

## MSC-exo 一种新型细胞递送工具转运靶向基因 调控胰腺癌增殖效应分析

朱磊, 李瑞雪, 鲍长磊, 黄晨宸, 梁书鑫, 赵振林, 朱洪  
(深圳瑞普逊干细胞与再生医学研究院, 广州 深圳 518038)

**[摘要]** **目的** 观察 1 种新型细胞递送工具(MSC-exo)转运靶向基因调控胰腺癌增殖效应。**方法** 透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)和纳米颗粒跟踪分析技术(nanoparticle tracking analysis, NTA)鉴定人间充质干细胞外泌体(human mesenchymal stem cell exosomes, MSC-exo)并转运 miR-450a-5p 进入 CFPAC-1, 探讨 miR-450a-5p 靶向 BZW2 抑制胰腺癌细胞增殖效应。基因技术处理 pc-BZW2, CCK-8、EdU、细胞划痕、Transwell 验证 MSC-exo 与 MSC-exo-miR-450a-5p 对细胞的抑制作用。**结果** 与胰腺正常组织相比 miR-450a-5p 在胰腺癌组织中低表达( $P<0.05$ ), CFPAC-1 细胞 MSC-exo-miR-450a-5p 外泌体标记蛋白 CD63、TSG101 表达高于 MSC-exo( $P<0.05$ )。CCK-8、EdU、细胞划痕、Transwell 实验显示 MSC-exo-miR-450a-5p 较 MSC-exo 可显著抑制 CFPAC-1 细胞增殖、侵袭和迁移( $P<0.05$ )。通过双荧光素酶实验证实, miR-450a-5p 靶向 BZW2, 并且 RT-qPCR 和免疫印迹检测 miR-450a-5p 和 BZW2 表达成负性相关( $P<0.05$ )。过表达 BZW2, CCK-8、EdU、细胞划痕、Transwell 实验均证实, pc-BZW2 逆转 MSC-exo-miR-450a-5p 对 CFPAC-1 的抑癌功能, 免疫印迹检测 PCNA、Ki-67、MMP2、MMP9, 结果与上述实验一致( $P<0.05$ )。**结论** hMSC-exo 是 1 种新的递送系统, 靶向 BZW2 转运 miR-450a-5p 抑制胰腺癌细胞的生物学恶性, 为胰腺癌靶向治疗研究提供了重要线索。

**[关键词]** 胰腺癌; 间充质干细胞; 外泌体; miR-450a-5p; BZW2

**[中图分类号]** R4 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2095-610X(2024)02-0039-10

## Effect of MSC-exo, a New Cell Delivery Tool, on Gene Delivery and Proliferation of Pancreatic Cancer

ZHU Lei, LI Ruixue, BAO Changlei, HUANG Chenchen,

LIANG Shuxin, ZHAO Zhenlin, ZHU Hong

(Shenzhen Ripson Stem Cell and Regenerative Medicine Research Institute,  
Guangzhou Shenzhen 518038, China)

**[Abstract]** **Objective** To observe the effect of a new cell delivery tool (MSC-exo) on the proliferation of pancreatic cancer by transferring targeted genes. **Methods** Transmission Electron Microscope (TEM) and Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) were used to identify human mesenchymal stem cell exosomes (MSC-exo) and transport miR-450a-5p into CFPAC-1, to explore the effect of miR-450a-5p targeting BZW2 on inhibiting the proliferation of pancreatic cancer cells. **Results** The expression of miR-450a-5p was low in pancreatic cancer tissue ( $P<0.05$ ), and the expression of CD63 and TSG101 of MSC-exo-miR-450a-5p in CFPAC-1 cells was higher than that of MSC-exo by Western blot ( $P<0.05$ ). CCK-8 and EdU results showed that MSC-exo-miR-450a-5p significantly inhibited the proliferation of CFPAC-1 cells ( $P<0.05$ ). Cell scratch and Transwell experiments showed that MSC-exo-miR-450a-5p can inhibit the migration and invasion of CFPAC-1 cells ( $P<0.05$ ). Through dual luciferase assay, it was confirmed that miR-450a-5p targets BZW2, and RT-qPCR and Western blotting

**[收稿日期]** 2023-11-01

**[基金项目]** 深圳市科技创新基础研究基金资助项目(JCYJ20190807103605679)

**[作者简介]** 朱磊(1984~), 男, 云南昆明人, 医学硕士, 主治医师, 主要从事 MSC 在胰腺癌中的机制研究工作。

**[通信作者]** 朱洪, E-mail: zhuhong@kmmu.edu.cn

showed a negative correlation ( $P < 0.05$ ) between miR-450a-5p and BZW2 expression. Overexpression of BZW2, CCK-8, EdU, cell scratch, and Transwell experiments confirmed that pc-BZW2 reversed the anti-cancer function of MSC-exo-miR-450a-5p on CFPAC-1. Western blot detected PCNA, Ki-67, MMP2, MMP9, and the results were consistent with the above experiments ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** hMSC exo is a new delivery system, targeting BZW2 to transport miR-450a-5p to inhibit the biological malignancy of pancreatic cancer cells, which provides an important clue for the research of targeted treatment of pancreatic cancer.

[**Key words**] Pancreatic adenocarcinoma; Mesenchymal stem cell; Exosomes; miR-450a-5p; BZW2

胰腺恶性肿瘤 90% 是胰腺导管腺癌, 恶性程度高, 起病隐匿, 进展迅速<sup>[1]</sup>。患者早期症状不典型, 大多数在临床治疗时已处于临床诊断晚期<sup>[2]</sup>。近来, 胰腺癌的发病率在全球范围内呈上升趋势, 2021 年的统计数据显示<sup>[3]</sup>, 在美国所有恶性肿瘤中, 胰腺癌发病率在男性中排名第 10, 在女性中排名第 9, 在癌症相关死亡率中排名第 4。据中国国家癌症中心 2021 年统计<sup>[4]</sup>, 中国胰腺癌易发中年男性, 恶性肿瘤相关死亡率排名第 6。随着影像学、内窥镜检查、病理学等学科的发展, 癌症的诊断水平有所提高。根治性胰十二指肠切除术、吉西他滨或替吉奥辅助化疗的临床运用, 为胰腺癌的有效性治疗带来了机遇。

增殖和转移是胰腺癌患者死亡的主要原因<sup>[5]</sup>。以前的研究发现 miRNAs 是调节这 2 种生物行为的关键因素<sup>[6-7]</sup>。基于显微解剖和微阵列芯片分析技术的研究结果, 与正常胰腺导管细胞相比, miR-10b 在胰腺癌细胞中显著升高, 且 miR-10b 的高表达与患者生存率差呈正相关<sup>[8]</sup>。此外, miR-34b 在胰腺癌中的表达降低, 通过 CpG 甲基化抑制肿瘤转移<sup>[9]</sup>。有趣的是, miR-126 表达在浸润性导管腺癌中显著降低, 而 miR-126 表达增加抑制肿瘤侵袭和上皮间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 能力<sup>[10]</sup>。这些 miRNA 与胰腺癌的转移、侵袭和预后相关, 但调控这些过程的机制尚不清楚。因此, miRNA 的治疗方法仍需进一步研究。

最近, miR-450a-5p 在各种癌症中被广泛研究<sup>[11-12]</sup>。Zhang 等<sup>[13]</sup>采用生物信息学方法, 报道 miR-450a-5p 可能通过参与 MET 通路影响肺癌的发展。此外, miR-450a-5p 被证实通过靶向 WISP2 促进成脂分化; 在胃癌中, 它异常表达影响细胞增殖、迁移和侵袭<sup>[14]</sup>。然而, miR-450a-5p 在胰腺癌中的作用机制尚不清楚。

外泌体是多泡体与质膜融合时释放到细胞外环境的膜泡<sup>[15]</sup>。以往的研究<sup>[16]</sup>已经报道, 外泌体可以有效地传递生物药物, 然后通过分子途径靶向和识别肿瘤细胞, 实现精确的药物传递。本

研究旨在探索 miR-450b-5p 在胰腺癌中的表达, 将 miR-450a-5p 转染间充质干细胞来源的外泌体 (MSC-exo-miR-450a-5p), 并探讨其下游靶基因, 为胰腺癌的治疗提供潜在靶点。

## 1 材料与方法

### 1.1 数据来源

“STARBASE” (<http://starbase.sysu.edu.cn/pan-Cancer.php>) 是 1 个在线非编码 RNA 研究数据库。

“PAN-CANCER”软件可用于分析 32 种肿瘤组织与正常组织中 miRNA 和基因表达的差异。纳入患者资料主要来源于癌症基因组图谱 (the cancer genome atlas, TCGA)。用 PITA、miRanda 和 miRmap 筛选 miR-450a-5p 靶点。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 MSC-exo 提取及细胞转染

人正常胰腺细胞系 (HPC-Y5)、人胰腺癌细胞系 (CFPAC-1、PANC-1) 和人骨髓间充质干细胞系由中国科学院昆明动物研究所捐赠。常规培养于含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基 (Gibco) 中。当 hMSCs 在完全培养基中的增殖率达到 80% ~ 90% 时, 用 MEM 培养基代替原培养基, 在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 72 h。取培养上清, 以 3000 r/min 离心 30 min, 去除细胞碎片, 用 0.22 μm 滤膜过滤, 去除可能的凋亡小体。利用 Exosome 分离试剂盒沉淀 MSC-exo。Exo-Fect Exosome 转染试剂盒 (EXFT10A-1, System biosciences) 将核酸直接转移到分离的外泌体中。将 miR-450a-3p、Exo-Fect 试剂和分离的 hMSC 外泌体混合均匀后与靶细胞共培养。用脂质体 2000 (Invitrogen) 转染 Pc-BZW2 和 Pc-NC。

**1.2.2 外泌体形态鉴定** 用 TEM 观察了样品中外泌体的形态结构和大小。将样品滴加到铜网中, 60 s 后, 用滤纸吸干表面悬浮液。滴加醋酸铀试剂反应 15 s, 再用滤纸再次除去表面浮液。在白炽灯下干燥后, 在透射电镜下观察并拍照。外泌体多为碟形, 直径大于 100 nm, 具有明显的双层

膜结构<sup>[17]</sup>。

**1.2.3 NTA 粒度分析** 过滤新鲜提取的外泌体, 用磷酸盐缓冲液稀释, 然后缓慢注入 NTA 仪器 (Malvern Panalytical, Malvern, UK), 分析外泌体粒径。

**1.2.4 CFPAC-1 细胞对 MSC-exo 的摄取** 将 CFPAC-1 细胞以  $2 \times 10^5$  个细胞/孔接种于 35 mm 培养皿中, 并在 37 °C 培养箱中培养过夜。将染色液 (PKH26, Sigma-Aldrich, USA) 加入 MSC-exo 中, 混合, 然后在 4 °C 下 ( $2 \times 10^5$  g) 1 h。再悬浮后加入 CFPAC-1 细胞培养 6 h, 用 4% 多聚甲醛固定 30 min, 加入 2 mg/mL 甘氨酸中和过量醛

基, 摇瓶培养 5 min, 共加入渗透剂 1 mL, 孵育 10 min, 以 1 : 1000 的体积比加入 DAPI 染色液。样品用 PBS 清洗, 在激光共聚焦显微镜下拍照 (LSM5 Live Carl Zeiss, Germany)。

**1.2.5 RT-qPCR 分析** 使用 TRIzol 试剂 (Invitrogen, CA) 从外泌体和细胞中提取 RNA, 后立即进行反转录。提取的总 RNA 严格按照 miScript II RT 试剂盒 (QIAGEN, GER) 的指示反转录为 cDNA, 然后进行实时荧光定量 PCR。在 ABI7500 快速 PCR 仪上实时荧光定量 PCR 检测 cDNA 和对照样品的相对表达水平, 并用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法进行统计分析, 引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Tab. 1 Primer sequence

基因	上游	下游
miR-450a-5p	5'-TTTTGCGATGTGTTCC-3'	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'
U6	5'-TGCTCACTGTCTAAAATTGG-3'	5'-AGAAGAAGTCTGCTGTTGAC-3'
BZW2	5'-CTAACAGGCCAGCGGTTCAAA-3'	5'-GGACAAGTGTATCCCTGAAGACT-3'
B-actin	5'-ACACAGTGCTGTCTGGTGGT-3'	5'-TGATCTTCATGGTGTGGGAG-3'

**1.2.6 蛋白质印迹分析** 分组处理细胞, 裂解液裂解、离心, 提取上清液, 煮沸 10 min, 通过 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质并转移到 PVDF 膜上。将分离的蛋白质用 5% 脱脂乳封闭 2 h, 加一抗 4 °C 孵育过夜,  $\beta$ -actin (1 : 5000)、CD63 (1 : 1000)、TSG101 (1 : 1000)、PCNA (1 : 1000)、Ki-67 (1 : 5000)、MMP-2 (1 : 1000)、MMP-9 (1 : 1000) 和 BZW2 (1 : 500)。用 TBST 洗膜 3 次, 二抗孵育 2 h。洗膜 3 次后, ECL 溶液进行发光显影, Image J (v1.8.0.345) 软件 (ImageJ software Inc, USA) 分析数据。本实验所有抗体购自武汉三鹰生物技术公司。

**1.2.7 CCK-8 测定** 将每组细胞的浓度调整为  $1 \times 10^5$ /mL, 每孔 100  $\mu$ L 浓度接种 96 孔板。将细胞置于培养箱中培养 72 h, 加入 10  $\mu$ L/孔 CCK-8 试剂检测吸光度。

**1.2.8 EdU 增殖测定** 将每组细胞接种在 96 孔板中, 并在实验结束前 6 h 加入 EdU 试剂进行孵育。固定、渗透和洗涤后, 加入工作液, 避光孵育 30 min。用 PBS 洗涤后, 将 1X Hoechst 33342 反应溶液加入每个孔中反应 30 min。在倒置荧光显微镜下观察并收集图像。使用 ImageJ 软件对 EdU-阳性细胞的数量和 DAPI 标记的细胞的数量进行计数, 统计增殖率。

**1.2.9 划痕实验测定** 将每组细胞接种在 6 孔板上。当细胞融合率达到 80% ~ 90% 时, 用 200  $\mu$ L 移液管尖端在中心画 1 条直线, 在单层细胞之间形成划痕, 培养 24 h。在显微镜下观察并拍照, 用 ImageJ 软件测量迁移距离。

**1.2.10 Trans-well 测定** 将 20  $\mu$ L 基质胶 (Gibco) 涂布在 Transwell 上室。将含有  $6 \times 10^4$  个细胞的 200  $\mu$ L 悬浮液加入上室, 将含有 20% FBS 的 600  $\mu$ L 培养基加入下室。在继续培养 24 h 后, 移除上室。用多聚甲醛固定细胞, 用结晶紫染色, 在光学显微镜下拍照并计数。侵袭实验, 不使用基质胶, 其他步骤与上述相同。

**1.2.11 双荧光素酶报告基因测定** 通过双荧光素酶报告基因实验验证了 miR-450a-5p 和 BZW2 之间的靶向关系。构建了野生型 BZW2 3'-UTR 的荧光素酶基因质粒和携带突变体 BZW2 3'-UTR 的基因质粒。用野生型或突变基因质粒、miR-450a-5p 模拟物和 NC 共转染细胞。转染 24 h 后, 使用双荧光素酶报告基因检测试剂盒测定各组细胞的荧光素酶活性。

### 1.3 统计学处理

计量资料采用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 用 SPSS 19.0 对数据进行分析, 用 GraphPad Prism 6.0 软件作图。2 组间比较采用独立样本 *t* 检验,

多组间的比较采用单因素方差分析, 多组间任意 2 组间的比较采用 Tukeys 方法进行分析。  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 在胰腺癌组织和细胞中 miR-450a-5p 低表达

在“STARBASE”数据库中分析了共 178 个癌症患者组织样本和 4 个正常胰腺组织样本。miR-450a-5p 在胰腺癌组织中的表达水平低于正常胰腺组织 ( $P < 0.05$ ), 见图 1A。采用 RT-qPCR 检测人胰腺癌细胞系(CFPAC-1, PANC-1)和 HPC-Y5 细胞系中的 miR-450a-5p 的表达。CFPAC-1 和 PANC-1 细胞系的 miR-450a-5p 表达低于 HPC-Y5 细胞, 见图 1B。因此, miR-450a-5p 在胰腺

癌组织和细胞中的表达水平较低。

### 2.2 CFPAC-1 细胞摄取 MSC-exo-miR-450a-5p

在固定的透射电子显微镜下, 典型的 MSC-exo 和 MSC-exo-miR-450a-5p 是圆形或椭圆形的, 见图 2A。MSC-exo 和 MSC-exo-miR-450a-5p 组的外泌体的主要尺寸约为 120 nm, 见图 2B。免疫印迹结果显示, 外泌体标记蛋白(CD63 和 TSG101)在 MSC-exo 和 MSC-exo-miR-450a-5p 中表达, 见图 2C。此外, miR-450a-5p 在 MSC-exo-miR-450a-5p 组中的表达高于 MSC-exo 组, 见图 2D。检测了 CFPAC-1 细胞对外泌体的摄取能力, CFPAC-1 细胞吸收了 MSC-exo 和 MSC-exo-miR-450a-5p, 见图 2E。基于此证据, MSC-exo 和 miR-450a-5p 成功结合并被 CFPAC-1 细胞摄取。

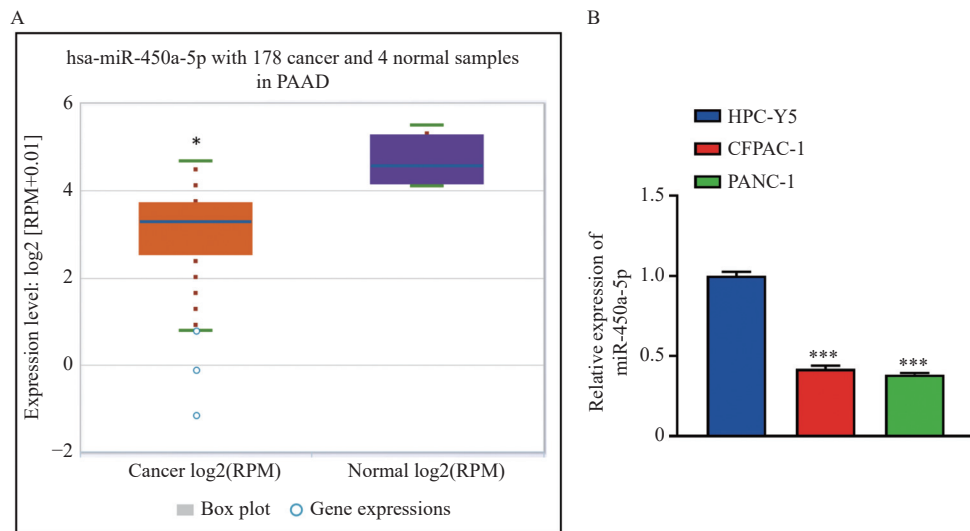


图 1 胰腺癌组织和细胞中 miR-450a-5p 呈低表达 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

Fig. 1 The expression of miR-450a-5p was low in pancreatic cancer tissues and cells. ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

A: miR-126-5p 在胰腺癌组织中的表达水平低于正常胰腺组织; 与 Normal 组比较,  $*P < 0.05$ ; B: CFPAC-1 和 PANC-1 细胞系的 miR-450a-5p 表达低于 HPC-Y5 细胞, 与 HPC-Y5 组比较,  $***P < 0.001$ 。

### 2.3 MSC-exo-miR-450a-5p 抑制 CFPAC-1 的增殖

经过处理后, 发现 MSC-exo-miR-450a-5p 显著抑制细胞增殖, 而 MSC-exo 无作用, 见图 3A; EdU 分析显示相似的结果, 见图 3B。免疫印迹检测 PCNA 和 Ki-67 增殖蛋白, MSC-exo 蛋白表达较对照组差异无统计学意义, 而 MSC-exo-miR-450a-5p 组的增殖蛋白表达量显著低于对照组 ( $P < 0.05$ ), 结果证实 MSC-exo-miR-450a-5p 对细胞增殖具有抑制作用, 见图 3C。MSC-exo-miR-450a-5p 抑制了细胞的侵袭和迁移过程, 见图 3D ~

3E。此外, MSC-exo-miR-450a-5b 也抑制了 MMP2 和 MMP9 的蛋白表达, 见图 3F。上述结果表明, MSC-exo-miR-450a-5b 抑制了 CFPAC-1 细胞的生物学行为。

### 2.4 miR-450a-5p 靶向 BZW2

PITA、miRanda 和 miRmap 用于筛选 miR-450a-5p 的靶标。取 3 个数据库的交叉点, 共筛选出 3 个基因, 见图 4A。根据“TargetScan”数据库, miR-450a-5p 和 BZW2 的结合, 见图 4B。与对照组相比, 用 miR-450a-5p 模拟物转染的 BZW2-Mut 细胞的双荧光素酶活性显著增加 ( $P < 0.01$ ),

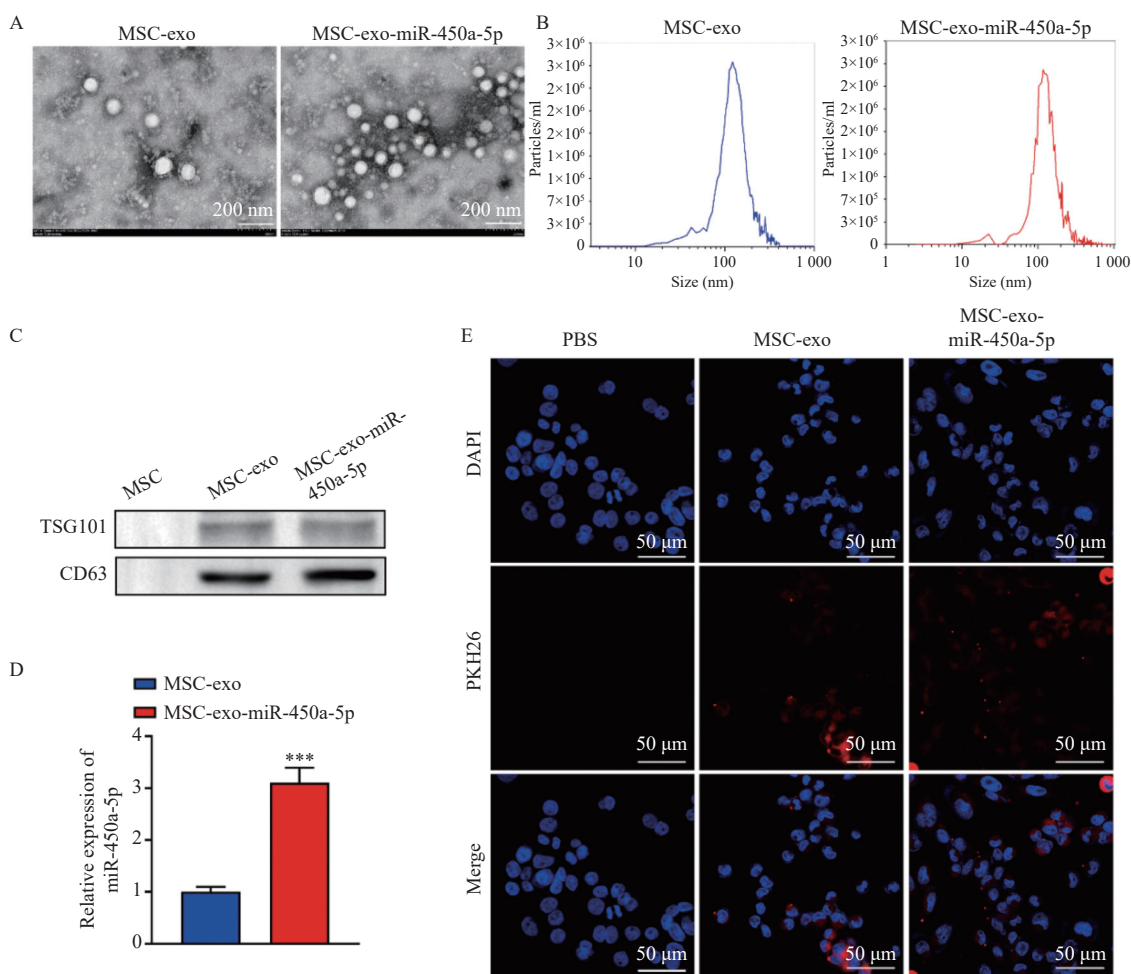


图2 CFPAC-1 细胞摄取 MSC-exo-miR-450a-5p

Fig. 2 CFPAC-1 cells uptake MSC-exo-miR-450a-5p

A: 使用生物透射电子显微镜(TEM)观察样品中外泌体的形态和大小; B: 外泌体和 MSC-exo 的平均粒径和主峰; C: 标记蛋白(CD63 和 TSG101)的表达水平在 MSC-exo-miR-450a-5p 组中较高; D: miR-450a-5p 在 MSC-exo-miR-450a-5p 组中的表达高于 MSC-exo 组; E: CFPAC-1 细胞摄取 MSC-exo 和 MSC-exo-miR-450a-5p。与 MSC-exo 组比较, \*\*\* $P<0.001$ 。

而 BZW2-WT 组的双荧光素酶活性没有显著变化, 见图 4C。因此, miR-450a-5p 靶向 BZW2。

### 2.5 BZW2 在 CFPAC-1 细胞中高表达

BZW2 在胰腺癌组织中的表达水平高于对照组, 见图 5A。同样, 它在胰腺癌细胞中的表达也较高, 见图 5B。RT-qPCR 和免疫印迹分析检测了用 miR-450a-5p 模拟物转染的胰腺癌细胞的 BZW2 表达, 结果表明 miR-450a-5p 模拟物明显降低了 BZW2 的水平, 见图 5C~5D。最后, 相关性分析证实 miR-450a-5p 负调控 BZW2 表达, 见图 5E。这些结果证实 miR-450a-5p 在胰腺癌细胞中负调控 BZW2 的表达。

### 2.6 Pc-BZW2 挽救 MSC-exo-miR-450a-5p 的功能

为了进一步证实, miR-450a-5p 与 BZW2 的相互关系, 通过回复实验进行验证。分组检查, 根据 CCK-8 和 EdU 测定的结果, MSC-exo-miR-

450a-5p 抑制了增殖, 而 pc-BZW2 逆转增殖抑制效应 ( $P<0.05$ ), 见图 6A~6B。增殖相关基因的表达也证实了这些结果。miR-450a-5p 抑制 PCNA 和 Ki-67 的表达, 而 pc-BZW2 部分逆转了这种作用 ( $P<0.05$ ), 见图 6C。此外, MSC-exo-miR-450a-5p 抑制细胞的侵袭和迁移过程, 而 Pc-BZW2 发挥了积极作用, 见图 6D~6E。同样 MMP2 和 MMP9 的蛋白质水平也被 MSC-exo-miR-450a-5p 抑制, Pc-BZW2 可逆转 ( $P<0.05$ ), 见图 6F。

## 3 讨论

细胞外囊泡是指来源于细胞的囊泡体, 其中外泌体来源于多泡小体<sup>[18]</sup>。外泌体存在于身体的各种组织、器官和体液中, 具有渗透能力<sup>[19]</sup>。外泌体在体内循环, 它们必须避免免疫细胞和排泄

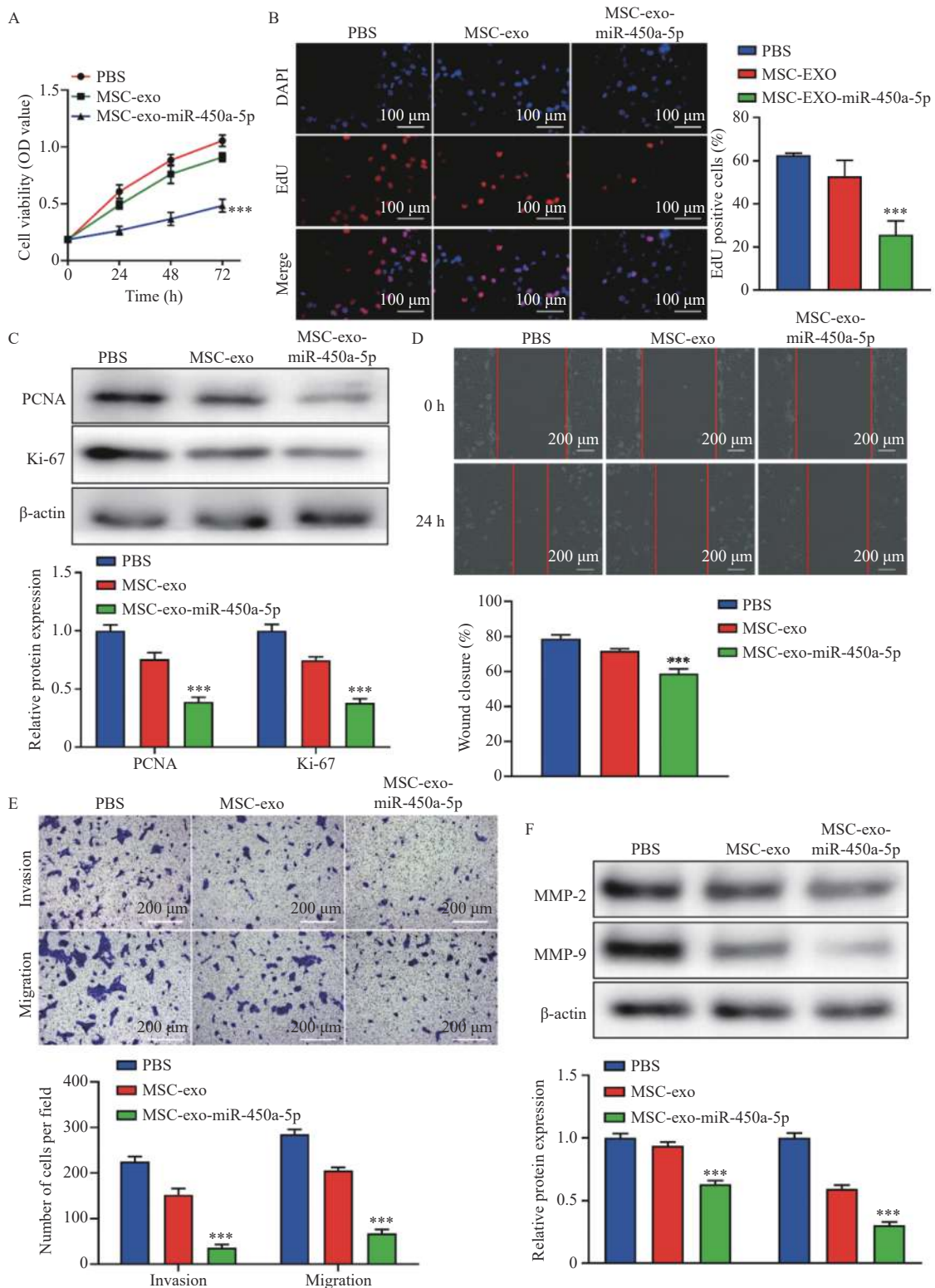


图 3 MSC-exo-miR-450a-5p 抑制 CFPAC-1 细胞生物学行为

Fig. 3 MSC-exo-miR-450a-5p inhibits the biological behavior of CFPAC-1 cells

A: MSC-exo-miR-450a-5p 显著抑制胰腺癌细胞增殖; B: EdU 测定 MSC-exo-miR-450a-5p 对细胞的增殖影响; C: 用蛋白质印迹法检测增殖相关蛋白的水平; D ~ E: MSC-exo-miR-450a-5p 抑制侵袭和迁移; F: MMP2 和 MMP9 的蛋白水平被 MSC-exo-miR-450a-5p 抑制, 与 MSC-exo 组比较, \*\*\* $P < 0.001$ 。

器官, 如肝、肺和肾<sup>[20]</sup>。它们的靶组织效率取决于功能化程度以及外泌体与靶细胞相互作用的强度。基于外泌体的分子转运能力和靶向特性, 基

于外泌物的分子转运容量和靶向特征, 研究人员开发了具有精确靶向性的外泌体细胞递送载体<sup>[21]</sup>。通过在供体细胞中共表达蛋白质/RNA 转

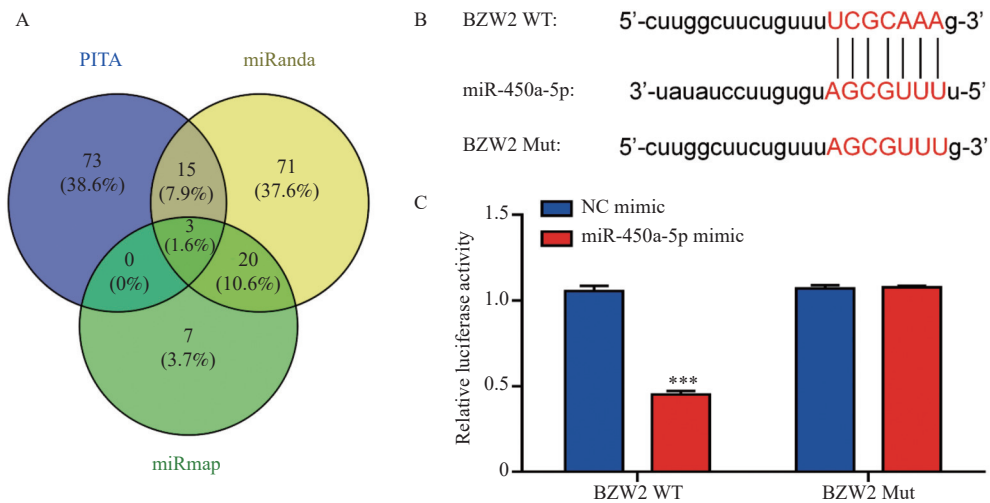


图 4 miR-450a-5p 靶向 BZW2

Fig. 4 MiR-450a-5p targets BZW2

A: PITA、miRanda 和 miRmap 数据库中 miR-450a-5p 靶点的交叉点; B: miR-450a-5p 和 BZW2 的组合; C: 双荧光素酶报告基因测定, 与 NC mimic 组比较, \*\*\* $P < 0.001$ 。

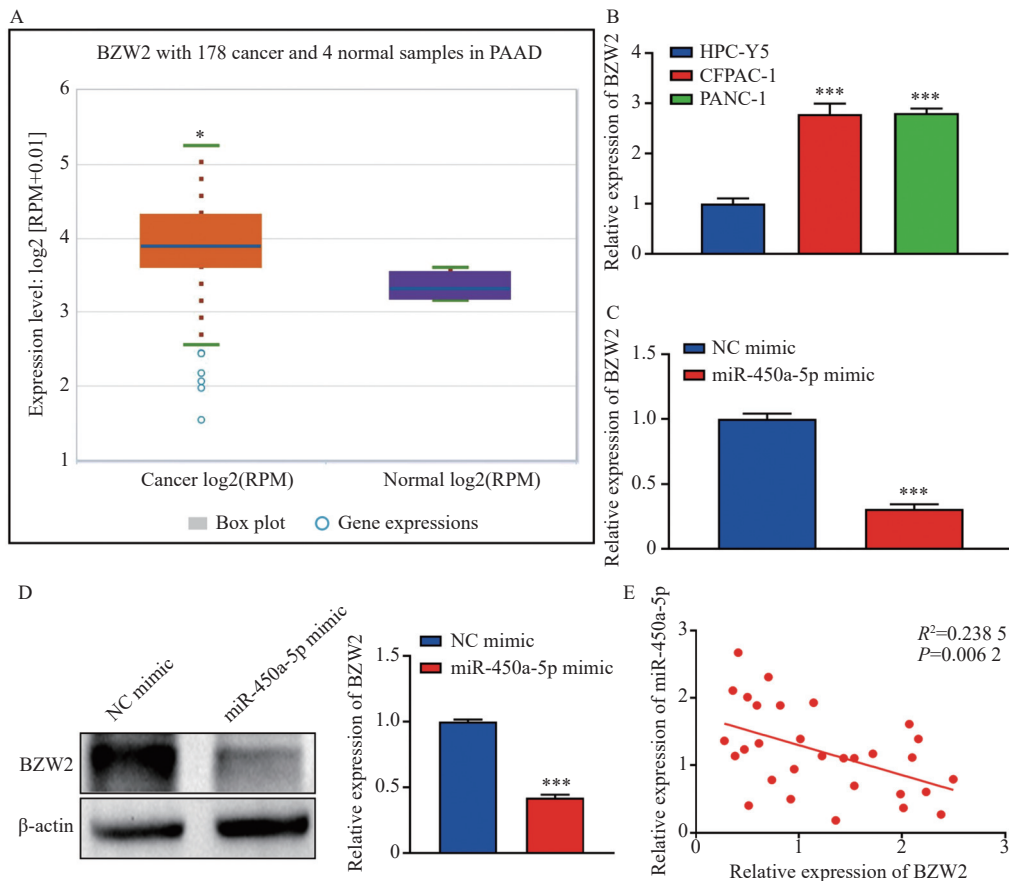


图 5 BZW2 在 CFPAC-1 细胞中呈高表达

Fig. 5 BZW2 is highly expressed in CFPAC-1 cells

A: 根据“StarBase”数据库, BZW2 在胰腺癌组织中的表达水平高于正常组织, 与 Normal 组比较, \* $P < 0.05$ 。B: BZW2 在胰腺癌细胞中表达较高, 与 HPC-Y5 组比较, \*\*\* $P < 0.001$ 。C: RT-qPCR 检测用 miR-450a-5p 模拟物转染的胰腺癌细胞中 BZW2 的基因表达; D: 免疫印迹分析检测用 miR-450a-5p 模拟物转染的胰腺癌细胞中 BZW2 的蛋白表达; E: miR-450a-5p 与 BZW2 的相关性分析, 与 NC mimic 组比较, \*\*\* $P < 0.001$ 。

运蛋白, 可以将特定的蛋白质/RNA 分子装载到外泌体中<sup>[22]</sup>。Kamerkar 等<sup>[23]</sup>指出, 与脂质体相

比, 外泌体表现出更高的递送 siRNA 分子的能力, 抑制胰腺肿瘤生长。因此, 本研究构建了 MSC-

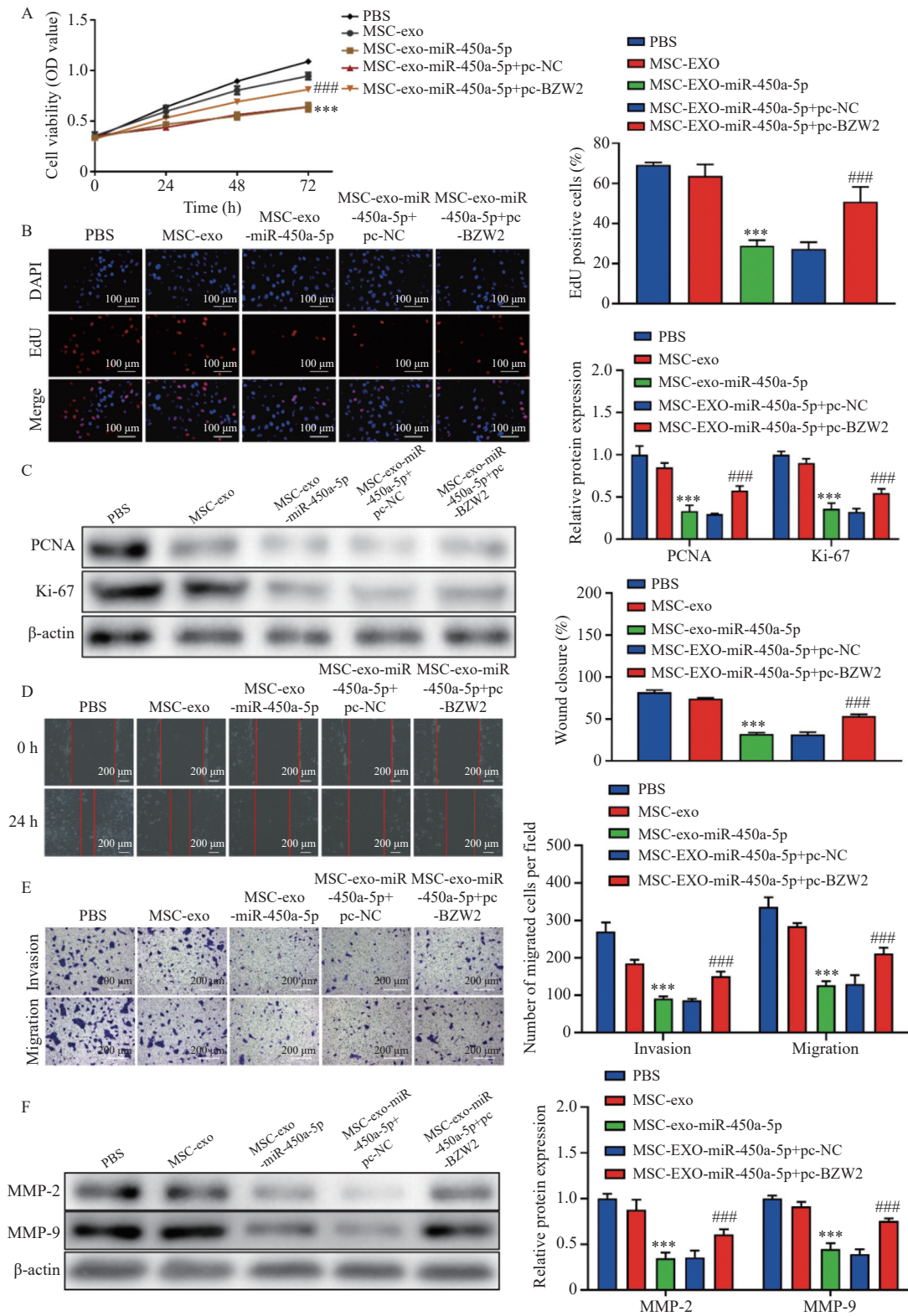


图 6 Pc-BZW2 逆转 MSC-exo-miR-450a-5p 的增殖抑制功能

Fig. 6 Pc-BZW2 reverses the proliferation inhibition function of MSC exo miR-450a-5p

A: 基于 CCK-8 测定, MSC-exo-miR-450a-5p 抑制 CFPAC-1 增殖, 而 Pc-BZW2 逆转了增殖效应; B: 分组处理细胞, EdU 实验检测, BZW2 逆转 MSC-exo-miR-450a-5p 对胰腺癌的增殖效应; C: miR-450a-5p 抑制 PCNA 和 Ki-67 的表达, 而 Pc-BZW2 部分逆转了这种作用; D: 分组处理, MSC-exo-miR-450a-5p 抑制侵袭过程; E: 分组处理, MSC-exo-miR-450a-5p 抑制迁移过程; F: MMP2 和 MMP9 的蛋白水平被 MSC-exo-miR-450a-5p 抑制, 但 Pc-BZW2 可逆转, 与 MSC-exo 组比较,  $***P<0.001$ , 与 MSC-exo-miR-450a-5p+pc-NC 组比较,  $####P<0.001$ 。

exo-miR-450a-5p, 以研究 miR-450a-5b 在胰腺癌细胞中的功能。有趣的是, miR-450a-5p 在胰腺癌组织和细胞中低表达, MSC-exo-miR-450a-5p 可显著抑制 CFPAC-1 的增殖。

到目前为止, 还没有研究 miR-450a-5p 在胰腺癌中的作用。然而, 据报道, 它在各种疾病中异常表达<sup>[11, 14]</sup>。有趣的是, EGFR 抑制剂(Tarceva)已被批准用于治疗晚期癌症, 尤其是 EGFR 靶点突变肿瘤<sup>[24]</sup>。在食管鳞状细胞癌中, 靶向 DUSP10 参与自噬<sup>[12]</sup>。miR-450a-5p/SOX2 通路在调节结肠癌肿瘤干性、血管生成, 而血管生成模拟中的独特机制可能是 CRC 的潜在治疗靶点<sup>[25]</sup>。在之前的一项研究中, SOX2 的表达在癌症的侵袭和转移中起着关键的调节作用。Sharma 等<sup>[26]</sup>指出, SOX2 的表达随着胰腺上皮内瘤变的程度而增加。因此, miR-450a-5p 可能通过调节各种基因或途径影响胰腺癌的发展。

在本研究中, miR-450a-5p 负调控胰腺癌细胞中 BZW2 的表达。BZW2 基因编码的蛋白质含有亮氨酸拉链和 W2 结构域<sup>[27]</sup>。例如, BZW2 抑制 NF- $\kappa$ B 和 NFAT 的转录活性, 表明 BZW2 可能是心脏发育的潜在候选基因<sup>[28]</sup>。NF- $\kappa$ B 是一种具有多效性转录调控的多肽, 它通过激活和调节各种肿瘤相关基因的转录, 促进细胞生长, 抵抗细胞凋亡, 引起细胞恶性转化, 促进肿瘤细胞转移<sup>[29-30]</sup>。此外, 敲低 BZW2 可抑制乳腺上皮细胞的增殖, 并显著下调转录激活剂、 $\beta$ -酪蛋白和催乳素受体的表达水平<sup>[31]</sup>。值得注意的是, 到目前为止, miR-450a-5p 在胰腺癌中的功能和分子机制尚未得到研究。然而, 根据上述证据, BZW2 的一些线索可能会被揭示出来。重要的是, 笔者的结果证实 Pc-BZW2 逆转了 MSC-exo-miR-450a-5p 的功能, BZW2 的具体作用机制还有待进一步探索。

综上所述, 间充质干细胞来源的外泌体是 1 种新的递送系统, 用于胰腺癌治疗中 miRNA 的靶向递送。它们通过靶向 BZW2 转运 miR-450a-5p 来抑制胰腺癌细胞的增殖, 这为未来胰腺癌的治疗和预防研究提供了重要线索。

### [参考文献]

[1] Stoffel E M, Brand R E, Goggins M. Pancreatic cancer: Changing epidemiology and new approaches to risk assessment, early detection, and prevention[J]. *Gastroenterology*, 2023, 164(5): 752-765.

[2] Yu J, Yang X, Wu H, et al. Clinical significance of color ultrasound, MRI, miR-21, and CA199 in the diagnosis of pancreatic cancer[J]. *J Oncol*, 2021, 2021: 2380958.

[3] Ji J, Cao C, Xu H: Minimally invasive intervention of obstructive jaundice in pancreatic cancer[J]. *Integrative Pancreatic Intervention Therapy*, 2021.

[4] Hu ZI, O'Reilly EM. Therapeutic developments in pancreatic cancer[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2024, 21(1): 7-24.

[5] Mihaljevic A L, Michalski C W, Friess H, et al. Molecular mechanism of pancreatic cancer—understanding proliferation, invasion, and metastasis[J]. *Langenbeck's Archives of Surgery*, 2010, 395(4): 295-308.

[6] Fu Y, Liu X, Chen Q, et al. Downregulated miR-98-5p promotes PDAC proliferation and metastasis by reversely regulating MAP4K4[J]. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2018, 37(1): 130.

[7] Jiang M, Jike Y, Liu K, et al. Exosome-mediated miR-144-3p promotes ferroptosis to inhibit osteosarcoma proliferation, migration, and invasion through regulating ZEB1[J]. *Mol Cancer*, 2023, 22(1): 113.

[8] Nakata K, Ohuchida K, Mizumoto K, et al. MicroRNA-10b is overexpressed in pancreatic cancer, promotes its invasiveness, and correlates with a poor prognosis[J]. *Surgery*, 2011, 150(5): 916-922.

[9] Vogt M, Munding J, Grüner M, et al. Frequent concomitant inactivation of miR-34a and miR-34b/c by CpG methylation in colorectal, pancreatic, mammary, ovarian, urothelial, and renal cell carcinomas and soft tissue sarcomas[J]. *Virchows Archiv*, 2011, 458(3): 313-322.

[10] Hamada S, Satoh K, Fujibuchi W, et al. MiR-126 Acts as a tumor suppressor in pancreatic cancer cells via the regulation of ADAM9[J]. *Molecular Cancer Research*, 2012, 10(1): 3-10.

[11] Zhang Y, Yu M, Dai M, et al. miR-450a-5p within rat adipose tissue exosome-like vesicles promotes adipogenic differentiation by targeting WISP2[J]. *Journal of Cell Science*, 2017, 130(6): 1158-1168.

[12] Chen H, Yao X, Di X, et al. MiR-450a-5p inhibits autophagy and enhances radiosensitivity by targeting dual-specificity phosphatase 10 in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Cancer Lett*, 2020, 28:483: 114-126.

[13] Zhang Z W, Chen J J, Xia S H, et al. Long intergenic non-

- protein coding RNA 319 aggravates lung adenocarcinoma carcinogenesis by modulating miR-450b-5p/EZH2[J]. *Gene*, 2018, 15:650: 60-67.
- [14] Zhao Y J, Zhang J, Wang Y C, et al. MiR-450a-5p inhibits gastric cancer cell proliferation, migration, and invasion and promotes apoptosis via targeting CREB1 and inhibiting AKT/GSK-3 $\beta$  signaling pathway[J]. *Front Oncol*, 2021, 29:11: 633366.
- [15] Ribeiro M F, Zhu H, Millard R W, et al. Exosomes function in pro- and anti-angiogenesis[J]. *Current Angiogenesis*, 2013, 2(1): 54.
- [16] Yeo R, Lai R C, Zhang B, et al. Mesenchymal stem cell: an efficient mass producer of exosomes for drug delivery[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2013, 65(3): 336-341.
- [17] Gao L, Qiu F, Cao H, et al. Therapeutic delivery of microRNA-125a-5p oligonucleotides improves recovery from myocardial ischemia/reperfusion injury in mice and swine[J]. *Theranostics*, 2023, 13(2): 685-703.
- [18] Ageta H, Tsuchida K. Post-translational modification and protein sorting to small extracellular vesicles including exosomes by ubiquitin and UBLs[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2019, 76(24): 4829-4848.
- [19] Gao W, Fei L, Liu L, et al. Endothelial colony-forming cell-derived exosomes restore blood-brain barrier continuity in mice subjected to traumatic brain injury[J]. *Experimental Neurology*, 2018, 307: 99-108.
- [20] Silverman J M, Clos J, Horakova E, et al. Leishmania exosomes modulate innate and adaptive immune responses through effects on monocytes and dendritic cells[J]. *The Journal of Immunology*, 2010, 185(9): 5011-5022.
- [21] Paskes M D A, Entezari M, Mirzaei S, et al. Emerging role of exosomes in cancer progression and tumor microenvironment remodeling[J]. *J Hematol Oncol*, 2022, 15(1): 83.
- [22] Huang J, Yu M, Yin W, et al. Development of a novel RNAi therapy: Engineered miR-31 exosomes promoted the healing of diabetic wounds[J]. *Bioactive Materials*, 2021, 6(9): 2841-2853.
- [23] Kamekar S, LeBleu V S, Sugimoto H, et al. Exosomes facilitate therapeutic targeting of oncogenic KRAS in pancreatic cancer[J]. *Nature*, 2017, 546(7659): 498-503.
- [24] Choi H D, Chang M J. Eye, hepatobiliary, and renal disorders of erlotinib in patients with non-small-cell lung cancer: A meta-analysis[J]. *PLoS One*, 2020, 15(7): e0234818.
- [25] Chen J, Chen S, Zhuo L, et al. Regulation of cancer stem cell properties, angiogenesis, and vasculogenic mimicry by miR-450a-5p/SOX2 axis in colorectal cancer[J]. *Cell Death Disease*, 2020, 11: 173.
- [26] Sharma N S, Gupta V K, Dauer P, et al. O-GlcNAc modification of Sox2 regulates self-renewal in pancreatic cancer by promoting its stability[J]. *Theranostics*, 2019, 9(12): 3410-3424.
- [27] Loughran G, Firth A E, Atkins J F, et al. Translational autoregulation of BZW1 and BZW2 expression by modulating the stringency of start codon selection[J]. *PLoS ONE*, 2018, 13(2): e0192648.
- [28] Antony P, Petro J B, Carlesso G, et al. B cell receptor directs the activation of NFAT and NF- $\kappa$ B via distinct molecular mechanisms[J]. *Experimental Cell Research*, 2003, 291(1): 11-24.
- [29] Yu H, Lin L, Zhang Z, et al. Targeting NF- $\kappa$ B pathway for the therapy of diseases: Mechanism and clinical study[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5(1): 209.
- [30] Liu X, Hogg G D, Zuo C, et al. Context-dependent activation of STING-interferon signaling by CD11b agonists enhances anti-tumor immunity[J]. *Cancer Cell*, 2023, 41(6): 1073-1090.e12.
- [31] Sun R Q, Qing Z L I, Yan H B, et al. Bzw2 Promotes Proliferation and Lactation of Mammary Epithelial Cell in Dairy Goat[J]. *农业科学学报:英文版*, 2012, 11(11): 8.