



· 论 著 ·

非小细胞肺癌患者外周血外泌体中差异表达的微小 RNAs 研究

张婷, 王凌伟

【摘要】 **背景** 目前, 临床上尚缺乏早期、有效诊断非小细胞肺癌 (NSCLC) 的指标, 来源于癌组织的外泌体及其内部物质因可反映亲本细胞性质而有望成为早期诊断肿瘤的生物标志物。**目的** 通过高通量测序技术筛选 NSCLC 患者外周血外泌体中差异表达的微小 RNAs (miRNAs)。**方法** 收集 2018 年 1 月—2019 年 1 月于深圳市人民医院就诊的 4 例 NSCLC 患者的外周血样品, 其中肺腺癌 (LUAD) 2 例、肺鳞状细胞癌 (LUSC) 2 例; 另收集同期 4 例健康志愿者的外周血样品作为对照。采用 HiSeq 2500 高通量测序仪进行 miRNAs 测序, 采用 DESeq2 软件筛选差异表达的 miRNAs; 在癌症基因组图谱 (TCGA) 中选取并比较 39 对 LUAD 组织及其配对癌旁正常组织、45 对 LUSC 组织及其配对癌旁正常组织 miRNA-9-3p 测序结果。**结果** (1) 高通量测序结果显示, 4 例 NSCLC 患者外周血外泌体中平均检测到 776 种 miRNAs, 4 例健康志愿者外周血外泌体中平均检测到 238 种 miRNAs。(2) LUAD 与 LUSC 患者外周血外泌体中差异表达最显著的 10 种 miRNAs 中有 6 种是重合的, 分别为 miRNA-1228-5p、miRNA-129-5p、miRNA-760、miRNA-885-3p、miRNA-9-3p、miRNA-95-3p。(3) LUSC-1、LUSC-2、LUAD-1 及 LUAD-2 外周血外泌体中 miRNA-9-3p 表达量分别为 71.51、15.61、13.99、16.11 转录本数, 4 例健康志愿者外周血外泌体中 miRNA-9-3p 表达量均为 0。TCGA 中 LUAD 组织和 LUSC 组织 miRNA-9-3p 表达量均高于其配对癌旁正常组织 ($P<0.01$)。**结论** 通过高通量测序技术发现 miRNA-1228-5p、miRNA-129-5p、miRNA-760、miRNA-885-3p、miRNA-9-3p、miRNA-95-3p 可能是 NSCLC 患者潜在的特异性 miRNAs, 其中 miRNA-9-3p 主要来源于 NSCLC 患者癌组织, 这为后续通过外周血外泌体 miRNAs 测序而实现 NSCLC 的早期、无创诊断奠定了研究基础。

【关键词】 非小细胞肺癌; 外泌体; 微小 RNAs; 高通量测序; 诊断

【中图分类号】 R 730.26 **【文献标识码】** A DOI: 10.3969/j.issn.1008-5971.2019.11.012

张婷, 王凌伟. 非小细胞肺癌患者外周血外泌体中差异表达的微小 RNAs 研究 [J]. 实用心脑血管病杂志, 2019, 27 (11): 54-58. [www.syxnf.net]

ZHANG T, WANG L W. Differentially expressed microRNAs in peripheral blood exosomes in patients with non-small cell lung cancer [J]. Practical Journal of Cardiac Cerebral Pneumal and Vascular Disease, 2019, 27 (11): 54-58.

Differentially Expressed MicroRNAs in Peripheral Blood Exosomes in Patients with Non-small Cell Lung Cancer

ZHANG Ting, WANG Lingwei

Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Shenzhen People's Hospital (the First Affiliated Hospital of Southern University of Science and Technology), Shenzhen 518020, China

Corresponding author: WANG Lingwei, E-mail: limey@sina.com

基金项目: 深圳市科技研发资金基础研究项目 (JCYJ20170307095633450)

518020 广东省深圳市人民医院 (南方科技大学第一附属医院) 呼吸与危重症医学科

通信作者: 王凌伟, E-mail: limey@sina.com

[21] BAI Y, ZHOU Q, FANG Q, et al. Inflammatory cytokines and t-lymphocyte subsets in serum and sputum in patients with bronchial asthma and chronic obstructive pulmonary disease [J]. Med Sci Monit, 2019, 25 (25): 2206-2210. DOI: 10.12659/MSM.913703.

type I collagen turnover indicators accompanied by IL-6 and IL-8 release in stable COPD [J]. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2019, 3 (14): 163-168. DOI: 10.2147/COPD.S188139.

(收稿日期: 2019-06-03; 修回日期: 2019-10-12)

(本文编辑: 李越娜)

[22] ZENG Y Y, HU W P, ZUO Y H, et al. Altered serum levels of

【Abstract】 Background There is no early and effective diagnostic indicators of non-small cell lung cancer (NSCLC) at present, exosomes and their internal substances from cancer tissues can reflect the nature of parent cells, which is expected to become biological markers for the early diagnosis of tumor. **Objective** To screen the differentially expressed microRNAs (miRNAs) in peripheral blood exosomes in patients with by high-throughput sequencing. **Methods** Peripheral blood samples of 4 patients with NSCLC were collected in Shenzhen People's Hospital from January 2018 to January 2019, including 2 patients with lung adenocarcinoma (LUAD) and 2 patients with lung squamous cell carcinoma (LUSC); meanwhile peripheral blood samples of 4 healthy volunteers were collected as control. HiSeq 2500 high-throughput sequencer was used to complete the sequencing of miRNAs, and DESeq2 software was used to screen the differentially expressed miRNAs; miRNA-9-3p sequencing results in the 39 pairs of LUAD tissues and matched normal paracancerous tissues, 45 pairs of LUSC tissues and matched normal paracancerous tissues were compared in TCGA. **Results** (1) High-throughput sequencing found 776 kinds of miRNAs in peripheral blood exosomes in the 4 patients with NSCLC and 238 kinds of miRNAs in peripheral blood exosomes in the 4 healthy volunteers on average. (2) A total of 6 kinds of miRNAs were identical in the 10 miRNAs with the most significant differential expression in peripheral blood exosomes between patients with LUAD and LUSC, including miRNA-1228-5p, miRNA-129-5p, miRNA-760, miRNA-885-3p, miRNA-9-3p and miRNA-95-3p. (3) Expression quantity of miRNA-9-3p in the peripheral blood exosomes in LUSC-1, LUSC-2, LUAD-1 and LUAD-2 was 71.51, 15.61, 13.99 and 16.11 TPM, respectively, while expression quantities of miRNA-9-3p in peripheral blood exosomes in the 4 healthy volunteers were all 0. Expression quantity of miRNA-9-3p in LUAD tissues and LUSC tissues was statistically significantly higher than that in the matched normal tissues in TCGA, respectively ($P < 0.01$). **Conclusion** miRNA-1228-5p, miRNA-129-5p, miRNA-760, miRNA-885-3p, miRNA-9-3p and miRNA-95-3p found by high-throughput sequencing may be potential specific miRNAs for patients with NSCLC, thereinto miRNA-9-3p mainly originated from cancer tissues of patients with NSCLC, thus it may lay the foundation of researches about early and non-invasive diagnosis of NSCLC through sequencing of miRNAs in peripheral blood exosomes.

【Key words】 Non-small cell lung cancer; Exosomes; MicroRNAs; High throughput sequencing; Diagnosis

肺癌是全球范围内发病率及病死率最高的恶性肿瘤之一,其发病率及病死率亦位居我国恶性肿瘤之首^[1]。肺癌主要包括非小细胞肺癌(NSCLC)和小细胞肺癌(SCLC),其中NSCLC发病率较高,约占所有肺癌患者的80%。但目前NSCLC尚缺乏早期有效的诊断指标,故导致约75%的NSCLC患者确诊时已处于晚期,5年存活率仅为17%。

外泌体是由细胞分泌的直径为30~100 nm的亚细胞囊泡,早在上个世纪就已被科学家发现并认为是丢弃、不需要的细胞组分的“垃圾桶”^[2]。近年研究表明,外泌体可在细胞间传递重要分子信号,可作用于靶细胞并参与调节蛋白表达及各种信号通路^[3];此外,外泌体及其内部物质可反映亲本细胞的性质,因此推测来源于肿瘤细胞的外泌体可以检测到肿瘤相关标志物。微小RNAs(miRNAs)是由内源性发夹结构转录产物衍生的一种长19~25 nt的单链RNAs,其在癌症发生、发展过程中发挥着重要调节作用,其中部分miRNAs甚至扮演着抑癌基因和原癌基因的角色^[4]。本研究采用高通量测序技术检测4例NSCLC患者和4例健康志愿者外周血外泌体中miRNAs表达并筛选差异表达的miRNAs,旨在为NSCLC的早期、无创诊断提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 一般材料 收集2018年1月—2019年1月于深圳

市人民医院就诊的4例NSCLC患者的外周血样品,均经组织病理学确诊,其中肺腺癌(LUAD)2例、肺鳞状细胞癌(LUSC)2例;另收集同期4例健康志愿者的外周血样品作为对照,NSCLC患者和健康志愿者临床资料见表1。本研究经深圳市人民医院医学伦理委员会审核批准,且收集外周血样品前已取得受试者知情同意。

1.2 主要试剂与仪器 (1)主要试剂:exoRNEasy试剂盒、QIAzol试剂盒(德国QAGEN公司生产),CD63荧光标记抗体、CD81荧光标记抗体(英国Abcam公

表1 4例NSCLC患者和4例健康志愿者临床资料

Table 1 Clinical data of the 4 patients with NSCLC and 4 healthy volunteers

样品编号	性别	年龄(岁)	转移情况	TNM分期	治疗药物
LUAD-1	男	71	骨转移	Ⅳ期	吉非替尼
LUAD-2	女	47	骨转移	Ⅳ期	-
LUSC-1	男	54	骨转移	Ⅳ期	吉西他滨、多西他赛、奥沙利铂
LUSC-2	女	65	多发转移	Ⅳ期	-
normal-1	男	66	-	-	-
normal-2	男	52	-	-	-
normal-3	女	45	-	-	-
normal-4	女	69	-	-	-

注:LUAD=肺腺癌,LUSC=肺鳞状细胞癌,normal=健康志愿者;“-”为无相关数据

司生产), 丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺(美国 Sigma-Aldrich 公司生产)。(2) 主要仪器: HiSeq 2500 高通量测序仪(美国 Illumina 公司生产), $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱(美国 Harris 公司生产), 低温高速离心机(德国 Eppendorf 公司生产), PAGE 胶电泳仪(美国 Bio-Rad 公司生产), 流式细胞仪 FACSCanto™ II (美国 BD 公司生产)。

1.3 方法

1.3.1 外泌体的提取和鉴定 收集 NSCLC 患者和健康志愿者外周静脉血 5 ml, 置于 $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 环境下过夜, 之后 $2\ 000\times g$ 离心 5 min, 取上层血清于 1.5 ml 无菌 EP 管中并置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存待测。按照 exoRNEasy 试剂盒操作步骤提取外泌体, 使用电镜分析外泌体粒径大小并采用外泌体特异性标记蛋白 CD63 和 CD81 荧光标记抗体, 之后使用流式细胞仪 FACSCanto™ II 检测分离到的外泌体阳性百分比。

1.3.2 外泌体 RNAs 提取及 miRNAs 测序 按照 QIAzol 试剂盒操作步骤提取 NSCLC 患者和健康志愿者外周静脉血外泌体总 RNAs, 并使用 PAGE 胶分离不同片段大小的 RNA, 切取介于 18~30 nt 的条带, 回收 miRNAs。符合纯度和浓度检测标准后, 采用 HiSeq 2500 高通量测序仪进行 miRNAs 测序, 得到测序数据后通过数据过滤去除低质量和被污染的序列, 与人类参考基因组序列(hg19)进行比对并采用 miRBase 数据库^[5]进行注释, 分析得出 NSCLC 患者和健康志愿者外周静脉血外泌体中 miRNAs 种类及支持序列数(reads)。以每 100 万个碱基在染色体中位置上的读值定位到外显子的每 1 000 个碱基上的转录本数(transcripts per kilobase of exon model per million mapped reads, TPM)计算每个 miRNAs 在外周血样品中的表达量。

1.3.3 miRNAs 差异表达分析 DESeq2 软件是基于负二项分布模型进行差异基因表达筛选的工具^[6], 采用 DESeq2 软件计算 NSCLC 患者和健康志愿者外周血外泌体中 miRNAs 差异倍数(fold changes, FC), 采用 Benjamini-Hochberg 法^[6]对原有假设检验得到的 *P* 值进行校正, 从而得到每个差异表达的 miRNAs 的伪发现率(FDR)。最后, 以 $|\log_2(\text{FC})| > 1$ 、 $\text{FDR} < 0.05$ 为标准筛选 NSCLC 患者和健康志愿者外周血外泌体中表达差异的 miRNAs。

1.4 统计学方法 采用 R 语言进行数据处理, 癌症基因组图谱(TCGA)中 LUAD 及 LUSC 的肿瘤组织与癌旁正常组织中 miRNA-9-3p 表达量的比较采用 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 外周血外泌体中 miRNAs 测序结果 8 个样品共产生 7 007 兆碱基对(megabase pairs, Mbp)的数据

量, 每个样品平均产生 876 Mbp 的数据量。去掉测序接头污染和低质量序列后每个样品平均保留 625 Mbp 的数据量用于 miRNAs 分析。与 miRBase 数据库进行比对后发现, 8 个样品检测到 200~1 048 种 miRNAs, 其中 4 例 NSCLC 患者外周血外泌体中平均检测到 776 种 miRNAs, 4 例健康志愿者外周血外泌体中平均检测到 238 种 miRNAs, 详见表 2。

2.2 外周血外泌体中差异基因分析结果 以 $|\log_2(\text{FC})| > 1$ 、 $\text{FDR} < 0.05$ 为标准, 与健康志愿者相比, LUAD 患者外周血外泌体中共有 53 种差异表达的 miRNAs (见图 1), LUSC 患者外周血外泌体中共有 62 种差异表达的 miRNAs (见图 2)。LUAD 与 LUSC 患者外周血外泌体中差异表达最显著的 10 种 miRNAs 中有 6 种是重合的, 分别为 miRNA-1228-5p、miRNA-129-5p、miRNA-760、miRNA-885-3p、miRNA-9-3p、miRNA-95-3p, 详见图 3。

2.3 筛选 NSCLC 患者特异性表达的 miRNAs 通过检索文献发现, 上述 6 种重合的 miRNAs 中仅 miRNA-9-3p 表达上调与 NSCLC 患者预后有关^[7]。通过比较 4 例 NSCLC 患者和 4 例健康志愿者外周血外泌体中 miRNA-9-3p 表达丰度发现, LUSC-1、LUSC-2、LUAD-1 及 LUAD-2 样品中 miRNA-9-3p 表达量分别为 71.51、15.61、13.99、16.11 TPM, 4 例健康志愿者外周血外泌体中 miRNA-9-3p 表达量均为 0。

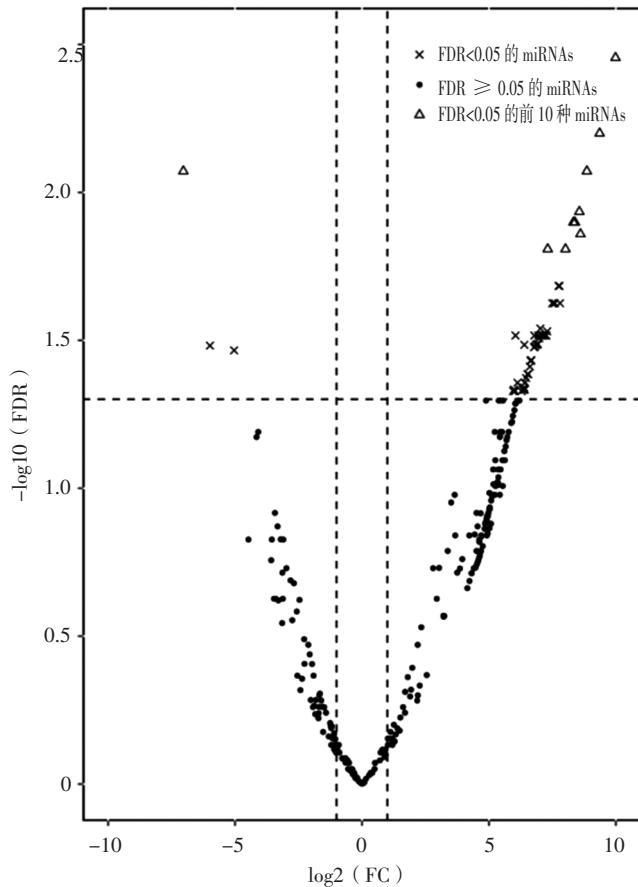
2.4 TCGA 中 LUAD 组织和 LUSC 组织与其配对的癌旁正常组织中 miRNA-9-3p 的表达差异 对 TCGA 中 39 对 LUAD 组织和配对的癌旁正常组织及 45 对 LUSC 组织和配对的癌旁正常组织中 miRNA-9-3p 测序数据进行对比发现, LUAD 组织和 LUSC 组织中 miRNA-9-3p 表达量分别高于其配对的癌旁正常组织(*t* 值分别为 -4.272 、 -6.600 , $P < 0.01$, 见图 4)。

表 2 4 例 NSCLC 患者和 4 例健康志愿者外周血外泌体 miRNAs 高通量测序结果

Table 2 High-throughput sequencing results of miRNAs in peripheral blood exosomes in the 4 patients with NSCLC and the 4 healthy volunteers

样品编号	测序原始数据量 (Mbp)	过滤后数据量 (Mbp)	过滤比 (%)	检测到的 miRNAs 数量 (种)
LUSC-1	876	627	71.61	1 048
LUSC-2	916	599	65.43	657
LUAD-1	898	661	73.61	705
LUAD-2	737	460	62.35	695
normal-1	819	741	90.39	317
normal-2	836	638	76.38	200
normal-3	1 129	697	61.7	225
normal-4	796	578	72.64	210
合计	7 007	5 001	-	-

注: MbP=兆碱基对, miRNAs=微小 RNA; “-”为无相关数据



注: FDR= 伪发现率, FC= 差异倍数, miRNAs= 微小 RNAs

图1 LUAD患者和健康志愿者外周血外泌体中miRNAs差异表达的火山图

Figure 1 Volcano plot for differentially expressed miRNAs in peripheral blood exosomes in patients with LUAD and healthy volunteers

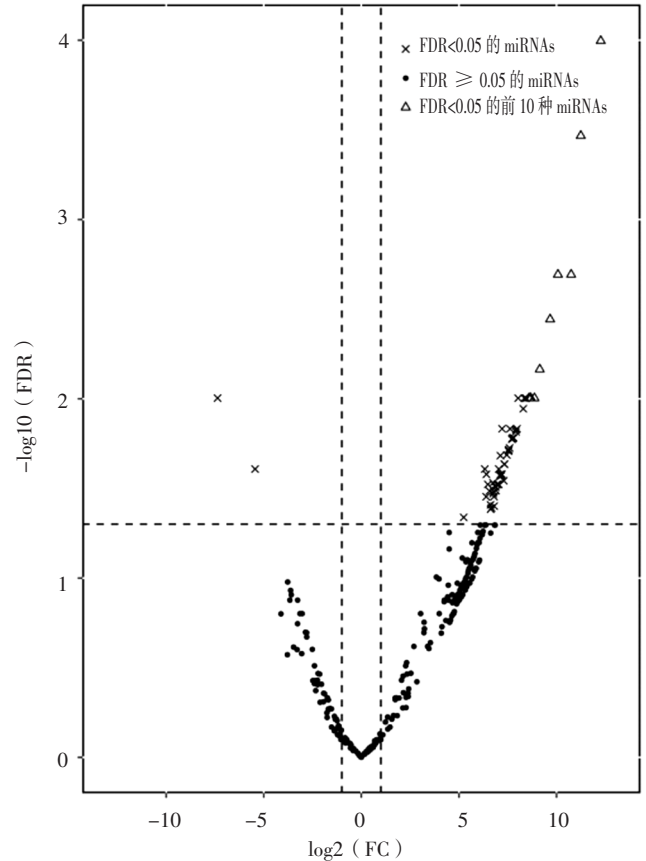
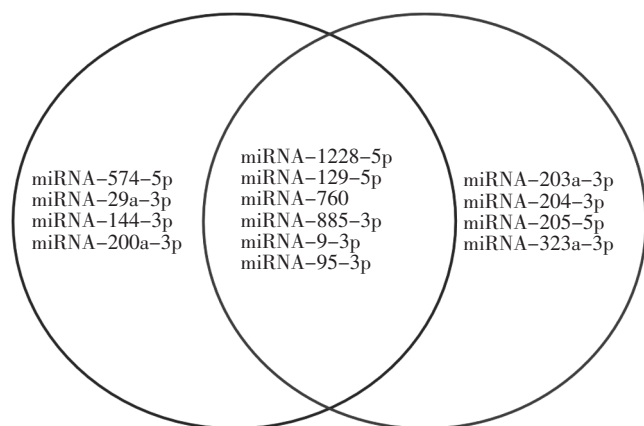


图2 LUSC患者和健康志愿者外周血外泌体中miRNAs差异表达的火山图

Figure 2 Volcano plot for differentially expressed miRNAs in peripheral blood exosomes in LUSC patients and healthy volunteers

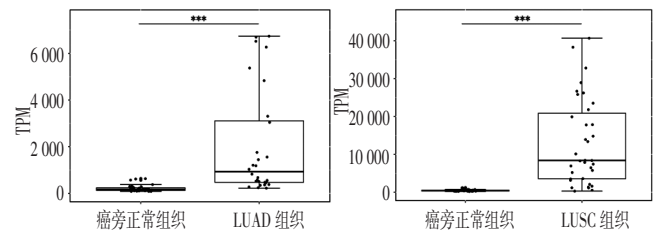
LUAD患者比健康志愿者 LUSC患者比健康志愿者



注: LUAD= 肺腺癌, LUSC= 肺鳞状细胞癌

图3 LUAD患者比健康志愿者与LUSC患者比健康志愿者外周血外泌体中差异表达最显著的10种miRNAs

Figure 3 The 10 miRNAs with the most significant expression difference in LUAD patients compared with healthy volunteers and LUSC patients compared with healthy volunteers



注: TPM= 转录本数

图4 TCGA中LUAD组织和LUSC组织与其配对的癌旁正常组织中miRNA-9-3p的表达量比较的箱式图

Figure 4 Box diagram for comparison of expression quantity of miRNA-9-3p between LUAD tissues, LUSC tissues and the matched normal paracancerous tissues in TCGA

3 讨论

本研究通过对4例NSCLC患者和4例健康志愿者外周血外泌体中miRNAs进行高通量测序并产生了一批高质量的miRNAs测序数据,之后将测序序列信息与miRBase数据库进行比对发现4例NSCLC患者外周血外泌体中平均检测到776种miRNAs,多于4例健康志愿者的238种,与既往研究报道的癌症患者血浆外泌体

中 miRNAs 数量明显多于正常人群相一致^[8-9]。国外研究表明,与正常组织相比,肿瘤组织会释放更多的外泌体到外周血中^[10],且该外泌体常携带特定的 miRNAs 并在肿瘤微环境中发挥信号沟通作用^[11],此外其还与肿瘤细胞的侵袭能力和肿瘤微环境有关^[12]。上述研究表明,NSCLC 患者肿瘤组织释放额外数量的外泌体可能携带来源于肿瘤细胞的特异性 miRNAs,而通过分析外泌体特异性组成可能成为癌症的辅助诊断工具。

本研究采用 DESeq2 软件分析 NSCLC 患者和健康志愿者外周血外泌体中差异表达的 miRNAs 并发现 LUAD 与 LUSC 患者外周血外泌体中差异表达最显著的 10 种 miRNAs 中有 6 种是重合的,提示该 6 种 miRNAs 可能是来源于 NSCLC 组织的特异性 miRNAs;之后笔者通过检索文献发现,上述 6 种重合的 miRNAs 中仅 miRNA-9-3p 表达上调与 NSCLC 患者预后有关,其可作为评估 NSCLC 患者预后的生物学标志物^[7]。本研究结果显示,4 例 NSCLC 患者外周血外泌体中均可检测到 miRNA-9-3p 的表达,而 4 例健康志愿者外周血外泌体中均未检测到 miRNA-9-3p 的表达;为了证实外周血外泌体中 miRNA-9-3p 来源于 NSCLC 组织,笔者对 TCGA 中 39 对 LUAD 组织和配对的癌旁正常组织及 45 对 LUSC 组织和配对的癌旁正常组织中 miRNA 测序数据进行对比并发现 LUAD 组织和 LUSC 组织中 miRNA-9-3p 表达量分别高于其配对的癌旁正常组织。

综上所述,通过高通量测序技术发现 miRNA-1228-5p、miRNA-129-5p、miRNA-760、miRNA-885-3p、miRNA-9-3p、miRNA-95-3p 可能是 NSCLC 患者潜在的特异性 miRNAs,其中 miRNA-9-3p 主要来源于 NSCLC 患者癌组织,这为后续通过外周血外泌体 miRNAs 测序而实现 NSCLC 的早期、无创诊断奠定了研究基础;但本研究样本量小,研究发现的 6 种潜在的特异性 miRNAs 在 NSCLC 发生发展过程中的作用机制尚不清楚,因此下一步需要扩大样本量进一步证实 NSCLC 患者外周血外泌体中特异性 miRNAs 并通过生物功能学实验深入探索其作用机制。

作者贡献:张婷进行文章的构思与设计,研究的实施与可行性分析,数据的收集、整理、分析,结果分析与解释,并负责撰写论文;王凌伟负责文章的质量控制及审校,对文章整体负责,监督管理。

本文无利益冲突。

参考文献

[1] TORRE L A, BRAY F, SIEGEL R L, et al.Global cancer statistics, 2012 [J].CA Cancer J Clin, 2015, 65: 87-108.

[2] PAN B T, TENG K, WU C, et al.Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes [J].J Cell Biol, 1985, 101 (3): 942-948.DOI: 10.1083/jcb.101.3.942.

[3] ZHANG X, YUAN X, SHI H, et al.Exosomes in cancer: small particle, big player [J].J Hematol Oncol, 2015, 8: 83.

[4] INAMURA K, ISHIKAWA Y.MicroRNA in lung cancer: novel biomarkers and potential tools for treatment [J].J Clin Med, 2016, 5 (3): E36.DOI: 10.3390/jcm5030036.

[5] KOZOMARA A, GRIFFITHS-JONES S.MiRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data [J].Nucleic Acids Res, 2011, 39 (Database issue): D152-157.DOI: 10.1093/nar/gkq1027.

[6] LOVE M I, HUBER W, ANDERS S.Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2 [J].Genome Biol, 2014, 15 (12): 550.DOI: 10.1186/s13059-014-0550-8.

[7] XU T, LIU X, HAN L, et al.Up-regulation of miR-9 expression as a poor prognostic biomarker in patients with non-small cell lung cancer [J].Clin Transl Oncol, 2014, 16 (5): 469-475.DOI: 10.1007/s12094-013-1106-1.

[8] BHOME R, DEL VECCHIO F, LEE G H, et al.Exosomal microRNAs (exomiRs): Small molecules with a big role in cancer [J].Cancer Lett, 2018, 420: 228-235.DOI: 10.1016/j.canlet.2018.02.002.

[9] 元小宁,朱运峰.外泌体(Exosome)及其在肿瘤调控中的作用[J].中国生物工程杂志, 2013, 33 (8): 106-112.DOI: 10.13523/j.cb.20130817.

[10] ANDRE F, SCHATZ N E, MOVASSAGH M, et al.Malignant effusions and immunogenic tumour-derived exosomes [J].Lancet, 2002, 360 (9329): 295-305.DOI: 10.1016/S0140-6736 (02) 09552-1.

[11] CHALLAGUNDLA K B, WISE P M, NEVIANI P, et al.Exosome-mediated transfer of microRNAs within the tumor microenvironment and neuroblastoma resistance to chemotherapy [J].J Natl Cancer Inst, 2015, 107 (7).pii: djv135.DOI: 10.1093/jnci/djv135.

[12] PAN J H, ZHOU H, ZHAO X X, et al.Role of exosomes and exosomal microRNAs in hepatocellular carcinoma: Potential in diagnosis and antitumour treatments (Review) [J].Int J Mol Med, 2018, 41 (4): 1809-1816.DOI: 10.3892/ijmm.2018.3383.

(收稿日期: 2019-06-16; 修回日期: 2019-11-05)

(本文编辑: 谢武英)