

· 论著 ·

微小RNA200a/141-信号转导和转录激活因子4轴在口腔鳞状细胞癌进展中的作用研究

姚曼曼 仇永乐 刘铁军 路月亭 路华林 尚宏悦 董博

河北医科大学第四医院口腔科 石家庄 050000

[摘要] 目的 基于公共数据库探索微小RNA (miRNA) 200a/141、信号转导和转录激活因子4 (STAT4) 在口腔鳞状细胞癌 (OSCC) 中的表达及临床意义并构建预后模型, 探讨其作为潜在治疗靶点的可行性。通过体外实验验证仿生明胶外泌体颗粒递送 miRNA200a/141 进而调节 STAT4, 评估在 OSCC 的细胞和分子水平上的核酸保护能力及抗癌作用。方法 通过癌症基因组图谱数据库下载 OSCC 相关 miRNA 及信使 RNA 表达测序数据, 使用 R 语言进行数据分析, 评估 miRNA200a/141 与 STAT4 的表达水平和临床相关性。制备负载 miRNA200a/141 的仿生明胶外泌体纳米颗粒 (GNP-EXO-miRNA200a/141), 进行 Transwell 迁移、细胞划痕和四甲基偶氮唑蓝实验, 评估纳米颗粒对 SCC25 细胞的作用, 并通过定量聚合酶链式反应和蛋白质免疫印迹法检测其对 SCC25 细胞中 STAT4 表达的影响。结果 miRNA200a/141 在 OSCC 组织中的表达水平显著降低, 而其靶标 STAT4 的表达水平升高, 两者呈负相关。制备的 GNP-EXO-miRNA200a/141 纳米颗粒具有良好的粒径分布和稳定性。在细胞实验中, GNP-EXO-miRNA200a/141 显著抑制了 SCC25 细胞的增殖和迁移, 并显著下调了 STAT4 的表达。结论 miRNA200a/141 通过调节 STAT4 在 OSCC 中发挥重要作用, 其有望成为 OSCC 的诊断、治疗和预后的潜在的分子标志物和治疗靶点。

[关键词] 口腔鳞状细胞癌; 微小RNA 200a/141; 信号转导和转录激活因子4; 外泌体; 明胶纳米颗粒

[中图分类号] R782 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.7518/gjkq.2025062



开放科学 (资源服务)
标识码 (OSID)

Role of mircoRNA200a/141-signal transduction and transcriptional activator 4 axis in the progression of oral squamous cell carcinoma

Yao Manman, Qiu Yongle, Liu Tiejun, Lu Yueting, Lu Hualin, Shang Hongyue, Dong Bo

Dept. of Stomatology, the Fourth Hospital, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China

Supported by: Project of the Hebei Provincial Administration of Traditional Chinese Medicine (2024050); Hebei Provincial Natural Science Foundation General Project (H2024206476); Central Government Guides Local Funds Supported by S&T Program of Hebei (246Z7762G)

Correspondence: Qiu Yongle, Email: qiuyongle@163.com

[Abstract] **Objective** This study aimed to explore the expression and clinical significance of mircoRNA (miRNA) 200a/141 and signal transducer and activator of transcription 4 (STAT4) in oral squamous cell carcinoma (OSCC) and con-

struct a prognostic model to explore its feasibility as a potential therapeutic target. *In vitro* experiments verified that bionic gelatin exosome particles delivered miRNA200a/141 to regulate STAT4. This study also aimed to evaluate the protective capacity and anticancer effects of nucleic acids at the cellular and molecular levels of OSCC. **Methods** OSCC-related miRNA-sequencing and messenger RNA-sequencing data were downloaded

[收稿日期] 2024-06-10; **[修回日期]** 2025-01-08

[基金项目] 河北省中医药管理局项目 (2024050); 河北省自然科学基金面上项目 (H2024206476); 中央引导地方科技发展资金项目 (246Z7762G)

[作者简介] 姚曼曼, 主治医师, 硕士, Email: 49103567@hebm.u.edu.cn

[通信作者] 仇永乐, 副主任医师, 博士, Email: qiuyongle@163.com

from The Cancer Genome Atlas database. Data analysis was performed using R language to assess the expression levels and clinical correlation of miRNA200a/141 with STAT4. Biomimetic gelatin exosome nanoparticles (GNP-EXO-miRNA200a/141) loaded with miRNA were prepared, and Transwell migration assay, cell scratch assay, and methyl thiazolyl tetrazolium assay were performed to evaluate the effect of nanoparticles on SCC25 cells. The effects of the nanoparticles on STAT4 expression in SCC25 cells were examined using quantitative polymerase chain reaction and Western blot.

Results The expression of miRNA200a/141 was significantly reduced in OSCC tissues, whereas that of its target STAT4 increased, which was inversely correlated. The prepared GNP-EXO-miRNA200a/141 nanoparticles showed good size distribution and stability. In cell experiments, GNP-EXO-miRNA200a/141 significantly inhibited the proliferation and migration of SCC25 cells and significantly downregulated STAT4 expression.

Conclusion miRNA200a/141 plays an important role in OSCC by regulating STAT4, and it is expected to be a potential molecular marker and therapeutic target for the diagnosis, treatment, and prognosis of OSCC.

[Key words] oral squamous cell carcinoma; mircoRNA200a/141; signal transducer and activator of transcription 4; exosomes; gelatin nanoparticles

口腔鳞状细胞癌 (oral squamous cell carcinoma, OSCC) 是一种高侵袭性的肿瘤, 占所有口腔恶性肿瘤的90%。在早期转移的情况下, 患者的生存率仅为40%~50%^[1], 这一现象主要与晚期常发生的淋巴结转移相关^[2]。TNM分期系统基于对原发肿瘤大小、局部淋巴结受累和远处转移的评估, 有助于OSCC的风险分层和区分早期与晚期OSCC。目前, 手术仍是OSCC的首选治疗方法, 对于晚期病例, 可选择辅助治疗, 如放疗、化疗、免疫和靶向治疗。微小RNA (mirco RNA, miRNA) 在癌症中的表达分析不仅有助于鉴定具有诊断、预后和预测价值的miRNA, 还能揭示与癌症发生、进展相关的miRNA的病因学作用^[3]。miRNA200家族在多种癌症中表现为下调, 并在肿瘤转移和血管生成中发挥重要作用^[4]。其中, miRNA200a在食管鳞状细胞癌和胃癌中下调, 参与上皮-间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 和侵袭转移过程^[5]。miRNA141在食管鳞状细胞癌中呈低表达, 而在内皮细胞中发挥抗血管生成作用^[6-7]。基因组分析表明, 食管鳞状细胞癌和头颈部鳞状细胞癌 (head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC) 具有共同的致病机制^[8]。除了miRNA200a/141, 其他一些关键miRNA如miRNA21、miRNA155、miRNA146a等也在HNSCC中表现出异常表达, 并在癌症的发生和进展中发挥重要作用^[9-10]。这些miRNA的功能和机制也值得进一步研究和探讨, 以全面了解OSCC的分子机制并开发新的治疗策略。

癌症基因组图谱 (The Cancer Genome Atlas,

TCGA) 数据库提供了全面的癌症基因组图谱, 有助于癌症的诊断、治疗和预防^[11]。研究^[12-13]发现, 信号转导和转录激活因子4 (signal transducer and activator of transcription 4, STAT4) 是miRNA200a和miRNA141的潜在靶标, 这两种miRNA通过靶向STAT4发挥抑癌作用, 协同抑制上皮细胞钙黏蛋白和波形蛋白的表达, 调节癌细胞增殖和迁移。miRNA疗法作为一种特异性、高效且安全的癌症治疗方法, 其上调可增加肿瘤细胞对化疗药物的敏感性^[14]。外泌体 (exosome, EXO) 是一种有效的miRNA递送工具, 具有生物相容性和稳定性。EXO在递送miRNA200a可有效抑制EMT介导的癌细胞转移^[15]。

本研究通过生物信息学分析OSCC中的miRNA200a/141表达数据, 并与患者临床信息进行关联分析, 构建预后模型, 以预测OSCC患者的预后情况。通过制备负载miRNA的仿生明胶纳米颗粒, 评估其在细胞和分子水平上的核酸保护能力和抗癌作用。开发安全有效的miRNA载体对于癌症的治疗具有重要意义。这种结合miRNA的精准性和纳米颗粒的传递效果, 提供了一种高效特异性的肿瘤治疗策略。

1 材料和方法

1.1 数据下载与分析

1.1.1 数据下载 从TCGA数据库 (<http://www.cancer.gov/ccg/>) 下载HNSCC中口腔相关部位 (包括口底、舌、牙龈、腭、唇、口腔其他未指明部

位)的样本信息和临床数据,排除非口腔相关部位(如喉、口咽、扁桃体)的样本。下载miRNA测序(miRNA sequencing, miRNA-seq)及信使RNA测序(messenger RNA sequencing, mRNA-seq)相关数据,截止日期为2023年8月6日。使用R 4.3.1进行数据整理,导入后清洗并删除缺失值和异常值。

1.1.2 分析 miRNA200a/141 和 STAT4 在 OSCC 中表达的差异 整理miRNA-seq及mRNA-seq表达矩阵,提取数据,构建分组矩阵,储存为肿瘤(tumor)和正常(normal)矩阵。安装基于负二项分布的差异基因表达分析2版(differential gene expression analysis based on the negative binomial distribution version 2, DESeq2)包进行差异基因表达分析,筛选出miRNA200a/141和STAT4在肿瘤与癌旁组织中的表达。通过威尔科克森秩和检验(Wilcoxon)比较OSCC样本和癌旁样本的中位数差异,应用ggplot2包进行可视化。

1.1.3 miRNA200a/141 与 STAT4 的相关性分析 使用斯皮尔曼等级相关系数(Spearman)分析miRNA-141与STAT4、miRNA-200a与STAT4的相关性,结果用相关系数R值表示,并应用ggplot2和ggExtra包进行可视化。

1.1.4 构建 miRNA200a/141 和 STAT4 在 OSCC 中的预后模型 整理患者临床数据,使用survival包进行比例风险假设检验和生存回归分析。将miRNA200a/141和STAT4按中位数分为高表达组 and 低表达组,分析其与患者预后的相关性。使用survminer包计算总生存期(overall survival, OS),建立预后模型。进行miRNA200a/141和STAT4的单因素和多因素Cox回归分析。

1.2 体外实验

1.2.1 主要试剂与仪器 人口腔鳞状细胞癌SCC25细胞系购自美国典型培养物保藏中心,间充质干细胞购自北京友康生物。ZS90纳米颗粒尺寸和zeta电位分析仪(马尔文仪器有限公司,英国);荧光定量聚合酶链式反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)扩增仪(ABI公司,美国);TRNzol总RNA提取试剂[天根生化科技(北京)有限公司,中国];胎牛血清、二甲基亚砜(BI公司,以色列);达尔伯克改良伊格尔培养基(Dulbecco's modified eagle medium, DMEM)(Gibco公司,美国);Trizol提取试剂盒、Lipofectamine™ RNAiMAX转染试剂和STAT4

抗体(赛默飞世尔科技公司,美国);胰蛋白酶(北京索莱宝生物技术有限公司,中国);细胞活力检测的四甲基偶氮唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)试剂(Sigma公司,美国);引物(Promega公司,美国)。

1.2.2 SCC25细胞的体外培养 将冻存的SCC25细胞解冻,用70%乙醇消毒安瓿,1 000 r/min离心5 min去除二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO),弃上清。将SCC25细胞接种于含10%胎牛血清的DMEM培养基,37 °C、5%CO₂培养箱中培养过夜。

1.2.3 仿生明胶EXO颗粒的制备及性能检测 制备明胶纳米颗粒(gelatin nanoparticles, GNP):将1.25 g B型明胶溶于25 mL蒸馏水中,加热溶解后加入25 mL丙酮。沉淀物重新溶于25 mL水中,调节pH至2.5,逐滴添加40 mL丙酮进行脱溶,搅拌10 min,加入8%戊二醛交联30 min,离心后加热至40 °C蒸发丙酮,得到阳离子GNP。

负载miR-200a的GNP(GNP-miR-200a):按制造商方案制备Lipofectamine™ RNAiMAX复合物,将miRNA阳离子脂质体加入明胶溶液并稀释,随后将GNP分散于无水乙醇中,加入4-甲酰苯硼酸反应过夜,离心后分散沉淀物形成GNP-miR-200a。

负载EXO的GNP(GNP-EXO):培养间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)至80%汇合,收集细胞培养上清液,超速离心(100 000×g, 2 h)去除沉淀物,提取EXO;GNP与EXO共孵育,使EXO表面吸附或包裹GNP,超速离心进一步纯化GNP-EXO,重悬于磷酸盐缓冲盐水(phosphate buffered saline, PBS)中。

MSC转染miRNA-141:培养MSC至80%汇合,按制造商方案制备Lipofectamine™ RNAiMAX和miRNA-141复合物,加入12孔细胞培养板中培养24 h。

负载miRNA200a/141的仿生明胶EXO颗粒(GNP-EXO-miRNA200a/141):将miRNA-141复合物与GNP-miRNA-200a混合培养,收集细胞培养上清,超速离心去除沉淀物,提取EXO,重悬于PBS中并过滤去除杂质,冻存于-80 °C(图1)。

1.2.4 仿生明胶EXO颗粒的性能检测 通过动态光散射和透射电子显微镜(transmission electron microscopy, TEM)观察GNP、GNP-EXO、GNP-EXO-miRNA200a/141纳米颗粒的粒径和Zeta电位的表征。

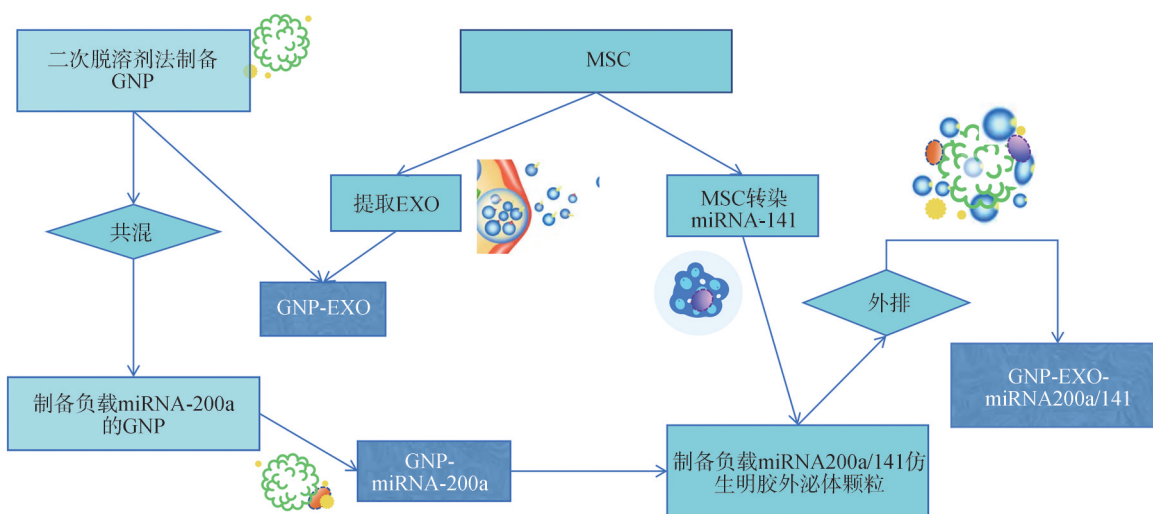


图 1 仿生明胶EXO颗粒的制备模式图

Fig 1 Preparation model of bionic gelatin EXO particles

蛋白质印迹检测EXO标志蛋白CD63、CD9的表达：用PBS洗涤细胞，加入放射免疫沉淀缓冲液（radio immunoprecipitation assay buffer, RIPA）裂解液，离心回收蛋白质。用二喹啉甲酸（bicinchoninic acid, BCA）法测定蛋白质含量，进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE），蛋白转移后封闭，孵育一抗和二抗，显色并用Image J软件分析图像。

检测 GNP-EXO-miRNA200a/141 颗粒的稳定性：分别将miRNA200a/141（未加载体）、GNP-EXO-miRNA200a/141与10 μg RNase A混合孵育，再与1%的十二烷基硫酸钠溶液混合后，引入1.2%琼脂糖凝胶样品孔中，电泳30 min，分析未降解的miRNA条带亮度，评估miRNA载体对抗miRNA降解的保护功效。

1.2.5 检测GNP-EXO-miRNA200a/141颗粒对SCC25细胞的抑制作用 用胰酶消化SCC25细胞，加入完全培养液，计数细胞数，接种于96孔板。使用阳离子脂质体将样品转染至细胞内，设置GNP-EXO（对照）、miRNA200a/141、GNP-EXO-miRNA200a/141组，每组设3个孔。细胞培养24、48和72 h，进行MTT实验，测量吸光度。

1.2.6 蛋白质印迹检测 SCC25 细胞中 EXO 标志蛋白 CD63、CD9 表达及 STAT4 蛋白水平 用 PBS 洗涤细胞，加入放射免疫沉淀缓冲液（radio immunoprecipitation assay buffer, RIPA）裂解液，离心回收蛋白质。用二喹啉甲酸（bicinchoninic acid, BCA）法测定蛋白质含量，进行 SDS-PAGE，蛋

白转移后封闭，孵育一抗和二抗，显色并用Image J软件分析图像。

1.2.7 检测GNP-EXO-miRNA200a/141颗粒对SCC25细胞增殖和迁移的影响 Transwell实验检测细胞取对数生长的细胞，调整细胞密度，制备细胞悬液。准备Transwell上室和下室，分别加入细胞悬液和细胞外囊泡，培养48 h，PBS洗涤，4%多聚甲醛固定，结晶紫染色，计数迁移细胞数。

将对数生长期的SCC25细胞，胰蛋白酶消化成单细胞悬液，接种于6孔培养板，细胞培养37 °C、5%CO₂培养箱中培养24 h，待细胞生长至80%时，每孔时分别于不同孔注入GNP-EXO、miRNA200a/141、GNP-EXO-miRNA200a/141，分别在划痕后的0、24、48 h时，在倒置显微镜下拍照并记录每孔划痕直径。

1.2.8 使用qRT-PCR检测SCC25细胞中miRNA的表达水平 用Trizol法提取总RNA，加入Trizol试剂，混匀，加入氯仿，离心收集上清，加入异丙醇沉淀RNA，洗涤RNA，用二乙基焦磷酸酯（diethylpyrocarbonate, DEPC）水重溶RNA。使用miRNA逆转录试剂盒将miRNA逆转录为互补DNA（complementary DNA, cDNA），采用SYBR Green I法实时荧光定量检测miRNA。

qRT-PCR反应流程：预变性94 °C 5 min，变性94 °C 30 s，退火58 °C 30 s，延伸72 °C 30 s，30个循环。用2^{-ΔΔCt}法对实验结果进行分析，选择甘油醛-3-磷酸脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH）作为内参。miRNA引物基于基因组数据库设计，由上海吉玛公司合成，

详见表1。

表 1 引物序列

Tab 1 The primer sequence

基因	引物
STAT4	正向引物, 5'-AGCCATCTCGGAGGAATA-3'
	反向引物, 5'-CAGACAACCGGCCTTTAT-3'
GAPDH	正向引物, 5'-CGTGGGCCGCCCTAGGCACCA-3'
	反向引物, 5'-TTGGCTTAGGGTTCAGGGGGG-3'
miRNA-200a	正向引物, 5'-TAACACTGTCTGGTAACGATGT-3'
	反向引物, 5'-ATCGTTACCAGACAGTGTATT-3'
miRNA-141	正向引物, 5'-ACACTCCAGCTGGTAACACTGTCTG-GTAA-3'
	反向引物, 5'-CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCA-ATTCAAGTT GAGCCATCTTT-3'

1.3 统计方法

采用R 4.3.1和IBM SPSS Statistics 23.0进行数据处理和统计分析。使用Shapiro-Wilk方法检验数据正态分布,符合正态分布的数据用均数±标准差表示。

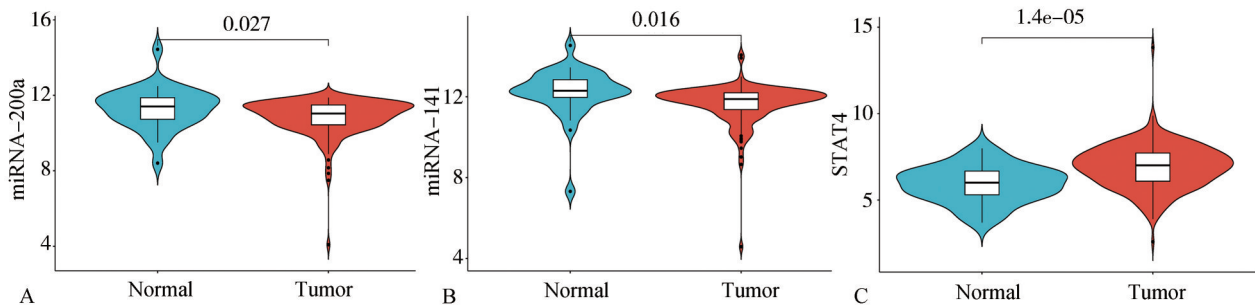
两组间比较采用t检验,多组间比较采用单因素方差分析,两组间进一步比较采用LSD t检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 miRNA200a/141 与 STAT4 在 OSCC 中的关联分析结果

2.1.1 纳入样本临床数据分析结果 使用TCGA数据库共下载345例样本数据,包括313例OSCC组织样本和32例癌旁组织样本的miRNA-seq和mRNA-seq数据及临床数据。清洗数据后,共纳入259例OSCC组织样本和32例癌旁组织样本,其中年龄 ≥ 50 岁患者共215例(83%),年龄 < 50 岁患者共44例(17%),男性患者共176例(68%),女性患者83例(52%)。

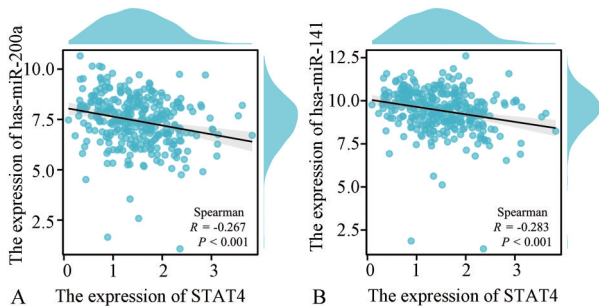
2.1.2 miRNA200a/141在OSCC临床队列中的表达及与STAT4的相关性分析结果 miRNA和信使RNA的差异表达分析结果显示:红色代表OSCC组织,蓝色代表癌旁组织,OSCC组织中miRNA200a/141呈低表达,STAT4呈高表达, P 值均小于0.05,差异有统计学意义(图2)。相关性分析结果显示,miRNA-200a与STAT4的相关系数 R 值为-0.267($P < 0.001$),miRNA141与STAT4的相关系数 R 值为-0.283($P < 0.001$),均呈负相关(图3)。



A: OSCC 组织中 miRNA-200a 表达水平; B: OSCC 组织中 miRNA-141 表达水平; C: OSCC 组织中 STAT4 表达水平。

图 2 单基因差异分析

Fig 2 Analysis of single gene differences



A: miRNA-200a; B: miRNA-141。

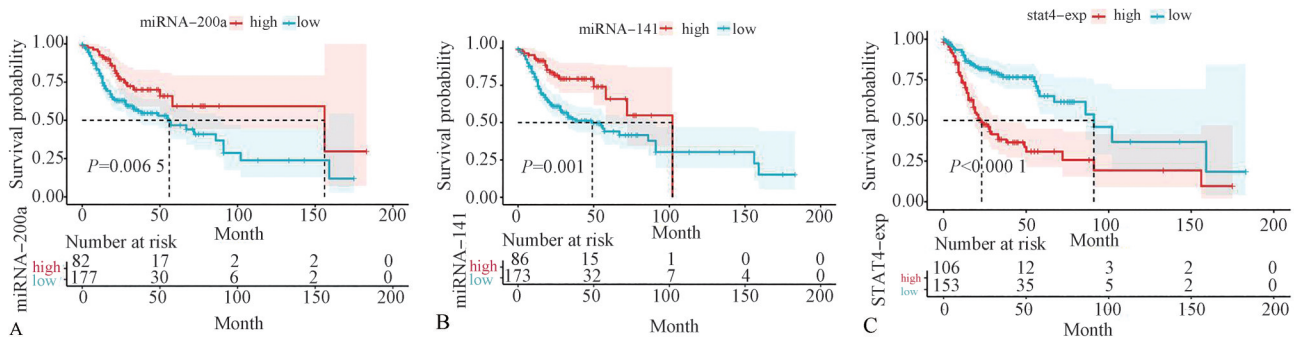
图 3 miRNA-200a/141 和 STAT4 相关性

Fig 3 Correlation between miRNA200a/141 and STAT4

2.1.3 miRNA-200a/141 与 STAT4 在 OSCC 中的表达及预后分析结果 miRNA-200a/141与STAT4在OSCC中的表达分析结果表明:在miRNA-200a/141样本中,低表达组的死亡风险要高于高表达组($P < 0.01$)(图4A、B);在STAT4样本中,高表达组的死亡风险要高于低表达组($P < 0.0001$)(图4C)。单因素回归分析发现,患者年龄和性别的差异无统计学意义($P > 0.05$),而III期和IV期[危险比(hazard ratio, HR)=1.776, 95%CI: 1.086~2.905, $P=0.022$], T3~T4期(HR=2.269, 95%CI: 1.464~3.517, $P < 0.001$), N2~N3期(HR=1.847,

95%CI: 1.206~2.829, $P=0.005$), miRNA-200a低表达组 (HR=1.916, 95%CI: 1.193~3.076, $P=0.007$), miRNA-141低表达组 (HR=2.298, 95%CI: 1.377~3.835, $P=0.001$), STAT4高表达组 (HR=3.016, 95%CI: 2.017~4.511, $P<0.001$) 是影响OSCC患者预后的危险因素。多因素回归分

析发现, T3和T4 (HR=1.863, 95%CI: 1.201~2.891, $P=0.006$), miRNA-141低表达组 (HR=2.077, 95%CI: 1.240~3.478, $P=0.005$), STAT4高表达组 (HR=2.715, 95%CI: 1.809~4.075, $P<0.001$) 是影响OSCC患者预后的独立危险因素, 具体见表2。



A: miRNA-200a ($P=0.0065$); B: miRNA-141 ($P=0.001$); C: STAT4 ($P<0.0001$).

图 4 miRNA-200a/141 和 STAT4 表达与 OSCC 患者预后的生存分析

Fig 4 Survival analysis of miRNA200a/141 and STAT4 expression and prognosis in patients with OSCC

表 2 影响 OSCC 预后的单因素多因素分析

Tab 2 Single factor and multiple factor analysis of OSCC prognosis

特征	例数	单因素分析		多因素分析	
		风险比 (95% 置信区间)	P 值	风险比 (95% 置信区间)	P 值
年龄/岁	<50	44	参照		
	≥50	215	1.186 (0.691~2.038)		0.536
性别	男	176	参照		
	女	83	1.209 (0.805~1.815)		0.360
分期	I 期和 II 期	64	参照		
	III 期和 IV 期	195	1.776 (1.086~2.905)		0.022
T 分期	T1~T2	111	参照		
	T3~T4	148	2.269 (1.464~3.517)		<0.001
N 分期	N0	104	参照		
	N1	46	0.526 (0.243~1.137)		0.102
	N2~N3	109	1.847 (1.206~2.829)		0.005
miRNA-200a	高表达	82	参照		
	低表达	177	1.916 (1.193~3.076)		0.007
miRNA-141	高表达	86	参照		
	低表达	173	2.298 (1.377~3.835)		0.001
STAT4	低表达	153	参照		
	高表达	106	3.016 (2.017~4.511)		<0.001

2.2 仿生明胶 EXO 颗粒的理化性质

由 TEM 图像可见, GNP-EXO 和 GNP-EXO-miRNA 200a/141 纳米颗粒呈圆形结构 (图 5A、B); GNP 颗粒平均粒径为 (109.1±12.1) nm, GNP-EXO 颗粒则增加到 (123.1±12.3) nm (图 5C, 表 3), GNP-EXO-miRNA200a/141 颗粒粒径为 80~160 nm, 平均分散指数 (polydispersity index,

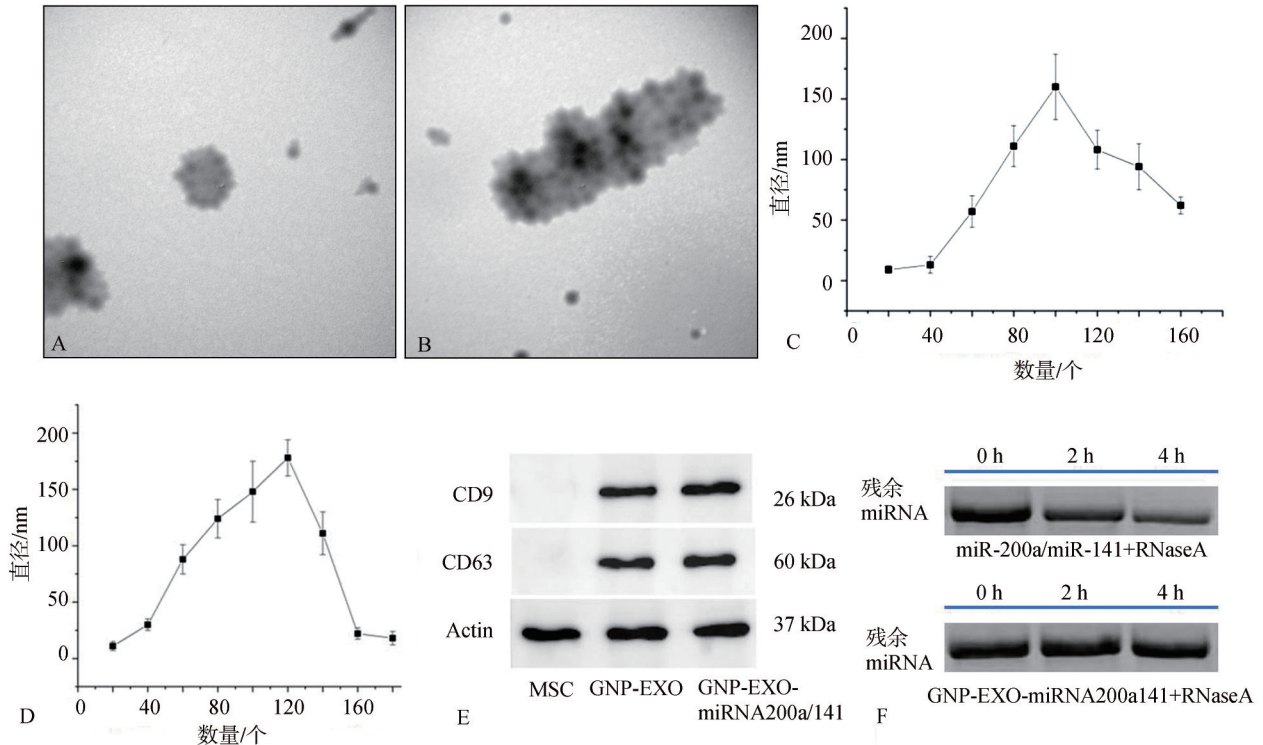
PDI) 为 0.214±0.030 (图 5D, 表 3)。GNP、GNP-EXO、GNP-EXO-miRNA200a/141 颗粒的表面电位分别为 (24.53±0.70) (-11.00±1.20) (-10.20±0.70) mV (表 3), 由图 5E 可见, 从 MSC 中收获的 EXO 成功包被了 GNP 和 GNP-miRNA200a/141 的表面。

综上, GNP-EXO、GNP-EXO-miRNA200a/141 颗粒粒径, Zeta 电位和 EXO 标记物 CD63 和 CD9

的表达均成功验证了颗粒的制备成功。

琼脂糖凝胶电泳图(图5F)显示,与RNase A 孵育2 h后,裸露miRNA的荧光强度迅速下降。与裸露miRNA相比,GNP-EXO-miRNA200a/141在

含RNase A的溶液中培养4 h后表现出显著的抗降解能力,说明制备的GNP-EXO-miRNA200a/141颗粒稳定性良好。



A: GNP-EXO的TEM图像 × 40 000; B: GNP-EXO-miRNA200a/141的TEM图像 × 40 000; C: GNP-EXO的尺寸分布; D: GNP-EXO-miRNA200a/141的尺寸分布; E: MSC、GNP-EXO、GNP-EXO-miRNA200a/141样本中CD63和CD9的表达; F: GNP-EXO-miRNA200a/141对miRNA的保护作用。

图 5 GNP-EXO和GNP-EXO-miRNA200a/141特征图

Fig 5 The characteristic of GNP-EXO and GNP-EXO-miRNA200a/141

表 3 纳米粒子的表征

Tab 3 Characterization of nanoparticles

组别	粒径/nm	PDI	表面电位/ mV
GNP	109.1±12.1	0.193±0.050	24.53±0.70
GNP-EXO	123.1±12.3	0.216±0.080	-11.00±1.20
GNP-EXO-miRNA200a/141	127.3±14.0	0.214±0.030	-10.20±0.70

2.3 GNP-EXO-miRNA 200a/141 颗粒对 SCC25 细胞的作用

2.3.1 细胞活力检测 miRNA200a/141 颗粒和 GNP-EXO-miRNA 200a/141颗粒对SCC25细胞生长的抑制具有时间依赖性, GNP-EXO-miRNA200a/141颗粒对细胞生长的抑制作用更显著(图6)。

2.3.2 Transwell 实验结果 miRNA200a/141 和 GNP-EXO-miRNA200a/141均能显著抑制SCC25细胞的迁移, GNP-EXO-miRNA200a/141颗粒效果更

佳(图7)。

划痕实验结果显示:与GNP-EXO相比,48 h后观察到GNP-EXO-miRNA200a/141明显降低了SCC25细胞的迁移($P<0.01$) (图8)。

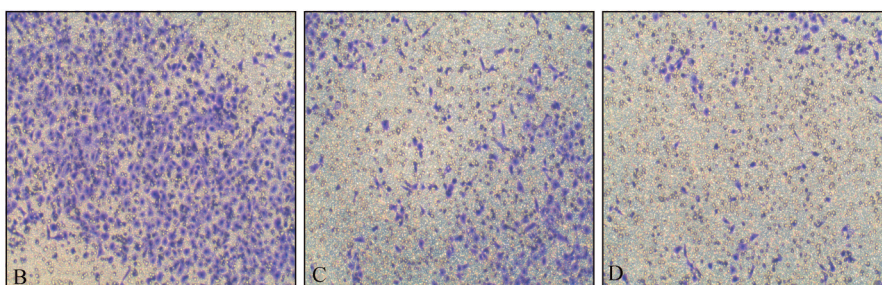
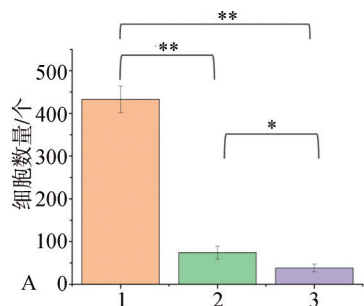
2.3.3 GNP-EXO-miRNA200a/141 颗粒降低 SCC25 细胞中 STAT4 的表达 qRT-PCR和蛋白质印迹结果显示:miRNA200a/141 和 GNP-EXO-miRNA200a/141均能显著降低SCC25细胞中STAT4的表达, GNP-EXO-miRNA200a/141 颗粒效果更优(图9)。

3 讨论

OSCC是最常见的口腔恶性肿瘤。目前手术、化学疗法和放射疗法是主要的治疗手段,但对于转移或晚期OSCC患者,现有治疗方法的效果仍然

有限^[2,16]。基因组学研究表明，OSCC的可操作靶标有限，已获批的靶向疗法也非常局限。近年来，生物信息学方法在癌症研究中得到了广泛应用，可以识别和筛选OSCC的基因表达模式，为现有药物的重新定位提供了低成本和高效率的策略^[17]。miRNA在癌症中的作用已被广泛研究，作为癌症标志物，它们在诊断、预后和治疗中具有巨大潜力^[18]。miRNA200家族成员，如miRNA-200a和miRNA-141，在多种癌症中被认为是潜在的生物标志物和预后预测因子^[19]。本研究通过TCGA数据库分析，发现miRNA200a/141在OSCC组织中的表达水平显著降低，而STAT4的表达水平显著升高，二者呈显著负相关。

这一结果证实，miRNA200a/141与肿瘤中的特定靶标之间存在负相关表达关系，尤其是STAT4在miRNA200a/141介导的增殖加速和应激效应减少中起关键作用。研究^[20]表明，miRNA-200a和miRNA-141通过调节STAT4，抑制EMT过程，从而调控癌细胞的增殖和迁移。此外，本研究发现，miRNA200a/141低表达组的患者死亡风险显著高于高表达组，而STAT4高表达组的患者死亡风险显著高于低表达组。

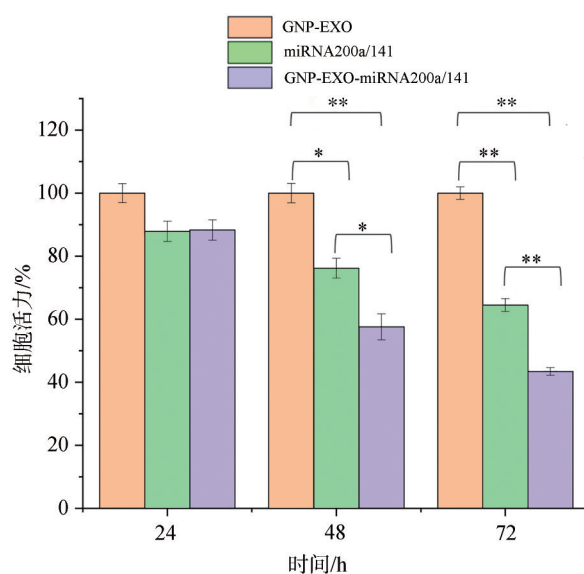


A: Transwell 实验检测细胞迁移能力，与对照组相比，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ，1 是 GNP-EXO，2 是 miRNA200a/141，3 是 GNP-EXO-miRNA200a/141；B: GNP-EXO 结晶紫染色 $\times 100$ ；C: miRNA200a/141 结晶紫染色 $\times 100$ ；D: GNP-EXO-miRNA200a/141 结晶紫染色 $\times 100$ 。

图 7 Transwell 实验结果

Fig 7 Transwell assay results

目前，纳米技术在靶向给药系统的探索中发挥着重要作用，但通过纳米给药系统将药物递送到肿瘤组织中仍存在许多困难，例如无机纳米材料引起的免疫反应、肿瘤部位蓄积作用差、药物被溶酶体困住而无法发挥疗效等^[21]。明胶是一种天然的蛋白质水解产物，无毒，无免疫原性，具有良好的生物相容性。它还可以修饰肽链上的羧基和氨基改变其理化性质^[22]。特别值得注意的是，由于明胶纳米颗粒能够被肿瘤组织中富集的金属蛋白酶降解，因此具有实现药物释放的潜力^[23]。



24、48、72 h 的 GNP-EXO、miRNA200a/141 和 GNP-EXO-miRNA200a/141 处理 SCC25 后的细胞活力；* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。

图 6 GNP-EXO-miRNA200a/141 颗粒对 SCC25 细胞生长的抑制作用

Fig 6 Inhibitory effect of GNP-EXO-miRNA200a/141 nanocomplexes on SCC25 cell growth

这些结果表明，miRNA200a/141在OSCC中的低表达和STAT4的高表达是影响OSCC患者预后的重要因素。

本研究通过二次脱溶剂法和差速离心法制备了负载miRNA的仿生纳米载体系统，成功制备了GNP-EXO-miRNA200a/141纳米颗粒，这些纳米颗粒的粒径分布在80~160 nm，具有良好的分布均匀性和稳定性。EXO是真核细胞内形成的具有双膜结构的胞外囊泡，直径在40~160 nm^[24]。它们不仅作为稳定可靠的miRNA来源，为体液中被封装的miRNA提供保护，使其在非生理条件下不被降解，还通过运输包括包括miRNA在内的多种生物活性成分，在细胞通讯中起着至关重要的作用^[25]。肿

瘤衍生EXO通过局部微环境重塑、远距离转移、血管生成和免疫抑制等动态变化促进癌症生长和侵袭,其中的miRNA是最有效的EXO载体,可用于追踪EXO、早期检测癌症细胞活性变化、预后预测以及调控缺氧诱导的肿瘤进展和癌细胞耐药性^[26]。有研究^[27]表明,EXO可有效地将miRNA-

200a递送,显著促进胃癌细胞中miRNA-200a的表达水平,并且相应减少ZEB1、vimentin、Snail1和β-catenin的表达,同时增加E-cadherin以抑制肿瘤细胞的转移。通过靶向具有致癌特性的EXO-miRNA预防转移,有助于HNSCC的治疗^[28]。

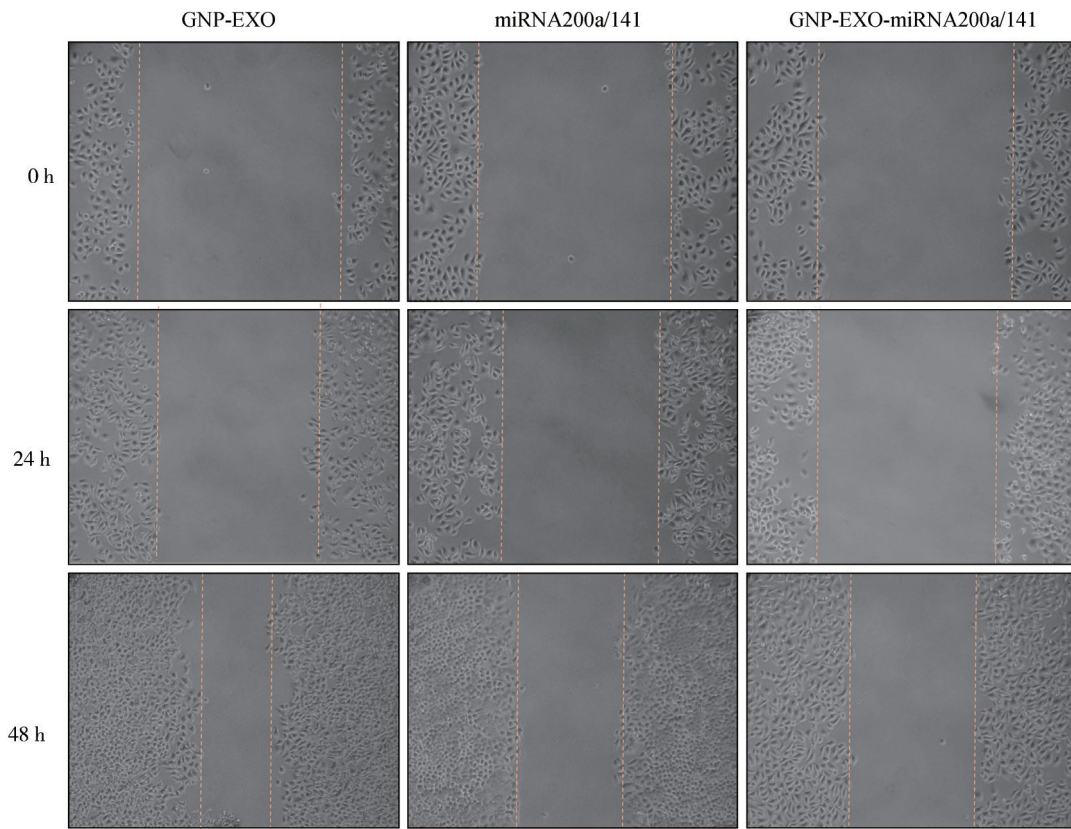


图 8 细胞划痕实验结果

Fig 8 Cell scratch assay results

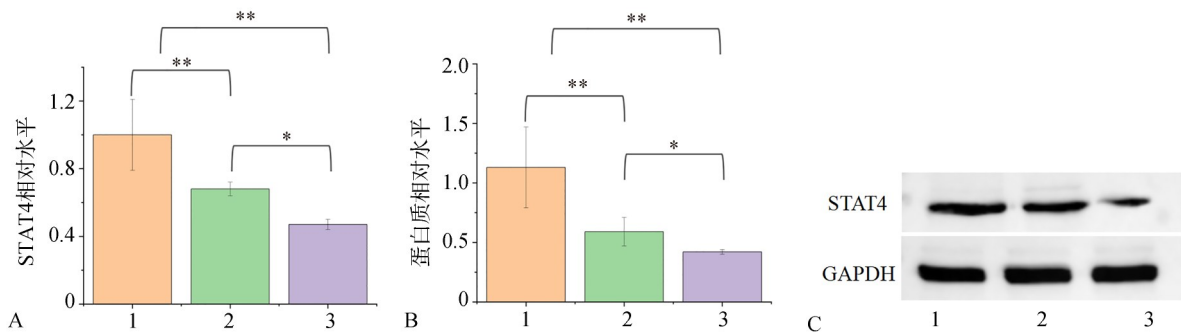


图 9 SCC25细胞中STAT4蛋白的表达
A: qRT-PCR实验; B: 蛋白质印迹实验柱状图; C: 蛋白质印迹实验电泳图; 与对照组相比, *P<0.05, **P<0.01; 1是GNP-EXO, 2是miRNA200a/141, 3是GNP-EXO-miRNA200a/141。

图 9 SCC25细胞中STAT4蛋白的表达

Fig 9 STAT4 protein expression in SCC25 cells

蛋白CD63和CD9是存在于细胞外囊泡群体中的标记物,在过去20年中已被用作EXO标记物^[29],本研究证实,CD63和CD9在GNP-EXO和GNP-

EXO-miRNA200a/141颗粒中表达,表明MSC细胞中收获的EXO成功包被GNP和GNP-EXO-miRNA200a/141表面,通过观察表面电位和典型标记

物的存在, 确认了提取的细胞外囊泡为EXO。进一步的细胞实验中发现, GNP-EXO-miRNA200a/141颗粒对SCC25细胞迁移具有显著抑制作用, 并表现出时间依赖性。有研究^[15]表明, miR-200a和miR-141的下游蛋白STAT4在恶性肿瘤中常发生失调, 两者在EMT过程中协同抑制E-钙黏蛋白和N-钙黏蛋白的表达, 并通过靶向STAT4调控OSCC细胞的增殖、迁移和侵袭。在HNSCC患者外周血中, 免疫调节剂干扰素 α 2b可诱导STAT4的激活^[30]。本研究评估了miRNA200a/141组和GNP-EXO-miRNA200a/141颗粒对SCC25细胞中STAT4表达的影响, 采用qRT-PCR和蛋白印迹分析来量化STAT4表达水平, 比较各组之间的差异。结果显示, 与miRNA200a/141组相比, GNP-EXO-miRNA 200a/141组中STAT4显著下调, 这一结果与Transwell测定的观察结果一致。

本研究成功地揭示了miRNA200a/141在OSCC中的重要调控作用, 特别是其通过调节STAT4抑制肿瘤增殖和迁移的机制。通过TCGA数据库的生物信息学分析, 本研究发现miRNA200a/141在OSCC中的表达显著降低, 而STAT4表达显著升高, 二者呈负相关。基于这一发现, 笔者进一步制备了负载miRNA的仿生明胶EXO纳米颗粒GNP-EXO-miRNA200a/141, 并在细胞水平上验证了其对于SCC25细胞增殖和迁移的显著抑制作用。GNP-EXO-miRNA200a/141纳米颗粒展现出优良的核酸保护能力和生物活性, 在体外实验中有效下调了STAT4的表达水平, 抑制了OSCC细胞的迁移性。本研究表明, miRNA200a/141-STAT4轴在OSCC的发展和进展中起关键作用, 利用仿生纳米载体递送miRNA200a/141不仅增强了miRNA的稳定性, 还显著提高了其抑制肿瘤的效果。这一创新性的纳米递送系统为OSCC的精准治疗提供了新的策略和方向, 具有潜在的临床应用价值。未来的研究应进一步在不同细胞系及动物体内实验中验证这些结果, 以期为OSCC患者提供更有效的治疗手段, 提高患者的生存率和生活质量。

利益冲突声明: 作者声明本文无利益冲突。

4 参考文献

- [1] Coletta RD, Yeudall WA, Salo T. Grand challenges in oral cancers[J]. *Front Oral Health*, 2020, 1: 3.
- [2] Romano A, Di Stasio D, Petruzzi M, et al. Noninvasive imaging methods to improve the diagnosis of oral carcinoma and its precursors: state of the art and proposal of a three-step diagnostic process[J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(12): 2864.
- [3] Sempere LF, Azmi AS, Moore A. microRNA-based diagnostic and therapeutic applications in cancer medicine[J]. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2021, 12(6): e1662.
- [4] Rupaimoole R, Slack FJ. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2017, 16(3): 203-222.
- [5] Mirzaei S, Baghaei K, Parivar K, et al. The expression level changes of microRNAs 200a/205 in the development of invasive properties in gastric cancer cells through epithelial-mesenchymal transition[J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 857: 172426.
- [6] Xue L, Yu X, Jiang X, et al. TM4SF1 promotes the self-renewal of esophageal cancer stem-like cells and is regulated by miR-141[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(12): 19274-19284.
- [7] Dong H, Weng C, Bai R, et al. The regulatory network of miR-141 in the inhibition of angiogenesis [J]. *Angiogenesis*, 2019, 22(2): 251-262.
- [8] Song Y, Li L, Ou Y, et al. Identification of genomic alterations in oesophageal squamous cell cancer[J]. *Nature*, 2014, 509(7498): 91-95.
- [9] Li CX, Su Y, Wang ZY, et al. A PRISMA meta-analysis for diagnostic value of microRNA-21 in head and neck squamous cell carcinoma along with bioinformatics research[J]. *Oral Maxillofac Surg*, 2024, 28(2): 739-752.
- [10] Kiran K, Chowdhury N, Singh A, et al. The relationship of grade, stage and tobacco usage in head and neck squamous cell carcinoma with p53, PIK3CA and microRNA profiles[J]. *Cureus*, 2024, 16(2): e54737.
- [11] Banwait JK, Bastola DR. Contribution of bioinformatics prediction in microRNA-based cancer therapeutics[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2015, 81: 94-103.
- [12] Chen S, Zhang J, Chen Q, et al. MicroRNA-200a and microRNA-141 have a synergetic effect on the suppression of epithelial-mesenchymal transition in liver cancer by targeting STAT4[J]. *Oncol Lett*, 2021, 21(2): 137.

- [13] Anderson K, Ryan N, Volpedo G, et al. Immune suppression mediated by STAT4 deficiency promotes lymphatic metastasis in HNSCC[J]. *Front Immunol*, 2020, 10: 3095.
- [14] Brozovic A, Duran GE, Wang YC, et al. The miR-200 family differentially regulates sensitivity to paclitaxel and carboplatin in human ovarian carcinoma OVCAR-3 and MES-OV cells[J]. *Mol Oncol*, 2015, 9(8): 1678-1693.
- [15] Li Y, Wang J, Chen W, et al. Overexpression of STAT4 under hypoxia promotes EMT through miR-200a/STAT4 signal pathway[J]. *Life Sci*, 2021, 273: 119263.
- [16] Tan Y, Wang Z, Xu M, et al. Oral squamous cell carcinomas: state of the field and emerging directions [J]. *Int J Oral Sci*, 2023, 15(1): 44.
- [17] Chai AWY, Lim KP, Cheong SC. Translational genomics and recent advances in oral squamous cell carcinoma[J]. *Semin Cancer Biol*, 2020, 61: 71-83.
- [18] Berindan-Neagoe I, Monroig Pdel C, Pasculli B, et al. MicroRNAome genome: a treasure for cancer diagnosis and therapy[J]. *CA Cancer J Clin*, 2014, 64(5): 311-336.
- [19] Lee JS, Ahn YH, Won HS, et al. Prognostic role of the microRNA-200 family in various carcinomas: a systematic review and meta-analysis[J]. *Biomed Res Int*, 2017, 2017: 1928021.
- [20] Zhang Z, Li H, Jiang S, et al. A survey and evaluation of Web-based tools/databases for variant analysis of TCGA data[J]. *Brief Bioinform*, 2019, 20(4): 1524-1541.
- [21] Cong Y, Baimanov D, Zhou Y, et al. Penetration and translocation of functional inorganic nanomaterials into biological barriers[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2022, 191: 114615.
- [22] Zhang Y, Zhang Y, Ma C, et al. Gelatin nanoparticles transport DNA probes for detection and imaging of telomerase and microRNA in living cells[J]. *Talanta*, 2020, 218: 121100.
- [23] Zhang CY, Yang CQ, Chen Q, et al. miR-194-loaded gelatin nanospheres target MEF2C to suppress muscle atrophy in a mechanical unloading model[J]. *Mol Pharm*, 2021, 18(8): 2959-2973.
- [24] Najafi S, Majidpoor J, Mortezaee K. Extracellular vesicle-based drug delivery in cancer immunotherapy[J]. *Drug Deliv Transl Res*, 2023, 13(11): 2790-2806.
- [25] Elewaily MI, Elsergany AR. Emerging role of exosomes and exosomal microRNA in cancer: pathophysiology and clinical potential[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2021, 147(3): 637-648.
- [26] Ngu A, Wang S, Wang H, et al. Milk exosomes in nutrition and drug delivery[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2022, 322(5): C865-C874.
- [27] Hofmann L, Waizenegger M, Röth R, et al. Treatment dependent impact of plasma-derived exosomes from head and neck cancer patients on the epithelial-to-mesenchymal transition[J]. *Front Oncol*, 2023, 12: 1043199.
- [28] Mirzaei S, Gholami MH, Aghdaei HA, et al. Exosome-mediated miR-200a delivery into TGF- β -treated AGS cells abolished epithelial-mesenchymal transition with normalization of ZEB1, vimentin and Snail1 expression[J]. *Environ Res*, 2023, 231(Pt 1): 116115.
- [29] Mathieu M, Névo N, Jouve M, et al. Specificities of exosome versus small ectosome secretion revealed by live intracellular tracking of CD63 and CD9[J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 4389.
- [30] Bose A, Ghosh D, Pal S, et al. Interferon alpha2b augments suppressed immune functions in tobacco-related head and neck squamous cell carcinoma patients by modulating cytokine signaling[J]. *Oral Oncol*, 2006, 42(2): 161-171.

(本文编辑 张玉楠)