网络出版时间: 2021-7-28 11:52 网络出版地址: https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20210728.1030.036.html

# 胶质瘤细胞外泌体通过 miR-125b 对细胞增殖凋亡的影响

刘彦廷 孙 拯 汪壮壮 龚 伟 马金阳 田春雷

摘要 目的 探索胶质瘤细胞来源的外泌体对细胞增殖周 亡的影响,并探讨其作用机制。方法 高速离心法提取胶质 瘤细胞 U251 外泌体 通过电镜及纳米粒径分析外泌体形态, Western blot 检测外泌体特征性蛋白表达。在 U251 细胞培 养基中分别加入浓度为 100 μg/ml 的外泌体悬液 30 μl(外 泌体组) 或等量不含外泌体培养基(对照组) 通过双荧光染 色法验证外泌体能否进入 U251 细胞; CCK-8 及流式细胞法 检测细胞增殖周亡的变化。通过 RT-PCR 法筛选 U251 外泌 体与人星型胶质细胞外泌体中差异性表达的 miRNAs。最 后将 miR-NC、miR-125b mimics 或 miR-125b inhibitor 转染 U251 细胞 /重新提取外泌体后加入细胞培养基 /采用 CCK-8 及流式细胞法检测 U251 细胞增殖周亡变化。结果 U251 细胞分离的外泌体为圆形或卵圆形囊泡状小体 直径范围约 100 nm 富含 CD63 和 CD9 蛋白。在 U251 细胞培养基中加 入外泌体悬液后,外泌体能够被 U251 细胞吞噬。CCK-8 及 流式细胞法显示:外泌体组细胞增殖活性高于对照组,凋亡 比例低于对照组。RT-PCR 显示: U251 细胞外泌体 miRNA-125b含量高于人星型胶质细胞外泌体。将 miR-NC、miR-125b mimics 或 miR-125b inhibitor 转染 U251 细胞后,分别提 取三组细胞外泌体并加入 U251 细胞培养基,miR-125b inhibitor 组细胞增殖活性低于 miR-NC 组 ,凋亡比例高于 miR-NC 组; miR-125b mimics 组细胞增殖活性高干 miR-NC 组 调 亡比例低于 miR-NC 组。差异均有统计学意义(P < 0.05)。 结论 胶质瘤细胞来源的外泌体可通过 miR-125b 促进胶 质瘤细胞增殖 抑制细胞凋亡。

关键词 外泌体; 胶质瘤; 凋亡; 增殖

中图分类号 R 739.41

文献标志码 A 文章编号 1000 - 1492(2021)09 - 1361 - 06 doi: 10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2021.09.004

胶质瘤是中枢神经系统常见的恶性肿瘤之一, 目前临床上多采用手术+放化疗等综合治疗为主,

2021-03-09 接收

- 基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(编号:81701278); 湖北省卫生计生委科研项目(编号:WJ2019M063);宜昌 市卫生医疗科技项目(编号:A18-301-29)
- 作者单位:三峡大学第一临床医学院神经外科 , 宜昌 443003

作者简介: 刘彦廷,男,博士,主治医师 田春雷,男,副主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail: cltianyc@163.com 但患者复发率极高,整体预后差<sup>[1]</sup>。胶质瘤细胞可 分泌一种直径约40~100 nm 细胞外膜性囊泡,即外 泌体 不仅可作为细胞间的通信载体,还可通过携带 miRNAs 调控肿瘤细胞的增殖凋亡。目前发现, miR-125b 与胶质瘤组织恶性程度存在相关性,可通 过抑制下游靶基因,调控胶质瘤细胞的增殖凋亡。 如:miR-125b 可通过抑制 DNA 损伤 DRAM2、P53 和 P38 等靶基因,改变肿瘤细胞的增殖活性<sup>[2]</sup>。该研 究拟通过提取胶质瘤细胞的外泌体,将其与 U251 细胞共培养,观察外泌体能否通过 miRNAs 调控胶 质瘤细胞增殖凋亡,为该领域的研究提供新的实验 依据。

#### 1 材料与方法

1.1 材料与仪器 人胶质瘤细胞 U251 与人星型 胶质细胞购于南方医科大学神经病学研究实验室细 胞库 ,RT-PCR 试剂盒购于日本 TaKaRa 公司 ,CCK-8 试剂盒购于美国 Sigma 公司; 兔抗人 CD63、CD9 和 phalloidin 单克隆抗体均购于美国 Cell Signaling Technolog 公司 β-actin 单克隆抗体购于上海康成生物公司; 胎牛血清、培养基购于美国 Gibco 公司; PKH67 购于德国默克公司 ,Annexin-V / Propidium I-odide 试剂盒购自广州康众生物有限公司 , RP-MI1640 和胎牛血清购自广州益龙科技有限公司。 共聚焦显微镜(德国莱卡公司),H-7600 电子显微镜 (日本日立)。2% 磷钨酸购自美国 Sigma ,TRIzol LS 试剂(Invitrogen ,CA ,USA)。

1.2 细胞培养与外泌体的提取 人源性胶质瘤细胞 U251 或人星型胶质细胞置于 RPMI 1640 培养基 中常规培养 添加青霉素 100 U/ml ,链霉素 100  $\mu$ g/ ml 降低细胞污染 ,设定培养箱参数为 37 ℃、95% 饱 和湿度 5% CO<sub>2</sub> 培养箱 ,每 2 ~ 3 天更换 1 次培养 基 ,常规培养细胞 72 h 后 ,提取细胞上清液 A ℃下 完成离心操作 ,依次 275 r/min 离心 8 ~ 10 min ,提取 离心管内上清液 ,1 836 r/min 离心 15 min ,提取离 心管内上清液 3 000 r/min 离心 60 min ,去除离心管 内上清液 ,用 1 ml PBS 吹打混匀管底 ,冻存于 -80℃冰箱。

1.3 透射电镜观察外泌体形态 外体重悬液置于涂有碳涂层的 300 网铜网格上,然后在室温下干燥 5 min ,用 2% 磷钨酸滴染色 10 min。采用 H-7600 电子显微镜观察样品形态,纳米颗粒跟踪分析(NTA) 评估分离的外泌体直径分布。

**1.4** Western blot 实验设 U251 细胞外泌体组和 U251 细胞去外泌体上清液组(对照组),总蛋白提 取后,用 SDS-PAGE 将等载量的提取蛋白分离,然后 转移到聚偏二氟乙烯膜上。用 5% 脱脂牛奶封闭膜 3 h,然后依次加入 CD9、CD63 和 β-actin 蛋白抗体 (1:1000)4℃ 解育过夜。PBS 冲洗后滴加二抗(1:2000),室温下温育 2 h。滴加化学发光试剂 (ECL) 2 min,使用 Chemi DocMP 显现。

**1.5** 免疫荧光染色 细胞 PBS 冲洗后,依次加入 多聚甲醛溶液固定 0.1% Tirton X-100,BSA 溶液封 闭,按预设时间间隔加入 PKH67 荧光标记(绿色)

(1:100稀释), phalloidin 抗体(1:100稀释),
U251细胞外泌体采用 PKH67荧光标记(绿色),
U251细胞质用 phalloidin 染色,避光条件下孵育1h, DAPI 染核3 min, PBS冲洗后取出细胞爬片,封片 荧光显微镜下观察。运用激光共聚焦显微镜采集图像。图像采用 Image Pro 软件分析。

1.6 细胞增殖活力检测 取处于对数生长期细胞, 配置密度为  $1 \times 10^6$  /ml 细胞悬液,于 96 孔板中每孔 加入单细胞悬液 100 µl,空白孔加入等量的培养基, 置于 37 ℃、恒定饱和湿度、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育, 分别于培养第 0、24、48、72 及 96 小时加入 10 µl CCK-8 溶液 继续孵育 3 ~4 h 后,置于酶标仪用 450 nm 单波长测吸光度值(OD 值),实验重复 3 次,绘 制细胞生长曲线。

1.7 流式细胞仪检测细胞凋亡 取对数生长期细胞 以 2 × 10<sup>5</sup> 个/孔接种在 6 孔板上。按实验设计分组培养后胰酶消化收集处理 ,PBS 清洗后 70% 冷乙醇固定 离心洗涤后采用 Annexin-V / Propidium I-odide 试剂盒检测细胞凋亡比例。

**1.8** MiRNAs 基因筛选 选择国内外文献报道,已 通过 miRNAs 基因芯片证实与 U251 胶质瘤细胞增 殖凋亡相关20个 miRNAs 作为筛选目标: miR-4726-5p、miR -1255b-2-3p、miR -340-5p、miR -4275、miR -4712-3p、miR -576-5p、miR -1299、miR -4268、miR -3591-5p、miR -626、miR -3169、miR-374a、miR-590-3p、miR-374b、miR-29c、miR-125b、miR-221、miR- 10a、miR-32 和 miR-138<sup>[3-4]</sup>。

**1.9 MiR-125b** NC、mimics、inhibitor 质粒转染 实验分对照组:转染阴性对照组(negative control, NC)、miR-125b mimics 组和 miR-inhibitor 组。miR-125b NC、mimics 和 inhibitor 质粒载体由上海吉玛生 物制药有限公司构建 将质粒载体转染后,采用胰酶 收集细胞,重悬沉淀后用细胞培养液将细胞密度调 至 5 × 10<sup>6</sup> 个/ml 接种于 6 孔板中培养。

**1.10 RT-PCR** 参照 TRIzol 试剂说明书操作提取 细胞总 RNA 鉴定 RNA 浓度及纯度。采用 RT-PCR 试剂盒 按照上面反应体系进行 cDNA 的合成逆转 录反应体系。ABI Prism7500 型荧光定量 PCR 仪中 扩增,以内参 U6 进行标准化,采用 2<sup>-ΔΔCi</sup>法计算基 因的相对表达量。

**1.11** 统计学处理 采用 SPSS 20.0 版软件进行数 据分析处理 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示 2 组间比较采用 独立样本 t 检验 P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胶质瘤细胞源性外泌体的鉴定 透射电子显 微镜结果显示:胶质瘤 U251 细胞上清液提取出外 泌体颗粒具有双侧膜结构(图1A),纳米颗粒跟踪 分析显示:外泌体的尺寸分布约为100 nm 直径(图1B)。Western blot 显示:外泌体组特异性外泌体标 记蛋白 CD9 和 CD63 含量高于对照组(去外泌体细 胞上清液)(图1C)。结果表明,外泌体成功地从细 胞上清液中分离出来。

2.2 U251 细胞摄取外泌体情况 在 U251 细胞培 养基中分别加入浓度为 100 μg/ml 的外泌体悬液 30 μl(外泌体组) 或等量不含外泌体培养基(对照组), 共聚焦荧光显微镜结果显示:外泌体组 U251 细胞 内可见 PKH67 荧光标记,对照组(细胞上清液)细 胞内未见 PKH67 荧光标记(图 2)。

2.3 外泌体影响 U251 细胞增殖凋亡 分别将外泌体悬液 30 μl(浓度为 100 μg/ml)或无外泌体培养基 30 μl(对照组)加入 U251 细胞共培养 流式细胞术结果显示:外泌体组细胞凋亡比例为(6.03 ± 0.15)% (低于对照组(18.34 ±4.07)%(t=17.207, P<0.01)(图 3A)。CCK-8 结果显示:外泌体组细胞增殖活性在 72 h(t=9.398 P<0.01)及96 h(t=6.025 P<0.01)时间点高于对照组对应时间点(图 3B) 差异有统计学意义(P<0.05)。</li>

2.4 胶质瘤细胞源性外泌体内 miRNA 的鉴定



图1 胶质瘤细胞源性外泌体的鉴定

A: 电镜下外泌体形态(×50 000 红色箭头); B: 外泌体径粒分析; C: 外泌体标志性蛋白 CD63 和 CD9 表达量



图 2 荧光显微镜下 U251 细胞摄取外泌体情况 ×400 DAPI: U251 细胞核; PKH67: 外泌体; FITC-phalloidin: U251 细胞质; Merge: 合图





按"1.8 项下方法"选择的20个miRNAs RT-PCR 结 果显示: U251 细胞外泌体中 miR-l25b、miR-221、 miR-374a、miR-l38 和 miR-4712 等含量高于人星型 胶质细胞外泌体。其中 miR-l25b 倍数差异性最高 (图4),差异有统计学意义(*t* = 38.322 *P* < 0.01)。 2.5 外泌体通过 miR-l25b 调控胶质瘤细胞的增 殖凋亡 分别将 miR-NC、miR-125b mimics 或 miR-125b inhibitor 转染 U251 细胞后提取外泌体 ,RT-PCR 结果显示: miR-NC 组外泌体 miR-125b 水平高 于 miR-125b inhibitor 组(*t* = 2.533 ,*P* = 0.039),低 于 miR-125b mimics 组(*t* = 21.103 ,*P* < 0.01)(图 5A)。将提取的外泌体与 U251 细胞共培养 ,CCK-8 结果显示:在72h及96h时间点,miR-NC组细胞增 殖活性低于 miR-125b mimics 组(72h,t = 2.486,P = 0.038)(96h,t = 2.636,P = 0.030),高于 miR-125b inhibitor 组(72h,t = 2.938,P = 0.028)(96h,t = 2.815,P = 0.021)(图5B)。流式细胞术结果显 示 miR-NC 组细胞凋亡比例为(14.33 ± 3.06)%,高 于 miR-125b mimics 组(7.12 ± 1.27)%(*t* = 4.132, *P* = 0.003),低于 miR-125b inhibitor 组(32.75 ± 5.41)%,差异均有统计学意义(*t* = 6.198,*P* < 0.01)(图 5C)。





#### 3 讨论

研究<sup>[5-6]</sup>发现,外泌体是细胞外囊泡的常见类型,可作为蛋白质、RNAs和其他生物活性分子载体,参与胶质瘤细胞间的信号传导,进而改变受体细胞的增殖、凋亡等。Spinelli et al<sup>[7]</sup>发现人内皮细胞外泌体通过干扰胶质瘤干细胞的增殖及分化,促使胶质瘤干细胞保持多向分化能力及肿瘤特性。Hao et al<sup>[8]</sup>发现星型胶质瘤细胞外泌体通过抑制受体细胞 PTEN 蛋白,促进肿瘤细胞增殖,减少细胞自然状态下的凋亡比例。此外,Zhou et al<sup>[9]</sup>总结指出,巨噬细胞、星型细胞等,均可通过外泌体完成细胞间的信号传导,触发反馈循环通路。本研究中发现,将胶质瘤细胞外泌体与肿瘤细胞共培养后,可增加细胞增殖活性;流式细胞术发现,外泌体与U251 细胞共培养后,细胞晚期凋亡比例明显降低,提示外泌体可调控细胞增殖凋亡活性。

在胶质瘤细胞微环境中,外泌体 miRNAs 是多 种生理和病理条件下的细胞调节因子 通过激活和 (或)抑制不同的信号通路 在胶质瘤增殖周亡过程 中发挥重要作用<sup>[10]</sup>。如 Yue et al<sup>[11]</sup>提出 低氧条件 下胶质瘤细胞外泌体通过 miR-301a 靶向抑癌基因 转录延伸因子 A 样蛋白7 激活 Wnt/catenin 信号通 路,调控胶质母细胞瘤的增殖活性。Yang et al<sup>[12]</sup>发 现胶质瘤细胞外泌体可通过 miR-221,抑制受体细 胞发动蛋白(DNM3),促进细胞增殖。本研究对比 人星型胶质细胞外泌体与胶质瘤细胞外泌体发现, 多个 miRNAs 出现差异性表达,如 miR-125b、miR-221、miR-10a、miR-32 等,提示外泌体可根据细胞源 性不同,调整RNAs转录。但同时也发现,PCR结果 与以往文献报道存在差异性,推测其可能原因是: miRNAs 必须通过 RNA 结合蛋白 RBPs 运输到多囊 泡体 最终装载到外泌体并从质膜分泌<sup>[13]</sup>。在不同 细胞源性及微环境下,外泌体中Argonaute 2 蛋白的 缺失程度不同 或外泌体 miRNAs 降解程度不一 均 可导致 miRNAs 水平出现差异性变化<sup>[13]</sup>。

研究发现 ,miR-125b 在多个肿瘤细胞中表达含 量明显升高 ,其对应的靶基因众多 ,覆盖细胞增殖、 分化、迁移、凋亡、细胞周期和耐药等 ,但其作用存在 差异性。如 Zheng et al<sup>[14]</sup>发现急性淋巴细胞白血病 和低分化非小细胞肺癌中 ,miR-125b 作为肿瘤增殖 和细胞周期调控的抑制因子 ,通过调控 NF-<sub>K</sub>B 信号 通路发挥作用。而 Huang et al<sup>[15]</sup>在胶质瘤细胞中 发现 ,miR-125b 的上调可激活 Wnt 通路 ,同时促进 STAT3 和 NF-KB 信号通路活性。此外,神经氨酸酶 1、DRAM2、P53 和 P38 均是 miR-125b 的直接靶点, miR-125b 对下游靶基因的抑制程度直接影响细胞 增殖活性。在本研究中,外泌体内 miR-125b 含量较 高,明显高于其他 RNAs 将外泌体悬液与 miR-125b inhibitor 共同加入细胞共培养后,可逆转外泌体对 细胞增殖凋亡的影响,提示外泌体对胶质瘤细胞增 殖凋亡的调控作用,主要依赖 miR-125b。此外,本 研究中,miR-125b 促进胶质瘤细胞增殖,抑制凋亡, 推测 miR-125b 可能通过 P53 和 P38 蛋白发挥作用。

本研究的局限性在于仅在 U251 细胞株进行验证 在其他胶质瘤细胞株中的结果尚未证实;此外, 外泌体是否可通过长链非编码 RNA、mRNAs 或蛋白质等发挥作用仍需要进一步论证。

### 参考文献

- [1] 顾润环,朱尔春. 替莫唑胺联合放疗治疗恶性脑胶质瘤患者的 临床研究[J]. 中国临床药理学杂志 2020 36(10):1202-4.
- [2] Balachandran A A ,Larcher L M ,Chen S ,et al. Therapeutically significant MicroRNAs in primary and metastatic brain malignancies [J]. Cancers (Basel) 2020 ,12(9): 2534 – 63.
- [3] Ames H ,Halushka M K ,Rodriguez F J. miRNA regulation in gliomas: usual suspects in glial tumorigenesis and evolving clinical applications [J]. J Neuropathol Exp Neurol 2017 ,76(4):246-54.
- [4] Luo J W ,Wang X ,Yang Y ,et al. Role of micro-RNA (miRNA) in pathogenesis of glioblastoma [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci , 2015 ,19(9): 1630 – 9.
- [5] Kalluri R. The biology and function of exosomes in cancer [J]. J Clin Invest 2016, 126(4): 1208 - 23.
- [6] Tai Y L , Chen K C , Hsieh J T , et al. Exosomes in cancer development and clinical applications [J]. Cancer Sci , 2018 , 109 (8): 2364 - 74.
- [7] Spinelli C Montermini L Meehan B et al. Molecular subtypes and differentiation programmes of glioma stem cells as determinants of extracellular vesicle profiles and endothelial cell-stimulating activities [J]. J Extracell Vesicles 2018 7(1): 1490144 – 60.
- [8] Hao S C ,Ma H ,Niu Z F ,et al. hUC-MSCs secreted exosomes inhibit the glioma cell progression through PTENP1/miR-10a-5p/ PTEN pathway [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci ,2019 ,23 (22) : 10013 - 23.
- [9] Zhou J ,Li X ,Wu X , $\epsilon$ t al. Exosomes released from tumor-associated macrophages transfer miRNAs that induce a Treg/Th17 cell imbalance in epithelial ovarian cancer [J]. Cancer Immunol Res , 2018  $\beta$ (12):1578 – 92.
- [10] 徐 峰 胡珊珊 谢时帅 等. 胶质瘤干细胞分泌的外泌体对缺 氧/复氧损伤的血管内皮细胞的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2020 55(6):837-42.
- [11] Yue X ,Lan F ,Xia T. Hypoxic glioma cell-secreted exosomal miR-301a activates Wnt/β-catenin signaling and promotes radiation re-

sistance by targeting TCEAL7 [J]. Mol Ther 2019 27 (11): 1939 - 49.

- [12] Yang J K , Yang J P , Tong J , et al. Exosomal miR-221 targets DNM3 to induce tumor progression and temozolomide resistance in glioma
   [J]. J Neurooncol 2017 ,131(2):255 65.
- [13] Zhang J Li S Li L et al. Exosome and exosomal microRNA: trafficking sorting and function [J]. Genomics Proteomics Bioinformatics 2015 ,13(1):17-24.
- [14] Zheng Z ,Qu J Q ,Yi H M ,et al. MiR-125b regulates proliferation and apoptosis of nasopharyngeal carcinoma by targeting A20/NFkappaB signaling pathway [J]. Cell Death Dis 2017 &(6): e2855 -68.
- [15] Huang T ,Alvarez A A ,Pangeni R P ,et al. A regulatory circuit of miR-125b/miR-20b and Wnt signalling controls glioblastoma phenotypes through FZD6-modulated pathways [J]. Nat Commun , 2016 A(7):12885 - 902.

## Glioma cell exosomes effect cell proliferation and apoptosis through miR-125b

Liu Yanting Sun Zheng ,Wang Zhuangzhuang ,et al

(Dept of Neurosurgery The First College of Clinical Medical Science Yichang 443003)

Abstract Objective To explore the mechanism of exosomes derived from glioma cells on cell proliferation and apoptosis. *Methods* The U251 exosomes were extracted by high-speed centrifugation. The morphology of exosomes was analyzed by electron microscopy and nano particle size and the characteristic protein expression of exosomes was detected by Western blot. 30 µl of exosome suspension with concentration of 100 µg/ml (exosome group) or equal amount of medium without exosomes ( control group) was added to U251 cell culture medium and the double fluorescence staining method was used to verify whether exosomes could enter U251 cells. The changes of cell proliferation and apoptosis were detected by CCK-8 and flow cytometry. The miRNAs differentially expressed in U251 exosomes and human astroglial cells were screened by RT-PCR. Finally the U251 cells were transfected with miR-NC miR-125b mimicsor miR-125b inhibitor exosomes were extracted and added into cell culture medium and the proliferation and apoptosis of U251 cells were detected by CCK-8 and flow cytometry. **Results** The exosomes isolated from U251 cells were round or oval vesicular bodies with the diameter around 100 nm and rich in CD63 and CD9 proteins. After adding exosomes suspension in U251 cell culture medium exosomes could bepackaged by U251 cells. CCK-8 and flow cytometry showed that the proliferation activity of exosomes was higher than that of the control group and the apoptosis rate was lower. RT-PCR showed that the content of miRNA-125b in U251 cells exosomes was higher than that in human astrocytes exosomes. After transfection of U251 cells with miR-NC ,miR-125b mimicsor miR-125b inhibitor the exosomes of the three groups were extracted and added into U251 cell culture medium. The proliferative activity of miR-125b inhibitor group was lower than that of miR-NC group and the apoptosis rate was higher than that of miR-NC group. The cell proliferation activity of miR-125b mimics group was higher than that of miR-NC group and the apoptosis rate was lower than that of miR-NC group. The differences were statistically significant (P < 0.05). Conclusion By enriching miR -125b , exosomes derived from glioma cellscan promote the proliferation of glioma cells and inhibit cell apoptosis.

Key words exosomes; glioma; apoptosis; proliferation