

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.22.003

肝细胞癌患者血清外泌体 microRNA 表达鉴定*

纪奇峰^{1,2} 祝春来^{1,2} 王伟^{2,3} 毛壮⁴ 汪钦^{1,2} 成珊^{1,2} 颜真^{1,2,Δ}

(1 第四军医大学药学院药物基因组学教研室 陕西 西安 710032; 2 肿瘤生物学国家重点实验室 陕西 西安 710032;

3 第四军医大学药学院药事管理与药物信息学教研室 陕西 西安 710032; 4 第四军医大学学员一旅一营三连 陕西 西安 710032)

摘要 目的:探讨肝细胞外泌体中差异表达的 microRNAs(miRNAs)在肝细胞癌(HCC)诊断中的应用价值。**方法:**通过高通量测序筛选肝细胞外泌体中差异表达的 miRNAs。实时定量 PCR 验证差异表达分子;检测差异表达的 miRNAs 在健康人(Health)、慢性乙型肝炎患者(CHB)、肝硬化患者(LC)及乙型肝炎病毒阳性的肝细胞癌患者(HCC)血清外泌体中的表达。**结果:**高通量测序筛选到肝细胞外泌体中差异表达的 miRNA 共 88 种,其中 58 种表达上调,30 种表达下调。选择其中 8 种差异表达的 miRNAs 进行 qRT-PCR 验证,结果显示,此 8 种 miRNAs 在细胞上清外泌体、细胞内、癌与癌旁组织中的表达趋势与测序结果一致。miR-221-3p 和 miR-224-5p 在 HCC 组外泌体中的表达水平显著高于 Health 组、CHB 组和 LC 组 ($P<0.01$),miR-124-3p 和 let-7a-5p 在 HCC 组外泌体中的表达水平显著低于其他各组($P<0.05$)。四个组中,miR-21-5p、miR-191-5p、miR-34a-5p 和 miR-122-5p 的表达水平不存在显著性差异($P>0.05$)。**结论:**血清外泌体中的 miR-221-3p、miR-224-5p、miR-124-3p 和 let-7a-5p 可能成为肝细胞癌的候选标志物。

关键词:肝细胞癌;外泌体;miRNAs;肿瘤标志物

中图分类号:R-33;R735.7 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6373(2018)22-4213-06

Exosomal MicroRNA Expression Identification in Hepatocellular Carcinoma Patients Serum*

JI Qi-feng^{1,2}, ZHU Chun-lai^{1,2}, WANG Wei^{2,3}, MAO Zhuang⁴, WANG Qin^{1,2}, CHENG Shan^{1,2}, YAN Zhen^{1,2,Δ}

(1 Department of Pharmacogenomics, School of Pharmacy, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

2 State Key Laboratory of Cancer Biology, Xi'an, Shaanxi, 710032, China; 3 Department of Pharmacy administration and Drug

Information, School of Pharmacy, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

4 Cadet Brigade, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To explore the possible clinical application of differentially expressed exosomal miRNAs in hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods:** The differentially expressed miRNAs from HCC cells exosomes were screened by Next Generation Sequencing. The expression levels of differentially expressed miRNAs were confirmed by quantitative real-time PCR and evaluated in healthy controls (Health), hepatitis B patients (CHB), liver cirrhosis patients (LC) and hepatitis B positive HCC patients. **Results:** Eighty-eight differentially expressed miRNAs were identified in exosomes of HCC cell lines through highthroughput sequencing, including 58 up-regulated and 30 down-regulated miRNAs. Eight differentially expressed miRNAs were verified by qRT-PCR. It showed that miRNA expression was consistent with the sequencing results in either cell line exosomes or in cell lines, also in tumor tissues vs. adjacent tissues. The expression levels of miR-221-3p and miR-224-5p in exosomes were significantly higher in HCC patients than those in Health, CHB or LC group ($P<0.01$). Furthermore, the expression levels of exosomal miR-124-3p and let-7a-5p were lower in HCC than Health, CHB or LC group ($P<0.05$). There was no significant difference in the expression of miR-21-5p, miR-191-5p, miR-34a-5p and miR-122-5p among the four groups ($P>0.05$). **Conclusion:** Serum exosomal miR-221-3p, miR-224-5p, miR-124-3p and let-7a-5p have the possibility to become candidate biomarkers for hepatocellular carcinoma diagnosis.

Key words: Hepatocellular carcinoma; Exosome; miRNAs; Tumor biomarker

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R735.7 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)22-4213-06

前言

外泌体的直径约为 30~100 nm,内容物丰富,参与了如免疫应答、细胞间通讯等多种生理进程,是一种重要的细胞间物

质和信息交流工具^[1]。不同组织来源的外泌体在组成和功能方面存在差异,这就为通过分析外泌体成分的变化来判断疾病的变化提供了基础^[2]。最近,多项研究结果表明,外泌体中异常表达的 miRNA 与某些特征性的肿瘤疾病密切相关,使之成为一

* 基金项目:肿瘤生物学国家重点实验室自由探索项目(CBSKL2015Z14);陕西省科技统筹创新工程项目(2016KTCL03-09)

作者简介:纪奇峰(1992-),硕士研究生,主要从事肝癌分子标志物相关研究工作,电话:15829317580,E-mail: 2496914459@qq.com

Δ 通讯作者:颜真(1961-),博士生导师,教授,主要从事肿瘤及药物基因组学研究工作,E-mail: yanzhen@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2018-03-23 接受日期:2018-04-18)

种新型的疾病诊断候选标志物。

肝癌是一种常见的恶性肿瘤,50%的肝癌发病和死亡发生在中国,而70~90%的原发性肝癌属于肝细胞癌^[3]。肝细胞癌发病隐匿,进展迅速,一经发现即是晚期,从而失去手术时机^[4]。近年有关外泌体与肝癌的研究已经开始,主要涉及外泌体调控肝脏肿瘤细胞能量代谢、诱导肿瘤血管新生、增强肿瘤细胞侵袭性等^[5-11],然而其作为生物标志物的研究还非常有限。

本研究选取了肝癌细胞系上清外泌体中差异表达的 miRNAs,探索其在肝细胞癌患者、健康人、慢性乙肝患者和肝硬化患者血清外泌体的表达情况,旨在为肝细胞癌早期临床诊断提供依据。

1 资料与方法

1.1 临床样本

研究样本共80例,来自2015年9月至2017年6月第四军医大学西京医院体检的健康人(Health组)以及确诊的乙肝阳性患者,其中乙肝阳性患者又被分为慢性乙肝患者(CHB组)、HBV阳性的肝硬化患者(LC组)及HBV阳性的肝细胞癌(合并或不合并肝硬化)患者(HCC组)。各组20例,均符合相应的诊断标准。Health组、CHB组和LC组排除其他如心、肺、胃肠等内脏器官器质性疾病。LC组为经过影像学(超声、CT)手段确诊肝硬化的患者;HCC组为HBV阳性经过影像(超声、CT)和病理检查确诊的患者。研究中纳入血清标本的患者在取血前未接受任何治疗。HCC组患者的血清在肿瘤手术切除前收集,同时收集HCC患者手术切除的肝癌及毗邻癌旁组织标本。

1.2 材料及仪器

人正常肝细胞系HL-7702及HBV阳性肝癌细胞系Hep 3B购自南京科佰生物科技有限公司;胎牛血清购自以色列Biological Industries公司;DMEM培养基及血清外泌体提取试剂盒Total exosome Isolation from serum购自美国赛默飞世尔公司;RNAiso Plus、Mir-XTM miRNA First-Strand Synthesis kit反转录试剂盒、SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus)实时定量PCR试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司;PCR引物由上海生工生物技术有限公司合成;细胞上清外泌体提取试剂盒Ribo™ Exosome Isolation Reagent (for cell culture media)及内参Cel-miR-39购自广州市锐博生物科技有限公司;FITC-labeled-anti-CD63和FITC-labeled-anti-CD81抗体购自美国生物科学事业部公司;透射式电子显微镜(JEOL JEM-1230)购自日本电子株式会社;流式细胞仪(Accuri C6 Flow cytometer)购自美国Becton Dickinson公司;Real-time PCR仪(Applied Biosystems 7500)购自美国赛默飞世尔公司。

1.3 外泌体的分离与鉴定

1.3.1 细胞上清外泌体的提取与 miRNA 高通量测序 收集无囊泡血清培养基培养的HL-7702及Hep 3B细胞上清,按照广州市锐博生物科技有限公司细胞上清外泌体提取试剂盒说明书提取外泌体,进一步提取total RNA,样品送至广州市锐博生物科技有限公司进行miRNA的高通量测序。

1.3.2 血清外泌体的提取 采用赛默飞世尔公司血清外泌体提取试剂盒,操作步骤简述如下:① 250 μL的血清2000×g离心30 min,去除血细胞及碎片;② 将上清转移至新的EP管中,

加入50 μL外泌体沉淀试剂;③ 涡旋混匀成为均质溶液,2-8℃孵育30 min;④ 10,000×g室温离心10 min;⑤ 吸弃上清,管底的沉淀即为外泌体,用适当体积的PBS进行重悬。

1.3.3 透射电镜鉴定外泌体形态 将提取的外泌体用250 μL PBS稀释,枪头吹打混匀后取稀释液10 μL滴于2 mm的载样铜网上,室温静置5 min,用滤纸将多余液体轻轻吸去。用3% (质量浓度)磷钨酸钠液负染3 min,室温晾干,在80 KV透射电镜下观察并拍照。

1.3.4 流式细胞术鉴定外泌体表面标志物 将提取好的外泌体用FITC-labeled anti-CD63和FITC-labeled-anti-CD81染色,使用流式细胞仪进行检测。

1.4 实时定量PCR检测 miRNAs 的表达

使用Trizol法提取组织及外泌体中的total RNA。在提取外泌体中total RNA前加入25 fmol的cel-miR-39-5p作为内参以标准化实时定量PCR结果。miRNA反转录反应如下:37℃ 60 min,85℃ 5 min。对高通量测序结果中差异表达的miRNAs(miR-221-3p、miR-224-5p、miR-21-5p、miR-191-5p、miR-124-3p、let-7a-5p、miR-34a-5p和miR-122-5p)进行检测。将得到的反转录产物进行实时定量PCR扩增,反应总体积为20 μL。反应过程如下:95℃预变性30 s,95℃变性5 s,60℃退火延伸34 s,40个循环。每个样品的Ct值为PCR反应后三个复孔Ct的均值,cel-miR-39-5p为内参,基因相对表达水平计算方式如下 $\Delta Ct = Ct_{miRNA} - Ct_{cel-miR-39-5p}$ ^[12],计算方法为 $2^{-\Delta Ct}$ ^[13]。

1.5 统计学处理

实验数据以均值±标准差表示($\bar{x} \pm SD$)表示,miRNAs在细胞上清外泌体、细胞系、癌和癌旁组织中的表达差异性检验使用配对样本t检验,miRNAs在血清外泌体中的表达差异性检验采用ANOVA统计分析,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义,统计采用SPSS 16.0完成。

2 结果

2.1 外泌体的鉴定

按照外泌体提取试剂盒说明书步骤分离提取细胞上清和人血清外泌体,使用透射电镜(×100,000)观察外泌体的形态与大小,可见提取的外泌体呈现完整的囊泡状结构,大小为30~100 nm,与文献报道的外泌体大小和形态相一致(图1A、1B)^[4]。利用流式细胞仪对提取的外泌体进行检测,选取CD63和CD81作为外泌体膜蛋白标志。检测结果显示CD63和CD81蛋白均呈阳性表达(图1C、1D),证实细胞上清及人血清中存在丰富的外泌体。

2.2 细胞上清外泌体 miRNA 高通量测序与差异表达分子筛选

通过对人正常肝细胞系HL-7702及HBV阳性肝癌细胞系Hep 3B细胞培养上清外泌体的分离与miRNA进行高通量测序,比对后发现两者间有88种miRNA存在表达差异,其中Hep 3B细胞上清外泌体中表达升高的有58种,表达降低的有30种。其中差异倍数2倍及以上的部分结果如表1所示

2.3 临床信息分析

按照资料与方法所述收集检测对象的临床信息,针对AFP、肝功主要数据进行统计分析,结果显示ALT、AST在CHB组中显著高于Health组、LC组和HCC组,差异有统计学

意义($P<0.001$);HCC 组 AFP 显著高于 CHB 组和 LC 组,差异有统计学意义($P<0.001$);HCC 组中,肿瘤直径大于等于 5 cm 的样本有 5 例,直径小于 5 cm 的样本有 15 例;TNM I 期的样

本有 7 例,TNM II 期的样本有 8 例,TNM III 期的样本有 5 例。详情见表 2。

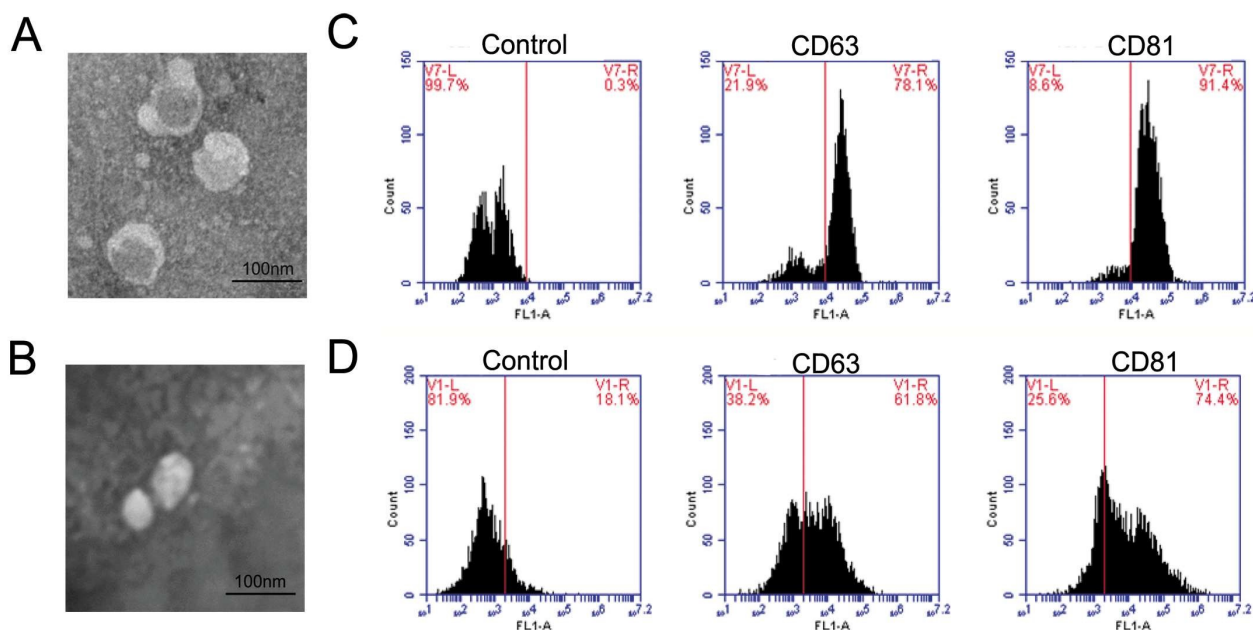


图 1 细胞上清及人血清外泌体的鉴定

(A)细胞上清及(B)人血清外泌体透射电镜鉴定图($\times 100,000$);流式细胞检测(C)细胞上清及(D)人血清外泌体 CD63 和 CD81 表达

Fig.1 Identification of exosomes derived from cell supernatants and serum

The transmission electron microscope image of exosomes derived from cell supernatant(A) and serum(B)($\times 100,000$); Expression of CD63 and CD81 of exosomes derived from cell supernatant(C) and serum(D) was detected by flow cytometer.

表 1 培养细胞上清外泌体 miRNA 高通量测序差异表达结果(Hep 3B vs HL-7702)

Table 1 The differential expressed exosomal miRNAs identified by high-throughput sequencing from cell supernatant(Hep 3B vs HL-7702)

miRNA ID	log2(fold change)	P
miR-221-3p	8.1	<0.0001
miR-224-5p	8.1	<0.0001
miR-21-5p	2.1	<0.0001
miR-191-5p	1.9	<0.0001
miR-122-5p	-8.4	<0.0001
miR-124-3p	-7.5	<0.0001
miR-34a-5p	-8.0	<0.0001
let-7a-5p	-7.2	<0.0001

表 2 样本的临床特征(N=80)

Table 2 Clinical features of the subjects(N=80)

Clinicopathological parameters	Health (N=20)	CHB (N=20)	LC (N=20)	HCC (N=20)	P
Age(years)	54.5± 7.9	56.4± 7.9	51.9± 9.1	58.1± 8.3	NS
Gender ratio (male/female)	19/1	19/1	19/1	19/1	NS
ALT(IU/L)	18.7± 16.2	67.6± 46.3*	29.8± 12.5	39.7± 21.0	<0.001
AST(IU/L)	18.1± 7.16	84.8± 57.9*	41.2± 19.6	44.7± 26.0	<0.001
AFP(ng/mL)	/	2.7± 1.7	3.4± 2.0	290.7± 72.1*	<0.001

Note: compared with the HCC group, LC group and HCC group, * $P<0.001$.

2.4 miRNAs 在肝癌细胞系与肝细胞癌组织中的表达鉴定

为了验证高通量测序发现的差异表达 miRNA 在肝癌细胞系上清外泌体中的表达,比较 miRNA 在外泌体与肝细胞内的表达一致性,以及与肝癌组织和癌旁组织表达的一致性,我们针对高通量测序结果表一中差异表达的 8 种 miRNAs 分子,分别在 HL-7702 和 Hep 3B 细胞系上清外泌体、HL-7702 和 Hep 3B 细胞中、癌和癌旁组织中进行了实时定量 PCR 表达检测。结果显示:Hep 3B 上清外泌体及细胞中,miR-221-3p、miR-224-5p、miR-21-5p 和 miR-191-5p 的表达显著高于 HL-7702,miR-122-5p、miR-124-3p、miR-34a-5p 和 let-7a-5p 的

表达显著低于 HL-7702,差异有统计学意义 ($P<0.01$)(图 2A、2B);肝细胞癌组织中 miR-221-3p、miR-224-5p、miR-21-5p 和 miR-191-5p 的表达显著高于癌旁组织,差异有统计学意义($P<0.05, P<0.01, P<0.01, P<0.05$)(图 2C);肝细胞癌组织中 miR-122-5p、miR-124-3p、miR-34a-5p 和 let-7a-5p 的表达显著低于癌旁组织,差异有统计学意义 ($P<0.05$)(图 2C)。8 种 miRNAs 在细胞上清外泌体中表达趋势与测序结果一致;同一分子在外泌体中与细胞内的表达趋势一致;虽然 8 种 miRNAs 在肝癌与癌旁组织的表达趋势与外泌体一致,但肝癌与癌旁组织间的表达差异性小于外泌体中的差异。

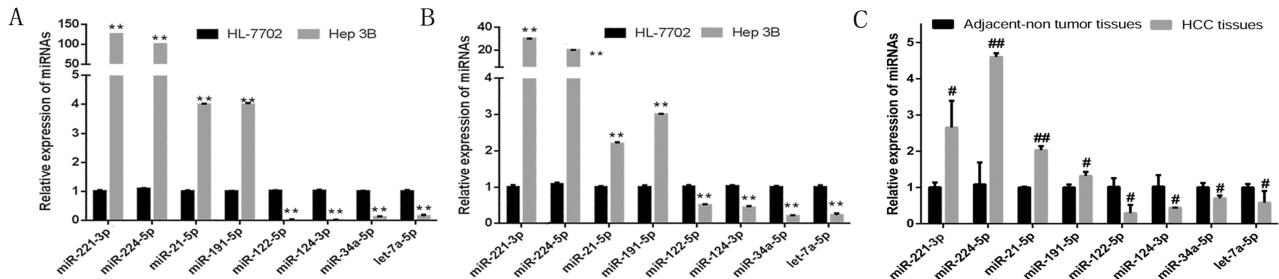


图 2 miRNAs 在肝癌细胞系上清外泌体中(A)、肝癌细胞系中(B)、肝细胞癌组织和癌旁组织中的表达(C)

Fig.2 The expression of miRNAs in HCC cell line supernatant exosomes(A)、HCC cell lines(B)、HCC tissues and adjacent tissues (C)

Note: Data were expressed as $\bar{x} \pm SD$. ** $P<0.01$, compared with HL-7702; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, compared with Adjacent-non tumor tissues.

2.5 血清外泌体 miRNAs 在肝脏疾病中的差异表达

血清外泌体 miRNA 分子是否可区分肝癌、正常人群、慢性乙肝与肝硬化是判断其能否作为肝细胞癌早期诊断标志物的关键。针对细胞上清外泌体中差异表达的 miRNAs,我们进一步对四组患者血清外泌体中的 miRNAs 进行了实时定量表达检测。结果显示:HCC 组与 Health 组、CHB 组、LC 组相比,

miR-221-3p 和 miR-224-5p 的表达水平显著上调,组别之间差异有统计学意义($P<0.01$),其余各组间不存在统计学差异($P>0.05$)(图 3A);miR-124-3p 和 let-7a-5p 的表达水平在 HCC 组则显著下调 ($P<0.05$), (图 3B)。miR-21-5p、miR-191-5p、miR-34a-5p 和 miR-122-5p 的表达水平在各组中均不存在统计学差异(图 3C)。

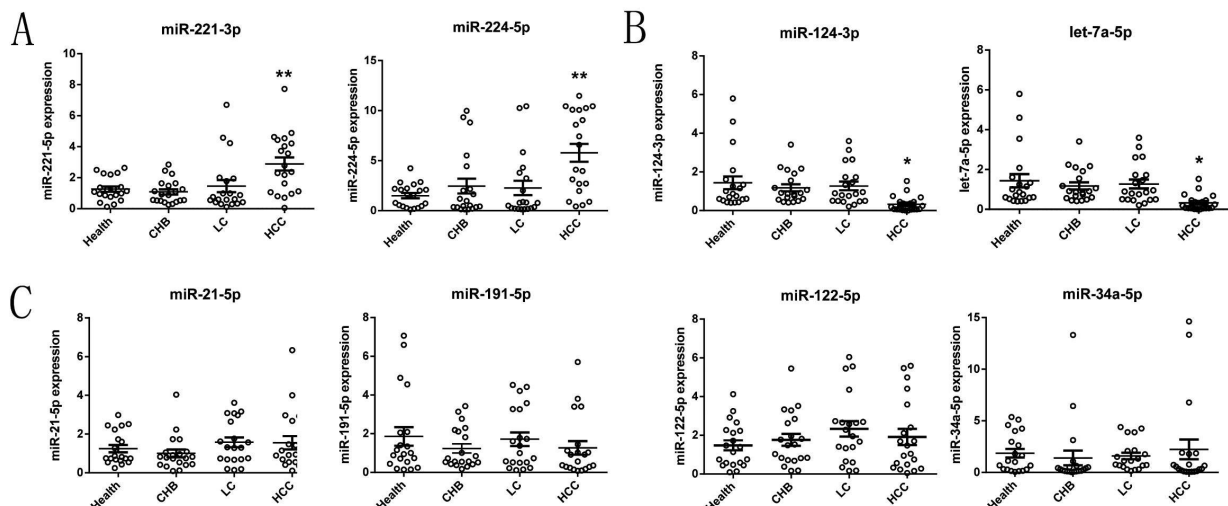


图 3 实时定量 PCR 鉴定血清外泌体 miRNA 表达

(A)miR-221-3p 和 miR-224-5p 在各组样本的表达;(B)miR-124-3p 和 let-7a-5p 在各组样本的表达;

(C)miR-21-5p、miR-191-5p、miR-122-5p 和 miR-34a-5p 在各组样本的表达。

Fig.3 Quantitative Real-time PCR identified expressions of serum exosomal miRNAs

(A)Expressions of miR-221-3p and miR-224-5p among each group patients;(B)Expressions of miR-124-3p and let-7a-5p among each group patients;

(C)Expression of miR-21-5p, miR-191-5p, miR-122-5p and miR-34a-5p among each group patients.

Note: * $P<0.05$, ** $P<0.01$, HCC group compared with Health, CHB and LC group.

3 讨论

外泌体是一种能由绝大多数细胞释放的、具有脂质双分子层和丰富内容物的微囊泡结构,内容物丰富,包括蛋白、脂质和核酸等,研究发现它们参与了如免疫应答、抗原提呈、细胞间通讯等多种生理进程,是一种重要的细胞间物质和信息交流工具^[1]。大量研究表明,肿瘤发生时肿瘤细胞释放外泌体的水平明显增加,其外泌体中含有大量特异性 miRNA^[14-16]。因此外泌体 miRNA 具有成为肿瘤诊断标志物的潜力。

本研究通过对细胞系培养上清外泌体 miRNA 进行高通量测序,筛选获得了 88 种在肝细胞癌细胞中差异表达的 miRNA 分子,我们分别选择了 4 种表达上调(miR-221-3p、miR-224-5p、miR-21-5p 和 miR-191-5p)和 4 种表达下调(miR-124-3p、let-7a-5p、miR-34a-5p、miR-122-5p)的 miRNA 进行下一步实验。文献显示此 8 种 miRNA 可以影响肝癌细胞增殖、细胞周期、侵袭和凋亡等一系列生物学行为^[17-25]。首先我们验证了它们在肝癌细胞系中的表达,证明了高通量测序的准确性;进一步发现这些外泌体中的 miRNA 与肝癌细胞中的表达具有非常好的一致性;并且发现它们在肝细胞癌组织和癌旁组织的表达也具有相同的表达趋势。暗示了肿瘤细胞分泌的外泌体中的 miRNA 丰度可能与细胞内的 miRNA 丰度相关,肿瘤细胞可能通过这些有外泌体包裹的 miRNA 影响肿瘤的发生发展。譬如研究发现高转移乳腺癌细胞内 miR-105 高表达,其分泌的外泌体中 miR-105 表达上调,外泌体 miRNA 被内皮细胞吸收后,可以降低紧密连接蛋白 ZO-1 的表达,从而破坏内皮细胞的紧密连接,破坏细胞间连接的完整性,从而促进细胞的转移^[26]。在已经转移的鼻咽癌组织和即将转移的鼻咽癌组织中,miR-23a 表达较高,其来源的外泌体中 miR-23a 的表达水平也较高,miR-23a 的高表达可促进血管内皮细胞 HUVEC 的生长,提高 HUVEC 的迁移和血管形成能力^[27]。

我们分别检测了来自健康人、慢性乙肝患者、肝硬化患者及肝细胞癌患者血清外泌体中上述 8 种 miRNA 的表达情况,发现 miR-221-3p 和 miR-224-5p 在 HCC 组中的表达显著上调,miR-124-3p 和 let-7a-5p 在 HCC 组中显著下调,其表达差异程度可明显区分正常对照、慢性乙肝以及肝硬化组。文献显示 miR-221-3p 主要与发育(如血管生成^[28]、乳腺发育^[29])和疾病(如肿瘤)相关。miR-221-3p 在多种肿瘤中高表达,在肝癌中亦是如此。在人的肝癌细胞中,上调的 miR-221-3p 通过抑制细胞周期依赖性激酶抑制剂 p27 和 DNA 损伤诱导型转录物的表达,促进细胞生长、增殖、迁徙和侵袭^[30]。miR-224-5p 的相关报道集中于肿瘤,其在多种肿瘤中表达异常。在肝癌细胞中,上调的 miR-224 可抑制 PPP2R1B 的表达,激活 AKT 信号通路进而促进细胞的增殖、迁移和侵袭^[19]。目前已有文章报道,肝癌患者血清外泌体中的 miR-221-3p、miR-224-5p 的表达水平显著高于肝硬化患者和慢性乙型肝炎患者^[31]。本研究结果与其一致,进一步证明了其作为肝癌标志物的可能性。miR-124-3p 被发现在包括肝癌在内的多种肿瘤中表达异常。miR-124-3p 的过表达可抑制 Hep3B 和 SMMC-7221 细胞的活力,其直接靶基因为 KLF4, KLF4 的过表达可提高细胞的成球实验能力和 CD44/133 阳性细胞的数目,提高细胞的干性^[20]。let-7a-5p 属于 let-7 家族,let-7 家族 miRNA 广泛参与了组织器官发育调控,

与肿瘤、心血管疾病、病毒感染等发生发展相关。let-7a-5p 和 HBV 病毒的复制相关,let-7a-5p 过表达通过抑制 EMT 和 Wnt 信号通路,进而影响肝细胞癌细胞的干性^[21,22]。目前已有报道证实,血浆外泌体中的 miR-124-3p 具有成为鼻咽癌的诊断标志物的潜力^[32],let-7a-5p 具有成为结肠癌的诊断标志物的潜力^[33],然而 miR-124-3p 和 let-7a-5p 在肝癌中尚未见此相关报道,本研究发现 miR-124-3p 和 let-7a-5p 在 HCC 组中显著下调,其表达差异程度可明显区分正常对照、慢性乙肝以及肝硬化组。因此,我们的研究结果提示,外泌体中这 4 种 miRNA 分子具有成为肝癌标志物的潜力。

然而我们的研究并没有发现 miR-21-5p、miR-191-5p、miR-34a-5p、miR-122-5p 在各组间的表达差异。据文献报道,相对于慢性乙型肝炎和正常健康人,肝癌患者血清外泌体中的 miR-21 的表达水平明显升高,并且与肝纤维化及肝癌的分期呈正相关^[34]。相较于肝硬化患者和慢性乙型肝炎患者,肝癌患者血清外泌体中的 miR-122 的表达显著降低^[31]。本研究中并没有得到与这两篇报道相一致的结果。虽然有文献报道 miR-191-5p 在肝癌组织中高表达^[35],miR-34a-5p 在肝癌组织中低表达^[17],但结果主要来自细胞研究而非外泌体。另外,由于患者个体之间的差异、外泌体 miRNA 分泌调控机制的复杂性,外泌体中 miRNA 的表达和肝细胞癌细胞中可能并不完全一致,以及受所检测样本数量的局限性,这些原因可能导致我们没有发现这四种 miRNA 表达差异的真实性。

传统的肝癌诊断手段有限,导致了肝细胞癌的生存率和治愈率都极低,血液中循环 miRNAs(circulating miRNAs)的发现一定程度上给肝细胞癌的早期诊断带来了机会。循环 miRNAs 可以是来源于血浆或血清的游离分子,也可以是在细胞中与脂质或脂蛋白结合形成外泌体。外泌体 miRNA 和循环游离 miRNA 相比有着更加明显的优势。首先外泌体有脂质保护,外泌体中的 miRNA 不易被降解破坏^[36]。其次,外泌体反映了其组织来源,使用相应的组织特异性蛋白抗体进行免疫分离可以对外泌体进行分离和来源组织鉴定^[37]。因此外泌体内的 miRNA 的检测具有更高的稳定性和特异性。相信随着外泌体提取分离技术的成熟,外泌体的检测有更好的临床应用前景。

参考文献(References)

- [1] El A S, Mager I, Breakefield X O, et al. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities [J]. Nat Rev Drug Discov, 2013, 12(5): 347-357
- [2] 徐玉彬,崔恒密,薛峰,等.外泌体源性 miRNA 与结直肠癌诊断的研究进展[J].中华普外科手术学杂志, 2016, 12(06): 535-537
Xu Yu-bin, Cui Heng-mi, Xue Feng, et al. Progress in study on the role of exosome-derived microRNA in diagnosis of CRC [J]. Chin J Oper Proc Gen Surg, 2016, 12(06): 535-537
- [3] Torre L A, Bray F, Siegel R L, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108
- [4] Lau W Y, Lai E C. Hepatocellular carcinoma: current management and recent advances [J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2008, 7 (3): 237-257
- [5] Cerretelli P, Gelfi C. Energy metabolism in hypoxia: reinterpreting some features of muscle physiology on molecular grounds [J]. Eur J Appl Physiol, 2011, 111(3): 421-432
- [6] Wu Zhi-tong, Zeng Qing-hai, Cao Ke, et al. Exosomes: small vesicles with big roles in hepatocellular carcinoma [J]. Oncotarget, 2016, 7 (37): 60687-60697

- [7] Yao Hong, Liu Nian-li, Lin M C, et al. Positive feedback loop between cancer stem cells and angiogenesis in hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Lett*, 2016, 379(2): 213-219
- [8] Huang Ai-xue, Dong Jie, Li Shao-xue, et al. Exosomal transfer of vasorin expressed in hepatocellular carcinoma cells promotes migration of human umbilical vein endothelial cells [J]. *Int J Biol Sci*, 2015, 11(8): 961-969
- [9] Vlashi E, Pajonk F. Cancer stem cells, cancer cell plasticity and radiation therapy[J]. *Semin Cancer Biol*, 2015, 31: 28-35
- [10] Takahashi K, Yan I K, Wood J, et al. Involvement of extracellular vesicle long noncoding RNA (linc-VLDLR) in tumor cell responses to chemotherapy[J]. *Mol Cancer Res*, 2014, 12(10): 1377-1387
- [11] Qu Zhen, Wu Jun-hua, Wu Jun-yi, et al. Exosomes derived from HCC cells induce sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma both in vivo and in vitro[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2016, 35(1): 159
- [12] Mitchell P S, Parkin R K, Kroh E M, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(30): 10513-10518
- [13] Schmittgen T D, Livak K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method[J]. *Nat Protoc*, 2008, 3(6): 1101-1108
- [14] Melo S A, Sugimoto H, O Connell J T, et al. Cancer Exosomes Perform Cell-Independent MicroRNA Biogenesis and Promote Tumorigenesis[J]. *Cancer Cell*, 2014, 26(5): 707-721
- [15] Riches A, Campbell E, Borger E, et al. Regulation of exosome release from mammary epithelial and breast cancer cells - A new regulatory pathway [J]. *European Journal of Cancer*, 2014, 50(5): 1025-1034
- [16] Kahlert C, Kalluri R. Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis [J]. *Journal of Molecular Medicine*, 2013, 91(4): 431-437
- [17] Cheng Jun, Zhou Liu, Xie Qin-fen, et al. The impact of miR-34a on protein output in hepatocellular carcinoma HepG2 cells [J]. *Proteomics*, 2010, 10(8): 1557-1572
- [18] Liu Zi-min, Wang Cheng-hong, Jiao Xue-long, et al. miR-221 promotes growth and invasion of hepatocellular carcinoma cells by constitutive activation of NF κ B [J]. *Am J Transl Res*, 2016, 8(11): 4764-4777
- [19] Ma Dong-lai, Tao Xuan-chen, Gao Feng, et al. miR-224 functions as an onco-miRNA in hepatocellular carcinoma cells by activating AKT signaling[J]. *Oncol Lett*, 2012, 4(3): 483-488
- [20] Wu Li-pei, Wu Jian, Shang An-quan, et al. miR-124 inhibits progression of hepatocarcinoma by targeting KLF4 and promises a novel diagnostic marker[J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2017: 1-9
- [21] Qiu Dong-ni, Chen Jian, Liu Jie, et al. Expression of microRNA let-7a positively correlates with hepatitis B virus replication in hepatocellular carcinoma tissues[J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2017, 242(9): 939-944
- [22] Jin Bin, Wang Wei, Meng Xiang-xin, et al. Let-7 inhibits self-renewal of hepatocellular cancer stem-like cells through regulating the epithelial-mesenchymal transition and the Wnt signaling pathway[J]. *BMC Cancer*, 2016, 16(1): 863
- [23] Wang Zhi-peng, Yang Huan, Ren Lei. MiR-21 promoted proliferation and migration in hepatocellular carcinoma through negative regulation of Navigator-3[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 464(4): 1228-1234
- [24] Jin Yun, Wang Jun-feng, Han Jiang, et al. MiR-122 inhibits epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma by targeting Snail1 and Snail2 and suppressing WNT/beta-cadherin signaling pathway[J]. *Exp Cell Res*, 2017, 360(2): 210-217
- [25] Sun Ting-yi, Xie Hong-jian, Li Zhen, et al. miR-34a regulates HDAC1 expression to affect the proliferation and apoptosis of hepatocellular carcinoma[J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(1): 103-114
- [26] Zhou Wei-ying, Fong M Y, Min Yong-fen, et al. Cancer-Secreted miR-105 Destroys Vascular Endothelial Barriers to Promote Metastasis[J]. *Cancer Cell*, 2014, 25(4): 501-515
- [27] Bao Li-li, You Bo, Shi Si, et al. Metastasis-associated miR-23a from nasopharyngeal carcinoma-derived exosomes mediates angiogenesis by repressing a novel target gene TSGA10 [J]. *Oncogene*, 2018[Epub ahead of print]
- [28] Suarez Y, Fernandez-Hernando C, Pober J S, et al. Dicer dependent microRNAs regulate gene expression and functions in human endothelial cells[J]. *Circ Res*, 2007, 100(8): 1164-1173
- [29] 陆黎敏,李庆章,王春梅,等.miR-221 对小鼠乳腺上皮细胞增殖和泌乳功能的影响 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2009, (05): 454-458
- Lu Li-min, Li Qing-zhang, Wang Chun-mei, et al. Impact of miR-221 on Mouse Mammary Epithelial Cells and Lactation [J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2009, (05): 454-458
- [30] Pineau P, Volinia S, Mcjunki K, et al. miR-221 overexpression contributes to liver tumorigenesis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(1): 264-269
- [31] Sohn W, Kim J, Kang S H, et al. Serum exosomal microRNAs as novel biomarkers for hepatocellular carcinoma [J]. *Exp Mol Med*, 2015, 47: e184
- [32] 徐夏.鼻咽癌血浆 microRNA 分子标志物的筛选及意义[D]. 南方医科大学, 2014
- Xu Xia. Screening and significance of plasma microRNAs as biomarkers for nasopharyngeal carcinoma[D]. Southern Medical University, 2014
- [33] Hosseini M, Khatamianfar S, Hassanian S M, et al. Exosome-Encapsulated microRNAs as Potential Circulating Biomarkers in Colon Cancer[J]. *Curr Pharm Des*, 2017, 23(11): 1705-1709
- [34] Wang Hong-wei, Hou Li-juan, Li Ai-hui, et al. Expression of serum exosomal microRNA-21 in human hepatocellular carcinoma [J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014: 864894
- [35] He Ying-hua, Cui Ying, Wang Wei, et al. Hypomethylation of the hsa-miR-191 locus causes high expression of hsa-mir-191 and promotes the epithelial-to-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma[J]. *Neoplasia*, 2011, 13(9): 841-853
- [36] Kimura K, Hohjoh H, Fukuoka M, et al. Circulating exosomes suppress the induction of regulatory T cells via let-7i in multiple sclerosis [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 17
- [37] Pant S, Hilton H, Burczynski M E. The multifaceted exosome: biogenesis, role in normal and aberrant cellular function, and frontiers for pharmacological and biomarker opportunities[J]. *Biochem Pharmacol*, 2012, 83(11): 1484-1494