

血清外泌体 miR-451a 在弥漫大 B 细胞淋巴瘤 治疗监测中的意义

曹迪, 蒋昱, 冯钰, 景彩霞, 徐娟, 徐才刚[△]

四川大学华西医院 血液科 血液病学研究室(成都 610041)

【摘要】 目的 探索血清外泌体 miR-451a 在弥漫大 B 细胞淋巴瘤(diffuse large B cell lymphoma, DLBCL)中的水平及其在治疗监测中的价值。方法 本研究共纳入 56 例 DLBCL 患者, 56 例健康对照者。收集新发 DLBCL 患者治疗前、化疗 2~4 疗程及化疗结束后血清样本, 并同时收集健康人血液标本, 提取血清中的外泌体 RNA, 并进行实时荧光定量 PCR(quantitative real time polymerase chain reaction, qRT-PCR), 用受试者工作特征(receive operator characteristic, ROC)曲线判定 miR-451a 的诊断效能, 用各时点收集的血清样本动态分析血清外泌体 miR-451a 水平与化疗效果之间的关系。结果 56 例 DLBCL 患者与 56 例健康对照者相比, DLBCL 患者血清外泌体 miR-451a 水平下降($P < 0.0001$), 在两组受试者间用 miR-451a 诊断 DLBCL 的曲线下面积(AUC)为 0.737(95% CI 0.645~0.816)。在随访到的 43 例 DLBCL 患者中, 化疗后获得完全缓解或者部分缓解的患者其血清外泌体 miR-451a 水平较化疗前有所上升($P < 0.05$), 与配对的健康人水平差异无统计学意义($P > 0.05$); 化疗后未获得缓解的患者, 其血清外泌体 miR-451a 水平较化疗前无明显变化($P > 0.05$), 且仍然低于配对的健康人水平($P < 0.05$); 化疗完成后在未缓解者与缓解者之间进行鉴别, 血清 miR-451a 的 AUC 为 0.867(95% CI 0.728~0.951)。结论 血清外泌体 miR-451a 水平动态监测有助于 DLBCL 化疗过程中的疗效(是否缓解)判断。

【关键词】 弥漫大 B 细胞淋巴瘤 外泌体 miR-451a 疗效

The Value of Circulating Exosomal miR-451a to Monitor Therapy Response in Diffuse Large B Cell Lymphoma CAO Di, JIANG Yu, FENG Yu, JING Cai-xia, XU Juan, XU Cai-gang[△]. Department of Hematology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

[△] Corresponding author, E-mail: xucg@cd120.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the expression level of circulating exosomal miR-451a and its significances in therapy monitoring in diffuse large B cell patients. **Methods** We isolated exosomal RNAs fractions from serum of 56 DLBCL patients before treatment, during treatment and after treatment. The serum of 56 healthy controls was collected at the same time. Quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR) were performed to detected the expression level of circulating exosomal miR-451a. Receive operator characteristic (ROC) curve was performed to confirm the diagnostic efficiency of miR-451a. Chemotherapy effect corresponding with miR-451a was analyzed. **Results** Circulating exosomal miR-451a was down-expression in DLBCL compared with healthy controls ($P < 0.0001$), and the area under the ROC curve (AUC) was 0.737 (95% CI 0.645-0.816). In 43 patients who had complete follow-up information, the patients who obtained remission, including complete remission (CR) and partial remission (PR), had the levels of circulating exosomal miR-451a gradually increased. While in patients who did not get remission, including stable disease (SD) and progression disease (PD), had no significant changes of circulating exosomal miR-451a. **Conclusion** Circulating exosomal miR-451a may be an potential indicator for therapy response monitoring in DLBCL.

【Key words】 Diffuse large-B cell Lymphoma exosome miR-451a Treatment outcome

弥漫大 B 细胞淋巴瘤(diffuse large B cell lymphoma, DLBCL)是最常见的非霍奇金淋巴瘤(NHL)种类, 约占所有 NHL 的 30%~40%^[1]。正确的化疗前评估及化疗过程中评估有助于医师选择正确的化疗方案而使患者受益。目前, DLBCL 的治

疗监测金标准仍然为 PET/CT, 该方法价格昂贵且有潜在的放射危害^[2], 普通民众难以接受。因而, 发掘在化疗过程中有监测意义的分子标记物显得尤为重要。

外泌体是大小约为 30~100 nm 的脂质双分子杯状囊泡, 它可以由各种细胞分泌并在外周血中稳定存在^[3-4]。外泌体中含有多种生物活性物质, 如

[△] 通信作者, E-mail: xucg@cd120.com

蛋白质、脂质、核酸(包括 microRNA)^[4]。microRNA(miRNA)是一类小分子非编码 RNA,在转录后水平通过 miRNA-mRNA 相互作用参与调控基因表达。其中,miR-451a 在许多肿瘤中均有报道,已被证实与多种肿瘤的生物行为密切相关^[5-7],且有基础研究表明,在其他类型癌症中,miR-451a 低表达促使 *c-MYC* 表达上调,进而促进肿瘤进展^[8]。*c-MYC* 是一种核蛋白类的原癌基因,且 *c-MYC* 基因易位与 DLBCL 的发病及预后相关^[1,9]。基于以上背景,本研究将分析血清外泌体 miR-451a 在 DLBCL 中的表达情况及其与化疗治疗反应性之间的关系。

1 材料和方法

1.1 病例资料

本研究共纳入 56 例在四川大学华西医院就诊并经病理学确诊(根据 WHO2008 年淋巴瘤造血系统肿瘤分类标准^[10])的新发 DLBCL 患者,病理学标本均为手术切除标本,患者诊断时年龄 23~87 岁(中位 58.5 岁),其中男性 33 例,女性 23 例。Ann Arbor 分期 I-II 期 24 例,III-IV 期 32 例;有 B 症状者 22 例,伴随大包块者 15 例,乳酸脱氢酶(LDH)升高 22 例,正常 34 例。并选择 56 例在本院常规体检并且各项检查指标基本正常的健康人作为健康对照,健康对照组年龄 21~76 岁(中位年龄 57 岁),其中男性 30 例,女性 26 例。56 例 DLBCL 患者中,43 例在所有化疗完成后采集到血样,5 例在化疗过程中死亡,2 例在化疗过程中因严重的副反应未再化疗,6 例在确诊后失访。纳入研究的患者分别在化疗前、化疗 2~4 疗程后及化疗完成后采集 5 mL 静脉血,并同时接受临床医生疗效评估,评估标准参照国际工作组建议的《恶性淋巴瘤疗效评价标准》^[11],包括完全缓解(complete remission, CR)、部分缓解(partial remission, PR)、疾病稳定(stable disease, SD)和疾病进展(progression disease, PD),CR 及 PR 为缓解组,SD 及 PD 为未缓解组(non-remission, NR)。本研究已获得所有研究对象的知情同意,并已通过四川大学华西医院伦理委员会批准(批件号 2017 年审(380)号)。

1.2 主要试剂和仪器

外泌体提取试剂盒及表面蛋白鉴定试剂盒来自美国 SBI 公司。外泌体 RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒、PCR 试剂盒及相对应的引物均来自美国 Qiagen 公司。电泳仪来自美国 Bio-Rad 公司。

Qubit[®] 3.0 荧光定量仪来自美国赛默飞公司。

1.3 实验方法

1.3.1 静脉血标本的处理 采集静脉血 5 mL 并保存在 4 °C,4 h 内以 3 000×*g* 离心 15 min,吸取上层血清。再以 16 000×*g* 离心 15 min,吸取上层无细胞血清,以 500 μL 分装于无酶 EP 管中,冻存于 -80 °C 备用。

1.3.2 血清外泌体 miR-451a 提取及鉴定 外泌体 miR-451a 提取操作步骤按照试剂盒说明书进行,提取完成后对外泌体进行大小及表面蛋白 CD63, HSP70 鉴定。外泌体大小鉴定使用纳米粒径分析(NTA),表面蛋白鉴定使用 Western blot。

1.3.3 血清外泌体 miR-451aRNA 提取 将在 1 mL 血清中提取的外泌体重悬于 800 μL qiazol 中,加入 3.5 μL 1.6×10⁸ copies/μL Ce_miR-39_1 作为外参,充分混匀。以下提取步骤参照 Qiagen 血清 miRNA 提取试剂盒试剂说明书。RNA 量及质量鉴定采用 Nanodrop 分光光度计(ND-1000, Nanodrop Technologies)。

1.3.4 实时荧光定量(qRT-PCR)检测血清中的 miR-451a mRNA 逆转录反应体系 20 μL: 4 μL 5×miscript Hispect Buffer, 2 μL 10×miscript Nucleics Mix, 2 μL Miscript Reverse Transcriptase Mix 及全部 RNA 模板(约 12 μL)混合,37 °C 60 min,95 °C 5 min 条件下逆转录。

PCR 体系 10 μL: 1 μL cDNA 模板,1 μL 上游引物,1 μL 下游 10×Miscript Universal Primer, 5 μL 2×QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix,加 ddH₂O 补至 10 μL。循环条件:95 °C 预变性 10 min,94 °C 变性 15 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,45 个循环。

miR-451a 相对表达量采用 2^{-ΔΔCt} 计算,反应重复操作 3 次。

1.3.5 免疫组织化学法检测 c-MYC 蛋白表达情况 手术切取的 DLBCL 组织标本经体积分数为 10% 中性福尔马林固定、石蜡包埋,4 μm 厚切片。免疫组化染色采用 EnVision 两步法,DAB 显色,以 PBS 替代一抗作为空白对照,已知阳性组织切片为阳性对照。一抗及二抗均购自福州迈新公司。*c-MYC* 蛋白免疫组化判读标准为肿瘤组织中阳性细胞的百分率。

1.4 统计学方法

计数资料组间比较采用 χ^2 检验,miR-451a 相对水平的定量结果以中位数(四分位间距)表示,组

间比较用 Kruskal-Wallis 检验及 Mann-Whitney *U* 检验, Spearman 分析两组数据的相关性, 用受试者工作特征 (ROC) 曲线分析诊断效能。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 外泌体鉴定

如图 1 所示, NTA 显示提取物大小约 115 nm。 Western blot 显示提取物表面携带外泌体标记蛋白 CD63 及 HSP70。 以上结果证实采用 SBI 公司血清外泌体试剂盒提取的沉淀物为外泌体。

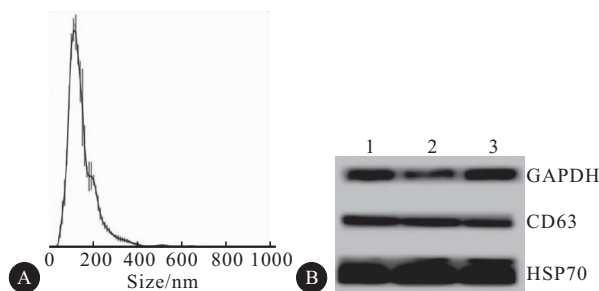


图 1 外泌体鉴定图

Fig 1 Validation of exosomes from serum of participants

A: Nanosight NS 3000 showed the diameter of exosomes was about 115 nm; B: Western blot showed the extractions were equipped with exosomal marker protein CD63 and HSP70. 1: Sample 1; 2: Sample 2; 3: Sample 3

2.2 血清外泌体 miR-451a 在 DLBCL 患者中的相对表达水平及其诊断效能

qRT-PCR 检测 56 例 DLBCL 患者及 56 例健康对照患者血清外泌体中 miR-451a 水平, 结果显示, 与健康对照相比, miR-451a 在 DLBCL 患者中的表达水平降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$, 图 2)。分析血清外泌体 miR-451a 在两组中对于

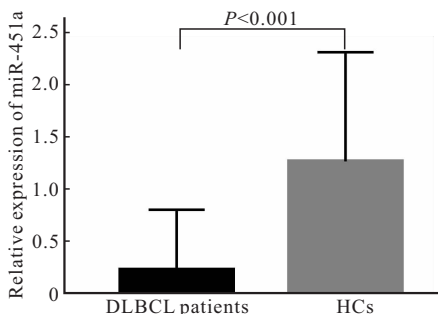


图 2 DLBCL 患者及正常对照血清外泌体 miR-451a 相对表达水平
Fig 2 Relative expression of circulating exosomal miR-451a between DLBCL patients and healthy controls

HCs: Healthy controls

DLBCL 的诊断效能, 结果显示, 其曲线下面积 (AUC) 为 0.737 (95% CI 0.645 ~ 0.816) ($P < 0.0001$, 图 3), 表明血清外泌体 miR-451a 对 DLBCL 具有中等效能诊断价值。

2.3 DLBCL 患者 miR-451a 与 c-MYC 表达水平的相关性

进一步分析 DLBCL 患者血清外泌体中 miR-451a 水平与 DLBCL 组织中 c-MYC 水平的相关性, 结果表明, miR-451a 与 c-MYC 呈负相关关系 ($r = -0.591$, $P < 0.001$, 图 4)。

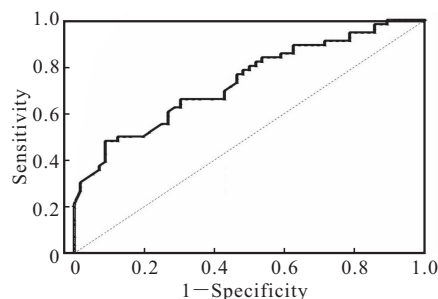


图 3 血清外泌体 miR-451a 诊断 DLBCL 的 ROC 曲线图

Fig 3 ROC analysis of miR-451a in distinguishing DLBCL patients and healthy controls

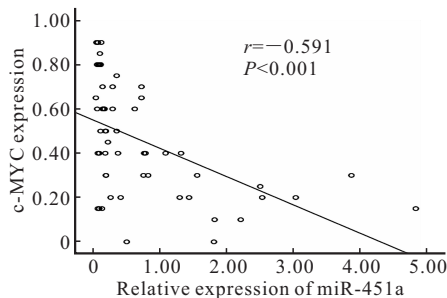


图 4 miR-451a 相对表达水平与 c-MYC 表达情况关联性分析

Fig 4 Spearman correlation between miR-451a expression and c-MYC expression

2.4 化疗后血清外泌体 miR-451a 水平的变化情况

在可追踪的 43 例患者中, 19 例获得 CR, 14 例获得 PR, 10 例未获得缓解 (NR, 包括 SD 及 PD)。统计结果显示, 在 CR 组 (图 5A), 血清外泌体 miR-451a 水平逐渐上升 ($P < 0.0001$), 在完成化疗后几乎接近健康人水平 ($P = 0.1301$); 在 PR 组 (图 5B), 完成化疗后血清外泌体 miR-451a 水平较化疗前也有升高 ($P = 0.0008$), 但化疗期间变化不明显 ($P = 0.1763$, $P = 0.1763$), 该组患者在化疗完成后与健康人水平几乎无差异 ($P = 0.3228$); 在 NR 组 (图 5C), 血清外泌体 miR-451a 水平在化疗全程

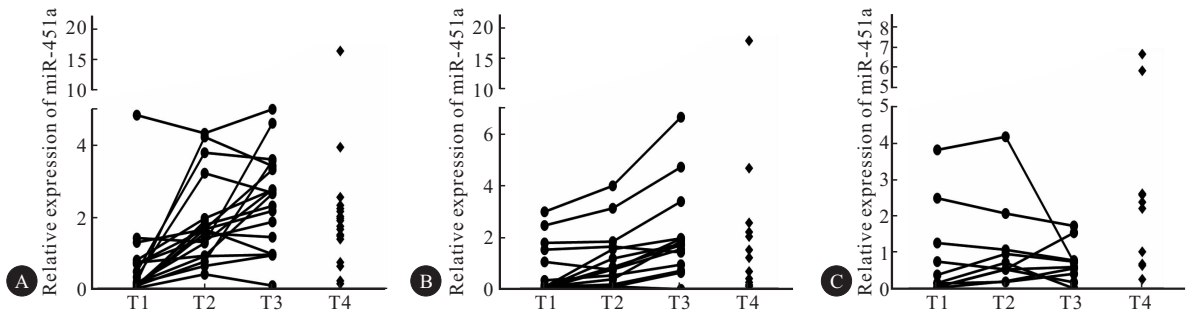


图 5 化疗前后 DLBCL 患者血清外泌体 miR-451a 变化水平

Fig 5 The variation of the level of miR-451a changed over chemotherapy courses

A: The group of complete remission (CR); B: The group of partial remission (PR); C: The group of non-remission (NR); T1: Before chemotherapy; T2: After 2-4 cycles; T3: Chemotherapy completed; T4: Paired healthy controls

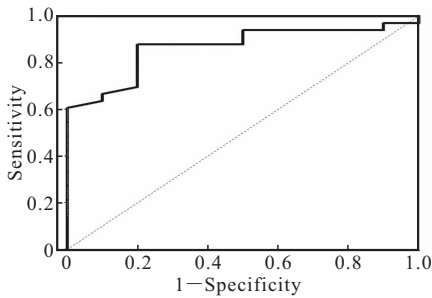


图 6 血清外泌体 miR-451a 评估治疗效果的 ROC 曲线图

Fig 6 ROC analysis of miR-451a in distinguishing remission group and non-remission group

无明显变化 ($P=0.6013$), 该组患者在化疗完成后血清外泌体 miR-451a 仍低于健康人 ($P=0.0232$)。在 NR 组中, 2 例患者为获得 PR 后疾病进展, 其血清外泌体 miR-451a 水平有不同程度的下降。以血清外泌体 miR-451a 表达水平为测试变量, 以化疗完成后的疗效 (缓解组与未缓解组) 为状态变量绘制 ROC 曲线并计算其临界值, 结果显示其 AUC 为 0.867 (95% CI 0.728 ~ 0.951) ($P < 0.0001$, 图 6), 表明血清外泌体 miR-451a 在区分缓解与非缓解患者方面有较佳的能力。

3 讨论

DLBCL 作为 NHL 中最常见的一个类型, 疾病演化进程具有很大的异质性, 短者生存不足一年, 长者可存活数十年^[1]。因而, 监测疾病进程对于有效判断患者所处的疗效状态显得极为重要。目前, 临床疗效判断标准主要依赖于影像学检查, 然而, 多次进行放射学检查可能给患者带来额外伤害, 且其费用相对较高^[2]。近年来, 包括外泌体在内的液体活检领域成为肿瘤疾病的研究热点。许多研究已证

实, 外泌体中包含的 miRNA 可以作为肿瘤诊断、疗效监测及预后判断的分子标记物^[12-13]。相较于其他类型的分子诊断标记物, 如循环肿瘤 DNA 及血清游离 miRNA, 血清外泌体 miRNA 是由活体细胞不停地释放, 与肿瘤发生发展具有密切联系, 且由于外泌体有双层脂质分子包裹而更稳定, 因而, 外泌体 miRNA 或许是液体活检领域最具潜能的分子标记物^[14]。

在本研究中, DLBCL 患者血清外泌体 miR-451a 较健康人而言, 表达水平降低 ($P < 0.001$)。miR-451a 位于 17 号染色体长臂 11.2 区, 是近年来研究较多的 miRNA 之一, 已被证实与多种肿瘤的生物行为密切相关, 且多数研究表明其在恶性肿瘤中发挥抑癌基因的作用^[15], 这或许可以解释为什么血清外泌体 miR-451a 在 DLBCL 呈现低表达状态。进一步, 我们分析了 c-MYC 与 miR-451a 的关联性, 结果显示二者呈较为显著的负相关关系 ($r = -0.591, P < 0.001$), 即 miR-451a 水平越低, c-MYC 蛋白阳性率越高。CHANG 等^[8]曾报道, 在前列腺癌中, miR-451a 低表达通过上调 c-MYC 表达促进细胞存活, 进而导致前列腺癌发生发展, miR-451a 在 DLBCL 中或许也发挥着类似的作用。

为了更好地研究外泌体 miR-451a 动态监测治疗效果的情况, 本研究在化疗前、化疗中 (2~4 疗程)、化疗完成后 2~4 周内对纳入研究的患者进行血清外泌体 miR-451a 水平检测, 并同时评估其治疗效果。本研究中, 化疗后获得缓解的病例 (包括 CR 及 PR 组), 在化疗完成后其血清外泌体 miR-451a 水平与正常人几乎无差异, 而未获得缓解的患者 (包括 SD 及 PD 组) 在化疗完成后其血清外泌体 miR-451a 水平仍然低于正常人。其中, CR 组血清外泌体 miR-451a 呈现逐渐升高的水平, 在化疗完

成后 2~4 周后检测,其水平与正常人相比无明显差异。而 PR 组中,血清外泌体 miR-451a 水平在化疗过程中变化不明显,但化疗完成后,其水平较化疗前升高,并且与正常人几乎无差异。而在未获得缓解的患者中,血清外泌体 miR-451a 水平在化疗过程中的变化无统计学意义,化疗完毕后其水平仍然低于正常人水平。在未缓解组,有 2 例患者为 PR 后进展为 PD 状态,其血清 miR-451 水平有不同程度下降,但由于例数较少,不具有代表性,无法进行进一步的统计学分析。

本研究中,共 5 例患者在化疗过程中死亡,其中 4 例因疾病快速进展死亡,1 例因化疗后严重骨髓抑制并发肺部感染死亡,治疗相关死亡率相对较高。其主要原因可能为整体样本量较少导致出现抽样误差;另一方面,四川大学华西医院为西南地区淋巴瘤诊疗中心,收治的患者病情相对较重(上述 5 例死亡患者中 2 例由急诊转入血液科或肿瘤科,且有 2 例为原发中枢系统淋巴瘤),这或许也是本研究中治疗死亡相关率较高的原因之一。

综上所述,血清外泌体 miR-451a 变化水平与治疗效果具有一定的相关性,在治疗反应较好的患者中,miR-451a 水平逐步上升至正常人水平左右;而在治疗效果较差的患者中,其水平无明显变化,提示血清外泌体 miR-451a 水平可在一定水平上反映化疗效果。相较于传统的影像学检查而言,该监测手段简便快捷且相对价廉,并可避免相关的放射损伤。但本研究所纳入的研究样本量较少,且随访时间短,应当进一步扩大样本量并延长随访时间加以验证。

参 考 文 献

- [1] SWERDLOW SH, CAMPO E, PILERI SA, *et al.* The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*,2016,127(20):2375-2390.
- [2] BRENNER DJ, HALL EJ. Computed tomography—an increasing source of radiation exposure. *N Engl J Med*,2007,357(22):2277-2284.
- [3] BOUKOURIS S, MATHIVANAN S. Exosomes in bodily fluids are a highly stable resource of disease biomarkers. *Proteomics Clin Appl*,2015,9(3/4):358-367.
- [4] THERY C, ZITVOGEL L, AMIGORENA S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nature reviews Immunology*,2002,2(8):569-579.
- [5] LI Y, WANG J, DAI X, *et al.* miR-451 regulates FoxO3 nuclear accumulation through Ywhaz in human colorectal cancer. *Am J Transl Res*,2015,7(12):2775-2785.
- [6] SU Z, ZHAO J, RONG Z, *et al.* MiR-451, a potential prognostic biomarker and tumor suppressor for gastric cancer. *Int J Clin Exp Pathol*,2015,8(8):9154-9160.
- [7] YIN P, PENG R, PENG H, *et al.* MiR-451 suppresses cell proliferation and metastasis in A549 lung cancer cells. *Mol Biotechnol*,2015,57(1):1-11.
- [8] CHANG C, LIU J, HE W, *et al.* A regulatory circuit HP1gamma/miR-451a/c-Myc promotes prostate cancer progression. *Oncogene*,2018,37(4):415-426.
- [9] MOYO TK, WILSON CS, MOORE DJ, *et al.* Myc enhances B-cell receptor signaling in precancerous B cells and confers resistance to Btk inhibition. *Oncogene*,2017,36(32):4653-4661.
- [10] SABATTINI E, BACCI F, SAGRAMOSO C, *et al.* WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues in 2008; an overview. *Pathologica*,2010,102(3):83-87.
- [11] CHESON BD, PFISTNER B, JUWEID ME, *et al.* Revised response criteria for malignant lymphoma. *J Clin Oncol*,2007,25(5):579-86.
- [12] VAN EIJNDHOVEN MA, ZIJLSTRA JM, GROENEWEGEN NJ, *et al.* Plasma vesicle miRNAs for therapy response monitoring in Hodgkin lymphoma patients. *JCI Insight*, 2016, 1 (19): e89631 [2018-03-28]. <https://insight.jci.org/articles/view/89631>. doi: 10.1172/jci.insight.89631
- [13] MELO SA, LUECKE LB, KAHLERT C, *et al.* Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. *Nature*,2015,523(7559):177-182.
- [14] MELO SA, SUGIMOTO H, O'CONNELL JT, *et al.* Cancer exosomes perform cell-independent microRNA biogenesis and promote tumorigenesis. *Cancer Cell*,2014,26(5):707-721.
- [15] RIQUELME I, TAPIA O, LEAL P, *et al.* miR-101-2, miR-125b-2 and miR-451a act as potential tumor suppressors in gastric cancer through regulation of the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Cellr Oncol (Dordr)*,2016,39(1):23-33.

(2017-12-03 收稿,2018-03-15 修回)

编辑 汤洁