

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.21.019

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20200725.1339.002.html\(2020-07-25\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20200725.1339.002.html(2020-07-25))

血清 circRNA 在 PTMC 及中央区颈部淋巴结转移的表达研究*

白超¹, 杨雯雯², 张丽^{3△}

(1. 新疆医科大学第一附属医院血管甲状腺外科, 乌鲁木齐 830063; 2. 新疆医科大学第二附属医院内分泌科, 乌鲁木齐 830063; 3. 三亚中心医院内分泌科, 海南三亚 572000)

[摘要] **目的** 探讨血清环状 RNA(circRNA)在甲状腺微小乳头状癌(PTMC)发生颈部淋巴结转移的表达水平。**方法** 选择 2018 年 11—12 月在新疆医科大学第一附属医院甲状腺外科手术经病理诊断为 PTMC 不伴颈部淋巴结转移(PTMC 组)和 PTMC 伴颈部淋巴结转移[PTMC(L)组]的患者各 6 例,均为女性。收集两组患者的静脉血,随机选取每组 3 例患者进行芯片检测,每组剩余 3 例进行芯片结果验证。经基因本体(Go)软件检测两组患者血清中差异表达 circRNA 的亲本基因分析,得出富集前 10 位的生物学过程、细胞组分和分子功能。通过 KEGG Pathway 分析差异表达基因富集前 10 位通路。采用 miRNA 结合位点预测软件对 hsa_circRNA_000121miRNA 结合位点进行预测。**结果** 经芯片检测 PTMC 与 PTMC(L)组患者中血清筛选差异表达 circRNA 共有 690 个,其中上调 400 个,下调 290 个。采用 miRNA 结合位点预测软件对 hsa_circRNA_000121 预测到的 5 个具有高匹配值的 miRNA 结合位点, MRE1、MRE2、MRE3、MRE4、MRE5 分别为 hsa-miRNA-6775-3p、hsa-miRNA-146b-3p、hsa-miRNA-3614-3p、hsa-miRNA-3139、hsa-miRNA-3064-5p。逆转录 PCR(RT-PCR)对 circRNA000121 结果验证表明,芯片结果和验证结果一致;与 PTMC 组比较,PTMC(L)组患者 hsa_circRNA_000121 表达水平上调 3.24 倍(3.24±0.38 vs. 1.01±0.15),差异有统计学意义($P<0.01$)。**结论** circRNA000121 在女性、PTMC 并中央区淋巴结转移的血清中高表达,后期需要进一步扩大样本量进行验证。

[关键词] 甲状腺微小乳头状癌;淋巴结转移;血清;环状 RNA;微小 RNA**[中图分类号]****[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2020)21-3587-05

Expression of serum circRNA in papillary thyroid microcarcinom and central region cervical lymph node metastasis*

BAI Chao¹, YANG Wenwen², ZHANG Li^{3△}

(1. Department of Vascular and Thyroid Surgery, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumchi, Xinjiang 830063, China; 2. Department of Endocrinology, Second Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumchi, Xinjiang 830063, China; 3. Department of Endocrinology, Sanya Central Hospital, Sanya, Hainan 572000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expression level of serum circularRNA (circRNA) in cervical lymph node metastasis of papillary thyroid microcarcinom (PTMC). **Methods** Each 6 cases of PTMC without cervical lymph node metastasis (PTMC group) and PTMC with cervical lymph node metastasis [PTMC(L) group] pathologically diagnosed by thyroid surgery in the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University from November to December 2018, all were females, were selected. The venous blood in the two groups was collected. Three cases were randomly selected from each group for conducting microarray detection, and the remaining 3 cases in each group conducted the microarray result verification. The parental gene analysis of the differentially expressed circRNA in serum of the two groups was detected by the gene ontology(Go) software. The biological processes, cell components and molecular functions in the top 10 of enrichments were obtained. The first 10 pathways of differentially expressed genes in enrichment were analyzed by KEGG Pathway. The miRNA binding site prediction software was adopted to predict the binding sites of hsa_circRNA_000121miRNA. **Results** A total of 690 differentially expressed circRNAs in serum of the PTMC and PTMC

* 基金项目:新疆维吾尔自治区卫生和计划生育委员会青年医学科技人才专项科研项目(WJWJ-201817);新疆维吾尔自治区卫生健康委员会青年医学科技人才专项科研项目(WJWY-2020:36)。 作者简介:白超(1981—),副主任医师、副教授,博士,主要从事甲状腺和血管疾病的诊治研究。 △ 通信作者, E-mail:1481538986@qq.com。

(L) groups were detected by microarray, in which 400 were up-regulated and 290 were down-regulated. The miRNA binding site prediction software was adopted to predict 5 miRNA binding sites with high matching value in has_circRNA_000121, the MRE1, MRE2, MRE3, MRE4, MRE5 were hsa-miRNA-6775-3p, hsa-miRNA-146b-3p, hsa-miRNA-3614-3p, hsa-miRNA-3139 and hsa-miRNA-3064-5p respectively. The results verification of RT-PCR on circRNA000121 showed that the microarray results were consistent with the verification results; compared with the PTMC group, the expression level of has_circRNA_000121 in the PTMC(L) group was up-regulated by 3.24 times (3.24 ± 0.38 vs. 1.01 ± 0.15), and the difference was statistically significant ($P < 0.01$). **Conclusion** CircRNA000121 is highly expressed in serum of women with PTMC and central region lymph node metastasis, the late stage needs to be verified by further expanding the sample size.

[Key words] papillary thyroid microcarcinoma; lymph node metastasis; serum; circularRNA; mircoRNA

甲状腺癌是常见的恶性肿瘤,近年来患病率呈持续增长,其中甲状腺微小乳头状癌(PTMC)增长速度最快。PTMC具有两个特征:一是发病率较高,进展缓慢,预后较好,属于“惰性”肿瘤;二是如发生颈部淋巴结转移,复发率高。对于PTMC的诊治,是选择定期复查、随访,还是即刻手术治疗,是临床医生需要思考的问题^[1]。本研究拟寻找一种简便、快捷、微创的方法,结合临床常规检查,在术前尽可能鉴别PTMC是否发生颈部淋巴结转移,为PTMC患者选择是否需要手术治疗提供依据。

环状RNA(circRNA)是一种单链、共价封闭的RNA。在哺乳动物的细胞中广泛存在^[2],并且较为稳定^[3],可以吸附miRNA^[4]。近年来,学术界对于circRNA与恶性肿瘤的相关性关注颇多,如circRNA和胃癌^[5]、宫颈癌^[6]、骨肉瘤^[7]等相关性研究。但circRNA在PTMC中的诊断价值和生物学功能仍然知之甚少。现有文献报道表明,在各类血细胞、血浆及血清中,有大量的circRNA表达^[8]。本研究收集PTMC伴颈部淋巴结转移和不伴颈部淋巴结转移的患者术前血清进行circRNA芯片检测,进一步明确PTMC伴颈部淋巴结转移患者血清circRNA表达谱,将circRNA芯片进行数据分析,选择表达差异较大的circRNA进行逆转录PCR(RT-PCR)验证,探讨PTMC发生颈部淋巴结转移的可能机制,以为PTMC是否发生颈部淋巴结转移的诊断提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选择2018年11—12月在新疆医科大学第一附属医院甲状腺外科行甲状腺全部切除并经病理诊断的PTMC不伴颈部淋巴结转移(PTMC组)和PTMC伴颈部淋巴结转移[PTMC(L)组]的患者各6例,均为女性,平均年龄(46.58 ± 7.18)岁。纳入标准:(1)年龄大于18岁;(2)女性;(3)均无甲状腺恶性肿瘤的家族史;(4)均无头颈部放射史;(5)均未无甲状腺手术史;(6)术前均未接受放、化疗。排除标准:(1)有甲状腺恶性肿瘤家族史;(2)有头颈部放射史;(3)术前已使用甲状腺素或抗甲状腺素药物;(4)术前因各种疾病行放、化疗;(5)肝、肾功能异常。

1.2 方法

1.2.1 采集患者血液标本

采集患者空腹静脉血5 mL,经离心得血清,低温保存。每组随机各选取3例患者血清标本,进行基因芯片检测;并对剩余的标本进行芯片检测结果的验证。

1.2.2 手术方式

PTMC的手术方式:将病变一侧的甲状腺全部切除,在手术进行中将病变甲状腺送快速病理检查,若病理检查报告是PTMC,在术中立即探查对侧甲状腺叶,若对侧甲状腺叶存在结节,则切除全部对侧甲状腺叶,根据淋巴结情况,进行选择清扫。将经手术切除的甲状腺和淋巴结组织送至该院病理诊断科,3 d内报告病理诊断。

1.2.3 circRNA表达谱芯片检测

全部委托于上海康成生物有限公司检测。(1)主要试剂: CyDyev Fluors 荧光染料购自美国 Healthcare 公司, RNA 扩增试剂盒购自美国 kiinina 公司, TRIZOL-LS 试剂购自美国 Invitrogen Life technologies 公司。(2)主要仪器、设备: 基因芯片杂交仪购自 Leica 公司, Agilent 扫描仪购自美国安捷伦科技有限公司, 计算机图像分析系统购自德国 Leica Qwi 公司, NanoDrop 1000 超微量分光光度仪购自美国 Thermo Scientific 公司。实验步骤:(1)提取血清总 RNA;(2)检测 RNA 质量;(3)测定 RNA 浓度;(4)检测总 RNA 的质量;(5)标记样品;(6)标记扩增后的 cRNA 并质量检查;(7)芯片预杂交;(8)配置杂交液;(9)芯片杂交。芯片监测使用显微镜观察切片,测量每个视野中阳性反应区域 AOD。

1.2.4 circRNA 芯片数据的生物信息学分析

委托上海康成生物有限公司分析。对两组患者血清中的 circRNA 表达谱芯片检测结果进行分析,再对 PTMC(L) 组患者血清标本存在差异表达的 circRNA 及亲本基因的功能分类、circRNA/微小 RNA(miRNA)、circRNA 参与的信号通路等进行观察。(1)筛选差异基因(DEGs);(2)聚类分析;(3)基因本体(GO)分析;(4)信号通路分析,采用京都基因和基因组百科全书(KEGG)数据库对两组患者 circRNA 的差异表达进行信号通路分析;(5)分析 circRNA/miRNA 结合位点;(6)预测 miRNA 靶基因。

1.2.5 RT-PCR 验证

委托乌鲁木齐市格林金诺生物科技有限公司,采

用 RT-PCR 原理进行验证。选择验证的 circRNA, 对 PTMC、PTMC(L) 组患者基因芯片进行检测, 根据两组患者 circRNA 差异表达的 Fold change 倍数和 P 值, 选取 1 个上调的 circRNA 进行 RT-PCR 验证。

1.3 统计学处理

数据采用 SPSS19.0 软件进行统计学分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验; 以 circRNA 芯片检测结果为基础, 筛选出大于 1.5 倍的基因, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, 将所有存在差异表达的基因导入 R 语言包, 得到 GO 分析和通路。

2 结果

2.1 两组患者基线资料比较

PTMC 组 3 例患者, 年龄分别为 40、49、53 岁, 平均 (47.33 ± 6.66) 岁; PTMC(L) 组 3 例患者年龄分别为 40、52、58 岁, 平均 (50.00 ± 9.17) 岁, 两组患者年龄比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.2 circRNA 表达谱芯片检测

2.2.1 RNA 浓度和纯度测定

PTMC 组 (1~3)、PTMC(L) 组 (1~3) 样品的 A_{260}/A_{280} 比值均为 1.21~1.68, 样品浓度为 198.66~251.61 ng/ μ L。

2.2.2 circRNA 的表达

芯片检测到了 12 900 个 circRNA 在研究对象的血清中表达, 见图 1。

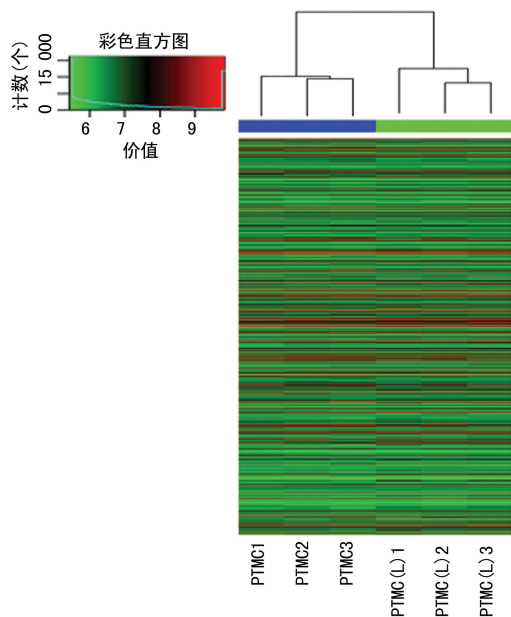


图 1 两组患者表达的 circRNA

2.2.3 差异 circRNA 的筛选

筛选出差异表达大于 1.5 倍的 circRNA 有 690, 其中上调的 400, 下调的 290。PTMC 与 PTMC(L) 组患者血清差异表达的 circRNA 散点图和火山图, 见图 2、3。

2.2.4 差异表达 circRNA 的亲本基因 GO 分析

对 PTMC(L) 组患者中差异表达上调的 circRNA 进行亲本基因 GO 分析, 并筛选出 Enrichment score 排名前 10 的分子功能、细胞组分和生物学过程, 见

图 4。

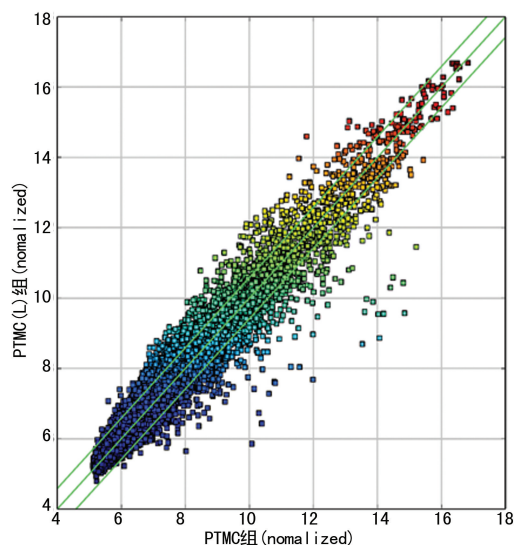


图 2 散点图

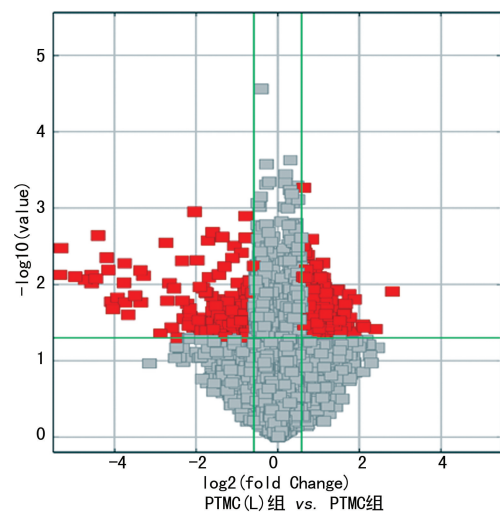


图 3 火山图

2.2.5 circRNA/miRNA 的结合位点分析

采用 miRNA 结合位点预测软件, 对 hsa_circRNA_000121 预测到的 5 个具有高匹配值的 miRNA 结合位点, MRE1、MRE2、MRE3、MRE4、MRE5 分别为 hsa-miRNA-6775-3p、hsa-miRNA-146b-3p、hsa-miRNA-3614-3p、hsa-miRNA-3139、hsa-miRNA-3064-5p。

2.2.6 信号通路分析

通过 KEGG 信号通路分析, 明确两组患者血清中差异表达基因的 Enrichment score 排名前 10 位的信号通路, 见图 5。

2.3 RT-PCR 验证

RT-PCR RNA 纯度分析显示, PTMC 组 (4~6)、PTMC(L) 组 (4~6) 患者的 A_{260}/A_{280} 的比值为 1.36~1.57, 样品浓度为 128.60~154.40 ng/ μ L。RT-PCR 结果显示, 芯片结果与骰结果一致; 与 PTMC 组比较, PTMC(L) 组患者 hsa_circRNA_000121 表达水平上调 3.24 倍 $(3.24 \pm 0.38 \text{ vs. } 1.01 \pm 0.15, P = 2.53E-11)$, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

Sig GO terms of DE gene

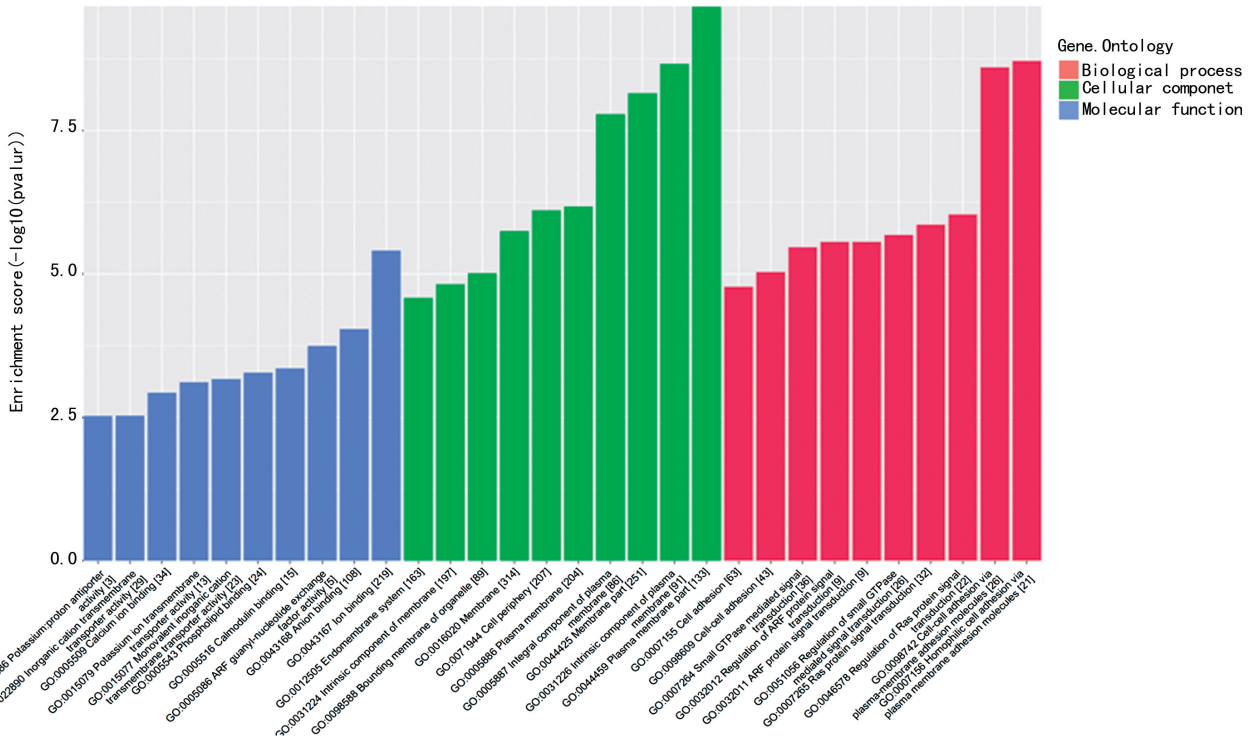


图 4 两组差异表达的 circRNA 亲本基因的 Go 富集分析

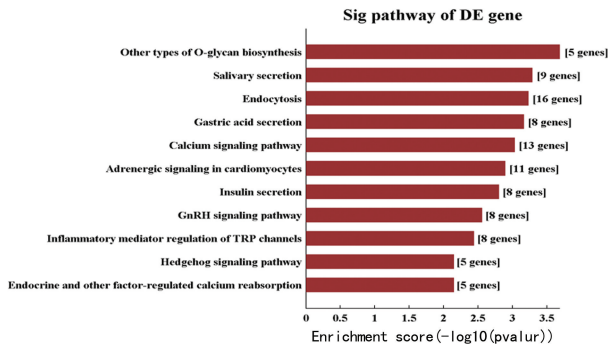


图 5 信号通路分析

3 讨论

circRNA 主要作用:(1)吸附 miRNA;(2)与蛋白结合相互作用;(3)参与多种信号通路。它可以作为 circRNA“海绵”吸附 miRNA,从而通过与内源性 RNAs 竞争的机制调控 miRNA 的下游靶基因^[9]。在肿瘤研究中,该作用已被广泛报道^[10-12]。与 miRNA 相比,circRNA 是研究者认为更为理想的生物学标志物,并为各类疾病的后续治疗提供新思路。

CAI 等^[13]发现 circBACH2 (hsa_circ_0001627) 在 PTC 组织和 PTC 细胞株中高表达。通过荧光原位杂交(FISH)技术、荧光素酶法和 ago2-rip 法,验证 circBACH2 可以与 miRNA-139-5p 直接相结合,并减轻 LIM-only4 对靶细胞的抑制作用,从而促进肿瘤的发展。该研究表明 circBACH2 可吸附 miRNA-139-5p,并可作为 PTC 的生物标志物,可为制订 PTC 的临床治疗提供依据。

BI 等^[14]研究表明,在 PTC 组织和细胞株中,circRNA_102171 表达上调。circRNA_102171 低表达抑制 PTC 细胞增殖、迁移和侵袭,并促进细胞凋亡。

circRNA_102171 过表达,将会通过 CTNNBIP1 依赖的方式激活 Wnt/ β -catenin 通路,以促进 PTC 发展。

本研究是以患者血清作为研究标本。血清最大的优点是采集时对人体创伤小,更容易接受,不会影响检测结果,可为外科医师术前判断 PTMC 是否发生转移提供理论支持。

本研究通过生物信息学手段分析得出两组患者存在差异表达的 circRNA 的线性 GO 分析,其中生物学过程(BP)、细胞组分(CC)及分子功能(MF),通过美国 Arraystar 公司的 miRNA 结合位点预测软件,对每个差异表达的 circRNA 预测 5 个高匹配值的 miRNA 结合位点。以 KEGG 数据库对存在差异表达的 circRNA 预测结合的与 PTMC 伴颈部淋巴转移相关的 miRNA 已验证靶基因的生物信号通路分析。根据 PTMC 不伴和伴颈部淋巴结转移的血清差异对比的倍数和 P 值,选取上调明显的 circRNA,即 hsa_circRNA_000121,并进行 RT-PCR 验证,RT-PCR 通过验证表明,芯片表达的结果与验证结果一致。

本研究表明,circRNA000121 高配位吸附的 hsa-miRNA-146b-3p 与甲状腺乳头状癌的发生、发展密切相关。HAN 等^[15]学者收集了 237 例甲状腺全切加中央区淋巴结清扫术的组织标本,均检测出 BRAFV600E 基因突变,并存在 miRNA-222、miRNA-146b-5p、miRNA-21、miRNA-204、miRNA-146b-3p、miRNA-221 和 miRNA-375 的相应表达。经 logist 回归分析得出:miRNA-146b-3p 高表达和 BRAFV600E 基因突变是甲状腺癌中央区淋巴结转移的独立危险因素。MiRNA-146b-3p 可以作为该类患者是否存在中央区淋巴结转移的生物学标志物,为临床医师提供理论依据是否清扫中央区淋巴结,也

为后期该类患者靶向药物治疗的灵敏度提供依据。根据本研究 and HAN 等^[15] 学者研究表明, hsa_circRNA_000121/hsa-miRNA-146b-3p 通路是 PTMC 发生颈部淋巴结转移的通路。

YU 等^[16] 研究者发现, 过度表达的 hsa-miRNA-146b-3p、hsa-miRNA-146b-5p 与乳头状甲状腺瘤 (PTC) 发生颈部淋巴结转移密切相关。hsa-miRNA-146b-3p 相比 miRNA-146b-5p 更能增强恶性肿瘤细胞的侵袭性和转移能力, 主要原因是前者可以抑制 NF2 基因表达, 以上均表明了 hsa-miRNA-146b-3p 在 PTC 是否发生转移的评估价值。该研究的结论, circRNA000121/hsa-miRNA-146b-3p/NF2 是 PTC 发生转移和侵袭性的重要通路, 后期可以进行进一步、大样本量的验证, 为后期靶向治疗提供依据。

本研究芯片检测和小样本验证表明, circRNA000121 在 PTMC 伴中央区淋巴结转移的血清中为高表达, 因验证的样本量较小, 后期可通过扩大样本量进行研究, 探讨 circRNA000121 是否可以成为 PTMC 并有中央区颈部淋巴结转移的生物学标志物。并验证 hsa_circRNA_000121/hsa-miRNA-146b-3p 是 PTMC 发生中央区颈部淋巴结转移的、重要的信号通路。

参考文献

- [1] SIDDIQUI S, WHITE M G, ANTIC T, et al. Clinical and pathologic predictors of lymph node metastasis and recurrence in papillary thyroid microcarcinoma[J]. *Thyroid*, 2016, 26(6):807-815.
- [2] LI J, YANG J, ZHOU P, et al. Circular RNAs in cancer: novel insights into origins, properties, functions and implications[J]. *Am J Cancer Res*, 2015, 5(2):472-480.
- [3] JECK W R, SHARPLESS N E. Detecting and characterizing circular RNAs[J]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(5):453-461
- [4] LEE Y J, KIM D W, PARK H K, et al. Pre-operative ultrasound diagnosis of nodal metastasis in papillary thyroid carcinoma patients according to nodal compartment[J]. *Ultrasound Med Biol*, 2015, 41(5):1294-1300.
- [5] DAI X, GUO X, LIU J, et al. Circular RNA circGRAMD1B inhibits gastric cancer progression by sponging miR-130a-3p and regulating PTEN and p21 expression[J]. *Aging*, 2019, 11(21):9689-9708.
- [6] CHEN R X, LIU H L, YANG L L, et al. Circular RNA circRNA_0000285 promotes cervical cancer development by regulating FUS[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(20):8771-8778.
- [7] PAN G, HU T, CHEN X, et al. Upregulation of circMMP9 promotes osteosarcoma progression via targeting miR-1265/CHI3L1 axis[J]. *Cancer Manag Res*, 2019, 11(10):9225-9231.
- [8] VEA A, LLORENTE-CORTES V, DE GONZALO-CALVO D. Circular RNAs in Blood[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1087:119-130.
- [9] NANA-SINKAM S P, CROCE C M. MicroRNA regulation of tumorigenesis, cancer progression and interpatient heterogeneity: towards clinical use[J]. *Genome Biol*, 2014, 15(9):445.
- [10] JU H, ZHANG L, MAO L, et al. Altered expression pattern of circular RNAs in metastatic oral mucosal melanoma[J]. *Am J Cancer Res*, 2018, 8(9):1788-1800.
- [11] WANG L, TONG X, ZHOU Z, et al. Circular RNA hsa_circ_0008305 (circPTK2) inhibits TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition and metastasis by controlling TIF1 γ in non-small cell lung cancer [J]. *Mol Cancer*, 2018, 17(1):140.
- [12] ZHUANG Z G, ZHANG J A, LUO H L, et al. The circular RNA of peripheral blood mononuclear cells: Hsa—circ—0005836 as a new diagnostic biomarker and therapeutic target of active pulmonary tuberculosis[J]. *Mol Immunol*, 2017, 90:264-272.
- [13] CAI X Y, ZHAO Z, DONG J N, et al. Circular RNA circBACH2 plays a role in papillary thyroid carcinoma by sponging miR-139-5p and regulating LMO4 expression [J]. *Cell Death Disease*, 2019, 10(184):963.
- [14] BI W, HUANG J Y, NIE C L, et al. CircRNA circRNA_102171 promotes papillary thyroid cancer progression through modulating CTNN-BIP1-dependent activation of β -catenin pathway [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1):275.
- [15] HAN P A, KIM H S, CHO S, et al. Association of BRAF V600E mutation and MicroRNA expression with central lymph node metastases in papillary thyroid cancer: a prospective study from four endocrine surgery centers[J]. *Thyroid*, 2016, 26(4):532-542.
- [16] YU C, ZHANG L, LUO D, et al. MicroRNA-146b-3p promotes cell metastasis by directly targeting NF2 in human papillary thyroid cancer[J]. *Thyroid*, 2018, 28(12):1-41.