

外周血促甲状腺激素受体 mRNA 鉴别甲状腺良恶性结节的研究

任婷婷 吴艺捷 金宇颺 顾鸣宇 林毅 徐艳红

【摘要】 **目的** 检测甲状腺结节患者外周血促甲状腺素受体(TSHR)mRNA 的表达水平,探讨其在甲状腺良恶性结节鉴别诊断中的价值。**方法** 以细针穿刺细胞学检查(FNAC)和(或)术后组织病理学结果为诊断标准,对 33 例甲状腺良性结节,39 例恶性结节患者,以及 20 名健康对照,采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)方法检测其外周血 TSHR mRNA 表达情况。**结果** 对照组 TSHR mRNA 表达均为阴性,而良性结节组与恶性结节组术前外周血 TSHR mRNA 阳性率分别为 48.5% 和 91.2%,二者差异具有统计学意义($P < 0.01$)。甲状腺癌组术前外周血 TSHR mRNA 表达水平明显高于对照组、良性组及甲状腺癌术后组(均 $P < 0.01$)。采用 TSHR mRNA 诊断甲状腺癌的敏感性、特异性及准确率依次为 91.2%、51.5% 和 71.6%。采用外周血 TSHR mRNA 和 FNAC 二者分别及联合检测时,诊断甲状腺癌的敏感性依次为 91.3%、86.9% 和 100.0%,而准确率依次为 84.0%、80.0% 和 92.0%。外周血 TSHR mRNA 表达与性别、年龄、结节直径、结节数量之间无明显关联性(均 $P > 0.05$),但在良恶性结节间明显不同($P < 0.01$)。**结论** 外周血 TSHR mRNA 表达水平可作为甲状腺癌分子标志物,有助于甲状腺良恶性结节的鉴别诊断。

【关键词】 甲状腺癌;外周血;促甲状腺素受体;分子标志物

Investigation on peripheral blood TSHR mRNA for differentiation of benign and malignant thyroid nodules

REN Ting-ting, WU Yi-jie, JIN Yu-biao, GU Ming-yu, LIN Yi, XU Yan-hong. Department of Endocrinology and Metabolism, Affiliated First People's Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200080, China

Corresponding author: WU Yi-jie, Email: drwuyijie@gmail.com

【Abstract】 **Objective** To assess the value of peripheral blood thyroid stimulating hormone receptor(TSHR) mRNA determination in differential diagnosis of benign and malignant thyroid nodules. **Methods** Fine needle aspiration cytology(FNAC) and(or) postoperative histopathology as the gold standard were carried out, the expression of circulating TSHR mRNA was determined by RT-PCR in 33 patients with benign thyroid nodules, 39 patients with thyroid cancer, and 20 normal controls. **Results** TSHR mRNA signals were not detected in normal controls, the positive rate of TSHR mRNA was higher in the group with malignant nodules than the group of benign nodules(91.2% vs 48.5%, $P < 0.01$). TSHR mRNA level in the preoperative malignant group was significantly higher than that in the normal, benign, and postoperative cancer groups(all $P < 0.01$). Using peripheral blood TSHR mRNA for differentiating benign or malignant of thyroid nodule had a sensitivity, specificity, and accuracy of 91.2%, 51.5% and 71.6%, respectively. The sensitivities of TSHR mRNA, FNAC, and these two methods combined in detecting malignant nodules were 91.3%, 86.9%, and 100.0% respectively, while diagnostic accuracies were respectively 84.0%, 80.0%, and 92.0%. TSHR mRNA expression showed no significant relationship with sex, age, size, and number of nodule in these patients(all $P > 0.05$), but it did exhibit significant difference between benign and malignant nodules($P < 0.01$). **Conclusion** The peripheral blood TSHR mRNA could be used as a molecular marker for thyroid cancer, and it would help enhance the preoperative differentiation of benign and malignant thyroid nodules.

【Key words】 Thyroid cancer; Peripheral blood; Thyroid stimulating hormone receptor; Molecular markers
(Chin J Endocrinol Metab, 2013, 29; 112-115)

甲状腺结节在临床上很常见,其中多数为良性结节,少数为恶性结节,二者早期临床表现相似,但治疗方法及预后并不相同,因此鉴别甲状腺结节良恶性性质

至关重要^[1]。尽管临床上可采用高分辨率超声、扫描、CT、MRI、甲状腺细针穿刺细胞学检查(FNAC)等来评估结节的良恶性性质,但依然存在一定的局限性,造成了一些患者进行不必要的手术治疗^[1-3]。由于甲状腺癌细胞可以分泌、表达一些甲状腺特异性抗原,因此,近年国外一些学者致力于在组织或外周血中寻找甲状腺癌分子标志物,关注热点包括 DNA 甲基化

物、BRAF 基因、甲状腺球蛋白 (Tg) mRNA、促甲状腺素受体 (TSHR) mRNA 和甲状腺过氧化物酶 (TPO) mRNA 等^[4-7],国内近年也有外周血 Tg mRNA 表达的报道^[8]。虽然这些研究分别从甲状腺癌早期诊断、监测复发及转移方面探讨了这些分子标记物的意义,但离临床实际应用尚有距离。因此,本组观察了一组甲状腺良、恶性结节患者以及健康人外周血 TSHR mRNA 表达的差异,探讨其在鉴别甲状腺良恶性结节时的价值,为这种分子标记物是否可用于甲状腺癌早期诊断提供实验依据。

对象和方法

一、对象

所有病例为 2011 年 7 月至 2011 年 11 月因甲状腺结节于我院就诊患者,根据手术组织病理学结果分为:(1)甲状腺良性结节组为 33 例,其中男 6 例,女 27 例,年龄(52.9±8.1)岁,病理学类型为结节性甲状腺肿 25 例,腺瘤 2 例,结节性甲状腺肿伴腺瘤 1 例,桥本甲状腺炎合并结节性甲状腺肿 5 例;(2)甲状腺癌组为 39 例,其中男 10 例,女 29 例,年龄(46.7±12.4)岁,病理学类型为甲状腺乳头状癌。并根据病程再分为 2 个亚组,即甲状腺癌术前组及术后组,其中术前组为 34 例,均为本次新诊断患者。术后组为 11 例,其中 6 例为本次新诊断的患者在手术后 3 天时所采集的血样,5 例为既往诊断甲状腺乳头状癌,随访无复发迹象,分别在手术后 6~24 个月时所采集的血样;(3)对照组为 20 名,其中男 12 名,女 8 名,年龄(45.9±3.0)岁,为本院健康体检者,无甲状腺疾病史及家族史,无重要脏器疾病史。

二、方法

1. 标本采集和总 RNA 提取:所有对象均过夜禁食 12 h,清晨采用抗凝管空腹抽取肘静脉血 5~6 ml, Ficoll (GE Healthcare 公司)提取外周单个核细胞,加入 1 ml Trizol (Invitrogen 公司)以提取 RNA, DEPC 水溶解,调节 RNA 浓度至 1 μg/μl, -80℃ 保存。

2. RT-PCR:按照反转录试剂盒 (TAKARA 公司)说明书将 mRNA 反转录成 cDNA (1 μg RNA/20 μl 体系), -20℃ 保存。按照 PCR 试剂盒 (TAKARA 公司)说明书行 PCR 反应 (2 μl cDNA/50 μl 体系),其中 TSHR 引物参照 Gupta 等^[9]采用序列, GAPDH 为内参,序列见表 1。扩增条件:94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 30 s, TSHR 62℃ (GAPDH 57℃) 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 36 个循环后, 4℃ 保存。

3. 凝胶分析:2% 琼脂糖凝胶电泳, Marker (上海博彩生物公司)标记,拍照,并计算相对应的灰度值,

表 1 PCR 引物序列

Tab 1 Primer sequence of PCR

引物 Primer	序列 Sequence	扩增片段 Product length (bp)
TSHR 上游引物 Forward primer	5'-GCTTTTCAGGGACTATGCAATGAA-3'	212
下游引物 Reverse primer	5'-AAGGGCCACTGACACTGGTTGAGA-3'	
GAPDH 上游引物 Forward primer	5'-AGAAGGCTGGGGCTCATTTC-3'	258
下游引物 Reverse primer	5'-AGGGGCCATCCACAGTCTTC-3'	

获得 TSHR mRNA 的相对表达量。

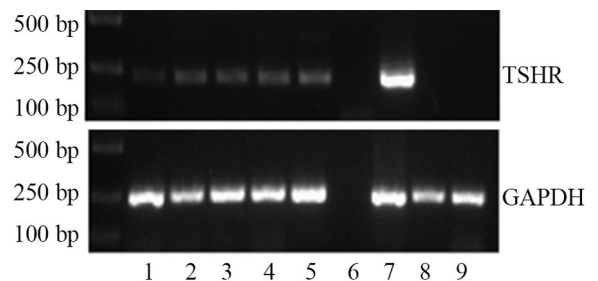
三、统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计软件,定性参数组间差异的比较根据理论频数是否小于 5,选择独立样本卡方检验或连续性校正法比较。定量参数组间差异比较根据原始数据的正态性检验,选择 *t* 检验或非参数检验。同一患者手术前、后的定量检测结果采用根据正态性检验,选择配对 *t* 检验或配对秩和检验比较, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。非正态分布数据以 *M* (四分位间距)表示。

结 果

一、外周血 TSHR mRNA 表达

外周血 TSHR mRNA 表达的典型电泳结果如图 1 示,图中可见,甲状腺癌患者术前外周血 TSHR mRNA 表达呈现阳性(泳道 1~5),而取自甲状腺癌患者的甲状腺组织亦呈现阳性,且其表达量明显高于外周血(泳道 7),良性结节患者 TSHR mRNA 表达则为阴性(泳道 8,9)。各组外周血 TSHR mRNA 表达的阳性率不尽相同,良性结节组 33 例中,16 例阳性表达,阳性率为 48.5%;甲状腺癌术前组 34 例中,31 例阳性表达,阳性率为 91.2%;而对照组中均为阴性表达。其中以甲状腺癌术前组阳性率最高,与良性组及对照组



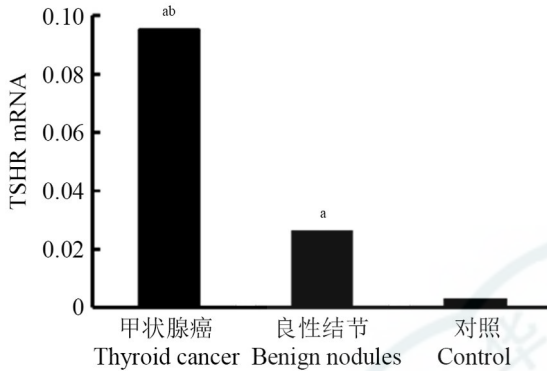
注:1-5:甲状腺癌 Thyroid cancers;6:空白对照 Negative control;7:阳性对照(取自甲状腺癌组织) Positive control (thyroid cancer tissue);8,9:甲状腺良性结节 Thyroid benign nodules

图 1 RT-PCR 方法检测外周血 TSHR mRNA 表达

Fig 1 Expression of circulating TSHR mRNA by RT-PCR

比较差异显著($P < 0.01$), 良性组表达也稍高于对照组($P < 0.01$)。

观察外周血 TSHR mRNA 的灰度值, 进行相对定量比较, 结果见图 2, 从图中可见, 3 组间 TSHR mRNA 表达水平明显不同($P < 0.01$), 甲状腺癌术前组 TSHR mRNA 表达水平明显高于良性组及对照组(均 $P < 0.01$), 而良性组表达亦稍高于对照组($P < 0.01$)。



注: 与对照比较 vs Control, ^a $P < 0.01$; 与良性结节比较 vs Benign nodules, ^b $P < 0.01$

图 2 各组间 TSHR mRNA 表达水平

Fig 2 Expression of TSHR mRNA in different groups

二、甲状腺癌手术前后 TSHR mRNA 表达的变化

甲状腺癌术前组 TSHR mRNA 表达水平中位数为 9.54×10^{-2} , 范围 $(5.89 \sim 16.33) \times 10^{-2}$, 术后组 TSHR mRNA 表达水平中位数为 0.70×10^{-2} , 范围为 $(0.29 \sim 9.30) \times 10^{-2}$, 与甲状腺癌术前组相比, 差异显著($P < 0.01$)。有 6 例甲状腺癌患者术前及术后均进行了 TSHR mRNA 检测, 术前水平较高者术后表达水平明显降低($P < 0.05$, 图 3)。

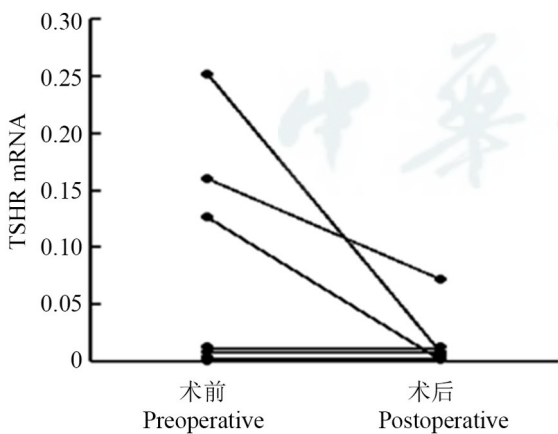


图 3 甲状腺癌患者术前、术后外 TSHR mRNA 表达水平变化

Fig 3 Preoperative and postoperative expressions of TSHR mRNA in patients with thyroid cancer

三、外周血 TSHR mRNA 表达与临床特征关系

对良性结节组和甲状腺癌术前组两组共 67 例患者的年龄、性别、结节直径、结节数量、良恶性状等与 TSHR mRNA 表达进行, 结果见表 2。从表中可见, 除

表 2 外周血 TSHR mRNA 表达与临床特征关系

Tab 2 The relationship between expression of circulating TSHR mRNA and clinical features

临床特征	例数	TSHR mRNA 阳性率
Clinical features	n	TSHR mRNA positive rate (%)
性别		
男	14	71.4
Gender		
Male		
女	53	69.8
Female		
年龄(岁)		
≤50	33	75.8
Age(year)		
>50	34	64.7
结节直径		
≤1	16	75.0
Nodule size(cm)		
>1	51	68.6
结节数量		
单一	17	64.7
Nodule number		
多发	50	72.0
Multiple		
结节性质		
良性	33	48.5
Nodule nature		
恶性	34	91.2 ^a
Malignant		

注: 与良性比较 vs Benign, ^a $P < 0.01$

甲状腺的良恶性结节性质不同, TSHR mRNA 表达存在差异外($P < 0.01$), 其余临床表现与 TSHR mRNA 表达之间无明显关联(均 $P > 0.05$)。

四、外周血 TSHR mRNA 表达诊断甲状腺癌

用 67 例良性结节组及甲状腺癌术前组患者结果, 按下述公式计算外周血 TSHR mRNA 在诊断甲状腺癌时的敏感性、特异性及准确率。

敏感性 = (癌术前组中表达阳性例数/癌术前例数) × 100% ;

特异性 = (良性组中表达阴性例数/良性例数) × 100% ;

准确率 = [癌术前组中表达阳性例数 + 良性组中表达阴性例数] / (癌术前例数 + 良性例数) × 100% 。

TSHR mRNA 诊断甲状腺癌的敏感性、特异性及准确率依次为 91.2% (31/34)、51.5% (17/33) 和 71.6% (48/67)。

五、外周血 TSHR mRNA 表达与 FNAC 鉴别良恶性结节的比较

在本组甲状腺结节患者中, 有 25 例患者术前曾经进行 FNAC 检查, 以手术病理诊断为依据, 结果术前 TSHR mRNA 表达和 FNAC 在鉴别结节良、恶性质的敏感性依次为 91.3% (21/23), 86.9% (20/23), 诊断准确率依次为 84.0% (21/25), 80.0% (20/25), 当联合应用这二种检测, 并取任一异常结果作为判断标准时, 诊断敏感性及准确率还可进一步提高, 分别为 100% (23/23) 和 92.0% (23/25)。

讨 论

TSHR 为甲状腺滤泡细胞的膜受体, 其主要作用

是通过与 TSH 结合调节甲状腺的功能和甲状腺生长分化。由于甲状腺癌细胞也可表达 TSHR, Gupta 等^[9] 率先报道用 RT-PCR 技术检测外周血中有 TSHR mRNA 表达,并认为是存在甲状腺癌的标志。随后 Chinnappa 等^[10] 发现甲状腺癌患者外周血 TSHR mRNA 阳性率高于良性组。Chia 等^[11] 检测到分化型甲状腺癌(DTC)患者外周血 TSHR mRNA 表达水平高于良性结节组及对照组。Milas 等^[5] 则通过研究认为外周血 TSHR mRNA 对甲状腺滤泡性肿瘤的鉴别有很好的临床应用价值。近来, Gutnick 等^[12] 的研究还证实该检测同样可用于年龄小于 18 岁患者结节良恶性质的判断。本研究发现甲状腺癌组 TSHR mRNA 表达阳性率及表达水平最高,与良性组及对照组相比,差异显著($P < 0.01$),提示外周血中 TSHR mRNA 表达有助于结节良恶性质的鉴别。

TSHR mRNA 在循环血中的半衰期较短,有学者检测到 DTC 患者术后 1 天外周血 TSHR mRNA 表达水平便可降低至正常,认为其有助于残余癌的发现^[11]。Milas 等^[13] 的研究发现该检测还可用于长期监测甲状腺癌是否复发。在本研究中,有 6 例甲状腺癌患者术前及术后均进行外周血 TSHR mRNA 的检测,结果提示术后表达水平明显低于术前水平($P < 0.05$),此外本研究还观察到 11 例甲状腺癌术后患者(其中 5 例患者为术后长期随访未见复发患者)其表达水平明显低于术前水平($P < 0.01$),根据本组的初步结果,提示术后外周血 TSHR mRNA 水平对发现残余癌与监测甲状腺癌的复发有一定的作用。

本研究中,对在手术前同时完成外周血 TSHR mRNA 与 FNAC 的 25 例患者的结果进行比较,以评价二者对甲状腺癌的诊断价值,表明术前外周血 TSHR mRNA 表达与 FNAC 检测诊断甲状腺癌的敏感性依次为 91.7%, 87.5%, 诊断准确率依次为 84.6%, 80.8%, 而二者联合检测诊断的敏感度及准确率依次为 100%, 92.3%。本研究结果提示,当二者联合检测时更有助于甲状腺癌的早期诊断,这与 Chia 等^[11] 及 Wagner^[14] 等的报道相一致。

利用外周血 TSHR mRNA 表达鉴别结节良恶性质的敏感性较高,但其特异性目前还存有争议。一些学者认为该检测特异性较高^[10,11,14],但有些学者发现 TSHR 可低表达于人外周血淋巴细胞,认为需要对方法学加以改进^[6,15]。Gupta 等^[9] 采用新的引物序列,不以人外周血单个核细胞基因为模板扩增,认为有较好的特异性。虽然本研究中采用了这种引物序列,但在本组所研究的良性结节组及甲状腺癌术前组患者中,其特异性为 51.5%,仍存在特异性不理想的问题。

除了实验室间的差异外,仍需进一步寻找特异性更强的引物,改进实验方法,以期更好的提高诊断的特异性。

综上所述,本研究初步结果提示外周血 TSHR mRNA 表达水平可有助于甲状腺良恶性结节的鉴别,联合 FNAC 检查结果可进一步提高甲状腺癌手术前的确诊率,减少不必要的手术治疗。然而由于样本量,尤其是甲状腺癌术后及长期随访的样本量还较少,因此在临床应用上仍有待于更深入的研究。

参 考 文 献

- [1] Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR, et al. Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid*, 2009,19:1167-1214.
- [2] 施秉银. 积极推进我国甲状腺结节和肿瘤诊治的规范化. *中华内分泌代谢杂志*, 2010,26:833-834.
- [3] 林毅, 吴艺捷, 金宇飏, 等. 甲状腺细针穿刺细胞学检查对甲状腺结节鉴别诊断的价值. *中华内分泌代谢杂志*, 2010,26(增刊):372.
- [4] Panka DJ, Sullivan RJ, Mier JW. An inexpensive, specific and highly sensitive protocol to detect the BrafV600E mutation in melanoma tumor biopsies and blood. *Melanoma Res*. 2010,20:401-407.
- [5] Milas M, Shin J, Gupta M, et al. Circulating thyrotropin receptor mRNA as a novel marker of thyroid cancer: clinical applications learned from 1758 samples. *Ann Surg*, 2010,252:643-651.
- [6] Ishikawa T, Miwa M, Uchida K. Quantitation of thyroid peroxidase mRNA in peripheral blood for early detection of thyroid papillary carcinoma. *Thyroid*, 2006,16:435-442.
- [7] 韩静静, 吴艺捷. 外周血甲状腺肿瘤标记物的研究进展. *国际内分泌代谢杂志*, 2010,30:155-158.
- [8] 范群, 匡安仁, 袁耿彪. 外周血甲状腺球蛋白 mRNA 对分化型甲状腺癌的诊断价值. *中华核医学杂志*, 2008,28:267-269.
- [9] Gupta MK, Taguba L, Arciaga R, et al. Detection of circulating thyroid cells by reverse transcription-PCR for thyroid-stimulating hormone receptor and thyroglobulin: the importance of primer selection. *Clin Chem*, 2002,48:1862-1865.
- [10] Chinnappa P, Taguba L, Arciaga R, et al. Detection of thyrotropin-receptor messenger ribonucleic acid (mRNA) and thyroglobulin mRNA transcripts in peripheral blood of patients with thyroid disease: sensitive and specific markers for thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004,89:3705-3709.
- [11] Chia SY, Milas M, Reddy SK, et al. Thyroid-stimulating hormone receptor messenger ribonucleic acid measurement in blood as a marker for circulating thyroid cancer cells and its role in the preoperative diagnosis of thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007,92:468-475.
- [12] Gutnick J, Soldes O, Gupta M, et al. Circulating thyrotropin receptor messenger RNA for evaluation of thyroid nodules and surveillance of thyroid cancer in children. *J Pediatr Surg*, 2012,47:171-176.
- [13] Milas M, Barbosa GF, Mitchell J, et al. Effectiveness of peripheral thyrotropin receptor mRNA in follow-up of differentiated thyroid cancer. *Ann Surg Oncol*, 2009,16:473-480.
- [14] Wagner K, Arciaga R, Siperstein A, et al. Thyrotropin receptor/thyroglobulin messenger ribonucleic acid in peripheral blood and fine-needle aspiration cytology: diagnostic synergy for detecting thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005,90:1921-1924.
- [15] Torosian L, Manrique G, Alvarez B, et al. Blood thyroglobulin and TSH receptor mRNA detection by RT-PCR in the follow-up of differentiated thyroid cancer patients. *Rev Esp Med Nucl*, 2010,29:109-113.

(收稿日期:2012-03-01)

(本文编辑:朱铨达)