

· 论 著 ·

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

杨 智 唐 栋 曹 磊 杨光诚

【摘要】目的 探讨胶质瘤病人血清外泌体 miRNA-30a-5p 的表达水平,及其在胶质瘤诊断及预后评估中的价值。**方法** 选取 2014 年 1 月至 2015 年 12 月收治的胶质瘤 60 例为研究对象,另选取健康体检者 40 例为对照。RT-PCR 检测血清外泌体 miRNA-30a-5p 表达水平。用受试者工作特性(ROC)曲线分析 miRNA-30a-5p 诊断胶质瘤的价值。用 Kaplan-Meier 法绘制生存曲线,采用 log-rank 检验;多因素 Cox 比例风险回归模型分析预后危险因素。**结果** 胶质瘤病人血清外泌体 miRNA-30a-5p 表达水平明显高于健康人($P<0.001$)。ROC 曲线分析显示,血清外泌体 miRNA-30a-5p 诊断胶质瘤的曲线下面积为 0.901(95% CI 0.812~0.986),最佳截断值为 0.601,此时 miRNA-30a-5p 诊断胶质瘤的灵敏度和特异度分别为 78.05%和 93.55%。术后 60 例均得到有效随访,随访时间平均(28.39±3.25)个月。Kaplan-Meier 分析结果显示,血清外泌体 miRNA-30a-5p 低表达病人总体生存时间高于高表达病人($P<0.001$)。多因素 Cox 比例风险回归模型分析结果显示血清外泌体 miRNA-30a-5p 高表达是胶质瘤病人不良预后的独立影响因素($P<0.05$)。**结论** 血清外泌体 miRNA-30a-5p 对胶质瘤的诊断和预后评价均有一定价值。

【关键词】 胶质瘤;血清;外泌体;miRNA-30a-5p;诊断;预后

【文章编号】 1009-153X(2020)05-0296-03 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 739.41; Q 786

Value of serum exosome miRNA-30a-5p to diagnosis and prognosis evaluation of human glioma

YANG Zhi, TANG Dong, CAO Lei, YANG Guang-cheng. Department of Neurosurgery, The Fifth People's Hospital of Ji'nan City, Ji'nan 250022, China

【Abstract】 Objective To investigate the expression level of serum exosome miRNA-30a-5p in glioma patients and its value to the diagnosis and prognostic evaluation of glioma. **Methods** The expression of miRNA-30a-5p in exosomes was detected by RT-PCR in 60 glioma patients and 40 healthy people. Receiver operating characteristic (ROC) curve was used to analyze the value of miRNA-30a-5p to the diagnosis of gliomas. Kaplan-Meier method and log-rank test was used to analyze the overall survival time of the patients with glioma. Cox proportional risk model was used to analyze the prognostic factors of the patients with glioma. **Results** The expression level of serum exosome miRNA-30a-5p in glioma patients was significantly higher than that in healthy people ($P<0.001$). ROC curve analysis showed that the area under curve was 0.901 (95% CI 0.812~0.986), and the best cut-off value was 0.601. The sensitivity and specificity of serum exosome miRNA-30a-5p to the diagnosis of glioma was 78.05% and 93.55%, respectively. All these 60 glioma patients were followed up effectively after the operation, with an average follow-up time of (28.39±3.25) months. Kaplan-Meier analysis showed that the overall survival time of patients with low expression of serum exosome miRNA-30a-5p was significantly higher than that of patients with high expression of serum exosome miRNA-30a-5p ($P<0.001$). The results of multivariate Cox proportional regression risk model analysis showed that the high expression of serum exosome miRNA-30a-5p was an independent risk factor for the poor prognosis of glioma patients ($P<0.05$). **Conclusion** Serum exosome miRNA-30a-5p has certain value to the diagnosis and prognosis evaluation of human glioma.

【Key words】 Human glioma; Serum; Exosomes; miRNA-30a-5p; Diagnosis; Prognosis

胶质瘤是最常见的原发性脑肿瘤,占原发性脑肿瘤的 70%以上。尽管过去几十年里,胶质瘤的治疗取得了长足进步,但是总体生存率未见明显提高^[1]。微小 RNA(microRNA, miRNA)在肿瘤的发生和发展中起着重要作用,对肿瘤的早期诊断也有重要

意义^[2]。既往研究证实,外泌体 miRNA 非常稳定,因此适合作为潜在的生物学标志物^[3]。外泌体 miRNA 可作为肿瘤早期诊断、治疗及预后的生物学标志物。本文探讨胶质瘤病人血清外泌体 miRNA-30a-5p 的表达水平,及其在诊断及预后评估中的价值。

1 资料与方法

1.1 研究对象 选取 2014 年 1 月至 2015 年 12 月收治的胶质瘤 60 例为研究对象,其中男 32 例,女 28 例;

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2020.05.013

作者单位:250022,济南市第五人民医院神经外科(杨 智、唐 栋、曹 磊、杨光诚)

年龄10~78岁,平均(47.36±8.01)岁。纳入标准:术前未接受手术或放化疗;术后病理组织学检查证实为胶质瘤;病例资料完整。排除标准:合并其他类型肿瘤;复发性胶质瘤;合并急慢性感染性疾病。另选取健康体检者40例为对照,其中男22例,女18例;年龄18~56岁,平均(44.39±11.11)岁。本研究已经过本院伦理委员会批准,所有受试者均签署知情同意书。

1.2 外泌体的分离 胶质瘤病人术前抽取空腹肘静脉血5 ml,取血清800 μ l,4 $^{\circ}$ C条件下2 000转/min离心20 min,取上清液。加入1/3体积的外泌体分离试剂(北京天恩泽基因科技有限公司),混匀。4 $^{\circ}$ C下静置20 min,15 000转/min离心2 min。弃去上清液,以50 μ l的PBS重悬沉淀,分装后在-70 $^{\circ}$ C冰箱中保存备用。

1.3 外泌体电镜观察 将冻存的外泌体重悬液于室温下放置10~15 min使其溶解。取10 μ l外泌体滴加于铜网上沉淀60 s,用滤纸吸取悬液。取醋酸双氧铀(北京中镜科仪技术有限公司)10 μ l滴加于铜网上沉淀60 s,吸干液体。在常温下干燥10 min,用Tecnai Spirit G2透射电子显微镜观察外泌体形态。

1.4 免疫印迹法检测外泌体标志物CD63的表达 将冻存的外泌体重悬液室温下放置10~15 min使其溶解。用Nanosight系统(英国Malvern公司)检测外泌体的浓度。检测浓度为1.0 μ g/ μ l和0.5 μ g/ μ l时外泌体CD63的表达情况。取100 μ l,向其中加入RIPA细胞裂解液(北京索莱宝科技有限公司),提取蛋白。用BCA试剂盒(美国Sigma公司)进行蛋白定量检测,随后进行SDS-PAGE凝胶电泳,将分离的蛋白电转至PVDF膜上。用5%脱脂牛奶封闭,加入兔抗人CD63单克隆抗体(1:1000,美国Sigma公司),4 $^{\circ}$ C孵育过夜。TBST洗涤3次后加入羊抗兔二抗(1:5 000,美国Sigma公司),温室下作用1 h,再用TBST洗涤3次。最后用ECL显影。内参为GAPDH。

1.5 RT-PCR检测外泌体miRNA-30a-5p表达水平 将冻存的外泌体重悬液室温下放置10~15 min使其溶解。取100 μ l,用miRNAOUT试剂盒(上海雅吉生物科技有限公司)提取样本miRNA,随后进行miRNA逆转录。miRNA-30a-5p引物由苏州泓迅生物科技股份有限公司设计并提供,上游引物5'-GCCG-GCGCCCAGCTCTGGCTC-3',下游引物5'-TGTA-AACATCCTCGACTGGAAG-3'。用RT-PCR试剂盒(美国Sima公司)检测miRNA相对表达量。以U6作为内参(上游引物5'-GTGCTCGCTTCGGCAGCA-

CAT-3',下游引物5'-TACCTTGCGAAGTGCTTA-AAC-3')。用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算miRNA-30a-5p的表达量。

1.6 随访 采用门诊及电话方式进行随访。术后半年内,每3个月随访1次;此后,每半年随访1次。总生存期(overall survival, OS)定义为术后第一天至死亡或最后一次随访。

1.7 统计学方法 采用SPSS 20.0进行分析;正态分布计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,用 t 检验;计数资料采用 χ^2 检验;等级资料用秩和检验;受试者工作特性(receiver operating characteristic, ROC)曲线分析诊断价值,计算曲线下面积(area under curve, AUC)、灵敏度和特异度;用Kaplan-Meier法绘制生存曲线,采用log-rank检验;多因素Cox比例回归风险模型分析危险因素; $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 外泌体标志物CD63的表达情况 电镜下外泌体呈圆形囊泡状,单个分布或聚集分布,囊泡外周可见膜性结构,直径在60~150 nm(图1)。1.0 μ g/ μ l外泌体的CD63相对表达量明显高于0.5 μ g/ μ l外泌体(图2)。

2.2 胶质瘤血清外泌体miRNA-30a-5p的表达水平 胶质瘤病人血清外泌体miRNA-30a-5p相对表达量明显高于正常人($P<0.001$,图3)。

2.3 血清外泌体miRNA-30a-5p诊断胶质瘤的价值 ROC曲线分析显示,血清外泌体miRNA-30a-5p诊断胶质瘤的AUC为0.901(95%置信区间0.812~

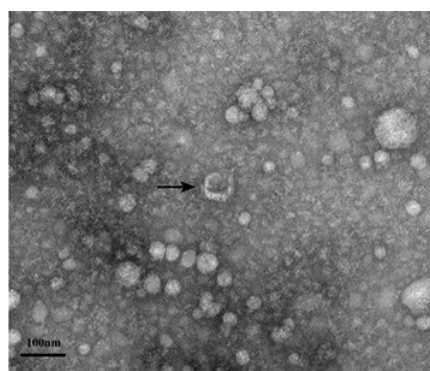


图1 胶质瘤病人血清外泌体电镜下观察

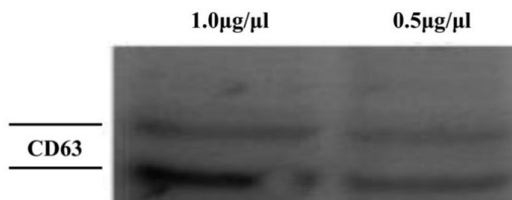


图2 胶质瘤病人血清外泌体标志物CD63表达电泳图

表 1 胶质瘤病人预后影响因素的 Cox 比例回归风险模型分析结果

| 影响因素 | 单因素 | | | 多因素 | | |
|-----------------------|-------|--------------|--------|-------|--------------|--------|
| | 风险比 | 95%置信区间 | P 值 | 风险比 | 95%置信区间 | P 值 |
| 年龄(≥60/<60) | 3.568 | 1.135~7.236 | 0.564 | | | |
| 性别(男/女) | 1.657 | 0.932~5.520 | 0.721 | | | |
| WHO 分级(I~II/III~IV) | 7.368 | 4.236~17.335 | <0.001 | 5.320 | 3.624~13.624 | <0.001 |
| KPS 评分(≥80/<80) | 6.538 | 2.340~14.396 | <0.001 | 4.687 | 3.241~12.001 | <0.001 |
| miRNA-30a-5p(高表达/低表达) | 5.236 | 2.240~12.368 | <0.001 | 4.523 | 3.264~10.248 | <0.001 |

0.986),最佳截断值为 0.601。miRNA-30a-5p 表达量为 0.601 时,诊断胶质瘤的灵敏度和特异度分别为 78.05%和 93.55%(图 4)。

2.4 血清外泌体 miRNA-30a-5p 与胶质瘤病人预后的关系 术后 60 例均得到有效随访,随访时间平均(28.39±3.25)个月。Kaplan-Meier 分析结果显示,血清外泌体 miRNA-30a-5p 低表达病人总体生存时间

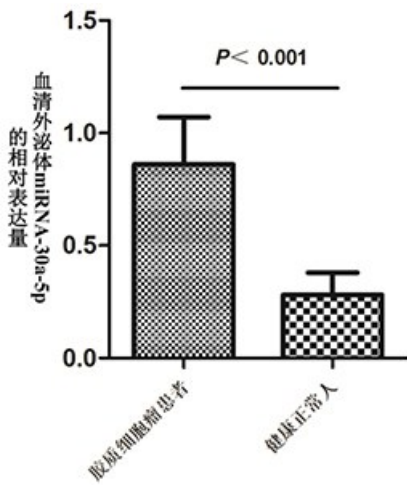


图 3 胶质瘤病人血清外泌体 miRNA-30a-5p 表达水平变化

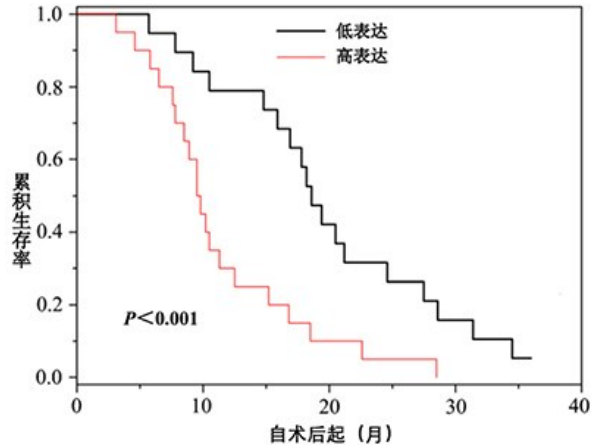


图 5 胶质瘤病人血清外泌体 miRNA-30a-5p 水平与病人预后的关系

高于高表达病人($P < 0.001$,图 5)。多因素 Cox 比例回归风险模型分析结果显示,WHO 分级高、KPS 评分低、miRNA-30a-5p 高表达是胶质瘤病人不良预后的独立影响因素($P < 0.05$,表 1)。

3 讨论

外泌体 miRNA 是近年来研究的热点。外泌体 miRNA 具有肿瘤特异性,在不同贮存条件下都较为稳定^[3]。miRNA 在胶质瘤的筛查、诊断及预后评估中具有重要作用^[5]。本文结果发现,胶质瘤病人血清外泌体 miRNA-30a-5p 表达水平明显升高,可作为胶质瘤早期诊断及判断预后的指标。

miRNA-30a-5p 在胶质瘤中的作用机制尚不明确。Wang 等^[6]发现,miRNA-30a-5p 可以靶向调控神经细胞粘附分子通过 Wnt/ β -catenin 通路促进胶质瘤细胞增殖和侵袭。本文胶质瘤病人血清外泌体 miRNA-30a-5p 相对表达量为明显高于正常人。血清外泌体 miRNA 对胶质细胞瘤的早期诊断有重要价值^[7]。有学者发现,血清外泌体 miRNA-310a 有助于早期诊断胶质瘤,灵敏度和特异度分别为 82.6%和 93.2%。

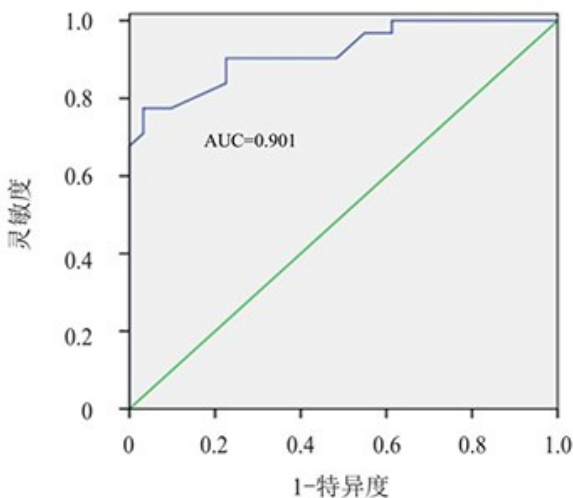


图 4 血清外泌体 miRNA-30a-5p 诊断胶质瘤的 ROC 曲线

(下转第 302 页)