

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.11.008

文章编号: 1005-8982(2019)11-0041-06

乳头状甲状腺癌中 microRNA-599、BRD4 表达 及与临床病理特征和预后的关系

赖明华¹, 杨岚淞²

(云南省第一人民医院 1. 乳腺甲状腺外科, 2. 消毒供应中心, 云南 昆明 650032)

摘要: **目的** 研究乳头状甲状腺癌(PTC)中 microRNA-599(miR-599)、含溴结合域蛋白(BRD4)表达及与临床病理特征和预后的关系。**方法** 选取2005年5月—2007年3月云南省第一人民医院接受甲状腺手术的 PTC 患者 52 例。其中癌旁正常甲状腺组织 41 例, 分离癌变组织和癌旁正常组织, 分别检测组织中 miR-599 和 BRD4 的相对表达量, 分析癌变组织中 miR-599 和 BRD4 表达与患者临床病理特征和预后的关系。**结果** PTC 患者癌变组织和癌旁正常组织中 miR-599、BRD4 的相对表达量差异有统计学意义($P < 0.05$); miR-599、BRD4 相对表达量在不同 TNM 分期、肿瘤直径、肿瘤侵犯包膜、淋巴结转移患者中的差异有统计学意义($P < 0.05$); miR-599、BRD4 高表达和低表达患者 5 及 10 年生存率差异有统计学意义($P < 0.05$); miR-599 与 BRD4 的相对表达量呈负相关($r = -0.872, P = 0.000$)。**结论** miR-599 和 BRD4 与 PTC 发生、发展及预后密切相关, 对临床诊断和治疗 PTC 及预测预后有重要意义。

关键词: 甲状腺肿瘤; microRNA-599; 含溴结合域蛋白/蛋白; 病理学, 临床; 预后

中图分类号: R736.1

文献标识码: A

Clinical significance of microRNA-599 and BRD4 in papillary thyroid carcinoma

Ming-hua Lai¹, Lan-song Yang²

(1. Department of Breast and Thyroid Surgery, 2. Sterilization and Supply Centre, The First People's Hospital of Yunnan Province, Kunming, Yunnan 650032, China)

Abstract: Objective To study the expression and clinical significance of miR-599 and bromodomain-containing protein (BRD4) in papillary thyroid carcinoma (PTC). **Methods** A total of 52 PTC patients who received thyroid surgery in our hospital from May 2005 to March 2007 were selected. Totally 41 cases of para-cancer normal tissue as well as cancerous tissues were utilized for determination of expression of miR-599 and BRD4. Relationship between the expressions of miR-599 and BRD4 and clinicopathological features was analyzed. **Results** The relative expression of miR-599 and BRD4 in cancerous tissues was significantly different when compared with adjacent normal tissues ($P < 0.05$). Expressions of miR-599 and BRD4 were closely correlated with TNM stage, tumor diameter, invasion of tumor capsule, and lymph node metastasis ($P < 0.05$). The 5-year and 10-year survival rates in patients with high expression of miR-599 or BRD4 were significant varied from those in patients with low expression of miR-599 or BRD4 ($P < 0.05$). Expressions of miR-599 was negatively correlated with BRD4 ($r = -0.872, P = 0.000$). **Conclusions** MiR-599 and BRD4 are closely related to the occurrence, development and prognosis of PTC, which may be prognostic biomarkers.

Keywords: thyroid neoplasms; microRNA-599; bromodomain-containing protein/protein; pathology, clinics; prognosis

收稿日期: 2018-12-19

[通信作者] 杨岚淞, E-mail: 1720505682@qq.com; Tel: 15877903163

乳头状甲状腺癌 (papillary thyroid carcinoma, PTC) 是甲状腺癌最常见的分化类型, 约占甲状腺癌发生的 85%, 具有肿瘤生长缓慢、恶化程度低、潜伏时间长等特点^[1]。近年来, PTC 发病率呈上升趋势, 虽然在其治疗方面取得了进展, 但其存活率仍存在进一步改善的可能。明确高危病变临床有用预测因子是诊断和治疗惰性和侵袭性疾病的关键^[2]。MicroRNA (miRNA) 是具有调节功能和显著组织特异性的小 RNA 分子, 能够调节若干通路的多个靶标, 常在癌症中异常表达, 已成为一类癌症诊断、治疗及预后判断的新型生物标志物^[3]。大量研究表明, 多个 miRNAs 如 miR-34a、miR-146b、miR-31、miR-221、miR-21 等在 PTC 中过量表达, 与 PTC 发生及预后有关^[4]。但 miR-599 在 PTC 中表达水平及与 PTC 关系鲜有报道。溴结构域蛋白 4 (bromodomain-containing protein 4, BRD4) 是 BET 家族主要成员之一, 在多种疾病的发生、发展中发挥重要作用。研究报道, 抑制 BRD4 表达可以影响肿瘤细胞生物活性, 减缓肿瘤生长^[5]。因此, 本研究旨在分析 miR-599 和 BRD4 在 PTC 癌变组织中的相对表达量及其与 PTC 发生、发展及预后的关系, 以期为诊断和治疗 PTC, 改善患者预后提供参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2005 年 5 月—2007 年 3 月云南省第一人民医院接受甲状腺手术的 PTC 患者 52 例作为研究对象。其中, 男性 14 例, 女 38 例; 年龄 27 ~ 45 岁, 平均 (35.13 ± 7.02) 岁; 癌旁正常甲状腺组织 41 例。根据美国癌症联合委员会癌症分期手册中分化型甲状腺癌 TNM 分期标准^[6]: I 期 24 例, II 期 15 例, III 期 8 例, IV 期 5 例。每例患者切除甲状腺后, 立即留取肿瘤组织和癌旁正常甲状腺组织 (距肿瘤 1 cm 处正常甲状腺组织), 置于液氮中冷冻保存。纳入标准: ①所有患者符合甲状腺结节和分化型甲状腺癌诊疗指南中 PTC 诊断标准^[7]; ②病灶 >5 mm; ③均行全甲状腺切除手术; ④经本院医学伦理委员会批准, 所有患者及其家属知情并自愿签署同意书。排除标准: ①其他分化型甲状腺癌, 如滤泡状癌、未分化癌和髓样癌; ②有其他脏器肿瘤; ③术前因其他肿瘤进行过放化疗治疗; ④有既往颈部手术史。

1.2 试剂与序列

RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒、蛋白提取

试剂盒均购自大连宝生物工程有限公司, BCA 蛋白浓度检测试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司, BRD4 抗体和 GAPDH 抗体购自美国 Cell Signaling 公司, ECL 超敏发光液和 Western blotting 一抗稀释液购自江苏碧云天生物技术研究, 逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 引物在生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。miR-599 正向引物: 5'-GUU GUGUCAGUUUAUCAAAAC-3', 反向引物: 5'-CTCCTAT CGCACTTTAATCTCTAACT-3'; 内参 U6 snRNA 正向引物: 5'-GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT-3', 反向引物: 5'-CGCTTCACGAATTTGCGTGTGCAT-3'; BRD4 正向引物: 5'-GTGGGAGGAAAGAAACAGGGACA-3', 反向引物: 5'-AGGAGGAGGATTCGGCTGAGG-3'; 内参 GAPDH 正向引物: 5'-TCAAGAAGCTGCTGAAGCA G-3', 反向引物: 5'-CGTCAAAGGTGGAGGAGTG-3'。

1.3 方法

1.3.1 RNA 和蛋白提取 取液氮中保存的甲状腺肿瘤组织和正常组织, 研磨, 组织总 RNA 和总蛋白的提取采用试剂盒法, 纯化后采用分光光度仪 (美国贝克曼库尔特有限公司) 检测总 RNA 浓度和纯度, 提取 RNA 溶液 A260/A280 值 >1.8 可用于后续检测, 同时采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒检测提取纯化后蛋白浓度。

1.3.2 RT-PCR 提取总 RNA 溶液经稀释后, 用于逆转录生成 cDNA, 以 cDNA 为模板进行 RT-PCR 检测 miR-599 相对表达量, 以 U6 snRNA 为内参对照, RT-PCR 扩增总体系 20 μl, Mix 10 μl, 正反向引物各 1 μl, 模板 2 μl, DEPC 水 6 μl。RT-PCR 程序: 95℃预变性 15 min, 95℃变性 15 s, 60℃退火 1 min 循环扩增, 共 40 个循环。每个样本重复 3 次。

1.3.3 Western blotting 取蛋白样品, 经电泳、转膜、封闭、洗膜后, 分别加入 BRD 抗体和 GAPDH 抗体稀释溶液中, 4℃、低速震荡条件下, 孵育过夜。取出后用 15 ml TBST 冲洗 3 次, 10 min/次。冲洗后, 将膜放于辣根过氧化物酶标记的牛抗鼠第二抗体 IgG 孵育液中, 震荡孵育 1 h, 取出后用 15 ml TBST 冲洗 3 次, 10 min/次。最后, 将膜放入 ECL 显影液中, 充分接触 3 ~ 5 min, UVP 凝胶成像仪中曝光、拍照。

1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 17.0 统计软件, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较采用 *t* 检验, 计数资料以例 (%) 表示, 比较采用 χ^2 检验, 绘制 Kaplan-

Meier 生存曲线, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-599、BRD4 在 PTC 组织中的表达

癌变组织中 miR-599 相对表达量与正常组织中 miR-599 相对表达量比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 癌变组织低于正常组织 (见表 1); 癌变组织中 BRD4 相对表达量与正常组织中 BRD4 相对表达量比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 癌变组织高于正常组织 (见表 1 和图 1)。

2.2 miR-599、BRD4 相对表达量与 PTC 临床病理特征的关系

TNM 分期晚的患者 miR-599 相对表达量低于分期早的患者 ($P < 0.05$), TNM 分期晚的患者 BRD4 相对表达量高于分期早的患者 ($P < 0.05$); 肿瘤直径 > 1 cm 患者 miR-599 相对表达量低于肿瘤直径 ≤ 1 cm 患者 ($P < 0.05$), 肿瘤直径 > 1 cm 患者 BRD4 相对表达量高于肿瘤直径 ≤ 1 cm 患者 ($P < 0.05$); 肿瘤侵犯包膜患者 miR-599 相对表达量低于肿瘤未侵犯包膜患者 ($P < 0.05$), 肿瘤侵犯包膜患者 BRD4 相对表达量高于肿瘤未侵犯包膜患者 ($P < 0.05$); 淋巴结转移患者 miR-599 相对表达量低于无淋巴结转移患者 ($P < 0.05$), 淋巴结转移患者 BRD4 相对表达量高于无淋巴结转移患者 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 1 miR-599、BRD4 在癌变组织和正常组织中的相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	miR-599	BRD4
癌变组织	52	0.88 ± 0.10	4.57 ± 1.27
正常组织	41	3.12 ± 0.84	1.25 ± 0.31
t 值		19.086	18.200
P 值		0.000	0.000

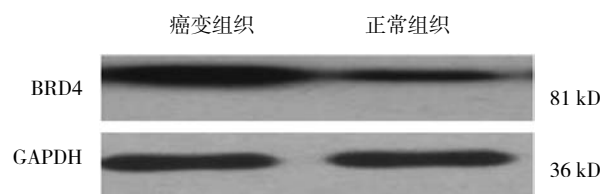


图 1 BRD4 蛋白相对表达量

2.3 miR-599、BRD4 相对表达量与预后关系

miR-599 和 BRD4 相对表达量以癌变组织中平均表达量值为界, 分为高水平和低水平。高水平患者 miR-599 和 BRD4 与低水平患者比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。高水平 miR-599 患者 5 和 10 年病死率均低于低水平患者; 高水平 BRD4 患者 5 和 10 年病死率均高于低水平者。见表 3 和图 2。

2.4 miR-599、BRD4 相对表达量相关性分析

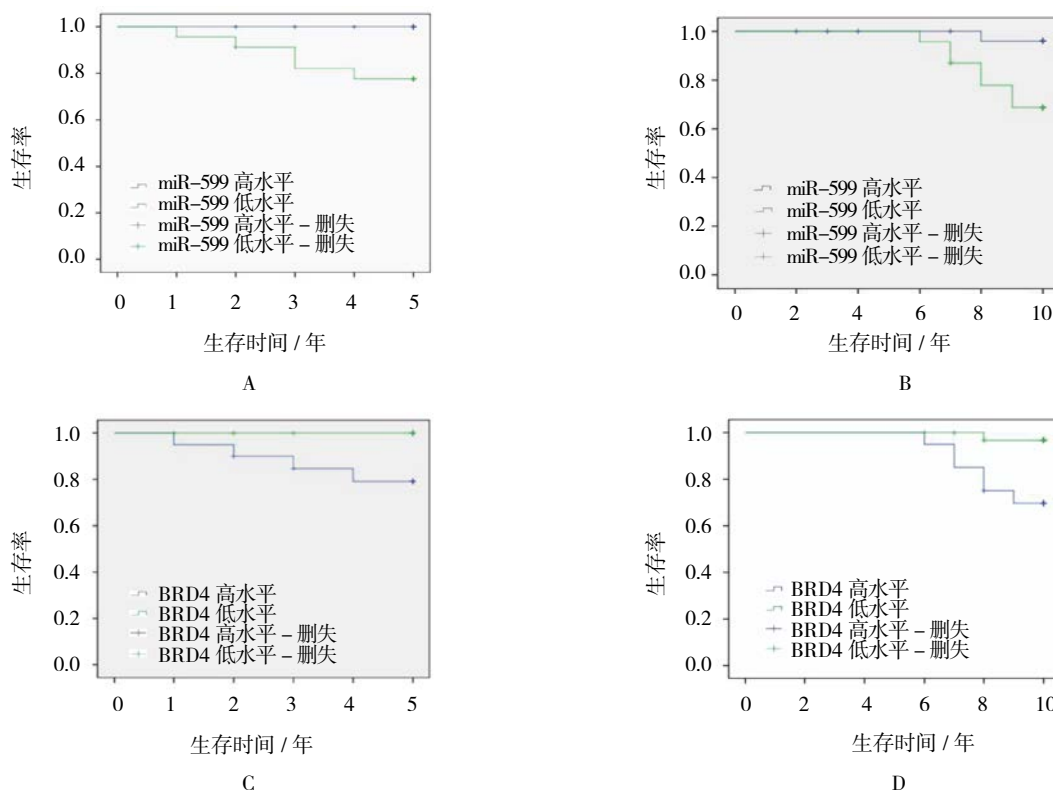
PTC 癌变组织中 miR-599 与 BRD4 相对表达量呈负相关 ($r = -0.872$, $P = 0.000$)。见图 3。

表 2 PTC 临床病理参数与 miR-599、BRD4 相对表达量的关系

临床病理参数	n	miR-599	t 值	P 值	BRD4	t 值	P 值
TNM 分期							
I、II	39	1.09 ± 0.13	8.652	0.000	4.36 ± 1.16	2.216	0.031
II、III	13	0.81 ± 0.09			5.17 ± 1.08		
肿瘤直径							
> 1 cm	19	0.83 ± 0.08	5.583	0.000	5.09 ± 1.07	2.583	0.013
≤ 1 cm	33	0.98 ± 0.10			4.27 ± 1.12		
侵犯包膜							
有	17	0.82 ± 0.06	2.910	0.005	5.26 ± 0.91	3.207	0.002
无	35	0.91 ± 0.12			4.23 ± 1.16		
淋巴结转移							
有	24	0.81 ± 0.07	4.985	0.000	5.29 ± 0.89	4.457	0.000
无	28	0.94 ± 0.11			3.95 ± 1.22		

表 3 miR-599、BRD4 相对表达量与预后关系 例 (%)

因素	n	5 年病死率	10 年病死率	因素	n	5 年病死率	10 年病死率
miR-599				BRD4			
高水平	29	0 (0.00)	1 (3.45)	高水平	20	4 (20.00)	6 (30.00)
低水平	23	5 (21.74)	7 (30.43)	低水平	32	0 (0.00)	1 (3.13)
χ^2 值		4.698	5.253	χ^2 值		4.403	5.498
P 值		0.000	0.022	P 值		0.036	0.019



A: miR-599 5 年生存曲线; B: miR-599 10 年生存曲线; C: BRD4 5 年生存曲线; D: BRD4 10 年生存曲线

图 2 miR-599、BRD4 相对表达量高水平组和低水平组生存曲线

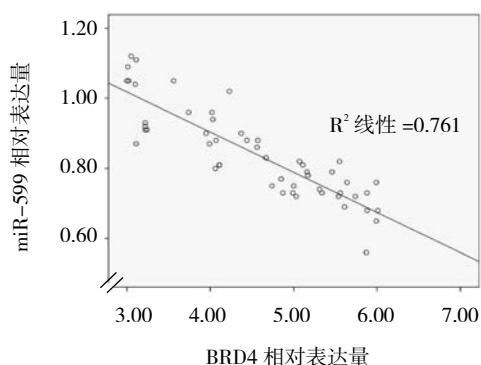


图 3 miR-599、BRD4 相对表达量相关性分析

3 讨论

PTC 是甲状腺组织中最常见的恶性肿瘤,受激素、遗传、环境等因素影响,在基因方面,PTC 的特征是

通过激活 BRAF 和 RET/PTC 基因重组中的基因突变而改变 RET/PTC-RAS-BRAF 信号传导途径^[8]。正常细胞中基因表达受到复杂基因调控网络的高度调控,其调控网络被阻断或异常过量表达则可能引发各种疾病,包括癌症^[9]。miRNA 是一类长度约为 20 ~ 24 个核苷酸的非编码单链小 RNA,参与基因转录后表达调控,一个 miRNA 可以同时调控多个靶基因,多个 miRNA 也可以调控同一个基因^[10]。miRNAs 通过干扰蛋白表达,调控细胞增殖、分化和凋亡,通常导致转录抑制或靶基因降解和基因沉默,越来越多的研究表明,miRNAs 异常表达与癌症发生相关,表现出在正常组织和肿瘤组织中表达量不同^[11]。戴璇璇等^[12]采用基因芯片技术和 RNA 印记杂交法检测 PTC 甲状腺组

织中 miRNA 表达水平, 结果显示 miR-34a、miR-146b、miR-31、miR-221、miR-21 在 PTC 甲状腺肿瘤组织中过表达, 并提示 miR-221 和 miR-146 在 PTC 预后预测中具有重要作用。SUN 等^[13] 研究报道, miR-146a 和 miR-146b 在甲状腺组织中过量表达与 PTC 发生及恶化有关, 可能是 PTC 潜在的生物标志。PERDAS 等^[14] 研究发现, let-7 miRNA 能够抑制肿瘤 RAS 基因表达, 起到抑制肿瘤作用, 可作为 PTC 的新型诊断、治疗、监测及预后标志物。李桂荣等^[15] 研究报道, miR-221 和 miR-222 在 PTC 癌变组织中过表达, 与 PTC 肿瘤侵犯包膜、局部淋巴结转移等相关, miR-221 和 miR-222 对 PTC 临床诊断、治疗及预后有指导意义。

目前, miR-599 已被发现在肝细胞癌和乳腺癌中表达下调。TIAN 等^[16] 研究报道, hsa-miR-599 在肝细胞癌中表达下降, 而 hsa-miR-599 过表达可通过抑制靶基因 MYC 抑制肝癌细胞增殖、迁移和侵袭, 提示 hsa-miR-599 可以作为肝细胞癌诊断和治疗的生物标志物。但 miR-599 在 PTC 中表达尚未见报道。本研究采用 RT-PCR 检测 PTC 甲状腺癌变组织和癌旁正常组织中 miR-599 的相对表达量, miR-599 在 PTC 癌变组织中相对表达量低于正常组织。miR-599 相对表达量与患者病理特征关系分析结果表明, miR-599 相对表达量在 PTC 患者 TNM 分期、肿瘤直径、肿瘤有无侵犯包膜、淋巴结是否转移方面存在差异, 与在肝细胞癌和乳腺癌中表达趋势相同, 说明 miR-599 相对表达量与 PTC 发生、发展相关。miR-599 相对表达量高水平患者 5 和 10 年病死率均显著低于 miR-599 相对表达量低水平患者, 说明 miR-599 相对表达量影响患者预后。

BRD4 是 BET 家族成员, 可以通过结合乙酰化组蛋白而影响下游基因转录, 加快肿瘤细胞生长, 许多研究已证实, BRD4 抑制剂可以导致癌细胞周期停滞或凋亡, 是癌症治疗的新靶点^[17-18]。有研究报道, BRD4 在膀胱癌癌变组织中过量表达, 通过上调 C-myc 正向调节 EZH2, 促进癌细胞增殖, 而抑制 BRD4 能够减少癌细胞增殖, 同时促进癌细胞凋亡, 提示 BRD4 是一种干扰转录程序治疗癌症的新型药理治疗靶点。在小细胞肺癌中 BRD4 有同样的表达趋势^[19]。在甲状腺癌中, GAO 等^[20] 研究报道, BRD4 在甲状腺癌组织和细胞系中上调, 而抑制 BRD4 表达可导致癌细胞周期停滞, 增强患者碘摄取进而抑制肿瘤生长。本研究结果, BRD4 在 PTC 癌变组织中相对表达量高于正常组织,

BRD4 相对表达量在 PTC 患者 TNM 分期、肿瘤直径、肿瘤有无侵犯包膜、淋巴结是否转移有差异, 且 BRD4 相对表达量高水平患者 5 和 10 年病死率高于 BRD4 相对表达量低水平患者, 与 GAO 等研究趋势一样, 说明 BRD4 与 PTC 发生、发展及预后密切相关。WANG 等^[21] 研究报道, hsa-miR-599 在乳腺癌中通过下调 BRD4 抑制乳腺癌细胞增殖、生长。本研究对 PTC 癌变组织中 miR-599 和 BRD4 相对表达量的相关性分析结果, PTC 癌变组织中 miR-599 和 BRD4 相对表达量呈负相关, 说明 miR-599 和 BRD4 在 PTC 中也可能存在相互作用关系。

综上所述, miR-599 在 PTC 癌变组织中下调, BRD4 在 PTC 癌变组织中上调, 可能参与 PTC 患者癌细胞增殖、分化、转移, 影响患者预后, 可作为临床诊断、治疗 PTC, 预测患者预后的靶基因。本研究初步分析 miR-599 和 BRD4 在 PTC 癌变组织中的相对表达趋势, 而对其作用机制尚不完全清楚, 因此需进一步研究 miR-599 和 BRD4 影响 PTC 患者临床病理特征及对 PTC 癌细胞生物活性的作用机制。

参 考 文 献:

- [1] 陈传新, 胡春洪, 马岩, 等. 乳头状甲状腺癌的 CT 表现与病理对照分析[J]. 中国 CT 和 MRI 杂志, 2015, 13(8): 30-32.
- [2] REYESGIBBY C C, MELKONIAN S C, WANG J, et al. Identifying novel genes and biological processes relevant to the development of cancer therapy-induced mucositis: An informative gene network analysis[J]. PLoS One, 2017, 12(7): e0180396.
- [3] LIN S, GREGORY R I. MicroRNA biogenesis pathways in cancer[J]. Nature Reviews Cancer, 2015, 15(6): 321-333.
- [4] LEONARDI G C, CANDIDO S, CARBONE M, et al. microRNAs and thyroid cancer: biological and clinical significance (Review)[J]. International Journal of Molecular Medicine, 2012, 30(5): 991-999.
- [5] DELMORE J E, ISSA G C, LEMIEUX M E, et al. BET bromodomain inhibition as a therapeutic strategy to target c-Myc[J]. Cell, 2011, 146(6): 904-917.
- [6] EDGE S B, COMPTON C C. The American joint committee on cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM[J]. Annals of Surgical Oncology, 2010, 17(6): 1471-1474.
- [7] 中华医学会内分泌学分会, 中华医学会外科学分会内分泌学组, 中国抗癌协会头颈肿瘤专业委员会, 等. 甲状腺结节和分化型甲状腺癌诊治指南[J]. 中华核医学与分子影像杂志, 2013, 33(2): 96-115.
- [8] SUN YI CHOI, HEONSOO PARK, MYUNG KOO KANG, et al. The relationship between the BRAF V600E, mutation in papillary thyroid microcarcinoma and clinicopathologic factors[J]. World

- Journal of Surgical Oncology, 2013, 11(1): 1-5.
- [9] 钟晓明, 申晴, 彭继光, 等. 在恒河猴基因组学框架下研究人类演化与调控 [J]. 生命科学, 2017, 29(3): 230-236.
- [10] GUZZI P H, MARTINO M T D, TAGLIAFERRI P, et al. Analysis of miRNA, mRNA, and TF interactions through network-based methods[J]. Eurasip Journal on Bioinformatics & Systems Biology, 2015, 2015(1): 4-8.
- [11] 李登云, 张德礼. 病毒编码 miRNA 与宿主免疫 [J]. 中国免疫学杂志, 2014, 30(4): 558-561.
- [12] 戴璇璇, 周毅力, 刘超, 等. miRNAs 在甲状腺乳头状癌中的表达及临床病理意义 [J]. 浙江医学, 2013, 35(20): 1802-1806.
- [13] SUN M, FANG S, LI W, et al. Associations of miR-146a and miR-146b expression and clinical characteristics in papillary thyroid carcinoma[J]. Cancer Biomarkers, 2015, 15(1): 33-40.
- [14] PERDAS E, STAWSKI R, NOWAK D, et al. The Role of miRNA in papillary thyroid cancer in the context of miRNA Let-7 family[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2016, 17(6): 909-912.
- [15] 李桂荣, 赵清侠, 宋斌, 等. miR-221 与 miR-222 在甲状腺乳头状癌组织中的表达及临床意义 [J]. 现代检验医学杂志, 2017, 32(1): 41-44.
- [16] TIAN J, HU X, WEI G, et al. Identification a novel tumor-suppressive hsa-miR-599 regulates cells proliferation, migration and invasion by targeting oncogenic MYC in hepatocellular carcinoma[J]. American Journal of Translational Research, 2016, 8(6): 2575-2584.
- [17] ZOU Z, HUANG B, WU X, et al. Brd4 maintains constitutively active NF- κ B in cancer cells by binding to acetylated RelA[J]. Oncogene, 2014, 33(18): 2395-2404.
- [18] WU X, LIU D, TAO D, et al. BRD4 regulates EZH2 transcription through upregulation of C-MYC and represents a novel therapeutic target in bladder cancer[J]. Molecular Cancer Therapeutics, 2016, 15(5): 1029-1042.
- [19] LENHART R, KIROV S, DESILVA H, et al. Sensitivity of small cell lung cancer to BET inhibition is mediated by regulation of ASCL1 gene expression[J]. Molecular Cancer Therapeutics, 2015, 14(10): 2167-2174.
- [20] GAO X, WU X, XIAO Z, et al. Inhibition of BRD4 suppresses tumor growth and enhances iodine uptake in thyroid cancer[J]. Biochemical & Biophysical Research Communications, 2016, 469(3): 679-685.
- [21] WANG Y, SUI Y, ZHU Q, et al. Hsa-miR-599 suppresses the migration and invasion by targeting BRD4 in breast cancer[J]. Oncology Letters, 2017, 14(3): 3455-3462.

(张西倩 编辑)