

# 血清外泌体 miR-486-3p 对非小细胞肺癌早期诊断价值

王琳娜<sup>1,2</sup>, 王静<sup>1</sup>

(1 青岛大学基础医学院, 山东 青岛 266071; 2 山东省慢性病医院(山东省康复中心)检验科)

**[摘要]** 目的 分析血清外泌体 miR-486-3p 对非小细胞肺癌的早期诊断价值。方法 选择非小细胞肺癌病人 120 例为观察组, 同期体检健康志愿者 120 例为对照组, 均采集空腹静脉血, 磷酸钠溶液染色后采用透射电镜观察外泌体形态, Western blot 方法检测外泌体标志蛋白 CD81、TSG101 表达, 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR) 方法检测 miR-486-3p 水平, 采用化学发光法检测血癌胚抗原(CEA)、糖类抗原 125(CA125)、神经元特异性烯醇化酶(NSE)、细胞角蛋白 19 片段(CYFRA21-1)水平, 绘制受试者工作特征曲线(ROC 曲线)分析血清外泌体 miR-486-3p 诊断非小细胞肺癌的灵敏度和特异度。结果 透射电镜观察可见, 外泌体呈盘状囊泡样结构, 直径为 20~300 nm, 颗粒状。Western blot 实验鉴定表面标志蛋白 CD81、TSG101 证实为外泌体。观察组血清 CEA、CA125、NSE、CYFRA21-1 水平均高于对照组( $t=10.701\sim31.406, P<0.01$ ), miR-486-3p 水平低于对照组( $t=17.155, P<0.01$ ); 观察组高龄、男性、有淋巴转移病灶及 TNM 分期 III~IV 期病人的 miR-486-3p 表达水平均低于中青年、女性、无淋巴转移性病灶及 TNM 分期 I~II 期病人( $t=8.168\sim19.658, P<0.05$ )。ROC 曲线分析显示, 血清外泌体 miR-486-3p 诊断非小细胞肺癌的曲线下面积(AUC)为 0.781, 95% 置信区间(CI)为 0.724~0.839, 灵敏度为 51.67%, 特异度为 98.33%, 最佳界值为 0.945。结论 血清外泌体 miR-486-3p 对非小细胞肺癌具有一定的早期诊断价值, 血清外泌体 miR-486-3p 表达水平越低, 非小细胞肺癌病人恶化程度越高。

**[关键词]** 血清; 外泌体; miR-486-3p; 癌; 非小细胞肺; 癌症早期检测

**[中图分类号]** R730.4 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2096-5532(2023)02-0292-04

**doi:** 10.11712/jms.2096-5532.2023.59.068

**[开放科学(资源服务)标识码(OSID)]**



**[网络出版]** <https://kns.cnki.net/kcms2/detail/37.1517.R.20230524.1604.003.html>; 2023-05-27 20:46:51

VALUE OF SERUM EXOSOMAL MIR-486-3P IN EARLY DIAGNOSIS OF NON-SMALL CELL LUNG CANCER WANG Linna, WANG Jing (School of Basic Medicine, Qingdao University, Qingdao 266071, China)

**[ABSTRACT]** **Objective** To analyze the value of serum exosomal miR-486-3p in the early diagnosis of non-small cell lung cancer. **Methods** A total of 120 patients with non-small cell lung cancer were selected as the observation group, and another 120 healthy volunteers in the same period were selected as the control group. The fasting venous blood samples were collected from both groups and stained with sodium phosphotungstate solution. The morphology of exosomes was observed by a transmission electron microscope (TEM). The expression of biomarkers CD81 and TSG101 of exosomes was measured by Western blot. The level of miR-486-3p was measured by real-time quantitative polymerase chain reaction. Chemiluminescent assay was used to measure the levels of carcino-embryonic antigen (CEA), carbohydrate antigen 125 (CA125), neuron-specific enolase (NSE), and cytokeratin 19 fragment (CYFRA21-1). The receiver operator characteristic (ROC) curve was plotted to analyze the sensitivity and specificity of serum exosomal miR-486-3p in the diagnosis of non-small cell lung cancer. **Results** Exosomes were observed by a TEM with a disk-like vesicle structure and a diameter of 20–300 nm and in granular shape. The surface marker proteins CD81 and TSG101 were confirmed as exosomes by Western blot. The levels of serum CEA, CA125, NSE, and CYFRA21-1 in the observation group were significantly higher than those in the control group ( $t=10.701\sim31.406, P<0.01$ ); the miR-486-3p level of the observation group was significantly lower than that of the control group ( $t=17.155, P<0.01$ ); in the observation group, the expression levels of miR-486-3p in elderly male patients with lymph node metastasis and tumor, node, metastasis (TNM) stage III–IV were significantly lower than those in young and middle-aged female patients with no lymph node metastasis and TNM stage I–II ( $t=8.168\sim19.658, P<0.05$ ). The area under the ROC curve of serum exosomal miR-486-3p in the diagnosis of non-small cell lung cancer was 0.781, the 95% confidence interval was 0.724–0.839, the sensitivity was 51.67%, the specificity was 98.33%, and the best cut-off value was 0.945. **Conclusion** Serum exosomal miR-486-3p has a certain value in the early diagnosis of non-small cell lung cancer. The lower the expression level of serum exosomal miR-486-3p, the higher the severity of non-small cell lung cancer.

**[KEY WORDS]** serum; exosomes; miR-486-3p; carcinoma,

non-small-cell lung; early detection of cancer

**[收稿日期]** 2022-02-28; **[修订日期]** 2023-04-09

**[基金项目]** 山东省医务职工科技创新计划项目(2020-23242)

**[第一作者]** 王琳娜(1976-), 女, 硕士研究生, 副主任技师。

**[通信作者]** 王静(1963-), 女, 副教授, 硕士生导师。E-mail:

wln315727@163.com。

肺癌是临床上发病率最高的癌症之一, 也是全

球范围内恶性肿瘤死亡的常见原因之一<sup>[1]</sup>。非小细胞肺癌是肺癌中最常见的病理类型,其早期诊断具有一定的难度,且 5 年生存率较低<sup>[2]</sup>。肺癌发病早期多无典型临床表现,一经发现往往已经发展至中晚期,预后不佳。外泌体天然存在于人体体液中,其成分中含有 mRNA、miRNA 和蛋白质等能够携带重要生物信息的分子,肿瘤源性或肿瘤相关的外泌体含有丰富的生物成分,可作为信号信使参与前列腺癌发生、发展、进展和转移过程中细胞间通讯,是调节微环境的重要递质<sup>[3]</sup>。由于这些外泌体可以从各种体液中分离出并检测到,已成为肿瘤诊断和预后潜力的新的生物标记物。miRNA 是一种非编码小分子 RNA,可调节细胞的增殖、分化和凋亡,在肿瘤的诊断、预后和治疗中发挥重要作用<sup>[4]</sup>。外泌体中的 miRNA-486-3p 在很多恶性肿瘤中均呈现异常表达,如肝癌、胰腺癌、肺癌或胰腺癌等<sup>[5]</sup>。本研究通过检测并分析非小细胞肺癌病人和健康体检者血清外泌体 miR-486-3p 表达水平差异,探究血清外泌体 miR-486-3p 对非小细胞肺癌的早期诊断价值。现将结果报告如下。

### 1 资料与方法

#### 1.1 一般资料

2018 年 10 月—2020 年 9 月,选取本院收治的非小细胞肺癌病人 120 例为观察组,以同期本院体检的健康志愿者 120 例为对照组。观察组男 93 例,女 27 例;年龄 40~79 岁,平均(59.87±10.39)岁。病人纳入标准:①经影像学及病理检查确诊为非小细胞肺癌;②意识清楚,无精神系统疾病,认知正常,能够通过语言或行为与他人正常交流。排除标准:①肝肾功能严重不全者;②免疫系统疾病病人;③合并其他恶性肿瘤者;④除肺部以外其他恶性肿瘤病人。对照组男 95 例,女 25 例;年龄 38~80 岁,平均(60.34±11.27)岁。所有对照组受试者影像学检查、实验室检测均未见明显异常;意识清醒,无精神系统疾病。所有研究对象知情同意且研究通过本院伦理委员会审核批准。

#### 1.2 检测指标及方法

采集两组受试者空腹静脉血 5 mL,以 4 000 r/min 离心 15 min,获取血清,应用 Auto 2000 发光仪(美国,SBI 公司)检测血清中癌胚抗原(CEA)、糖类抗原 125(CA125)、神经元特异性烯醇化酶(NSE)及细胞角蛋白抗原片段 21-1(CYFRA21-1)水平。

应用 Exo Quick-TM 试剂(美国,SBI 公司)提取血清外泌体,按照试剂说明书操作。用磷钨酸溶液染色法染色后,透射电镜(Olympus)观察外泌体颗粒形态,纳米颗粒跟踪分析(NTA)技术测定外泌体粒径大小。应用 Western blot 法检测外泌体表面蛋白标志物 CD81 和 TSG101 表达,实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)方法检测 miR-486-3p 水平。收集受试者一般资料,对病人手术后肿瘤组织病理学、肿瘤病灶最大直径等进行分析。

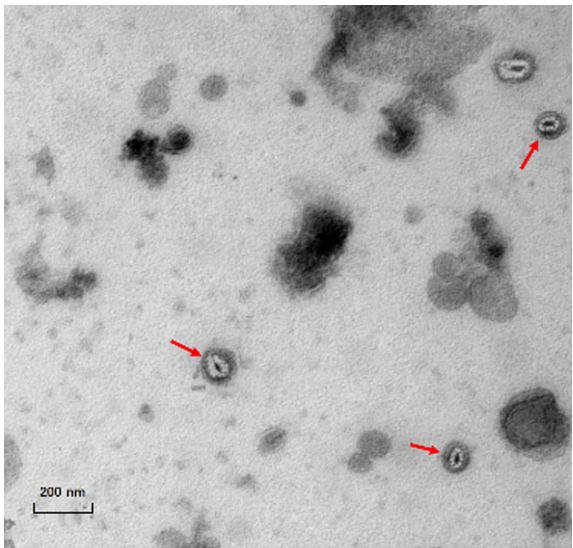
#### 1.3 统计学方法

采用 GraphPad Prism9 软件进行统计学处理。计量资料结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用 *t* 检验;计数资料用百分比或例数表示,数据间比较采用  $\chi^2$  检验;*P*<0.05 表示差异有统计学意义。应用 MedCalc 15.2.2 软件绘制受试者工作特征(ROC)曲线,分析血清外泌体 miR-486-3p 诊断非小细胞肺癌的灵敏度和特异度。

### 2 结 果

#### 2.1 血清外泌体的鉴定

透射电镜观察显示,外泌体具有脂质双层囊泡结构(图 1);NTA 技术观察结果显示,外泌体颗粒直径呈单峰正态分布,峰值处颗粒直径约为 90 nm,颗粒主要分布于 20~300 nm(图 2)。Western blot 检测显示,外泌体表达 CD81 和 TSG101 表面标志蛋白(图 3)。



箭头所示为外泌体,磷钨酸溶液染色法染色,放大 70 000 倍。

图 1 血清外泌体形态透射电镜观察

#### 2.2 两组血清检测指标比较

观察组血清 CEA、CA125、NSE 和 CYFRA21-1

水平平均高于对照组( $t=10.701\sim31.406,P<0.01$ ),观察组血清外泌体 miR-486-3p 水平显著低于对照组( $t=17.155,P<0.01$ )。见表 1 和图 4。

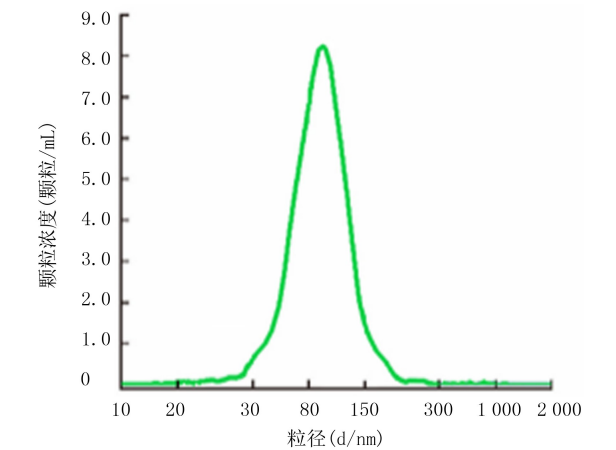


图 2 NTA 检测外泌体颗粒的直径分布

表 1 两组间血清检测指标比较 ( $n=120, \bar{x} \pm s$ )

分组	miR-486-3p	CEA( $\rho/\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )	CA125( $\text{z}/\text{kU} \cdot \text{L}^{-1}$ )	NSE( $\rho/\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )	CYFRA21-1( $\rho/\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )
对照组	1.10 $\pm$ 0.33	4.50 $\pm$ 2.11	10.68 $\pm$ 3.69	10.11 $\pm$ 5.36	4.70 $\pm$ 2.80
观察组	0.56 $\pm$ 0.10 *	36.98 $\pm$ 15.37 *	25.42 $\pm$ 3.58 *	24.10 $\pm$ 11.58 *	13.47 $\pm$ 8.53 *

与对照组比较, \*  $t=10.701\sim31.406,P<0.01$ 。

表 2 不同病理特征非小细胞肺癌 miR-486-3p 表达比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

病理特征	<i>n</i>	miR-486-3p	<i>t</i>	<i>P</i>
性别			19.658	<0.001
男	93	0.13 $\pm$ 0.05		
女	27	0.65 $\pm$ 0.24		
年龄(岁)			8.168	<0.001
$\geq 60$	25	0.17 $\pm$ 0.07		
40~59	95	0.60 $\pm$ 0.26		
TNM 分期			14.196	<0.001
I~II	53	0.62 $\pm$ 0.18		
III~IV 期	67	0.23 $\pm$ 0.12		
淋巴转移性病灶			19.574	<0.001
有	54	0.25 $\pm$ 0.08		
无	66	0.59 $\pm$ 0.11		
组织学诊断			1.649	0.102
腺癌	70	0.53 $\pm$ 0.24		
鳞癌	50	0.61 $\pm$ 0.29		

**2.4 miR-486-3p 对非小细胞肺癌的诊断效能评估**  
ROC 曲线分析显示,血清外泌体 miR-486-3p 诊断非小细胞肺癌的曲线下面积(AUC)为 0.781,95%置信区间(CI)为 0.724~0.839,诊断的灵敏度为 51.67%,特异度为 98.33%,最佳界值为 0.945(图 5)。

3 讨 论

肺癌在临床上发病率较高,其病死率居恶性肿

2.3 不同病理特征非小细胞肺癌 miR-486-3p 表达比较

观察组高龄、男性、有淋巴转移性病灶及 TNM 分期Ⅲ~Ⅳ期病人的 miR-486-3p 表达水平平均低于中青年、女性、无淋巴转移性病灶及 TNM 分期Ⅰ~Ⅱ期病人( $t=8.168\sim19.658,P<0.05$ ),而组织学诊断差异无统计学意义( $P>0.05$ )。见表 2。

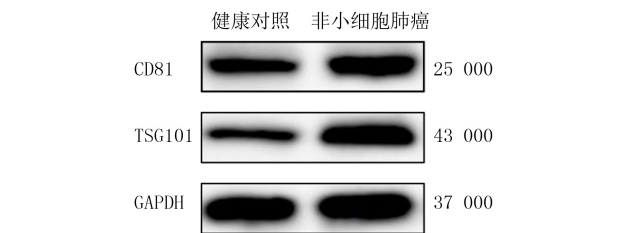


图 3 Western blot 方法检测外泌体表面标志蛋白 CD81 以及 TSG101 表达

瘤首位,其中非小细胞肺癌病人占 80%以上<sup>[6]</sup>。很多病人在明确诊断时往往已经发展至中晚期,若早期明确诊断,采取手术等措施综合治疗,5 年生存率能够显著提高<sup>[7]</sup>。CEA、CA125、NSE、CYFRA21-1 等肿瘤标志物是常见的肺癌筛查指标,但其灵敏度、特异度均较低,无法满足临床需求<sup>[8]</sup>。低剂量螺旋 CT 具有发现早期病灶的能力,但却容易引起医生对疾病的误判,导致进行一些不必要的治疗;另外,频繁的 CT 检查也对病人的健康不利<sup>[9]</sup>。其他检查,如支气管病理活检,属于有创检查,病人接受难度较高,对于早期非小细胞肺癌病人的诊断价值比较有限。因此,寻找特异度及灵敏度更高的检测方法是肺癌筛查的目标。

外泌体的本质是一种细胞外囊泡,其体积较小,直径通常介于 20~300 nm 范围内,它们主要由细胞分泌产生,并通过胞吐的方式释放进入各种体液,外泌体可在血液、尿液、汗液以及脑脊液等多种体液中存在<sup>[10]</sup>。Exocarta 数据库显示,已经发现的外泌体超过万种,在各种外泌体中,其组成成分包括蛋白质、mRNA、miRNA 以及脂质<sup>[11]</sup>。这些成分是体内新陈代谢的重要物质,参与体内的物质交换,因此它们在肿瘤发生的早期即可出现一定的变化,对肿瘤早期诊断以及治疗后病情的评估都有着重要的意义,

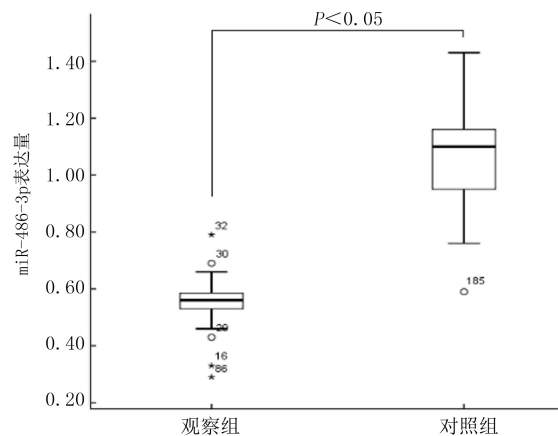


图 4 两组 miR-486-3p 表达比较

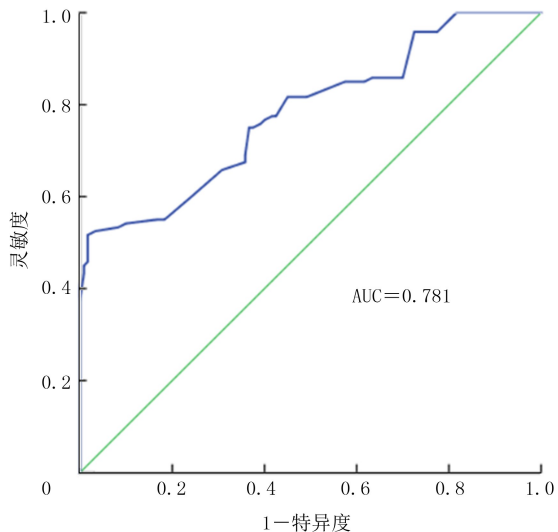


图 5 miR-486-3p 表达诊断非小细胞肺癌的 ROC 曲线

已成为肿瘤血清生物标记研究的热点<sup>[12]</sup>。

本文研究主要检测血清外泌体中的 miRNA。miRNA 属于非编码 RNA,能够通过 mRNA 的靶向互补作用而达成对基因表达的调控作用。目前研究认为,miRNA 在肿瘤发生发展及转移的过程中有一定的临床作用,这也是癌症治疗中的新思路。有研究表明,miRNA 在恶性肿瘤病人体内多呈异常表达,与多种恶性肿瘤病人的预后关系密切,具有一定的早期诊断价值。本文结果显示,观察组血清 CEA、CA125、NSE、CYFRA21-1 的水平均高于对照组,而血清外泌体 miR-486-3p 水平低于对照组,提示检测肿瘤标志物能一定程度筛选出肺癌病人。

TNM 是分析肺癌的病理类型、浸润程度等方面的常用分型方式。本文研究结果显示,观察组高龄、男性、有淋巴转移性病灶及 TNM 分期Ⅲ~Ⅳ期病人的 miR-486-3p 表达水平均低于中青年、女性、TNM 分期Ⅰ~Ⅱ期、无淋巴转移性病灶者。提示肿瘤细胞恶化程度越高,miR-486-3p 表达水平可能

越低。

综上所述,非小细胞肺癌在肺癌中比较常见,预后较差,早期诊断并及时予以治疗措施,能够延长病人生存时间。血清外泌体 miR-486-3p 属于常见抑癌 miRNA,在非小细胞肺癌中呈现低水平表达,且非小细胞肺癌病人恶化程度越高,血清外泌体 miR-486-3p 表达水平越低,二者之间呈负相关,提示血清外泌体 miR-486-3p 对非小细胞肺癌具有一定的早期诊断价值。外泌体 miRNA 是外泌体的重要组成部分,在机体免疫、疾病进展,尤其是肿瘤的发生、发展、变化中都有参与。但是目前,临床上对于外泌体的研究还处于基础阶段,在理论体系方面尚不完善,并且在科研投入和技术支持方面都存在一定的欠缺,有待进一步深入。外泌体中的很多组成部分均有望成为疾病的无创生物标志物,为疾病的早期发现、预后评估提供可靠的临床依据。

[参考文献]

[1] 张帅,许志云,董高超,等. 肺癌合并其他器官多原发癌的临床特点分析[J]. 中国肺癌杂志, 2021,24(1):7-12.

[2] Chinese Preventive Medicine Association. 中国肺癌筛查标准 (T/CPMA 013-2020)[J]. 中国慢性病预防与控制, 2021,29(1):1-8.

[3] AWADASSEID A, WU Y L, ZHANG W. Extracellular vesicles (exosomes) as immunosuppressive mediating variables in tumor and chronic inflammatory microenvironments[J]. Cells, 2021,10(10):2533.

[4] 王新颖,顾玉海. miRNA 在肺癌诊断、治疗及预后判断中的应用进展[J]. 山东医药, 2017,57(31):108-111.

[5] 乔书培. miR-486-3p 特异性过表达系统构建及在癌症中的作用及其机制研究[D]. 黑龙江:哈尔滨工业大学, 2019.

[6] 余昌敏,张丹,闵明,等. 外泌体 miRNA 作为癌症早期诊断标志物的研究进展[J]. 中国免疫学杂志, 2020,36(22):2786-2790.

[7] 何敏,黄燕. 肺癌早期诊断方法的研究进展[J]. 现代预防医学, 2020,47(23):4381-4384.

[8] 陈献,刘静莎,高红梅,等. 肺癌肿瘤标志物定量检测的临床价值[J]. 武警医学, 2016,27(4):379-381,385.

[9] 赵静茹,文智. 非小细胞肺癌新分期的影像学进展[J]. 中国临床医学影像杂志, 2014,25(9):657-659.

[10] 赵越,王超,陈和忠. 外泌体生成和分泌机制的研究进展[J]. 解放军医学杂志, 2017,42(12):1106-1109.

[11] 张怡萌,张慧欣,刘洋. 外泌体生物分析及其临床应用研究进展[J]. 高等学校化学学报, 2020,41(11):2306-2323.

[12] 朱深圳,章佳新. 外泌体不同成分在乳腺癌中研究进展及前景[J]. 国际外科学杂志, 2020,47(11):787-792.

(本文编辑 黄建乡)