± 0.24 , respectively. ROC curves for miR-155 to distinguish PTC and the control group yielded an AUC of 0.932 (95%CI:0.851~0.970) ($P < 0.001$) and nodular goiter yielded an AUC of 0.887 (95%CI:0.811~0.961) ($P < 0.001$). There was a positive correlation of miR-155 expression between plasma and tumorous tissue in PTC patients ($r=0.589$, $P < 0.000 1$). However, there was no relevance between the expression of plasma miR-155 and the clinical characteristics of the study population ($P > 0.05$). **Conclusion:** miR-155 expression is upregulated in patients with PTC. Plasma miR-155 may be used as a noninvasive biomarker for the prediction of papillary thyroid cancer.

[Keywords] papillary thyroid cancer; plasma; miRNA; biological marker

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(07):999-1003]

[基金项目] 江苏省卫生厅面上项目(H201203)

*通信作者(Corresponding author),E-mail:nj_shenmp@sina.com

microRNA(miRNA)是一类长度约22个核苷酸的非编码单链小分子RNA,可通过与靶mRNA的3'端非翻译区(untranslated region,UTR)完全或不完全互补结合,诱导靶mRNA降解或阻遏其转录后翻译,从而调节细胞增殖、分化与凋亡,参与个体发育、机体代谢以及肿瘤发生、发展等过程^[1]。研究表明,机体内组织、器官的代谢异常或器质性病变可能存在特定疾病状态下某些循环miRNA表达水平的变化^[2]。miR-155作为炎症相关的miRNA^[3],在多种肿瘤组织及细胞中呈高表达^[4-6],并且在乳腺癌^[7]、子宫内膜癌^[8]患者血浆中表达也升高。但miR-155在甲状腺乳头状癌(papillary thyroid cancer,PTC)组织及血浆中的表达变化尚研究不足。

本研究通过实时荧光定量聚合酶链式反应(real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction,RT-PCR)检测了52例PTC、32例结节性甲状腺肿患者组织中miR-155的表达水平及对应患者血浆、30例健康对照组血浆中miR-155的表达情况,探讨miR-155作为PTC诊断血液学标志物的可行性。

1 材料与方法

1.1 材料

组织均选自2013年12月至2014年12月南京医科大学第一附属医院甲状腺外科住院手术患者。PTC组52例,男9例,女43例,平均年龄(45.12 ± 14.31)岁。结节性甲状腺肿组(结甲肿组)32例,男6例,女26例,平均年龄(48.66 ± 12.38)岁。以上组织均经过病理证实,标本离体后迅速放入液氮保存,以上患者同时取血分离血浆。另选择同期于本院行体检健康人群30例作为对照组,男7例,女23例,平均年龄(46.03 ± 13.62)岁。患者组与对照性别构成、年龄分布均无统计学差异($P > 0.05$),说明两组资料具有可比性。各取外周血2 mL,离体1 h内分离出血浆放入液氮保存。

miRNA提取分离试剂盒(北京天根生化科技公司),RT反转录试剂盒、实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应(qRT-PCR)试剂盒(TaKaRa公司,日本),NanoDrop 2000c紫外分光光度计(美国赛默飞世尔公司),7500 Fast型qRT-PCR仪(ABI公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 总miRNA提取和纯化

组织样本需经液氮研磨至粉末状;血浆样本200 μ L,分别严格按照miRNA提取分离试剂盒说明书操

作步骤提取miRNA。用紫外分光光度仪测定提取RNA的浓度和纯度。选取吸光度 $D(260\text{ nm}/280\text{ nm})$ 值在1.8~2.2的样品用于后续实验。

1.2.2 miR-155表达检测

miRNA的表达水平通过qRT-PCR法检测。以U6RNA为内参^[9]。利用miRbase数据库进行引物设计,合成由广州锐博生物科技有限公司完成。本实验所用引物序列:U6RNA上游5'-TGCGGCTGCTCGCTTCGGCAGC-3';miR-155上游5'-TTAATGCTAATCGTGATAGGGGT-3';下游引物使用试剂盒所提供的通用引物Uni-miR qPCR Primer(TaKaRa Code:D352)。按RT反转录试剂盒说明书将RNA反转录为cDNA。qRT-PCR总反应体系为20 μ L,包括SYBR Premix Ex TaqTM(2 \times)10 μ L,PCR Forward primer(10 μ mol/L)0.4 μ L,PCR Reverse primer(10 μ mol/L)0.4 μ L,ROX Reference Dye(50 \times)0.4 μ L,cDNA模板1 μ L,ddH₂O 7.8 μ L。反应条件:95 $^{\circ}$ C 30 s;95 $^{\circ}$ C 3 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,共40个循环。用7500 Fast System SDS软件计算Ct值。miR-155的相对表达量用2^{- $\Delta\Delta$ Ct}法计算,每个样本按同样的条件检测3次^[10],求平均值。

1.3 统计学方法

应用SPSS20.0软件进行统计学处理,所有数据进行正态性检验。正态分布的计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。两组间比较采用两独立样本 t 检验。非正态分布的资料两组间比较采用Mann-Whitney U 检验。用受试者工作特征曲线(ROC)曲线及曲线下面积(AUC)测定miR-155诊断PTC的敏感性和特异性。通过双变量线性回归与相关分析评估PTC患者癌组织与相应血浆miR-155相对表达量的相关性。所有检验均为双侧检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

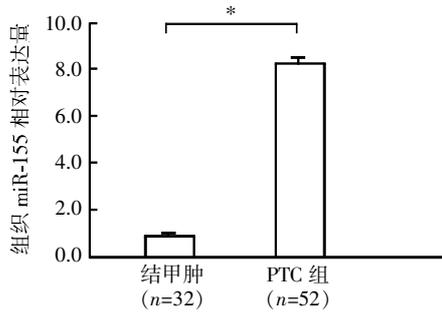
2 结果

2.1 miR-155的表达水平比较

PTC组、结甲肿组组织miR-155表达量分别为 8.43 ± 6.14 、 1.14 ± 0.41 。PTC组表达量明显高于结甲肿组,差异有统计学意义($P < 0.01$,图1)。PTC组、结甲肿组、对照组血浆miR-155表达量分别为 3.35 ± 1.85 、 1.30 ± 0.30 和 1.41 ± 0.24 ,PTC组显著高于结甲肿组及对照组,差异均有统计学意义($P < 0.01$,图2)。

2.2 血浆miR-155在PTC诊断中的价值

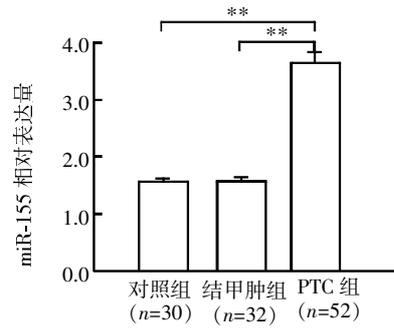
对所有受检者进行ROC曲线分析显示,PTC组



两组比较, * $P < 0.01$ 。

图 1 miR-155 在 PTC 组织和结甲肿组织中的表达水平

Figure 1 The expression of miR-155 in PTC and nodular goiter tissues



两组比较, * $P < 0.01$ 。

图 2 miR-155 在 PTC、结甲肿和对照组血浆中的表达水平

Figure 2 The expression of plasma miR-155 in PTC, nodular goiter and healthy controls

与对照组的 AUC 为 0.932(95%CI:0.851~0.970, $P < 0.001$),PTC 组与结甲肿组的 AUC 为 0.887 (95%CI:0.811~0.961, $P < 0.001$,图3)。提示血浆 miR-155 可作为甲状腺乳头状癌的筛选指标。

2.3 miR-155 在 PTC 组癌组织及血浆中表达的相关性分析

患者癌组织中 miR-155 的表达水平与血浆中的表达量($r=0.589, P < 0.000 1$)呈正相关(图 4)。

2.4 血浆 miR-155 表达水平与临床病理因素间关系

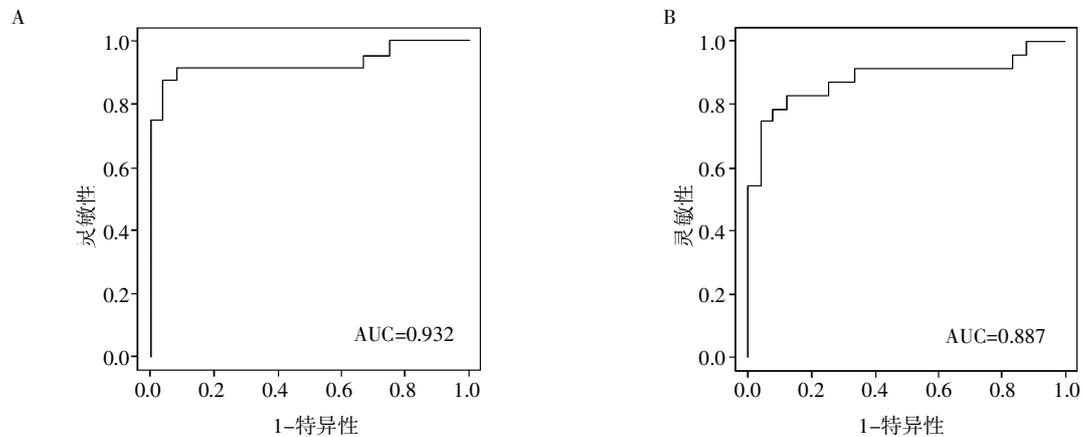
血浆 miR-155 表达量与 PTC 患者的临床病理特征间关系显示,其表达水平在患者的年龄、性别、癌灶数量、淋巴结转移及 TNM 分期期间的差异均无统计学意义($P > 0.05$,表 1)。

3 讨论

PTC 约占甲状腺恶性肿瘤的 90%,是近年来发病率增长最迅速的内分泌系统恶性肿瘤^[11]。临床上

主要通过触诊、超声、核素成像等方法对 PTC 进行术前诊断,但这些方法的诊断水平仍十分有限。目前约 20%的甲状腺结节通过上述方法难以明确诊断^[12]。因此,获取新的诊断方法,改善术前鉴别良恶性肿瘤的诊断准确性以提高 PTC 的诊断水平一直是关注和研究的热点,也是未来研究的方向。

miRNA 作为小 RNA 家族的一员,参与调控多种肿瘤的发生、进展、分化及凋亡^[1]。目前关于 PTC 中 miRNA 表达的研究标本多来源于手术切除组织^[13-14],术前无法获得,因此利用 miRNA 诊断 PTC 对临床诊断指导有限。超声引导下细针穿刺细胞学活检(ultrasound-guided fine-needle aspiration biopsy,US-FNAB)是目前临床上应用较成熟的技术,具有微创、阳性率较高等优点,对提高 PTC 的术前诊断和早期诊断有重要意义。有研究发现,US-FNAB 取得病变标本,并且以 miR-222、miR-328、miR-197、miR-21 为生物标记有助于区分甲状腺结节的良恶性病变^[15-16],



A:ROC 曲线分析血浆 miR-155 对 PTC($n=52$)和对照组($n=30$)的鉴别效能;B:ROC 曲线分析血浆 miR-155 对 PTC($n=52$)和结甲肿($n=32$)的鉴别效能。

图 3 血浆 miR-155 诊断 PTC 的 ROC 曲线分析

Figure 3 ROC curves of plasma miR-155 to discriminate the PTC

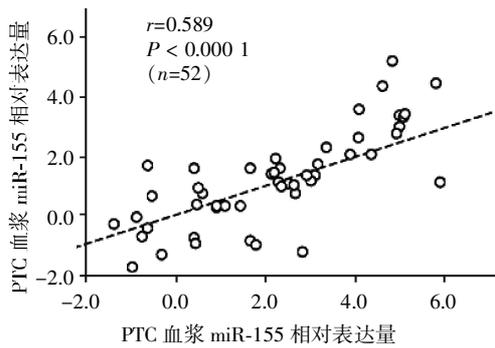


图 4 miR-155 在 PTC 组织表达与血浆中的表达呈正相关
Figure 4 The expression of miR-155 in tumour tissue was correlated with that in plasma

表 1 PTC 组 miR-155 表达水平与临床病理特征间关系
Table 1 Correlation between plasma miR-155 and clinical pathological indicators in PTC group ($\bar{x} \pm s$)

临床病理特征	例数	miR-155	P 值
性别			0.437
男	9	3.04 ± 2.21	
女	43	3.39 ± 1.83	
年龄(岁)			0.869
≥45	17	3.24 ± 1.69	
<45	21	3.47 ± 2.04	
肿瘤大小(cm)			0.228
≤2	31	2.70 ± 1.93	
<2	7	3.45 ± 1.84	
癌灶数量			0.652
多灶	20	3.13 ± 1.66	
单灶	18	3.35 ± 1.75	
淋巴结转移			0.216
阳性	27	2.89 ± 1.96	
阴性	11	3.41 ± 1.76	
TNM 分期			0.228
I / II	29	3.51 ± 1.95	
III / IV	9	2.45 ± 0.69	

为疾病的诊断提供了非常有价值的参考。但是,细针穿刺毕竟是一种有创检查,有一定并发症发生率,而且在体积较小病变或一些癌前病变中的检出阳性率较低。

大量研究表明,肿瘤细胞可以释放其内源性 miRNA 进入外周血循环,导致特定疾病状态下特异性循环 miRNA 的表达水平显著变化^[2]。因此,深入研究不同疾病状态下循环 miRNA 表达谱的差异性及其与疾病的关联,有望为疾病诊断、筛查及疗效监控等提供新的分子标志物。近年来,许多研究在评估循环 miRNA 表达水平对诊断及预后的预测价值方面取得较大进展^[7-8]。因此,我们认为通过测定患者血浆 miRNA 的表达水平可能对 PTC 的术前诊

断及病情检测有一定指导意义。

miR-155 位于 21q21.3 染色体,由 B 细胞集成簇(B-cell integration cluster, BIC)基因转录活化形成^[17],在多种实体恶性肿瘤中表达上调,并与肿瘤的发生、发展及预后密切相关^[4-6]。已有研究关注人体血液循环中 miR-155 的表达,并认为血浆 miR-155 的表达升高对恶性肿瘤的早期诊断、疾病检测、预后评价等方面的预测价值^[7-8]。因此,本研究对 PTC 患者组织及血浆 miR-155 进行临床研究。

我们采用 qRT-PCR 的方法,以 U6 为内参对 PTC、结甲肿患者组织,PTC、结甲肿患者及对照组相应血浆 miR-155 的表达水平进行检测。结果显示 PTC 患者组织中 miR-155 在表达量高于结甲肿组($P < 0.01$)。这一结果与之前研究的结果相吻合^[18-19],提示 miR-155 在 PTC 的发生发展中可能发挥癌基因的作用,其致癌具体机制值得进一步研究。PTC 患者血浆 miR-155 表达水平高于结甲肿组及对照组;ROC 曲线分析显示,血浆 miR-155 以 0.932 的 AUC 将 PTC 与健康者区分开(95%CI:0.851~0.970, $P < 0.001$)。血浆 miR-155 以 0.887 的 AUC 将 PTC 与结甲肿患者区分开(95%CI:0.811~0.961, $P < 0.001$),提示血浆 miR-155 可作为甲状腺乳头状癌的筛选指标。血浆 miR-155 水平与所收集的各临床病理指标均无相关性,这可能与样本收集差异存在关系。但目前 miR-155 参与 PTC 发生、发展的观点尚缺乏直接证据,还需进一步研究。通过 miR-155 在 PTC 组癌组织及血浆中表达的相关性分析发现患者癌组织中 miR-155 的表达水平与相应血浆中的表达量($r=0.589, P < 0.000 1$)呈正相关。说明在癌组织中 miR-155 表达量越高其在血浆中的表达也越高。我们认为这可能与肿瘤负荷有关,即肿瘤负荷越大则其释放到血液的特异性 miRNA 就越多。

本研究的意义在于验证 PTC 组织中 miR-155 的高表达,同时发现 PTC 患者血浆 miR-155 表达水平升高。使用血浆标本代替肿瘤组织标本更便于临床研究,为 PTC 诊断及病情评估提供新的生物学标志物,这有可能成为未来 PTC 防治的新突破点,为进一步研究 miR-155 在 PTC 临床诊疗中的价值提供了理论基础。但本研究尚存在许多局限性,如样本量不足,随访时间有限等,需要扩大样本量进一步评估血浆 miR-155 作为 PTC 诊断及病情评估生物标志物的意义和价值。

本研究发现,血浆 miR-155 在 PTC 中较良性病变表达升高,表明其可用于甲状腺结节的筛查。但

由于缺少最佳临界值以及样本量有限,其临床应用仍需要进一步研究确认。本研究表明血浆 miR-155 可以作为 PTC 筛查的血液学标记物。在此初步研究基础上,将进一步挖掘评估更多循环 miRNAs,并监测其在甲状腺术后随访、评判预后中的价值。

[参考文献]

- [1] Iorio MV, Croce CM. Causes and consequences of microRNA dysregulation[J]. *Cancer*, 2012, 18(3):215-217
- [2] Ichikawa D, Komatsu S, Konishi H, et al. Circulating microRNA in digestive tract cancers[J]. *Gastroenterology*, 2012, 142(5):1074-1078
- [3] Yao R, Ma Y, Du Y, et al. The altered expression of inflammation-related microRNAs with microRNA-155 expression correlates with Th17 differentiation in patients with acute coronary syndrome[J]. *Cell Mol Immunol*, 2011, 8(6):486-495
- [4] Zhang CJ, Xiao HX, Tian HP, et al. Upregulation of microRNA-155 promotes the migration and invasion of colorectal cancer cells through the regulation of claudin-1 expression[J]. *Int J Mol Med*, 2013, 31(6):1375-1380
- [5] Kono H, Nakamura M, Ohtsuka T, et al. High expression of microRNA-155 is associated with the aggressive malignant behavior of gallbladder carcinoma[J]. *Oncol Rep*, 2013, 30(1):17-24
- [6] Zhao XD, Zhang W, Liang HJ, et al. Overexpression of miR-155 promotes proliferation and invasion of human laryngeal squamous cell carcinoma via targeting SOCS1 and STAT3[J]. *PLoS One*, 2013, 8(2):e56395
- [7] Sun Y, Wang M, Lin G, et al. Serum microRNA-155 as a potential biomarker to track disease in breast cancer[J]. *PLoS One*, 2012, 7(10):e47003
- [8] 谭志琴, 刘伏香, 唐海林, 等. 子宫内腺癌患者血清 hsa-miR-155 的表达及其临床意义[J]. *中华妇产科杂志*, 2010, 45(10):772-774
- [9] Rao Y, Lee Y, Jarjoura D, et al. A comparison of normalization techniques for microRNA microarray data[J]. *Stat Appl Genet Mol Biol*, 2008, 7(1):Article 22
- [10] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} method[J]. *Methods*, 2001, 25(4):402-408
- [11] Mehra S, Tuttle RM, Milas M, et al. Database and registry research in thyroid cancer: striving for a new and improved national thyroid cancer database[J]. *Thyroid*, 2015, 25(2):157-168
- [12] Bakhos R, Selvaggi SM, DeJong S, et al. Fine-needle aspiration of the thyroid: rate and causes of cytohistopathologic discordance[J]. *Diagn Cytopathol*, 2000, 23(4):233-237
- [13] Nikiforova MN, Tseng GC, Steward D, et al. MicroRNA expression profiling of thyroid tumors: biological significance and diagnostic utility[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2008, 93(5):1600-1608
- [14] Chen YT, Kitabayashi N, Zhou XK, et al. MicroRNA analysis as a potential diagnostic tool for papillary thyroid carcinoma[J]. *Mod Pathol*, 2008, 21(9):1139-1146
- [15] Agretti P, Ferrarini E, Rago T, et al. MicroRNA expression profile helps to distinguish benign nodules from papillary thyroid carcinomas starting from cells of fine-needle aspiration[J]. *Eur J Endocrinol*, 2012, 167(3):393-400
- [16] Keutgen XM, Filicori F, Crowley MJ, et al. A panel of four miRNAs accurately differentiates malignant from benign indeterminate thyroid lesions on fine needle aspiration[J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(7):2032-2038
- [17] Elton TS, Selemon H, Elton SM, et al. Regulation of the MIR155 host gene in physiological and pathological processes[J]. *Gene*, 2013, 532(1):1-12
- [18] Yu S, Liu Y, Wang J, et al. Circulating microRNA profiles as potential biomarkers for diagnosis of papillary thyroid carcinoma[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2012, 97(6):2084-2092
- [19] Cantara S, Pilli T, Sebastiani G, et al. Circulating miRNA95 and miRNA190 are sensitive markers for the differential diagnosis of thyroid nodules in a Caucasian population[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2014, 99(11):4190-4198

[收稿日期]2015-01-02