

缺氧处理乳腺癌细胞外泌体对乳腺癌增殖侵袭的影响

张 阳¹ 张雨萌² 王英丽³

1. 吉林省肿瘤防治研究所分子生物室,吉林 长春 130012;
2. 吉林省肿瘤医院信息管理中心,吉林 长春 130012;
3. 吉林省肿瘤防治研究所药物毒理室,吉林 长春 130012

【摘要】 目的 研究缺氧处理乳腺癌细胞外泌体对乳腺癌增殖侵袭的影响。方法 研究时间:2021年2月—2022年12月,正常条件和缺氧条件下培养乳腺癌细胞 MCF-7,两组培养细胞上清液用超速离心法提取癌细胞外泌体;透射电镜观察外泌体形态,Western blot 法检测外泌体分子标志物 CD81 与 CD63 表达情况;CCK8 方法检测乳腺癌细胞增殖情况;Transwell 侵袭小室法检测细胞迁移能力和侵袭能力。结果 透射电镜下观察,两组外泌体均呈现双层膜囊泡状结构;Western blot 法结果显示,外泌体分子标志物 CD81 与 CD63 表达阳性;CCK8 法结果显示,与 PBS 组相比,Nom-exo 组和 Hypo-exo 组细胞增殖能力增加明显($P<0.05$),与 Nom-exo 组相比,Hypo-exo 组细胞增殖能力增加明显($P<0.05$);Transwell 侵袭小室法结果显示,与 PBS 组相比,Nom-exo 组和 Hypo-exo 组细胞侵袭能力增加明显($P<0.05$),与 Nom-exo 组相比,Hypo-exo 组细胞侵袭能力增加明显($P<0.05$);与 PBS 组相比,Nom-exo 组和 Hypo-exo 组细胞迁移能力增加明显($P<0.05$),与 Nom-exo 组相比,Hypo-exo 组细胞迁移能力增加明显($P<0.05$)。结论 乳腺癌细胞来源的外泌体可以促进乳腺癌细胞增殖,可以增强乳腺癌细胞侵袭能力和迁移能力。缺氧条件下,乳腺癌细胞来源的外泌体可以进一步促进乳腺癌细胞增殖,可以进一步增强乳腺癌细胞侵袭能力和迁移能力。

【关键词】 缺氧;外泌体;乳腺癌

乳腺癌严重影响女性生命健康。多种肿瘤细胞都能够分泌外泌体,乳腺癌细胞同样也能够分泌外泌体。除了肿瘤细胞分泌外泌体之外,包括树突细胞、上皮细胞、淋巴细胞等细胞上清中和胸腹水、羊水、母乳、尿等各种体液中都存在外泌体。由于外泌体来源不同,功能也不同,甚至相反^[1-3]。相关研究报道^[4-6],肿瘤细胞来源的外泌体在肿瘤微环境中具有增强免疫逃逸,促进肿瘤迁移等作用。缺氧是肿瘤微环境的重要特征之一,据研究报道^[7-9],缺氧可以刺激外泌体分泌,影响外泌体的组分,为了适应缺氧环境,肿瘤新生血管系统进一步发展,形成新的血管,引起肿瘤发展。本研究主要探讨缺氧处理乳腺癌细胞外泌体对乳腺癌增殖侵袭的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞 MCF-7 乳腺癌细胞由吉林省肿瘤防治研究所提供。

1.2 试剂 IMDM 培养液、胎牛血清均购自美国 Gibco 公司;CCK8 试剂盒、Transwell 试剂盒购自长春天辰公司。

1.3 方法

1.3.1 缺氧条件处理乳腺癌细胞 正常条件:37℃、5% CO₂、20% O₂ 培养箱培养 MCF-7 细胞。缺氧条件:37℃、5% CO₂、1% O₂ 培养箱培养 MCF-7 细胞。其余体积分数由氮气补充。在上述两种条件下分别培养 48h 后收集外泌体。

1.3.2 提取外泌体 采用多步离心法提取外泌体。将正常组和缺氧组细胞上清收集,按照多步法:第一步,除死细胞,将两组上清经 4℃、3500×g 离心 20min,保留上清;第二步,除细胞碎片,6500×g 离心 45min,保留上清;第三步,10000×g 离心 70min,保留上清;第四步,120000×g 离心 1h,缓慢去上清,保留沉淀,用磷酸盐缓冲液悬浮沉淀,-80℃保存。

1.3.3 外泌体鉴定 低温保存的外泌体取出融化后,取相同体积 4% 多聚甲醛与融化的外泌

体混合,取 5 μL 混悬液加至载样铜网上 20min,三重样,在封口膜上加 100 μLPBS ,在封口膜上加外泌体 5 倍稀释样品 10 μL ,2% 磷酸钨染色,透射电镜观察外泌体形态。

1.3.4 Western blot 法检测外泌体分子标志物 CD81 与 CD63 表达 提取蛋白:取 RIPA 裂解液 200 μL ,放置常温,使其溶解,加入融化的外泌体,冰浴 30min。MCF-7 细胞用冷 PBS 洗 3 次后,加至 6 孔培养板,每孔加 100 μL RIPA 裂解液,冰浴,收集细胞,4 $^{\circ}\text{C}$,10000 $\times\text{g}$ 离心 10min,取上清,-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。按试剂盒操作确定蛋白浓度。

将 5 $\times\text{SDS}$ 与蛋白样按照 1:4 混合,沸水浴 20min 加热,冷却至常温后,12000 $\times\text{g}$ 离心 15min。按说明配制分离胶和浓缩胶,蛋白上样后,先设定电泳电压 80V,在条带跑到分离胶和浓缩胶连接处时,设定电泳电压为 120V,在分离胶底部停止电泳。用滤纸和 PVDF 膜转膜,脱脂牛奶封闭 1.5h,添加一抗(抗小鼠 CD63、CD81)后,4 $^{\circ}\text{C}$ 12h,加入稀释好的 HRP 二抗溶液(1:2000)共同孵育 2h,ECL 曝光显色。

1.3.5 CCK8 方法检测乳腺癌细胞增殖情况 将指数生长期乳腺癌细胞 MCF-7 与正常组和缺氧组外泌体分别共培养于 96 孔培养板,每孔 100 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 条件培养 6h,加入等体积 CCK8 溶液,共同孵育 15min,450nm 酶标仪检测吸光度(A)值。

1.3.6 Transwell 侵袭小室法检测细胞侵袭能力和迁移能力 将指数生长期乳腺癌细胞 MCF-7 与正常组和缺氧组外泌体分别共培养 48h。在 Transwell 侵袭小室中注入融化的 Matrigel 胶 50 μL ,检测两组 MCF-7 细胞侵袭。

将指数生长期乳腺癌细胞 MCF-7 与正常组和缺氧组外泌体分别共培养 48h。分别取两组细胞,调细胞浓度为 $3 \times 10^4/\text{mL}$,取 200 μL 细胞注入 Transwell 侵袭小室,将小室置于 24 孔培养板中,每孔加入 500 μL 含 15% 胎牛血清的 IMDM 培养液,在 37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 条件培养 24h,用 PBS 清洗小室底部,无水乙醇固定 1h,倒扣小室,加结晶紫染色 15min,晾干,显微拍照并计数。

1.3.7 统计学方法 采用 SPSS25.0 统计软件进行数据分析,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,两组间采用 LSD-t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 透射电镜观察外泌体形态 我们应用透射电镜观察外泌体形态学特征。散在的椭圆形或杯子型双层膜囊泡状磷脂结构。直径在 30 ~ 160nm 之间。

2.2 Western blot 法检测外泌体分子标志物 CD81 与 CD63 表达 Western blot 结果显示,多步离心法获取的外泌体表达 CD81 和 CD63 外泌体分子标志蛋白,结构和生物学特征均符合外泌体的特点。而 MCF-7 细胞中的 CD81 和 CD63 表达相对较低。

2.3 CCK8 方法检测缺氧条件对乳腺癌细胞增殖的影响 实验分三组,PBS 组、正常氧气外泌体组(Nom-exo)与缺氧外泌体组(Hypo-exo)。与 PBS 组相比,Nom-exo 组和 Hypo-exo 组细胞增殖能力增加明显($P < 0.05$)。与 Nom-exo 组相比,Hypo-exo 组细胞增殖能力增加明显($P < 0.05$),见图 1。

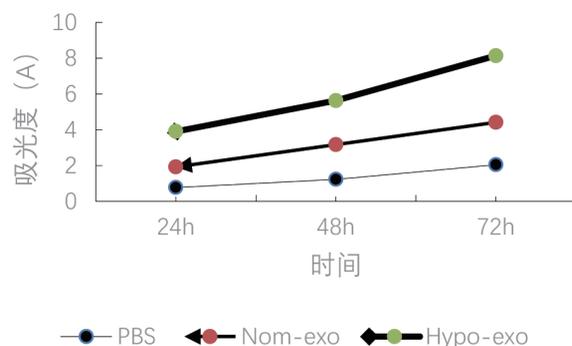


图 1 缺氧条件对乳腺癌细胞增殖的影响

2.4 缺氧环境乳腺癌细胞外泌体对乳腺癌细胞侵袭能力的影响 实验分三组,PBS 组、正常氧气乳腺癌细胞外泌体组(Nom-exo)与缺氧乳腺癌细胞外泌体组(Hypo-exo)。与 PBS 组相比,Nom-exo 组和 Hypo-exo 组细胞侵袭能力增加明显($P < 0.05$)。与 Nom-exo 组相比,Hypo-exo 组细胞侵袭能力增加明显($P < 0.05$),见图 2。

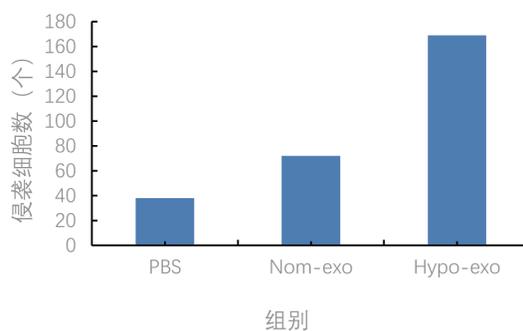


图 2 缺氧环境乳腺癌细胞外泌体侵袭能力的影响

2.5 缺氧环境乳腺癌细胞外泌体对乳腺癌细胞迁移能力的影响 实验分三组, PBS 组、正常氧气乳腺癌细胞外泌体组 (Nom-exo) 及缺氧乳腺癌细胞外泌体组 (Hypo-exo)。与 PBS 组相比, Nom-exo 组和 Hypo-exo 组细胞迁移能力增加明显 ($P < 0.05$)。与 Nom-exo 组相比, Hypo-exo 组细胞迁移能力增加明显 ($P < 0.05$), 见图 3。

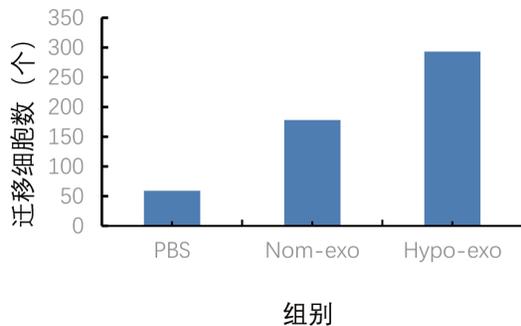


图 3 缺氧环境乳腺癌细胞外泌体对乳腺癌细胞迁移能力的影响

3 讨论

越来越多的研究表明, 乳腺癌的发生发展、转移复发与人体的免疫系统密切相关, 其前提条件之一是适合乳腺癌发展的肿瘤微环境对发病机体本身的免疫抑制。在这微环境中, 免疫反应的调节 T 细胞和效应 T 细胞的平衡被打破, 机体的免疫系统不但不能杀灭癌细胞, 甚至还会促进癌细胞生长, 产生免疫逃逸。

缺氧是肿瘤发生过程的重要特征。打破体内氧的动态平衡可以促进肿瘤新生血管形成, 阻止癌细胞的凋亡代谢, 并通过这些新生血管协助癌细胞的侵袭和迁移等。

机体的多种细胞都可以分泌释放外泌体, 包括 DC 细胞、T 细胞、B 细胞以及肿瘤细胞等。这些不同细胞来源的外泌体的功能不尽相同, 甚至相反。抗原递呈细胞外分泌释放的外泌体具有抗肿瘤免疫功能; 而大多数肿瘤细胞分泌的外泌体和来源于肿瘤 T 细胞的外泌体具有促进新生血管形成和协助肿瘤侵袭和迁移的功能。本研究探讨乳腺癌细胞来源外泌体在缺氧条件下和常氧条件下对乳腺癌细胞增殖侵袭的影响, 研究结果显示, 乳腺癌细胞来源的外泌体可以促进乳腺癌细胞增殖, 可以增强乳腺癌细胞侵袭能力和迁移能力。缺氧条件下, 乳腺癌细胞来源的外泌体可以进一步促进乳腺癌细胞增殖, 可以进一步增强乳腺癌细胞侵袭能力和迁移能力。

肿瘤组织周围缺氧是由于肿瘤新生血管的覆盖范畴满足不了肿瘤的快速生长引起的。肿瘤组织的氧分压远远低于正常组织。乳腺癌细胞分泌释放外泌体, 并且其释放的量与缺氧程度呈正相关, 也侧面证实肿瘤细胞来源外泌体与肿瘤的发生发展有关。

综上所述, 缺氧条件下的乳腺癌细胞分泌的外泌体能够促进乳腺癌的增殖、侵袭和转移, 关于其机制还有待于进一步研究。研究其相关机制为乳腺癌的免疫治疗提供线索。

参考文献

- [1] 周珍珍, 庞媛, 孙伟. 淋巴结-肿瘤双靶向型外泌体: 双效协同肿瘤免疫治疗 [J]. 科学通报, 2022, 67(22): 2570-2572.
- [2] 白金权, 潘炫豪, 张译丹, 等. 外泌体在肿瘤中的作用及其临床应用 [J]. 吉林医药学院学报, 2022, 43(3): 199-202.
- [3] 王璐, 陈梦丽, 何芳, 等. 工程化外泌体介导巨噬细胞清除肿瘤外泌体 [J]. 中国生物工程杂志, 2022, 42(6): 1-11.
- [4] 李青芳, 肖华卫, 鞠小妍. YY1 转录因子诱导低氧乳腺癌外泌体中的 circ_000543 促进乳腺癌细胞增殖、侵袭 [J]. 中华内分泌外科杂志, 2022, 16(3): 314-319.
- [5] 赵玥, 付永强, 周真林, 等. 外泌体中 circ-RPPH1 通过 circ-RPPH1/miR-146b-3p/MUC19 通路轴调控乳腺癌对紫杉醇的耐药性 [J]. 中国肿瘤外科杂志, 2022, 14(3): 296-306.
- [6] 何洋, 安天志, 李成, 等. 树突状细胞来源外泌体通过 NF- κ B 通路影响内皮细胞致促炎因子的变化 [J]. 贵州医科大学学报, 2022, 47(6): 654-660.
- [7] 李启程, 邓进, 付小洋, 等. 骨髓间充质干细胞来源外泌体对成肌细胞缺氧状态的影响 [J]. 中国组织工程研究, 2023, 27(6): 853-859.
- [8] 施经斌, 熊阳. 肿瘤微环境与乳腺癌细胞相互作用导致肿瘤转移的研究进展 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2022, 27(5): 562-574.
- [9] 张磊, 谢劲松, 张永臣. 缺氧对髓源性抑制细胞来源外泌体免疫抑制能力的影响 [J]. 现代免疫学, 2022, 42(3): 207-212, 230.