

# 鼻咽癌外泌体通过 LncTUG1 促进内皮细胞增殖和血管生成\*

王科 马敏 蒋晋安 赵琳 张海鹏

(西安医学院第一附属医院耳鼻咽喉头颈外科, 陕西 西安 710100)

**【摘要】** 目的 探讨鼻咽癌来源外泌体通过长非编码 RNA 牛磺酸上调基因 1 (LncTUG1) 促进内皮细胞 (HUVECs) 增殖和血管生成的作用及其可能的作用机制。方法 采用脂质体转染法转染 CNE1 细胞并将其分为 Blank 组、sh-NC 组、sh-LncTUG1-1 组、sh-LncTUG1-2 组和 sh-LncTUG1-3 组。将 HUVECs 与外泌体共孵育, 设为 PBS 组和 CNE1-Exo 组或 PBS 组、CNE1-Exo-sh-NC 组和 CNE1-Exo-sh-LncTUG1 组。RT-PCR 实验检测人鼻咽癌细胞株 CNE1、CNE2、HONE1、正常鼻咽上皮 NP69 和人脐静脉 HUVECs 中 LncTUG1 的表达; 透射电镜观察外泌体形态; Nanosight 纳米粒度颗粒跟踪分析仪检测外泌体粒径; PKH67 试剂盒检测 HUVECs 对外泌体的摄取情况; Western blot 检测外泌体标志性蛋白 CD63、CD9 和 TSG101 蛋白表达; CCK-8 试剂盒检测 HUVECs 细胞活力; EdU 实验检测 HUVECs 细胞增殖; Matrigel 血管形成实验检测 HUVECs 血管形成能力。结果 CNE1、CNE2 和 HONE1 细胞中 LncTUG1 表达水平平均高于 NP69 细胞 ( $P < 0.01$ ), 且 CNE1 细胞中 LncTUG1 表达水平最高。成功分离 NP69 来源外泌体 (NP69-Exo) 和 CNE1 来源外泌体 (CNE1-Exo、CNE1-Exo-sh-NC、CNE1-Exo-sh-LncTUG1), 外泌体呈圆形囊泡结构, 直径均约为 100 nm, 且高表达 CD63、CD9 和 TSG101 蛋白。PKH67 标记的外泌体可被 HUVECs 摄取。CNE1-Exo 组 HUVECs 中 LncTUG1 的表达、细胞活力、EdU 阳性细胞率、管状网络结构数量明显高于 PBS 组 ( $P < 0.05$ )。CNE1-Exo-sh-NC 组 HUVECs 中 LncTUG1 的表达、细胞活力、EdU 阳性细胞率和管状网络结构数量明显高于 PBS 组 ( $P < 0.05$ ), CNE1-Exo-sh-LncTUG1 组中 HUVECs 中 LncTUG1 表达、细胞活力、EdU 阳性细胞率和管状网络结构数量明显低于 CNE1-Exo-sh-NC 组 ( $P < 0.05$ )。结论 鼻咽癌外泌体通过 LncTUG1 促进内皮细胞增殖和血管生成, 在鼻咽癌中发挥重要作用。

**【关键词】** 鼻咽癌; 牛磺酸上调基因 1; 外泌体; 增殖; 血管生成

**【中图分类号】** R739.63 **【文献标志码】** A **DOI:** 10.3969/j.issn.1672-3511.2022.03.010

## Nasopharyngeal carcinoma-derived exosomes promote endothelial cell proliferation and angiogenesis through TUG1

WANG Ke, MA Min, JIANG Jin'an, ZHAO Lin, ZHANG Haipeng

(Department of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, The First Affiliated Hospital of Xian Medical College, Xian 710100, China)

**【Abstract】** **Objective** To explore the effects of nasopharyngeal carcinoma-derived exosomes on endothelial cell proliferation and angiogenesis and its possible mechanisms. **Methods** CNE1 cells were transfected with liposome and divided into Blank, sh-NC, sh-LncTUG1-1, sh-LncTUG1-2 and sh-LncTUG1-3 groups. HUVECs and exosomes were co-incubated and divided into PBS group, CNE1-Exo-sh-NC group and CNE1-Exo-sh-LncTUG1 group. RT-PCR was used to detect the expression of lncTUG1 in human nasopharyngeal carcinoma cell lines CNE1, CNE2, HONE1, normal nasopharyngeal epithelial NP69 and human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). Transmission electron microscopy was used to observe exosome morphology. Nanosight nanoparticle size Particle tracking analyzer was used to detect the size of exosomes. PKH67 kit was used to detect the uptake of HUVECs to exosomes. Western blot was used to

基金项目: 陕西省重点研发项目 (2019SF-082)

通信作者: 张海鹏, E-mail: 66024592@qq.com

引用本文: 王科, 马敏, 蒋晋安, 等. 鼻咽癌外泌体通过 LncTUG1 促进内皮细胞增殖和血管生成 [J]. 西部医学, 2022, 34(3): 367-374. DOI: 10.3969/j.issn.1672-3511.2022.03.010

detect the expression of exosome marker proteins CD63, CD9, TSG101. CCK-8 kit was used to detect HUVECs cell viability. EdU test was used to detect HUVECs cell proliferation. Matrigel angiogenesis test was used to detect HUVECs angiogenesis ability. **Results** The expression level of lncTUG1 in CNE1, CNE2 and HONE1 cells was higher than that of NP69 cells ( $P < 0.01$ ), and the expression level of lncTUG1 in CNE1 cells was the highest. NP69-derived exosomes and CNE1-derived exosomes (CNE1-Exo, CNE1-Exo-sh-NC, CNE1-Exo-sh-lncTUG1) were successfully separated. The exosomes have a round vesicle structure with a diameter of approximately 100nm, and highly express CD63, CD9 and TSG101 proteins. PKH67 labeled exosomes could be taken up by HUVECs. The expression of lncTUG1, cell viability, EdU positive cell rate and the number of tubular network structures in HUVECs in CNE1-Exo group were significantly higher than those in PBS group ( $P < 0.05$ ). The expression of lncTUG1, cell viability, EdU positive cell rate and the number of tubular networks in the CNE1-Exo-sh-NC group were significantly higher than those in the PBS group ( $P < 0.05$ ). The expression of lncTUG1 and cells in the CNE1-Exo-sh-lncTUG1 group Vitality, EdU positive cell rate and the number of tubular network structures were significantly lower than those in CNE1-Exo-sh-NC group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The high expression of lncTUG1 in nasopharyngeal carcinoma exosomes promotes endothelial cell proliferation and angiogenesis.

**[Key words]** Nasopharyngeal carcinoma; Taurine upregulated gene 1; Exosomes; Proliferation; Angiogenesis

鼻咽癌是我国南方地区常见的头颈部上皮性恶性肿瘤, Epstein-Barr 病毒感染、饮食和遗传因素与其病因有关<sup>[1]</sup>。放疗是早期鼻咽癌患者的有效治疗方法, 但绝大多数(75%~90%)鼻咽癌患者在初诊时已发生转移, 这阻碍了鼻咽癌的有效治疗, 并增加了疾病复发的风险<sup>[2]</sup>。肿瘤血管生成对肿瘤的生长、浸润和转移都有重要作用。肿瘤发展过程中, 血管生成开关被激活, 从而导致血管增生。血管生成开关的激活受肿瘤细胞或肿瘤微环境所引起的各种因素的调节<sup>[3]</sup>。因此, 探究肿瘤血管生成的机制对于肿瘤治疗具有重要意义。长非编码 RNA (Long noncoding RNAs, lncRNAs) 通过调控癌细胞增殖、迁移、侵袭和凋亡等过程, 参与调控癌症的发生和发展<sup>[4]</sup>。外泌体是一种直径为 30~150 nm 的膜状囊泡, 其可通过携带蛋白质和遗传物质 (DNA、lncRNA、miRNA 和 mRNA) 等分子货物, 介导细胞间信息转导, 在肿瘤中发挥多种生物学功能<sup>[5]</sup>。先前的研究表明, 长非编码 RNA 牛磺酸上调基因 1 (Long noncoding RNA taurine upregulated gene 1, lncTUG1) 在多种肿瘤中高表达, 可通过调控肿瘤细胞周期及血管生成参与肿瘤的发生、发展过程<sup>[6]</sup>。目前, 关于 lncTUG1 在鼻咽癌中的具体作用机制尚不明确。基于此, 本研究旨在探究鼻咽癌外泌体中 lncTUG1 对内皮细胞 (HUVECs) 增殖和血管生成的作用, 以为鼻咽癌的治疗提供新思路。

## 1 材料与方法

1.1 主要材料 人鼻咽癌细胞株 CNE1、CNE2、HONE1、正常鼻咽上皮 NP69 和人脐静脉内皮细胞购自中科院上海细胞库; PKH67 试剂盒购自美国 Sigma-Aldrich 公司; ActinRed 购自美国 Invitrogen 公司;

CD63、CD9、TSG101 和 GAPDH 抗体购自英国 Abcam 公司; SYBRPremix Ex Taq™ II 试剂盒购自日本 Takara 公司; sh-lncTUG1-1、sh-lncTUG1-2、sh-lncTUG1-3 和 sh-NC 由上海吉玛制药技术有限公司设计并合成; CCK-8 试剂盒购自日本同仁化学研究所; 5-乙炔基-2'-脱氧尿苷 (EdU) 购自大连美仑生物技术有限公司; Matrigel 基质胶购自美国 BD Biocoat 公司。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养 CNE1、CNE2、HONE1 和 NP69 细胞用含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养, HUVECs 用含 10% FBS 的 DMEM/F12 培养基于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。所有细胞每 2 天更换一次培养基。

1.2.2 RT-PCR 检测 lncTUG1 表达 收集 CNE1、CNE2、HONE1、NP69 和 HUVECs 细胞, Trizol 法提取细胞总 RNA, 测定 RNA 浓度, 将 RNA 逆转录合成 cDNA。按照 SYBRPremix Ex Taq™ II 试剂盒说明书进行 RT-PCR 实验。反应条件: 95℃ 30 s; 95℃ 5 s; 60℃ 34 s, 40 个循环。lncTUG1 以 GAPDH 为内参, 采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法计算其 mRNA 表达。lncTUG1 上游引物: 5'-CTGAAGAAAGGCAACATC-3', 下游引物: 5'-GTAGGCTACTACAGGATTTG-3'; GAPDH 上游引物: 5'-ATCCACGGGAGAGCGACAT-3', 下游引物: 5'-CAGCTGCTTGTAAGTGGAC-3'。

1.2.3 细胞转染 将 CNE1 细胞按 4 × 10<sup>5</sup> 个/孔密度接种于 6 孔板, 于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h 后, 将细胞随机分为 Blank 组、sh-NC 组、sh-lncTUG1-1 组、sh-lncTUG1-2 组和 sh-lncTUG1-3 组, 每组设置 3 个重复。按照 Lipofectamine2000™ 说明书进行 sh-NC、sh-lncTUG1-1、sh-lncTUG1-2 和 sh-

LncTUG1-3 的转染。另外,将细胞随机分为 CNE1-sh-NC 组和 CNE1-sh-LncTUG1 组,每组设置 3 个重复。按照 Lipofectamine2000™ 说明书进行 sh-NC 和 sh-LncTUG1 (干扰效率最高的 sh-LncTUG1) 的转染。37℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 48 h 后,进行后续实验。

1.2.4 外泌体的分离及鉴定 ①外泌体的分离:将对数期生长的 NP69 和 CNE1 细胞接种于培养皿中,添加含 10% FBS 的无外泌体的培养基,37℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 72 h,待细胞密度达到 80%~90% 时,收集细胞培养上清液。2000 g 离心 20 min,去除沉淀;10000 g 离心 30 min 去除沉淀。上清液用超速离心机 4℃、100000 g 离心 70 min,无菌 PBS 重悬沉淀后,重复此步骤一次。沉淀用无菌 PBS 重悬后,0.22 μm 滤器过滤,所得分别为 NP69 和 CNE1 细胞来源外泌体,简称 NP69-Exo 和 CNE1-Exo。用转染了 sh-NC 和 sh-LncTUG1 的 CNE1 细胞,按照以上实验步骤进行分离,所得的外泌体分别命名为 CNE1-Exo-sh-NC 和 CNE1-Exo-sh-LncTUG1。所有外泌体于-80℃ 条件下保存备用。②外泌体的鉴定:取适量 NP69-Exo、CNE1-Exo、CNE1-Exo-sh-NC 和 CNE1-Exo-sh-LncTUG1 置于铜网,3% 磷钨酸负染色液染色 5 min,去除染色液。铜网晾干后,透射电镜观察外泌体形态。取适量 NP69-Exo、CNE1-Exo、CNE1-Exo-sh-NC 和 CNE1-Exo-sh-LncTUG1, PBS 稀释,0.22 μm 滤器过滤后,Nanosight 纳米粒度颗粒跟踪分析仪进行外泌体粒径检测。Western blot 实验检测外泌体标志性蛋白 CD63、CD9、TSG101 蛋白表达。

1.2.5 外泌体标记示踪 按照 PKH67 试剂盒说明书标记分离的 CNE1-Exo,用 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基停止过度染色。PBS 清洗外泌体后,将外泌体加入 HUVECs 中,37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h 后,HUVECs 细胞骨架用 ActinRed 染色,并用 4',6'-二氨基-2-苯基吡啶(DAPI)复染细胞核。激光共聚焦显微镜观察 HUVECs 中外泌体的摄取情况。

1.2.6 Western blot 检测外泌体标志性蛋白 CD63、CD9 和 TSG101 蛋白表达 收集外泌体或细胞,RIPA 裂解液裂解外泌体或细胞,取上清,BCA 法测定蛋白浓度。取 30 μg 蛋白进行 SDS-PAGE 分离,湿转法将蛋白转至 PVDF 膜上。10% 脱脂奶粉室温封闭 3 h,CD63 抗体(1:1000)、CD9 抗体(1:2000)、TSG101 抗体(1:1000)和 GAPDH 抗体(1:2000)4℃ 孵育过夜,HRP 标记二抗(1:5000)室温孵育 1 h。ECL 发光液显色,暗室曝光。

1.2.7 外泌体与 HUVECs 的共培养 HUVECs 以 4×10<sup>5</sup> 个/孔密度接种于 6 孔板,将 HUVECs 分为

PBS 组和 CNE1-Exo 组或 PBS 组、CNE1-Exo-sh-NC 组和 CNE1-Exo-sh-LncTUG1 组,每组设置 3 个重复。按照分组,向细胞中添加 50 μg/mL CNE1-Exo、CNE1-Exo-sh-NC、CNE1-Exo-sh-LncTUG1 和等量 PBS。细胞继续培养 48 h 后,进行后续实验。

1.2.8 CCK-8 检测 HUVECs 细胞活力 HUVECs 接种于 96 孔板,每孔 5×10<sup>3</sup> 个细胞,继续培养 12 h 后,将细胞分为 PBS 组和 CNE1-Exo 组或 PBS 组、CNE1-Exo-sh-NC 组和 CNE1-Exo-sh-LncTUG1 组。按照分组,向细胞中添加 CNE1-Exo、CNE1-Exo-sh-NC、CNE1-Exo-sh-LncTUG1 和等量 PBS。细胞继续培养 12、24、48 和 72 h 后,向每孔细胞中加入 10 μL CCK-8,37℃ 条件下孵育 3 h。酶标仪测定各孔在 450 nm 处的光密度(OD)值。

1.2.9 5-乙炔基-2'-脱氧尿苷(EdU)实验检测 HUVECs 细胞增殖 取 1.2.7 中的 HUVECs 以 2×10<sup>5</sup> 个/孔数量接种于 24 孔板中,培养 12 h 后,根据说明书,向细胞中添加 EdU 至终浓度为 10 μm。继续培养 2 h 后,弃去培养基,4% 多聚甲醛固定 15 min,0.5% Triton X-100 穿透 20 min, Apollo® 567 避光染色 30 min, DAPI 染核 5 min。激光共聚焦显微镜观察细胞,其中蓝色荧光代表细胞核,红色荧光代表 EdU 阳性细胞。

1.2.10 Matrigel 血管形成实验检测 HUVECs 血管形成能力 取 1.2.7 中的 HUVECs,DMEM/F12 培养基重悬细胞,以 2×10<sup>5</sup> 个/孔细胞数量接种于加有 Matrigel 胶的 24 孔板,37℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 10 h 后,记录各组细胞所有管状结构交叉点数目。

1.3 统计学分析 采用 SPSS 19.0 软件进行数据统计分析,检测所得数据以均值±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较采用单因素方差分析,若组间差异有统计学意义,则采用 LSD-*t* 检验,以  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 LncTUG1 在不同鼻咽癌细胞系中的表达及 sh-LncTUG1 干扰效率筛选 RT-PCR 检测结果显示,CNE1、CNE2 和 HONE1 细胞中 LncTUG1 表达水平均高于 NP69 细胞( $P < 0.01$ ),且 CNE1 细胞中 LncTUG1 表达水平最高,因此选取 CNE1 细胞进行后续实验。sh-LncTUG1-1 组、sh-LncTUG1-2 组和 sh-LncTUG1-3 组 CNE1 细胞中 LncTUG1 表达明显低于 sh-NC 组( $P < 0.01$ ),其中 sh-LncTUG1-3 组 LncTUG1 表达水平最低,因此选取 sh-LncTUG1-3 进行后续实验,简称 sh-LncTUG1。见图 1。

2.2 LncTUG1 在鼻咽癌细胞来源外泌体中的表达水平 透射电镜结果显示,NP69-Exo 和 CNE1-Exo

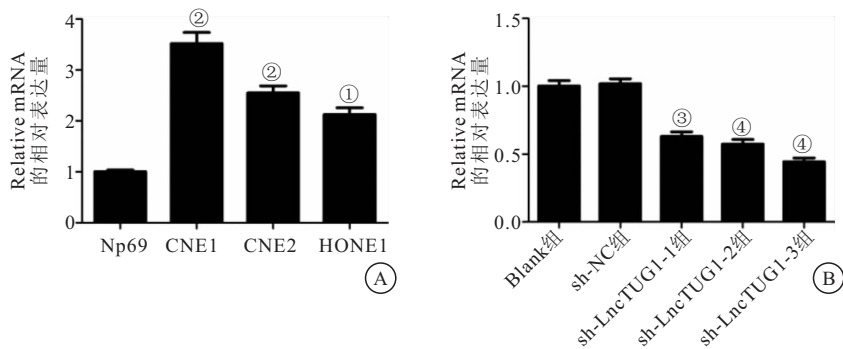


图 1 LncTUG1 在不同鼻咽癌细胞系中的表达及 sh-LncTUG1 干扰效率筛选

Figure 1 Expression of LncTUG1 in different nasopharyngeal carcinoma cell lines and screening of interference efficiency of LncTUG1

注:A. RT-PCR 检测 LncTUG1 在不同鼻咽癌细胞系中的表达;B. RT-PCR 检测 CNE1 细胞系中 LncTUG1 的表达。与 NP69 组比较,①  $P < 0.01$ , ②  $P < 0.001$ ;与 sh-NC 组比较,③  $P < 0.01$ , ④  $P < 0.001$

均呈圆形囊泡结构(图 2A)。粒径分析显示 NP69-Exo 和 CNE1-Exo 直径约为 100 nm(图 2B)。Western blot 实验结果显示 NP69-Exo 和 CNE1-Exo 中外泌体标志性蛋白 CD63、CD9、TSG101 蛋白呈阳性表达(图 2C)。RT-PCR 结果显示,CNE1 组中 LncTUG1 的表

达明显高于 NP69 组 ( $P < 0.001$ ), CNE1-Exo 中 LncTUG1 的表达明显高于 NP69-Exo 组 ( $P < 0.001$ ) (图 2D)。激光共聚焦结果显示,PKH67 标记的外泌体可被 HUVECs 摄取,见图 2E。

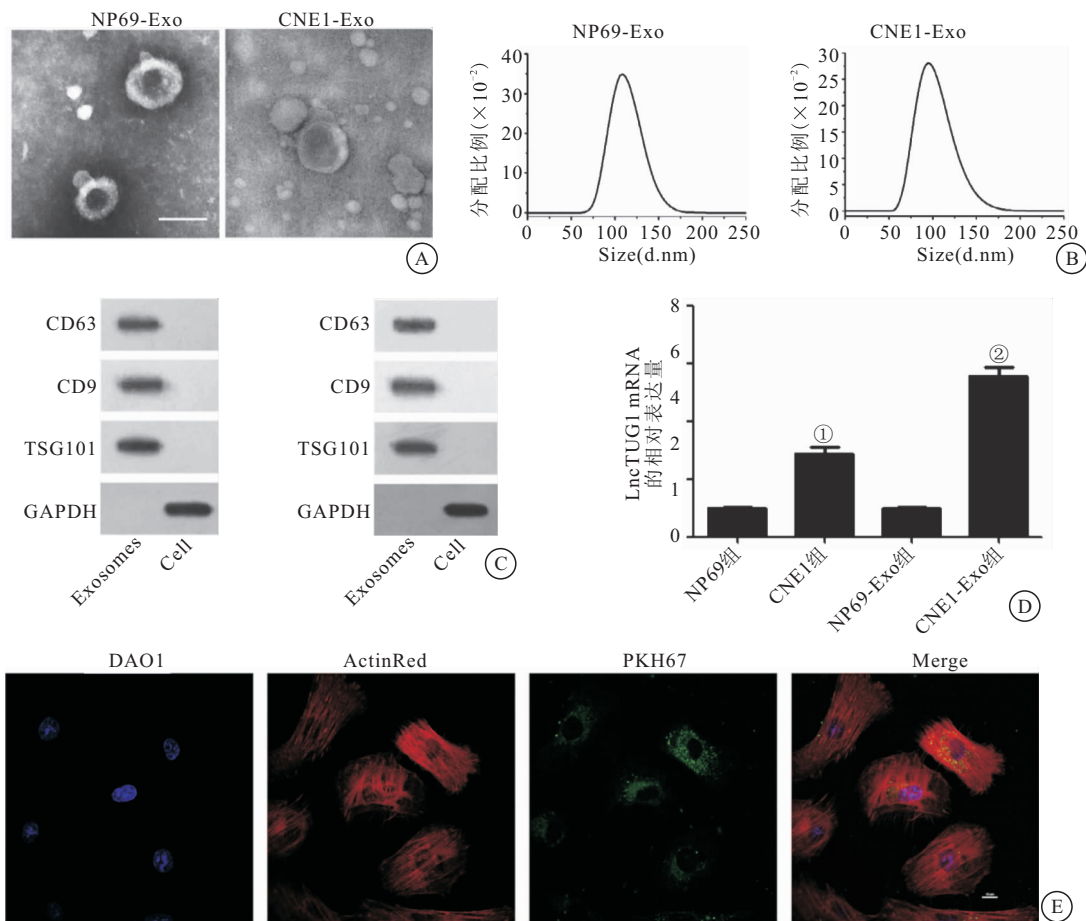


图 2 LncTUG1 在鼻咽癌细胞外泌体中的表达水平

Figure 2 Expression level of LncTUG1 in exosomes of nasopharyngeal carcinoma cells

注:A. 透射电镜检测 NP69-Exo 和 CNE1-Exo 结构,标尺 100 nm;B. 粒径分析检测 NP69-Exo 和 CNE1-Exo 直径;C. Western blot 检测 NP69-Exo 和 CNE1-Exo 外泌体标志物的表达;D. RT-PCR 检测 NP69 和 CNE1 细胞及其对应外泌体中 LncTUG1 的表达;E. 激光共聚焦实验检测 HUVECs 中外泌体的摄取情况(800×)。与 NP69 组比较,①  $P < 0.001$ ;与 NP69-Exo 组比较,②  $P < 0.001$

2.3 CNE1-Exo 对内皮细胞增殖的影响 RT-PCR 实验结果显示, CNE1-Exo 组内皮细胞中 lncTUG1 的表达明显高于 PBS 组 ( $P < 0.001$ ) (图 3A); CCK-8 实验结果显示, CNE1-Exo 组在不同时间点的细胞活力

明显高于 PBS 组 ( $P < 0.05$ ) (图 3B); EdU 实验结果显示, CNE1-Exo 组 EdU 阳性细胞率明显高于 PBS 组 ( $P < 0.001$ ), 见图 3C。

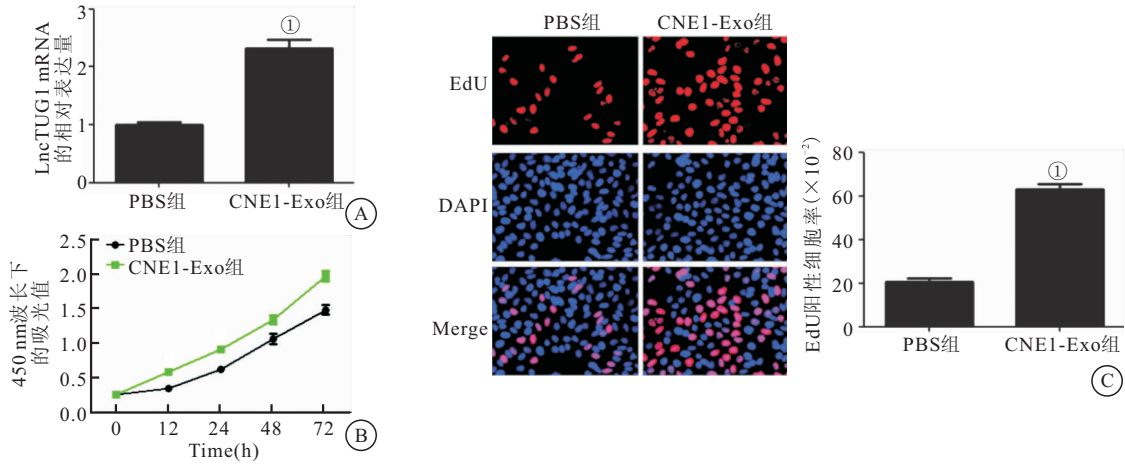


图 3 CNE1-Exo 对内皮细胞增殖的影响

Figure 3 Effect of CNE1-Exo on endothelial cell proliferation

注: A. RT-PCR 检测内皮细胞中 lncTUG1 的表达; B. CCK-8 检测内皮细胞活力; C. EdU 实验检测内皮细胞增殖 (100×)。与 PBS 组比较, ①  $P < 0.05$

2.4 外泌体对内皮细胞血管生成的影响 Matrigel 成管实验结果显示, CNE1-Exo 组 HUVECs 管状网

络结构数量明显高于 PBS 组 ( $P < 0.001$ ), 见图 4。

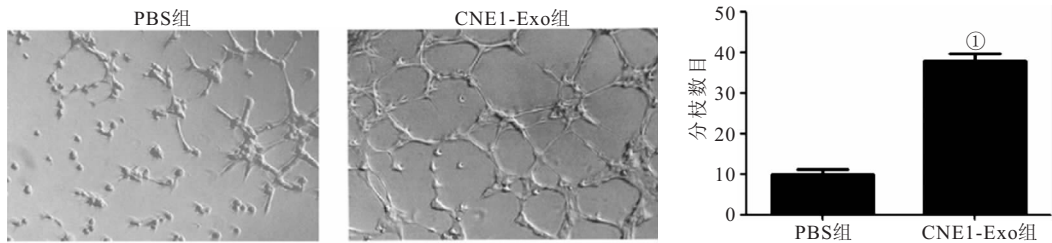


图 4 外泌体对 HUVECs 血管生成的影响

Figure 4 Effect of exosomes on angiogenesis of HUVECs

注: 与 PBS 组比较, ①  $P < 0.001$

2.5 lncTUG1 在 CNE1-Exo-sh-NC 和 CNE1-Exo-sh-lncTUG1 中的表达 透射电镜结果显示, CNE1-Exo-sh-NC 和 CNE1-Exo-sh-lncTUG1 均呈圆形囊泡结构 (图 5A)。粒径分析显示 CNE1-Exo-sh-NC 和 CNE1-Exo-sh-lncTUG1 直径约为 100 nm (图 5B)。Western blot 实验结果显示 CNE1-Exo-sh-NC 和 CNE1-Exo-sh-lncTUG1 中外泌体标志性蛋白 CD63、CD9、TSG101 蛋白呈阳性表达 (图 5C)。RT-PCR 结果显示, CNE1-Exo-sh-NC 组中 lncTUG1 的表达明显高于 PBS 组 ( $P < 0.001$ ), CNE1-Exo-sh-lncTUG1 组中 lncTUG1 的表达明显低于 CNE1-Exo-sh-NC 组 ( $P < 0.001$ ), 见图 5D。

2.6 sh-lncTUG1 对内皮细胞增殖的影响 CCK-8

实验结果显示, CNE1-Exo-sh-NC 组在 12、24、48 和 72 h 的细胞活力明显高于 PBS 组 ( $P < 0.05$ ), CNE1-Exo-sh-lncTUG1 组在 24、48 和 72 h 的细胞活力明显低于 CNE1-Exo-sh-NC 组 ( $P < 0.05$ )。EdU 实验结果显示, CNE1-Exo-sh-NC 组 EdU 阳性细胞率明显高于 PBS 组 ( $P < 0.001$ ), CNE1-Exo-sh-lncTUG1 组 EdU 阳性细胞率明显低于 CNE1-Exo-sh-NC 组 ( $P < 0.001$ ), 见图 6。

2.7 sh-lncTUG1 对内皮细胞血管生成的影响 Matrigel 成管实验结果显示, CNE1-Exo-sh-NC 组 HUVECs 管状网络结构数量明显高于 PBS 组, CNE1-Exo-sh-lncTUG1 组 HUVECs 管状网络结构数量明显低于 CNE1-Exo-sh-NC 组 (均  $P < 0.001$ ), 见图 7。

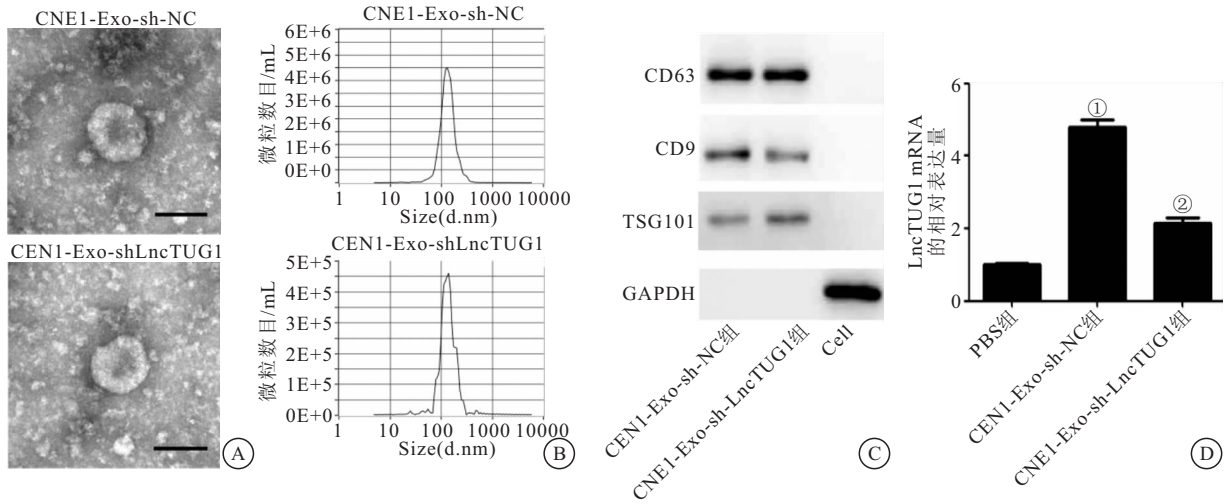


图 5 LncTUG1 在 CNE1-Exo-sh-NC 和 CNE1-Exo-sh-LncTUG1 中的表达

Figure 5 The expression of lncTUG1 in CNE1-Exo-sh-NC and CNE1-Exo-sh-LncTUG1

注: A. 透射电镜检测 CNE1-Exo-sh-NC 和 CNE1-Exo-sh-LncTUG1 结构, 标尺, 100 nm; B. 粒径分析检测 CNE1-Exo-sh-NC 和 CNE1-Exo-sh-LncTUG1 直径; C. Western blot 检测 CNE1-Exo-sh-NC 和 CNE1-Exo-sh-LncTUG1 外泌体标志物的表达; D. RT-PCR 检测 CNE1-Exo-sh-NC 和 CNE1-Exo-sh-LncTUG1 中 LncTUG1 的表达。与 PBS 组比较, ① $P < 0.001$ ; 与 CNE1-Exo-sh-NC 组比较, ② $P < 0.001$

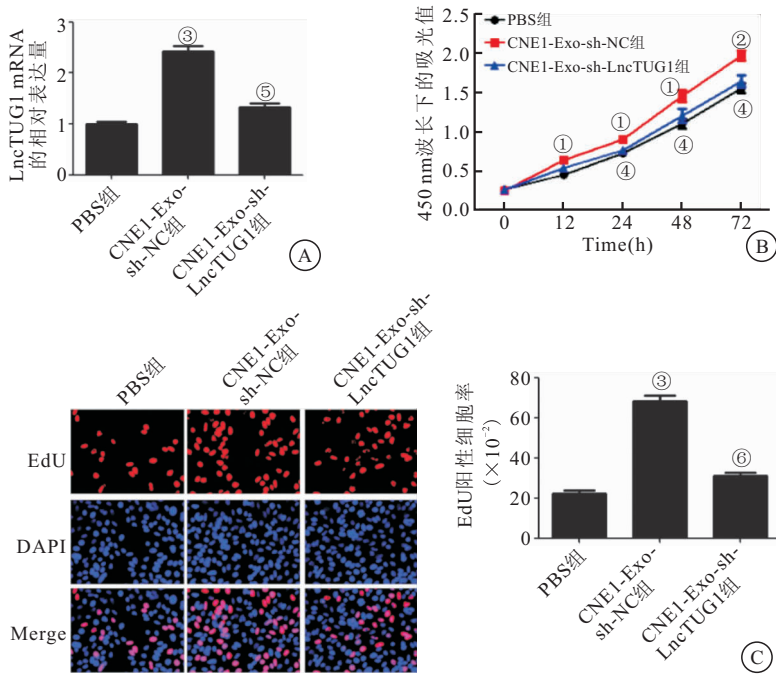


图 6 sh-LncTUG1 对 HUVECs 细胞增殖的影响

Figure 6 Effect of sh-LncTUG1 on HUVECs proliferation

注: A. RT-PCR 检测内皮细胞中 LncTUG1 的表达; B. CCK-8 检测内皮细胞活力; C. EdU 实验检测内皮细胞增殖(100 $\times$ )。与 PBS 组比较, ① $P < 0.05$ , ② $P < 0.01$ , ③ $P < 0.001$ ; 与 CNE1-Exo-sh-NC 组比较, ④ $P < 0.05$ , ⑤ $P < 0.01$ , ⑥ $P < 0.001$

### 3 讨论

鼻咽癌是一种具有特定地理分布的头颈部肿瘤。据统计, 2018 年全世界约有 13 万名患者受其影响, 发病率最高的地区是华南、东南亚和北非。70% 以上的患者在发病时被诊断为局部晚期疾病<sup>[7]</sup>。最近研究发现, LncRNAs 在鼻咽癌组织中差异表达, LncRNAs 参与原发性鼻咽癌的发病机制并与鼻咽癌复发相

关<sup>[8]</sup>。已有研究表明, LncTUG1 在肿瘤中发挥着致癌作用, 敲低 LncTUG1 可抑制癌细胞增殖、侵袭、迁移和上皮间质转化过程, 并诱导细胞凋亡<sup>[9]</sup>。目前, 关于 LncTUG1 在鼻咽癌中的作用尚未可知。因此, 本研究旨在探究 LncTUG1 对鼻咽癌血管生成的作用及其可能的作用机制, 以为鼻咽癌发病机制的探明和开发新的治疗靶点提供新的科学资料。

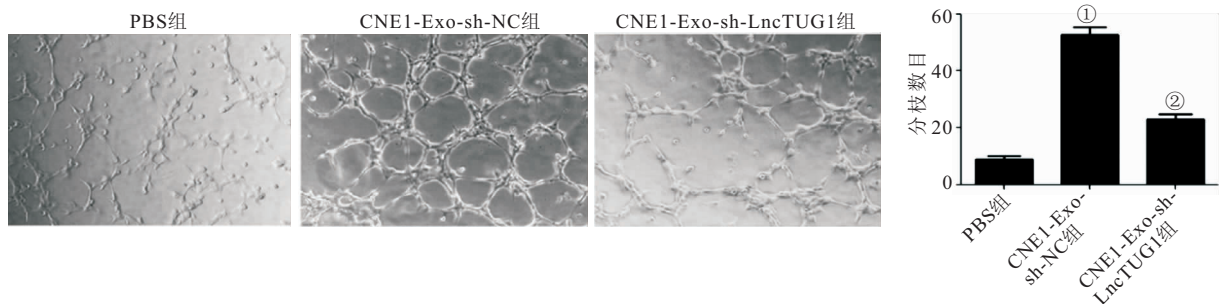


图 7 sh-LncTUG1 对 HUVECs 血管生成的影响

Figure 7 Effect of sh-LncTUG1 on angiogenesis of HUVECs

注:与 PBS 组比较,① $P < 0.001$ ;与 CNE1-Exo-sh-NC 组比较,② $P < 0.001$

在正常情况下,血管生成只发生在胚胎发育、女性生殖周期和伤口修复过程中。然而,异常血管生成是肿瘤发生发展的关键介质和主要过程<sup>[10]</sup>。肿瘤细胞利用各种细胞间通讯机制来适应局部微环境,操纵免疫系统,促进转移。外泌体释放是细胞间通讯的一种新机制。这些纳米囊泡通过所运输的核酸、蛋白质等活性物质参与肿瘤的发生发展<sup>[11]</sup>。研究表明,高转移潜能的宫颈癌细胞来源外泌体通过向低转移潜能癌细胞传递 miR-29,促进低转移潜能癌细胞转移<sup>[12]</sup>。星形胶质瘤细胞来源外泌体中的 miR-1246 可通过靶向细胞黏附分子 1,促进胶质瘤细胞增殖和转移<sup>[13]</sup>。此外,骨肉瘤来源的外泌体中 miR-1307 的高表达可促进骨肉瘤细胞增殖并抑制细胞凋亡<sup>[14]</sup>。鼻咽癌细胞来源外泌体通过 miR-9 靶向 MDK 和调节 PDK/AKT 信号通路,抑制 HUVECs 血管生成和迁移<sup>[15]</sup>。本研究成功分离鼻咽癌细胞 CNE1 外泌体(CNE1-Exo),随后用 CNE1-Exo 处理 HUVECs 发现,CNE1-Exo 可促进 HUVECs 增殖和血管生成。该研究结果表明,CNE1 以外泌体的形式,促进 HUVECs 增殖和血管生成。

LncRNAs 是超过 200 个核苷酸长的转录本,没有编码潜力,但其在肿瘤发生、发展过程中具有一定的致癌或抑癌作用<sup>[16]</sup>。已有研究表明,敲低 LncTUG1 可抑制口腔鳞状细胞癌细胞增殖并诱导凋亡,促进自然杀伤细胞杀伤敏感性<sup>[17]</sup>。LncTUG1 在鼻咽癌细胞中高表达,抑制 LncTUG1 表达可显著降低鼻咽癌细胞的增殖、迁移、侵袭和上皮间质转化<sup>[18]</sup>。不难看出,LncTUG1 可能是鼻咽癌诊断、预后和治疗的有效靶点。本研究检测了人鼻咽癌细胞株 CNE1、CNE2、HONE1 和正常鼻咽上皮 NP69 中 LncTUG1 的表达,发现 LncTUG1 在鼻咽癌细胞中呈高表达,其中 CNE1 表达差异最明显。

一些研究表明,癌源性外泌体 LncRNAs 具有功能性,可以向邻近细胞传递不同的表型模式,如耐药

性和血管生成增加<sup>[19]</sup>。外泌体 LncRNAs 在肿瘤早期诊断、治疗监测和预后评估中具有潜在临床应用价值<sup>[20]</sup>。用高表达 LncSNHG14 的乳腺癌细胞来源的外泌体处理癌细胞,可诱导其曲妥珠单抗耐药性,而敲低 LncSNHG14 可消除这种作用<sup>[2]</sup>。LncMALAT1 在转移性上皮性卵巢癌细胞及其外泌体中表达上调。上皮性卵巢癌细胞外泌体中 LncMALAT1 通过外泌体转移到受体 HUVECs 中,介导 HUVECs 促血管生成活性<sup>[22]</sup>。本研究结果显示,LncTUG1 在 CNE1 来源外泌体中高表达,用 CNE1 来源外泌体处理 HUVECs 后, HUVECs 中 LncTUG1 表达升高, HUVECs 增殖能力和血管生成能力升高;敲低 LncTUG1 后,CNE1 来源外泌体中 LncTUG1 表达下调,对应的 HUVECs 中 LncTUG1 表达也下调, HUVECs 增殖能力和血管生成能力受到抑制。

#### 4 结论

鼻咽癌细胞外泌体通过 LncTUG1 促进 HUVECs 增殖和血管生成,在鼻咽癌进展中发挥重要作用。该研究结果为明确鼻咽癌的发病机制和开发新的临床治疗靶点提供了新的实验依据。

#### 【参考文献】

- [1] WEI F, WU Y, TANG L, *et al.* Trend analysis of cancer incidence and mortality in China[J]. *Sci China Life Sci*, 2017, 60(11): 1271-1275.
- [2] MA B B Y, CHEN Y P, HUI E P, *et al.* Recent Advances in the Development of Biomarkers and Chemoradiotherapeutic Approaches for Nasopharyngeal Carcinoma[J]. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*, 2020, 40: 1-11.
- [3] VIALARD C, LARRIVÉE B. Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets[J]. *Angiogenesis*, 2017, 20(4): 409-426.
- [4] 胡娟,谭芳,张鑫鑫,等.长链非编码 RNA PVT1 在妇科癌症中的研究进展[J]. *中国临床药理学杂志*, 2021, 37(4): 479-483.
- [5] 郭梦玲,李燕伶,王巧丽,等.外泌体源性 lncRNA 与肿瘤的研究进展[J]. *国际遗传学杂志*, 2021, 44(1): 32-39.

- [6] 熊乐, 卢婧, 刘安文. 长链非编码 RNA TUG1 在恶性肿瘤中的研究进展[J]. 临床与实验病理学杂志, 2017, 33(4): 425-428.
- [7] ZHANG X, LI H, LI Q, *et al.* Application of red light phototherapy in the treatment of radioactive dermatitis in patients with head and neck cancer[J]. *World J Surg Oncol*, 2018, 16(1): 222.
- [8] 胡锦涛, 钟田雨, 胡晓梅, 等. LncRNAs 在鼻咽癌中作用机制的研究进展[J]. 实用医学杂志, 2020, 36(6): 823-826.
- [9] LI Y S, ZHENG D, PAN L T, *et al.* Knockdown of TUG1 by shRNA inhibited renal cell carcinoma formation by miR-299-3p/VEGF axis in vitro and in vivo[J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 860: 172536.
- [10] LI T, KANG G, WANG T, *et al.* Tumor angiogenesis and anti-angiogenic gene therapy for cancer [J]. *Oncol Lett*, 2018, 16(1): 687-702.
- [11] 张万里, 刘璇, 章雄文. 外泌体调控肿瘤恶病质的研究进展[J]. 生命科学, 2020, 32(11): 1212-1217.
- [12] 崔虎军, 张亚男, 李慧亭. 外泌体 miRNA29 在宫颈癌转移中作用机制探讨[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2018, 25(19): 1365-1370.
- [13] 解学军, 张冰. 外泌体 MicroRNA-1246 促进星形胶质瘤细胞增殖与侵袭的研究[J]. 中华细胞与干细胞杂志(电子版), 2018, 8(5): 292-296.
- [14] 韩飞, 蒲沛东, 马青源, 等. 骨肉瘤外泌体 miR-1307 与骨肉瘤细胞的增殖和凋亡[J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(13): 2036-2042.
- [15] LU J, LIU Q H, WANG F *et al.* Exosomal miR-9 inhibits angiogenesis by targeting MDK and regulating PDK/AKT pathway in nasopharyngeal carcinoma[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1): 147.
- [16] 张强, 王长利. 长链非编码 RNA 及与肿瘤相关性的研究进展[J]. 国际生物医学工程杂志, 2018, 41(6): 556-561.
- [17] 王培, 汤春波, 李斌, 等. LncTUG1 通过靶向 miR-212-3p 对口腔鳞状细胞癌细胞 NK 细胞杀伤敏感性的影响[J]. 上海口腔医学, 2019, 28(6): 567-571.
- [18] QIAN W, REN Z T, LU X G. Knockdown of long non-coding RNA TUG1 suppresses nasopharyngeal carcinoma progression by inhibiting epithelial-mesenchymal transition (EMT) via the promotion of miR-384 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 509(1): 56-63.
- [19] FAN Q, YANG L, ZHANG X D, *et al.* The emerging role of exosome-derived non-coding RNAs in cancer biology[J]. *Cancer Lett*, 2018, 414: 107-115.
- [20] 常文婧, 李冬, 孙祖俊. 外泌体长链非编码 RNA: 肿瘤分子诊断新型标志物[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(15): 1793-1799.
- [21] DONG H Y, WANG W, CHEN R, *et al.* Exosome-mediated transfer of lncRNA-SNHG14 promotes trastuzumab chemoresistance in breast cancer[J]. *Int J Oncol*, 2018, 53(3): 1013-1026.
- [22] QIU J J, LIN X J, TANG X Y, *et al.* Exosomal Metastasis-Associated Lung Adenocarcinoma Transcript 1 Promotes Angiogenesis and Predicts Poor Prognosis in Epithelial Ovarian Cancer [J]. *Int J Biol Sci*, 2018, 14(14): 1960-1973.

(收稿日期: 2021-02-22; 修回日期: 2021-10-18; 编辑: 刘灵敏)

(上接第 366 页)

- [18] 孙华, 冯强, 李圆, 等. 2 型糖尿病患者糖、脂代谢与氧化应激和炎症反应的典则相关分析[J]. 上海医学, 2017, 40(7): 434-438.
- [19] GAO M, LIU Y, CHEN Y, *et al.* miR-214 protects erythroid cells against oxidative stress by targeting ATF4 and EZH2[J]. *Free Radic Biol Med*, 2016, 92: 39-49.
- [20] LIU K, LIU S, ZHANG W, *et al.* miR-494 promotes cell proliferation, migration and invasion, and increased sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma by targeting PTEN[J]. *Oncol Rep*, 2015, 34(2): 1003-1010.
- [21] XUE R, ZHAI R, XIE L, *et al.* Xuesaitong Protects Podocytes from Apoptosis in Diabetic Rats through Modulating PTEN-PDK1-Akt-mTOR Pathway[J]. *J Diabetes Res*, 2020, 2020: 9309768.
- [22] MAHIMAINATHAN L, DAS F, VENKATESAN B. Choudhury, Mesangial cell hypertrophy by high glucose is mediated by down-regulation of the tumor suppressor PTEN[J]. *Diabetes*, 2006, 55(7): 2115-2125.
- [23] 黄为钧, 赵进喜, 王世东, 等. 基于 PI3K/Akt 信号通路探索益气活血祛风络法治疗糖尿病肾病的作用机制[J]. 环球中医药, 2018, 11(8): 1196-1203.
- [24] 严瑞. PPAR $\gamma$  调控 PTEN/AKT/FAK 通路影响糖尿病肾病肾小管间质纤维化的机制研究[D]. 贵州: 贵州医科大学, 2017.

(收稿日期: 2021-01-13; 修回日期: 2021-11-07; 编辑: 刘灵敏)