

· 论 著 ·

脑脊液外泌体 miR-146a 与人脑胶质瘤术后复发的相关性

田 艳 魏可欣 张向宁

【摘要】目的 探讨脑脊液外泌体 miR-146a 与人脑胶质瘤术后复发的相关性。**方法** 收集 2016 年 5 月~2017 年 5 月经术后病理证实的 70 例脑胶质瘤(低级别胶质瘤 31 例,高级别胶质瘤 39 例)和 25 例颅脑损伤(对照组)的脑脊液,采用 PCR 检测脑脊液外泌体 miR-146a 表达水平。胶质瘤病人术后随访 1~36 个月,记录术后复发情况。**结果** 与对照组(1.00 ± 0.14)相比,脑胶质瘤组脑脊液外泌体 miR-146a 相对表达量(0.71 ± 0.26)明显降低($P<0.001$);高级别胶质瘤脑脊液外泌体 miR-146a 相对表达量(0.64 ± 0.27)明显低于低级别胶质瘤(0.77 ± 0.24 ; $P<0.05$)。随访期间,19 例(27.14%)术后复发。多因素 logistic 回归分析显示,脑脊液外泌体 miR-146a 表达量低是脑胶质瘤术后复发的独立危险因素($P<0.05$)。ROC 曲线分析显示,脑脊液外泌体 miR-146a 表达水平预测脑胶质瘤术后复发的曲线下面积为 0.853 (95% 置信区间 0.762~0.944),最佳截断值为 0.445,特异度和灵敏度分别为 90.2% 和 63.2%,约登指数为 0.534。**结论** 脑胶质瘤病人脑脊液外泌体 miR-146a 表达普遍降低,而且胶质瘤病理级别越高,降低越明显;脑脊液外泌体 miR-146a 表达水平对预测术后复发具有一定的参考价值。

【关键词】 脑胶质瘤;脑脊液;外泌体;miR-146a;术后复发

【文章编号】 1009-153X(2021)04-0250-04 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 739.41; Q 786

Correlation between cerebrospinal fluid level of exosomal miR-146a and postoperative recurrence of glioma

TIAN Yan¹, WEI Ke-xin², ZHANG Xiang-ning¹. 1. Department of Neurosurgery, The 82nd Group Military Hospital, PLA, Baoding 071000, China; 2. Department of Neurosurgery, Baoding No.1 Hospital, Baoding 071000, China

【Abstract】 Objective To explore the correlation between the cerebrospinal fluid (CSF) level of exosomal miR-146a and the postoperative recurrence of glioma. **Methods** The levels of exosomal miR-146a were detected in the CSF obtained from 70 glioma patients (31 low-grade and 39 high-grade gliomas) who underwent surgery from May 2016 to May 2017 and from 25 patients with traumatic brain injury (control group) using the PCR. All the glioma patients were followed up from 1 to 36 months. **Results** The relative expression level of CSF exosomal miR-146a of glioma group was significantly lower than that of control group ($P<0.001$). The relative expression level of CSF exosomal miR-146a of high-grade gliomas was significantly lower than that of low-grade gliomas ($P<0.05$). During the follow-up, 19 patients (27.14%) had the postoperative recurrence of tumors. Multivariate logistic regression analysis showed down-expression of CSF exosomal miR-146a was an independent risk factor for the postoperative recurrence of glioma patients ($P<0.05$). ROC curve showed that: the area under curve of the expression level of CSF exosomal miR-146a to predict the postoperative recurrence of glioma patients was 0.853 (95% CI 0.762~0.944); the best cut-off value was 0.445, the specificity and sensitivity were 90.2% and 63.2%, respectively; the Youden index was 0.534. **Conclusions** The expression of CSF miR-146a of patients with glioma is generally down-regulated, and the higher the pathological grade of glioma, the more obvious the decrease of the level of CSF miR-146a. The expression level of CSF miR-146a has certain value for predicting the postoperative recurrence of glioma patients.

【Key words】 Glioma; Cerebrospinal fluid; Exosomes; miR-146a; Postoperative recurrence

脑胶质瘤是起源于神经胶质细胞的原发性恶性脑肿瘤,脑脊液被认为是诊断或判断脑肿瘤恶性进展理想的生物标志物来源,其中含有大量外泌体,包含并运输多种核苷酸和蛋白质,可用作健康细胞和

肿瘤细胞间通讯机制^[1]。低级别和高级别胶质瘤病人脑脊液外泌体存在差异性表达的基因或蛋白分子,可能是参与肿瘤进展的重要机制^[2]。miR-146a 调节 Notch1 通路,抑制神经胶质瘤干细胞的生长^[3]。本文通过检测胶质瘤病人脑脊液外泌体 miR-146a 表达水平,分析其与胶质瘤术后复发的相关性。

1 资料与方法

1.1 研究对象 纳入标准:①术后病理检查证实为脑胶质瘤;②术后完成 2~4 个疗程的辅助治疗(化疗、

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2021.04.009

作者单位:071000 河北保定,中国人民解放军陆军第八十二集团军医院神经外科(田 艳、张向宁);071000 河北,保定市第一医院神经外科(魏可欣)

通讯作者:魏可欣,E-mail:shengli1919@163.com

放疗或同步放化疗)。排除标准:伴有其他脑部疾病;合并严重心血管、肺部等严重疾病;有其他部位恶性肿瘤。

2016 年 5 月至 2017 年 5 月收治符合标准的脑胶质瘤 70 例,其中男 42 例,女 28 例;平均年龄(49.24 ± 12.39)岁;低级别胶质瘤 31 例,高级别胶质瘤 39 例。手术、化疗和/或放疗之前收集脑脊液,病人都签署知情同意书,本研究已经获得我院伦理委员会的批准。

另外选取 25 例颅脑损伤病人脑脊液为对照,其中男 18 例,女 7 例;年龄(52.24 ± 14.90)岁。

1.2 检测方法

1.2.1 样本获取 手术切除的肿瘤标本用于病理检查。另外,行腰椎穿刺术取脑脊液样本,立即离心($1\,350$ 转/min, 30 min)去除细胞和细胞碎片,收集上清液, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2.2 脑脊液外泌体提取及 miR-146a 的检测 取脑脊液样本,复溶后采用高速离心法和 miRCURY Exosome Isolation Kit(丹麦 Exiqon 公司)分离外泌体。 $4\,000$ 转/min 初步离心 30 min,去除细胞碎屑。加入沉淀缓冲液稀释, $1\,5000$ 转/min 再次离心 25 min; $20\,000$ 转/min 三次离心 90 min。用缓冲液重悬,贮存在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$,避免不必要的冻融循环,以免影响囊泡结构的稳定性。采用透射电镜和免疫印迹法对样品进行分析,以便进行质量控制。采用自旋柱色谱法(miRCURYRNA 提取试剂盒,美国 Applied Biosystems 公司)提取外泌体 RNA,加入 cel-miR-39-3p 作为内参。通过 MicroRNA 反转录试剂盒(美国 Applied Biosystems 公司)进行反转录成 cDNA,在 ABI 7900 系统上应用 TaqMan Fast PCR Master Mix 试剂盒(美国 Applied Biosystems 公司)进行实时定量逆转录聚合酶链反应。通过测定 CT 值以 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法对表达数据进行分析。miR-146a 引物序列:正向 5'-ACT-

GAATTCCATGGGTTGTGTC-3',反向 5'-TGACAGA-GATATCCCAGCTGAAG-3'。

1.3 随访及预后分析 术后随访 1~36 个月,主要终点为术后复发(术后复查 MRI 显示肿瘤生长范围较术前扩大或肿瘤出现在不同部位)。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 17.0 软件分析;计数资料采用 χ^2 检验;计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 t 检验;应用多因素 logistic 回归分析检验脑胶质瘤术后复发的危险因素;使用受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线评估脑脊液外泌体 miR-146a 预测术后复发的灵敏性和特异性; $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 脑脊液外泌体的提取和鉴定 透射电镜观察脑脊液外泌体形态学特征,发现外泌体呈类球形、双层膜结构,直径约 100 nm 。免疫印迹法检测显示外泌体特异性标志 CD63 呈阳性表达。高灵敏度生物分析仪检测显示,脑胶质瘤病人脑脊液外泌体总 RNA 丰度更高。见图 1。

2.2 胶质瘤病人脑脊液外泌体 miR-146a 表达量与对照组(1.00 ± 0.14)相比,脑胶质瘤组脑脊液外泌体 miR-146a 相对表达量(0.71 ± 0.26)明显降低($P<0.001$)。高级别胶质瘤脑脊液外泌体 miR-146a 相对表达量(0.64 ± 0.27)明显低于低级别胶质瘤(0.77 ± 0.24 ; $P<0.05$)。

2.3 脑胶质瘤术后复发的危险因素 随访期间,19 例(27.14%)术后复发。多因素 logistic 回归分析显示,病理分级高、肿瘤直径大、肿瘤未全切除、脑脊液外泌体 miR-146a 表达量低是脑胶质瘤术后复发的独立危险因素($P<0.05$,表 1)。

2.4 脑脊液外泌体 miR-146a 表达对脑胶质瘤术后复发的预测价值 ROC 曲线分析显示,脑脊液外泌体

表 1 70 例人脑胶质瘤术后复发危险因素的 logistic 回归分析

影响因素	单因素		多因素	
	比值比(95%置信区间)	P 值	比值比(95%置信区间)	P 值
年龄(<49 岁/ ≥ 49 岁)	1.011(0.969~1.056)	0.610		
性别(男/女)	1.127(0.387~3.287)	0.826		
WHO 病理分级(Ⅱ级/Ⅲ~Ⅳ级)	4.889(1.259~28.360)	0.025	3.992(1.437~17.986)	0.046
肿瘤直径($\leq 4.5\text{ cm}$ / $>4.5\text{ cm}$)	1.757(1.289~2.395)	<0.001	1.523(1.048~2.214)	0.027
肿瘤位置(额叶/其他)	0.491(0.169~1.428)	0.192		
IDH1(野生型/突变型)	1.395(0.483~4.033)	0.539		
肿瘤切除程度(全切除/未全切除)	3.972(1.290~12.235)	0.016	2.621(1.585~11.740)	0.028
脑脊液外泌体 miR146a 高表达	0.059(0.012~0.285)	<0.001	0.085(0.015~0.484)	0.005

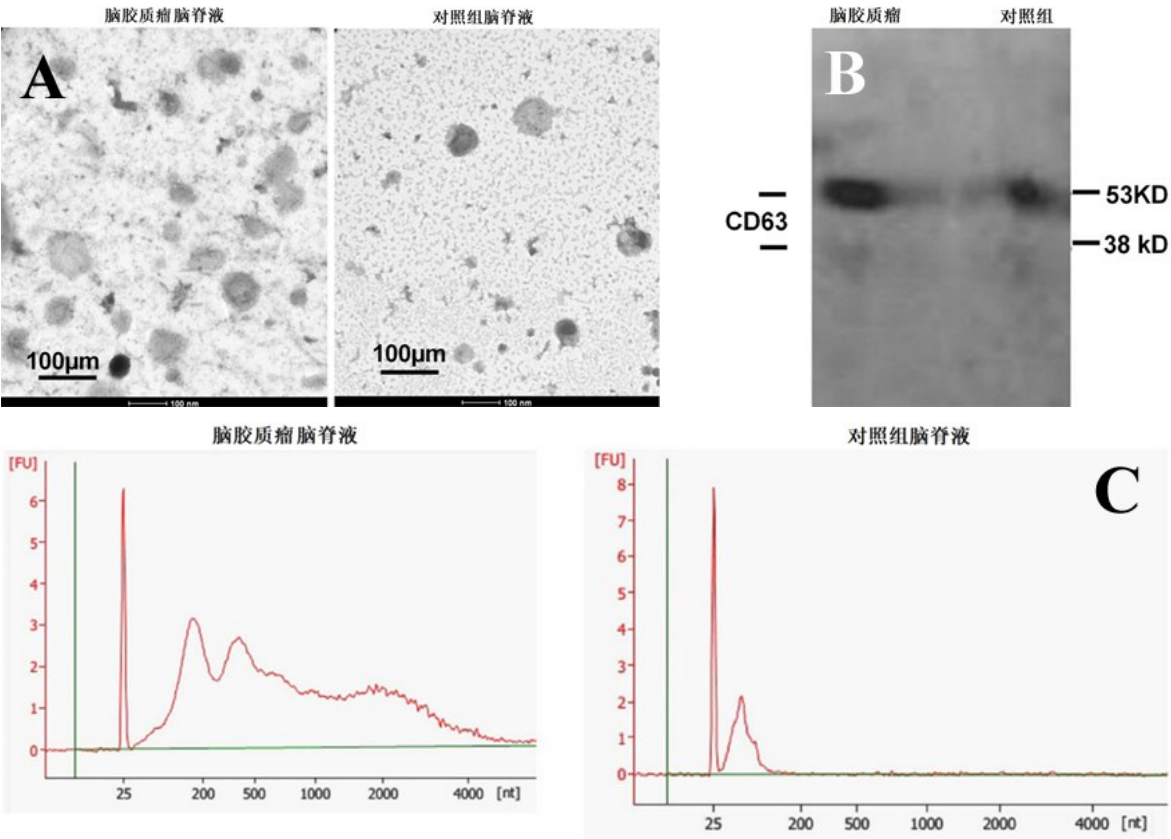


图1 人脑胶质瘤病人脑脊液外泌体的提取和鉴定

A. 透射电镜观察脑脊液外泌体形态学特征;B. 免疫印迹法检测CD63蛋白表达;C. 高灵敏度生物分析仪检测外泌体中核糖核酸含量

miR-146a 表达水平预测脑胶质瘤术后复发的曲线下面积为0.853(95%置信区间0.762~0.944),最佳截断值为0.445,在该阈值下,特异度和灵敏度分别为90.2%和63.2%,约登指数为0.534。见图2。

3 讨论

外泌体是一种细胞外膜泡,可由多种类型的细胞分泌,如T淋巴细胞、神经元和恶性脑肿瘤细胞等^[4-7]。外泌体普遍存在于各种体液(包括脑脊液)中,包含并运输多种核苷酸和蛋白质,可用作健康细胞和肿瘤细胞的细胞间通讯机制^[8]。miRNAs是一类非编码小分子RNA,通过调节基因转录和蛋白质翻译的过程,调控特定靶基因的表达。研究表明,miRNAs能够调节肿瘤发生/肿瘤抑制基因的细胞水平及其介导的信号转导通路^[9]。本文结果显示脑胶质瘤病人脑脊液外泌体 miR-146a 相对表达量普遍降低,而且与肿瘤病理分级和术后复发风险有关。

越来越多的研究证实体液外泌体 miRNAs 可预测脑胶质瘤病人的预后、复发或治疗反应。程玥和叶秀峰^[10]证实胶质瘤细胞在缺氧条件下分泌的外泌体部分通过提高JAK/STAT3信号通路的磷酸化水平促进胶质瘤干细胞的迁移。杨智等^[5]发现胶质瘤病人血清外泌体 miRNA-30a-5p 表达水平明显高于健康人群,检测血清外泌体 miRNA-30a-5p 表达水平对胶质瘤的诊断和预后评价均有一定的临床价值。说明外泌体含有相对丰富的与肿瘤有关的

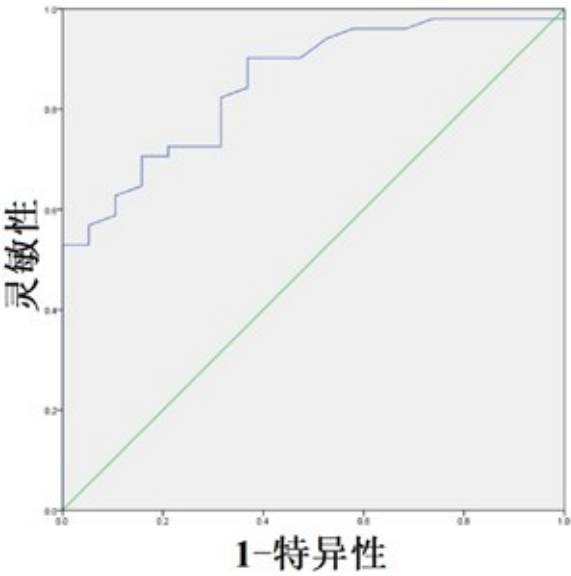


图2 ROC 曲线分析脑脊液 miR-146a 表达水平与脑胶质瘤术后复发的关系

miRNAs。Balachandran 等^[11]发现 miR-146a 表达下调与胶质母细胞瘤的发生、发展有关,包括对下游 Notch1、Notch2、JMJD6 等靶点的调控。有研究显示小胶质细胞是 miR-146a 的主要细胞来源,而小胶质细胞为大脑的常驻免疫细胞,可支持肿瘤的进展,是肿瘤中形成浸润免疫细胞群的重要组成部分,然而 miR-146a 的缺失会差异性地影响小胶质细胞的功能和蛋白质组成^[12]。Qiu 等^[13]预测 SMAD4 是 miR-146a 的重要靶基因之一,miR-146a 可能通过转化生长因子-β/SMADs 信号通路影响细胞的增殖和侵袭活性。Hu 等^[14]发现 miR-146a 基因包含 Notch1 mRNA 的 3'-UTR 序列,而且脑胶质瘤组织 miR-146a 表达与 Notch1 蛋白表达呈负相关。而 Notch 信号通路的激活是脑胶质瘤细胞增殖、侵袭、分化的重要机制。这提示 miR-146a 表达失调可能与脑胶质瘤的发生、发展有关。

综上所述,miR-146a 与脑胶质瘤病理分级和术后复发风险有关;检测脑脊液外泌体 miR-146a 表达对于预测胶质瘤病人术后复发风险具有一定的参考价值。

【参考文献】

[1] Zhou Q, Liu J, Quan J, *et al.* MicroRNAs as potential biomarkers for the diagnosis of glioma: A systematic review and meta-analysis [J]. *Cancer Sci*, 2018, 109(9): 2651-2659.

[2] Wang L, Wu L, Wu J. Downregulation of miR-154 in human glioma and its clinicopathological and prognostic significance [J]. *J Int Med Res*, 2016, 44(5): 994-1001.

[3] Hu HQ, Sun LG, Guo WJ. Decreased miRNA-146a in glioblastoma multiforme and regulation of cell proliferation and apoptosis by target Notch1 [J]. *Int J Biol Markers*, 2016, 31(3): e270-e275.

[4] 任光辉,李武雄,齐利豪. 胶质瘤干细胞外泌体通过 PI3K/

Akt 信号通路促进胶质瘤 U87 细胞侵袭、迁移[J]. *中国临床神经外科杂志*, 2021, 26(3): 176-179.

[5] 杨 智,唐 栋,曹 磊,等. 血清外泌体 miRNA-30a-5p 在人脑胶质瘤诊断及预后评价中的作用[J]. *中国临床神经外科杂志*, 2020, 25(5): 296-298.

[6] 董林正,王 诚,李炜昕. 外泌体在脑胶质瘤诊治中的研究进展[J]. *中国临床神经外科杂志*, 2020, 25(2): 121-123

[7] 田 其,李明昌. 外泌体微小 RNA 在中枢神经系统疾病诊断中作用的研究进展[J]. *中国临床神经外科杂志*, 2019, 24(9): 570-572.

[8] 张 敏,张晨光,丁 卫,等. 外泌体及其在肿瘤诊疗中的意义[J]. *生理科学进展*, 2014, 45(5): 372-378.

[9] Yang RS, Wang YH, Ding C, *et al.* MiR-146 regulates the repair and regeneration of intervertebral nucleus pulposus cells via Notch1 pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(11): 4591-4598.

[10] 程 玥,叶秀峰. 缺氧条件下胶质瘤分泌的外泌体通过 JAK/STAT3 信号通路促进胶质瘤干细胞迁移[J]. *第三军医大学学报*, 2020, 42(4): 392-400.

[11] Balachandran AA, Larcher LM, Chen S, *et al.* Therapeutically significant MicroRNAs in primary and metastatic brain malignancies [J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12(9): 2534.

[12] Martin NA, Hyrlov KH, Elkjaer ML, *et al.* Absence of miRNA-146a differentially alters microglia function and proteome [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1110.

[13] Qiu M, Li T, Wang B, *et al.* miR-146a-5p regulated cell proliferation and apoptosis by targeting SMAD3 and SMAD4 [J]. *Protein Pept Lett*, 2020, 27(5): 411-418.

[14] Hu HQ, Sun LG, Guo WJ. Decreased miRNA-146a in glioblastoma multiforme and regulation of cell proliferation and apoptosis by target Notch1 [J]. *Int J Biol Markers*, 2016, 31(3): e270-e275.

(2021-01-11 收稿, 2021-03-02 修回)