

[DOI]10.12016/j.issn.2096-1456.2018.04.004

· 基础研究 ·

舌鳞状细胞癌细胞株 CAL27 外泌体源性 miR-21、miR-221 和 miR-222 的表达

黄文曦¹, 欧阳颖², 魏常博², 余东升²

1. 佛山市禅城区中心医院口腔科, 广东 佛山(528000); 2. 中山大学光华口腔医学院·附属口腔医院, 广东省口腔医学重点实验室, 广东 广州(510055)

【摘要】 目的 研究舌鳞状细胞癌细胞 CAL27 外泌体源性 miR-21、miR-221 和 miR-222 的表达。方法 培养舌鳞状细胞癌细胞株 CAL27 和正常口腔上皮粘膜角质细胞 HOK, 收集培养上清液分离外泌体, 电镜检测外泌体, qRT-PCR 检测外泌体 miR-21、miR-221 和 miR-222 的表达。结果 在舌鳞状细胞癌细胞 CAL27 和正常口腔上皮细胞 HOK 的培养基中都能检测出外泌体, qRT-PCR 结果检测表明 CAL27 外泌体源性 miR-21、miR-221 和 miR-222 的表达比 HOK 升高 ($P < 0.05$)。结论 舌鳞状细胞癌细胞外泌体源性 miR-21、miR-221 和 miR-222 的表达较正常口腔上皮细胞升高。

【关键词】 癌; 舌; 鳞状细胞; 外泌体; miR-21; miR-221; miR-222; qRT-PCR

【中图分类号】 R739.8 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 2096-1456(2018)04-0222-05

【引用著录格式】 黄文曦, 欧阳颖, 魏常博, 等. 舌鳞状细胞癌细胞株 CAL27 外泌体源性 miR-21、miR-221 和 miR-222 的表达[J]. 口腔疾病防治, 2018, 26(4): 222-226.

Expression of miR-21, miR-221, and miR-222 in exosomes of CAL27 tongue squamous cell carcinoma cells

HUANG Wenxi¹, OUYANG Ying², WEI Changbo², YU Dongsheng². 1. Department of Stomatology, Foshan Chancheng District Centre Hospital, Foshan 528000, China; 2. Hospital of Stomatology, Guanghua School of Stomatology, Sun Yat-sen University, Guangdong Provincial Key Laboratory of Stomatology, Guangzhou 510055, China

Corresponding author: YU Dongsheng, Email: yudsh@mail.sysu.edu.cn, Tel: 0086-20-83862543

【Abstract】 Objective To assess the expression of miR-21, miR-221, and miR-222 in exosomes of CAL27 tongue squamous cell carcinoma cells. **Methods** CAL27 tongue squamous cell carcinoma cells and normal human oral keratinocytes (HOKs) were cultured, and then, the cultured supernatant was collected to separate the exosomes. Exosomes were detected by electron microscopy, and the expression levels of miR-21, miR-221, and miR-222 in the exosomes of tongue cancer cells were measured by qRT-PCR. **Results** Exosomes existed in the cultured supernatants of CAL27 cells and HOKs. Additionally, the expression levels of miR-21, miR-221, and miR-222 in the exosomes of CAL27 cells were significantly enhanced compared with those in the HOK exosomes ($P < 0.05$). **Conclusion** The expression levels of miR-21, miR-221, and miR-222 were markedly enhanced in the exosomes of CAL27 tongue squamous cell carcinoma cells.

【Key words】 Carcinoma; Tongue; Squamous cell; Exosome; miR-21; miR-221; miR-222; qRT-PCR

2012年在世界范围内口腔癌出现的新病例和

死亡病例分别为 300 400 和 145 400^[1]。根据美国 2017 年癌症研究报告显示口腔癌在美国的发病人数为 51 540 人, 死亡人数为 10 030 人, 其发病率在所有癌症中排第八位, 并呈上升趋势^[2]。中国口腔癌的总发病率约为 2.93 / 10 万, 并且发病率正在逐年增加^[3]。目前, 尽管口腔癌手术, 放疗和化疗有一些进展, 但死亡率仍然很高^[4]。因此, 进一步发现口腔癌的发病机制以及潜在治疗靶点有助于口

【收稿日期】 2017-10-10; **【修回日期】** 2017-11-07

【基金项目】 国家自然科学基金项目(81472526), 广东省科技计划项目(2016A020216007)

【作者简介】 黄文曦, 主治医师, 硕士研究生在读, Email: 390892423@qq.com

【通信作者】 余东升, 主任医师, 博士, Email: yudsh@mail.sysu.edu.cn

腔癌的治疗。

外泌体是一种直径为40~130 nm的囊泡结构,其中含有各种蛋白质、核酸和脂质等能够调节细胞间物质信息传递。与正常细胞相比,肿瘤细胞释放更多的外泌体,并且其中所包含的一系列差异蛋白质和核酸组分,在调节肿瘤的发展转移过程中发挥重要的作用^[5]。外泌体源性microRNA在肿瘤中不仅可作为分子诊断标志物,而且可能成为肿瘤的新治疗靶点^[6]。在口腔癌中,外泌体源性miR-142-3p能够促进口腔癌的发展以及转移,导致患者预后不良^[7]。而口腔癌外泌体源性miR-21、miR-221和miR-222的表达情况尚少有报道。本研究通过分离人舌鳞状细胞癌细胞株CAL27外泌体,检测其外泌体源性miR-21、miR-221和miR-222的表达,为舌鳞状细胞癌病变机制的进一步研究提供实验基础。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

舌鳞状细胞癌细胞株CAL27和正常口腔上皮粘角质细胞HOK(ScienCell,美国);HOK细胞培养基(ScienCell,美国);H-DMEM培养基和胎牛血清(Gibco,美国);CD63和CD81抗体(Abcam,美国);外泌体提取试剂盒以及Exosome-free胎牛血清(system bioscience,美国);二抗兔抗鼠IgG(H+L)-HRP和羊抗兔IgG(H+L)(southern biotech,美国);TRNzol Universal(天根生化科技(北京)有限公司);All-in-one miRNA Frist-strand cDNA Synthesis Kit(广州复能基因);GoTaq qPCR Master Mix(Promega,美国);JEM-1400透射电镜(日本电子株式会社JEOL);ABI Stepone Plus荧光定量PCR仪(ABI)。

1.2 细胞培养

正常口腔上皮粘角质细胞HOK在HOK细胞培养基培养基中培养,舌鳞状细胞癌细胞CAL27在含10%质量分数胎牛血清的H-DMEM培养基(含100 U/mL青霉素和100 μg/mL链霉素)中培养。所有细胞置于37℃、5%体积分数的CO₂和95%相对湿度的培养箱中进行培养。每2 d换液传代1次,取对数生长期细胞进行实验。

1.3 外泌体提取

用15 cm细胞培养皿常规培养细胞,待细胞融合度达到80%左右(即约1×10⁸细胞),然后用20 mL无菌的PBS溶液清洗细胞培养皿3次,然后加入含

exosome-free的细胞培养液(10% exosome-free胎牛血清+培养基)继续培养2 d。收集培养上清液10 mL后4℃、300×g离心15 min,去除细胞以及大的细胞碎片;采用4℃、2 000×g离心20 min去除小的细胞碎片;4℃、12 000×g低温离心30 min去除大分子蛋白;然后取上清,按照4:1加入沉降剂,混匀后4℃静止过夜;4℃、12 000×g离心5 min,弃上清收集黄白色沉淀,该沉淀为外泌体。PBS重悬外泌体后100 000×g离心70 min,弃上清;PBS重悬外泌体,-80℃保存。

1.4 透射电镜观察外泌体形态

吸取外泌体样品10 μL滴加到铜网上沉淀1 min,滤纸从边缘处吸取浮液;然后采用2%磷酸10 μL滴加到铜网上沉淀1 min,滤纸从边缘处吸取浮液;常温干燥2 min,将此铜网置于透射电镜的样品室内,调节电压为120 kV,观察外泌体形态并拍摄电镜照片。

1.5 Western blot检测

将收集的外泌体按1 mL裂解液加10 μL PMSF(100 mmol/L)和10 μL Cocktail提取蛋白。将提取好的总蛋白进行定量。然后取相同质量的蛋白溶液和5×上样缓冲液按4:1混合,煮沸10 min,缓慢恢复室温后,稍离心,进行SDS-PAGE电泳。电泳结束后将取出凝胶,将其放至滤纸上,形成凝胶转印堆积层,滤纸,凝胶,PVDF膜,滤纸,凝胶转印堆积层这样的“三明治”结构进行转膜。结束后取出杂交膜,漂洗,脱脂奶粉溶液封闭,洗膜,将CD63和CD81按照1:1 000进行稀释,然后4℃孵育过夜。TBST洗膜10 min,4次;相应二抗稀释液37℃孵育1 h;TBST洗膜10 min,4次。将杂交膜置于一透明塑料板上,用一干净移液器将化学荧光发光底物均匀地加到膜的表面,并使反应持续5 min。用试剂盒提供的滤纸吸去膜表面多余的底物溶液,放至暗盒,显影。

1.6 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)

将收集的外泌体进行总RNA提取,实验步骤按照TRNzol Universal试剂盒说明书进行操作。逆转录反应采用All-in-one miRNA Frist-strand cDNA Synthesis Kit说明书进行操作。首先将模板RNA置于冰上融解,5×PAP/RT Buffer和ddH₂O(RNase and DNase free)室温融解。轻柔混匀试剂盒中各种组分,短暂离心后置于冰上保存,准备反转录反应液,将总RNA加入2 μg,2.5 U/μL Poly A Polymerase 1 μL,RTase Mix 1 μL,5×PAP/RT Buffer 5 μL加入预冷的RNase-free反应管至终体积为25 μL。动作

轻柔地混匀已准备好的反应混合物,短暂离心后置于 37 °C 孵育 60 min,接着置于 85 °C 温育 5 min (终止逆转录反应)。进行 qPCR 反应,先用灭菌蒸馏水稀释逆转录产物 5 ~ 20 倍,2 μL 稀释的 cDNA 加入 20 μL 的 qPCR 反应体系。qPCR 操作按照 GoTaq qPCR Master Mix 试剂盒说明书进行操作。PCR 循环条件如下:95 °C 激活 2 min,之后是 95 °C 变性 15 s、60 °C 退火/延伸 60 s 的 40 个循环,接下来是 60 °C 到 90 °C 的溶解曲线分析。引物序列如表 1 所示。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

miRNA	序列(5'-3')
H-miR-21-5p-F	TAGCTTATCAGACTGATGTT
H-miR221-3p-F	AGCTACATTGTCTGCTGGGT
H-miR222-3p-F	AGCTACATCTGGCTACTGGGT
H-U6-F	CGCTTCGGCAGCACATATACTAA
Universal Primer-R	TTACCTAGCGTATCGTTGAC

1.7 统计学分析

采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据分析。计量资料用均数 ± 标准差表示,组间对比采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

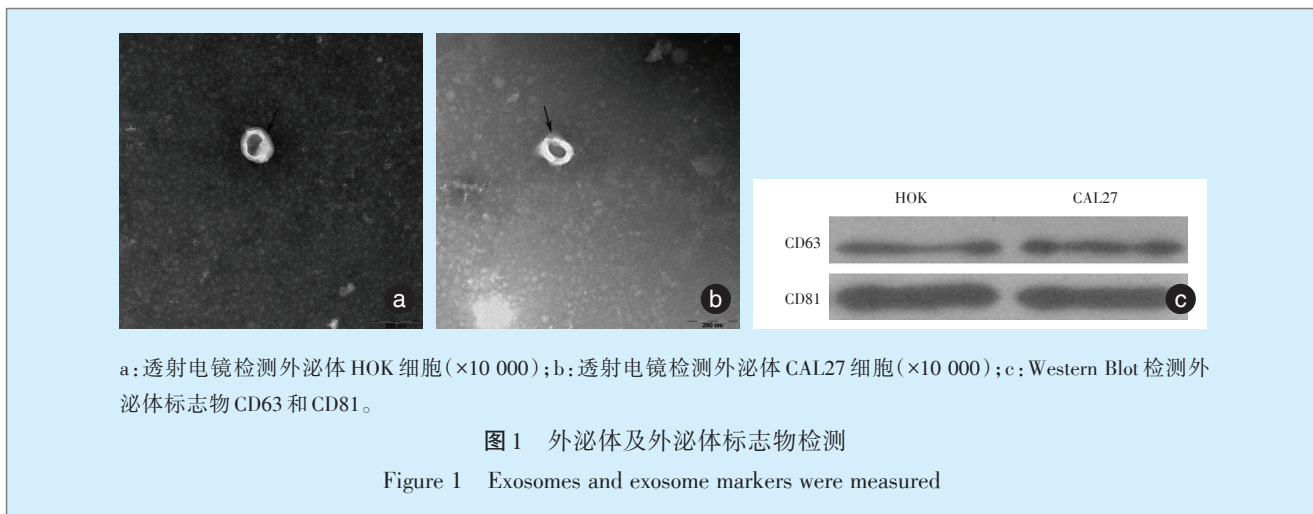
2 结果

2.1 外泌体检测结果

透射电镜检测正常口腔上皮粘膜角质细胞 HOK 和舌癌 CAL27 细胞上清的外泌体(图 1a、1b),结果显示 HOK 和 CAL27 细胞上清中均存在外泌体,且外泌体直径约 50 ~ 100 nm,形态基本类似,呈椭圆形。进一步采用 Western Blot 检测收集的外泌体中的特异性标志物 CD63 和 CD81(图 1c),结果显示收集的外泌体中均存在 CD63 和 CD81 表达,表明收集获得的囊泡为外泌体。

2.2 CAL27 细胞外泌体中 miR-21、miR-221 和 miR-222 的表达升高

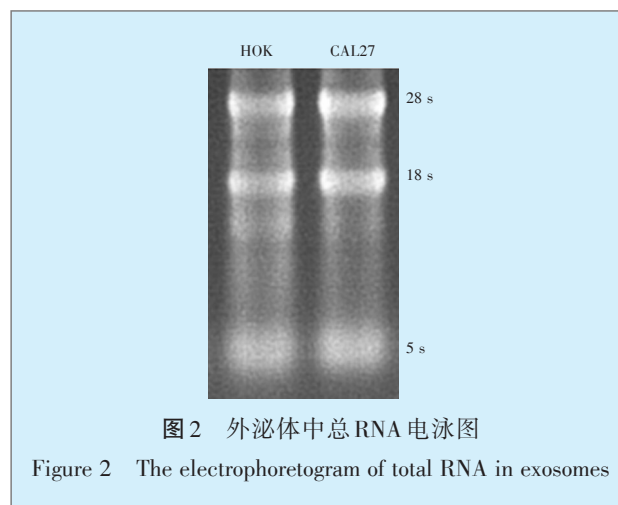
HOK 和 CAL27 外泌体中的总 RNA 提取后电泳图如图 2 所示。外泌体中 miR-21、miR-221 和 miR-222



的表达采用 qRT-PCR 检测,扩增曲线和溶解曲线如图 3 所示。外泌体中 miR-21、miR-221 和 miR-222 的表达如图 4 所示,该结果表明和 HOK 细胞外泌体相比,CAL27 细胞外泌体中 miR-21 ($t = 11.22, P < 0.001$)、miR-221 ($t = 19.28, P < 0.001$) 和 miR-222 ($t = 17.65, P < 0.001$) 的表达升高。

3 讨论

外泌体中含有各种蛋白质、核酸和脂质等能够调节细胞间信息传递的物质。研究表明外泌体 miRNA 不仅能够结合于 mRNA 的 3' UTR 区域,参与转录后调控^[8],而且有研究发现 miRNA 也可以



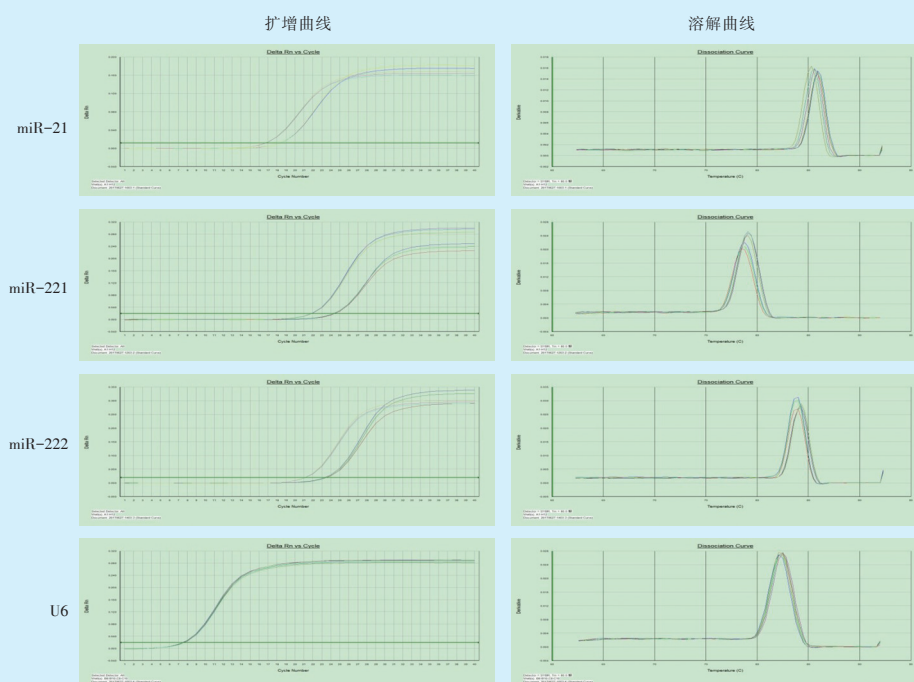
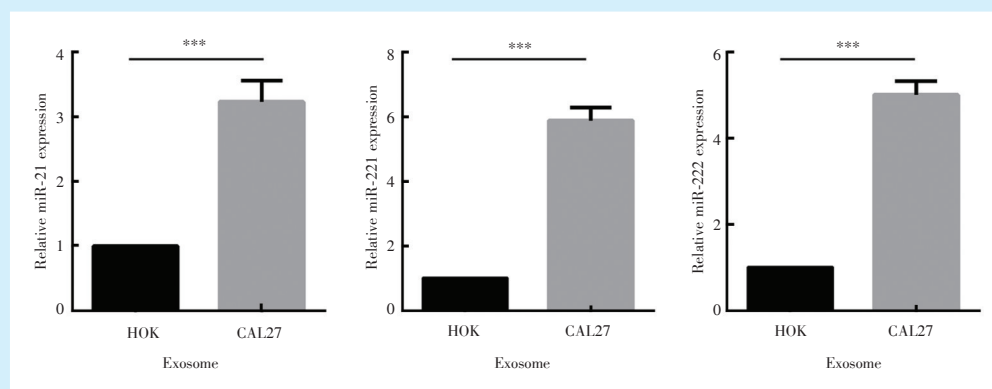


图3 qRT-PCR检测外泌体中miR-21、miR-221和miR-222表达的扩增曲线和溶解曲线
Figure 3 Amplification curves and melting curves for miR-21, miR-221 and miR-222 expression in exosomes detected by qRT-PCR



***, $P < 0.001$ vs HOK 细胞。

图4 HOK和CAL27细胞外泌体中miR-21、miR-221和miR-222的相对表达
Figure 4 The expression of miR-21, miR-221 and miR-222 in the exosomes of HOKs and CAL27 cells

通过外泌体分泌到胞外,直接作为配体与Toll样受体(TLR)交互调控下游信号通路发挥重要的作用^[9-10]。外泌体源性miRNA能够调节肿瘤的发生发展、转移和肿瘤耐药性,可能成为治疗肿瘤的新靶点^[11-12]。以往研究表明在肺癌和乳腺癌细胞及外泌体中miR-21、miR-221和miR-222的表达升高^[13-14]。在口腔癌细胞中miR-21、miR-221和miR-222的表达和正常口腔细胞相比升高^[13-14]。和以往

研究类似,本研究结果表明在正常口腔细胞HOK和舌癌细胞CAL27的培养基中都能够发现外泌体的存在,CAL27外泌体源性miR-21、miR-221和miR-222的表达水平比HOK升高。

miR-21、miR-221和miR-222作为口腔癌的早期诊断标志物,miR-21、miR-221和miR-222促进口腔癌的增殖、迁移和侵袭,抑制细胞凋亡^[15-17]。此外,miR-221还能够抑制金属蛋白酶-3的表达从而

降低口腔癌细胞对阿霉素的敏感性^[18]。黑色素瘤和乳腺癌中,外泌体源性 miR-222 的表达显著上调,促进肿瘤的发展以及耐药^[10,19]。以上研究表明外泌体源性 miR-21、miR-221 和 miR-222 能够促进肿瘤的发生发展以及耐药。口腔癌中外泌体源性 miR-21、miR-221 和 miR-222 的异常表达有可能促进口腔癌的发生发展以及耐药,但是其对口腔鳞癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力以及耐药性的机制还需进一步研究。

参考文献

- [1] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65(2): 87-108.
- [2] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(1): 7-30.
- [3] Zhang SK, Zheng RS, Chen Q, et al. Oral cancer incidence and mortality in China, 2011 [J]. *Chin J Cancer Res*, 2015, 27(1): 44-51.
- [4] Wikner J, Gröbe A, Pantel K, et al. Squamous cell carcinoma of the oral cavity and circulating tumour cells [J]. *World J Clin Oncol*, 2014, 5(2): 114-124.
- [5] 李孟娇, 王浩, 李庆伟. 外泌体在肿瘤转移及诊疗中的研究进展 [J]. *中国细胞生物学学报*, 2016, 38(5): 608-615.
- [6] 唐慧, 伍海珊, 杨怡, 等. 外泌体源性 microRNA 在疾病诊疗中的研究进展 [J]. *中南大学学报: 医学版*, 2015, 40(11): 1270-1275.
- [7] Dickman CT, Lawson J, Jabalee J, et al. Selective extracellular vesicle exclusion of miR-142-3p by oral cancer cells promotes both internal and extracellular malignant phenotypes [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(9): 15252-15266.
- [8] Patel GK, Khan MA, Bhardwaj A, et al. Exosomes confer chemoresistance to pancreatic cancer cells by promoting ROS detoxification and miR-155-mediated suppression of key gemcitabine-metabolising enzyme, DCK [J]. *Br J Cancer*, 2017, 116(5): 609-619.
- [9] Lehmann SM, Krüger C, Park B, et al. An unconventional role for miRNA: let-7 activates Toll-like receptor 7 and causes neurodegeneration [J]. *Nat Neurosci*, 2012, 15(6): 827-835.
- [10] Park CK, Xu ZZ, Berta T, et al. Extracellular microRNAs activate nociceptor neurons to elicit pain via TLR7 and TRPA1 [J]. *Neuron*, 2014, 82(1): 47-54.
- [11] Casadei L, Calore F, Creighton CJ, et al. Exosome-Derived miR-25-3p and miR-92a-3p Stimulate Liposarcoma Progression [J]. *Cancer Res*, 2017, 77(14): 3846-3856.
- [12] Wang X, Zhang H, Bai M, et al. Exosomes Serve as Nanoparticles to Deliver Anti-miR-214 to Reverse Chemoresistance to Cisplatin in Gastric Cancer [J]. *Mol Ther*, 2018, 26(3): 774-783.
- [13] Xue X, Liu Y, Wang Y, et al. MiR-21 and MiR-155 promote non-small cell lung cancer progression by downregulating SOCS1, SOCS6, and PTEN [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(51): 84508-84519.
- [14] Zaleska K, Przybyła A, Kulcenty K, et al. Wound fluids affect miR-21, miR-155 and miR-221 expression in breast cancer cell lines, and this effect is partially abrogated by intraoperative radiation therapy treatment [J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(4): 4029-4036.
- [15] Supic G, Zeljic K, Rankov AD, et al. miR-183 and miR-21 expression as biomarkers of progression and survival in tongue carcinoma patients [J]. *Clin Oral Investig*, 2018, 22(1): 401-409.
- [16] Wang Y, Zhu Y, Lv P, et al. The role of miR-21 in proliferation and invasion capacity of human tongue squamous cell carcinoma in vitro [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(5): 4555-4563.
- [17] Yang CJ, Shen WG, Liu CJ, et al. miR-221 and miR-222 expression increased the growth and tumorigenesis of oral carcinoma cells [J]. *J Oral Pathol Med*, 2011, 40(7): 560-566.
- [18] Chen D, Yan W, Liu Z, et al. Downregulation of miR-221 enhances the sensitivity of human oral squamous cell carcinoma cells to adriamycin through upregulation of TIMP3 expression [J]. *Biomed & Pharmacother*, 2016, 77: 72-78.
- [19] Felicetti F, De Feo A, Coscia C, et al. Exosome-mediated transfer of miR-222 is sufficient to increase tumor malignancy in melanoma [J]. *J Transl Med*, 2016, 14(56): 56.

(编辑 罗燕鸿, 曾曙光)