

血清外泌体 miR-221 和 miR-378 水平检测在胃癌诊断中的应用研究

张筱东¹, 谢星星¹, 李 佳², 朱 帅²

(1. 延安市人民医院检验科, 陕西延安 716000; 2. 延安大学医学院, 陕西延安 716000)

摘要: 目的 研究血清外泌体中 miR-221 和 miR-378 水平及其联合检测对诊断胃癌的价值。方法 选取延安市人民医院收治的胃癌患者 92 例为试验组, 选取同期诊断为胃息肉的患者 68 例和同期健康体检者 50 例为对照组, 空腹采集静脉血提取血清外泌体用 Western Blot 和 Nanosight 法鉴定, 用实时荧光定量 PCR 检测血清外泌体 miR-221 和 miR-378 水平, 用 ROC 曲线分析 miR-221 和 miR-378 联合检测对胃癌的诊断效能。结果 血清外泌体标本经 Western Blot 蛋白标志物检测鉴定和 Nanosight 颗粒浓度检测鉴定, 结果显示所提取的标本中确实含有外泌体。用实时荧光定量 PCR 对本进行定量检测结果显示, 血清外泌体中 miR-221 和 miR-378 水平胃癌组高于胃息肉组, 胃息肉组又高于健康对照组, 差异均有统计学意义 ($F=7.112\sim 10.986$, 均 $P < 0.01$)。ROC 曲线分析显示, miR-221 和 miR-378 联合检测对胃癌诊断的特异度、灵敏度、诊断符合率以及阴性预测值都明显高于单独检测, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 说明这两种 miRNA 联合检测对胃癌的诊断效能高于单独检测。结论 血清外泌体 miR-221 和 miR-378 水平联合检测对诊断胃癌有潜在的应用价值。

关键词: 外泌体; miRNA; 胃癌

中图分类号: R735.2; R730.43 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414 (2020) 06-052-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2020.06.013

Application Study of Serum Exosome miR-221 and miR-378 Detection in the Diagnosis of Gastric Cancer

ZHANG Xiao-dong¹, XIE Xing-xing¹, LI Jia², ZHU Shuai²

(1. Yan'an People's Hospital, Shaanxi Yan'an 716000, China;

2. Medical School of Yan'an University, Shaanxi Yan'an 716000, China)

Abstract: Objective To study the levels of miR-221 and miR-378 in serum exosomes and their combined detection value in the diagnosis of gastric cancer. **Methods** Selected 92 gastric cancer cases from Yan'an People's Hospital as experimental group, selected 68 gastric polyps cases in the same period, and selected 50 healthy persons doing physical examinations as control group. Fasting venous blood was collected to extract and identify exosomes using Western Blot and Nanosight method. Real-time quantitative PCR was used to detect levels of miR-221 and miR-378 in the serum exosomes. ROC curve analysis was used to analyze diagnostic efficiency of joint detection of miR-221 and miR-378 for gastric cancer. **Results** Western Blot protein marker identification and Nanosight particle concentration detection results of serum exosome samples showed that the extracted samples did contain exosomes. Real-time quantitative PCR detection showed that the expression levels of miR-221 and miR-378 in serum exosomes were higher in gastric cancer group than those in gastric polyp control group, which were higher than those in healthy control group, and the differences were statistically significant ($F=7.112\sim 10.986$, all $P < 0.01$). ROC curve analysis showed that the specificity, sensitivity, diagnostic coincidence rate and negative predictive value of the combined detection of miR-221 and miR-378 were significantly higher than those of the single detection, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). The results indicated that the combined detection was more effective than single detection. **Conclusion** The combined detection of serum exosome miR-221 and miR-378 levels has potential application value in the diagnosis of gastric cancer.

Keywords: exosome; microRNA; gastric cancer

胃癌 (gastric cancer) 在我国是发病率很高的一种恶性肿瘤, 其死亡率根据近年统计占我国城乡人口癌症死因之第二位^[1]。目前胃癌的早期诊断率比

较低, 多数患者在就诊时已经到了癌症中晚期或晚期。因此, 寻找灵敏度和特异度比较高的胃癌肿瘤标志物, 从而提高胃癌的早期诊断率非常有必要。

作者简介: 张筱东 (1984-), 男, 硕士, 主管检验师, 执业医师, E-mail: 411733157@qq.com。

通讯作者: 谢星星 (1982-), 男, 主管检验师, 副主任医师, E-mail: 548411302@qq.com。

微RNA或microRNA(miRNA)是一类长度为21~23个碱基的非编码小RNA分子,他们的表达水平在多种癌症出现异常,并在不同肿瘤中呈差异表达,miRNA目前被认为是可用于诊断恶性肿瘤的一种比较好的生物标志物。研究发现,胃癌患者的miRNA miR-221和miR-378表达水平均升高,对胃癌具有潜在诊断意义^[2]。外泌体(exosome)是近年来发现的一种大小为30~150 nm的微囊泡,由细胞分泌并在血液中循环,囊泡中携带着多种生物信息分子,如mRNA,miRNA,linRNA和DNA片段等,这些信息分子往往与癌症发生、侵袭和转移相关,通过检测外泌体内容物中的特定信息分子对恶性肿瘤进行辅助诊断,在最近几年备受重视^[3]。本文研究了血清外泌体中miR-221和miR-378的联合检测对诊断胃癌的应用价值,报道如下。

1 材料与方法

1.1 研究对象 选取2017年1月~2020年1月在延安市人民医院就诊且经病理检查确诊的胃癌患者92例为胃癌组,其中男性53例,女性39例,年龄46~81岁。根据美国癌症联盟委员会第7版胃癌肿瘤TNM标准进行分期,其中I期16例,II期21例,III期45例,IV期10例。按分化程度分,分为低分化65例,中、高分化27例。纳入标准:患者经过胃镜检查 and 活检确诊为胃癌,患者同意并签署知情同意书。排除标准:并发有其他肿瘤,自身免疫性疾病/血液疾病,并发感染性疾病如肝炎、结核等,临床资料不完整。选择同期在我院诊断为胃息肉的患者68例为胃息肉对照组,男性40例,女性28例,年龄46~81岁。选择同期我院健康体检者50例为健康对照组,男性29例,女性21例,年龄46~81岁。以上三组的年龄和性别等一般资料匹配。

1.2 仪器与试剂 血清外泌体的提取采用日本SBI公司ExoQuick-TM外泌体提取试剂,血清外泌体颗粒浓度用英国Malvern公司Nanosight试剂检测,Western Blot检测用的兔抗calnexin,CD9,CD63和TSG101蛋白一抗购自Abcam上海贸易有限公司,羊抗兔二抗购自碧云天杭州生物科技有限公司,RNA提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司,miRNA逆转录和定量测定分析用德国QIAGEN公司的mirVana试剂盒。

1.3 研究方法

1.3.1 血液标本采集:患者于确诊入院后2周内进行采血,清晨空腹取静脉血10 ml,4℃静置30 min,1 800 r/min离心20 min,弃上清,置-80℃冰箱保存。

1.3.2 外泌体提取鉴定:血清外泌体的提取严格按照SBI公司ExoQuick-TM外泌体提取试剂盒的说

明进行操作。外泌体鉴定用Western Blot检测外泌体表面4种蛋白标志物(calnexin,CD9,CD63和TSG101蛋白)的表达水平。血清外泌体颗粒浓度检测用Nanosight法,将样品稀释50 000~20 000倍,使样品中颗粒浓度为 $10^7/\text{ml}$ ~ $10^9/\text{ml}$,Nanosight检测参数不变、阈值设定为5。

1.3.3 外泌体miRNA定量测定:外泌体中miRNA的定量测定,先用RNA提取试剂提取外泌体总RNA,再用mirVana试剂以实时荧光定量PCR(RTqPCR)对miRNA进行逆转录和定量测定分析。按照miR-221和miR-378在GeneBank中的序列号,用Premier Primer 5.0软件进行引物序列设计。RTqPCR的总反应体系为25 μl ,预变性95℃ 10 min,反应条件95℃ 5s,60℃ 60s,反应40个循环。用ABI7700软件采集荧光信号做溶解曲线分析,每样品3个复孔,进行绝对定量测定分析。用化学合成的1 mol/L miRNA,稀释成不同浓度作为标准品($10^6, 10^5, 10^4, 10^3, 10^2$ fmol/L),以每个浓度的对数值为X轴,以每个浓度相对应的Ct值为Y轴,绘制标准曲线。用标准曲线根据所测得的Ct值计算miR-221和miR-378的绝对浓度。

1.4 统计学分析 采用SPSS 22.0统计软件做统计学分析。实验结果计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两组间比较采用t检验,多组比较采用单因素方差分析(ANOVA),在此之后用LSD做两两比较分析,用ROC曲线评估miR-221和miR-378联合检验在胃癌诊断中的效能,率的比较用卡方检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 外泌体鉴定 血清外泌体标本经Western Blot分析鉴定,结果显示,来自胃癌组、胃息肉组和健康组的血清外泌体标本的Calnexin,CD63,CD93和TSG101这4种外泌体标志蛋白均呈高表达,而来自相应组细胞裂解物的这4种标志性蛋白均呈低表达。Nanosight颗粒浓度检测结果显示,标本中含有大量的直径为30~100 nm的细胞外微囊泡颗粒。故认为所获得的血清外泌体标本中确实含有外泌体。

2.2 外泌体miR-221和miR-378定量检测 见表1。血清外泌体标本中miR-221和miR-378水平用RTqPCR进行定量检测,检测结果经ANOVA分析发现各组均数之间的差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。进一步用LSD做两两比较分析,结果显示,血清外泌体miR-221和miR-378水平在胃癌组和健康对照组($F=10.986, 10.721$)之间、在胃癌组和胃息肉组($F=7.112, 7.238$)之间以及在胃息肉组和健康对照组($F=3.863, 3.579$)之间差异

均有显著性统计学意义(均 $P < 0.01$), 胃癌组高于健康对照组并高于胃息肉组、胃息肉组高于健康对照组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。

表1 三组间血清外泌体 miR-221 和 miR-378 水平 ($\bar{x} \pm s$) 比较

检测项目 (fmol/L)	胃癌组 (n=92)	胃息肉组 (n=68)	健康组 (n=50)	P
miR-221	197.62 ± 27.88	114.70 ± 20.54	54.49 ± 13.75	< 0.01
miR-378	189.44 ± 25.36	101.39 ± 17.28	47.65 ± 13.09	< 0.01

2.3 外泌体 miR-221 与 miR-378 联合检测的诊断效能评价 见表2和表3。用ROC曲线分析比较外泌体 miR-221 与 miR-378 单独检测和联合检测对胃癌组和健康对照组诊断效能的数据显示, miR-221

的曲线下面积为 0.689, miR-378 的曲线下面积为 0.657, 联合检测 miR-221 和 miR-378 的曲线下面积为 0.776, 联合检测的特异度、灵敏度、诊断符合率以及阴性预测值均明显高于单独检测, 差异具有统计学意义(均 $P < 0.05$)。用ROC曲线下面积分析比较 miR-221 与 miR-378 单独检测和联合检测对胃癌组和胃息肉组诊断效能的数据显示, miR-221 的曲线下面积为 0.681, miR-378 的曲线下面积为 0.672, 联合检测 miR-221 和 miR-378 的曲线下面积为 0.755, 联合检测的特异度、灵敏度、诊断符合率以及阴性预测值都明显高于单独检测, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。以上结果说明, 外泌体 miR-221 与 miR-378 联合检测对胃癌的诊断价值高于单独检测。

表2 外泌体 miR-221 与 miR-378 单独检测和联合检测对胃癌组和健康组诊断效能的 ROC 曲线分析

检测项目	ROC 曲线下面积	检测特异度 (%)	检测灵敏度 (%)	诊断符合率 (%)	阴性预测值	阳性预测值
miR-221	0.689	66.61	79.33	80.02	0.685	0.717
miR-378	0.657	65.37	77.08	78.99	0.611	0.793
miR-221 与 miR-378 联合	0.776	88.23	91.55	90.17	0.862	0.939

表3 外泌体 miR-221 与 miR-378 单独检测和联合检测对胃癌组和胃息肉组诊断效能的 ROC 曲线分析

检测项目	ROC 曲线下面积	检测特异度 (%)	检测灵敏度 (%)	诊断符合率 (%)	阴性预测值	阳性预测值
miR-221	0.681	69.66	82.54	82.12	0.692	0.751
miR-378	0.672	60.53	79.89	79.64	0.603	0.834
miR-221 与 miR-378 联合	0.755	90.07	94.36	93.12	0.895	0.926

3 讨论

外泌体是细胞形成和分泌的一种具有脂质双层的膜性微囊泡, 囊泡中包含有多种类型的小分子 RNA, DNA 片段和蛋白质等生物信息分子。外泌体的直径介于 30~100 nm, 密度为 1.11~1.19 g/ml^[3]。几乎所有类型的细胞在正常和病理情况下均能形成和分泌外泌体, 其形成过程包括细胞内内体颗粒的膜内陷形成多囊泡体, 多囊泡体外膜与细胞膜融合后其中的囊泡被释放到胞外即为外泌体。外泌体广泛存在于血液循环、唾液、尿液、羊水和母乳中, 在细胞间交流或信息传递、细胞增殖分化和免疫调节等多种过程中发挥重要的作用, 并参与了心血管、消化、神经、免疫等疾病和肿瘤发生发展的过程, 检测外泌体及其成分有望成为一种新的疾病诊断方法或辅助诊断方法^[4]。

为保证外泌体和其他细胞外微囊泡研究的可信度与重复性, 国际细胞外囊泡协会制定了最低要求的国际研究指南。外泌体的鉴定主要包括形态学特征、浓度和 / 或直径大小、表面蛋白分子鉴定等^[5-6]。我们的研究中, 外泌体鉴定用 Western Blot 检测了外泌体表面 4 种蛋白标志物 (calnexin,

CD9, CD63 和 TSG101 蛋白) 的表达水平, 用 Nanosight 法检测了外泌体的颗粒浓度, 所用的方法和指标数均符合国际细胞外囊泡协会的要求。

基于外泌体检测的临床诊断大多聚焦于外泌体内容物的检测。外泌体核酸内容物的检测研究, 多采用二代测序技术、杂交芯片技术和实时荧光定量 PCR (RTqPCR) 或液滴数字 PCR 技术^[5-6]。我们的研究, 用 RTqPCR 技术定量检测了来自胃癌患者、胃息肉患者和健康体检者的血清外泌体标本中的两种 microRNA, miR-221 和 miR-378 的水平。

MicroRNA 是一类由细胞基因组编码的长度约为 22bp 的非编码单链小 RNA 分子, 广泛存在于各种真核生物, 参与转录后水平的基因表达调控。迄今, 已经报道了约 3 万种 miRNA 分子在不同动植物中存在, 在人类中, 已发现的约有 2 600 种。在病理方面, miRNA 可以参与调控癌基因和抑癌基因的表达, 因而在肿瘤发生发展中起着重要作用。miRNA 在多种肿瘤患者的血清 / 血浆和组织液中以非常稳定的形式存在, 被认为是一种新的实用的肿瘤生物标志物, 在多种肿瘤包括胃癌的诊断方面有很好的应用前景。

在我国已有不少关于胃癌 miRNA 研究的报道^[7-9]。LIU 等^[10]用全基因组 miRNA 微阵列技术研究发现,胃癌患者血浆中 miR-378, miR-371-5p 和 miR-187 表达水平升高,其中 miR-378 在胃癌早期即表达升高。SONG 等^[11]的研究发现,胃癌患者血浆 miR-221, miR-744 以及 miR-376c 的表达水平升高。ZHANG 等^[12]的研究发现,miR-214 的表达在胃癌组织和患者血浆中均显著升高,其血浆水平在患者术后从第 14 天至第 30 天呈进行性下降。LI 等^[13]发现,miR-17-92 在胃癌患者中的表达上调。因此,以上 miRNA 均可作为胃癌辅助性诊断的生物标志,联合检测则更有意义^[14-16]。我们选择了 miR-221 和 miR-378,研究了血清外泌体中这两种 miRNA 联合检测用于诊断胃癌的价值,结果显示,血清外泌体 miR-221 和 miR-378 水平联合检测对诊断胃癌有一定的应用价值。

参考文献:

- [1] FU Zhaoying, HAN Xiaodong, DU Juan, et al. Euphorbia lunulata extract acts on multidrug resistant gastric cancer cells to inhibit cell proliferation, migration and invasion, arrest cell cycle progression, and induce apoptosis[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2018, 212: 8-17.
- [2] 贾晶莹, 本巴吉, 韩军, 等. miRNA 在胃癌诊疗中的研究进展 [J]. 医学综述, 2020, 26(17): 3421-3428. JIA Jingying, BEN Baji, HAN Jun, et al. Research progress of miRNA in diagnosis and treatment of gastric cancer [J]. Medical Recapitulate, 2020, 26(17): 3421-3428.
- [3] LEBLEU V S, KALLURI R. Exosomes as a multicomponent biomarker platform in cancer[J]. Trends in Cancer, 2020, 6(9): 767-774.
- [4] HU Qian, SU Hang, LI Juan, et al. Clinical applications of exosome membrane proteins [J]. Precision Clinical Medicine, 2020, 3(1): 54-66.
- [5] DILSIZ N. Role of exosomes and exosomal microRNAs in cancer[J]. Future Science OA, 2020, 6(4): FSO465.
- [6] 蒲双双. 外泌体的提取、鉴定和保存方法研究进展 [J]. 现代检验医学杂志, 2018, 33(5): 157-160. PU Shuangshuang. Research progress in isolation, identification and preservation of exosomes [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2018, 33(5): 157-160.
- [7] 朱萌, 张宁, 卢新兰, 等. 肿瘤源性外泌体 miR-106a 调控间皮细胞 Smad7 表达影响胃癌腹膜转移 [J]. 西安交通大学学报(医学版), 2020, 41(3): 340-346. ZHU Meng, ZHANG Ning, LU Xinlan, et al. Regulatory effect of tumor-derived exosomal miR-106a on Smad7's expression in mesothelial cells to promote the peritoneal metastasis of gastric cancer[J]. Journal of Xi'an Jiaotong University(Medical Sciences), 2020, 41(3): 340-346.
- [8] 王文博, 韩肖肖, 符兆英, 等. 乳浆大戟增加多药耐药胃癌细胞对化疗药敏感性的研究 [J]. 延安大学学报(医学科学版), 2017, 15(4): 1-6. WANG Wenbo, HAN Xiaoxiao, FU Zhaoying, et al. Euphorbia esula increased the sensitivity of multidrug resistant gastric cancer cells to chemotherapeutic drugs[J]. Journal of Yan'an University(Medical Sciences), 2017, 15(4): 1-6.
- [9] 刘维帅, 郭晓宁, 杨洋, 等. 胃癌病理类型及临床预后与血清 miR-133a 和 DKK-1 相关性分析 [J]. 陕西医学杂志, 2020, 49(6): 751-754. LIU Weishuai, GUO Xiaoning, YANG Yang, et al. Correlation of pathological types and clinical prognosis of gastric cancer with serum miR-133a and DKK-1 [J]. Shaanxi Medical Journal, 2020, 49(6): 751-754.
- [10] LIU Hanshao, ZHU Lin, LIU Bingya, et al. Genome-wide microRNA profiles identify miR-378 as a serum biomarker for early detection of gastric cancer[J]. Cancer Letters, 2012, 316(2): 196-203.
- [11] SONG Mingyang, PAN Kaifeng, SU Huijuan, et al. Identification of serum microRNAs as novel non-invasive biomarkers for early detection of gastric cancer[J]. PLoS One, 2012, 7(3): e33608.
- [12] ZHANG Kecheng, XI Hongqing, CUI Jianxin, et al. Hemolysis-free plasma miR-214 as novel biomarker of gastric cancer and is correlated with distant metastasis[J]. American Journal of Cancer Research, 2015, 5(2): 821-829.
- [13] LI Hong, WU Qiong, LI Ting, et al. The miR-17-92 cluster as a potential biomarker for the early diagnosis of gastric cancer: evidence and literature review[J]. Oncotarget, 2017, 8(28): 45060-45071.
- [14] GUO Xianli, HAN Xiaodong, TIAN Ziwei, et al. Full extract of euphorbia esula reversed chemoresistance, inhibited cell migration/invasion, and induced apoptosis of multidrug-resistant SGC7901/VCR cells [J]. Phcog Mag, 2018, 14(56): 411-417.
- [15] 洪宏, 袁建芬, 喻海忠. 乳腺癌患者血清 miR-765, miR-200b 水平检测及与临床病理学相关研究 [J]. 现代检验医学杂志, 2018, 33(6): 55-58. HONG Hong, YUAN Jianfen, YU Haizhong. Detection of serum miR-765 and miR-200b levels in breast cancer patients and its correlation with clinicopathology[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2018, 33(6): 55-58.
- [16] 黄刚, 陈霏, 肇玉博, 等. 非小细胞肺癌患者血浆 miRNA-145 和 miRNA-221 表达与临床特征及术后复发的相关性研究 [J]. 现代检验医学杂志, 2019, 34(4): 40-44. HUANG Gang, CHEN Fei, ZHAO Yubo, et al. Study on the correlation between the expression of microRNA145 and microRNA221 in plasma and clinical characteristics and postoperative recurrence in patients with non-small cell lung cancer [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2019, 34(4): 40-44.

收稿日期: 2020-06-18

修回日期: 2020-07-22