

· 论 著 ·

甲状腺乳头状癌 microRNA 差异表达谱分析

陈 鑫¹, 吴诚义¹, 张 政²

(重庆医科大学:1. 附属第一医院普外科;2. 生物学教研室 400016)

摘要:目的 建立甲状腺乳头状癌(PTC)microRNA(miRNA)的差异表达谱,为进一步探讨 miRNA 在甲状腺乳头状癌发生机制的作用提供依据。方法 收集 12 例 PTC 肿瘤组织和临近肿瘤未受侵袭的组织标本,临近肿瘤未受侵袭的组织标本作为正常对照,一半用于芯片检测,另一半用于荧光定量 PCR 检测。用 Trizol 法抽提组织标本总 RNA, YM-100 微离心滤器富集小 RNA, 含 875 个探针的 miRHuman_13.0_091250 miRNA 芯片检测 PTC 肿瘤组织标本和临近肿瘤未受侵袭组织标本 miRNA 的差异表达谱。利用 TaqMan[®] miRNA Assays 定量 PCR 试剂盒,以 U6 snRNA 作为内标,对部分差异表达的 miRNAs 进行实时定量 PCR 检测。结果 部分 miRNAs 在 PTC 肿瘤中表达异常, miR-433、miR-221 和 miR-21 在 PTC 肿瘤高表达, miR-138、miR-26a 和 miR-709 在 PTC 肿瘤低表达。结论 部分 miRNAs 在 PTC 肿瘤和临近肿瘤未受侵袭组织中存在差异表达,可能参与了 PTC 发生的分子机制。

关键词:miRNA; 甲状腺乳头状癌; 差异表达

中图分类号:R736.1; R730.231

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)10-1188-02

miRNA differential expression of papillary thyroid carcinoma

CHEN Xin¹, WU Cheng-yi¹, ZHANG Zheng²

(1. Department of General Surgery, First Affiliated Hospital; 2. Department of Biology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To explore the miRNA (miRNA) differential expression profile of papillary thyroid carcinoma (PTC), and to provide the evidence that miRNAs are involved in the molecular pathogenesis of PTC. **Methods** Twelve human PTC and control tissues were tested by miRNA array and real-time PCR. mRNA was extracted from the tissues by Trizol reagent. miRNA differential expression profile in PTC and controls were assayed by 875 miRHuman_13.0_091250 miRNA array. Real-time PCR was performed by TaqMan[®] miRNA Assays kits on the tissues of PTC and controls. The relative expression was calculated using the $\Delta\Delta\text{CT}$ method and normalized to the expression of U6 snRNA. **Results** We examined the expression of 875 miRNA species based on version 13.0 of the Sanger miRBase by miRNA microarrays. 572 miRNAs were expressed in PTC group, and 388 miRNAs were expressed in control group. Sixty-eight miRNAs were differentially expressed with $P < 0.01$. Of these, 47 were overexpressed and 21 were underexpressed in PTC. The changes with $P < 0.01$ ranged from 1.6-fold to 19.2-fold. Three upregulated (miR-433, miR-221 and miR-21) and three down-regulated miRNA species (miR-138, miR-26a and miR-709) were examined. As anticipated, real-time PCR confirmed the differences in expression of these miRNAs in PTC and control tissues. **Conclusion** Some miRNAs expressed differently between PTC and control groups, suggesting that they may be involved in the pathogenesis of PTC.

Key words: miRNA; papillary thyroid carcinoma; differential expression

乳头状甲状腺癌(papillary thyroid carcinoma, PTC)是甲状腺组织中最常见的恶性肿瘤,占有甲状腺癌的 80%。近年来其发病率有上升的趋势^[1]。MicroRNAs(miRNAs)是近年来发现的一类重要的短小内生 RNAs,通过对靶 miRNAs 的直接分解或抑制其翻译的方式在转录后水平调节基因表达,在发育时序、干细胞分化、信号转导、细胞生长和肿瘤的发生等必要的生物学进程中起着非常重要的作用。有研究发现 miRNAs 与 PTC 关系密切,但 miRNAs 在 PTC 的发生发展中的确切作用迄今尚不明确。因此,本文通过运用 miRNA 芯片技术结合实时荧光定量 PCR,高通量地检测 PTC 组织及癌旁正常对照组织的 miRNA 差异表达谱,深入探讨 miRNA 在 PTC 发生中的重要意义。

1 对象与方法

1.1 研究对象 PTC 组:12 份 PTC 肿瘤组织标本;对照组:相应的临近肿瘤未受侵袭组织标本。根据病理诊断标准选择住院手术后患者,其中男 6 例,女 6 例,排除心、脑、肝、肾及内分泌代谢疾病。

1.2 检测方法

1.2.1 总 RNA 提取 分别将 PTC 组和对照组标本液氮碾磨

成粉末状后,加入 RNAiso Reagent 匀浆,室温静置 5 min,加入 1/5 RNAiso Reagent 体积量的氯仿,振荡混匀,室温静置 5 min,4 ℃ 12 000×g 离心 15 min,将上清液移至新的离心管中,加入与上清液等体积的异丙醇,室温静置 10 min,4 ℃ 12 000×g 离心 10 min,弃上清液,向沉淀中加入 1 mL 的 75% 乙醇清洗沉淀,4 ℃ 12 000×g 离心 5 min,弃上清液,保留沉淀,于超净台内干燥后,溶解于适量的 DEPC 处理水中,用紫外分光光度计检测总 RNA 的纯度和甲醛变性胶电泳质检总 RNA 的质量。

1.2.2 芯片检测 (1)富集小 RNA:用 YM-100 微离心滤器将 PTC 组和对照组标本组织各 6 例总 RNA 样本进行大小分别,取 2~5 μg 小 RNA (<300 nt) 用 poly A 聚合酶扩展 3' 末端形成 poly A 尾。(2)把 1 个寡核苷酸标记连接到 poly A 尾上用于荧光染色。通过微循环泵在 Paraflomicrofluidic 芯片上进行杂交,过夜。在 microfluidic 芯片上,每个检测探针由 1 个化学修饰核苷酸编码的片段互补地结合到靶 miRNA 或其他 RNA,聚乙二醇的分隔片段促使编码片段从底物中分离出来。检测探针是原位 PCR 化学合成。杂交解链温度的平衡由探针的化学修饰调节完成。杂交反应在 34 ℃ 下用 100 L 6xSSPE

buffer(包含 25% 甲醛胺)平衡。此后,用 tag-specific Cy3 和 Cy5 染料进行荧光标记,用激光扫描器收集杂交的图像。扣除背景,用 LOWESS 滤器规范信号后,用专业软件分析数据。对于 2 个颜色的实验值,按两组检测信号的比率及 P 值和 t 检验值计算。

1.2.3 RT-PCR 检测 采用 PTC 组和对照组标本各 6 例,根据 miRNA 芯片分析结果,将差异表达较明显的 miRNA 进一步定量 PCR 验证。利用 TaqMan® miRNA Assays 定量 PCR 试剂盒,以 U6 snRNA 作为内标,对部分差异表达的 miRNAs 进行实时定量 PCR 检测(表 1)。实验中引物均由 Applied Biosystems 公司提供,反应参照试剂盒说明书进行。逆转录反应:取总 RNA 2 ng 作为起始模板,反应体系为 10 μL,每个检验指标做 3 个复孔。反应条件为:95 °C 变性 2 min,40 个循环 95 °C、15 s,60 °C、30 s。最终数据用 2-ΔΔCT 公式分析^[6]。

1.3 统计学方法 运用 SPSS10.0 统计软件对数据进行处理。两组间比较采用 t 检验,P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 组织总 RNA 质量检测 为检测总 RNA 能否满足后续芯片实验的要求,用紫外分光光度计检测总 RNA 的纯度和甲醛变性胶电泳质控总 RNA 的质量。结果 PTC 组组织总 RNA 为 1 043.1 μg/μL,D260 : D280 为 1.98,D260 : D230 为 1.34;对照组组织总 RNA 为 1 497.1 μg/μL,D260 : D280 为 2.03,D260 : D230 为 1.54,结合电泳结果,鉴定 RNA 纯度及其完整性,符合芯片实验要求。

表 1 PTC 差异表达 miRNAs 的芯片和 RT-PCR 检测结果比较

miRNAs	芯片	RT-PCR
上调的 miRNAs		
mmu-miR-433	5.22	4.93
mmu-miR-221	3.70	3.05
mmu-miR-21	2.04	2.62
下调的 miRNAs		
mmu-miR-138	4.37	3.83
mmu-miR-26a	2.69	2.14
mmu-miR-709	2.56	2.96

芯片结果为 PTC 组标准值/对照组标准值得到差异倍数;RT-PCR 结果通过 2-ΔΔCT 公式计算得到差异倍数。

2.2 miRNA 芯片检测结果 来自对照组和 PTC 组标本组织总 RNA 经小 RNA 分离后,分别用 Cy3 和 Cy5 标记,然后同 miRNA 芯片杂交。每张芯片由多个重复区域组成。每个区域的 miRNA 探针序列信息来自于 Sanger miRBase Release 13.0 版本数据库 (<http://miRNA.sanger.ac.uk/sequences/>)。使用 Genepix 4000B 对杂交后的芯片进行图像扫描,图像以伪色显示扩大可视的动态范围。在 Cy3 和 Cy5 的信号强度图像中,随着信号强度从 1 增加到 65 535,对应的色彩从蓝-绿-黄-红进行渐进变化。在 Cy3/Cy5 信号比值图中,当 Cy3 信号高于 Cy5 信号时,色彩显示为绿色;当 Cy3 信号与 Cy5 信号相当时,色彩显示为黄色;当 Cy5 信号高于 Cy3 信号时,色彩显示为红色。在 PTC 组有 572 个 miRNAs 表达,对照组 388 个 miRNAs 表达。通过 Genepix Pro 6.0 分析所得数据,差异有统计学意义(P<0.01)表达的 miRNA 有 68 个,其中 47 个

miRNAs 在 PTC 组呈高表达,21 个 miRNAs 呈低表达,差异倍数为 1.6~19.2。在这 68 个 miRNAs 中有 6 个 miRNAs 在两组均呈高表达,且差异有统计学意义,在 PTC 组和对照组均表达高提示可靠性、可重复性较好;差异有统计学意义表明与 PTC 关系密切。这 6 个 miRNAs 分别为 miR-433、miR-221 和 miR-21 在 PTC 组高表达,miR-138、miR-26a 和 miR-709 在 PTC 组低表达。

2.3 RT-PCR 检测结果 将 6 例对照组和 6 例 PTC 组组织的 cDNA 分子为模板,利用 TaqMan® miRNA Assays 定量 PCR 试剂盒对部分 miRNAs 进行 TaqMan 探针荧光定量 PCR。比较定量 PCR 检测结果与芯片检测结果,如表 1 所示,提示定量 PCR 结果与芯片结果趋势一致,表明芯片结果是可靠的。

3 讨 论

miRNA 是一类非编码的小 RNA 分子,有 5 端磷酸基和 3 端羟基,定位于 RNA 前体的 3 端或 5 端。自第 1 个 miRNA (lin-4 和 let-7)分子在线虫中被发现以来^[2],迄今为止已在包括人类、果蝇、植物等多种生物物种中鉴别出超过 3 500 种 miRNA 分子。目前越来越多的研究表明,miRNA 通过与靶基因的相互作用,调控人类至少 1/3 基因的表达,在生理和病理过程中均具有重要作用^[3]。

生物芯片(biochip)技术是 20 世纪 90 年代初发展起来的新技术,具有高通量、高集成、微型化、连续化和自动化的特点,此技术现今已经成熟运用到 mRNA 水平基因表达检测上,是检测细胞或组织 miRNA 表达谱的理想方法^[4]。本研究通过采用 miRNA 芯片筛查 PTC 组织和正常对照组织 miRNA 差异表达谱,RT-PCR 验证部分差异表达 miRNA,初步筛查出了一些 PTC 相关的 miRNAs。

本实验通过 miRHuman_13.0_091250 miRNA 芯片检测 PTC 组和对照组 miRNA 表达的差异谱,在含 875 个探针 miRNA 芯片检测中发现有 572 个 miRNAs 在 PTC 组中表达,388 个 miRNAs 在对照组表达。PTC 组和对照组组织表达的 miRNA 有 68 个 miRNAs 差异有统计学意义(P<0.01),其中 47 个 miRNAs 在 PTC 组呈高表达,21 个 miRNAs 在 PTC 组呈低表达。其中 miR-433、miR-221 和 miR-21 在 PTC 组高表达,miR-138、miR-26a 和 miR-709 在 PTC 组低表达。荧光定量 PCR 验证了这 6 个 miRNAs 在 PTC 组和对照组组织的表达。由此提示,部分 miRNAs 在 PTC 患者肿瘤组织和临近肿瘤未受侵袭组织中存在差异表达,可能参与了 PTC 发生的分子机制。上述研究结果与国外学者对 PTC 与 miRNAs 相关的结论有一定的一致性。He^[5]等发现 miR-146、miR-221 和 miR-222 在 PTC 患者肿瘤组织中表达上调;Mitomo^[6]等发现 miR-138 在 PTC 细胞系中表达下调;Visone^[7]等发现在甲状腺未分化癌中 miR-30d、miR-125b、miR-26a 和 miR-30a-5p 表达明显下降。与本研究结果比较显示,miR-221 和 miR-138 具有可重复性,而 miR-433、miR-21、miR-26a 和 miR-709 是作者新发现的 PTC 相关 miRNAs,为后续研究提供了重要的依据。因此,miRNAs 确实在 PTC 发生中发挥作用。

综上所述,对 PTC 相关 miRNA 初步筛查发现,miR-433、miR-221 和 miR-21 在 PTC 组高表达,miR-138、miR-26a 和 miR-709 在 PTC 组低表达,提示这些 miRNAs 可能参与 PTC 的发生,后续实验将针对 miRNAs 在 PTC 的分子机制进行进一步的研究。

参考文献:

[1] Jemal A,Clegg LX,Ward E,et al. Annual(下转第 1192 页)

HR 下降 24%，肺动脉平均压下降 11%。

垂体后叶素的有效成分是 AVP，罗哲等^[14]在重症监护病房对难治性休克患者使用小剂量垂体后叶素治疗。作者应用小剂量垂体后叶素($0.04 \text{ u} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)治疗体外循环后 VS，结果提示，能有效地提高外周血管阻力，维持患者血压和心排量，而且本组病例只有 2 例患者合用了去甲肾上腺素治疗，说明小剂量垂体后叶素治疗体外循环后 VS 具有确切的效果。使用外源性 AVP 可通过激活血管平滑肌上丰富的 V1 受体，增加细胞内 IP₃ 钙离子浓度，阻断钾离子通道、增强肾上腺素能的作用来达到收缩外周血管、维持血管张力的目的，从而改善血流动力学、保证重要脏器的血液灌注。而且在 A 组仅有 2 例患者合用了相对较低剂量去甲肾上腺素治疗取得良好效果，提示在体外循环后 VS 治疗中应用小剂量垂体后叶素后可以明显减少去甲肾上腺素的应用剂量，甚至可不用去甲肾上腺素治疗，这样可以降低心肌氧耗，保护心脏，减少恶性心血管事件的发生。

在本研究中，与 N 组相比，A 组患者治疗后尿量增加明显，且 Cr 较低，分析原因除了改善了肾的灌注外，与小剂量垂体后叶素对肾的作用有关。在肾脏的出球小动脉上，分布着垂体后叶素作用的 V1 受体，而入球小动脉则无此受体，因此 AVP 的血管收缩效应可增加肾小球滤过率，使尿量增加，从而可以改善肾功能。

垂体后叶素的不良反应发生原因主要与大剂量持续给药相关。陈宇星等^[15]收集总结了 238 例使用垂体后叶素的不良反应报道，发现主要不良反应为稀释性低钠血症，全部发生于应用垂体后叶素止血的患者。如果 24 h 累积垂体后叶素的用药量大于 90 u，可出现严重的不良反应。本研究使用 $0.04 \text{ u} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 的小剂量垂体后叶素，24 h 累积用药量远低于 90 u，而且没观察到尿量增加后稀释性低钠血症，也未发生缺血性皮肤损害，另外未发现其他心肌缺血、心肌梗死、室性心律失常等临床不良反应的发生。由此说明小剂量的垂体后叶素极少引发临床不良反应和并发症，并且垂体后叶素治疗还可以减少去甲肾上腺素的需要量，进而减少与之有关的不良反应。

综上所述，使用小剂量的垂体后叶素 ($0.04 \text{ u} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) 可使体外循环后 VS 患者的血流动力学稳定、保证重要脏器的血液灌注，改善肾功能，未见相关并发症。

参考文献：

[1] Gomes WJ, Carvalho AC, Palma J H, et al. Vasoplegic syndrome; a new dilemma[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 1994, 107(3): 942.

(上接第 1189 页)

report to the nation on the status of cancer, 1975-2001, with a special feature regarding survival [J]. Cancer, 2004, 101(1): 3.

[2] Coleman DL. Diabetes-obesity syndromes in mice[J]. Diabetes, 1982, 31 Suppl 1: S1.

[3] Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*[J]. Cell, 1993, 75(5): 843.

[4] 孙建国, 廖荣霞, 周度金, 等. 基于基因芯片的乳腺癌干细胞 miRNAs 检测分析[J]. 重庆医学, 2007, 36(13): 1280.

[5] He H, Jazdzewski K, Li W, et al. The role of miRNA

[2] Dünser MW, Westphal M. Arginine vasopressin in vasodilatory shock: effects on metabolism and beyond[J]. Curr Opin Anaesthesiol, 2008, 21(2): 122.

[3] Strohmenger HU, Krismer A, Wenzel V. Vasopressin in shock states[J]. Curr Opin Anaesthesiol, 2003, 6(2): 159.

[4] Gomes WJ, Carvalho AC, Palma J H, et al. Vasoplegic syndrome after open heart surgery[J]. Cardiovasc Surg, 1998, 39: 619.

[5] Edmunds LH Jr. Inflammatory response to cardiopulmonary bypass[J]. Ann Thorac Surg, 1998, 66 Suppl 5: S12.

[6] Downing SW, Edmunds LH Jr. Release of vasoactive substances during cardiopulmonary bypass[J]. Ann Thorac Surg, 1992, 54: 1236.

[7] Argenziano M, Chen JM, Choudhri AF, et al. Management of vasodilatory shock after cardiac surgery: identification of predisposing factors and use of a novel pressor agent [J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 1998, 116(6): 973.

[8] Gomes WJ, Carvalho AC, Palma JH, et al. Vasoplegic syndrome after open heart surgery[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 1998, 116(6): 619.

[9] 熊刚, 杨康, 廖克龙, 等. 体外循环术后血管麻痹综合征的临床观察[J]. 重庆医学, 2004, 33(12): 1767.

[10] 吴冰, 菅向东, 谢永胜. 心肺脑复苏中联合应用肾上腺素、血管加压素、纳洛酮效果观察[J]. 山东医学, 2009, 49(1): 65.

[11] Treschan TA, Peters J. The vasopressin system: physiology and clinical strategies[J]. Anesthesiology, 2006, 105(3): 599.

[12] Albright TN, Zimmerman MA, Selzman CH. Vasopressin in the cardiac surgery intensive care unit[J]. Am J Crit Care, 2002, 11(4): 326.

[13] Dunser MW, Mayr AJ, Tur A, et al. Ischemic skin lesions as a complication of continuous vasopressin infusion in catecholamine-resistant vaso dilatory shock: incidence and risk factors[J]. Crit Care Med, 2003, 31: 1394.

[14] 罗哲, 诸杜明, 吴肇光. 小剂量垂体后叶素治疗难治性休克[J]. 中国临床医学, 2007, 14(3): 394.

[15] 陈宇星, 陈志斌, 陈光, 等. 垂体后叶素致 SIADH 的临床研究[J]. 临床肺科杂志, 2006, 11(5): 6401.

(收稿日期: 2009-08-05 修回日期: 2009-10-27)

genes in papillary thyroid carcinoma[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(52): 19075.

[6] Mitomo S, Maesawa C, Ogasawara S, et al. Downregulation of miR-138 is associated with overexpression of human telomerase reverse transcriptase protein in human anaplastic thyroid carcinoma cell lines [J]. Cancer Sci, 2008, 99(2): 280.

[7] Visone R, Pallante P, Vecchione A, et al. Specific miRNAs are downregulated in human thyroid anaplastic carcinomas [J]. Oncogene, 2007, 26(54): 7590.

(收稿日期: 2009-11-04 修回日期: 2009-11-17)