

健脾消癌方对结肠癌外泌体诱导HFL1活化成CAFs的影响

刘佳琴¹, 罗吉², 李勇敏², 杨晓³, 谭小宁², 罗燕², 吕元², 蒋益兰^{2*}

(1. 湖南中医药大学研究生院, 长沙 410208; 2. 湖南省中医药研究院附属医院, 中医肿瘤学湖南省重点实验室, 抗肿瘤中药创新平台, 长沙 410006; 3. 湖南中医药大学第一附属医院, 长沙 410007)

[摘要] 目的:探讨健脾消癌方对人结肠癌细胞(HCT116)来源外泌体诱导正常人胚肺成纤维细胞(HFL1)向肿瘤相关成纤维细胞(CAFs)活化的影响。方法:以13.1 g·kg⁻¹的健脾消癌方灌胃SD大鼠以制备含药血清,采取超高速离心法分别提取含10%无外泌体血清培养的HCT116细胞外泌体及含20%健脾消癌方含药血清培养的HCT116细胞外泌体,纳米颗粒跟踪分析仪(Zetaview)检测外泌体的粒径分布,蛋白免疫印迹法(Western blot)鉴定外泌体的标志蛋白凋亡转接基因2互作蛋白X(Alix),热休克蛋白70(HSP70),肿瘤易感基因101蛋白(TSG101),荧光显微镜观察HFL1对细胞膜染色试剂盒(PKH67)标记的外泌体的摄取情况;将HFL1细胞分6组:空白组,转化生长因子-β₁(TGF-β₁)组,TGF-β₁联合HCT116外泌体2 mg·L⁻¹组,TGF-β₁联合HCT116外泌体4 mg·L⁻¹组,TGF-β₁联合健脾消癌方外泌体2 mg·L⁻¹组,TGF-β₁联合健脾消癌方外泌体4 mg·L⁻¹组,均干预48 h,Western blot和实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)分别测定α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)蛋白和mRNA的表达水平。结果:Zetaview检测粒径分布主要集中在50~100 nm,结合标志蛋白Alix,HSP70和TSG101的表达证实其为外泌体,HFL1细胞与外泌体共孵育后,荧光显微镜下可看到大量外泌体被HFL1细胞所摄取;与空白组比较,TGF-β₁组和TGF-β₁联合HCT116外泌体组的α-SMA蛋白及mRNA表达水平升高(P<0.05);与TGF-β₁联合HCT116外泌体组比较,TGF-β₁联合健脾消癌方外泌体组的α-SMA蛋白及mRNA水平下降(P<0.01)。结论:人结肠癌细胞外泌体联合TGF-β₁可诱导HFL1活化成CAFs,健脾消癌方可通过影响α-SMA的表达水平而降低HFL1的活化能力从而达到拮抗结肠癌转移的作用。

[关键词] 结肠癌; 外泌体; 正常人胚肺成纤维细胞; 肿瘤相关成纤维细胞; α-平滑肌肌动蛋白; 健脾消癌方

[中图分类号] R22;R242;R2-031;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)22-0040-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20201985

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200724.1613.014.html>

[网络出版日期] 2020-7-24 17:00

Effect of Jianpi Xiaoi Prescription on Activation of HFL1 into CAFs Induced by Exosomes in Colon Cancer

LIU Jia-qin¹, LUO Ji², LI Yong-min², YANG Xiao³, TAN Xiao-ning², LUO Yan²,
LYU Yuan², JIANG Yi-lan^{2*}

(1. Graduate School, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China;
2. Hunan Key Laboratory of Chinese Medicine Oncology, Innovative Platform of Antitumor Chinese Drugs, Hunan Academy of Traditional Chinese Medicine Affiliated Hospital, Changsha 410006, China;
3. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Jianpi Xiaoi prescription on the activation of normal human embryonic lung fibroblasts (HFL1) into tumor-associated fibroblasts (CAF) induced by human colon cancer cells (HCT116) derived exosomes. **Method:** SD rats were gavaged with 13.1 g·kg⁻¹ of Jianpi Xiaoi

[收稿日期] 20200408(002)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81774287);中央引导地方科技发展专项(2017CT5029);湖南省科技创新计划项目(2017SK50403);湖南中医药大学研究生培养质量工程项目(2019CX10)

[第一作者] 刘佳琴,博士,医师,从事恶性肿瘤的中西医结合防治研究,E-mail:776947093@qq.com

[通信作者] *蒋益兰,博士生导师,主任医师,从事肿瘤病中西医结合防治方法和规律研究,E-mail:tianshangren624@163.com

prescription to prepare drug-containing serum, and HCT116 cell exosomes-containing 10% exosomes-free serum and 20% Jianpi Xiaoi prescription drug serum were isolated by ultra-high speed centrifugation. The particle size distribution of exosomes were detected by Nanoparticle tracking analyzer (Zetaview), and the exosomes' marker proteins apoptotic transfer gene 2 interaction protein X (Alix), heat shock protein 70 (HSP70), and tumor-susceptibility gene 101 (TSG101) were identified by Western blot, and the uptake of exosomes labeled with cell membrane staining kit (PKH67) by HFL1 was observed by fluorescence microscope. HFL1 cells were divided into six groups: the blank group, the transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) group, the TGF- β_1 combined with HCT116 exosomes of $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ group, the TGF- β_1 combined with HCT116 exosomes of $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ group, the TGF- β_1 combined with Jianpi Xiaoi prescription exosomes of $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ group, and the TGF- β_1 combined with Jianpi Xiaoi prescription exosomes of $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ group, and all groups were cultivated for 48 h. Western blot and Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) were used to determine the protein and mRNA expressions of α -smooth muscle actin (α -SMA). **Result:** The particle size distribution detected by Zetaview was mainly between 50-100 nm, and the exosomes were verified based on the expressions of marker proteins Alix, HSP70 and TSG101. After co-incubation of HFL1 cells with exosomes, a large number of exosomes were absorbed by HFL1 cells under fluorescence microscope. Compared with the blank control group, the protein and mRNA expressions of α -SMA in the TGF- β_1 group and TGF- β_1 combined with HCT116 exosome groups were increased ($P < 0.01$). Compared with the TGF- β_1 combined with HCT116 exosome groups, the protein and mRNA expressions of α -SMA were decreased in the TGF- β_1 combined with Jianpi Xiaoi prescription exosome groups ($P < 0.01$). **Conclusion:** Human colon cancer cell exosomes combined with TGF- β_1 can induce the activation of HFL1 into CAFs, and Jianpi Xiaoi prescription can reduce the activation of HFL1 by affecting the expressions of α -SMA, thus antagonizing the lung metastasis of colon cancer.

[Key words] colorectal cancer; exosomes; normal embryonic lung fibroblasts; cancer associated fibroblasts; α -smooth muscle actin (α -SMA); Jianpi Xiaoi prescription

大肠癌目前是全球常见的恶性肿瘤,有研究表明约12.5%的患者存在远处转移^[1],其中肺脏是最常见的转移部位之一,但结直肠癌肺转移的机制有待进一步阐明。肿瘤相关成纤维细胞(CAFs)作为肿瘤微环境中最主要的间质细胞,在肿瘤发展的不同阶段均发挥着重要作用, α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA),血小板源性生长因子受体(PDGFR)及成纤维细胞激活蛋白(FAP)等作为CAFs特异性表达的蛋白标志物^[2]。正常组织中的成纤维细胞常处于静息状态,但在肿瘤的发生发展过程中,常被活化成为CAFs,但其活化的分子机制尚不明确。有研究表明结肠癌^[3]、卵巢癌^[4]、乳腺癌^[5]外泌体可诱导CAFs的活化,但结肠癌外泌体能否诱导正常人胚肺成纤维细胞活化成CAFs暂未见报道,有研究表明转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)能够促进正常成纤维细胞(NFs)向CAFs转化,但目前其在结直肠癌肺转移中的机制研究较少。

本课题组基于长期临床实践,依据中医“虚瘀毒”理论治疗结直肠癌,组方“健脾消癌方”,获得了

较好的临床疗效^[6-7],并从肿瘤细胞增殖、凋亡、侵袭转移、血管生成等多个环节证明健脾消癌方拮抗结直肠癌复发转移的效应机制^[8-10]。结合中药抗肿瘤具有多靶点、多途径的特点,本研究拟从肿瘤来源外泌体着手,从体外研究结肠癌细胞来源的外泌体对人胚肺成纤维细胞活化的影响以及健脾消癌方的干预研究,以期为拮抗结肠癌肺转移的治疗提供新靶点和新思路。

1 材料

1.1 动物和细胞系 SPF级SD大鼠50只,雌雄各半,体质量(200 ± 20)g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,合格证号SCXK(湘)2019-0004,动物实验符合湖南省中医药研究院实验动物伦理委员会规定(批号2019-0034)。人结肠癌细胞株(HCT116)(目录号TCHu 99)及正常人胚肺成纤维细胞株(HFL1)(目录号GNHu28)均购自上海中科院细胞库,传至第5代。

1.2 药物 健脾消癌方组成:人参片15g,薏苡仁30g,淫羊藿10g,枳壳6g,白花蛇舌草30g,重楼

10 g, 藤梨根 15 g, 郁金 15 g。药材均取道地药材, 购自湖南省中医药研究院中药房, 由湖南省中医药研究院附属医院田其学主任药师鉴定为正品。煎煮方法: 上述 2 倍处方剂量, 加入冷水浸泡 30 min, 以水量没过药物 3~5 cm 为宜, 先以武火煮沸后再改文火煎煮 20~30 min 后保存药液; 药渣按照上述煎煮方法继续煎煮 1 次, 合并 2 次药液后过滤、去沉淀, 再继续浓缩成相当于生药 $1.5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 冷却后于 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷藏备用。

1.3 试剂 普通 FBS(美国 Gibco 公司, 批号 U-02G181206-E-1141); 无外泌体血清(上海素尔生物有限公司, 批号 SUER050QY); DMEM 高糖培养基(美国 Hyclone 公司, 批号 8119226); F12K 培养基, PKH67 染色试剂盒(美国 Sigma 公司, 批号分别为 SLBS9200, MKBZ0604V); Alix, HSP70, TSG101, α -SMA 抗体(美国 Abcam 公司, 批号分别为 ab186249, ab181606, ab125011, ab32575); β -肌动蛋白(β -actin)抗体, rh TGF- β_1 (美国 Proteintech 公司, 批号分别为 66009-1-Ig, 1218209F0319); BCA Protein Assay Kit(美国 Thermo 公司, 批号 SF249041); 逆转录试剂盒(日本 Takara 公司, 批号 AJ12456A); TB GreenTM Premix Ex TaqTM II (Tli RNaseH Plus) RT-PCR 试剂盒(美国 ABI 公司, 批号 A1A1169); trizol 试剂(美国 Ambion 公司, 批号 AH97191A)。

1.4 仪器 3141 型细胞培养箱(美国 Thermo Fisher 公司); G:BOX ChemiXRQ 型化学发光成像系统(美国 Syngene 公司); powerpac 型电泳仪, Mini Trans-Blot C 型转膜仪(美国 Bio-Rad 公司); CKX53 型倒置相差荧光显微镜(日本奥林巴斯公司); 微量核酸蛋白浓度分析仪(英国 BioDrop 公司); Optima-XE-100 型超速离心机[贝克曼库尔特商贸(中国)有限公司]; FAST480 II 型实时荧光定量 PCR 仪(美国 Roche 公司)。

2 方法

2.1 健脾消癌方含药血清的制备 SD 大鼠随机分成正常组和含药血清组, 正常组 20 只, 含药血清组 30 只。含药血清组按 70 kg 成年人 $131 \text{ g} \cdot \text{d}^{-1}$ 的等效剂量, 即 $13.1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃^[11]; 正常组据其体质量灌服等容积生理盐水。每天灌胃 1 次, 持续 7 d, 于末日灌胃给药后 1 h, 以 10% 水合氯醛按 $3.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 体质量腹腔麻醉大鼠, 腹主动脉采血, 冰箱冷藏静置过夜后以 $4\ 500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 收集上层血清, 无菌条件下合并同组血清, 以 $0.22 \text{ }\mu\text{m}$ 无菌滤膜过滤,

分装保存于 $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱。

2.2 细胞培养

2.2.1 人结肠癌细胞 HCT116 细胞株培养 采用含 10% 胎牛血清+1% 青链霉素的 DMEM 高糖培养基, 根据细胞生长情况适时进行胰酶消化后传代, 待细胞贴壁, 约铺满培养瓶底 40% 时, 更换为含 10% 无外泌体血清的 DMEM 高糖培养基或含 20% 健脾消癌方含药血清的 DMEM 高糖培养基培养 48 h, 分别收集细胞上清以备提外泌体, 其细胞予消化传代, 于 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 饱和湿度的培养箱中培养。

2.2.2 人胚肺成纤维细胞 HFL1(简称 HFL1)的培养 采用含 10% 胎牛血清+1% 青、链霉素的 F12K 培养基培养, 待细胞汇合度达 70%~80% 时, 予无血清 F12K 培养基饥饿培养 48 h 以洗脱胎牛血清中外泌体对细胞转化的影响, 弃原培养基, 加入含 10% 无外泌体血清的 F12K 培养基, 同时加入不同外泌体的不同浓度干预 HFL1 细胞 48 h, 培养条件为 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 饱和湿度。

2.2.3 HFL1 细胞分组 本实验中 HFL1 细胞分 6 组: 无外泌体血清培养组(简称空白组), TGF- β_1 干预组(简称 TGF- β_1 组), TGF- β_1 联合 HCT116 外泌体 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组, TGF- β_1 联合 HCT116 外泌体 $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组, TGF- β_1 联合健脾消癌方外泌体 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组, TGF- β_1 联合健脾消癌方外泌体 $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组。分组干预过程中均使用含无外泌体血清的培养基培养。本实验 rh TGF- β_1 选择的质量浓度为 $10 \text{ }\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[12]。

2.3 HCT116 外泌体的提取与鉴定

2.3.1 细胞上清外泌体的提取 将收集的含 10% 无外泌体血清培养的 HCT116 细胞上清及含 20% 健脾消癌方含药血清培养的 HCT116 细胞上清采取超高速离心法提取外泌体(分别简称为 HCT116 外泌体, 健脾消癌方外泌体): $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 的环境下先后予 $300 \times g$ 离心 10 min, 取上清, 再以 $2\ 000 \times g$ 离心 20 min, 取上清, 再以 $1 \text{ 万} \times g$ 离心 30 min, 取上清, 再以贝克曼超速离心机 Type32 Ti 转子以 $10 \text{ 万} \times g$ 离心 90 min, 弃上清, 留取下层沉淀, 再以无菌 PBS 溶液 6.5 mL 重悬沉淀, 混匀后再以贝克曼超速离心机 Type90 Ti 转子以 $10 \text{ 万} \times g$ 离心 90 min, 弃上清, 最后分别予无菌 PBS 溶液 $500 \text{ }\mu\text{L}$ 重悬沉淀即得外泌体混悬液, 进行分装, 各取适量外泌体混悬液以 BCA 法定量, 余保存于 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱。

2.3.2 外泌体的鉴定 外泌体混悬液以 PBS 稀释至合适浓度, 再予 Zetaview 行粒径检测, 具体由上海道鹏生物有限公司测定。Western blot 检测标志

蛋白具体步骤:外泌体样品根据BCA定量结果加入6×蛋白上样缓冲液,金属浴中煮沸变性,均以蛋白总量20 μg进行点样,凝胶电泳,转膜(0.22 μm PVDF膜,4 °C,350 mA转膜90 min),5%封闭液封闭2 h,封闭后加一抗(Alix 1:8 000, HSP70 1:1 000, TSG101 1:8 000),4 °C摇床过夜孵育。次日用TBST及TBS清洗后,孵二抗(山羊抗兔,抗鼠均以1:5 000)室温孵育2 h,弃二抗后再予TBST清洗,TBS浸泡,采用ECL化学发光液显影(A液与B液等比例混合),于自动化学发光成像仪曝光以获取图片,Image J软件分析灰度值等。

2.4 荧光显微镜观察HFL1对外泌体的摄取情况

采取PKH67染色法,根据试剂盒操作方法全程需避光操作,分别取上述外泌体溶液100 μL与Diluent C 500 μL混合入一新的离心管中,同时将PKH67染料2.5 μL与Diluent C 500 μL混匀入另一新的离心管中,再将两者混匀,避光室温孵育3 min;而后加入无外泌体血清1 mL孵育1 min终止染色,取混合液1 mL,再加入无FBS培养基1 mL,放回培养箱孵育3 h;而后取出,用PBS清洗2遍,以4%多聚甲醛常温固定30 min;再弃多聚甲醛,用PBS清洗2遍,取1×DAPI,PBS稀释1 000倍,染色20 min后弃DAPI,再用PBS 500 μL清洗2遍,用F-actin染细胞骨架(用固有稀释液稀释1 000倍),常温孵育30 min,荧光显微镜观察HFL1对外泌体的摄取情况。

2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测各组 CAFs相关α-SMA的蛋白表达水平 采用6孔板培养HFL1细胞,将收集的HCT116外泌体及健脾消癌外泌体,分不同浓度外泌体联合TGF-β₁干预HFL1细胞(其中各组TGF-β₁的浓度均为10 μg·L⁻¹),其中外泌体联合TGF-β₁组,先予外泌体及TGF-β₁室温孵育1.5 h后再予其混合液干预HFL1细胞48 h,加入RIPA裂解液,提取总蛋白,BCA法定量,均以蛋白总量20 μg进行点样,凝胶电泳,转膜,封闭,4 °C孵一抗α-SMA(1:5 000),β-actin(1:5 000)过夜,室温孵二抗(1:5 000)2.5 h,发光检测α-SMA蛋白的表达水平,以Image J软件分析灰度值。

2.6 Real-time PCR检测各组 CAFs相关α-SMA mRNA水平 采用六孔板培养HFL1细胞,将收集的HCT116外泌体及健脾消癌外泌体干预HFL1细胞,具体方法同2.5项,根据trizol试剂说明收集各组细胞的总RNA,并取适量RNA样品采用Biodrop仪器检测各组RNA浓度,计算加样量。采用逆转录试剂盒行逆转录,反应条件:42 °C 2 min,37 °C

15 min,85 °C 5 s,冷却后将cDNA进行PCR反应,反应条件:95 °C预变性4 min,1个循环;94 °C变性30 s,55 °C退火30 s,72 °C延伸1 min,共40个循环。GAPDH为内参,实验结果采用2^{-ΔΔCt}法计算各组 CAFs相关α-SMA mRNA相对表达。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司设计合成。见表1。

表1 引物序列

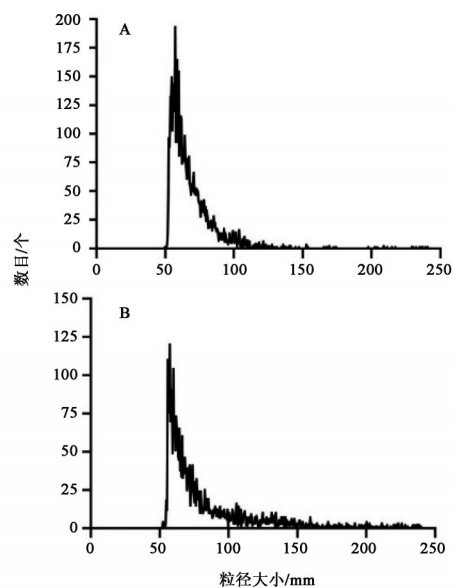
Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
GAPDH	上游 ACCACAGTCCATGCCATCAC	452
	下游 TCCACCACCCTGTTGCTGTA	
α-SMA	上游 CTGAAGAGCATCCGACAC	520
	下游 GACTCCATCCCAATGAAAG	

2.7 统计学处理 采用Graphpad Prism 8.0软件进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,根据数据的正态分布和方差齐性检验结果选取合适的检验方法,两组间比较采用t检验或非参数检验,多组间比较采用单因素方差分析,以P<0.05表示差异具有统计学意义。实验均重复3次。

3 结果

3.1 外泌体的鉴定 HCT116外泌体及健脾消癌外泌体的粒径分布均集中在50~100 nm,见图1。HCT116外泌体及健脾消癌外泌体均表达Alix, HSP70, TSG101等标志蛋白,结合粒径图和Western blot外泌体标志蛋白检测结果可证实所提取的即为外泌体,见图2。



A.HCT116外泌体;B.健脾消癌方外泌体(图2同)

图1 细胞上清外泌体粒径分布

Fig. 1 Particle size distribution of supernatant exosomes in cells

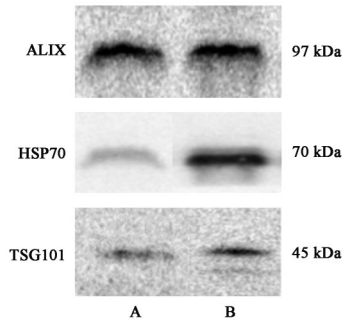


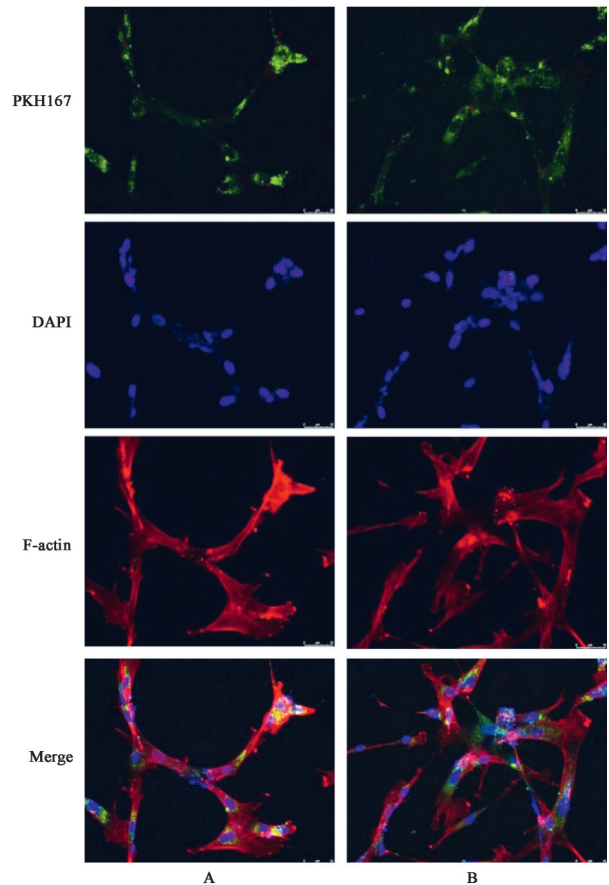
图2 外泌体标志蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of exosome marker protein expressions

3.2 HFL1对外泌体摄取的影响 将PKH67标记的HCT116外泌体及健脾消癌方外泌体分别与HFL1细胞共孵育后,荧光显微镜可观察到HFL1细胞质中出现较多的绿色荧光标记的外泌体,表明HFL1细胞可以摄取HCT116外泌体及健脾消癌方外泌体。见图3。

3.3 对各组CAF_s相关 α -SMA蛋白表达水平的影响 与空白组比较,TGF- β_1 组及TGF- β_1 联合HCT116外泌体组的 α -SMA蛋白表达水平升高($P < 0.05$, $P < 0.01$);与TGF- β_1 组比较,TGF- β_1 联合HCT116外泌体组 α -SMA蛋白表达显著升高($P < 0.01$)。与TGF- β_1 联合HCT116外泌体组比较,TGF- β_1 联合健脾消癌方外泌体组 α -SMA蛋白显著下调($P < 0.01$),但TGF- β_1 联合健脾消癌方外泌体组的组间差异比较无统计学意义。由此可得TGF- β_1 联合HCT116外泌体可使HFL1向CAF_s转化,而TGF- β_1 联合健脾消癌方外泌体干预HFL1后,可使 α -SMA的表达水平下降至接近正常水平。见表2,图4。

3.4 对各组CAF_s相关 α -SMA mRNA表达的影响 与空白组比较,TGF- β_1 组及TGF- β_1 联合HCT116外泌体组的 α -SMA mRNA表达升高($P < 0.05$),TGF- β_1 联合健脾消癌方外泌体2 mg·L⁻¹组的 α -SMA mRNA表达降低($P < 0.01$);与TGF- β_1 组比



PKH67. 荧光标记外泌体; DAPI. 荧光标记细胞核; F-actin. 荧光标记细胞骨架; A. HCT116外泌体; B. 健脾消癌方外泌体

图3 HFL1对外泌体的摄取情况(PKH67染色, $\times 400$)

Fig. 3 Uptake of exosomes by HFL1 (PKH67 staining, $\times 400$)

较,TGF- β_1 联合HCT116外泌体4 mg·L⁻¹组 α -SMA mRNA表达显著升高($P < 0.01$)。与TGF- β_1 联合HCT116外泌体组比较,TGF- β_1 联合健脾消癌方外泌体组的 α -SMA mRNA表达显著下调($P < 0.01$)。见表2。

4 讨论

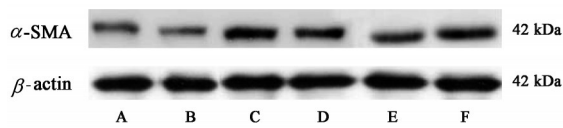
肿瘤微环境的动态变化与肿瘤的发生发展密切相关,CAF_s作为恶性肿瘤微环境的主要细胞成

表2 TGF- β_1 联合外泌体对HFL1中 α -SMA蛋白及mRNA表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Effect of TGF- β_1 combined with exosomes on expression of α -SMA in HFL1 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	外泌体质量浓度/mg·L ⁻¹	α -SMA/ β -actin	α -SMA mRNA
空白	-	1.00 \pm 0.01	1.00
TGF- β_1	-	1.72 \pm 0.71 ¹⁾	2.19 \pm 0.01 ²⁾
TGF- β_1 联合HCT116外泌体	2	4.45 \pm 1.70 ^{2,4)}	1.80 \pm 0.01 ¹⁾
	4	3.24 \pm 0.64 ^{2,4)}	4.65 \pm 0.05 ^{2,4)}
TGF- β_1 联合健脾消癌方外泌体	2	1.25 \pm 0.17 ^{3,5)}	0.02 \pm 0.02 ^{2,4,5)}
	4	1.59 \pm 0.29 ^{1,5)}	0.73 \pm 0.01 ^{3,5)}

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与TGF- β_1 组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$;与TGF- β_1 联合HCT116外泌体组比较⁵⁾ $P < 0.01$ 。



A. 空白组; B. TGF- β_1 组; C. TGF- β_1 联合HCT116外泌体 $2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组; D. TGF- β_1 联合HCT116外泌体 $4\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组; E. TGF- β_1 联合健脾消癌方外泌体 $2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组; F. TGF- β_1 联合健脾消癌方外泌体 $4\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组

图4 TGF- β_1 联合外泌体对HFL1细胞 α -SMA蛋白表达电泳
Fig. 4 Electrophoresis of TGF- β_1 combined with exosomes in HFL1 on α -SMA protein expression

分,与肿瘤细胞产生相互作用。外泌体类似盘状小囊泡,通常直径在30~100 nm,其表面特异性表达TSG101, Alix, CD63, HSP70等标志物^[13],较多的证据表明外泌体在细胞间信息传递中发挥着重要作用^[14-15],肿瘤细胞来源的外泌体可促进肿瘤基质中的其他细胞转化成CAFs,CAFs也能分泌外泌体作用于恶性肿瘤细胞,即外泌体是CAFs与恶性肿瘤细胞间沟通的桥梁,是影响恶性肿瘤转移性的重要因素^[16-18]。健脾消癌方是蒋益兰教授基于长期临床实践,以“健脾益气,化痰解毒”为法凝练总结的治疗结直肠癌复发转移的方剂,其中人参、薏苡仁重在益气健脾,扶正抗癌,淫羊藿助其健脾益气之功,枳壳理气宽中,助脾胃运化之力,白花蛇舌草、重楼、藤梨根清热解毒散结,郁金活血化瘀,全方配伍精良,标本兼顾,攻补兼施。前期体内外实验研究表明健脾消癌方可明显抑制TGF- β_1 因子诱导的EMT,以达到抑制肿瘤转移的进程^[19-20]。本研究基于前期研究基础,从结肠癌细胞来源外泌体的角度出发,观察体外培养的结肠癌细胞来源外泌体对正常人胚肺成纤维细胞活化的影响,同时观察健脾消癌方含药血清的干预作用,拟从外泌体的角度探讨其拮抗结肠癌肺转移的新机制和新靶点。

肺转移作为大肠癌远处转移最常见的部位之一,目前认为大肠癌肺转移的机制主要与外泌体携带整合素的特异导向性^[21]和原发肿瘤的基因特征^[22-23]有关,但其具体机制有待进一步研究。 α -SMA在正常组织和细胞中常呈低表达, α -SMA作为CAFs的特异性标志蛋白,相比正常组织和细胞具有更高的表达水平^[24-26],因此常以 α -SMA的表达水平作为是否发生CAFs活化的标志。本研究采取超高速离心法提取结肠癌HCT116外泌体及健脾消癌方外泌体,再予细胞上清来源外泌体干预HFL1细胞,显微镜观察到HFL1能摄取外泌体,且TGF- β_1 联合HCT116外泌体可使HFL1细胞中 α -

SMA的蛋白和基因表达水平明显上调,说明TGF- β_1 联合结肠癌细胞来源外泌体可促进HFL1向CAFs转化;当加入健脾消癌方外泌体后, α -SMA的蛋白和基因表达水平明显下调,表明健脾消癌方可使HFL1向CAFs的转化能力下降。

本研究证明了TGF- β_1 联合结肠癌细胞来源外泌体可促进HFL1向CAFs转化,为结肠癌肺转移微环境的基础研究提供了新靶点和新思路,而健脾消癌方可通过影响 α -SMA的表达水平而降低HFL1向CAFs的转化能力,为健脾消癌方通过干预外泌体,从而影响HFL1向CAFs的转化能力,以拮抗结肠癌肺转移提供一定的科学依据。健脾消癌方为中药复方制剂,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。

[参考文献]

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2017[J]. CA Cancer J Clin, 2017, 67(1): 7-30.
- [2] SHARON Y, ALON L, GLANZ S, et al. Isolation of normal and cancer-associated fibroblasts from fresh tissues by fluorescence activated cell sorting (FACS) [J]. Jove J Vis Exp, 2013, 1(71): 1-6.
- [3] JI Q, ZHOU L H, SUI H, et al. Primary tumors release ITGBL1-rich extracellular vesicles to promote distal metastatic tumor growth through fibroblast-niche formation [J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 1211-1219.
- [4] GIUSTI I, DI FRANCESCO M, D'ASCENZO S, et al. Ovarian cancer-derived extracellular vesicles affect normal human fibroblast behavior [J]. Cancer Biol Ther, 2018, 19(8): 722-734.
- [5] ELVIRA D, DANILO F, MARTINA N, et al. Cancer-associated fibroblasts release exosomal microRNAs that dictate an aggressive phenotype in breast cancer [J]. Oncotarget, 2017, 8(12): 19592-19608.
- [6] 蒋益兰, 潘敏求, 蔡美. 健脾消癌饮配合化疗拮抗大肠癌术后复发转移62例总结[J]. 湖南中医杂志, 2007, 23(1): 1-3.
- [7] 王容容, 王其美, 蒋益兰, 等. 健脾消癌方联合化疗治疗晚期转移性结肠癌的临床研究[J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(5): 1732-1736.
- [8] 罗燕, 罗吉, 蒋益兰, 等. 健脾消癌方抑制结肠癌增殖的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(6): 151-155.

- [9] 杨晓,唐蔚,蒋益兰,等. 健脾消癌方对人结肠癌 HCT116 细胞周期、凋亡及 Wnt/ β -catenin 信号通路相关因子的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2018, 25(6):61-65.
- [10] 李勇敏,谭小宁,徐琳本,等. 结直肠癌转移模型裸鼠血管因子变化及健脾消癌方干预作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(6):167-171.
- [11] 贺石林,王键,王净净. 中医科研设计与统计学[M]. 长沙:湖南科学技术出版社,2012:48-49.
- [12] MENG W, XIA Q, WU L, et al. Downregulation of TGF-beta receptor types II and III in oral squamous cell carcinoma and oral carcinoma-associated fibroblasts[J]. BMC Cancer, 2011, 11(1):1-13.
- [13] VAN NIEL G, D'ANGELO G, RAPOSO G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2018, 19(4): 213-228.
- [14] COLOMBO M, RAPOSO G, THERY C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles [J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2014, 30(1):255-289.
- [15] TKACH M, THERY C. Communication by extracellular vesicles: where we are and where we need to go[J]. Cell, 2016, 164(6): 1226-1232.
- [16] KRYZA T, SILVA L M, BOCK N, et al. Kallikrein-related peptidase 4 induces cancer-associated fibroblast features in prostate-derived stromal cells [J]. Mol Oncol, 2017, 11(10): 1307-1329.
- [17] JIANG H, HEGDE S, DENARDO D G. Tumor-associated fibrosis as a regulator of tumor immunity and response to immunotherapy[J]. Cancer Immunol Immunother, 2017, 66(8): 1037-1048.
- [18] MEZAWA Y, ORIMO A. The roles of tumor- and metastasis-promoting carcinoma-associated fibroblasts in human carcinomas[J]. Cell Tissue Res, 2016, 365(3):675-689.
- [19] 罗吉,李勇敏,简小兰,等. 健脾消癌方对转化生长因子- β_1 诱导的 SW620 细胞上皮间质转化的影响[J]. 中国中医药信息杂志,2018,25(2):42-46.
- [20] 谭小宁,李勇敏,罗吉,等. 健脾消癌方对人结直肠癌裸鼠移植模型肿瘤组织上皮间质转化及转化生长因子 β 的影响[J]. 中医杂志,2017,58(24):2137-2140.
- [21] HOSHINO A, COSTA-SILVA B, SHEN T L, et al. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis[J]. Nature, 2015, 527(7578): 329-335.
- [22] RUSSO A L, BORGER D R, SZYMONIFKA J, et al. Mutational analysis and clinical correlation of metastatic colorectal cancer [J]. Cancer, 2014, 120(10): 1482-1490.
- [23] MORRIS V K, LUCAS F A S, OVERMAN M J, et al. Clinicopathologic characteristics and gene expression analyses of non-KRAS 12/13, RAS-mutated metastatic colorectal cancer[J]. Ann Oncol, 2014, 25(10):2008-2014.
- [24] QUAIL D F, JOYCE J A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis [J]. Nat Med, 2013, 19(11):1423-1437.
- [25] CORTEZ E, ROSWALL P, PIETRAS K. Functional subsets of mesenchymal cell types in the tumor microenvironment [J]. Semin Cancer Biol, 2014, 4(25):3-9.
- [26] YINGYING H, SUFANG Z, YONG H, et al. Isolation of fibroblast-activation protein-specific cancer-associated fibroblasts [J]. Biomed Res Int, 2017, 8(14):1-8.

[责任编辑 张丰丰]