

• 短篇论著 •

腹腔灌洗液外泌体中 miR-21、miR-320c、miR-1225-5p 检测对胃癌腹膜转移的诊断价值

张建新¹, 田 珍²

1. 荆门市第二人民医院消化内一科, 湖北荆门 448000; 2. 荆门市第一人民医院消化内科, 湖北荆门 448000

摘 要:目的 探讨腹腔灌洗液外泌体中 miR-21、miR-320c、miR-1225-5p 检测对胃癌腹膜转移的诊断价值。方法 纳入 2017 年 5 月至 2020 年 6 月荆门市第二人民医院收治的胃癌患者 298 例, 其中胃癌腹膜转移患者 87 例作为转移组, 胃癌无腹膜转移患者 132 例作为无转移组, 胃癌预后良好患者 79 例作为对照组。通过实时荧光定量 PCR 检测受试患者腹腔灌洗液外泌体中 miR-21、miR-320c、miR-1225-5p 的表达水平。用受试者工作特征曲线(ROC)的曲线下面积(AUC)分析腹腔灌洗液外泌体中 miR-21、miR-320c、miR-1225-5p 检测对胃癌腹膜转移的诊断价值。结果 转移组腹腔灌洗液外泌体中 miR-21、miR-320c、miR-1225-5p 的相对表达水平均高于无转移组和对照组($P < 0.05$), 无转移组与对照组腹腔灌洗液外泌体中 miR-21、miR-320c、miR-1225-5p 的相对表达水平比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。腹腔灌洗液外泌体中 miR-21、miR-320c、miR-1225-5p 检测用于鉴别胃癌腹膜转移患者与胃癌无腹膜转移患者的灵敏度分别为 93%、91%、92%, 特异度分别为 93%、92%、91%。腹腔灌洗液外泌体中 miR-21、miR-320c、miR-1225-5p 联合检测对胃癌腹膜转移诊断的灵敏度为 94.25%, 特异度为 90.99%, 准确度为 91.95%。结论 腹腔灌洗液外泌体中 miR-21、miR-320c、miR-1225-5p 的表达水平可作为诊断胃癌腹膜转移的潜在标志物。

关键词:腹腔灌洗液; 外泌体; miR-21; miR-320c; miR-1225-5p; 胃癌; 腹膜转移; 诊断

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2021.17.023

中图法分类号:R446.19

文章编号:1673-4130(2021)17-2151-03

文献标志码:A

胃癌是全世界与癌症相关的死亡的第二大最常见原因^[1]。腹膜是胃癌转移和复发的最常见部位, 由腹膜癌细胞扩散引起的恶性腹水与不良预后有关^[2]。目前, 尚无可靠的预测因素可预测胃癌患者发生腹膜恶性腹水。微小 RNA(miRNA)是长度为 19~23 个核苷酸的非编码 RNA, 可作为基因表达的转录后调节子, 并在许多生物学过程的控制中发挥重要作用, 包括细胞分化、增殖和凋亡^[3]。外泌体是小膜状囊泡, 与细胞免疫反应有关, 包含大量的 RNA, 并且可能参与免疫非依赖性调节机制^[4]。含有 miRNA 的外泌体代表了一种新的细胞间信号传导机制, 对其进行研究有助于更加深入地了解癌细胞转移至腹膜的机制^[5]。TOKUHISA 等^[6]发现, 胃癌腹膜转移患者腹腔灌洗液外泌体中 miR-21、miR-320c、miR-1225-5p 的相对表达水平异常。然而, 对腹腔灌洗液外泌体中 miR-21、miR-320c、miR-1225-5p 的诊断价值仍然所知甚少。基于此, 本研究旨在探讨腹腔灌洗液外泌体中 miR-21、miR-320c、miR-1225-5p 检测对胃癌腹膜转移的诊断价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 将 2017 年 5 月至 2020 年 6 月荆门市第二人民医院收治的胃癌患者 298 例纳入研究。其中胃癌腹膜转移患者 87 例作为转移组, 男 57 例、

女 30 例, 平均年龄(57.32 ± 21.45)岁; 胃癌非腹膜转移患者 132 例作为无转移组, 男 94 例、女 38 例, 平均年龄(58.43 ± 19.60)岁, 淋巴结转移 71 例、血行转移 61 例。胃癌预后良好患者 79 例作为对照组, 男 59 例、女 20 例, 平均年龄(57.04 ± 20.85)岁。所有纳入研究的患者均已通过对从原发灶获取的组织活检样品的病理学检查诊断为胃癌。排除标准: (1)有严重心、肝、肾功能损害者; (2)服用过内分泌药物者; (3)患有其他肿瘤者; (4)患有精神疾病者。各组一般资料比较, 差异均无统计学意义($P > 0.05$), 具有可比性。本研究经医院伦理委员会审批, 受试者均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 腹膜灌洗液外泌体的获取 患者行开腹手术后, 将 100 mL 生理盐水倒入道格拉斯气袋中, 并在手术切除肿瘤之前收集腹膜灌洗水。为了去除大的细胞颗粒和细胞碎片, 将腹膜灌洗液在 4℃ 下以 $2\,000 \times g$ 离心 15 min, 然后通过 0.22 μm 直径的过滤器(Millipore)过滤。为了沉淀外泌体, 将样品在 4℃ 条件下, 以 $110\,000 \times g$ 离心 70 min。将外泌体沉淀物用 11 mL 磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤, 然后再次离心, 弃上清后获得腹膜灌洗液外泌体。

1.3 RNA 抽取与实时荧光定量 PCR 根据制造商

的说明,使用 miRNeasy mini 试剂盒(Qiagen)从外泌体中提取总 RNA,然后将其储存在-80℃直至需要进一步分析。使用 Agilent Bioanalyzer 2100(安捷伦科技公司)评估总外泌体 RNA 的质量、浓度和大小。在分析之前,使用 RNA 6000 Pico 试剂盒(安捷伦科技公司)提取总 RNA。使用 TaqMan miRNA RT 试剂盒进行 cDNA 第一链的合成。使用 TaqMan microRNA 试剂盒和 ABI 7500 仪器定量分析(Life 科技公司)miR-21、miR-320c、miR-1225-5p、miR-16。所有反应均重复 3 次。将目标 miRNA 的表达水平用于 miR-16 的表达水平进行标准化处理,将 miR-16 用作稳定表达的对照。

1.4 统计学处理 使用 SPSS21.0 软件进行统计分析。呈正态分布的计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析,进一步两两比较采用 SNK-*q* 检验;计数资料以频数表示,组间比较采用 Fisher 精确检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 3 组患者腹腔灌洗液外泌体中 miR-21、miR-320c、miR-1225-5p 的相对表达水平 转移组腹腔灌洗液外泌体中 miR-21、miR-320c、miR-1225-5p 的相

对表达水平均高于无转移组 and 对照组($P < 0.05$),无转移组与对照组腹腔灌洗液外泌体中 miR-21、miR-320c、miR-1225-5p 的相对表达水平比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。

表 1 3 组患者腹腔灌洗液外泌体中 miR-21、miR-320c、miR-1225-5p 的相对水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	miR-21	miR-320c	miR-1225-5p
转移组	87	2.34±0.43	1.54±0.29	1.85±0.44
无转移组	132	0.26±0.08*	0.13±0.03*	0.23±0.09*
对照组	79	0.28±0.05*	0.11±0.02*	0.24±0.07*

注:与转移组比较,* $P < 0.05$ 。

2.2 患者腹腔灌洗液外泌体中 miR-21、miR-320c、miR-1225-5p 检测的诊断价值 为了评估腹腔灌洗液外泌体中 miR-21、miR-320c、miR-1225-5p 检测用于胃癌腹膜转移与未转移的鉴别诊断价值,绘制受试者工作特征(ROC)曲线。当 miR-21 的 cut-off 值为 1.116 时诊断的灵敏度为 93%,特异度为 93%;miR-320c 的 cut-off 值为 0.690 时诊断灵敏度为 91%,特异度 92%;miR-1225-5p 的 cut-off 值为 0.854 时的诊断灵敏度为 92%,特异度为 91%。见表 2。

表 2 胃癌腹膜转移患者与无转移患者腹腔灌洗液外泌体中 miR-21、miR-320c、miR-1225-5p 检测的诊断价值

检测指标	cut-off 值	灵敏度(%)	特异度(%)	约登指数	AUC	95%CI	<i>P</i>
miR-21	1.116	93	93	0.86	0.94	0.909~0.972	<0.001
miR-320c	0.690	91	92	0.84	0.91	0.873~0.953	<0.001
miR-1225-5p	0.854	92	91	0.84	0.93	0.894~0.963	<0.001

注:AUC 为曲线下面积。

2.3 腹腔灌洗液外泌体中 miR-21、miR-320c、miR-1225-5p 对胃癌腹膜转移的联合诊断 确诊为胃癌腹膜转移的患者为真阳性,未患有胃癌腹膜转移的为真阴性。以 miR-21 的阳性临界值为 1.116、miR-320c 的阳性临界值为 0.690、miR-1225-5p 的阳性临界值为 0.854 为诊断标准进行联合诊断,三者满足其一者为联合诊断阳性,反之则为联合诊断阴性。腹腔灌洗液外泌体中 miR-21、miR-320c、miR-1225-5p 联合对胃癌腹膜转移的诊断的灵敏度为 94.25%(82/87),特异度为 90.99%(192/211),准确性为 91.95%(274/298),见表 3。

表 3 腹腔灌洗液外泌体中 miR-21、miR-320c、miR-1225-5p 对胃癌腹膜转移的联合诊断(*n*)

联合诊断	病理结果		合计
	阳性	阴性	
阳性	82	19	101
阴性	5	192	197
合计	87	211	298

3 讨 论

即使有 R0 切除,伴有浆膜浸润的胃癌的预后仍然很差,原因在于其复发率很高,尤其是腹膜转移^[7]。胃癌并发腹膜转移是最复杂的胃癌复发类型,因为它既难以预测也难以诊断。尽管腹水是最常见的胃癌并发腹膜转移症状,但许多患有腹膜转移的胃癌患者并未出现腹水^[8]。在基于影像的诊断方法中,高速螺旋 CT 被广泛用于评估胃癌的术前分期和治疗后的随访^[9]。然而,在腹膜转移的情况下,其诊断准确性不足,主要是因为灵敏度低^[10]。使用 PET-CT 在胃癌中进行腹膜转移诊断也存在争议,因为据报道 FDG-PET 对胃癌中腹膜转移的检测灵敏度较差^[11-12]。腹腔灌洗液已成为诊断和预测胃癌中腹膜转移的下一个目标。术中收集的腹腔灌洗液的细胞学检查可用于预测腹膜复发,且在日本曾用于胃癌分期^[13]。但是,有研究报道,腹腔灌洗液细胞学不能显示出预测和检测腹膜转移所需的敏感性,并建议使用分子诊断方法(例如实时荧光定量 PCR)来检测腹膜转移中的微转移^[14]。在一项多中心的前瞻性研究中,通过实时荧光定量 PCR 评估了编码癌胚抗原(CEA)和细胞角

蛋白 20(CK-20)的基因的 mRNA 表达,可用于预测胃癌的总体存活率和腹膜转移^[15]。然而,基于 mRNA 的诊断方法的缺点是在外科手术过程中 mRNA 的高度可降解性。相反,包裹在外泌体中的 miRNA 保持稳定并可以在体液中循环很长时间,这些体液包括血清、血浆、唾液、尿液、母乳和眼泪。因此,腹腔灌洗液外泌体中的 miRNA 具有较高的诊断价值。

本研究发现胃癌腹膜转移患者腹腔灌洗液外泌体中 miR-21、miR-320c、miR-1225-5p 的相对表达水平平均高于胃癌非腹膜转移患者和胃癌预后良好患者($P < 0.05$),胃癌非腹膜转移患者与胃癌预后良好患者腹腔灌洗液外泌体中 miR-21、miR-320c、miR-1225-5p 的相对表达量差异无统计学意义($P > 0.05$)。因此,腹膜转移特异性的 miRNA,这种特异性可让其成为潜在的生物标志物。FABBRI 等^[16]报道,癌症释放外泌体中的 miR-21 和 miR-29a 通过与周围免疫细胞中的 TLRs 结合并激活以及诱导促转移性炎症反应,影响肿瘤的生长和扩散。这支持了肿瘤来源的外泌体有助于转移前微环境形成的观点。这表明癌细胞来源的外泌体有助于在腹膜中形成转移前小生境,从而支持胃癌根治性切除术后腹膜浸润。miR-1225-5p 靶向作用于多囊肾病基因 PKD1,该基因在常染色体显性多囊肾病中经常突变^[17]。因此,miR-1225-5p 可能影响该病的进展。然而,miR-1225-5p 与癌症的关系尚不清楚。miR-21 和 miR-1225-5p 有助于在腹膜中为转移癌细胞的扩散和沉降构建一个转移前小生境,因此可能造成治疗性胃癌切除术后腹膜转移的易发性。

综上所述,腹腔灌洗液外泌体中 miR-21、miR-320c、miR-1225-5p 的表达水平检测可作为诊断胃癌腹膜转移的潜在方法,有助于采取更有效的预防和治疗措施。

参考文献

- [1] ZHU L, LI T W, SHEN Y J, et al. Using tRNA halves as novel biomarkers for the diagnosis of gastric cancer[J]. Cancer Biomark, 2019, 25(2): 169-176.
- [2] FU M, GU J, JIANG P C, et al. Exosomes in gastric cancer: roles, mechanisms, and applications[J]. Mol Cancer, 2019, 18(1): 41.
- [3] MATSUOKA T, YASHIRO M. Biomarkers of gastric cancer: current topics and future perspective[J]. World J Gastroenterol, 2018, 24(26): 2818-2832.
- [4] LI Y, DENG L Y, YANG X H, et al. Early diagnosis of gastric cancer based on deep learning combined with the spectral-spatial classification method[J]. Biomed Opt Express, 2019, 10(10): 4999-5014.
- [5] CHENG X, FAN K, WANG L, et al. TfR1 binding with H-ferritin nanocarrier achieves prognostic diagnosis and enhances the therapeutic efficacy in clinical gastric cancer[J]. Cell Death Dis, 2020, 11(2): 92.
- [6] TOKUHISA M, ICHIKAWA Y, KOSAKA N A, et al. Exosomal miRNAs from peritoneum lavage fluid as potential prognostic biomarkers of peritoneal metastasis in gastric cancer[J]. PLoS One, 2015, 10(7): e0130472.
- [7] NECULA L, MATEI L, DRAGU D, et al. Recent advances in gastric cancer early diagnosis[J]. World J Gastroenterol, 2019, 25(17): 2029-2044.
- [8] WANG F H, SHEN L, LI J, et al. The Chinese society of clinical oncology (CSCO): clinical guidelines for the diagnosis and treatment of gastric cancer[J]. Cancer Commun (Lond), 2019, 39(1): 10.
- [9] KAHROBA H, HEJAZI M S, SAMADI N. Exosomes: from carcinogenesis and metastasis to diagnosis and treatment of gastric cancer[J]. Cell Mol Life Sci, 2019, 76(9): 1747-1758.
- [10] ZHU Y, WANG Q C, XU M D, et al. Application of convolutional neural network in the diagnosis of the invasion depth of gastric cancer based on conventional endoscopy[J]. Gastrointest Endosc, 2019, 89(4): 806-815.
- [11] LI L, CHEN Y S, SHEN Z, et al. Convolutional neural network for the diagnosis of early gastric cancer based on magnifying narrow band imaging[J]. Gastric Cancer, 2020, 23(1): 126-132.
- [12] FUKAGAWA T, KATAI H, MIZUSAWA J, et al. A prospective multi-institutional validity study to evaluate the accuracy of clinical diagnosis of pathological stage III gastric cancer (JCOG1302A)[J]. Gastric Cancer, 2018, 21(1): 68-73.
- [13] WANG J, LIU Y Y, SUN W W, et al. Plasma exosomes as novel biomarker for the early diagnosis of gastric cancer[J]. Cancer Biomark, 2018, 21(4): 805-812.
- [14] SHEKARI N, BARADARAN B, SHANEHBANDI D, et al. Circulating microRNAs: valuable biomarkers for the diagnosis and prognosis of gastric cancer[J]. Curr Med Chem, 2018, 25(6): 698-714.
- [15] LIN L Y, YANG L, ZENG Q, et al. Tumor-originated exosomal lncUEGC1 as a circulating biomarker for early-stage gastric cancer[J]. Mol Cancer, 2018, 17(1): 84-87.
- [16] FABBRI M, PAONE A, CALORE F, et al. MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109(31): 2110-2116.
- [17] RANA S, MALINOWSKA K, ZOLER M. Exosomal tumor microRNA modulates premetastatic organ cells[J]. Neoplasia, 2013, 15(3): 281-295.

(收稿日期: 2020-12-22 修回日期: 2021-03-28)