

• 论 著 •

血清外泌体来源的 miRNA-122 对肝癌诊断的研究

张 云^{1,2}, 度 敏³, 刘胜武^{1△}

(1. 武汉大学基础医学院 430071; 湖北省恩施土家族苗族自治州中心医院;
2. 临床检验中心; 3. 乳腺外科 445000)

摘 要:目的 探讨原发性肝癌(HCC)患者血清中外泌体来源的 miRNA-122 的表达水平,以评价其在肝癌早期的诊断价值。**方法** 以外泌体提取试剂盒分离纯化 HCC 患者和健康体检者血清中外泌体,通过蛋白免疫印迹(Western blot)检测 Hsp70, CD63 和 Alix 外泌体标记蛋白分子,透射电镜鉴定血清外泌体形态;实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)技术检测 82 例 HCC 患者和 79 例健康体检者中 miRNA-122 的水平;以外泌体 miRNA-122 水平鉴别 HCC 患者和健康体检者的诊断效能。**结果** Western blot 显示出血清外泌体 Hsp70, CD63 和 Alix 等标记分子的表达,透射电镜鉴定外泌体形态符合一般外泌体特征;qRT-PCR 结果表明,HCC 组中的 miRNA-122 [$\log_{10}(0.62 \pm 0.89)$]较健康对照组 [$\log_{10}(-0.78 \pm 0.77)$]血清外泌体升高,差异有统计学意义 ($P < 0.001$);血清外泌体来源的 miRNA-122 诊断肝癌的敏感度为 81.93%、特异度为 82.05%,曲线下面积为 0.89 (95% CI: 0.84~0.94)。**结论** 血清外泌体来源的 miRNA-122 可作为一种新的肿瘤标志物用于原发性肝癌的早期临床诊断。

关键词:外泌体; miRNA-122; 原发性肝癌; 早期诊断
DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2017.09.021 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2017)09-1260-03

Vsalue of serum exosomes miRNA-122 detection in diagnosis of primary hepatocellular carcinoma

ZHANG Yun^{1,2}, TUO Min³, LIU Shengwu^{1△}

(1. Basic Medical College, Wuhan University, Wuhan, Hubei 430071, China; 2. Clinical Laboratory Center;
3. Department of Breast Surgery, Central Hospital of Enshi Autonomous Prefecture, Enshi, Hubei 445000, China)

Abstract: **Objective** To study the expression of serum exosomes miRNA-122 in hepatocellular carcinoma (HCC) and to investigate clinical value in diagnosis of HCC. **Methods** Serum of exosomes from 82 patients with HCC and 79 healthy controls were isolated and purified by exosomes extraction kit. The exosomes marker of Hsp70, CD63 and Alix were analyzed by Western blot, and the exosomes were identified by transmission electron microscopy. Serum of miRNA-122 from 79 patients with HCC and 82 healthy controls were detected by real-time quantitative PCR (qRT-PCR). The diagnostic values of exosomes miRNA-122 were analyzed furtherly. **Results** The expression of Hsp70, CD63 and Alix could be detected by Western blot in the isolated exosomes. The characteristics of exosomes were identified by TEM. The levels of exosomes miRNA-122 in HCC patients [$\log_{10}(0.62 \pm 0.89)$] was significantly higher than that of the control group [$\log_{10}(-0.78 \pm 0.77)$] ($P < 0.001$). The sensitivity of serum exosomes miRNA-122 in diagnosing HCC was 81.93%, and the specificity was 82.05%, AUC was 0.89 (95% CI: 0.84—0.94). **Conclusion** The serum exosomes miRNA-122 could be used as diagnosis markers of HCC.

Key words: exosomes; miRNA-122; hepatocellular carcinoma; early diagnosis

临床上对肝癌的筛查主要是对甲胎蛋白(AFP)的检测,但因其对肝癌的诊断具有较低的敏感度,导致了其应用上的限制^[1],因此迫切需要寻找更具特异性的肿瘤标志物。近年来,一些新的肿瘤标志物的不断涌现为肝癌的早期诊断提供了方便^[2],其中血中循环微小核苷酸(miRNA)等用于肝癌标志物已被报道^[3]。miRNA-122 是一种常见的微小核苷酸,在肝癌患者体内表达失调^[4]。血液中的 miRNA-122 常以游离态存在或被包裹于外泌体中,血清游离 miRNA-122 已被研究表明是肝癌诊断的生物标志物,并被大量用于肝癌患者的诊断^[5],然而外泌体来源的 miRNA-122 少有研究。本研究旨在探讨血清外泌体来源的 miRNA-122 对肝癌诊断的价值,现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2014—2016 年健康体检者 79 例作为对照组,原发性肝癌(HCC)患者 82 例作为 HCC 组。对照组平均年龄(45.36 ± 8.63)岁;男 43 例,女 36 例;血清中 AFP 水平

(5.31 ± 1.74)ng/mL。HCC 组平均年龄(49.21 ± 8.83)岁;男 48 例,女 34 例;血清中 AFP 水平(283.73 ± 74.23)ng/mL。对照组排除其他如心、肺、胃肠及等内分泌疾病,HCC 患者均以病理组织检查确诊。

1.2 仪器及试剂 TEM-100CX II 透射电镜(日本电子公司);ABI 7000 荧光定量 PCR 仪(美国应用生物系统公司);Trizol LS 试剂(Invitrogen);TaqMan 探针荧光定量试剂盒(上海吉玛公司);MMLV-逆转录试剂盒(Invitrogen);引物合成委托武汉擎科生物公司;BCA 蛋白定量试剂盒(碧云天生物技术研究);外泌体分离试剂盒(美国 101Bio);Hsp70, CD63, Alix 以及 Golgin A1 兔抗人单克隆抗体以及羊抗兔二抗 IgG (美国 SBI 公司)。

1.3 方法

1.3.1 外泌体的分离 按照美国 101Bio 公司血清外泌体抽提试剂盒说明书进行。

1.3.2 透射电镜鉴定血清外泌体形态 取 1 滴分离液滴加到

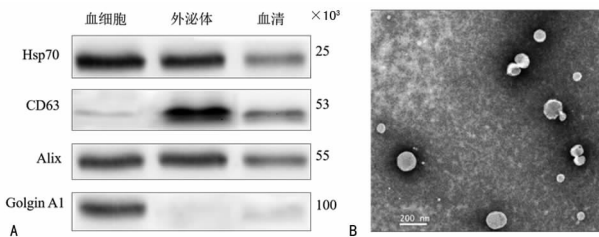
专用铜网上,以 5% 的固定液在 4℃ 固定 2 h;以 0.1 mol/L 磷酸液漂洗 5 次,每次 10 min;重复上述操作后,在浓度梯度逐渐增高的丙酮中进行脱水处理;用 3% 磷钨酸染色,并用滤纸吸除剩余液体,待自然挥干后,标本在 100 KV 透射电子显微镜进行观察。

1.3.3 荧光定量 PCR 反应检测血清中 miR-122 水平测量 以常规 Trizol 法提取外泌体总 RNA,测定浓度后调整浓度于一致,加入逆转录酶,进行逆转录反应,条件:16℃ 30 min, 42℃ 30 min, 85℃ 10 min。PCR 反应条件:95℃ 预变性 2 min; 94℃ 变性 12 s, 62℃ 退火延伸 40 s, 上述进行 40 个循环。引物序列同参考文献[6],基因水平采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算如下, $\Delta\Delta C_t = (\text{实验组 } C_{t_{\text{miR-122}}} - \text{实验组 } C_{t_{\text{U6 snRNA}}}) - (\text{对照组 } C_{t_{\text{miR-122}}} - \text{对照组 } C_{t_{\text{U6 snRNA}}})$, 此处的对照组规定为 miR-122 表达量最低的一组。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行数据处理,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用独立样本 *t* 检验;计数资料组间比较采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清中外泌体的分离与检测 蛋白免疫印迹(Western blot)检测外泌体标志性蛋白分子的表达情况,表明提取的外泌体均表达 Hsp70、CD63 和 Alix 标志性蛋白分子,而不含细胞成分 Golgin A1,见图 1A;透射电镜鉴定外泌体形态,电镜视野下可见外泌体呈现典型的圆形或椭圆形杯状结构,大小不均一,见图 1B。



注:A 为 Western blot 鉴定外泌体标志分子的表达;B 为透射电镜鉴定血清外泌体形态。

图 1 血清中外泌体的分离与检测

2.2 各组血清外泌体 miRNA-122 水平变化 qRT-PCR 检测外泌体中 miRNA-122 表达情况,结果显示,HCC 组中的 miRNA-122 [$\log_{10}(0.62 \pm 0.89)$] 高于对照组 [$\log_{10}(-0.78 \pm 0.77)$],差异有统计学意义($P < 0.001$)。

2.3 血清外泌体中 miRNA-122 对 HCC 诊断效能 miRNA-122 鉴别诊断肝癌的敏感度为 81.93%、特异度为 82.05%,曲线下面积(AUC)为 0.89(95%CI: 0.84~0.94)。

3 讨论

外泌体是一种由细胞产生的多囊泡运输体,其分布广泛,可存在于血浆、尿液甚至唾液[7]。外泌体内主要包含了特异性的标记蛋白和许多 miRNAs 分子[8],这些内含于外泌体的特异性蛋白如 Hsp70、CD63、Alix 等常用于外泌体的鉴定[9],而特异性的 miRNAs 分子已被用于肺癌、卵巢癌等的诊断中[10-11]。关于外泌体来源的 miRNAs 在肝癌中的相关研究也有报道,如外泌体来源的 miRNA-21 比血清游离的 miRNA-21 对 HCC 的诊断具有更高的价值[12],另一种外泌体来源的 miRNA-718 与肝癌密切相关,在肝移植治疗后,外泌体中的 miR-718 表现出与未治疗肝癌患者显著的差异[13]。在大鼠诱导的肝癌研究中,外泌体内 miRNA-122 对大鼠肝癌的诊断

AUC 可达到 0.915,优于 AFP 的 0.826,并且外泌体来源的 miRNA-122 与血清中游离的 miR-122 对肝癌的诊断效能也均表现出了明显高于 AFP 的优势[14],这些特性使外泌体用于肝癌的临床诊断研究提供了理论基础。

本课题组通过纳入本院治疗的 79 例 HCC 患者及 82 例健康体检者,提取血液中外泌体。通过 Western blot 检测发现,外泌体中稳定表达 Hsp70、CD63 和 Alix 标志性蛋白分子,并通过电镜观察证实了提取物为血清来源的外泌体,与文献[15]报道的类似。以纯化的外泌体提取总 RNA,通过 qRT-PCR 分别检测肝癌患者和健康体检人外泌体 miRNA-122 水平,结果显示,较健康对照组 miRNA-122 水平 [$\log_{10}(-0.78 \pm 0.77)$] 相比,HCC 组中的 miRNA-122 水平 [$\log_{10}(0.62 \pm 0.89)$] 显著升高,差异有统计学意义($P < 0.001$)。以血清外泌体中 miRNA-122 水平鉴别诊断 HCC 患者和对照组发现,其敏感度为 81.93%、特异度为 82.05%,AUC 为 0.89。相比而言,本研究通过外泌体 miRNA-122 诊断效能高于文献[16]报道的以 200 ng/mL AFP 诊断效能(AUC 为 0.835)。

作为一种新型的分子实体,外泌体的检测对于肝癌的诊断等有明显的优势,除了具有较高的特异性外,由于外泌体表面包含的脂膜成分,使得其内含物中的蛋白和 RNAs 等免受各种酶的降解,具有较高的稳定性,因而对外泌体内的 miRNA 的检测具有更高的稳定性和更好的特异性。相信随着外泌体提取技术的成熟,外泌体的检测将会拥有更加广阔的前景。

参考文献

- [1] Ertle JM, Heider D, Wichert M, et al. A combination of α -fetoprotein and des- γ -carboxy prothrombin is superior in detection of hepatocellular carcinoma[J]. Digestion, 2013, 87(2): 121-131.
- [2] 董良仓. 原发性肝癌的分子诊断[J]. 检验医学与临床, 2012, 9(1): 60-62.
- [3] Huang JT, Liu SM, Ma H, et al. Systematic review and Meta-Analysis: circulating miRNAs for diagnosis of hepatocellular carcinoma[J]. J Cell Physiol, 2016, 231(2): 328-335.
- [4] Wu X, Wu S, Tong L, et al. miR-122 affects the viability and apoptosis of hepatocellular carcinoma cells[J]. Scand J Gastroenterol, 2009, 44(11): 1332-1339.
- [5] Luo J, Chen M, Huang H, et al. Circulating microRNA-122a as a diagnostic marker for hepatocellular carcinoma[J]. Onco Targets Ther, 2013, 6: 577-583.
- [6] 吴瑞珊, 苏运钦, 余广超, 等. Taqman 探针实时荧光定量 PCR 检测肝脏疾病患者血清中 miR-122 的表达水平及其临床意义[J]. 中国病理生理杂志, 2013, 29(2): 348-353.
- [7] Lasser C. Exosomal RNA as biomarkers and the therapeutic potential of exosome vectors[J]. Expert Opin Biol Ther, 2012, 12(Suppl 1): S189-S197.
- [8] Pant S, Hilton H, Burczynski ME. The multifaceted exosome: biogenesis, role in normal and aberrant cellular function, and frontiers for pharmacological and biomarker opportunities[J]. Biochem Pharmacol, 2012, 83(11): 1484-1494.
- [9] Pospichalova V, Svoboda J, Dave Z, et al. Simplified protocol for flow cytometry analysis of fluorescently labeled exosomes and microvesicles using dedicated(下转第 1265 页)

参考文献

- [1] Brissot E, Labopin M, Beckers MM, et al. Tyrosine kinase inhibitors improve long-term outcome of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for adult patients with Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia[J]. *Haematologica*, 2015, 100(3):392-399.
 - [2] Huang XJ, Chang YJ. Unmanipulated HLA-Mismatched/Haploidentical Blood and Marrow Hematopoietic Stem Cell Transplantation[J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2011, 17(2):197-204.
 - [3] 吴德沛, 孙爱宁. 临床造血干细胞移植[M]. 合肥: 安徽科学技术出版社, 2010:283-290.
 - [4] Yan CH, Jiang Q, Huang XJ, et al. Superior survival of unmanipulated haploidentical hematopoietic stem cell transplantation compared with chemotherapy alone used as post-remission therapy in adults with standard-risk acute lymphoblastic leukemia in first complete remission[J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2014, 20(9):1314-1321.
 - [5] 胡健, 王莉红, 李渊, 等. 酪氨酸激酶抑制剂联合化疗后行异基因造血干细胞移植治疗 Ph⁺ ALL 急性淋巴细胞白血病的疗效比较[J]. *中国实验血液学杂志*, 2015, 35(7):593-597.
 - [6] 程珍, 赵澜, 陈广华, 等. 伊马替尼联合化疗或异基因造血干细胞移植治疗成人 Ph 染色体阳性急性淋巴细胞白血病的临床研究[J]. *中华血液学杂志*, 2014, 35(2):114-119.
 - [7] Bachanova V, Marks DI, Zhang MJ, et al. Ph⁺ ALL patients in first complete remission have similar survival after reduced intensity and myeloablative allogeneic transplantation impact of tyrosine kinase inhibitor and minimal residual disease[J]. *Leukemia*, 2014, 28(3):658-665.
 - [8] Chen R Z, Campbell JL, Chen BA. Prophylaxis and treatment of acute lymphoblastic leukemia relapse after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation[J]. *Onco Targets Ther*, 2015, 8:405-412.
 - [9] Frankfurt O, Licht JD. Ponatinib a step forward in overcoming resistance in chronic myeloid leukemia[J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(21):5828-5834.
 - [10] Nicolini FE, Basak GW, Soverini S, et al. Allogeneic stem cell transplantation for patients harboring T315I BCR-ABL mutated leukemias[J]. *Blood*, 2011, 118(20):5697-5700.
 - [11] Davila ML, Riviere I, Wang XY, et al. Efficacy and Toxicity Management of 19-28z CAR T Cell Therapy in B Cell Acute Lymphoblastic Leukemia[J]. *Science Translational Medicine*, 2014, 6(224):224-225.
 - [12] Zhang HM, Chen RZ, Cheng J, et al. Systematic review and meta-analysis of prospective studies for ECP treatment in patients with steroid-refractory acute GVHD[J]. *Patient Pref Adhere*, 2015, 9:105-111.
 - [13] 李晓红, 高春记, 吴晓雄, 等. 重组抗 CD25 人源化单克隆抗体治疗激素耐药急性移植物抗宿主病的临床研究[J]. *中国实验血液学杂志*, 2013, 21(6):1535-1540.
 - [14] 谭亚敏. 异基因造血干细胞移植后急性移植物抗宿主病防治策略及其关键 T 细胞和细胞因子研究[D]. 浙江: 浙江大学, 2014.
 - [15] Jodele S, Davies SM, Lane A, et al. Diagnostic and risk criteria for HSCT-associated thrombotic microangiopathy: a study in children and young adults[J]. *Blood*, 2014, 124(4):645-653.
 - [16] Jodele S, Laskin BL, Dandoy CE, et al. A new paradigm: diagnosis and management of HSCT-associated thrombotic microangiopathy as multi-system endothelial injury[J]. *Blood Rev*, 2015, 29(3):191-204.
 - [17] Kasahara H, Mori T, Kato J, et al. Post-transplant lymphoproliferative disorder of the adrenal gland after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: report of two cases and literature review[J]. *Transplant Infectious Disease*, 2015, 17(6):909-914.
 - [18] Luo L, Zhang L, Gao CJ, et al. Post-transplant lymphoproliferative disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a single-center experience[J]. *Ann Transplant*, 2014, 19:6-12.
- (收稿日期:2016-12-21 修回日期:2017-01-26)
-
- (上接第 1261 页)
- flow cytometer[J]. *J Extracell Vesicles*, 2015, 4:25530.
- [10] Taylor DD, Gercel-Taylor C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer[J]. *Gynecol Oncol*, 2008, 110(1):13-21.
 - [11] Aroldi A, Lampertico P, Montagnino G, et al. Natural history of hepatitis B and C in renal allograft recipients[J]. *Transplantation*, 2005, 79(9):1132-1136.
 - [12] Wang H, Hou L, Li A, et al. Expression of serum exosomal microRNA-21 in human hepatocellular carcinoma[J]. *Biomed Res Int*, 2014(2):864894.
 - [13] Sugimachi K, Matsumura T, Hirata H, et al. Identification of a bona fide microRNA biomarker in serum exosomes that predicts hepatocellular carcinoma recurrence after liver transplantation[J]. *Br J Cancer*, 2015, 112(3):532-538.
 - [14] Liu WH, Ren LN, Wang X, et al. Combination of exosomes and circulating microRNAs May serve as a promising tumor marker complementary to alpha-fetoprotein for early-stage hepatocellular carcinoma diagnosis in rats[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2015, 141(10):1767-1778.
 - [15] 陈加贵, 邓敬桓, 何敏. 肝癌细胞外泌体的分离与鉴定[J]. *世界华人消化杂志*, 2016, 24(5):737-743.
 - [16] Hu B, Tian X, Sun J, et al. Evaluation of individual and combined applications of serum biomarkers for diagnosis of hepatocellular carcinoma: a meta-analysis[J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(12):23559-23580.
- (收稿日期:2017-01-03 修回日期:2017-02-20)