

· 实验研究 ·

滋阴化痰方调控肿瘤细胞来源外泌体对 HUVECs 管样分化的影响*

李晶晶¹, 季青², 刘焯¹, 李琦², 岳小强¹

1. 中国人民解放军第二军医大学长征医院, 上海 200003; 2. 上海中医药大学附属曙光医院, 上海 200003

摘要:目的:探讨滋阴化痰方(Ziyin Huatan Recipe, ZYHT)调控肿瘤细胞来源外泌体(exosomes, Exos)对人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)管样分化的影响。方法:①将2种不同剂量的ZYHT分别与胃癌细胞株SGC-7901和MGC-803共培养48 h,使其主动进入细胞内,收集细胞上清液提取外泌体,透射电镜观察外泌体形态,Western blot法检测其膜表面标志蛋白TSG101和CD81,用纳米颗粒跟踪分析仪NanoSight分析外泌体粒径分布范围。②PKH67荧光标记外泌体,并与HUVECs共培养,共聚焦显微镜观察外泌体能否被HUVECs摄取。③通过体外Matrigel基质胶实验,观察含不同剂量ZYHT的SGC-7901-Exos与MGC-803-Exos对HUVECs管状结构形成能力的影响。上述实验以等量PBS作为对照。结果:①经鉴定从胃癌细胞上清液中提取的外泌体为形态一致的圆形或椭圆形膜性囊泡,表达标志蛋白TSG101和CD81,粒径范围30~200 nm。②共聚焦显微镜观察示肿瘤细胞来源外泌体可被HUVECs摄取。③在体外Matrigel胶成管实验中,随着外泌体浓度的增加,实验(含ZYHT高、低剂量)组分支总长度明显少于对照(PBS)组。结论:ZYHT可通过调控肿瘤细胞外泌体进而抑制胃癌血管新生。

关键词:滋阴化痰方;胃癌细胞株;外泌体;血管新生;人脐静脉内皮细胞

DOI:10.16368/j.issn.1674-8999.2021.01.027

中图分类号:R285.5 **文献标志码:**A **文章编号:**1674-8999(2021)01-0118-08

Effect of Ziyin Huatan Recipe on Tuboid Differentiation of HUVECs by Regulating Exosomes Derived from Tumor Cells

LI Jingjing¹, JI Qing², LIU Xuan¹, LI Qi², YUE Xiaoqiang¹

1. Changzheng Hospital, The Second Military Medical University of Chinese People's Liberation Army, Shanghai China 200003;
2. Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Chinese Medicine, Shanghai China 200003

Abstract: Objective: To investigate the effect of Ziyin Huatan Recipe (ZYHT) on the tubular differentiation of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) by regulating exosomes (Exos) derived from tumor cells. Methods: ① Two different doses of Ziyin Huatan Recipe were co-cultured with gastric cancer cell lines SGC-7901 and MGC-803 for 48 hours to actively enter the cells, collect the cell supernatant to extract Exos, observe by transmission electron microscope Exos morphology, Western blot method was used to detect the membrane surface marker proteins TSG101 and CD81, and nanoparticle tracking analyzer NanoSight was used to analyze the size distribution range of Exos. ② The Exos were labeled with PKH67 and co cultured with HUVECs. The Exos were detected by confocal microscopy. ③ The effects of SGC-7901-Exos and MGC-803-Exos containing different doses of Ziyin Huatan Recipe on the tubular structure formation ability of HUVECs were observed by Matrigel matrix gel test in vitro. The same amount of PBS was used as control. Results: ① The Exos extracted from the supernatant of gastric cancer cells were identified as round or oval shaped membranous vesicles, which expressed the marker proteins TSG101 and CD81, and the particle size ranged from 30 to

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81603434, 81804008)

200 nm. ②Confocal microscopy showed that Exos derived from tumor cells could be absorbed by HUVECs. ③In vitro Matrigel tube forming experiment, with the increase of Exos concentration, the total branch length of the experimental group (including high and low dose of Ziyin Huatan Recipe) was significantly less than that of the control (PBS) group. Conclusion: Ziyin Huatan Recipe can inhibit angiogenesis of gastric cancer by regulating Exos derived from tumor cells.

Key words: Ziyin Huatan recipe; gastric cancer cell line; exosomes (Exos); angiogenesis; human umbilical vein endothelial cells

胃癌是我国常见恶性肿瘤,虽然手术、放疗、化疗等技术不断进步,靶向药物也不断涌现,但目前对于胃癌的整体疗效仍不理想。近年来,中医药在胃癌综合防治中的作用与地位越来越受到重视。滋阴化痰方(Ziyin Huatan Recipe, ZYHT)是上海长征医院中医科基于“胃癌痰证理论”所创制的针对晚期胃癌的有效方剂。前期研究证实其对胃癌血管新生有明显的抑制作用^[1],但其确切机制尚不明确。外泌体是由多种细胞(包括肿瘤细胞)通过胞吐方式分泌至微环境中的一种直径在30~100 nm,具有双层膜结构的囊状结构^[2],几乎所有的细胞都可以分泌外泌体,有些微生物亦可以产生^[3-5]。近年来发现在细胞之间的通讯中发挥重要调节作用^[6],可直接转运促血管新生相关蛋白至内皮细胞,也可通过转运 microRNA 和 lncRNA,进而影响促血管新生因子的表达^[7]。外泌体不仅本身参与肿瘤免疫、肿瘤侵袭及转移等过程,并且肿瘤外泌体携带的内容物可能作为肿瘤标志物用于肿瘤的早期诊断与治疗^[8]。现代研究者认为,外泌体研究虽属微观分子学,但其整体表达的特点与中医整体观念有相似性^[9]。目前更有学者将外泌体引入中医的研究领域,为中医和外泌体的结合带来新的进展与突破^[10]。本研究拟观察 ZYHT 是否通过调控胃癌细胞来源的外泌体来影响人脐静脉内皮细胞管样分化,继而影响肿瘤的血管新生。

1 材料

1.1 细胞 HUVECs、SGC-7901、MGC-803 均购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。

1.2 药品与试剂 ZYHT 中所需药物百合(批号:18041006)、白花蛇舌草(批号:18082704)、制半夏(批号:19052209)均为吴江上海蔡同德中药饮片公司提供。DMEM 培养基(美国 Hyclone 公司,批号:AE29431636); FBS(美国 GIBCO 公司,批号:42G9081K); 0.25% 胰蛋白酶-0.02% EDTA(上海碧云天科技有限公司,批号:090619191011); PKH67 细胞膜标记荧光染色剂(美国 Sigma 公司,批号:

MKCH2943); Matrigel 基质胶(美国 BD 公司,批号:9189007); BCA 蛋白质定量试剂盒(上海碧云天科技有限公司,批号:010719190723); 表面标志物 TSG101、CD81 多克隆抗体(美国 Proteintech 公司,批号:14497-1-AP、66866-1-Ig); GAPDH 多克隆抗体(美国 Cell signaling 公司,批号:14971633)。细胞培养上清外泌体快速抽提试剂盒 HieffTM(上海翊圣生物科技有限公司,批号:H8914770)。

1.3 仪器 倒置相差显微镜(日本奥林巴斯公司,型号:CKX53); CO₂ 培养箱(美国 Thermo 公司,型号:CCL-170B-8); 多功能酶标仪(美国 Biotek Instruments 公司,型号:8218141); 透射电镜(美国 FEI 公司,型号:Tecnai G2 Spirit Biotwin); 纳米颗粒跟踪分析仪 NanoSight(英国 Malvern 公司,型号:Zeta View); 共聚焦荧光显微镜[奥林巴斯(中国)有限公司,型号:IX73]。

2 方法

2.1 ZYHT 制备 将百合 30 g, 白花蛇舌草 30 g 和制半夏 15 g, 加 8 倍水煎 2 次, 每次 2 h, 将煎液滤过, 减压浓缩成膏。加入 2 倍乙醇搅拌, 静置 48 h, 过滤并回收乙醇, 浓缩成膏, 并干燥粉碎^[11]。由上海长征医院药材科统一制备, 质控稳定。ZYHT 配制: 用培养基配制 1 g·L⁻¹ 母液。CCK-8 法检测 ZYHT 的 IC₁₀ 值, 根据 IC₁₀ 值确定 ZYHT 的给药浓度^[1]。此次实验确定高剂量 ZYHT(ZYHT-H) 和低剂量 ZYHT(ZYHT-L) 为研究对象。

2.2 外泌体的分离纯化 取对数生长期的第 4 代 MGC-803 细胞, 分别加入 2 种不同剂量的 ZYHT, 用去除外泌体的完全培养基培养 48 h 后, 收集上清培养液, 0.22 μm 滤膜过滤, 离心半径 11.5 cm, 3 000 g 离心 10 min, 小心收集上清并转移至新的离心管, 于冰上放置待用; 加入一定比例的外泌体抽提试剂, 涡旋振荡混匀 1 min, 放置 4 ℃ 静置 2 h 或过夜; 取出装有混合液的离心管于 4 ℃, 离心半径 8.4 cm, 10 000 g 离心 60 min, 弃上清, 收集沉淀, 取适量 PBS 均匀吹打离心沉淀物, 使其充分混匀, 并转移

至新的离心管中;将含有外泌体的离心管于4℃,离心半径8.4 cm,12 000 g离心2 min,弃沉淀,保留上清;将获取的MGC-803-Exos于80℃保存备用,避免反复冻融。SGC-7901-Exos操作同前。

2.3 外泌体的鉴定

2.3.1 透射电镜观察 MGC-803-Exos 形态 取10 μL的MGC-803-Exos滴于透射电镜专用的载样铜网上,常温静置2 min,滤纸吸去浮液,用1% (W/V)磷钨酸溶液染色5 min后,滤纸吸去多余染色液,晾干,透射电镜观察MGC-803-Exos的形态。

2.3.2 Western blot 法检测 MGC-803-Exos 膜表面标志性蛋白 取MGC-803-Exos 100 μg,加入100 μL的RIPA裂解液,吹打使裂解液和MGC-803-Exos充分混合,冰上裂解30 min,在4℃下,离心半径8.4 cm,12 000 g离心30 min,吸取上清液置于1.5 mL EP管中,-80℃冻存。BCA法检测蛋白浓度后,加入5×Loading Buffer,99℃变性10 min。按每孔20 μL上样至10% SDS-PAGE胶,80 V电泳30 min,120 V电泳1 h,采用湿法转膜,200 mA转膜1 h 30 min,5% BSA封闭液室温封闭2 h,5% BSA封闭液以1:1 000的比例稀释一抗GAPDH、TSG101和CD81,4℃孵育一抗过夜。TBST漂洗10 min,洗涤3次,加入二抗室温孵育2 h,加入显影液,上机曝光。

2.3.3 MGC-803-Exos 粒径分析 取浓度为100 mg·L⁻¹的100 μL的MGC-803-Exos重悬于1.5 mL PBS内,经纳米颗粒跟踪分析仪NanoSight进行检测。SGC-7901-Exos操作同前。

2.4 外泌体与 HUVECs 共培养观察

2.4.1 外泌体染色 取浓度为100 mg·L⁻¹的MGC-803-Exos加入300 μL的Diluent C溶液混匀,配制成MGC-803-Exos工作液,以确保完全分散。在新的离心管中加入1 μL的PKH6与250 μL的Diluent C溶液混匀,配制成PKH67染色液。SGC-7901-Exo工作液和PKH67染色液轻柔混匀4 min后,加入等体积0.5% BSA结合多余染料,室温孵育20 min。加入比例外泌体提取试剂4℃避光静置2 h。4℃,10 000 g,离心60 min,PBS重悬染色后的MGC-803-Exos。将含有外泌体的离心管于4℃,离心半径8.4 cm,12 000 g离心2 min,弃沉淀,保留上清,用0.22 μm滤器过滤,4℃避光保存备用。

2.4.2 MGC-803-Exos 与 HUVECs 共培养 取第5代HUVECs重悬于无血清培养基中,以5×10⁴·mL⁻¹浓度加入24孔板中,每孔100 μL(5 000个),置于37℃、5% CO₂培养箱中,待细胞贴壁后加入上述PKH67荧光标记的MGC-803-Exos,孵育24 h后去培养基,将细胞用TBST洗3遍,每次3 min;用4%多聚甲醛固定爬片15 min(可4℃固定过夜),PBS洗3次,每次3 min;每孔加入0.5% Tritonx-100 250 μL,室温通透20 min(细胞膜打孔);用TBST洗3遍,每次3~5 min,吸水纸吸干;每孔加入DAPI 200 μL,避光孵育5 min,用TBST洗3遍,每次3 min;染膜:膜探针(红色),1:100稀释,每孔200 μL,染5~20 min,用TBST洗3遍,每次3 min。共聚焦荧光显微镜下观察ADSC-Exos是否进入细胞,镜下PKH67荧光标记的MGC-803-Exos呈绿色荧光。SGC-7901-Exos操作同前。

2.4.3 外泌体影响进 HUVECs 管样结构形成实验

将Matrigel基质胶置于96孔板中,37℃孵育30 min使其凝固。用无血清培养基重悬第5代HUVECs后接种至96孔板中,每孔2×10⁴个细胞。实验分为4组分别加入浓度为100 mg·L⁻¹的MGC-803-Exos、300 mg·L⁻¹的MGC-803-Exos、500 mg·L⁻¹的MGC-803-Exos以及等量PBS(对照组)。每组3个复孔。于37℃处理48 h后,倒置相差显微镜下观察管状结构形成情况,计算每孔分支结构总长度。SGC-7901-Exos操作同前。

2.5 统计学方法 采用SPSS 19.0统计软件进行分析,计量资料以均数±标准差表示,多组比较时,先行正态性检验,若不符合正态分布,则采用非参数检验KruskalWallis检验法;若符合正态分布,则采用单因素方差分析(one way ANOVA),多个实验组与对照组进行比较采用Dunnett's test检验。检验水准为α=0.05,以P<0.05为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 外泌体鉴定 透射电镜观察示,MGC-803-Exos和SGC-7901-Exos为大小均匀、形态一致的圆形或椭圆形膜性囊泡,边缘清晰。纳米颗粒跟踪分析仪NanoSight检测显示,MGC-803-Exos粒径范围为37.9~203.5 nm,SGC-7901-Exos粒径范围57.4~147.5 nm符合外泌体粒径范围30~200 nm(见图1、图2)。Western blot检测显示,TSG101和CD81为其标志蛋白,内参蛋白为GAPDH(见图3)。

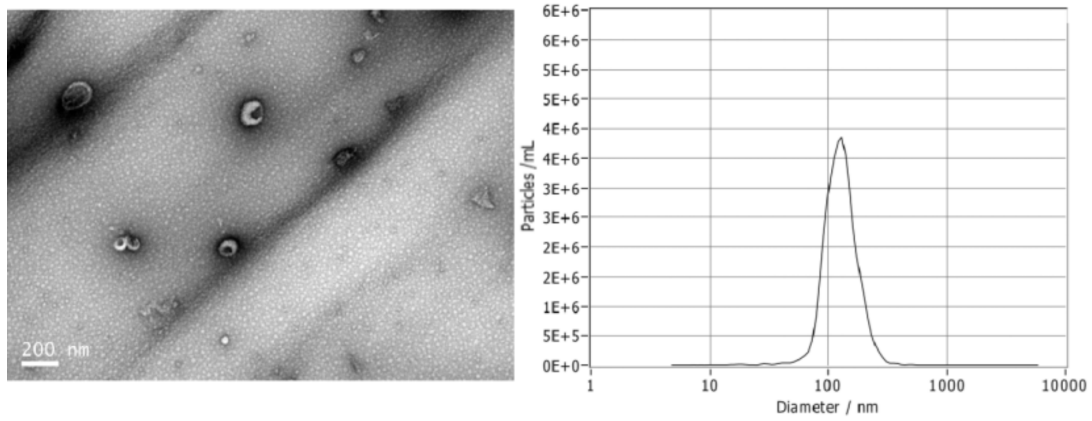


图1 MGC-803-Exos的电镜形态和粒径大小

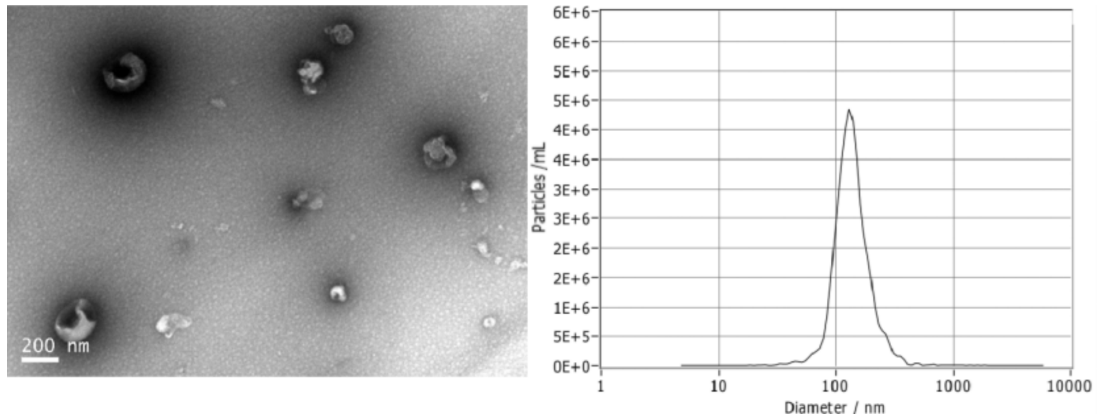


图2 SGC-7901-Exos的电镜形态和粒径大小

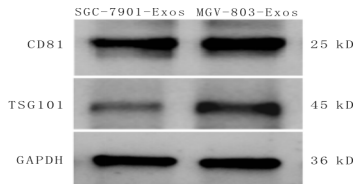
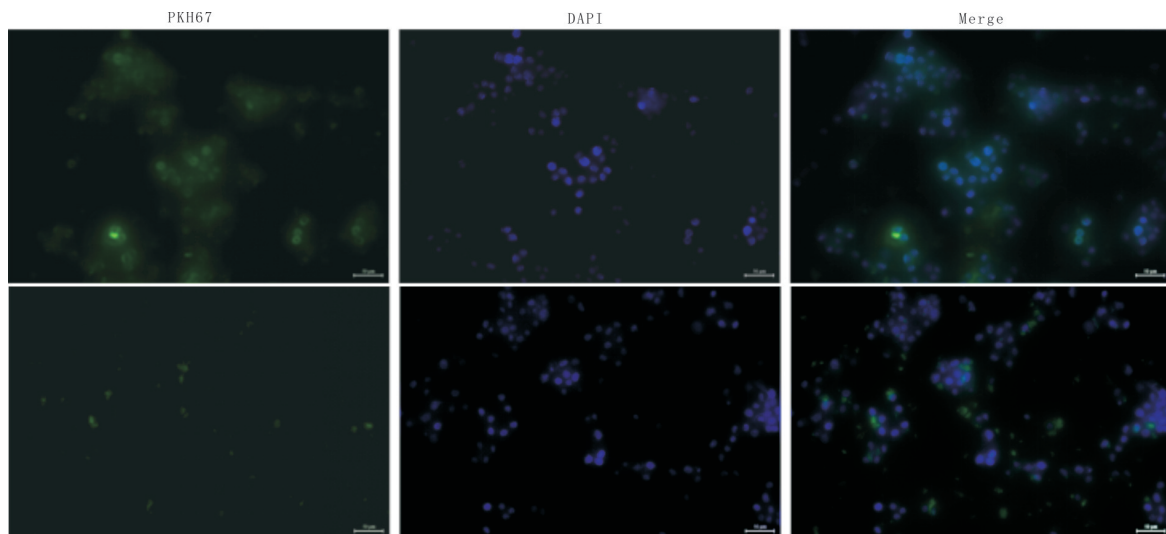


图3 外泌体的标志蛋白 CD81、TSH101

3.2 外泌体与 HUVECs 共培养 为了进一步验证外泌体能否被 HUVECs 摄取,我们对外泌体进行染色标记,与 HUVECs 共培养 24 h 后,发现在共聚焦显微镜下被 PKH67 荧光标记的外泌体呈云雾状或斑片状绿色荧光,聚集在细胞核周围。说明外泌体可以被 HUVECs 摄取(见图 4)。



注:上至下分别是 SGC-7901-EXO_s 和 MGC-803-EXO_s

图4 血管内皮细胞摄取外泌体

3.3 ZYHT 调控肿瘤细胞来源外泌体抑制 HUVECs 管样结构形成 将外泌体与 HUVECs 共培养, 观察 ZYHT 能否调控外泌体影响 HUVECs 的管样分化能力。倒置相差显微镜观察结果显示, 当外泌体浓度为 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 不论是 MGC - 803 - EXOs 或

SGC - 7901 - EXOs 对 HUVECs 成管能力无明显影响。但当外泌体浓度为 $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, ZYHT 调控外泌体影响 HUVECs 的管样分化能力与对照组相比表现出明显差异(见图 5、图 6)。

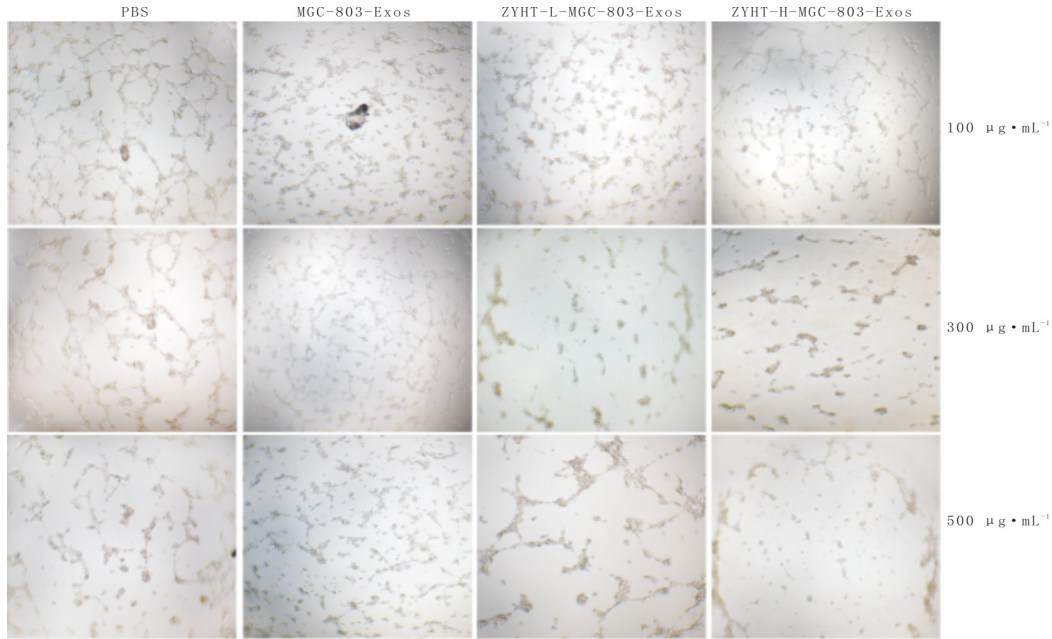


图 5 ZYHT 调控 MGC - 803 - Exos 对 HUVECs 体外成管能力的影响

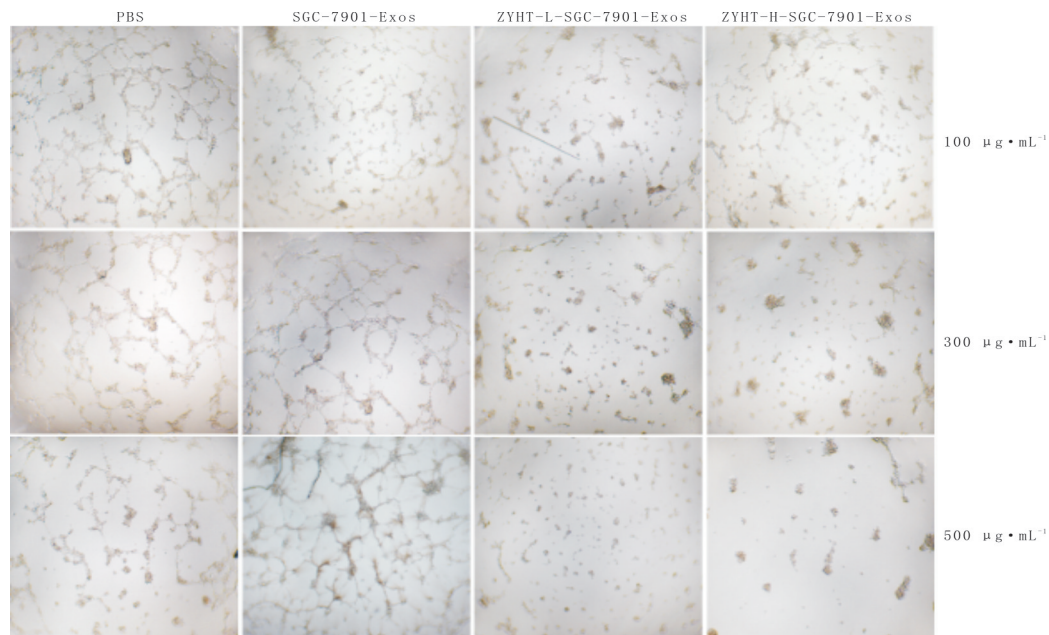


图 6 ZYHT 调控 SGC - 7901 - Exos 对 HUVECs 体外成管能力的影响

3.4 不同处理方式对 MGC 细胞的比较 运用重复测量方差分析的方法发现在 MGC - 803 细胞实验中不同的处理之间存在着显著的差异 ($F = 212.257, P < 0.001$), 不同处理方法与不同浓度之间的交互作用显著 ($F = 49.539, P < 0.001$), 而不同浓度之间不存在显著的差异(见表 1 和表 2)。由表

1 可知, HUVECs 的分支长度, 在 MGC - 803 - Exos 组是随着浓度的增加而增加; 在 ZYHT - L - MGC - 803 - Exos 组和 ZYHT - H - MGC - 803 - Exos 组是随浓度的增加而减少。由表 2 可知, 外泌体浓度为 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, MGC - 803 - Exos 组的 HUVECs 分支长度最长; 外泌体浓度为 $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,

ZYHT-H-MGC-803-Exos 组的 HUVECs 分支长度最短。由此得出 ZYHT 调控 MGC-803-Exos 抑制 HUVECs 管样分化能力的影响是随着外泌体浓度的增加及 ZYHT 剂量的增加而增强(见图 7)。

表 1 不同浓度在同一实验处理的比较 ($\bar{x} \pm s$)

处理方法	(I)浓度 ($\rho/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	(J)浓度 ($\rho/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	平均差异(I-J)
MGC-803-Exos	100	300	-1 107.33 ***
		500	-3 674.33
	300	100	1 107.33 ***
		500	-2 567.00
	500	100	3 674.33
		300	2 567.00
ZYHT-L-MGC-803-Exos	100	300	1 359.00 *
		500	2 273.67 *
	300	100	-1 359.00 *
		500	914.67 *
	500	100	-2 273.67 *
		300	-914.67 *
ZYHT-H-MGC-803-Exos	100	300	2 473.67 **
		500	3 140.67 **
	300	100	-2 473.67 **
		500	667.00
	500	100	-3 140.67 **
		300	-667.00

注: *表示 $P < 0.05$; **表示 $P < 0.01$; ***表示 $P < 0.001$

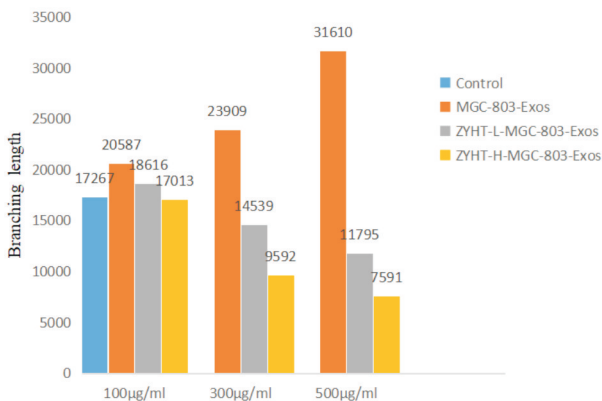


图 7 不同浓度在同一实验处理的比较

3.5 不同处理方式对 SGC-7901 细胞的比较 在 SGC-7901 细胞实验中,不同的处理之间也存在着显著的差异 ($F = 408.572, P < 0.001$),不同浓度之间存在显著差异 ($F = 53.374, P < 0.01$),且不同处理方法与不同浓度之间的交互作用显著 ($F = 407.535, P < 0.001$) (见表 3 和表 4)。由表 3 可知, HUVECs 的分支长度,在 SGC-7901-Exos 组是随着浓度的增加而增加;在 ZYHT-L-SGC-7901-Exos 组和 ZYHT-H-SGC-7901-Exo 是随浓度

的增加而减少。由表 4 可知,外泌体浓度为 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的情况下,SGC-7901-Exos 组的 HUVECs 分支长度最长;外泌体浓度为 $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,ZYHT-H-SGC-7901-Exos 组的 HUVECs 分支长度最短。由此得出 ZYHT 调控 SGC-7901-Exos 抑制 HUVECs 管样分化能力的影响是随着外泌体浓度的增加及 ZYHT 剂量的增加而增强(见图 8)。

表 2 不同处理在同一浓度的比较 ($\bar{x} \pm s$)

浓度($\rho/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	(I)处理方法	(J)处理方法	平均差异(I-J)	
100	Control	MGC-803-Exos	-1 106.67	
		ZYHT-L-MGC-803-Exos	-449.67	
		ZYHT-H-MGC-803-Exos	84.67	
		MGC-803-Exos	Control	1 106.67
		ZYHT-L-MGC-803-Exos	657.00	
		ZYHT-H-MGC-803-Exos	1 191.33 **	
	ZYHT-L-MGC-803-Exos	Control	449.67	
		MGC-803-Exos	-657.00	
		ZYHT-H-MGC-803-Exos	534.33	
		ZYHT-H-MGC-803-Exos	Control	-84.67
		MGC-803-Exos	-1 191.33 *	
		ZYHT-L-MGC-803-Exos	-534.33	
300	Control	MGC-803-Exos	-2 214.00 *	
		ZYHT-L-MGC-803-Exos	909.33	
		ZYHT-H-MGC-803-Exos	2 558.33 *	
		MGC-803-Exos	Control	2 214.00 *
		ZYHT-L-MGC-803-Exos	3 123.33 ***	
		ZYHT-H-MGC-803-Exos	4 772.33 ***	
	ZYHT-L-MGC-803-Exos	Control	-909.33	
		MGC-803-Exos	-3 123.33 ***	
		ZYHT-H-MGC-803-Exos	1 649.00 ***	
		ZYHT-H-MGC-803-Exos	Control	-2 558.33 *
		MGC-803-Exos	-4 772.33 ***	
		ZYHT-L-MGC-803-Exos	-1 649.00 ***	
500	Control	MGC-803-Exos	-4 781.00	
		ZYHT-L-MGC-803-Exos	1 824.00 *	
		ZYHT-H-MGC-803-Exos	3 225.33 *	
		MGC-803-Exos	Control	4 781.00
		ZYHT-L-MGC-803-Exos	6 605.00	
		ZYHT-H-MGC-803-Exos	8 006.33 *	
	ZYHT-L-MGC-803-Exos	Control	-1 824.00 *	
		MGC-803-Exos	-6 605.00 *	
		ZYHT-H-MGC-803-Exos	1 401.33 *	
		ZYHT-H-MGC-803-Exos	Control	-3 225.33 *
		MGC-803-Exos	-8 006.33 *	
		ZYHT-L-MGC-803-Exos	-1 401.33 *	

注: *表示 $P < 0.05$; **表示 $P < 0.01$; ***表示 $P < 0.001$

表3 不同浓度在同一实验处理的比较

处理方法	(I)质量浓度 ($\rho/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	(J)质量浓度 ($\rho/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	平均差异(I-J)
SGC-7901-EXOs	100	300	-1 741.33 *
		500	-2 414.33 ***
	300	100	1 741.33 ***
		500	-673.00
	500	100	2 414.33 ***
		300	673.00
ZYHT-L-SGC-7901-Exos	100	300	1 418.00 *
		500	2 116.67 *
	300	100	-1 418.00 *
		500	698.67 *
	500	100	-2 116.67 *
		300	-698.67 *
ZYHT-H-SGC-7901-Exos	100	300	1 383.33 *
		500	2 446.33 ***
	300	100	-1 383.33 *
		500	1 063.00 *
	500	100	-2 446.33 ***
		300	-1 063.00 *

注: *表示 $P < 0.05$; **表示 $P < 0.01$; ***表示 $P < 0.001$

表4 不同处理在同一浓度的比较

浓度($\rho/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	(I)处理方法	(J)处理方法	平均差异(I-J)	
100	Control	SGC-7901-EXOs	-385.33	
		ZYHT-L-SGC-7901-Exos	209.00	
		ZYHT-H-SGC-7901-Exos	1 126.67	
	SGC-7901-EXOs	Control	385.33	
		ZYHT-L-SGC-7901-Exos	594.33	
		ZYHT-H-SGC-7901-Exos	1 512.00 **	
	ZYHT-L-SGC-7901-Exos	Control	-209.00	
		SGC-7901-EXOs	-594.33	
		ZYHT-H-SGC-7901-Exos	917.67	
	ZYHT-H-SGC-7901-Exos	Control	-1 126.67	
		SGC-7901-EXOs	-1 512.00 **	
		ZYHT-L-SGC-7901-Exos	-917.67	
	300	Control	SGC-7901-EXOs	-2 126.67 *
			ZYHT-L-SGC-7901-Exos	1 627.00
			ZYHT-H-SGC-7901-Exos	2 510.00 **
SGC-7901-EXOs		Control	2 126.67 *	
		ZYHT-L-SGC-7901-Exos	3 753.67 **	
		ZYHT-H-SGC-7901-Exos	4 636.67 ***	
ZYHT-L-SGC-7901-Exos		Control	-1 627.00	
		SGC-7901-EXOs	-3 753.67 **	
		ZYHT-H-SGC-7901-Exos	883.00 *	
ZYHT-H-SGC-7901-Exos		Control	-2 510.00 **	
		SGC-7901-EXOs	-4 636.67 ***	
		ZYHT-L-SGC-7901-Exos	-883.00 *	
500		Control	SGC-7901-EXOs	-2 799.67 *
			ZYHT-L-SGC-7901-Exos	2 325.67 *
			ZYHT-H-SGC-7901-Exos	3 573.00 *
	SGC-7901-EXOs	Control	2 799.67 *	
		ZYHT-L-SGC-7901-Exos	5 125.33 ***	
		ZYHT-H-SGC-7901-Exos	6 372.67 **	
	ZYHT-L-SGC-7901-Exos	Control	-2 325.67 *	
		SGC-7901-EXOs	-5 125.33 ***	
		ZYHT-H-SGC-7901-Exos	1 247.33 *	
	ZYHT-H-SGC-7901-Exos	Control	-3 573.00 *	
		SGC-7901-EXOs	-6 372.67 **	
		ZYHT-L-SGC-7901-Exos	-1 247.33 *	

注: *表示 $P < 0.05$; **表示 $P < 0.01$; ***表示 $P < 0.001$

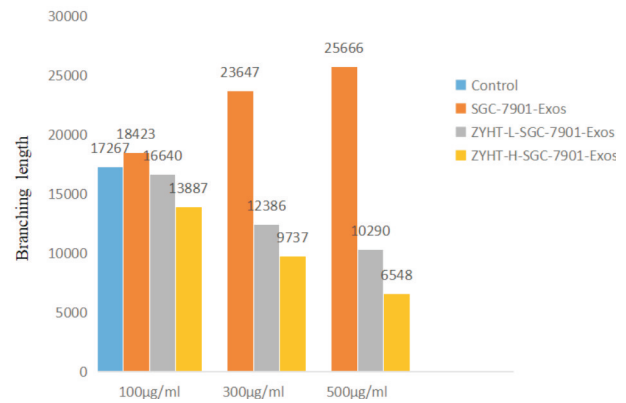


图8 不同处理在同一浓度的比较

4 讨论

近年来随着对肿瘤微环境研究的不断深入,外泌体开始受到越来越多的关注。外泌体在肿瘤的自噬、化疗抵抗、转移等生物学进程中发挥重要的调控作用^[12]。众所周知,在肿瘤发生的早期就伴随着新血管的生长,而更多研究表明肿瘤的血管新生与其产生的外泌体密切相关。外泌体作为肿瘤与各种正常细胞之间的通讯系统,可以将自身携带的与血管新生相关蛋白、microRNA 和 lncRNA 传递给参与血管生成的受体细胞的分子和遗传物质,并促进内皮细胞和其他正常细胞表型和功能的重新编程^[13]。研究发现恶性黑色素瘤细胞来源的外泌体内含有 miRNA-9,其可以通过激活 JAK-STAT 通路来促进血管内皮细胞的管腔形成^[14]。Umezumi 等^[15]发现来源于人类白血病肿瘤细胞的外泌体传递的 miRNA 被 HUVECs 摄取后,可增加肿瘤细胞迁移能力和促进血管管腔的形成。Yuk-Kit 等^[16]研究发现人鼻咽癌 C666-1 细胞分泌的外泌体被 HUVECs 胞吞后,改变了 HUVECs 相应的蛋白质,促进血管生成,表明外泌体可能通过改变内皮细胞蛋白质的表达水平来促进血管生成。还有研究证明,外泌体通过体内和体外靶向转录因子 c-MYB,将 miR-130a 从胃癌细胞导入到血管细胞,可以促进血管生成和肿瘤生长^[17]。LIU 等^[18]报道,CD97 高表达的胃癌组织来源的外泌体可发挥促血管生成作用而使胃癌细胞增殖能力提高 20%。由此可见,外泌体可以通过多种途径促进肿瘤血管的生成,加速肿瘤生长。外泌体作为肿瘤血管生成的潜在生物标志物,有望成为抗肿瘤血管生成治疗的靶点。

中医药对恶性肿瘤的防治有独特的作用,通过抑制血管新生、调节免疫微环境等干预肿瘤的侵袭和转移^[19],特别是针对肿瘤的复发,中医药具有一定的优势^[20]。由于外泌体参与肿瘤的发生发展和

侵袭与转移等诸多生理活动,而中医药防治肿瘤具有多环节、多途径、多靶点的特点,因此,中医药的作用机制可能通过干预外泌体介入肿瘤诊疗的各个环节^[21]。中医研究着眼于脏腑功能的整体变化,而细胞和组织分子亦是一个动态演变的过程,外泌体产生异常的蛋白质、分子等靶基因,提示人体内部微环境的动态变化,从而出现不同的症状和体征。因此将外泌体与中医药相结合,未来可从新的微观角度揭示中医辨证论治肿瘤的机制^[22-25]。ZYHT是课题组所在学科基于中医“从痰论治胃癌”的理论所创制的针对晚期胃癌的基础方,该方以百合为君,用之益胃扶正、化痰祛邪;制半夏为臣,降气和胃、燥湿化痰;佐以白花蛇舌草清热解毒利湿。前期临床观察发现,其联合化疗可明显改善胃癌患者生活质量,延长其生存期。本研究显示ZYHT可抑制胃癌细胞的侵袭和迁移,其机制与抗胃癌血管新生有关。本研究将ZYHT作用于肿瘤细胞,结果显示随着ZYHT药物剂量的增加,其调控外泌体抑制HUVECs的管样分化的作用增强,并且这种作用是随着外泌体浓度的增加而增强,提示调控肿瘤细胞外泌体分泌的确是ZYHT抗血管生成的内在分子机制之一。可见未来可以外泌体为切入点,更全面地研究中医药防治肿瘤的机制。

参考文献:

[1] 宋尚晋. 滋阴化痰方抑制胃癌转移的作用及其相关分子机制探讨[D]. 上海: 中国人民解放军海军军医大学, 2019.

[2] 赵濛, 刘志红, 李金泉. 外泌体组成特征及其作为细胞通讯和分子标记的生物学作用[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2016, 32(6): 612-619.

[3] CHENG Q, SHI X, HAN M, et al. Reprogramming exosomes as nanoscale controllers of cellular immunity [J]. J Am Chem Soc, 2018, 140(48): 16413-16417.

[4] DI C, ZHANG Q, WANG Y, et al. Exosomes as drug carriers for clinical application [J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2018, 46(sup3): S564-S570.

[5] PARK S J, KIM J M, KIM J, et al. Molecular mechanisms of biogenesis of apoptotic exosome-like vesicles and their roles as damage-associated molecular patterns [J]. PNAS, 2018, 115(50): 11721-11730.

[6] OHYASHIKI J H, UMEZU T, OHYASHIKI K. Exosomes promote bone marrow angiogenesis in hematologic neoplasia [J]. Curr Opin Hematol, 2016, 23(3): 268-273.

[7] 郭健民, 陈熙, 邹军, 等. 肿瘤细胞外泌体对肿瘤血管新生的调控作用[J]. 中国细胞生物学学报, 2019, 41(2): 297-303.

[8] 林锋, 钱海利. Exosome在肿瘤发展中的研究进展[J]. 癌症进展, 2016, 14(8): 725-729.

[9] 褚磊, 王婷婷, 游捷. 外泌体与中医整体观在肿瘤研究中的意义[J]. 河北中医, 2018, 40(11): 1740-1743.

[10] KLEIN J D, WANG X H. Electrically stimulated acupuncture increases renal blood flow through exosome-carried miR-181 [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2018, 315(6): F1542-F1549.

[11] 余嘉惠. LncRNA-ncRuPAR对胃癌的调控机制及滋阴化痰方的干预作用[D]. 上海: 中国人民解放军海军军医大学, 2018.

[12] FAN Q, YANG L, ZHANG X, et al. The emerging role of exosome-derived non-coding RNAs in cancer biology [J]. Cancer Lett, 2018, 414: 107-115.

[13] LUDWIG N, YERNENI S S, RAZZO B M, et al. Exosomes from HNSCC promote angiogenesis through reprogramming of endothelial cells [J]. Mol Cancer Res, 2018, 16(11): 1798-1808.

[14] GAJOS-MICHNIEWICZ A, DUECHLER M, CZYZ M. MiRNA in melanoma-derived exosomes [J]. Cancer Lett, 2014, 347(1): 29-37.

[15] UMEZU T, OHYASHIKI K, KURODA M, et al. Leukemia cell to endothelial cell communication via exosomal miRNAs [J]. Oncogene, 2013, 32(22): 2747-2755.

[16] CHAN Y K, ZHANG H M, LIU P, et al. Proteomic analysis of exosomes from nasopharyngeal carcinoma cell identifies intercellular transfer of angiogenic proteins [J]. Int J Cancer, 2015, 137(8): 1830-1841.

[17] YANG H, ZHANG H, GE S, et al. Exosome-derived miR-130a activates angiogenesis in gastric cancer by targeting C-MYB in vascular endothelial cells [J]. Mol Ther, 2018, 26(10): 2466-2475.

[18] LIU D, LI C, TROJANOWICZ B, et al. CD97 promotion of gastric carcinoma lymphatic metastasis is exosome dependent [J]. Gastric Cancer, 2016, 19(3): 754-766.

[19] 张兆洲, 李琦. 癌毒传舍的中医病机初探[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(11): 4839-4843.

[20] 高兆, 夏猛, Ming-Bo Huang, 等. 外泌体在肿瘤诊断和治疗中的作用研究概况[J]. 辽宁中医杂志, 2018, 45(6): 1332-1335.

[21] 寿崑, 马宇航, 虎力, 等. 外泌体研究在中医学领域的应用及前景[J]. 上海中医药大学学报, 2019, 33(6): 38-43.

[22] 张培彤, 于明薇, 杨宗艳, 等. 中晚期非小细胞肺癌中西医结合疗效评价方法比较研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2010, 30(7): 702-705.

[23] 徐川, 张秋娟. miRNA在中医药防治肿瘤机制研究中的应用前景及意义[J]. 中华中医药学刊, 2016, 34(8): 1819-1822.

[24] 黄黎明, 梁恒. 运用蛋白质组学方法研究肾虚异病同证的思路与方法[J]. 上海中医药杂志, 2005, 39(5): 44-46.

[25] ALVAREZ M L, KHOSROHEIDARI M, KANCHI RAVI R, et al. Comparison of protein, microRNA, and mRNA yields using different methods of urinary exosome isolation for the discovery of kidney disease biomarkers [J]. Kidney Int, 2012, 82(9): 1024-1032.

收稿日期: 2020-07-17

作者简介: 李晶晶(1984-), 女, 新疆伊宁人, 硕士研究生, 主治医师, 研究方向: 中医治疗消化系统疾病。

通信作者: 岳小强(1974-), 男, 山东青岛人, 医学博士, 副教授, 副主任医师, 研究方向: 中医治疗肿瘤消化系统疾病。

E-mail: xqyue@smmu.edu.cn

编辑: 李艳