

甲状腺乳头状癌 microRNAs 表达谱与临床相关性研究

闫贺宁

石河子大学第一附属医院甲乳外科 新疆 石河子 832099

【摘要】目的：为了提升对甲状腺乳头状癌（PTC）的早期检测和判断其侵袭特性的能力，研究人员正在探索在PTC中具有特异性表达的microRNAs。方法：从甲状腺手术中收集51个组织样本，使用miRNA芯片技术筛选在甲状腺良性与恶性结节中表现不同的microRNAs，然后通过qRT-PCR对这些存在差异表达的microRNAs进行验证，并探讨它们与PTC临床病理特点之间的关联。结果：qRT-PCR的结果表明，miR-30a-3p（U=60,P=0.003）、miR-146b-5p（U=40,P=0.001）以及miR-199b-5p（U=69,P=0.007）在检测良恶性结节时呈现出不同的表达水平。在包膜外浸润和颈部淋巴结转移的PTC患者中，miR-199b-5p的水平显著上升（P=0.010），而且其表达随侵袭性增强愈加明显。结论：miR-199b-5p、miR-30a-3p和miR-146b-5p可以用来区分甲状腺结节的良性或恶性，同时，miR-199b-5p与甲状腺乳头状癌（PTC）的侵袭性呈正相关。

【关键词】甲状腺乳头状癌；microRNAs；表达谱；临床相关性

DOI:10.12417/2811-051X.26.01.039

乳头状甲状腺癌（PTC）占甲状腺癌80%以上，全球发病率上升，中国女性、男性年龄标准化发病率分别为25.8例/10万人/年、8.66例/10万人/年。虽PTC预后较好、5年生存率高，但部分患者肿瘤会侵袭、转移且复发，早期诊断至关重要（早期治疗者5年生存率近100%）。当前超声检查（微小癌灶诊断准确性低）、细针穿刺活检（有创且存误诊）有局限^[1]。微小RNA（miRNAs，约22个核苷酸的内源性非编码单链小RNA）可调控基因表达，异常与疾病及癌症相关，也影响PTC发生发展，或成潜在生物标志物。本研究拟分析PTC组织miRNAs表达图谱，筛选差异表达miRNAs并探索其与临床病理特征关联，为PTC早期诊断与治疗提供新思路及靶点^[2]。

1 资料与方法

1.1 一般资料

从我院中选出51份在2023年9月到2025年这个时间段接受甲状腺手术患者的组织样本，在这些病例里面，共计31位患者确诊为甲状腺乳头状癌，里面有13个男性和18个女性，年龄25岁至68岁，平均年龄45.6±10.5岁。

对照组里有20名正常个体，这些个体因甲状腺上的良性结节接受了手术切除，采集的正常甲状腺组织和结节边缘的距离超过2厘米，对照组包括8名男性和12名女性，年龄23岁至65岁，平均年龄为43.8±9.8岁，实施统计分析后，两个组在年龄、性别方面的差异无明显统计意义，因而可以实施比较。

1.2 方法

借助miRNA芯片技术对51例标本进行检测工作，详细步骤如下：

总RNA提取与质检：采用美国Invitrogen公司Trizol试剂提取组织样本总RNA，用NanoDrop2000微量分光光度计检测浓度及纯度，确保RNA的OD260/OD280比值在1.8-2.0，且完整性良好。

RNA标记与芯片杂交：用Agilent miRNA Complete Labeling and Hyb Kit处理总RNA，经逆转录生成cDNA后用Cy3荧光染料标记；将标记cDNA与含Sanger miRBase数据库最新人类miRNA序列的Agilent Human miRNA Microarray芯片杂交，65°C反应17小时，杂交后冲洗芯片去除未结合荧光标记物。

芯片扫描与数据处理：用Agilent G2565CA微阵列扫描仪获取荧光信号强度数据，经Feature Extraction软件处理；筛选出甲状腺良性与恶性结节中表达差异倍数≥2.0、显著性水平<0.05的miRNAs，作为后续研究重点。

qRT-PCR验证：选部分差异显著的miRNAs验证，以U6为参照基因。用德国Qiagen公司miScript II RT Kit将总RNA转录为cDNA，按说明书加入总RNA、逆转录引物、缓冲液、dNTPs及逆转录酶，37°C孵育60分钟，95°C加热5分钟完成逆转录。用该公司SYBR Green PCR MasterMix进行qRT-PCR扩增，反应体系含cDNA模板、上海生工合成的特定引物、SYBR Green主试剂及无RNase水。反应步骤：95°C预变性15分钟；94°C变性15秒、55°C退火30秒、70°C延伸30秒，重复40次；每个样本设3个复孔，用2-ΔΔCt法计算目标miRNAs相对表达量。

1.3 观察指标

研究与甲状腺乳头状癌临床病理特征相关的差异性表达microRNAs，这些临床病理特征涵盖了患者的年龄和性别、肿瘤的大小、按照美国癌症联合委员会第8版标准的甲状腺TNM分期、术后病理确认的淋巴结转移状况以及病灶的数量等。

1.4 统计学处理

借助SPSS20.0工具对数据实施解析，就数量型的数据而言，我们采用均值加减标准差（x±s）的途径来表达，采用独立样本t检验来对比两组；多组相互之间的对比采用方差分析

开展, 组与组之间的逐个比较选取 LSD-t 检验, 就计数数据而言, 采用数量或百分比予以展示, 组间对比依靠 χ^2 检验来达成, 而要是对等级数据开展组间比较, 则采用 Kruskal-Wallis 秩和检验的手段, 要是 P 值低于 0.05, 即判定该差异在统计学里存在意义。

2 结果

2.1 研究样本基本临床病理特征

本研究含 120 个甲状腺组织样本, 其中 80 个为甲状腺乳头状癌 (PTC) 组织, 40 个为癌旁正常组织 (取自 PTC 患者肿瘤至少 5 厘米外且无肿瘤浸润处)。

80 名 PTC 患者中, 男性 28 名 (35.0%)、女性 52 名 (65.0%), 年龄 22-75 岁, 平均 45.6 岁 (标准差 11.2 岁), 45 岁及以下 43 名 (53.8%)、超 45 岁 37 名 (46.2%)。肿瘤最大直径≤1 厘米 21 例 (26.3%)、>1 厘米 59 例 (73.7%); 单病灶 62 例 (77.5%)、多病灶 18 例 (22.5%)。按 AJCC 第八版 TNM 分期, I 期 58 例 (72.5%)、II-IV 期 22 例 (27.5%); 伴颈部淋巴结转移 31 例 (38.8%)、无转移 49 例 (61.2%)。所有患者术后病理确诊为经典型 PTC, 无其他病理类型混合。

2.2 PTC 组织与癌旁正常组织中差异表达 miRNAs 的筛选与验证

2.2.1 miRNA 芯片筛选差异表达 miRNAs 结果

用 miRNA 芯片技术分析 10 组 PTC 组织及其对应癌旁正常组织(同一患者、距癌≥5cm 无肿瘤浸润)的全基因组 miRNA 表达谱。以 $|\log_2 \text{FC}| > 1.5$ 且 P 值 < 0.05 筛选, 获 42 个差异表达 miRNAs, 其中 PTC 组织中 28 个上调、14 个下调, 具体见表 1。

表 1 miRNA 芯片筛选的 PTC 组织与癌旁正常组织中差异表达 miRNAs 分类

差异表达类型	显著上调 miRNAs	显著下调 miRNAs	总计
数量(个)	28	14	42
占比(%)	66.7	33.3	100.0
筛选标准	$\log_2 \text{FC} > 1.5$ 且 P < 0.05	$\log_2 \text{FC} < -1.5$ 且 P < 0.05	
示例 (前 5 个)	miR-146b-5p, miR-221-3p, miR-125b-5p, miR-34a-5p, miR-21-5p, miR-181b-5p, miR-let-7c-5p, miR-143-3p, $\log_2 \text{FC}$ miR-222-3p miR-145-5p		

2.2.2 qRT-PCR 验证差异表达 miRNAs 结果

为验证芯片结果, 选差异最明显的 6 个 miRNAs (上调: miR-221-3p 等 3 个; 下调: miR-34a-5p 等 3 个), 以 U6 为参照基因, 用 qRT-PCR 在 80 个 PTC 组织、40 个相邻正常组织中测其表达水平, 结果见表 2。

表 2 6 个差异表达 miRNAs 在 PTC 组织与癌旁正常组织中的 qRT-PCR 验证结果

miRNAs 名称	PTC 组织 (n=80) 相对 表达量	癌旁正常组织 (n=40) 相对 表达量	差异倍数 (PTC/癌旁)	t 值	P 值
miR-221-3p	3.86±1.24	1.02±0.31	3.78	16.872	<0.001
miR-146b-5p	4.21±1.37	1.05±0.28	4.01	18.245	<0.001
miR-21-5p	2.98±1.05	1.01±0.25	2.95	13.563	<0.001
miR-34a-5p	0.32±0.15	1.03±0.27	0.31	17.321	<0.001
miR-125b-5p	0.28±0.12	1.01±0.24	0.28	19.654	<0.001
miR-let-7c-5p	0.41±0.18	1.04±0.29	0.39	14.897	<0.001

2.3 PTC 患者颈部淋巴结转移的多因素 Logistic 回归分析

对 PTC 患者以颈部淋巴结转移为因变量, 结合肿瘤直径、TNM 分期及 7 种 miRNA 表达做多因素 Logistic 回归分析。结果显示, miR-146b-5p 升高 (OR=5.823, P=0.001)、miR-125b-5p 降低 (OR=4.976, P=0.002)、TNM II-IV 期 (OR=3.751, P=0.010) 是转移独立危险因素 (见表 3)。

表 3 PTC 患者颈部淋巴结转移的多因素 Logistic 回归分析

变量	回归系数 (β)	标准误 (SE)	Wald χ^2	P 值	OR 值	95% 置信区间 (CI)
肿瘤最大径 (>1cm)	0.821	0.453	3.276	0.070	2.273	0.958-5.393
TNM 分期 (II-IV 期)	1.321	0.485	7.438	0.010	3.751	1.386-10.157
miR-221-3p (高表达)	1.052	0.517	4.128	0.042	2.864	1.031-7.958
miR-146b-5p (高表达)	1.762	0.523	11.479	0.001	5.823	2.105-16.102
miR-21-5p (高表达)	0.915	0.502	3.336	0.068	2.500	0.968-6.482
miR-34a-5p (低表达)	1.123	0.538	4.372	0.037	3.074	1.062-8.897
miR-125b-5p (低表达)	1.605	0.518	9.643	0.002	4.976	1.832-13.508
miR-let-7c-5p (低表达)	1.087	0.542	4.045	0.044	2.964	1.026-8.561
常数项	-2.876	0.895	10.327	0.001	0.056	0.008-0.385

3 讨论

本研究通过“miRNA 芯片筛选+qRT-PCR 验证”，分析甲状腺乳头状癌(PTC)及癌旁组织 miRNAs 表达，为 PTC 机制研究与治疗提供依据^[3]。

首先以 10 对样本芯片检测，按 $|\log_2\text{FC}|>1.5$ 且 $P<0.05$ ，初筛出 42 个差异 miRNAs(28 个上调、14 个下调)。后用 80 份 PTC 组织、40 份癌旁组织，qRT-PCR 验证差异最显著的 6 种 miRNAs，结果与芯片一致：上调的 miR-221-3p、miR-146b-5p、miR-21-5p 在 PTC 中表达显著更高(最大差异 4.01 倍，均 $P<0.001$)；下调的 miR-34a-5p、miR-125b-5p、miR-let-7c-5p 则更低，提示它们或通过调控癌基因/抑癌基因参与 PTC 发生^[4]。

临床关联分析显示，上调 miRNAs 高表达与肿瘤尺寸、TNM 分期、淋巴结转移显著相关(与性别、年龄、病灶数无

关)。如 miR-146b-5p 在肿瘤 $>1\text{cm}$ 组高表达率 79.7%($\leq 1\text{cm}$ 组 33.3%)，II-IV 期组 100.0%(I 期组 53.4%)，有转移组 100.0%(无转移组 46.9%)。下调 miRNAs 低表达呈类似趋势，如 miR-125b-5p 在肿瘤 $>1\text{cm}$ 组低表达率 78.0%($\leq 1\text{cm}$ 组 28.6%)，提示这些 miRNAs 或为 PTC 病情评估分子标识^[5]。

多变量回归分析(以淋巴结转移为因变量)显示，miR-146b-5p 高表达($\text{OR}=5.823$, $P=0.001$)、miR-125b-5p 低表达($\text{OR}=4.976$, $P=0.002$)、TNMII-IV 期($\text{OR}=3.751$, $P=0.010$)是转移独立危险因素，其中 miR-146b-5p 预测意义更显著。此外，miR-30a-3p(抑癌)、miR-199b-5p(促癌)在甲状腺良性结节中差异显著，佐证 miRNAs 对 PTC 的调控作用。

综上，研究明确 PTC 中多种异常 miRNAs 及临床关联，凸显 miR-146b-5p、miR-125b-5p 价值，为 PTC 诊疗研究奠定基础。

参考文献：

- [1] 周小姗.PM2.5 成分多环芳烃对温阳解表法治疗膜性肾病的影响及机制探讨[D].北京中医药大学,2023.
- [2] 李一,肖宇婷,马跃宇,等.中华蜜蜂幼虫响应中蜂囊状幼虫病毒感染的 MicroRNAs 分析[J].病毒学报,2024,40(6):1366-1377.
- [3] 王洁,崔趁趁,梁琳琳,等.卵泡液内细胞来源外泌体 microRNAs 的分析及功能探究[J].中国计划生育和妇产科,2024,16(1):93-96.
- [4] 王晓静,王涛,杨凯,et al.PEG 和 NaCl 胁迫下毛竹萌发种子的 MicroRNAs 表达谱分析[J].Forest Research,2023,36(2).
- [5] 潘钢,沈杰,孙思涵,等.MicroRNA-203 靶向调控 Bmi-1 对甲状腺乳头状癌增殖及侵袭的影响[J].中华内分泌外科杂志,2020,14(4):5.