

· 综述 ·

非编码 RNA 在分化型甲状腺癌分子诊断中的作用

耿艳 徐书杭 鲁一兵 刘超

【摘要】 分化型甲状腺癌占全部甲状腺癌的 90% 以上,主要包括乳头状癌和滤泡状癌。目前,细针穿刺抽吸活检是术前诊断甲状腺肿瘤的金标准,但仍存在一定的局限性,且临床上尚无理想的分子标志物用于确诊。非编码 RNA 是无蛋白编码功能的 RNA,主要包括微小 RNA(miRNA)和长链非编码 RNA(lncRNA),二者在甲状腺癌的发生、发展中起重要作用,其在分化型甲状腺癌分子诊断中的作用日益受到人们的关注,有望成为甲状腺癌诊断与分类的理想标志物。

【关键词】 非编码 RNA;分化型甲状腺癌;分子标志物;分子诊断

基金项目:江苏省重点研发计划(社会发展)项目(BE2015723)

Noncoding RNA in molecular diagnosis of differentiated thyroid cancer Geng Yan*, Xu Shuhang, Lu Yibing, Liu Chao. * The Second Clinical Medical School of Nanjing Medical University, Nanjing 210011, China; Department of Endocrinology, The Second Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou 221006, China

Corresponding author: Lu Yibing, Email: luyibing2004@126.com; Liu Chao, Email: liuchao@nfmcn.com

【Abstract】 Differentiated thyroid cancer, which mainly includes papillary and follicular cancer, accounts for more than 90% of all thyroid cancers. Currently, the gold standard for preoperative diagnosis of thyroid tumors is fine needle aspiration biopsy which has certain limitations yet. So far, there have not been ideal molecular markers used in accurately diagnosing thyroid cancer. Noncoding RNAs, which are transcribed but do not encode proteins, largely comprise microRNAs (miRNAs) and long noncoding RNAs (lncRNAs), and play important roles in the occurrence and development of thyroid cancer. Because noncoding RNA may serve as ideal diagnostic molecular markers for thyroid cancer, its role in molecular diagnosis of differentiated thyroid cancer have attracted more attention.

【Key words】 Noncoding RNA; Differentiated thyroid cancer; Molecular markers; Molecular diagnosis

Fund program: Key Research and Development Plan (Social Development) of Jiangsu Province (BE2015723)

甲状腺癌是内分泌系统最为常见的恶性肿瘤,且发病率呈现持续升高的趋势。按照病理类型,甲状腺癌大致可分为甲状腺乳头状癌(PTC)、甲状腺滤泡状癌(FTC)、甲状腺未分化癌(ATC)及甲状腺髓样癌(MTC)等。其中,前两者属于分化型甲状腺癌,占全部甲状腺癌的90%以上。细针穿刺细胞学检查(FNA)是目前最准确、最具成本效益的评估甲状腺结节良、恶性的方法,但仍有20%~30%不能经

FNA确定良、恶性,且不能区分FTC和滤泡性腺瘤^[1-2]。为此,寻找鉴别诊断良、恶性甲状腺结节的生物标志物至关重要。

目前,临床上最常用于PTC分子诊断的是BRAF基因,BRAFV600E突变是PTC中最常见的基因突变类型,对PTC的诊断有极高的特异性,但敏感性较低,且其预测预后的价值尚有争议。FTC中最常见的基因突变是NRas突变,但其特异性较低,并可见于良性滤泡性腺瘤。近年来,端粒酶逆转录酶(Telomerase reverse transcriptase, TERT)启动子突变对甲状腺癌的診断和判断预后的价值受到关注。TERT启动子突变常见于侵袭性甲状腺癌,而不会见于良性甲状腺肿瘤。与BRAFV600E突变相比,TERT启动子突变对PTC的预后评估价值更大,但

DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-4157.2017.02.008

作者单位:210011 南京医科大学第二临床医学院(耿艳);221006 徐州医学院第二附属医院内分泌科(耿艳);210028 南京,江苏省中医药研究院,南京中医药大学附属中西医结合医院内分泌代谢病区(徐书杭,刘超);210011 南京医科大学第二附属医院内分泌科(鲁一兵)

通信作者:鲁一兵,Email: luyibing2004@126.com; 刘超,Email: liuchao@nfmcn.com

其敏感性低于前者^[3,4]。总之,目前尚无理想的分子标志物用于分化型甲状腺癌的诊断。

RNA 可分为编码蛋白质的 mRNA 和无蛋白编码功能的非编码 RNA,近年的研究发现,作为非编码 RNA 的重要组分,微小 RNA (miRNA) 和长链非编码 RNA (lncRNA) 在甲状腺癌的发生、发展中发挥重要作用,其在甲状腺癌诊断中的价值受到关注。本文就这一领域的研究进展作一综述。

1 miRNA 在分化型甲状腺癌分子诊断中的作用

miRNA 是一类广泛存在于真核细胞中长约 22 nt 的非编码 RNA,通过与靶基因的结合,引起靶基因 mRNA 降解或翻译抑制,从而对基因转录后水平进行调控,具有高度保守性、时序性和组织特异性。miRNA 在多种生物学过程中起关键作用,而其表达异常与包括肿瘤在内的多种疾病相关,且其在组织及体液中的表达较稳定,易于提取及检测。

1.1 miRNA 对 PTC 的诊断价值 PTC 是甲状腺癌中最常见的病理类型,约占分化型甲状腺癌的 85%,近年来,甲状腺癌发病率的持续升高主要归因于 PTC 发病率的快速增长^[1]。目前,关于 miRNA 与 PTC 关系的研究中,大多数集中在组织中的 miRNA,而循环 miRNA 的研究相对较少。业已证实,在 PTC 组织中表达异常的 miRNA 包括 miRNA-221、miRNA-222 和 miRNA-146,且均为表达上调,同时 miRNA-222 和 miRNA-146b 的表达上调与 PTC 患者的复发有关^[5]。另外,在 FTC 组织中也发现三者表达上调,但有学者通过原位杂交方法分析石蜡包埋的组织标本,发现 miRNA-146b-5p 在 PTC 中的表达阳性率明显高于 FTC,提示 miRNA-146b-5p 有望成为诊断 PTC 的分子标志物^[6]。miRNA-146b-5p 可通过调控其靶基因 Smad4 而促进 PTC 细胞的迁移和侵袭,Smad4 是转化生长因子- β 信号通路中的一个关键蛋白^[7]。相对于表达上调的 miRNA,表达下调 miRNA 的相关研究则少而分散。在人 PTC 组织标本及 PTC 细胞系中 miRNA-199a-3p 均为表达下调,Met 可能为其靶基因,恢复 PTC 细胞中 miRNA-199a-3p 的表达可使 MET 的表达减少,肿瘤细胞的转移和增殖均受抑^[8]。同时,miRNA-204-5p 在人 PTC 组织标本及 PTC 细胞系中亦均为表达下调,胰岛素样生长因子结合蛋白 5 (IGFBP5) 是其靶基因,miRNA-204-5p 可通过抑制 IGFBP5 的表达而抑制癌细胞的增殖^[9]。滤泡变异型 PTC 是 PTC 中最常见的变异亚型,它和典型 PTC 的 miRNA 表达谱既有相似之处,

也有不同之处。其中,在滤泡变异型 PTC 中 miRNA-146b-3p、miRNA-146-5p、miRNA-221、miRNA-222 和 miRNA-222-5p 表达均上调^[10]。另外,美国白人和黑人 PTC 患者的 miRNA 表达谱可能也存在差异。最新的研究发现,尽管 miRNA-221 均表达上调,但白人明显高于黑人,而 miRNA-31 在黑人中表达上调,但在白人表达下调^[11]。可见,正常甲状腺组织与 PTC 组织中特定 miRNA 表达存在差异,提示后者可能在 PTC 的发病及肿瘤生物学行为中发挥重要作用,其表达的增减可能有助于 PTC 的诊断。

相对于组织标本,血液标本采集更容易,且创伤性极小。已有研究指出,循环 miRNA 有望成为诊断肿瘤的非侵入性生物标志物。2012 年, Yu 等^[12]首次报道了中国南方 PTC 患者血清 let-7e、miRNA-151-5p 和 miRNA-222 的表达较良性结节患者和正常成人明显升高,miRNA-151-5p 和 miRNA-222 在肿瘤切除后表达明显下降,且二者在 PTC 患者组织中表达亦升高。进一步分析显示,三者联合对 PTC 的诊断具有较高的敏感性和特异性,且和肿瘤大小、病灶数量及肿瘤分期有着较强的相关性。在中国北方 PTC 患者中的一项研究显示,血浆 miRNA-25-3p 和 miRNA-451a 表达明显升高^[13]。韩国学者研究发现,与良性结节患者相比,血浆 miRNA-146b 和 miRNA-155 在 PTC 患者的外周血和 PTC 组织中的表达均升高^[14]。Cantara 等^[15]提出,血清 miRNA-95 和 miRNA-190 是白种人 PTC 的敏感分子标志物,且联合两者具有更高的诊断效力,进一步研究发现,miRNA-95 和 miRNA-190 在 PTC 患者血清及组织中的表达趋势是一致的。表明血循环中与 PTC 相关的 miRNA 的表达在不同地区、不同种族的人群中可能存在差异。

1.2 miRNA 对 FTC 的诊断价值 FTC 是患病率仅次于 PTC 的甲状腺癌,约占分化型甲状腺癌的 12%^[1]。其中,常规型 FTC 和嗜酸细胞型 FTC 是最难通过细胞学和组织学诊断的甲状腺肿瘤,因此,临床上迫切需要理想的分子标志物用于二者的确诊。不过,由于临床病例较少,关于 FTC 和 miRNA 相关关系的临床研究进展较为缓慢。Dettmer 等^[16]在分析嗜酸细胞型 FTC 和常规型 FTC 的 miRNA 表达谱时发现,miRNA-885-5p 在嗜酸细胞型 FTC 中表达明显高于常规型 FTC,且 miRNA-221 和 miRNA-222 在常规型 FTC 和嗜酸细胞型 FTC 患者中的表达均上调,与在 PTC 患者中的表达趋势一致;此外,联合检测

miRNA-221、miRNA-885-5p 和 miRNA-574-3p 有助于在细针穿刺标本中鉴别 FTC 和良性增生性结节。Weber 等^[17]在研究人 FTC 组织标本及 FTC 细胞系中发现 miRNA-197 和 miRNA-346 表达均上调,并证实 EFEMP2 是 miRNA-346 的靶基因,而 ACVR1 和 TSPAN3 均为 miRNA-197 的靶基因,且三者的表达均受抑。这种表达的改变可能与 FTC 的生物学性质相关,因为 EFEMP2 具有肿瘤抑制功能,ACVR1 可抑制包括甲状腺滤泡上皮细胞在内的多种人体细胞的生长,而 TSPAN3 属于 tetraspan 超家族,参与细胞的迁移、黏附和融合。进一步的研究证实,二者在 FTC 患者中表达均上调,且发现 miRNA-199b 在 FTC 患者及体外培养的 FTC 细胞中表达均明显下调,VPS26A 和 ABCG1 可能是其靶基因,且二者的表达均升高^[18]。Wojtas 等^[19]通过分析 10 对 FTC 及癌旁正常组织的 miRNA 表达情况发现,miRNA-146b、miRNA-183 和 miRNA-221 在 FTC 中表达明显高于癌旁正常组织,而 miRNA-199b 在 FTC 中表达明显低于癌旁正常组织;在人 FTC 细胞系中 miRNA-146b 和 miRNA-183 可通过促进肿瘤转移及抑制凋亡而参与 FTC 的发生及发展。然而,迄今尚无 FTC 患者中循环 miRNA 表达特征的相关报道。

2 lncRNA 在分化型甲状腺癌分子诊断中的作用

lncRNA 是一类长度超过 200 nt 的非编码 RNA,在表观遗传水平、转录水平及转录后水平等多种层面上调控基因的表达。与 miRNA 相比,其作用机制更为复杂,也具有组织特异性,但序列保守性较低。lncRNA 具有重要的生物学功能,其与包括肿瘤在内多种疾病的关系是近年来研究的热点,但至今为止,关于 lncRNA 与甲状腺癌关系的研究极少。在 PTC 中,最早被发现表达下调的 lncRNA 是 NAMA (non-coding RNA associated with MAP kinase pathway and growth arrest),其与细胞生长停滞及 BRAFV600E 突变相关^[20]。BANCR 是 BRAF 激活的 lncRNA,也是与 BRAF V600E 突变同样密切相关的 lncRNA,在人 PTC 组织标本及 PTC 细胞系中, BANCR 的表达均被上调,可通过激活自噬而促进 PTC 细胞增殖^[21]。继 NAMA 之后,另一个在甲状腺肿瘤中被发现表达下调的 lncRNA 是 PTC 易感候选基因 3 (Papillary thyroid carcinoma susceptibility candidate 3, PTCSC3),且其表达具有极高的甲状腺组织特异性,钙结合蛋白 S100 家族中的重要成员之一 S100A4 可能是其靶基因。在人 PTC 细胞系中, PTCSC3 可下调 S100A4 的

表达,进而抑制肿瘤细胞的侵袭和转移^[22]。将构建的 PTCSC3 过表达载体和空载体分别转染 PTC、FTC 及 ATC 细胞系,结果发现, PTCSC3 可起抑癌基因的作用,且为 miRNA-574-5p 的竞争性内源 RNA^[23]。最近, Zheng 等^[24]通过分析 40 对 PTC 及癌旁正常组织的 lncRNA 表达情况发现, BANCR 在 PTC 中表达明显高于癌旁正常组织,而 NAMA 和 PTCSC3 在 PTC 中表达明显低于癌旁正常组织;在人 PTC 细胞系中进一步研究发现,抑制 BANCR 表达可显著减少促甲状腺激素受体的表达,同时,也能通过下调细胞周期蛋白 D1 的表达使细胞生长停滞在 G₀/G₁ 期而抑制细胞增殖。Lan 等^[25]采用基因芯片及生物信息学方法分析 62 对 PTC 及癌旁正常组织,发现许多 lncRNA 在 PTC 中异常表达,其中, NAMA 和 PTCSC3 表达下调,可通过调控靶基因的表达参与 PTC 的发生及发展。NONHSAT037832 是一个新近发现在 PTC 患者组织中表达下调的 lncRNA,且其表达与淋巴结转移及肿瘤大小相关,并有可能成为诊断 PTC 的生物标志物^[26]。尽管如此, lncRNA 在分化型甲状腺癌诊断和鉴别诊断中的确切价值尚不得而知。lncRNA 与 miRNA 一样,也可在血液中检测到,但迄今尚无甲状腺癌患者循环 lncRNA 表达特征的相关报道。

综上所述,近年来,随着生物信息学及基因芯片等技术的不断进步,非编码 RNA 用于分化型甲状腺癌诊断的相关研究取得了较大进展,尤其是循环 miRNA 用于 PTC 诊断的相关研究。与单个 miRNA 的检测相比,多个 miRNA 的联合检测可提高诊断的敏感性及特异性。然而, miRNA 的异常表达因种族及地区不同而有所差异,因此,还需要开展更多的大样本前瞻性临床研究。目前,关于 lncRNA 与甲状腺癌关系的研究尚处于起步阶段,还需要开展更多的深入研究以阐明 lncRNA 在甲状腺癌发生、发展中所起的作用及具体机制。随着分子诊断技术的不断进步及非编码 RNA 检测成本的逐步降低,加之非编码 RNA 与甲状腺癌关系研究的不断深入,非编码 RNA 将有望成为甲状腺癌诊断、鉴别诊断及预后评估的理想分子标志物。

参 考 文 献

- [1] Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, et al. 2015 American Thyroid Association management guidelines for adult patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer: The

- American Thyroid Association Guidelines task force on thyroid nodules and differentiated thyroid cancer[J]. *Thyroid*, 2016, 26 (1):1-133. DOI:10.1089/thy.2015.0020.
- [2] Keutgen XM, Filicori F, Crowley MJ, et al. A panel of four miRNAs accurately differentiates malignant from benign indeterminate thyroid lesions on fine needle aspiration[J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18 (7): 2032-2038. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-2487.
- [3] Liu R, Xing M. TERT promoter mutations in thyroid cancer[J]. *Endocr Relat Cancer*, 2016, 23 (3): R143-R155. DOI: 10.1530/ERC-15-0533.
- [4] Sun J, Zhang J, Lu J, et al. BRAF V600E and TERT promoter mutations in papillary thyroid carcinoma in Chinese Patients[J]. *PLoS One*, 2016, 11 (4): e0153319. DOI: 10.1371/journal.pone.0153319.
- [5] Chrušćik A, Lam AK. Clinical pathological impacts of micro RNAs in papillary thyroid carcinoma: a crucial review[J]. *Exp Mol Pathol*, 2015, 99 (3): 393-398. DOI: 10.1016/j.yexmp.2015.08.013.
- [6] Guo Z, Hardin H, Montemayor-Garcia C, et al. In situ hybridization analysis of miR-146b-5p and miR-21 in thyroid Nodules; diagnostic implications[J]. *Endocr Pathol*, 2015, 26(2): 157-163. DOI: 10.1007/s12022-015-9363-x.
- [7] Lima CR, Geraldo MV, Fuziwara CS, et al. MiRNA-146b-5p upregulates migration and invasion of different papillary thyroid carcinoma cells [J]. *BMC Cancer*, 2016, 16: 108. DOI: 10.1186/s12885-016-2146-z.
- [8] Minna E, Romeo P, De Cecco L, et al. miR-199a-3p displays tumor suppressor functions in papillary thyroid carcinoma[J]. *Oncotarget*, 2014, 5 (9): 2513-2528. DOI: 10.18632/oncotarget.1830.
- [9] Liu L, Wang J, Li X, et al. MiR-204-5p suppresses cell proliferation by inhibiting IGFBP5 in papillary thyroid carcinoma[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 457(4): 621-626. DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.01.037.
- [10] Dettmer M, Perren A, Moch H, et al. Comprehensive microRNA expression profiling identifies novel markers in follicular variant of papillary thyroid carcinoma[J]. *Thyroid*, 2013, 23(11): 1383-1389. DOI: 10.1089/thy.2012.0632.
- [11] Suresh R, Sethi S, Ali S, et al. Differential expression of microRNAs in papillary thyroid carcinoma and their role in racial disparity[J]. *J Cancer Sci Ther*, 2015, 7(5): 145-154. DOI: 10.4172/1948-5956.1000340.
- [12] Yu S, Liu Y, Wang J, et al. Circulating microRNA profiles as potential biomarkers for diagnosis of papillary thyroid carcinoma [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2012, 97 (6): 2084-2092. DOI: 10.1210/jc.2011-3059.
- [13] Li M, Song Q, Li H, et al. Circulating miR-25-3p and miR-451a may be potential biomarkers for the diagnosis of papillary thyroid carcinoma[J]. *PLoS One*, 2015, 10 (7): e0132403. DOI: 10.1371/journal.pone.0132403. eCollection 2015.
- [14] Lee YS, Lim YS, Lee JC, et al. Differential expression levels of plasma-derived miR-146b and miR-155 in papillary thyroid cancer[J]. *Oral Oncol*, 2015, 51 (1): 77-83. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2014.10.006.
- [15] Cantara S, Pilli T, Sebastiani G, et al. Circulating miRNA95 and miRNA190 are sensitive markers for the differential diagnosis of thyroid nodules in a Caucasian population[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2014, 99 (11): 4190-4198. DOI: 10.1210/jc.2014-1923.
- [16] Dettmer M, Vogetseder A, Durso MB, et al. MicroRNA expression array identifies novel diagnostic markers for conventional and oncocytic follicular thyroid carcinomas [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2013, 98(1): E1-E7. DOI: 10.1210/jc.2012-2694.
- [17] Weber F, Teresi RE, Broelsch CE, et al. A limited set of human microRNA is deregulated in follicular thyroid carcinoma [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006, 91 (9): 3584-3591. DOI: 10.1210/jc.2006-0693.
- [18] Rossing M, Borup R, Henao R, et al. Down-regulation of microRNAs controlling tumorigenic factors in follicular thyroid carcinoma[J]. *J Mol Endocrinol*, 2012, 48 (1): 11-23. DOI: 10.1530/JME-11-0039.
- [19] Wojtas B, Ferraz C, Stokowy T, et al. Differential miRNA expression defines migration and reduced apoptosis in follicular thyroid carcinomas[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2014, 388 (1-2): 1-9. DOI: 10.1016/j.mce.2014.02.011.
- [20] Yoon H, He H, Nagy R, et al. Identification of a novel noncoding RNA gene, NAMA, that is downregulated in papillary thyroid carcinoma with BRAF mutation and associated with growth arrest[J]. *Int J Cancer*, 2007, 121 (4): 767-775. DOI: 10.1002/ijc.22701.
- [21] Wang Y, Guo Q, Zhao Y, et al. BRAF-activated long non-coding RNA contributes to cell proliferation and activates autophagy in papillary thyroid carcinoma [J]. *Oncol Lett*, 2014, 8 (5): 1947-1952. DOI: 10.3892/ol.2014.2487.
- [22] Jendrzewski J, Thomas A, Liyanarachchi S, et al. PTCSC3 is involved in papillary thyroid carcinoma development by modulating S100A4 gene expression [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2015, 100(10): E1370-E1377. DOI: 10.1210/jc.2015-2247.
- [23] Fan M, Li X, Jiang W, et al. A long non-coding RNA, PTCSC3, as a tumor suppressor and a target of miRNAs in thyroid cancer cells[J]. *Exp Ther Med*, 2013, 5(4): 1143-1146. DOI: 10.3892/etm.2013.933.
- [24] Zheng H, Wang M, Jiang L, et al. BRAF-activated long noncoding RNA modulates papillary thyroid carcinoma cell proliferation through regulating thyroid stimulating hormone receptor [J]. *Cancer Res Treat*, 2016, 48 (2): 698-707. DOI: 10.4143/crt.2015.118.
- [25] Lan X, Zhang H, Wang Z, et al. Genome-wide analysis of long noncoding RNA expression profile in papillary thyroid carcinoma [J]. *Gene*, 2015, 569(1): 109-117. DOI: 10.1016/j.gene.2015.05.046.
- [26] Lan X, Sun W, Zhang P, et al. Downregulation of long noncoding RNA NONHSAT037832 in papillary thyroid carcinoma and its clinical significance [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37 (5): 6117-6123. DOI: 10.1007/s13277-015-4461-4.

(收稿日期:2016-05-18)