

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和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间距超过 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 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 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 版标准的甲状腺癌 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 ($\bar{x} \pm s$) 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 ≥ 5 cm 无肿瘤浸润)的全基因组 miRNA 表达谱。以 $|\log_2 FC|>1.5$ 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	$\log_2 FC>1.5$ 且 $P<0.05$	$\log_2 FC<-1.5$ 且 $P<0.05$	
示例 (前 5 个)	miR-146b-5p, miR-221-3p, miR-21-5p, miR-181b-5p, miR-222-3p	miR-125b-5p, miR-34a-5p, miR-let-7c-5p, miR-143-3p, 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

差异 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 \pm 1.24	1.02 \pm 0.31	3.78	16.872	<0.001
miR-146b-5p	4.21 \pm 1.37	1.05 \pm 0.28	4.01	18.245	<0.001
miR-21-5p	2.98 \pm 1.05	1.01 \pm 0.25	2.95	13.563	<0.001
miR-34a-5p	0.32 \pm 0.15	1.03 \pm 0.27	0.31	17.321	<0.001
miR-125b-5p	0.28 \pm 0.12	1.01 \pm 0.24	0.28	19.654	<0.001
miR-let-7c-5p	0.41 \pm 0.18	1.04 \pm 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 (>1 cm)	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 $|\log_2FC| > 1.5$ 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（OR=5.823， $P=0.001$ ）、miR-125b-5p 低表达（OR=4.976， $P=0.002$ ）、TNMII-IV 期（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）在甲状腺良恶性结节中差异显著，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] 周小珊.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.