

引用本文:刘洪霞,唐荔,尚观胜.外泌体微小RNA作为肺癌标志物的研究进展[J].安徽医药,2022,26(3):425-428.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2022.03.001.



◇ 综述 ◇

外泌体微小RNA作为肺癌标志物的研究进展

刘洪霞^{1,2},唐荔^{1,2},尚观胜³

作者单位:¹四川大学华西医院呼吸与危重症医学科MICU,四川 成都610041;

²四川大学华西护理学院,四川 成都610041;

³成都市第七人民医院胸外科,四川 成都610041

通信作者:尚观胜,男,副教授,硕士生导师,研究方向为胸肺基础疾病与肿瘤,Email:Sgs0804@163.com

基金项目:四川省教育厅重点项目(17ZA0136)

摘要: 肺癌是当今致死率较高的癌症之一,其早期诊断对于提高治疗效果至关重要。外泌体是肿瘤细胞信号传导过程中的一种重要方式,其内容物包括蛋白质、脂类物质、mRNAs、微小RNA(microRNAs)等。肿瘤细胞和微环境中其他细胞均可以向细胞外基质中释放外泌体,进而参与调控肿瘤的发生和发展。外泌体可体现其来源细胞的部分重要生物学特点,在多种疾病中具有良好的诊断应用前景,以液体诊断领域为甚。该研究从外泌体的生成和作用入手,对外泌体microRNAs在肺癌诊断标志物中的最新研究进展进行综述。

关键词: 肺肿瘤; 外泌体; 微小RNA; 标志物; 诊断; 总生存期

Research progress on exosomal microRNAs as markers of lung cancer

LIU Hongxia^{1,2},TANG Li^{1,2},SHANG Guansheng³

*Author Affiliations:*¹Department of Medical Intensive Care Unit, Respiratory and Critical Care Medicine, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, China; ²West China School of Nursing, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, China; ³Department of Thoracic Surgery, Chengdu Seventh People's Hospital, Chengdu, Sichuan 610041, China

Abstract: Lung cancer is one of the most lethal cancers today, and its early diagnosis is essential to improve treatment outcomes. Exosomes are an important method of signal transduction in tumor cells, and their contents include proteins, lipids, mRNAs, microRNAs, etc. Tumor cells and other cells in the microenvironment can release exosomes into the extracellular matrix and then participate in the regulation of tumor occurrence and development. Exosomes can reflect some of the important biological characteristics of the cells from which they are derived and have good diagnostic application prospects in various diseases, especially in the field of liquid diagnosis. This article starts with the generation and function of exosomes and reviews the latest research progress on exosomal microRNAs in the diagnosis of lung cancer.

Key words: Lung neoplasms; Exosomes; MicroRNAs; Marker; Diagnosis; Overall survival

目前肺癌死亡人数在全世界癌症相关死亡病人中占据首位^[1],病理分型主要为非小细胞肺癌和小细胞肺癌两大类。近年来,随着肺癌研究的长足进展和治疗手段的多样化,肺癌病人总生存期有所上升,但总体预后相较于其他恶性肿瘤仍有一定差距。肺癌的早期诊治可延长患者生存周期,改善预后,但隐匿性强、无特异性表现,早期诊断较为困难,发病就诊时大部分已处于中晚期,治疗效果不佳。生物标志物是反映恶性肿瘤发生、发展的重要物质,因此监测合理高效的标志物对早期诊治恶性肿瘤、增加患者生存率具有重要意义^[2-3]。

外泌体是一种双层膜结构的小囊泡,大小在

30~200 nm之间,起源于内体。几乎所有哺乳动物的细胞都能分泌外泌体,外泌体内容物包括蛋白质、脂类物质、mRNAs、微小RNA(microRNAs, miR)等,它们可以反映来源细胞的生物学特点^[4]。在正常和病理情况下,细胞通过合成并排出外泌体参与相应靶细胞的调控,包括肿瘤的生成和进展^[5]。

肿瘤来源的外泌体扮演信息传递的重要角色,将肿瘤细胞和肿瘤微环境的多种细胞成分紧密联系在一起。一方面,外泌体可通过改造间质细胞、免疫细胞等介导肿瘤的发生和发展。另一方面也可以进入血液和淋巴循环中到达其他器官,参与肿瘤的侵袭和远处转移。近年来,越来越多的研究表

明肿瘤外泌体中的 microRNAs 是介导外泌体功能的关键分子^[6-8]。本研究介绍外泌体的生成和作用,并重点综述外泌体 microRNAs 在肺癌诊断中的最新研究进展。

1 外泌体的生成和作用

外泌体的生成过程涉及两次胞膜内陷以及胞内多泡体的生成。第一次胞膜内陷形成一杯状结构,其内含有膜表面蛋白和细胞外环境中的可溶性蛋白、脂类物质、代谢产物和胞外液体等,进一步形成早期内体^[9],早期内体成熟为晚期内体并最终产生多泡体。多泡体进行第二次胞膜内陷,这一过程完成后可以生成多个管腔内囊泡。通常情况下,多泡体有两个结局,一是被降解,需要溶酶体或者自噬体的参与;二是成为外泌体,通过与胞膜融合,进而释放管腔内囊泡而完成^[10-11]。在人体的多种体液中均可检测到外泌体的存在,如唾液、血液、尿液、乳汁、脑脊液和胸腔积液等。细胞的类型、生长环境、细胞状态等都会影响外泌体的生成。

外泌体的主要作用是信息传递。靶细胞可通过大泡饮、网格蛋白依赖、受体配体结合等方式将外泌体摄入^[12-13]。外泌体释放内容物引起靶细胞表型和分子机制方面的改变,从而参与调控多种生物学过程,如新生血管形成、体液和细胞免疫反应、组织再生,以及肿瘤的产生和进展。肿瘤细胞释放的外泌体可被血管细胞摄取,导致血管生成相关的多个基因表达上调,增加肿瘤内血管数量,促进肿瘤体积增大^[14]。Hoshino 等^[15]研究发现部分器官的特异性细胞可摄取来源于肿瘤的外泌体,为肿瘤转移创造适宜的微环境。

从生成过程可看出外泌体大小不一,其内含有的蛋白、脂类物质和 RNAs 种类也不同,因此人们观察到的靶细胞反应是外泌体这一混合群体的共同作用。随着单个外泌体检测技术的发展,对其研究会更为精确。如香港科技大学团队开发了基于液滴的单个外泌体酶联免疫计数技术,可以精确定量肿瘤病人血清中的特异性外泌体,有望用于肿瘤早期诊断^[16]。

2 外泌体中 microRNAs 参与肺癌发生发展

肺癌细胞来源外泌体可在肿瘤细胞和肿瘤微环境组分之间传递信息,参与肺癌发生发展的多个方面。

(1)作用血管内皮细胞,增加新生血管数量。在低氧条件下,肺癌细胞产生的外泌体数量增加,miR-23a 分子表达显著升高,直接抑制靶分子脯氨酸羟化酶(PHD)1 和 PHD2,引起内皮细胞中缺氧诱导因子(HIF)-1 α 富集,进而促进肺癌组织血管化。

miR-23a 还可作用于紧密连接蛋白 ZO-1,调节血管通透性^[17]。Liu 等^[18]通过体外细胞实验研究发现恶性转化的人支气管上皮细胞可将富含 miR-21 的外泌体转移至血管内皮细胞,增加新生血管数量,此研究发现外泌体可促进新生血管形成,为恶性肿瘤的发展与侵袭创造有利条件。

(2)作用肺癌细胞,促进肿瘤生长、转移和耐药。研究发现肺癌外泌体 miR-96 的表达与肿瘤分期和侵袭呈正性相关^[19]。肺癌外泌体能够促进细胞生长和迁移,如向细胞内转染 miR-96 抑制剂则可显著抑制肿瘤生长。He 等^[20]经高通量测序分析发现来源于高侵袭性肺癌细胞的外泌体中 miR499a 呈高表达。miR499a 可作用于哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路,促进肿瘤细胞生长和迁移。Qin 等^[21]体外建立了顺铂耐药的肺癌细胞系,对其外泌体进行 microRNAs 表达谱芯片分析。在耐药细胞释放的外泌体中,有 11 个 microRNAs 的含量显著增加,有 31 个含量显著降低,其中下降最为明显者为 miR-100-5p(下降达 75%)。在小鼠肿瘤内注射 miR-100-5p,使用顺铂治疗 35 d 后,小鼠肿瘤体积显著增大,显示外泌体中 miR-100-5p 的缺失可增加细胞对顺铂的耐受性,在促进肿瘤细胞生长、转移及耐药过程中具有重要作用。

(3)作用免疫细胞,影响免疫功能。研究发现低氧条件下人类非小细胞肺癌细胞株 IGR-Heu 分泌的外泌体能教化自然杀伤细胞(NK),使 NK 细胞肿瘤杀伤作用减弱^[22]。这一过程中 miR-23a 可作为免疫抑制因子,降低 CD107a 分子表达,当抑制 miR-23a 时,CD107a 分子表达受限,肿瘤外泌体对 NK 细胞的抑制作用消失,显示外泌体与肿瘤微环境中的免疫抑制机制密切相关。

这些研究表明肿瘤细胞可以通过释放外泌体与其他细胞通信,改造细胞表型或分子特征,形成适宜生长的微环境。microRNAs 作为重要的转录后调节方式,参与肿瘤发生发展的多个过程^[23]。

3 外泌体中 microRNAs 在肺癌诊断中的作用

外泌体 microRNAs 可从多种体液中分离提取,在液体诊断方面具有较好的应用前景,是目前多种肿瘤和免疫相关疾病诊断标志物的研究热点。在肺癌方面,Rabinowits 等^[24]最早于 2009 年比较了 27 例肺癌病人和 9 例对照病人血清外泌体中 12 种 microRNAs 的表达情况,microRNAs 在肺癌病人血清中高表达,对照组基本检测不到,提示 microRNAs 可作为肺癌标志物。2013 年,Cazzoli 等^[25]对 10 例肺腺癌、10 例肺肉芽肿和 10 例健康吸烟者外泌体中 742 种 microRNAs 进行检测,并使用软件建模,挑选出 4

种可用于筛查肺腺癌和肺肉芽肿的 microRNAs 组合 (miR-378a、miR-379、miR-139-5p 和 miR-200-5p), 经分析灵敏度为 97.5%, 特异度为 72.0%。采用 6 种 microRNAs 组合 (miR-151a-5p、miR-30a-3p、miR-200b-5p、miR-629、miR-100 和 miR-154-3p) 进一步诊断肺腺癌和肺肉芽肿, 结果灵敏度为 96%, 特异度为 60%。Cazzoli 等^[25]表示此研究与低密度 CT 扫描相比假阳性率显著降低, 但仍需进一步评估以确认此模型对更大样本群的预测能力。2017 年, 温州医科大学 Jin 等^[26]对 46 例一期非小细胞肺癌病人和 42 例健康志愿者的血浆外泌体进行 miRNA 测序分析, 并在 60 例独立临床样本中进行验证, 发现肺腺癌和鳞癌特异性高度相关的 microRNAs。2019 年南京大学研究人员采用深度测序法比较 10 例对顺铂有反应和 10 例药物抵抗者的 microRNAs 表达, 其中 80 种 microRNAs 的含量增加或者降低都在 2 倍以上, 6 种差异最大: miR-425-3p, miR-1273h 和 miR-4755-5 表达升高, miR-9-5p, miR-146a-5p 和 miR-215-5p 表达降低^[27]。miR-425-3p 通过靶向 AKT1 上调自噬水平, miR-425-3p 高表达可作为顺铂低反应性和无进展生存期的生物标志物^[27]。与健康人相比, 非小细胞肺癌病人在疾病早期和进展期中, 血清中 miR-126 水平升高, 提示其可以作为生物标志物以筛查非小细胞肺癌^[28]。研究还发现进展期的非小细胞肺癌患者血清中 miR-146a-5p 的表达水平可用于预测肿瘤复发, miR-146a-5p 表达水平低的病人肿瘤复发率高, 可能与 miR-146a-5p 可以增强肺癌细胞对顺铂的敏感性有关^[29]。Wu 等^[19]用定量 PCR 法分析 56 例肺癌病人和 56 例对照组病人肺组织和血清中 miR-96 的表达水平, 发现肺癌病人 miR-96 均为高表达, 且表达水平与肿瘤分期呈正相关态势, 提示 miR-96 高表达可作为肺癌标志物。

支气管肺泡灌洗液中也分离出外泌体。韩国科学家从 13 例肺腺癌病人和 15 例肺间质病人支气管肺泡灌洗液中分离出外泌体, 采用商用探针试剂盒对外泌体中 6 种 microRNAs 进行检测 (miR-7, miR-21, miR-126, Let-7a, miR-17, 和 miR-19) 并用定量 PCR 验证, 结果发现肺腺癌病人灌洗液中 miR-126 和 Let-7a 水平显著升高; 进一步研究发现 miR-126 在肺腺癌灌洗液中高表达, 显示其可作为一种早期肺腺癌诊断标志物^[30]。Wang 等^[31]采用深度测序法对肺腺癌、结核及其他良性肺部病变产生的胸腔积液外泌体进行检测, 共发现 171 个 miRNAs 表达量差异有统计学意义, 其中 miR-205-5p, miR-483-5p, miR-375, miR-200c-3p, miR-429, miR-200b-3p, miR-200a-3p, miR-203a-3p, miR-141-3p 在肺腺

癌胸腔积液中高表达。

上述研究均表明血清、支气管肺泡灌洗液或胸腔积液中的 microRNAs 可以作为肺癌的分子标志物。

4 展望

肺癌的不良预后与多种因素有关, 一方面是目前缺乏行之有效的治疗策略, 另一方面大部分病人就诊时已处于晚期。外泌体中的 microRNA 作为基于人体体液的生物标志物, 在肿瘤诊断方面具有巨大的潜力, 对其深入探讨已成为近期肿瘤研究的热点之一。

外泌体的双层脂膜结构使其可以长时间保存, 从而保证其内容物 microRNAs 的完整性, 进一步扩展了 microRNAs 的研究领域。肺癌细胞分泌的外泌体可反映其母细胞的生物学特性, 能够提供与肿瘤相关的特异性 microRNAs 表达谱。目前 microRNAs 作为肺癌诊断标志物的研究有两项挑战, 一是如何简单快速的从血液或支气管肺泡灌洗液中分离出外泌体并提取 microRNAs 用于后续高通量或者定量 PCR 检测, 另一个是如何找到特异有效的 microRNAs 组合作为早期肺癌诊断的标志物, 特别是有基础疾病如糖尿病、高血压的病人。解决这些问题需依赖大规模肺癌病人血清或肺泡灌洗液等标本和更为精确的 microRNAs 定量检测。

虽然面临各种挑战, 但随着外泌体研究技术的不断发展, 特别是单个外泌体流式分析技术的出现, 未来 microRNAs 有望成为简便特异可靠的肺癌诊断方法。

参考文献

- [1] 江万仓. 临床 N-0 期非小细胞肺癌病人术后病理检查为 N₁(1-2) 期淋巴结转移的相关因素分析[J]. 安徽医药, 2019, 23(7): 1373-1375.
- [2] NASIM F, SABATH BF, EAPEN GA. Lung cancer[J]. Med Clin North Am, 2019, 103(3):463-473.
- [3] 吴亮, 山顺林. 非小细胞肺癌液体活检技术研究进展[J]. 安徽医药, 2019, 23(7):1286-1290.
- [4] KALLURI R, LEBLEU VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes [J]. Science, 2020, 367 (6478): 640-656.
- [5] SKOTLAND T, SANDVIG K, LLORENTE A. Lipids in exosomes: current knowledge and the way forward [J]. Prog Lipid Res, 2017, 66:30-41.
- [6] Li S, YI M, DONG B, et al. The roles of exosomes in cancer drug resistance and its therapeutic application [J/OL]. Clin Transl Med, 2020, 10(8): e257. DOI: 10.1002/ctm2.257.
- [7] HOSSEINI M, KHATAMIANFAR S, HASSANIAN SM, et al. Exosome-encapsulated microRNAs as potential circulating biomarkers in colon cancer [J]. Curr Pharm Des, 2017, 23 (11):

- 1705-1709.
- [8] JENA BC, MANDALA M. The emerging roles of exosomes in anti-cancer drug resistance and tumor progression: An insight towards tumor-microenvironment interaction [J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2021, 1875 (1) : 188488. DOI: 10.1016/j.bbcan.2020.188488.
- [9] MASHOURI L, YOUSEFI H, AREFAR, et al. Exosomes; composition, biogenesis, and mechanisms in cancer metastasis and drug resistance[J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1):75.
- [10] HESSVIK NP, LLORENTE A. Current knowledge on exosome biogenesis and release [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2018, 75 (2) : 193-208.
- [11] FAROOQI AA, DESAI NN, QURESHI MZ, et al. Exosome biogenesis, bioactivities and functions as new delivery systems of natural compounds[J]. *Biotechnol Adv*, 2018, 36(1):328-334.
- [12] GONDA A, KABAGWIRA J, SENTHIL GN, et al. Internalization of exosomes through receptor-mediated endocytosis [J]. *Mol Cancer Res*, 2019, 17(2):337-347.
- [13] HE F, YE ZY, ZHAO LD, et al. Probing exosome internalization pathways through confocal microscopy imaging [J]. *Chem Commun (Camb)*, 2019, 55(93):14015-14018.
- [14] YANG H, ZHANG H, GE S, et al. Exosome-derived miR-130a activates angiogenesis in gastric cancer by targeting C-MYB in vascular endothelial cells [J]. *Mol Ther*, 2018, 26 (10) : 2466-2475.
- [15] HOSHINO A, COSTA-SILVA B, SHEN TL, et al. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis [J]. *Nature*, 2015, 527(7578):329-335.
- [16] LIU C, XU X, LI B, et al. Single-exosome-counting immunoassays for cancer diagnostics [J]. *Nano Lett*, 2018, 18 (7) : 4226-4232.
- [17] HSU YL, HUNG JY, CHANG WA, et al. Hypoxic lung cancer-secreted exosomal miR-23a increased angiogenesis and vascular permeability by targeting prolyl hydroxylase and tight junction protein ZO-1 [J]. *Oncogene*, 2017, 36(34):4929-4942.
- [18] LIU Y, LUO F, WANG B, et al. STAT3-regulated exosomal miR-21 promotes angiogenesis and is involved in neoplastic processes of transformed human bronchial epithelial cells [J]. *Cancer Lett*, 2016, 370(1):125-135.
- [19] WU H, ZHOU J, MEI S, et al. Circulating exosomal microRNA-96 promotes cell proliferation, migration and drug resistance by targeting LMO7 [J]. *J Cell Mol Med*, 2017, 21(6) : 1228-1236.
- [20] HE S, LI Z, YU Y, et al. Exosomal miR-499a-5p promotes cell proliferation, migration and EMT via mTOR signaling pathway in lung adenocarcinoma [J]. *Exp Cell Res*, 2019, 379(2) : 203-213.
- [21] QIN X, YU S, ZHOU L, et al. Cisplatin-resistant lung cancer cell-derived exosomes increase cisplatin resistance of recipient cells in exosomal miR-100-5p-dependent manner [J]. *Int J Nanomedicine*, 2017, 12:3721-3733.
- [22] BERCHEM G, NOMAN MZ, BOSSELER M, et al. Hypoxic tumor-derived microvesicles negatively regulate NK cell function by a mechanism involving TGF- β and miR23a transfer [J/OL]. *Oncoimmunology*, 2016, 5 (4) : e1062968. DOI: 10.1080/2162402X.2015.1062968.
- [23] 王大鹏,夏庆欣.微RNA-375 对非小细胞肺癌脑转移的诊断价值 [J]. *安徽医药*, 2020, 24(1) : 38-41.
- [24] RABINOWITS G, GERCEL-TAYLOR C, DAY JM, et al. Exosomal microRNA: a diagnostic marker for lung cancer [J]. *Clin Lung Cancer*, 2009, 10(1):42-46.
- [25] CAZZOLI R, BUTTITTA F, DI NICOLA M, et al. MicroRNAs derived from circulating exosomes as noninvasive biomarkers for screening and diagnosing lung cancer [J]. *J Thorac Oncol*, 2013, 8(9):1156-1162.
- [26] JIN X, CHEN Y, CHEN H, et al. Evaluation of tumor-derived exosomal miRNA as potential diagnostic biomarkers for early-stage non-small cell lung cancer using next-generation sequencing [J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(17):5311-5319.
- [27] YUWEN D, MA Y, WANG D, et al. Prognostic role of circulating exosomal miR-425-3p for the response of NSCLC to platinum-based chemotherapy [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2019, 28(1):163-173.
- [28] GRIMOLIZZI F, MONACO F, LEONI F, et al. Exosomal miR-126 as a circulating biomarker in non-small-cell lung cancer regulating cancer progression [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):15277.
- [29] YUWEN DL, SHENG BB, LIU J, et al. MiR-146a-5p level in serum exosomes predicts therapeutic effect of cisplatin in non-small cell lung cancer [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21(11) : 2650-2658.
- [30] KIM JE, EOM JS, KIM WY, et al. Diagnostic value of microRNAs derived from exosomes in bronchoalveolar lavage fluid of early-stage lung adenocarcinoma: A pilot study [J]. *Thorac Cancer*, 2018, 9(8):911-915.
- [31] WANG Y, XU YM, ZOU YQ, et al. Identification of differential expressed PE exosomal miRNA in lung adenocarcinoma, tuberculosis, and other benign lesions [J/OL]. *Medicine (Baltimore)*, 2017, 96(44):e8361. DOI: 10.1097/MD.00000000000008361.

(收稿日期:2020-12-07,修回日期:2021-01-24)