

· 论 著 · DOI:10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2018. 22. 013

新型循环提取方法研究 miRNA-21 在 NSCLC 中的预测价值

荣 昊¹, 任伟宏^{2△}, 李延卿², 何 鑫¹, 冯 倩², 李文博², 冯慧洁²

(1. 河南中医药大学, 郑州 450000; 2. 河南中医药大学第一附属医院检验科, 郑州 450000)

摘 要:目的 构建新型血清 miRNA 提取方法, 并评估血清外泌体 miRNA-21 表达水平与非小细胞肺癌(NSCLC)患者病理与临床特征的相关性。**方法** 收集 30 例 NSCLC 患者(试验组)和 10 例健康志愿者(对照组)。从每例受试者外周血中离心出两份等量的外周血血清, 设为 A、B 两组, 每组为相同的 40 例血清标本。在 miRNA 提取方法方面, A 组为直接从血清中提取 miRNA-21, B 组先富集血清外泌体, 再从外泌体中提取 miRNA-21, 然后采用实时荧光定量 PCR 法分别检测 A、B 两组血清 miRNA-21 表达水平, 通过分析两组血清中各自试验组、对照组的检测结果是否存在明显差异, 来比较两种血清 miRNA 提取方法的优劣; 并进一步分析血清外泌体 miRNA-21 表达水平与 NSCLC 患者病理分型、病理分期、TNM 分期的相关性。**结果** NSCLC 患者血清外泌体中 miRNA-21 的表达水平较健康人明显上调($P < 0.05$), 上调倍数为 2.93 倍, 受试者工作曲线显示其预测 NSCLC 风险价值高, 曲线下面积为 0.867($P < 0.05$), 95%CI 为 0.721~1.000; 而通过直接从血清中提取 miRNA-21 的方法, NSCLC 患者和健康人表达水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。NSCLC 患者外泌体 miRNA-21 表达水平与病理分期、TNM 分期相关($P < 0.05$), 与病理分型无关($P > 0.05$)。**结论** 血清外泌体 miRNA-21 表达水平具有更高的预测 NSCLC 风险的价值, 并且与 NSCLC 病理分期、TNM 分期相关。

关键词: NSCLC; 血清; 外泌体; miRNA

中图法分类号: R446.11

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2018)22-3367-04

The predictive value of circulating miRNA-21 in NSCLC by constructing a novel circulating miRNA extraction method

RONG Hao¹, REN Weihong^{2△}, LI Yanqing², HE Xin¹, FENG Qian², LI Wenbo², FENG Huijie²

(1. Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou, Henan 450000, China;

2. Department of Clinical Laboratory, First Affiliated Hospital, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou, Henan 450000, China)

Abstract: Objective Take the expression of miRNA-21 in peripheral blood of patients with non-small cell lung cancer(NSCLC) is significantly increased as the entry point to establish a method of miRNA extraction that serum exosomes are enriched first and miRNA in exosomes are then extracted; And evaluate the correlation between the level of miRNA-21 in serum exosomes and the pathological and clinical features of NSCLC patients. **Methods** Thirty NSCLC patients(experimental group) and 10 healthy volunteers(control group) were enrolled. Peripheral blood serum was collected from the subjects, and the serum of each subject was divided evenly into two groups. In group A, miRNA-21 was directly extracted from serum; In group B, serum exosomes are enriched first and miRNA-21 in exosomes are then extracted. And then using real-time fluorescence PCR to detect the expression of serum miRNA-21 in group A and group B. By comparing the results of experimental group with the control group in two groups of serum, to compare the quality of the two methods of serum miRNA extraction; and then analyze the relevance of serum exosome miRNA-21 and NSCLC pathological type, pathological stage, TNM stage. **Results** The expression level of miRNA-21 in serum exosomes of NSCLC patients was significantly higher than that of healthy people($P < 0.05$), and the up-regulation was 2.93 times. The working curve of the subjects showed high value in predicting the risk of NSCLC, area under the curve was 0.867. The 95% confidence interval (CI) ranged from 0.721 to 1.000. While there was no significant difference between NSCLC patients and healthy controls($P > 0.05$) by directly extracting miRNA-21 from serum. The expression of miRNA-21 in exosomes of NSCLC was correlated with pathological stage($P < 0.05$), TNM stage($P < 0.05$), but not with pathological type($P > 0.05$). **Conclusion** Compared with serum

miRNAs, serum exosome miRNAs have higher detection efficiency. Serum exosome miRNA-21 expression level can be used as a biomarker that predicts the risk of NSCLC, pathological stage and TNM stage.

Key words: NSCLC; serum; exosome; miRNA

肺癌是全世界范围内癌症的首要死因,其中非小细胞肺癌(NSCLC)占肺癌病死率的85%^[1]。在NSCLC发病早期做出正确诊断的患者5年生存率明显较高,但大多数肺癌都是因为出现明显症状才被发现,而此时疾病已经发展到中晚期,有大约10%的NSCLC患者在初诊时即已出现脑转移,且平均生存期仅有4个月^[2]。与应用乳腺X线检测乳腺癌或者应用结肠镜检测结肠癌不同,除了病理活检并没有可靠的手段用于NSCLC的早期诊断。因此,越来越多的研究专注于寻找NSCLC的早期生物标志物^[3-4]。

外泌体是一种极其微小的纳米级囊泡结构,其直径范围在30~100 nm^[5-6]。研究证实,任何细胞均可以以胞吐的形式释放出外泌体,但肿瘤细胞的外泌体释放量远超正常细胞,并且可以稳定存在于各种体液中,如血液、汗液、尿液、精液、胸腔积液和腹水。在外泌体最开始被发现时一度被认为是“垃圾袋”,当时人们认为细胞通过外泌体这种“垃圾袋”将其自身不需要的废料排出体外^[7]。然而近几年来人们通过对外泌体的不断探索,逐渐认识到它的巨大价值,尤其是对于肿瘤研究方面,外泌体可以对肿瘤微环境进行免疫调节,并通过促进肿瘤的转移前生态位形成加速肿瘤生长,甚至可以介导肿瘤细胞产生抗肿瘤药物抵抗^[8-10]。此外,外泌体还特异性地包含mRNA、miRNA、dsDNA和蛋白质,可以作为不同肿瘤的诊断、预测和预后的生物标志物。更重要的是,外泌体可以被理解为细胞间的信息传递介质,它的内容物与肿瘤母细胞具有高度一致性,为肿瘤细胞特征的分析提供了一条新的途径。

在外泌体的众多内容物中,miRNA是被研究最多的分子,miRNA是微小的非编码RNA,它通过结合其靶mRNA的3'UTR来调节基因,导致靶基因表达的改变,通过这种方式,单个miRNA就可以同时对多个基因进行调节。miRNA在外泌体的保护下稳定地存在于血液中并不受RNase的降解,因此可以广泛地应用于癌症研究。在外泌体包含的众多miRNA中,miRNA-21在NSCLC患者外泌体中的异常表达被广泛研究。相关文献指出,在NSCLC中,表达水平较健康人明显上调的miRNA有miRNA-21、miRNA-205和miRNA-155,尤其以miRNA-21上调最为明显^[11-14]。因为血液中的外泌体miRNA水平与它们在组织中的水平呈正相关,所以研究血清外泌体miRNA-21的表达水平对于了解NSCLC肿瘤组织中miRNA-21的表达水平,以及进一步研究肿瘤机制至

关重要^[14-15]。因此,本研究选取血清外泌体miRNA-21为目标RNA,研究其对于预测NSCLC患病风险的价值,及其与NSCLC病理、临床特征的相关性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 血清标本收集于河南中医药大学第一附属医院,标本采集过程经过医院伦理委员会审核批准通过,所有患者均签署知情同意书。试验组为NSCLC患者血清30例,对照组为体检健康者血清10例。血清4℃冷藏保存。

1.2 仪器与试剂 外泌体提取试剂盒PureExo®Exosome Isolation Kit(P101)购自美国101Bio公司;外泌体RNA提取试剂盒SeraMir Exosome RNA Amplification(140710-002)购自美国SBI公司;血清RNA提取试剂盒miRcute miRNA Isolation Kit(DP501)、逆转录试剂盒miRcute Plus miRNA First-Strand cDNA Synthesis Kit(KR211-02)、实时荧光定量PCR扩增试剂盒miRcute Plus miRNA qPCR Detection Kit(SYBR Green)(FP411-02)、miRNA检测外参(CR100-1)、miRNA外参检测引物(CD200-01)、miRNA-21检测引物(CD201-0092)均购自天根生化科技有限公司。ABI7500实时荧光定量PCR分析仪为美国应用生物系统公司产品;超净工作台、低温高速离心机为美国Thermo Fisher科技公司产品;透射电镜JEM-1400为日本电子株式会社(JEOL)产品。

1.3 方法

1.3.1 分离血清外泌体 取每例受试者血清标本400 μL,共计40例,设为A组,按照外泌体提取试剂盒PureExo®Exosome Isolation Kit(P101)说明书提取血清外泌体;将分离出的外泌体悬于PBS溶液中,置于4℃冰箱以备下一步操作。

1.3.2 透射电子显微镜下验证外泌体形态 吸取30 μL分离纯化后的外泌体悬液加于载样铜网上,待网孔吸收后干燥10 min;加入20 μL洗液进行洗涤;重复洗涤后加入10 μL的电镜溶液,作用10 min;洗涤2次,在室温下干燥过夜;电镜下成像。

1.3.3 提取外泌体RNA 按照外泌体RNA提取试剂盒SeraMir Exosome RNA Amplification说明书要求提取血清外泌体中RNA;每例血清外泌体应当获得30~40 μL外泌体RNA;提取的外泌体RNA-70℃保存。

1.3.4 提取血清RNA 再取每例受试者血清标本400 μL,共计40例,设为B组,按照血清RNA提取试剂盒miRcute miRNA Isolation Kit说明书要求提取

白质结合形成复合物,免于受到血液中核糖核酸酶的降解,以及血液温度、酸碱度等不利因素的干扰^[16-18]。常规的提取循环 miRNA 的方法是首先裂解包裹 miRNA 的膜结构,再提取释放入血清的游离 miRNA,但 miRNA 性质极其不稳定,一旦释放入血液必定受到各种干扰因素的降解,影响提取效率,因此,有报道指出全血 miRNA 可能并不适用于筛选 NSCLC^[19]。针对以上问题,本项研究提出首先从血清中分离出外泌体,这就使得 miRNA 在被提取之前就已经随外泌体脱离血清,故可大大提高提取效率。

从另一个角度来讲,虽然所有细胞都可以分泌外泌体,但肿瘤细胞的外泌体释放量远超正常细胞,因此,癌症患者血清外泌体绝大部分来自于肿瘤细胞,在组成成分(包括蛋白质、DNA、mRNA、miRNA 等)上与肿瘤母细胞保持高度一致性^[20]。提取血清外泌体来代替肿瘤组织进行相关癌症研究,正是时下的三大液体活检技术之一。

本研究发现,血清外泌体 miRNA-21 高水平表达是 NSCLC 患病的高危预测因素,这与 NSCLC 肿瘤组织或肿瘤细胞中的结果一致,而如果直接从血清中检测 miRNA-21 的表达水平,体检健康者和 NSCLC 患者没有差异^[14-15]。本研究还发现,NSCLC 患者血清外泌体 miRNA-21 表达水平与病理分期、TNM 分期相关,miRNA-21 表达水平随着肿瘤细胞恶性程度的增高以及癌症病情的发展而升高。笔者推测,其机制可能是 miRNA-21 抑制细胞的分化并诱导细胞向肿瘤细胞转化,最终导致癌症的发生,并且在癌症进程中,miRNA-21 进一步促进肿瘤细胞的浸润和转移。但是,NSCLC 患者血清外泌体 miRNA-21 表达水平与病理分型不相关,这就提示在肺腺癌、鳞癌、大细胞癌肿瘤组织中 miRNA-21 表达水平无差异。

本研究存在一些不足之处,选取样本量较少,还需在接下来的研究中扩大样本量以进一步验证本文结果;本研究仅选取了 NSCLC 这一个癌症病种,没有涉及其他癌症类型的研究,故血清外泌体 miRNA-21 表达量升高在预测 NSCLC 风险中的特异性有待考证;对于 miRNA-21 在 NSCLC 疾病发展中的作用机制仅仅作出了推测,同样需要进一步研究验证。

外泌体是一个相对较新的研究领域,许多研究团队已经对这个领域产生了兴趣,并且发表了许多颇有见解的文章,然而至今为止却尚未建立一个成熟的分离和分析方案,对于如何很好地应用外泌体也缺乏共识。这些事实表明,在了解外泌体的功能作用方面还有很长的路要走,我们需要进一步研究外泌体的内容物如 miRNA 如何作用于肿瘤细胞,以及如何在癌症的诊断和预后中发挥作用,并通过对外泌体 miRNA 的研究来帮助我们理解癌症的机制,最终指导临床靶

向用药。

参考文献

- [1] LAI X, FRIEDMAN A. Exosomal miRs in lung cancer: a mathematical model [J]. *PLoS One*, 2016, 11 (12): e0167706.
- [2] ALI A, GOFFIN J R, ARNOLD A, et al. Survival of patients with non-small-cell lung cancer after a diagnosis of brain metastases [J]. *Current Oncol*, 2013, 20 (4): E300-E306.
- [3] AN T, QIN S, XU Y, et al. Exosomes serve as tumour markers for personalized diagnostics owing to their important role in cancer metastasis [J]. *J Extracellular Vesicles*, 2015 (4): 27522.
- [4] MUNAGALA R, AQIL F, GUPTA R C. Exosomal miRNAs as biomarkers of recurrent lung cancer [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37 (8): 10703-10714.
- [5] ZHOU J, LI X, CHEN Z, et al. Tumor-derived exosomes in colorectal cancer progression and their clinical applications [J]. *Oncotarget*, 2017, 8 (59): 100781-100790.
- [6] FRYDRYCHOWICZ M, KOLECKA-BEDNARCZYK A, MADEJCZYK M, et al. Exosomes-structure, biogenesis and biological role in non-small-cell lung cancer [J]. *Scand J Immunol*, 2015, 81 (1): 2-10.
- [7] RECLUSA P, TAVERNA S, PUCCI M, et al. Exosomes as diagnostic and predictive biomarkers in lung cancer [J]. *J Thorac Dis*, 2017, 9 (13): S1373-S1382.
- [8] CHOW A, ZHOU W, LIU L, et al. Macrophage immunomodulation by breast cancer-derived exosomes requires Toll-like receptor 2-mediated activation of NFκB [J]. *Sci Rep*, 2014 (4): 5750.
- [9] COSTA-SILVA B, AIELLO N M, OCEAN A J, et al. Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver [J]. *Nat Cell Biol*, 2015, 17 (6): 816-826.
- [10] RAIMONDO S, SAIEVA L, CORRADO C, et al. Chronic myeloid leukemia-derived exosomes promote tumor growth through an autocrine mechanism [J]. *Cell Commun Signal*, 2015 (13): 8-18.
- [11] GALLO A, TANDON M, ALEVIZOS I, et al. The majority of microRNAs detectable in serum and saliva is concentrated in exosomes [J]. *PLoS One*, 2012, 7 (3): e30679.
- [12] FENG B, ZHANG K, WANG R, et al. Non-small-cell lung cancer and miRNAs: novel biomarkers and promising tools for treatment [J]. *Clin Sci*, 2015, 128 (10): 619-634.
- [13] ZHAO W, ZHAO J J, ZHANG L, et al. Serum miR-21 level: a potential diagnostic and prognostic biomarker for non-small cell lung cancer [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8 (9): 14759-14763.
- [14] YU L, TODD N W, XING L X, et al. (下转第 3376 页)

- 筛查宫颈癌前病变的临床研究[J]. 陕西医学杂志, 2017, 46(2):162-164.
- [11] 蒙志平, 黎勇明, 杨玲, 等. HPV DNA 和 HPV E6/E7 mRNA 检测在宫颈癌筛查中的应用价值探讨[J]. 实用临床医学杂志, 2016, 20(11):76-79.
- [12] 黄宝英, 周伦顺, 富显果, 等. HPV E6/E7 mRNA 检测对宫颈癌筛查意义的初步评价[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2013, 20(14):1061-1064.
- [13] 黄海燕, 刘细荣, 李伟, 等. HPV E6/E7 mRNA 检测在宫颈病变进程中的临床应用研究[J]. 中国妇幼保健, 2017, 32(12):2582-2585.
- [14] 李理. HPV E6/E7 mRNA 检测在葫芦岛地区宫颈癌筛查中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(17):2285-2286.
- [15] 黄凌霄, 潘琼慧, 郑建琼, 等. HPV E6/E7 mRNA 在 CIN II 以上病变中的诊断价值[J]. 温州医科大学学报, 2015, 45(8):583-587.
- [16] 郑智, 曹晓恩, 张红萍. 高危型 HPV E6/E7 mRNA 检测对高级别宫颈病变的诊断价值[J]. 浙江医学, 2016, 38(14):1154-1157.
- [17] 乔峤. 高危型 HPV E6/E7 mRNA 检测在诊断宫颈病变方面的价值[J]. 当代医药论丛, 2016, 14(22):64-65.
- [18] 叶丽君, 喻长法, 蔡莎莎, 等. 高危型人乳头瘤病毒 E6/E7 mRNA 联合液基细胞学检查在宫颈病变诊断中的应用[J]. 中国慢性病预防与控制, 2017, 25(7):499-501.
- [19] 刘佳佳, 冯姝, 瞿全新, 等. 高危型人乳头瘤病毒 E6/E7 mRNA 在宫颈病变筛查中的作用研究[J]. 中国全科医学, 2014, 17(10):1140-1143.
- [20] 陈海迎, 郑小冬, 郭敏, 等. 高危型人乳头瘤病毒 E6/E7 mRNA 检测在宫颈细胞学 ASC-US 分流管理中的应用[J]. 中国妇幼保健, 2015, 30(35):6186-6188.
- [21] 赵旭晔, 崔勇, 姜淑芳, 等. 高危型人乳头瘤病毒 E6/E7 mRNA 检测在宫颈癌筛查中的意义[J]. 中华医学杂志, 2014, 94(43):3432-3435.
- [22] 余兰, 周伦顺, 刘桐宇, 等. 闽东宫颈癌普查中 HPV E6/E7 mRNA 及 DNA 的应用研究[J]. 中国妇幼保健, 2013, 28(25):4241-4243.
- [23] 杜彩英, 李芳. 人乳头瘤病毒 DNA 及 E6/E7 mRNA 检测在宫颈病变诊断中的比较研究[J]. 中国优生与遗传杂志, 2015, 23(4):38-40.
- [24] 张永欣, 张璐. 人乳头瘤病毒 E6/E7 mRNA 检测在宫颈癌筛查中的意义[J]. 中国妇幼保健研究, 2016, 27(7):816-818.
- [25] 张生枝, 邵华江, 马建婷. 人乳头瘤病毒 E6/E7 mRNA 检测在宫颈病变筛查中的应用价值[J]. 中国实验诊断学, 2014, 18(4):582-585.
- [26] 魏彩平. 人乳头瘤病毒 E6/E7 蛋白在宫颈病变筛查中的应用[J]. 川北医学院学报, 2017, 32(5):670-672.
- [27] 周莉, 陈珊, 张帝开. 持续性人乳头瘤病毒感染与宫颈癌的研究进展[J]. 中国病理生理杂志, 2010, 26(12):2482-2486.
- [28] KWAN T T, CHEUNG A N, LO S S, et al. Psychological burden of testing positive for high-risk human papillomavirus on women with atypical cervical cytology: a prospective study[J]. Acta Obstet Gynecol Scand, 2011, 90(5):445-451.
- [29] TROPÉ A, SJØBORG K, ESKILD A, et al. Performance of human papillomavirus DNA and mRNA testing strategies for women with and without cervical neoplasia[J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(8):2458-2464.
- [30] LIAO S, DENG D, HU X, et al. Hpv16/18 e5, a promising candidate for cervical cancer vaccines, affects scps, cell proliferation and cell cycle, and forms a potential network with e6 and e7[J]. Int J Mol Med, 2013, 31(1):120-128.
- [31] ANDERSSON S, HANSSON B, NORMAN I, et al. Expression of E6/E7 mRNA from 'high risk' human papillomavirus in relation to CIN grade, viral load and p16INK4a[J]. Int J Oncol, 2006, 29(3):705-711.

(收稿日期:2018-05-27 修回日期:2018-07-28)

(上接第 3370 页)

- Early detection of lung adenocarcinoma in sputum by a panel of microRNA markers[J]. Int J Cancer, 2010, 127(12):2870-2878.
- [15] ZHU J J, ZENG Y Y, XU C, et al. Expression profile analysis of microRNAs and downregulated miR-486-5p and miR-30a-5p in non-small cell lung cancer[J]. Oncol Rep, 2015, 34(4):1779-1786.
- [16] LIU R, LIAO J, YANG M, et al. Circulating mir-155 expression in plasma: a potential biomarker for early diagnosis of esophageal cancer in humans[J]. J Toxicol Environ Health A, 2012, 75(18):1154-1162.
- [17] BOUKOURIS S, MATHIVANAN S. Exosomes in bodily fluids are a highly stable resource of disease biomarkers[J]. Proteomics Clin Appl, 2015, 9(3/4, SI):358-367.
- [18] ENDZELINS E, BERGER A, MELNE V, et al. Detection of circulating miRNAs: comparative analysis of extracellular vesicle-incorporated miRNAs and cell-free miRNAs in whole plasma of prostate cancer patients[J]. BMC Cancer, 2017(17):730-736.
- [19] PATNAIK S K, KANNISTO E D, MALLICK R, et al. Whole blood microRNA expression may not be useful for screening non-small cell lung cancer[J]. PLoS One, 2017, 12(7):e0181926.
- [20] KOSAKA N, TAKESHITA F, YOSHIOKA Y, et al. Exosomal tumor-suppressive microRNA as novel cancer therapy: "exocure" is another choice for cancer treatment[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2013, 65(3):376-382.

(收稿日期:2018-02-27 修回日期:2018-05-28)