

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2025.02.003

· 基础研究 ·

## 肿瘤源性外泌体 hsa-miR-29c-3p 通过靶向 ATAD2B 调控宫颈鳞状细胞癌的血管生成

张芳, 李亚, 周菲, 谭松红(衡阳市中心医院 妇科, 湖南 衡阳 421000)

**[摘要]** **目的:** 探讨宫颈癌(CC)细胞 SiHa 源性外泌体 hsa-miR-29c-3p 在 CC 血管生成中的作用。**方法:** 收集 2019 年 1 月至 2021 年 12 月在衡阳市中心医院妇科就诊的 45 例宫颈鳞状细胞癌(CSCC)患者的癌组织标本和 15 例正常宫颈组织标本。常规培养 SiHa 细胞和人脐静脉内皮细胞(HUVEC), 用 Lipofectamine 2000 将 hsa-miR-29c-3p、miRNA-NC、si-hsa-miR-29c-3p 和 si-miRNA-NC 转染至 SiHa 细胞中, 记为 miRNA-NC 组、hsa-miR-29c-3p 组、si-miRNA-NC 组和 si-hsa-miR-29c-3p 组。用 Lipofectamine 2000 将 mimic-NC、miR-29c-3p-mimic、pCMV-NC、pCMV-含 AAA 结构域的 ATPase 家族蛋白 2B(ATAD2B)载体分别转染 HUVEC, 记为 mimic-NC 组、miR-29c-3p-mimic 组、pCMV-NC 组、pCMV-ATAD2B 组和 pCMV-ATAD2B + miR-29c-3p-mimic 组。原位杂交(ISH)法检测 CSCC 组织中 hsa-miR-29c-3p 的表达, 免疫组化(IHC)法检测 CSCC 组织和移植瘤组织中的 CD31 阳性血管。分离纯化 SiHa、C33a 细胞来源的外泌体, 用透射电镜技术和 WB 法对其表征进行鉴定及进行 HUVEC 摄取实验。qPCR 法检测 SiHa、C33a 细胞和外泌体中 hsa-miR-29c-3p 和 ATAD2B mRNA 的表达。成管试验、Transwell 小室实验和划痕愈合实验检测外泌体对 HUVEC 成管和迁移能力的影响。双萤光素酶报告基因实验验证 hsa-miR-29c-3p 与 ATAD2B 的靶向结合关系, 移植瘤实验检测各组 SiHa 细胞来源外泌体对移植瘤生长和血管增生的影响。**结果:** hsa-miR-29c-3p 在 CSCC 组织中呈高表达且与其微血管密度(MVD)正相关(均  $P < 0.05$ ); SiHa、C33a 细胞来源的外泌体完全符合典型外泌体形态和蛋白表达表征; 在体外 HUVEC 摄取 SiHa、C33a 细胞来源的外泌体和其包含的 hsa-miR-29c-3p; SiHa 细胞来源的外泌体 hsa-miR-29c-3p 可在体外促进 HUVEC 的成管和迁移能力(均  $P < 0.05$ ); SiHa 细胞来源的外泌体 hsa-miR-29c-3p 可促进移植瘤生长和血管增生; hsa-miR-29c-3p 可与 ATAD2B 基因直接结合并调节其表达(均  $P < 0.05$ )。过表达 ATAD2B 可逆转 hsa-miR-29c-3p 对 HUVEC 的成管、迁移和划痕愈合能力的促进作用(均  $P < 0.05$ )。**结论:** SiHa 细胞源性外泌体 hsa-miR-29c-3p 通过靶向 ATAD2B 调控 CSCC 组织中的血管生成。外泌体 hsa-miR-29c-3p 可能是 CC 诊疗的潜在标志物和治疗靶点。

**[关键词]** 宫颈鳞状细胞癌; 外泌体; SiHa 细胞; 人脐静脉内皮细胞; 血管生成; hsa-miR-29c-3p; 含 AAA 结构域的 ATPase 家族蛋白 2B(ATAD2B)

**[中图分类号]** R737.33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2025) 02-0151-10

## Tumor-derived exosomal hsa-miR-29c-3p regulates angiogenesis in cervical squamous cell carcinoma by targeting ATAD2B

ZHANG Fang, LI Ya, ZHOU Fei, TAN Songhong (Department of Gynecology, Hengyang Central Hospital, Hengyang 421000, Hunan, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the role of SiHa cell-derived exosomal hsa-miR-29c-3p in the angiogenesis of cervical cancer (CC). **Methods:** Cancer tissue specimens from 45 patients with cervical squamous cell carcinoma (CSCC) and normal cervical tissue specimens from 15 controls were collected from Department of Gynecology, Hengyang Central Hospital from January 2019 to December 2021. CSCC SiHa cells and human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were routinely cultured. miRNA-NC, hsa-miR-29c-3p, si-miRNA-NC, and si-hsa-miR-29c-3p were transfected into SiHa cells with Lipofectamine 2000, grouped as miRNA-NC group, hsa-miR-29c-3p group, si-miRNA-NC group and si-hsa-miR-29c-3p group, respectively. HUVECs were transfected with mimic-NC, miR-29c-3p-mimic, pCMV-NC, and pCMV-ATAD2B (ATPase family protein 2B with AAA domain) using Lipofectamine 2000, grouped as the mimic-NC group, miR-29c-3p-mimic group, pCMV-NC group, pCMV-ATAD2B group, and pCMV-ATAD2B + miR-29c-3p-mimic group. The expression of hsa-miR-29c-3p in CSCC tissues was detected by *in situ* hybridization (ISH), and CD31-positive blood vessels in CSCC tissues and xenograft tissues were detected by immunohistochemistry (IHC).

**[基金项目]** 衡阳市指导性计划科研项目(No. 202222035651)

**[作者简介]** 张芳(1985—), 女, 硕士, 主要从事妇科生殖内分泌及妇科肿瘤的研究。E-mail: 48145056@qq.com

**[通信作者]** 李亚, E-mail: 3074272282@qq.com

Exosomes from SiHa and C33a cells were isolated and characterized using transmission electron microscopy (TEM) and western blotting (WB). The uptake of exosomes by HUVECs was examined. The expression of hsa-miR-29c-3p and ATAD2B mRNA in SiHa and C33a cells, as well as in their derived exosomes, was detected using qPCR. Tube-forming assay, Transwell assay, and scratch healing assay were performed to detect the effect of exosomes on the ability of HUVEC migration and tube formation. Dual luciferase reporter gene assay verified the interaction between hsa-miR-29c-3p and ATAD2B. Xenograft experiments examined the effects of SiHa cell-derived exosomes on transplanted tumor growth and angiogenesis in each group. **Results:** hsa-miR-29c-3p was highly expressed in CSCC tissues and was positively correlated with microvessel density (MVD) (all  $P < 0.05$ ). Exosomes derived from SiHa and C33a cells exhibited typical exosomal morphology and protein expression patterns. Exosomal hsa-miR-29c-3p from SiHa and C33a cells were efficiently taken up by HUVECs *in vitro*. The SiHa cell-derived exosomal hsa-miR-29c-3p promoted not only the tube-forming and migration of HUVECs *in vitro* but also the xenograft growth and angiogenesis *in vivo* (all  $P < 0.05$ ). hsa-miR-29c-3p directly targeted ATAD2B and regulated its expression ( $P < 0.05$ ). Overexpression of ATAD2B reversed the promotive effect of hsa-miR-29c-3p on tube-formation, migration, and scratch-healing in HUVECs (all  $P < 0.05$ ). **Conclusion:** SiHa cell-derived exosomal hsa-miR-29c-3p regulates angiogenesis in CSCC tissues by targeting ATAD2B. Exosomal hsa-miR-29c-3p may be a potential diagnostic marker and therapeutic target for CC diagnosis and treatment.

**[Key words]** cervical squamous cell carcinoma (CSCC); exosome; SiHa cell; human umbilical vein endothelial cells (HUVEC); angiogenesis; hsa-miR-29c-3p; ATPase family AAA domain containing 2B (ATAD2B)

[Chin J Cancer Biother, 2025, 32(2): 151-160. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2025.02.003]

宫颈癌(cervical cancer, CC)是发展中国家女性癌症相关死亡的主要原因之一<sup>[1]</sup>。宫颈鳞状细胞癌(cervical squamous cell carcinoma, CSCC)是CC最常见的组织学类型,主要由人乳头状瘤病毒(HPV)感染引起。根据肿瘤的分化程度和病理形态,CSCC可分为外生型、内生型、溃疡型和颈管型,其中高分化鳞癌、中分化鳞癌和低分化鳞癌是最常见的三种类型。尽管已经开发了包括手术、化疗、放疗及免疫疗法等治疗手段,但转移性或复发性CC的治疗选择有限,且病死率很高<sup>[2]</sup>。贝伐单抗,一种针对血管内皮生长因子(VEGF)的抗体,可以提高复发性、持续性或转移性CC患者的中位存活期<sup>[3]</sup>。然而,抗血管生成疗法大多以VEGF轴为靶标,而以血管生成成为靶标的联合方案因为患者对治疗反应不一、不良反应和耐药而受到应用的限制<sup>[4-5]</sup>。因此,确定新的抗血管生成机制将对未来的药物开发和抗癌治疗至关重要。外泌体为细胞间交流的一种新模式<sup>[6]</sup>。研究<sup>[7]</sup>显示,肿瘤源性外泌体在肿瘤的发生发展、转移、耐药和血管生成中发挥重要作用。miRNA是一类内源性的22至25 nt的非编码单链RNA分子,在外泌体中很稳定<sup>[8]</sup>。miRNA已被确认为不同生物过程中转录后基因调节的主要角色<sup>[9]</sup>。研究<sup>[10]</sup>发现,hsa-miR-29c-3p在包括肝癌、膀胱癌及结直肠癌顺铂耐药中发挥重要作用。然而,其在外泌体及血管生成以及CC中的调控作用尚不明确,因此本研究旨在探讨外泌体hsa-miR-29c-3p对CSCC发生发展及其血管生成的调控作用,以期CC辅助治疗提供新的方向。

## 1 材料与方法

### 1.1 临床标本

本研究收集2019年1月至2021年12月于衡阳市中心医院妇科就诊的45例CSCC患者的癌组织标本,所有样本均经过两位病理专家确认。此外,15例正常宫颈组织样本来自接受子宫切除术并被诊断为子宫肌瘤,但未被诊断为HPV感染或宫颈病变的患者。该研究方案获衡阳市中心医院伦理学委员会的批准(批准号:20190103号),每位患者均充分知情并签署了知情同意书。

### 1.2 细胞和主要试剂

人CSCC细胞SiHa、C33a、人脐静脉内皮细胞(HUVEC)和人胚胎肾293T细胞均购自北京北纳生物技术有限公司。胎牛血清(FBS)、DMEM、RPMI 1640、Lipofectamine 2000、TRIzol试剂盒均购自赛默飞世尔科技公司,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、4%多聚甲醛固定液、2%多聚甲醛固定液、苏木精、细胞上清外泌体提取试剂盒(沉淀法)、RIPA裂解液、BeyoRT™ III cDNA第一链合成试剂盒、10% SDS-PAGE凝胶超快速配制试剂盒和牛血清白蛋白均购自碧云天生物技术有限公司,胃蛋白酶、3,3'-二氨基联苯胺均、CD31抗体、戊二醛、甲基纤维素、乙酸、尿素和草酸均购自Sigma-Aldrich;兔含AAA结构域的ATPase家族蛋白2B(ATPase family AAA domain containing 2B, ATAD2B)、GM130、CD54、Annexin、CD54和GAPDH抗体均购自Abcam, Hieff®exosometracker kit外泌体绿色荧光示踪试剂盒购自翌圣生物科技(上海)股份有限公司。

### 1.3 细胞培养、转染与分组

SiHa细胞在10% FBS的DMEM中培养。HUVEC在10% FBS的RPMI 1640中培养。常规培养SiHa细胞,用Lipofectamine 2000将hsa-miR-29c-3p、

miRNA-NC、si-hsa-miR-29c-3p 和 si-miRNA-NC 转染至 SiHa 细胞中, 分别记为 miRNA-NC 组、hsa-miR-29c-3p 组、si-miRNA-NC 组和 si-hsa-miR-29c-3p 组。用 Lipofectamine 2000 将 mimic-NC、miR-29c-3p-mimic、pCMV-NC、pCMV-ATAD2B 分别转染 HUVEC, 分别记为 mimic-NC 组、miR-29c-3p-mimic 组、pCMV-NC 组、pCMV-ATAD2B 组和 pCMV-ATAD2B + miR-29c-3p-mimic 组。

1.4 原位杂交(in situ hybridization, ISH)法显示 CSCC 组织中 hsa-miR-29c-3p 的表达

将 CSCC 组织及正常宫颈组织标本经常规石蜡包埋、切片、脱蜡入水后, 用 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 室温下处理 30 min, 37 °C 下胃蛋白酶消化 2 min, 4% 多聚甲醛固定 5 min 后, 在含生物素标记的 hsa-miR-29c-3p 或 U6 寡核苷酸探针的杂交缓冲液中 42 °C 下处理切片 30 min, 充分洗涤后, 用辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素复合物室温下处理切片 30 min, 随后用 3,3'-二氨基联苯胺染色液进行染色 5~10 min, 最后用苏木精对切片进行复染。对于组织中 hsa-miR-29c-3p 染色强度进行染色评分, 根据着色强度分为 4 个等级: 无、浅、中等和强着色, 分别记 0、1、2 和 3 分, 然后, 计算每个染色强度的阳性细胞的百分比, 最后使用以下公式获得染色评分。染色评分 = [1 × (1 分的阳性细胞%) + 2 × (2 分的阳性细胞%) + 3 × (3 分的阳性细胞%)] × 100。

1.5 免疫组化(IHC)法显示 CSCC 组织和移植瘤组织中的血管

将 CSCC 组织及正常宫颈组织标本经常规石蜡包埋、切片、脱蜡入水后, 用 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 室温下处理 30 min, 37 °C 下胃蛋白酶消化 15 min, 1% BSA 室温下处理 30 min, 小鼠抗人 CD31 一抗(1:200)或大鼠抗小鼠 CD31 一抗(1:800)在 4 °C 下处理过夜, 辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠抗体(1:50)室温下处理 1 h, 随后用 3,3'-二氨基联苯胺染色液进行染色 5~10 min, 最后用苏木精对切片进行复染。在 CSCC 组织样本和小鼠移植瘤组织中, 对每个样本的瘤内和瘤周组织中 CD31 免疫反应阳性的小血管进行计数, 计算出每个视野的小血管数量。

1.6 外泌体分离、检测及 HUVEC 摄取

用不含外泌体的完全培养液培养 SiHa、C33a 细胞, 当细胞生长至汇合度约 70% 时, 用 PBS 洗 3 次, 并在无血清培养液中培养 24 h, 收集上清液。将上清液在 3 000 × g 下离心 15 min, 以去除细胞和细胞碎片, 后与 Exo-Quick 外泌体沉淀液混合处理过夜。然后, 在 4 °C 下以 1 500 × g 离心 30 min。将外泌体悬浮在 PBS 中, 随后转移到无 RNase 的试管中储存或进行电子显微镜观察、蛋白质检测、RNA 提取, 并用于体外或体内处理。

将 2% 多聚甲醛固定处理后的外泌体滴加在涂有碳支持膜的 400 目铜网上吸附 20 min, 1% 戊二醛再固定 5 min, 用尿素-草酸溶液(pH 7.0)染色 5 min, 然后用 pH 值为 4 含 2% 甲基纤维素和 4% 乙酸尿素(9:1)的混合液(pH 4.0)染色 10 min, 风干铜网, 在电子显微镜下观察、拍照。

按照制造商提供的操作程序, 用外泌体绿色荧光示踪试剂盒中的 PKH67 外泌体绿色荧光标记染料对外泌体进行标记。用稀释液 C 将 PKH67 linke 储存液稀释 10 倍, 配制浓度为 100 μmol/L 的染料工作液; 在 10 μg 外泌体加入 50 μL 染料工作液, 将离心管盖紧, 通过涡旋振荡器混匀 1 min, 再静置处理 10 min; 向处理后的外泌体-染料复合物中加入 10 mL 的 PBS 混匀; 按照外泌体提取方法再次提取外泌体以去除多余染料; 最后取 200 μL PBS 重悬沉淀物, 并加入 1 × 10<sup>5</sup> 个 HUVEC 中。在 0、6、12、24 和 36 h 时收集 HUVEC 用于 qPCR 和免疫荧光检测分析。

1.7 qPCR 法检测 SiHa、C33a 细胞和外泌体中 hsa-miR-29c-3p 和 ATAD2B mRNA 的表达

用 TRIzol 试剂提取转染各组细胞和外泌体样品中的总 RNA。用 BeyoRT™ III cDNA 第一链合成试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA, 取 2 μL cDNA 进行 qPCR, 反应条件: 95 °C 3 min; 95 °C 5 s, 56 °C 10 s 和 72 °C 25 s, 共 35 个循环; 最后, 在 65 °C 下延长 5 s。引物序列见表 1。以 U6 或 GAPDH 为内参照基因, 采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法计算 hsa-miR-29c-3p 或 ATAD2B mRNA 的相对含量。

表1 引物序列

基因名称	正向引物	反向引物
hsa-miR-29c-3p	5'-AGCTACATTGTCTGCTGGGTTC-3'	5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'
U6	5'-CTCGCTTCGGCAGCAC-3'	5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'
ATAD2B	5'-GCGGCAGACTTTGGACCTCAAC-3'	5'-GCAGCCCACTTCACGAGGCTA-3'
GAPDH	5'-ACAACCTTTGGTATCGTGGAAGG-3'	5'-GCCATCACGCCACAGTTTC-3'



### 1.8 WB法检测外泌体中表征蛋白和各组HUVEC中ATAD2B蛋白的表达

用蛋白裂解液提取外泌体样本和各组细胞中的总蛋白质,经10% SDS-PAGE分离后转移至PVDF膜上,用5%的牛血清白蛋白封闭1 h,在4℃下用一抗液处理过夜,一抗包括外泌体表征抗体[GM130抗体(1:1 000)、CD54抗体(1:1 000)、Annexin抗体(1:1 000)和CD9抗体(1:1 000)]、ATAD2B抗体(1:1 000)和GAPDH抗体(1:1 000),用PBST洗膜3次后用辣根过氧化物酶标记的二抗(1:5 000)处理1 h,最后用PBST洗膜后,用增强化学发光试剂显示蛋白质条带,用Image J软件分析条带的灰度值。

### 1.9 成管试验检测外泌体对HUVEC成管能力的影响

用转染各组SiHa细胞来源的外泌体处理HUVEC(将10 μg外泌体重悬于100 μL PBS中加入 $1 \times 10^5$ 个HUVEC),用无血清的RPMI 1640稀释HUVEC,以每孔加入100 μL(含 $1.5 \times 10^4$ 个HUVEC)接种于预涂有基质胶的96孔培养板上,37℃下培养6~8 h。在倒置显微镜下观察、拍照。

### 1.10 Transwell小室实验和划痕愈合实验检测各组HUVEC的迁移能力

按1.9节方法用外泌体处理HUVEC,培养24 h后收集细胞,用无血清RPMI 1640稀释( $1 \times 10^5$ 个/200 μL)并加入至Transwell上室,室底不涂基质胶,在下室中,加入含10% FBS的RPMI 1640培养基。培养24 h后,用苏木精染色,擦除未入侵的细胞,在光学显微镜下随机计数5个视野( $\times 200$ )。实验独立重复3次。

按Transwell小室实验的方法处理HUVEC,收集HUVEC后以 $1 \times 10^5$ 个细胞/孔的密度接种于6孔板,当细胞汇合度约70%~80%时,用无菌移液器吸头划痕,用PBS洗涤去除漂浮的细胞。在0和24 h时用倒置显微镜拍摄划痕图像。用Image J软件测量各组划痕宽度。

### 1.11 双萤光素酶报告基因实验验证hsa-miR-29c-3p与ATAD2B的靶向结合关系

通过PCR扩增ATAD2B基因的野生型(WT)和突变型(MUT)3'UTR片段,插入双萤光素酶报告基因载体中,构建成为3'UTR-ATAD2B-luc-WT和3'UTR-ATAD2B-luc-MUT。用Lipofectamine 2000将3'UTR-ATAD2B-luc-WT和3'UTR-ATAD2B-luc-MUT、mimic-NC和hsa-miR-29c-3p-mimic共转染至SiHa细胞,分为3'UTR-ATAD2B-luc-WT + mimic-NC组、3'UTR-ATAD2B-luc-WT + hsa-miR-29c-3p mimic组、3'UTR-ATAD2B-luc-MUT + mimic-NC组、3'UTR-ATAD2B-luc-MUT + hsa-miR-29c-3p-mimic组。转染48 h后,检测转染各组萤光素酶活性。

### 1.12 移植瘤实验检测各组SiHa细胞来源外泌体对移植瘤生长的影响

30只6周龄雌性无胸腺裸鼠购自北京维通利华动物有限公司。将肿瘤细胞(SiHa细胞, $5 \times 10^6$ 个/100 μL/小鼠)植入裸鼠的腹部皮下。每3 d测量一次肿瘤体积,计算公式为体积( $\text{mm}^3$ )=(宽度) $^2$ ×长度/2。当肿瘤达到最小体积50  $\text{mm}^3$ 时(大约在肿瘤接种后12 d),将动物按随机数字表法分为5组,每组6只。每3 d将各组SiHa细胞来源的10 μg外泌体重悬于20 μL PBS中并注射入移植瘤中心。注射5次后,原发肿瘤的体积达到约300  $\text{mm}^3$ ,小鼠被安乐死,剥离移植瘤,多聚甲醛固定,石蜡包埋切片后进行IHC染色分析。

### 1.13 统计学处理

本研究采用SPSS(20.0版)软件进行统计学分析,图形和图表由GraphPad Prism生成。符合正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较用 $t$ 检验,多组间比较用单因素方差分析(ANOVA)检验,相关分析用Spearman等级检验。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 hsa-miR-29c-3p在CSCC组织中呈高表达且与其微血管密度(microvessel density, MVD)正相关

原位杂交技术检测结果(图1A)显示,与正常宫颈组织样本相比,CSCC组织中hsa-miR-29c-3p的表达明显升高( $P < 0.05$ )。CSCC中hsa-miR-29c-3p的表达水平与MVD呈正相关(图1B, $r^2 = 0.6544$ ;  $P < 0.0001$ )。实验结果表明,hsa-miR-29c-3p可能在CSCC中促进血管生成。

### 2.2 在体外HUVEC摄取SiHa、C33a细胞来源的外泌体及其包含的hsa-miR-29c-3p

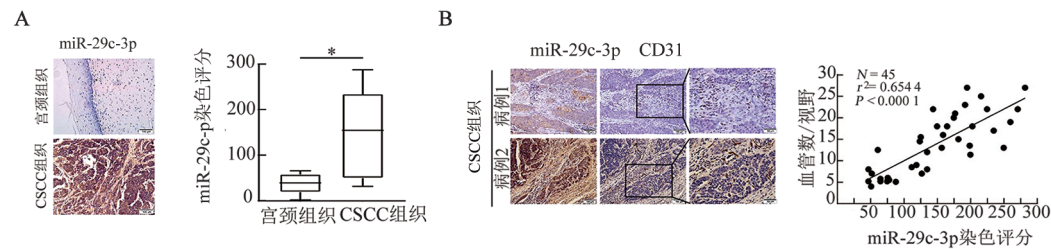
用透射电镜技术和WB法对SiHa、C33a细胞的培养液中分离的外泌体进行鉴定,结果(图2A、B)显示,外泌体呈典型杯状形态,直径约30~100 nm,与细胞总蛋白比较,外泌体中缺少GM130蛋白,说明本实验分离的外泌体正确无误。HUVEC摄取PKH67标记荧光的外泌体实验检测结果(图2C)显示,HUVEC中呈现明显的绿色荧光。实验结果表明,SiHa、C33a细胞的外泌体能够进入HUVEC内部发挥作用。

qPCR法检测结果(图2D)显示,与PBS对照和miR-NC组比较,miR-29c-3p组SiHa细胞及其外泌体中miR-29c-3p水平均显著升高( $P < 0.05$ );与PBS对照、miR-NC组、miR-29c-3p组、si-miR-NC组比较,si-miR-29c-3组SiHa细胞及其外泌体中miR-29c-3p水平均显著降低(均 $P < 0.05$ )。实验结果说明,SiHa



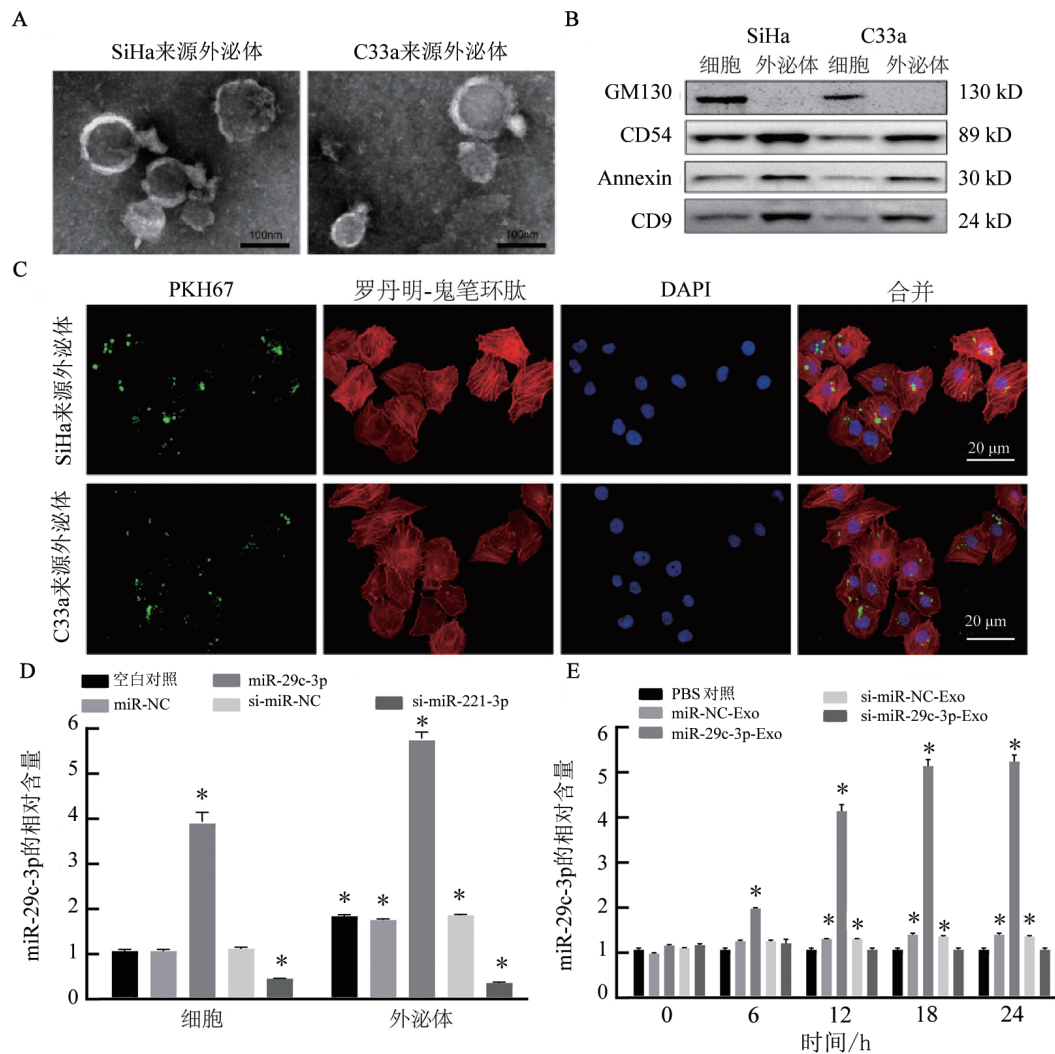
细胞和其外泌体中成功地过表达了 miR-29c-3p, 而 si-miR-29c-3 也成功地抑制了 miR-29c-3p 的表达。  
用转染各组 SiHa 细胞来源的外泌体处理

HUVEC 后, qPCR 检测结果(图 2E)显示, 与 PBS 对照、miR-NC 组比较, HUVEC 中 miR-29c-3p 水平均明显升高(均  $P < 0.05$ ), 呈现出时间依赖性趋势。



A: ISH 法检测正常宫颈组织和 CSCC 组织中 hsa-miR-29c-3p 的表达 ( $\times 200$ ); B: ISH 和免疫组化法检测相邻 CSCC 组织切片中 hsa-miR-29c-3p 和 CD31 蛋白的表达。

图1 ISH 和 IHC 法检测 hsa-miR-29c-3p 和 CD31 蛋白在正常宫颈和 CSCC 组织中的表达



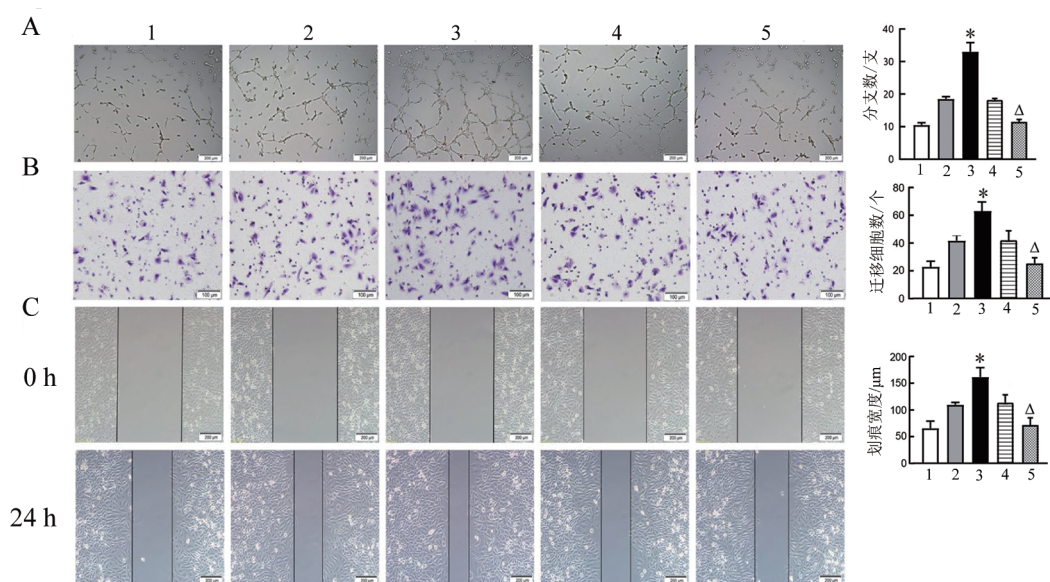
A: 透射电镜观察典型外泌体形态和大小; B: WB 法检测 C33a 和 SiHa 来源外泌体的表征; C: 共聚焦显微镜观察 PKH67(绿色)标记 SiHa 和 C33a 来源的外泌体被 HUVEC 摄取, 罗丹明标记的鬼笔环肽显示 HUVEC(红色), DAPI 显示细胞核标志物(蓝色); D: qPCR 法检测转染各组 SiHa 细胞和其外泌体中 hsa-miR-29c-3p 的表达; E: qPCR 法检测转染各组 SiHa 细胞来源的外泌体处理后 HUVEC 中 hsa-miR-29c-3p 水平。与 PBS 组或 miR-NC 组或 si-miR-NC 组比较,  $*P < 0.05$ 。

图2 在体外 HUVEC 摄取 SiHa、C33a 细胞来源的外泌体中的 hsa-miR-29c-3p

### 2.3 SiHa 细胞来源的外泌体可在体外促进 HUVEC 的成管和迁移能力

成管实验、迁移实验和划痕愈合实验检测结果(图3)显示,与PBS对照、miR-NC组比较,miR-29c-3p组SiHa细胞来源的外泌体处理后,HUVEC成管、

迁移和划痕愈合能力均明显增强(均 $P < 0.05$ );与si-miR-NC比较,si-miR-29c-3p组SiHa细胞来源的外泌体处理后,HUVEC的成管、迁移和划痕愈合能力均明显降低(均 $P < 0.05$ )。



A~C:成管实验(A,  $\times 40$ )、Transwell小室试验(B,  $\times 100$ )和划痕愈合实验(C,  $\times 40$ )分别检测转染各组SiHa细胞来源的外泌体对HUVEC成管、迁移和划痕愈合能力的影响。1:PBS组;2:miR-NC-Exo组;3:miR-29c-3p-Exo组;4:si-miR-NC-Exo组;5:si-miR-29c-3p-Exo组。与PBS对照组或miR-NC组或si-miR-NC组比较,\* $P < 0.05$ 。

图3 CSCC外泌体 hsa-miR-29c-3p 在体外促进 HUVEC 的血管生成

### 2.4 SiHa 细胞来源的外泌体可促进移植瘤生长和血管增生

移植瘤实验检测结果(图4A、B)显示,与PBS对照、miR-NC-Exo组比较,hsa-miR-29c-3p-Exo组移植瘤体积和质量均明显增加(均 $P < 0.05$ )。免疫组化法检测结果(图4C)显示,与PBS对照、miR-NC-Exo组比较,hsa-miR-29c-3p-Exo组移植瘤内和周围组织中CD31免疫反应阳性的血管数量均明显增加(均 $P < 0.05$ )。实验结果说明, SiHa 来源的外泌体 hsa-miR-29c-3p 能促进移植瘤生长和血管数量增多。

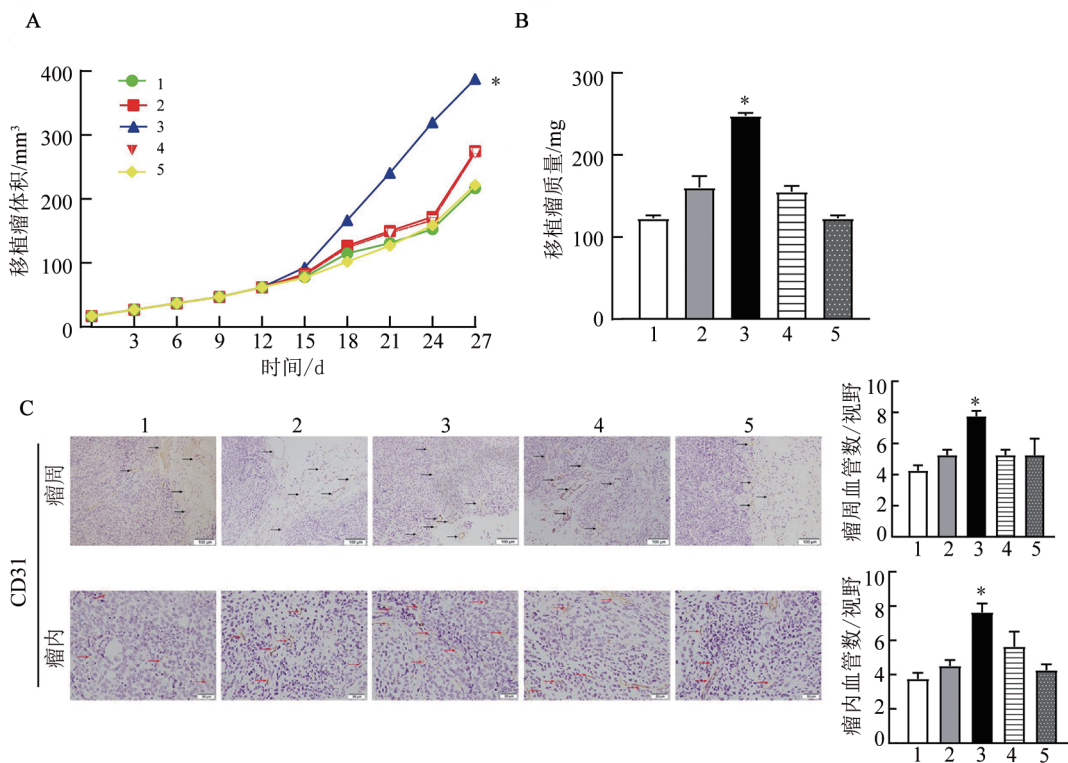
### 2.5 hsa-miR-29c-3p 可与 ATAD2B 基因直接结合并调节其表达

本研究使用miRWalk和PicTar数据库筛选出61个候选基因为hsa-miR-29c-3p最可能的下游靶基因,基因本体论(gene ontology, GO)数据库分析表明,有401个抗血管生成的基因,使用Venny 2.1.0软件综合分析上述数据,确定ATAD2B为参与血管生成过程中的假定 hsa-miR-29c-3p 靶基因(图5A),ATAD2B mRNA的3'UTR中存在与 hsa-miR-29c-3p 潜在碱基配对的区域(图5B)。双荧光素酶报告基因实验检测结果(图5C)

显示,与3'UTR-ATAD2B-luc-WT + mimic-NC组比较,3'UTR-ATAD2B-luc-WT + hsa-miR-29c-3p mimic-组荧光素酶活性明显降低( $P < 0.05$ ),与3'UTR-ATAD2B-luc-MUT + mimic-NC组比较,3'UTR-ATAD2B-luc-MUT + has-miR-29c-3p-mimic组荧光素酶活性无明显变化。qPCR和WB法检测结果(图5D~F)显示,与mimic-NC组比较,miR-29c-3p-mimic组HUVEC中miR-29c-3p的表达明显降低( $P < 0.05$ ),与inhibitor-NC组比较,miR-29c-3p-inhibitor组HUVEC中miR-29c-3p的表达明显降低( $P < 0.05$ );与mimic-NC组比较,miR-29c-3p-mimic组HUVEC中ATAD2B mRNA和其蛋白的表达均明显降低(均 $P < 0.05$ );与inhibitor-NC组比较,miR-29c-3p-inhibitor组HUVEC中ATAD2B mRNA和其蛋白的表达均明显升高( $P < 0.05$ )。实验结果说明, hsa-miR-29c-3p 可与 ATAD2B 直接结合,调控其转录活性。

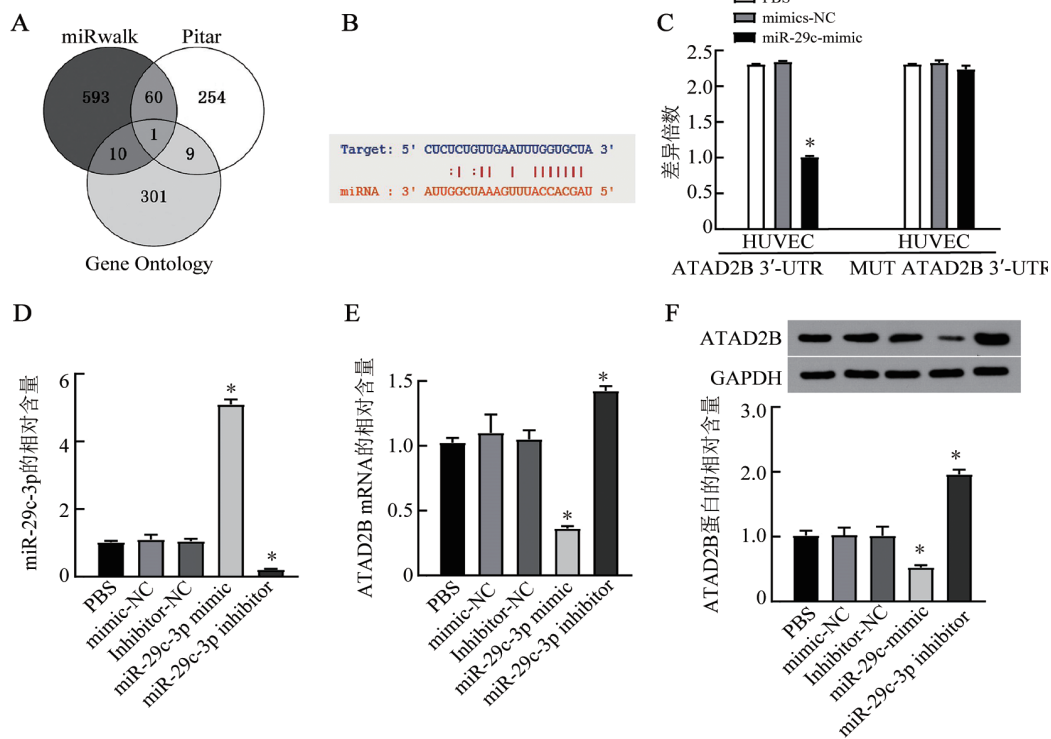
### 2.6 过表达 ATAD2B 可逆转 hsa-miR-29c-3p 对 HUVEC 的成管、迁移和划痕愈合能力的促进作用

qPCR和WB法检测结果显示,与PBS对照和pCMV-NC组比较,pCMV-ATAD2B组HUVEC中ATAD2B mRNA和蛋白的表达水平均明显上调



A: 各组移植瘤的生长曲线; B: 各组移植瘤体质量; C: IHC 法检测各组移植瘤组织中 CD31 免疫反应阳性血管, 放大倍数为  $\times 100$ 。1: PBS 组; 2: miR-NC-Exo 组; 3: miR-29c-3p-Exo 组; 4: si-miR-NC-Exo 组; 5: si-29c-3p-Exo 组。与空白对照组或 miR-NC 组或 si-miR-NC 组比较,  $*P < 0.05$ 。

图 4 处理各组 SiHa 来源的外泌体 hsa-miR-29c-3p 促进移植瘤的生长



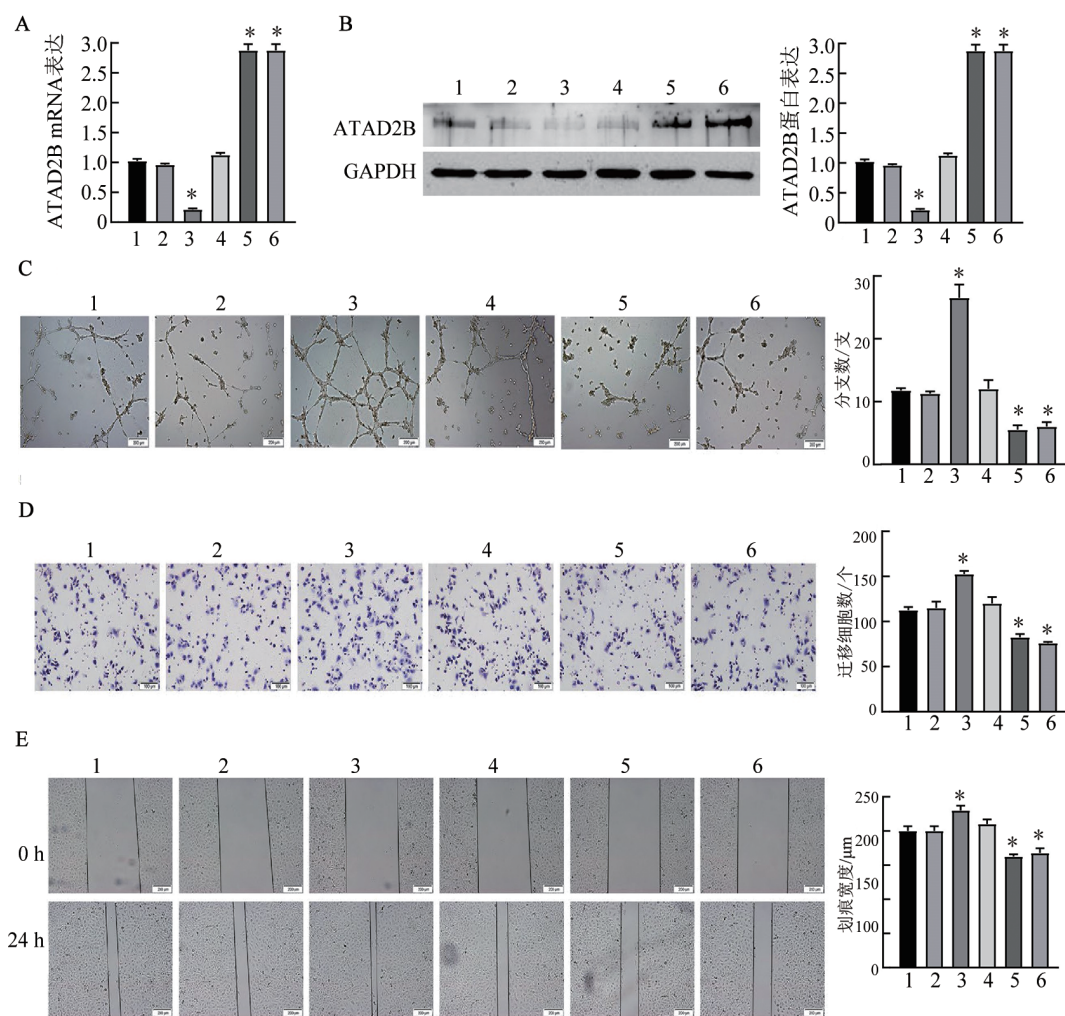
A: 数据库预测 hsa-miR-29c-3p 靶点的维恩图; B: 数据库预测的 hsa-miR-29c-3p 与 ATAD2B 间的靶向位点; C: 双萤光素酶报告基因实验中各组 HUVEC 中萤光素酶活性; D: 转染各组 HUVEC 中 miR-29c-3p 的表达; E: 转染各组 HUVEC 中 ATAD2B mRNA 的表达; F: 转染各组 HUVEC 中 ATAD2B 蛋白的表达。与 PBS 或 mimic-NC 或 inhibitor-NC 组比较,  $*P < 0.05$ 。

图 5 ATAD2B 是 hsa-miR-29c-3p 的直接靶点



(图 6A、B, 均  $P < 0.05$ ); 与 mimic-NC 组比较, hsa-miR-29c-3p-mimic 组 HUVEC 中 ATAD2B mRNA 和蛋白的表达均被明显抑制 (均  $P < 0.05$ ); 与 hsa-miR-29c-3p-mimic 组比较, hsa-miR-29c-3p-mimic + pCMV-ATAD2B 组 HUVEC ATAD2B mRNA 和蛋白明显升高, 完全逆转 hsa-miR-29c-3p-mimic 的作用。成管实验、Transwell 小室实验和划痕愈合实验检测结果 (图 6C~E) 显示, 与 PBS 对照和 pCMV-NC 组比较, pCMV-ATAD2B 组 HUVEC 成管、迁移和划痕愈合能力均明显下降 (均  $P < 0.05$ ); 与 mimic-NC

组比较, hsa-miR-29c-3p-mimic 组 HUVEC 的成管、迁移和划痕愈合能力均明显增强 (均  $P < 0.05$ ); 与 hsa-miR-29c-3p-mimic 组比较, hsa-miR-29c-3p-mimic + pCMV-ATAD2B 组 HUVEC 的成管、迁移和划痕愈合能力均明显降低 (均  $P < 0.05$ )。实验结果说明, hsa-miR-29c-3p-mimic 通过抑制 HUVEC 中 ATAD2B mRNA 和蛋白的表达, 促进 HUVEC 的成管、迁移和划痕愈合能力, 过表达 ATAD2B 则可完全逆转这一作用。



A、B: qPCR (A) 和 WB (B) 法检测各组 HUVEC 中 ATAD2B mRNA 和蛋白的表达; C~E: 成管实验 (C)、Transwell 小室实验 (D) 和划痕愈合实验 (E) 分别检测各组 HUVEC 的成管、迁移能力。1: PBS 组; 2: mimic-NC 组; 3: miR-29c-3p-mimic 组; 4: pCMV-NC 组; 5: pCMV-ATAD2B 组; 6: miR-29c-3p-mimic + pCMV-ATAD2B 组。与 PBS 或 mimic-NC 组或 pCMV-NC 组比较,  $P < 0.05$ 。

图 6 过表达 ATAD2B 可以逆转 hsa-miR-29c-3p 的血管生成作用

### 3 讨论

血管生成对 CC 的发生发展至关重要。抗血管生成治疗已被证明是晚期或复发性 CC 患者的有效治疗策略<sup>[11]</sup>, 而抗 VEGF 策略可有效提高无进展生存期。然而, 单一的目标和潜在的抗性可能限制了抗

血管生成的疗效<sup>[12-13]</sup>。本研究关注了肿瘤源性外泌体 miRNA 作为 CSCC 中血管生成的生物标志物。本研究发现, hsa-miR-29c-3p 在 CSCC 患者中表达量很高, 且 hsa-miR-29c-3p 表达与肿瘤 MVD 呈正相关。其次, 瘤源性外泌体将 hsa-miR-29c-3p 从 CSCC 细胞运送到 HUVEC, 外泌体来源的 hsa-miR-29c-3p

能明显诱导血管生成以促进肿瘤生长。最后, hsa-miR-29c-3p 调控血管内皮细胞中的 ATAD2B 表达以促进血管生成。

以往的研究<sup>[14-15]</sup>发现, 内皮细胞源性 hsa-miR-29c-3p 在转移性肾细胞癌、肝细胞癌, 甚至在胚胎发育中具有促进血管生成的功能。本研究表明, 外源性 SiHa 细胞衍生的 hsa-miR-29c-3p 进入 HUVEC, 直接促进血管生成, 与内源性 hsa-miR-29c-3p 相似。这一结果表明, 血清中长存的外泌体 hsa-miR-29c-3p 是一个潜在的生物标志物和治疗靶标, 可用于临床诊断和治疗。本研究还发现, HUVEC 中的 miR-29c-3p-ATAD2B 轴在 CC 模型中促进血管生成和肿瘤生长。ATAD2B 已被发现是一种有效的内源性血管生成抑制剂<sup>[16-18]</sup>。ATAD2B 作为一种具有 ATP 酶活性的蛋白质, 在肿瘤研究领域受到广泛关注。研究<sup>[19-20]</sup>表明, ATAD2B 在多种肿瘤中表达异常, 与肿瘤的发生、发展及预后紧密相关。其异常表达可能促进肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭, 同时与肿瘤细胞的凋亡平衡调控和侵袭转移过程有关。此外, ATAD2B 的表达水平也被发现与肿瘤患者预后密切相关, 其高表达往往预示较差的预后。因此, ATAD2B 作为潜在的肿瘤治疗靶点正受到研究者的探索, 旨在通过抑制其表达或活性来阻断肿瘤进展<sup>[21-22]</sup>。尽管已有一定进展, 但 ATAD2B 在肿瘤中的具体作用机制仍需深入研究。本研究进一步对其上下游调控关系进行了验证。但是仍缺少对下游调控机制的深入探讨, 这也将是未来主要的研究方向之一。

综上所述, 本研究发现肿瘤源性外泌体将 hsa-miR-29c-3p 从癌细胞转移到血管内皮细胞, 并通过下调 ATAD2B 促进血管生成。外泌体 hsa-miR-29c-3p 可能是 CSCC 发生发展的一个新的诊断生物标志物和治疗靶标。

## 【参 考 文 献】

- [1] SOZZI G, CHIANTERA V. Vena cava resection and bypass for recurrent cervical cancer[J/OL]. *Int J Gynecol Cancer*, 2021, 31(10): 1393[2024-08-10]. <https://doi.org/10.1136/ijgc-2021-002971>. DOI:10.1136/ijgc-2021-002971.
- [2] RIZZUTO I, OTTER S J, BHARATHAN R, *et al.* Vascular endothelial growth factor (VEGF) inhibitors for the treatment of metastatic and recurrent cervical cancer[J/OL]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2020[2024-08-10]. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD013605>. DOI:10.1002/14651858.cd013605.
- [3] NIE D, ZHENG Q W, LIU L, *et al.* Up-regulated of angiopoietin-like protein 4 predicts poor prognosis in cervical cancer[J]. *J Cancer*, 2019, 10(8): 1896-1901. DOI:10.7150/jca.29916.
- [4] DING X Y, JIA X M, WANG C, *et al.* Correction to: a DHX9-lncRNA-MDM2 interaction regulates cell invasion and angiogenesis of cervical cancer[J/OL]. *Cell Death Differ*, 2019, 26(12): 2807[2024-08-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7224065/>. DOI:10.1038/s41418-019-0273-1.
- [5] 张花, 潘莹, 何全中. 下调 TSP1 表达抑制宫颈腺癌 HeLa 细胞生长及促血管生成能力的研究[J]. *海南医学*, 2023, 34(6): 768-773. DOI:10.3969/j.issn.1003-6350.2023.06.002.
- [6] FAN W Q, PANG H P, LI X, *et al.* Plasma-derived exosomal miRNAs as potentially novel biomarkers for latent autoimmune diabetes in adults[J/OL]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2023, 197: 110570[2024-08-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36746199/>. DOI:10.1016/j.diabres.2023.110570.
- [7] WANG J X, TAO Y Y, ZHAO F, *et al.* Expression of urinary exosomal miRNA-615-3p and miRNA-3147 in diabetic kidney disease and their association with inflammation and fibrosis[J/OL]. *Ren Fail*, 2023, 45(1): 2121929[2024-08-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9879181/>. DOI:10.1080/0886022X.2022.2121929.
- [8] CARIELLO M, SQUILLA A, PIACENTE M, *et al.* Drug resistance: the role of exosomal miRNA in the microenvironment of hematopoietic tumors[J/OL]. *Molecules*, 2022, 28(1): 116[2024-08-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9821808/>. DOI:10.3390/molecules28010116.
- [9] 彭晓霞, 朱莉. 外泌体在宫颈癌中的研究与应用前景[J]. *现代妇产科进展*, 2023, 32(3): 231-233. DOI:10.13283/j.cnki.xdfckjz.2023.03.035.
- [10] WEN L L, YU T H, MA Y Z, *et al.* Sequential expression of miR-221-3p and miR-338-3p in Schwann cells as a therapeutic strategy to promote nerve regeneration and functional recovery[J]. *Neural Regen Res*, 2023, 18(3): 671-682. DOI:10.4103/1673-5374.350214.
- [11] 金丹, 金雪亚, 金剑英, 等. 血清 bFGF、VEGF 与宫颈癌化疗敏感性及其预后的关系[J]. *浙江中西医结合杂志*, 2022, 32(4): 345-347+350.
- [12] 刘亚红, 刘艳庆, 邱育红. 血管内皮生长因子、糖类抗原 125、糖类抗原 19-9 在宫颈癌中的表达及临床价值[J]. *癌症进展*, 2022, 20(7): 712-715. DOI:10.11877/j.issn.1672-1535.2022.20.07.17.
- [13] 张亚军, 王丹凤. 宫颈癌患者的临床病理特点及 P16 基质细胞衍生因子-1 基质金属蛋白酶-9 血管内皮生长因子-C 表达分析[J]. *中国药物与临床*, 2021, 21(23): 3892-3894. DOI:10.11655/zgwyylc2021.23.035.
- [14] 李艳丽, 谭仕康, 申元英, 等. hsa-miR-221-3p 靶基因预测及生物信息学分析[J]. *医学信息*, 2022, 35(7): 59-65. DOI:10.3969/j.issn.1006-1959.2022.07.015.
- [15] 徐敏芹, 李雪, 周玲, 等. 术前血清 miR-221-3p 及血管内皮生长因子-C 表达与早期宫颈鳞癌发生盆腔淋巴结转移的关系[J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2022, 36(1): 18-21. DOI:10.13507/j.issn.1674-3474.2022.01.005.
- [16] 朱晓志, 王冬梅, 王丽蓉. MiR-200b-5p 靶向 ATAD2 调控 P13K/AKT 信号通路参与宫颈癌血管生成的作用机制[J]. *中国性科学*, 2019, 28(7): 42-46. DOI:10.3969/j.issn.1672-1993.2019.07.010.
- [17] 薛纯. ATAD2 蛋白在浸润性乳腺癌中表达的相关性研究[D]. 蚌埠: 蚌埠医学院, 2022.
- [18] 周磊. METTL3 调节 ATAD2 促进骨肉瘤细胞增殖和侵袭机制的研究[D]. 山东大学, 2020.
- [19] SUN T, LIU Z Y. MicroRNA-139-5p suppresses non-small cell lung cancer progression by targeting ATAD2[J/OL]. *Pathol Res Pract*, 2023, 249: 154719[2024-08-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>

- 37595446/. DOI:10.1016/j.prp.2023.154719.
- [20] FU J H, ZHANG J, CHEN X Y, *et al.* ATPase family AAA domain-containing protein 2 (ATAD2): from an epigenetic modulator to cancer therapeutic target[J]. *Theranostics*, 2023, 13(2): 787-809. DOI:10.7150/thno.78840.
- [21] SHUKLA S, LAZARCHUK P, PAVLOVA M N, *et al.* Genome-wide survey of D/E repeats in human proteins uncovers their instability and aids in identifying their role in the chromatin regulator ATAD2[J/OL]. *iScience*, 2022, 25(12): 105464[2024-08-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9672403/>. DOI:10.1016/j.isci.2022.105464.
- [22] YAO D H, YOU J S, YANG X T, *et al.* Fragment-based design, synthesis and biological evaluation of theophylline derivatives as ATAD2 inhibitors in BT-549 cells[J/OL]. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2023, 38(1): 2242601[2024-08-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10402865/>. DOI:10.1080/14756366.2023.2242601.

[收稿日期] 2024-08-15

[修回日期] 2024-10-23

[本文编辑] 向正华