

血浆外泌体 miR-548k 在食管鳞癌中的表达及诊断价值

冯绪梅¹, 宋相庆², 季冠虹², 赵小刚², 肖兆华²

(1.山东大学第二医院健康管理科, 山东 济南 250033; 2.山东大学第二医院胸外科, 山东 济南 250033)

摘要:目的 探讨血浆外泌体中与食管鳞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)发生相关的 microRNAs (miRNAs), 并评估其在 ESCC 诊断中的应用价值。方法 选取 2020 年 3 月至 2021 年 6 月山东大学第二医院胸外科收治的 55 例 ESCC 患者为 ESCC 组, 另选取 55 例健康体检者为对照组, 提取受试者血浆外泌体, 并通过透射电镜、NanoSight 粒径分析及 Western blotting 进行鉴定。筛选阶段, 送检对照组、ESCC 组术前血浆外泌体 RNA 各 5 例进行测序。采用 qRT-PCR 法对训练集、验证集中差异性 miRNAs 分子表达进行检测, 并通过受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线评估差异性 miRNAs 分子的诊断价值。结果 测序结果显示, 与对照组相比, 5 个 miRNAs (miR-548k, miR-6516-5p, let-7b-3p, miR-3934-5p, miR-196a-5p) 在 ESCC 组血浆外泌体中表达显著上调, 8 个 miRNAs (miR-34c-5p, novel_167, miR-548u, miR-548ah-3p, miR-548p, miR-200a-5p, miR-200b-3p, miR-1228-5p) 明显下调。通过训练队列证实, miR-548k 在 ESCC 组血浆外泌体中明显上调 ($P < 0.001$), 血浆外泌体 miR-548k 用于 ESCC 诊断时 ROC 曲线下面积 (area under curve, AUC) 为 0.918, 明显优于 miR-34c-5p、miR-548u、miR-6516-5p。通过验证队列进一步证实, miR-548k 在 ESCC 组血浆外泌体中高表达 ($P < 0.001$), 血浆外泌体 miR-548k 可用于 ESCC 患者诊断 (AUC 值为 0.889)。结论 miR-548k 在 ESCC 组血浆外泌体中表达显著增高, 血浆外泌体 miR-548k 对 ESCC 诊断有一定的临床应用价值。

关键词:食管鳞癌; 血浆外泌体; 诊断; 生物标志物; miR-548k

中图分类号: R735.1

文献标志码: A

Expression and diagnostic value of plasma exosomal miR-548k in esophageal squamous cell carcinoma

FENG Xumei¹, SONG Xiangqing², JI Guan hong², ZHAO Xiaogang², XIAO Zhaohua²

(1. Health Management Center, The Second Hospital of Shandong University, Jinan 250033, Shandong, China;

2. Department of Thoracic Surgery, The Second Hospital of Shandong University, Jinan 250033, Shandong, China)

Abstract: Objective To screen out the candidate plasma exosomal microRNAs (miRNAs) which play crucial role in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) occurrence and evaluate their potential in ESCC diagnosis. **Methods** A total of 55 ESCC patients who underwent surgical resection at The Second Hospital of Shandong University from March 2020 to June 2021 and 55 healthy volunteers were enrolled in this study. After identified by transmission electron microscopy (TEM), NanoSight tracking analysis (NTA) and Western blotting assays, RNA sequencing was performed to determine the miRNA profiles of plasma exosomes from 5 ESCC patients and 5 healthy control. Then, quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was used to detect the expression level of differential exosomal miRNAs in the training and validation sets. Then, receiver operating characteristic (ROC) curve was conducted to evaluate their diagnostic value. **Results** Five miRNAs (miR-548k, miR-6516-5p, let-7b-3p, miR-3934-5p, miR-196a-5p) were significantly higher, and 8 miRNAs (miR-34c-5p, novel_167, miR-548u, miR-548ah-3p, miR-548p, miR-200a-5p, miR-200b-3p, miR-1228-5p) were obviously decreased in plasma exosomes of ESCC group than that of control group. Additionally,

through the training cohort, we verified that miR-548k was significantly up-regulated in plasma exosomes of ESCC group ($P < 0.001$). ROC curve analysis revealed that exosomal miR-548k exhibited higher accuracy than miR-34c-5p, miR-548u, miR-6516-5p in ESCC diagnosis, and the area under ROC curve (AUC) value was 0.918. Finally, through the validation cohort, we further confirmed that miR-548k was highly expressed in plasma exosomes of ESCC group ($P < 0.001$), and plasma exosomal miR-548k could be used for ESCC diagnosis (AUC = 0.889). **Conclusion** MiR-548k is significantly up-regulated in plasma exosomes of ESCC patients and plasma exosomal miR-548k has high clinical diagnostic value for ESCC.

Key words: Esophageal squamous cell carcinoma; Plasma exosomes; Diagnosis; Biomarker; miR-548k

食管癌作为常见的消化系统恶性肿瘤,其发病率位居全球所有恶性肿瘤第7位,死亡率位居第6位^[1]。根据组织学分型,食管癌主要分为食管鳞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)及食管腺癌。其中,ESCC是我国最为常见的食管癌病理类型,每年新发病例超过22万,新增死亡病例超过20万,极大威胁着人们的生命健康^[2]。由于ESCC患者早期多无典型临床症状,且病程发展较快,部分患者初诊时已处于中晚期,导致不良预后。因此,早发现、早诊断对于改善ESCC患者预后至关重要^[3]。目前,临床上用于ESCC患者早期筛查的主要检查手段为食管拉网脱落细胞学检查及上消化道钡餐等影像学检查^[4],但其耐受性差。此外,尽管糖类抗原19-9、鳞状细胞抗原及细胞角蛋白19片段相关抗原等肿瘤标志物在ESCC诊断中具有一定的价值,但是敏感性和特异性均较低^[3,5-7]。近年来,循环肿瘤细胞、循环肿瘤DNA等液体活检技术在ESCC诊断中展现出一定的前景。但是循环肿瘤细胞、循环肿瘤DNA在外周血中含量较少,检出率低,对于检测方法的灵敏性要求高^[8-9]。因此,进一步探索可用于ESCC诊断的敏感性高、特异性强的无创性分子标志物具有重要意义。

外泌体是一类由机体细胞在病理、生理条件下释放到胞外的囊泡,直径约为30~200 nm,其可携带蛋白质、脂质及核酸(mRNA, microRNA, circRNA及lncRNA)等多种生物学活性物质,并广泛分布于血液、唾液及腹水等多种体液中^[10-11]。miRNAs是一类长约17~22个核苷酸的非编码RNA分子,主要通过下游靶基因mRNA的3'-UTR区结合,导致靶基因mRNA降解或抑制其翻译,从而调控细胞的增殖、迁移、侵袭及凋亡等生物学行为^[12-13]。血浆外泌体miRNA由于有双层膜的保护,可避免被RNA酶降解,因而与外周血中游离miRNAs相比具有较高的稳定性^[14]。外泌体miRNAs具有一定的组织特异性,在肿瘤的早期筛查、

淋巴结转移预测、预后判断及复发监测等方面有着广泛的应用前景^[15-18]。本研究旨在探讨可用于ESCC诊断的血浆外泌体miRNAs分子,从而为ESCC的临床诊断提供参考和依据。

1 资料与方法

1.1 临床资料

1.1.1 研究对象

选取2020年3月至2021年6月山东大学第二医院胸外科就诊的55例ESCC患者为ESCC组,其中男40例,女15例,48~80岁,平均64.35岁。ESCC纳入标准:①组织学诊断为ESCC;②无其他恶性肿瘤史;③未接受过术前新辅助等抗肿瘤治疗;④临床资料完善。排除标准:①合并其他食管疾病者;②合并其他部位恶性肿瘤者;③合并急慢性炎症、神经系统或免疫疾病者;④合并重要脏器严重疾病者。术后根据第8版食管癌TNM分期标准进行分期。另选取55例健康体检者为对照组,其中男34例,女21例,48~78岁,平均63.91岁。对照组实验室检查及影像学检查未见明显异常。所有研究对象均签署知情同意书。本研究通过山东大学第二医院伦理委员会审批(KYLL-2023-473)。

1.1.2 实验设计

本研究分为筛选、训练、验证3个阶段。筛选阶段通过RNA测序对5例对照组及5例ESCC组(测序队列)血浆外泌体miRNA表达谱进行检测。训练阶段收集对照组和ESCC组血浆外泌体各20例(训练队列),采用实时荧光定量PCR(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)法对训练队列中显著差异性miRNAs(Log_2 |差异倍数| > 2 , $P < 0.05$)进行检测,通过受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线评估其诊断效能。验证阶段收集对照组和ESCC组血浆外泌体各30例(验证队列),采用qRT-PCR法及ROC曲线评估其诊断效能,并与传统肿瘤标志物鳞状细胞癌抗原(squamous cell

carcinoma antigen, SCC) 的诊断效能进行比较,进一步评估其临床诊断价值。根据 miR-548k 中位表达,将 50 例 ESCC 患者(训练队列+验证队列)分为

miR-548k 高表达组($n=25$)、低表达组($n=25$),通过 χ^2 检验分析血浆外泌体 miR-548k 与 ESCC 患者临床病理特征间的关系,见图 1。

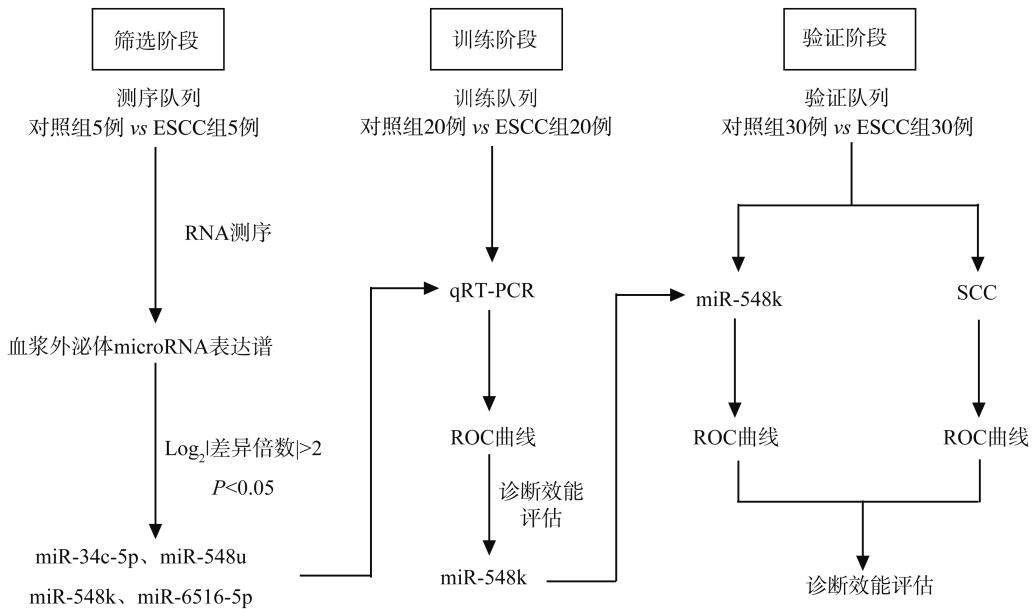


图 1 实验设计流程图

Figure 1 Workflow chart of the study design

1.1.3 主要试剂与仪器

外泌体分离试剂盒(日本 SBI 公司),抗-CD63、GRP94、TSG101 抗体(美国 Abcam 公司),RNA 提取、逆转录、荧光定量试剂盒(北京天根生化科技有限公司),qRT-PCR 引物(北京擎科生物科技有限公司),透射电子显微镜(美国 Thermo 公司),粒径分析仪(德国 PMX 公司),显影仪(上海 Tanon 公司),逆转录仪(德国 Eppendorf 公司),实时荧光定量 PCR 仪(美国 Thermo 公司)。

1.2 方法

1.2.1 血浆外泌体提取

采用 EDTA 抗凝管收集受试者外周血,于 4 °C 条件下,1 900×g 离心 10 min、3 000×g 离心 15 min 后收集血浆。按照说明书提取血浆外泌体,1×PBS 重悬,储存于-80 °C 冰箱备用。

1.2.2 血浆外泌体鉴定

通过透射电子显微镜观察外泌体的形态及大小:① 取外泌体悬液 20 μ L,经 4%多聚甲醛固定后滴于铜网上,静置 20 min;② 将铜网正面放于滴有 1%戊二醛的封口膜上,孵育 5 min;③ 用双蒸水清洗铜网 7~8 次,将铜网正面置于滴有 4%醋酸双氧铀的封口膜上,避光染色 5 min;④ 将铜网正面放于滴有 1%甲基纤维素液的封口膜上,包埋 5 min;⑤ 干燥 30 min,于电镜下观察并拍照。采用 Nano-Sight 粒径分析(nanosight tracking analysis, NTA)

检测外泌体的粒径分布:① 用 1×PBS 将外泌体稀释 10 000 倍;② 清洗并排空检测池内的气泡;③ 注入待测样品,设置帧速为 30 帧/s 并开始检测。采用 Western blotting 法检测外泌体标志物:① 采用 BCA 法对外泌体蛋白浓度进行定量;② 取 30 μ g 蛋白,经 10% SDS-PAGE 胶电泳后,以 220 mA 恒流进行转膜;③ TBST 洗膜 3 次,用 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h;④ 分别加入 CD63 (ab134045, 1:1 000)、TSG101 (ab125011, 1:1 000)、GRP94 (ab108606, 1:1 000)一抗,4 °C 过夜孵育;⑤ TBST 洗膜 3 次后,室温孵育二抗 1 h;⑥ 将 PVDF 膜放入显影仪,滴加适量显影液,进行显影并拍照。

1.2.3 RNA 测序及生物信息学分析

送检 5 例健康体检者、5 例 ESCC 患者术前血浆外泌体 RNA,由北京诺禾致源公司基于 Illumina SE50 平台进行测序。测序结束后,以 Log_2 |差异倍数| > 1.5 或 < -1.5, $P < 0.05$ 为阈值,筛选差异表达的 miRNAs 分子。运用 UALCAN (<https://ualcan.path.uab.edu/index.html>)、UCSC Xena (<https://xena.ucsc.edu>) 在线网站分析 miR-548k 在 ESCC 样本中的表达^[19]。通过 Kaplan-Meier plotter 数据库 (<https://kmplot.com>) 分析 miR-548k 与 ESCC 患者预后之间的关系^[20]。

1.2.4 RNA 提取及逆转录获得 cDNA

按照 miRcute miRNA 分离试剂盒说明提取血

浆外泌体中 RNA, 采用 Nanodrop 分光光度仪测定所提 RNA 浓度。根据 miRcute 增强型反转录试剂说明逆转录获得 cDNA。反应体系: RNA 1 μg , $2\times$ miRNA RT Reaction Buffer 10 μL , miRNA RT Enzyme mix 2 μL , RNase-Free ddH₂O 补齐至 20 μL 。反应条件: 42 $^{\circ}\text{C}$, 60 min (miRNA 加尾及逆转录); 95 $^{\circ}\text{C}$, 3 min (酶失活); 4 $^{\circ}\text{C}$ (终止)。反应结束, 将 cDNA 稀释 2 倍, 用于 qRT-PCR 实验或储存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

1.2.5 采用 qRT-PCR 法检测 miRNAs 表达

根据 miRNA 荧光定量试剂盒说明进行 qRT-PCR。反应体系: $2\times$ miRcute Plus miRNA Premix 5 μL , 正向引物 2 μL , 反向引物 2 μL , cDNA 1 μL 。反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 15 min, 40 个循环于 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 20 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火、延伸 34 s, 添加溶解曲线。以 U6 为内参, 以公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算 miRNAs 的相对表达量。miRNAs 的反向引物为荧光定量试剂盒中的通用引物。正向引物序列如下 (5'-3'): U6: CTCGCTTCG-GCAGCACA; miR-34c-5p: AGGCAGTGTAGTTA-GCTGATTGC; miR-548k: GCGAGTACTTGCGGA-TTTTGCT; miR-6516-5p: TTTGCAGTAACAGGT-GTGAGCA; miR-548u: AGACTGCAATTACTTTT-GCGCG。

1.3 统计学处理

采用 GraphPad Prism 9.0.1 软件。计量资料经 Kolmogorov-Smirnov 检验符合正态分布, 以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 所得结果采用独立样本 t 检验。通过 ROC 曲线评估血浆外泌体中差异性 miRNAs 及肿瘤标志物 SCC 用于 ESCC 诊断的效能。通过 χ^2 检验分析血浆外泌体 miR-548k 与 ESCC 患者临床病理特征间的关系。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床资料比较

ESCC 组和对照组在性别、年龄方面差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。此外, 训练队列、验证队列中 ESCC 组和对照组临床资料分别进行比较, 两组受试者间性别、年龄差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.2 血浆外泌体鉴定

透射电镜结果显示, 所提沉淀呈双层囊泡状结构 (图 2A)。粒径分析结果显示, 所提沉淀的直径峰值约为 150 nm, 符合外泌体的粒径分布范围 (图 2B)。Western blotting 结果证实所提沉淀表达 CD63、TSG101, 而不表达 GRP94 (图 2C), 表明所提沉淀即为血浆外泌体。

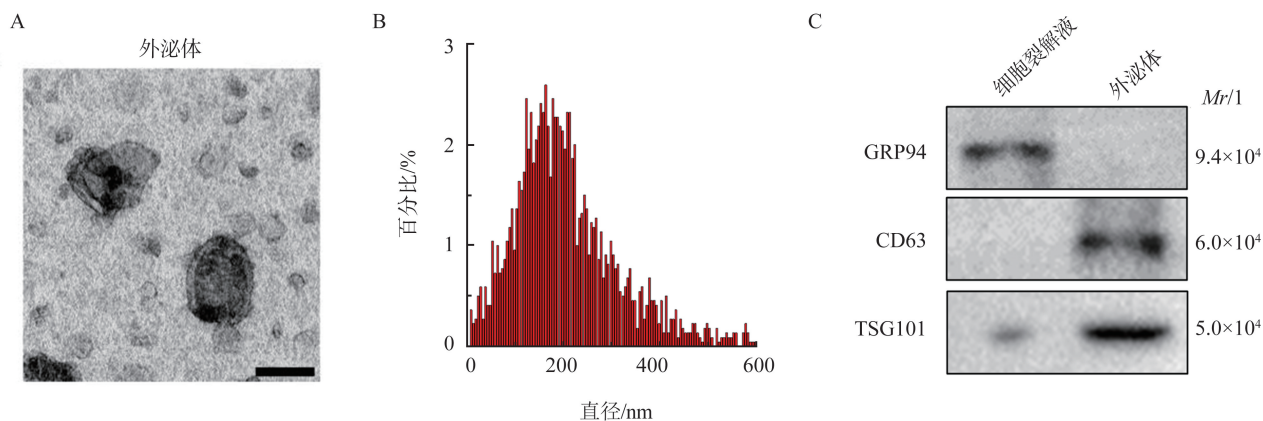


图2 血浆外泌体鉴定

A: 透射电镜观察所提沉淀的形态及大小 (标尺 = 100 nm); B: NTA 粒径分析检测所提沉淀的粒径分布范围; C: Western blotting 法检测所提沉淀中 CD63、TSG101 及 GRP94 的表达。

Figure 2 Identification of plasma exosomes

A: The morphology of exosomes was identified under a transmission electron microscope (scale bar, 100 nm); B: Size distribution of exosomes detected by NTA; C: The expression of CD63, TSG101 and GRP94 in plasma exosomes determined by Western blotting.

2.3 对照组和 ESCC 组血浆外泌体中 miRNAs 的表达

与对照组相比, 5 个 miRNAs 分子 (miR-548k、miR-6516-5p、let-7b-3p、miR-3934-5p、miR-196a-5p) 在 ESCC 组血浆外泌体中表达水平显著上调, 8 个

miRNAs 分子 (miR-34c-5p、novel_167、miR-548u、miR-548ah-3p、miR-548p、miR-200a-5p、miR-200b-3p、miR-1228-5p) 明显下调 (图 3)。筛选条件为 Log_2 |差异倍数| > 1.5 或 < -1.5 , $P < 0.05$, 差异性 miRNAs 分子的表达见表 1。

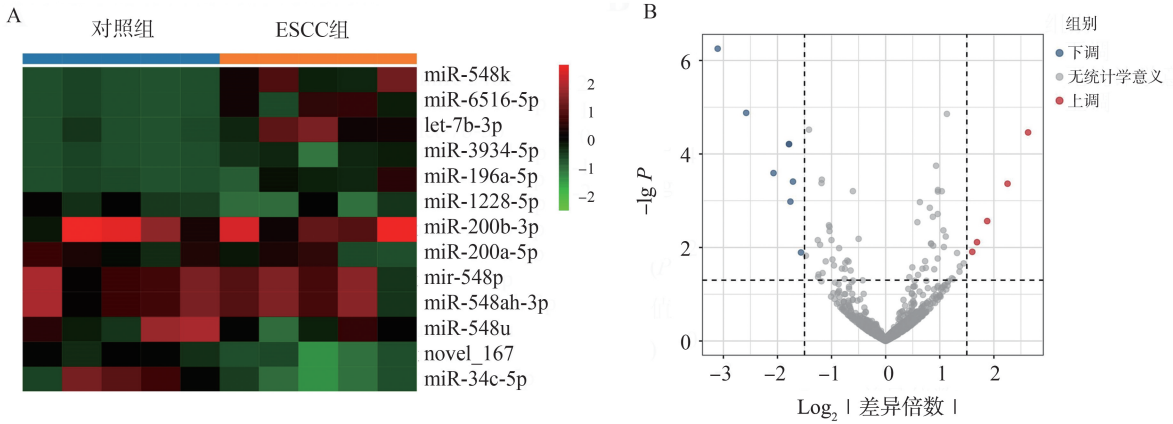


图3 RNA 测序结果中差异性 miRNAs 表达

A: 血浆外泌体中差异性 miRNAs 的热图; B: 血浆外泌体中差异性 miRNAs 的火山图。

Figure 3 Differential miRNAs in RNA sequencing

A: Heatmap of differentially expressed miRNAs in plasma exosomes; B: The volcano map of differentially expressed miRNAs in plasma exosomes.

表1 RNA 测序结果中差异性 miRNAs 的表达
Table 1 Differential miRNAs in RNA sequencing

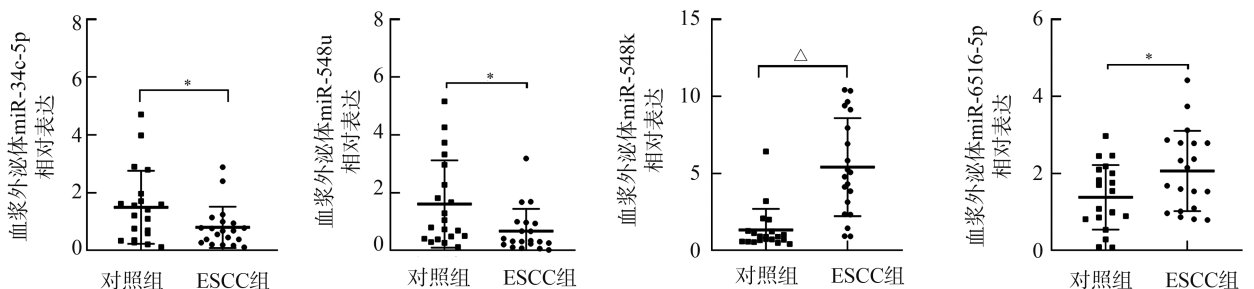
miRNAs	Log ₂ 差异倍数 (>1.5 或 <-1.5)	P	ESCC 组 vs 对照组
hsa-miR-548k	2.632	<0.001	上调
hsa-miR-6516-5p	2.253	<0.001	上调
hsa-let-7b-3p	1.877	0.003	上调
hsa-miR-3934-5p	1.688	0.008	上调
hsa-miR-196a-5p	1.601	0.001	上调
hsa-miR-1228-5p	-1.565	0.013	下调
hsa-miR-200b-3p	-1.714	<0.001	下调
hsa-miR-200a-5p	-1.761	0.001	下调
hsa-miR-548p	-1.787	<0.001	下调
hsa-miR-548ah-3p	-1.787	<0.001	下调
hsa-miR-548u	-2.073	<0.001	下调
novel_167	-2.579	<0.001	下调
hsa-miR-34c-5p	-3.106	<0.001	下调

2.4 训练队列中差异性 miRNAs 的表达及诊断价值评估

与对照组相比, miR-34c-5p、miR-548u 在 ESCC 组血浆外泌体中显著下调 ($P=0.039, 0.018$), miR-548k、miR-6516-5p 在 ESCC 组血浆外泌体中显著上调 ($P<0.001, P=0.029$, 图 4A)。ROC 曲线分析结果

显示, 血浆外泌体 miR-34c-5p、miR-548u、miR-548k、miR-6516-5p 用于 ESCC 诊断时敏感性分别为 80%、70%、85%、75%, 特异性分别为 60%、65%、85%、50%, ROC 曲线下面积 (area under curve, AUC) 值分别为 0.678、0.735、0.918、0.670, 截断值 (cutoff 值, ΔCT 表示) 分别为 5.08、9.20、10.66、7.01 (图 4B)。

A



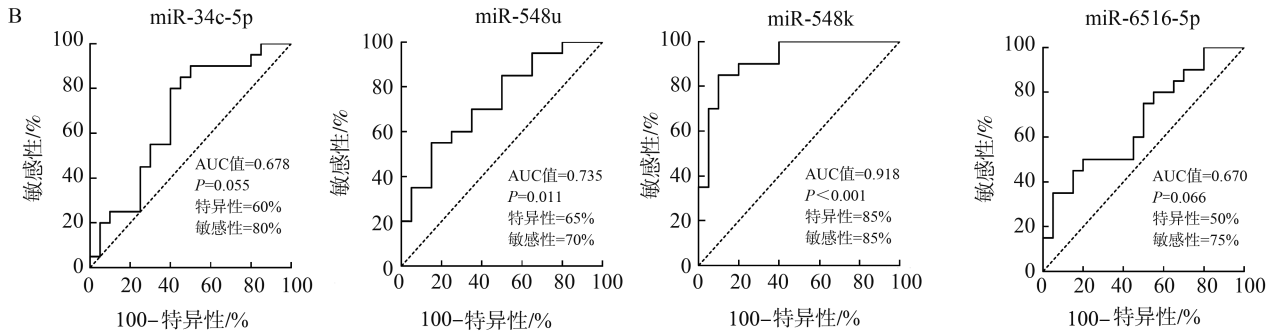


图4 训练队列血浆外泌体中差异性 miRNAs 的表达及诊断价值评估

A: 训练队列血浆外泌体中差异性 miRNAs 相对表达量 (* $P<0.05$, $\Delta P<0.001$ vs 对照组); B: 训练队列血浆外泌体中差异性 miRNAs 诊断 ESCC 的 ROC 曲线。

Figure 4 The expression and diagnostic value of differential plasma exosomal miRNAs in training cohort

A: qRT-PCR analysis of differential miRNAs expression in plasma exosomes of training cohort (* $P<0.05$, $\Delta P<0.001$ vs control group); B: ROC curve of the diagnostic value of differential exosomal miRNAs for ESCC in training cohort.

2.5 miR-548k 在 ESCC 中表达及预后分析

UALCAN 结果显示,与正常组织相比,ESCC 组织中 miR-548k 表达水平显著上调($P<0.001$,图 5A)。UCSC Xena 数据库同样显示,ESCC 组织中 miR-548k 表达水平显著高于正常组织($P=0.005$,图 5B)。

此外,Kaplan-Meier plotter 预后分析软件结果显示,miR-548k 表达水平与 ESCC 患者 5 年总体预后密切相关,miR-548k 高表达者,预后往往较差($P=0.006$,图 5C)。

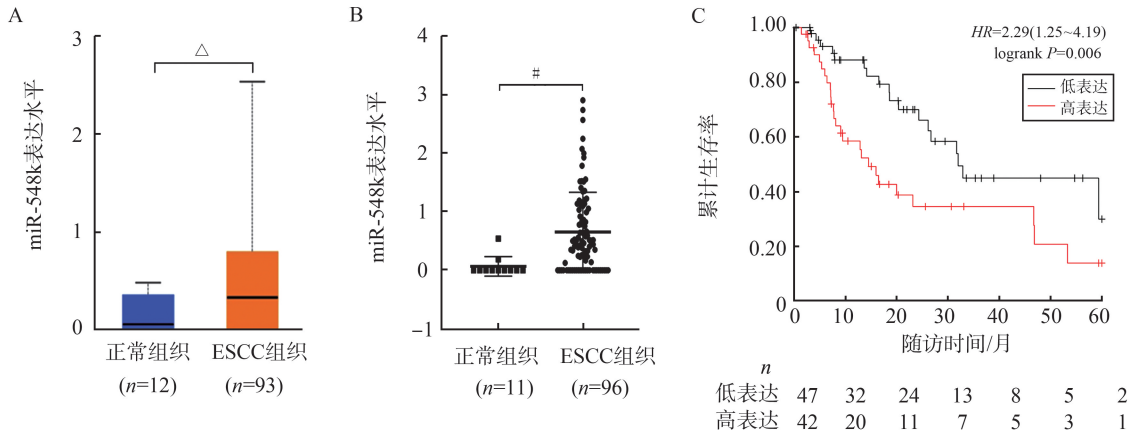


图5 miR-548k 在 ESCC 中表达及预后分析

A: UALCAN 网站分析正常组织、ESCC 组 miR-548k 的相对表达量 ($\Delta P<0.001$ vs 正常组织); B: UCSC Xena 在线网站分析 ESCC 组织中 miR-548k 的表达 ($\Delta P<0.01$ vs 正常组织); C: Kaplan-Meier plotter 软件分析 miR-548k 与 ESCC 患者 5 年总体预后的关系。

Figure 5 Expression and prognosis analysis of miR-548k in ESCC

A: The level of miR-548k in normal and ESCC tissues analyzed by the UALCAN website ($\Delta P<0.001$ vs normal tissues); B: The level of miR-548k in normal and ESCC tissues analyzed by the UCSC Xena website ($\Delta P<0.01$ vs normal tissues); C: Kaplan-Meier plot of miR-548k for 5-year overall survive of ESCC patients.

2.6 验证队列中血浆外泌体 miR-548 的表达及诊断价值评估

与训练队列结果一致,验证队列中 ESCC 组血浆外泌体 miR-548k 表达水平较对照组明显上调($P<0.001$,图 6A),ROC 曲线分析结果显示,血浆外泌体 miR-548k 用于 ESCC 诊断时敏感性高达 83.3%,特异性也达到 86.7%,AUC 值为 0.889,cutoff 值为 10.09(图 6B)。而传统肿瘤标志物 SCC 用于 ESCC 诊断时敏感性、特异性、AUC 值分别为 70.0%、93.3%、0.871(图 6C)。可见,血浆外泌体 miR-548k 在 ESCC 诊断中

具有较高的诊断效能。

2.7 血浆外泌体 miR-548 表达与 ESCC 患者临床病理特征相关性分析

χ^2 检验结果显示,血浆外泌体 miR-548k 表达与患者的 N 分期、TNM 分期呈明显正相关;N1-3 期患者血浆外泌体 miR-548k 表达水平显著高于 N0 期患者($P=0.004$),III-IV 期患者表达显著高于 I-II 期患者($P=0.021$),而与患者的性别、年龄、分化程度及 T 分期无明显相关性($P>0.05$),见表 2。

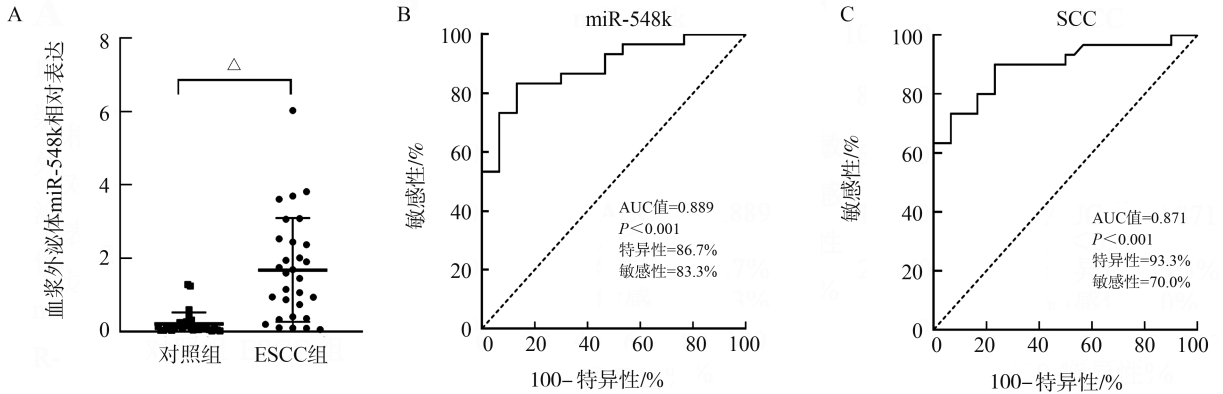


图6 验证队列中血浆外泌体 miR-548 的表达及诊断价值评估

A: 验证队列血浆外泌体中 miR-548k 相对表达量 ($\Delta P < 0.001$ vs 对照组); B: 验证队列中血浆外泌体 miR-548k 诊断 ESCC 的 ROC 曲线; C: 验证队列中肿瘤标志物 SCC 诊断 ESCC 的 ROC 曲线。

Figure 6 Expression and diagnostic value of plasma exosomal miR-548k in validation cohort

A: qRT-PCR analysis of miR-548k expression in plasma exosomes of validation cohort ($\Delta P < 0.001$ vs healthy control); B: ROC curve of diagnostic value of plasma exosomal miR-548k for ESCC in validation cohort; C: ROC curve of diagnostic value of SCC in validation cohort.

表2 血浆外泌体 548k 表达与 50 例 ESCC 患者临床病理特征之间的关系

Table 2 Correlations between plasma exosomal miR-548k level and clinicopathologic characteristics of 50 ESCC patients

临床特征	训练队列 <i>n</i> = 20	验证队列 <i>n</i> = 30	miR-548k 表达/ <i>n</i> (%)			<i>P</i>
			<i>n</i> = 50	低表达	高表达	
性别						0.758
男	15	20	35	17(48.6)	18(51.4)	
女	5	10	15	8(53.3)	7(46.7)	
年龄/岁						0.544
<60	4	12	16	9(56.3)	7(43.7)	
≥60	16	18	34	16(47.1)	18(52.9)	
分化程度						0.556
低	13	19	32	15(46.9)	17(53.1)	
中高	7	11	18	10(55.6)	8(44.4)	
T 分期						0.069
T1~2	9	7	16	11(68.8)	5(31.2)	
T3~4	11	23	34	14(41.2)	20(58.8)	
N 分期						0.004
N0	10	10	20	15(75.0)	5(25.0)	
N1~3	10	20	30	10(33.3)	20(66.7)	
TNM 分期						0.021
I + II	11	9	20	14(70.0)	6(30.0)	
III + IV	9	21	30	11(36.7)	19(63.3)	

3 讨论

近年来,随着外泌体分离技术的成熟及研究的深入,外泌体在疾病发生发展中的作用逐渐被揭示。外泌体不仅参与免疫应答、神经信号转导等正常生理过程,其在肿瘤、神经系统等多种疾病的发生发展中同样发挥着重要作用^[21-22]。特别是在肿瘤的进展过程中,外泌体所携带的生物活性物质也会随之发生相应的改变,因而外泌体在肿瘤诊断方面有着

巨大的潜力^[23-25]。研究表明,外泌体在 ESCC 的早期诊断、预后判断及放化疗抵抗方面同样扮演着重要角色^[26]。与传统的食管拉网脱落细胞学、上消化道钡餐等 ESCC 筛查方法相比,血浆/血清外泌体的检测具有创伤小、简便快捷、可连续监测的特点,因此在 ESCC 诊断方面有着广阔的应用前景^[27]。Yan 等^[28]研究发现,ESCC 患者血清外泌体 LncRNA:UCA1、POU3F3、ESCCAL-1 及 PEG10 表达水平较健康对照显著上调,可用于 ESCC 早期筛查。但是 LncRNA 在血清/血浆外泌体中的表达丰度较低,与

之相比,外泌体中 miRNAs 含量远超 LncRNAs、circRNAs 的表达,不需体外扩增即可直接检测。此外,与血清外泌体相比,血浆外泌体不受血小板的影响,因此,血浆外泌体 miRNAs 脱颖而出,成为近年来肿瘤无创检查的热点。

本研究为筛选血浆外泌体中可用于 ESCC 诊断的 miRNAs,对 5 例健康体检者、5 例 ESCC 患者术前血浆外泌体 miRNAs 进行了测序。测序结果显示,与对照组相比,miR-548k、miR-6516-5p、let-7b-3p、miR-3934-5p、miR-196a-5p 在 ESCC 组血浆外泌体中明显上调,miR-34c-5p、novel_167、miR-548u、miR-548ah-3p、miR-548p、miR-200a-5p、miR-200b-3p、miR-1228-5p 则明显下调。训练阶段,miR-548k 在血浆外泌体中显著高表达,血浆外泌体 miR-548k 对 ESCC 诊断的价值明显高于 miR-34c-5p 等其他差异性 miRNAs。miR-548k 位于染色体 11q13.3,该区域在 ESCC 组织中存在高频扩增现象^[29]。近年研究表明,miR-548k 作为潜在的促癌分子在乳腺癌、食管癌中表达显著上调。特别是在 ESCC 中,miR-548k 可通过调控 ESCC 细胞的增殖、迁移侵袭及 ESCC 相关淋巴管生成促进 ESCC 发生发展^[29-32]。但是 miR-548k 在 ESCC 患者血浆外泌体中的表达及诊断价值尚不明确。

本研究通过 UALCAN、UCSC Xena 数据库分析及 qRT-PCR 验证,发现 miR-548k 在 ESCC 组织中表达水平显著增高,血浆外泌体 miR-548k 表达与 ESCC 患者的 N 分期、TNM 分期呈明显正相关,且预后分析显示,miR-548k 水平与 ESCC 患者预后密切相关,miR-548k 高表达者预后往往较差,提示着 miR-548k 可能是驱动 ESCC 发生发展的关键分子。通过对验证队列中对照组、ESCC 组血浆外泌体中 miR-548k 表达水平进行检测,结果显示,miR-548k 在 ESCC 患者血浆外泌体中表达水平显著增高。ROC 曲线分析结果显示,血浆外泌体 miR-548k 用于 ESCC 诊断时敏感性为 83.3%,特异性为 86.7%,显示血浆外泌体 miR-548 可成为 ESCC 诊断的分子标志物。Liu 等^[33] 研究报道血清外泌体 miR-25/miR-203 用于 ESCC 诊断时 AUC 值、敏感性、特异性分别为 0.821、71.9%、96.6%。但是,该研究局限于特定 miRNAs 分子的表达,且并未对 miR-25/miR-203 的诊断价值进行验证。与之相比,本研究通过筛选、训练及验证 3 个队列,对差异性 miRNAs 的表达、诊断价值进行筛选及验证,具有更高的准确性。此外, Kim 等^[34] 通过对食管上皮细胞、ESCC 细胞上清中的外泌体 miRNA 进行测序,并通过血

浆外泌体样本进行验证,鉴定出了可用于 ESCC 诊断的 miR-205-5p、miR-429、miR-375-3p。但是,细胞上清与血浆 miRNA 表达谱存在一定的差异。与之相比,本研究对对照组、ESCC 组受试者血浆外泌体测序,能够直接反应血浆样本中 miRNA 表达情况。由于本研究所纳入的样本量较小,血浆外泌体 miR-548k 能否成为 ESCC 诊断的分子标志物还需要大样本验证。此外,尽管公共数据库分析显示 miR-548k 高表达与 ESCC 患者不良预后相关,但由于本研究样本随访时间较短,血浆外泌体 miR-548k 能否用于 ESCC 患者的预后判断还需要进一步的随访。

综上所述,本研究结果显示,ESCC 患者术前血浆外泌体中 miR-548k 表达水平显著增高,血浆外泌体 miR-548k 在 ESCC 诊断方面有着较高的敏感性、特异性,有望成为 ESCC 患者诊断的潜在分子标志物。

参考文献:

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, 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] Yang S, Lin S, Li N, et al. Burden, trends, and risk factors of esophageal cancer in China from 1990 to 2017: an up-to-date overview and comparison with those in Japan and South Korea[J]. *J Hematol Oncol*, 2020, 13(1): 146.
- [3] Visaggi P, Barberio B, Ghisa M, et al. Modern diagnosis of early esophageal cancer: from blood biomarkers to advanced endoscopy and artificial intelligence[J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(13): 3162. doi: 10.3390/cancers13133162.
- [4] Codipilly DC, Qin Y, Dawsey SM, et al. Screening for esophageal squamous cell carcinoma: recent advances[J]. *Gastrointest Endosc*, 2018, 88(3): 413-426.
- [5] Ju M, Ge X, Di X, et al. Diagnostic, prognostic, and recurrence monitoring value of plasma CYFRA21-1 and NSE levels in patients with esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 789312. doi: 10.3389/fonc.2021.789312.
- [6] Mou X, Peng ZL, Yin T, et al. Non-endoscopic screening for esophageal squamous cell carcinoma: recent advances[J]. *J Gastrointest Cancer*, 2023. doi: 10.1007/s12029-023-00980-x.
- [7] 宋颂, 雷林, 张瑞, 等. 食管癌筛查的研究进展[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2022, 29(7): 451-455.
SONG Song, LEI Lin, ZHANG Rui, et al. Research progress on screening for esophageal cancer[J]. *Chinese*

- Journal of Cancer Prevention and Treatment, 2022, 29 (7): 451-455.
- [8] 刘宇英,魏君丽,江柔,等.食管癌的流行病学及筛查研究进展[J].中华疾病控制杂志,2022,26(7):839-844.
- LIU Yuying, WEI Junli, JIANG Rou, et al. Research progress on the epidemiology and screening of esophageal cancer[J]. Chinese Journal of Disease Control and Prevention, 2022, 26(7): 839-844.
- [9] 凌媛媛,于文俊,乔永霞.液体活检对食管癌诊疗和预后的价值[J].中国细胞生物学学报,2023,45(12):1896-1907.
- LING Yuanyuan, YU Wenjun, QIAO Yongxia. Diagnostic and prognostic values of liquid biopsy in esophageal cancer[J]. Chinese Journal of Cell Biology, 2023, 45 (12): 1896-1907.
- [10] Liu J, Ren L, Li S, et al. The biology, function, and applications of exosomes in cancer[J]. Acta Pharm Sin B, 2021, 11(9): 2783-2797.
- [11] Pegtel DM, Gould SJ. Exosomes[J]. Annu Rev Biochem, 2019, 88: 487-514. doi: 10.1146/annurev-biochem-013118-111902.
- [12] Shang RF, Lee S, Senavirathne G, et al. MicroRNAs in action: biogenesis, function and regulation[J]. Nat Rev Genet, 2023, 24: 816-833. doi: 10.1038/s41576-023-00611-y.
- [13] Sun Z, Sun Z, Shi K, et al. Effect of exosomal miRNA on cancer biology and clinical applications[J]. Mol Cancer, 2018, 17(1): 147.
- [14] Du Y, Wu L, Wang L, et al. Extracellular vesicles in cardiovascular diseases: from pathophysiology to diagnosis and therapy[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2023, 74: 40-55. doi:10.1016/j.cytogfr.2023.09.006.
- [15] 郑清月,赵秋红,渠香云,等.血清外泌体 miR-205-5p/miR-152-5p 对早期非小细胞肺癌的诊断价值[J].山东大学学报(医学版),2019,57(10):101-106.
- ZHENG Qingyue, ZHAO Qihong, QU Xiangyun, et al. Diagnosis value of serum exosome miR-205-5p/miR-152-5p on early non-small cell lung cancer[J]. Journal of Shandong University (Health Sciences), 2019, 57 (10): 101-106.
- [16] Preethi KA, Selvakumar SC, Ross K, et al. Liquid biopsy: exosomal microRNAs as novel diagnostic and prognostic biomarkers in cancer[J]. Mol Cancer, 2022, 21 (1): 54. doi:10.1186/s12943-022-01525-9.
- [17] Xiao Z, Feng X, Zhou Y, et al. Exosomal miR-10527-5p inhibits migration, invasion, lymphangiogenesis and lymphatic metastasis by affecting Wnt/ β -catenin signaling via Rab10 in esophageal squamous cell carcinoma [J]. Int J Nanomedicine, 2023, 18: 95-114. doi: 10.2147/ijn.s391173.
- [18] Zhou L, Wang W, Wang F, et al. Plasma-derived exosomal miR-15a-5p as a promising diagnostic biomarker for early detection of endometrial carcinoma [J]. Mol Cancer, 2021, 20(1): 57. doi: 10.1186/s12943-021-01352-4.
- [19] Chandrashekar DS, Karthikeyan SK, Korla PK, et al. UALCAN: an update to the integrated cancer data analysis platform[J]. Neoplasia, 2022, 25: 18-27. doi:10.1016/j.neo.2022.01.001.
- [20] Lánczky A, Györfy B. Web-based survival analysis tool tailored for medical research (KMplot): development and implementation[J]. J Med Internet Res, 2021, 23 (7): e27633. doi:10.2196/27633.
- [21] Kalluri R, LeBleu VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes [J]. Science, 2020, 367(6478): eaau6977.
- [22] Boriachek K, Islam MN, Möller A, et al. Biological functions and current advances in isolation and detection strategies for exosome nanovesicles[J]. Small, 2018, 14 (6). doi:10.1002/sml.201702153.
- [23] 王传新.外泌体生物标志物与肿瘤发生发展的研究进展[J].山东大学学报(医学版),2018,56(10):18-23.
- WANG Chuanxin. Research progress of exosomes biomarkers in tumor development[J]. Journal of Shandong University (Health Sciences), 2018, 56(10): 18-23.
- [24] Yu W, Hurley J, Roberts D, et al. Exosome-based liquid biopsies in cancer: opportunities and challenges[J]. Ann Oncol, 2021, 32(4): 466-477.
- [25] Patel G, Agnihotri TG, Gitte M, et al. Exosomes: a potential diagnostic and treatment modality in the quest for counteracting cancer [J]. Cell Oncol, 2023, 46(5): 1159-1179.
- [26] 金玮娜,陈蒙蒙,彭天娇,等.食管癌相关外泌体 miRNA 的研究进展[J].食管疾病,2022,4(3):193-197.
- JIN Weina, CHEN Mengmeng, PENG Tianjiao, et al. Progress in esophageal cancer-related exosomal miRNA [J]. Journal of Esophageal Diseases, 2022, 4(3): 193-197.
- [27] Jing Z, Chen K, Gong L. The significance of exosomes in pathogenesis, diagnosis, and treatment of esophageal cancer[J]. Int J Nanomedicine, 2021, 16: 6115-6127. doi:10.2147/ijn.s321555.
- [28] Yan S, Du L, Jiang X, et al. Evaluation of serum exosomal lncRNAs as diagnostic and prognostic biomarkers for esophageal squamous cell carcinoma [J]. Cancer Manag Res, 2020, 12: 9753-9763. doi: 10.2147/cmar.s250971.
- [29] Zhang W, Hong R, Li L, et al. The chromosome 11q13.3 amplification associated lymph node metastasis is driven by miR-548k through modulating tumor microenvironment[J].

- Mol Cancer, 2018, 17(1): 125. doi:10.1186/s12943-018-0871-4.
- [30] Chen Z, Lin J, Wu S, et al. Up-regulated miR-548k promotes esophageal squamous cell carcinoma progression via targeting long noncoding RNA-LET [J]. Exp Cell Res, 2018, 362(1): 90-101.
- [31] Lin J, Chen Z, Wu S, et al. An NF90/long noncoding RNA-LET/miR-548k feedback amplification loop controls esophageal squamous cell carcinoma progression [J]. J Cancer, 2019, 10(21): 5139-5152.
- [32] Yadollahi-Farsani M, Amini-Farsani Z, Moayedi F, et al. MiR-548k suppresses apoptosis in breast cancer cells by affecting PTEN/PI3K/AKT signaling pathway [J]. IUBMB Life, 2023, 75(2): 97-116.
- [33] Liu Z, Huang Y, Han Z, et al. Exosome-mediated miR-25/miR-203 as a potential biomarker for esophageal squamous cell carcinoma: improving early diagnosis and revealing malignancy [J]. Transl Cancer Res, 2021, 10(12): 5174-5182.
- [34] Kim S, Kim GH, Park SJ, et al. Exosomal microRNA analyses in esophageal squamous cell carcinoma cell lines [J]. J Clin Med, 2022, 11(15): 4426. doi:10.3390/jcm11154426.

(编辑:徐苗蓁)

读者·作者·编者

阿拉伯数字使用规则

公历世纪、年代、年、月、日和时刻必须使用阿拉伯数字。年份用四位数表示,不能简写。例如:1999年不能写成99年。日期和时间的表示采用全数字式写法。例如:2006年2月18日,写作2006-02-18或19990218或1999 02 18(年、月、日之间加半字空);下午3时9分38.5秒写作15:09:38.5或150938.5。计量单位前的数字和统计表中的数值一律使用阿拉伯数字。引文标注中的版次、卷号、期号、页码等用阿拉伯数字。

(本刊编辑部)