



•综合医学•

高敏特异甲状腺癌血液分子肿瘤标志物的筛选与鉴定

1李一鸣 1王跃辉 1刘云龙 1吕 岩 1高 莹 2金 铭 1史鹏泉

(1 齐齐哈尔医学院附属第二医院 黑龙江齐齐哈尔 161006; 2 齐齐哈尔医学院 黑龙江齐齐哈尔 161006)

摘要:目的:拟利用生物信息学分析手段从网络大数据库中挖掘甲状腺癌血液分子肿瘤标志物,并通过临床病例对照研究,对所筛选的分子进行实时定量分析其在血液中表达量,以期发现和鉴定与甲状腺癌相关的高敏特异性血液肿瘤分子标志物。**方法:**通过下载 TCGA 甲状腺癌相关数据,筛选分析与甲状腺癌差异表达的 miRNA 分子。通过 qPCR 扩增所筛选的 miRNA 在甲状腺癌患者、甲状腺结节患者及健康人血液中的表达情况,并采用 ROC 工作曲线评定该 miRNA 的诊断意义。**结果:**通过 TCGA 筛选到 miR-21、iR-139、miR-221 和 let-7miRNA,4 个 miRNA, qPCR 显示 miR-21 在肿瘤组中特异高表达,miR-139, miR-221, 及 let-7miRNA 在肿瘤组中特异低表达,ROC 工作曲线显示,miR-21 的 AUC 为 0.862,灵敏度为 89.8%,特异度为 91.6%,约登指数为 0.814; miR-139 的 AUC 为 0.944,灵敏度为 91.8%,特异度为 94.4%,约登指数为 0.862; miR-221 的 AUC 为 0.928,灵敏度为 89.2%,特异度为 91.6%,约登指数为 0.808; let-7miRNA 的 AUC 为 0.845,灵敏度为 92.7%,特异度为 79.4%,约登指数为 0.621。**结论:**miR-21、iR-139、miR-221 和 let-7miRNA 在甲状腺癌血液中特异差异表达,可作为潜在的分子诊断标志物

关键词: 甲状腺癌, miRNA, 肿瘤标志物, 血循环**中图分类号:** R256.12**文献标识码:** A**文章编号:** 1009-5187 (2018) 14-282-02

甲状腺癌是内分泌科最常见的恶性肿瘤,约占人类所有恶性肿瘤的 1%[1],近十年呈发病率上升趋势。甲状腺癌发病早期缺乏临床特异性,多数患者确诊时已达中晚期,而早期的诊断和及时治疗可显著改善患者预后,并有效降低复发率和死亡率。目前临床上有较多方法可诊断甲状腺癌,包括超声诊断检查、细针穿刺和血清甲状腺激素等测定[2]。但其准确性、特异性和有效性仍不理想。microRNA 是近十年内发现的非编码小型 RNA,能够通过能够与靶基因 mRNA 结合从而调控靶基因转录,超过半数的 miRNA 结合位点都位于肿瘤相关基因区域或脆性位点,肿瘤中异常表达的 miRNA 可应用于肿瘤诊断领域,通过 miRNA 研究肿瘤诊断标记物和药物靶标成为当前研究的热点。随着血液学检测技术不断提升,血液分子标志物检测以其取样方便,检测快捷在甲状腺癌诊疗中的应用价值日益凸显[3]。因此本研究通过对肿瘤基因组图谱 (TCGA) 数据库等大型生物信息平台,挖掘甲状腺癌差异表达 miRNA,并通过临床样本验证了所筛选的 miRNA 是否可用于诊断,现报告如下:

1. 材料与方法

1.1 甲状腺癌相关 miRNA 数据筛选与下载

甲状腺癌相关 miRNA 数据来源于 TCGA (<https://cancergenome.nih.gov>) 数据库,在下载界面,选择 RNASeqV2、miRNASeq 和 Clinical, 点击 Build Archived, 输入邮箱, 24h 内下载完成[]。选择的甲状腺癌患者样本需要有完整的病例资料、预后信息及 miRNA 测序数据,共有 184 例甲状腺癌病例资料纳入研究,其中男 106 例,女 78 例,年龄 46.35 ± 4.26 岁,对高表达或低表达占整体 85% 上的 miRNA 列为研究目标,共计 56 个 miRNA 纳入研究。再根据 pubmed 上发表文献,最终将 miR-21[4]、iR-139、miR-221[5] 和 let-7miRNA[6] 纳入研究。

1.2 所筛选的 miRNA 的临床验证

1.2.1 研究对象

研究对象选自齐齐哈尔医学院附属第二医院 2017 年 1 月-2018 年 7 月间肿瘤外科收治的具有明确诊断的原发甲状腺癌患者 64 例(肿瘤组),其中男 31 例,女 33 例,年龄 $20 \sim 65$ 岁,平均 42.17 ± 4.33 岁,另选自 72 例甲状腺良性结节患者(结节组),男 33 例,女 39 例,年龄 $20 \sim 63$ 岁,平均 40.82 ± 4.46 岁,排除标准,①小于 20 岁或大于 65 岁,②合并其他肿瘤患者及血液病患者,③患有其他系统疾病者,④患有精神障碍患者,⑤具有放疗、化疗史。另收集 76 例经超声检查甲状腺正常健康志愿者,收集所有纳入研究者每人 5ml 置于 EDTA 抗凝管中;外周静脉血 5ml,所有标本立即送检或 -80°C 保存待用。本研究获齐齐哈尔医学院附属第二医院伦理委员会伦理批准,所

有纳入研究者均签署知情同意书。

1.2.2 miRNA 基因检测

根据 Trizol (ThermoFisher, 美国) 法提取所有血液样本和组织样本总 RNA,按照逆转录试剂盒 (Takara, 大连) 将 RNA 逆转录成 cDNA,逆转录条件为: 25°C 30 min, 42°C 30 min, 85°C 5 min[7]。以 GAPDH 为内参,根据 qPCR 试剂盒配制反应体系,在 ABI-7300 实时荧光定量仪上进行 PCR 扩增。qPCR 引物由北京六合华大基因合成,序列信息如表 1 所示,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算 miRNA 相对表达水平。

表 1 qPCR 引物序列

miRNAs	引物序列	
	正向引物 5' -3'	反向引物 5' -3'
miR-21	ACGTTGCTAGCTTATCAGACTG	AATGGTTGTTCTCCACTCTC
miR-139	CTACAGTGCACGTG TCT	TGGAGACGCGCCCTGTT
miR-221	GGGAAGCTACATTGTCTGCTGC	CAGTGCCTGTCTGCTG AGT
let-7miRNA	GCGCCTGAGGTAGTAGGTTG	CAGTGCAGGGTCCGAGGT
U6	GCT TCGGCAGCACATATA CTA	CGCTTCACGAATTGCGT
	AAAT	GTCAT

1.5 数据分析

数据采用 SPSS22.0 软件统计分析,数据以均数士标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,先采用方差检验或 t 检验将 miRNAs 不同组别进行表达量的比较,而后根据受试者工作特征曲线 (ROC 曲线) 下面积 (AUC) 分析各 miRNA 对甲状腺癌的诊断水平,诊断标志物通过计算约登指数 (敏感度+特异度-1) 评价,越接近 1,表明预测越准确。

2. 结果

2.1 miRNAs 在各组血液标本表达水平比较

各 miRNAs 在血液样本中相对表达水平如表 1 所示,其中 miR-21 在肿瘤组中特异高表达,miR-139, miR-221, 及 let-7miRNA 在肿瘤组中特异低表达,差异具有统计学意义。

表 2 各 miRNA 在血液标本中的相对表达水平

组别	miR-21	miR-139	miR-221	let-7miRNA
健康组	0.899	0.934	0.986	0.942
结节组	1.327	0.793	0.882	0.803
肿瘤组	2.186*	0.339*	0.228*	0.316*
F	7.026	5.344	5.679	5.614
P	0.027	0.037	0.032	0.035

*与对照组及结节组相比,肿瘤组表达水平平均有差异, P 小于 0.05

(下转第 285 页)



•综合医学•

高,有其自身特点,是重要的实验室检查方法,CSF涂片发现或培养出结核杆菌是结核性脑膜炎诊断的金标准。83例CSF涂片结核菌抗酸染色均为阴性,这可能是由于CSF送检的量少(多数为1.5 ml左右),而结核杆菌的相对密度为1.014,结核性脑膜炎的CSF为渗出液,其相对密度高,所以在离心沉淀中难以找到结核杆菌。国外CSF培养结核杆菌阳性率在39%~80.9%,国内CSF培养结核杆菌阳性率在3.7%~17.2%[6,7],本组83例CSF培养结核杆菌阳性率54例(65%),和前者大致相符,可能有以下原因。(1)本组资料来源于结核病的专科医院,就诊的大多是结核病人,而且CSF标本量远远大于综合医院,因此阳性率比一般医院要高;(2)对疑似结核性脑膜炎的患者,CSF结核菌培养是作为常规项目送检,本组资料显示,无色或微黄毛玻璃样混浊的CSF结核菌培养阳性率大于清澈透明的CSF($P<0.05$)因此在作脑脊液穿刺时,对这类脑脊液一定要作结核菌培养检查,以免延误病人的诊断和治疗。

结核菌培养阳性不仅可做鉴别诊断的依据之一,还可对治疗和判断预后提供重要的参考价值。有报道认为,治疗1个月时,临床分期仍高和结核菌培养阳性的患者预后不良。本组资料亦显示,结核菌培养阳性的患者预后要比结核菌培养阴性的患者预后要差,本组7例死亡病例全部是CSF结核菌培养阳性。结核性脑膜炎的预后与病情严重程度、治疗及时性直接有关,早期、联合、规律、适当全程的督导化疗方案的推行,能确保疗效,缩短病程,减少耐药性的发生,早期应用皮质激素,对减轻症状,改善预后有良好的效果。

参考文献:

- [1] 韩庆,谈芙蓉,端木和运,等.结核性脑膜炎37例临床本会[J].2009(21):41-42.
- [2] 张敦熔.现代结核病学[M].北京:人民军医出版社,2000:338-340.

(上接第282页)

2.2 各miRNAs对甲状腺癌的诊断水平

各miRNAs诊断甲状腺癌的ROC曲线如图1所示,其中,miR-21的AUC为0.862,灵敏度为89.8%,特异度为91.6%,约登指数为0.814;miR-139的AUC为0.944,灵敏度为91.8%,特异度为94.4%,约登指数为0.862;miR-221的AUC为0.928,灵敏度为89.2%,特异度为91.6%,约登指数为0.808;let-7miRNA的AUC为0.845,灵敏度为92.7%,特异度为79.4%,约登指数为0.621;

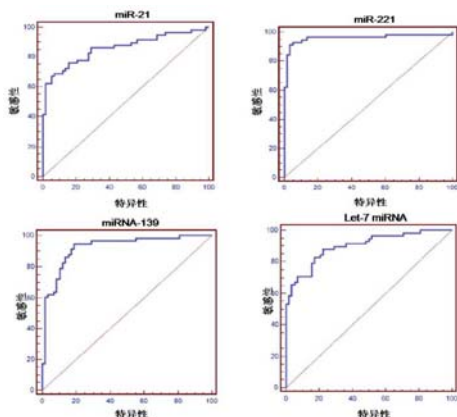


图2 各miRNAs诊断甲状腺癌的ROC曲线

3.讨论

近20年来我国甲状腺癌发病呈上升趋势,且为我国癌症谱中女性恶性肿瘤上升速度最快的肿瘤,甲状腺癌病因目前尚不明确[8]。尽管对于甲状腺癌辅助诊断标志物的研究很多,但是目前尚未找到诊断灵敏度和特异性均高的单一标志物或联合标志物应用于临床诊断。血液分子标志物检测以其取样方便,检测快捷在甲状腺癌诊疗中的应用价值日益凸显。本研究从TCGA等数据库中筛选甲状腺癌血液分子肿瘤标志物,并基于文献整理,选择出四个与甲状腺癌相关的血液表达差异miRNA,通过临床病例对照入组,搜集血液样本分析该分子表达量,鉴定该分子是否具有诊断意义,可为甲状腺癌诊断提供依据。

miRNA因其能与特定的基因mRNA结合,从而调节基因的表达[9],因此其与许多生理病理过程关系密切,越来越多的研究表明,miRNA表达异常与肿瘤的发生发展相关,同时也可对肿瘤的分类及预后进行预测[10],本研究筛选到了4个miRNAs,在临床验证中发现,其中

miR-21在肿瘤患者血液中特异高表达,miR-139,miR-221,及let-7miRNA在肿瘤患者血液中特异低表达,该4个miRNA且ROC曲线图显示都具有较高的约登指数,可作为潜在的甲状腺癌诊断标记物。

参考文献:

1. 董芬,张彭,单广良.中国甲状腺癌的流行现状和影响因素[J].中国癌症杂志2016,26(1):47-52
 2. 董芙蓉,刘欣.甲状腺癌分子诊断标志物的研究进展.医学与哲学,2017,38(12):67-71.
 3. 王先明.基因检测与分子靶向治疗在甲状腺癌治疗中的热点与展望[J].医学与哲学,2015,36(10B):9-12.
 4. PEKOW J, MECKEL K, DOUGHERTY T, et al. miR-193a-3p is a key tumor suppressor in ulcerative colitis-associated colon cancer and promotes carcinogenesis through up-regulation of IL17RD[J]. Clin Cancer Res, 2017, 23(17):5281-5291.
 5. 贺梦子,赵银龙,刘晓冬,等.甲状腺乳头状癌组织中差异表达miRNA及其靶基因的筛选和预测[J].吉林大学学报(医学版),2013;39(1):99-103
 6. Caini, S., Gibelli, B., Palli, D., etc. Menstrual and reproductive history and use of exogenous sex hormones and risk of thyroid cancer among women: a meta-analysis of prospective studies[J]. Cancer causes & control: CCC, Apr, 2015, 26(4): 511-8.
 7. Liz J, Esteller MLncRNAs and microRNAs with a role in cancer development[J] Biochimica Et Biophysica Acta, 2016, 1859(1): 169-177
 8. 秦建武.精准医疗在甲状腺癌中的临床应用与展望[J].医学与哲学,2016,37(10B):9-13.
 9. Liu, X., Ouyang, D., Li, H., etc. Papillary Thyroid Cancer: Dual-Energy Spectral CT Quantitative Parameters for Preoperative Diagnosis of Metastasis to the Cervical Lymph Nodes[J]. Radiology, Apr, 2015, 5(1): 167-76.
 10. Bhatia, P., Deniwar, A., Friedlander, P., etc. Diagnostic Potential of Ancillary Molecular Testing in Differentiation of Benign and Malignant Thyroid Nodules[J]. Anticancer research, Mar, 2015, 35(3): 1237-1241.
- 注:此文为2017年齐齐哈尔市科技局指导项目,编号:SFZD-2017135