

# 血清 miR-451a、miR-25-3p、GAS8-AS1 联合检测用于早期甲状腺乳头状癌的诊断

程燕 何启胜

池州市人民医院内分泌科 247000

通信作者:程燕, Email:1390482547@qq.com

**【摘要】 目的** 探讨血清miR-451a、miR-25-3p、GAS8-AS1联合用于早期甲状腺乳头状癌的诊断价值。**方法** 纳入2016年3月至2019年3月池州市人民医院收治的早期甲状腺乳头状癌患者70例为肿瘤组、良性结节患者70例为良性组、健康体检者70名为对照组。通过实时荧光定量PCR检测血清miR-451a、miR-25-3p、GAS8-AS1的表达量。通过酶联免疫吸附试验检测患者血清甲状腺球蛋白(Tg)水平。用受试者工作特征(ROC)曲线的曲线下面积(AUC)分析miR-451a、miR-25-3p、GAS8-AS1检测在早期甲状腺乳头状癌中的诊断意义。**结果** 肿瘤组、良性组和对照组血清miR-451a、miR-25-3p、GAS8-AS1、Tg的表达水平差异存在统计学意义( $F=14.920, 9.849, 15.060, 9.090, P$ 均 $<0.05$ )。血清miR-451a、miR-25-3p、GAS8-AS1、Tg鉴别肿瘤组和对照组的敏感性分别为86%、83%、87%、83%,特异性分别为93%、83%、87%、73%,鉴别肿瘤组和良性组的敏感性分别为97%、97%、78%、84%,特异性分别为87%、80%、93%、71%。miR-451a、miR-25-3p、GAS8-AS1联合对早期甲状腺乳头状癌诊断的敏感性为94.29%,特异性为88.57%,准确性为90.48%。**结论** 血清miR-451a、miR-25-3p、GAS8-AS1联合检测可能在诊断早期甲状腺乳头状癌中具有一定价值。

**【关键词】** miRNA-451a; GAS8-AS1; miRNA-25-3p; 甲状腺乳头状癌; 诊断

DOI:10.3760/cma.j.cn121383-20200306-03016

**Diagnosis of early papillary thyroid carcinoma by combined detection of serum miR-451a, miR-25-3p, and GAS8-AS1** Cheng Yan, He Qisheng. Department of Endocrinology, Chizhou People's Hospital, Chizhou 247000, China

Corresponding author: Cheng Yan, Email:1390482547@qq.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the diagnostic value of combined detection of serum miR-451a, miR-25-3p and GAS8-AS1 in early thyroid papillary carcinoma. **Methods** A total of 70 patients with early thyroid papillary carcinoma admitted to Chizhou People's Hospital from March 2016 to March 2019 were included in the tumor group, 70 patients with benign nodules were included in the benign group, and 70 healthy people were included in the control group. The expressions of serum miR-451a, miR-25-3p and GAS8-AS1 were detected by real-time fluorescent quantitative PCR. Serum thyroglobulin (Tg) was detected by enzyme-linked immunosorbent assay. The diagnostic significance of detection of miR-451a, miR-25-3p and GAS8-AS1 in early thyroid papillary carcinoma was analyzed with the area under curve (AUC) of receiver operating characteristic (ROC) curve. **Results** Serum levels of miR-451a, miR-25-3p, GAS8-AS1 and Tg in tumor group, benign group and control group were significantly different ( $F=14.920, 9.849, 15.060, 9.090$ , all  $P<0.05$ ). The sensitivity of serum miR-451a, miR-25-3p, GAS8-AS1 and Tg to identify the tumor group and the control group were 86%, 83%, 87%, 83%, and the specificity were 93%, 83%, 87%, 73%, respectively. The sensitivity to identify the tumor group and the benign group were 97%, 97%, 78%, 84%, and the specificity were 87%, 80%, 93%, 71%, respectively. Combination of serum miR-451a, miR-25-3p, and GAS8-AS1 in the diagnosis of early thyroid papillary carcinoma showed a sensitivity of 94.29%, specificity of 88.57%, and accuracy of 90.48%. **Conclusion** Combined detection of serum levels of miR-451a, miR-25-3p and GAS8-AS1 can be used as potential markers for the diagnosis of early thyroid papillary carcinoma.

**[Key words]** miRNA-451a; GAS8-AS1; miRNA-25-3p; Papillary thyroid carcinoma; Diagnosis

DOI:10.3760/cma.j.cn121383-20200306-03016

微小 RNA (miRNA) 是不编码蛋白质的 RNA。人血液中的 miRNA 非常稳定, 对内源性 RNA 酶不敏感<sup>[1]</sup>。从肿瘤细胞释放到体液的 miRNA 及其细胞内 miRNA 是诊断癌症的潜在生物标志物。最近的研究分析了不同类型甲状腺肿瘤组织中 miRNA 的表达, 结果表明, 甲状腺乳头状癌 (PTC) 患者血清 miR-451a、miR-25-3p、生长阻滞特异性因子 8 反义 RNA 1 (the growth arrest-specific 8-antisense RNA 1, GAS8-AS1) 的表达与非肿瘤组织或良性增生性多结节性甲状腺组织有显著差异<sup>[2-3]</sup>。目前临床常用甲状腺球蛋白 (Tg) 作为甲状腺癌血液指标的参考。故本研究以 Tg 作为参考, 探讨血清 miR-451a、miR-25-3p、GAS8-AS1 联合检测对早期 PTC 诊断的价值。

## 1 对象与方法

**1.1 研究对象** 纳入 2016 年 3 月至 2019 年 3 月池州市人民医院内分泌科收治的早期 PTC 患者 70 例为肿瘤组; 其中男 33 例, 女 37 例, 年龄 33 ~ 72 岁, 平均年龄 (46.13 ± 12.09) 岁; 肿瘤直径 1.1 ~ 3.5 cm, 平均直径为 (1.89 ± 0.92) cm; 依据国际抗癌联盟《TNM 恶性肿瘤分类》第 7 版进行 TNM 分期: I 期 48 例, II 期 22 例。同时纳入池州市人民医院内分泌科收治的甲状腺良性结节患者 70 例为良性组; 其中, 男 34 例, 女 36 例, 年龄 31 ~ 82 岁, 平均年龄 (43.50 ± 18.38) 岁。肿瘤组和良性组均经池州市人民医院病理科证实。排除标准: (1) 严重心、肝、肾功能损害者。(2) 长期使用皮质类固醇激素及免疫抑制剂者。(3) 患有精神疾病者。(4) 患有其他肿瘤者。同时, 纳入 2016 年 3 月至 2019 年 3 月于池州市人民医院体检的健康体检者 70 名为对照组; 其中男 35 名, 女 35 名, 年龄 39 ~ 77 岁, 平均年龄 (45.28 ± 16.28) 岁。各组一般资料比较差异均无统计学意义 ( $P$  均 > 0.05), 可纳入此次分析。本研究经医院伦理委员会审批 (IEC-FOM-013-20), 受试者均签署知情同意书。

**1.2 研究方法** 采集治疗前肿瘤组、治疗前良性组和对照组的肘前静脉血 5 ml。使用武汉艾美捷科技有限公司的 Tg 检测试剂盒 (货号: KA4022)。

使用 RNA 快速提取试剂盒 (北京百泰克生物技术有限公司, RP5301) 抽取总 RNA。miR-451a、miR-25-3p、GAS8-AS1 的引物通过 NCBI 在线设计, 见表 1, 交由武汉金凯瑞公司合成。以 U48 作为内

参。3 个指标为同一批样本分批检测, 去除极大值和极小值, 保留其余数据。

表 1 引物序列和名称

引物名称	引物序列 (5'→3')
miR-451a-F	ATTGCACTGTCTCGGTCTG
miR-451a-R	CTCAACTGCTGCTGGAGTCGGCAAT-TCAGTTGAGCTTACAG
GAS8-AS1-F	GACAAGACAACGAGCAACAAG
GAS8-AS1-R	GGAGCCTCTAAAGGTCTGTGAC
miR-25-3p-F	ATTGCACTGTCTCGGTCTG
miR-25-3p-R	CCAAGCTTTGTCAGACCGAGACAAGTGC
U48-F	AGTGATGATG ACCCCAGGTAA
U48-R	GCTGTCAACGATACGCTACG

注: GAS8-AS1: 生长阻滞特异性因子 8 反义 RNA 1

**1.3 统计学处理** 应用 PRISM 7.0 软件进行统计分析, 符合正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间均数比较采用方差分析。应用受试者工作特征 (ROC) 曲线下面积 (AUC) 分析 miR-451a、miR-25-3p、GAS8-AS1 检测早期 PTC 的临床诊断价值。 $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 3 组血清中 miR-451a、miR-25-3p、GAS8-AS1、Tg 的表达水平** 肿瘤组、良性组和对照组血清中 miR-451a、miR-25-3p、GAS8-AS1、Tg 的表达水平差异存在统计学意义 ( $P$  均 < 0.05), 见表 2。

**2.2 肿瘤组和对照组血清 miR-451a、miR-25-3p、GAS8-AS1 的 ROC 曲线、AUC、敏感性、特异性和截断值** 为了评估血清 miR-451a、miR-25-3p、GAS8-AS1 在肿瘤组和对照组中的诊断价值, 绘制肿瘤组和对照组的 ROC 曲线。miR-451a 的 ROC 曲线 AUC 为  $0.89 \pm 0.05$  (95% CI: 0.804 7 ~ 0.988 7,  $P < 0.000 1$ ), 以 miR-451a 的阳性临界值为 0.330 4, 其诊断敏感性为 86%, 特异性为 93%; GAS8-AS1 的 ROC 曲线 AUC 为  $0.84 \pm 0.05$  (95% CI: 0.734 6 ~ 0.947 6,  $P < 0.000 1$ ), 以 GAS8-AS1 的阳性临界值为 0.712 3, 其诊断敏感性为 83%, 特异性为 83%; miR-25-3p 的 ROC 曲线 AUC 为  $0.84 \pm 0.06$  (95% CI: 0.737 3 ~ 0.958 2,  $P < 0.000 1$ ), 以 miR-25-3p 的阳性临界值为 0.908 9, 其诊断敏感性为 87%, 特异性为 87%。Tg 的 ROC 曲线 AUC 为  $0.81 \pm 0.04$  (95% CI: 0.728 3 ~ 0.882 8,  $P < 0.000 1$ ), 以 Tg 的阳性临界值为 12.87 (μg/L), 其诊断敏感性为 83%, 特异性为 73%, 见图 1 (封 3)。

表 2 3 组血清 miR-451a、miR-25-3p、GAS8-AS1 的表达水平比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	miR-451a	GAS8-AS1	miR-25-3p	Tg( $\mu\text{g/L}$ )
肿瘤组	70	1.48 $\pm$ 0.11 <sup>ab</sup>	0.38 $\pm$ 0.07 <sup>ab</sup>	1.58 $\pm$ 0.11 <sup>ab</sup>	15.53 $\pm$ 1.24 <sup>a</sup>
良性组	70	0.68 $\pm$ 0.24 <sup>b</sup>	1.49 $\pm$ 0.28	0.92 $\pm$ 0.22 <sup>b</sup>	11.65 $\pm$ 0.23
对照组	70	0.20 $\pm$ 0.12	1.51 $\pm$ 0.21	0.47 $\pm$ 0.04	11.58 $\pm$ 0.31
<i>F</i>		14.920	9.849	15.060	9.090
<i>P</i>		<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1	0.000 2

注:与良性组相比,<sup>a</sup>*P*<0.05;与对照组相比,<sup>b</sup>*P*<0.05;Tg:甲状腺球蛋白

2.3 肿瘤组和良性组血清 miR-451a、miR-25-3p、GAS8-AS1 的 ROC 曲线、AUC、敏感性、特异性和截断值 为了评估血清中 miR-451a、miR-25-3p、GAS8-AS1 在肿瘤组和对照组中的诊断价值,绘制肿瘤组和对照组的 ROC 曲线。miR-451a 的 ROC 曲线 AUC 为 0.85  $\pm$  0.06 (95% *CI*: 0.736 5 ~ 0.974 6, *P*<0.000 1), 以 miR-451a 的阳性临界值为 1.029, 其诊断敏感性为 97%, 特异性为 87%; GAS8-AS1 的 ROC 的 AUC 为 0.86  $\pm$  0.06 (95% *CI*: 0.75 ~ 0.97, *P*<0.000 1), 以 GAS8-AS1 的阳性临界值为 0.713 5, 其诊断敏感性为 97%, 特异性为 80%; miR-25-3p 的 ROC 曲线 AUC 为 0.84  $\pm$  0.05 (95% *CI*: 0.748 5 ~ 0.947 0, *P*<0.000 1), 以 miR-25-3p 的阳性临界值为 1.046, 其诊断敏感性为 78%, 特异性为 93%。Tg 的 ROC 曲线 AUC 为 0.81  $\pm$  0.04 (95% *CI*: 0.729 7 ~ 0.886 0, *P*<0.000 1), 以 Tg 的阳性临界值为 12.54 ( $\mu\text{g/L}$ ), 其诊断敏感性为 84%, 特异性为 71%, 见图 2(封 3)、表 4。

2.4 血清 miR-451a、miR-25-3p、GAS8-AS1 联合诊断早期 PTC 患有早期 PTC 为真阳性, 未患有早期 PTC 为真阴性。因 Tg 的敏感性和特异性较低, 故采用血清 miR-451a、miR-25-3p、GAS8-AS1 的联合诊断。以 miR-451a 的阳性临界值为 1.029, GAS8-AS1 的阳性临界值为 0.723, miR-25-3p 的阳性临界值为 1.046 为诊断标准, 三者均满足为联合诊断阳性, 反之则为联合诊断阴性。血清 miR-451a、miR-25-3p、GAS8-AS1 联合对早期 PTC 诊断的敏感性为 94.29% (66/70), 特异性为 88.57% (124/140), 准确性为 90.48% (190/210), 见表 3。

表 3 血清 miR-451a、miR-25-3p、GAS8-AS1 联合诊断早期甲状腺乳头状癌

诊断方法	类型	病理结果		合计
		阳性	阴性	
联合诊断	阳性	66	16	82
	阴性	4	124	128
合计		70	140	210

注:GAS8-AS1:生长阻滞特异性因子 8 反义 RNA1

### 3 讨论

目前,患有可疑甲状腺结节的患者通常通过超

声、CT 进行检查。随后,通过术前超声引导细针穿刺细胞学检查和术中病理检查冷冻切片检查可疑 PTC 患者<sup>[4]</sup>。术前超声引导细针穿刺细胞学检查采样不足会导致细胞学诊断失败,可能需要反复抽吸<sup>[5]</sup>。由于其侵入性,重复抽吸对 PTC 患者可能是危险的。迫切需要一种新的生物标志物来区分临床上的恶性甲状腺病变和良性甲状腺病变。本研究发现血清 miR-451a、miR-25-3p、GAS8-AS1 联合对早期 PTC 诊断的敏感性为 94.29%, 特异性为 88.57%, 准确性为 90.48%。血清 miR-451a、miR-25-3p、GAS8-AS1 单项诊断的敏感性和特异性均高于 Tg。

以往的研究表明,甲状腺组织中 miR-451 表达上调与 PTC 淋巴转移有关,而甲状腺未分化癌细胞中 miR-25 的异位表达,通过诱导细胞周期阻滞来抑制癌细胞的增殖<sup>[6-7]</sup>。miR-451a 是不同前体产生高度相似成熟 miR-451 的一种 miRNA, miR-25-3p 来源于前体 miR-25 3' 端茎环臂的 miRNA。本研究发现,肿瘤组血清 miR-451a、miR-25-3p 的表达水平均高于良性组和对照组 (*P* 均 <0.05)。miR-451a、miR-25-3p 鉴别肿瘤组与对照组敏感性分别为 86%、87%, 特异性分别为 93%、87%, 鉴别肿瘤组与良性组的敏感性分别为 97%、78%, 特异性分别为 87%、93%。先前的研究发现,miR-25 的高表达能够抑制癌细胞的增殖<sup>[7]</sup>。PTC 患者血清中 miR-25 的高表达可能是机体对 PTC 的自我调节。众所周知,循环 miRNA 是肿瘤细胞死亡和裂解的产物,由肿瘤来源的微泡或外泌体释放,可能来自癌症相关的免疫反应<sup>[8]</sup>。因此,PTC 可以释放更高水平的血浆 miR-25-3p 和 miR-451a。

据报道,在 PTC 中, GAS8-AS1 c.713A>G/714T>C 的核苷酸改变导致其 RNA 表达的显著降低<sup>[9]</sup>。同时,与甲状腺癌旁组织相比,没有突变的 PTC 组织中也观察到 GAS8-AS1 水平降低,因此 GAS8-AS1 的表达水平与 PTC 的发生、发展相关,提示其可成为潜在的 PTC 生物标志物。本研究发现,肿瘤组 GAS8-AS1 的表达水平低于良性组和对照组

( $P < 0.05$ )。GAS8-AS1 鉴别肿瘤组与对照组的敏感性和特异性均为 83%。GAS8-AS1 鉴别肿瘤组与良性组敏感性和特异性分别为 97% 和 80%。异位表达的 GAS8-AS1 显著抑制多种甲状腺癌细胞系的细胞活力,而内源性 GAS8-AS1 表达的降低可促进 PTC 细胞的增殖,提示 GAS8-AS1 是一个潜在的抑癌基因<sup>[10-11]</sup>。

本研究存在局限性,未对血清 miR-25-3p、miR-451a 和 GAS8-AS1 水平与临床病理特征之间的潜在关系进行详细分析,因为样本量较小,难以进行分层和缺乏对这些 miRNA 的功能研究。因此,需要在更大群体中进一步研究,以评估血清 miR-25-3p、miR-451a 和 GAS8-AS1 水平作为 PTC 术前诊断以及预测肿瘤复发的生物标志物的价值。

综上所述,血清 miR-451a、miR-25-3p、GAS8-AS1 的联合检测可作为诊断早期 PTC 的潜在标志。

### 参 考 文 献

- [1] Ma L, Zhou Y, Luo X, et al. Long non-coding RNA XIST promotes cell growth and invasion through regulating miR-497/MACCl axis in gastric cancer[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(3):4125-4135. DOI:10.18632/oncotarget.13670.
- [2] Min L, Qinbin S, Hang L, 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.
- [3] Dongxue Z, Xin L, Bojun W, et al. Plasma lncRNA GAS8-AS1 as a potential biomarker of papillary thyroid carcinoma in Chinese patients [J]. *Int J Endocrinol*, 2017, 2017:2645904. DOI: 10.1155/2017/2645904.
- [4] 张渊琪, 赵德善. 分化型甲状腺癌的治疗进展[J]. *国际放射医学核医学杂志*, 2017, 41(2):126-131. DOI:10.3760/j.issn.1673-0860.2006.06.028.
- [5] Mallick UK. The revised American Thyroid Association management guidelines 2009 for patients with differentiated thyroid cancer: an evidence-based risk-adapted approach[J]. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*, 2010, 22(6):472-474. DOI: 10.1016/j.clon.2010.05.001.
- [6] Wang Z, Zhang H, Zhang P, et al. Upregulation of miR-2861 and miR-451 expression in papillary thyroid carcinoma with lymph node metastasis[J]. *Med Oncol*, 2013, 30(2):577. DOI: 10.1007/s12032-013-0577-9.
- [7] Esposito F, Tornincasa M, Pallante P, et al. Down-regulation of the miR-25 and miR-30d contributes to the development of anaplastic thyroid carcinoma targeting the polycomb protein EZH2 [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2012, 97(5):E710-E718. DOI: 10.1210/jc.2011-3068.
- [8] 罗雪兰, 陈伟, 莫国君, 等. 27-nt miRNA 对血管内皮细胞 eNOS 表达/活性的调节及其代谢产物的影响[J]. *现代生物医学进展*, 2017, 17(8):1442-1447. DOI:10.13241/j.cnki.pmb.2017.08.009.
- [9] Pan W, Zhou L, Ge M, et al. Whole exome sequencing identifies lncRNA GAS8-AS1 and LPAR4 as novel papillary thyroid carcinoma driver alternations[J]. *Hum Mol Genet*, 2016, 25(9):1875. DOI:10.1093/hmg/ddw056.
- [10] Pan W, Zhou L, Ge M, et al. Whole exome sequencing identifies lncRNA GAS8-AS1 and LPAR4 as novel papillary thyroid carcinoma driver alternations [J]. *Hum Mol Genet*, 2016, 25(9):1875-1884. DOI:10.1093/hmg/ddw056.
- [11] Pan W, Zhang N, Liu W, et al. The long noncoding RNA GAS8-AS1, suppresses hepatocarcinogenesis by epigenetically activating the tumor suppressor GAS8 [J]. *J Biol Chem*, 2018, 293(44):17154-17165. DOI:10.1074/jbc.RA118.003055.

(收稿日期:2020-03-06)

(本文编辑:饶颖)

## • 消息 •

### 2021 年《国际内分泌代谢杂志》征稿暨征订启事

《国际内分泌代谢杂志》原刊名《国外医学内分泌学分册》,是由中华人民共和国国家卫生健康委员会主管,中华医学会、天津医科大学主办的国内外公开发行的国家级医学学术期刊,是中华医学会系列杂志之一。本刊为中文科技核心期刊。主要栏目设有述评、专家论坛、临床热点话题、综述、论著、报道与交流、病例报告、争鸣园地、新药介绍、网上快讯、会议精粹等。

除综述类文章,本刊还欢迎具有独创性和包含重大研究成果的论著文章。已在国外核心期刊发表的研究成果可以中文形式在本刊二次发表,以促进国内研究人员对该研究工作的深入了解。另外,如果您有内分泌方面的常见但易于误诊、误治或疑难、罕见病例,也欢迎您投稿。

《国际内分泌代谢杂志》中国标准连续出版物号:CN 12-1383/R,ISSN 1673-4157。

本杂志印刷版为大 16 开 72 页,双月刊,逢单月 20 日出版,每册定价 25 元,全年 6 期,共计 150 元。国外代号:W86。国内邮发代号:6-53,全国邮局均可订阅,也可直接向编辑部订阅。

地址:300070 天津市和平区气象台路 22 号天津医科大学院内《国际内分泌代谢杂志》编辑部

电话:022-83336730

本刊编辑部