

胸部放疗患者血浆外泌体中 miR-7-5p 与 miR-17-5p 的表达及临床意义

邵国梅, 郭京, 王高仁

(南通市肿瘤医院 / 南通大学附属肿瘤医院放疗科, 江苏南通 226019)

摘要:目的 检测胸部放疗患者放疗 50Gy 血浆外泌体中 miR-7-5p 与 miR-17-5p 较放疗前表达的差异, 探讨其预测放射性肺损伤 (radiation-induced lung injury, RILI) 中的价值。方法 选取在南通市肿瘤医院行胸部放疗并发放射性肺炎的 80 例患者为研究对象, 按照美国肿瘤放射治疗协作组和欧洲肿瘤治疗研究协作组 (RTOG/EORTC) 诊断分级标准, 分为 ≥ 3 级 RILI 患者组 16 例和 < 3 级 RILI 患者组 64 例, 检测患者放疗前和放疗 50Gy 预留血浆外泌体差异, 深度测序筛查出放疗 50Gy 时差异表达明显的 miRNA, qRT-PCR 方法检测放疗前, 放疗 50Gy 血浆外泌体 miR-7-5p 与 miR-17-5p 表达量, 利用 ROC 曲线分析血浆外泌体 miR-7-5p 与 miR-17-5p 预测 ≥ 3 级 RILI 的临床意义。结果 放疗 50Gy 后外泌体标志蛋白 CD9, CD63 和 TSG101 表达较放疗前明显升高, 而 Albumin 较放疗前明显下降, 差异均具有统计学意义 ($t=5.714\sim 20.159$, 均 $P < 0.05$)。两组患者放疗 50Gy 后, miR-7-5p 与 miR-17-5p 表达丰度显著升高, 且 ≥ 3 级 RILI 组升高幅度高于 < 3 级 RILI 患者, 差异均具有统计学意义 ($t=8.652\sim 11.233$, 均 $P < 0.05$)。miR-7-5p 的曲线下面积 (AUC) 为 0.705 (95% 置信区间: 0.618~0.795), 灵敏度和特异度分别为 0.762 和 0.681。miR-17-5p 的曲线下面积 (AUC) 为 0.683 (95% 置信区间: 0.585~0.764), 灵敏度和特异度分别为 0.708, 0.715。结论 放疗至 50Gy, 血浆外泌体中 miR-7-5p 与 miR-17-5p 高表达可能是预测与诊断严重 RILI 的重要生物学标志。

关键词: 外泌体; 微小核糖核酸; 生物学标志; 放射性肺损伤

中图分类号: R815; R392.11 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414 (2021) 04-035-05

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2021.04.008

Expression and Clinical Significance of miR-7-5p and miR-17-5p in Plasma Exosomes of Patients with Thoracic Radiotherapy

TAI Guo-mei, GUO Jing, WANG Gao-ren

(Department of Radiotherapy, Nantong Tumor Hospital, Tumor Hospital Affiliated to Nantong University, Jiangsu Nantong 226019, China)

Abstract: Objective To detect the expression of miR-7-5p and miR-17-5p in plasma exosomes of 50Gy patients with thoracic radiotherapy and explore the value of miR-7-5p and miR-17-5p in predicting radiation-induced lung injury (RILI). **Methods** 80 patients with radiation pneumonitis who received chest radiotherapy in Nantong Cancer Hospital were selected as the research objects. According to the diagnostic grading standard of RTOG / EORTC, they were divided into ≥ 3 groups. There were 16 patients with grade 3 RILI and 64 patients with grade 3 RILI. The difference of plasma exosomes was detected before radiotherapy and 50Gy after radiotherapy. The miRNA with significant difference expression was screened by deep sequencing. The expression levels of miR-7-5p and miR-17-5p were detected by qRT PCR before radiotherapy and 50Gy after radiotherapy. ROC curve was used to analyze the clinical significance of plasma exosomes miR-7-5p and miR-17-5p in predicting ≥ 3 grade RILI. **Results** After 50Gy radiotherapy, the expressions of exosome marker proteins CD9, CD63 and TSG101 were significantly higher than those before radiotherapy, while albumin were significantly lower than that before radiotherapy ($t=5.714\sim 20.159$, all $P < 0.05$). After 50Gy radiotherapy, the expression abundance of miR-7-5p and miR-17-5p in the two groups were significantly increased, and the increase amplitude in the group with grade ≥ 3 RILI was higher than that in the group with grade < 3 RILI, with statistical significance ($t=8.652\sim 11.233$, all $P < 0.05$). The area under the curve (AUC) of miR-7-5p was 0.705 (95% confidence interval: 0.618~0.795), the sensitivity and the specificity were 0.762 and 0.681 respectively. The area

基金项目: 南通市民生科技 - 面上项目: 外泌体在放射性肺炎个体化精准诊疗中的研究 (编号 MS12018096), 江苏省研究生科研与实践创新计划 (编号 SJCX19-0868)。

作者简介: 邵国梅 (1978-), 女, 博士, 副主任医师, 研究方向: 胸部肿瘤及正常组织反射敏感性研究, E-mail: lunc 123@qq.com。

通讯作者: 王高仁 (1965-), 男, 硕士, 主任医师, 研究方向: 胸部肿瘤及正常组织反射效应。

under the curve (AUC) of miR-17-5p was 0.683 (95% confidence interval: 0.585~0.764), the sensitivity and the specificity were 0.708 and 0.715, respectively. **Conclusion** The high expression of miR-7-5p and miR-17-5p in plasma exosomes after radiotherapy to 50Gy may be biological markers to predict and diagnose the occurrence of serious RILI.

Keywords: exosomes; miRNA; biomarkers ;radiation-induced lung injury (RILI)

放疗是胸部肿瘤病人主要的治疗方式之一。在胸部肿瘤放射治疗期间,肺部的周围组织无法避免的接受照射,发生炎症反应和促纤维化因子表达增强,引起放射性肺损伤 (radiation-induced lung injury, RILI)。RILI 疾病的发展是一个变化的过程,大多从急性放射性肺炎的第一阶段渐渐转变为第二阶段的放射性肺纤维化。目前,临床上并无特效治疗 RILI 疾病的方法,严重者发生进行性肺纤维化,肺功能逐步降低,最终会造成继发感染及呼吸衰竭而死亡^[1]。因此,如何提前预防 RILI 产生是成功治疗胸部肿瘤的重点环节。但 RILI 早期症状不具有特异性,缺乏特异性预测因子,导致患者常常错过最佳治疗期,不可避免进入肺纤维化期^[2]。因此,寻找早期预测发生的因子具有重要意义。临床影像学上常常观察到照射野外发生 RILI 表现,辐射旁效应是 RILI 的重要机制^[3]。外泌体是介导电离辐射旁效应的一种可能机制,并且外泌体中的 RNA 发挥着重要作用,但临床真实环境下研究仍较少^[4]。我们考虑靶区受照 50Gy,达姑息放疗剂量,故研究放疗至靶区达到姑息剂量 50Gy 时,血浆中外泌体 miRNA 变化与 ≥ 3 级 RILI 关系,评估外泌体 miRNA 预测 ≥ 3 级 RILI 的临床价值,为减少 ≥ 3 级 RILI 提供临床参考方案。

1. 材料与方法

1.1 研究对象 本研究发生 RILI 的胸部放疗患者 80 例均来自南通市肿瘤医院,于放疗前及放疗 95%PTV (planning target volume, 计划靶面积) 50Gy 时采集患者血浆备用。根据患者放疗后发生 RILI 严重程度分为 ≥ 3 级 RILI 患者组 16 例和 <3 级 RILI 患者组 64 例,其中 ≥ 3 级 RILI 组中男性 10 例,女性 6 例;年龄 28~73 岁,平均年龄 48.5 ± 11.8 岁。 <3 级 RILI 患者组中男性 40 例,女性 24 例;年龄 26~75 岁,平均年龄 9.6 ± 12.1 岁。两组患者年龄、性别等资料具有可比性 ($P > 0.05$)。

1.2 仪器与试剂 枸橼酸抗凝采血管,离心机 (美国贝克曼库尔特公司);移液枪,透视电镜 (德国蔡司公司);电泳仪 (美国伯乐公司);实时定量 PCR 仪 (美国伯乐公司);2g/dl 醋酸双氧铀染色液,Western blot 检测试剂盒 (美国伯乐公司),CD9, CD63, TSG101, Albumin 及 GAPDH 抗体,二抗 (美国艾博抗公司);RNA 提取试剂盒 (美国伯乐公司);SDS-PAGE 凝胶 (上海生工生物科技有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 血浆收集:收集胸部患者放疗前、放疗 50Gy 新鲜全血 20ml 置于枸橼酸抗凝采血管,4℃ 1h 进行凝固分层后,3 000 r/min 离心取上清转至干净的离心管中。然后 12 000 r/min 4℃ 离心 10min,取上清分装到 1.5ml 离心管中,-80℃ 冰箱保存。

1.3.2 外泌体分离:将 -80℃ 储存的血浆在冰上融化,采用梯度离心法提取胸部放疗患者放疗前、放疗 50Gy 时患者血浆中的外泌体,-80℃ 冰箱保存备用。外泌体鉴定:从 -80℃ 冰箱取出已分离的外泌体样本后置于冰盒中,溶解后稍离心,使用移液枪吸取 15 μ l 的外泌体样本于铜网上静置 1min。用镊子夹取铜网,使用滤纸将铜网上的外泌体样本吸干,然后使用移液枪吸取 15 μ l 的 2g/dl 醋酸双氧铀染色液室温染色 1min。将染色完成的样本放于灯下干燥 10min,在透视电镜下观察拍照,保存图片。将外泌体样本裂解后,将外泌体中的蛋白提取出来,通过 Western blot 分别检测患者放疗前以及放疗 50Gy 时外泌体标志蛋白 CD9, CD63, TSG101 以及 Albumin 的表达变化。

1.3.3 外泌体 RNA 提取与 RT-qPCR 检测:提取 ≥ 3 级 RILI 患者放疗前及放疗 50Gy 时,以及 <3 级 RILI 患者相应时间血浆外泌体中 RNA 做 miRNA 芯片进行鉴定,筛选外泌体中差异明显 miRNA 为观察对象,对血浆外泌体 miR-7-5 与 miR-17-5p 和 ≥ 3 级 RILI 进行相关性研究;利用 RT-qPCR 技术验证 miRNA 分子表达差异。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 20.0 统计软件分析数据,采用均数 \pm 标准误 (Mean \pm SE) 表达计量资料,使用 Prism6.0 软件进行两组间分析,采用 t 检验。构建受试者工作特性曲线 (ROC 曲线) 以评估 miR-7-5p 与 miR-17-5p 测量值的敏感度和特异度,并比较其预测严重 RILI 的价值。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 分离的血浆外泌体鉴定 分别于胸部放疗患者放疗前以及放疗 50Gy 时采集患者血浆,提取血浆内外泌体,通过透射电镜观察外泌体,见图 1。血浆外泌体为直径约 100 nm 的双层膜球形囊泡结构,符合外泌体的特征,证明分离外泌体方法可以用于后续实验。

2.2 放疗前及放疗 50Gy 后血浆外泌体标志蛋白相对

表达量变化 见表1。放疗 50Gy 后外泌体标志蛋白 CD9, CD63 和 TSG101 表达较放疗前明显升高, 而

Albumin 较放疗前明显下降, 差异均具有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。

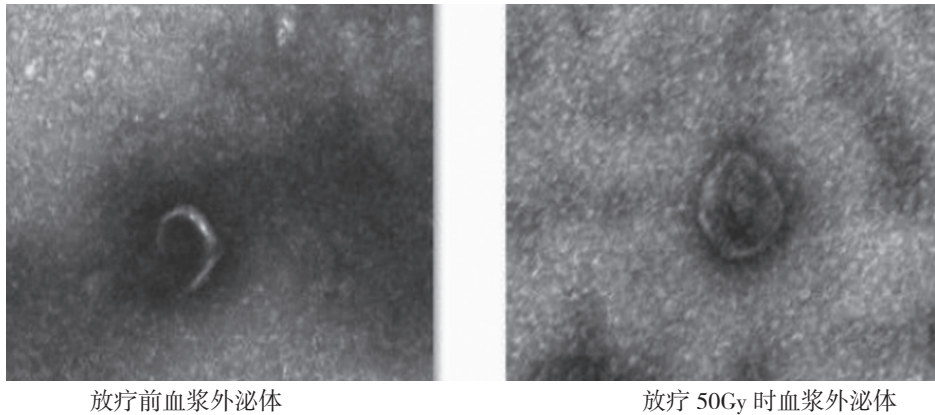


图1 电镜鉴别外泌体形态

表1 放疗前及放疗 50Gy 后血浆外泌体标志蛋白相对表达量变化 ($n=80$, Mean \pm SE)

项目	放疗前	放疗 50Gy	t	P
CD9	0.45 ± 0.10	0.62 ± 0.12	9.734	<0.001
CD63	0.34 ± 0.08	0.73 ± 0.15	20.159	<0.001
TSG101	0.48 ± 0.11	0.80 ± 0.13	16.807	<0.001
Albumin	0.75 ± 0.14	0.30 ± 0.07	25.714	<0.001

2.3 放疗 50Gy 后外泌体中 miRNA 表达丰度对比 见表2。放疗 50Gy 后两组患者外泌体中 miR-7-5p 与 miR-17-5p 表达丰度显著升高, 且 ≥ 3 级 RILI

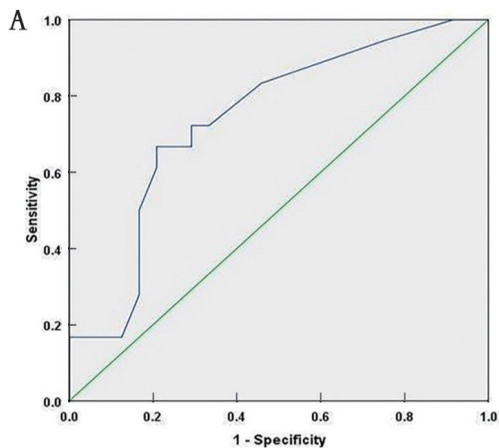
组升高幅度高于 <3 级 RILI 患者, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表2 放疗 50Gy 后外泌体中 miRNA 表达丰度对比 (Mean \pm SE)

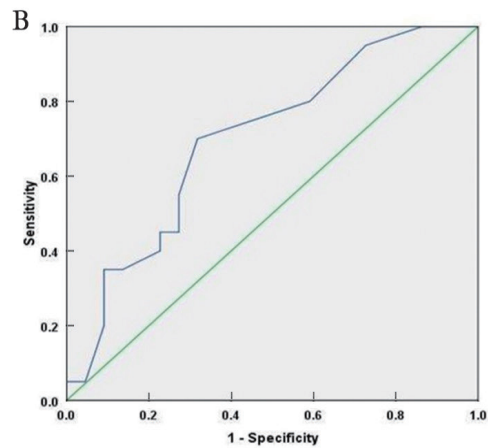
项目	<3 RILI 组 ($n=64$)		t	P	≥ 3 级 RILI 组 ($n=16$)		t	P
	放疗前	放疗后			放疗前	放疗后		
miR-7-5p	0.63 ± 0.17	0.89 ± 0.17	8.652	<0.001	0.64 ± 0.16	1.45 ± 0.24	11.233	<0.001
miR-17-5p	0.62 ± 0.15	0.90 ± 0.16	10.214	<0.001	0.63 ± 0.14	1.34 ± 0.23	10.547	<0.001

2.4 ROC 分析外泌体 miR-7-5p 与 miR-17-5p 预测 远期发生 ≥ 3 级 RILI 价值 见图2。图2A所示: miR-7-5p 的曲线下面积 (AUC) 为 0.705 (95% 置信区间: 0.618~0.795), 灵敏度和特异度分别

为 0.762 和 0.681。图2B所示: miR-17-5p 的曲线下面积 (AUC) 为 0.683 (95% 置信区间: 0.585~0.764), 灵敏度和特异度分别为 0.708 和 0.715。



(A) miR-7-5p 预测 ≥ 3 级 RILI 价值



(B) miR-17-5p 预测 ≥ 3 级 RILI 价值

图2 ROC 分析分泌体 miR-7-5p 与 miR-17-5p 预测远期发生 ≥ 3 RILI 曲线图

3 讨论

放疗是胸部恶性肿瘤重要治疗手段, RILI 是胸部肿瘤放射治疗较为常见的并发症, 该疾病是一个动态变化过程, 若不能有效干预, 极易从急性放射性肺炎阶段转变为放射性肺纤维化阶段。病人在肺部纤维化后会极大地影响其肺功能, 造成其生活质量大大下降; 同时 RILI 无效治疗后会造成病人并发感染和呼吸衰竭, 最终导致死亡^[5]。临床上, 目前尚没有特异性治疗 RILI 方法, 因此, 寻找有效地特异性筛查及早期预测放射性肺损伤发生的因子, 并基于此调整治疗, 制定科学、合理的精准治疗手段, 对高风险的患者在放疗前以及放疗中进行预防放射肺损伤处理, 成为胸部肿瘤患者治疗中发生 RILI 的治疗重点^[6]。

临床影像学上常常观察到照射野外发生 RILI 表现, 故我们推测辐射远隔效应在肺放射性损伤中起重要作用。近年来研究表明电离辐射可影响和改变细胞膜结构物质外泌体生成, 通过辐射远隔效应, 产生多种不同的生物学效应^[7]。外泌体可广泛而稳定存在于体液中, 系细胞间通讯交流的一种新发现途径^[8]。外泌体内含蛋白质、脂质、DNA, RNA 以及 miRNA 等多种物质, 另外, 研究发现外泌体作为一种带膜结构, 还能保护其中的 miRNA 免受 RNA 酶的降解, 具有更稳定、更高效特性, 可以向临床提供一种独特的、非创伤性、含相关大量宝贵生物学信息的动态标本, 可动态反映和监测机体的生物状态^[9-10]。

miRNA 作为一种内源性, 包含 19~23 个核苷酸结构的小分子 RNA, 大多存在于真核生物细胞中, 且具有很高的保守性。miR-7-5p 明显抑制人支气管上皮细胞 BEP2D 的表皮生长因子受体 (EGFR) 表达, 而且抑制 AKT 和 mTOR 的磷酸化, 诱导细胞发生旁自噬效应^[11]。我们在本研究中发现放疗 50Gy 后外泌体标志蛋白 CD9, CD63 和 TSG101 表达较放疗前明显升高, 而 Albumin 较放疗前明显下降, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。HAO 等^[12]研究发现小鼠肾脏缺血再灌注损伤和培养的肾小管细胞缺氧期间, miR-17-5p 明显上调, 其表达水平依赖于 P53, 在肾小管 p53 基因敲除小鼠中, 肾脏缺血再灌注损伤中的 miR-17-5p 诱导作用减弱, 支持 p53 在体内 miR-17-5p 诱导作用, 推测 p53-miR-17-5p-DR6 是肾脏缺血再灌注损伤中的一种新的保护途径, 可能是预防和治疗缺血性急性肾脏损伤的靶点, 可预测急性肾损伤。

在本研究中, 我们胸部肿瘤患者放疗前后血浆中分离并鉴定了外泌体, 通过基因芯片分析, 筛选出放疗前、放疗 50Gy 差异明显 miR-7-5p 与 miR-

17-5p, 两组患者放疗 50Gy 后, miR-7-5p 与 miR-17-5p 表达丰度显著升高, 且 ≥ 3 级 RILI 组升高幅度高于 <3 级 RILI 患者, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。推测放疗至 50Gy 时出现 miR-7-5p 与 miR-17-5p 患者若按原计划放疗后, 发生严重 RILI 几率较高。此外, 本研究发现血浆外泌体中 miR-7-5p 与 miR-17-5p 具有预测和诊断远期 ≥ 3 级 RILI 的临床意义; 临床选择 95%PTV 50Gy/25f 时调整放疗计划, 通过寻找合适预测远期 RILI 个体差异因子, 基于此调整放疗体积、照射剂量, 对避免胸部肿瘤患者治疗中发生严重 RILI 具有重要意义。但是, 还需要扩大样本进行多中心研究以确认 miR-7-5p 与 miR-17-5p 在预测严重 RILI 的临床价值。

综上所述, 放疗至 50Gy, 血浆外泌体中 miR-7-5p 与 miR-17-5p 高表达可能是预测与诊断严重 RILI 的重要生物学标志。

参考文献:

- [1] 贵丹, 胡兴荣. 放射性肺损伤诊治研究进展 [J]. 湖北民族学院学报 (医学版), 2019, 36 (1): 69-71.
GUI Dan, HU Xingrong. Progress in diagnosis and treatment of radiation-induced lung injury [J]. Journal of Hubei University for Nationalities (Medical Edition), 2019, 36 (1): 69-71.
- [2] 胡凯, 王仁生. 放射性肺损伤的相关影响因素 [J]. 广西医科大学学报, 2019, 36 (2): 316-320.
HU Kai, WANG Rensheng. Related factors of radiation-induced lung injury [J]. Journal of Guangxi Medical University, 2019, 36 (2): 316-320.
- [3] BEACH T A, GROVES A M, WILLIAMS J P, et al. Modeling radiation-induced lung injury: lessons learned from whole thorax irradiation [J]. International Journal of Radiation Biology, 2020, 96 (1): 129-144.
- [4] MEI Zijie, TIAN Xiaoli, CHEN Jing, et al. α 7-nAChR agonist GTS-21 reduces radiation-induced lung injury [J]. Oncology Reports, 2018, 40 (4): 2287-2297.
- [5] KALMAN N S, HUGO G D, MAHON R N, et al. Diabetes mellitus and radiation induced lung injury after thoracic stereotactic body radiotherapy [J]. Radiotherapy and Oncology, 2018, 129 (2): 270-276.
- [6] 刘文秀, 曹博, 杨娟, 等. 循环 miR-29 a 和 miR-150 与非小细胞肺癌胸部放射治疗剂量的相关性 [J]. 现代肿瘤医学, 2018, 26 (5): 708-712.
LIU Wenxiu, CAO Bo, YANG Juan, et al. Study on the correlation between circulating miR-29a, miR-150 and delivered dose in radiotherapy for non-small cell lung cancer [J]. Journal of Modern Oncology, 2018, 26 (5): 708-712.
- [7] FOUKOURIS S, MATHIVANAN S. Exosomes in bodily fluids are a highly stable resource of disease biomarkers [J]. Proteomics Clin Appl, 2015, 9 (3/4): 358-367.
- [8] FRYDRYCHOWICZ M, KOLECKA-BEDNARCZYK A, MADEJCZYK M, et al. Exosomes - structure, biogenesis and biological role in non-small-cell lung cancer [J]. Scandinavian Journal of Immunology, 2015, 81 (1): 2-10.

(下转第 105 页)