

• 论 著 •

肿瘤教育血小板源性 miRNA-122 和 miRNA-21 在肝癌 早期诊断中的应用研究^{*}

余恋雨,王 宇,唱 凯,陈 鸣[△]

陆军军医大学第一附属医院检验科,重庆 400038

摘 要:**目的** 探究肝癌患者肿瘤教育血小板源性微小 RNA(miRNA)-122 和 miRNA-21 的表达水平及其对肝癌的诊断价值。**方法** 选取 2021 年 12 月在该院诊治的 15 例原发性肝癌患者及同期在该院行健康体检的 15 例体检健康者分别作为肝癌组和健康对照组。采用低速离心法提取受试者血浆中的血小板,采用实时荧光定量 PCR 检测富血小板悬液中教育血小板源性 miRNA-122 和 miRNA-21 的相对表达量,并采用受试者工作(ROC)曲线分析它们在肝癌诊断方面的临床价值。**结果** 肝癌组教育血小板源性 miRNA-122 和 miRNA-21 的相对表达量均上调,差异均有统计学意义($P<0.05$)。miRNA-122 和 miRNA-21 诊断原发性肝癌的曲线下面积(AUC)分别为 0.987 和 0.916。**结论** 肝癌组血浆中教育血小板源性 miRNA-122 和 miRNA-21 的表达水平明显升高,其相对表达量可以有效区分肝癌组和健康对照组,肿瘤教育血小板源性 miRNA-122 和 miRNA-21 有望成为诊断肝癌的潜在分子标志物。

关键词:肝癌; 教育血小板; 微小 RNA-122; 微小 RNA-21; 诊断价值

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2022.05.002

中图法分类号:R735.7

文章编号:1673-4130(2022)05-0519-04

文献标志码:A

Application of tumor educated platelets derived miRNA-122 and miRNA-21 in the early diagnosis of liver cancer^{*}

YU Lianyu, WANG Yu, CHANG Kai, CHEN Ming[△]

Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Army
Medical University, Chongqing 400038, China

Abstract: Objective To detect the expression levels of miRNA-532 and miRNA-221 in tumor-educated platelets (TEP) of liver cancer patients, and to explore their diagnostic value for liver cancer. **Methods** Fifteen patients with liver cancer treated in the hospital in December 2021 and 15 healthy people who underwent physical examination in the hospital in the same period were selected as liver cancer group and healthy control group. Low-speed centrifugation was used to extract the platelets from the subjects' plasma, and real-time fluorescent quantitative PCR was used to detect the relative expression of TEP miRNA-122 and miRNA-21. The receiver operating characteristic (ROC) curve was used to analyze their clinical value in the diagnosis of liver cancer. **Results** The relative expression levels of TEP miRNA-122 and miRNA-21 in liver cancer patients group level higher than those in the control group, the differences were statistically significant ($P<0.05$). The area under the curve (AUC) of TEP miRNA-122 and miRNA-21 for diagnosing primary liver cancer were 0.987 and 0.916, respectively. **Conclusion** The expression levels of TEP miRNA-122 and miRNA-21 in liver cancer patients' plasma are significantly increased, and their relative expression levels can effectively distinguish liver cancer patients from healthy controls. TEP miRNA-122 and miRNA-21 are expected to be potential molecular markers for the diagnosis of liver cancer.

Key words: liver cancer; educational platelet; miRNA-122; miRNA-21; diagnostic value

肝细胞癌(HCC)是世界上最具破坏性的恶性肿瘤之一,其发病率在所有恶性肿瘤中排名第 5 位,死

^{*} 基金项目:国家自然科学基金面上项目(81972027)。

作者简介:余恋雨,女,硕士研究生在读,主要从事临床检验及生物传感器方面的研究。[△] 通信作者, E-mail: chming1971@126.com。

本文引用格式:余恋雨,王宇,唱凯,等.肿瘤教育血小板源性 miRNA-122 和 miRNA-21 在肝癌早期诊断中的应用研究[J]. 国际检验医学杂志, 2022, 43(5): 519-522.

亡率排名第 3 位^[1]。HCC 起病隐匿,早期往往无明显症状,易漏诊或误诊,临床症状明显者病情大多已进入中晚期,亟待灵敏度更高特异度更强的肝癌标志物来及早甄别出早期患者。

血小板是外周血中丰富的无核细胞碎片,具有形成血栓、监测外周血中的病原体、与免疫细胞相互作用等多种功能。更重要的是,它们可以接受癌细胞的“教育”。血小板在整个生命周期中可以吸收并携带蛋白质和核酸等物质,包括 mRNA、pre-mRNA、miRNA、lncRNA、circRNA 和线粒体 RNA 等。在肿瘤组织的发生、发展过程中,肿瘤细胞可以直接或者间接通过不同的信号分子或受体影响血小板的 RNA 信息及蛋白质水平,形成受肿瘤教育的小血小板(TEP)^[2-3]。研究表明,TEP RNA 正逐渐成为疾病诊断和预后的潜在新型血清生物标志物^[4]。TEP RNA 作为癌症诊断的生物标志物有许多优点:(1)血小板不含细胞核,因此受到来自基因组 DNA 的干扰非常小;(2)血小板易于收集、分离和分析,易于在普通临床实验室中标准化;(3)TEP miRNA 对外界刺激反应迅速,能够为癌症的进展提供动态 miRNA 信号,这可能使早期检测癌症具有更好的灵敏度^[5]。

作为 TEP RNA 中含量最高的 RNA,miRNA 是一种小的(20~24 个核苷酸)非编码 RNA,通过负向调控靶 mRNA 来调节基因表达和细胞过程^[6]。miRNA 谱具有不同的细胞类型,并产生不同的功能。肝脏 miRNA 谱可通过调节肝脏代谢,在肝脏损伤、纤维化和肿瘤的发展中发挥重要作用,包括 miRNA-122、miRNA-194/192、miRNA-223、miRNA-21、miRNA-155 等。其中,miRNA-122 是一种肝脏特异性的 miRNA,是肝脏发育和肝脏疾病中的关键调控因子,研究表明,miRNA-122 在 HCC 患者肝脏组织中的表达显著下调,但是在外周循环中表达上调^[7-8]。miRNA-21 是血液循环中检测到的最丰富的 miRNA 之一,几乎在所有实体癌症中高表达,在肿瘤细胞中起着抗凋亡、促存活的作用^[9-10]。本研究探讨肿瘤教育血小板源性的 miRNA-122 和 miRNA-21 在 HCC 中的表达水平,并评估其对 HCC 的诊断价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2021 年 12 月在本院采集的 15 例原发性肝癌患者和 15 例健康受试者的临床剩余全血样本 2 mL,分别归入肝癌组和健康对照组。其中肝癌组男 8 例,女 7 例,年龄 35~56 岁,平均(47.67±6.42)岁;健康对照组男 8 例,女 7 例,年龄 28~58 岁,平均(44.60±9.61)岁。两组间性别、年龄差异无统计学意义($P>0.05$)。本研究纳入的原发性肝癌患者均按照中国临床肿瘤学会制定的《原发性肝癌诊疗指南 2020》明确诊断。排除标准:(1)已经外科手术或多次化疗;(2)伴有心、肺等其他重要脏器

严重功能不全;(3)伴有严重感染性疾病(包括细菌、病毒、支原体、衣原体感染等);(4)伴有严重精神疾病;(5)血液标本明显有脂血、浑浊、污染等情况。本研究经本院伦理委员会批准,受试者均获得书面知情同意。

1.2 方法

1.2.1 血小板分离提取(低速离心法) 将所收集的 2 mL 全血样本于室温下,120×g 离心 10 min 提取上清获得富血小板血浆后再次 120×g 离心 10 min 去除血浆中残留的红细胞和白细胞。使用全自动血细胞分析仪计数血小板以确认血小板被成功分离提取。随后在室温下 360×g 离心 20 min,去除上清以获得血小板沉淀。

1.2.2 血小板中总 RNA 的提取以及实时荧光定量 PCR(RF-qPCR) 将所获得的血小板沉淀用 miRNA 提取试剂盒(德国 Qiagen)进行总 miRNA 提取后,用 NanoPhotometer® N50 对 RNA 的浓度和纯度进行检测,随后采用 miRNA First Strand cDNA Synthesis Kit(茎环法,中国生工)将上述总 miRNA 逆转录为 cDNA,最后使用 2×SG Fast qPCR Master Mix Kit(中国生工)检测 miRNA-122 和 miRNA-21 的表达水平,并根据 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法以 U6 为内参分别计算它们的相对表达量。其中,hsa-miR-122-5p 的茎环法逆转录引物序列为 5'-GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACC AAA CA-3',PCR 正向引物序列为 5'-AAC ACG CTG GAG TGT GAC AA-3',反向引物序列为 5'-CAG TGC AGG GTC CGA GGT-3'; hsa-miR-21-5p 的逆转录引物序列为 5'-CTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG AGT CAA CA-3',PCR 正向引物序列为 5'-CGC GCG CGT AGC TTA TCA GAC TGA-3',反向引物序列为 5'-ATC CAG TGC AGG GTC CGA GG-3'; 内参基因 U6 的逆转录引物序列为 5'-GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACA AAA TA-3',PCR 正向引物序列为 5'-AGA GAA GAT TAG CAT GGC CCC TG-3',反向引物序列为 5'-ATC CAG TGC AGG GTC CGA GG-3'。

1.3 统计学处理 采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验。利用受试者工作特征曲线(ROC)分析 TEP miRNA-122 和 miRNA-21 的诊断效能。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TEP miRNA-122 在健康对照组和肝癌组血浆中的相对表达量 肝癌组 TEP miRNA-122 的相对表达量(11.94±6.28)明显高于健康对照组(1.76±

1.37), 差异有统计学意义($P<0.0001$)。见图 1。

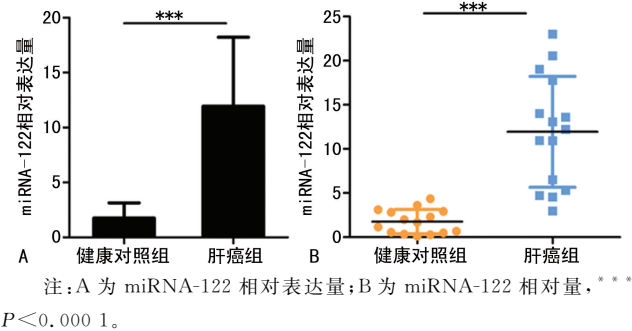


图 1 两组受试者 TEP miRNA-122 的表达水平比较

2.2 TEP miRNA-21 在健康对照组和肝癌组血浆中的相对表达量 肝癌组 TEP miRNA-21 的相对表达量(3.47 ± 1.69)高于健康对照组(1.10 ± 0.53), 差异有统计学意义($P<0.0001$)。见图 2。

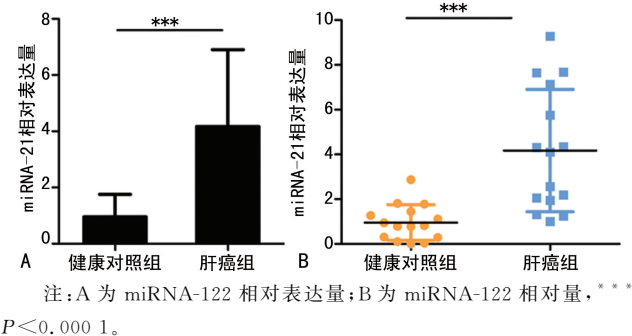


图 2 两组受试者 TEP miRNA-21 的表达水平比较

2.3 TEP miRNA-122 和 miRNA-21 对原发性肝癌的诊断价值 绘制 TEP miRNA-122 和 miRNA-21 诊断原发性肝癌的 ROC 曲线, 结果显示, TEP miRNA-122 的曲线下面积(AUC)为 0.987 (95% CI: 0.955~1.018), 当最佳截断值为 4.46 时, 约登指数最高, 诊断原发性肝癌的灵敏度为 93.3%, 特异度为 100.0%; TEP miRNA-21 的 AUC 为 0.916 (95% CI: 0.819~1.012), 当最佳截断值为 1.88 时, 约登指数最高, 诊断灵敏度为 80.0%, 特异度为 93.3%。见图 3。

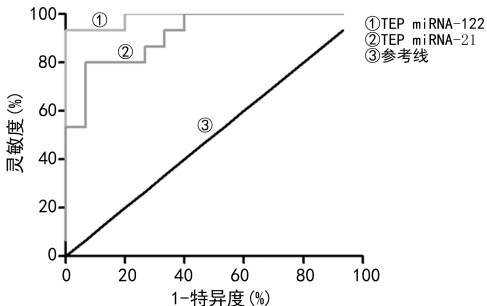


图 3 TEP miRNA-122 和 miRNA-21 诊断原发性肝癌的 ROC 曲线

3 讨论

早期诊断、早期治疗和精准个体化治疗是目前癌症医疗方面的目标, 血清学标志物辅助检查结合影像

学方法是主流的诊断肝癌的办法, 但他们早期诊断的检出率不高, 对于肝癌早期诊疗的价值有限^[11]。液体活检通过检测肿瘤释放到血液中的循环游离 DNA、miRNA 等核酸分子, 以及肿瘤血小板、循环肿瘤细胞、外泌体等结构可以突破组织病理活检的限制, 提高血清学标志物的灵敏度和特异度, 同时具有非侵入性检测、均质化肿瘤异质性、可重复性高、耗时较短、可以实时监测肿瘤的发展变化和治疗效果等优点^[12]。

长期以来, 血小板一直被认为是癌症的潜在诊断工具。几项研究表明, 简单的平板计数已经包含潜在的临床相关信息^[13-15]。除了血小板计数外, 血小板的大小和血小板蛋白标记物, 如 P-选择素, 也用于基于血液的癌症诊断和预后^[16]。KANIKARLA-MARIE 等^[17]发现了“富含特异性肿瘤成分的血栓”参与肿瘤细胞的转移, 随后其对巨核细胞、血小板、癌症之间相互作用的研究引出了 TEPs 的概念。在肿瘤组织浸润时, 血小板可以响应肿瘤细胞的信号, 摄取肿瘤 RNA 并调节自身 mRNA 的剪切成为 TEP, 另一方面 TEP 也可以释放多种生长和促血管生成因子、吸引其他血细胞, 创造有利于肿瘤转移的微环境^[18]。因此, 异常 TEP RNA 的表达和基因测序用于液体活检诊断肿瘤或靶向治疗越来越受到重视。2015 年, BEST 等^[19]通过对 283 个血小板样本的 mRNA 进行测序, 以 96.0% 的准确率将癌症患者与健康个体区分开来, 并且以 71.0% 准确率正确识别出 6 种不同类型的肿瘤, 这项研究证实了 TEP 的诊断潜力。除了 mRNA, 参与 RNA 沉默和转录后基因调控的非编码 miRNA 的水平也在 TEP 中发生改变。2019 年, WANG 等^[5]发现, TEP miR-34c-3p 和 miR-18a-5p 在鼻咽癌中的表达水平上调, 对鼻咽癌的诊断具有重要的临床价值。2021 年, ZHU 等^[20]通过生物信息学分析和 qRT-PCR 发现, TEP miR-495-3p 和 miR-1293 在 HCC 患者和健康对照者中存在差异表达, 提示其可能参与了 HCC 的病理生理过程。

针对 TEP miRNA 进行液体活检诊断肿瘤具有很多优势: 首先, 响应外部信号的特定剪接事件与血小板直接摄取(剪接)循环 mRNA 的能力相结合, 可以为 TEP 提供高度动态的 miRNA 库, 且其具有潜在的癌症诊断适用性; 其次, 肿瘤教育血小板上的异常 miRNA 可以受到血小板的保护, 具有易分离、易储存及易检测的优势。

本研究发现, TEP 的 miRNA-122 和 miRNA-21 在原发性肝癌患者体内的相对表达量均显著高于健康受试者, 差异有统计学意义($P<0.05$), ROC 曲线分析结果显示, TEP miRNA-122 的 AUC 达到 0.987, miRNA-21 的 AUC 达到 0.916, 表明 TEP miRNA-122 和 miRNA-21 的相对表达水平可以有效区分肝癌患者和健康受试者。当 miRNA-122 确定最

佳截断值为 4.46 时,其诊断的灵敏度和特异度分别达到 100.0%和 93.3%;而当 miRNA-221 确定最佳截断值为 1.64 时,其诊断的灵敏度和特异度分别达到 80.0%和 93.3%。因此,TEP 的 miRNA-122 和 miRNA-21 是具有潜在应用价值的肝癌临床辅助诊断标志物,有望补充目前用于液体活检诊断的生物分子库。但是,本次研究没有具体分析 TEP miRNA 的相对表达量在不同病理类型和阶段、不同临床分期的肝癌患者中的区别,而且分析样本的量较少,所以在将 TEP miRNA-122 和 miRNA-21 用于临床肝癌的早期诊断还需要进一步研究。

综上所述,肝癌患者血浆中 TEP miRNA(miRNA-122 和 miRNA-21)相对于健康受试者均有较高的相对表达量,可以作为潜在的诊断肝癌的分子标志物,但在不同肿瘤分期、细胞分化程度等方面是否存在差异性表达,仍需进一步研究。

参考文献

[1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3):209-249.

[2] SOL N, WURDINGER T. Platelet RNA signatures for the detection of cancer[J]. Cancer Metastasis Rev, 2017, 36(2):263-272.

[3] ASGHAR S, WAQAR W, UMAR M, et al. Tumor educated platelets, a promising source for early detection of hepatocellular carcinoma; liquid biopsy an alternative approach to tissue biopsy[J]. Clin Res Hepatol Gastroenterol, 2020, 44(6):836-844.

[4] D'AMBROSI S, NILSSON R J, WURDINGER T. Platelets and tumor-associated RNA transfer[J]. Blood, 2021, 137(23):3181-3191.

[5] WANG H, WEI X, WU B, et al. Tumor-educated platelet miR-34c-3p and miR-18a-5p as potential liquid biopsy biomarkers for nasopharyngeal carcinoma diagnosis [J]. Cancer Manag Res, 2019, 11:3351-33360.

[6] RUPAIMOOLE R, SLACK F J. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases[J]. Nat Rev Drug Discov, 2017, 16(3):203-221.

[7] WANG X, HE Y, MACKOWIAK B, et al. MicroRNAs as regulators, biomarkers and therapeutic targets in liver diseases[J]. Gut, 2021, 70(4):784-795.

[8] SZABO G, BALA S. MicroRNAs in liver disease[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2013, 10(9):542-552.

[9] CAO L Q, YANG X W, CHEN Y B, et al. Exosomal miR-21 regulates the TETs/PTENp1/PTEN pathway to promote hepatocellular carcinoma growth[J]. Mol Cancer, 2019, 18(1):148.

[10] ZHANG T, YANG Z, KUSUMANCHI P, et al. Critical role of microRNA-21 in the pathogenesis of liver diseases [J]. Front Med (Lausanne), 2020, 7:7.

[11] YANG J D, HEIMBACH J K. New advances in the diagnosis and management of hepatocellular carcinoma[J]. BMJ, 2020, 371:m3544.

[12] YE Q, LING S, ZHENG S, et al. Liquid biopsy in hepatocellular carcinoma; circulating tumor cells and circulating tumor DNA[J]. Mol Cancer, 2019, 18(1):114.

[13] BOTTSFORD-MILLER J, CHOI H-J, DALTON H J, et al. Differential platelet levels affect response to taxane-based therapy in ovarian cancer[J]. Clin Cancer Res, 2015, 21(3):602-610.

[14] MANTUR M, KOPER O, SNARSKA J, et al. Evaluation of PDGF-AB and sP-selectin concentrations in relation to platelet count in patients with colorectal cancer before and after surgical treatment[J]. Pol Arch Med Wewn, 2008, 118(6):345-350.

[15] CHO M S, BOTTSFORD-MILLER J, VASQUEZ H G, et al. Platelets increase the proliferation of ovarian cancer cells[J]. Blood, 2012, 120(24):4869-4872.

[16] MANTUR M, KEMONA H, PIETRUCZUK M, et al. Does renal carcinoma affect the expression of P-selectin on platelets? [J]. Neoplasma, 2002, 49(4):243-245.

[17] KANIKARLA-MARIE P, LAM M, MENTER D G, et al. Platelets, circulating tumor cells, and the circulome[J]. Cancer Metastasis Rev, 2017, 36(2):235-248.

[18] ROWETH H G, BATTINELLI E M. Lessons to learn from tumor-educated platelets[J]. Blood, 2021, 137(23):3174-3180.

[19] BEST M G, SOL N, KOOI I, et al. RNA-seq of tumor-educated platelets enables blood-based pan-cancer, multi-class, and molecular pathway cancer diagnostics[J]. Cancer Cell, 2015, 28(5):666-676.

[20] ZHU B, GU S, WU X, et al. Bioinformatics analysis of tumor-educated platelet microRNAs in patients with hepatocellular carcinoma [J]. Biosci Rep, 2021, 41(12):20211420.