

细胞外囊泡协同递送维替泊芬/TRAIL 诱导口腔鳞癌 细胞凋亡及增殖抑制实验研究

王文晶,李昆珊,刘铁军,刘昕,仇永乐

摘要 **目的** 制备细胞外囊泡(EVs)共载体系,以协同递送肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TRAIL)/维替泊芬(VPF)组合用于诱导口腔鳞癌细胞凋亡及增殖抑制。**方法** 通过超速离心、过滤法分离纯化 TRAIL/VPF 共载 EVs (MSCT-EVs/VPF)。通过 BCA 法检测 CD63、CD9 和 TRAIL 表达,确认 EVs 来源。用高效液相法检测 VPF 载药量,绘制体外释放曲线。使用 MTT 法检测细胞毒性和半数抑制浓度(IC₅₀)。通过流式细胞仪检测细胞凋亡,最后 Western blot 被用于检测 MSCT-EVs/VPF 对 SCC25 细胞中凋亡相关蛋白和 YAP 表达的影响。**结果** MSCT-EVs/VPF 颗粒圆整,分散性良好,直径约为 100 nm;纳米体系载药量为(15.43 ± 0.44)%,在 10 h 内释放 57.8%的 VPF,45 h 释放约 82.5%;MSCT-EVs 和 VPF 均可抑制 SCC25 肿瘤细胞生长,呈剂量依赖性,MSCT-EVs 和 VPF 的质量比(wt%)在 10:1~5:1 的比例范围内显示出最佳抑制效果;在 100:5~100:15 (wt%) 比例下,MSCT-EVs/VPF 的半抑制浓度(IC₅₀) 低于游离 MSCT-EVs + 游离 VPF 组($P < 0.05$),显示出更高效的抑制作用。MSCT-EVs/VPF 对鳞癌细胞的高效抑制作用部分源自对 Caspase-3、Bax、Bcl-2、mTOR、p-mTOR 和 YAP 的调控。**结论** 通过 EVs 递送固定比例的 TRAIL/VPF,对口腔鳞癌细胞展现出高效抑制作用,为多药耐药肿瘤的治疗提供

了新思路。

关键词 维替泊芬;细胞外囊泡;肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体;口腔鳞状细胞癌

中图分类号 R 979.1

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)02-0247-07
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.02.016

肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)是肿瘤坏死因子超家族成员之一^[1],能通过抑制肿瘤增殖和促进肿瘤凋亡在多种癌症治疗过程中发挥作用,曾被认为是极具前景的选择^[2]。然而,恶性肿瘤对 TRAIL 诱导细胞凋亡的耐药性阻碍了其应用拓展。Yes 激酶相关蛋白(yes-associated protein, YAP)的活化及过表达与多种肿瘤细胞耐药性相关。如黑色素瘤细胞对丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶抑制剂的耐药性源自激动蛋白对 YAP/转录联合激活因子通路的重塑活化,卵巢癌细胞对紫杉醇的耐药性涉及到 YAP 的过表达。近期基因组分析显示 YAP 在口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)中过表达^[3]。Hiemer et al^[4]证明 YAP 的核积聚可促进口腔鳞癌细胞的增殖和迁移。Kim et al^[5]研究表明,YAP 能有效的抑制 MCF10A 细胞中 TRAIL 表达。故推测通过 YAP 抑制剂维替泊芬(verteporfin, VPF)有望提高 OSCC 细胞对 TRAIL 的敏感性。该研究为改善口腔鳞癌细胞对 TRAIL 作用的耐药性,制备协同递送 TRAIL/VPF 的细胞外囊泡(TNF-related apoptosis-

2021-10-25 接收

基金项目:国家癌症中心攀登基金(编号:NCC201803B006);河北省医学科学研究课题计划(编号:20200102)

作者单位:河北医科大学第四医院口腔科,石家庄 050000

作者简介:王文晶,女,主管护师;

仇永乐,男,博士,副主任医师;责任作者,E-mail: chouyongle123@163.com

in tumor tissues and cell lines by RT-qPCR. CCK-8, EdU, flow cytometry, wound healing and transwell chamber assays were performed to investigate the role of FGD5-AS1 in HCC cell proliferation, apoptosis, migration and invasion *in vitro*. At the molecular level, dual luciferase reporter and RNA pull down assays were performed to identify the interaction among FGD5-AS1, miR-873-5p and GTPBP4. **Results** FGD5-AS1 was upregulated in HCC tissues and cells. Moreover, FGD5-AS1 knockdown suppressed HCC cell proliferation, migration and invasion, and induced apoptosis *in vitro*. Mechanistically, FGD5-AS1 directly bound to miR-873-5p and competitively inhibit its expression to increase the expression level of GTPBP4 in HCC cells. Finally, our findings indicated that the role of FGD5-AS1 was mediated by miR-873-5p/GTPBP4 axis. **Conclusion** FGD5-AS1 promotes the proliferation, migration and invasion of HCC cells and inhibits apoptosis by regulating the miR-873-5p/GTPBP4 axis.

Key words hepatocellular carcinoma; LncRNA FGD5-AS1; miR-873-5p; GTPBP4

inducing ligand/verteporfin co-loading extracellular vesicles, MSCT-EVs/VPF) 并对其体外抗癌活性及相关机制进行评价。

1 材料与方法

1.1 材料 VPF 购自美国 MedChemExpress 公司; SCC25 细胞系来自美国 ATCC 供应商, 在含有 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基中培养。成人间充质干细胞状态良好, 购自美国 ATCC 供应商。用慢病毒转染表达人 TRAIL 的 MSCs 建立 MSCT 细胞模型^[6], 在含有 17% FBS 的 RPMI-1640 培养基中培养和保存。FBS、RPMI-1640、胰酶、DMSO 均购自美国 Sigma 公司。

1.2 细胞外囊泡 (extracellular vesicles, EVs) 分离

MSCs 和 MSCT 细胞 (第三代) 在 37 °C 和 5% CO₂ 条件下, 在含有 17% FBS 的 RPMI-1640 细胞培养基中至 (70 ~ 80)% 融合, 收集培养基。后培养基改为 10% FBS 的 RPMI-1640 细胞培养基, 每 48 h 更换 1 次。MSCT 细胞 (第三代) 在 37 °C 和 5% CO₂ 条件下, 在含有 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基加入 0.3 mg/ml VPF, 48 h 后收集培养基。将收集的培养基在 1 337 r/min 下离心 10 min, 然后 6 453 r/min 4 °C 再次离心, 去除细胞和碎片。此后, 使用 0.22 μm 过滤器 (德国 membrana 公司) 对培养基真空过滤。用 100 ku (德国 Sartorius 公司) 浓缩 5 次, 最后在 24 419 r/min, 4 °C 下超速离心 2 h。用 0.22 μm 膜过滤器过滤收集 EVs 产物, 并用磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 洗涤 2 次。最终产品储存在 -80 °C 的 PBS 中。

1.3 EVs 表征及质谱条件 取离心后用 10 μl PBS 再悬浮 EVs 样品, 然后加入铜网中沉淀 2 min。使用 JEM-1400 透射电子显微镜 (日本 JEOL 公司) 进行观察, 使用 Nano Measurer 1.2.5 软件计算粒径分布范围。

为定量 EVs 中的 VPF, 样品用 0.6 mol/L 高氯酸 (1 : 1, v/v) 脱蛋白, 含有抗氧化剂二硫化钠 (5 mg/ml), 离心, 通过 0.2 μm 尼龙过滤器 (美国 Phenomenex 公司, Phenomenex NY 4 mm) 过滤。使用 VPF 标准, 采用高效液相色谱法 (Agilent 1260), 以乙腈和水为流动相, 流速为 1 ml/min, 波长为 230 nm。

1.4 体外释放实验 将 MSCT-EVs/VPF 溶液 (2 ml) 放入透析袋 (MWCO : 8 000 ~ 14 000)。将透析袋的两端夹紧, 将含有 0.5% (w/v) 吐温 - 80 的 40 ml 磷酸钠缓冲溶液放入烧杯中作为透析液。将烧杯置

于恒温摇床中, 将转速设置为 100 r/min, 温度为 37 °C。预定时间间隔从透析液中采集样品, 后补充相同含量的缓冲液。以 14 000 r/min 离心 10 min, 用高效液相色谱法测定透析液中各时间点 VPF 的含量。

1.5 细胞毒性和凋亡分析 将对数期的 SCC25 细胞以 $3 \times 10^3 \sim 5 \times 10^3$ 个/孔的密度接种于 96 孔板, 37 °C 孵育 24 h, 细胞贴壁。用不同浓度游离 VPF、MSCT-EVs、MSCT-EVs: VPF (游离 MSCT-EVs + 游离 VPF)、MSCT-EVs/VPF 处理细胞 48 h, 然后加入 20 μl MTT 溶液 (5 mg/ml) 孵育 4 h。然后, 抽取培养基并添加 150 μl 二甲基亚砷。轻摇 10 min 溶解甲瓩, 用微板阅读器 (美国 OPTIMAX 公司) 测量每个孔在 570 nm 处的 OD 值。

将 SCC25 细胞接种于 6 孔板中, 细胞数为 5×10^5 个/孔, 37 °C 培养 24 h, 细胞融合至 70%。将 PBS (空白组照)、VPF (2 μg/ml)、MSCT-EVs (20 μg/ml)、MSCT-EVs : VPF (20 μg/ml) 和 MSCT-EVs/VPF (20 μg/ml) 分别加入到 6 孔板中, 培养 24 h 进行细胞凋亡分析。用胰蛋白酶消化细胞, 轻轻搅拌, 离心, 收集细胞。用 AF647、annexin V 和 2 μg/ml 的 DAPI 染色, 流式细胞仪检测细胞死亡。

1.6 Western blot 实验 VPF (2 μg/ml)、MSCT-EVs : VPF (20 μg/ml)、MSCT-EVs/VPF (20 μg/ml) 处理 SCC25 细胞后细胞, 用 BCA 法检测蛋白质含量, SDS-PAGE 电泳分离。电泳后, 去除凝胶, 将蛋白质转移到 PVDF 膜上, 用 5% 脱脂奶粉密封 1 h, 4 °C 下与一抗孵育过夜。PEST 洗涤后, 加入相应二抗 (1 : 5 000), 室温孵育 2 h, PBST 清洗后观察 ECL 的形成。

1.7 统计学处理 使用 GraphPad Prism 6 软件采用 K-S 检验证实数据符合正态分布且方差齐, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示; 用单因素方差分析比较不同比例的 MSCT-EVs 和 VPF 组间差异, Dunnett's post-test 法进行两两比较。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MSC-EVs 的分离与表征 MSCT-EVs/VPF 以颗粒大小进行表征, MSCT-EVs/VPF 平均粒径约为 100 nm, 粒径分布范围较窄, 见图 1A、B。CD63 和 CD9 是 MSC-EVs 的典型标志物, 见图 1C。CD63、CD9 和 TRAIL 在 MSCT-EVs 中均有表达, 见图 1C、D。MSCs 中仅有 CD81 表达, 见图 1C。

2.2 载药与体外释药 包封率为 $(93.7 \pm 1.53)\%$, 载药量为 $(15.43 \pm 0.44)\%$ 。透析法检测

MSCT-EVs/VPF 的药物含量。MSCT-EVs/VPF 在 10 h 内释放 57.8% 的 VPF, 45 h 释放约 82.5%, 见图 2B。在释放试验的前 15 h, MSCT-EVs/VPF 表现出快速释放特性, 随后药物释放速率减慢, 30 h 后药物释放进入平台期。

2.3 细胞毒性

2.3.1 细胞毒性和半数抑制浓度 (IC₅₀) 在药物作用试验前, 先测定 MSCT-EVs 是否能抑制 SCC25

细胞的生长。结果表明, MSCT-EVs 和 VPF 可以剂量依赖性地抑制 SCC25 细胞的生长, 见图 3A、B。图 3C 显示 VPF 和 MSCT-EVs 的比例与其对癌细胞的协同杀伤作用密切相关。不同比例的游离 VPF 和 MSCT-EVs 的 IC₅₀ 值差异较大。MSCT-EVs 和 VPF 的质量比 (wt%) 在 10 : 1 ~ 5 : 1 的比例范围内具有最佳协同效应。MSCT-EVs/VPF 和 MSCT-EVs : VPF 均可抑制 SCC25 细胞增殖 (图 3D)。在相同

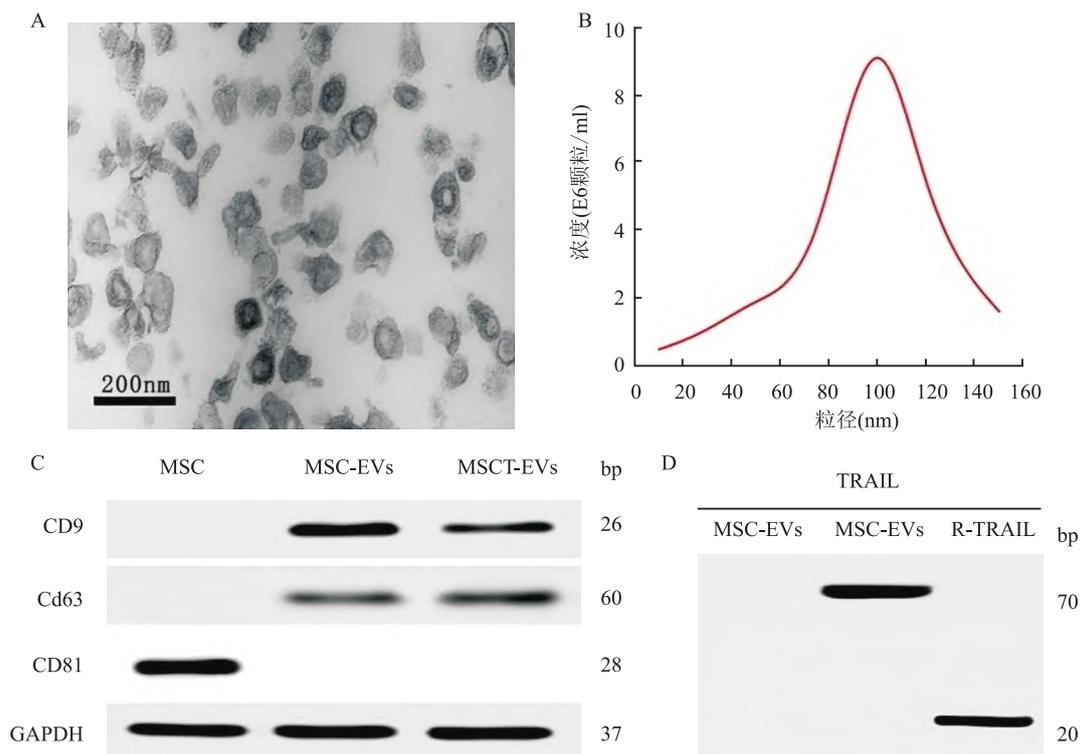


图 1 MSC-EVs 的表征及标志物分析

A: MSC-EVs 的 TEM 图 ×40 000; B: MSC-EVs 的大小分布; C: MSC、MSC-EVs 和 MSCT-EVs 中 CD63、CD9 和 CD81 的免疫印迹分析; D: 对 MSC-EVs、MSCT-EVs 和 R-TRAIL 作为阳性对照进行 Western blot 分析

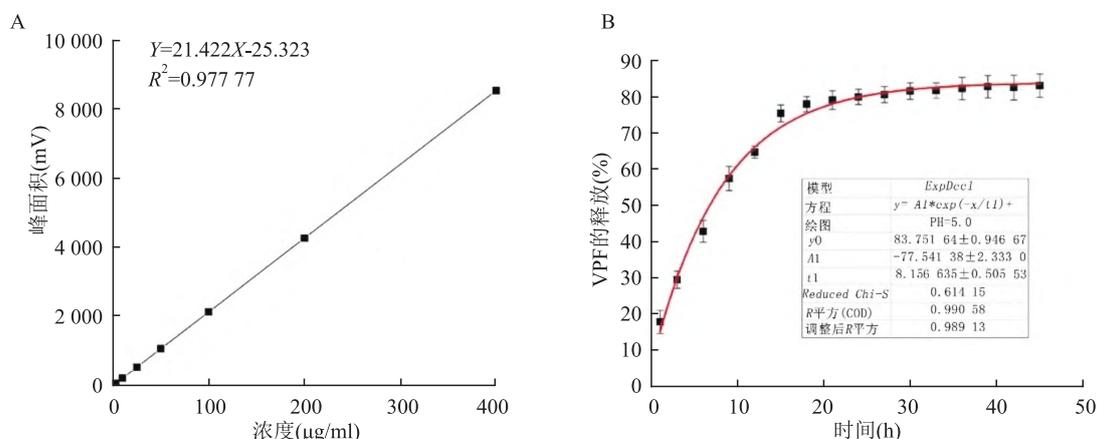


图 2 VPF 标准曲线及释放曲线

A: 根据 HPLC 结果得出的 VPF 回归曲线; B: VPF 的释放曲线

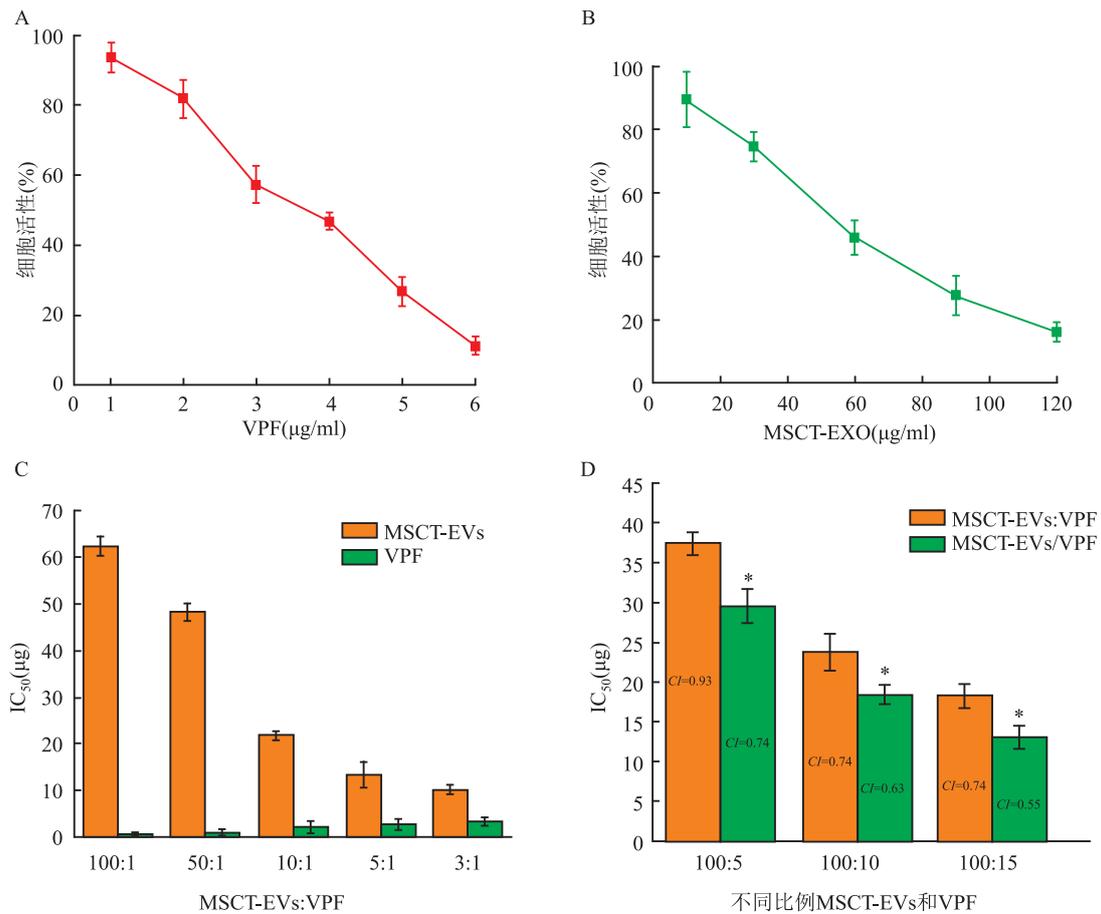


图3 VPF的细胞毒性及半数抑制浓度

A:不同浓度 VPF 对 SCC25 细胞的抑制作用;B:不同浓度 MSCT-EVs 对 SCC25 细胞的抑制作用;C: 不同比例的 MSCT-EVs 和 VPF 的 IC₅₀; D: 不同比例的 MSCT-EVs:VPF 和不同比例的 MSCT-EVs/VPF 的 IC₅₀;与 MSCT-EVs:VPF 比较: * P < 0.05

的药物比例下, MSCT-EVs/VPF 的 IC₅₀ 显著低于 MSCT-EVs : VPF ($P = 0.003, F = 10.67$), 显示出更高效的抑制作用。因此, 结果提示 MSCT-EVs/VPF 组可能在 10 : 1 ~ 5 : 1 (wt%) 范围内表现出最佳的协同效应。但由于 MSCT-EVs 载药量限制, 尚不能确定最佳协同比例。

2.3.2 MSCT-EVs/VPF 诱导细胞凋亡 VPF、MSCT-EVs、MSCT-EVs:VPF 和 MSCT-EVs/VPF 均可以诱导 SCC25 细胞凋亡, 见图 4。联合用药组, 高于单独用药组。载 VPF 的 MSCT-EVs 对癌细胞的杀伤作用强于游离 MSCT-EVs:VPF 组, 见图 4、5。用 AnnexinV/DAPI 检测 MSCT-EVs/VPF 对 SCC25 细胞的杀伤作用。结果表明, MSCT-EVs/VPF 对 SCC25 细胞的诱导凋亡作用高于游离 MSCT-EVs:VPF, 见图 5。提示 MSCT-EVs/VPF 能有效诱导肿瘤细胞凋亡, 并能减少游离药物的用量。

2.3.3 MSCT-EVs/VPF 对 SCC25 细胞中凋亡相关蛋白和 YAP 表达的影响 MSCT-EVs/VPF 能够上

调 SCC25 细胞中 Caspase-3、Bax 的表达, 同时下调 Bcl-2 的表达量。VPF 在该浓度下未显示对凋亡蛋白明显的调控作用, 但可以提高 MSCT-EVs 对 Caspase-3 ($P = 6.93 \times 10^{-5}, F = 290.78$)、Bax ($P = 1.95 \times 10^{-6}, F = 1750.31$)、Bcl-2 ($P = 0.0007$,

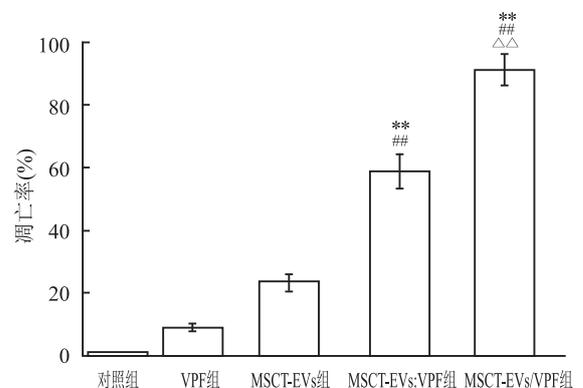


图4 各组对 SCC25 细胞的凋亡诱导作用

与 VPF 组比较: ** P < 0.01; 与 MSCT-EVs 组比较: ## P < 0.01; 与 MSCT-EVs:VPF 组比较: $\Delta\Delta$ P < 0.01

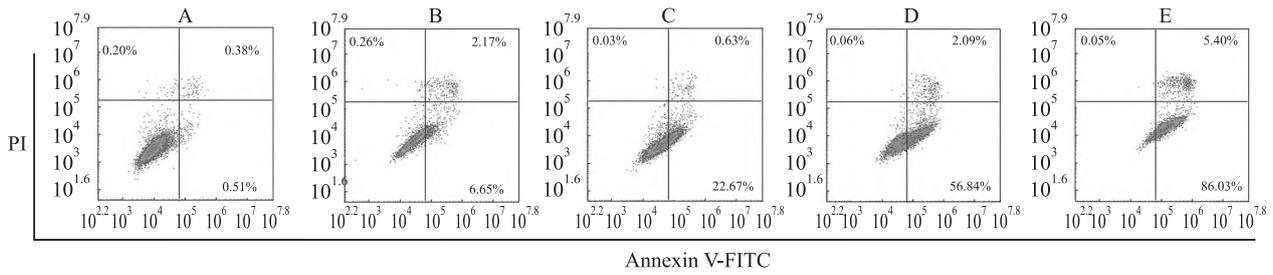


图5 Annexin V/DAPI 检测 SCC25 细胞凋亡图

A: 对照组; B: VPF(2 μg/ml); C: MSCT-EVs(20 μg/ml); D: MSCT-EVs + VPF(20 μg/ml); E: MSCT-EVs/VPF(20 μg/ml)

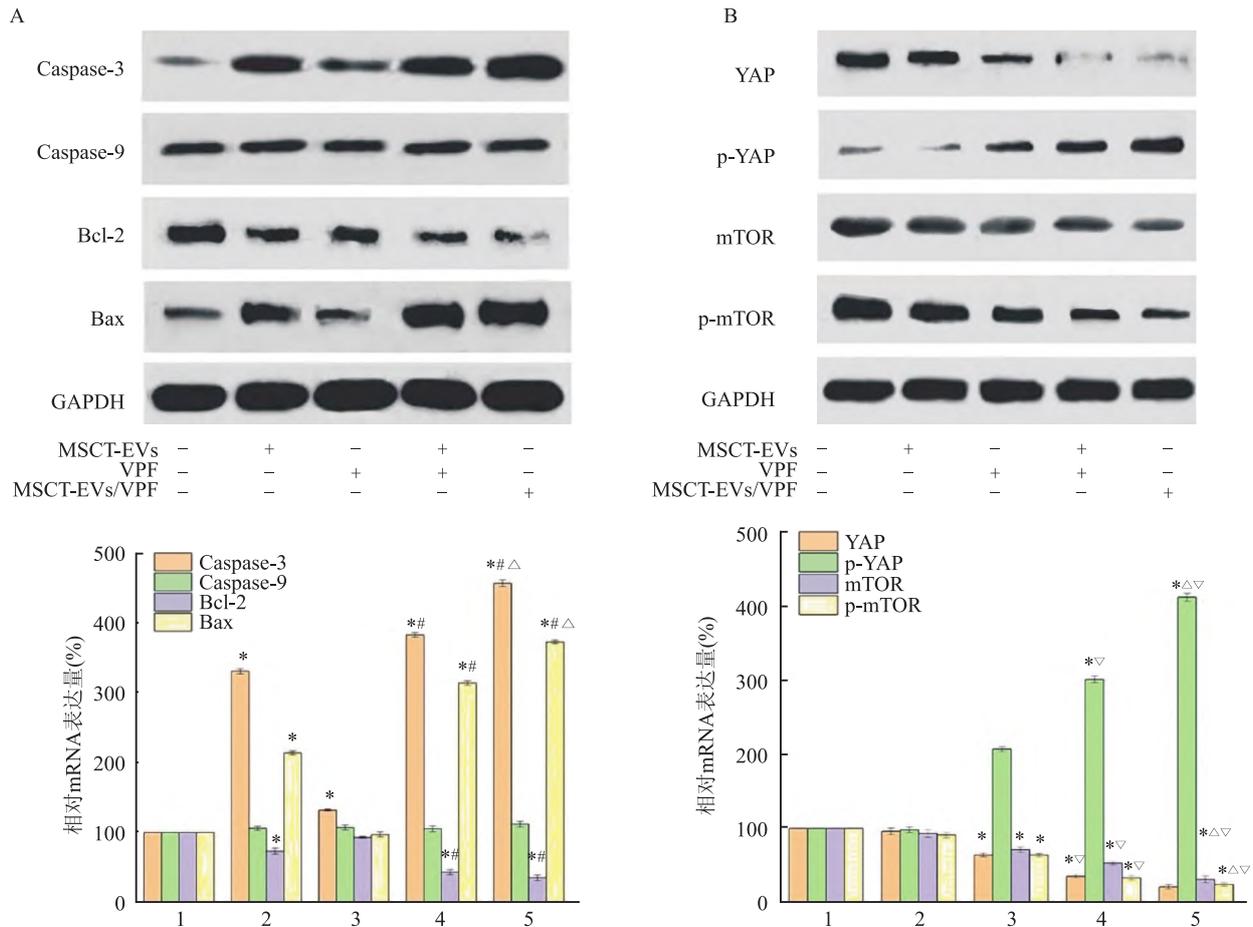


图6 MSCT-EVs/VPF 对 SCC25 细胞中凋亡相关蛋白和 YAP、mTOR、p-mTOR 表达的影响

A: MSCT-EVs/VPF 对 SCC25 细胞中凋亡相关蛋白表达的影响; B: MSCT-EVs/VPF 对 SCC25 细胞中 YAP、mTOR、p-mTOR 表达的影响; 1: 对照组; 2: MSCT-EVs 组; 3: VPF 组; 4: MSCT-EVs + VPF 组; 5: MSCT-EVs/VPF 组; 与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 MSCT-EVs 比较: # $P < 0.05$; 与游离 VPF 比较: ∇ $P < 0.05$; 与 MSCT-EVs + VPF 比较: Δ $P < 0.05$

$F = 90.17$) 调控作用。相对于 MSCT-EVs + VPF 组, MSCT-EVs/VPF 对 Caspase-3 ($P = 3.12 \times 10^{-5}$, $F = 435.49$)、Bax ($P = 1.8 \times 10^{-5}$, $F = 574.33$)、Bcl-2 ($P = 0.041$, $F = 9.67$) 的调控作用更强。

随后实验检测了 MSCT-EVs/VPF 对 YAP、mTOR 信号通路的调控作用。MSCT-EVs 对 YAP、p-YAP、mTOR、p-mTOR 无显著影响, 当联合 VPF 用药时, VPF 对 YAP ($P = 3.43 \times 10^{-5}$, $F = 414.67$)、p-

YAP ($P = 7.07 \times 10^{-7}$, $F = 2910.74$)、mTOR ($P = 0.0003$, $F = 139.77$)、p-mTOR ($P = 3.2 \times 10^{-6}$, $F = 1366.66$) 信号通路的调控作用被增强。相对于 MSCT-EVs + VPF 组, MSCT-EVs/VPF 组对 YAP ($P = 0.00256$, $F = 45.57$)、p-YAP ($P = 1.26 \times 10^{-5}$, $F = 686.54$)、mTOR ($P = 0.002$, $F = 51.24$)、p-mTOR ($P = 3.2 \times 10^{-6}$, $F = 1366.06$) 信号的抑制作用更高。见图 6。

3 讨论

TRAIL 因其对肿瘤细胞的特异性杀伤作用,被广泛用于癌症治疗相关研究^[7]。然而,由于肿瘤的多药耐药性,TRAIL 单药应用无法达到预期治疗效果。长期以来,无论是稳定性增强的重组 TRAIL 蛋白还是特异性更高的 TRAIL 抗体,抗癌效果均有限。因此,探究药物协同递送途径来增强其效用,对于 TRAIL 的临床应用具有重要意义^[8-9]。YAP 信号是多种实体肿瘤靶向、化疗和免疫治疗反应的关键调节因子。YAP 的过度表达与 OSCC 促癌基因的表达水平呈正相关,能促进肿瘤细胞的增殖和肿瘤的侵袭能力。此外,YAP 还能促进 OSCC 细胞对化疗药物的耐药性^[10]。维替泊芬(VPF)是一种用于治疗眼部异常血管的光敏药物,可直接抑制 YAP-TEAD 结合并减少 YAP 过度表达^[11]。Fisher et al^[12] 研究表明 VPF 能通过抑制 YAP 来提高恶性肿瘤细胞对 RAFi、TKI 或化疗药物的敏感性。然而,维替泊芬仅在高微摩尔浓度下阻断 YAP-TEAD 结合,因此在临床上应用受限^[13]。该研究通过超速离心法和 0.22 μm 过滤制备载 VPF 的 TRAIL 转染纳米囊泡,提高 OSCC 细胞对 TRAIL 的敏感性。

MSCs 首先转染 TRAIL (MSCTs),然后用 VPF 孵育,得到载药纳米囊泡。TEM 结果显示,EVs 纳米粒子颗粒圆整,粒径分布较窄。高速离心法去除粒径大于 220 nm 的微泡,再经蔗糖密度梯度超速离心进一步纯化。载药囊泡具有较高的载药量和良好的释药曲线。体外实验表明,载药系统具有良好的抗肿瘤活性,VPF 能增强 MSCT-EVs 对 SCC25 的抑制作用,EVs 协同递送的 VPF/TRAIL 能更加高效的抑制肿瘤细胞生长。这可能是由于 MSCT-EVs/VPF 组中 MSCT-EVs 和 VPF 能以固定比例进入细胞,作用稳定,间充质干细胞衍生 EVs 的细胞归巢作用增加了 VPF/TRAIL 细胞摄取。这一结果与以往研究一致,如在介孔硅中装载吉西他滨和紫杉醇^[14],以及载负顺铂和二甲双胍的纳米立方体^[15],相较于游离药物组,纳米载药组显示出更强的药效。相较于 MSCT-EVs;VPF, 100:5~100:15 范围内囊泡内的 MSCT-EVs 和 VPF 的联合应用具有良好的协同作用 ($P < 0.05$)。由于载药量的限制,不能直接计算 MSCT-EVs/VPF 的最佳配比。由于 MSCT-EVs 和游离 VPF 在 10:1~5:1 (wt%) 的比例范围内显示出最佳抑制作用,因此推测 MSCT-EVs/VPF 组的最佳比例也位于 10:1~5:1 (wt%) 范围内。

该研究检测了 MSCT-EVs/VPF 对 SCC25 细胞中凋亡相关蛋白和 YAP 表达的影响。VPF 不能直接调控 SCC25 细胞中凋亡蛋白的表达,但可以提高 MSCT-EVs 对 Caspase 3、Bax、Bcl2 调控作用 ($P < 0.05$)。MSCT-EVs 可增强 VPF 对 SCC25 细胞内 YAP、mTOR 蛋白的抑制作用。相较于 MSCT-EVs + VPF 组,MSCT-EVs/VPF 对 Caspase 3、Bax、Bcl2 的调控作用更强 ($P < 0.05$),与凋亡、细胞活性实验结果相符。MSCT-EVs 对 YAP、p-YAP、mTOR、p-mTOR 不具有调控作用,然而却能够加强 VPF 对 YAP、p-YAP、mTOR、p-mTOR 的调控作用,这种作用被 EVs 的协同递送增强。此前的研究表明 YAP 能够抑制 TRAIL 的表达,VPF 可通过抑制 YAP 的表达增强 TRAIL 作用^[5],与该研究结果相符。

综上所述,该研究从 MSCT 中分离出 VPF 相关 EVs,证明 MSCT-EVs/VPF 对口腔鳞癌细胞具有显著的抑制作用,这种抑制作用源于对凋亡蛋白和 YAP 调控。制备的载药 EVs 能降低 VPF 的使用剂量,增强 TRAIL 对 OSCC 细胞的敏感性。新型载药 EVs 协同递送 TRAIL/VPF 对 OSCC 细胞展现出高效抑制作用,为多药耐药肿瘤的治疗提供新思路。

参考文献

- [1] 代雪飞. TRAIL 及其受体在肝脏疾病中的作用研究进展[J]. 安徽医科大学学报, 2017,52(2): 304-7.
- [2] de Miguel D, Lemke J, Anel A, et al. Onto better TRAILs for cancer treatment[J]. *Cell Death Differ*, 2016, 23(5): 733-47.
- [3] Yost S, Stashenko P, Choi Y, et al. Increased virulence of the oral microbiome in oral squamous cell carcinoma revealed by metatranscriptome analyses[J]. *Int J Oral Sc*, 2018, 10(4): 1-10.
- [4] Hiemer S E, Zhang L, Kartha V K, et al. A YAP/TAZ-regulated molecular signature is associated with oral squamous cell carcinoma[J]. *Mol Cancer Res*, 2015, 13(6): 957-68.
- [5] Kim M, Kim T, Johnson R L, et al. Transcriptional co-repressor function of the hippo pathway transducers YAP and TAZ[J]. *Cell Rep*, 2015, 11(2): 270-82.
- [6] Sage E K, Kolluri K K, McNulty K, et al. Systemic but not topical TRAIL-expressing mesenchymal stem cells reduce tumour growth in malignant mesothelioma[J]. *Thorax*, 2014, 69(7): 638-47.
- [7] Azijli K, Weyhenmeyer B, Peters G J, et al. Non-canonical kinase signaling by the death ligand TRAIL in cancer cells; discord in the death receptor family[J]. *Cell Death Differ*, 2013, 20(7): 858-68.
- [8] Hellwig C T, Rehm M. TRAIL signaling and synergy mechanisms used in TRAIL-based combination therapies[J]. *Mol Cancer Ther*, 2012, 11(1): 3-13.

- [9] Lecis D, Drago C, Manzoni L, et al. Novel SMAC-mimetics synergistically stimulate melanoma cell death in combination with TRAIL and Bortezomib[J]. *Br J Cancer*, 2010, 102(12): 1707–16.
- [10] Yoshikawa K, Noguchi K, Nakano Y, et al. The Hippo pathway transcriptional co-activator, YAP, confers resistance to cisplatin in human oral squamous cell carcinoma[J]. *Int J Oncol*, 2015, 46(6): 2364–70.
- [11] Liu-Chittenden Y, Huang B, Shim J S, et al. Genetic and pharmacological disruption of the TEAD – YAP complex suppresses the oncogenic activity of YAP[J]. *Genes Dev*, 2012, 26(12): 1300–5.
- [12] Fisher M L, Grun D, Adhikary G, et al. Inhibition of YAP function overcomes BRAF inhibitor resistance in melanoma cancer stem cells[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(66): 110257–72.
- [13] Dasari V R, Mazack V, Feng W, et al. Verteporfin exhibits YAP-independent anti-proliferative and cytotoxic effects in endometrial cancer cells[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(17): 28628–40.
- [14] Meng H, Wang M, Liu H, et al. Use of a lipid-coated mesoporous silica nanoparticle platform for synergistic gemcitabine and paclitaxel delivery to human pancreatic cancer in mice[J]. *ACS nano*, 2015, 9(4): 3540–57. *ACS Nano*. 2015;9(4):3540–57.
- [15] Saber M M, Al-Mahallawi A M, Nassar N N, et al. Targeting colorectal cancer cell metabolism through development of cisplatin and metformin nano-cubosomes[J]. *BMC Cancer*, 2018, 18(1): 822.

Experimental study on apoptosis-inducing and proliferation inhibition by synergistic delivery of verteporfen/TRAIL by extracellular vesicles in oral squamous cell carcinoma cells

Wang Wenjing, Li Kunshan, Liu Tiejun, Liu Xin, Qiu Yongle

(Dept of Stomatology Fourth Affiliated Hospital, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000)

Abstract Objective To develop an extracellular vesicles (EVs) co-loading system by synergistically deliver tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand (TRAIL)/verteporfin (VPF) combination to induce apoptosis and inhibit proliferation of OSCC cells. **Methods** TRAIL/VPF co-loaded EVs (MSCT-EVs/VPF) was purified and collected through ultracentrifugation and dialysis. The expression of CD63, CD9 and TRAIL was detected by BCA to confirm the origin of EVs. High performance liquid chromatography (HPLC) was used to detect the drug loading of VPF and draw the release curve in vitro. Cytotoxicity and half inhibitory concentration (IC_{50}) were detected by MTT assay. The apoptosis rate was detected by flow cytometry. Finally, Western blot was used to detect the effects of MSCT-EVs/VPF on the expression of apoptosis related proteins and Yap in SCC25 cells. **Results** MSCT-EVs/VPF particles were round and well dispersed with a diameter of about 100 nm. The drug loading of the nano system was about $(15.43 \pm 0.44)\%$, 57.8% of VPF was released in 10 h and 82.5% in 45h; MSCT-EVs and VPF could inhibit the growth of SCC25 tumor cells in a dose-dependent manner, showing good synergistic effect in the ratio of 10:1–5:1 ($CI < 1$, wt%). At the ratio of 100:5 ~ 100:15 (Mass ratio of MSCT-EVs to VPF, wt%), the IC_{50} of MSCT-EVs/VPF was significantly lower than that of free MSCT-EVs + free VPF group ($P < 0.05$), and showed a more effective inhibition. The high inhibitory effect of MSCT-EVs/VPF on squamous cell carcinoma cells was partly due to the regulation of Caspase-3, Bax, BCL-2, mTOR, p-mTOR and YAP. **Conclusion** EVs delivery of a fixed proportion of TRAIL/VPF shows high inhibitory effect on oral squamous cell carcinoma cells, which provides a new idea for the treatment of multidrug-resistant tumors.

Key words verteporfen; extracellular vesicles; TRAIL; oral squamous cell carcinoma