

· 临床研究 ·

血浆外泌体 miR-1260b 的表达与肺腺癌患者临床特征的相关性

夏 阳, 闻 伟*

南京医科大学第一附属医院胸外科, 江苏 南京 210029

[摘要] 目的:探讨血浆外泌体 miR-1260b 在肺腺癌中的表达及其与临床特征的关系。方法:收集并提取肺腺癌患者血浆中外泌体,通过透射电镜(transmission electron microscopy, TEM)、粒径分析(nanoparticle tracking analysis, NTA)、Western blot 鉴定外泌体的大小、分布情况。采用 qRT-PCR 检测外泌体 miR-1260b 的表达。结果:外泌体广泛存在于肺腺癌患者血浆中。亚组分析发现,与肿瘤 ≤ 3 cm 组相比,血浆外泌体 miR-1260b 在肿瘤 > 3 cm 组中呈高表达($P=0.010$);与 N0 组相比,血浆外泌体 miR-1260b 在 N1($P<0.05$)、N2($P<0.001$)组中呈高表达;与非气道播散组相比,血浆外泌体 miR-1260b 在气道播散组中高表达($P<0.001$)。与未复发/转移组相比,血浆外泌体 miR-1260b 在复发/转移组中高表达($P=0.038$)。结论:血浆外泌体 miR-1260b 在肺腺癌中高表达,且与肿瘤大小、气道播散、复发/转移相关,可作为肺腺癌患者诊治的分子靶标。

[关键词] 肺腺癌;外泌体;miRNA

[中图分类号] R734.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2020)12-1779-05

doi:10.7655/NYDXBNS20201207

Correlation between plasma exosomal miR - 1260b and the clinical characteristics of patients with lung adenocarcinoma

XIA Yang, WEN Wei*

Department of Thoracic Surgery, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

[Abstract] **Objective:** This study aims to investigate the expression of plasma exosomal miR - 1260b in patients with lung adenocarcinoma and its correlation with clinical features. **Methods:** Exosomes were extracted from the plasma of the patients with lung adenocarcinoma. The size and distribution of exosomes were identified by transmission electron microscopy (TEM), nanoparticle tracking analysis (NTA) and Western blot. qRT-PCR was used to detect the expression of exosomal miR - 1260b. **Results:** Exosomes were widely present in the plasma of patients with lung adenocarcinoma. Subgroup analysis found that plasma exosomal miR - 1260b was highly expressed in > 3 cm compared with ≤ 3 cm group ($P=0.010$); Compared with the N0 group, plasma exosomal miR - 1260b was increased in the N1 ($P<0.05$) and N2 ($P<0.001$) groups; Compared with the spread without air spaces group, plasma exosomal miR - 1260b was elevated in the spread through air spaces group ($P<0.001$). Compared with the non-relapse/metastasis group, plasma exosomal miR - 1260b was highly expressed in the relapse/metastasis group ($P=0.038$). **Conclusion:** Plasma exosomal miR - 1260b is highly expressed in patients with lung adenocarcinoma, and is related to tumor size, stas and recurrence/metastasis. It can be used as a molecular target for the diagnosis and treatment of lung adenocarcinoma patients.

[Key words] lung adenocarcinoma; exosomes; miRNA

[J Nanjing Med Univ, 2020, 40(12):1779-1783]

肺腺癌发病率呈不断上升趋势^[1]。在过去几十年中尽管外科手术、放化疗和靶向治疗等疗法取得了巨大进步,但肺腺癌的预后仍然不够理想^[1]。因

[基金项目] 国家自然科学基金(青年项目)(81702262)

*通信作者(Corresponding author), E-mail:754032@qq.com

此,探索新的生物标志物对肺腺癌的早发现早治疗和预后具有重要意义。微小 RNA(microRNA, miRNA)是一类 18~24 个核苷酸的非编码 RNA,它们在癌症进展中起重要作用,并作为各种癌症早期发现和预后的生物标志物^[2-3]。外泌体是直径为 30~150

nm的小囊泡,携带多种物质,例如非编码RNA、蛋白质和脂质等^[4]。miRNA在外泌体中特别丰富,血浆外泌体miRNA的异常表达已被证明是肺腺癌诊治和预后的重要生物标志物^[5]。本课题组既往研究已证明miR-1260b对肺腺癌增殖和侵袭转移具有调控作用^[6-7]。但是,血浆外泌体miR-1260b在肺腺癌中的表达情况及其潜在的临床意义尚不清楚。因此,本研究旨在阐明血清外泌体miR-1260b在肺腺癌中的表达情况及其与临床特征的关系。

1 材料和方法

1.1 材料

收集2015年1月—2020年6月108例在南京医科大学第一附属医院接受手术治疗的肺腺癌患者血浆。术后病理均证实为肺腺癌,气道播散均由术后病理报告明确描述。剔除临床资料不完整及失访病例。并按8版病理分类。每例患者都签署了知情同意书。该研究得到了本院伦理委员会的批准。

1.2 方法

1.2.1 血浆外泌体提取及鉴定

在4℃以1 200 r/min离心15 min分离血浆和血细胞。500 μL血浆用于qRT-PCR。4℃以15 000 r/min超速离心70 min来分离外泌体^[7],用PBS缓冲液(Biological Industries,以色列)洗涤沉淀,并在-80℃下保存以进行qRT-PCR分析。将外泌体样品用5%戊二醛固定,并放入碳包铜的网格中。磷钨酸溶液(2%, pH 7.0)用于覆盖网格30 s。透射电子显微镜(transmission electron microscopy, TEM, Tecnai G2 Spirit Bio TWIN, FEI, 美国)观察外泌体。外泌体用PBS缓冲液稀释。通过使用粒径分析仪(nanoparticle tracking analysis, NTA)(ZetaView PMX 110, Particle Metrix, Meerbusch, 德国)和ZetaView 8.04.02软件,检测外泌体的颗粒大小和浓度。ZetaView系统使用110 nm聚苯乙烯颗粒进行校准,条件是28.7℃ pH 7.0。采用Western blot检测外泌体标志物CD63和TSG101的表达水平。用含有10 μg/mL磷酸酶抑制剂和100 μg/mL PMSF(上海 Beyotime 公司)的RIPA试剂(上海 Beyotime 公司)从细胞中提取总蛋白。通过十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离蛋白质,然后将其转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上。封闭1 h后,将膜用一抗稀释液、抗CD63(ab134045, Abcam 公司, 英国),抗TSG101(ab30871, Abcam 公司, 英国)在4℃下孵育过夜。将其洗涤5 min 3次,然后在相应的第二抗体中

温育2 h。之后,通过增强化学发光(ECL)进行检测。

1.2.2 qRT-PCR

使用TRIzol试剂(Invitrogen 公司, 美国)从肺腺癌患者血浆中获得RNA,然后将其反转录为cDNA。通过exoRNeasy Midi试剂盒(Qiagen 公司, 美国)提取外泌体RNA。U6用作内部参考。通过ABI 7900快速实时PCR系统(ABI 公司, 美国)进行qRT-PCR分析,条件为95℃ 5 min,然后94℃ 15 s, 55℃ 30 s进行40个循环。

1.3 统计学方法

应用Stata 12.0和Graphpad 5进行数据的统计学分析,计数资料采用卡方、Fisher确切概率法对血浆外泌体miR-1260b表达水平与患者的临床特征进行分析,符合正态分布的计量资料,两组比较采用 t 检验,多组采用单因素方差分析,多组间两两比较采用LSD检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 外泌体鉴定

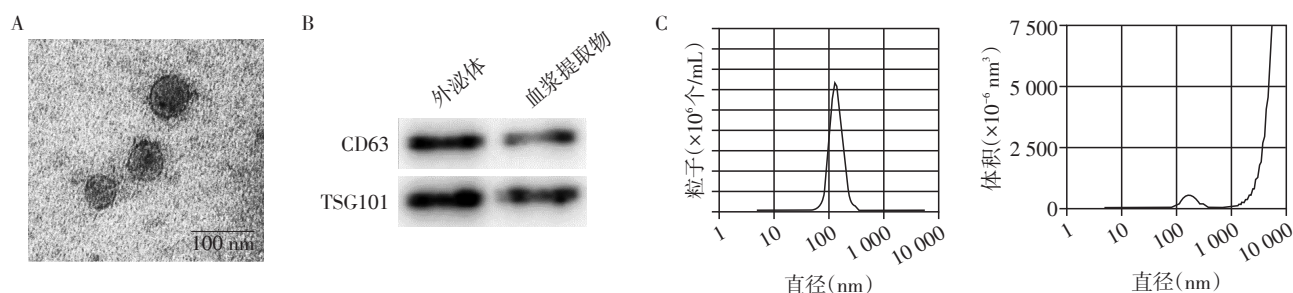
从108例患者的血浆中收集并提取了外泌体。通过TEM观察外泌体的形态,具有均匀杯状形态,直径大小为40~120 nm(图1A)。CD63和TSG101是用于鉴定外泌体的特异性标志物^[7],通过Western blot进行测定,结果显示,在分离的外泌体中富含CD63和TSG101(图1B)。采用NTA分析外泌体的分布情况(图1C)。结果表明,所收集的囊泡是外泌体,外泌体广泛存在于肺腺癌患者血浆中。

2.2 血浆外泌体miR-1260b在肺腺癌患者中的表达情况

采用qRT-PCR检测血浆外泌体miR-1260b的表达,并进行亚组分析,结果表明,血浆外泌体miR-1260b与分化程度无统计学差异(高分化 vs. 中分化: $P=0.159$;高分化 vs. 低分化: $P=0.054$;中分化 vs. 低分化: $P=0.473$,图2A);与肿瘤 ≤ 3 cm组相比,血浆外泌体miR-1260b在肿瘤 > 3 cm组中呈高表达($P=0.010$,图2B);与N0组相比,血浆外泌体miR-1260b在N1组、N2组中呈高表达(N0 vs. N1: $P < 0.05$; N0 vs. N2: $P < 0.001$; N1 vs. N2: $P=0.002$,图2C)。

2.3 血浆外泌体miR-1260b高表达与患者临床特征的关系

根据肺腺癌患者血浆外泌体miR-1260b的中位数水平,将所有肺腺癌病例分为高表达组和低表达组。结合临床资料分析发现,血浆外泌体miR-1260b异常表达与年龄、性别、吸烟史、病理亚型、分



A: 通过 TEM 观察外泌体的形态, 具有均匀杯状形态, 直径大小为 40~120 nm ($\times 20\ 000$); B: Western blot 检测到外泌体的特异性标志物 CD63 和 TSG101; C: 采用 NTA 分析外泌体的分布情况。

图1 外泌体鉴定

Figure 1 Exosomes identification

化程度无关, 而与肿瘤大小 ($P=0.013$)、淋巴结转移 ($P=0.002$)、气道播散 ($P=0.024$)、复发/转移 ($P=0.008$) 相关 (表 1)。

2.4 血浆外泌体 miR-1260b 与气道播散、复发/转移的关系

气道播散均由术后病理报告明确描述 (图

3A)。采用 qRT-PCR 检测血浆外泌体 miR-1260b 的表达, 分析其与气道播散、复发转移的关系。结果发现, 与非气道播散患者相比, 血浆外泌体 miR-1260b 在气道播散中呈高表达 ($P < 0.001$, 图 3B)。与未复发/转移组相比, 血浆外泌体 miR-1260b 在复发/转移组中高表达 ($P=0.038$, 图 3C)。

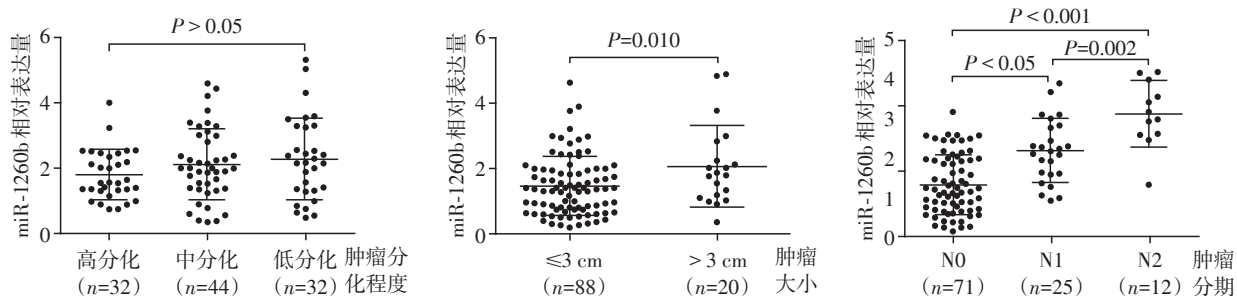


图2 qRT-PCR 检测血浆外泌体 miR-1260b 在肺腺癌患者中的表达

Figure 2 Plasma exosomal miR-1260b expression in patients with lung adenocarcinoma

3 讨论

肺腺癌的早期发现和预后对于降低病死率很重要。不幸的是, 目前尚无可靠的生物标志物用于肺腺癌诊断。本研究的目的是阐明特定血浆外泌体 miR-1260b 作为生物标志物的价值。

血液外泌体及其 miRNA 含量为分子诊断开辟了新领域。最近研究表明, 血浆/血清外泌体 miRNA 可被认为是有望的肺癌诊断和预后生物标志物^[8]。本研究证实了肺腺癌患者血浆中稳定存在大量外泌体, 并且, 血浆外泌体 miR-1260b 表达在不同分化程度间差异无统计学意义; 与肿瘤 ≤ 3 cm 组相比, 血浆外泌体 miR-1260b 在肿瘤 > 3 cm 组中呈高表达; 与 N0 相比, 血浆外泌体 miR-1260b 在 N1、N2 中呈高表

达。结合临床资料分析发现, 血浆外泌体 miR-1260b 异常表达与年龄、性别、吸烟史、病理亚型、分化程度无关, 而与肿瘤大小、复发/转移有关, 说明血浆外泌体 miR-1260b 参与了肺腺癌的进展过程。本课题组之前的研究已证实 miR-1260b 通过调控 Wnt/ β -catenin 或 KIT 信号通路来影响肺腺癌细胞的增殖凋亡、侵袭转移等生物学过程^[6-7], 这也与其他研究结果一致^[9]。

随后本研究还发现, 与非气道播散组相比, 血浆外泌体 miR-1260b 在气道播散组中呈高表达。血浆外泌体 miR-1260b 与肺腺癌的气道播散有关这一发现非常重要。2015 年, 世界卫生组织提出了气道播散作为肺腺癌侵袭转移新模式这一概念, 是指肺癌细胞在肺实质内经气道播散到肿瘤主灶边缘

表1 血浆外泌体miR-1260b表达情况与肺腺癌临床特征的关系

Table 1 Correlation between plasma exosomal miR-1260b expression and clinical characteristics of lung adenocarcinoma [n(%)]

临床特征	例数	外泌体 miR-1260b		P值	临床特征	例数	外泌体 miR-1260b		P值
		高表达	低表达				高表达	低表达	
年龄				0.227	分化程度				0.081
<45岁	38	16(42.1)	22(57.9)		低	32	20(62.5)	12(37.5)	
≥45岁	70	38(54.3)	32(45.7)		中	44	23(52.3)	21(47.7)	
吸烟史				0.560	高	32	11(34.4)	21(65.6)	
无	61	29(47.5)	32(52.5)		肿瘤大小				0.013
有	47	25(53.2)	22(46.8)		≤3 cm	88	39(44.3)	49(55.7)	
性别				0.430	>3 cm	20	15(75.0)	5(25.0)	
男	42	19(45.2)	23(54.8)		淋巴结转移				0.002
女	66	35(53.0)	31(47.0)		无	71	28(39.4)	43(60.6)	
病理亚型				0.280	有	37	26(70.3)	11(29.7)	
贴壁型	30	12(40.0)	18(60.0)		气道播散				0.024
腺泡型	41	18(43.9)	23(56.1)		无	73	31(42.5)	42(57.5)	
乳头型	17	11(64.7)	6(35.3)		有	35	23(65.7)	12(34.3)	
微乳头型	7	5(71.4)	2(28.6)		复发/转移				0.008
实体型	13	8(61.5)	5(38.5)		无	77	33(42.9)	44(57.1)	
					有	18	14(77.8)	4(22.2)	

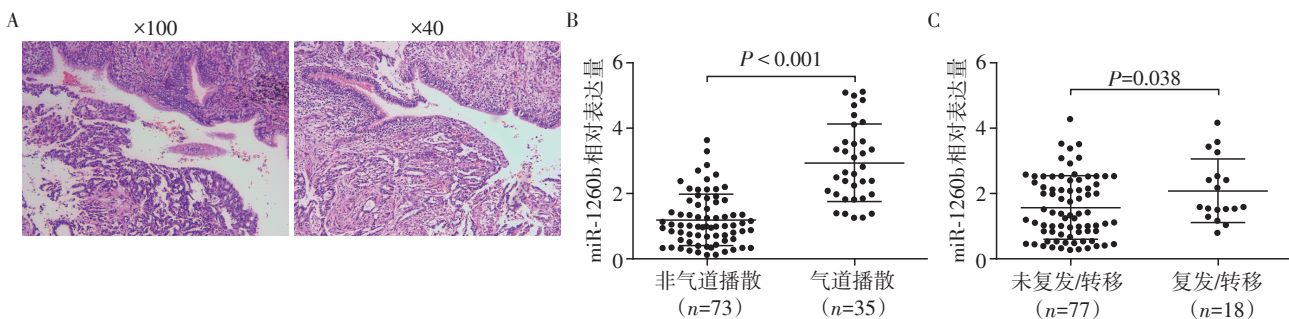


图3 血浆外泌体miR-1260b与患者预后水平的相关性

Figure 3 The correlation between plasma exosomal miR-1260b and patient prognosis

以外^[10]。近年来,气道播散被认为与肺癌的一些基因突变有关,与表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)突变负相关^[11],而与kirsten大鼠肉瘤病毒癌基因(kirstenrat sarcoma viral oncogene, KRAS)、鼠类肉瘤滤过性毒菌致癌同源体B1(v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1, BRAF)和转移相关基因1(metastasis associated gene1, MTA1)正相关^[12-13]。如果通过检测血液中相关因子^[14]再结合影像学^[15]等方法,术前就准确判断出是否有气道播散存在,这将对术前手术方式的选择及术后患者预后水平的改善起至关重要的作用。另一有趣的发现是,与未复发/转移组相比,血浆外

泌体 miR-1260b 在复发/转移组中高表达,表明血浆外泌体 miR-1260b 与肺腺癌患者复发/转移相关。外科手术一定程度上是宏观、机械性地切除病变组织^[16],而在患者术前,甚至是术中存在于血液中的某些致癌因子如外泌体等可能已随体液如血液、淋巴液播散至肺的其他部位甚至远处器官,这或许是导致肺腺癌复发/转移的因素之一。因此,今后针对肺腺癌患者的诊治过程,从宏观和微观的角度共同诊治就显得十分必要。

本研究仍有一些不足之处:①样本量不足;②本研究未涉及血浆外泌体 miR-1260b 与肺腺癌患者预后水平的评估,这一数据仍在随访和统计中。因

此, 还需要大样本的综合论证血浆外泌体 miR-1260b 与肺腺癌患者临床特征的关系, 并深入研究外泌体 miR-1260b 参与肺腺癌进展, 特别是气道播散、复发/转移具体的分子机制。

总之, 本研究初步表明, 血浆外泌体 miR-1260b 在肺腺癌中高表达, 且与肿瘤大小、气道播散、复发/转移相关。将来, 更深入全面地鉴定受 miR-1260b 调控的其他靶基因将有助于突出 miR-1260b 在致癌和转移过程中的功能。靶向外泌体 miR-1260b 可能为肺腺癌的诊治提供新的视野。

[参考文献]

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2019[J]. *CA Cancer J Clin*, 2019, 69(1): 7-34
- [2] YUAN Y, LIAO H, PU Q, et al. miR-410 induces both epithelial - mesenchymal transition and radioresistance through activation of the PI3K/mTOR pathway in non-small cell lung cancer[J]. *Signal Transduct Tar*, 2020, 5(1): 85
- [3] LI X, ZHONG M, WANG J, et al. miR-301a promotes lung tumorigenesis by suppressing Runx3 [J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 99
- [4] FAN J, XU G, CHANG Z, et al. miR-210 transferred by lung cancer cell-derived exosomes may act as proangiogenic factor in cancer-associated fibroblasts by modulating JAK2/STAT3 pathway[J]. *Clin Sci(Lond)*, 2020, 134(7): 807-825
- [5] HUANG W, YAN Y, LIU Y, et al. Exosomes with low miR-34c-3p expression promote invasion and migration of non-small cell lung cancer by upregulating integrin alpha2beta1[J]. *Signal Transduct Tar*, 2020, 5(1): 39
- [6] XIA Y, WEI K, YANG F M, et al. miR-1260b, mediated by YY1, activates KIT signaling by targeting SOCS6 to regulate cell proliferation and apoptosis in NSCLC [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(2): 112
- [7] XIA Y, WEI K, HU L Q, et al. Exosome-mediated transfer of miR-1260b promotes cell invasion through Wnt/beta-catenin signaling pathway in lung adenocarcinoma [J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(10): 6843-6853
- [8] WU Y, WEI J, ZHANG W, et al. Serum exosomal miR-1290 is a potential biomarker for lung adenocarcinoma [J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13: 7809-7818
- [9] XU L, XU X, HUANG H, et al. MiR-1260b promotes the migration and invasion in non-small cell lung cancer via targeting PTPRK [J]. *Pathol Res Pract*, 2018, 214(5): 776-783
- [10] TRAVIS W D, BRAMBILLA E, NICHOLSON A G, et al. The 2015 World Health Organization Classification of lung tumors: impact of genetic, clinical and radiologic advances since the 2004 classification [J]. *J Thorac Oncol*, 2015, 10(9): 1243-1260
- [11] MORALES-OYARVIDE V, MINO-KENUDSON M. Taking the measure of lung adenocarcinoma: towards a quantitative approach to tumor spread through air spaces (STAS) [J]. *J Thorac Dis*, 2017, 9(9): 2756-2761
- [12] MA K, ZHAN C, WANG S, et al. Spread through air spaces (STAS): a new pathologic morphology in lung cancer [J]. *Clin Lung Cancer*, 2019, 20(2): e158-e162
- [13] LIU Y, CHEN D, QIU X, et al. Relationship between MTA1 and spread through air space and their joint influence on prognosis of patients with stage I - III lung adenocarcinoma [J]. *Lung Cancer*, 2018, 124: 211-218
- [14] 孔君, 杨雪, 孔辉, 等. 2394例肺腺癌患者 EGFR 及 ALK 驱动基因分析 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2020, 40(5): 675-680
- [15] 虞梁, 王俊, 李洪, 等. 肺磨玻璃结节 CT 影像征象鉴别诊断肺浸润性腺癌与微浸润腺癌 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2020, 40(2): 248-251
- [16] 朱焱宁, 李志华, 何志成, 等. 胸腔镜下肺亚段切除术的临床对比研究 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2020, 40(6): 870-874

[收稿日期] 2020-07-19