

细胞外囊泡装载仑伐替尼对肝癌细胞株 HepG2 增殖、侵袭及凋亡的影响

孙建海, 晏菲, 魏武杰, 邓洁, 李黎, 马燕凌*

(江汉大学附属湖北省第三人民医院肿瘤科, 湖北 武汉 430000)

[摘要] 目的 探讨细胞外囊泡装载仑伐替尼对肝癌细胞株 HepG2 增殖、侵袭及凋亡的影响。方法 设肝癌细胞株 HepG2 组、细胞外囊泡组 (extracellular vesicles, EVs 混悬液 5 mL, 10^6 个/mL)、仑伐替尼组 (仑伐替尼 5 mL, 30 mg/L)、仑伐替尼载药囊泡组 (EVs 混悬液 5 mL, 10^6 个/mL + 仑伐替尼 5 mL, 30 mg/L), 以上各组细胞每孔设 6 个平行样, 培养 72 h。培养结束后, 测定细胞增殖、侵袭、迁移、凋亡水平, 应用 RT-PCR 法和蛋白印迹法测定各组细胞 miR-482、CYR61 表达水平。**结果** 与肝癌细胞株 HepG2 组比较, 细胞外囊泡组 OD 值、存活率、单克隆形成数目、穿膜数、迁移距离、凋亡率、miR-482、CYR61 mRNA 和蛋白水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与肝癌细胞株 HepG2 组和细胞外囊泡组比较, 仑伐替尼组、仑伐替尼载药囊泡组 OD 值、存活率、单克隆形成数目、穿膜数、迁移距离、CYR61 mRNA 和蛋白水平降低, 凋亡率、miR-482 升高 ($P < 0.05$)。与仑伐替尼组比较, 仑伐替尼载药囊泡组 OD 值、存活率、单克隆形成数目、穿膜数、迁移距离、CYR61 mRNA 和蛋白水平降低, 凋亡率、miR-482 升高 ($P < 0.05$)。**结论** 细胞外囊泡装载仑伐替尼后能明显增强仑伐替尼对肝癌细胞株 HepG2 的杀伤力, 增加其抑制增殖、侵袭与促凋亡作用; 其机制可能与细胞外囊泡装载仑伐替尼能促进肝癌细胞株 HepG2 高表达 miR-482, 低表达 CYR61 有关。

[关键词] 癌, 肝细胞; 细胞外囊泡; 仑伐替尼 doi:10.3969/j.issn.1007-3205.2024.06.011

[中图分类号] R730.261 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1007-3205(2024)06-0687-08

Effects of extracellular vesicles loaded with lenvatinib on the proliferation, invasion and apoptosis of hepatocellular carcinoma cell line HepG2

SUN Jian-hai, YAN Fei, WEI Wu-jie, DENG Jie, LI Li, MA Yan-ling*

(Department of Oncology, the Third People's Hospital of Hubei Province Affiliated to Jianghan University, Hubei Province, Wuhan 430000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of extracellular vesicle loaded with lenvatinib on the proliferation, invasion and apoptosis of hepatocellular carcinoma cell line HepG2. **Methods** Liver cancer cell line HepG2 group, extracellular vesicles group (EVs suspension 5 mL, 10^6 /mL), lenvatinib group (lenvatinib 5 mL, 30 mg/L), and lenvatinib-loaded vesicle group (EVs suspension 5 mL, 10^6 /mL + lenvatinib 5 mL, 30 mg/L). Six parallel samples were set up in each well of the above groups and cultured for 72 h. Cell proliferation, invasion, migration and apoptosis were measured after the end of culture. The expression levels of miR-482 and CYR61 in each group were detected by real-time PCR (RT-PCR) and Western blot. **Results** Compared with HepG2 group, the OD value, survival rate, the number of monoclonal clones formed, the number of transmembrane cells, the migration distance, the apoptosis rate, the

[收稿日期] 2023-04-14

[基金项目] 湖北省卫健委 2019 年科研项目 (WJ2019F184)

[作者简介] 孙建海 (1973-), 男, 江苏宜兴人, 江汉大学附属湖

北省第三人民医院主任医师, 医学硕士, 从事肿瘤疾病诊治研究。

* 通信作者。E-mail: zhongshan_doctor@163.com

mRNA and protein levels of miR-482 and CYR61 in the extracellular vesicle group had no significant changes ($P > 0.05$). Compared with the HepG2 group and the extracellular vesicle group, OD value, survival rate, number of monoclonal clones formed, number of transmembrane cells, migration distance, CYR61 mRNA and protein levels were decreased in the lenvatinib group and the lenvatinib-loaded vesicle group, while apoptosis rate and miR-482 were increased ($P < 0.05$). Compared with the lenvatinib group, the OD value, survival rate, the number of monoclonal clones formed, the number of transmembrane cells, the migration distance, CYR61 mRNA and protein levels were decreased in the lenvatinib-loaded vesicle group, while the apoptosis rate and miR-482 were increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Extracellular vesicles loaded with lenvatinib can significantly enhance the killing effect of chemotherapy lenvatinib on hepatocellular carcinoma cell line HepG2, and increase its inhibitory effect on proliferation, invasion and pro-apoptosis. The mechanism may be related to the increased expression of miR-482 and decreased expression of CYR61 in HepG2 cells loaded with lenvatinib in extracellular vesicles.

[Key words] carcinoma, hepatocellular; extracellular vesicles; lenvatinib

肝癌是全球第6大常见癌症,其中肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)占80%以上,其发病率不断上升,多数患者确诊时处于转移期,预后不佳^[1-2]。多靶点受体酪氨酸激酶抑制剂仑伐替尼是不可切除或晚期HCC的主要治疗药物之一^[3]。然而,只有不到1/3的HCC患者从仑伐替尼治疗中获益,大多数患者在给药6个月内表现出耐药性及其他不良反应^[4]。因此,确定新疗法以优化HCC患者的仑伐替尼治疗至关重要。细胞外囊泡(extracellular vesicles, EVs)是一种从细胞表面释放的膜结合囊泡,含有多种重要分子,如微小RNA(miRNA)^[5]。将仑伐替尼与HCC患者来源的EVs经特殊处理有机结合就形成了装载仑伐替尼的EVs,其具有靶向性、特异度高、不良反应小等特点^[6]。miRNA是一种内源性小分子非编码RNA,可作为基因表达的调节剂,与肿瘤发生有关。细胞外囊泡miRNA是细胞间通讯和癌症发生和发展的基本组成部分^[7]。既往研究^[8]显示miR-482在胃癌组织中下调,但miR-482在HCC细胞生物学事件中的作用尚不清楚。本研究拟探讨细胞外囊泡装载仑伐替尼对肝癌细胞株HepG2增殖、侵袭及凋亡及miR-482的影响,以期对HCC的治疗提供参考。

1 材料与方 法

1.1 试剂及仪器 Ribo TM EV分离试剂(广州RiboBio Co, Ltd, 中国广州, 批号为52158), 阳性标记蛋白 Alix (1/1 000, ab186429, Abcam Inc, Cambridge, MA, USA), CD9 (1/2 000, ab92726,

Abcam), 热休克蛋白 70 (HSP70, 1/1 000, ab181606, Abcam), 仑伐替尼(德国默克生物, 批号为5265953), RPMI-1640培养基(美国HyClone, 批号为596256), 10%胎牛血清(FBS, Thermo Fisher Scientific, Inc, 批号为202564), Cell Counting Kit-8 (CCK-8) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, 批号为3026515), AnnexinV-FITC、碘化丙啶(BioLegend, USA, 批号为N-32659、M-63259), 转孔板(8.0 μm 孔径;美国康宁公司, 批号为521696), Transwell室(Corning, 批号为F-632659), Matrigel Basement Membrane Matrix (BD Biosciences, 批号为526548), TRIzol试剂(Invitrogen; 批号为MJ-523659), TaqManmicroRNA逆转录试剂盒(Applied Biosystems; 批号为302658), ABScriptIIc DNA第一链合成试剂盒(Invitrogen; 批号为202658), TaqManmiRNA Assay Probes (Applied Biosystems, 批号为302659), SYBRPremixExTaq™ Real-TimePCRKit (Thermo Fisher Scientific, Inc, 批号为1639585), BCA蛋白质测定试剂盒(Beyotime Institute of Biotechnology, 批号为30215), 聚偏二氟乙烯膜(Millipore, Billerica, 批号为526958), 抗甘油醛3-磷酸脱氢酶一抗(GAPDH, Sigma, 批号为632589), CYR61 (Becton, Dickinson and Company, 批号为847458)。

Nanosight NS300系统(Malvern analytical Co, Worcestershire), FACScan流式细胞仪(BDBiosciences, USA), EclipseTi-U倒置显微镜(日本奥林巴斯), NanoDrop紫外分光光度计

(Thermo Scientific, Waltham, USA), Applied Biosystems 7500 序列检测器(Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Inc)。

1.2 细胞外囊泡的分离 根据 Ribo TM EV 分离试剂提供的说明书提取肝癌细胞株 HepG2 的 EVs, 并立即鉴定或储存在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。然后通过添加

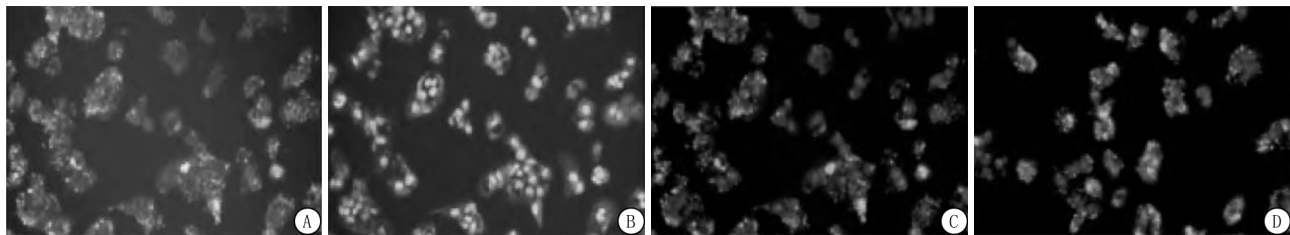


图1 电子显微镜下观察 EVs 的大小和形状

A. 肝癌细胞株 HepG2 组; B. 细胞外囊泡组; C. 仑伐替尼组; D. 仑伐替尼载药囊泡组

Figure 1 The size and shape of EVs observed under the electron microscope

1.3 细胞复苏培养及其分组设计 肝癌细胞株 HepG2 细胞购自中国科学院细胞库典型培养物保藏中心。细胞在 RPMI-1640 培养基中培养。所有培养基都添加了 10% 的胎牛血清, 并在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下放入含有 5% CO_2 的加湿培养箱中培养。

肝癌细胞株 HepG2 组、细胞外囊泡组、仑伐替尼组、仑伐替尼载药囊泡组培养方法: 肝癌细胞株 HepG2 组的培养方法如前所述; 细胞外囊泡组加入 EVs 混悬液 5 mL (10^6 个/ mL); 仑伐替尼组加入仑伐替尼 5 mL (30 mg/L , 预实验求出仑伐替尼对肝癌细胞株 HepG2 的 LD_{50} 为 60 mg/L , 以 $1/2\text{ LD}_{50}$ 为作用剂量); 仑伐替尼载药囊泡组加入载药囊泡混悬液 5 mL , 载药囊泡混悬液的制备方法如下: 取仑伐替尼 $30\text{ }\mu\text{g}$, 溶于 1 mL EVs 混悬液中, 在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中孵育 1 h , $9\text{ }168\text{ r/min}$ 离心 10 min , 经 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 过滤器过滤; $30\text{ }900\text{ r/min}$ 离心 70 min , 将沉淀溶于 PBS, 即得载药囊泡混悬液。以上各组细胞每孔设 6 个平行样, 培养 72 h 。

1.4 肝癌细胞株 HepG2 活力的 MTT 法检测及癌细胞单克隆形成数目检测 将培养结束的细胞以每孔 4×10^3 个细胞的密度接种到 96 孔板中并孵育 72 h 。根据制造商的说明, 将每个孔中的细胞与 $10\text{ }\mu\text{L}$ CCK-8 溶液一起孵育, 在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下再孵育 2 h 后, 使用酶标仪在 450 nm 波长下测量每个时间点的吸光度。所有实验在生物学上重复 3 次。并计算平均值作为最终结果。测量每个孔的光密度 (optical density, OD)。细胞存活率 = (实验组 OD - 空白组 OD) / (肝癌细胞株 HepG2 组 OD - 空白组 OD)。

将培养结束的各组肝癌细胞株 HepG2 用

磷酸盐缓冲盐水将 $30\text{ }\mu\text{L}$ 的 EVs 悬浮液稀释至 10^6 个/ mL , 并使用 Nanosight NS300 系统测量粒径和粒径分布。将 $10\text{ }\mu\text{L}$ 的 EVs 悬浮液滴在纸上, 并添加 $10\text{ }\mu\text{L}$ 悬浮液以覆盖铜网。室温孵育 2 min 后, 用滤纸吸去多余液体, 加入 1% 醋酸铀染料 30 s , 透射电子显微镜观察 EVs 的大小和形状。见表 1。

0.25% 胰蛋白酶消化成单细胞, 并以 4×10^5 个细胞/孔的密度接种到 6 孔培养板中, 24 h 后, 将 50 个细胞接种于 6 孔组织培养板中, 继续培养 2 周。然后将细胞用结晶紫-福尔马林溶液染色 10 min 并计数。

1.5 肝癌细胞株 HepG2 凋亡测定 培养结束 72 h 后, 收获细胞, 用冰冷的 PBS 洗涤 2 次, 并在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下用 70% 乙醇固定 1 h 。细胞与 $50\text{ }\mu\text{L}$ RNase1 在室温下孵育 10 min 以降解 RNA。将细胞在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下以 157 g 离心 5 min , 然后加入 $5\text{ }\mu\text{L}$ AnnexinV-FITC、 $5\text{ }\mu\text{L}$ 碘化丙啶在室温下暗处双染色 30 min 。使用 FACScan 流式细胞仪评估细胞凋亡状态。

1.6 肝癌细胞株 HepG2 侵袭、迁移水平测定 在 24 孔、 6.5 mm 内径的转孔板中检测细胞侵袭。血清饥饿细胞 (2×10^5 个细胞/ mL) 置于上室, 下室充满含 10% FBS 的培养基, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 孵育 24 h 后, 用干净的棉签擦拭去除过滤器上表面的细胞; 滤膜下侧的侵袭细胞用甲醇固定, 并用 0.5% 结晶紫染色。然后在直立显微镜下观察和计数侵袭的细胞 (每个室五个视野)。

对于迁移水平的测定, 细胞迁移测定如上进行, 除了使用预涂有 Matrigel (在培养基中 1:4 稀释; BD Biosciences) 的 $8\text{ }\mu\text{m}$ 孔径插入物的 transwell 过滤器, 将 2×10^5 个细胞一式两份地接种到置于组织培养皿中的两个腔室培养插入物的每一侧, 并使其黏附 24 h 直至完全融合。使用无菌镊子移除插入物以产生均匀的 $500\text{ }\mu\text{m}$ 无细胞间隙。用 PBS 仔细清洗细胞以去除任何漂浮细胞, 并使用安装在其上的 Nikon HDMI-0a 1080P 相机在间隙后 18 h 拍照, 计算迁移距离。

1.7 肝癌细胞株 HepG2 miR-482、CYR61 mRNA 表达水平测定 使用 TRIzol 试剂从细胞系中提取总 RNA,并使用 TaqManmicroRNA 逆转录试剂盒或使用 ABScriptIIcDNA 第一链合成试剂盒在 37 °C 下 60 min 或 98 °C 下合成 10 min 合成 cDNA。使用 TaqManmiRNAAssayProbes 或 SYBRPremixExTaq Real-TimePCRKit 在 AppliedBiosystems7500 序列检测器上进行定量实时 PCR,引物序列: miR-482, 正向, 5'-TCGCGTAGCTAGCTAGTCGATCGAGGCTAGCTAGTCGTCA-3' 和反向, 5'-TGGGCTAGGGCGCGATGCTAGCTAGTCGTA-3'; U6, 正向, 5'-TGGGGCTAGTGATGCGGCGTAGTCC-3' 和反向, 5'-TGGGGTCGATGCTGATCGATGCTAGCTAGTC-3'; CYR61, 正向, 5'-TGGGCTGATCGATGCTAGTGCTAGTCGCA-3' 和反向, 5'-TGGTTCGCTAGCTGATCGTAGCTAGTCGA-3'; GAPDH, 正向, 5'-TGGGGCGTCGCTAGCTAGCTGATGCA-3' 和反向, 5'-TGGGTCGCTAGCTAGTCGATCGATGCTAGTCC-3'。miR-482 和 CYR61 的相对表达分别归一化为 U6 和 GAPDH 蛋白,并使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算。所有实验重复 3 次。

1.8 肝癌细胞株 HepG2 CYR61 蛋白表达水平测定 使用洗涤剂缓冲液制备细胞裂解物。根据制造商的手册使用 BCA 蛋白质测定法测量蛋白质浓度。通过 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离等量 (80 μg) 的蛋白质,并将其转移至聚偏二氟乙烯膜。然后将膜在 4 °C 下用 1:1 000 稀释的抗甘油醛 3-磷酸脱氢酶和 CYR61。用 1:1 000 稀释的抗免疫球蛋白辣根过氧化物酶连接抗体再孵育 1 h 后,通过增强型化学发光检测系统捕获印记信号。

1.9 统计学方法 应用 SPSS 26.0 统计软件分析数据。计量资料比较采用单因素方差分析和 LSD-*t* 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组肝癌细胞株 HepG2 OD 值、存活率的比较 细胞外囊泡组与肝癌细胞株 HepG2 组 OD 值、存活率比较差异无统计学意义 (P > 0.05); 与肝癌细胞株 HepG2 组和细胞外囊泡组比较, 仑伐替尼组、仑伐替尼载药囊泡组 OD 值、存活率降低; 与仑

伐替尼组比较, 仑伐替尼载药囊泡组 OD 值、存活率降低, 差异有统计学意义 (P < 0.05)。见表 1。

2.2 各组肝癌细胞株 HepG2 单克隆形成数目的比较 细胞外囊泡组与肝癌细胞株 HepG2 组单克隆形成数目比较差异无统计学意义 (P > 0.05); 与肝癌细胞株 HepG2 组和细胞外囊泡组比较, 仑伐替尼组、仑伐替尼载药囊泡组单克隆形成数目降低, 差异有统计学意义 (P < 0.05), 与仑伐替尼组比较, 仑伐替尼载药囊泡组单克隆形成数目降低, 差异有统计学意义 (P < 0.05)。见表 2, 图 2。

表 1 各组肝癌细胞株 HepG2 OD 值、存活率比较

Table 1 Comparison of OD value and survival rate of liver cancer cell line HepG2 in each group

(n = 6, $\bar{x} \pm s$)

组别	OD 值	存活率 (%)
肝癌细胞株 HepG2 组	0.85 ± 0.09	78.99 ± 9.78
细胞外囊泡组	0.83 ± 0.10	76.54 ± 9.38
仑伐替尼组	0.59 ± 0.07 *	52.32 ± 6.24 *
仑伐替尼载药囊泡组	0.29 ± 0.04 * #	36.02 ± 5.05 * #
F 值	66.731	40.783
P 值	< 0.001	< 0.001

* P 值 < 0.05 与肝癌细胞株 HepG2 组比较 # P 值 < 0.05 与仑伐替尼组比较 (LSD-*t* 检验)

表 2 各组肝癌细胞株 HepG2 克隆形成数目比较

Table 2 Comparison of the number of clones of liver cancer cell line HepG2 in each group

(n = 6, $\bar{x} \pm s$)

组别	单克隆形成数目
肝癌细胞株 HepG2 组	619.74 ± 99.25
细胞外囊泡组	614.58 ± 95.58
仑伐替尼组	439.58 ± 55.58 *
仑伐替尼载药囊泡组	162.24 ± 22.58 * #
F 值	49.054
P 值	< 0.001

* P 值 < 0.05 与肝癌细胞株 HepG2 组比较 # P 值 < 0.05 与仑伐替尼组比较 (LSD-*t* 检验)

2.3 各组肝癌细胞株 HepG2 凋亡率、侵袭能力比较 细胞外囊泡组与肝癌细胞株 HepG2 组凋亡率、穿膜数比较差异无统计学意义 (P > 0.05); 与肝癌细胞株 HepG2 组和细胞外囊泡组比较, 仑伐替尼组、仑伐替尼载药囊泡组凋亡率升高、穿膜数降低, 差异有统计学意义 (P < 0.05); 与仑伐替尼组比较, 仑伐替尼载药囊泡组凋亡率升高、穿膜数降低, 差异有统计学意义 (P < 0.05)。见表 3, 图 3。

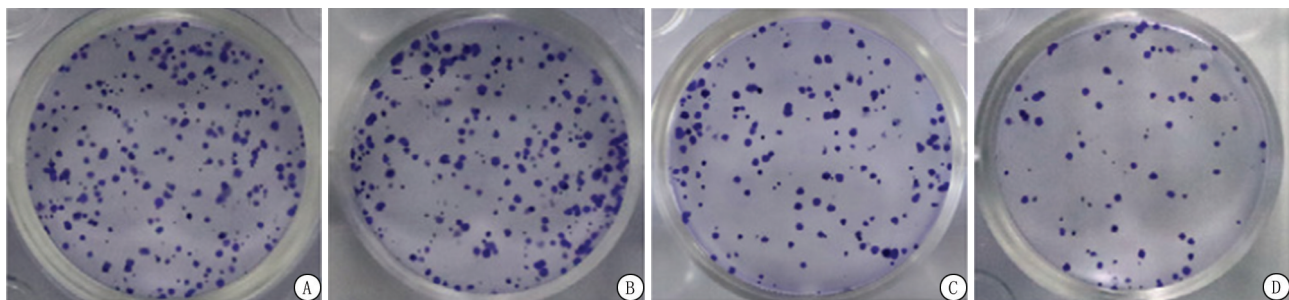


图2 各组肝癌细胞株 HepG2 克隆形成数目比较

A.肝癌细胞株 HepG2 组;B.细胞外囊泡组;C.仑伐替尼组;D.仑伐替尼载药囊泡组

Figure 2 Comparison of the number of liver cancer cell line HepG2 in each group

表3 各组肝癌细胞株 HepG2 凋亡率、穿膜数比较

Table 3 Comparison of apoptosis rate of liver cancer cell

line HepG2 and the number penetrating the membrane in each group

 $(n=6, \bar{x} \pm s)$

组别	凋亡率(%)	穿膜数(个)
肝癌细胞株 HepG2 组	2.10±0.02	2 693.85±484.85
细胞外囊泡组	2.12±0.03	2 702.28±411.25
仑伐替尼组	3.70±0.35 *	1 293.85±205.25 *
仑伐替尼载药囊泡组	6.50±0.51 * #	417.34±85.95 * #
F 值	267.992	66.633
P 值	<0.001	<0.001

* P 值<0.05 与肝癌细胞株 HepG2 组比较 # P 值<0.05 与仑伐替尼组比较(LSD-t 检验)

2.4 各组肝癌细胞株 HepG2 迁移能力比较 细胞外囊泡组与肝癌细胞株 HepG2 组迁移距离比较差异无统计学意义($P>0.05$)。与肝癌细胞株 HepG2 组和细胞外囊泡组比较,仑伐替尼组、仑伐

替尼载药囊泡组迁移距离增加,差异有统计学意义($P<0.05$);与仑伐替尼组比较,仑伐替尼载药囊泡组迁移距离增加,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表4,图4。

表4 各组肝癌细胞株 HepG2 迁移距离比较

Table 4 Comparison of migration distance of liver cancer cell line HepG2 in each group

 $(n=6, \bar{x} \pm s, \mu\text{m})$

组别	迁移距离
肝癌细胞株 HepG2 组	28.63±5.25
细胞外囊泡组	29.63±5.27
仑伐替尼组	45.85±2.88 *
仑伐替尼载药囊泡组	99.36±1.28 * #
F 值	407.210
P 值	<0.001

* P 值<0.05 与肝癌细胞株 HepG2 组比较 # P 值<0.05 与仑伐替尼组比较(LSD-t 检验)

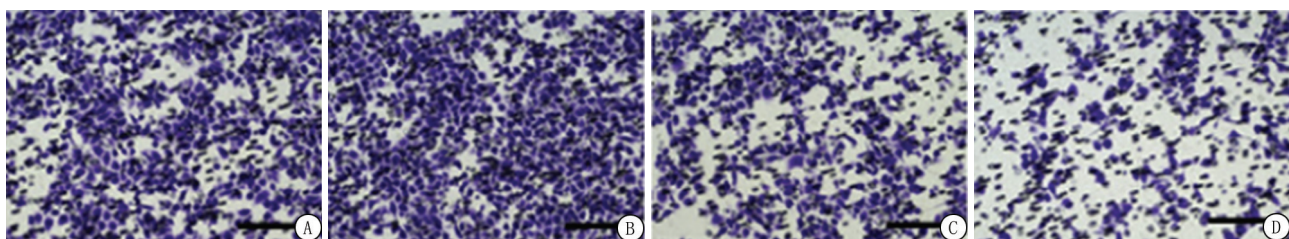


图3 各组肝癌细胞株 HepG2 穿膜数数目比较

A.肝癌细胞株 HepG2 组;B.细胞外囊泡组;C.仑伐替尼组;D.仑伐替尼载药囊泡组

Figure 3 Comparison of the number of liver cancer cell line HepG2 penetrating the membrane in each group

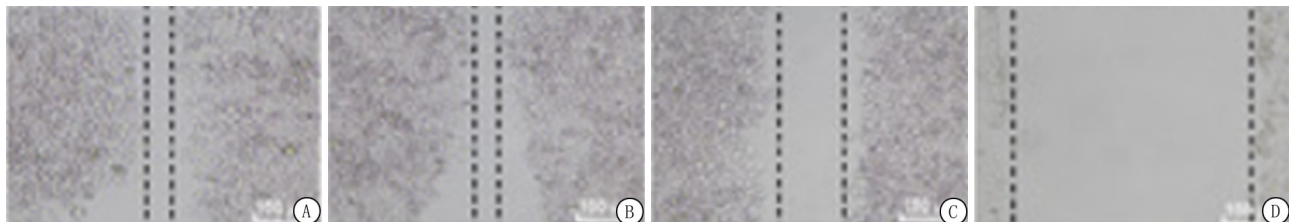


图4 各组肝癌细胞株 HepG2 迁移距离比较

A.肝癌细胞株 HepG2 组;B.细胞外囊泡组;C.仑伐替尼组;D.仑伐替尼载药囊泡组

Figure 4 Comparison of migration distance of liver cancer cell line HepG2 in each group

2.5 各组肝癌细胞株 HepG2 miR-482、CYR61 mRNA 表达水平比较 细胞外囊泡组与肝癌细胞

株 HepG2 组 miR-482 比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与肝癌细胞株 HepG2 组和细胞外囊泡组比较, 仑伐替尼组、仑伐替尼载药囊泡组 miR-482 升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与仑伐替尼组比较, 仑伐替尼载药囊泡组 miR-482 升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。细胞外囊泡组与肝癌细胞株 HepG2 组 CYR61 mRNA 和蛋白水平比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 与肝癌细胞株 HepG2 组和细胞外囊泡组比较, 仑伐替尼组、仑伐替尼载药囊泡组 CYR61 mRNA 和蛋白水平降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与仑伐替尼组比较, 仑伐替尼载药囊泡组 CYR61 mRNA 和蛋白水平降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 5, 图 5、6。

表 5 各组肝癌细胞株 HepG2 miR-482、CYR61 表达水平比较

Table 5 Comparison of miR-482 and CYR61 expression levels of liver cancer cell line HepG2 in each group ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

组别	miR-482	CYR61mRNA	CYR61 蛋白 (GAPDH)
肝癌细胞株 HepG2 组	1.17 ± 0.23	3.85 ± 0.65	3.95 ± 0.79
细胞外囊泡组	1.15 ± 0.26	3.90 ± 0.63	3.89 ± 0.78
仑伐替尼组	3.68 ± 0.57 *	2.54 ± 0.44 *	2.34 ± 0.47 *
仑伐替尼载药囊泡组	5.42 ± 0.98 * #	1.63 ± 0.28 * #	1.44 ± 0.21 * #
F 值	74.012	26.531	24.196
P 值	<0.001	<0.001	<0.001

* P 值 < 0.05 与肝癌细胞株 HepG2 组比较 # P 值 < 0.05 与仑伐替尼组比较 (LSD-*t* 检验)

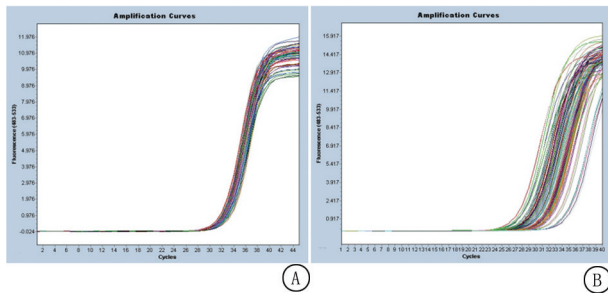


图 5 miR-482、CYR61 的扩增图

A. miR-482 的扩增图; B. CYR61 的扩增图

Figure 5 Amplification maps of miR-482 and CYR61

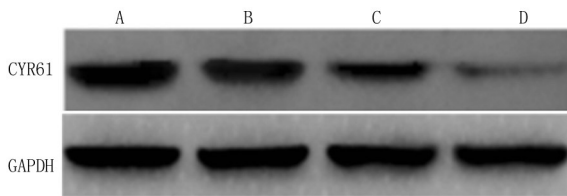


图 6 各组肝癌细胞株 HepG2 CYR61 蛋白比较

A. 肝癌细胞株 HepG2 组; B. 细胞外囊泡组; C. 仑伐替尼组; D. 仑伐替尼载药囊泡组

Figure 6 Comparison of CYR61 protein of liver cancer cell line HepG2 in each group

3 讨 论

EV 可以作为一种介质, 从肿瘤细胞转移重要因子, 对 HCC 期间的肿瘤发生和转移具有重要调控作用。载药囊泡是以癌细胞来源的 EVs 作为化疗药物载体, 携带化疗药物, 可将药物输入癌细胞内, 具有极强的癌细胞亲和力及较好的靶向性^[9]。仑伐替尼是一种多靶点酪氨酸激酶抑制剂, 靶向成纤维细胞生长因子受体 (fibroblast growth factor receptor, FGFR) 1-4、血小板衍生生长因子受体 (platelet-derived growth factor receptors, PDGFR)- β 、Ret、血管内皮生长因子受体 (vascular endothelial growth factor, VEGFR) 1-3 和 Kit, 用于治疗癌症患者。已证明^[10] 仑伐替尼调控 PDGFR- β 、Ret、FGFR1-4、VEGF 和 Kit 介导血管生成靶向与 NSCLC 的进展和肿瘤转移相关的分子。此外, 已经在临床和临床前实验中评估了仑伐替尼针对各种人类肿瘤的抗肿瘤活性, 并确认了疗效。仑伐替尼还通过靶向转移性肾细胞癌中的 PDGFR- β 、Ret、VEGFR1-3、FGFR1-4 和 Kit 通路证明了临床益处^[11-12]。先前的一项研究^[13] 表明, 仑伐替尼给药可延长 NSCLC 患者的总生存期。体外研究在临床前模型中评估了仑伐替尼的抗癌效果^[14]。仑伐替尼降低 KIF5B-RET、CCDC6-RET 和 NcoA4-RET 的自身磷酸化, 抑制 CCDC6-RET 人甲状腺和肺癌细胞系的增殖, 并阻断 RET 基因融合转化的 NIH3T3 细胞的致瘤性^[15]。仑伐替尼在 5 种甲状腺癌和 5 种未分化甲状腺癌异种移植物中表现出抗血管生成活性, 而其抗增殖活性仅在 2/11 甲状腺癌细胞系 (即 RO82-W-1 和 TT 细胞) 中显出体外。仑伐替尼还能够抑制具有激活突变 C634W 的 TT 细胞中的 RET 磷酸化。本研究结果显示, 与肝癌细胞株 HepG2 组比较, 细胞外囊泡组 OD 值、存活率、单克隆形成数目、穿膜数、迁移距离、凋亡率比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 与肝癌细胞株 HepG2 组、细胞外囊泡组比较, 仑伐替尼组、仑伐替尼载药囊泡组 OD 值、存活率、单克隆形成数目、穿膜数、迁移距离降低, 凋亡率升高 ($P < 0.05$), 与仑伐替尼组比较, 仑伐替尼载药囊泡组 OD 值、存活率、单克隆形成数目、穿膜数、迁移距离降低, 凋亡率升高 ($P < 0.05$); 说明仑伐替尼能明显抑制肝癌细胞株 HepG2 增殖、侵袭诱导其凋亡; 而细胞外囊泡装载仑伐替尼后能明显增强仑伐替尼对肝癌细胞株 HepG2 的杀伤力, 增加其增殖、侵袭抑制水平。

EVs 中 miR 表达失调与 HCC 进展相关。例如,细胞外囊泡 miR-335 可作为 HCC 的一种新型治疗策略。通过数据库分析,本研究显示,miR-482 在 HCC 组织中异常表达。而临床研究^[16]结果表明,与健康志愿者相比,HCC 患者血浆 EVs 中的 miR-482 表达更低。EVs 介导的 miR 从根本上可以作为多种肝病(尤其是 HCC)的新诊断生物标志物和治疗靶点。此外,血浆 EVs 中 miR-482 的表达与 HCC 患者的临床分期相关,对 HCC 患者的诊断具有一定的临床意义。体外研究^[17]将 miR-482 抑制剂转移到 HepG2 和 SMMC7721 细胞中。miR-482 的上调可显著抑制 HCC 细胞的增殖、侵袭、迁移和 EMT^[18]。EMT 是 HCC 侵袭和转移的重要步骤,通过 miR 调节抑制 EMT 可能是治疗 HCC 的潜在策略。而 miR-482 介导的 Zeb1 (EMT 相关转录因子)上调是阿霉素耐药 HCC 细胞侵袭性表型的驱动因素。miR-482 的上调可以抑制 HCC 细胞的恶性行为。本研究显示,与肝癌细胞株 HepG2 组比较,细胞外囊泡组 miR-482 差异无统计学意义($P > 0.05$)。与肝癌细胞株 HepG2 组、细胞外囊泡组比较,仑伐替尼组、仑伐替尼载药囊泡组 miR-482 升高($P < 0.05$),与仑伐替尼组比较,仑伐替尼载药囊泡组 miR-482 升高($P < 0.05$);说明 VEs 装载仑伐替尼能促进肝癌细胞株 HepG2 高表达 miR-482,进而抑制肝癌细胞恶性生物学行为。

CYR61 是 miR-482 的下游调控因子,也是 CYR61/结缔组织生长因子/肾母细胞瘤过表达蛋白家族的成员,在细胞黏附、迁移、有丝分裂、分化、侵袭和血管生成以及癌细胞的转移中被介导。CYR61 可能作为致癌基因发挥重要作用,通过向肿瘤细胞提供氧气和营养物质抑制血管生成^[19]。之前的一项研究报告^[20]称,CYR61 在 EMT 过程中调节迁移并抑制各种癌细胞凋亡。此外,CYR61 在三阴性乳腺癌细胞中介导 Src 信号传导,并在前列腺癌中受磷酸肌醇 3-激酶/AKT 信号传导调节。TGF- β 1 已被证明可上调 CYR61 表达,从而导致结肠癌细胞和骨肉瘤细胞迁移侵袭。在当前的研究中,与正常肺细胞中 CYR61 在 EMT 过程中不可或缺,此外,地塞米松抑制 TGF- β 1 诱导的 CYR61 表达并调节 N-钙黏蛋白、纤连蛋白、波形蛋白和 E-钙黏蛋白的表达。本研究中,与肝癌细胞株 HepG2 组比较,细胞外囊泡组 CYR61 mRNA 和蛋白无明显改变($P > 0.05$)。与肝癌细胞株 HepG2 组、细胞外囊泡组比较,仑伐替尼组、仑伐替尼载药囊泡组

CYR61 mRNA 和蛋白降低($P < 0.05$),与仑伐替尼组比较,仑伐替尼载药囊泡组 CYR61 mRNA 和蛋白降低($P < 0.05$);说明 VEs 装载仑伐替尼能促进肝癌细胞株 HepG2 低表达 CYR61,进而抑制肝癌细胞恶性生物学行为。

综上所述,VEs 装载仑伐替尼后,能明显增强仑伐替尼对肝癌细胞株 HepG2 的杀伤力,增加其增殖、侵袭抑制水平与凋亡水平;其机制可能与 VEs 装载仑伐替尼能促进肝癌细胞株 HepG2 高表达 miR-482,低表达 CYR61 有关。

[参考文献]

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209–249.
- [2] Lazzaro A, Hartshorn KL. A comprehensive narrative review on the history, current landscape, and future directions of hepatocellular carcinoma (HCC) systemic therapy [J]. Cancers (Basel), 2023, 15(9): 2506.
- [3] Jin H, Shi Y, Lv Y, et al. EGFR activation limits the response of liver cancer to lenvatinib [J]. Nature, 2021, 595 (7869): 730–734.
- [4] Yamashige D, Kawamura Y, Kobayashi M, et al. Potential and clinical significance of 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography/computed tomography for evaluating liver cancer response to lenvatinib treatment [J]. Oncology, 2021, 99(3): 169–176.
- [5] Von Felden J, Garcia-Lezana T, Dogra N, et al. Unannotated small RNA clusters associated with circulating extracellular vesicles detect early stage liver cancer [J]. Gut, 2022, 71(10): 2069–2080.
- [6] Kostallari E, Valainathan S, Biquard L, et al. Role of extracellular vesicles in liver diseases and their therapeutic potential [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2021, 175: 113816.
- [7] Nukala SB, Jousma J, Cho Y, et al. Long non-coding RNAs and microRNAs as crucial regulators in cardio-oncology [J]. Cell Biosci, 2022, 12(1): 1–28.
- [8] Pan L, Shi Y, Zhang J, et al. Association between single nucleotide polymorphisms of mirnas and gastric cancer: a scoping review [J]. Genet Test Mol Biomarkers, 2022, 26(10): 459–467.
- [9] Pan Y, Liu Y, Wei W, et al. Extracellular vesicles as delivery shippers for noncoding rna-based modulation of angiogenesis: insights from ischemic stroke and cancer [J]. Small, 2023, 19(17): e2205739.
- [10] Tarasov VV, Svistunov AA, Chubarev VN, et al. Extracellular vesicles in cancer nanomedicine [J]. Semin Cancer Biol, 2021, 69: 212–225.
- [11] Fleeman N, Houten R, Bagust A, et al. Lenvatinib and

- sorafenib for differentiated thyroid cancer after radioactive iodine: a systematic review and economic evaluation [J]. *Health Technol Assess*, 2020, 24(2): 1–180.
- [12] Mo DC, Luo PH, Huang SX, et al. Safety and efficacy of pembrolizumab plus lenvatinib versus pembrolizumab and lenvatinib monotherapies in cancers: A systematic review[J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 91: 107281.
- [13] Taylor MH, Lee CH, Makker V, et al. Phase IB/II trial of lenvatinib plus pembrolizumab in patients with advanced renal cell carcinoma, endometrial cancer, and other selected advanced solid tumors[J]. *J Clin Oncol*, 2020, 38(11): 1154–1163.
- [14] Wirth LJ, Brose MS, Sherman EJ, et al. Open-label, single-arm, multicenter, phase II trial of lenvatinib for the treatment of patients with anaplastic thyroid cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2021, 39(21): 2359–2366.
- [15] Giani C, Valerio L, Bongiovanni A, et al. Safety and quality-of-life data from an Italian expanded access program of lenvatinib for treatment of thyroid cancer[J]. *Thyroid*, 2021, 31(2): 224–232.
- [16] Bautista-Sánchez D, Arriaga-Canon C, Pedroza-Torres A, et al. The promising role of miR-21 as a cancer biomarker and its importance in RNA-based therapeutics [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2020, 20: 409–420.
- [17] Shang A, Gu C, Wang W, et al. Exosomal circPACRGL promotes progression of colorectal cancer via the miR-142-3p/miR-506-3p-TGF- β 1 axis[J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 117.
- [18] Gan X, Zhu H, Jiang X, et al. CircMUC16 promotes autophagy of epithelial ovarian cancer via interaction with ATG13 and miR-199a[J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 45.
- [19] Jiang M, Zhang W, Zhang R, et al. Cancer exosome-derived miR-9 and miR-181a promote the development of early-stage MDSCs via interfering with SOCS3 and PIAS3 respectively in breast cancer[J]. *Oncogene*, 2020, 39(24): 4681–4694.
- [20] Hsu PC, Li JM, Yang CT. Forced overexpression of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) activates yes-associated protein (YAP) expression and increases the invasion and proliferation abilities of small cell lung cancer (SCLC) cells[J]. *Biomedicines*, 2022, 10(7): 1704.

(本文编辑:何祯)