

DOI:10.13602/j.cnki.jcls.2021.03.04

· 临床研究 ·

肾透明细胞癌患者血清细胞外囊泡中 miR-99b-3p 水平检测的临床价值*

田亚萍^{1,2a}, 张明威^{2a}, 葛京平^{2b}, 张春妮^{2a}, 汪俊军^{2a}, 王成^{2a} (1. 常州市第一人民医院检验科, 江苏常州 213003; 2. 中国人民解放军东部战区总医院 a. 检验科, b. 泌尿外科, 南京 210002)

摘要:目的 探讨肾透明细胞癌(clear cell renal cell carcinoma, ccRCC)患者血清细胞外囊泡(extracellular vesicles, EVs)中 miR-99b-3p 的水平变化, 评估其作为 ccRCC 非侵入性辅助诊断分子标志物的临床价值。方法 收集 2016 年 12 月至 2018 年 10 月东部战区总医院泌尿外科收治且未经治疗的 65 例 ccRCC 患者, 另收集 75 例年龄、性别匹配的健康人对照血清标本, 分离血清 EVs 并提取 RNA。采用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测 ccRCC 患者及健康人对照血清 EVs miR-99b-3p 的水平, 并采用 Mann-Whitney *U* 检验、ROC 曲线及 Logistic 回归分析 EVs miR-99b-3p 水平对 ccRCC 的诊断效能, Pearson 相关分析 EVs miR-99b-3p 水平与 ccRCC 患者临床病理参数的相关性。结果 Mann-Whitney *U* 检验结果显示, ccRCC 患者血清 EVs miR-99b-3p 的表达水平较健康人对照组明显上调($P < 0.01$); ROC 曲线分析显示, EVs miR-99b-3p 筛查 ccRCC 患者与健康人对照的曲线下面积(AUC^{ROC})为 0.757(95%CI: 0.674~0.840), 敏感性为 69.2%, 特异性为 77.3%; 区分 I/II 级 ccRCC 患者的 AUC^{ROC} 为 0.754(95%CI: 0.663~0.846), 敏感性和特异性分别为 69.2%、77.3%; Logistic 回归分析结果显示, 血清 EVs miR-99b-3p 是 ccRCC 独立危险因素($OR = 7.745, 95\%CI: 3.596 \sim 16.682, P < 0.01$); Pearson 相关分析显示, 血清 EVs miR-99b-3p 与肿瘤分级、大小、有无远处转移的相关性均无统计学意义(P 均 > 0.05)。结论 ccRCC 患者血清 EVs miR-99b-3p 水平较健康人对照显著升高, 是 ccRCC 潜在的液体活检辅助诊断分子标志物。

关键词:肾透明细胞癌; 细胞外囊泡; miR-99b-3p; 分子标志物

中图分类号: R446

文献标志码: A

Clinical value of serum extracellular vesicles miR-99b-3p levels in patients with clear cell renal cell carcinoma

TIAN Yaping^{1,2a}, ZHANG Mingwei^{2a}, GE Jingping^{2b}, ZHANG Chunni^{2a}, WANG Junjun^{2a}, WANG Cheng^{2a} (1. Department of Clinical Laboratory, The First People's Hospital of Changzhou, Changzhou 213003, Jiangsu; 2a. Department of Clinical Laboratory, 2b. Department of Urology, General Hospital of Eastern Theater Command, PLA, Nanjing 210002, Jiangsu, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of miR-99b-3p in serum extracellular vesicles (EVs) of the patients with clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) and evaluate its clinical value as a noninvasive diagnostic marker for ccRCC. **Methods** A total of 65 ccRCC patients from Department of Urology and 75 age-sex matched healthy individuals from Health Examination Center of General Hospital of Eastern Theater Command from December 2016 to October 2018 were enrolled in this study. Serum EVs was isolated from the patients and healthy individuals, and the level of EVs miR-99b-3p was determined by qRT-PCR. The clinical value of serum EVs miR-99b-3p was further assessed by Mann-Whitney *U* test, receiver operating characteristic curve (ROC) and logistics analyses. Pearson correlation analysis method was used to analyze the correlation between EVs miR-99b-3p level and ccRCC clinicopathological parameters. **Results** According to the Mann-Whitney *U* test, the relative expression level of serum EVs miR-99b-3p in the ccRCC patients was significantly higher than that in the healthy individuals ($P < 0.01$). The level of receive operating characteristic curve (ROC) analysis demonstrated that the efficiency of area under curve (AUC^{ROC}) for discriminating the ccRCC patients from healthy individuals was 0.757 (95%CI: 0.674 to 0.840) with sensitivity of 69.2% and specificity of 77.3% at the optimal cutoff value. The AUC^{ROC} for differentiating early stage ccRCC patients from healthy individuals was 0.754 (95%CI: 0.663 to 0.846) with sensitivity of 69.2% and specificity of 77.3% at the same cutoff value. Logistic regression analyses showed that serum EVs miR-99b-3p was an independent risk factor for ccRCC ($OR = 7.745, 95\%CI: 3.596 \text{ to } 16.682, P < 0.01$). Pearson correlation analysis revealed that no statistically significant correlations between serum EVs miR-99b-3p and the stage and size of tumor as well as the distant metastasis ($P > 0.05$). **Conclusion** Serum EVs miR-99b-3p levels may significantly increased in ccRCC patients, and could be served as a novel non-invasive liquid biopsy diagnostic marker for ccRCC.

* 基金项目: 国家自然科学基金(81772282)。

作者简介: 田亚萍, 1989 年生, 女, 技师, 硕士研究生, 从事 miRNA 与肿瘤标志物的研究。

通信作者: 王成, 主管技师, 博士, E-mail: wangchengnju@163.com。

Key words: clear cell renal cell carcinoma; extracellular vesicles; miR-99b-3p; molecular biomarker

肾透明细胞癌 (clear cell renal cell carcinoma, ccRCC) 是肾脏常见的恶性肿瘤,且易对放、化疗耐受,目前手术切除仍是首要治疗方案。ccRCC 尚缺乏有效的血清学标志物,病理活检是 ccRCC 诊断的“金标准”,但因具有创伤性使其临床应用受限^[1]。目前已证实几种血清蛋白质具有一定的诊断 ccRCC 或提示复发的价值,但其临床应用价值尚不明确^[2]。细胞外囊泡 (extracellular vesicles, EVs) 是细胞主动分泌的 30~150 nm 的囊泡,可携带 miRNAs 等生物活性分子在细胞组织间传递交流。因 EVs miRNAs 的释放是一个主动过程,其作为肿瘤分子生物学标志物更具特异性^[3]。miR-99b-3p 在多种不同类型肿瘤中表达异常,而与其源于同一前体 miRNA 的 miR-99b-5p,在 ccRCC 患者组织中呈低表达,且与酪氨酸激酶抑制剂治疗的肿瘤进展有关^[4],提示 miR-99b-3p 亦可能与 ccRCC 密切相关。本研究拟通过检测 miR-99b-3p 在 ccRCC 患者和健康人对照血清 EVs 中的表达水平,评估其作为辅助诊断 ccRCC 的潜在临床价值。

1 材料与方法

1.1 研究对象 收集 2016 年 12 月至 2018 年 10 月于东部战区总医院泌尿外科初诊且确诊为肾脏疾病患者的血清样本 100 例。排除标准:(1) ccRCC 伴有乙肝、结核、急性炎症、肾肿瘤未确诊或其他器官肿瘤;(2) 接受过干预治疗的 ccRCC、ccRCC 复发或最后被确诊为非肾脏恶性肿瘤,如肾囊肿、肾良性肿瘤;(3) 肾脏其他恶性肿瘤,如多房囊性肾细胞癌、嫌色肾细胞癌、乳头状肾细胞癌、Xp11.2 易位/转录因子 E3 (translocation factor E3, *TFE3*) 基因融合相关性肾细胞癌。参照 WHO 肿瘤分型标准对所有患者手术切除样本进行病理学确诊,最终共有 65 例 ccRCC 患者样本纳入分析,且在入院之前均未进行任何治疗,其中男 37 例,女 28 例,年龄 (57.31 ± 1.33) 岁。按照 Furrman 分级标准^[5]对肿瘤进行分级,其中 I 级 (高分化) 5 例、II 级 (高分化) 47 例、III 级 (中分化) 10 例、IV 级 (低分化) 3 例。75 名健康人对照为同期在本院体检中心就诊的体检者,男 43 例,女 32 例,年龄 (56.54 ± 1.55) 岁,两组间性别 ($\chi^2 = 0.002, P > 0.05$)、年龄 ($t = 0.380, P > 0.05$) 差异均无统计学意义。本研究经东部战区总医院医学伦理委员会批准 (No.

2017NZGKJ-068), 纳入对象均知情同意。

1.2 主要试剂与仪器 分析纯级别无水乙醇、异丙醇、氯仿 (上海化学试剂公司), ExoQuick-exosome 试剂盒 (美国 CA 公司), AMV 逆转录酶、rTaq 酶、buffer、dNTP 及 MgCl₂ 等均购自日本 TaKaRa 公司, 除 RNA 酶水 (美国 Sigma-Aldrich 公司), Trizol 试剂 (美国 Life Technologies 公司), miR-99b-3p 及内参 miR-16 所用逆转录引物、TaqMan 探针、7300 型实时荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司), Tissuelyser-48 全自动样品自动研磨仪 (上海净信科技公司), SAS67120 型超纯水机 (美国 Millipore 公司), 5418 型高速冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司)。

1.3 标本前期处理与保存 抽取健康人对照体检时和 ccRCC 患者治疗前的空腹静脉血 3.5 mL 于含分离胶的生化管中。1 500×g 离心 5 min 后取血清, 4 °C、12 000×g 离心 5 min, 进一步去除残留血细胞和细胞碎片, 将收集上清置于 -80 °C 保存。

1.4 血清 EVs 的提取 按照 ExoQuick 试剂盒操作说明书提取 100 μL 血清中 EVs, 并将其重悬于 25 μL 除 RNA 酶水中。

1.5 EVs RNA 提取 用 Trizol 试剂从 EVs 重悬液中提取 RNA^[6], 所得总 RNA 溶解于 20 μL 除 RNA 酶水后, 置于 -80 °C 保存待用。

1.6 qRT-PCR 检测 EVs miR-99b-3p 水平 用基于 TaqMan 探针技术的 qRT-PCR 检测 EVs miR-99b-3p。首先将 RNA 逆转录为 cDNA, 逆转录反应体系: 3.5 μL DEPC ddH₂O、2 μL 5×buffer、1 μL 反向引物、0.5 μL AMV 酶、2 μL RNA 和 1 μL 10 mmol/L dNTPs, 共 10 μL, 反应条件: 16 °C 30 min, 42 °C 30 min, 85 °C 5 min, 4 °C 保存, 将所得 cDNA 样本置于 -20 °C 保存。qRT-PCR 反应体系共 20 μL, 包括: 14.77 μL ddH₂O、2 μL 10×PCR 缓冲液、1.2 μL 25 mmol/L MgCl₂、0.4 μL 10 mmol/L dNTP、0.3 μL rTaq 酶、0.33 μL TaqMan 探针和 miRNA 上、下游引物、1 μL cDNA。反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 共 40 个循环。另外, 以无 RNA 模板的 ddH₂O 为阴性对照, 每份样本均进行 3 个复孔检测。采用内参基因 miR-16 对结果进行校正以及计算 EVs miR-99b-3p 的表达水平; 应用 2^{-ΔCt} 法^[7] 计算 EVs miR-99b-3p 相对于内参 miR-16 的表达水平, 公式: $\Delta Ct = Ct_{miR-99b-3p} - Ct_{miR-16}$ 。

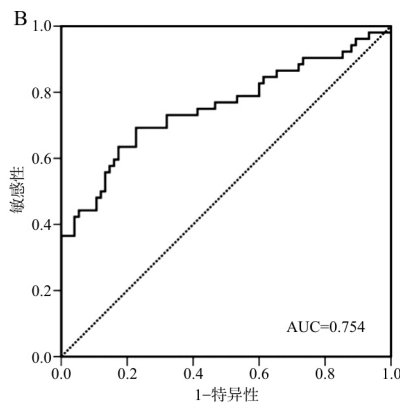
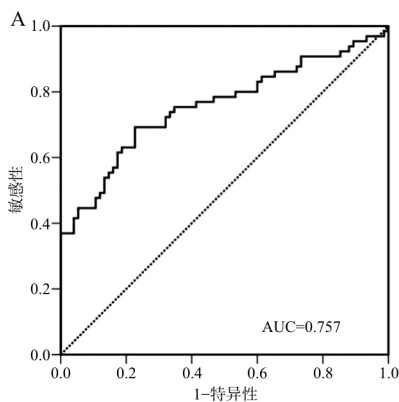
1.7 统计学分析 采用 Graphpad 6.0 软件和 SPSS

20.0 软件进行数据统计分析。呈正态分布的数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较用 t 检验;偏态分布数据以中位数(四分位数间距) [$M(P_{25}, P_{75})$] 表示,两组间比较用 Mann-Whitney U 检验。ROC 曲线评估 EVs miR-99b-3p 对 ccRCC 的诊断效能。采用 Logistic 回归分析评估 EVs miR-99b-3p 是否为 ccRCC 独立危险因素。Pearson 相关分析 EVs miR-99b-3p 与 ccRCC 患者临床病理参数的相关性。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ccRCC 患者 EVs miR-99b-3p 水平变化 miR-16 在 ccRCC 患者和健康人对照血清 EVs 中的表达水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。进一步利用 miR-16 对 miR-99b-3p 的水平进行校正和计算。qRT-PCR 检测结果显示, ccRCC 患者血清 EVs miR-99b-3p 水平 [19.770(4.724, 22.910)] 显著高于健康人对照组 [5.830(2.046, 7.862)], 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

2.2 ccRCC 早期患者 EVs miR-99b-3p 变化水平



注:A, EVs miR-99b-3p 对 ccRCC 筛查价值; B, EVs miR-99b-3p 对早期 ccRCC 筛查价值。

图 1 EVs miR-99b-3p 筛查 ccRCC ROC 曲线

2.4 EVs miR-99b-3p 水平与 ccRCC 的风险评估分析 在单因素 Logistic 回归分析中,将 ccRCC 状态作为因变量, EVs miR-99b-3p 为自变量,结果显示 EVs miR-99b-3p 与 ccRCC 密切相关 ($OR = 7.677$, $95\% CI: 3.610 \sim 16.328$, $P < 0.01$);校正性别、年龄、饮酒史及吸烟史等因素后,多因素 Logistic 回归分析结果显示, EVs miR-99b-3p 仍是 ccRCC 患者潜在的独立危险因素 ($OR = 7.745$, $95\% CI: 3.596 \sim 16.682$, $P < 0.01$)。

2.5 EVs miR-99b-3p 水平与 ccRCC 患者临床病理参数的相关分析 Pearson 相关分析结果显示, EVs miR-99b-3p 与 ccRCC 患者的临床分级、肿瘤大小、

I/II 级 ccRCC(早期)患者的 EVs miR-99b-3p 水平 [16.960(4.429, 20.960)] 和 III/IV 级 ccRCC 患者(晚期)的 EVs miR-99b-3p 水平 [27.490(5.248, 37.060)] 均显著高于体检健康者 (P 均 < 0.01);但早期与晚期 ccRCC 患者 EVs miR-99b-3p 水平间的差异则无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.3 ROC 曲线评估 EVs miR-99b-3p 水平筛查 ccRCC 的效能 将 ccRCC 患者和健康人对照分别设为疾病组和对照组,绘制 ROC 曲线。根据 Youden 指数最大原则,确定 cut-off 值,并计算其 ROC 曲线下面积 (AUC^{ROC})、敏感性、特异性,评估 EVs miR-99b-3p 对于 ccRCC 的筛查价值,结果显示,当取 cut-off 值 6.483 时,其筛查 ccRCC 患者与健康人对照的 AUC^{ROC} 为 0.757 ($95\% CI: 0.674 \sim 0.840$);筛查早期 ccRCC 患者与健康人对照的 AUC^{ROC} 为 0.754 ($95\% CI: 0.663 \sim 0.846$),筛查 ccRCC 及早期 ccRCC 的敏感性均为 69.2%,特异性均为 77.3%,但早、晚期 ccRCC 患者 EVs miR-99b-3p 水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 1。

有无远处转移均无明确相关性 (r 值分别为 0.018、-0.152、0.020, P 均 > 0.05)。

3 讨论

EVs miRNA 与 ccRCC 的关系已有相关报道。ccRCC 患者尿液 EVs 中的 miR-126-3p、miR-449a 以及 miR-34b-5p 可作为 ccRCC 潜在的非侵入性诊断性尿液生物标志物^[8]。Dias 等^[9]分析来自 32 例 ccRCC 原位癌患者手术前后及 37 例伴随转移的 ccRCC 患者血浆 EVs miRNA 图谱,结果发现,与术前相比,术后 EVs hsa-miR-25-3p、hsa-miR-126-5p、hsa-miR-200c-3p 和 hsa-miR-301a-3p 的水平降低,

而 hsa-miR-1293 水平升高;与原位癌患者相比,已发生转移患者的 hsa-miR-301a-3p 水平升高,而 hsa-miR-1293 水平降低,提示 hsa-miR-301a-3p、hsa-miR-1293 可作为转移性 ccRCC 的肿瘤标志物。

本研究通过 qRT-PCR 检测 miR-99b-3p 在 ccRCC 患者血清 EVs 中的表达水平,发现相比于健康人对照,ccRCC 患者血清 EVs miR-99b-3p 显著升高。ROC 曲线分析提示,血清 EVs miR-99b-3p 对 ccRCC 的诊断有潜在应用价值,但对早期患者尚不具备更好的诊断效率。同时 Logistics 回归结果显示,miR-99b-3p 是 ccRCC 的独立危险因素。然而,本研究尚存在一些不足:(1)样本量不够充足,已有数据无法证实 EVs miR-99b-3p 与 ccRCC 的临床分期、肿瘤大小、是否发生转移相关;(2)EVs miR-99b-3p 的具体来源、去向及分子调控机制并不清楚,对其调控的靶基因以及生物学功能还需进一步研究;(3)患者随访时间较短,无法评估 EVs miR-99b-3p 对 ccRCC 预后价值;(4)ccRCC 组织中 miR-99b-3p 的表达水平如何,是否与 EVs 表达一致尚不清楚。后期我们将扩大样本量并加强随访以及增加组织样本进一步探讨。

miR-99b 在多种不同类型肿瘤中发挥不同作用,如 miR-99b 通过抑制 κB -Ras2 和 mTOR 基因的表达,促进肿瘤相关巨噬细胞的吞噬作用和抗原呈递能力,但具体调控机制尚不明确^[10];Li 等^[11]发现,miR-99b 可抑制 PI3K/AKT/mTOR 信号通路,抑制人宫颈癌细胞的侵袭和转移,并证实其以与 mRNA 3'-UTR 结合方式下调 mTOR 的表达。另外,Yao 等^[12]通过体外细胞实验证实 miR-99b-3p 通过直接靶向原钙黏蛋白 19,促进肝癌细胞转移和增殖,其调控机制也是在转录后水平与原钙黏蛋白 19 mRNA 结合,且高表达的 miR-99b-3p 与肝癌患者的恶性临床病理特征和较差的预后密切相关。由于 miR-99b-3p 和 miR-99b-5p 由同一前体经核酸内切酶处理而来,据此猜测 miR-99b-3p 亦可能与 ccRCC 的进展密切相关。本研究结果表明,miR-99b-3p 在 ccRCC 患者血清中 EVs 表达水平升高,且对 ccRCC 具有潜在的诊断价值,但对其潜在的靶基因、其对靶基因的调控是经典的转录后水平或通过其他方式进行调控,以及如何影响 ccRCC 的生物

学行为仍需进一步研究。

4 参考文献

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2017 [J]. CA Cancer J Clin, 2017, 67(1):7-30.
- [2] Golovastova MO, Korolev DO, Tsoy LV, et al. Biomarkers of renal tumors; the current state and clinical perspectives [J]. Curr Urol Rep, 2017, 18(1):1-11.
- [3] Shehzad A, Islam SU, Shahzad R, et al. Extracellular vesicles in cancer diagnostics and therapeutics [J]. Pharmacol Ther, 2021, 223:107806.
- [4] Lukamowicz-Rajska M, Mittmann C, Prummer M, et al. MiR-99b-5p expression and response to tyrosine kinase inhibitor treatment in clear cell renal cell carcinoma patients [J]. Oncotarget, 2016, 7(48):78433-78447.
- [5] Zhang L, Wu B, Zha Z, et al. The correlation of clinicopathological features with the status of surgical margins in renal cell cancer patients following nephron-sparing surgery: a systematic review and meta-analysis [J]. Front Oncol, 2019, 9:648.
- [6] Wan S, Wang J, Wang J, et al. Increased serum miR-7 is a promising biomarker for type 2 diabetes mellitus and its microvascular complications [J]. Diabetes Res Clin Pract, 2017, 130:171-179.
- [7] Zhang YG, Yang HL, Zhang YP, et al. circCRAMP1L is a novel biomarker of preeclampsia risk and may play a role in preeclampsia pathogenesis via regulation of the MSP/RON axis in trophoblasts [J]. BMC Pregnancy Childbirth, 2020, 20(1):1-10.
- [8] Butz H, Nofech-Mozes R, Ding Q, et al. Exosomal MicroRNAs are diagnostic biomarkers and can mediate cell-cell communication in renal cell carcinoma [J]. Eur Urol Focus, 2016, 2(2):210-218.
- [9] Dias F, Teixeira AL, Nogueira I, et al. Extracellular vesicles enriched in hsa-miR-301a-3p and hsa-miR-1293 dynamics in clear cell renal cell carcinoma patients: potential biomarkers of metastatic disease [J]. Cancers, 2020, 12(6):1450.
- [10] Wang L, Hu YY, Zhao JL, et al. Targeted delivery of miR-99b reprograms tumor-associated macrophage phenotype leading to tumor regression [J]. J Immunother Cancer, 2020, 8(2):e000517.
- [11] Li YJ, Wang Y, Wang YY. MicroRNA-99b suppresses human cervical cancer cell activity by inhibiting the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway [J]. J Cell Physiol, 2019, 234(6):9577-9591.
- [12] Yao XB, Zhang HG, Liu YJ, et al. miR-99b-3p promotes hepatocellular carcinoma metastasis and proliferation by targeting protocadherin 19 [J]. Gene, 2019, 698:141-149.

(收稿日期:2021-01-04)

(本文编辑:许晓蒙)