・论 著・ doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.06.001

鼻咽癌外泌体 miR-20a 通过靶向 BCL2L11 基因抑制 肿瘤相关巨噬细胞凋亡^{*}

吕龙辉^{1,2},黄晓悫²,熊小明³,张 旭⁴,杨志惠³,方红雁^{1,5△}

(1. 西南医科大学附属医院耳鼻喉科,四川泸州 6460000;2. 重钢总医院耳鼻喉科,重庆 400081;

3. 西南医科大学附属医院病理科,四川泸州 646000;4. 西南医科大学形态学实验中心,四川泸州 64600;

5. 重庆市人民医院耳鼻咽喉头颈外科 400014)

[摘要] 目的 探索鼻咽癌外泌体 microRNA 是否通过靶向凋亡基因而抑制肿瘤相关巨噬细胞(TAM)凋亡。方法 通过 生物信息学方法确定目标 microRNA 及其靶基因,检测鼻咽癌患者血清及鼻咽癌细胞培养基中的外泌体内 miR-20a 的表达量。 应用 miR-20a 的拟似物及抑制物转染巨噬细胞;并检测干预后的凋亡指数及凋亡通路相关蛋白。结果 miR-20a 在鼻咽癌外泌 体中表达显著上调。miR-20a 的靶基因为 BCL2L11,过表达 miR-20a 可以抑制巨噬细胞凋亡,且凋亡通路相关蛋白 Bim、caspase-9 和 caspase-3 均显著减少(P<0.05)。结论 miR-20a 通过抑制 Bim-caspase-9-caspase-3 凋亡途径的活化从而抑制鼻咽癌中 TAM 凋亡。

 [关键词]
 鼻咽肿瘤;外泌体;miR-20a;BCL2L11;巨噬细胞

 [中图分类号]
 R766.3
 [文献标识码]
 A
 [文章编号]
 1671-8348(2017)06-0721-04

Exosome-derived miR-20a inhibit apoptosis of TAM by targeting BCL2L11 in nasopharyngeal carcinoma*

Lv Longhui^{1,2}, Huang Xiaoque², Xiong Xiaoming³, Zhang Xu⁴, Yang Zhihui³, Fang Hongyan^{1,5}

(1. Department of ENT, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China;

2. Department of ENT, General Hospital of Chongging Iron & Steel Group Company, Chongging 400081, China;

3. Department of Pathology, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China;

4. Morphological Experimental Center, Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China;

5. Department of ENT, the People's Hospita lof Chongqing, Chongqing 400014, China)

[Abstract] Objective To investigate whether exosome-derived microRNA of nasopharyngeal carcinoma suppresses apoptosis of tumor associated macrophage (TAM). Methods Target microRNAs and genes were determined by bioinformatics methods. Isolated exosomes were used to detect miR-20a expression by qRT-PCR. Furthermore, apoptosis index and proteins involved in apoptotic pathways were detected after miR-20a mimic and inhibitor transfection into macrophages. Results miR-20a expression was upregulated in isolated exosomes, miR-20a target gene was BCL2L11. MiR-20a overexpression could inhibit apoptosis of macrophages, meanwhile, apoptotic pathways related proteins Bim, caspase-9 and caspase-3 were significantly suppressed by miR-20a mimic(P < 0.05). Conclusion miR-20a can suppress activation of Bim-caspase-9-casepase-3 and resulting in apoptotic inhibition of macrophages.

[Key words] nasopharyngeal neoplasms; exosome; miR-20a; BCL2L11; macrophages

鼻咽癌是高发的头颈部恶性肿瘤之一^[1]。现有研究发现 肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophages,TAM)在肿 瘤的生长、侵袭和转移过程中发挥重要作用^[2],在鼻咽癌中也 是如此^[3-4]。在TAM发挥促癌作用的过程中,表现出凋亡受 抑制的现象,在可能参与调节TAM凋亡的因素中,来自肿瘤 细胞的外泌体的 microRNA(miRNA)可能是一个重要因素。 相关研究表明,在鼻咽癌中,肿瘤细胞来源的外泌体中有大量 miRNA,其中有一些是显著上调的^[5]。本研究借助生物信息 学数据库及软件对上述 miRNA 的可能靶点和相关信号通路 进行预测,发现 hsa-miR-20a-5p(以下简称 miR-20a)可能通过 抑制 BCL2L11和 CASP2 基因而参与了抑制凋亡。本研究对 鼻咽 癌外 泌体中的 miR-20a 是否通过 靶向 BCL2L11 或 CASP2 基因抑制 TAM 凋亡,以及相关的机制进行了探讨。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂 抗体 F4/80 购自美国 Abcam 公司;抗

体 Bim、caspase-2 和 α-Tubulin 均购自 Cell Signaling Technology 公司;人正常鼻咽上皮细胞株 NP69 和鼻咽癌细胞株 5-8F 购自中国科学院上海细胞研究所细胞库;人单核/巨噬细胞分 离试剂 Ficoll-Paque 购自 GE 公司;人血清及培养基外泌体提 取试剂盒、miR-20a 抑制物和拟似物及各自相应的对照试剂均 购自广州锐博生物科技有限公司。

1.2 生物信息学检索方法 使用 TargetScan、MicroCosm 和 miRTarBase 3 个在线分析数据库,预测即有研究证实了的在 鼻咽癌中表达显著上调的 miRNA 的靶 mRNA;从预测结果中 找出 3 个软件预测的交集;再借助 UniProt 在线数据库筛选出 与凋亡功能相关的候选靶 mRNA 及对应的 miRNA;最后利用 miRanda 在线数据库/软件预测 miRNA 的相互作用位点。

1.3 免疫组织化学染色方(SP)法 切片脱蜡至水后,柠檬酸盐液加热修复抗原,灭活后加一抗 F4/80 过夜,第2天加生物素标记二抗,然后滴加 SP,用 DAB 显色。最后复染苏木素并

^{*} **基金项目:**国家自然科学基金资助项目(81101679);四川省科技厅自然科学基金资助项目(14JC0178)。 作者简介:吕龙辉(1980-),在 读硕士,主治医师,主要从事鼻窦炎及鼻咽癌方面的研究。 △ 通信作者,E-mail:emelyhui@163.com。

脱水、透明、封片。

1.4 外泌体分离及电镜成像 患者血清来源:选取 10 例临床 明确诊断鼻咽癌的患者,同时招募 10 名健康志愿者;分别抽取 他们的空腹静脉血 12 mL。外泌体提取按试剂盒说明进行,简 言之:将样本于 2 000×g 离心 20 min 后转移上清液至新管,加 入外泌体分离剂混匀后于4 ℃静置 30 min 至 2 h;然后4 ℃, 15 000×g 离心 30 min;弃上清液即得外泌体。取 PBS 重悬的 外泌体 50 μ L,使之吸附于带有聚醋酸甲基乙烯脂支持膜的铜 网上,再经 2% 磷钨酸染色,使用透射电镜观察、摄片。

1.5 细胞培养 NP69 细胞使用 K-SFM 完全培养基培养,5-8F 细胞使用含 10% 胎牛血清(FBS)的 RPMI-1640 培养基培 养。培养条件为 37 ℃,5% CO₂。

1.6 人巨噬细胞的分离和激活 按照 Ficoll-Paque 试剂的流 程对健康志愿者的外周血离心获得人巨噬细胞,将其用培养基 稀释,根据实验需要接种于 24 孔板或 96 孔板;然后在培养基 中加入脂多糖(LPS,100 ng/mL)和干扰素(IFN-γ,20 ng/mL) 作为刺激因子模拟体内炎性环境^[6]。

1.7 外泌体荧光标记、成像及巨噬细胞摄取实验 将经过细胞膜红色荧光染料 PKH26 标记过的外泌体 DMEM 重悬液替换掉 24 孔板中培养巨噬细胞的培养基,继续孵育 24 h;然后固定、染色、观察和摄片^[7]。

1.8 不同来源外泌体处理巨噬细胞及相关检测

1.8.1 外泌体处理巨噬细胞 将不同来源提取的外泌体以 200 ng/mL 的终浓度加入分离培养的巨噬细胞;相应分为 NP69组、5-8F组、鼻咽癌患者组、健康志愿者组和不加外泌体 的对照组。

1.8.2 凋亡指数测定 外泌体处理 72 h 后收集各组巨噬细胞并使用 Annexin V/PI 双染细胞凋亡检测方法检测各组细胞的凋亡指数。

1.8.3 Western blot 实验 外泌体处理 72 h 后提取各组巨噬 细胞总蛋白,按常规流程进行 Western blot 检测 caspase-2 和 Bim 蛋白定量。

1.9 实时荧光定量 PCR 检测外泌体内 miR-20a 的表达 按 常规流程检测 NP69 组、5-8F 组、鼻咽癌患者组、健康志愿者组 的培养基或血清中分离的外泌体中的 miR-20a 的表达, PCR 反应步骤:95 ℃ 10 min;95 ℃ 15 s,60 ℃ 1 min,共40 个循环。 反应以 U6 为内参照。miR-20a 引物序列:上游引物 5'-GCT CA GTT CGC TCT GAG CAG G-3',下游引物 5'-CAG GGT CCC AGT GGA GGT-3'; U6 引物序列:上游引物 5'-CTC GCT TCG GCA GCA CA-3',下游引物 5'-AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT-3'。

1.10 miR-20a 拟似物及抑制物的转染 将 5-8F 细胞接种于 24 孔板中,之后用终浓度为 1 μmol/L 的拟似物、拟似物对照、 抑制物和抑制物对照工作液加入到细胞培养基中,继续培养 48 h 后提取培养基中的外泌体并与原代培养的巨噬细胞共孵 育。经过处理的巨噬细胞 72 h 后进行凋亡指数检测及 Western blot 实验检测 Bim 蛋白、caspase-9 蛋白和 caspase-3 蛋白 的表达情况。

1.11 统计学处理 采用 SigmaPlot12.0 软件分析数据。计量资料以 x±s 表示,多样本均数之间比较采用单因素方差分析(ANOVA),以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 生物信息学检索结果 经生物信息学分析发现:鼻咽癌 患者血清或者鼻咽癌细胞培养基中表达显著上调的 miRNA

中 miR-20a 与凋亡有最密切的关系,其与凋亡有关的候选靶基因为 BCL2L11 和 CASP2 基因(分别编码 Bim 和 caspase-2)。 其中 BCL2L11 mRNA 存在两个与 miR-20a 互补的区域。

2.2 鼻咽癌组织中巨噬细胞的检测及外泌体分离、成像 经 巨噬细胞特异性抗体 F4/80 的免疫组织化学染色,巨噬细胞 细胞质呈棕黄色;可见大量巨噬细胞散布于癌巢及周边间质 中,见图 1。从鼻咽癌患者的血清及 5-8F 细胞的培养基中均 可以分离出丰富的外泌体,经透射电镜成像,这些外泌体为圆 形的膜状结构,直径约 80~120 nm,见图 2。



图 1 鼻咽癌组织的 F4/80 免疫组织化学染色(×400)



图 2 外泌体的透射电镜成像

2.3 巨噬细胞的分离培养及对外泌体的摄取 由健康志愿者 外周血分离获得的人巨噬细胞镜下呈圆形或椭圆形,常有不规 则突起或伪足,见图 3。在荧光显微镜下可以见到巨噬细胞细 胞质内吞噬了数量不一并标记了红色荧光染料的外泌体,见 图 4。



图 3 巨噬细胞的原代培养

2.4 不同来源外泌体处理巨噬细胞后的相关检测 来自 5-8F组和鼻咽癌患者组提取的外泌体处理的巨噬细胞的凋亡指 数显著低于对照组、NP69 组和健康志愿者组(P < 0.05),见图 5。各组 caspase-2 蛋白差异无统计学意义(P > 0.05),见图 6; 5-8F 组和鼻咽癌患者组的外泌体处理巨噬细胞后的 Bim 蛋白 显著少于其他组(P < 0.05),见图 7。来自 5-8F 组外泌体中的 miR-20a 水平显著高于 NP69 组(P < 0.01);由鼻咽癌患者组 提取的外泌体中的 miR-20a 的水平显著高于健康志愿者组 (P < 0.05),见图 8。









2.5 miR-20a 拟似物及抑制物的转染实验 与 miR-20a 抑似 物对照组比较,miR-20a 拟似物组的凋亡指数显著减少(P< 0.01);而相对于 miR-20a 抑制物对照组,抑制物组的凋亡指数 差异无统计学意义(P>0.05),见图 9。Bim 蛋白:相对于 miR-20a 抑似物对照组,miR-20a 拟似物组的 Bim 蛋白水平显著减 少(P<0.05);而相对于 miR-20a 抑制物对照组,抑制物组的 Bim 蛋白差异无统计学意义(P > 0.05),见图 10。cleaved caspase-9:相对于 miR-20a 抑似物对照组,miR-20a 拟似物组 的 cleaved caspase-9 蛋白水平显著减少(P < 0.05);而相对于 miR-20a 抑制物对照组,抑制物组的 cleaved caspase-9 蛋白差 异无统计学意义(P > 0.05),见图 11。cleaved caspase-3:相对于 miR-20a 抑制物对照组,miR-20a 拟似物组的 cleaved caspase-3 蛋白水平显著减少(P < 0.05);而相对于 miR-20a 抑制物对照组,抑制物组的 cleaved caspase-3 蛋白差异无统计学意义(P > 0.05),见图 12。



*:P<0.05,与对照组、NP69组、健康志愿者组比较。
 图 7 不同来源外泌体处理后各组巨噬
 细胞的 Bim 蛋白表达



图 8 血清或培养基中分离的外泌体中 miR-20a 表达量(实时荧光定量 PCR 法)





3 讨 论

TAM 是肿瘤微环境中重要的成分^[8+9]。在本研究中,在 鼻咽癌活检组织中也查见大量 TAM,说明其可能参与了促鼻 咽癌的作用。本研究前期从鼻咽癌患者血清和鼻咽癌细胞的 培养基中均分离出丰富的外泌体,原代培养的巨噬细胞可以对 这些外泌体吞噬,且随后凋亡会受到抑制;因此考虑鼻咽癌外 泌体可能通过其内含的 miRNA 抑制了 TAM 的凋亡过程。外 泌体是细胞来源的膜包被的微小囊泡,可以携带一系列的功能 性分子如蛋白质、mRNA 和 miRNA 等。肿瘤来源的外泌体可 以借助其内含的 miRNA 对肿瘤微环境中的成纤维细胞、血管 内皮细胞等进行 调节^[10-12]。miRNA 是一类非编码单链小

重庆医学 2017 年 2 月第 46 卷第 6 期

RNA 分子,可以通过与靶基因 mRNA 的 3'-UTR 结合而在转 录后水平沉默特定基因^[13]。借助对相关文献及生物信息学数 据库的分析,本研究确定鼻咽癌细胞可能是借助外泌体中的 miR-20a 抑制了 BCL2L11 和(或)CASP2 基因而参与抑制凋 亡。本研究证实鼻咽癌细胞可以过表达 miR-20a,而且可以经 过外泌体转移进入巨噬细胞,进而抑制其凋亡。对凋亡通路关 键蛋白的定量检测发现 miR-20a 调控的靶基因是 BCL2L11 而 非 CASP2。分析得知: miR-20a 和 BCL2L11 mRNA 的 3'-UTR 之间存在高度匹配的序列; miR-20a 可以通过与之互补 结合而抑制 BCL2L11 mRNA 的翻译。BCL2L11 基因编码的 Bim 蛋白属于 Bcl-2 家族一员,是促凋亡因子。Bim 可以通过 一些列过程最终募集并激活 caspase-9,再由 caspase-9 激活 caspase-3 使细胞进入凋亡^[14]。miR-20a 拟似物组的上述 3 种 蛋白水平均显著低于对照组,证明了过表达的 miR-20a 是通过 抑制 Bim-caspase-9-caspase-3 途径而抑制巨噬细胞凋亡的。

综上,本研究发现了鼻咽癌微环境中,癌细胞可以过表达 miR-20a并通过外泌体将其传递到 TAM 而抑制其凋亡,机制 是 miR-20a 抑制了 Bim-caspase-9-casepase-3 途径的活化。因 此,基于此发现可以设计新的抗肿瘤的研究或治疗策略。

参考文献

- [1] Yoshizaki T,Ito M, Murono S, et al. Current understanding and management of nasopharyngeal carcinoma[J]. Auris Nasus Larynx, 2012, 39(2):137-144.
- [2] Kim J, Bae JS. Tumor-associated macrophages and neutrophils in tumor microenvironment[J]. Mediators Inflamm, 2016,2016:6058147.
- [3] Duan Y, Li Z, Cheng S, et al. Nasopharyngeal carcinoma progression is mediated by EBER-triggered inflammation via the RIG-I pathway[J]. Cancer Lett, 2015, 361(1):67-74.
- [4] Shimakage M, Sakamoto H. Macrophage involvement in Epstein-Barr virus-related tumors [J]. Exp Ther Med, 2010,1(2):285-291.
- [5] Ye SB, Li ZL, Luo DH, et al. Tumor-derived exosomes promote tumor progression and T-cell dysfunction through the regulation of enriched exosomal microRNAs in human nasopharyngeal carcinoma [J]. Oncotarget, 2014,5(14):5439-5452.
- [6] Solinas G, Germano G, Mantovani A, et al. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancerrelated inflammation[J]. J Leukocyte Biol, 2009, 86(5): 1065-1073.
- [7] Lee JK, Park SR, Jung BK, et al. Exosomes derived from mesenchymal stem cells suppress angiogenesis by downregulating VEGF expression in breast cancer cells [J]. PLoS One, 2013, 8(12): e84256.
- [8] Van Overmeire E, Laoui D, Keirsse J, et al. Mechanisms driving macrophage diversity and specialization in distinct tumor microenvironments and parallelisms with other tissues [J]. Front Immunol, 2014, 5(3); 127.
- [9] Tu E, Chia PZ, Chen W. TGFβ in T cell biology and tumor immunity: angel or devil? [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2014, 25(4):423-435. (下转第 728页)

本实验结果表明,HIFU治疗裸鼠肝移植瘤后,再注入载 HSV-TK 的纳米级超声分子探针治疗,在残瘤中 MVD、 VEGF 及 HIF-1α的表达均低于 HIFU 联合包裹 HSV-TK 基 因的超声微泡组及其他对照组。这表明 HIFU 联合载 HSV-TK 基因的纳米级超声分子探针治疗可以更有效地抑制肿瘤 组织中血管的生成,使得肿瘤生长的血供条件受限,造成肿瘤 内部出现缺血坏死,从而提高肿瘤的治疗效果。分析其机制, 可能是由于载 HSV-TK 基因的纳米级超声分子探针,改善了 肿瘤组织中的缺氧环境,进而使 HIF-1α 的表达降低,使得 VEGF 的表达下调来降低残瘤中的 MVD。但 HIFU 联合载 HSV-TK 基因的纳米级超声分子探针治疗裸鼠肝移植瘤,其 导致缺氧环境改善的具体机制目前尚不明确,可能与治疗过程 中自由基的产生有关,这有待于进一步研究。

综上所述,HIFU 联合载 HSV-TK 基因的纳米级超声分 子探针治疗肝癌,可降低肝癌组织中 VEGF 和 HIF-1α 的表 达,使肿瘤新生血管减少,破坏肿瘤生长的血供条件,进而抑制 肿瘤生长、转移,提高并巩固了 HIFU 治疗肝癌的疗效,这为 肝癌治疗手段的改善提供了理论依据。

参考文献

- [1] Zhou YF. High intensity focused ultrasound in clinical tumor ablation[J]. World J Clin Oncol, 2011, 2(1); 8-27.
- [2] Wijlemans JW, Bartels LW, Deckers R, et al. Magnetic resonance-guided high-intensity focused ultrasound(MR-HIFU) ablation of liver tumours[J]. Cancer Imaging, 2012,28(12):387-394.
- [3] Duarte S, Carle G, Faneca H, et al. Suicide gene therapy in cancer: where do we stand now[J]Cancer Lett, 2012, 324
 (2):160-170.
- [4] Yin X, Yu B, Tang Z, et al. Bifidobacterium infantis-mediated HSV-TK/GCV suicide gene therapy induces both extrinsic and intrinsic apoptosis in a rat model of bladder cancer[J]. Cancer Gene Ther, 2013, 20(2):77-81.
- [5] Zhou S, Li S, Liu Z, et al. Ultrasound-targeted microbubble destruction mediated herpes simplex virus-thymidine kinase gene treats hepatoma in mice[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2010, 29(1):170-175.
- [6] Wang HL, Anatelli F, Zhai QJ, et al. Glypican-3 as a useful diagnostic marker that distinguishes hepatocellular carcinoma from benign hepatocellular mass lesions [J]. Arch Pathol Lab Med, 2008, 132(11):1723-1728.

(上接第724页)

- [10] Simons M, Raposo G. Exosomes-vesicular carriers for intercellular communication [J]. Curr OpinCell Biol, 2009, 21(4):575-581.
- [11] Ohshima K, Inoue K, Fujiwara A, et al. Let-7 microRNA family is selectively secreted into the extracellular environment via exosomes in a metastatic gastric cancer cell line[J]. PLoS One,2010,5(10):e13247.
- [12] Hannafon BN, Ding WQ. Intercellular communication by

- [7] Shirakawa H,Kuronuma T,Nishimura Y, et al. Glypican-3 is a useful diagnostic marker for acomponent of hepatocellular carcinoma in human liver cancer [J]. Int J Oncol, 2009,34(3):649-656.
- [8] 李奥,王志刚,赵建农,等.纳米级超声分子探针的制备及 其体外寻靶实验[J].中国超声医学杂志,2010,26(4): 289-292.
- [9] 景周宏,何承後,潘万龙,等.载肝癌细胞 GPC3 抗体的纳 米级脂质超声微泡制备及体外寻靶研究[J].重庆医科大 学学报,2013,38(5):449-453.
- [10] Weidner N. Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors [J]. Breast Cancer Res Treat, 1995,36(2):169-180.
- [11] Keith B, Johnso RS, Simon MC. HIF1_α and HIF2_α: sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression [J]. Nat Rev Cancer, 2011, 12(1): 9-22.
- [12] Ku JH, Park YH, Myung JK, et al. Expression of hypoxia inducible factor- 1_{α} and 2_{α} in conventional renal cell carcinoma with or without sarcomatoid differentiation [J]. Urol Oncol, 2011, 29(6):731-737.
- [13] Kong J, Kong J, Pan B, et al. Insufficient radiofrequency ablation promotes angiogenesis of residual hepatocellular carcinoma via HIF-1α/VEGF[J]. PLoS One, 2012,7(5): e37266.
- [14] Florczyk U, Czauderna S, Stachurska A, et al. Opposite effects of HIF-1α and HIF-2α on the regulation of IL-8 expression in endothelial cells[J]. Free Radic Biol Med, 2011,51(10):1882-1892.
- [15] Nagao K,Oka K. HIF-2 directly activates CD82 gene expression in endothelial cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 407(1):260-265.
- [16] Tsuzuki Y,Fukumura D,Oosthuyse B,et al. Vascular endothelial growth factor(VEGF) modulation by targeting hypoxia-inducible factor-1α→hypoxia response element→ VEGF cascade differentially regulates vascular response and growth rate in tumors[J]. Cancer Res,2000,60(22): 6248-6252.

(收稿日期:2016-10-23 修回日期:2016-11-16)

exosome-derived microRNAs in cancer[J]. Int J Mol Sci, 2013,14(7):14240-14269.

- [13] Bushati N, Cohen SM. microRNA functions [J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2007, 23:175-205.
- [14] Sionov RV, Vlahopoulos SA, Granot Z. Regulation of Bim in health and disease[J]. Oncotarget, 2015, 6(27): 23058-23134.

(收稿日期:2016-10-24 修回日期:2016-11-22)