

外泌体miRNA-423-5p在胃间质瘤中的表达及临床意义

高歌, 钱波*

安徽医科大学第二附属医院普外科, 安徽 合肥

收稿日期: 2022年9月15日; 录用日期: 2022年10月2日; 发布日期: 2022年10月11日

摘要

目的: 本研究旨在探讨胃间质瘤患者血浆外泌体中miRNA-423-5p的表达情况及与临床资料之间的关系。方法: 选取2020年10月~2022年2月安徽医科大学第二附属医院确诊的胃间质瘤患者48例, 其中女性18例, 男性30例, 对照组健康人10例。利用超速离心法分离胃间质瘤患者和健康人血浆中的外泌体, 采用RT-qPCR检测外泌体中miRNA-423-5p的表达, 分析其与临床资料之间的关系。结果: 胃间质瘤患者血浆外泌体中miRNA-423-5p的表达水平较健康人明显升高($P < 0.05$), 其表达水平与患者性别、年龄无关($P > 0.05$), 与肿瘤直径、核分裂像、危险度呈正相关($P < 0.05$)。结论: miRNA-423-5p在胃间质瘤患者外泌体中表达明显上调, 和预后不佳相关, 提示外泌体miRNA-423-5p可能成为胃肠间质瘤诊断和判断预后的标志物。

关键词

胃肠间质瘤, miRNA-423-5p, 外泌体

Expression and Clinical Significance of miRNA-423-5p in Exosomes in Gastric Stromal Tumors

Ge Gao, Bo Qian*

Department of General Surgery, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei Anhui

Received: Sep. 15th, 2022; accepted: Oct. 2nd, 2022; published: Oct. 11th, 2022

Abstract

Objective: This study aimed to investigate the relationship between miRNA-423-5p expression in plasma exosomes in patients with gastric stromal tumor and the clinical data. **Methods:** We selected

*通讯作者。

48 patients with gastric stromal tumor diagnosed in the Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University from October 2020 to February 2022, including 18 women and 30 men, 10 healthy patients in the control group. Exosomes were isolated from the plasma of gastric stroma patients and healthy people, and miRNA-423-5p expression in exosomes was measured by RT-qPCR, and the relationship between clinical data was analyzed. Results: The expression level of miRNA-423-5p in plasma exosomes of gastric stromal tumor patients was significantly higher compared with healthy people ($P < 0.05$), regardless of patient gender and age ($P > 0.05$), and positively correlated with tumor diameter, mitotic figures, and risk ($P < 0.05$). Conclusions: The expression of miRNA-423-5p was significantly upregulated in the exosomes of patients with gastric stromal tumors, which is associated with a poor prognosis, suggesting that the exosome miRNA-423-5p may be a marker for the diagnosis and judging the prognosis of gastrointestinal stromal tumor.

Keywords

Gastrointestinal Stromal Tumor, miRNA-423-5p, Exosomes

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

胃肠间质瘤(Gastrointestinal Stromal Tumor, GIST)是胃肠道最常见的间叶来源肿瘤,其年发病率约(10~20)/100万[1]。因GIST位于胃肠粘膜下,活检困难,且有破裂播散风险,术前不易病理诊断。CT、MRI等可以发现GIST,但和其他间质来源肿瘤鉴别困难。此外,GIST缺乏特异的血清标志物。故术前诊断仍是GIST诊治的难点。

外泌体(Exosomes)是一种细胞产生并主动分泌到细胞外的微小囊泡样小体,其中包含微小RNA(miRNA)、DNA片段、蛋白质和短肽链磷脂等分子[2]。已有研究显示外泌体miRNA在胃癌[3]、肝癌[4]、结直肠癌[5]和肺癌[6]等肿瘤诊治方面有临床价值,本课题组前期通过高通量测序筛选,检测5位胃间质瘤患者血浆外泌体miRNA表达谱,发现miRNA-423-5p表达较正常人上调2.72倍。本课题进一步研究胃间质瘤患者血浆外泌体miRNA-423-5p的表达情况,以及与临床资料之间的关系。

2. 资料与方法

2.1. 一般资料

选取2020年10月~2022年02月就诊于安徽医科大学第二附属医院的胃间质瘤患者48例。其中女性18例,男性30例,年龄27~69(50.65 ± 18.35)岁。纳入标准:1)经组织病理学确诊为胃肠间质瘤;2)未接受任何形式的抗肿瘤药物治疗;3)具有完整的临床病理学资料和随访信息。排除标准:1)合并严重心、脑、血管等重要器官疾病;2)具有其他组织来源肿瘤病史;3)发生感染或妊娠。收集入组患者和10名健康体检静脉血各10ml,分离血浆,-80℃保存。我院伦理委员会已审核通过本研究(编号YX2020-102F1),患者均签署书面知情同意书。

2.2. 方法

2.2.1. 外泌体提取

首先取出血浆冰上解冻,4℃条件下离心(12,000 g, 30 min),留取上清液。随后使用0.22 μm的过滤

器过滤, 除去大颗粒囊泡, 4℃条件下超速离心(120,000 g, 60 min), 去除上清, 留下外泌体粗提沉淀。再用预冷 PBS 溶液重悬沉淀, 再次超速离心(4℃, 120,000 g, 60 min), 最后得到的沉淀即为高纯度的外泌体, 用小体积的预冷 PBS 重悬沉淀, 立即使用或-80℃分装保存。

2.2.2. 外泌体鉴定

首先进行透射显微镜及纳米粒径分析(Nanoparticle Tracking Analysis, NTA): 提取外泌体液用 2% 锇酸溶液固定, 清洗脱水后用丙酮置换两次, 放入盛有包埋剂的包埋板中, 染色清洗后通过 JEM-1230 透射电子显微镜观察外泌体形状。NTA 对外泌体的直径和浓度进行分析(上海研载生物科技有限公司)。然后利用 Western Blot 检测外泌体标志性蛋白表达, 使用 RIPA 裂解液、蛋白酶抑制剂 PMSF (碧云天生物科技有限公司)提取总的外泌体蛋白, 10% SDS-PAGE 凝胶进行蛋白转膜。在 4℃条件下, 将膜置入一抗溶液(CD63 1:1000, CD9 1:1000, CD81 1:1000)孵育过夜(CD63 抗体, ABclonal, A5271; CD9 抗体, Abcam, ab92726; CD81 抗体, Abcam, ab109201)。随后在 37℃下加抗二抗(Goat anti-mouse IgG, Jackson, 115-035-003)温育 1 h, 使膜与 ECL (Beyotime, P0018S)反应 5 min, 最后暗盒 X 片曝光。

2.2.3. qRT-PCR 检测外泌体 miRNA

按 RNAiso Plus (TAKAPA)试剂盒说明书提取外泌体 RNA, 用 Prime Script II RTase 试剂盒(TAKAPA)逆转录 RNA, 再以 SYBR Premix EX Taq (Thermo)进行 PCR 扩增, miRNA-423-5p 引物由上海生工合成, 以 U6 为内参(表 1)。PCR 反应条件如下: 95℃, 2 min, 预变性; 95℃, 15s, 变性, 60℃, 1 min, 退火延伸, 40 个循环进行扩增, 每个样品重复 3 次。应用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 miRNA-423-5p 的相对表达量。

Table 1. Sequences of the miRNA primers

表 1. miRNA 引物序列

引物名称	引物序列(5'-3')
has-423-5p-JH	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGACTTT
has-423-5p-F	GCTCGCTCTCTGCCCTCA
U6	CTCGCTTCGGCAGCAC
U6	AACGCTTCACGAATTTGCGT

2.2.4. 统计学处理

采用 SPASS 26.0 软件, 计量资料呈正态分布并用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 组间比较用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

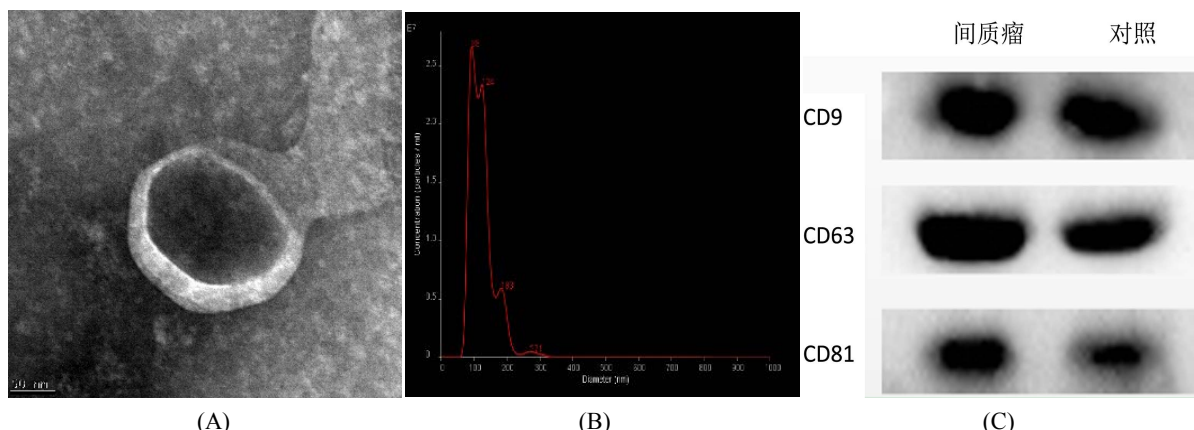
3. 结果

3.1. 外泌体的提取和鉴定

本实验通过透射电子显微镜、NTA、Western Blot 对提取的血浆外泌体特性进行鉴定。在透射电镜下放大 10,000 倍条件下, 观察到血浆外泌体[7]呈茶托样双层脂质膜结构(图 1(A))。NTA 分析发现其直径范围为 50~300 nm, 主要集中于 93 nm, 对其定量后浓度约为 3.63×10^9 个颗粒/ml (图 1(B))。Western Blot 检测外泌体特异性表达蛋白[8] CD9、CD63、CD81(图 1(C))。

3.2. 健康人和间质瘤患者血清外泌体中 miRNA-423-5p 的表达水平

胃间质瘤患者和健康人血清外泌体中 miRNA-423-5p 的表达水平采用 qRT-PCR 进行检测。结果显示, 健康人群中 miRNA-423-5p 表达较低, 胃间质瘤患者血清外泌体中 miRNA-423-5p 表达明显上调, 较健康人群上调 3.17 倍(图 2), 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。



A: 在透射电子显微镜(比例尺 = 100 nm)下观测提取的外泌体; B: NTA 所提取的外泌体的浓度和根据直径所获取的粒子分布; C: Western Blot 检测外泌体特异性标志物 CD9、CD63、CD81。

Figure 1. Identification of the blood plasma exosomes

图 1. 血浆外泌体的鉴定

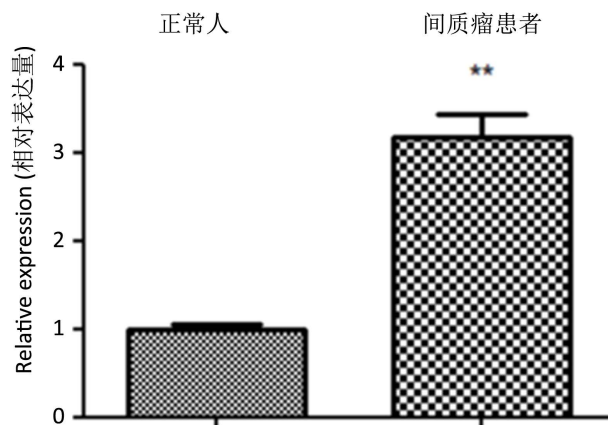


Figure 2. Expression levels of exosomal miRNA-423-5p in healthy humans and gastric stromal tumor patients

图 2. 健康人和胃间质瘤患者外泌体 miRNA-423-5p 的表达水平

3.3. 血清外泌体的表达与间质瘤患者临床资料的关系

根据血清外泌体中 miRNA-423-5p 的表达水平,分析外泌体 miRNA-423-5p 表达水平与临床资料之间的关系。结果显示,血清外泌体 miRNA-423-5p 的水平与间质瘤患者性别、年龄无明显差异($P > 0.05$),与肿瘤直径、核分裂像、危险度分级呈正相关($P < 0.05$),见表 2。

Table 2. The relationship between the miRNA-423-5p expression levels and the clinical data in the serum exosomes of patients with interstitial tumors

表 2. 间质瘤患者血清外泌体中 miRNA-423-5p 表达水平和临床资料的关系

临床特征	n	miR-423-5p 表达量	t	P
年龄(岁)			0.488	0.314
<50	19	3.19 ± 0.31		
≥50	29	3.14 ± 0.41		

Continued

性别			0.422	0.337
女	18	3.19 ± 0.39		
男	30	3.15 ± 0.33		
核分裂数(/50HPF)			6.333	<0.001
≥5	14	3.52 ± 0.22		
<5	34	3.01 ± 0.26		
肿瘤大小(cm)			-2.003	0.026
<5	31	3.08 ± 0.32		
≥5	17	3.29 ± 0.35		
危险度分级			2.927	0.003
低危 - 中危	32	3.06 ± 0.31		
高危	16	3.35 ± 0.33		

4. 讨论

外泌体是一种由活细胞分泌的直径 30~100 nm 之间的囊泡样小体, 广泛存在于组织和循环体液中, 同样也存在于肿瘤微环境中。由于其包膜有双层磷脂分子结构, 可以保护内含的蛋白质、脂质和 miRNA 等因子避免被各种血液中的酶降解, 故可以作为天然的“信使”, 在细胞与细胞, 细胞与组织甚至器官之间传递信息。间质瘤外泌体相关研究较少, 2014 年 Safinur 等[9]首次从间质瘤患者血浆和细胞株 (GIST-T1) 培养上清中分离出外泌体, 检测发现外泌体中包含有间质瘤特异蛋白, SMA、KIT、CD34、DOG-1 和 Dismin。本研究中, 我们提取间质瘤患者血浆中的外泌体, 检测显示具有外泌体典型的特征, 如直径在 100 nm 左右的双层结构, 表达外泌体标志蛋白 CD9、CD63 和 CD81。

外泌体 miRNA 是目前肿瘤研究的热点之一, 在胃癌、肝癌、结直肠癌等肿瘤中, 已有研究发现外泌体 miRNA 参与肿瘤的发生、发展、转移以及耐药等环节[10], 在临床上具有诊断和预后判断方面的价值[11]。李等[12]通过分析乙肝相关早期肝细胞癌患者以及健康人群外周血浆标本, 发现血浆外泌体 miR-15b、miR-224、miR-501 表达水平较健康组明显升高($P < 0.05$)。采用 ROC 曲线评估 miR-15b、miR-224、miR-501 三者联合检测用于乙肝相关早期肝细胞癌诊断的灵敏度、特异度、准确度较单一检测明显提高。Yang 等[13]通过分析胃癌患者以及健康人群外周血浆标本, 发现血浆外泌体 miR-423-5p 表达水平较健康显著升高($P < 0.001$)。采用 ROC 曲线评估外泌体 miR-423-5p 与传统的肿瘤生物标志物如 CEA、CA-199 的诊断效果。发现外泌体 miR-423-5p 的诊断效果高于 CEA 和 CA-199。Jia 等[14]通过分析 223 例结直肠癌和 130 例健康患者的血浆标本, 发现结直肠癌患者血浆外泌体中 miR-24、miR-320a 和 miR-423-5p 浓度均低于健康对照组, 其中 miR-423-5p 的表达最低。联合检测 3 种 miRNA, 对结直肠癌的诊断灵敏度为 0.90, 特异性为 0.70。郭等[15]通过分析发现结直肠癌患者血清外泌体 miR-92a 的表达水平较健康组明显上调($P < 0.05$)。采用 ROC 曲线分析血清外泌体 miR-92a 区分结直肠癌患者和健康人的 AUC 为 0.836, 特异度为 80.8%, 敏感度为 67.1%。行 Cox 多因素分析显示血清外泌体 miR-92a 表达水平可作为结直肠癌患者预后判断的独立影响因素之一。本研究发现外泌体 miRNA-423-5p 在胃间质瘤患者中表达明显上调, 间质瘤患者外泌体 miRNA-423-5p 表达较健康人上调约 3.17 倍, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。提示 miRNA-423-5p 在间质瘤诊断方面的潜在价值, 在胃肠道恶性肿瘤中 miRNA-423-5p 多低表达, 其可能成为鉴别诊断胃肠间质瘤和其他消化道肿瘤的标志物。

在消化道肿瘤研究中发现, miRNA-423-5p 即有促癌也有抑癌作用。Liu 等[16]通过研究发现胃癌组织中的 miR-423-5p 较匹配的非肿瘤组织明显增高,通过 microRNA 靶标预测工具发现 TFF1 是 miR-423-5p 的靶基因,进一步研究发现 TFF1 受 miR-423-5p 负调控,通过上调 miRNA-423-5p/TFF1/cyclinD1/cyclinD3 信号通路,可促进细胞周期进程,抑制细胞迁移和侵袭。Yang 等[13]通过研究发现外泌体 miR-423-5p 在胃癌发展过程中可能发挥促癌因子的作用,通过 microRNA 靶标预测工具发现融合蛋白抑制因子(SUFU)是 miR-423-5p 的靶基因,外泌体 miR-423-5p 通过抑制 SUFU 的表达,从而增强了胃癌细胞的增殖和迁移。Kong 等[17]通过研究发现存活小于 1 年的患者和存活超过 5 年胃癌患者相比,血清中 miR-423-3p 的表达明显上调。进一步研究表明 miR-423-3p 与高龄、肿瘤大小、肿瘤侵袭和远处转移显著相关。此外,miR-423-3p 高表达水平的患者比低表达水平的患者整体生存率更差。柯瑞盛等[18]通过研究肝癌患者发现癌组织的 miR-423-5p 的表达水平高于癌旁组织,且高表达 miR-423-5p 与患者的淋巴结转移, TMN 分期及生存预后较差等均呈正相关。进一步研究显示,肝细胞癌中 TGFBR3 是 miR-423-5p 的靶基因,miR-423-5p 通过上调 TGFBR3/PI3K/AKT 信号通路促进细胞增殖、迁移侵袭和抑制细胞凋亡。Jia [19]等通过研究发现结肠癌患者的血浆中 miR-423-5p 的表达较健康人明显下调。通过转染上调外泌体 miR-423-5p,可以促进结肠癌细胞的凋亡,并抑制细胞增殖和菌落形成。提示 miR-423-5p 在结直肠癌中发挥抑癌作用。既往研究显示在胃肠间质瘤中,预后与肿瘤部位、大小、核分裂像以及危险度等级密切相关,且随着危险度的提升,术后复发转移概率明显提升[20]。我们研究发现,胃间质瘤外泌体 miRNA-423-5p 表达与患者年龄、性别无关($P > 0.05$),与肿瘤大小、核分裂象以及危险度呈正相关($P < 0.05$)。提示外泌体 miRNA-423-5p 可能起到促进胃间质瘤发生发展,导致预后较差,生存期较短。提示外泌体 miRNA-423-5p 高表达可能是间质瘤患者预后不佳的标志。

综上所述,本研究表明,miRNA-423-5p 在间质瘤患者血浆外泌体中高表达,其高表达可能与预后不良相关,可能成为 GIST 诊断及判断预后的标志物。

参考文献

- [1] Iwatsuki, M., Harada, K., Iwagami, S., et al. (2018) Neoadjuvant and Adjuvant Therapy for Gastrointestinal Stromal Tumors. *Annals of Gastroenterological Surgery*, **3**, 43-49. <https://doi.org/10.1002/ags3.12211>
- [2] Chen, C.Y., Rao, S.S., Ren, L., et al. (2018) Exosomal DMBT1 from Human Urine-Derived Stem Cells Facilitates Diabetic Wound Repair by Promoting Angiogenesis. *Theranostics*, **8**, 1607-1623. <https://doi.org/10.7150/thno.22958>
- [3] 张筱东, 谢星星, 李佳, 等. 血清外泌体 miR-221 和 miR-378 水平检测在胃癌诊断中的应用研究[J]. 现代检验医学杂志, 2020, 35(6): 52-55.
- [4] Lin, J., Huang, S., Wu, S., et al. (2011) MicroRNA-423 Promotes Cell Growth and Regulates G(1)/S Transition by Targeting p21Cip1/Waf1 in Hepatocellular Carcinoma. *Carcinogenesis*, **32**, 1641-1647. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgr199>
- [5] Balacescu, O., Sur, D., Cainap, C., et al. (2018) The Impact of miRNA in Colorectal Cancer Progression and Its Liver Metastases. *International Journal of Molecular Sciences*, **19**, 3711. <https://doi.org/10.3390/ijms19123711>
- [6] Wang, R., Li, G., Zhuang, G., et al. (2019) Overexpression of microRNA-423-3p Indicates Poor Prognosis and Promotes Cell Proliferation, Migration, and Invasion of Lung Cancer. *Diagnostic Pathology*, **14**, Article No. 53. <https://doi.org/10.1186/s13000-019-0831-3>
- [7] 杨佳佳, 党旖旎, 彭磊, 等. 血浆外泌体 miR-452 作为胃癌诊断的生物标志物[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2019, 28(9): 1023-1029.
- [8] 周山健, 李海乐, 肖大伟, 等. miR-126 修饰的间质干细胞来源的外泌体对大鼠早期缺血性股骨头坏死的影响[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2018, 39(3): 379-385.
- [9] Atay, S., Banskota, S., Crow, J., et al. (2014) Oncogenic KIT-Containing Exosomes Increase Gastrointestinal Stromal Tumor Cell Invasion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **111**, 711-716. <https://doi.org/10.1073/pnas.1310501111>

- [10] Xu, J.J., Ji, L., Liang, Y., *et al.* (2020) CircRNA-SORE Mediates Sorafenib Resistance in Hepatocellular Carcinoma by Stabilizing YBX1. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, **5**, Article No. 298. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00375-5>
- [11] 张志军. 外泌体 miRNAs 作为非小细胞肺癌生物标志物及参与侵袭转移的机制研究[D]: [博士学位论文]. 济南: 山东大学, 2021.
- [12] 李洪, 冯雪晶, 秦维, 等. 血清外泌体 miR-15b、miR-224、miR-501 检测对乙型肝炎相关早期肝细胞癌的诊断价值[J]. *国际检验医学杂志*, 2021, 42(17): 2058-2061.
- [13] Yang, H., Fu, H., Wang, B., *et al.* (2018) Exosomal miR-423-5p Targets SUFU to Promote Cancer Growth and Metastasis and Serves as a Novel Marker for Gastric Cancer. *Molecular Carcinogenesis*, **57**, 1223-1236. <https://doi.org/10.1002/mc.22838>
- [14] Jia, W., Zeng, L., Luo, S., *et al.* (2018) Association of microRNA-423 rs6505162 C>A Polymorphism with Susceptibility and Metastasis of Colorectal Carcinoma. *Medicine (Baltimore)*, **97**, e9846. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000009846>
- [15] 郭树创. 血清外泌体 miR-92a 在结直肠癌中的表达以及预后的相关性分析[D]: [硕士学位论文]. 广州: 南方医科大学, 2020.
- [16] Liu, J., Wang, X., Yang, X., *et al.* (2014) miRNA423-5p Regulates Cell Proliferation and Invasion by Targeting Trefoil Factor 1 in Gastric Cancer Cells. *Cancer Letters*, **347**, 98-104. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.01.024>
- [17] Kong, P., Zhu, X., Geng, Q., *et al.* (2017) The microRNA-423-3p-Bim Axis Promotes Cancer Progression and Activates Oncogenic Autophagy in Gastric Cancer. *Molecular Therapy*, **25**, 1027-1037. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.01.013>
- [18] 柯瑞盛. miR-423-5p、HNRNPA1 在肝细胞癌中的临床意义及分子机制研究[D]: [硕士学位论文]. 福州: 福建医科大学, 2019.
- [19] Jia, W., Yu, T., An, Q., Cao, X. and Pan, H. (2018) MicroRNA-423-5p Inhibits Colon Cancer Growth by Promoting Caspase-Dependent Apoptosis. *Experimental and Therapeutic Medicine*, **16**, 1225-1231. <https://doi.org/10.3892/etm.2018.6288>
- [20] Kaymaz, E., Taşdöven, İ. and Barut, F. (2021) The Relationship of Clinicopathological Findings and PDGFR- β Expression with Tumor Recurrence in Gastrointestinal Stromal Tumors. *Turkish Journal of Gastroenterology*, **32**, 1038-1048. <https://doi.org/10.5152/tjg.2021.21148>