

甲状腺癌组织 miR-93-5p、BRMS1L 表达水平及临床意义研究

熊燕 周颖 蒋桂珍 陈金丽

[摘要] 目的 探究甲状腺癌组织中微小 RNA-93-5p(miR-93-5p)、乳腺癌转移抑制基因 1 相似基因(BRMS1L)表达及临床意义。方法 选取行手术治疗的甲状腺癌患者 150 例,收集患者临床病理资料,术中取患者甲状腺癌组织及对应癌旁组织。利用癌症基因组图谱(TCGA)查询 miR-93-5p、BRMS1L 基因在甲状腺癌组织中的表达水平;采用免疫组织化学法检测甲状腺癌组织与癌旁组织中 BRMS1L 蛋白表达情况;采用 qRT-PCR 法分析甲状腺癌组织与癌旁组织中 miR-93-5p 表达;分析 miR-93-5p、BRMS1L 表达水平与甲状腺癌患者临床病理参数之间的关系;对患者随访 3 年,统计 3 年累计生存率,分析 miR-93-5p、BRMS1L 水平对患者 3 年累计生存率的影响。结果 TCGA 数据库显示,甲状腺癌组织中 miR-93-5p 基因表达水平与癌旁组织比较,差异无统计学意义($t=1.73, P>0.05$);甲状腺癌组织中 BRMS1L 基因表达水平低于癌旁组织,差异有统计学意义($t=2.98, P<0.05$);免疫组织化学染色结果显示,BRMS1L 蛋白在甲状腺癌组织中的阳性表达率明显低于癌旁组织($\chi^2=47.17, P<0.05$),miR-93-5p 在甲状腺癌组织中的表达水平明显高于癌旁组织($t=26.31, P<0.05$)。miR-93-5p、BRMS1L 表达水平与患者年龄、TNM 分期、淋巴结转移和分化程度相关(χ^2 分别=9.98、5.18;9.29、3.90;72.44、11.96;24.22、47.55, P 均 <0.05)。甲状腺癌组织中 miR-93-5p 高表达组和低表达组患者 3 年累计生存率分别为 65.70%、27.00%,差异有统计学意义($\chi^2=7.95, P<0.05$);BRMS1L 高表达组和低表达组患者 3 年累计生存率分别为 31.80%、52.00%,差异有统计学意义($\chi^2=3.98, P<0.05$)。结论 miR-93-5p 在甲状腺癌组织中的表达水平高于癌旁组织,BRMS1L 表达低于癌旁组织,均与患者年龄、TNM 分期、淋巴结转移和分化程度相关,对患者 3 年累计生存率有一定的影响。

[关键词] 甲状腺癌; 微小 RNA-93-5p; 乳腺癌转移抑制基因 1 相似基因; 临床意义

The expression levels and clinical significance of miR-93-5p and BRMS1L in thyroid cancer tissues XIONG Yan, ZHOU Ying, JIANG Guizhen, et al. Department of Laboratory, Lishui Second People's Hospital, Lishui 323000, China.

[Abstract] **Objective** To explore the expression and clinical significance of microRNA-93-5p (miR-93-5p) and breast cancer metastasis suppressor 1 like (BRMS1L) in thyroid cancer tissues. **Methods** A total of 150 cases of thyroid cancer patients who underwent surgical treatment were selected. The clinicopathological data of patients were collected, and the patient's thyroid cancer tissue and corresponding adjacent tissues were taken during the operation. The cancer genome atlas (TCGA) was used to query the expression levels of miR-93-5p and BRMS1L genes in thyroid cancer tissues. Immunohistochemical method was used to detect the expression of BRMS1L protein in thyroid cancer tissues and adjacent tissues. The qRT-PCR was used to analyze the expression of miR-93-5p in thyroid cancer tissues and adjacent tissues. The relationship between the expression levels of miR-93-5p, BRMS1L and clinicopathological parameters in patients with thyroid cancer was analyzed. The patients were followed up for 3 years, the survival rate within 3 years was counted, and the effects of miR-93-5p and BRMS1L levels on the survival rate of patients within 3 years were analyzed.

Results The TCGA database showed that the expression level of miR-93-5p gene in thyroid cancer tissue was higher

DOI:10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2022.004.006

基金项目:浙江省基础公益研究计划项目(LGF20H090016)

作者单位:323000 浙江丽水,丽水市第二人民医院检验科(熊燕、蒋桂珍),特检科(陈金丽);丽水市人民医院检验科(周颖)

than that in adjacent tissues, but the difference was not statistically significant ($t=1.73, P>0.05$). The expression level of BRMS1L gene in thyroid cancer tissue was lower than that in adjacent tissues ($t=2.98, P<0.05$). The results of immunohistochemical staining showed that the positive expression rate of

BRMS1L protein in thyroid cancer tissues was significantly lower than that in adjacent tissues ($\chi^2=47.17, P<0.05$), and the expression level of miR-93-5p in thyroid cancer tissues was significantly higher than that in adjacent tissues ($t=26.31, P<0.05$). The expression levels of miR-93-5p and BRMS1L were correlated with age, TNM stage, lymph node metastasis and differentiation degree ($\chi^2=9.98, 5.18, 9.29, 3.90, 72.44, 11.96, 24.22, 47.55, P<0.05$). The 3-year survival rate of patients in the miR-93-5p high expression group and low expression group was 65.70% and 27.00%, respectively, the difference was statistically significant ($\chi^2=7.95, P<0.05$). The 3-year survival rate of patients in the BRMS1L high expression group and low expression group was 31.80% and 52.00%, respectively, the difference was statistically significant ($\chi^2=3.98, P<0.05$). **Conclusion** The expression level of miR-93-5p in thyroid cancer tissues is higher than that in adjacent tissues, and BRMS1L is lower than that in adjacent tissues. They are related to the patient's age, TNM stage, lymph node metastasis and degree of differentiation, and have a certain impact on the survival rate within 3 years.

[Key words] thyroid cancer; microRNA-93-5p; breast cancer metastasis suppressor 1 like; clinical significance

甲状腺癌是指甲状腺上皮细胞的恶性肿瘤,是世界上生长最快的癌症之一。据报道,甲状腺癌的发病率为3.1%,在所有恶性肿瘤中排名第11位,死亡率为0.4%。其中,分化型甲状腺癌的恶性程度、预后优于未分化型,早期治疗后生存率一般较高^[1]。微小RNA(microRNA, miRNA)是最近新发现的一类短序列非编码RNA^[2],成熟的miRNA可靶向结合mRNA 3'-UTR区,从而对基因网络进行调控^[3]。其中miR-93-5p可促进宫颈癌细胞增殖,抑制自然杀伤细胞的杀伤能力,且在骨髓瘤、多发性癌和肝细胞癌等多种恶性肿瘤中表达增高,对癌细胞增殖、凋亡发挥重要生物学功能^[4]。而乳腺癌转移抑制基因1(breast cancer metastasis suppressor 1, BRMS1)是最近研究人员新发现的肿瘤转移抑制基因,即随着肿瘤细胞转移能力的增加,其BRMS1 mRNA的表达逐渐下降^[5-7]。但是,关于miR-93-5p、BRMS1相似基因(BRMS1 like, BRMS1L)在甲状腺癌组织的表达尚未见到相关报道。因此,本研究旨在探讨miR-93-5p、BRMS1L在甲状腺癌组织的表达及临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取2016年3月到2019年3月在丽水市人民医院和丽水市第二人民医院行手术治疗的甲状腺癌患者150例,其中男性76例、女性74例;年龄18~86岁;根据国际抗癌联盟标准确定临床分期:I期62例、II期50例、III期20例、IV期18例;分化程度:低分化65例、中分化50例、高分化35例;淋巴结转移90例、无淋巴结转移60例。纳入标准为:①所有患者术前均未进行放化疗等其他抗癌治疗;②所有取得的组织标本均经病理证实。排除标准为:①合并有其他肿瘤或恶性疾病的患者;

②存在心、肝、肾等重要脏器功能障碍。本次研究经过医院伦理委员会审批。

1.2 方法

1.2.1 数据库分析 利用癌症基因组图谱(the cancer genome atlas, TCGA)数据库分析miR-93-5p、BRMS1L基因在甲状腺癌组织和癌旁组织中的表达。

1.2.2 免疫组化分析 术中取患者甲状腺癌组织及对应癌旁组织,迅速置于液氮中保存。将甲状腺癌组织及对应的癌旁组织用石蜡包埋,制成4 μ m连续切片,充分烘烤后置于枸橼酸缓冲液10 min;一抗BRMS1L单克隆抗体(由北京博奥派克生物科技股份有限公司生产)4 $^{\circ}$ C过夜孵育24 h后,添加二抗室温下孵育1 h;二氨基联苯胺染色,苏木精复染,在显微镜下观察染色情况。观察BRMS1L的表达。

1.2.3 实时荧光定量聚合酶链反应(real-time quantitative PCR, qRT-PCR)检测 miR-93-5p 使用PureLink[®] RNA微量提取试剂盒(由广州吉赛生物科技股份有限公司生产)提取甲状腺癌组织中总RNA并进行质量检测。根据RevertAid RT逆转录试剂盒(由广州吉赛生物科技股份有限公司生产)说明书将总RNA反转录成扩增所需模板cDNA。采用Gentier 96E/96R全自动医用PCR分析系统(由西安天隆科技有限公司生产),根据qRT-PCR试剂盒说明书进行操作,总反应体系为10 μ l。反应条件为:95 $^{\circ}$ C预热15 min;然后94 $^{\circ}$ C变性15 s,55 $^{\circ}$ C退火30 s,70 $^{\circ}$ C延伸30 s,共40个循环。miR-93-5p以U6作为内参,用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 来计算基因的相对表达量。引物序列见表1。

1.3 染色结果及判定 显微镜下随机选取5个视野,对细胞着色部分进行记分:细胞基本未着色为

0分;细胞着浅黄色为1分;细胞着深黄色为2分;细胞着棕褐色为3分。根据评分结果分为两组:分

数<2为阴性,即为低表达水平;分数≥2为阳性,即为高表达水平。

表1 qRT-PCR引物序列

基因名称	正向引物5'-3'	反向引物5'-3'
miR-93-5p	GGCAAACCTCTGTTTCGTC	GTGCGTCTCGTGGAGTCG
U6	GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT	CGCTTCACGAATTTGCGTGTCTAT

1.4 统计学方法 采用SPSS25.0软件进行数据的录入与分析。计数资料以例或%表示,采用 χ^2 检验;计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用 t 检验;使用Log-Rank检验miR-93-5p、BRMS1L表达与患者3年累计生存率的关系。以 $P < 0.05$ 为

差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-93-5p、BRMS1L基因在甲状腺癌组织和癌旁组织中的表达水平见图1

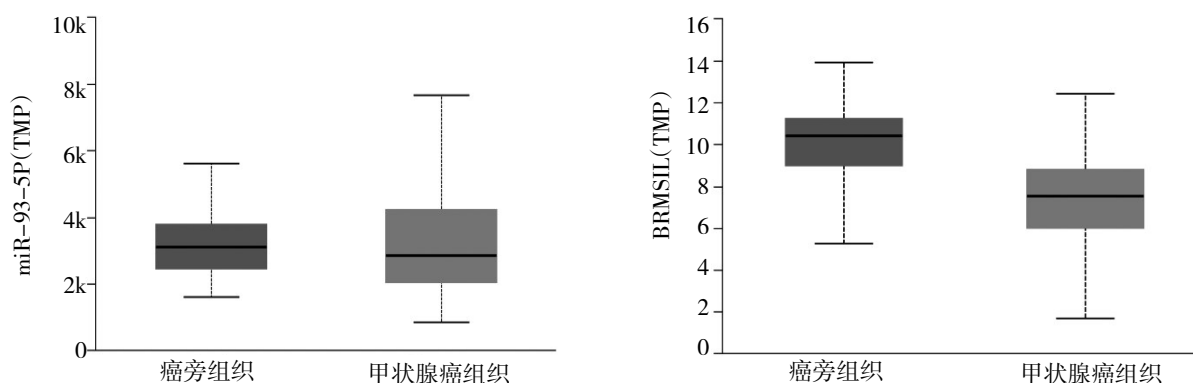


图1 miR-93-5p、BRMS1L基因在甲状腺癌中的表达水平

由图1可见,TCGA数据库显示,甲状腺癌组织中miR-93-5p基因表达水平与癌旁组织比较,差异无统计学意义($t=1.73, P>0.05$);甲状腺癌组织中BRMS1L基因表达水平低于癌旁组织,差异有统计学意义($t=2.98, P<0.05$)。

2.2 免疫组化染色见封二图2

由封二图2可见,免疫组化染色结果显示BRMS1L主要定位于细胞核和细胞质中。

2.3 BRMS1L蛋白表达水平 BRMS1L蛋白在甲状腺癌组织中的阳性表达率为24.00%,明显低于癌旁组织的63.33%,差异有统计学意义($\chi^2=47.17, P<0.05$)。

2.4 miR-93-5p表达水平 miR-93-5p在甲状腺癌组织中的表达水平为(1.83 ± 0.38),明显高于癌旁组织(1.00 ± 0.07),差异有统计学意义($t=26.31, P<0.05$)。

2.5 miR-93-5p、BRMS1L表达情况与患者临床病理参数之间的关系 以甲状腺癌组织miR-93-5p中位值(1.83)为界,将甲状腺癌患者分为miR-93-5p高表达组(111例)和miR-93-5p低表达组(39例)。

miR-93-5p、BRMS1L表达情况与患者临床病理参数之间的关系见表2。

由表2可见,miR-93-5p、BRMS1L表达情况与甲状腺癌患者年龄、TNM分期、淋巴结转移和分化程度相关(χ^2 分别=9.98、5.18; 9.29、3.90; 72.44、11.96; 24.22、47.55, P 均<0.05),与性别无关(χ^2 分别=0.01、0.00, P 均>0.05)。

2.6 甲状腺癌组织中miR-93-5p、BRMS1L表达水平与患者3年累计生存率的关系 采用电话随访或门诊随访的方式,随访时间从出院日开始,随访期限为3年。甲状腺癌组织中不同表达水平的miR-93-5p、BRMS1L患者的3年累计生存率见图2。

由图2可见,甲状腺癌组织中miR-93-5p高表达组和低表达组患者3年累计生存率分别为65.70%、27.00%,经Log-Rank检验,差异有统计学意义($\chi^2=7.95, P<0.05$);甲状腺癌组织中BRMS1L高表达组和低表达组患者3年累计生存率分别为31.80%、52.00%,经Log-Rank检验,差异有统计学意义($\chi^2=3.98, P<0.05$)。

表2 miR-93-5p、BRMS1L与甲状腺癌临床病理特征的关系/例(%)

临床病理特征		n	miR-93-5p		BRMS1L	
			低表达(n=39)	高表达(n=111)	低表达(n=95)	高表达(n=55)
年龄	>50岁	100	34(34.00)	66(66.00)	57(57.00)	43(43.00)
	≤50岁	50	5(10.00)	45(90.00)	38(76.00)	12(24.00)
性别	男	76	20(26.32)	56(73.68)	48(63.16)	28(36.84)
	女	74	19(25.66)	55(74.32)	47(63.51)	27(36.49)
TNM分期	I~II	112	22(19.64)	90(80.36)	76(67.86)	36(32.14)
	III~IV	38	17(44.74)	21(55.26)	19(50.00)	19(50.00)
淋巴结转移	有	90	1(1.11)	89(98.89)	67(74.44)	23(25.26)
	无	60	38(63.33)	22(36.67)	28(46.67)	32(53.33)
分化程度	中高	85	9(10.59)	76(89.41)	74(87.06)	11(12.94)
	低	65	30(46.15)	35(53.85)	21(32.31)	44(67.69)

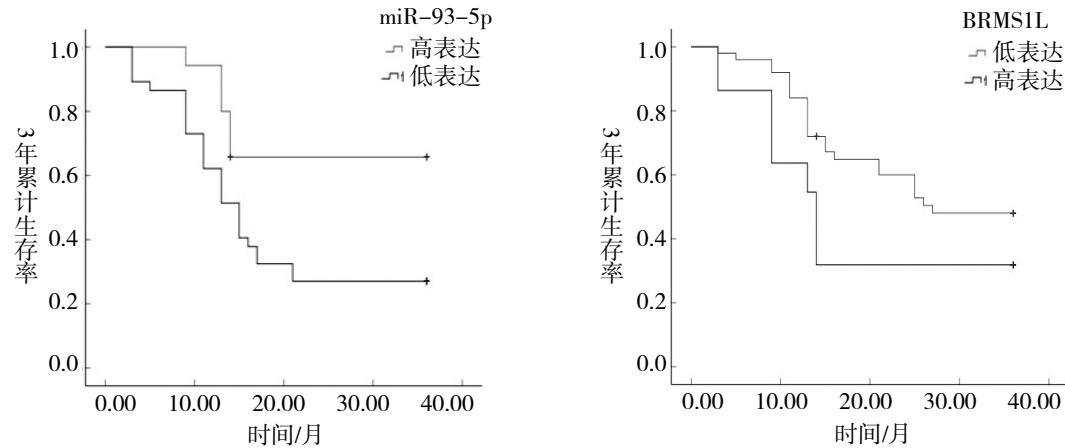


图2 不同表达水平的miR-93-5p、BRMS1L患者的3年累计生存率

3 讨论

甲状腺癌是常见的内分泌恶性肿瘤,占每年诊断出的所有癌症的3.4%。不同人群的发病率不同^[8]。根据组织学特征将甲状腺肿瘤细分为几种不同的亚型,最常见的是乳头状癌(70%~80%),其次是滤泡癌(10%~20%)、髓样癌(5%~10%)和间变性癌(2%~10%)。基因突变、拷贝数变异和DNA甲基化等均与甲状腺癌发生和进展有关^[9]。肿瘤细胞无限增殖的机制除细胞复制增殖信息传导通路异常活跃外,还依赖于新生血管形成来提供营养,促进生长。而靶向化疗主要通过阻断肿瘤细胞增殖信息传导通路及新生血管生成而发挥作用。miR-93-5p、BRMS1L主要是通过干扰丝裂原活化蛋白激酶/细胞外调节蛋白激酶和磷脂酰肌醇3激酶/蛋白激酶B等信号途径,并控制肿瘤的增殖活动。

miR-93-5p是与骨髓瘤、肝细胞癌等恶性肿瘤发生相关的基因^[10],主要参与DNA损伤反应^[11,12]。

本研究使用TCGA数据库检索发现,甲状腺癌组织中miR-93-5p基因表达水平高于正常组织,qRT-PCR结果显示,miR-93-5p在甲状腺癌组织中的表达高于癌旁组织。本次研究还发现,miR-93-5p表达情况与甲状腺癌患者年龄、TNM分期、淋巴结转移和分化程度相关;并且甲状腺癌组织中miR-93-5p高表达组患者3年累计生存率65.70%高于低表达组患者27.00%,提示miR-93-5p表达水平与患者部分临床病理参数和3年累计生存率有关。

BRMS1L被证明与转移抑制恶性肿瘤密切相关,转移抑制是BRMS1L复合物的核心组成部分。越来越多的证据表明BRMS1L在甲状腺癌的发生、转移中起到了重要作用。除此之外,BRMS1L能够参与调节癌症转移的许多过程,包括迁移、侵袭以及淋巴结转移。本研究表明,甲状腺癌组织中BRMS1L阳性表达率低于癌旁组织,王继红等^[13]实验结果显示,鼻咽癌组织中BRMS1L阳性表达率显著低于癌

旁组织,与本研究结果一致,初步说明,BRMS1L蛋白表达与癌细胞的转移过程可能有一定关联。除此之外,BRMS1L表达水平与乳腺癌、肺癌、黑色素瘤、胶质瘤的转移密切相关^[14]。本研究发现,BRMS1L蛋白表达情况与甲状腺癌患者淋巴结转移、分化程度、年龄、TNM分期相关;BRMS1L高表达3年累计生存率31.80%低于BRMS1L低表达的患者52.00%,说明甲状腺癌患者的BRMS1L表达水平与临床病理参数及患者3年累计生存率有密切关系。

综上所述,miR-93-5p在甲状腺癌组织的水平高于癌旁组织,BRMS1L在甲状腺癌组织的水平低于癌旁组织,二者表达水平均与患者年龄、TNM分期、淋巴结转移和分化程度有关,对患者3年累计生存率有一定的影响。但是本研究样本量较少,可能存在一定的误差,后续还需扩大样本量,继续研究。

参考文献

- 1 陈霖霖,李正东,金从稳,等.甲状腺乳头状癌患者血清miR-21、miR-221、miR-146a水平变化及其与临床特征的关系[J].山东医药,2021,61(13):21-24.
- 2 查卫娜,刘阁玲,杨晓琳.MiRNAs在甲状腺癌中的研究进展[J].海南医学,2021,32(2):240-245.
- 3 毛君,付珺.microRNAs在甲状腺癌中的异常表达和功能研究进展[J].中国临床研究,2021,34(1):126-128,132.
- 4 李宗禹,徐金锴,赖婧玥,等.miR-93-5p靶向CCNG2基因对甲状腺癌细胞增殖和凋亡的影响及其机制[J].现代肿瘤医学,2020,28(19):3325-3330.
- 5 马欢,焦英华,李曙光,等.直肠癌患者BRMS1mRNA、PT-NmRNA的表达及临床意义[J].分子诊断与治疗杂志,2020,12(11):1479-1483.
- 6 冯勤超,邹贤,王国瑞,等.基于微阵列数据分析的甲状腺癌circRNA-miRNA调控预测模型研究[J].南京医科大学学报(自然科学版),2020,40(8):1140-1148.
- 7 张磊,李国良,孟帮柱,等.miR-485-5p通过靶基因FLOT2调控甲状腺癌细胞增殖、凋亡的分子机制[J].中国老年学杂志,2020,40(15):3313-3319.
- 8 陈杰.miR-20a-5p靶向调控BRMS1L对人结直肠癌细胞株SW480增殖、凋亡能力的影响及其机制探讨[J].山东医药,2020,60(12):5-9.
- 9 周伟清,庄一心,沈卫星,等.甲状腺癌患者血清let-7e、miR-142表达及其与Th17/Treg的相关性分析[J].疑难病杂志,2020,19(4):362-366,380.
- 10 祝心怡,鲁海珍.甲状腺癌分子病理研究新进展[J].肿瘤预防与治疗,2019,32(12):1119-1126.
- 11 苗雅昕,陈万志.miRNA对甲状腺癌诊治各阶段作用的研究进展[J].肿瘤预防与治疗,2019,32(12):1127-1134.
- 12 Chen X, Liu J, Zhang Q, et al. Exosome-mediated transfer of miR-93-5p from cancer-associated fibroblasts confer radioresistance in colorectal cancer cells by downregulating FOXA1 and upregulating TGFβ3[J]. Exp Clin Cancer Res, 2020, 39(1):65-66.
- 13 王继红,马素丽,夏西超,等.miR-17-5p通过下调BRMS1L表达调控鼻咽癌CNE2细胞增殖、侵袭、迁移和凋亡[J].中国肿瘤生物治疗杂志,2019,26(11):1249-1255.
- 14 Zhou R, Tang X, Li L, et al. Identification of BRMS1L as metastasis suppressing gene in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Cancer Manag Res, 2020, 12:531-539.

(收稿日期 2022-01-11)

(本文编辑 葛芳君)