

甲状腺乳头状癌 mir-221 表达与 BRAF 突变的相关性研究

刘超,戴璇璇,周毅力,苏星韵,张筱晔,王瓯晨
(温州医学院附属第一医院,浙江 温州 325000)

摘要: [目的] 探讨甲状腺乳头状癌(PTC)中 mir-221 表达和 BRAF 基因状态的相关性和临床意义。[方法] 采用 RNA 核酸印迹(Northern blot)法检测 43 例 PTC 癌组织及其癌旁正常组织中 mir-221 表达,直接测序法检测 PTC 癌组织中 BRAF 基因状态,分析 mir-221 表达和 BRAF 基因状态的相关性及其与临床病理特征的关系。[结果] mir-221 在 PTC 癌组织中的表达显著高于配对正常组织(中位值:0.855 vs 0.549, $P<0.001$);mir-221 高表达与临床分期($P=0.002$)及淋巴结转移($P=0.042$)有关。BRAF 基因在 PTC 癌组织中的突变率为 53.49%(23/43)。突变型 BRAF 的甲状腺癌患者组 mir-221 表达显著高于野生型 BRAF 患者组($P=0.024$)。[结论] mir-221 与 BRAF 基因在 PTC 的发生、发展过程中起重要作用,mir-221 表达升高与 BRAF 基因突变有一定相关性。

关键词: 甲状腺肿瘤;mir-221;BRAF;基因突变

中图分类号: R736.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0242(2012)04-0298-05

Correlation between mir-221 Expression and BRAF Mutation in Papillary Thyroid Cancer

LIU Chao, DAI Xuan-xuan, ZHOU Yi-li, et al.

(The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the correlation between mir-221 expression and BRAF mutation and their clinical significance in papillary thyroid cancer(PTC). [Methods] The mir-221 expression of specimens obtained from 43 cases with PTC and cancer adjacent tissues were examined by Northern blot. The status of BRAF of PTC was analyzed by direct DNA sequencing. The correlation between mir-221 expression and BRAF status with clinicopathologic features was analyzed. [Results] The expression of mir-221 in tumor tissues was significantly higher than that in normal thyroid tissues (median 0.855 vs. 0.549, $P<0.001$). The overexpression of mir-221 was correlated with TNM staging ($P=0.002$) and LN metastasis ($P=0.042$). BRAF mutation was found 53.49%(23/43) in all cases. The expression of mir-221 was significantly higher in BRAF mutation group than that in wild type group ($P=0.024$). [Conclusion] mir-221 and BRAF play an important role in carcinogenesis and progression of PTC. The overexpression of mir-221 may correlate with the BRAF mutation in PTC.

Key words: papillary thyroid carcinoma; mir-221; BRAF mutation

小分子 RNA(microRNA)为非编码的短链 RNA (19~23nt),通过抑制靶基因的蛋白表达,在肿瘤发生、发展中起重要作用^[1]。He 等^[2]通过基因微阵列方式在甲状腺乳头状癌 (papillary thyroid cancer, PTC) 中发现了 5 个过度表达的 microRNA,其中以 mir-221 最为显著。在其他肿瘤的研究中,如肝癌、前列腺癌、胶质瘤、胰腺癌等也有报道 mir-221 过度表

达^[3-5]。除 microRNA 外,基因事件在癌症的发生、发展过程中也起着重要作用,BRAF 蛋白是丝裂原活化蛋白激酶通路(MAPK)中的一种丝/苏氨酸蛋白激酶,2002 年 Davies 等^[6]首次报道多种癌细胞株中存在 BRAF 基因突变,如黑色素瘤、结肠癌、肝癌、胶质瘤等,随后在 PTC 中也发现存在 BRAF 基因突变^[7]。鉴于 mir-221 表达与 BRAF 基因突变在 PTC 发生、发展过程中的相关性以及临床意义仍存在较大的争议^[8,9],我们用 Northern blot 法检测 43 例 PTC 癌

收稿日期:2011-12-16;修回日期:2012-02-24

基金项目:浙江省自然科学基金资助项目(Y207526)

通讯作者:王瓯晨,E-mail: woc099@sina.com

组织及相应的癌旁正常组织中 mir-221 的表达水平,焦磷酸测序法检测 PTC 癌组织中 BRAF 基因状态,分析 mir-22 表达与 BRAF 基因状态的相关性及在甲状腺癌中的临床意义。

1 资料与方法

1.1 研究对象

2009 年 1 月至 2010 年 12 月在温州医学院附属第一医院肿瘤外科行甲状腺手术且术后病理诊断均为甲状腺乳头状癌的 43 例患者,组织病理类型的判断标准参照 2007 版 AJCC 甲状腺肿瘤的病理学分类。所有患者无明显放射接触史,均签署临床标本采集知情同意书。男性 16 例(中位年龄 39 岁,年龄 22~71 岁),女性 27 例(中位年龄 43 岁,年龄 16~69 岁);I~II 期 31 例,III~IV 期 12 例;7 例患者因术前体检及辅助检查提示无颈淋巴结肿大仅行甲状腺单侧腺叶切除术或全切术,36 例行颈淋巴结清扫术,其中 26 例患者有淋巴结转移。每例标本留取肿瘤组织及配对的距癌 1cm 以上的癌旁正常甲状腺组织(经病理学证实),离体后 10min 内置于液氮保存留待实验。每例标本肿瘤组织的石蜡组织取自于温州医学院附属第一医院病理科相应的石蜡标本。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂

Trizol 试剂购自美国 Invitrogen 公司;PCR 体系试剂购自 Takara;PCR 产物纯化试剂盒购自 Qiagen 公司;Northern 杂交系列试剂及抗地高辛抗体购自 Roche 公司;石蜡组织 DNA 提取试剂盒购自 Qiagen 公司;引物由上海英骏生物技术有限公司合成。

1.2.2 实验方法

总 RNA 提取:取液氮保存的甲状腺乳头状癌及对应癌旁正常甲状腺组织标本,在液氮中碾碎至粉状,按 Trizol 试剂说明书提取总 RNA,DEPC 处理过的蒸馏水溶解。采用 Thermo 公司分光光度检测 RNA 溶液 A260/A280 吸光值,计算 RNA 浓度和纯度,A260/A280 比值>1.8 方可用于检测,1%琼脂糖变性凝胶电泳检测 RNA 的完整性。

总 DNA 提取:石蜡组织总 DNA 的提取采用 QIAamp DNA FFPE Tissue Kit 试剂盒,实验步骤按说明书指导进行,提取的 DNA 用 NF 水溶解后-20℃保存。BRAF 基因扩增:扩增片段为 BRAF 基因第 15

外显子,引物由 Gu 设计^[10]。上游引物序列为:5'-TCATAATGCTTGCTCTGATAGGA-3',下游引物序列为 5-GGCCAAAAATTTAATCAGTGG-3';PCR 扩增程序为:94℃ 5min;94℃ 30s,60℃ 30s,68℃ 1min,35 个循环;68℃ 10min。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测后(图 2),通过 Qiagen PCR clean kit 试剂盒纯化后留待测序。

标本测序:所有标本 BRAF 突变均由 ABI PRISM 3730 XL 测序仪检测,测序过程由上海 Invitrogen 公司完成。

Norther 印迹杂交:RNA 样品 95℃热变性 3min 后立即置冰上冷却。15% PAGE 胶 180V 预电泳 30min,用移液枪吹散上样孔中的尿素,将 RNA 样品加入上样孔中,180V 电泳 60min。取出 PAGE 胶,与滤纸和尼龙膜组成“三明治”结构,100mA 转膜 60min,转膜后将尼龙膜紫外交联 2min。取适量杂交液置于杂交管中,将尼龙膜正面朝管中,68℃预杂交 30min,预杂交结束后,在杂交液中加入变性的 DiG 标记的 mir-221 探针,42℃杂交过夜。杂交完毕后 2×SSC (含 0.1% SDS)42℃洗膜 3 次,室温下 Washing buffer 洗膜 10min,Blocking buffer 封闭 30min。Digoxigenin-AP 抗体室温下结合 1h,Washing buffer 洗膜 3 次,每次 10min。将膜放入 Detection Buffer 浸泡 5min,暗室中观察曝光胶片压膜。

1.3 统计学处理

数据分析采用 SPSS 13.0 软件,年龄、肿瘤大小等资料采用 Student's *t* 检验,BRAF 分类资料采用 χ^2 检验。mir-221 表达以中位数和四分位数间距表示,采用 Mann-Whitney *U* 检验(两组)进行统计学分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PTC 癌组织及配对癌旁正常组织中 mir-221 表达

mir-221 表达通过 Scion Image 软件计算 PTC 癌组织(A)及配对癌旁正常组织(N)中的 mir-221 及 U6 表达条带的灰度值,并设定 U6 表达条带的灰度值为 1,用所得 mir-221/U6 相对值来表示 PTC 癌组织及配对癌旁正常组织中 mir-221 的表达。PTC 癌组织中 mir-221 表达中位值为 0.855,而配对癌旁正常组织中 mir-221 表达中位值为 0.549;通过成组配对 Mann-Whitney *U* 检验发现,mir-221 在两组间的表达

差异有显著性($P<0.001$)(见图 1)。

2.2 PTC 癌组织中 BRAF 基因突变

43 例 PTC 中有 23 例(53.4%)发生 BRAF 突变(图 2、图 3)。BRAF 野生型患者年龄低于 BRAF 突变

型患者 ($P=0.002$);BRAF 野生型患者分期较 BRAF 突变型患者早 ($P=0.015$);BRAF 野生型患者淋巴结转移率较 BRAF 突变型低($P=0.026$)。BRAF 突变与性别、肿瘤大小、病灶数目等无明显相关性,见表 1。

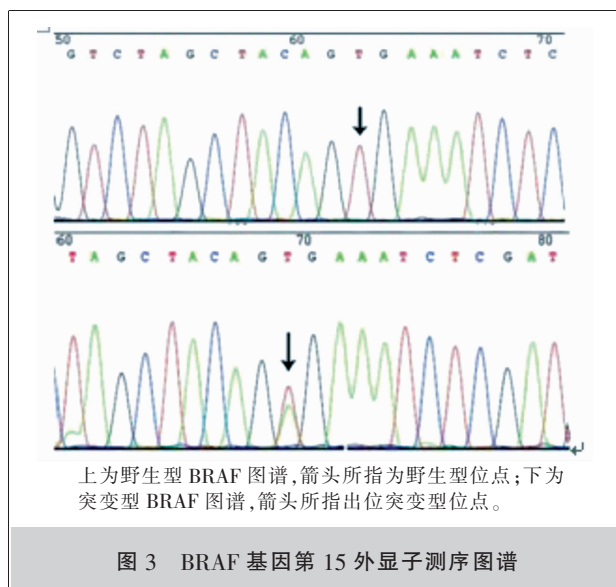
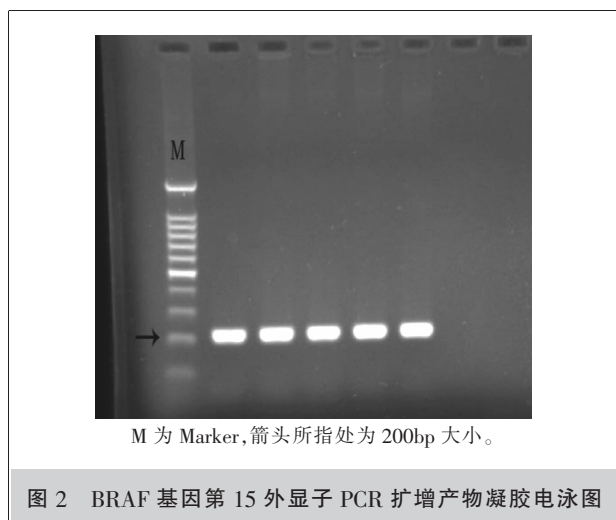
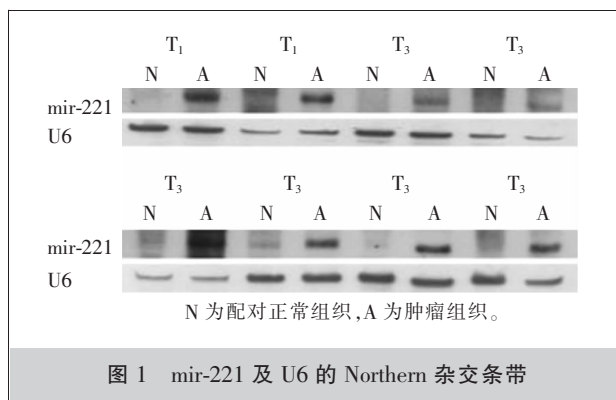


表 1 BRAF 突变与甲状腺乳头状癌的临床病理因素的相关性

临床病理因素	BRAF		χ^2	P 值
	突变型(n=23)	野生型(n=20)		
年龄(岁)				
<45	9	17	9.416	0.002
≥45	14	3		
性别				
男性	8	8	0.125	0.724
女性	15	12		
肿瘤大小(cm)				
≤1	4	8	2.718	0.100
>1	19	12		
临床分期				
I~II	13	18	5.959	0.015
III~IV	10	2		
淋巴结转移*				
有	16	10	4.985	0.026
无	2	8		
病灶数目				
单发	17	16	0.222	0.637
多发**	6	4		

*:43 例患者有 36 例患者行颈淋巴结清扫术,其中 26 例患者有颈淋巴结转移。**:多发病灶指经病理确认后病灶数≥2 个。

表 2 mir-221 表达与甲状腺乳头状癌临床病理因素及 BRAF 突变的相关性

临床病理因素	例数	mir-221 表达中位值	Z	P 值
年龄(岁)				
<45	26	1.442(1.172~1.828)	1.751	0.080
≥45	17	1.721(1.369~2.322)		
性别				
男性	16	1.419(1.301~1.580)	1.018	0.309
女性	27	1.658(1.190~2.046)		
肿瘤大小(cm)				
≤1	12	1.442(1.201~1.906)	0.636	0.525
>1	31	1.535(1.225~2.046)		
临床分期				
I~II	31	1.440(1.127~1.659)	3.206	0.002
III~IV	12	1.957(1.598~2.375)		
淋巴结转移*				
有	26	1.637(1.344~2.304)	2.064	0.042
无	10	1.321(1.199~1.671)		
病灶数目				
单发	33	1.443(1.220~1.943)	0.805	0.421
多发**	10	1.608(1.327~2.325)		
BRAF				
突变型	23	1.813(1.356~2.304)	2.252	0.024
野生型	20	1.442(1.087~1.628)		

mir-221 的表达数据采用中位数及四分位数间距表示。*:43 例患者有 36 例患者行颈淋巴结清扫术,其中 26 例患者有颈淋巴结转移。**:多发病灶指经病理确认后病灶数≥2 个。

2.3 mir-221 与 PTC 临床病理因素的相关性

I~II 期患者 mir-221 的表达 (中位值 1.440) 低于 III~IV 期患者 (中位值 1.957), 差异具有统计学意义 ($P=0.002$); 无淋巴结转移的患者 mir-221 的表达 (中位值 1.321) 低于淋巴结转移的患者 (中位值 1.637) ($P=0.042$); 野生型 BRAF 患者 mir-221 的表达 (中位值 1.442) 低于突变型 BRAF 患者 (中位值 1.813) ($P=0.024$)。mir-221 表达量与性别、年龄、肿瘤大小、病灶数目无明显相关性。见表 2。

3 讨论

本研究我们发现在 PTC 癌组织中 mir-221 的表达较癌旁正常组织高, III~IV 期 PTC 患者中 mir-221 的表达较 I~II 期患者高, 在淋巴结转移患者中 mir-221 的表达较无淋巴结转移患者高。本研究结果与 Chou 等^[9] 报道中指出的 mir-146b、mir-221、mir-222 表达水平与 PTC 腺外侵袭、肿瘤分期等具有相关性的结果一致, 认为通过 miRNA 表达水平的改变, 可以使肿瘤获得同时调控多种靶基因表达的能力, 从而使肿瘤协调有序地进展^[10,11]。另外在 mir-221 与 PTC 临床病理特征相关性分析中, 我们也发现 mir-221 表达与淋巴结转移相关, 从而为判断 PTC 是否有淋巴结转移提供了一种新的预测指标。目前关于 mir-221 在 PTC 中功能的研究主要集中在靶基因的鉴别及对 PTC 功能的影响, 如 Visone 等^[12] 的研究表明 mir-221 抑制细胞周期蛋白依赖性激酶抑制蛋白 p27^{Kip1} 表达, 促进癌细胞的增殖; Garofalo 等^[13] 的研究表明 mir-221 通过抑制 PTEN 及 TIMP3 的表达, 最终使癌细胞发生浸润及转移。近几年来较多研究在评估血浆或血清中 microRNA 的表达水平对诊断及预后判断的预测价值方面取得了较大的进展^[14,15]。因此, 我们认为通过测定患者血浆和血清中 mir-221 的表达水平可能会对 PTC 的术前诊断、预后判断及个体化治疗等具有一定指导意义, 但仍有待进一步研究确认。

BRAF 基因突变主要为第 15 号外显子的 T1799A 突变^[6], 多项研究显示 BRAF 突变在 PTC 中发生率约为 28%~69%^[16,17]。2007 年 Xing^[18] 指出虽然各个研究组关于 BRAF 突变与 PTC 临床病理因素关系的结果不是非常一致, 但含 BRAF 突变的 PTC 大多存在淋巴结转移, 腺外浸润和较高临床分期等一

种或多种恶性临床病理特征^[18]。本研究表明 PTC 的 BRAF 突变率为 53.49%, 并发现 BRAF 野生型患者分期较 BRAF 突变型患者早, BRAF 野生型患者的淋巴结转移率较 BRAF 突变型患者低。除 PTC 以外, 甲状腺微小癌、部分分化差的甲状腺癌以及未分化癌等也有 BRAF 突变的报道^[17,19]。在转基因小鼠模型中的研究发现 BRAF 突变不仅能诱导 PTC 的产生, 而且能使 PTC 向分化差的甲状腺癌转变^[20]。这些研究都证实了 BRAF 基因突变在 PTC 发生、发展过程中起着重要作用。本研究中 BRAF 基因突变与淋巴结转移、肿瘤分期等临床病理特征具有相关性的结果也与其相符。

本研究分析发现, PTC 中 mir-221 表达与 BRAF 基因突变具有相关性。然而促使两者具有相关性的具体机制仍不清楚, 由于 mir-221 与 BRAF 基因 mRNA 的 3' 端非编码区之间无互补配对序列, 因此 mir-221 并非通过靶向调节 BRAF 基因而发挥作用, 我们推论 mir-221 可能接受 BRAF 基因调控。在 PTC 中 BRAF 基因突变后能激活 MAPK 及 NF- κ B^[21,22] 等多条下游通路, 而且研究表明 NF- κ B 通路中 p65 亚基可以与 mir-221 基因远侧端的增强子区域相结合促进 mir-221 表达^[23]。因此, 我们认为在 PTC 中 BRAF 基因突变可能通过 NF- κ B 通路调控 mir-221 表达, 进而增强 BRAF 基因在 PTC 中的作用, 从而使 PTC 更具侵袭性。

综上所述, mir-221 表达与较高的临床分期、淋巴结转移等因素有关, 检测 mir-221 的表达水平可能会为指导 PTC 的个性化治疗提供新的思路。mir-221 表达与 BRAF 基因突变具有一定相关性, 在 PTC 中 BRAF 基因突变可能通过 NF- κ B 通路调控 mir-221 表达进而使 PTC 发生恶性进展。

参考文献:

- [1] Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs-microRNAs with a role in cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2006, 6(4):259-269.
- [2] He H, Jazdzewski K, Li W, et al. The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma [J]. Proc Natl Acad Sci, 2005, 102(52): 19075-19080.
- [3] Galardi S, Mercatelli N, Giorda E, et al. MiR-221 and miR-222 expression affects the proliferation potential of human prostate carcinoma cell lines by targeting p27Kip1 [J]. J Biol Chem, 2007, 282(32): 23716-23724.

- [4] Fornari F, Gramantieri L, Ferracin M, et al. MiR-221 controls CDKN1C/p57 and CDKN1B/p27 expression in human hepatocellular carcinoma [J]. *Oncogene*, 2008, 27(43): 5651–5661.
- [5] Ciafre SA, Galardi S, Mangiola A, et al. Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 334(4):1351–1358.
- [6] Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer[J]. *Nature*, 2002, 417(6892): 949–954.
- [7] Cohen Y, Xing M, Mambo E, et al. BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2003, 95(8):625–627.
- [8] Nikiforova MN, Tseng GC, Steward D, et al. MicroRNA expression profiling of thyroid tumors: biological significance and diagnostic utility [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2008, 93(5):1600–1608.
- [9] Chou CK, Chen RF, Chou FF, et al. MiR-146b is highly expressed in adult papillary thyroid carcinomas with high risk features including extrathyroidal invasion and the BRAF(V600E) mutation[J]. *Thyroid*, 2010, 20(5):489–494.
- [10] Gu LQ, Li FY, Zhao L, et al. BRAF(V600E) mutation and X-linked inhibitor of apoptosis expression in papillary thyroid carcinoma[J]. *Thyroid*, 2009, 19(4):347–354.
- [11] Yip L, Kelly L, Shuai Y, et al. MicroRNA signature distinguishes the degree of aggressiveness of papillary thyroid carcinoma[J]. *Ann Surg Oncol*, 2011, 18(7):2035–2041.
- [12] Visone R, Russo L, Pallante P, et al. MicroRNAs (miR)-221 and miR-222, both overexpressed in human thyroid papillary carcinomas, regulate p27Kip1 protein levels and cell cycle[J]. *Endocr Relat Cancer*, 2007, 14(3):791–798.
- [13] Garofalo M, Di Leva G, Romano G, et al. MiR-221&222 regulate TRAIL resistance and enhance tumorigenicity through PTEN and TIMP3 downregulation[J]. *Cancer Cell*, 2009, 16(6):498–509.
- [14] Asaga S, Kuo C, Nguyen T, et al. Direct serum assay for microRNA-21 concentrations in early and advanced breast cancer[J]. *Clin Chem*, 2011, 57(1):84–91.
- [15] Hu Z, Chen X, Zhao Y, et al. Serum microRNA signatures identified in a genome-wide serum microRNA expression profiling predict survival of non-small-cell lung cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2010, 28(10):1721–1726.
- [16] Xing M. BRAF mutation in thyroid cancer[J]. *Endocr Relat Cancer*, 2005, 12(2):245–262.
- [17] Ugolini C, Giannini R, Lupi C, et al. Presence of BRAF V600E in very early stages of papillary thyroid carcinoma [J]. *Thyroid*, 2007, 17(5):381–388.
- [18] Xing M. BRAF mutation in papillary thyroid cancer: pathogenic role, molecular bases, and clinical implications [J]. *Endocr Rev*, 2007, 28(7):742–762.
- [19] Ricarte-Filho JC, Ryder M, Chitale DA, et al. Mutational profile of advanced primary and metastatic radioactive iodine-refractory thyroid cancers reveals distinct pathogenetic roles for BRAF, PIK3CA, and AKT1[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(11):4885–4893.
- [20] Charles RP, Iezza G, Amendola E, et al. Mutationally activated BRAF (V600E) elicits papillary thyroid cancer in the adult mouse[J]. *Cancer Res*, 2011, 71(11):3863–3871.
- [21] Pacifico F, Leonardi A. Role of NF-kappaB in thyroid cancer[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2010, 321(1):29–35.
- [22] Bommarito A, Richiusa P, Carissimi E, et al. BRAFV600E mutation, TIMP-1 up-regulation and NF-κB activation: closing the loop on the papillary thyroid cancer trilogy[J]. *Endocr Relat Cancer*, 2011, 18(6):669–685.
- [23] Galardi S, Mercatelli N, Farace MG, et al. NF-κB and c-Jun induce the expression of the oncogenic miR-221 and miR-222 in prostate carcinoma and glioblastoma cells[J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(9):3892–3902.