

负载 Bcl-2 siRNA 外泌体的制备及其对胰腺癌细胞生长抑制作用

左 玲¹, 乔 淦^{1,2}, 郭铭悦¹, 林秀坤¹, 刘明华^{1,2*}

(1. 西南医科大学药学院, 四川 泸州 646000; 2. 厅市共建中枢神经系统药物四川省重点实验室, 四川 泸州 646000)

摘要: Bcl-2 高表达与胰腺癌的发生、发展密切相关。本研究采用超速离心法从人胚肾 (HEK293) 细胞上清培养液中分离外泌体, 利用电转技术制备了负载 Bcl-2 siRNA 的外泌体 (exosiBcl-2), 透射电镜观察表明, 外泌体呈现典型内凹的杯状结构, Western blot 分析表明外泌体特征蛋白 CD9、CD81、CD63 和 TSG101 呈现高表达, 采用共聚焦显微镜、流式细胞术分析证实, exosiBcl-2 可以高效转染人胰腺癌 Miapaca-2 细胞, 转染效率为 77.2%。MTS 分析表明, exosiBcl-2 可以显著抑制 Miapaca-2 细胞增殖, 抑制率达到 63%。本研究证实, exosiBcl-2 可高效穿透细胞膜, 通过抑制靶基因 Bcl-2 表达发挥抑制肿瘤细胞生长的作用。

关键词: 胰腺癌; Bcl-2; 外泌体; 细胞增殖

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2020)12-2918-06

Preparation of exosome-coated Bcl-2 siRNA and its inhibitory effect on the growth of pancreatic cancer cells

ZUO Ling¹, QIAO Gan^{1,2}, GUO Ming-yue¹, LIN Xiu-kun¹, LIU Ming-hua^{1,2*}

(1. School of Pharmacy, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China; 2. Central Nervous System Drug Key Laboratory of Sichuan Province, Luzhou 646000, China)

Abstract: High expression of Bcl-2 is associated with the development of pancreatic cancer, and downregulation of Bcl-2 is an effective approach for the treatment of pancreatic malignancy. In the present study exosomes were isolated from the cultured medium of human embryonic kidney cells (HEK293) by ultracentrifugation and exosome-coated Bcl-2 siRNA (exosiBcl-2) was synthesized using electroporation. The results showed that the particle size of exosiBcl-2 was 67.3 ± 9.7 nm and the morphology of exosomes displayed a concave ring structure as determined by transmission electron microscopy (TEM). Western blot analysis indicated that exosomal proteins including CD9, CD81, CD63 and TSG101 were highly expressed. Confocal microscopy revealed that exosiBcl-2 was widely distributed in Miapaca-2 cells, and the transfection efficiency of exosiBcl-2 in Miapaca-2 was 77.2% as determined by flow cytometry. Treatment with exosiBcl-2 at a concentration of $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ resulted in an inhibitory effect on the growth of Miapaca-2 cells with an inhibition rate of 63%. ExosiBcl-2 treatment can downregulate Bcl-2 and upregulate Bax protein. This study provides evidence that exosiBcl-2 is able to inhibit the growth of pancreatic cancer cells and the nanoparticles have potential to be developed as a novel anticancer agent.

Key words: pancreatic cancer; Bcl-2; exosome; cell proliferation

胰腺癌是全球癌症相关死亡的第四大原因, 其特

点是预后差、早期复发和快速转移。胰腺癌的传统治疗方法包括手术、化疗、放疗和姑息治疗。近年来, 尽管诊断和治疗措施有所改善, 但 5 年存活率仍低于 8%^[1]。目前, 胰腺癌的化疗药物仍然以吉西他滨作为一线药物, 但其存在毒副作用及抗药性的问题。近年来, 利用吉西他滨联合表皮生长因子受体 (epidermal

收稿日期: 2020-06-17; 修回日期: 2020-06-22.

基金项目: 四川省科技厅重点研发项目 (2019YFS0116); 四川省杰出青年科技人才项目 (2019JDJQ33).

*通讯作者 Tel: 86-830-3193872, E-mail: liumhvip@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2020-1011

growth factor receptor, EGFR)、血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 等靶向药物治疗取得了一定进展^[2]; 单克隆抗体和细胞因子等免疫治疗手段也尝试应用于胰腺癌的治疗^[3], 但这些新的治疗措施对改善胰腺癌患者的生存率尚未获得显著的临床效果。因此, 发展胰腺癌新的治疗策略具有重要意义^[4]。

siRNA 分子通过碱基互补配对与 mRNA 结合, 诱导 mRNA 的降解和/或阻断蛋白质的合成。siRNA 药物可以通过阻断转录后过程或抑制致病基因的翻译, 对遗传性疾病、自身免疫性疾病和癌症等的治疗都具有广泛的应用前景。2018 年, 美国 FDA 批准了第一种基于 RNA 治疗的 siRNA 药物 patisiran^[5]。目前 siRNA 药物已成为国内外的研究热点, 与其他抗癌药物相比, siRNA 靶向治疗对基因异常表达具有较高的特异性。然而, siRNA 属于极性大分子、半衰期短、膜穿透能力弱, 因此开发高效、低毒的细胞递送载体对 siRNA 药物具有重要意义。外泌体是从活细胞中释放出来的磷脂双分子层纳米囊泡 (40~100 nm), 具有重要的生物学功能^[6]。近年来外泌体作为蛋白、DNA 及 RNA 载体的研究受到广泛重视, 多种外泌体负载的 siRNA 药物对肿瘤细胞具有良好的抑制作用^[7]。Alvarez-Erviti 等^[8]首次利用神经元特异性肽修饰外泌体, 采用电穿孔的方法使外泌体成功负载 BACE1 siRNA, 特异性靶向小鼠神经元细胞, 可以显著降低 BACE1 基因的表达。B 淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2) 是一种癌基因, 在细胞凋亡和转移中起重要作用^[9]。Bcl-2 的高表达能够抑制细胞色素 c (cyt-c) 结合凋亡诱导因子 1 (Apaf1) 和 caspase-9 形成凋亡体并激活下游 caspase 级联反应引起的线粒体凋亡。Bcl-2 还可以通过刺激各种信号元件如激酶、转录因子、细胞表面受体和基质降解酶, 促进细胞迁移和侵袭^[10]。前期研究表明, Bcl-2 在胰腺癌细胞中高表达, 抑制 Bcl-2 可以抑制胰腺癌细胞生长^[11]。本研究制备了负载 Bcl-2 siRNA 的外泌体 (exosome-coated Bcl-2 siRNA, exosiBcl-2), 研究了其对胰腺癌细胞生长的抑制作用, 结果表明 exosiBcl-2 可以显著抑制胰腺癌细胞 Miapaca-2 生长。

材料与方法

药品与试剂 DMEM 培养基、胎牛血清系美国 HyClone 公司产品; SBI 无外泌体血清系美国 SBI 公司产品; 单克隆抗体 CD9、CD63、CD81、TSG101 购自 Abcam 公司; Bcl-2 siRNA 与带红色荧光标签的 cy3-Bcl-2 siRNA 购自上海吉凯基因化学技术有限公司。MTS 试剂盒购自美国 Sigma 公司; Western blot 凝胶试剂盒系苏州凯

基生物技术公司产品; 总 RNA 提取试剂盒及 qRT-PCR 引物购自北京天根公司; BCA 试剂盒购自美国 Thermo 公司。其他化学试剂均为分析试剂级。

细胞株 人胰腺癌细胞株 Miapaca-2 和人胚肾细胞 HEK293 购均自 ATCC (American Type Culture Collection)。

外泌体的制备 采用超速离心法对 HEK293 上清培养液中的外泌体进行分离。HEK293 细胞正常培养至密度为 60%, 换为无外泌体的血清, 待密度至 85% 左右, 收集细胞上清, 4 °C、2 000 ×g 离心 15 min。上清液再于 4 °C、16 500 ×g 离心 30 min, 经 0.22 μm 的滤膜过滤, 去除大于 200 nm 的颗粒杂质。4 °C、100 000 ×g 超速离心 70 min, 重复 2 次, 收集下层外泌体, 用 100 μL PBS 重悬, 于 -80 °C 保存。

电转制备 exosiBcl-2 Bcl-2 siRNA 的序列设计如下^[12]: sense 5'-GUACAUCCAUUAUAAGCUG-dTdT-3'; antisense 5'-CAG CUU AUA AUG GAU GUAC-dTdT-3'。为了方便检测, 同时合成了带红色荧光标签 cy3 的 Bcl-2 siRNA, 即 cy3-Bcl-2 siRNA。将外泌体与 Bcl-2 siRNA 按照质量比为 5:1 加入电转杯中, 于 400 V、125 μF 电转 2 s (Bio-Rad Gene Pulser Xcell 电穿孔仪)。电转后的混合物以 135 000 ×g、4 °C 离心 70 min, 获得的 exosiBcl-2 用 PBS (100 μL) 重悬, 于 -80 °C 保存。

粒径检测 将分离得到的外泌体和 exosiBcl-2, 分别取 10 μL 于不同的 EP 管中, 用 PBS 稀释后, 混匀加入比色皿中, 利用马尔文 Nano-ZS90 纳米颗粒计数仪测定外泌体和 exosiBcl-2 的粒径。

Western blot 外泌体经 BCA 蛋白定量, 采用 Western blot 检测 CD9、CD63、CD81、TSG101 表达水平。Miapaca-2 细胞 (2×10⁵ 个) 接种到 6 孔板中, 培养 24 h, 采用 exosiBcl-2 处理细胞, 继续培养 48 h, 用 RIPA 裂解液裂解, 离心提取蛋白。采用 BCA 法测定各组蛋白浓度, 每组样品取 40 μg 蛋白上样, SDS-PAGE 分离蛋白, 电转移至 PVDF 膜上; 用 5% 脱脂奶粉室温摇床封闭 1 h, TBST 洗膜 1 次加入一抗 (Bcl-2 和 Bax), 4 °C 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次, 每次 5 min, 加入二抗室温孵育 1 h, TBST 洗 3 次, 每次 5 min。用 ECL 化学发光法检测蛋白表达。使用 Image J 软件分析蛋白的相对表达量。

外泌体形态观察 采用负染色法观察外泌体形态。取外泌体样品 10 μL, 添加到带碳膜的铜网上, 滤纸吸走浮液、静置 30 min。配制 2% 醋酸双氧铀, 取 10 μL 对外泌体进行染色 20 min。去离子水清洗 5 次, 每次 2 min, 透射电镜下观察样品形态。

ExosiBcl-2 在细胞内的分布测定 采用共聚焦显微镜检测 exosiBcl-2 在细胞内的分布。将 Miapaca-2 细胞

(1.5×10^5 个) 接种于共聚焦培养皿中, 加入 cy3-exosiBcl-2 处理 24 h, 加入免疫染色固定液孵育 10 min, 用免疫染色洗涤液洗涤 4 次, 每次 5 min; 将绿色荧光探针 (Actin-Tracker Green) 用免疫荧光染色二抗稀释液稀释 (1:200), 加 200 μL 至共聚焦培养皿, 室温孵育 30 min, 染色完成后, 洗涤液洗 4 次, 每次 5 min; 加入 DAPI 工作液室温孵育 10 min; PBS 洗涤 4 次, 使用激光共聚焦显微镜观察。

转染效率分析 采用流式细胞技术测定 exosiBcl-2 的转染效率。取对数期生长的 Miapaca-2 细胞, 胰蛋白酶消化后, 悬浮计数, 将细胞悬液以 2×10^5 个/孔接种至 6 孔板中。过夜培养 24 h 后, 以 cy3-exosiBcl-2 处理细胞, 于 37°C 、5% CO_2 条件下转染 24 h, 胰酶消化, $800 \times g$ 离心 5 min 收集细胞, 重悬于 500 μL 的 PBS 中。使用流式细胞仪分析, 统计 cy3 荧光为阳性的细胞比例, 得到转染效率。

MTS 检测 exosiBcl-2 对胰腺癌细胞增殖的影响 取对数生长期的 Miapaca-2 细胞, 胰蛋白酶消化, 细胞计数, 以培养液稀释为终浓度为每毫升 3×10^4 个的细胞悬液, 每孔 100 μL 接种于 96 孔板中, 37°C 、5% CO_2

过夜培养 24 h, 用 exosiBcl-2 处理细胞, 于 37°C 培养 0、24、48、72、96、120 和 144 h 后, 每孔加入 MTS 试剂孵育 1 h, 用全波长酶标仪于 490 nm 测定吸光值。

统计学分析 所得数据用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 用 Excel 和 GraphPad Prism 8.0 统计软件进行数据统计和分析, 组间的均数比较用 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。应用 GraphPad Prism 8.0 对数据进行分析作图。

结果

1 外泌体和 exosiBcl-2 的鉴定

从 HEK293 细胞上清培养液中提取外泌体, 外泌体产量约为 $150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。采用电转法制备 exosiBcl-2, 用 Malvern Zetasizer 激光粒度仪测定粒径, 结果表明外泌体粒径为 $66.1 \pm 10.7 \text{ nm}$, exosiBcl-2 粒径为 $67.3 \pm 9.7 \text{ nm}$ (图 1A 和 B)。透射电子显微镜下观察结果表明, 外泌体膜结构完整, 呈内凹的杯状结构, 符合外泌体的结构和表征 (图 1C 和 D)。Western blot 结果显示, 外泌体特征蛋白 CD9、CD63、CD81 和 TSG101 的表达富集 (图 1E)。使用琼脂糖凝胶测定 exosiBcl-2 中 Bcl-2

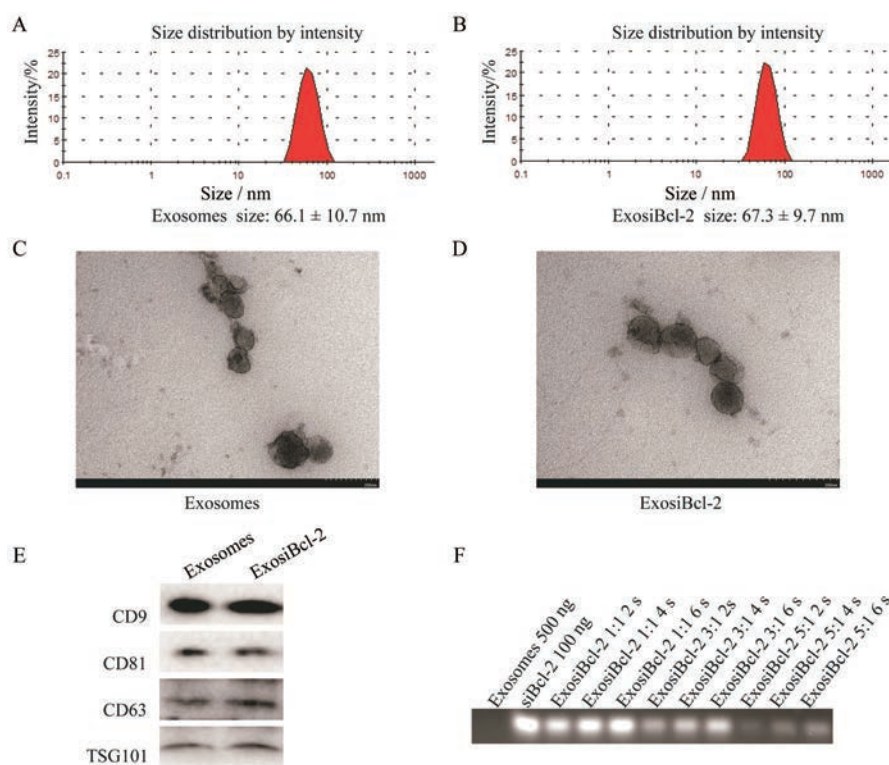


Figure 1 Characteristic analysis of exosomes and exosiBcl-2 by transmission electron microscopy (TEM), Malvern zetasizer laser analyzer and Western blot. Exosomes were extracted from the cultured medium of HEK293 cells by ultracentrifugation, and exosiBcl-2 was synthesized by electroporation. The size distribution of exosomes (A) and exosiBcl-2 (B) were analyzed by Malvern zetasizer laser analyzer. The morphology of exosomes (C) and exosiBcl-2 (D) was observed by TEM. Western blot analysis was performed to determine the expression of the characteristic proteins including CD9, CD63, CD81, and TSG101 (E). The loading rate of Bcl-2 siRNA was analyzed by agarose electrophoresis (F)

siRNA 的负载率, 如图 1F 所示, 提示当 siRNA 与外泌体的质量比在 5:1, 脉冲时间为 2 s, 400 V 和 125 μ F 条件时, Bcl-2 siRNA 在外泌体中的负载率约为 63.1%。

2 ExosiBcl-2 可以高效进入胰腺癌 Miapaca-2 细胞

本研究首先采用共聚焦显微镜观察 exosiBcl-2 在 Miapaca-2 细胞中的分布, 结果表明, 转染 cy3-exosiBcl-2 的细胞中红色荧光强度显著增加 (图 2), 说明 exosiBcl-2 广泛分布于细胞内。

进一步利用流式细胞术测定了 Bcl-2 siRNA 转染

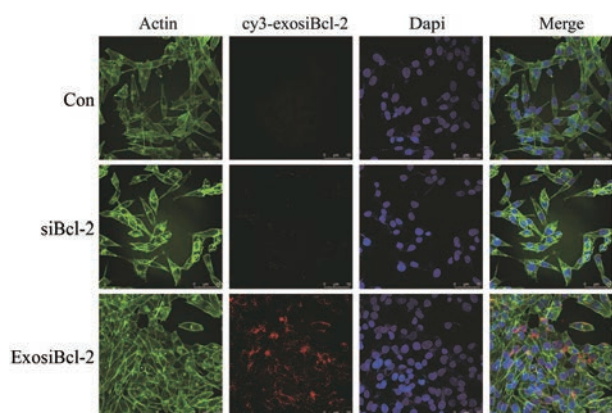


Figure 2 The distribution of exosiBcl-2 in Miapaca-2 cells. Miapaca-2 cells were treated with exosiBcl-2 for 24 h, and the fluorescence intensity was analyzed using Confocal microscopy approach. Green fluorescence (actin-tracker green) represented the actin and blue fluorescence (DAPI) indicated the nucleus, while the red fluorescence represented distribution of cy3-exosiBcl-2. Scale Bar = 50 μ m

效率。如图 3 所示, 与 siBcl-2 对照组相比, 转染 24 h 后, exosiBcl-2 在 Miapaca-2 中的转染效率为 77.2%, 转染效率显著提高 ($P < 0.01$)。

3 ExosiBcl-2 通过下调 Bcl-2 的表达抑制 Miapaca-2 细胞生长

ExosiBcl-2 ($100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 处理 Miapaca-2 细胞, 采用 MTS 法测定其对胰腺癌细胞生长的影响, 如图 4 所示, 随着时间增加, 经 exosiBcl-2 处理, Miapaca-2 细胞活力逐步降低, 第 7 天的抑制率达到 63%。采用 Western blot 测定 Bcl-2 相关凋亡蛋白的表达, 结果显示, exosiBcl-2 处理可以导致抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达下降, 促凋亡蛋白 Bax 表达增加, 提示 exosiBcl-2 可以通过影响 Bcl-2/Bax 的表达, 从而抑制胰腺癌细胞生长。

讨论

本研究通过电穿孔的方法制备了 exosiBcl-2, 并在体外评估了其抗胰腺癌作用。结果表明, exosiBcl-2 可以高效进入肿瘤细胞, 并抑制胰腺癌细胞 Miapaca-2 的生长。进一步的研究表明, exosiBcl-2 可以通过下调抗凋亡蛋白 Bcl-2, 上调促凋亡蛋白 Bax 发挥抑制肿瘤细胞生长的作用。

基于 siRNA 的靶向治疗具有多种优点, 包括高特异性、低毒性和高效性。但是, 由于 siRNA 属于极性大分子, 难以进入细胞, 因此发展安全有效的载体是 siRNA 药物成功的关键^[5]。多年来, 已经开发了多种载体, 包括脂质体介导的 siRNA 纳米制剂^[13]、聚乙烯亚胺 (PEI)

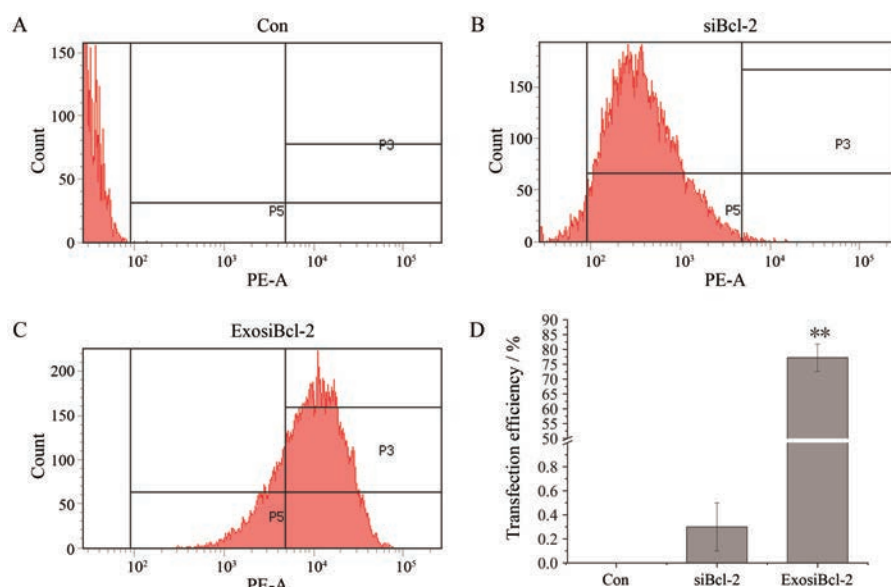


Figure 3 Analysis of transfection efficiency of exosiBcl-2 in Miapaca-2 cells. Miapaca-2 cells were cultured at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 24 h, and exosiBcl-2 ($100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) was added. After incubated for 24 h, cells were collected by centrifugation at 1 000 $\times g$ for 10 min, and the transfection efficiency of exosiBcl-2 in Miapaca-2 cells transfected with control (A), siBcl-2 (B), exosiBcl-2 (C) was analyzed by flow cytometry. (D) indicated the quantitative analysis of transfection efficiency. $n = 3, \bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$ vs siBcl-2 group

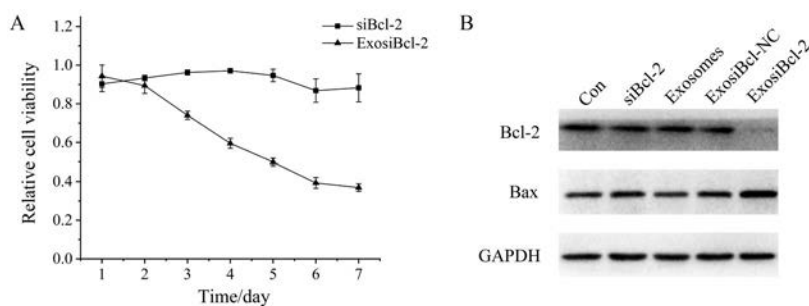


Figure 4 ExosiBcl-2 inhibited the growth of Miapaca-2 cells *via* downregulating Bcl-2. Miapaca-2 cells were treated with exosiBcl-2 and the cell proliferation activity was evaluated by MTS analysis (A). Western blot was performed to determine the expression of Bcl-2 and Bax protein (B)

和聚乙二醇 (PEG) 介导的 siRNA 纳米颗粒^[14]。本课题组前期研究表明, PEI 包裹的 miR-125b 可以显著抑制肿瘤细胞生长^[15]。由于 PEI 对人正常细胞具有毒性, 使用 PEI 作为 siRNA 的载体不能满足临床应用的要求^[16]。与其他大分子纳米载体相比, 外泌体具有组织相容性好和低免疫原性等优点。此外, 可以通过对外泌体表面跨膜蛋白的特异性修饰实现体内靶向治疗。Ohno 等^[17]通过对外泌体膜蛋白的修饰, 特异性表达 GE11, 表明外泌体经修饰后负载的 miRNA let-7a 能够靶向 EGFR 高表达的乳腺癌细胞。本实验室正在进行修饰外泌体的研究, 以增加 exosiBcl-2 的靶向性能。

肿瘤转移是肿瘤细胞从原发部位向远处器官逐渐定植的过程, 是导致癌症患者死亡的主要因素^[18]。Bcl-2 在促进肿瘤细胞转移中起重要作用。Bcl-2 家族成员可以通过刺激各种信号传导因子, 如黏着斑激酶 (FAK) 和促分裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 来促进细胞迁移和侵袭^[10]。ExosiBcl-2 对胰腺癌的抗转移作用需要更多的实验证实。

作者贡献: 左玲、刘明华负责实验设计, 左玲和乔淦进行具体实验, 郭铭悦参与了实验数据分析, 林秀坤进行实验评估和指导。

利益冲突: 文章内容不涉及相关利益冲突, 该研究未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

References

- [1] Golan T, HammeL P, Reni M, et al. Maintenance olaparib for germline BRCA-mutated metastatic pancreatic cancer [J]. *N Engl J Med*, 2019, 381: 317-327.
- [2] Schultheis B, Reuter D, Ebert MP, et al. Gemcitabine combined with the monoclonal antibody nimotuzumab is an active first-line regimen in KRAS wildtype patients with locally advanced or metastatic pancreatic cancer: a multicenter, randomized phase IIb study [J]. *Ann Oncol*, 2017, 28: 2429-2435.
- [3] Foley K, Kim V, Jaffee E, et al. Current progress in immunotherapy for pancreatic cancer [J]. *Cancer Lett*, 2016, 381: 244-251.
- [4] Seufferlein T, Ettrich TJ. Treatment of pancreatic cancer-neoadjuvant treatment in resectable pancreatic cancer (PDAC) [J]. *Transl Gastrointest Cancer*, 2019, 4: 21.
- [5] Jain S, Pathak K, Vaidya A. Molecular therapy using siRNA: recent trends and advances of multi target inhibition of cancer growth [J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 116: 880-892.
- [6] Thery C, Amigorena S, Raposo G, et al. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids [J]. *Curr Protoc Cell Biol*, 2006. DOI: 10.1002/0471143030.cb0322s30.
- [7] Van DB, Jasper G, Schlee M, et al. siRNA delivery with exosome nanoparticles [J]. *Nat Biotechnol*, 2011, 29: 325-326.
- [8] Alvarez-Erviti L, Seow Y, Yin H, et al. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes [J]. *Nat Biotechnol*, 2011, 29: 341-345.
- [9] Adams JM, Cory S. The Bcl-2 arbiters of apoptosis and their growing role as cancer targets [J]. *Cell Death Differ*, 2017, 25: 27-36.
- [10] Zuo J, Ishikawa T, Boutros S, et al. Bcl-2 overexpression induces a partial epithelial to mesenchymal transition and promotes squamous carcinoma cell invasion and metastasis [J]. *Mol Cancer Res*, 2010, 8: 170-182.
- [11] Westphal S, Kalthoff H. Apoptosis: targets in pancreatic cancer [J]. *Mol Cancer*, 2003, 2: 6.
- [12] Beh CW, Seow WY, Wang Y, et al. Efficient delivery of Bcl-2-targeted siRNA using cationic polymer nanoparticles: downregulating mRNA expression level and sensitizing cancer cells to anticancer drug [J]. *Biomacromolecules*, 2009, 10: 41-48.
- [13] Eloy JO, Petrilli R, Raspantini GL, et al. Targeted liposomes for siRNA delivery to cancer [J]. *Curr Pharm Des*, 2018, 24: 2664-2672.
- [14] Song F, Sakurai N, Okamoto A, et al. Design of a novel PEGylated liposomal vector for systemic delivery of siRNA to solid tumors [J]. *Biol Pharm Bull*, 2019, 42: 996-1003.
- [15] Rytblat I, Wu N, Xu HL, et al. *In vitro* studies of polyethylenei-

- mine coated miRNA microspheres as anticancer agents [J]. *Nano Res*, 2016, 9: 1609-1617.
- [16] Xiong MP, Forrest ML, Ton G, et al. Poly(aspartate-g-PEI800), a polyethylenimine analogue of low toxicity and high transfection efficiency for gene delivery [J]. *Biomaterials*, 2007, 28: 4889-4900.
- [17] Ohno S, Takanashi M, Sudo K, et al. Systemically injected exosomes targeted to EGFR deliver antitumor microRNA to breast cancer cells [J]. *Mol Ther*, 2013, 21: 185-191.
- [18] Robert J. Biology of cancer metastasis [J]. *Bull Cancer*, 2013, 100: 333-342.