

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.04.003

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2017.04.003>

PRSS3-mRNA与长链非编码RNA-PRSS3P2在甲状腺乳头状癌组织中的表达及其临床意义

何冰^{1,2}, 王继纲², 李玉军²

(青岛大学 1. 基础医学院病理学教研室; 2. 附属医院病理科, 山东 青岛 266003)

[摘要] 目的: 检测PRSS3-mRNA及lncRNA-PRSS3P2在甲状腺乳头状癌(papillary thyroid carcinoma, PTC)及癌旁甲状腺组织中的表达特点, 探讨二者在PTC中表达的临床病理意义。方法: 收集2016年7至10月本院55例PTC及癌旁甲状腺组织的新鲜手术标本, 应用荧光实时定量PCR检测PRSS3-mRNA及lncRNA-PRSS3P2在PTC和癌旁组织中表达情况, 并分析其与临床病理特征的相关性。结果: PRSS3-mRNA及lncRNA-PRSS3P2在PTC组织中表达均明显高于非肿瘤组织; PRSS3P2的表达与患者的年龄相关($P < 0.05$), 而PRSS3与各种临床病理特征无明显相关性。结论: 在PTC组织中, PRSS3-mRNA和lncRNA-PRSS3P2的表达均明显升高, 这提示二者可能参与了PTC的发病过程; PRSS3-mRNA和lncRNA-PRSS3P2可以作为PTC的诊断标志物进行进一步研究。

[关键词] 甲状腺乳头状癌; 丝氨酸蛋白酶3; 长链非编码RNA

Expression and clinical significance of PRSS3-mRNA and LncRNA-PRSS3P2 in papillary thyroid carcinoma

HE Bing^{1,2}, WANG Jigang², LI Yujun²

(1. Department of Pathology, School of Basic Medicine; 2. Department of Pathology, Affiliated Hospital, Qingdao University, Qingdao Shandong 266003, China)

Abstract **Objective:** To detect the expressions of PRSS3-mRNA and lncRNA-PRSS3P2 in PTCs and their corresponding normal thyroid tissues, and to explore the clinicopathologic significance of PRSS3 and PRSS3P2 in PTC. **Methods:** A total of 55 fresh tissues of PTC plus with their paired normal thyroid tissues resected between July 1 and October 31, 2016 were collected. The expressions of PRSS3-mRNA and lncRNA-PRSS3P2 were detected by real-time quantitative PCR. The relationship between expressions of PRSS3/PRSS3P2 and the clinicopathologic features were carefully analyzed. **Results:** The expression levels of PRSS3 and PRSS3P2 in PTC tissues were obviously higher than their non-tumor counterparts ($P < 0.05$). PRSS3P2 was correlated with the age of patients ($P < 0.05$); however, PRSS3 is not associated with the clinicopathologic features of PTC. **Conclusion:** The expressions of PRSS3-mRNA and lncRNA-PRSS3P2 were increased in PTC. The present findings indicate that

收稿日期 (Date of reception): 2017-01-05

通信作者 (Corresponding author): 李玉军, Email: liyujun.66@163.com; 王继纲, Email: qdwangjigang@hotmail.com

基金项目 (Foundation item): 国家自然科学基金 (81502272)。This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81502272).

PRSS3 and PRSS3P2 may participate the development of PTC. PRSS3-mRNA and lncRNA-PRSS3P2 can be served as two potential diagnostic markers for PTC.

Keywords papillary thyroid carcinoma; protease serine 3; long non-coding RNA

甲状腺癌是最常见的内分泌系统恶性肿瘤,近年来我国发病率呈逐年上升趋势,其中甲状腺乳头状癌(papillary thyroid carcinoma, PTC)最为常见,约占甲状腺癌的80%^[1-2]。已有报道^[3]表明:其预后与年龄、性别、淋巴结转移等临床病理参数密切相关。

胰腺腺泡细胞内合成的丝氨酸蛋白酶3(protease serine 3, PRSS3)属于人类胰蛋白酶原家族,其不同于PRSS1和PRSS2, PRSS3在胰腺外分泌功能中只发挥了很少的作用。胰腺PRSS3蛋白的激活可能会降低保护因素SPINK1的水平,促进胰腺炎的发展^[4]。目前,对于PRSS3在人类肿瘤发生的作用还存在争议。有研究^[4-5]表明:PRSS3与胰腺癌、乳腺癌、前列腺癌等肿瘤的发生、发展和转移密切相关。然而,在非小细胞癌等恶性肿瘤中PRSS3却发挥了抑制肿瘤发生及侵袭的作用^[6-7]。

长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)是一类转录本超过200 nt的非编码的内源性细胞RNA,它们位于基因组的蛋白质编码基因的内含子或者基因间区^[8]。迄今为止,已有大量研究^[9-10]结果表明:lncRNA可通过染色体重塑、转录、转录后加工等多种途径参与基因表达调控,其调节异常与人类许多疾病,尤其在肿瘤的发生、发展中发挥重要作用。LncRNA-PRSS3P2(protease serine 3 pseudogene 2, PRSS3P2, NR_001296.3)是人类PRSS3基因的同源假基因,全长863 bp,是通过lncRNA表达谱芯片筛选出的在PTC中上调最明显的20种lncRNA分子之一(GEO entity: GSE66783; fold change =109.6173, $P < 0.001$)^[11]。有关PRSS3P2的相关研究报道罕见,Beer等^[12]认为PRSS3P2与慢性胰腺炎的发生有关;目前对于PRSS3P2在人类肿瘤中的表达及作用未见报道。

本研究旨在阐明PRSS3-mRNA和lncRNA-PRSS3P2在PTC组织中的表达情况以及相关性和相关性,探讨二者的表达与PTC临床病理特征之间的相关性。

1 对象与方法

1.1 对象

收集自2016年7月至2016年10月间于青岛大学附属医院行甲状腺手术患者的新鲜PTC组织及癌旁正常甲状腺组织(距离>0.5 cm),共55例;年龄

16~73(中位年龄44)岁(临床资料及病理特征见表1)。研究样本均在术后即可采集,立即-80℃冻存直至RNA提取。术后病理切片均经过两位及以上病理医师严格诊断鉴定确定病理类型。所有患者于术前均未接受过局部或全身治疗。研究已获得青岛大学附属医院伦理委员会批准。

表1 55例甲状腺乳头状癌患者临床病理特征

Table 1 Clinicopathologic features of 55 PTC patients

参数	例数	构成比/%
性别		
男性	6	10.91
女性	49	89.09
年龄/岁		
<30	7	12.73
30~44	21	38.18
45~59	21	38.18
≥60	6	10.91
肿瘤直径/cm		
<1.0	18	32.73
1.0~2.0	23	41.82
>2.0	14	25.45
淋巴结转移		
有	27	49.09
无	28	50.91
包膜侵犯		
有	21	38.18
无	34	61.82

1.2 RT-qPCR

使用TRIzol[®] Reagent(Invitrogen, Cat#.15596026, 上海)提取55对PTC及癌旁组织的总RNA,紫外分光光度计测定RNA浓度并鉴定纯度。使用PrimeScript[®] RT Master Mix kit(Takara, Cat#.RR047A, 大连)将总RNA反转录为cRNA,反应条件:37℃ 15min, 85℃ 5s,总体积为30 μL, -20℃保存。使用SYBR Green方法(SYBR[®] PremixEx Taq[™] Green, TaKara, Cat#.RR086, 大连)应用ABI 7500荧光定量PCR仪进行PCR扩增。反应条件:95℃变性5 min, 95℃ 5 s, 60℃ 30 s,共扩增40个循环。采用2^{-ΔCt}方法计算PRSS3和PRSS3P2的表达水平, ΔCt = Ct(PRSS3/PRSS3P2) - Ct(GAPDH)。引物序列见表2。

表2 RT-qPCR引物序列

Table 2 Primer sequences of PCR amplification

RNA	引物序列(5'-3')	片段长度/bp
GAPDH	正向: CAAATTCATGGCACCCTCA	20
	反向: ATCGCCCCACTTGATTTGG	20
PRSS3	正向: CCATTCCTGATCCTTGCTTTGT	23
	反向: AGTCAGCACCAAAGCTCAGA	20
PRSS3P2	正向: CTCACCTCACAGACTCCTC	21
	反向: TCCCACAAAGGCAAGGATCA	20

1.3 统计学处理

采用SPSS 19.0软件进行统计, 采用GraphPad Prism5.0进行绘图。计量资料均以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。PTC组织和癌旁组织中PRSS3和PRSS3P2的表达量采用配对设计的t检验。采用 χ^2 检验比较PRSS3和PRSS3P2的表达与不同临床病理之间的关系。同时, 采用Pearson相关分析方法分析PRSS3及PRSS3P2的表达量之间的相关性。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 甲状腺组织中 PRSS3-mRNA 和 lncRNA-PRSS3P2 表达水平检测

PCR结果显示: PRSS3在PTC组中高于非肿瘤组织组(7.20 ± 1.87 vs. 3.69 ± 1.36), PRSS3P2在PTC组中的表达也高于非肿瘤组织组(7.25 ± 1.25 vs. 3.53 ± 1.06); 二者的表达差异均具有统计学意义($P < 0.05$, 图1)。55对标本中, PRSS3在49例PTC组织中的表达高于癌旁组织, PRSS3P2在47例PTC中表达高于癌旁组织, 其中42例PTC组织中的PRSS3和PRSS3P2的表达均高于癌旁组织(表3)。

2.2 甲状腺乳头状癌 PRSS3-mRNA 和 lncRNA-PRSS3P2 表达水平与临床病理特征关系

PTC患者PRSS3-mRNA相对表达量与患者性别、年龄、瘤体直径、淋巴结转移等其它临床病理特征无明显相关性; PTC患者PRSS3P2相对表达量与患者性别、瘤体直径、淋巴结转移等临床病理特征无明显相关性, 但在不同年龄组的PTC患者中PRSS3P2表达存在差别, 其差异具有统计学意义($P < 0.05$, 表4)。

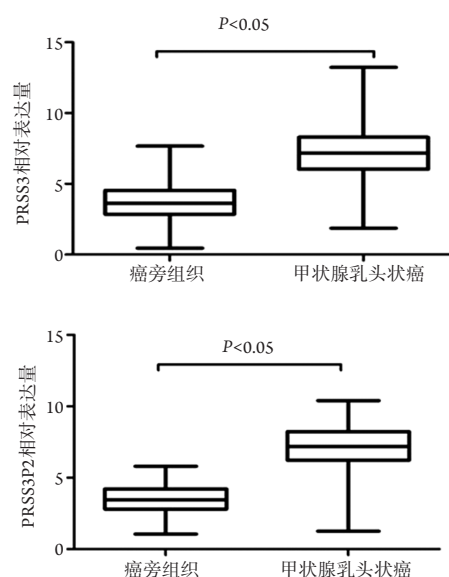


图1 PTC组织和癌旁组织中PRSS3和PRSS3P2相对表达量
Figure 1 Relative expression levels of PRSS3 and PRSS3P2 in PTC tissues and non-tumoral thyroid tissues

表3 55对PTC组织和癌旁组织中PRSS3和PRSS3P2表达关系
Table 3 Expression relationship between PRSS3 and PRSS3P2 in 55 paired of PTC and non-tumoral thyroid tissues

PRSS3P2	PRSS3		合计
	高表达	低表达	
高表达	42	5	47
低表达	7	1	8
合计	49	6	55

高表达指在癌组织中的表达水平高于癌旁组织, 低表达是指在癌组织中的表达水平低于癌旁组织。

High expression indicates that the expression levels of PRSS3/PRSS3P2 in PTC tissues are higher than those in their non-tumor counterparts, and low expression indicates that the expression levels of PRSS3/PRSS3P2 in PTC tissues are lower than those in their non-tumor counterparts.

表4 55例PTC组织中PRSS3和PRSS3P2表达和PTC临床病理参数之间的关系

Table 4 Relationship between PRSS3/PRSS3P2 expressions and clinicopathologic features of 55 PTC cases

参数	n	PRSS3		P	PRSS3P2		P
		高表达	低表达		高表达	低表达	
性别				0.813			0.092
男	6	3	3		1	5	
女	49	27	22		26	23	
年龄/岁				0.430			0.021
<30	7	5	2		6	1	
30~44	21	10	11		13	8	
45~59	21	13	8		7	14	
≥60	6	2	4		1	5	
肿瘤直径/cm				0.326			0.644
<1.0	18	12	6		8	10	
1.0~2.0	23	10	13		13	10	
>2.0	14	8	6		6	8	
淋巴结转移				0.694			0.139
有	27	14	13		16	11	
无	28	16	12		11	17	
包膜侵犯				0.800			0.467
有	21	11	10		9	12	
无	34	19	15		18	16	

PRSS3的表达水平分组以该分子在PTC组织中的表达水平的中位数7.02为界, 大于该值为高表达, 小于该值为低表达; PRSS3P2的表达水平分组以该分子在PTC组织中的表达水平的中位数7.21为界, 大于该值为高表达, 小于该值为低表达。

The cut-off value of PRSS3 value is 7.02 (median expression value), the cases with expression value more than 7.02 are categorized into high expression group; the cut-off value of PRSS3 value is 7.21 (median expression value), the cases with expression value more than 7.02 are categorized into high expression group.

3 讨论

PTC是最常见的甲状腺癌病理类型, 普遍认为, PTC患者经过甲状腺切除术后预后较好, 病死率低。然而, 仍有部分侵袭性PTC预后较差。因此进一步寻找PTC相关肿瘤标志物, 对于PTC的精确诊断以及阐明PTC的发病机制具有重要的意义。近年来, 人们注意到lncRNA分子与人类恶性肿瘤的发生发展密切相关。通过lncRNA表达谱芯片对PTC组织和癌旁组织中差异表达的lncRNA分子进行筛选的结果提示: *lncRNA-PRSS3P2*在PTC中高表达^[11]。本研究采用PCR技术, 进一步检测了55对新鲜PTC组织和癌旁组织中PRSS3P2的表达情况, 同时将其对应的真基因PRSS3纳入研究。实验结果显示: PTC组织中PRSS3-mRNA及其假基因产物*lncRNA-PRSS3P2*较非癌组织的表达明显上调, 这提示二者可以做为PTC的诊断标志物进行进一步

研究。

研究^[6,13]表明: PRSS3基因所编码的丝氨酸的生物学功能是消化降解胰蛋白酶抑制剂, 同时指出PRSS3蛋白与乳腺、肺、胰腺等肿瘤的发生具有相关性。Ghilardi等^[14]研究显示PRSS3蛋白可水解其底物TFPI-2, 从而裂解含有Kunitz型结构域蛋白, 有利于肿瘤的血管生成和血管重构。Jiang等^[4]研究发现在胰腺癌中, PRSS3能特异性地活化PAR1, 触发ERK磷酸化并且上调VEGF的表达, 诱导胰腺癌的体内转移, 这为治疗胰腺癌提供了新的治疗靶点。本研究首次证明PRSS3在PTC中高表达, 但其生物学功能尚需进一步的实验验证。

假基因是基因组上与编码基因序列非常相似的非功能性基因组DNA, 相当一部分lncRNA分子为假基因的转录产物。目前发现一些假基因具有一定的生物学功能, 例如PTENP1基因^[15]。目前已报道的大多数功能性假基因均是通过其转录

本行使功能, 主要机制包括: 1) 作为反义RNA抑制亲本功能真基因的表达; 2) 产生内源性siRNA抑制真基因的表达; 3) 竞争性地结合miRNA从而保证其真基因的表达水平^[16-17]。通过前两种机制, 假基因抑制其亲本真基因的表达, 而通过第三种机制, 假基因能够促进其真基因的表达。本实验发现: PTC组织中PRSS3-mRNA及其假基因产物lncRNA-PRSS3P2的表达水平均升高, 这提示lncRNA-PRSS3P2可能通过吸附某些miRNA分子(miR-423-5p), 从而降低该miRNA对PRSS3的转录抑制作用。进一步预测并验证二者之间的结合miRNA分子, 阐明二者间的相互调控机制, 有助于从lncRNA的角度进一步明确PTC的发病机制。

近年来, 越来越多的证据^[18-19]表明: lncRNA在不同类型癌症的发生和发展中发挥了重要作用, 且有证据显示某些lncRNA的表达失调与PTC存在密切的联系。例如, lncRNA-BANCR被认为通过调节cyclin D1和促甲状腺激素受体的活性促进PTC的发生^[18]。而PTCSC3和NAMA在PTC中的表达量明显低于在正常甲状腺组织中的表达量, 被认为对PTC的肿瘤发生具有抑制作用^[20]。Chen等^[21]认为PRSS3P2在具有完整的外显子-内含子结构的基础上可以启动正常的转录。然而, Diederichs等^[22]却指出由于胰蛋白酶原基因的高度的同源性, PRSS3P2启动的表达通路存在不确定性。鉴于假基因启动子区域的多样性以及其转录调控机制的不确定性, 对于PTC中PRSS3P2的高表达机制尚待从多角度进一步研究。

本研究结果还显示在PTC患者中, 其年龄与lncRNA-PRSS3P2表达相关。目前, 研究^[23-24]表明: 在PTC的分期中不同年龄组间存在明显差异, 45岁被认为是其预后的分界线, 而年龄<45岁患者相对危险性较高。由此可见, lncRNA-PRSS3P2在不同年龄组PTC患者中的差异表达可能与其预后相关。另外, 有研究^[25]报道BRAF基因V600E突变与PTC患者年龄及预后有关, 而BRAF激活的lncRNA(BANCR)被认为是通过调节甲状腺激素受体调控PTC, 但是lncRNA-PRSS3P2在不同年龄组PTC患者中的差异表达是否与BRAF激活有关及其机制尚不清楚。

综上所述, PRSS3-mRNA和lncRNA-PRSS3P2在PTC组织中表达均升高, 且PRSS3P2与PTC患者的年龄具有相关性。进一步研究二者在PTC中的功能, 明确二者间是否存在相互调控关系以及与其他PTC相关信号之间的关系, 有助于从lncRNA的角度进一步阐明PTC的发病机制。

参考文献

1. Adela NB, Elena ZA, Oana C, et al. Distinct morphological features predictive for aggressiveness of papillary thyroid microcarcinoma: a study of 72 cases and 80 tumor foci[J]. Acta Medica Marisiensis, 2016, 62(1): 51-55.
2. Yoruker EE, Terzioğlu D, Teksoz S, et al. MicroRNA expression profiles in papillary thyroid carcinoma, benign thyroid nodules and healthy controls[J]. J Cancer, 2016, 7(7): 803-809.
3. Eustatia-Rutten CF, Corssmit EP, Biermasz NR, et al. Survival and death causes in differentiated thyroid carcinoma[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2006, 91(1): 313-319.
4. Jiang G, Cao F, Ren G, et al. PRSS3 promotes tumour growth and metastasis of human pancreatic cancer[J]. Gut, 2010, 59(11): 1535-1544.
5. Radisky ES. PRSS3/mesotrypsin in prostate cancer progression: implications for translational medicine[J]. Asian J Androl, 2013, 15(4): 439-440.
6. Marsit CJ, Okpukpara C, Danaee H, et al. Epigenetic silencing of the PRSS3 putative tumor suppressor gene in non-small cell lung cancer[J]. Mol Carcinog, 2005, 44(2): 146-150.
7. Yamashita K, Mimori K, Inoue H, et al. A tumor-suppressive role for trypsin in human cancer progression[J]. Cancer Res, 2003, 63(20): 6575-6578.
8. Liao XH, Wang JG, Li LY, et al. Long intergenic non-coding RNA APOC1P1-3 inhibits apoptosis by decreasing α -tubulin acetylation in breast cancer[J]. Cell Death Dis, 2016, 7: e2236.
9. Kung JT, Colognori D, Lee JT. Long noncoding RNAs: past, present, and future[J]. Genetics, 2013, 193(3): 651-669.
10. Ponting CP, Oliver PL, Reik W. Evolution and functions of long noncoding RNAs[J]. Cell, 2009, 136(4): 629-641.
11. 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.
12. Rygiel AM, Beer S, Simon P, et al. Gene conversion between cationic trypsinogen (PRSS1) and the pseudogene trypsinogen 6 (PRSS3P2) in patients with chronic pancreatitis[J]. Hum Mutat, 2015, 36(3): 350-356.
13. Hockla A, Miller E, Salameh MA, et al. PRSS3/mesotrypsin is a therapeutic target for metastatic prostate cancer[J]. Mol Cancer Res, 2012, 10(12): 1555-1566.
14. Ghilardi C, Anastasia A, Avigni R, et al. PO-44 - Tissue factor pathway inhibitor-2 (TFPI-2) is cleaved by PRSS3: implication for tumor endothelial cells migration[J]. Thromb Res, 2016, 140(Suppl 1): S192-S193.
15. Poliseno L, Haimovic A, Christos PJ, et al. Deletion of PTENP1 pseudogene in human melanoma[J]. J Invest Dermatol, 2011, 131(12):

- 2497-2500.
16. Ruud P, Fodstad O, Hovig E. Identification of a novel cytokeratin 19 pseudogene that may interfere with reverse transcriptase-polymerase chain reaction assays used to detect micrometastatic tumor cells[J]. *Int J Cancer*, 1999, 80(1): 119-125.
 17. Hirotsune S, Yoshida N, Chen A, et al. An expressed pseudogene regulates the messenger-RNA stability of its homologous coding gene[J]. *Nature*, 2003, 423(6935): 91-96.
 18. Guo Q, Zhao Y, Chen J, et al. BRAF-activated long non-coding RNA contributes to colorectal cancer migration by inducing epithelial-mesenchymal transition[J]. *Oncol Lett*, 2014, 8(2): 869-875.
 19. 原佳沛, 张浩文, 鲁志. 新型长链非编码RNA(lncRNA)的生物信息学研究进展[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2013, 40(7): 634-640.
YUAN Jiawei, ZHANG Haowen, LU Zhi. Progress on bioinformatic research of lncRNA[J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2013, 40(7): 634-640.
 20. 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.
 21. Chen JM, Montier T, Férec C. Molecular pathology and evolutionary and physiological implications of pancreatitis-associated cationic trypsinogen mutations[J]. *Hum Genet*, 2001, 109(3): 245-252.
 22. Diederichs S, Bulk E, Steffen B, et al. S100 family members and trypsinogens are predictors of distant metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(16): 5564-5569.
 23. Wang N, Xu Y, Ge C, et al. Association of sonographically detected calcification with thyroid carcinoma[J]. *Head Neck*, 2006, 28(12): 1077-1083.
 24. 郝儒田, 张筱骅, 潘怡飞. 甲状腺乳头状癌与甲状腺结节钙化的关系探讨[J]. *中国肿瘤临床*, 2007, 34(20): 1178-1180.
HAO Rutian, Zhang Xiaohua, PAN Yifei. The correlation between calcified thyroid nodules and thyroid papillary carcinoma[J]. *Chinese Journal of Clinical Oncology*, 2007, 34(20): 1178-1180.
 25. 龚艳萍, 龚日祥, 杨敬, 等. 甲状腺乳头状癌BRAF基因突变与临床病理特征间的关系及临床意义[J]. *四川大学学报(医学版)*, 2013, 44(4): 662-665.
GONG Yanping, GONG Rixiang, YANG Jing, et al. The relationship between BRAF gene mutation and clinicopathological features of papillary thyroid carcinoma and its clinical significance[J]. *Journal of Sichuan University. Medical Science Edition*, 2013, 44(4): 662-665.

本文引用: 何冰, 王继纲, 李玉军. *PRSS3-mRNA*与长链非编码RNA-*PRSS3P2*在甲状腺乳头状癌组织中的表达及其临床意义[J]. *临床与病理杂志*, 2017, 37(4): 667-672. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.04.003

Cite this article as: HE Bing, WANG Jigang, LI Yujun. Expression and clinical significance of *PRSS3-mRNA* and *LncRNA-PRSS3P2* in papillary thyroid carcinoma[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2017, 37(4): 667-672. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.04.003