



DOI: 10.3969/j.issn.2095-1264.2023.04.10

文章编号: 2095-1264(2023)04-0461-05

## 结肠癌患者血清外泌体 miR-320 的表达 及其临床意义

王治帮, 关道宏, 谢彝忠

(海南省肿瘤医院 普外科, 海南海口, 570000)

**摘要:** **目的** 分析结肠癌患者血清外泌体 miR-320 的表达及其临床意义。**方法** 选取 2018 年 4 月至 2020 年 4 月我院收治的 50 例结肠癌患者纳入研究, 另选取 50 例体检健康者纳入对照组, 收集两组的血清样本, 采用 RT-qPCR 法检测血清外泌体中 miR-320 的表达, 并分析其对结肠癌的诊断价值。**结果** 纯化的血清样品中存在大量外泌体颗粒, 其特性与其他相关研究报道一致。结肠癌患者血清外泌体中 miR-320 的相对表达量明显低于健康对照组 [(0.69±0.23) vs. (1.53±0.48),  $t=11.16$ ,  $P<0.001$ ]。血清外泌体 miR-320 诊断结肠癌的曲线下面积为 0.871 (95% CI: 0.596~0.925), 诊断敏感度为 90.73%, 特异度为 82.43%。**结论** 结肠癌患者血清外泌体中 miR-320 表达下调, 可能作为结肠癌早期诊断的评价指标。

**关键词:** 结肠癌; 血清外泌体; miR-320; 表达

**中图分类号:** R375.3 **文献标识码:** A

## Expression and clinical significance of serum exosome miR-320 in patients with colon cancer

WANG Zhibang, GUAN Daohong, XIE Yizhong

(Hainan Cancer Hospital, Haikou, 570000, Hainan, China)

**Abstract: Objective** To analyze the expression and clinical significance of serum exosome miR-320 in patients with colon cancer. **Methods** A total of 50 patients with colon cancer admitted in our hospital between April 2018 and April 2020 were included in the study, and 50 healthy patients were included in the control group. The serum samples were collected from the two groups, and the expression of miR-320 in serum exosomes was detected by RT-qPCR method, and the diagnostic value of colon cancer was analyzed. **Results** There were a large number of exosome particles in the purified serum samples, and its characteristics were consistent with those reported in other relevant research. The relative expression of miR-320 in serum exosomes of patients with colon cancer was significantly lower than that of healthy controls [(0.69±0.23) vs. (1.53±0.48),  $t=11.16$ ,  $P<0.001$ ]. The area under the curve for serum exosome miR-320 in the diagnosis of colon cancer was 0.871 (95% CI: 0.596~0.925), with the diagnostic sensitivity of 90.73%, and the specificity of 82.43%. **Conclusion** The expression of miR-320 was down-regulated in the serum exosomes of patients with colon cancer. The miR-320 in serum exosome may become an evaluation indicator for early diagnosis of colon cancer.

**Keywords:** Colon cancer; Serum exosome; miR-320; Expression

### 前言

结肠癌为临床常见恶性肿瘤之一, 其早期诊断

一直是临床关注的重点<sup>[1]</sup>。miRNA 为内源性非编码小分子 RNA, 可在多种组织中表达, 参与细胞的增殖、分化等过程, 且组织特异性良好<sup>[2]</sup>。既往研究表

明,miRNA 与多种恶性肿瘤的发生、发展有关<sup>[3]</sup>。但临床研究大多基于癌组织或细胞中 miRNA 的差异化表达,组织样本主要通过穿刺、手术等方式获取,不便于临床广泛筛查。最近研究显示,外周血 miRNA 可能作为肿瘤早期诊断的标志物,但由于血清成分较为复杂,可能影响检测结果<sup>[4]</sup>。有资料显示,miRNA 在血清外泌体中稳定存在。外泌体可介导 miRNA 转运,有利于 miRNA 在循环系统中稳定表达,且不同肿瘤中 miRNA 的表达不同,推测不同肿瘤患者血清外泌体中 miRNA 的表达可能不同<sup>[5]</sup>,这使得血清外泌体 miRNA 具备了成为肿瘤标志物的条件。因此,本研究对近年收治的结肠癌患者进行研究,旨在探讨血清外泌体 miR-320 诊断结肠癌的临床价值。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选取 2018 年 4 月至 2020 年 4 月期间我院收治的 50 例结肠癌患者纳入研究。病例均经组织病理检查证实为结肠癌,且排除合并其他恶性肿瘤、急性感染等病例。其中,男性患者 21 例,女性患者 29 例;年龄 38~70 岁,平均年龄(57.02±4.15)岁。另选取 50 例同期体检健康者作为对照组,男性 27 例,女性 23 例;年龄 34~69 岁,平均年龄(56.71±3.83)岁。两组性别及年龄无显著差异( $P>0.05$ )。本研究经本院医学伦理委员会审批通过,且入组人员均知情同意。

### 1.2 方法

**1.2.1 样本收集** 收集样本前,患者均未接受手术治疗或放化疗。采集两组空腹静脉血 5~8 mL,结肠癌组于确诊当日采集,健康对照组于体检当日采集。采集的样本经离心(3 000 r·min<sup>-1</sup> 10 min)处理后,留取上层血清,置于-80 °C 冰箱保存。

**1.2.2 外泌体提取及鉴定** 采用 ExoQuick-TM 试剂盒(日本 SBI 公司)提取血清外泌体。提取后,将外泌体样品染色并置于 JEM-2100F 型透射电子显微镜(日本电子株式会社)下观察颗粒形态。采用蛋白质免疫印迹法(Western blotting)检测外泌体表面的蛋白标志物,抗体包括羊抗兔二抗(深圳市安捷生物科技有限公司)、CD63 抗体(武汉菲恩生物科技有限公司)、CD9 抗体(武汉菲恩生物科技有限公司)、Calnexin 抗体(巴傲得生物科技有限公司)及 TSG101 抗体(美国 abcam 公司)。采用 Nanosight 纳米颗粒跟踪分析仪(英国马尔文仪器有限公司,型

号 NS300)检测外泌体颗粒浓度,稀释样品,浓度为 $1\times 10^8\sim 1\times 10^9$ 个/mL,检测阈值设为 5。

**1.2.3 血清外泌体 miR-320 检测** 采用 TRIzol 试剂盒(碧云天生物技术有限公司)提取外泌体样品中的总 RNA。逆转录反应严格按照逆转录试剂盒(碧云天生物技术有限公司)说明书操作,反应体系 20  $\mu$ L:RNA 样品 2  $\mu$ L、引物 1  $\mu$ L、逆转录酶 1  $\mu$ L、5 $\times$ RT 缓冲液 4  $\mu$ L、GAPDH 反向引物 1  $\mu$ L、RNase 抑制剂 0.5  $\mu$ L、dNTP 混合物(10 mmol·L<sup>-1</sup>) 1  $\mu$ L、不含 RNase 的水 9.5  $\mu$ L。采用实时荧光定量 PCR 扩增仪对 miR-320 进行定量检测,反应体系 25  $\mu$ L:稀释的 cDNA 2  $\mu$ L、引物 2  $\mu$ L、SYBR 12.5  $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O 8.5  $\mu$ L。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算结果,以 miR-39 为外参基因,血清外泌体 miR-320 相对表达量= $2^{-\Delta C_t_{miR-320}}/2^{-\Delta C_t_{miR-39}}$ 。

**1.3 统计学分析** 采用 SPSS 21.0 统计学软件进行数据分析,计量资料以均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,采用  $t$  检验;计数资料以率(%)表示,采用  $\chi^2$  检验;采用受试者操作特征曲线(receiver operating characteristic curve, ROC)评价血清外泌体 miR-320 的诊断价值, $P<0.05$  为差异有统计学意义。

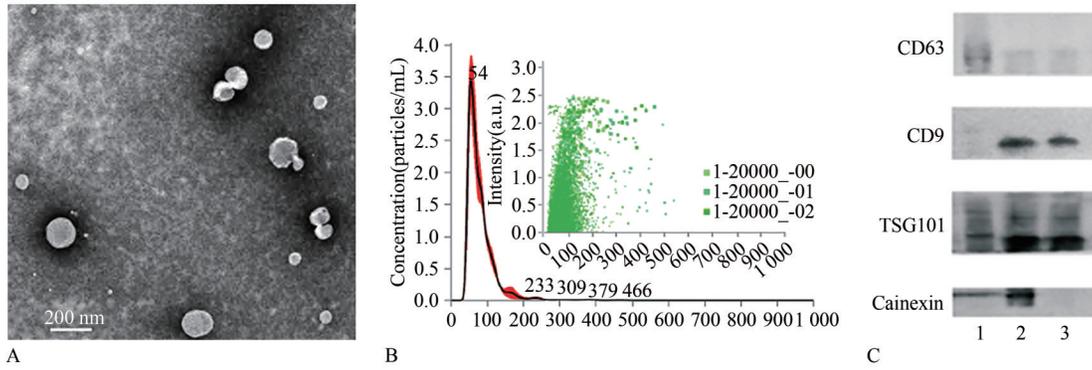
## 2 结果

**2.1 血清外泌体的鉴定** 电子显微镜视野内可见直径约为 100 nm 的圆形颗粒,呈脂质双层膜囊状。Nanosight 结果显示,样品中颗粒主要分布于 35~190 nm,且分散均匀,颗粒直径呈单峰正态分布。Western blotting 结果显示,样品中外泌体表面有外泌体标志蛋白表达,细胞膜标志蛋白 Calnexin 呈高表达(图 1)。以上结果说明纯化的血清样品中存在大量外泌体颗粒。

**2.2 血清外泌体 miR-320 相对表达量** 结肠癌组血清外泌体 miR-320 相对表达量明显低于健康对照组 [(0.69±0.23) vs. (1.53±0.48),  $t=11.16$ ,  $P<0.001$ ](图 2)。

**2.3 miR-320 与结肠癌患者临床特征的关系** 不同临床分期、不同分化程度及是否出现淋巴结转移的结肠癌患者血清中外泌体 miR-320 的相对表达量比较,差异有统计学意义( $P<0.05$ )(表 1)。

**2.4 ROC 曲线分析** 血清外泌体 miR-320 诊断结肠癌的 ROC 曲线下面积为 0.871(95% CI: 0.596~0.925),诊断敏感度为 90.73%,特异度为 82.43%(图 3)。



注:(A)电镜下外泌体颗粒形态;(B)颗粒直径分布图;(C) Western blotting 检测结果。

Note: (A) The shape of exosomes particles under electron microscope; (B) Particle diameter distribution diagram; (C) Results of Western blotting.

图1 血清外泌体的鉴定

Fig. 1 Identification of serum exosomes

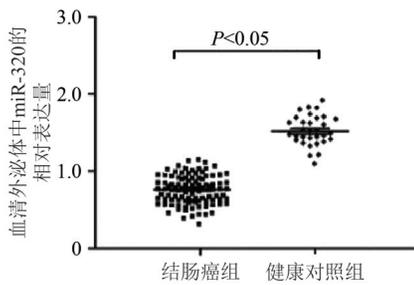


图2 血清外泌体 miR-320 相对表达量分析

Fig. 2 Analysis of the relative expression of miR-320 in serum exosomes

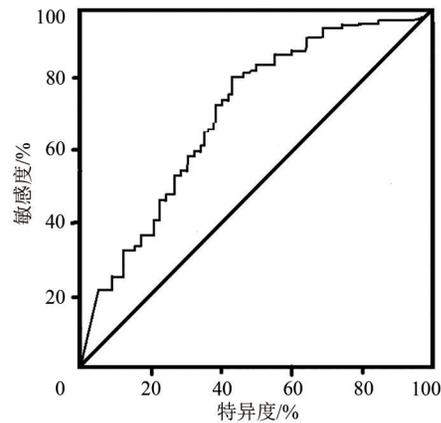


图3 ROC 曲线分析

Fig. 3 ROC curve analysis

表1 miR-320 与结肠癌患者临床特征的关系

Tab. 1 The relationship between miR-320 and the clinical characteristics of colon cancer patients

临床特征	n	血清外泌体 miR-320 相对表达量	t	P
性别			1.025	0.310
男	21	0.67±0.09		
女	29	0.70±0.11		
年龄			0.810	0.422
<50岁	26	0.71±0.14		
≥50岁	24	0.68±0.12		
肿瘤直径			0.581	0.564
<5 cm	23	0.70±0.11		
≥5 cm	27	0.68±0.13		
临床分期			3.375	0.001
I ~ II期	32	0.73±0.10		
III ~ IV期	18	0.64±0.07		
分化程度			7.111	<0.001
中低分化	34	0.57±0.05		
高分化	16	0.74±0.12		
淋巴结转移			9.558	<0.001
有	31	0.52±0.08		
无	19	0.79±0.12		

### 3 讨论

临床上,结肠癌的早期症状较为隐匿,约75%~85%的患者确诊时已错过手术治疗时机<sup>[6]</sup>。因此,临床应重视结肠癌的早期诊断。随着临床对结肠癌诊断标志物的深入研究,miRNA被发现与肿瘤的发生和进展有关。miRNA为一类具有高时序性、保守性、组织特异性等特征的内源性非编码RNA。既往研究报道,miR-98-5p<sup>[7]</sup>、miR-145<sup>[8]</sup>、miR-183<sup>[9]</sup>等多种miRNA在结肠癌组织中表达异常。虽然miRNA可用于结肠癌的早期诊断,但目前多数研究均以结肠癌组织或细胞作为检测miRNA的样本,而样本的采集一般通过穿刺或有创手术进行,相对繁琐,因此不适用于结肠癌的普遍筛查。

有资料显示,miRNA在人体血液、胸腔积液、脑脊液、尿液等体液中均有表达,其中,外周血中miRNA的表达受到临床广泛关注<sup>[10]</sup>。徐菲菲等<sup>[11]</sup>研究

报道,结直肠癌患者血清中 miR-194 和 miR-497 呈高表达。另有学者报道,miR-224-3p 在结直肠癌患者血清中呈高表达<sup>[12]</sup>。由以上结果可知,血清 miRNA 有可能成为结肠癌临床诊断的评价指标。但血清中包含蛋白质、类脂、无机盐等复杂成分,可能对血清 miRNA 的检测造成一定影响。既往研究显示,血清外泌体的成分没有血清复杂,其中 miRNA 的存在形式稳定,且检测样本容易获得,分离纯化技术较完善<sup>[13]</sup>。此外,外泌体在 4 °C 环境下可保存 2 周,在 -20 °C 环境下可保存 5 年,这为血清外泌体 miRNA 成为肿瘤评价指标提供了可能性。

本研究显示,结肠癌患者血清外泌体中 miR-320 的相对表达量明显低于健康对照组 ( $P < 0.001$ ),提示血清外泌体中 miR-320 异常表达可能与结肠癌有关。既往研究报道,miR-320 可抑制结肠癌细胞增殖和侵袭,可能是结肠癌的治疗靶点<sup>[14]</sup>。余海婷等<sup>[15]</sup>对 70 例结直肠癌患者进行研究发现:miR-21 和 miR-92a 在结直肠癌患者血清外泌体中呈高表达,血清外泌体 miR-21 与结直肠癌肝转移有关,血清外泌体 miR-92a 与结直肠癌临床分期、淋巴结转移、浸润程度等相关,二者可用于结直肠癌患者的病情评估。由以上研究结果推测,血清外泌体 miRNA 可能成为结肠癌临床诊断的评价指标。

进一步通过 ROC 曲线分析发现,血清外泌体 miR-320 诊断结肠癌的曲线下面积为 0.871 (95% CI: 0.596~0.925),敏感度为 90.73%,特异度为 82.43%,提示血清外泌体 miR-320 对结肠癌具有较高的诊断价值。其原因可能是由于外泌体表面的脂膜阻断了酶对其中 miRNA 和蛋白的降解,使得外泌体的稳定性较高,故而对外泌体 miR-320 的检测具有较好的特异性和稳定性。杨晓等<sup>[16]</sup>研究报道,外泌体中含多种特异性分子,可能成为结直肠癌早期诊断的理想标志物。陈欢等<sup>[17]</sup>研究报道,外泌体 miRNA 对结直肠癌早期临床诊断具有重要价值。Tang 等<sup>[18]</sup>研究报道,血清外泌体 miR-320 是一项非侵入性诊断生物标志物,可用于区分转移性和非转移性大肠癌。以上研究表明,血清外泌体 miRNA 参与了肿瘤的发生,是一类可用于预测肿瘤的标志物,血清外泌体 miR-320 检测作为一项非侵袭性肿瘤诊断技术,值得临床借鉴。

综上所述,结肠癌患者血清外泌体中 miR-320 表达下调,可能成为结肠癌早期诊断的评价指标。同时,本研究也存在一定不足,由于受样本量限制,

未能对 miR-320 在结肠癌发生和进展中的作用机制进行探究,今后会继续收集相关样本,深入探讨血清外泌体 miRNA 与结肠癌的关系,以期能为结肠癌的早期诊疗提供更有价值的参考依据。

## 参考文献

- [1] ZHANG W L, XIAO J, LU X M, et al. PVT1 (rs13281615) and miR-146a (rs2910164) polymorphisms affect the prognosis of colon cancer by regulating COX2 expression and cell apoptosis [J]. J Cell Physiol, 2019, 234(10): 17538-17548. DOI: 10.1002/jcp.28377.
- [2] 祝磊,李炳强,陈晨. miRNA-145 对结肠癌细胞体外增殖、侵袭、凋亡的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2019, 35(5): 575-578. DOI: 10.3969/j.issn.1000-484X.2019.05.012.
- [3] 李琰,杨博. 3D 腹腔镜下全结肠系膜切除术后对右半结肠癌患者术后 microRNA-101 和 CD4<sup>+</sup> 水平变化及局部复发率的影响[J]. 中国内镜杂志, 2019, 25(4): 24-31. DOI: 10.3969/j.issn.1007-1989.2019.04.005.
- [4] DING X Q, WANG Z Y, XIA D, et al. Proteomic profiling of serum exosomes from patients with metastatic gastric cancer [J]. Front Oncol, 2020, 10: 1113. DOI: 10.3389/fonc.2020.01113.
- [5] KATO T, MIZUTANI K, KAWAKAMI K, et al. CD44v8-10 mRNA contained in serum exosomes as a diagnostic marker for docetaxel resistance in prostate cancer patients [J]. Heliyon, 2020, 6(7): e04138. DOI: 10.1016/j.heliyon.2020.e04138.
- [6] FRYDENBERG H, HARSEM N K, OFIGSBØ Å, et al. Chemotherapy during pregnancy for advanced colon cancer: a case report [J]. Clin Colorectal Cancer, 2020, 19(2): 141-144. DOI: 10.1016/j.clcc.2020.02.013.
- [7] 李红,邓文英,赵玉州,等. miRNA-98-5p 靶向 HMGA2 调控结直肠癌细胞增殖、侵袭和上皮间质转化[J]. 现代肿瘤医学, 2019, 27(20): 3565-3571. DOI: 10.3969/j.issn.1672-4992.2019.20.005.
- [8] 程先硕,刘萍,杨之斌. miRNA-145 在结直肠癌中的作用及临床应用价值研究进展[J]. 实用肿瘤杂志, 2019, 34(3): 273-276. DOI: 10.13267/j.cnki.syzlzz.2019.03.018.
- [9] 董然,朱晓雷. microRNA-183 抑制结直肠癌肿瘤细胞的增殖、侵袭及迁移[J]. 现代肿瘤医学, 2019, 27(13): 2267-2271. DOI: 10.3969/j.issn.1672-4992.2019.13.009.
- [10] 赵钊,葛玉梅,陈盼盼,等. 胰腺癌患者血清外泌体 miRNA 表达谱分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2018, 28(12): 1464-1466.
- [11] 徐菲菲,陈昭华,王亚南. microRNA-194 及 microRNA-497 在结直肠癌患者血清中的表达和临床意义[J]. 检验医学与临床, 2019, 16(14): 1997-2000. DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2019.14.013.
- [12] 朱莹,王亚南. 血清 microRNA-224-3p 在结直肠癌中的表达及临床研究[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(13): 1548-1552. DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2019.13.004.
- [13] 刘玉山,闫红江,李春雨. 血清外泌体 miRNA-184 在非小细胞肺癌中的表达水平及其诊断效能[J]. 癌症进展, 2019, 17(4): 411-414. DOI: 10.11877/j.issn.1672-1535.2019.17.04.11.
- [14] 董伟,戴涵斌,朱沛枫,等. miR-320 靶向调控 FoxM1 对结肠癌 SW480 细胞增殖、侵袭的影响[J]. 中国现代医生, 2019, 57(26): 33-36.
- [15] 余海婷. 联合检测血清外泌体 miR-21 和 miR-92a 表达水平在结直肠癌患者中的临床意义[D]. 广州:南方医科大学, 2017.

- [16] 杨晓, 罗燕, 李勇敏, 等. 外泌体在大肠癌中的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(6): 182-188. DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.20180672.
- [17] 陈欢, 向彦臻, 袁泽婷, 等. 外泌体介导的微小 RNA 在结肠癌诊断预后的研究现状[J]. 中国临床药理学杂志, 2019, 35(16): 1820-1822. DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2019.16.028.
- [18] TANG Y Y, ZHAO Y J, SONG X G, et al. Tumor-derived exosomal miRNA-320d as a biomarker for metastatic colorectal cancer [J]. *J Clin Lab Anal*, 2019, 33(9): e23004. DOI: 10.1002/jcla.23004.

收稿日期: 2020-06-08 校稿: 王娟 李征

本文引用格式: 王治帮, 关道宏, 谢彝忠. 结肠癌患者血清外泌体 miR-320 的表达及其临床意义[J]. *肿瘤药学*, 2023, 13(4): 461-465. DOI: 10.3969/j.issn.2095-1264.2023.04.10.

Cite this article as: WANG Zhibang, GUAN Daohong, XIE Yizhong. Expression and clinical significance of serum exosome miR-320 in patients with colon cancer [J]. *Anti-tumor Pharmacy*, 2023, 13(4): 461-465. DOI: 10.3969/j.issn.2095-1264.2023.04.10.

## 《肿瘤药学》杂志审稿专家

(按姓名拼音排序)

白 勇	蔡净亭	曹 伟*	陈 刚	陈金洋	陈 力	陈临溪	陈 攀*
陈 坡	陈珊珊*	陈 帅	陈 翔	陈兴贵	陈 雪	谌 贇	成舒乔
程 凯	程 岩	戴 森	戴 助*	邓 敏	邓 坦	邓锡云	邓银华
邓玉屏	丁 一	杜灵彬	范 刚	范洁琳	范 磊	方 堃	方唯意
冯剑波	冯智军*	符一岚*	付滢舟	高水超	郭丽娜	韩正祥	郝志英*
何 枫	何 欣	何 奕	贺怡子	衡建福	洪 婷*	侯 静	胡 蕾
胡英斌	胡哲煜	黄 赛	黄闻欢*	黄 奕	贾罄竹	蒋 倩	蒋 涛
蒋文娟	蒋小剑	金 一	雷 光	雷 坚*	李贵玲	李国文	李海涛
李 贺*	李金兰*	李 凌*	李明君	李 宁	李奇灵	李清林	李秋华
李 威(湖南)	李 威(上海)	李 武	李湘平	李心亮	李亚军	李 妍	李 洋
李跃军	李 芸	李 政	李志铭	李子明	廖德华	廖乙媚	林 琴
刘 芬	刘 峰	刘高明	刘 红	刘 洪	刘 怀	刘继勇	刘 珈
刘 俊*	刘 科	刘 黎	刘 利*	刘 路*	刘 森*	刘 妮	刘 念
刘 鹏(北京)	刘 鹏(湖南)	刘 韶	刘天舒	刘 文	刘文辉	刘香丽	刘晓慧
刘新福	刘学文	刘 耀	刘艺平	刘 颖(北京)	刘 颖*(湖南)	刘兆喆	刘志刚
刘志中	刘治国	龙红萍	龙 瀛	鲁智豪	罗 嘉	罗 茜	罗尧岳
毛超安	毛 婷	梅 恒	蒙光义	倪士峰	宁贻崇	欧阳磊	欧阳琳达
潘常愜	彭文颖*	彭向东	彭 杨*	蒲兴祥*	全香花	任 欢	戎佩佩
申 竝	申莹莹	沈 波	石 峰	石 卉	石泽亚	史 琛	宋 程
宋香清	宋永喜	宋正波	苏 晨	苏 婧	苏 敏	孙 鹏	孙 涛
孙 未	覃 丽	汤梦婕	唐海林	唐 洁	唐静怡	唐 田	唐艳艳
佟仲生	涂 剑	万小敏	王碧芸	王贺冉	王 俊	王 念	王胜峰
王树森	王 涛*	王晓稼	王 瑛	王志远	王子毅	魏永长	温 灏
吴宏伟	吴 晖	吴辉菁	吴俚蓉	吴娜怡园	吴文一*	吴 峥	席加喜
夏隆政*	夏月峰	夏铮铮	向 波	向 往	向左娟	肖海帆	肖洪涛
肖 华	肖 坚*	肖 凯	肖 玲	肖 帅	谢建飞	谢明颖	谢 宁
谢伟彬	谢阳春	谢 宇	熊 炜	徐崇锐	徐建国	徐康平	徐芹芹
许湘华	颜 苗	颜仕鹏	阳 帆	杨海燕	杨 蕙	杨 娟	杨 烁
杨云鹏	叶子奇	易 斌	尹 月	于鲁海	于芝颖	袁 芑	袁 霞*
曾宏亮	曾 理	曾 亮	曾媚姿	曾 珊	曾卫强	张春波	张家兴
张乐蒙*	张瑞光	张师前	张英丽	张永昌*	赵德华	赵东陆	郑 虹
钟 警	钟外生	钟 喆	周春花	周殿友*	周英玲	周文虎	周于禄
周钰娟	周泽平	邹冬玲	邹双发	左笑丛			

标\*的为本期审稿专家