

血浆外泌体hsa_circ_0052513在非小细胞肺癌中的表达及意义

张磊¹, 李晨曦², 彭辉勇³, 朱栋炜⁴, 谢劲松¹

Hsa_circ_0052513 in Plasma Exosomes as A New Diagnostic Marker for Non-Small Cell Lung Cancer

ZHANG Lei¹, LI Chenxi², PENG Huiyong³, ZHU Dongwei⁴, XIE Jingsong¹

1. Department of Clinic Laboratory, Nanjing Second Hospital, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210037, China; 2. School of Life Science and Technology, Jiangsu University Jingjiang College, Zhenjiang 212013, China; 3. Department of Clinic Laboratory, The First People's Hospital of Zhenjiang (Affiliated Hospital of Jiangsu University), Zhenjiang 212013, China; 4. Department of Immunology, Jiangsu Key Laboratory of Laboratory Medicine, School of Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China

Corresponding Author: XIE Jingsong, E-mail: 1123086556@qq.com

Abstract: Objective To screen differentially-expressed circRNA in plasma exosomes of patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) and verify its diagnostic value for NSCLC. **Methods** The plasma exosomes of six patients with NSCLC and six healthy people were analyzed by circRNA sequencing. The expression of hsa_circ_0052513 in plasma exosomes of 60 NSCLC patients and 60 healthy controls was detected by qRT-PCR. The expression level of hsa_circ_0052513 in plasma exosomes of NSCLC patients before and after surgery was detected by qRT-PCR. The correlation between the expression of plasma exosomal hsa_circ_0052513 and clinical data of patients with NSCLC was statistically analyzed. **Results** Sequencing results showed that the expression of hsa_circ_0052513 in the plasma exosomes of NSCLC patients was higher than that of healthy controls, and the results were confirmed by qRT-PCR. Hsa_circ_0052513 was decreased in patients with NSCLC after tumor resection ($P < 0.05$). The high expression of plasma exosomal hsa_circ_0052513 in patients with NSCLC was correlated with tumor size, distant metastasis, and TNM stage of NSCLC (all $P < 0.05$). The area under the curve of plasma exosomal hsa_circ_0052513 in the diagnosis of patients with NSCLC was 0.790 4 ($P < 0.0001$). **Conclusion** Hsa_circ_0052513 is highly expressed in the plasma exosomes of patients with NSCLC and is related to tumor size, metastasis, and TNM stage. Hence, Hsa_circ_0052513 could be a new diagnostic marker for NSCLC.

Key words: hsa_circ_0052513; NSCLC; Plasma; Exosomes

Funding: National Natural Science Foundation of China (No. 81800698)

Competing interests: The authors declare that they have no competing interests.

摘要: 目的 筛选非小细胞肺癌 (NSCLC) 血浆外泌体中差异表达的circRNA, 并验证其作为NSCLC的诊断价值。 **方法** 对6例NSCLC患者和6例健康者的血浆外泌体进行circRNA测序分析。qRT-PCR法验证60例NSCLC患者和60例健康对照样本外泌体中hsa_circ_0052513的表达水平。qRT-PCR检测NSCLC患者术前与术后血浆外泌体中hsa_circ_0052513的表达水平。统计分析NSCLC患者血浆外泌体hsa_circ_0052513的表达量与临床病例资料的相关性。 **结果** 测序结果显示hsa_circ_0052513在NSCLC

患者血浆外泌体中的表达水平高于健康对照。qRT-PCR结果确认了测序结果, 而在NSCLC患者手术切除肿瘤后表达降低 ($P < 0.05$)。NSCLC患者血浆外泌体hsa_circ_0052513的高表达与NSCLC的肿瘤大小、远端转移和TNM分期相关 (均 $P < 0.05$)。血浆外泌体 hsa_circ_0052513 诊断NSCLC患者曲线下面积 (AUC) 为0.7904 ($P < 0.0001$)。 **结论** Hsa_circ_0052513在NSCLC患者血浆外泌体中高表达,

收稿日期: 2024-02-07; 修回日期: 2024-07-08

基金项目: 国家自然科学基金 (81800698)

作者单位: 1. 210037 南京, 南京中医药大学附属南京医院 (南京市第二医院) 检验科; 2. 212013 镇江, 江苏大学京江学院生命科学技术学院; 3. 212013 镇江, 镇江市第一人民医院 (江苏大学附属人民医院) 检验科; 4. 212013 镇江, 江苏大学医学院免疫学教研室 江苏省临床检验诊断重点实验室

通信作者: 谢劲松 (1969-), 男, 硕士, 主任技师, 主要从事肺癌免疫细胞功能研究, E-mail: 1123086556@qq.com, ORCID: 0009-0006-5314-7059

作者简介: 张磊 (1989-), 男, 本科, 主管技师, 主要从事肺癌免疫细胞功能的研究, ORCID: 0009-0003-6059-6141

且和肿瘤大小、转移以及TNM分期相关，有望成为NSCLC新的诊断标志物。

关键词：hsa_circ_0052513；非小细胞肺癌；

血浆；外泌体

中图分类号：R446

开放科学(资源服务)标识码(OSID)：



0 引言

肺癌是世界范围内常见的恶性肿瘤之一，严重影响人类健康，其中非小细胞肺癌（non-small cell lung cancer, NSCLC）约占85%^[1]。尽管有大量关于肺癌的研究，但是目前对于肺癌的治疗手段仍然不足。探索早期诊断的肿瘤标志物和治疗靶点仍然是目前研究的热点之一^[2]。

外泌体（exosome）是由多种细胞分泌的直径为40~160 nm的细胞外膜性微囊泡^[3]。外泌体内包含多种生物活性物质，包括脂质、蛋白质、DNA和非编码RNA等^[4]。不同宿主细胞分泌的外泌体含有不同的分子，因此具有不同的生物学功能^[5]。其中，研究表明外泌体包裹的非编码RNA对于包括肿瘤在内的多种疾病进展相关^[6-7]。非编码RNA是一类不编码蛋白质的RNA，约占人类基因组的98%。非编码RNA已成为表观遗传学领域的重要课题^[8]。目前对非编码RNA的研究主要集中在miRNA、长链非编码RNA和环状RNA（circRNA）^[9]。CircRNA因其特殊的结构和重要的功能而受到研究者的关注，其在人体内含量丰富，具有多种生物学功能，其中circRNA能够海绵吸附miRNA，从而在转录后水平调控基因表达^[10-11]。之前的研究表明，circRNA与肿瘤的发生发展密切相关，并且可以稳定地从患者外周血外泌体中富集^[12]。这表明检测血浆外泌体circRNA可作为NSCLC诊断策略。本研究通过circRNA测序筛选到了NSCLC患者血浆外泌体中高表达的hsa_circ_0052513，并且验证了其作为NSCLC新诊断标志物的可行性。

1 资料与方法

1.1 病例资料

血液样本来源于2022年5月—2023年10月江苏大学附属镇江市第一人民医院呼吸科收治的66例非小细胞肺癌患者。其中男38例、女28例，年龄37~82（59.37±11.83）岁；0~Ⅱ期29例、Ⅲ~Ⅳ期37例。患者均是首诊未治，病理确诊为非小细胞肺癌，无其他重大疾病和肿瘤，样本于术前采集。66例健康血样本收集于体检部门。另收集小细胞肺癌20例、纵隔淋巴瘤25例、肺结核18例、肺炎30例

的血浆标本，用作与非小细胞肺癌的鉴别诊断。本研究经江苏大学附属镇江市第一人民医院伦理委员会审批，参与者均签署知情同意书。

1.2 血浆样本采集

EDTA抗凝管采集患者或健康体检者外周静脉血10 ml，通过离心机在4℃条件下3 500 r/min离心10 min，吸取上层血浆储存于-80℃冰箱备用。

1.3 血液外泌体提取

0.22 μm滤器过滤血浆样本，然后采用exoEasy Maxi Kit试剂盒（Qiagen，美国）操作方法提取血浆外泌体。该方法利用膜亲和性原理，XBP缓冲液与等体积血浆进行混合稀释，然后在exoEasy离心柱内离心，获得液体用XWP缓冲液继续洗涤，最后使用XE缓冲液孵育，洗脱离心获得外泌体。

1.4 透射电子显微镜检测及粒径分析检测

Tecnai G2 F20透射电子显微镜购自荷兰皇家飞利浦公司，ZetaView Twin pmx220纳米颗粒跟踪分析仪购自德国PMX公司。检测方法严格按照仪器说明书进行。

1.5 Western blot检测

将PBMC或血浆外泌体与RIPA裂解液等体积混合，冰上放置1 h，期间每10 min振荡1次。12 000 g、4℃离心15 min，收集上清液。按体积比4:1将蛋白样本和5×SDS-PAGE混匀，100℃水浴10 min。14 000 g离心10 min备用。将制备的样本进行SDS-PAGE电泳、转膜后，BSA封闭1 h，加一抗（羊抗小鼠CD9、CD63、CD81、HSP60、Calnexin和GAPDH抗体）4℃孵育过夜，第二天用兔抗羊IgG二抗室温孵育1 h后，ECL显色曝光。

1.6 CircRNA测序分析

委托广州锐博公司对健康对照和非小细胞肺癌患者血浆外泌体进行circRNA的提取和测序分析。

1.7 qRT-PCR检测

细胞或外泌体样本均溶于TRIzol试剂中，手工法提取总RNA，总RNA的OD值在1.9~2.0之间。反转录获得cDNA，4℃冰箱保存备用。根据日本TaKaRa公司的qRT-PCR试剂盒说明书对标本进行circRNA的定量检测，其中预变性温度为98℃，延伸的温度为60℃，变性延伸退火设置40个循环，内参基因选择U6。最终通过Ct值和相对定量法计算circRNA的表达水平。

1.8 细胞培养

人肺癌细胞株（A549、H661、H460、H1299、H226、MES-1）购自广州Saiku生物科技公司。正常人肺支气管上皮细胞16HBE购自中国科学院上海

细胞库。

1.9 统计学方法

用SPSS 16.0软件进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示；数据呈偏态分布或方差不齐时，用中位数和四分位数间距表示。Mann-Whitney U检验比较两组间差异，分析与临床病例特征的相关性。受试者工作特征（receiver operator characteristic, ROC）曲线分析血浆外泌体hsa_circ_0052513对非小细胞肺癌的诊断效能。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血浆外泌体的鉴定

透射电子显微镜显示，制备的外泌体呈圆形或椭圆形，具有外泌体茶托样结构（图1A）。纳米粒径分析结果显示，外泌体粒径在30~190 nm范围内，并且在91 nm处富集（图1B）。Western blot结果显示，相比于外周血单个核细胞的蛋白成分，血浆外泌体丰富表达HSP60、CD9、CD63和CD81，这些均为外泌体膜上的标志蛋白，同时血浆外泌体不表达Calnexin、GAPDH这些细胞常规表达的蛋白（图1C）。这些结果表明，我们制备的血浆外泌体符合要求。

2.2 芯片分析及验证

对6例NSCLC患者和6例健康者来源的血浆外泌体进行了circRNA测序分析（图2A）。测序结果显示，相比于健康对照，NSCLC患者血浆外泌体中的hsa_circ_0052513、hsa_circ_0048856、hsa_circ_0076305、SATB2和hsa_circ_00102481表达明显增高，是倍数变化大的前五位（图2B）。随后对后续60例NSCLC患者（其中鳞癌26例，腺癌34例）和60例健康者及与NSCLC进行鉴别诊断的小细胞

肺癌20例、纵隔淋巴瘤25例、肺结核18例、肺炎30例患者的血浆外泌体中的hsa_circ_0052513进行了qRT-PCR检测，结果表明，相比于健康对照，NSCLC患者（肺鳞癌和肺腺癌）血浆外泌体中hsa_circ_0052513的表达显著增高（ $P < 0.001$ ），而小细胞肺癌、纵隔淋巴瘤、肺结核、肺炎患者血浆外泌体中hsa_circ_0052513的表达水平没有明显变化（图2C）。

2.3 hsa_circ_0052513在非小细胞肺癌细胞系中高表达

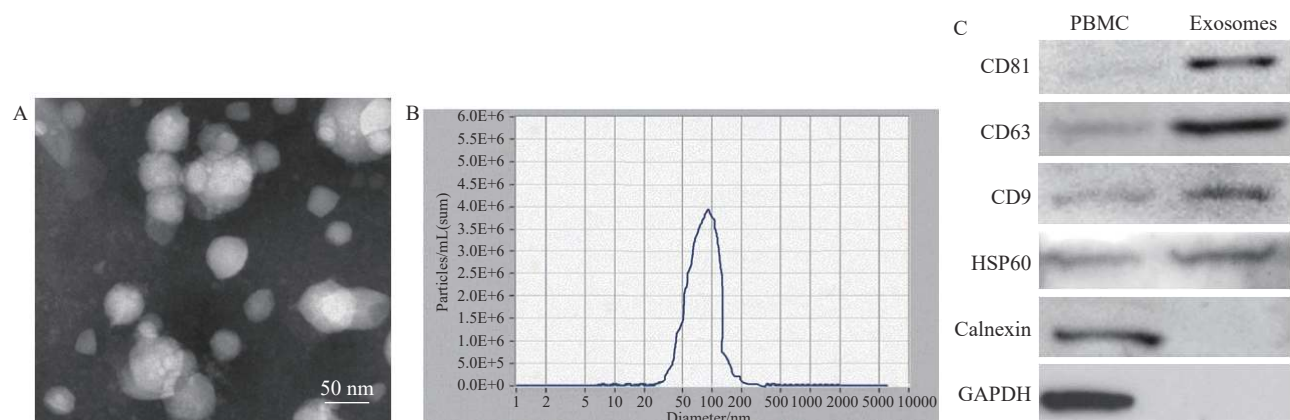
研究表明，肿瘤患者血浆以及外泌体中的非编码RNA成分发生改变，这些非编码RNA有些由肿瘤细胞分泌，并且有望成为肿瘤诊断的标志物^[13-15]。我们推测NSCLC患者血浆外泌体中高表达的hsa_circ_0052513来源于肿瘤细胞，所以对正常支气管上皮细胞16HBE和非小细胞肺癌细胞系A549、H661、H460、H1299、H226、MES-1中的hsa_circ_0052513进行了qRT-PCR检测。结果表明，相比于16HBE细胞，A549、H661、H460、H1299、H226和MES-1中hsa_circ_0052513的表达均明显增高（均 $P < 0.05$ ），见图3。

2.4 非小细胞肺癌患者术后血浆外泌体hsa_circ_0052513的表达

接下来我们对手术切除前后一周的NSCLC患者血浆进行了采集，共计33例。对血浆进行外泌体提取后，qRT-PCR检测hsa_circ_0052513的表达量。结果表明，NSCLC患者手术后的血浆外泌体hsa_circ_0052513表达水平明显降低（ $P < 0.05$ ），见图4。

2.5 血浆外泌体hsa_circ_0052513的表达与临床特征相关分析

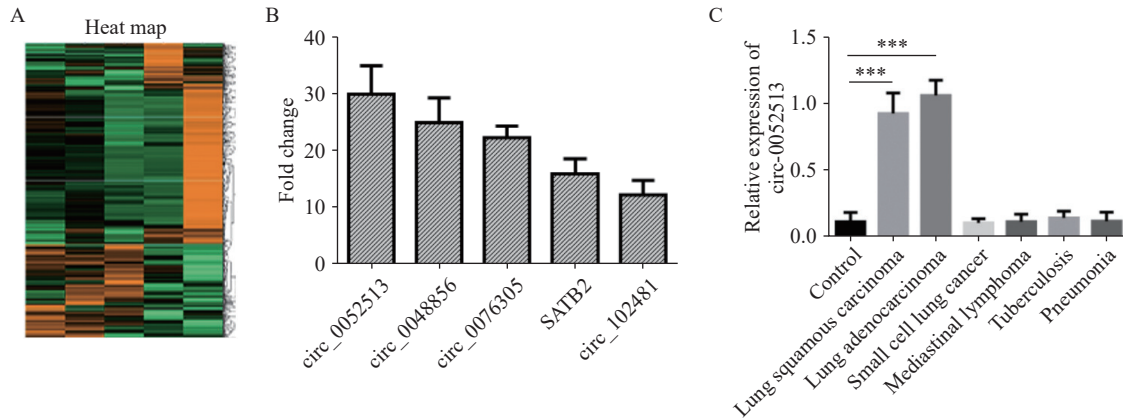
利用Mann-Whitney U检验对NSCLC患者血浆



A: transmission electron microscopy image of plasma exosomes; B: particle size analysis of plasma exosomes; C: Western blot analysis of the characteristic proteins of plasma exosomes; PBMC: peripheral blood mononuclear cell; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

图1 血浆外泌体的鉴定

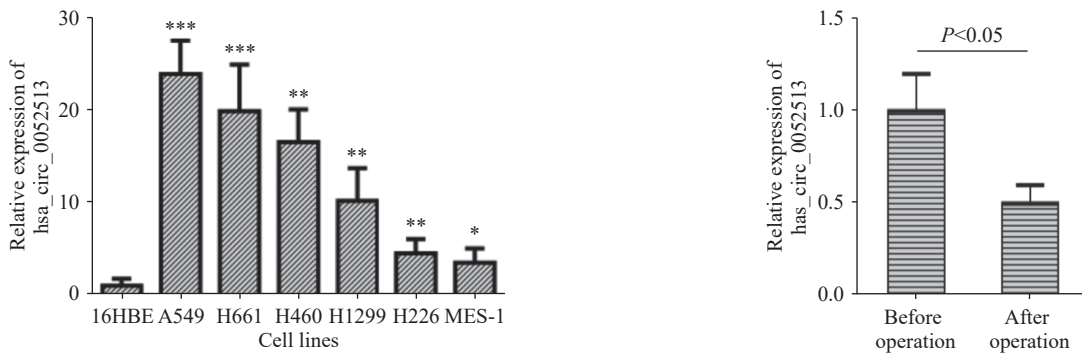
Figure 1 Identification of plasma exosomes



***: $P<0.001$. A: sequencing analysis of plasma exosomal circRNA; B: differential expression of circRNA in the plasma exosomes of patients with NSCLC; C: comparison of the expression levels of hsa_circ_0052513 in the plasma exosomes among healthy controls and patients with lung squamous cell carcinoma, lung adenocarcinoma, small cell lung cancer, mediastinal lymphoma, tuberculosis, and pneumonia.

图2 血浆外泌体circRNA测序分析及验证

Figure 2 Sequencing analysis and verification of plasma exosomal circRNA



*: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$.

图3 qRT-PCR检测非小细胞肺癌细胞系中 hsa_circ_0052513 的表达

Figure 3 Detection of hsa_circ_0052513 expression in non-small cell lung cancer cell lines by qRT-PCR

外泌体 hsa_circ_0052513 的表达与临床特征间相关性进行分析,以Cut-off值为界,将NSCLC患者分为 hsa_circ_0052513 高表达组(38例)和低表达组(22例)。结果发现,其高表达与NSCLC的肿瘤大小、远端转移和TNM分期相关(均 $P<0.05$),而与年龄、性别、肿瘤部位、分化程度和淋巴结转移无关,见表1。

2.6 血浆外泌体 hsa_circ_0052513 对非小细胞肺癌的诊断效能

利用ROC曲线进行诊断效能评价,血浆外泌体 hsa_circ_0052513 具有较高的诊断效能,曲线下面积(AUC)为0.7904,特异性为78%,敏感度为75% ($P<0.0001$),见图5。

3 讨论

肺癌已成为全球癌症相关死亡的重要原因,且

图4 qRT-PCR检测非小细胞肺癌患者手术前后血浆外泌体中 hsa_circ_0052513 的表达

Figure 4 Detection of hsa_circ_0052513 expression in plasma exosomes of patients with non-small cell lung cancer by qRT-PCR before and after operation

发病率和死亡率呈上升趋势,其中NSCLC占肺癌的85%^[16]。大多数肺癌确诊时已处于中晚期,治疗效果和预后一般较差,因此尽早发现肿瘤以及适当的干预是治疗肿瘤的最佳策略。CircRNA在人类细胞中广泛表达,其表达水平可能远高于母细胞,与其他非编码RNA相比, circRNA在细胞、组织和(或)体液中表达更稳定、更特异,因此作为有效的生物标志物具有更大的潜力^[17]。外泌体可以有效保护circRNA免受降解,因此外泌体circRNA被认为是多种实体肿瘤早期诊断和预后评价的理想指标。

本研究旨在筛选NSCLC血浆外泌体中差异表达的circRNA,并验证其作为NSCLC的诊断价值。首先,我们对制备的血浆外泌体进行了验证,结果表明,制备的外泌体在电子显微镜下呈茶托样结构,并且大小在30~190 nm范围内。Western blot

表 1 hsa_circ_0052513在非小细胞肺癌患者血浆外泌体中表达水平与病理参数的关系

Table 1 Relationship between the expression level of hsa_circ_0052513 in plasma exosomes and pathological parameters of patients with non-small cell lung cancer

Pathological feature	n	Low	High	P
		hsa_circ_0052513 expression	hsa_circ_0052513 expression	
Age (years)				0.717
≤65	24	9	15	
>65	36	13	23	
Gender				0.722
Male	35	10	25	
Female	25	12	13	
Tumor site				0.603
Left	27	11	16	
Right	33	11	22	
Tumor size (cm)				0.011
≤5	43	19	24	
>5	17	3	14	
Differentiation degree				0.674
Low	31	10	21	
Middle/High	29	12	17	
Lymphatic metastasis				0.206
N0	44	19	25	
N1-N2	16	4	12	
Distant metastasis				0.024
No	56	21	35	
Yes	4	1	3	
TNM classification				0.001
I	3	2	1	
II	22	11	11	
III	31	8	23	
IV	4	1	3	

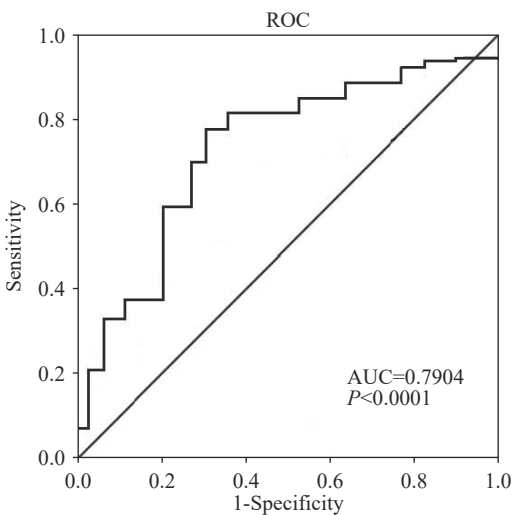


图 5 ROC分析血浆外泌体中hsa_circ_0052513对非小细胞肺癌的诊断潜能

Figure 5 ROC curve for analysis of the diagnostic potential of plasma exosomal hsa_circ_0052513 for non-small cell lung cancer

结果显示，制备的外泌体表达CD81、CD63、CD9等四次跨膜蛋白，而不表达细胞器相关蛋白，这些结果均表明我们的外泌体制备符合要求^[18-19]。通过circRNA测序分析发现，相比于健康对照组，NSCLC患者血浆外泌体中hsa_circ_0052513的表达水平增高最为显著。于是我们先用qRT-PCR测定了60例NSCLC患者和60例健康对照样本外泌体中hsa_circ_0052513的表达水平，结果与测序结果一致。再检测正常支气管上皮细胞和NSCLC细胞系（A549、H661、H460、H1299、H226、MES-1）中hsa_circ_0052513的表达水平，结果表明，hsa_circ_0052513在NSCLC细胞系中均高表达（均 $P<0.05$ ）。手术后NSCLC患者的血浆外泌体中hsa_circ_0052513的表达水平降低（ $P<0.05$ ）。上述结果表明，NSCLC患者血浆外泌体中hsa_circ_0052513的高表达可能来源于肿瘤细胞。

本研究结果表明，血浆外泌体中hsa_circ_0052513在NSCLC患者中表达明显增高且具有特异性，与患者肿瘤大小、远端转移和TNM分期相关。该研究为NSCLC患者的辅助诊断和预后评价提供了无创、简便而有效的新方法。然而，本研究也存在不足之处，样本采集量有待提高以及样本采集地点单一。另外，本研究聚焦于hsa_circ_0052513，其实还有很多差异表达的circRNA没有分析，包括其他表达增高或降低很显著的circRNA。后续研究将探讨hsa_circ_0052513调控肿瘤进展的具体分子机制，验证其对NSCLC诊疗的潜在价值。更重要的是，尽管在过去几年中，关于液体活检的研究和进展已经取得了许多进展，但很少被转化为临床实践。开发和改进从液体活检中分离分析物 and 对其进行分析的特定技术是必要的，这有利于提高检测的敏感度和特异性，这些标志物才可以安全地用于早期检测、预后和监测。此外基于机器学习和改进新的数学和计算方法也是改进液体活检准确性的关键。总之，以血浆外泌体circRNA检测为代表的液体活检具有广大的市场价值和研究价值，有望将来提高包括肺癌在内的肿瘤早期检出率。

利益冲突声明：

所有作者均声明不存在利益冲突。

参考文献：

[1] Olivares-Hernández A, González Del Portillo E, Tamayo-Velasco Á, et al. Immune checkpoint inhibitors in non-small cell lung cancer: from current perspectives to future treatments-a systematic review[J]. *Ann Transl Med*, 2023, 11(10): 354.

- [2] Li S, Wang A, Wu Y, *et al.* Targeted therapy for non-small-cell lung cancer: New insights into regulated cell death combined with immunotherapy[J]. *Immunol Rev*, 2024, 321(1): 300-334.
- [3] Kalluri R, Lebleu VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes[J]. *Science*, 2020, 367(6478): eaau6977.
- [4] Pegtel DM, Gould SJ. Exosomes[J]. *Annu Rev Biochem*, 2019, 88: 487-514.
- [5] Doyle LM, Wang MZ. Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis[J]. *Cells*, 2019, 8(7): 727.
- [6] Maqsood Q, Sumrin A, Saleem Y, *et al.* Exosomes in Cancer: Diagnostic and Therapeutic Applications[J]. *Clin Med Insights Oncol*, 2024, 18: 11795549231215966.
- [7] Shuai ZQ, Wang ZX, Ren JL, *et al.* Differential expressions and potential clinical values of lncRNAs in the plasma exosomes of rheumatoid arthritis[J]. *Int Immunopharmacol*, 2024, 128: 111511.
- [8] Yan H, Bu P. Non-coding RNA in cancer[J]. *Essays Biochem*, 2021, 65(4): 625-639.
- [9] Zhou H, Hao X, Zhang P, *et al.* Noncoding RNA mutations in cancer[J]. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2023, 14(6): e1812.
- [10] Zhang L, Gao H, Li X, *et al.* The important regulatory roles of circRNA-encoded proteins or peptides in cancer pathogenesis (Review)[J]. *Int J Oncol*, 2024, 64(2): 19.
- [11] Nishita-Hiresha V, Varsha R, Jayasuriya R, *et al.* The role of circRNA-miRNA-mRNA interaction network in endothelial dysfunction[J]. *Gene*, 2023, 851: 146950.
- [12] Zhang N, Nan A, Chen L, *et al.* Circular RNA circSATB2 promotes progression of non-small cell lung cancer cells[J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 101.
- [13] Casagrande GMS, Silva MO, Reis RM, *et al.* Liquid Biopsy for Lung Cancer: Up-to-Date and Perspectives for Screening Programs[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(3): 2505.
- [14] Zheng R, Zhang K, Tan S, *et al.* Exosomal circLPAR1 functions in colorectal cancer diagnosis and tumorigenesis through suppressing BRD4 via METTL3-eIF3h interaction[J]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 49.
- [15] Chen SW, Zhu SQ, Pei X, *et al.* Cancer cell-derived exosomal circUSP7 induces CD8(+) T cell dysfunction and anti-PD1 resistance by regulating the miR-934/SHP2 axis in NSCLC[J]. *Mol Cancer*, 2021, 20(1): 144.
- [16] Osarogiagbon RU, Van Schil P, Giroux DJ, *et al.* The International Association for the Study of Lung Cancer Lung Cancer Staging Project: Overview of Challenges and Opportunities in Revising the Nodal Classification of Lung Cancer[J]. *J Thorac Oncol*, 2023, 18(4): 410-418.
- [17] Xu Y, Han J, Zhang X, *et al.* Exosomal circRNAs in gastrointestinal cancer: Role in occurrence, development, diagnosis and clinical application (Review)[J]. *Oncol Rep*, 2024, 51(2): 19.
- [18] Li J, Li Y, Li P, *et al.* Exosome detection via surface-enhanced Raman spectroscopy for cancer diagnosis[J]. *Acta Biomater*, 2022, 144: 1-14.
- [19] Evguenieva-Hackenberg E, Hou L, Glaeser S, *et al.* Structure and function of the archaeal exosome[J]. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2014, 5(5): 623-635.

[编辑: 黄园玲; 校对: 杨卉]

作者贡献:

张 磊: 实验操作与论文撰写

李晨曦、彭辉勇: 标本采集与数据分析

朱栋炜: 文章修改

谢劲松: 实验整体规划和论文修改