

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.12.001

• 基础研究 •

血清外泌体中长链 RNA 作为早期肾癌诊断标志物的研究

陈继胜¹ 吴巧¹ 杨安桥¹ 谢伟建² 卢大儒^{1Δ}

(1 复旦大学生命科学学院 上海 200433; 2 苏州溯源精微生物科技有限公司 江苏 苏州 215124)

摘要 目的:肾癌早期无明显症状,且无血清诊断标志物,晚期缺乏有效治疗手段。外泌体的生物学功能及现有研究报道为早期肾癌的诊断提供了新的理论基础和新思路,本文旨在尝试在肾癌血清外泌体中寻找肾癌诊断标志物以有助于提高肾癌的诊断水平,减少肾癌死亡率。**方法:**取肾癌肿瘤组和对照组各 10 个样本,用试剂盒(PEG 法)分离外泌体,提取 RNA 后建库测序,数据处理后以 $|\log_2(\text{fold change})| > 1$ 和显著水平 $q_value < 0.001$ 为标准筛选得一组显著差异基因,设计引物探针后大样本 qPCR 验证,对数据进行统计并作 t 检验分析,通过 LASSO 回归建立诊断模型,ROC-AUC 判断诊断价值。**结果:**RNA-seq 并深度分析筛出 PFN2 RAB4B PHEX DACH1 Linc01765 五个基因,运用 LASSO 回归建立了早期肾癌诊断模型,计算 ROC-AUC 值是 0.818。**结论:**在肾癌血清外泌体中筛到一组基因,通过 LASSO 回归建立早期肾癌诊断模型,ROC-AUC 值达 0.818,具有一定的临床应用价值。

关键词:外泌体;肿瘤标志物;早期诊断;LASSO 回归;肾癌

中图分类号:R-33;R737.11 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2021)12-2201-06

Study on Serum Exosomal Long Chain RNA as Diagnostic Biomarkers for Early-stage Renal Cell Carcinoma

CHEN Ji-sheng¹, WU Qiao¹, YANG An-qiao¹, XIE Wei-jian², LU Da-ru^{1Δ}

(1 School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai, 200433, China;

2 Suzhou Suyuanjingwei Biotechnology CO., Ltd, Suzhou, Jiangsu, 215124, China)

ABSTRACT Objective: Early renal cell carcinoma (RCC) has no significant clinical manifestation, also lack of specific serum biomarkers. There is no effective treatment for advanced RCC. The biological function of exosomes and the existing research provide a new theoretical basis and new ideas for the diagnosis of early RCC. This paper attempts to find the diagnostic biomarkers in serum exosomes of RCC in order to improve the diagnostic level and reduce the mortality of RCC. **Methods:** The exosomes were isolated with commercial kit (PEG method) from 10 samples of renal tumor group and control group. RNA was extracted and sequenced. After data processing, the data were analyzed with $|\log_2(\text{fold change})| > 1$ and significant level $Q_Value < 0.001$ was used as the standards to screen a group of significantly different genes. Primers and probes were designed and qPCR was used for validation with large samples. The data were analyzed by t-test. The diagnostic model was established by LASSO regression, and the diagnostic value was judged by ROC-AUC. **Results:** Five genes (pfen2 rab4b PHEX Dach1 linc01765) were screened by RNA-SEQ and deep analysis. The diagnostic model of early RCC was established by lasso regression. The ROC-AUC value was 0.818. **Conclusion:** A group of genes were screened from the serum exosomes of renal cell carcinoma, and the diagnostic model of early renal cell carcinoma was established by lasso regression. The ROC-AUC value was 0.818, which has certain clinical value.

Key words: Exosome; Tumor biomarkers; Early diagnosis; LASSO regression; Renal cell carcinoma

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R737.11 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2021)12-2201-06

前言

肾癌(renal cell carcinoma, RCC)约占成人恶性肿瘤的 3%,发病率位居泌尿系统肿瘤的第二位,仅次于膀胱癌^[1-3]。肾癌早期并无显著的临床表现,且缺少特异性蛋白标志物,约 30%罹患肾癌人群首次就诊时已处于晚期,目前晚期肾癌缺乏有效的

治疗手段^[4-6]。而 4 mm 以下的早期肾癌 5 年生存率高达 95.4%^[7],但 4 mm 以下的病灶,常规的影像学(如 B 超,CT)并不能区分肾癌,肾囊肿,肾错构瘤。

肿瘤细胞来源的外泌体选择性携带其亲代肿瘤细胞的生物活性物质,如 mRNA, LncRNA, miRNA, 蛋白质等^[8],且肿瘤细胞释放外泌体在体液中的数量可达 10^9 个/mL^[9]。外泌体

作者简介:陈继胜,男,主要研究方向:肿瘤遗传学,E-mail: cjsxhn@163.com

Δ 通讯作者:卢大儒,男,教授,主要研究方向:肿瘤遗传学,E-mail: drlu@fudan.edu.cn

(收稿日期:2020-12-23 接受日期:2021-01-18)

积小^[10],可穿透体内各种组织屏障,易到达各种体液中^[11]。近期的研究证实了外泌体中寻找肿瘤标志物的可行性, Kim S^[12]等报道了血清来源外泌体的 miRNA-145 和 miRNA-200c 可作为卵巢癌诊断的标志物。浙江大学 Wei Zhang^[13]等报道了血清外泌体 miR-210 and miR-1233 作为透明性细胞肾癌的诊断标志物,但是血清外泌体中 LncRNA 和 mRNA 作为早期肾癌标志物的研究却鲜有报道。Kazutoshi Fujita 等^[14]报道了尿液外泌体中 PCA3, ERG 和 SPDEF 在前列腺癌诊断的潜在价值。由于尿液取样麻烦,外泌体含量极低,而且病人外泌体组成成分受饮水,运动等影响很大^[15,16]。综上,我们期望能在血清外泌体中找到这样的长链 RNA 可以作为临床诊断肾癌的标志物。

1 材料和方法

1.1 材料

本项目所有样本由相关合作医院提供,肿瘤样本都为早期透明性肾细胞癌样本,所有样本都经过伦理审查,患者知情并同意用于本项目。

miRNeasy Micro Kit(50);血清外泌体分离试剂盒(上海华盈生物科技有限公司);CD63 抗体 (ABGENT AP5333b);CD9 抗体 (ABGENT AP1482d);TSG101 抗体 (ABGENT AM8662b);NEBNext® Ultra™ II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina;Takala RR047A PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser;TaqPath ProAmp Master Mixes (货号: A30872);透射电子显微镜 JEM1400 Flash(日本 JEOL 公司);NanoSight NS300(Malvern 公司)。

1.2 方法

血清外泌体分离试剂盒(上海华盈生物科技有限公司)按说明书进行实验;RNA 提取,TEM,NTA,WB 按照相关实验说明书进行实验。NEBNext® Ultra™ II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina (E7760S)除 rRNA 去除步骤不需要处理外,其他按照 protocol 进行实验即可。RT-PCR:外泌体 RNA 起始量调整为 10 μ L,考虑外泌体 RNA 总量都在 ng 级别,反转录引物 Radom primers 统一加 1 μ L 即可,其他试剂用量按说明书实验即可,反应程序不变。qPCR:由于外泌体中 RNA 含量极低,在 qPCR 过程中预扩增 10 个循环,此 10 个循环不进行荧光信号的采集,再进行常规 qPCR 流程,最佳退火温度为 60℃,每个靶位点 3 复孔检测,用肾癌组织样本 100 倍稀释后做阳性参考,每板加阴性对照。

2 结果

2.1 外泌体质检结果

外泌体检测方法有 NTA,TEM,WB,外泌体表面标志蛋白有 CD9,CD63,CD81,内部功能性标志蛋白有 TSG101,ALIX 等。质检结果符合预期,本项目后期实验用华盈生物试剂盒进行外泌体分离。

2.2 外泌体 RNA 建库测序结果

选取早期肾透明性细胞癌样本 10 例,肾囊肿,错构瘤病例 10 例,分离外泌体并提取 RNA,建库,测序。测序数据在获得最初测序数据处理后部分 QC 结果见表 4.1。

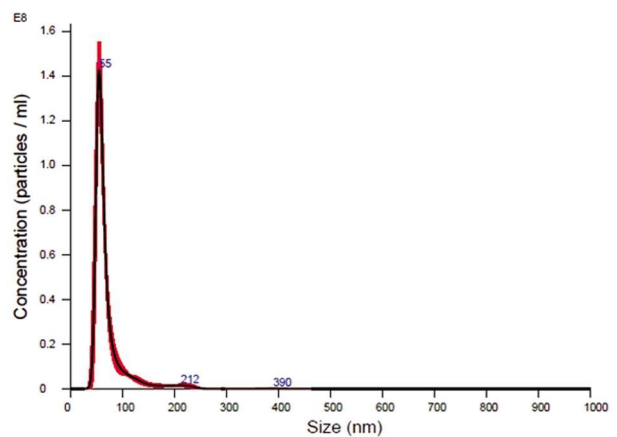


图 1 商用试剂盒法外泌体 NTA

Fig.1 Commercial kit method for exosomes NTA

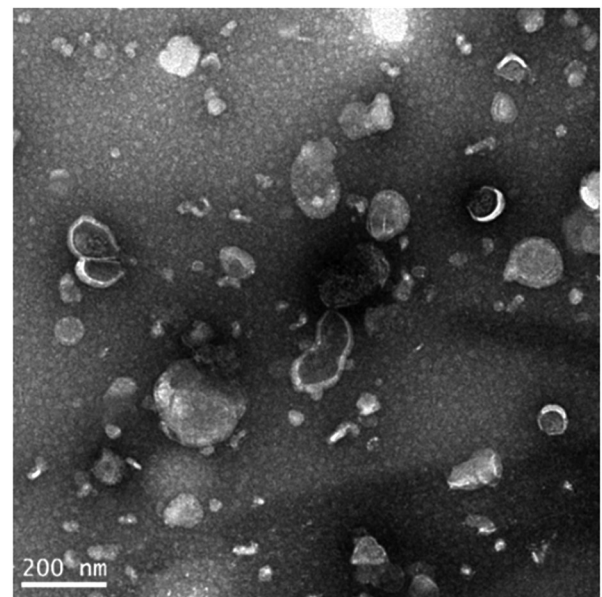


图 2 PEG 沉淀法外泌体 TEM

Fig.2 Commercial kit method for exosomes TEM

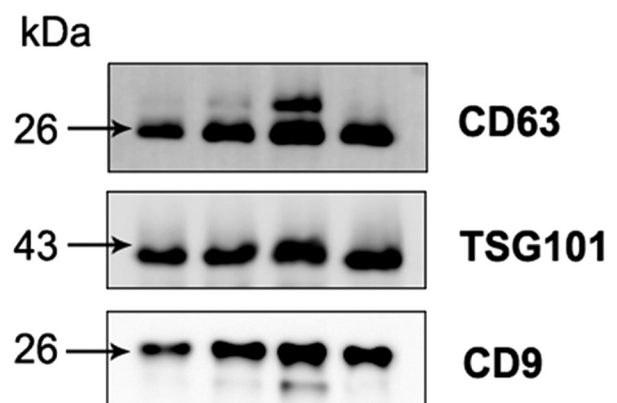


图 3 外泌体 western 结果

Fig. 3 Exosomes WB(Lane1, Lane2 exosomes from Ultracentrifugation method, Lane3 exosomes from company Q kit, Lane4 exosomes from HUAWAY kit)

本次建库样本 20 例,2 例样本文库 QC 未通过,实际测序 18 例,从 Q30 判断 1 例低于 70,其他符合生信分析要求,可以进行后续生物信息学分析。

表 1 R1 方向测序结果
Table 1 R1 directional sequence result

Sample	R1				
	Total Reads	Reads length	Q20	Q30	BaseCount(M)
Sample1	41986118	150	99.84%	84.00%	6297.92
Sample2	51093858	150	99.88%	80.88%	7664.08
Sample3	34935950	150	99.98%	91.52%	5240.39
Sample4	52125752	150	99.98%	75.96%	7818.86
Sample5	43771313	150	99.99%	86.07%	6565.7
Sample6	44009915	150	99.99%	89.91%	6601.49
Sample7	37140238	150	99.98%	72.52%	5571.04
Sample8	48769614	150	99.97%	95.49%	7315.44
Sample9	32442951	150	99.95%	95.16%	4866.44
Sample10	31779896	150	99.97%	96.17%	4766.98
Sample11	25515637	150	99.87%	84.66%	3827.35
Sample12	38833504	150	99.98%	93.89%	5825.03
Sample13	33099701	150	99.94%	93.63%	4964.96
Sample14	28757545	150	99.86%	95.42%	4313.63
Sample15	39717784	150	99.99%	85.81%	5957.67
Sample16	36640616	150	99.96%	49.37%	5496.09
Sample17	37427544	150	99.97%	72.54%	5614.13
Sample18	45285093	150	99.98%	82.54%	6792.76

2.3 筛选差异基因

通过差异倍数 $|\log_2(\text{fold change})| > 1$ 和显著水平 $q_value < 0.001$ 两个标准挑选出实验组和对照组的差异 mRNA 和

LncRNA^[17]。

筛得 5 条差异显著基因(见表 2)。

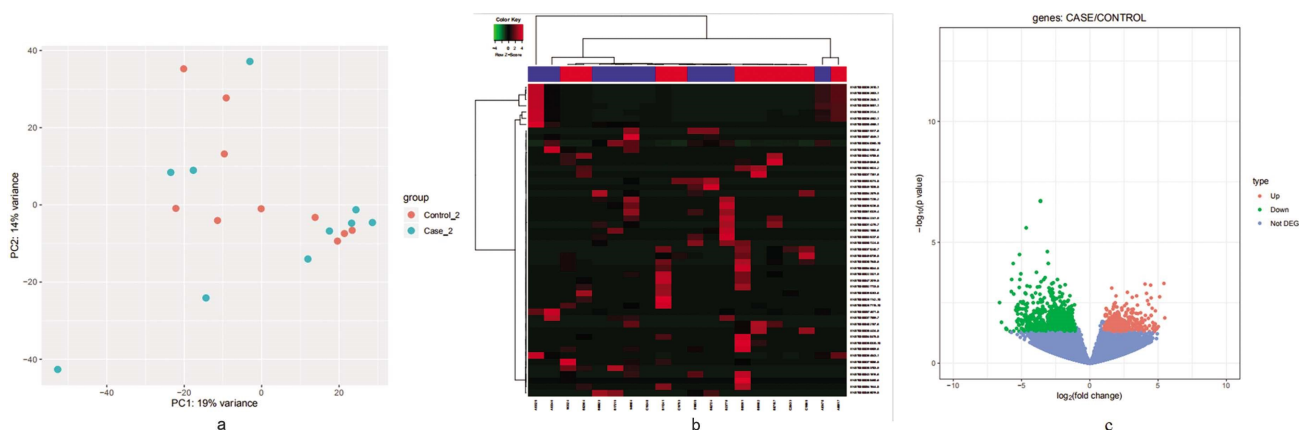


图 4 RNA 测序深度分析 a)主成分分析 b) 热图 c) 火山图

Fig. 4 RNA-seq in-depth analysis a) PCA b) Heatmap c) Volcano map

2.4 差异 mRNA 和 LncRNA 引物和探针设计

根据测序 reads 情况,设计对应的外显子引物和探针,引物设计过程中在同一外显子上设计正向和反向引物,结果见表 3,并验证设计引物。

2.5 靶基因 qPCR 验证并对靶点基因数据统计

统计学初步分析候选分子标记物(靶点基因)在不同分组

的 Ct 值表达差异及各基因肿瘤组和对照组差异显著性检验(见图六)。

根据上述分析结果,可得如下结论:

DACH1, Linc01756, PHEX 在肾癌肿瘤组和对照组血清外泌体中 Ct 值从统计学上存在显著差异。

2.6 靶基因 qPCR 验证并对靶点基因数据统计

应用 "Lasso 回归 " 建立最优化的临床诊断模型, 使用 Ct-k4*DACH1Ct-k5*Linc01765Ct
ROC-AUC 评估临床应用价值。其中 k1 取 0.1~0.3;K2 取 0.2~0.4;K3 取 0.8~1.2;K3 取
根据 Lasso 回归建立如下临床诊断模型^[18-19]: 3.0~3.5;K4 取 5~5.5;取中位数计算,部分结果见表 4。
SUMCT=k1*PFN2Ct-k2*RAB4BCt-k3*PHEX-

表 2 差异显著基因
Table 2 Significant differential genes

Feature	log2FoldChange	P value	Gene_name	Gene_type
ENSG00000276644.5	1.408909963	0.000347863	DACH1	protein_coding
ENSG00000167578.18	1.09791112	0.000664408	RAB4B	protein_coding
ENSG00000102174.9	1.907262898	0.000708094	PHEX	protein_coding
ENSG00000230523.1	-1.006194934	0.000855366	LINC01756	lincRNA
ENSG00000070087.14	1.047906135	0.000946552	PFN2	protein_coding

表 3 差异显著基因引物基因
Table 3 Significant differential gene primers

GENE	EXON	F primer sequence	R primer sequence	Probe sequence
DACH1	E9	GAGAAAATTGCAGGAAGCA	CTGCCTGTTTTAGCGTCTGT	TTGAGTTTGAGACGAAAC(FAM)
RAB4B	E5	GGGAGACATACAACCTCAC	AAGCGGGAGGCCTCCAGGAAA	TGCCTGGCTGACGGATGC(Joe)
PHEX	E18	AATGGAAACCTGGATCCTTG	CTGGAGCAAGTGTCTTGG	TGGTCTACTGAATCAGAAGA(FAM)
LINC01756	E2	AGTGCTCCAGTGCATGCA	CTGGAGCAAGTGTCTTGG	ATTCATCCCACACCACAGTCC(Joe)
PFN2	E2	AGACCGGGAAGGTTTCTTTACC	GTGCAGTCAACATCGAC	ACGGTTTGACTCTTGGCGC(Joe)
ACTB	E5	AGTCCTGTGGCATCCACGAAA	TACCTTCAACTCCATCATGA	CAGCACTGTGTTGGCGGTACA(FAM)

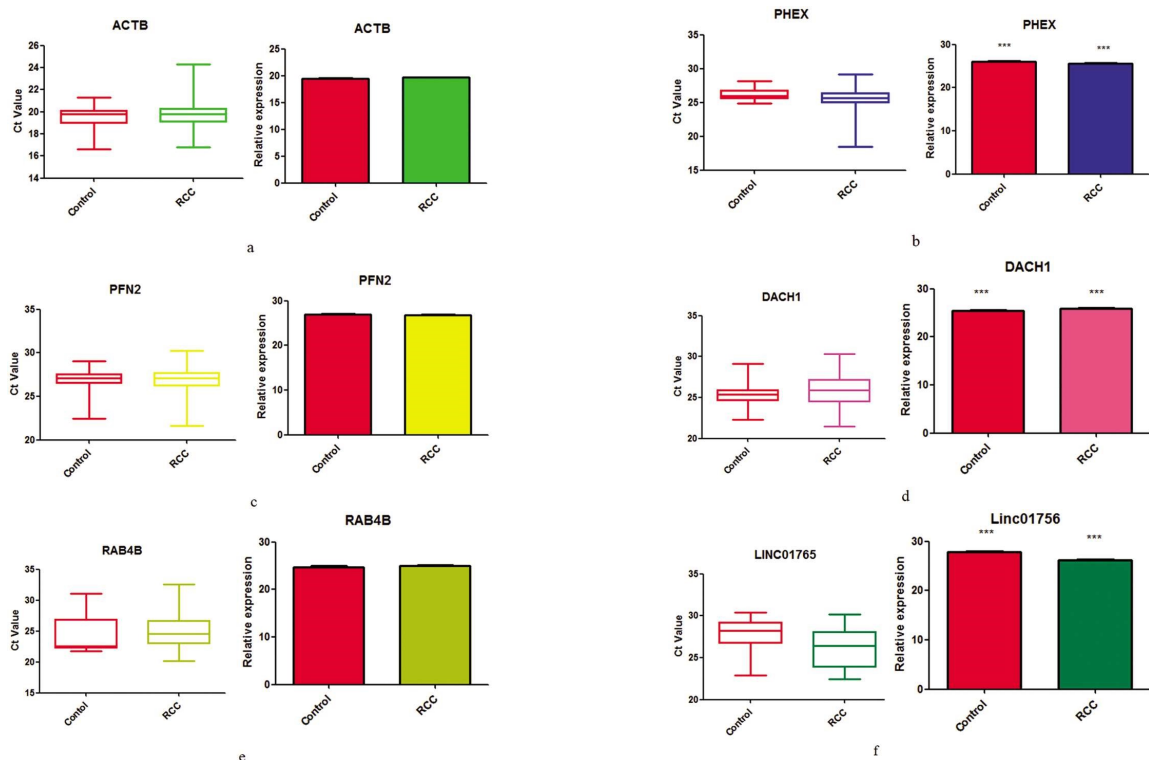


图 6 差异显著基因 Ct 值统计表达差异和 t 检验结果

Fig.6 Expression difference and t test results

Note: a) expression difference and t test results of actb CT value. b) expression difference and t test results of PHEX CT value. c) expression difference and t test results of PFN2 CT value. d) expression difference and t test results of DACH1 CT value. e) expression difference and t test results of RAB4B CT value. f) expression difference and t test results of Linc01756 CT value.

表 4 部分样本 SUMCT 值统计

Table 4 Partial samples SUMCT

NO.	Pathological State	SUMCT
N1	renal oncocytoma	-253.07
N2	simple cystoma	-248.55
N3	hamartoma	-254.79
N4	simple cystoma	-266.87
N	hamartoma	-260.52
N6	hamartoma	-252.77
N7	hamartoma	-261.10
N8	renal oncocytoma	-261.93
N9	hamartoma	-261.81
N10	hamartoma	-254.52
T1	CcRCC	-235.92
T2	CcRCC	-248.13
T3	CcRCC	-242.48
T4	CcRCC	-241.11
T5	CcRCC	-247.64
T6	CcRCC	-242.16
T7	CcRCC	-249.33
T8	CcRCC	-242.27
T9	CcRCC	-244.13
T10	CcRCC	-235.33

2.7 结合数据,绘制 ROC-AUC 曲线

本项目计划用 100 例对照样本和 200 例肿瘤组验证 LASSO 模型,统计数据时,去掉 qPCR 过程中一些无扩增样本及三重重复中只有单孔 Ct 值,最终有效样本为对照组 60 例,肾癌肿瘤组样本 161 例,合计 221 例。qPCR 验证 LASSO 模型最终 AUC 值 0.818,从 ROC-AUC 可以判断,在区分肾癌早期肿瘤和肾囊肿,肾错构瘤方面有一定的临床价值,可作为早期肾癌筛选的方法进一步后续临床研究。

3 讨论

肾癌是近年来为数不多的患病率一直上升的恶性肿瘤之一,国内国外各方面的数据都支持这一结论,肾癌不仅呈现出普遍化趋势,更有年轻化趋势^[20,21]。肾癌早期没有明显的临床表现。目前肾癌检查的主要手段是影像学方法,但影像学确诊后大部分患者已经处于癌症中后期,错过了癌症治疗的最佳时间窗口^[22,23]。因此寻找早期肾癌的诊断标志物具有重要的临床价值和现实意义。

外泌体和血清中其他囊泡一样,发现之初都被认为是人体代谢的废弃物。随着对外泌体认识的深入,近五年关于外泌体相关的研究文章出现了指数级的增长。从外泌体的分离方法,到外泌体的组成研究,外泌体的生物功能,外泌体内含物作为诊断标志物的研究,外泌体与肿瘤关联性的研究各方面的文

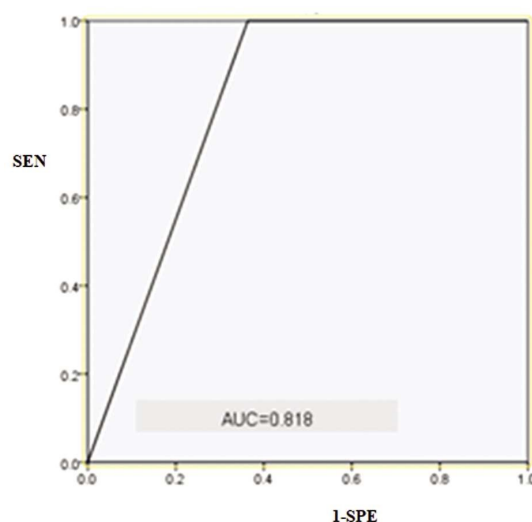


图 7 ROC 曲线

Fig.7 ROC curve

章层出不穷。即便如此,外泌体分离的技术还未得到有效解决,如何区分外泌体和体液中的凋亡小泡、胞外体样囊泡、膜颗粒和胞质体依然是解决外泌体研究的首要问题^[24-26]。

外泌体内含物中主要包含 miRNA, mRNA, LncRNA 和各种蛋白质等,miRNA 在外泌体中存在富集,也是前期外泌体研究的重点。miRNA 是一类长度在 20~24 bp 的 RNA 分子,它和 mRNA 结合从而调控 mRNA 的表达。miRNA 最大的特点就是 miRNA 不易降解,稳定性高。但 miRNA 本身检测方法限制了它成为肿瘤标志物的应用,无论是 POLY(A)加尾还是较实用的径环法都不能解决 miRNA 同源物之间的影响。于是研究人员将目光转向 LncRNA,尿液中 PC3, ERG, SPDEF 等 LncRNA 作为诊断标志物的报道较成熟^[27,28],且美国 FDA 也批准相关外泌体诊断产品上市,这也给外泌体中 LncRNA 作为其他肿瘤标志物研究带来了前所未有的机遇。但是用尿液外泌体检测前列腺癌理论上还有一些科学问题有待进一步解决,如尿液成分的不稳定性,尿液成分受运动,睡眠,饮水,饮食,情绪等影响很大^[29,30]。其次,从人体生理结构来说,前列腺分泌的外泌体能有多少逃过肾小球的过滤进入尿液又是个科学问题,这些都影响了尿液检测外泌体实际情况。

肿瘤的发生根本就是 mRNA 表达发生异常,miRNA 和 LncRNA 绝大部分影响肿瘤功能也是通过 mRNA 来实现的, mRNA 在组织中的最大问题在于其稳定性,如何保证 RNA 的稳定性,不同时间段细胞体内的 RNA 成分理论上是不一样的,根据已有外泌体形成理论,不同时期形成的不同外泌体其外泌体内含物也不一样,这样就导致外泌体的异质性,癌症不同阶段检测外泌体的 RNA 成分和 RNA 含量存在差异,这就给取样带来挑战,何时取样? 到目前该问题没有得到统一规范。其次,虽然有报道说外泌体中 RNA 由于有脂质双分子层的保护及本身已经片面化外泌体中 RNA 稳定性相对较高,但 mRNA 在外泌体中同样存在降解情况,降解程度和降解机制尚需进一步研究。异质性和这种动态变化大大增加了检测血清外泌体中 RNA 作为肿瘤诊断标志物的难度。

本项目最大创新之处就是结合了外泌体中 mRNA 和 LncRNA 用来作为早期肾癌诊断标志物的研究,尽管外泌体作

为肿瘤诊断标志物的研究取得不少进展,但是依然有很多急需解决的技术问题:第一,外泌体分离方法,如何保证外泌体纯度,血清中其他 EV 也存在 RNA(DNA),不能保证外泌体的纯度后续 RNA 的纯度就值得质疑?第二:外泌体的异质性,外泌体的异质性会不会稀释差异基因的差异度(显著性),导致检测的准确性存疑;第三:外泌体中 RNA 的时间差异性,稳定性,何时取样,何时检测都会给外泌体中 RNA 检测结果带来影响;第四:从外泌体分离,到外泌体中提取 RNA,到 RT-PCR 再到 Qpcr,整个流程复杂且繁琐,外泌体 RNA 本身含量就较低,即使有差异基因表达量存在差异,差异绝对量理论上也不会太多,经过如此繁琐的步骤后,差异倍数还能得到真实的体现?第五:外泌体中靶基因含量太低,给 RNA 检测增加了相当难度。

本项目初步研究筛选出 PFN2,RAB4B,PHEX,DACH1,Linc01765 五个差异基因并基于 LASSO 回归模型建立肾癌早期诊断模型。ROC-AUC 结果显示 0.818,有一定的临床参考价值,可进行下一步深入研究。

参考文献(References)

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(1): 7-30
- [2] Albiges L, Fay AP, McKay-RR, et al. Diagnosis of Renal Cell Carcinoma[J]. Surg Pathol, 2015, 8(4): 657-664
- [3] Znaor A, Lortet-Tieulent J, Laversanne M, et al. International variations and trends in renal cellcarcinoma incidence and mortality [J]. Eur Urol, 2015, 67: 519
- [4] Bianchi M, Sun M, Jeldres C, et al. Distribution of metastatic sites in renal cell carcinoma: A population-based analysis [J]. Ann Oncol, 2012, 23(4): 973-980
- [5] Bukowski RM, Negrier S, Elson P. Prognostic factors in patients with advanced renal cell carcinoma: Development of an international kidney cancer working group[J]. Clin cancer Res, 2012, 10(4): 262-270
- [6] Tan HJ, Norton EC, Ye Z, et al. Long-term Survival Following Partial vs Radical Nephrectomy Among Older Patients With Early-Stage Kidney Cancer[J]. JAMA, 2012, 307, 27(28): 29-35
- [7] 法朋燕, 刘华, 郑君芳, 等. NHERF3 在肾癌组织中的表达变化及其意义[J]. 首都医科大学学报, 2015, 36(2): 251-254
- [8] KOSAKA N, TAKESHITA F, YOSHIOKA Y, et al. Exosomal tumor-suppressive microRNAs as novel cancer therapy: "exocure" is another choice for cancer treatment [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2013, 65 (3): 376-382
- [9] HE M, ZENG Y. Microfluidic exosome analysis toward liquid biopsy for cancer[J]. J Lab Autom, 2016, 21(4): 599-608
- [10] Yang F, Liao X, Tian Y, et al. Exosome separation using microfluidic systems: size-based, immunoaffinity-based and dynamic methodologies[J]. Biotechnol J, 2017, 12(4): 16006991-8
- [11] BOUKOURIS S, MATHIVANAN S. Exosome in bodily fluids are a highly stable resource of disease biomarkers[J]. Proteomics Clin Appl, 2015, 9(3/4,SI): 358-367
- [12] Kim S, Choi MC, Jeong JY, et al. Serum exosomal miRNA-145 and miRNA-200c as promising biomarkers for preoperative diagnosis of ovarian carcinomas[J]. Cancer, 2019, 10(9): 1958-1967
- [13] Zhang W, Ni M, Su Y, et al. MicroRNAs in Serum Exosomes as Potential Biomarkers in Clear-cell Renal Cell Carcinoma [J]. Eur Urol Focus, 2018, 4(3): 412-419
- [14] Fujita K, Nonomura N. Urinary biomarkers of prostate cancer[J]. International Journal of Urology, 2018, 25: 770-779
- [15] ZHOU H, YUEN P S, PISITKUN T, et al. Collection, storage preservation, and normalization of human urinary exosomes for biomarker discovery[J]. Kid Int, 2006, 69(8): 1471-1476
- [16] Skotland T, Ekroos K, Kauhanen D, et al. Molecular lipid species in urinary exosomes as potential prostate cancer biomarkers [J]. Eur J Cancer, 2017, 70: 122-132
- [17] 刘佳毅. 尿液外泌体内 Lnc-RNA 作为肾癌早期诊断标记物相关研究[D]. 上海: 第二军医大学外科学(泌尿外科), 2017
- [18] 郭巍, 王力, 郝元涛. 基于 LASSO 回归模型与百度搜索数据构建的流感疫情预测系统[J]. 中国卫生统计, 2017, 34(2): 186-191
- [19] Huang Y, Liu Z, He L, et al. Radiomics Signature: A Potential Biomarker for the Prediction of Disease-Free Survival in Early-Stage (I or II) Non-Small Cell Lung Cancer [J]. Radiology, 2016, 281 (3): 947-957
- [20] Hsieh JJ, Purdue MP, Signoretti S, et al. Renal Cell Carcinoma[J]. Nat Rev Dis Primers, 2017, 3: 17009
- [21] Keegan KA, Schupp CW, Chamie K, et al. Histopathology of surgically treated renal cell carcinoma[J]. J Urol, 2012, 188(2): 391-397
- [22] 杨波, 赵振国, 文峰, 等. 64 排螺旋 CT 多期增强扫描在肾癌诊断中的应用价值[J]. 医疗卫生装备, 2019, 40(1): 62-65
- [23] Ljungberg B, Bensalah K, Canfield S, et al. EAU guidelines on renal cell carcinoma: 2014 update[J]. Eur Urol, 2015, 67(5): 913-24
- [24] 陈军歌. 外泌体作为结直肠癌诊断标志物的研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2020, 28(17): 3089-3091
- [25] Alvarez M L, Khosroheidari M, Kanchi Ravi R, et al. Comparison of protein, microRNA, and Mrna yields using different methods of urinary exosome isolation for the discovery of kidney disease biomarkers [J]. Kidney Int, 2012, 82(9): 1024-1032
- [26] van der Vlist EJ, Nolte-t Hoen EN, Stoorvogel W, et al. Fluorescent labeling of nano-sized vesicles released by cells and subsequent quantitative and qualitative analysis by high-resolution flow cytometry[J]. Nat Protoc, 2012, 7(7): 1311-1262
- [27] Gupta RA, Shah N, Wang KC, et al. Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis [J]. Nature, 2010, 464(7291): 1071-1076
- [28] Grote PI, Wittler L, Hendrix D, et al. The tissue-specific lncRNA Fendrr is an essential regulator of heart and body wall development in the mouse[J]. Dev Cell, 2013, 24(2): 206-214
- [29] Channavajjhala SK, Rossato M, Morandini F, et al. optimizing the purification and analysis of miRNAs from urinary exosomes [J]. Clin Chem Lab Med, 2014, 52(3): 345-354
- [30] Skotland T, Ekroos K, Kauhanen D, et al. Molecular lipid species in urinary exosomes as potential prostate cancer biomarkers [J]. Eur J Cancer, 2017, 70: 122-132