脑科学与神经精神系统疾病前沿 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.003840

凋亡外囊泡传递LncRNA-XIST在胶质瘤细胞耐药性作用机制研究

薛箕山，赵媛媛，邱　浩，阿衣希塔·奴尔江，刘　正，杜　鹏
（新疆维吾尔自治区新疆医科大学第二附属医院神经外科，乌鲁木齐　830000）

【摘　要】目的：探讨胶质瘤细胞来源的凋亡外囊泡（apoptotic cell-derived extracellular vesicles，apoEVs）对胶质瘤肿瘤发生和替莫唑胺（temozolomide，TMZ）耐药性的影响及作用机制。**方法：**经提取的apoEVs经纳米颗粒跟踪分析和透射电子显微镜表征，并通过Western blot、流式细胞术、CCK-8实验、细胞克隆形成实验和Transwell实验等方法评估其对细胞增殖、迁移、侵袭及凋亡的影响。**结果：**apoEVs促进胶质瘤细胞的TMZ耐药性，显著提高TMZ半数抑制浓度（IC50）（t=9.326，P=0.001），抑制细胞凋亡，并通过外泌体抑制剂GW4869逆转该效应。apoEVs促进胶质瘤细胞的迁移和侵袭，增加波形蛋白（Vimentin）和Twist蛋白的表达（t=8.762，P=0.002和t=7.941，P=0.004），抑制裂解型半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3（leaved-Caspase-3）的表达（t=9.217，P=0.002）。进一步机制研究表明，apoEVs通过调控LncRNA-XIST/miR-29c/O6-甲基鸟嘌呤-DNA甲基转移酶（O6-methylguanine-DNA methyltransferase，MGMT）轴，影响胶质瘤细胞对TMZ的耐药性。沉默LncRNA-XIST降低MGMT表达、增加miR-29c表达，从而增强TMZ敏感性，抑制细胞迁移和侵袭。**结论：**胶质瘤细胞来源的凋亡外囊泡通过传递LncRNA-XIST调节miR-29c/MGMT轴从而促进胶质瘤恶性进展和替莫唑胺耐药。

【关键词】胶质瘤；凋亡外囊泡；长链非编码RNA-X染色体失活转录物；上皮-间质转化；miR-29c/O6-甲基鸟嘌呤-DNA甲基转移酶轴
【中图分类号】R739.41　　**【文献标志码】**A　　**【收稿日期】**2025-03-19

Mechanism of apoptotic extracellular vesicles delivering LncRNA-XIST in drug resistance of glioma cells

Xue Jishan，Zhao Yuanyuan，Qiu Hao，Nuerjiang Ayixita，Liu Zheng，Du Peng
（*Department of Neurosurgery，The Second Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University*）

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect of glioma cell-derived apoptotic extracellular vesicles（apoEVs）on glioma tumorigenesis and temozolomide（TMZ）resistance and its mechanism. ***Methods*:** The extracted apoEVs were characterized using nanoparticle tracking analysis and transmission electron microscopy，and Western blot，flow cytometry，CCK-8 assay，colony formation assay，and Transwell assay were used to investigate the effect of apoEVs on cell proliferation，migration，invasion，and apoptosis. ***Results*:** ApoEVs promoted TMZ resistance in glioma cells，significantly increased the half-maximal inhibitory concentration of TMZ（t=9.326，P=0.001），and inhibited cell apoptosis，and this effect could be reversed by the exosome inhibitor GW4869. ApoEVs also promoted the migration and invasion of glioma cells，increased the expression of vimentin and Twist proteins（t=8.762，P=0.002；t=7.941，P=0.004），and inhibited the expression of cleaved caspase-3（t=9.217，P=0.002）. Further studies showed that apoEVs affected TMZ resistance of glioma cells by regulating the LncRNA-XIST/miR-29c/O6-methylguanine-DNA methyltransferase（MGMT）axis. Silencing of LncRNA-XIST could reduce the expression of MGMT and increase the expression of miR-29c，thereby enhancing the sensitivity to TMZ and inhibiting cell migration and invasion. ***Conclusion*:** Glioma cell-derived apoEVs promote the malignant progression and temozolomide resistance of glioma by delivering LncRNA-XIST to regulate the miR-29c/MGMT axis.

【Key words】glioma；apoptotic extracellular vesicles；long non-coding RNA X-inactive specific transcript；epithelial-mesenchymal transition；miR-29c/O6-methylguanine-DNA methyltransferase axis

作者介绍：薛箕山，Email：845284453@qq.com，
研究方向：脑胶质瘤的研究和治疗。
通信作者：杜　鹏，Email：419373019@qq.com。
基金项目：新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目（编号：2022D01C273）。
优先出版：https://link.cnki.net/urlid/50.1046.r.20250418.1611.006（2025-04-21）

神经胶质瘤是颅内最常见原发性恶性肿瘤，标准治疗包括最大限度的安全手术切除、术后放化疗联合电场治疗[1]。替莫唑胺（temozolomide，TMZ）作为标准化疗法，提高了患者的总生存率，但患者中位生存期仅为22个月[2-3]，胶质瘤细胞对TMZ的耐药性，化疗效果降低，导致复发，克服TMZ耐药成为

研究热点之一。近年来，凋亡细胞源性细胞外囊泡（apoptotic cell-derived extracellular vesicles，apoEVs）受到关注，因其参与多种疾病调控[4]，并在胶质母细胞瘤中促进肿瘤细胞的表型转化和侵袭性[5]，但apoEVs在胶质瘤TMZ耐药性研究不明确。LncRNA-XIST作为竞争性内源RNA，在促进恶性肿瘤和其他疾病的发展中发挥关键作用。本研究通过分离和鉴定神经胶质瘤细胞来源的apoEVs，探讨其对胶质瘤细胞行为的影响。同时，研究敲低LncRNA-XIST或使用外泌体抑制剂GW4869是否能够阻断其促进作用。该研究旨在为克服TMZ耐药性提供潜在的治疗策略。

1 材料与方法

1.1 材料

人胶质瘤细胞系LN229（CRL-2611，ATCC，Manassas，USA）在含有10%胎牛血清和1%青霉素/链霉素的Dulbecco改良的Eagle培养基中，在37 ℃、5% CO_2条件下培养。将LN229细胞系用120 μmol/L TMZ（T2577，Sigma-Aldrich，St. Louis，USA）和/或10 μmol/L外泌体抑制剂GW4869（S7609，Selleck Chemicals，Houston，USA）处理48 h。对照组用等量的DMSO处理，培养上清液在48 h后收集用于后续实验。

1.2 方法

1.2.1 外泌体的提取与鉴定 LN229细胞在无外泌体血清培养基（41210ES50，Yeasen，中国上海）中培养至90%贴壁后，加入120 μmol/L TMZ和/或10 μmol/L GW4869，处理48 h。收集细胞上清液，4 ℃下3 000 g离心10 min去除细胞和碎片。将上清液转移至无菌离心管，加入外泌体浓缩液（Umibio，中国上海），混合后冰箱中过夜。上清液离心60 min收集沉淀，并用PBS重悬后12 000 g离心2 min。将上清液转移至外泌体纯化滤器（Umibio，中国上海），4 ℃下3 000 g离心10 min，收集滤液为纯化外泌体，保存于-80 ℃。使用Pierce™ BCA蛋白测定试剂盒（Thermo Fisher Scientific，Waltham，USA）测定外泌体浓度，取50 μg/mL外泌体处理LN229细胞48 h。使用NanoSight LM10（Malvern Panalytical，Malvern，UK）测量外泌体尺寸分布和电位，透射电子显微镜观察外泌体形态，蛋白质印迹法分析外泌体标志蛋白[CD81（66866-1-Ig，1∶1 000，Proteintech，Wuhan，China）、CD9（60232-1-IG，1∶5 000，Proteintech）、CD63（25682-1-AP，1∶1 000，Proteintech）]及凋亡标志蛋白（裂解型caspase3（ab2302，1∶100，Abcam，Cambridge，USA）、钙网蛋白（calreticulin，#12238，1∶1 000，Cell Signaling Technology，Danvers，USA）。

1.2.2 Western blot 使用RIPA裂解液（Beyotime，中国上海）裂解细胞和小鼠肿瘤组织，Pierce™ BCA试剂盒测量总蛋白含量。将蛋白样品与取样缓冲液混合，沸水浴5 min变性。电泳1~2 h，直至溴酚蓝迁移至凝胶底部。220 mA电流下冰浴转膜120 min。膜在封闭液中室温封闭60 min。GAPDH（AF7021，1∶1 000，Affinity Biosciences，中国杭州）、裂解型Caspase-3（ab2302，1∶1 000，Abcam）和波形蛋白（Vimentin）（10366-1-AP，1∶2 000，Proteintech）一抗室温孵育，Twist蛋白（CSB-PA025358LA01HU，1∶1 000，Cusabio，中国武汉）一抗4 ℃过夜孵育。次日，洗涤3次（每次10 min），二抗（辣根过氧化物酶偶联的抗兔或抗鼠IgG，1∶5 000，Beijing Kangwei Century Biotechnology Co.，Ltd.，中国北京）室温孵育1 h后再次洗涤。加显影剂，使用化学发光成像系统（Bio-Rad，Hercules，USA）检测蛋白信号。

1.2.3 CCK-8实验 将LN229细胞以每孔5 000个细胞的密度接种于96孔板中，每孔加入100 μL培养基，培养24 h。更换培养基后，添加不同浓度的TMZ，处理细胞24 h。每孔加入10 μL CCK-8溶液，孵育2 h后，使用酶标仪（Bio-Rad）在450 nm处测量吸光度。使用SPSS 8.0软件计算TMZ的半数抑制浓度（IC_{50}）值。

1.2.4 细胞克隆形成实验 将对数生长期的LN229细胞以每孔1 000个细胞接种于6孔板，过夜培养后，用apoEVs或apoEVs-GW4869处理48 h。继续培养14 d，用2 mL 4%多聚甲醛固定15 min。0.1%结晶紫染色15 min后，使用Image J软件计算克隆数量。

1.2.5 流式细胞术 使用Annexin V-FITC/PI凋亡检测试剂盒（Multisciences Biotech Co.，Ltd.，中国杭州）检测各处理组的细胞凋亡。收集1×10^5~1×10^6个细胞用预冷的PBS清洗，并重新悬浮于500 μL 1×缓冲液中。每管加入5 μL FITC和5 μL PI染料，混合后室温避光孵育15 min。使用流式细胞仪（BD Biosciences，San Jose，USA）分析凋亡。

1.2.6 Transwell侵袭实验 将1∶8稀释的Matrigel（C0372，Beyotime）加入Transwell腔室，37 ℃固化3 h，后用无血清培养基水合30 min。迁移实验无需基质胶。收获TMZ、apoEVs和apoEVs-GW4869处理的LN229细胞，用无FBS培养基稀释。将100 μL细胞悬液加入Transwell顶部腔室，底部加入800 μL含10% FBS的培养基，培养24 h。取出腔室，底部用结晶紫染色20 min。使用Image J统计细胞数量。

1.2.7 细胞转染 使用OriTrans® PEI-X（ORI2311，ORIBIO，中国上海）将si-XIST和si-NC分别转染到LN229细胞中。转染24 h后，补充总浓度为50 μg/mL的apoEVs，继续孵育48 h。然后收集细胞用于后续实验。

1.2.8 DiI示踪外泌体 将超离心外泌体用5 μmol/L DiI在室温下孵育30 min，4 ℃下以10 000 g离心30 min，弃去上清未结合染料。再以120 000 g离心70 min，沉淀重悬于PBS，避光低温保存。将2 μg/mL DiI标记的apoEVs加入培养基（经0.22 μm过滤），与LN229细胞共孵育4 h。PBS洗涤3次后，用Alexa Fluor 488染色细胞骨架15 min，DAPI染色细胞核1 min。封片后，用荧光显微镜观察外泌体摄取。

1.2.9 定量逆转录聚合酶链反应（quantitative reverse transcription polymerase chain reaction，qRT-PCR） 收集细胞样本后，使用TRIZOL提取LN229细胞和apoEVs的总RNA。使用反转录试剂盒进行反转录。使用LightCycler 480荧光定量PCR仪检测基因表达。反应条件按照荧光定量PCR试剂盒的协议进行。每个反应重复定量PCR 3次。使用GAPDH作为目标基因相对表达量的标准化内参。

1.3 统计学处理

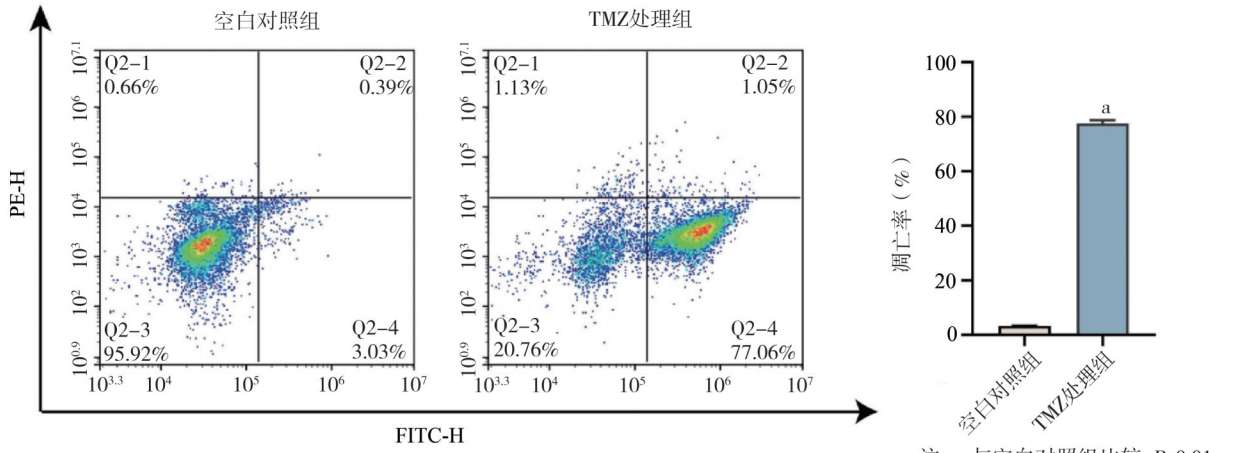
所有数据以均值±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，经正态性检验和方差齐性检验确认后，两组间比较采用独立样本t检验，多组间比较采用单因素方差分析（ANOVA）及Tukey事后检验，

数据来自至少3个独立重复实验的结果，检验水准α=0.05。

2 结 果

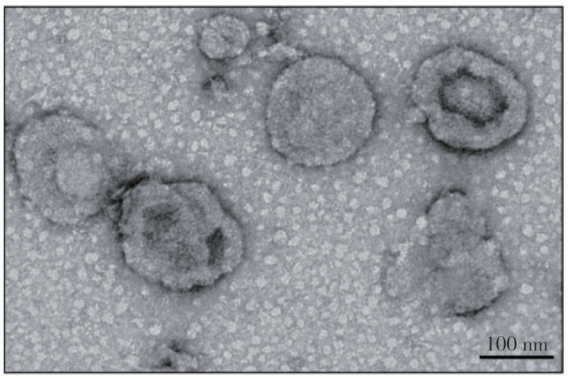
2.1 从凋亡的胶质瘤细胞中提取并表征apoEVs

对LN229细胞进行TMZ处理后，流式细胞术散点图显示空白对照组和TMZ处理组的凋亡情况，柱状图中对比空白对照组与TMZ处理组的凋亡率超过70%（t=12.348，P<0.001）（图1A）。从凋亡细胞中提取的胶质瘤来源apoEVs在电子显微镜下显示双层膜结构和茶杯状形态（图1B），其平均粒径为148.0 nm（图1C）。apoEVs同样高表达未经TMZ或GW4869处理的LN229细胞培养上清液提取的常规细胞外囊泡（extracellular vesicles，EVs）的标志物CD9、CD63和CD81，并且含有更高水平的凋亡相关标志蛋白裂解型caspase-3（cleaved-Caspase-3）和钙网蛋白（calreticulin）（图1D），在zeta电位中EVs和apoEVs均呈负电性，表明两组粒子表面带负电荷，无统计学差异（t=1.482，P=0.156）（图1E）。这些结果表明，apoEVs保留了EVs的经典形态特征，并高表达凋亡相关标志蛋白。

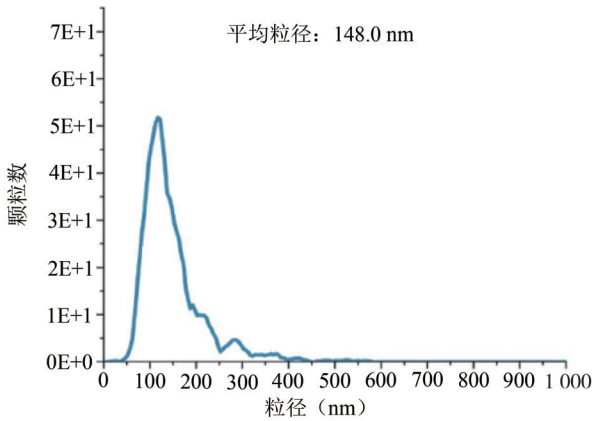


A. 流式细胞术检测120 μmol/L TMZ处理48 h后LN229细胞的凋亡率

注：a，与空白对照组比较，P<0.01

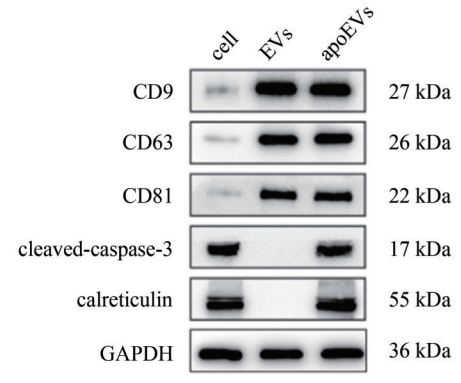


B. 电子显微镜检测TMZ处理后提取的apoEVs形态特征

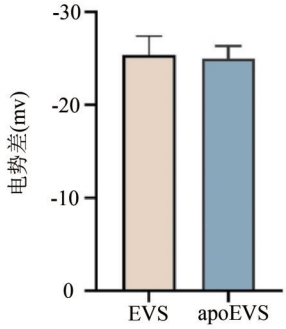


注：横轴为粒径（nm），纵轴为粒径对应的颗粒数（对数表示），平均粒径为148.0 nm

C. 使用NTA检测apoEVs的粒径分布



D. Western blot分析CD9、CD63、CD81、cleaved-caspase-3和calreticulin在凋亡的LN229细胞、EVs和apoEVs中的表达水平

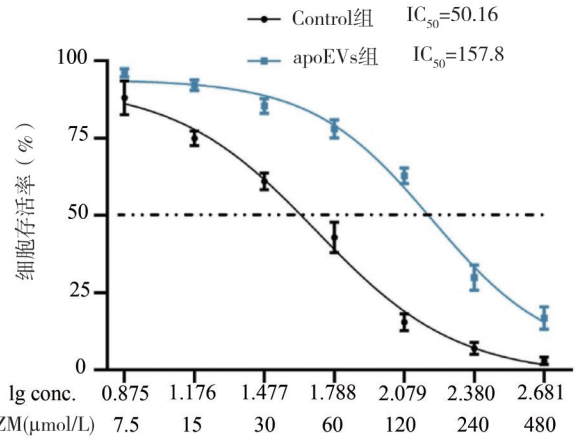


E. 检测正常EVs和apoEVs的zeta电位

图1 凋亡外囊泡的提取与表征

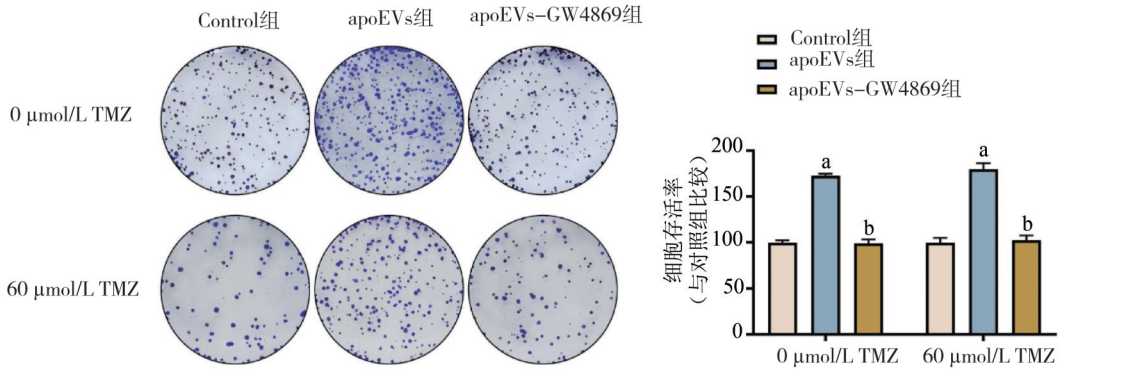
2.2　apoEVs促进胶质瘤细胞对TMZ的耐药性

验证apoEVs对胶质瘤中TMZ敏感性，对照组和apoEVs组的TMZ IC_{50}值分别为50.16 μmol/L和157.8 μmol/L，结果表明apoEVs处理后LN229细胞的TMZ敏感性降低（t=9.326，P=0.001）（P<0.01）（图2A）。验证药物耐受性时，胶质瘤细胞经apoEVs和apoEVs-GW4869处理后，在0和60 μmol/L TMZ条件下，apoEVs显著促进细胞增殖（t=7.762，P=0.003）（P<0.01），而GW4869显著减少这种增殖效应（t=8.763，P=0.001）（P<0.01）（图2B）。在60 μmol/L TMZ条件下，apoEVs显著抑制细胞凋亡（t=6.551，P=0.001）（P<0.01），而GW4869则逆转此效应，（t=8.129，P=0.001）（P<0.01）（图2C）。结果表明，胶质瘤来源的apoEVs在TMZ诱导的凋亡条件下促进耐药性。



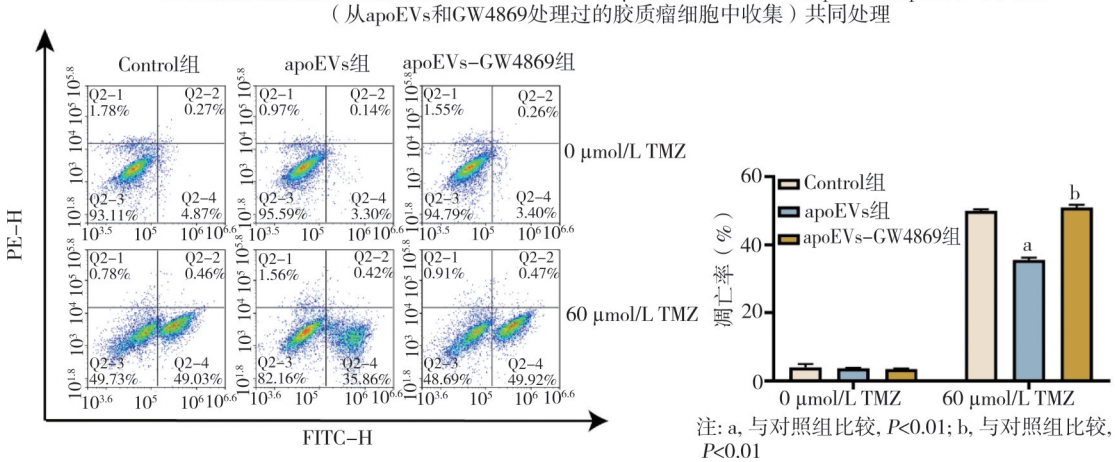
注：黑色曲线为对照组(Control)，蓝色曲线为apoEVs组(50 μg/mL)

A. LN229细胞分别与不同浓度的TMZ(0~480 μmol/L)和/或apoEVs(50 μg/mL)共同处理48 h后，使用CCK8法检测TMZ对LN229细胞IC_{50}值的变化



注：a，与对照组比较，P<0.01；b，与对照组比较，P<0.01

B. 细胞克隆形成实验检测LN229细胞分别在0和60 μmol/L TMZ条件下与apoEVs和apoEVs-GW4869（从apoEVs和GW4869处理过的胶质瘤细胞中收集）共同处理



注：a，与对照组比较，P<0.01；b，与对照组比较，P<0.01

C. 流式细胞术检测LN229细胞分别在0和60 μmol/L TMZ条件下与apoEVs和apoEVs-GW4869（从apoEVs和GW4869处理过的胶质瘤细胞中收集）共同处理

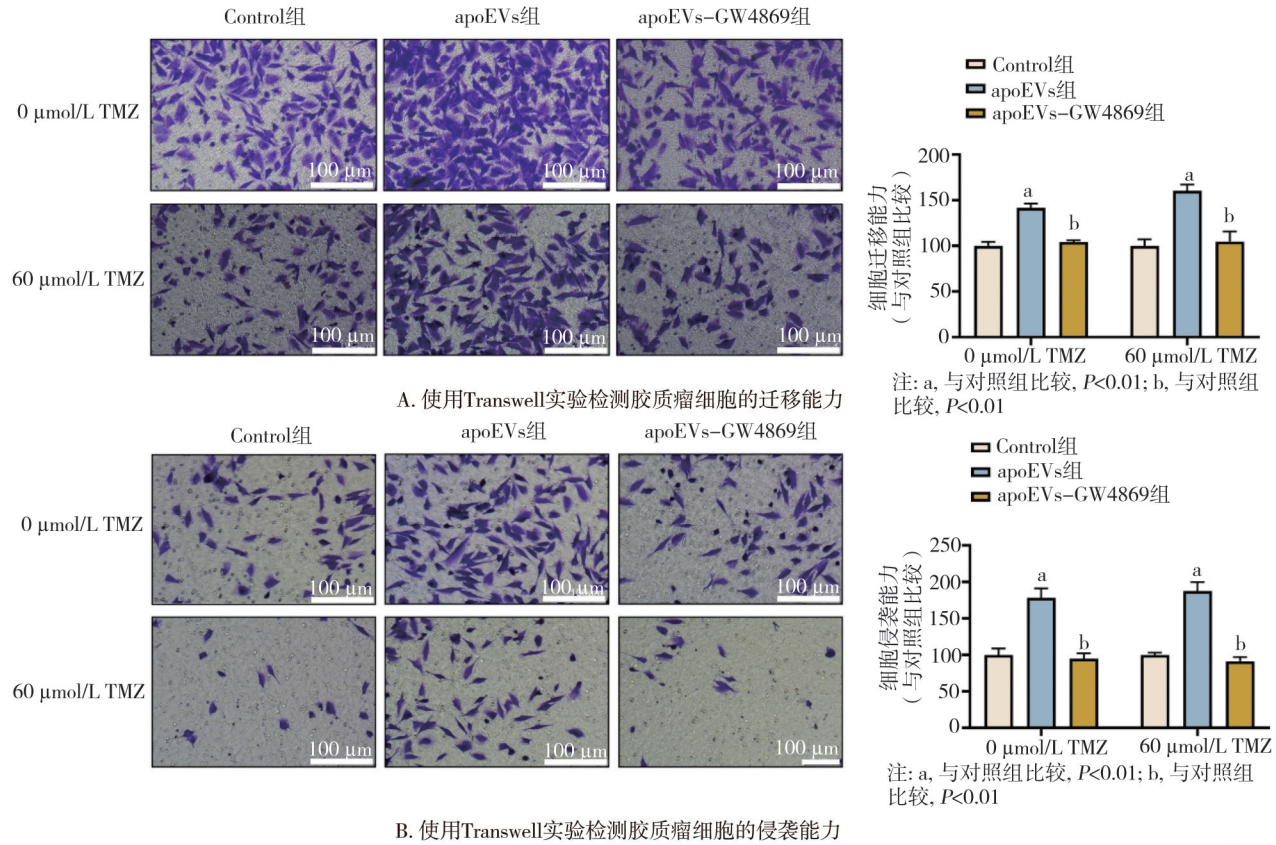
图2　apoEVs促进胶质瘤细胞耐药性

2.3 apoEVs促进胶质瘤细胞的迁移和侵袭

细胞迁移实验显示，在0 μmol/L和60 μmol/L TMZ条件下，apoEVs明显增强了细胞迁移能力（t=11.542，P=0.001），而GW4869逆转了该效应（t=7.219，P=0.003）（图3A）。细胞侵袭实验结果表明，apoEVs同样显著提高了细胞侵袭能力（t=12.876，P=0.001），GW4869处理后显著降低（t=9.421，P=0.002）（图3B）。在0和60 μmol/LTMZ条件下，apoEVs显著增加Vimentin蛋白和Twist蛋白水平（t=8.762，P=0.002和t=7.941，P=0.004），而apoEVs-GW4869逆转这种影响（t=6.219，P=0.005和t=5.874，P=0.007）（图3C、D）。在0 μmol/L TMZ条件下，apoEVs和apoEVs-GW4869对裂解型Caspase-3表达无影响（t=1.142，P=0.341），但在60 μmol/L TMZ条件下，apoEVs显著抑制其表达（t=9.217，P=0.002），而GW4869逆转这种效应（t=7.614，P=0.003）（图3C、D）。结果表明，TMZ处理引起的apoEVs能促进胶质瘤细胞的迁移和侵袭。

2.4 胶质瘤细胞摄取携带LncRNA-XIST的apoEVs，从而调控miR-29c/MGMT轴

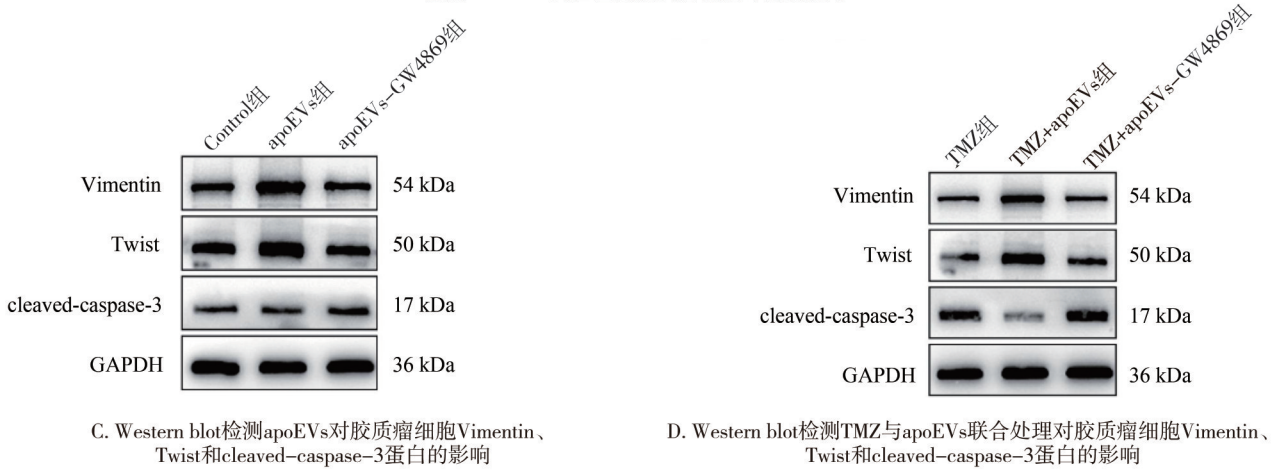
已有研究表明，LncRNA-XIST通过其竞争性内源RNA（ceRNA）作用，调控多个miRNA的表达，从而影响下游靶基因及其相关。在胶质瘤中，miR-29c是一种已知的肿瘤抑制性miRNA，其通过O6-甲基鸟嘌呤-DNA甲基转移酶（O6-methylguanine-DNA methyltransferase，MGMT）基因表达，增



A. 使用Transwell实验检测胶质瘤细胞的迁移能力

注：a，与对照组比较，P<0.01；b，与对照组比较，P<0.01

B. 使用Transwell实验检测胶质瘤细胞的侵袭能力



C. Western blot检测apoEVs对胶质瘤细胞Vimentin、Twist和cleaved-caspase-3蛋白的影响

D. Western blot检测TMZ与apoEVs联合处理对胶质瘤细胞Vimentin、Twist和cleaved-caspase-3蛋白的影响

图3 apoEVs促进胶质瘤细胞迁移、侵袭及相关蛋白表达

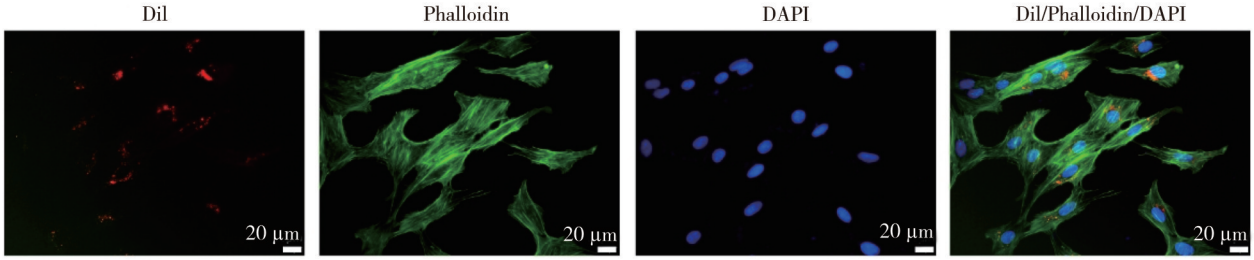
强TMZ敏感性[6]。验证apoEVs是否通过传递LncRNA-XIST发挥促耐药作用，实验使用Dil标记外泌体囊泡和鬼笔环肽标记胶质瘤细胞，结果显示胶质瘤细胞能够摄取apoEVs（t=14.219，P<0.001）（图4A）。经过RNaseA和Triton X-100处理后，qPCR结果显示RNaseA处理对LncRNA-XIST水平无显著影响，而联合Triton X-100处理后明显降低LncRNA-XIST表达（t=0.428，P=0.682）（图4B），表明LncRNA-XIST主要是膜包裹，并且在Triton X-100破坏囊泡后RNase A才能有效降解囊泡内的RNA。qPCR结果还显示，与apoEVs共培养后，LN229细胞中LncRNA-XIST和MGMT表达水平升高（t=11.542，P=0.001和t=10.764，P=0.001），miR-29c表达减少（t=13.219，P<0.001）；而apoEVs-GW4869处理的LN229细胞中，LncRNA-XIST和MGMT水平下降（t=8.761，P=0.002和t=9.214，P=0.001），miR-29c增加（t=12.321，P<0.001）（图4C）。以上结果表明胶质瘤细胞能够摄取携带LncRNA-XIST的apoEVs，从而调控miR-29c/MGMT轴的表达。

2.5　敲低LncRNA-XIST降低了apoEVs诱导的TMZ耐药性

验证LncRNA-XIST沉默对LN229细胞中apoEVs对胶质瘤TMZ耐药性，使用qPCR检测敲除效率，结果显示沉默LncRNA-XIST后，apoEVs和（si-NC）-apoEVs组的LncRNA-XIST表达无明显差异（t=0.842，P=0.426），而（si-XIST）-apoEVs组的LncRNA-XIST表达明显下降（t=14.219，P=0.0002）（P<0.01），表明（si-XIST）可有效抑制LncRNA-XIST在apoEVs中的表达（图5A）。与（si-NC）-apoEVs组相比，（si-XIST）-apoEVs组中LncRNA-XIST和MGMT表达水平降低（t=12.341，P=0.001和t=11.542，P=0.002），miR-29c表达水平升高（t=13.214，P<0.001）（图5B）。研究发现，（si-XIST）-apoEVs组的TMZ IC_{50}值为66.55 μmol/L，明显低于（si-NC）-apoEVs组的157.2 μmol/L，表明敲低lncRNA-XIST增强了LN229细胞对TMZ的敏感性（t=16.219，P=0.001）（图5C）。在60 μmol/L TMZ条件下，板克隆形成实验显示，（si-XIST）-apoEVs组的细胞克隆数明显减少，细胞存活率明显下降，该处理显著抑制胶质瘤细胞增殖（t=15.132，P<0.001）（图5D）。流式细胞术结果表明，（si-XIST）-apoEVs组的凋亡率明显增加并增强凋亡，表明抑制LncRNA-XIST明显增强了TMZ对细胞的凋亡诱导效应（t=14.981，P<0.001）（图5E）。结果表明，敲低LncRNA-XIST缓解了apoEVs诱导的胶质瘤细胞对TMZ的耐药性。

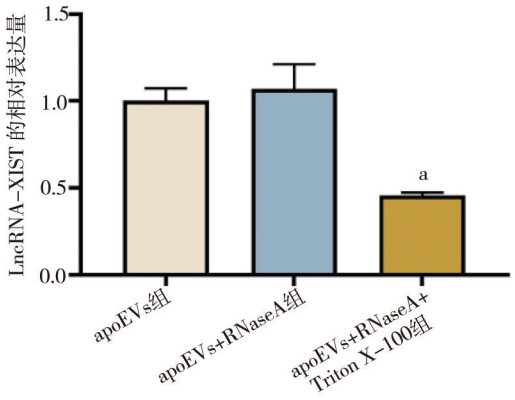
2.6　敲低LncRNA-XIST降低了apoEVs诱导的胶质瘤细胞迁移和侵袭

验证LncRNA-XIST沉默的LN229细胞中apoEVs对胶质瘤细胞迁移和侵袭，qPCR结果显示，在60 μmol/L TMZ条件下，迁移实验提示apoEVs和（si-NC）-apoEVs组的细胞迁移能力无统计学差异，而（si-XIST）-apoEVs组的细胞迁移能



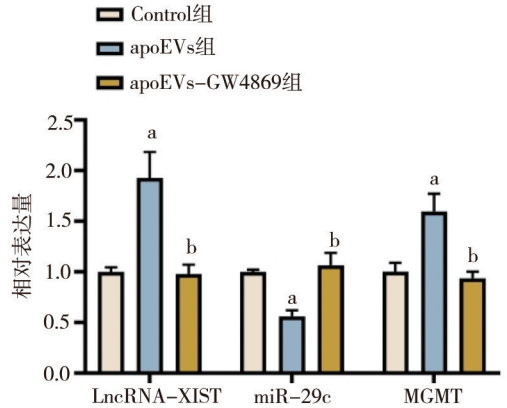
注：Dil/Phalloidin/DAPI（合并图）：这张图将上述3种染色合并在一起，可以清楚地看到外泌体、细胞骨架和细胞核之间的相互位置关系

A. 荧光显微镜观察Dil标记的外泌体（红色）、Phalloidin标记的细胞骨架（绿色）和DAPI标记的细胞核（蓝色）



注：a，与apoEVs组和apoEVs+RnaseA比较，P<0.01

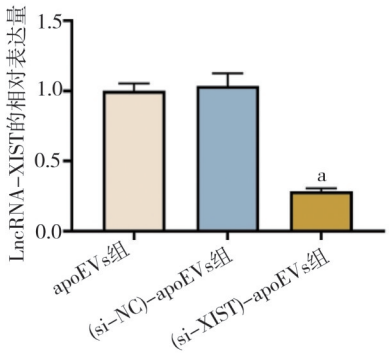
B. qRT-PCR检测apoEVs经RNaseA以及和Triton X-100共处理后LncRNA-XIST mRNA水平



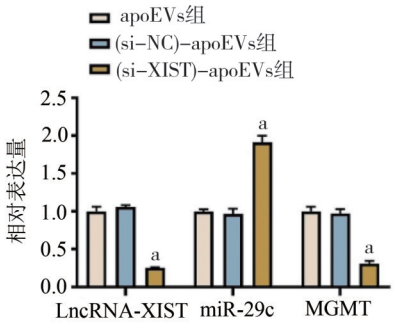
注：a，与对照组比较，P<0.01；b，与对照组比较，P<0.01

C. LN229细胞处理apoEVs或apoEVs-GW4869后，48 h内使用qRT-PCR检测LncRNA-XIST、miR-29c和MGMT水平

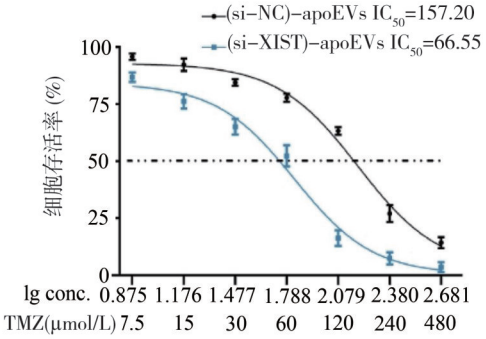
图4　apoEVs传递LncRNA-XIST调控miR-29c/MGMT轴的机制



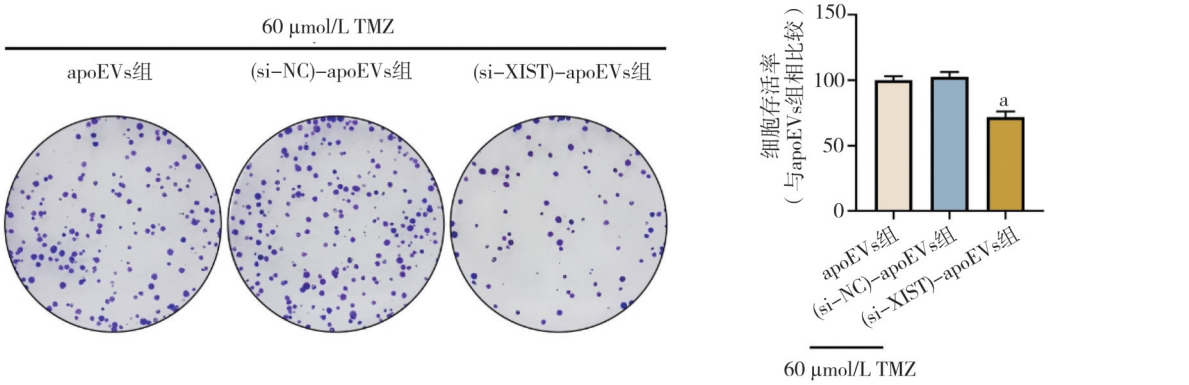
A. 使用qRT-PCR检测apoEVs中的LncRNA-XIST表达



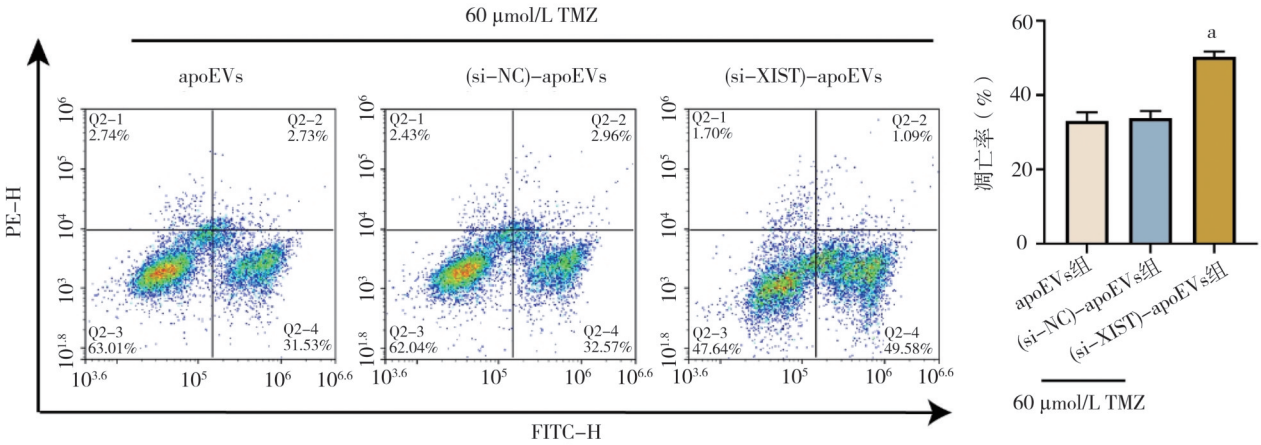
B. LN229细胞与apoEVs，(si-NC)-apoEVs和(si-XIST)-apoEVs共孵育48 h。使用qRT-PCR检测胶质瘤细胞中的LncRNA-XIST、miR-29c和MGMT水平



C. LN229细胞在孵育(si-XIST)-apoEVs和(si-NC)-apoEVs 48 h后收集。在不同浓度的TMZ处理后，使用CCK8检测TMZ的IC_{50}值的变化



D. 使用细胞隆形成实验检测apoEVs，(si-NC)-apoEVs和(si-XIST)-apoEVs在60 μmol/L TMZ处理下对胶质瘤细胞增殖和凋亡的影响

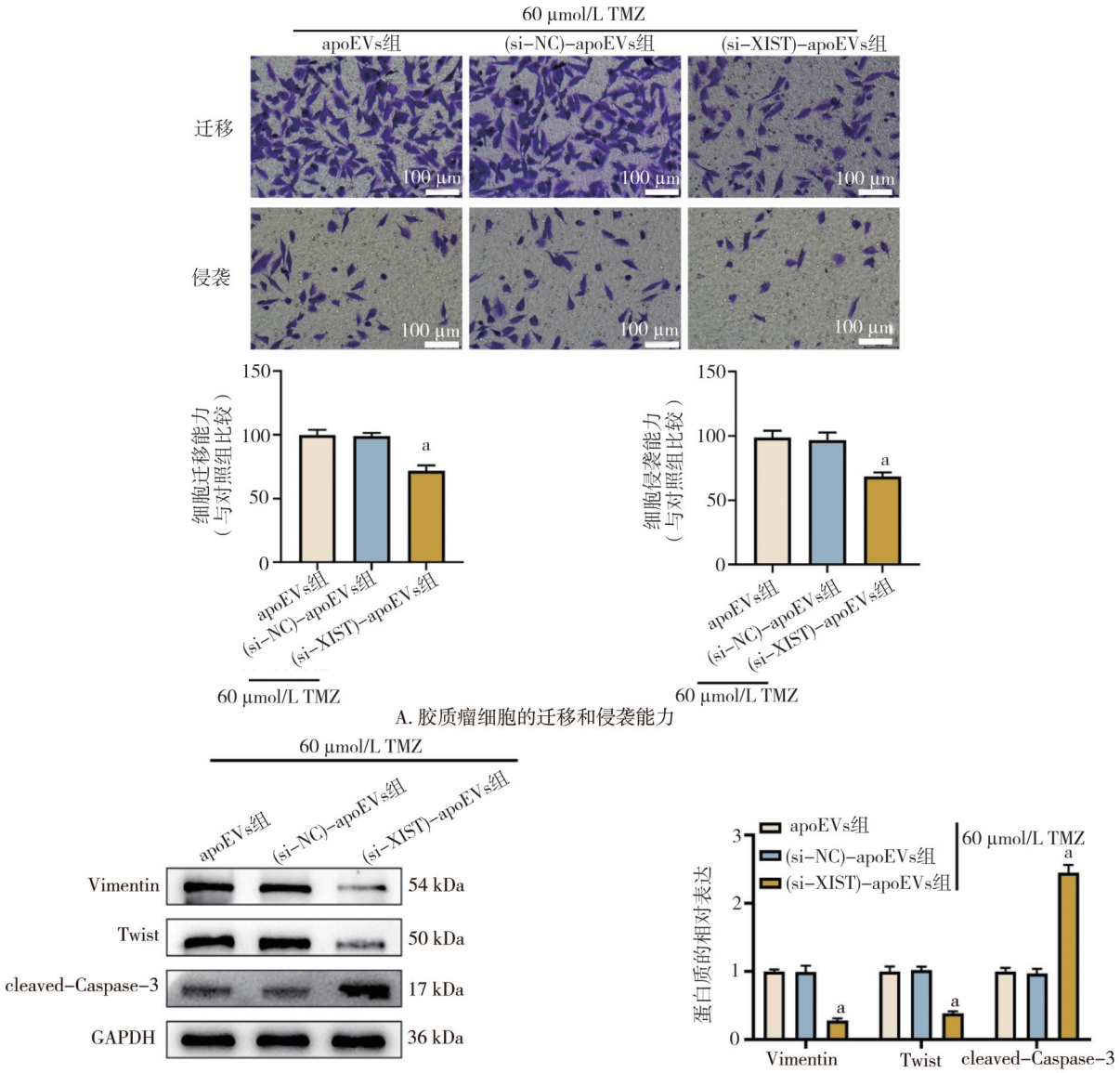


E. 使用流式细胞术检测apoEVs，(si-NC)-apoEVs和(si-XIST)-apoEVs在60 μmol/L TMZ处理下对胶质瘤细胞增殖和凋亡的影响

注：a，与apoEVs组和(si-NC)-apoEVs组比较，$P<0.01$

图5　敲低LncRNA-XIST对apoEVs诱导胶质瘤细胞TMZ耐药性的影响

力明显降低（$t=1.042$，$P=0.341$）；侵袭能力实验显示，与迁移实验结果一致，(si-XIST)-apoEVs组的细胞侵袭能力明显下降（$t=13.217$，$P<0.001$），表明抑制LncRNA-XIST可明显减少细胞的迁移和侵袭行为。（图6A）。Western blot结果表明，相较于(si-NC)-apoEVs组，(si-XIST)-apoEVs处理明显抑制Vimentin蛋白和Twist蛋白的表达（$t=15.321$，$P<0.001$和$t=12.984$，$P<0.001$），这2种蛋白常关联于细胞的上皮-间质转换（epithelial-mesenchymal transition，EMT）和肿瘤侵袭能力，这2种蛋白的表达有所下降，可能表明减少的肿瘤侵袭性；leaved-Caspase-3蛋白是细胞凋亡过程中Caspase-3的活化形式，而(si-XIST)-apoEVs处理促进cleaved-Caspase-3的表达（$t=14.712$，$P<0.001$），说明抑制LncRNA-XIST可能促进了细胞的凋亡过程（图6B）。结果表明，沉默LncRNA-XIST缓解了apoEVs诱导的胶质瘤细胞迁移和侵袭。



A. 胶质瘤细胞的迁移和侵袭能力

B. 使用Western blot检测胶质瘤细胞中Vimentin、Twist和cleaved-Caspase-3蛋白含量

注：a，与apoEVs组和(si-NC)-apoEVs组比较，$P<0.01$

图6　LncRNA-XIST沉默对胶质瘤细胞迁移、侵袭及相关蛋白表达的影响

3　讨　论

胶质瘤是最常见的原发性脑肿瘤，其发病率占所有原发性脑肿瘤的36.7%~42.6%，具有发病率高、预后差、易恶性进展的特点[6]，预后差与胶质瘤细胞的高增殖能力、高浸润性、高迁移性及对化疗药物的高耐药性密切相关[9]。因此，探究胶质瘤细胞快速增殖、浸润、迁移和化疗药物耐药的内在机制对于攻克这一疾病具有重要意义。近20年来，大量随机对照研究表明，胶质瘤术后辅助化疗能延长患者总体生存时间[10-11]，特别是第二代咪唑并四嗪类烷化剂TMZ，因其广泛适用性和低毒性成为脑胶质瘤一线化疗药物。然而，临床实践发现TMZ虽然能消灭术后残留肿瘤细胞，但难以完全遏制肿瘤生长和复发[12-13]。大样本研究显示，约30%~40%的胶质瘤患者对TMZ初始耐药，更多患者逐渐产生耐药性，复发患者第二轮TMZ治疗无应答比例高达90%[14]。因此，TMZ耐药是导致脑胶质瘤术后生存期短的主要原因之一。研究TMZ耐药机制对开发新化疗药物和寻找新治疗靶点具有重要意义，为突破胶质瘤治疗瓶颈和未来临床治疗提供新希望。

本研究首次报道了胶质瘤来源的apoEVs在促进肿瘤发生和胶质瘤细胞对TMZ耐药性方面的作用。几十年来，apoEVs被认为是由凋亡细胞产生的碎片，并被吞噬细胞摄取和清除。最近的研究表

明，apoEVs能够将细胞成分递送到邻近细胞甚至远处器官。例如，肿瘤细胞衍生的apoEVs通过细胞间转移剪接体加速了恶性胶质母细胞瘤的发展[15]。本研究中，分离并表征了凋亡胶质瘤细胞来源的细胞外囊泡，发现其外观与apoEVs的形态特征一致。功能上，apoEVs显著促进了胶质瘤细胞系的多种恶性表型，包括TMZ耐药性以及细胞迁移和侵袭能力的增强。这一发现丰富了对apoEVs在恶性肿瘤中功能的理解，进一步表明其作为潜在肿瘤治疗靶点的可能性。

EMT因其在肿瘤转移中的关键作用而受到广泛关注。肿瘤细胞中EMT的发生导致细胞间粘附减少和细胞极性丧失，使这些细胞容易从原发部位脱落，并从上皮表型转变为具有更高迁移和侵袭能力的间质表型[16]。同时，EMT通过调节多种信号通路或促进肿瘤细胞生成间充质干细胞，增强了恶性肿瘤的治疗耐药性。Vimentin是EMT的关键标志物之一，而Twist蛋白是与EMT调控相关的关键转录因子之一。本研究表明，apoEVs显著增加了Vimentin蛋白和Twist蛋白的表达水平，表明apoEVs在胶质瘤细胞中的促肿瘤作用和促TMZ耐药性与EMT密切相关。

本研究首次报道apoEVs通过递送LncRNA-XIST促进肿瘤进展。有研究表明，LncRNA-XIST可以被包裹在外泌体中，同时LncRNA-XIST也能促进胶质瘤细胞的增殖[17]。正如之前报道的那样，LncRNA-XIST通过miR-29c/MGMT轴在胶质瘤TMZ耐药性中发挥关键作用[6]。在本研究中，apoEVs中异常高的LncRNA-XIST表达被证明通过miR-29c/MGMT轴增强了胶质瘤细胞的恶性表型。LncRNA-XIST的敲低和外泌体抑制剂GW4869可以有效逆转上述效应。这些结果进一步确认了LncRNA-XIST、miR-29c和MGMT作为恶性肿瘤治疗潜在靶点的可能性。

综上所述，apoEVs递送的LncRNA-XIST在介导EMT以及胶质瘤细胞迁移能力、侵袭能力和TMZ耐药性中起到了关键作用。上调的LncRNA-XIST通过miR-29c/MGMT轴促进了胶质瘤细胞的上述恶性表型，表明靶向apoEVs和LncRNA-XIST在胶质瘤治疗中的重要作用。这一发现表明，通过抑制apoEVs的形成可以干预LncRNA-XIST的功能，从而为靶向LncRNA-XIST调节胶质瘤中的TMZ耐药提供新的治疗策略选择。

参 考 文 献

[1] 杜 鹏，耿道颖. 多模态MRI影像组学在胶质瘤精准诊疗中的研究进展[J]. 国际医学放射学杂志，2023，46(6)：672-679. Du P，Geng DY. Research progress of multimodal MRI radiomics in precision diagnosis and treatment of glioma[J]. Int J Med Radiol，2023，46(6)：672-679.

[2] Weller M，van den Bent M，Preusser M，et al. EANO guidelines on the diagnosis and treatment of diffuse gliomas of adulthood[J]. Nat Rev Clin Oncol，2021，18：170-186.

[3] Rose M，Cardon T，Aboulouard S，et al. Surfaceome proteomic of glioblastoma revealed potential targets for immunotherapy[J]. Front Immunol，2021，12：746168.

[4] Li M，Xing X，Huang H，et al. BMSC-Derived ApoEVs Promote Craniofacial Bone Repair via ROS/JNK Signaling[J]. J Dent Res，2022，101(6)：714-723.

[5] Yekula A，Yekula A，Muralidharan K，et al. Extracellular vesicles in glioblastoma tumor microenvironment[J]. Front Immunol，2020，10：3137.

[6] Du P，Zhao HT，Peng RJ，et al. LncRNA-XIST interacts with *miR-29c* to modulate the chemoresistance of glioma cell to TMZ through DNA mismatch repair pathway[J]. Biosci Rep，2017，37(5)：BSR20170696.

[7] Lapointe S，Perry A，Butowski NA. Primary brain tumours in adults[J]. Lancet，2018，392(10145)：432-446.

[8] Smith HL，Wadhwani N，Horbinski C. Major features of the 2021 WHO classification of CNS tumors[J]. Neurotherapeutics，2022，19(6)：1691-1704.

[9] Xu B，Tian L，Chen J，et al. An oncolytic virus expressing a full-length antibody enhances antitumor innate immune response to glioblastoma[J]. Nat Commun，2021，12(1)：5908.

[10] Wang HW，Fang B，Peng B，et al. Recent advances in chemical biology of mitochondria targeting[J]. Front Chem，2021，9：683220.

[11] Liu EK，Sulman EP，Wen PY，et al. Novel therapies for glioblastoma[J]. Curr Neurol Neurosci Rep，2020，20(7)：19.

[12] Nafe R，Hattingen E. Forms of non-apoptotic cell death and their role in gliomas-presentation of the current state of knowledge[J]. Biomedicines，2024，12(7)：1546.

[13] Yu Y，Villanueva-Meyer J，Grimmer MR，et al. Temozolomide-induced hypermutation is associated with distant recurrence and reduced survival after high-grade transformation of low-grade IDH-mutant gliomas[J]. Neuro Oncol，2021，23(11)：1872-1884.

[14] Ghiaseddin AP，Shin D，Melnick K，et al. Tumor treating fields in the management of patients with malignant gliomas[J]. Curr Treat Options Oncol，2020，21(9)：76.

[15] Arora A，Somasundaram K. Glioblastoma vs temozolomide：can the red queen race be won?[J]. Cancer Biol Ther，2019，20(8)：1083-1090.

[16] Yin JX，Ge X，Shi ZM，et al. Extracellular vesicles derived from hypoxic glioma stem-like cells confer temozolomide resistance on glioblastoma by delivering miR-30b-3p[J]. Theranostics，2021，11(4)：1763-1779.

[17] Manfioletti G，Fedele M. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) 2021[J]. Int J Mol Sci，2022，23(10)：5848.

[18] Zhu G，Xia Y，Zhao Z，et al. LncRNA XIST from the bone marrow mesenchymal stem cell derived exosome promotes osteosarcoma growth and metastasis through miR-655/ACLY signal[J]. Cancer Cell Int，2022，22(1)：330.

（责任编辑：李青颖）

本文引用格式：

薛箕山，赵媛媛，邱 浩，等. 凋亡外囊泡传递LncRNA-XIST在胶质瘤细胞耐药性作用机制研究[J]. 重庆医科大学学报，2025，50(7)：931-939.