

## 从乳腺癌微环境外泌体串扰角度探讨疏肝益肾方对他莫昔芬耐药细胞株的影响

崔莎莎, 卢雯平\*

(中国中医科学院广安门医院, 北京 100053)

**[摘要]** 目的:探讨疏肝益肾方(SGYS)通过干预乳腺癌微环境中外泌体的串扰对他莫昔芬(TAM)耐药细胞株LCC9的影响。方法:分别制备空白组,TAM( $2\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ )组,SGYS( $113.2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ )组,联合组共4组含药血清;采用超速离心法提取LCC9细胞的外泌体,并应用透射电子显微镜、纳米粒子追踪技术及蛋白免疫印迹法(Western blot)对其进行鉴定。然后将收集的LCC9外泌体(LCC9-EXO)与骨髓间充质干细胞(BMMSCs)共培养,在共培养体系中分别加入10%的上述4组含药血清。共培养48 h后,提取BMMSCs的外泌体(BMMSCs-EXO),与LCC9细胞进一步孵育。应用荧光显微镜观察细胞对外泌体的摄取情况,细胞增殖与活性检测试剂盒(CCK-8)法检测各组含药血清对LCC9细胞增殖的影响,流式细胞仪分析各组含药血清对LCC9细胞凋亡的影响,Transwell观察各组含药血清对LCC9细胞迁移的影响,Western blot检测各组CD24,CD44,人类表皮生长因子受体2(HER2),雌激素受体 $\alpha$ (ER $\alpha$ )蛋白的表达。结果:荧光显微镜观察到LCC9-EXO可以被BMMSCs成功摄取,且BMMSCs-EXO可以被LCC9细胞成功摄取;CCK-8检测细胞增殖结果显示,与TAM组相比,SGYS组和联合组的细胞增殖能力在各时间段均明显降低( $P<0.05$ ),联合组较SGYS组降低更明显( $P<0.05$ );流式细胞仪检测凋亡结果显示,与TAM组相比,SGYS组和联合组的细胞凋亡水平明显升高( $P<0.05$ );Transwell迁移结果显示,与TAM组相比,SGYS组与联合组的细胞迁移能力明显降低( $P<0.05$ )。Western blot结果显示,与TAM组相比,SGYS组与联合组的ER $\alpha$ 和CD24表达量均明显上调( $P<0.05$ ),HER2和CD44的表达量均明显下调( $P<0.05$ ),且联合组对蛋白表达量的影响优于SGYS组( $P<0.05$ )。结论:SGYS通过干预BMMSCs-EXO与LCC9-EXO串扰,从而逆转LCC9细胞的TAM耐药性。

**[关键词]** 疏肝益肾方; 乳腺癌; 他莫昔芬耐药; 微环境; 外泌体; 肿瘤干细胞; 骨髓间充质干细胞

**[中图分类号]** R22;R242;R285.5;R2-031;R979.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)20-0072-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20212092

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210902.1004.002.html>

**[网络出版日期]** 2021-09-02 10:28

### Effect of Shugan Yishen Prescription on Tamoxifen-resistant Cell Line from Exosome-mediated Crosstalk in Breast Cancer Microenvironment

CUI Sha-sha, LU Wen-ping\*

(Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the effect of Shugan Yishen prescription(SGYS) on the tamoxifen (TAM) -resistant cell line LCC9 by the intervention of exosome-mediated crosstalk in the breast cancer microenvironment. **Method:** Four groups of serum were set up, specifically, a blank group, a TAM ( $2\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ) group, an SGYS ( $113.2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ) group, and a combination group. The exosomes of LCC9 cells were extracted by ultracentrifugation and identified by transmission electron microscopy (TEM), nanoparticle tracking analysis (NTA), and Western blot. Then the collected LCC9 exosomes (LCC9-EXO) were co-cultured with bone marrow mesenchymal stem cells(BMMSCs), and 10% of the above four groups of serum

**[收稿日期]** 20210509(008)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81973839)

**[第一作者]** 崔莎莎,硕士,从事乳腺及妇科恶性肿瘤的中西医结合治疗研究,E-mail:1164726207@qq.com

**[通信作者]** \*卢雯平,博士,主任医师,博士生导师,从事乳腺及妇科恶性肿瘤的中西医结合治疗研究,E-mail:lu\_wenping@sina.com

were added to the co-culture system. After 48 hours of co-culture, the exosomes of BMMSCs (BMMSCs-EXO) were extracted and incubated with LCC9 cells. Fluorescence microscope was used to observe the uptake of exosomes by cells. Cell counting kit-8 (CCK-8) assay, flow cytometry, and Transwell assay were used to detect the effects of drug-containing serum in the four groups on the proliferation, apoptosis, and migration of LCC9 cells. Western blot was used to detect the protein expression of CD24, CD44, human epidermal growth factor 2 (HER2), and estrogen receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) in each group. **Result:** Fluorescence microscope observed that LCC9-EXO could be taken up by BMMSCs, and BMMSCs-EXO could be taken up by LCC9 cells. CCK-8 assay revealed that compared with the TAM group, the SGYS group and the combination group showed reduced cell proliferation ability at each period ( $P<0.05$ ), especially the combination group, but no statistically significant difference between the SGYS group and the combination group was observed ( $P<0.05$ ). Flow cytometry revealed that compared with the TAM group, the SGYS group and the combination group showed increased levels of apoptosis ( $P<0.05$ ). Transwell assay revealed that compared with the TAM group, the SGYS group and the combination group showed decreased cell migration ability ( $P<0.05$ ). Western blot revealed that compared with the TAM group, the SGYS group and the combination group showed up-regulated expression of ER $\alpha$  and CD24 ( $P<0.05$ ), and down-regulated expression of HER2 and CD44 ( $P<0.05$ ). The effect of the combination group on protein expression was superior to that of the SGYS group ( $P<0.05$ ). **Conclusion:** SGYS reverses the TAM resistance of LCC9 cells by interfering with the crosstalk between BMMSCs-EXO and LCC9-EXO.

**[Keywords]** Shugan Yishen prescription; breast cancer; tamoxifen resistance; microenvironment; exosomes; cancer stem cells; bone marrow mesenchymal stem cells

近年来,乳腺癌发病率一直居女性恶性肿瘤发病率之首。2020年全球最新癌症数据显示,2020年全球新增癌症病例约1 930万,新增病例60%来自于最常见的10种肿瘤,其中女性乳腺癌在数量上已经首次超越了肺癌,成为全球新诊断人数最多的癌症<sup>[1]</sup>。在乳腺癌分子分型中,雌激素受体(ER)阳性者占70%左右,内分泌治疗是其主要的治疗方式,他莫昔芬(TAM)是最有效的内分泌药物之一。约有1/3的患者对TAM治疗原发耐药,大多数对TAM敏感的患者经过一段时间的治疗后会出现继发性耐药<sup>[2]</sup>,TAM耐药是乳腺癌临床治疗中面临的重大挑战,因此探讨逆转TAM耐药的有效方法将具有十分重要的意义。

很多学者针对TAM耐药信号通路已做了大量研究,但源于耐药信号通路复杂性及对耐药机制的理解碎片化,虽有相应的药物进入临床,很快又出现新的耐药。故有必要将这些因子整合到一个有凝聚力的机制平台上。研究表明乳腺癌干细胞(BCSCs)在TAM耐药中发挥中轴作用,可以整合分散而复杂的耐药信号通路,其稳态平衡的破坏可诱发TAM耐药<sup>[3]</sup>。在BCSCs被认可在TAM耐药发挥重要作用之前,ER,核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)和磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR),周期蛋白依赖性激酶

(CDK)4/6等信号通路已被证实是引起TAM耐药的主要机制,同时研究也支持这些因子可能通过调节BCSCs促进对TAM的耐药<sup>[4-5]</sup>。外泌体是由细胞分泌的直径为30~150 nm的小囊泡,具有典型脂质双分子层结构,其包含多种生物活性蛋白,脂质,DNA和miRNA等并通过运输这些功能物质在细胞通讯中充当介质<sup>[6-7]</sup>。外泌体作为细胞之间信息传递的载体,在肿瘤微环境中调控乳腺癌干细胞动态变化<sup>[8]</sup>。骨髓间充质干细胞(BMMSCs)来源的外泌体(BMMSCs-EXO)和乳腺癌细胞(BCCs)来源的外泌体(BCCs-EXO)交互作用可以改变肿瘤微环境,增加肿瘤异质性从而影响乳腺癌细胞中非干细胞与干细胞的转化<sup>[9]</sup>。故课题组提出假设,BMMSCs-EXO与BCCs-EXO串扰,破坏了微环境中BCSCs的稳态,诱导TAM耐药。影响BMMSCs-EXO与BCCs-EXO间的串扰可能会逆转TAM耐药。

中药在逆转乳腺癌耐药方面有显著效果,疏肝益肾方(SGYS)是导师在逍遥散合理冲汤基础上,形成的治疗ER阳性乳腺癌的临床有效方剂,课题组前期实验研究也证实其能够抑制多个TAM相关的耐药信号通路。本研究拟探讨BMMSCs-EXO与BCCs-EXO的相互串扰作用在乳腺癌耐药中的影响及SGYS对其的调控,为SGYS的临床应用提供新的科学依据。

## 1 材料

**1.1 细胞株** LCC9细胞株由Georgetown University Medical Center的Clarke教授赠予;人骨髓间充质干细胞BMMSCs购自赛业生物科技有限公司,货号HUXMA-01001。

**1.2 动物** SPF级SD雌性大鼠40只,12周龄,体重(190±10)g,购自上海杰思捷实验动物有限公司,合格证号SCXK(沪)2018-0004。于上海懿贝瑞生物有限公司动物中心饲养,所有操作均严格按照中国中医科学院广安门医院伦理委员会有关动物研究指导原则进行。

**1.3 药物** SGYS由紫草、海藻、青蒿、浙贝、鳖甲、山慈菇、皂角刺、白花蛇舌草、骨碎补、炒酸枣仁、川芎、炙南星、白蒺藜、青皮、黄芪、生白术、鲜龙葵、郁金、半枝莲组成。中药均购自中国中医科学院广安门医院,经陈雯主管药师鉴定,符合2015年版《中华人民共和国药典》规定,由其煎药房煎制,浓缩至生药含量 $5.66\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,冷却后置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。枸橼酸他莫西芬片(TAM,10 mg/片,扬子江药业集团有限公司,国药准字H32021472),取30 mg研磨后用生理盐水300 mL稀释,配置质量浓度为 $0.1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

**1.4 试剂** 高糖DMEM,胎牛血清(Hyclone公司,批号分别为SH30022.01B,SH30396.02);牛胰岛素,4-羟基他莫昔芬,PKH26染色试剂盒,PKH67染色试剂盒,2%磷钨酸(美国Sigma公司,批号分别为I1882,H7904-5MG,MINI26,MINI67,HT152);细胞增殖与活性检测-8(CCK-8)试剂盒(日本东仁公司,批号CK04);AV/碘化丙烯(PI)试剂盒(美国BD公司,批号556547);结晶紫(索莱宝公司,批号G1062);多聚甲醛(上海Biosharp公司,批号BL539A);BCA蛋白定量试剂盒(美国Thermo公司,批号23227);CD9抗体(美国R&D公司,批号MAB25292);CD63抗体(武汉ABclonal公司,批号A5271);肿瘤易感基因101(TSG101),CD24,CD44,雌激素受体 $\alpha$ (ER $\alpha$ ),人类表皮生长因子受体2(HER2)抗体(美国Abcam公司,批号分别为ab125011, ab179821, ab157107, ab108398, abs131654); $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)抗体(美国Proteintech公司,批号66009-1-Ig);辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗鼠二抗,HRP标记山羊抗兔二抗(Beyotime公司,批号分别为A0216,A0208)。

**1.5 仪器** MCO-18AC型CO<sub>2</sub>细胞培养箱(日本Sanyo公司);26616型超高速离心机(美国Thermo

Fisher公司);Centrifuge 5424R型普通离心机(德国Eppendorf公司);ECLIPSE Ts2型普通光学显微镜,TS 100型荧光显微镜(日本Nikon公司);HT-7800型透射电子显微镜(日本Hitachi公司);Nanotracc wave II型纳米粒度分析仪(美国Microtrac公司);ChemiDoc型化学发光成像仪,PowerPac™型高压电泳仪(美国Bio-Rad公司);ELx808型全自动酶标检测仪(美国Biotek公司);NovoCyte型流式细胞仪(美国ACEA公司)。

## 2 方法

**2.1 大鼠含药血清制备** 将40只SD大鼠随机分为4组,每组10只,分别为空白组,TAM组,SGYS组,联合组。课题组前期研究结果显示SGYS等效剂量的4倍对LCC9细胞的增殖抑制作用最显著,按照人(70 kg)与大鼠(200 g)等效剂量的换算系数为7计算各组药物灌胃量。空白组大鼠给予生理盐水 $20\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ,TAM组给予TAM溶液 $2\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ,SGYS组给予SGYS水煎剂 $113.2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ,联合组给予SGYS水煎剂+TAM溶液(剂量同前,间隔30 min),灌胃量均为 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,每日2次,共3 d。于末次灌胃后1 h,进行腹主动脉取血, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , $3\ 500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min(离心半径13.5 cm)制备血清, $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴灭活30 min, $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 无菌滤器过滤分装后, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

### 2.2 细胞培养

**2.2.1 LCC9细胞株培养** 用高糖DMEM培养液(含10%胎牛血清+ $0.01\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 牛胰岛素+ $10^{-7}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TAM溶液)置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养,根据细胞生长状态进行换液或传代。待细胞长至培养瓶底的50%时,改用无外泌体血清的培养基继续培养48 h,收集细胞上清以备体外分泌体,将其细胞消化传代放入培养箱中继续培养。

**2.2.2 人源BMMSC培养** 用专用培养基(含10%专用胎牛血清+1%青-链霉素+1%谷氨酰胺)在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,5% CO<sub>2</sub>条件下培养。根据细胞生长状态进行换液或传代。

**2.2.3 分组干预** 用含无外泌体血清的培养基培养BMMSCs,待其贴壁生长融合至培养瓶底的50%时,换液,加入LCC9外泌体共同孵育,在共培养体系中分别加入上述4组10%含药血清,48 h后收集4组细胞上清分别提取BMMSCs外泌体。

**2.3 外泌体的提取** 将收集的LCC9细胞上清液及4组BMMSCs上清液用超速离心法提取外泌体。以 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , $500\times\text{g}$ 离心5 min,收集细胞上清转移至新的

50 mL离心管;然后以4℃,2 000×g离心30 min,再次收集上清液;之后以4℃,1万×g离心60 min,收集上清用0.22 μm无菌滤器过滤,最后将过滤后的上清液移入超高速离心管中,以4℃,12万×g,70 min超高速离心,管壁沉淀附着即为外泌体。小心去除上清液,用200 μL无菌磷酸盐缓冲液(PBS)溶解沉淀,收集重悬液并分装保存。

## 2.4 外泌体的鉴定

### 2.4.1 透射电子显微镜(TEM)观察外泌体形态

取外泌体溶液10 μL滴加于载样铜网上,室温静置10 min;用滤纸轻轻从侧面吸去多余的液体,然后往铜网上滴加2%磷钨酸溶液10 μL,室温负染1 min;小心用滤纸吸去多余的染色液,并于室温下晾干铜网;TEM下观察外泌体形态。

### 2.4.2 纳米粒子追踪技术(NTA)检测外泌体粒径

用PBS将外泌体混悬液稀释至合适的浓度,行粒径检测,具体由上海懿贝瑞生物有限公司测定。

### 2.4.3 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测外泌体标志蛋白

将所提取外泌体混悬液根据BCA法定量后加入5×蛋白上样缓冲液,干锅浴中煮沸变性,上样进行凝胶电泳,转膜(0.22 μm PVDF膜,4℃,220 mA转膜60 min),牛奶封闭1 h,将封闭液洗净后加一抗CD9(1:500),CD63(1:1 000),TSG101(1:1 500)4℃过夜。次日用TBST洗脱3次,每次15 min,加二抗(1:3 000)并在摇床上室温孵育1 h,回收二抗后再予TBST清洗3次,每次15 min。最后将ECL发光液A液和B液在离心管中按体积1:1混合后使用,使其与蛋白条带充分接触孵育后,于自动化学发光成像仪中显影曝光。

## 2.5 细胞对外泌体的摄取

①用6孔板培养细胞,待细胞贴壁生长融合至50%时,进行换液;②准备外泌体,取外泌体20 μg,重悬于稀释液C 1 mL中;③制备PKH26/PKH67染料,将PKH26/PKH67染料5 μL加入的稀释液C 1 mL中,制备染料;④外泌体标记,将外泌体1 mL与染料溶液1 mL混合染色5 min,加入等量的纯血清2 mL以结合多余的染料终止染色。用PBS稀释PKH26/PKH67标记的外泌体,在12万×g,4℃下超速离心70 min,并在PBS中洗涤2次,用PBS重悬外泌体;⑤细胞与外泌体共培养,将PKH26/PKH67染料标记的外泌体加入3个孔的细胞培养液中,另外3个孔加入与外泌体等量的PBS作为对照,放入培养箱中共同孵育48 h,然后用PBS清洗3遍;⑥制备Hoechst染料,将Hoechst 30 μL用PBS稀释至3 mL,每孔加500 μL,放入培养

箱中孵育10 min;⑦染料孵育结束后,用PBS洗3遍,加入适量培养基,用荧光显微镜观察细胞摄取外泌体的情况并拍照。

## 2.6 CCK-8法观察各组LCC9细胞的增殖情况

采用6孔板培养LCC9细胞,待其贴壁后弃去旧培养液,分别更换为含上述4组BMMSCs外泌体的培养基培养48 h,标记为空白组,TAM组,SGYS组,联合组。然后分别将各组LCC9细胞消化重悬,以 $1 \times 10^4$ 个/孔接种于96孔板中,每组设5个平行孔,3个调零孔,处理后24,48,72 h,分别取出一个96孔板,向每个孔中加入CCK-8溶液10 μL,之后继续将96孔板置于培养箱中培养3 h。最后,在免疫酶标检测仪波长450 nm处测量出各个孔的吸光度A,并根据公式计算出各组细胞增殖率。

## 2.7 流式细胞仪检测各组LCC9细胞的凋亡情况

采用6孔板培养LCC9细胞,待其贴壁后弃去旧培养液,分别更换为含上述4组BMMSCs外泌体的培养基培养48 h,标记为空白组,TAM组,SGYS组,联合组。然后分别将各组LCC9细胞消化重悬,收集在标记好的离心管中,每组4管。在室温下,300×g离心5 min,弃上清,收集细胞。用预冷的PBS洗涤一次,将细胞重悬并计数;取 $1 \times 10^5$ 个重悬的细胞,300×g离心5 min,弃上清,然后用PBS洗涤细胞,离心后弃除上清;加入稀释的1×Annexin V Binding buffer工作液重悬细胞100 μL;细胞悬液中加入Annexin V-FITC 2.5 μL和PI染色液2.5 μL;轻柔晃动混匀后,于室温下避光孵育15~20 min;加入稀释的1×Annexin V Binding buffer 400 μL,混匀样本,立即上机检测。

## 2.8 Transwell实验检测各组LCC9细胞的迁移情况

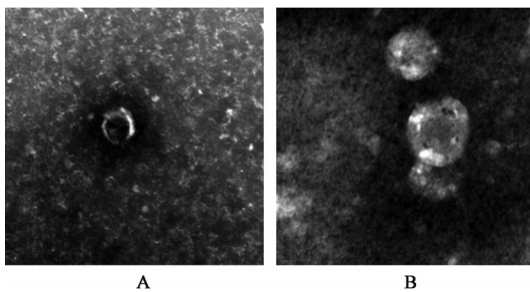
采用6孔板培养LCC9细胞,待其贴壁后弃去旧培养液,分别更换为含上述4组BMMSCs外泌体的培养基培养48 h,标记为空白组,TAM组,SGYS组,联合组,然后分别将各组LCC9细胞用无血清培养基消化重悬。将小室置于24孔板中,小室的下室中加入含20%胎牛血清的完全培养基800 μL,小室中加入充分混匀的细胞悬液200 μL(含 $1 \times 10^5$ 个细胞),放入细胞培养箱中继续培养24 h,每组设3个复孔。培养48 h后取出小室,PBS洗2次,室温下用4%多聚甲醛对细胞进行固定10 min,结晶紫染色15 min。然后用PBS缓慢冲洗掉多余染料,用棉签擦除小室中未迁移的细胞,使用正置光学显微镜100倍下对每组细胞的迁移能力进行观察和拍照,每组分别观察4个视野。

**2.9 Western blot 检测各组 LCC9 细胞中 CD24, CD44, HER2, ER $\alpha$  蛋白的表达** 采用 6 孔板培养 LCC9 细胞,待其贴壁后弃去旧培养液,分别更换为含上述 4 组 BMMSCs 外泌体的培养基培养 48 h,标记为空白组, TAM 组, SGYS 组, 联合组。各组细胞中均加入 RIPA 裂解液裂解,提取各组总蛋白,BCA 法蛋白定量,蛋白上样量均为 20  $\mu$ g 进行凝胶电泳,转膜,封闭,4  $^{\circ}$ C 条件下一抗 CD24(1:1 000), CD44(1:2 000), HER2(1:1 000), ER $\alpha$ (1:1 000) 孵育过夜,室温条件下二抗(1:3 000)孵育 1 h, ECL 化学发光法显色,通过 Image J 软件分析灰度值以得到蛋白相对表达量。

**2.10 统计学方法** 使用 Image J 进行数据采集,应用 GraphPad Prism 8 软件对实验数据进行统计分析,结果均以  $\bar{x} \pm s$  的方式表示,单因素两组间差异统计采用非配对 *t* 检验进行比较分析,多组间差异统计采用 One-way ANOVA 进行比较分析  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 外泌体形态学观察** 可见外泌体呈圆形、椭圆形中间凹陷的膜状结构,是杯状囊泡,直径为 30~150 nm,与典型的外泌体结构一致。见图 1。



A. LCC9 来源的外泌体; B. BMMSC 来源的外泌体

图 1 外泌体 TEM (TEM,  $\times 10$  万)

Fig. 1 TEM of exosomes (TEM,  $\times 10$  万)

**3.2 外泌体粒径检测** NTA 结果显示悬液中粒子大小大多在 100~150 nm, LCC9 来源的外泌体粒径主峰为 149.2 nm, BMMSC 来源的外泌体粒径主峰为 142.7 nm, 均属于外泌体的粒径范围。

**3.3 外泌体相关蛋白的表达** Western blot 检测结果显示,外泌体标志物蛋白 CD9, CD63 和 TSG101 在分离的外泌体中均呈阳性表达。见图 2, 3。

**3.4 细胞对外泌体的摄取** 用 PKH26 红色荧光染料标记 LCC9 来源的外泌体,与 BMMSCs 共培养 48 h, PBS 清洗之后用 Hoechst33342 染色 BMMSCs 细胞核,通过荧光显微镜观察发现,红色荧光为

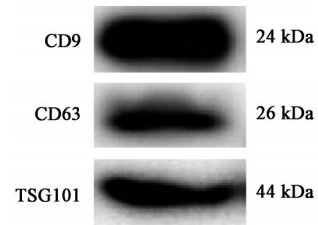
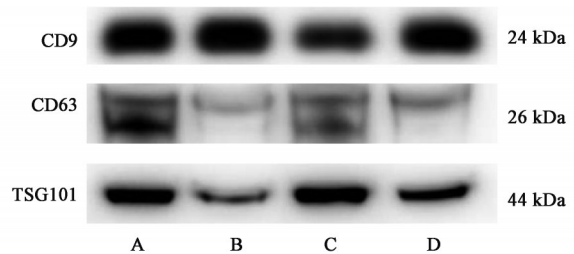


图 2 LCC9 细胞来源外泌体的 CD9, CD63 和 TSG101 蛋白电泳  
Fig. 2 Electrophoresis of CD9, CD63 and TSG101 in exosomes of LCC9 cells



A. 空白组; B. TAM 组; C. SGYS 组; D. 联合组(图 6~7 同)

图 3 BMMSCs 来源外泌体的 CD9, CD63 和 TSG101 蛋白电泳  
Fig. 3 Electrophoresis of CD9, CD63 and TSG101 in exosomes of BMMSCs

PKH26 标记的外泌体的信号,蓝色荧光为 Hoechst33342 标记的细胞核,合成图片中红色荧光信号围绕细胞核分布于核周或核上。说明 LCC9 细胞来源的外泌体可以被 BMMSCs 摄取。见图 4。

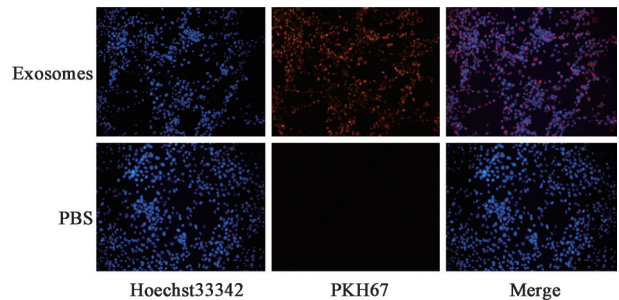


图 4 细胞对 LCC9 来源的外泌体摄取情况(荧光显微镜,  $\times 100$ )

Fig. 4 Uptake of exosomes from LCC9 cells (FM,  $\times 100$ )

用 PKH67 绿色荧光染料标记 BMMSCs 来源的外泌体,与 LCC9 细胞共培养 48 h, PBS 清洗之后用 Hoechst33342 染色 LCC9 细胞核,通过荧光显微镜观察发现,绿色荧光为 PKH67 标记的外泌体的信号,蓝色荧光为 Hoechst33342 标记的细胞核,合成图片中绿色荧光信号围绕细胞核分布于核周或核上。说明 BMMSCs 来源的外泌体可以被耐药细胞 LCC9 摄取。见图 5。

**3.5 SGYS 对 LCC9 细胞增殖的影响** 与空白组比较, TAM 组, SGYS 组和联合组的细胞增殖能力在各时间段均明显降低 ( $P < 0.05$ ), 联合组降低最明显,

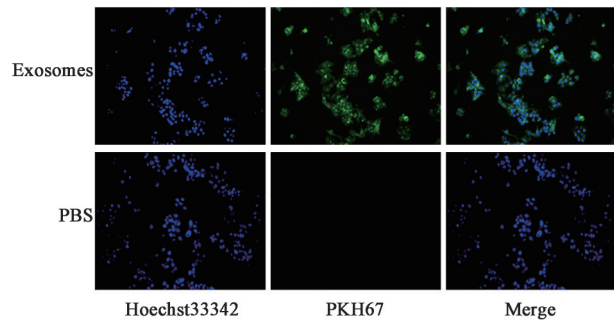


图5 细胞对BMMSCs来源的外泌体摄取情况(荧光显微镜,×100)  
Fig. 5 Uptake of exosomes from BMMSCs(FM,×100)

其次为SGYS组,TAM组。与TAM组比较,SGYS组和联合组的细胞增殖能力在各时间段均明显降低( $P<0.05$ ),联合组更明显。SGYS可以通过干预外泌体串扰抑制LCC9细胞增殖,且可以协同TAM增强药效,发挥逆转TAM耐药性的作用。见表1。

表1 SGYS对各组LCC9细胞增殖率的影响( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

Table 1 Effect of SGYS on proliferation rate of LCC9 cells in each group ( $\bar{x}\pm s, n=5$ ) %

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	24 h	48 h	72 h
TAM	2×10 <sup>-3</sup>	81.00±3.19 <sup>1)</sup>	75.80±5.18 <sup>1)</sup>	74.10±4.29 <sup>1)</sup>
SGYS	113.2	70.20±2.86 <sup>1,2)</sup>	67.60±3.21 <sup>1,2)</sup>	65.90±2.69 <sup>1,2)</sup>
联合	2×10 <sup>-3</sup> +113.2	65.30±1.99 <sup>1,2)</sup>	49.30±1.41 <sup>1,2)</sup>	51.50±2.79 <sup>1,2)</sup>

注:空白组增殖率为100%。与空白组比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ ;与TAM组比较<sup>2)</sup> $P<0.05$ (表2,3同)。

**3.6 SGYS对LCC9细胞凋亡与迁移的影响** 与空白组比较,TAM组,SGYS组和联合组的细胞凋亡水平显著升高( $P<0.05$ );与TAM组比较,SGYS组和联合组的细胞凋亡水平也显著升高( $P<0.05$ ),SGYS可以通过干预外泌体串扰促进LCC9细胞凋亡,且在一定程度上增强了TAM对耐药株LCC9的抗肿瘤作用。

与空白组比较,TAM组,SGYS组与联合组的细胞迁移的数量较少( $P<0.05$ ),且SGYS组与联合组的细胞迁移数明显低于TAM组( $P<0.05$ )。SGYS中药组对细胞迁移的抑制作用较明显,而TAM组对细胞的迁移抑制作用弱,效果不明显,联合SGYS后较单药组进一步增强对LCC9细胞迁移的抑制。见图6,表2。

**3.7 SGYS对LCC9细胞中CD24,CD44,HER2和ERα蛋白表达的影响** 与空白组比较,TAM组的CD24,CD44,HER2与ERα的变化差异均无统计学意义;SGYS组与联合组的ERα和CD24表达量均明显上调( $P<0.05$ ),HER2和CD44的表达量均明显下调( $P<0.05$ ),且对蛋白表达量变化的影响联合组均

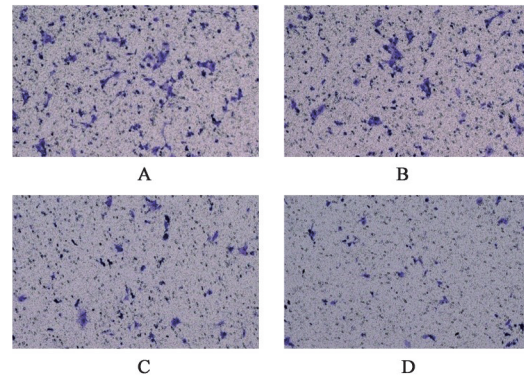


图6 SGYS对各组LCC9细胞迁移能力的影响(光学显微镜,×100)  
Fig. 6 Effect of SGYS on migration ability of LCC9 cells in each group(OM,×100)

表2 SGYS对各组LCC9细胞凋亡和迁移的影响( $\bar{x}\pm s, n=4$ )

Table 2 Effect of SGYS on apoptosis and migration of LCC9 cells in each group ( $\bar{x}\pm s, n=4$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	凋亡率/%	迁移数/个/视野
空白		6.10±0.49	980.00±38.65
TAM	2×10 <sup>-3</sup>	8.10±0.57 <sup>1)</sup>	852.00±83.69 <sup>1)</sup>
SGYS	113.2	12.50±0.36 <sup>1,2)</sup>	642.00±49.16 <sup>1,2)</sup>
联合	2×10 <sup>-3</sup> +113.2	12.20±0.31 <sup>1,2)</sup>	378.50±37.03 <sup>1,2)</sup>

优于SGYS组( $P<0.05$ )。SGYS可以升高TAM耐药细胞株LCC9中ERα和CD24的表达,同时降低HER2和CD44的表达,联合TAM会增强TAM对相关蛋白表达的影响。见图7,表3。

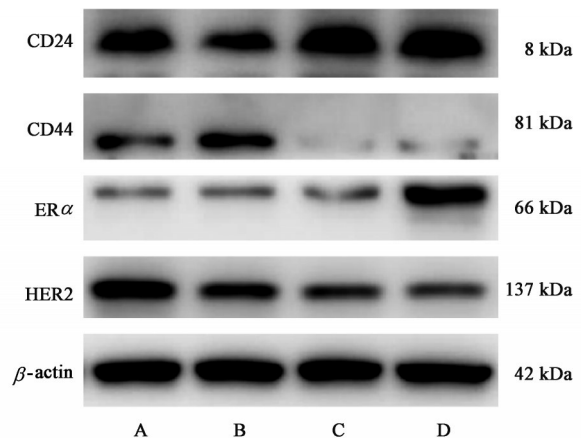


图7 各组LCC9细胞中CD24,CD44,HER2和ERα的蛋白表达电泳

Fig. 7 Electrophoresis of CD24, CD44, HER2 and ERα of LCC9 cells in each group

#### 4 讨论

内分泌治疗是ER阳性乳腺癌患者重要的治疗手段,TAM是最常用的治疗药物,在改善预后方面有显著疗效。然而,部分患者会出现原发性或继发性耐药,这是乳腺癌内分泌治疗中面临的临床难

表3 SGYS对各组LCC9细胞中CD24,CD44,HER2和ER $\alpha$ 蛋白表达的影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 3 Effect of SGYS on protein expression of CD24,CD44,HER2 and ER $\alpha$  in LCC9 cells in each group ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	CD24/ $\beta$ -actin	CD44/ $\beta$ -actin	HER2/ $\beta$ -actin	ER $\alpha$ / $\beta$ -actin
空白		0.70 $\pm$ 0.05	0.70 $\pm$ 0.01	1.00 $\pm$ 0.01	0.20 $\pm$ 0.01
TAM	2 $\times$ 10 <sup>-3</sup>	0.60 $\pm$ 0.08	0.70 $\pm$ 0.01	1.00 $\pm$ 0.02	0.30 $\pm$ 0.01
SGYS	113.2	0.80 $\pm$ 0.01 <sup>1,2)</sup>	0.20 $\pm$ 0.01 <sup>1,2)</sup>	0.50 $\pm$ 0.01 <sup>1,2)</sup>	0.40 $\pm$ 0.01 <sup>1,2)</sup>
联合	2 $\times$ 10 <sup>-3</sup> +113.2	0.90 $\pm$ 0.01 <sup>1,2)</sup>	0.10 $\pm$ 0.00 <sup>1,2)</sup>	0.40 $\pm$ 0.01 <sup>1,2)</sup>	0.90 $\pm$ 0.01 <sup>1,2)</sup>

题,耐药性的产生会导致疾病的复发与进展,从而严重影响了患者的临床获益<sup>[10-11]</sup>。

外泌体是直径约30~150 nm的细胞外囊泡,几乎所有类型的细胞均可分泌,越来越多的研究表明外泌体参与细胞间的信息传递<sup>[12-13]</sup>,在乳腺癌细胞的增殖、转移和耐药中起着重要作用<sup>[14]</sup>。研究表明BMMSCs-EXO与BCCs-EXO交互作用,BCCs-EXO促进肿瘤细胞招募BMMSCs,BMMSCs被由肿瘤细胞衍生的外泌体重新编辑,这种重新编辑的BMMSCs成为外泌体的丰富来源,携带有复杂的分子和基因。已发现这些外泌体通过携带干细胞相关的 $\beta$ -连环蛋白( $\beta$ -catenin),分泌型糖蛋白5(Wnt5),Notch信号蛋白介导诱导上皮-间充质转化(EMT)及干细胞性通路,通过转运干细胞性相关转录因子SOX2和SOX9,可以促进早期乳腺癌的形成及体内肿瘤的生长。BMMSCs-EXO还可以通过诱导MMP-2和ecto-5'-核苷酸酶活性改变肿瘤细胞的功能,从而改变肿瘤微环境和增加肿瘤异质性,进一步促进细胞耐药<sup>[15-19]</sup>。

中医理论认为,乳腺癌的病因有肝郁气滞、充任失调、正气亏虚等,涉及的经络与肝、脾、肾三脏有关,其中冲任失调与机体内雌激素的水平失衡关系密切。冲为血海,任主胞胎,若冲任失调,则会导致气血运行不畅,进而经络受阻而致本病,因此疏肝益肾,调和冲任是乳腺癌的主要治则之一。近年来中药在逆转肿瘤耐药的临床试验和基础实验方面取得较大进展,且疗效显著。SGYS由逍遥散合理冲汤加减而成。逍遥散具疏肝解郁,养血柔肝的功效。理冲汤源自《医学衷中参西录》,为近代名医张锡纯调理冲任之血,治疗癥瘕、积聚、气郁的主方,当代名医朱良春老先生对其倍加推崇,二者合用可攻补兼施,祛邪不伤正,具有疏肝益肾,调理冲任之血功能<sup>[20]</sup>。课题组前期基础研究发现SGYS对LCC9细胞株有抑制作用并可逆转其耐药性<sup>[21]</sup>,本研究从微环境中外泌体串扰的角度进一步研究SGYS逆转耐药的机制。

TAM耐药乳腺癌细胞中干细胞数量高于TAM敏感的细胞,耐药细胞增殖性强,具有更强的迁移能力<sup>[22-23]</sup>,且耐药细胞LCC9高表达HER2蛋白,低表达ER $\alpha$ 蛋白。本研究先采取超高速离心法提取TAM耐药性乳腺癌细胞株LCC9外泌体,收集提取的外泌体干预BMMSCs,干预过程中分别加空白组,TAM组,SGYS组,联合组4组含药血清处理,48 h后收集4组细胞上清分别提取BMMSCs外泌体,再用4组BMMSCs外泌体与LCC9细胞株共培养。荧光显微镜下观察到BMMSCs摄取LCC9外泌体,LCC9细胞株摄取BMMSCs外泌体。通过进一步的实验证明了SGYS组可以抑制LCC9细胞的增殖和迁移,促进LCC9细胞凋亡,升高TAM耐药细胞株LCC9中ER $\alpha$ 和CD24的表达,同时降低HER2和CD44的表达,且联合TAM具有协同增强作用,为SGYS通过干预外泌体串扰,从而逆转LCC9细胞的TAM耐药性提供一定的科学依据。SGYS为中药复方制剂,本课题组下一步将从分子机制及相关信号通路的影响及药物靶标治疗的实现方面进行深层次的研究。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71 (3): 209-249.
- [2] CLARKE R, TYSON J J, DIXON J M. Endocrine resistance in breast cancer-an overview and update [J]. Mol Cell Endocrinol, 2015, 418(3): 220-234.
- [3] SZOSTAKOWSKA M, TRĘBIŃSKA-STRYJEWSKA A, GRZYBOWSKA E A, et al. Resistance to endocrine therapy in breast cancer: molecular mechanisms and future goals [J]. Breast Cancer Res Treat, 2019, 173 (3): 489-497.
- [4] YAMAGUCHI N, NAKAYAMA Y, YAMAGUCHI N. Down-regulation of forkhead box protein A1

- (FOXA1) leads to cancer stem cell-like properties in tamoxifen-resistant breast cancer cells through induction of interleukin-6[J]. *J Biol Chem*, 2017, 292(20):8136-8148.
- [ 5 ] JIN X H, JIA Y S, SHI Y H, et al. ACT001 can prevent and reverse tamoxifen resistance in human breast cancer cell lines by inhibiting NF- $\kappa$ B activation[J]. *J Cell Biochem*, 2018, doi: 10. 1002/jcb. 27146.
- [ 6 ] ROBBINS P, MORELLI A E. Regulation of immune responses by extracellular vesicles [J]. *Nat Rev Immunol*, 2014, 14(3):195-208.
- [ 7 ] BOBRIE A, COLOMBO M, RAPOSO G, et al. Exosome secretion: molecular mechanisms and roles in immune responses[J]. *Traffic*, 2011, 12(12):1659-1668.
- [ 8 ] XU J, LIAO K, ZHOU W. Exosomes regulate the transformation of cancer cells in cancer stem cell homeostasis[J]. *Stem Cells Int*, 2018, doi: 10. 1155/2018/4837370.
- [ 9 ] WHITESIDE T L. Exosome and mesenchymal stem cell cross-talk in the tumor microenvironment [J]. *Semin Immunol*, 2018, 35:69-79.
- [10] ZHANG B, ZHANG X, TANG B, et al. Investigation of elemene-induced reversal of tamoxifen resistance in MCF-7 cells through oestrogen receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) re-expression [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2012, 136(2):399-406.
- [11] OH J H, LEE J Y, KIM K H, et al. Elevated GCN5 expression confers tamoxifen resistance by upregulating AIB1 expression in ER-positive breast cancer[J]. *Cancer Lett*, 2020, 495:145-155.
- [12] COLOMBO M, RAPOSO G, THÉRY C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles[J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2014, 30:255-289.
- [13] TKACH M, THÉRY C. Communication by extracellular vesicles: where we are and where we need to go[J]. *Cell*, 2016, 164(6):1226-1232.
- [14] MUGHEES M, KUMAR K, WAJID S. Exosome vesicle as a nano-therapeutic carrier for breast cancer [J]. *J Drug Target*, 2021, 29(2):121-130.
- [15] JOHNSON S M, DEMPSEY C, CHADWICK A, et al. Metabolic reprogramming of bone marrow stromal cells by leukemic extracellular vesicles in acute lymphoblastic leukemia [J]. *Blood*, 2016, 128(3):453-456.
- [16] YANG Y, BUCAN V, BAEHRE H, et al. Acquisition of new tumor cell properties by MSC-derived exosomes[J]. *Int J Oncol*, 2015, 47(1):244-252.
- [17] MULUHNGWI P, KLINGE C M. Identification of miRNAs as biomarkers for acquired endocrine resistance in breast cancer [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2017, 456:76-86.
- [18] BAO B, AHMAD A, LI Y, et al. Targeting CSCs within the tumor microenvironment for cancer therapy: a potential role of mesenchymal stem cells[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2012, 16(10):1041-1054.
- [19] LOPATINA T, GAI C, DEREGIBUS M C, et al. Cross talk between cancer and mesenchymal stem cells through extracellular vesicles carrying nucleic acids [J]. *Front Oncol*, 2016, 6:125.
- [20] 张秀丽, 马文心, 卢雯平. 基于循环肿瘤DNA观察疏肝益肾方治疗内分泌耐药晚期乳腺癌的临床效果 [J]. *中国医药*, 2020, 15(3):406-409.
- [21] 高雅静. 疏肝益肾方对三苯氧胺耐药乳腺癌的实验研究[D]. 北京:北京中医药大学, 2013.
- [22] GHASEMI F, SARABI P Z, ATHARI S S, et al. Therapeutics strategies against cancer stem cell in breast cancer[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2019, 109:76-81.
- [23] PRASAD S, RAMACHANDRAN S, GUPTA N, et al. Cancer cells stemness: a doorstep to targeted therapy [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2020, 1866(4):165424.

[责任编辑 王鑫]