

● 甲状腺结节鉴别 ●

新型分子标记物对甲状腺滤泡型肿瘤良恶性的鉴别诊断

张久丹 熊金华 王坚

【提要】 收集 29 例甲状腺结节组织标本,提取总 RNA,分别进行 RT-PCR 在核酸水平上检测所取甲状腺组织中 4 种目的基因 C1orf24、DDIT3、HMGA2、TFF3 的表达水平。与正常甲状腺组织相比,C1orf24 mRNA 在滤泡状腺瘤中的表达下调,在滤泡状癌中的表达上调;DDIT3 和 HMGA2 mRNA 在滤泡状腺瘤和滤泡状癌中的表达均上调,且在滤泡状癌中的表达高于滤泡状腺瘤;TFF3 mRNA 在滤泡状癌和滤泡状腺瘤中均下调。甲状腺肿瘤组织中 C1orf24、DDIT3、HMGA2、TFF3 对甲状腺滤泡状癌和滤泡状腺瘤的鉴别有一定价值。

【关键词】 甲状腺滤泡状癌;染色体 1 开放读码框 24;DNA 损伤诱导转录物 3;高迁移率族蛋白 A2;肠三叶因子

Application of molecular biomarkers in differential diagnosis of benign and malignant follicular thyroid tumors

ZHANG Jiu-dan, XIONG Jin-hua, WANG Jian. Department of Endocrinology, Nanjing Clinical Institute of Southern Medical University, Nanjing General Hospital of Nanjing Command, PLA, Nanjing 210002, China

Corresponding author: WANG Jian

【Summary】 Twenty-nine thyroid tissue samples were collected from patients with thyroid nodules. The total RNA were extracted, the gene expressions of TFF3, HMGA2, C1orf24, and DDIT3 were detected by RT-PCR. In comparison with normal thyroid tissues, the expression of C1orf24 mRNA was decreased in the follicular thyroid adenoma (FTA) group, but increased in the follicular thyroid carcinomas (FTC) group. The expressions of DDIT3 and HMGA2 mRNA were increased in both FTA and FTC groups, and were even higher in the latter. The expressions of TFF3 mRNA level were decreased in FTA and FTC. The data suggested that molecular markers C1orf24, DDIT3, HMGA2, and TFF3 in thyroid tissue seem to be helpful in the differential diagnosis between follicular adenomas and carcinomas.

【Key words】 Follicular thyroid cancer; Chromosome 1 open reading frame 24; DNA damage inducible transcript 3; High-mobility group A2; Intestinal trefoil factor

(Chin J Endocrinol Metab, 2013, 29: 1018-1020)

甲状腺结节(thyroid nodule, TN)诊断重点是良恶性的鉴别。随着分子技术的发展,陆续发现了许多分子生物标记物(molecular biomarkers)可以鉴别甲状腺结节的良恶性。其中染色体 1 开放读码框 24(chromosome 1 open reading frame 24, C1orf24)、DNA 损伤诱导转录物 3(DNA damage inducible transcript 3, DDIT3)、高迁移率族蛋白 A2(high-mobility group A2, HMGA2)、肠三叶因子(intestinal trefoil factor, TFF3)等分子对鉴别良恶性结节有较高的敏感性和特异性^[1]。因此本实验拟在前人研究的基础上,通过 RT-PCR 在核酸水平检测甲状腺肿瘤组织中 C1orf24、DDIT3、HMGA2、TFF3 的表达,评估所选标记物是否可用于甲状腺结节良恶性的鉴别,同时评估其敏感性和特异性。

一、对象和方法

1. 对象:收集南京军区南京总医院 2011 年 1 月至 2011 年 10 月的外科切除的甲状腺切结节的新鲜组织,总计 34 例,其中

滤泡状腺瘤 12 例[年龄(48.86±8.19)岁],滤泡状癌 8 例,包括 1 例乳头状癌滤泡型变[年龄(47.3±9.4)岁],乳头状癌 8 例[年龄(45.1±7.5)岁],另取正常甲状腺组织 6 例[年龄(47.2±11.0)岁]作为对照,其诊断结果由石蜡包埋切片组织学检查确定。新鲜组织切取后立即放于-80℃冰箱冻存。冻存组织经处理后提取 RNA,反转录为 cDNA,然后进行 RT-PCR 在核酸水平上分别检测甲状腺组织中四种目的基因 C1orf24、DDIT3、HMGA2、TFF3 表达水平。

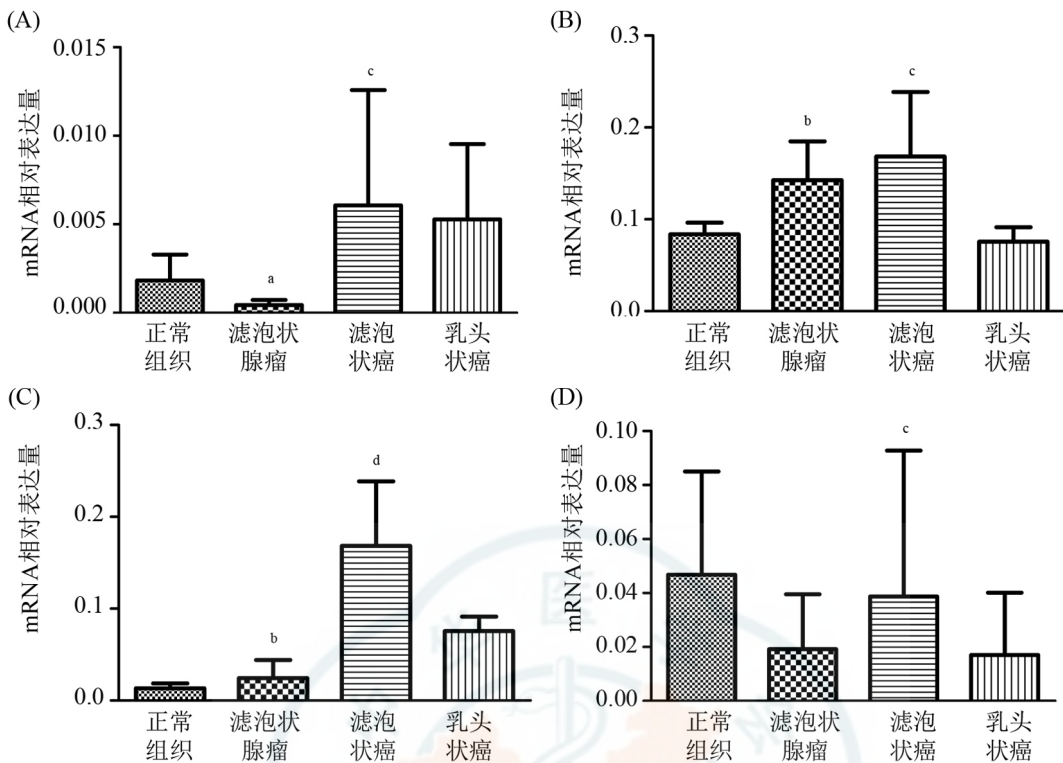
2. 方法:(1)组织中总 RNA 的提取:将组织剪碎后研磨再进行充分匀浆,然后置于离心管中分离,提取上清液即为 RNA 溶液,后经沉淀、洗涤、溶解后将提取的 RNA 进行琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度法进行质量和数量的鉴定。(2)以 β -actin 为内参基因,根据 NCBI 中 Genbank 的相应序列设计引物,采用 RT-PCR 方法经过反转录反应、扩增反应得出四种目的基因 C1orf24、DDIT3、HMGA2、TFF3 及内参基因的扩增曲线、熔解曲线。其阈值与 Ct 值由软件自动得出。

3. 统计学处理:每份样本目的基因的表达强度用其对应的内参基因 β -actin 基因的量进行校正,即 Δ CT 是目的基因相对于内参基因的表达强度。 Δ CT=CT(目的基因)-CT(β -actin 基因)。还原成线性数据就是 $2^{-\Delta$ CT}, 数值以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS

DOI:10.3760/cma.j.issn.1000-6699.2013.12.007

作者单位:210002 南京 南方医科大学南京临床医学院南京军区南京总医院内分泌科(张久丹),南京军区南京总医院内分泌科(熊金华、王坚)

通信作者:王坚



注: (A) 染色体 1 开放读码框 24 (C1orf24); (B) DNA 损伤诱导转录物 3 (DDIT3); (C) 高迁移率族蛋白 A2 (HMGA2); (D) 肠三叶因子 (TFF3); 与正常组织相比, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$; 与滤泡状腺瘤相比, ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$

图 1 4 种基因在不同组织中的 mRNA 相对表达量

16.0 软件进行统计分析, 对各组的 $2^{-\Delta CT}$ 分别进行两独立样本的 t 检验。 $P < 0.05$ 表示有显著差异。

二、结果

1. RNA 含量的测定: 本实验所有标本的 A260/A280 的比值介于 1.7~1.9 之间, 说明含量正常。

RNA 质量的测定: 琼脂糖凝胶电泳结果示内参基因及目的基因的电泳条带清楚, 无其他杂带出现, 说明 RNA 的质量良好。

熔解曲线分析: 内参基因和目的基因的熔解曲线均为单峰, 提示特异性好。

2. 相对于正常的甲状腺组织, C1orf24 mRNA 在滤泡状腺瘤中的表达下调, 在甲状腺滤泡状癌中的表达上调 ($P < 0.05$)。并且相比在良性肿瘤中的表达, C1orf24 mRNA 在恶性肿瘤中过表达, 两者的差异有统计学意义 (滤泡状腺瘤对乳头状癌、滤泡状癌, $P < 0.05$, 图 1A)。

DDIT3 mRNA 相对于正常组织, 在滤泡状腺瘤和滤泡状癌中的表达均上调, 并且在滤泡状癌和滤泡状腺瘤中的表达存在差异 ($P < 0.05$)。与正常组织相比, 在恶性组织中高表达, 且两者的差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 但在良恶性肿瘤中的表达差异没有统计学意义 ($P > 0.05$, 图 1B)

相对于正常组织, HMGA2 mRNA 在甲状腺滤泡状腺瘤和滤泡状癌中均高表达, 且在滤泡状癌中的表达显著高于滤泡状腺瘤 ($P < 0.01$)。在良恶性肿瘤中的表达差异不具有统计学意义 ($P > 0.05$), 恶性组织与正常组织中的表达亦未见明显差异 ($P > 0.05$, 图 1C)。

相对于正常的甲状腺组织, TFF3 mRNA 的表达水平在滤泡

状癌和滤泡状腺瘤中均表达下调; 在滤泡状癌中的表达显著高于滤泡状腺瘤中的表达 ($P < 0.05$)。在良性肿瘤和恶性肿瘤中的表达差异不具有统计学意义 ($P > 0.05$), 恶性肿瘤与正常组织中的表达亦未见明显差异 ($P > 0.05$, 图 1D)。

三、讨论

甲状腺滤泡状癌约占所有甲状腺肿瘤的 15%, 目前临床上关于甲状腺滤泡状腺瘤和滤泡状癌的鉴别仍较为困难。为了提高甲状腺滤泡状癌的诊断率, 随着分子技术的发展, 研究表明相关分子生物标记物 (molecular biomarkers) 能帮助鉴别甲状腺滤泡型肿瘤的良恶性, 提高术前诊断的准确率。如半乳糖素 3 (galectin-3, LGALS3), MET 基因过度表达与甲状腺癌的进展和转移有关^[2,3], 但没有一个单独的基因具有足够的敏感性和特异性而独立作为诊断分子标记物。我们的实验在前人研究的基础上, 选择了具有较高敏感性和特异性的分子标记物, 通过我们的实验发现在核酸水平上, DDIT3、HMGA2、TFF3、C1orf24 这四种分子标记物在甲状腺滤泡状腺瘤和滤泡状癌中的表达存在差异, 均能很好的鉴别甲状腺滤泡型肿瘤的良恶性。

DDIT3 在各种 DNA 损伤、组织缺氧、氧化应激等因素的诱导下可大量表达, 从而调节细胞的增殖和分化, 控制细胞的凋亡, 免疫反应, 炎症反应等^[4]。有研究提示低表达的 DDIT3 可能参与损伤细胞的易感性, 参与肿瘤化的进程。最近有研究发现 DDIT3 在甲状腺滤泡状癌、Hürthle 肿瘤以及 P53 突变的甲状腺癌细胞系中高表达^[5]。研究发现 DDIT3 mRNA 在甲状腺滤泡状腺瘤和甲状腺滤泡状癌中的表达分别为 9.4% 和 85.2%^[5], 对两者的鉴别诊断有较高的敏感性和特异性。本研

究也得出了同样的结论, DDIT3 mRNA 在甲状腺滤泡状癌和滤泡状腺瘤中的表达存在差异性 ($P < 0.05$)。DDIT3 表达的增高可能与肿瘤细胞的恶性增殖及浸润性有关, 可能在甲状腺滤泡型新生物恶变中起重要作用。

高迁移率族 A2 (high-mobility group A2, HMGA2) 对细胞的生长、分化、凋亡和向恶性转化有非常重要的调节作用^[6], 具有潜在的致癌作用。最近的研究显示, HMGA2 的过表达与许多组织的恶性肿瘤有关, 包括胰腺癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、甲状腺癌。检测 HMGA2 的表达对良恶性肿瘤鉴别的敏感性和特异性分别为 95.9%, 93.9%^[6]。在本实验中检测 HMGA2 mRNA 在恶性肿瘤中高表达, 并且在滤泡状腺瘤和滤泡状癌的表达中具有显著性差异 ($P = 0.0002$)。因此 HMGA2 可以鉴别甲状腺滤泡型肿瘤的良好性。

肠三叶因子 (intestinal trefoil factor, ITF/TFF3) 具有黏膜保护、修复、肿瘤抑制或促肿瘤发生、信号转导、调节细胞凋亡等功能。研究发现, 在人体正常组织中可见低水平表达, 而在实体肿瘤中过度表达, 如肝细胞癌、结肠癌、前列腺癌、胃癌等, 提示可能与恶性行为和转移有关^[7,8]。本研究发现 TFF3 可能是一个有用的鉴别甲状腺结节良恶性的分子标记物。TFF3 mRNA 的高表达可能在滤泡状癌的浸润和转移过程中其重要作用, 加速细胞的迁移, 参与肿瘤的生长、浸润和转移^[9]; 此外, 雌激素也可调节 TFF3 的表达, 从而导致 TFF3 表达的缺失或过度, 诱导肿瘤的生长^[10], 这也可能是甲状腺肿瘤在女性高发的一种潜在的因素。

C1orf24 的功能和作用途径目前尚未明了, 在人体正常组织如肌肉、胰腺、结肠、前列腺等均有表达, 研究发现 C1orf24 在 FTC 患者中高表达, 在 FTA 中呈低表达或不表达, 可能是恶性甲状腺滤泡型肿瘤分子标记物, 其鉴别甲状腺滤泡型肿瘤良恶性的敏感性和特异性分别为 97% 和 90%^[11]。本研究结果显示 C1orf24 mRNA 的表达水平在良恶性结节 (滤泡状腺瘤对滤泡状癌、乳头状癌) 中存在显著性差异 ($P < 0.05$), 在恶性甲状腺组织中高度表达^[12-17]。

综上所述, 本研究所选用的四种分子标记物 DDIT3、HMGA2、TFF3、C1orf24 对鉴别甲状腺滤泡型肿瘤的良好性均有一定的价值。但是目前的研究仍存在一些局限性: 目前收集到的恶性肿瘤数目较少, 因此数据的统计分析仅仅是一个大概的趋势, 而大规模的实验是否能得到一致的结论尚未知; 在甲状腺结节的研究中, 病理学诊断具有一定的差异性及其不确定性, 因此, 如何使病理学和以分子标记物为基础的诊断保持一致性尚需更进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] Finley DJ, Zhu B, Barden CB, et al. Discrimination of benign and malignant thyroid nodules by molecular profiling. *Ann Surg*, 2004, 240:425.
- [2] Htwe T, Karim N, Wong J, et al. Differential expression of galectin-3 in advancing thyroid cancer cells; a clue toward understanding tumour progression and metastasis. *Singapore Med J*, 2010, 51:856-859.
- [3] Chiu CG, Strugnell SS, Griffith OL, et al. Diagnostic utility of galectin-3 in thyroid cancer. *Am J Pathol*, 2010, 176:2067-2081.
- [4] Prasad NB, Somervell H, Tufano RP, et al. Identification of genes differentially expressed in benign versus malignant thyroid tumors. *Clin Cancer Res*, 2008, 14:3327-3337.
- [5] Yio X, Zhang JY, Babyatsky M, et al. Trefoil factor family-3 is associated with aggressive behavior of colon cancer cells. *Clin Exp Metastasis*, 2005, 22:157-165.
- [6] Chiappetta G, Ferraro A, Vuttariello E, et al. HMGA2 mRNA expression correlates with the malignant phenotype in human thyroid neoplasias. *Eur J Cancer*, 2008, 44:1015-1021.
- [7] Paulsen F, Varoga D, Paulsen A, et al. Trefoil factor family (TFF) peptides of normal human Vater's ampulla. *Cell Tissue Res*, 2005, 321:67-74.
- [8] Okada H, Kimura MT, Tan D, et al. Frequent trefoil factor 3 (TFF3) overexpression and promoter hypomethylation in mouse and human hepatocellular carcinomas. *Intern J Oncol*, 2005, 26:369-377.
- [9] Babyatsky M, Lin J, Yio X, et al. Trefoil factor-3 expression in human colon cancer liver metastasis. *Clin Exp Metastasis*, 2009, 26:143-151.
- [10] Prasad NB, Kowalski J, Tsai HL, et al. Three-gene molecular diagnostic model for thyroid cancer. *Thyroid*, 2012, 22:275-284.
- [11] Cerutti JM, Delcelo R, Amadei MJ, et al. A preoperative diagnostic test that distinguishes benign from malignant thyroid carcinoma based on gene expression. *J Clin Invest*, 2004, 113:1234-1242.
- [12] 滕卫平. 四雄合作, 共享硕果——写在《甲状腺结节和分化型甲状腺癌诊治指南》出版之际. *中华内分泌代谢杂志*, 2012, 28:777-778.
- [13] 中华医学会内分泌学分会, 中华医学会外科学分会内分泌学组, 中国抗癌协会头颈肿瘤专业委员会, 等. 甲状腺结节和分化型甲状腺癌诊治指南. *中华内分泌代谢杂志*, 2012, 28:779-797.
- [14] 徐书杭, 刘超. 甲状腺癌分子诊断——94 届美国内分泌年会 (2012. 6. 22-27). *中华内分泌代谢杂志*, 2012, 28:691-694.
- [15] 李俊, 秦贵军, 闫昱杉, 等. 2843 例甲状腺结节临床及术后病理结果分析. *中华内分泌代谢杂志*, 2012, 28:802-805.
- [16] 孔娜, 陈昕彦, 张春玉, 等. 385 例良恶性甲状腺结节临床资料比较分析. *中华内分泌代谢杂志*, 2012, 28:806-810.
- [17] 冯尚勇, 朱妍, 张真稳, 等. 江苏社区人群甲状腺结节的流行病学研究. *中华内分泌代谢杂志*, 2011, 27:492-494.

(收稿日期:2013-04-02)

(本文编辑:朱鉉达)