

miR-221 与 miR-222 在甲状腺乳头状癌组织中的表达及临床意义*

李桂荣¹, 赵清侠^{2a}, 宋 斌^{2b}, 刘 捷^{2c}, 张 瑾^{2c}, 李世东^{2c},
韩想利^{2c}, 刘 晖^{2c}, 张 文^{2c} (1. 陕西省第四人民医院耳鼻咽喉头颈外科, 西安 710043;
2. 陕西省人民医院 a. 手术二部; b. 普外二科; c. 耳鼻咽喉头颈外科, 西安 710068)

摘要:目的 探讨 miR-221 与 miR-222 在甲状腺乳头状癌(PTC)组织中的表达及其与临床病理因素之间的关系。方法 收集陕西省人民医院耳鼻咽喉头颈外科 2015 年 5 月~2016 年 5 月就诊的甲状腺乳头状癌(43 例)患者、结节性甲状腺肿(21 例)及癌旁正常甲状腺组织(14 例)共 78 例, 行 real time-PCR 检测组织中的 miR-221 及 miR-222, 并结合临床病理因素进行分析, 对结果进行统计学分析。**结果** 甲状腺乳头状癌组中的 miR-221 及 miR-222 相对表达水平(11.54±3.37, 10.67±2.45)高于结节性甲状腺肿组(3.21±1.12, 2.89±1.23)及正常对照组(2.02±0.76, 1.98±0.34), 差异有统计学意义($t=3.62, 3.25; 3.27, 3.01$, 均 $P<0.05$), 且与患者的性别、年龄、肿瘤大小等因素无关($P>0.05$), 而与局部淋巴结转移、肿瘤侵犯包膜、远处转移以及临床分期相关($P<0.05$)。结节性甲状腺肿组中的 miR-221 及 miR-222 与正常对照组比较差异无统计学意义($t=0.91, 0.79$, $P>0.05$)。**结论** miR-221 及 miR-222 可作为甲状腺乳头状癌相对特异的分子标志物, 对甲状腺乳头状癌的临床诊断及治疗有重要作用。

关键词: 甲状腺乳头状癌; 微小核糖核酸 221; 微小核糖核酸 222; 病理学

中图分类号: R736.1; R730.43 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-7414(2017)01-041-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2017.01.012

Expression of miR-221 and miR-222 in Papillary Thyroid Carcinoma Tissues and Its Clinical Significance

LI Gui-rong¹, ZHAO Qing-xia^{2a}, SONG Bin^{2b}, LIU Jie^{2c},
ZHANG Jin^{2c}, LI Shi-dong^{2c}, HAN Xiang-li^{2c}, LIU Hui^{2c}, ZHANG wen^{2c}
(1. Department of ENT & HNS, the Forth People's Hospital of Shaanxi, Xi'an 710043, China;
2a. the 2nd Department of OR; 2b. the 2nd Department of General Surgery;
2c. Department of ENT & HNS, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710068, China)

Abstract: Objective To explore the expressions of miR-221 and miR-222 in papillary thyroid carcinoma (PTC), and relationships with clinical pathological features. **Methods** Samples from patients of PCT (43 cases), nodular goiter (21 cases), and para-carcinoma thyroid tissues (14 cases), 78 cases in total (from 06/2015 to 05/2016, Shaanxi Provincial People's Hospital) were collected. Real time-PCR tests were carried out, then analyzed in relation to clinical pathology features, and statistical analysis was used to evaluate the results. **Results** The expressions of miR-221 and miR-222 were significantly higher in PTC (11.54±3.37, 10.67±2.45) than in nodular goiter (3.21±1.12, 2.89±1.23) and normal thyroid tissue (2.02±0.76, 1.98±0.34) ($t=3.62, 3.25; 3.27, 3.01$, all $P<0.05$), which were significantly related with Regional lymph node metastasis, tumor invasion coated, distant metastasis and clinical stage ($P<0.05$), while not related with the gender, age, or size of the tumor of the patients ($P>0.05$), and no differences were found in nodular goiter and in normal thyroid tissue ($t=0.91, 0.79$, $P>0.05$). **Conclusion** miR-221 and miR-222 could be considered as a specific molecular marker of PTC, may play an important role in the diagnosis and treatment on PTC.

Keyword: papillary thyroid carcinoma; miR221; miR-222; pathology

微小核糖核酸(miRNA)是一类广泛分布的非编码小RNA, 分子大小约20~25个核苷酸, 在多种肿瘤中的表达具有显著的特异性, 其与肿瘤的发生、发展、侵袭转移等有密切关系^[1~6]。其中 miR-221 与 miR-222 均位于 X 染色体, 是 miRNA 家族中两个关系密切的成员, 近年来被证实在胃癌、膀胱癌、乳腺癌、结直肠癌、肝癌等多种肿瘤组织中高

表达, 可能通过共同靶向某些关键基因的表达而发挥促进肿瘤细胞增殖、迁移和侵袭的作用^[7]。目前, miR-221 与 miR-222 在甲状腺乳头状癌(papillary thyroid carcinoma, PTC)中的作用尚不十分明确, 本研究旨在分析 miR-221 与 miR-222 在 PTC 组织中的表达, 以及与 PTC 病理特点之间的关系, 探讨其在 PTC 疾病的发生发展过程中的作用, 是

* 基金项目: 陕西省科学技术研究发展计划项目(2015SF050)。

作者简介: 李桂荣(1974-), 女, 本科, 副主任医师, 主要研究方向: 头颈肿瘤及鼻内镜技术, E-mail: 526286281@qq.com。

通讯作者: 张 文(1975-), 女, 在读博士, 主任医师, 主要研究方向: 中耳炎、耳聋及头颈肿瘤, E-mail: smileww@foxmail.com。

否能够作为相对特异的分子标志物。

1 材料与方法

1.1 研究对象 采集2015年5月~2016年5月就诊于陕西省人民医院耳鼻咽喉头颈外科的PTC、结节性甲状腺肿及癌旁正常甲状腺组织共78例。其中PTC 43例,包括男性14例,女性29例,年龄21~67岁,平均年龄 45 ± 12.4 岁;结节性甲状腺肿21例,包括男性8例,女性13例,年龄25~63岁,平均年龄 48 ± 13.6 岁;癌旁正常甲状腺组织14例,包括男性9例,女性5例,年龄26~69岁,平均年龄 49 ± 14.1 岁。患者在入院前未经其他任何治疗,术中取样后立即放入液氮中保存,然后转入 -70°C 冰箱长期保存。上述患者术后组织切片,均经本院病理确诊。

1.2 试剂 RNA提取试剂Trizol(invitrogen公司),PCR试剂盒(TaKaRa公司),real-time PCR试剂盒(TaKaRa公司),RT-PCR所用引物由上海生工合成。内参U6正向引物5'-GCTTCG-GCAGCACATATACTAAAAT-3',反向引物5'-CGCTTCACGAATTTGCGTGTCAT-3',产物101 bp; miR-221正向引物5'-GTTCGTGG-GAGCTACATTGTCTGC-3',反向引物5'-GT-GTCGTGGAGTCGGCAATTC-3',产物67 bp; miR-222正向引物5'-GTTCGTGGGAGCTA-CATCTGGC-3',反向引物5'-GTGTCGTG-GAGTCGGCAATTC-3',产物65 bp。

1.3 实验方法

1.3.1 总miRNA的提取:所有组织样本经液氮研磨处理为粉末状,按照RNA提取试剂盒说明操作步骤提取miRNA。提取的样本经紫外分光光度

计测定,吸光度 $A_{260\text{nm}/280\text{nm}}$ 值为1.8~2.1。

1.3.2 反转录:按照反转录试剂盒的说明书进行操作,样本RNA的量为 $0.5 \mu\text{g}$,冰上加入以下试剂:总RNA $1 \mu\text{l}$, $5 \times$ Prime Script Buffer $5 \mu\text{l}$, Prime Script RT Enzyme Mix $1 \mu\text{l}$, stem-loop RT primer $2 \mu\text{l}$,并加入DEPC水至总体积为 $20 \mu\text{l}$ 。然后将反应管置入PCR反应仪中,反应条件为 42°C 15 min, 85°C 5 s, 4°C 反应15 min,产物在 -80°C 冰箱中保存备用。

1.3.3 real-time PCR:real-time PCR Master Mix $10 \mu\text{l}$,上游引物 $1 \mu\text{l}$,下游引物 $1 \mu\text{l}$,cDNA $2 \mu\text{l}$,加DEPC水至 $20 \mu\text{l}$ 。将反应管置于real-time PCR反应仪中,反应条件为 95°C 预变性15 min,再按 95°C 15 s, 60°C 1 min,扩增40个循环。每个样本在同样的条件下重复实验3次。

1.4 统计学分析 实验数据结果分析采用SPSS21.0统计学软件。计量结果用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-221, miR222在PTC组织中的表达

见表1。miR-221与miR-222在PTC组织中的表达显著高于在结节性甲状腺肿组织中的表达,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。miR-221与miR222在PTC组织中的表达显著高于在正常对照甲状腺组织中的表达,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。miR-221与miR-222在结节状甲状腺肿组织与正常对照甲状腺组织比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表1 miR-221与miR-222在PTC、结节性甲状腺肿与正常对照组织中的表达

组别	n	miR-221表达			miR-222表达		
		相对表达量	t	P值	相对表达量	t	P值
甲状腺乳头状癌	43	11.54 ± 3.37	3.62	0.001 ^a	10.67 ± 2.45	3.25	0.002 ^a
结节性甲状腺肿	21	3.21 ± 1.12	0.91	0.370 ^b	2.89 ± 1.23	0.79	0.432 ^b
正常对照	14	2.02 ± 0.76	3.27	0.002 ^c	1.98 ± 0.34	3.01	0.003 ^c

注:^a. 甲状腺乳头状癌与结节性甲状腺肿;^b. 甲状腺乳头状癌与正常对照;^c. 结节性甲状腺肿与正常对照。

2.2 miR-221, miR222的表达与PTC患者临床病理因素间的关系 见表2。分析各病理因素得出miR-221, miR222的表达与PTC的性别、年龄、肿瘤大小关系并不密切,而与PTC的局部淋巴结转移、肿瘤侵犯包膜、远处转移以及临床分期显著相关,进一步说明miR-221, miR-222可能在PTC的发生、发展、侵袭转移等过程中具有重要作用。

3 讨论 甲状腺癌发病率约占全身恶性肿瘤的

1%,是最常见内分泌恶性肿瘤,其中80%为甲状腺乳头状癌(PTC),因此,研究PTC的早期诊断具有重要意义^[8~9]。目前PTC早期诊断方法有B超、细针穿刺、核素显像等,而最终诊断主要依赖组织病理学检查。近年来发现的miRNA对许多肿瘤的诊断,显示其越来越多的优越性,具有重要临床意义。许多miRNA已被证明在肿瘤中都存在特异性的高表达,如miR-21, miR-2861, miR-51

等, miR-221 及 miR-222 在甲状腺癌中的高表达也 已被发现,但仍缺乏更详细临床资料支持^[9]。

表 2 miR-221 与 miR222 的表达与 PTC 临床病理因素的关系

项 目	n	miR-221 表达			miR-222 表达			
		相对表达量	t	P 值	相对表达量	t	P 值	
性别	男	14	11.03±3.19	1.02	0.384	11.12±3.73	0.81	0.412
	女	29	11.62±3.76			11.79±4.23		
年龄(岁)	<45	19	11.25±2.32	0.78	0.436	11.37±2.17	0.83	0.403
	≥45	24	11.71±3.14			11.62±3.87		
肿瘤大小(mm)	<20	18	10.89±2.12	1.23	0.214	10.23±2.45	0.65	0.512
	≥20	25	11.65±3.65			11.76±3.43		
局部淋巴结移	有	26	12.78±4.23	2.46	0.018	13.78±3.87	2.38	0.023
	无	17	10.67±3.24			10.32±4.23		
肿瘤侵犯包膜	有	12	13.45±3.34	2.38	0.023	13.78±3.04	2.69	0.012
	无	31	10.21±1.32			10.12±2.45		
远处转移	有	4	14.34±5.65	3.12	0.004	15.01±3.46	2.97	0.005
	无	39	9.23±4.32			9.89±4.23		
临床分期	I~II 期	30	10.32±4.51	3.22	0.003	10.12±4.34	3.31	0.002
	III~IV 期	13	13.78±3.04			14.59±3.47		

对 miR221 和 miR222 两者在肿瘤作用机制方面的研究表明,其能够抑制靶基因周期依赖的蛋白激酶抑制剂(cyclin dependent kinase, CDK) p27kip1 的表达,阻止细胞周期从 G1 期进入 S 期,从而促进肿瘤细胞增殖;抑制 miR221 与 miR222 后,肿瘤细胞发生凋亡,增殖能力下降。BARF 基因突变可通过 NF-κB 通路上调 miR-221 和 miR-222 的表达,提高 PTC 的侵袭和转移。Lee 等^[10]研究了复发 PTC 以及为复发 PTC 病例组织,发现 miR-222 的表达水平在术后显著下降,复发后水平则显著上升,可作为 PTC 复发标志物。

陈晓敏等^[11]人对 87 例甲状腺结节针吸细胞活检(FNAB)组织进行研究发现 miR-221 和 miR222 的高表达与甲状腺癌的恶化程度、过程关系密切,可以联合 FNAB 的结果,提高对甲状腺结节的诊断准确率。然而在临床中 FNAB 并不能确诊所有的甲状腺结节,最终还需依赖患者术后病理结果。本研究发现 miR-221 与 miR-222 在 PTC 组织中的表达高于在结节性甲状腺肿、正常甲状腺组织中的表达,且差异有统计学意义,该结果与陈晓敏等^[11]的结果一致。Yip 等^[12]研究 PTC 中,miR-221 等在浸润癌中的表达显著高于在非浸润癌中的表达。本研究证实 miR-221 与 miR-222 与 PTC 的局部淋巴结转移、肿瘤侵犯包膜、远处转移以及临床分期显著相关,提示 miR221 与 miR222 可能与 PTC 肿瘤细胞的增殖与分化有密切关系。

综上所述,miR-221 与 miR222 可作为甲状腺乳头状癌相对特异的分子标志物,检测 miR-221

与 miR-222 能够为临床工作中 PTC 的诊断、治疗及预后提供理论基础,指导改进现有治疗手段,提高 PTC 的治疗疗效。

参考文献:

- [1] Boufraquech M, Klubo-Gwiedzinska J, Kebebew E. Mi-croRNAs in the thyroid[J]. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2016, 30(5): 603-619.
- [2] Matsuda A, Yan IK, Foye C, et al. MicroRNAs as paracrine signaling mediators in cancers and metabolic diseases[J]. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2016, 30(5): 577-590.
- [3] Santos JC, Ribeiro ML, Sarian LO, et al. Exosomes-mediate microRNAs transfer in breast cancer chemoresistance regulation[J]. Am J Cancer Res, 2016, 6(10): 2129-2139.
- [4] 谢小娟,朱娜,潘晶晶,等. miRNA-148a 在膀胱癌组织中的表达及生物信息学分析[J]. 现代检验医学杂志, 2015, 30(4): 6-9, 13.
Xie XJ, Zhu N, Pan JJ, et al. Expression of miRNA-148a in bladder carcinoma tissues and its bioinformatics analysis[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2015, 30(4): 6-9, 13.
- [5] Wu SY, Lan SH, Liu HS. Autophagy and microRNA in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma [J]. World J Gastroenterol, 2016, 22(1): 176-187.
- [6] Bell E, Taylor MA. Functional roles for exosomal microRNAs in the tumour Microenvironment[J]. Comput Struct Biotechnol J, 2016(15): 8-13.
- [7] 姜波,王玉明,段勇. 肺癌组织中调控 PUMA 基因的 miRNA 筛查和 MiR-221 表达差异研究[J]. 现代检验医学杂志, 2015, 30(1): 15-19.

- Jiang B, Wang YM, Duan Y. Study on the differential expression of miRNA screening and MiR-221 regulates apoptosis by targeting PUMA gene in lung cancer[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2015, 30(1): 15-19.
- [8] 刘志英, 徐 琥, 吴英杰. miRNA-221 表达与甲状腺乳头状癌临床病理分期的关系研究[J]. 癌症进展, 2015, 13(5): 538-540.
- Liu ZY, Xu X, Wu YJ. The expression of miRNA-221 in thyroid cancer and its relationship with clinicopathological staging[J]. Oncology Progress, 2015, 13(5): 538-540.
- [9] Paschke R, Lincke T, Muller SP, et al. The treatment of well-differentiated thyroid carcinoma[J]. Deutsch Arztebl Int, 2015, 112(26): 452-458.
- [10] Lee JC, Zhao JT, Clifton-Bligh RJ, et al. MicroRNA-222 and microRNA-146b are tissue and circulating biomarkers of recurrent papillary thyroid cancer[J]. Cancer, 2013, 119(24): 4358-4365.
- [11] 陈晓敏, 曹国平, 陈 琪. miR-221 及 miR-222 在甲状腺结节针吸细胞活检组织中的表达水平[J]. 现代实用医学, 2013, 25(10): 1121-1122.
- Chen XM, Cao GP, Chen Q. Expression of miR-221 and miR-222 in thyroid nodule tissue by fine needle aspiration biopsy[J]. Mod Prac Med, 2013, 25(10): 1121-1122.
- [12] Yip L, Kelly L, Shuai YL, et al. Micro RNA signature distinguishes the degree of aggressiveness of papillary thyroid carcinoma[J]. Ann Surg Oncol, 2011, 18(7): 2035-2041.

收稿日期: 2016-07-05

修回日期: 2016-10-23