

· 基础研究 ·

外泌体为载体的微小RNA-1基因运送抑制 人口腔鳞状细胞癌CAL-27细胞增殖的研究

伍宝琴^{1,2} 黎春晖^{1,2} 张梦莲¹ 聂敏海^{1,2}

1. 西南医科大学口腔医学院口颌面修复重建和再生实验室, 泸州 646000;

2. 西南医科大学附属口腔医院牙周黏膜病科, 泸州 646000

[摘要] **目的** 用供体细胞基因过表达的方法构建微小RNA-1 (miR-1) 高表达的细胞内源性外泌体, 探讨以外泌体为载体, 运送 miR-1 对口腔鳞状细胞癌 CAL-27 细胞增殖的作用。**方法** 采用超速离心法提取过表达 miR-1 的 HEK293 细胞的外泌体, 并用透射电子显微镜、纳米颗粒分析仪、Western blot 及定量聚合酶链反应 (qPCR) 进行外泌体鉴定。过表达 miR-1 的 HEK293 细胞外泌体 (miR1-EXO)、HEK293 细胞的外泌体 (CON-EXO) 及等体积磷酸盐缓冲液 (PBS) 分别与 CAL-27 细胞共培养, 用免疫荧光检测外泌体向细胞的转运, 用 qPCR 检测 CAL-27 细胞 miR-1 及下游靶基因 MET 的表达变化, 用噻唑蓝比色法 (MTT) 检测 CAL-27 细胞增殖情况, 用流式细胞术进行细胞周期检测。同时, miR1-EXO、CON-EXO 及等体积 PBS 分别与人正常口腔黏膜上皮角化细胞 (NOK) 共培养, 用 MTT 法检测 NOK 细胞增殖情况。**结果** miR1-EXO、CON-EXO 均呈典型的球形或杯状结构, 直径约 110 nm, 并高表达外泌体标志性蛋白 CD9、Alix 及 Tsg101。miR1-EXO 中 miR-1 的表达量为 285.80 ± 14.33 , CON-EXO 的表达量为 1.00 ± 0.06 , 二者间有统计学差异 ($P < 0.000 1$)。免疫荧光及 qPCR 结果显示, 与 CAL-27 细胞共培养后, miR1-EXO 被 CAL-27 细胞摄取, miR1-EXO CAL-27 细胞的 miR-1 表达水平高于 CON-EXO 及 PBS, miR-1 下游靶基因 MET 表达水平下调。MTT 及细胞周期结果显示, 与 CAL-27 细胞共培养后, miR1-EXO G0/G1 期细胞比例高于 CON-EXO 和 PBS, 抑制 CAL-27 细胞增殖, 而 miR1-EXO 对 NOK 细胞增殖的影响很小。**结论** 供体细胞基因过表达的方法可使过表达 miR-1 的 HEK293 细胞分泌高表达 miR-1 的外泌体, 并且高表达 miR-1 的外泌体可以将 miR-1 运送到 CAL-27 细胞, 下调 MET 基因表达, 抑制 CAL-27 细胞增殖。

[关键词] 外泌体; 微小RNA-1; 口腔鳞状细胞癌; 细胞增殖**[中图分类号]** R 739.8 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.7518/hxkq.2021.02.003

开放科学 (资源服务)
标识码 (OSID)

microRNA-1 gene delivery mediated by exosomes suppresses CAL-27 cell proliferation Wu Baoqin^{1,2}, Li Chunhui^{1,2}, Zhang Menglian¹, Nie Minhai^{1,2}. (1. Orofacial Reconstruction and Regeneration Laboratory, School of Stomatology of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China; 2. Dept. of Periodontal and Oral Medicine, The Affiliated Stomatology Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China)

Supported by: Key Project of Education Department of Sichuan Province (17ZA0443); Project of Health and Family Planning Commission of Sichuan Province (16PJ535); Project of The Affiliated Stomatology Hospital of Southwest Medical University (201707). Correspondence: Nie Minhai, E-mail: nieminhai@126.com.

[Abstract] **Objective** This study aims to construct endogenous exosomes abundantly loaded with miR-1 and investigate the role of exosome-mediated microRNA-1 (miR-1) delivery on CAL-27 cell proliferation. **Methods** Exosomes secreted by miR-1-overexpressing HEK293 cells (miR1-EXO) were purified via ultracentrifugation and subjected to transmission electron microscopy, nanoparticle analysis, Western blot analysis, and quan-

[收稿日期] 2020-06-26; **[修回日期]** 2020-09-09**[基金项目]** 四川省教育厅重点项目 (17ZA0443); 四川省卫生和计划生育委员会科研课题 (16PJ535); 西南医科大学附属口腔医院项目 (201707)**[作者简介]** 伍宝琴, 医师, 硕士, E-mail: wubaoqinasd@163.com**[通信作者]** 聂敏海, 教授, 博士, E-mail: nieminhai@126.com

titative polymerase chain reaction (qPCR). CAL-27 cells were cocultured with exosomes secreted by HEK293 cells (CON-EXO) and miR1-EXO and equivalent phosphate buffer saline. The intracellular transport of exosomes was measured by using immunofluorescence, the expression of miR-1 and its target gene MET were investigated via qPCR, CAL-27 cell proliferation was measured through MTT assay, and cell cycle state was determined by applying flow cytometry.

Results Electron microscopy revealed that miR1-EXO and CON-EXO were spherical or cup-shaped with an average diameter of approximately 110 nm. The well-known exosome markers CD9, Tsg101, and Alix were enriched. The expression of miR-1 in miR1-EXO was higher than that in CON-EXO (285.80 ± 14.33 vs 1.00 ± 0.06 , $P < 0.0001$). After coculture with CAL-27 cells, miR1-EXO was internalized and unloaded miR-1 into CAL-27 cells. After coculture with miR1-EXO, the expression of miR-1 in CAL-27 cells was upregulated, whereas that of MET, the target gene of miR-1, was suppressed and the proliferation of CAL-27 cells was inhibited significantly. Normal oral keratinocyte cell proliferation was negligibly affected after coculture with miR1-EXO. **Conclusion** Exosomes secreted from miR1-EXO cells could load abundant miR-1. Exosomal miR-1 delivered into CAL-27 cells by using miR1-EXO suppressed the expression of MET mRNA and inhibited cell proliferation.

[Key words] exosomes; microRNA-1; oral squamous cell carcinoma; cell proliferation

口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, 简称口腔鳞癌)是严重危害人类健康的恶性肿瘤之一,易复发、转移,预后差^[1],探索安全高效的口腔鳞癌治疗方案具有重要的科学意义及临床转化价值。外泌体介导的基因及药物运送为肿瘤治疗提供了新的思路。外泌体是由细胞膜两次内陷形成的具有双层膜结构的囊泡状小体,直径30~150 nm^[2]。外泌体装载了“发生细胞”的多种信号分子,如DNA、RNA、蛋白质、脂质等^[3],并通过与受体细胞的细胞膜融合,将信号分子传递给受体细胞,进而调控受体细胞的生理及病理过程^[4]。外泌体具有较低的免疫原性,不引起炎症反应,能够穿过血脑屏障,并且双层膜结构对其携带的内含物有很好的保护作用^[5]。2015年,Toffoli等^[6]发现,用外泌体运送阿霉素可在有效抑制乳腺癌生长的同时,显著减少药物在心脏的聚集,降低药物的心脏毒性。Mao等^[7]研究发现,外泌体运送人食管癌相关基因4(esophageal cancer related gene 4, ECRG4) mRNA,可有效抑制口腔鳞癌的生长。Xie等^[7]研究发现,miR-101-3p过表达的骨髓间充质干细胞外泌体能显著抑制口腔鳞癌的增殖、侵袭及迁移。因此,以外泌体为载体,运送肿瘤抑制基因或化学药物对口腔鳞癌的靶向治疗具有重要的意义。

微小RNA(microRNA, miR)-1是在肺癌^[8]、胃癌^[9]、食管癌^[10]、前列腺癌^[11]等肿瘤组织中显著低表达的非编码RNA,增强miR-1的表达可显著抑制肿瘤细胞生长、增殖,促进肿瘤细胞凋亡。miR-1对口腔鳞癌细胞的抑制作用已在SCC-4细胞系中得以证实^[12],是极具潜力的一种肿瘤抑制因

子。如何使miR-1在外泌体中大量富集以及外泌体的大规模量化生产是外泌体用于口腔鳞癌治疗的技术难点。本研究用供体细胞基因过表达的方法,通过基因工程技术调控外泌体中miR-1的表达,研究外泌体介导的miR-1基因运送在口腔鳞癌治疗中的作用,旨在为探索安全高效的口腔鳞癌治疗方案准备条件。

1 材料和方法

1.1 实验材料

miR1过表达质粒pri-miR1-3p-pLVX由本实验室前期构建,人胚胎肾细胞(human embryonic kidney cell, HEK)293及人舌鳞癌细胞CAL-27细胞购自中国医学科学院基础医学研究所细胞中心。脂质体(lipofectamine)2000、DMEM(Dulbecco's modified eagle medium)培养基、胎牛血清(fetal calf serum, FBS)血清、抗生素、CM-Di I 荧光探针、逆转录试剂盒(Thermo fisher公司,美国),miR-1逆转录、定量聚合酶链反应(quantitative polymerase chain reaction, qPCR)试剂盒及引物(GeneCopoeia公司,美国),Quanti Nova SYBR Green聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR) Kit试剂盒(QIAGEN公司,德国),异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记的鬼笔环肽(phalloidin)(FITC-Phalloidin,北京索莱宝科技有限公司),anti-CD9(sc-13118)、anti-Tsg101(sc-7964)、anti-Alix(sc-53540)抗体(Santa Cruz公司,美国),PI/RNase Staining Buffer细胞周期检测试剂盒(BD公司,美国)。引物由成都擎科梓熙

生物科技有限公司合成。

1.2 实验仪器

细胞培养箱 (Thermo 3111, Thermo fisher 公司, 美国)、实时荧光定量PCR仪 (CFX96 Touch, Bio-rad 公司, 美国)、超高速离心机 (Optima L-100XP, Beckman 公司, 美国)、酶标仪 (Infinite M200, Tecan 公司, 美国)、透射电子显微镜 (Hitachi-7500, Hitachi 公司, 日本)、纳米颗粒分析仪 (NanoSight NS300, Malvern 公司, 美国)、倒置荧光显微镜 (IX51, Olympus 公司, 日本)、流式细胞仪 (Gallios, Beckman 公司, 美国)。

1.3 细胞培养及转染

将HEK293及CAL-27细胞培养于含10% FBS、1%青霉素/链霉素的DMEM培养基, 人口腔黏膜上皮角化细胞 (normal oral keratinocyte, NOK) 培养于 Defined Keratinocyte SFM 培养基。采用脂质体转染法建立过表达 miR-1 的 HEK293 细胞 (miR1-HEK293)。转染前 1 d 接种 3×10^6 个 HEK293 细胞于 10 cm 培养皿中, 次日取 15 μg pri-miR1-3p-pLVX 质粒及 30 μL 脂质体 2000, 分别经 750 μL Opti-MEM 培养基稀释后混匀, 室温静置 10 min, 均匀滴入 HEK293 细胞中, 细胞在含 5% CO_2 的 37 $^\circ\text{C}$ 恒温培养箱培养 48 h, 收集细胞用于后续的 qPCR 检测。

1.4 外泌体提取与鉴定

外泌体提取采用超速离心法。HEK293 细胞及 miR1-HEK293 细胞培养至密度约 90% 后, 更换为无血清的 DMEM 培养基, 继续培养 48 h, 收集培养基, 分别经 4 $^\circ\text{C}$ 300 g 离心 15 min, 取上清; 4 $^\circ\text{C}$ 2 000 g 离心 15 min, 取上清; 4 $^\circ\text{C}$ 10 000 g 离心 30 min, 取上清; 4 $^\circ\text{C}$ 100 000 g 离心 70 min, 弃上清, 沉淀溶于预冷的磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS); 4 $^\circ\text{C}$ 100 000 g 离心 70 min, 沉淀为外泌体, 重悬于预冷的 PBS 溶液, -80 $^\circ\text{C}$ 保存备用。BCA 试剂盒检测外泌体蛋白质浓度, 透射电子显微镜放大 150 000 倍检测外泌体的形态, 纳米颗粒分析仪检测外泌体的粒径, Western blot 检测外泌体标志蛋白 CD9、Alix、Tsg101, qPCR 检测 HEK293 细胞外泌体 (CON-EXO) 及 miR1-HEK293 细胞外泌体 (miR1-EXO) 中 miR-1 的表达水平。

1.5 外泌体向细胞转运

采用亲脂性红色荧光探针标记外泌体。将 1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 CM-DiI (C7000) 加入到外泌体中, 终浓度 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 置于 37 $^\circ\text{C}$ 孵育 30 min, 4 $^\circ\text{C}$ 孵

育 15 min; 4 $^\circ\text{C}$ 100 000 g 离心 70 min, 弃上清; 用预冷的 PBS 重悬, 4 $^\circ\text{C}$ 100 000 g 离心 70 min, 弃上清, 沉淀用预冷的 PBS 重悬。

CAL-27 细胞中加入 CM-DiI 荧光标记的 miR1-EXO (10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 培养 24 h 后, 细胞用 PBS 清洗 3 次; 4% 多聚甲醛室温固定 15 min, PBS 清洗 5 min, 重复 3 次; 用 0.5% Triton X-100/PBS 室温孵育 10 min, PBS 清洗 5 min, 重复 3 次; FITC-Phalloidin 室温孵育细胞 30 min, PBS 清洗 5 min, 重复 3 次; DAPI 标记细胞核后封片, 荧光显微镜下放大 200 倍进行检测。

1.6 qPCR 检测

CAL-27 细胞分别加入 miR1-EXO (10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、CON-EXO (10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 和等体积的 PBS, 置于细胞培养箱中培养 24 h 后, 细胞用 PBS 清洗 3 次, 用 qPCR 检测细胞中 miR-1 及下游靶基因 MET 的表达水平。细胞总 RNA 提取使用 TRIzol 试剂进行。miR-1 表达检测使用 All-in-One™ RT-PCR Detection Kit 试剂盒, 以 U6 为内参。mRNA 表达检测使用逆转录试剂盒 Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit、实时荧光定量 PCR 试剂盒 SYBR Green PCR Kit。引物序列如下。MET 上游引物: 5'-AG-CAATGGGGAGTGTAAAGAGG-3', 下游引物: 5'-CCCAGTCTTGTACTCAGCAAC-3'。GAPDH 上游引物: 5'-GAGTCCACTGGCGTCTTCA-3', 下游引物: 5'-TCTTGAGGCTGTTGTCATACTTC-3'。

1.7 细胞增殖实验

采用噻唑蓝比色法 (methyl thiazolyl tetrazolium, MTT) 检测 miR1-EXO 对 CAL-27、NOK 细胞增殖的影响。

将 CAL-27 细胞接种于 96 孔板中 (每孔 5 000 个) 培养过夜后, 将培养基分别更换为含 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ CON-EXO、miR1-EXO、等体积 PBS 和 0.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 阿霉素的 DMEM 完全培养基, 其中 0.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 阿霉素作为抑制 CAL27 细胞增殖的阳性对照, PBS 作为抑制 CAL27 细胞增殖的阴性对照, 继续培养 48 h, 细胞中加入 10 μL MTT (5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), 37 $^\circ\text{C}$ 培养箱中放置 4 h, 吸干培养基, 每孔中加入 150 μL 的二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO), 室温低速震荡 10 min, 酶标仪检测吸光度 (OD_{490})。

NOK 细胞接种于 96 孔板中 (每孔 5 000 个) 培养过夜后, 将培养基分别更换为含 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ CON-EXO、miR1-EXO、等体积 PBS 的 DMEM 完全培养基, 继续培养了 48 h 之后, 再进行 MTT 检测。

1.8 细胞周期实验

采用流式细胞术进行细胞周期检测。CAL-27细胞接种于6孔板中(每孔 0.2×10^6 个),培养过夜,细胞经无血清培养基同步化培养12 h后,分别更换为含 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ CON-EXO、miR1-EXO及等体积PBS的DMEM完全培养基,继续培养48 h。细胞经胰蛋白酶消化后,PBS清洗2次,用预冷的70%乙醇 4°C 下固定过夜,PBS清洗2次,加入 $500 \mu\text{L}$ PI/RNase染液室温避光染色15 min,流式细胞仪进行检测。

1.9 统计学分析

采用Graphpad prism 9.0软件进行统计学分析。数据结果以均数 \pm 标准差表示,两组间比较采用独立样本*t*检验,多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

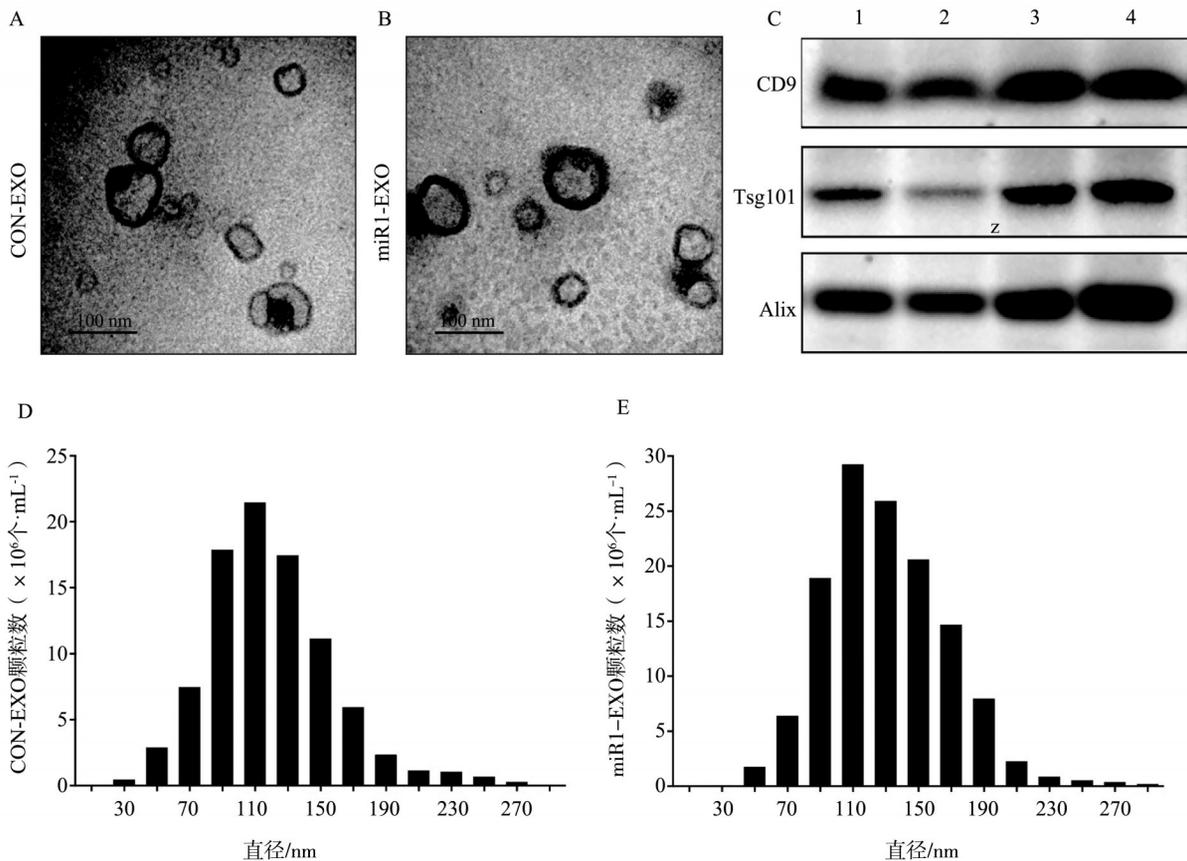
2.1 miR1-EXO的分离纯化

通过pri-miR1-3p-pLVX质粒转染HEK293细胞,

建立过表达miR-1的HEK293细胞(miR1-HEK293)。qPCR结果显示,miR1-HEK293细胞中miR-1的相对表达量为 $3\,053.00 \pm 85.51$,HEK293细胞中miR-1的相对表达量为 0.89 ± 0.15 ,二者间有统计学差异($P < 0.000\,1$),表明miR-1在HEK293细胞中过表达成功。

超速离心法提取外泌体,透射电子显微镜以及纳米颗粒分析仪检测结果显示,miR1-EXO及CON-EXO均呈典型的球形或者杯状结构,直径主要集中在110 nm,Western blot结果显示,miR1-EXO以及CON-EXO均高表达外泌体标志性蛋白CD9、Alix及Tsg101,且二者的形态结构及粒径无明显差异,均符合外泌体的经典特征(图1)。

qPCR结果显示,miR1-EXO中miR-1的表达量为 285.80 ± 14.33 ,CON-EXO的表达量为 1.00 ± 0.06 ,二者间有统计学差异($P < 0.000\,1$)。这表明,供体细胞基因过表达的方法可使外泌体成功装载大量miR-1,并且大量装载miR-1并未改变外泌体的形态结构。



A: CON-EXO, 透射电镜 $\times 150\,000$; B: miR1-EXO, 透射电镜 $\times 150\,000$; C: Western blot检测, 其中1、2、3、4分别代表HEK293、miR1-HEK293、CON-EXO、miR1-EXO; D: CON-EXO纳米颗粒分析仪检测; E: miR-EXO纳米颗粒分析仪检测。

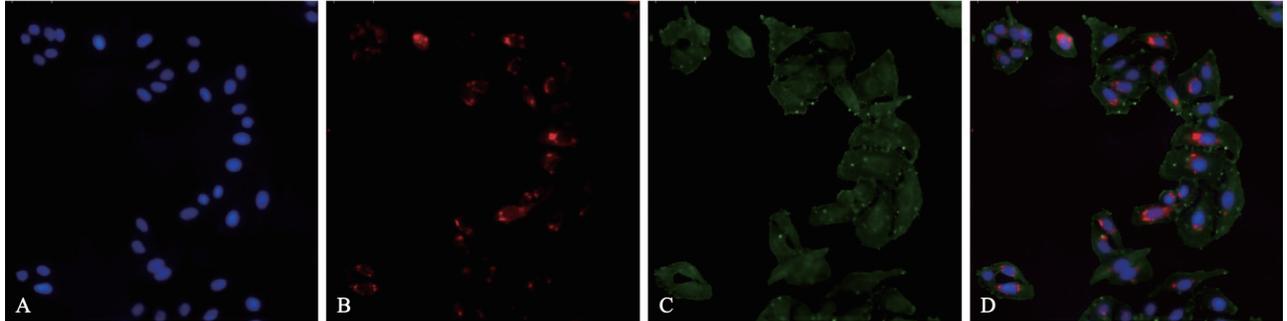
图1 外泌体的鉴定

Fig 1 Identification of exosomes

2.2 外泌体介导 miR-1 转运

免疫荧光检测结果显示，与 CAL-27 共培养后，miR1-EXO 被 CAL-27 细胞摄取，主要分布在细胞质中，围绕在细胞核周围（图 2）。qPCR 结果显示，miR1-EXO 组 CAL-27 细胞的 miR-1 表达水

平高于 CON-EXO 组及 PBS 组 ($P < 0.0001$)，CON-EXO 组与 PBS 组间无统计学差异 (miR1-EXO, 5.75 ± 0.23 ; CON-EXO, 1.23 ± 0.23 ; PBS, 1.03 ± 0.13)。图 3A)，表明 miR1-EXO 将携带的 miR-1 运送到了 CAL-27 细胞。



A: DAPI; B: 外泌体-Dil; C: 肌动蛋白; D: 合并。

图 2 CAL-27 细胞摄取外泌体

Fig 2 Uptake of exosomes by CAL-27 cells

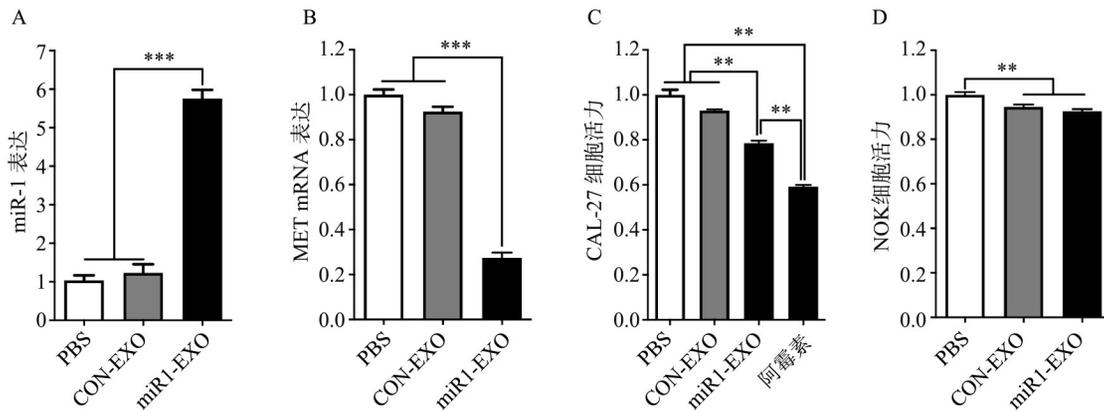
qPCR 检测 CAL-27 细胞中 miR-1 下游靶基因 MET mRNA 的表达变化，结果显示，miR1-EXO 组 MET mRNA 的表达水平下调，与 CON-EXO 组、PBS 组间有统计学差异 (miR1-EXO, 0.27 ± 0.04 ; CON-EXO, 0.92 ± 0.03 ; PBS, 1.00 ± 0.04) (图 3B)，表明 miR1-EXO 具有生物学活性，与 CAL-27 细胞融合后，显著抑制了 miR-1 下游靶基因 MET mRNA 的表达。

2.3 miR1-EXO 抑制 CAL-27 细胞增殖

MTT 及细胞周期检测结果显示，miR1-EXO 组 CAL-27 细胞活力低于 CON-EXO 组和 PBS 组，CON-EXO 组和 PBS 组间无统计学差异 (miR1-EXO, 0.79 ± 0.03 ; CON-EXO, 0.93 ± 0.02 ; PBS, 1.00 ± 0.07 ; 阿霉素, 0.59 ± 0.03) (图 3C)；miR1-EXO 组 G0/G1 期细胞比例高于 CON-EXO 组和 PBS

组，S 期及 G2/M 期细胞比例呈现略低于 CON-EXO 组和 PBS 组的趋势，但无统计学差异 (图 4)。这表明，CON-EXO 不影响 CAL-27 细胞增殖过程，而 miR1-EXO 使 CAL-27 细胞大量停滞在 G0/G1 期，阻滞细胞由 G0/G1 期进入 S 期，最终抑制 CAL-27 细胞增殖。

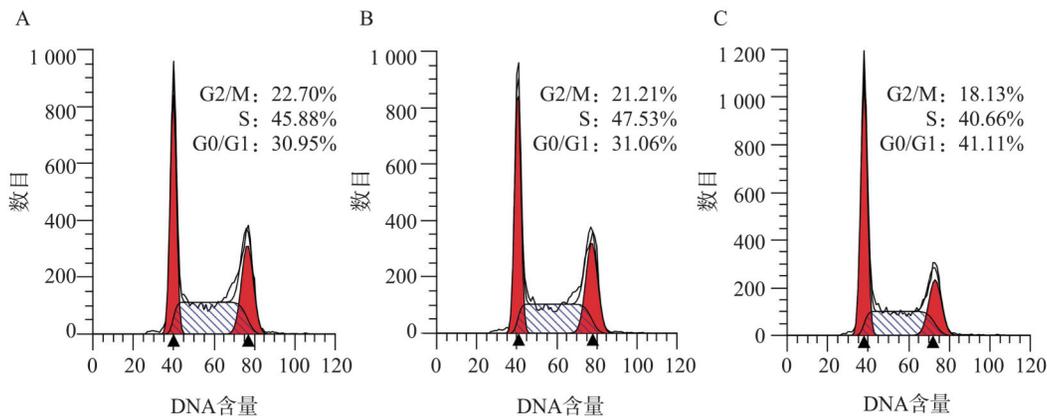
NOK 细胞 MTT 检测结果显示，miR1-EXO 组、CON-EXO 组的 NOK 细胞活力略低于 PBS 组 (miR1-EXO, 0.93 ± 0.03 ; CON-EXO, 0.95 ± 0.03 ; PBS, 1.00 ± 0.04) (图 3D)。虽然 miR1-EXO、CON-EXO 与 PBS 之间的差异具有统计学意义，但差值很小，miR1-EXO 和 CON-EXO 对 NOK 细胞活力的影响微乎其微，可以排除 2 种外泌体对正常口腔上皮细胞具有细胞毒性的风险。



A: CAL-27 细胞 miR-1 表达; B: CAL-27 细胞 MET mRNA 表达; C: CAL-27 细胞增殖; D: NOK 细胞增殖。*** $P < 0.0001$; ** $P < 0.01$ 。

图 3 外泌体运送 miR-1 抑制 CAL-27 细胞增殖

Fig 3 miR-1 was delivered into CAL-27 cells by exosomes and inhibited cell proliferation



A、B、C分别为PBS组、CON-EXO组、miR1-EXO组的CAL-27细胞周期检测。

图4 外泌体运送miR-1阻滞CAL-27细胞分裂

Fig 4 miR-1 was delivered into CAL-27 cells by exosomes and inhibited cell division

3 讨论

外泌体是细胞内源分泌的纳米尺寸囊泡,无免疫原性,不引起炎症反应,可作为一种潜在的药物运送载体。因此,如何使具有治疗作用的外源基因和药物在外泌体中富集是外泌体治疗的技术难点。研究显示,反复冻融^[13]、电穿孔^[14]、超声波处理^[15]及基因工程^[2]等方式都可以用于外源基因、化合物在外泌体中的富集。反复冻融、电穿孔及超声波处理是将外泌体提纯后,通过物理手段改变外泌体的膜结构,使外源基因或药物进入到外泌体中,可以理解为外泌体被动装载的过程。

本研究根据外泌体形成的生物学过程,用基因工程的方式将miR-1在供体细胞过表达,进而供体细胞的细胞膜内陷形成外泌体时,就会主动包裹胞浆中大量存在的miR-1,可以理解为外泌体主动装载的过程。本研究中miR1-HEK293细胞外泌体的miR-1含量大量增加,并且miR-1的大量富集并没有改变外泌体的形态结构。用抗生素筛选、流式分选等方法建立miR1-HEK293稳定表达的细胞株,就可以用于源源不断的产生大量富集miR-1的外泌体。因此,供体细胞基因工程修饰的方式不仅可以作为外泌体装载外源基因的有效手段,而且为大量富集外源基因的外泌体的大规模量化生产奠定了重要的基础。

外泌体介导的基因及药物运送为肿瘤靶向治疗提供了新的思路。Hadla等^[16]证实,外泌体可提高阿霉素对小鼠乳腺癌和卵巢癌的治疗效果,并降低药物的心脏毒性。Mao等^[2]证实,用外泌体运送人食道癌相关基因4,可有效抑制口腔鳞癌的生

长。Naseri等^[17]用骨髓间充质干细胞外泌体运送miRNA-142-3p拮抗剂,可抑制乳腺癌的发生。

miR-1是骨骼肌细胞发育的重要调控因子,在骨骼肌中广泛存在,在肿瘤组织中其表达量显著降低。研究显示,在前列腺癌^[9,18]、肺癌^[19]和结肠癌^[20]模型中,miR-1通过抑制原癌基因MET的表达,抑制肿瘤细胞生长。miR-1可通过与原癌基因MET mRNA的3'UTR结合,抑制基因表达,通过负调控Met/Akt/mTOR信号通路,抑制肿瘤细胞的增殖和迁移^[18]。本研究发现,大量装载miR-1的外泌体可以将miR-1运送到CAL-27细胞,使MET表达下调,延缓细胞由G0/G1期进入S期,抑制细胞生长。由此推测,外泌体介导的miR-1运送可能通过负调控MET及其下游信号通路,抑制CAL-27细胞增殖。

外泌体是否具有潜在的细胞毒性是决定其能否用于肿瘤临床治疗的重要问题。本研究结果表明,miR1-EXO显著抑制了口腔鳞癌CAL-27细胞增殖,而对NOK细胞不具有细胞毒性,证明了外泌体运送miR-1用于口腔鳞癌治疗的有效性和安全性。本研究用供体细胞过表达的方法实现了外泌体装载并运送肿瘤抑制基因,抑制肿瘤细胞生长,为外泌体介导的口腔鳞癌的靶向治疗准备了必要的条件。

利益冲突声明:作者声明本文无利益冲突。

[参考文献]

- [1] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108.
- [2] Mao L, Li X, Gong S, et al. Serum exosomes contain

- ECRG4 mRNA that suppresses tumor growth via inhibition of genes involved in inflammation, cell proliferation, and angiogenesis[J]. *Cancer Gene Ther*, 2018, 25(9/10): 248-259.
- [3] Mashouri L, Yousefi H, Aref AR, et al. Exosomes: composition, biogenesis, and mechanisms in cancer metastasis and drug resistance[J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 75.
- [4] Tai YL, Chen KC, Hsieh JT, et al. Exosomes in cancer development and clinical applications[J]. *Cancer Sci*, 2018, 109(8): 2364-2374.
- [5] Dang XT, Zeng XR. Targeted therapeutic delivery using engineered exosomes and its applications in cardiovascular diseases[J]. *Gene*, 2016, 575(2 Pt 2): 377-384.
- [6] Toffoli G, Hadla M, Corona G, et al. Exosomal doxorubicin reduces the cardiac toxicity of doxorubicin[J]. *Nanomedicine (Lond)*, 2015, 10(19): 2963-2971.
- [7] Xie C, Du LY, Guo FY, et al. Exosomes derived from microRNA-101-3p-overexpressing human bone marrow mesenchymal stem cells suppress oral cancer cell proliferation, invasion, and migration[J]. *Mol Cell Biochem*, 2019, 458(1/2): 11-26.
- [8] Hua L, Zhu GR, Wei JG. MicroRNA-1 overexpression increases chemosensitivity of non-small cell lung cancer cells by inhibiting autophagy related 3-mediated autophagy[J]. *Cell Biol Int*, 2018, 42(9): 1240-1249.
- [9] Han C, Zhou YB, An Q, et al. MicroRNA-1 (miR-1) inhibits gastric cancer cell proliferation and migration by targeting MET[J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(9): 6715-6723.
- [10] Liu WZ, Li MK, Chen XM, et al. MicroRNA-1 suppresses proliferation, migration and invasion by targeting Notch2 in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 5183.
- [11] Hudson RS, Yi M, Esposito D, et al. MicroRNA-1 is a candidate tumor suppressor and prognostic marker in human prostate cancer[J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(8): 3689-3703.
- [12] Wang ZS, Wang JL, Chen ZH, et al. MicroRNA-1-3p inhibits the proliferation and migration of oral squamous cell carcinoma cells by targeting DKK1[J]. *Biochimie Et Biol Cell*, 2018, 96(3): 355-364.
- [13] Haney MJ, Klyachko NL, Zhao YL, et al. Exosomes as drug delivery vehicles for Parkinson's disease therapy[J]. *J Control Release*, 2015, 207: 18-30.
- [14] Alvarez-Erviti L, Seow Y, Yin HF, et al. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes[J]. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(4): 341-345.
- [15] Haney MJ, Klyachko NL, Harrison EB, et al. TPP1 delivery to lysosomes with extracellular vesicles and their enhanced brain distribution in the animal model of batten disease[J]. *Adv Healthc Mater*, 2019, 8(11): e1801271.
- [16] Hadla M, Palazzolo S, Corona G, et al. Exosomes increase the therapeutic index of doxorubicin in breast and ovarian cancer mouse models[J]. *Nanomedicine (Lond)*, 2016, 11(18): 2431-2441.
- [17] Naseri Z, Oskuee RK, Jaafari MR, et al. Exosome-mediated delivery of functionally active miRNA-142-3p inhibitor reduces tumorigenicity of breast cancer *in vitro* and *in vivo*[J]. *Int J Nanomedicine*, 2018, 13: 7727-7747.
- [18] Gao S, Zhao ZY, Wu R, et al. miR-1 inhibits prostate cancer PC3 cells proliferation through the Akt/mTOR signaling pathway by binding to c-Met[J]. *Biomedicine Pharmacother*, 2019, 109: 1406-1410.
- [19] Jiao DM, Chen J, Li Y, et al. miR-1-3p and miR-206 sensitizes HGF-induced gefitinib-resistant human lung cancer cells through inhibition of c-Met signalling and EMT [J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22(7): 3526-3536.
- [20] Reid JF, Sokolova V, Zoni E, et al. miRNA profiling in colorectal cancer highlights miR-1 involvement in MET-dependent proliferation[J]. *Mol Cancer Res*, 2012, 10(4): 504-515.

(本文编辑 李彩)