

ABT-737 对 M2 型 TAM 来源外泌体处理的卵巢癌细胞 SKOV3 自噬性凋亡与干性特征的影响^{*}

符山花¹ 包利利² 赵达² 李俊² 林芳婷² 彭芸³

(1. 海南省妇女儿童医学中心妇科, 海南 海口 570205; 2. 海南省妇女儿童医学中心妇产科, 海南 海口 570205;

3. 海南医学院基础医学与生命科学学院, 海南 海口 571199)

【摘要】 目的 探讨 Bcl-2 小分子抑制剂 ABT-737 对经肿瘤相关巨噬细胞(TAM)来源外泌体(Exo)处理的卵巢癌细胞自噬性凋亡及干性特征的作用。方法 利用佛波酯(PMA)与重组人白细胞介素-4(IL-4)诱导人外周血单核细胞 THP-1 为 M2 型 TAM, 流式细胞术检测细胞表面巨噬细胞相关标志物表达; 差速离心法提取外泌体, 透射电镜与纳米粒子追踪技术观察外泌体形态及粒径分布, Western blot 检测外泌体标志蛋白表达, Dil 结合 PKH67 染色检测 TAM 来源外泌体被卵巢癌细胞系 SKOV3 摄取情况; 实验分组为对照组、Exo 组、Exo+ABT-737 组, 采用 TAM 来源外泌体与 ABT-737 按照分组处理 SKOV3 细胞, 流式细胞术检测细胞凋亡率, 双荧光 mRFP-GFP-LC3 实验检测细胞自噬水平, Western blot 检测细胞自噬相关蛋白(LC3-II/LC3-I、Beclin-1、p62)与凋亡相关蛋白(Bax、Bcl-2、Cleaved-caspase3)表达, 肿瘤细胞成球实验检测细胞干性, Western blot 检测肿瘤干细胞相关蛋白(CD133、OCT4、SOX2)表达。结果 经 PMA 与 IL-4 诱导后, THP-1 细胞形态发生改变, M1 型巨噬细胞标记物 CD86 表达比例降低而 M2 型巨噬细胞标记物 CD206 表达比例升高($P<0.05$)。分离的颗粒为球形囊泡, 大小均匀, 粒径峰值约为 140 nm, 外泌体标志蛋白 Alix、CD63、TSG101 表达明显, 由此判断成功分离到 M2 型 TAM 来源 Exo, 且其能被 SKOV3 摄取。与对照组比较, Exo 组 SKOV3 细胞凋亡率减少, GFP 与 mRFP 的荧光斑点减少, 细胞内 LC3-II/LC3-I、Beclin-1、Bax 及 Cleaved-caspase3 表达均下调, p62 与 Bcl-2 表达均上调, 此外, 细胞成球数量增加, CD133、OCT4 及 SOX2 表达均上调, 差异均具有统计学意义($P<0.05$)。与 Exo 组比较, Exo+ABT-737 组 SKOV3 细胞凋亡率增加, GFP 与 mRFP 的荧光斑点也增加, 细胞内 LC3-II/LC3-I、Beclin-1、Bax 及 Cleaved-caspase3 表达均上调, p62 与 Bcl-2 表达均下调, 细胞成球数量减少, 且 CD133、OCT4 及 SOX2 表达均下调, 差异均具有统计学意义($P<0.05$)。结论 ABT-737 能够在 M2 型 TAM 来源外泌体处理的卵巢癌细胞中发挥促自噬性凋亡的作用, 并且可以抑制卵巢癌肿瘤干性特征。

【关键词】 卵巢癌; ABT-737; 肿瘤相关巨噬细胞; 外泌体; 自噬性凋亡; 干性

【中图分类号】 R737.31 **【文献标志码】** A **DOI:**10.3969/j.issn.1672-3511.2023.05.005

Effects of ABT-737 on autophagic apoptosis and stemness characteristics of SKOV3 ovarian cancer cells treated with M2 tumor-associated macrophage-derived exosomes

FU Shanhu¹, BAO Lili², ZHAO Da², LI Jun², LIN Fangting², PENG Yun³

(1. Department of Gynecology, Hainan Women and Children's Medical Center, Haikou 570205, China;

2. Department of Obstetrics and Gynecology, Hainan Women and Children's Medical Center, Haikou 570205, China;

3. School of Basic Medicine and Life Sciences, Hainan Medical College, Haikou 571199, China)

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect of Bcl-2 small molecule inhibitor ABT-737 on autophagy apoptosis and stemness characteristics of ovarian cancer cells treated with tumor-associated macrophage (TAM)-derived exosomes (Exo). **Methods** Using phorbol ester (PMA) and recombinant human interleukin-4 (IL-4) to induce human peripheral blood mononuclear cells THP-1 to M2 type TAM, the expression of macrophage-related markers on the cell surface was detected by flow cytometry; The exosomes were extracted by differential centrifugation, the morphology and size distri-

基金项目: 海南省卫生健康行业科研项目(21A200406)

引用本文: 符山花, 包利利, 赵达, 等. ABT-737 对 M2 型 TAM 来源外泌体处理的卵巢癌细胞 SKOV3 自噬性凋亡与干性特征的影响[J]. 西部医学, 2023, 35(5): 654-661, 669. DOI:10.3969/j.issn.1672-3511.2023.05.005

bution of exosomes were observed by transmission electron microscopy and nanoparticle tracking technology, and the expression of exosome marker proteins was detected by Western blot, Dil combined with PKH67 staining was used to detect the uptake of TAM-derived exosomes by ovarian cancer cell line SKOV3; The experimental groups were divided into control group, Exo group, and Exo+ABT-737 group. TAM-derived exosomes and ABT-737 were used to treat SKOV3 cells according to the groups, and flow cytometry was used to detect the apoptosis rate, double fluorescent mRFP-GFP-LC3 assay was used to detect the level of autophagy, Western blot was used to detect autophagy-related proteins (LC3-II/LC3 I, Beclin-1, p62) and apoptosis-related proteins (Bax, Bcl-2, Cleaved-caspase3) expression, tumor cell spheroidization assay was used to detect cell stemness, and Western blot was used to detect the expression of cancer stem cell-related proteins (CD133, OCT4, SOX2). **Results** After induction by PMA and IL-4, the morphology of THP-1 cells changed, the expression ratio of M1 macrophage marker CD86 decreased while the expression ratio of M2 macrophage marker CD206 increased ($P < 0.05$). The isolated particles are spherical vesicles with uniform size and a peak particle size of about 140 nm, the exosome marker proteins Alix, CD63, and TSG101 are clearly expressed. It is judged that the M2-type TAM source Exo was successfully isolated and can be taken up by SKOV3. Compared with the control group, the apoptosis rate of SKOV3 cells in the Exo group decreased, the fluorescent spots of GFP and mRFP decreased, the expressions of LC3-II/LC3-I, Beclin-1, Bax and Cleaved-caspase3 in the cells were all down-regulated, and p62 and Bcl-2 were all up-regulated, in addition, the number of cell spheroids increased, and the expressions of CD133, OCT4 and SOX2 were all up-regulated, the differences were statistically significant ($P < 0.05$). Compared with the Exo group, the apoptosis rate of SKOV3 cells in the Exo + ABT-737 group increased, the fluorescent spots of GFP and mRFP also increased, the intracellular expressions of LC3-II/LC3-I, Beclin-1, Bax and Cleaved-caspase3 were all up-regulated, the expressions of p62 and Bcl-2 were down-regulated, the number of cell spheroids decreased, and the expressions of CD133, OCT4 and SOX2 were down-regulated, the differences were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** ABT-737 can promote the autophagy and apoptosis of ovarian cancer cells treated with M2-type TAM-derived exosomes, and inhibit the tumor stemness characteristic of ovarian cancer.

【Key words】 Ovarian cancer; ABT-737; Tumor-associated macrophages; Exosomes; Autophagic apoptosis; Stemness

卵巢癌死亡率较高,患者 5 年总生存率小于 50%^[1],由于缺乏典型症状和有效的早期诊断措施,大多数患者被诊断时已处于癌症晚期,此时治疗选择十分有限。近年来,尽管减瘤手术联合一线化疗取得了良好的治疗效果,但 70%~80% 的患者会在 2~5 年内复发,且最终都会出现化疗耐药的现象,这使得临床疗效降低^[2-3]。卵巢癌的复发和转移的机制尚不清楚,可能与免疫系统的变化有关,免疫系统由各种细胞和介质组成,其能够抵御外来病原体并消除受损细胞以维持组织稳态^[4]。在肿瘤进展过程中,免疫细胞往往表现出表型和功能不稳定性,并转分化为不同的细胞类型或状态,从而促进或抑制肿瘤的生长和转移;此外,各种免疫细胞浸润到肿瘤微环境中与卵巢癌患者的不良预后密切相关^[5-6]。肿瘤巨噬相关细胞(Tumour-associated macrophages, TAM)是肿瘤微环境的主要组成部分,早期巨噬细胞主要以 M1 型为主,起到杀伤肿瘤细胞的作用,而伴随着肿瘤的不断进展,肿瘤相关巨噬细胞逐渐转变为 M2 型, M2 型的 TAM 发生大量浸润具有免疫抑制功能,可以促进肿瘤细胞的免疫逃逸,进而有利于肿瘤发展^[7]。探索以 M2 型 TAM 作为癌症免疫疗法的新策略也是当今的

一大研究热点。研究表明, TAM 通过连接肿瘤细胞的细胞间通讯来参与肿瘤进展与转移。外泌体(Exosomes, Exo)是肿瘤微环境中不同细胞类型之间的重要交流媒介,在功能上可以转移多种蛋白质、DNA、RNA 及 miRNA,将信息从一个细胞传送到另一个细胞并重新编程受体细胞,在癌症进展中发挥复杂作用^[8]。目前,大多数研究都集中在肿瘤细胞分泌的 Exo 上,关于 TAM 来源的 Exo 及其对肿瘤细胞的影响研究相对较少。ABT-737 是一种抗凋亡蛋白 B 细胞淋巴瘤-2(B-cell lymphoma, Bcl-2)同源(BH)3 模拟物,作为 Bcl-2、Bcl-xL 和 Bcl-w 的抑制剂可以促进细胞发生凋亡,因此, ABT-737 成为一种新型癌症治疗试剂在多种类型肿瘤中起着抗肿瘤作用^[9]。本研究以卵巢癌细胞为研究对象,通过体外提取 TAM 来源 Exo 作用于该肿瘤细胞,观察 TAM 来源 Exo 对卵巢癌细胞的影响,以及 ABT-737 是否在 TAM 来源 Exo 作用的卵巢癌细胞中发挥作用,并进一步探讨其机制,以期为卵巢癌的诊治研究提供新思路。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂 人外周血单核细胞系 THP-1

和人卵巢癌细胞系 SKOV3 (中国科学院上海细胞库), Bcl-2 小分子抑制剂 ABT-737 (美国 Selleck Chemicals 公司), 胎牛血清、胰蛋白酶和 RPMI-1640 培养基 (美国 Gibco 公司), 佛波酯 (PMA) 与重组人白细胞介素-4 (IL-4) (美国 Sigma 公司), Dil 染料和 PKH67 染料 (江苏凯基生物技术公司), RIPA 裂解液、Bradford 蛋白检测试剂盒、ECL 超敏发光液及 DAPI 染料 (上海碧云天生物研究所), 磷钨酸 (北京康瑞纳生物科技公司), Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒 (南京诺唯赞生物科技公司), mRFP-GFP-LC3 自噬双标腺病毒 (上海汉恒生物工程公司), Polybrene 试剂 (北京凯诗源生物公司), 抗体 Alix、CD63、TSG101、LC3-II、LC3-I、Beclin-1、p62、Bax、Cleaved-caspase3、Bcl-2、CD133、OCT4、SOX2 及 β -actin (英国 Abcam 公司), PE-Cy7 标记的鼠抗人 CD86 抗体和 APC 标记的鼠抗人 CD206 抗体 (北京索莱宝生物公司)。

1.2 方法

1.2.1 M2 型 TAM 细胞培养与诱导 在 THP-1 细胞中加入含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。待细胞呈对数生长时, 调整密度为 1×10^6 个/mL, 吸取 100 μ L 植入 6 孔板中过夜培养。向新鲜培养基中加入 50 ng/mL PMA 培养 24 h, 将 THP-1 细胞诱导为巨噬细胞; 弃去培养液, 再向新鲜培养基中加入 20 ng/mL IL-4 继续诱导 72 h, 将其诱导为 M2 型巨噬细胞。通过倒置显微镜观察细胞形态变化, 摄取照片。

1.2.2 流式细胞术检测细胞表面巨噬细胞相关标志物表达 收集细胞, PBS 洗涤, 2000 rpm 离心 5 min, 弃上清并重悬细胞, 吸取 100 μ L 细胞悬液加入流式检测专用管中, 加入等体积的血清, 室温封闭 30 min。分别加入 10 μ L PE-Cy7 标记的鼠抗人 CD86 抗体、10 μ L APC 标记的鼠抗人 CD206 抗体, 4 °C 避光孵育 30 min, PBS 洗涤, 离心弃上清, 再加入适量 PBS 重悬, 振荡混匀, 通过流式细胞仪检测细胞表面 CD86 和 CD206 的表达情况。

1.2.3 M2 型 TAM 细胞来源外泌体的提取与鉴定 在诱导的 M2 型 TAM 细胞加入无血清培养基培养, 72 h 后收集细胞培养上清, 300 $\times$ g 离心 10 min 去掉沉淀, 收集上清; 2 000 $\times$ g 离心 10 min 去掉较大的碎片及颗粒, 收集血清; 10 000 $\times$ g 离心 30 min 去掉较小碎片及囊泡, 收集上清; 接着用 0.22 μ m 滤膜过滤, 收集滤液于超速离心管中, 100 000 $\times$ g 离心 90 min, 收集沉淀, 加入 PBS 重悬, 100 000 $\times$ g 离心 70 min, 收集沉淀, 即为外泌体, 以 PBS 重悬得到外泌体悬液。

吸取 10 μ L 外泌体滴在 200 目的铜网上, 室温孵育 1 min, 滤纸吸去多余液体, 用 1% 磷钨酸负染色 1 min, 蒸馏水冲洗铜网, 干燥后, 用透射电镜在 80 kV 下观察成像, 摄取照片, 并通过 ZetaView PMX110 仪器检测粒径分布。

1.2.4 M2 型 TAM 细胞来源外泌体摄取实验 将对数期生长的 SKOV3 细胞铺于含玻片的 6 孔板上, 置于 5% CO₂、37 °C 培养箱内培养 24 h, 每孔加入 Dil 染料避光染色 20 min。利用 Diution C 将 PKH67 稀释成染料工作液, 将外泌体与染料工作液混匀, 避光染色 5 min, 100 000 g 离心 70 min, 弃去上清, PBS 重悬外泌体。吸取 100 μ L 处理的外泌体加入到 SKOV3 细胞孔内, 培养 24 h 后, 4% 多聚甲醛固定, PBS 洗涤, 0.5% Triton X-100 室温透化 10 min, 再滴加 DAPI 避光复染 5 min, 使用含抗荧光淬灭剂的封片剂封片, 在共聚焦显微镜下观察荧光染色情况, 摄取照片。

1.2.5 实验分组与处理 将对数期生长的 SKOV3 细胞随机分为 3 组, 具体分组与处理如下: ①对照组, 细胞单独培养。②Exo 组: 加入 M2 型 TAM 细胞来源外泌体培养细胞。③Exo + ABT-737 组: 加入 M2 型 TAM 细胞来源外泌体与 5.0 μ mol/L ABT-737 培养细胞。进行各处理后, 将细胞培养板置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h, 收集各组 SKOV3 细胞进行后续实验。

1.2.6 流式细胞术检测细胞凋亡率 消化收集各组 SKOV3 细胞, 加入 PBS 洗涤, 用适量的缓冲液重悬细胞, 调整细胞密度为 1×10^6 个/mL, 吸取 100 μ L 细胞悬液加入流式检测专用管, 加入 5 μ L PI 染液和 5 μ L Annexin V-FITC 试剂液, 轻轻混匀, 避光染色 30 min 后, 立即上流式细胞仪检测分析各组 SKOV3 细胞凋亡情况。

1.2.7 双荧光 mRFP-GFP-LC3 实验检测细胞自噬水平 将 SKOV3 细胞按照 1×10^5 /孔的密度接种在含玻片的 6 孔板中, 置于 5% CO₂、37 °C 培养箱内培养 24 h, 更换为含 mRFP-GFP-LC3 慢病毒 (MOI=50) 感染细胞, 同时加入 5 μ g/mL Polybrene, 37 °C 孵育 12 h, 使用含 5 μ g/mL 嘌呤霉素进行筛选培养。将转染 mRFP-GFP-LC3 的 SKOV3 细胞进行分组处理后, PBS 洗涤, 4% 多聚甲醛固定, 使用含抗荧光淬灭剂的封片剂封片, 在共聚焦显微镜下观察细胞内斑点, 摄取照片。使用 ImageJ 中的共定位工具对绿色和红色荧光共定位进行定量分析。

1.2.8 Western blot 测定 外泌体标志物、自噬、凋亡及细胞干性相关蛋白表达用含有蛋白酶抑制剂的

RIPA 裂解液提取总蛋白, Bradford 法测量蛋白浓度。将蛋白样品煮沸变性, 同时制备 10% SDS-PAGE, 取 40 μ g 各蛋白上样至凝胶孔内, 恒压电泳进行分离, 湿法转膜, 将膜以 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h。滴加稀释的一抗, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST 洗膜, 滴加稀释的二抗, 室温孵育 1 h。TBST 洗膜, 利用 ECL 显色, 紫外凝胶成像仪呈现条带, ImageJ 软件测量图像灰度值, 以 β -actin 作为内参蛋白, 计算目的蛋白相对表达量, 以目的蛋白与内参蛋白的灰度值之比表示目的蛋白相对表达量。

1.2.9 肿瘤细胞成球实验检测细胞干性 将各组 SKOV3 细胞调整密度为 4×10^3 个/mL, 吸取 200 μ L (每孔 800 个细胞) 细胞悬液接种于 24 孔板中, 置于 5% CO₂、37 $^{\circ}$ C 培养箱内培养, 7 d 后取出, 在倒置显微镜观察并计数, 摄取图片。

1.3 统计学分析 采用 SPSS 23.0 软件进行统计学分析, GraphPad Prism 8.30 绘制统计图。符合正态分布的计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示。两组比较采用配对样本 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 M2 型巨噬细胞的诱导结果 通过倒置显微镜观察到诱导前后 THP-1 细胞形态发生明显变化, 诱导前细胞呈悬浮状, 边缘清晰, 为规则的圆形或椭圆形; 经 PMA 和 PMA+IL-4 诱导后, 细胞贴壁生长, 体积变大, 为混合圆形或纺锤形, 且有伪足伸出, 见图 1。流式细胞术检测结果显示, 相较于未经诱导的 THP-1 细胞, 加入 PMA+IL-4 进行诱导后, M1 型巨噬细胞标记物 CD86 表达比例显著降低而 M2 型巨噬细胞标记物 CD206 表达比例显著升高 ($P < 0.05$), 见图 2。

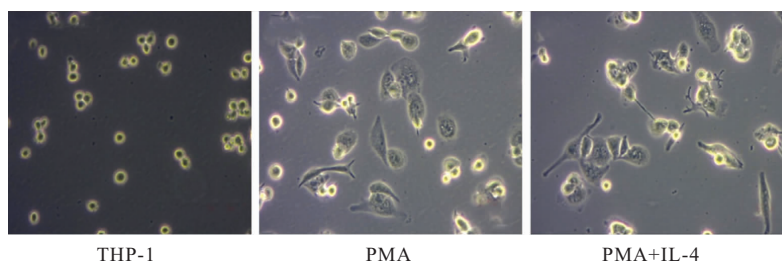


图 1 倒置显微镜观察诱导前后 THP-1 细胞形态 (100 $\times$)

Figure 1 Observation of THP-1 cell morphology before and after induction by in verted microscopy

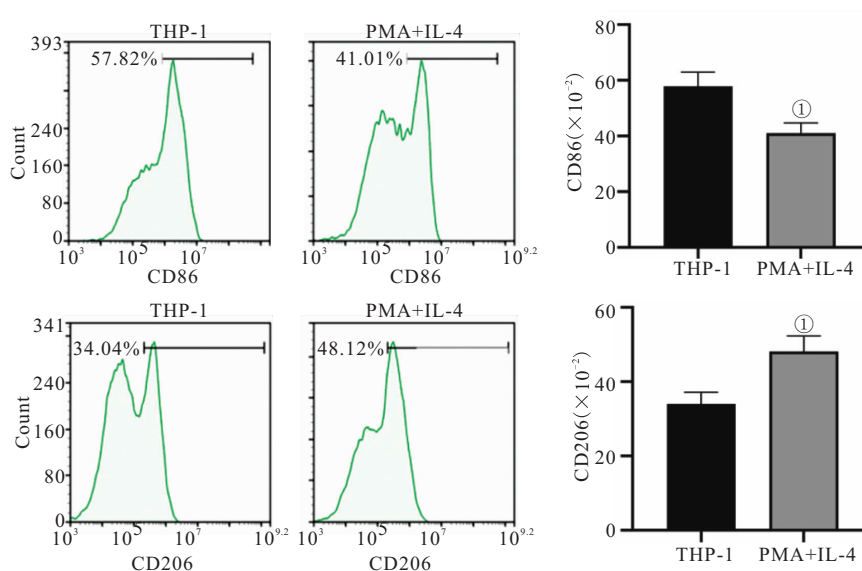


图 2 流式细胞术检测细胞中 M1 型巨噬细胞标记物 CD86 与 M2 型巨噬细胞标记物 CD206 表达

Figure 2 The expressions of M1-type macrophage marker CD86 and M2-type macrophage marker CD206 were detected by flow cytometry

注: 与 THP-1 细胞比较, ① $P < 0.05$ 。

2.2 M2 型巨噬细胞来源外泌体的鉴定 通过透射电镜观察到分离到的颗粒物为球形囊泡, 大小均匀, 测量得其粒径峰值约分布在 140 nm, 见图 3A、B。经

Western blot 检测发现, 该颗粒物中外泌体标志蛋白 Alix、CD63、TSG101 表达均更加明显, 见图 3C。综上所述, 判断成功分离到 M2 型巨噬细胞来源外泌体。

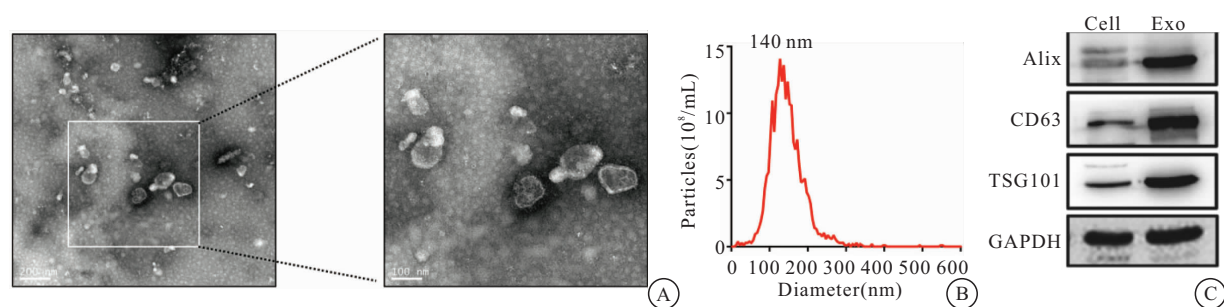


图 3 外泌体鉴定

Figure 3 Exosome identification

注: A. 透射电镜观察外泌体形态; B. NTA 测定外泌体直径粒径峰值; C. Western blot 检测外泌体标志蛋白 Alix、CD63、Tsg101 表达。

2.3 M2 型巨噬细胞来源外泌体被 SKOV3 细胞摄取情况 在共聚焦显微镜下观察, 经 Dil 染料标记的 SKOV3 细胞膜呈红色荧光, PKH67 标记的 Exo 呈绿

色荧光, 可见 Exo 分布在 SKOV3 细胞胞质与胞核周围, 表明 Exo 可被 SKOV3 细胞摄取, 见图 4。

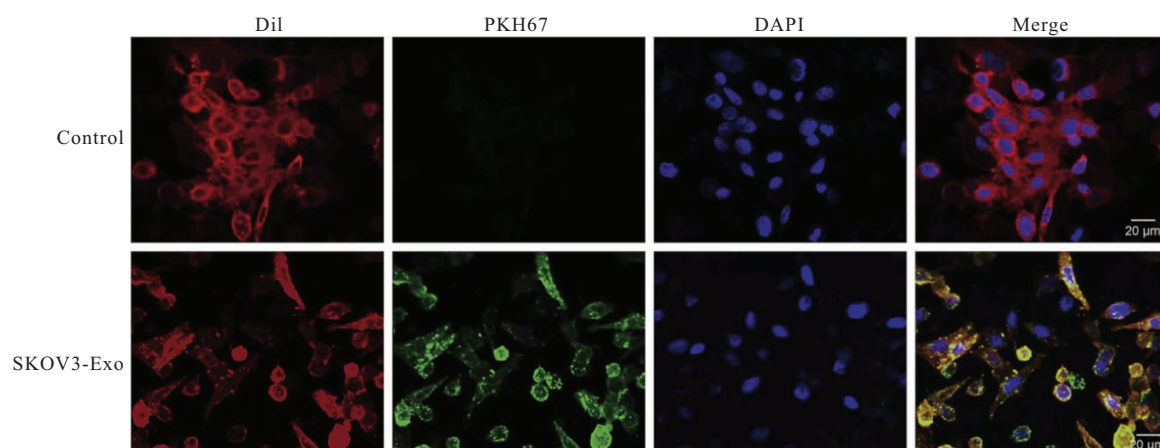


图 4 共聚焦显微镜观察外泌体被 SKOV3 细胞摄取情况

Figure 4 The uptake of exosomes by SKOV3 cells was observed by confocal microscopy

2.4 M2 型巨噬细胞来源外泌体对 SKOV3 细胞自噬性凋亡的影响 流式细胞术检测结果显示, 与对照组比较, Exo 组 SKOV3 细胞凋亡率显著减少 ($P < 0.05$); 与 Exo 组比较, Exo + ABT-737 组 SKOV3 细胞凋亡率则显著增加 ($P < 0.05$), 见图 5。采用 GFP-mRFP-LC3 质粒转染 SKOV3 细胞后, 按照分组用

Exo 与 ABT-737 对细胞进行处理, 在共聚焦显微镜下观察自噬通量, Exo 组细胞 GFP 与 mRFP 的荧光斑点均较对照组显著减少 ($P < 0.05$), 说明自噬水平降低; 而 Exo + ABT-737 组细胞 GFP 与 mRFP 的荧光斑点均较 Exo 组显著增加 ($P < 0.05$), 说明自噬水平升高, 见图 6。

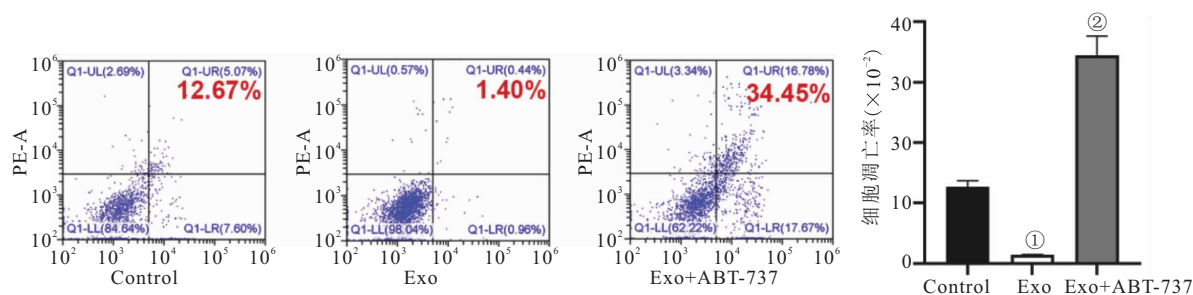


图 5 流式细胞术检测各组 SKOV3 细胞凋亡率

Figure 5 The apoptosis rate of SKOV3 cells in each group was determined by flow cytometry

注: 与对照组比较, ① $P < 0.05$; 与 Exo 组比较, ② $P < 0.05$ 。

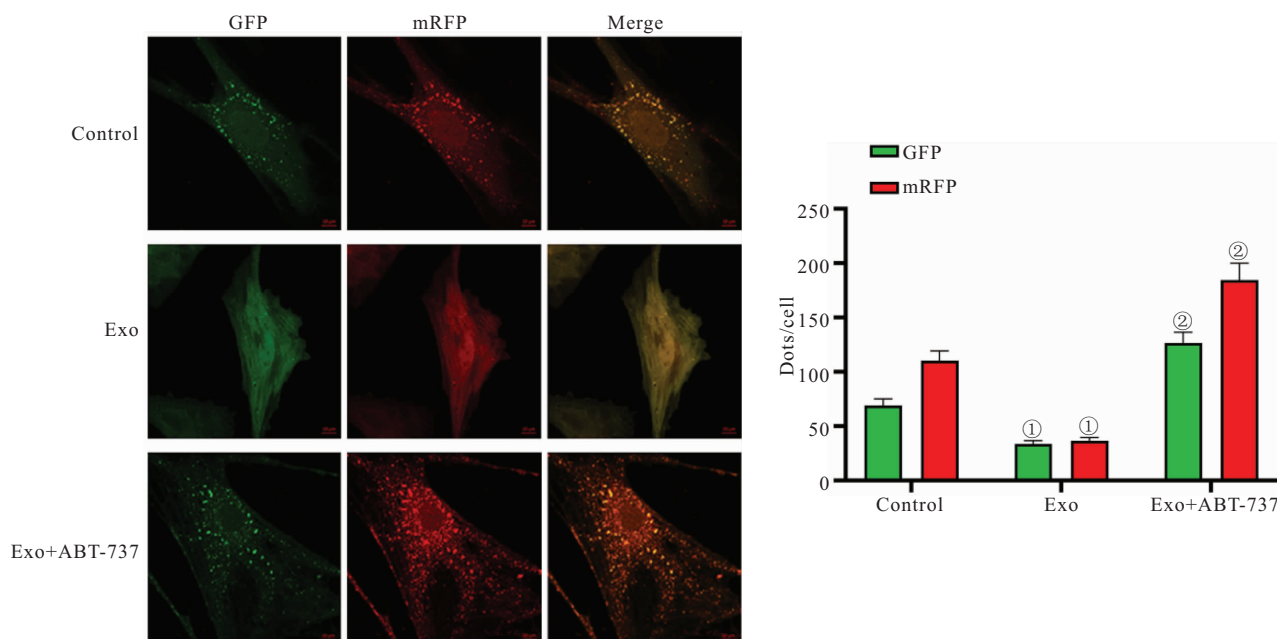


图 6 共聚焦显微镜观察各组 SKOV3 细胞自噬水平

Figure 6 Autophagy level of SKOV3 cells in each group was observed by confocal microscopy

注:与对照组比较,① $P<0.05$;与 Exo 组比较,② $P<0.05$ 。红色荧光斑点为自噬溶酶体,黄色荧光斑点为自噬体。

2.5 Western blot 检测各组 SKOV3 细胞自噬相关蛋白表达 与对照组比较,Exo 组细胞 LC3-II/LC3-I 与 Beclin-1 表达均显著下调, p62 表达显著上调 ($P<0.05$); 与 Exo 组比较, Exo+ABT-737 组细胞 LC3-II/LC3-I 与 Beclin-1 表达均显著上调而 p62 表达显著下调 ($P<0.05$)。此外,经过检测细胞内凋亡

相关蛋白发现,与对照组比较,Exo 组细胞 Bax 与 Cleaved-caspase3 表达均显著下调, Bcl-2 表达显著上调 ($P<0.05$); 与 Exo 组比较, Exo+ABT-737 组细胞 Bax 与活化的 caspase3 表达均显著上调, Bcl-2 表达则显著下调 ($P<0.05$)。见图 7。

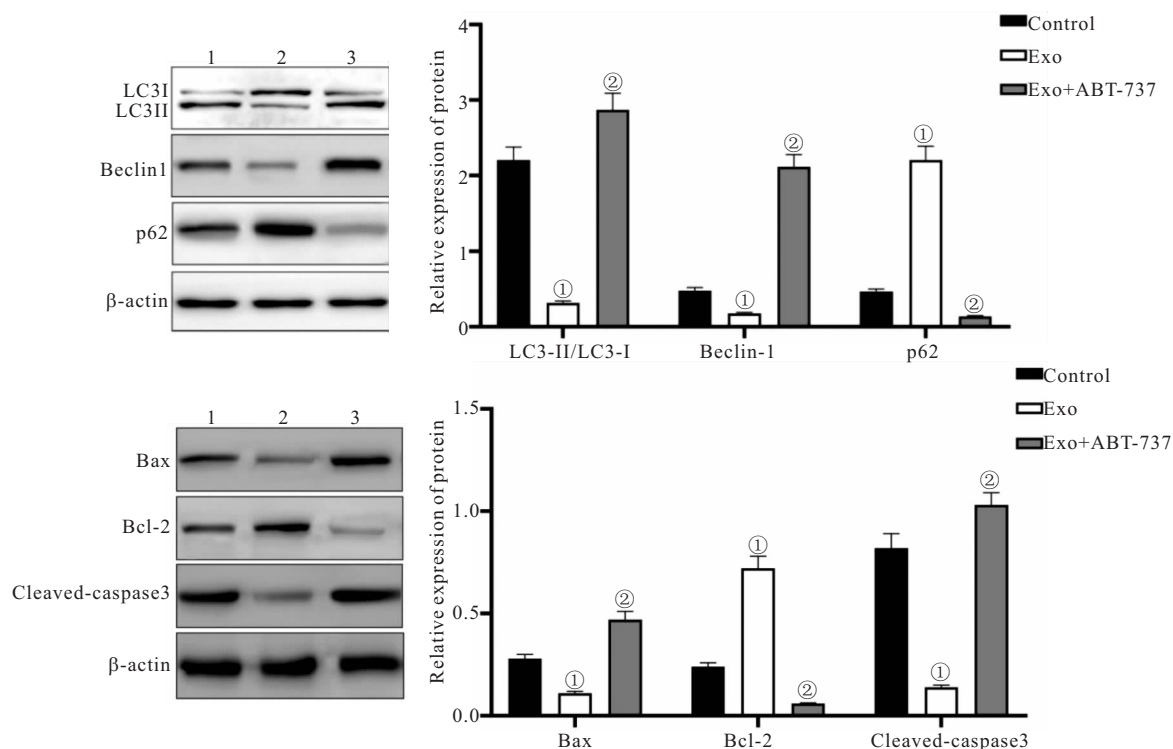


图 7 Western blot 检测各组 SKOV3 细胞自噬相关蛋白表达

Figure 7 The autophagy related protein expression of SKOV3 cells in each group was detected by Western blot

注:1. 对照组;2. Exo 组;3. Exo+ABT-737 组。与对照组比较,① $P<0.05$;与 Exo 组比较,② $P<0.05$ 。

2.6 M2 型巨噬细胞来源外泌体对 SKOV3 细胞干性特征的影响 肿瘤细胞成球实验检测结果显示,与对照组比较,Exo 组 SKOV3 细胞成球数量显著增加 ($P < 0.05$);与 Exo 组比较,Exo+ABT-737 组细胞成球数量显著减少 ($P < 0.05$)。见图 8。Western blot

检测各组 SKOV3 细胞干性相关蛋白表达,结果显示,Exo 组 SKOV3 细胞内 CD133、OCT4 及 SOX2 表达均显著高于对照组 ($P < 0.05$);与 Exo 组比较,Exo+ABT-737 组细胞内 CD133、OCT4 及 SOX2 表达均显著下调 ($P < 0.05$)。见图 9。

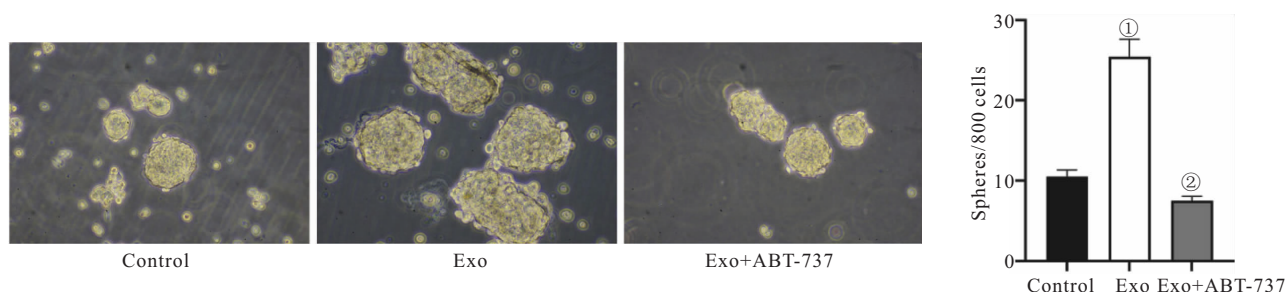


图 8 肿瘤细胞成球实验检测各组 SKOV3 细胞干性

Figure 8 SKOV3 cell dryness was detected by tumor cell pellet formation

注:与对照组比较,① $P < 0.05$;与 Exo 组比较,② $P < 0.05$ 。

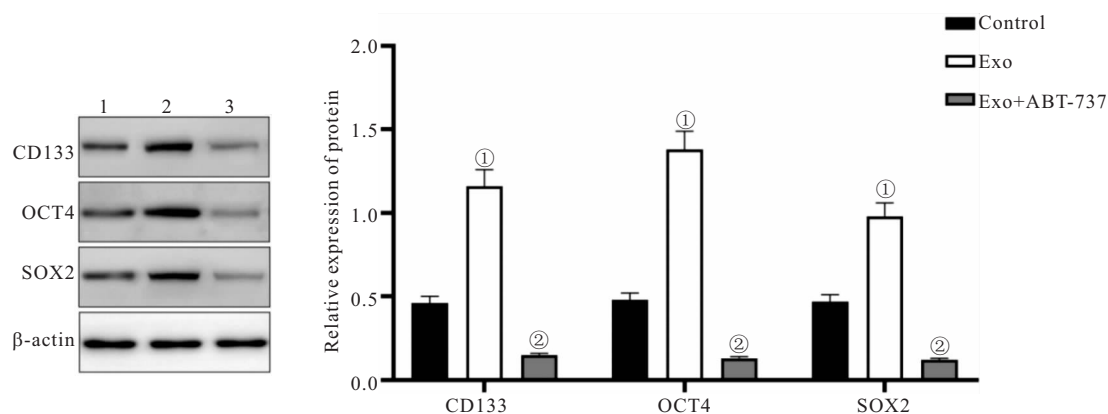


图 9 Western blot 检测各组 SKOV3 细胞内干性相关蛋白表达

Figure 9 The expression of SKOV3 cells in each group was detected by Western blot

注:1. 对照组;2. Exo 组;3. Exo+ABT-737 组。与对照组比较,① $P < 0.05$;与 Exo 组比较,② $P < 0.05$ 。

3 讨论

肿瘤进展不仅取决于恶性细胞的特征,还取决于整个肿瘤微环境的变化。免疫细胞群是肿瘤进展的重要参与者,包括肿瘤转移过程。在原发性卵巢肿瘤和腹水中,主要的免疫细胞群由巨噬细胞组成,包括两个主要来源:一是组织驻留巨噬细胞,来源于胚胎卵黄囊;二是从骨髓来源的单核细胞中募集的浸润性巨噬细胞^[10]。在肿瘤微环境中,这些巨噬细胞被转化为 TAM,并在肿瘤发展、转移、侵袭和血管生成中发挥着不可或缺的作用。TAM 是高度可塑性细胞,其可以表现出两种表型,即抗肿瘤 M1 型和促肿瘤 M2 型。然而在卵巢癌微环境中,TAM 通常表现出 M2 表型,在不同程度上促进卵巢癌进展,包括促进肿瘤细胞免疫逃逸、转移以及血管生成过程^[11]。大量研究表明,M2 型 TAM 在肿瘤中的高水平与患者的低总生存率之间存在正相关,并可作为预后不良的预测因

素之一^[12-13]。

M2 型 TAM 的主要促肿瘤功能是通过分泌多种细胞因子、趋化因子、酶、microRNA、Exo 等来发挥作用的,通过触发其促生存信号通路直接诱导卵巢癌细胞的侵袭潜力和化学抗性。此外,TAM 与其他免疫细胞相互作用,如淋巴细胞、自然杀伤细胞和树突状细胞,以抑制这些免疫细胞的反应,从而导致免疫抑制的发展^[14]。过往研究表明,M2 型 TAM 来源的 Exo 通过转移其遗传内容在细胞间通讯中发挥关键作用,影响肿瘤的增殖、凋亡、转移以及免疫逃逸。例如,Zheng 等^[15]研究表明 M2 型 TAM 来源的 Exo 通过 PI3K-AKT 信号通路促进胃癌细胞的迁移,该作用是通过 Exo 介导的功能性 ApoE 蛋白从 TAM 转移到肿瘤细胞实现的;Yang 等^[16]研究指出 M2 型 TAM 与胰腺导管腺癌组织的微血管密度呈正相关,M2 型 TAM 来源的 Exo 在体外可以促进小鼠主动脉内皮细

胞的血管生成,同时其还可以促进胰腺导管腺癌移植瘤模型小鼠的皮下肿瘤生长,并增加组织内血管密度。Lan 等^[17]研究结果显示 M2 型 TAM 来源的 Exo 能够促进结直肠癌细胞的迁移和侵袭,该作用依赖于该外泌体内 miR-21-5p 和 miR-155-5p 的高表达水平。在本研究中,经 M2 型 TAM 来源的 Exo 处理卵巢癌细胞后发现,细胞凋亡率下降,细胞自噬水平也降低,这一结果也提示 M2 型 TAM 来源的 Exo 在卵巢癌中可能发挥促肿瘤作用。

Bcl-2 是 Bcl-2 家族的抗凋亡蛋白成员,已在多种人类癌症类型中检测到 Bcl-2 表达上调。作为一种 Bcl-2 小分子抑制剂,ABT-737 能与 Bim 竞争结合 Bcl-2,导致 Bim 释放并触发 Bax/Bak 介导的细胞凋亡^[9]。过往的研究显示,ABT-737 不仅单独发挥抗肿瘤作用,还能够与一些药物或分子发挥协同作用来增强细胞凋亡或提高肿瘤细胞对放化疗的敏感性。例如,ABT-737 能够增强肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体诱导的胶质母细胞瘤凋亡^[18]。在 ABT-737 和辐照共同处理的宫颈癌细胞中 G1 期百分比增加,且 ABT-737 通过介导细胞中的 ROS 依赖性凋亡途径来增强辐照诱导的宫颈癌细胞凋亡^[19]。本研究结果显示,在 M2 型 TAM 来源的 Exo 处理的卵巢癌中加入 ABT-737 后,细胞凋亡率增加,Bax 与活化的 caspase3 表达均上调,Bcl-2 表达则下调,同时细胞内自噬水平也明显升高,LC3-II/LC3-I 与 Beclin-1 表达均上调而 p62 表达下调。Bax 也是控制细胞凋亡的主要因素,是一种促细胞凋亡因子。Caspase 家族是细胞凋亡易感性中的关键调节剂,其中活化的 caspase-3 可以诱导细胞凋亡^[20]。自噬作为一种降解长寿蛋白质和细胞器的分解代谢过程,可以由多种刺激触发,例如营养剥夺、蛋白质聚集和活性氧等^[21]。目前,自噬在肿瘤研究中引起了越来越多的关注,通过诱导肿瘤细胞持续自噬,导致肿瘤细胞发生自噬性凋亡是靶向激活自噬抗卵巢癌的主要机制^[22]。由此可见,激活自噬性凋亡可作为癌症治疗的一项策略。本研究结果显示,经过 M2 型 TAM 来源的 Exo 处理的卵巢癌细胞成球数量增加,肿瘤干细胞标志蛋白 CD133、OCT4 及 SOX2 表达上调,而加入 ABT-737 处理能够减少细胞成球数量,并下调 CD133、OCT4 及 SOX2 表达,由此推测,M2 型 TAM 来源的 Exo 能够促进卵巢癌细胞干性,而 ABT-737 则能够发挥抑制卵巢癌细胞干性的作用。肿瘤干细胞是肿瘤内少数具有干细胞特性的癌细胞,具有自我更新和分化的特点,也是唯一具有启动肿瘤发生的肿瘤细胞亚群。以往研究表明,肿瘤微环境中的 TAM 可增强恶性肿瘤的细胞干性^[23],肿

瘤干细胞的靶向治疗是改善 EOC 患者预后的一项有效措施。

4 结论

综上所述,M2 型 TAM 来源的 Exo 可以抑制卵巢癌细胞发生自噬性凋亡,增强卵巢癌细胞的干性特征,而 ABT-737 可激活 M2 型 TAM 来源的 Exo 处理的卵巢癌细胞自噬从而诱导细胞凋亡,并减弱卵巢癌细胞的干性特征。该结果为 ABT-737 作为卵巢癌治疗或辅助治疗药物提供理论基础,但具体机制有待后续进行深入探究。

【参考文献】

- [1] WINTERHOFF B J, MAILE M, MITRA A K, *et al.* Single cell sequencing reveals heterogeneity within ovarian cancer epithelium and cancer associated stromal cells[J]. *Gynecol Oncol*, 2017, 144(3):598-606.
- [2] YANG C, XIA B R, ZHANG Z C, *et al.* Immunotherapy for ovarian cancer: adjuvant, combination, and neoadjuvant[J]. *Front Immunol*, 2020, 11:577869.
- [3] MORAND S, DEVANABOYINA M, STAATS H, *et al.* Ovarian cancer immunotherapy and personalized medicine[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(12):6532.
- [4] VINAY D S, RYAN E P, PAWELEC G, *et al.* Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies[J]. *Semin Cancer Biol*, 2015, 35:S185-S198.
- [5] HEATH O, BERLATO C, MANIATI E, *et al.* Chemotherapy induces tumor-associated macrophages that aid adaptive immune responses in ovarian cancer[J]. *Cancer Immunol Res*, 2021, 9(6):665-681.
- [6] LUO X, XU J, YU J, *et al.* Shaping immune responses in the tumor microenvironment of ovarian cancer[J]. *Front Immunol*, 2021, 12:692360.
- [7] NOWAK M, KLINK M. The role of tumor-associated macrophages in the progression and chemoresistance of ovarian cancer[J]. *Cells*, 2020, 9(5):1299.
- [8] ZHANG L, YU D. Exosomes in cancer development, metastasis, and immunity[J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2019, 1871(2):455-468.
- [9] 姚瑶,夏敏,侯聪,等. ABT-737 对 TAMs 与 SKOV3 细胞共培养中卵巢癌细胞生长与血管拟生作用的影响[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2022, 27(2):144-153.
- [10] HAN Q, HUANG B, HUANG Z, *et al.* Tumor cell fibroblast heterotypic aggregates in malignant ascites of patients with ovarian cancer[J]. *Int J Mol Med*, 2019, 44(6):2245-2255.
- [11] CHENG H, WANG Z, FU L, *et al.* Macrophage polarization in the development and progression of ovarian cancers: an overview[J]. *Front Oncol*, 2019, 9:421.
- [12] TAN Q, LIU H, XU J, *et al.* Integrated analysis of tumor-associated macrophage infiltration and prognosis in ovarian cancer[J]. *Aging (Albany NY)*, 2021, 13(19):23210-23232.

- [7] DU X, ZHANG L, LI X, *et al.* TGF- β signaling controls FSHR signaling-reduced ovarian granulosa cell apoptosis through the SMAD4/miR-143 axis[J]. *Cell Death Dis*, 2016, 7(11):2476-2487.
- [8] DU X, PAN Z, LI Q, *et al.* SMAD4 feedback regulates the canonical TGF- β signaling pathway to control granulosa cell apoptosis[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(2):151-162.
- [9] MARTINEZ-RUIZ G U, MORALES-SANCHEZ A, PACHECO-HERNANDEZ A F. Roles played by YY1 in embryonic, adult and cancer stem cells[J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2021, 17(5):1590-1606.
- [10] GRIFFITH G J, TRASK M C, HILLER J, *et al.* Yin-yang1 is required in the mammalian oocyte for follicle expansion[J]. *Biol Reprod*, 2011, 84(4):654-663.
- [11] ZHOU M, LIU X, QIU KAI E, *et al.* Long non-coding RNA Xist regulates oocyte loss via suppressing miR-23b-3p/miR-29a-3p maturation and upregulating STX17 in perinatal mouse ovaries[J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(6):540-553.
- [12] HU M, GAO T, DU Y. MiR-98-3p regulates ovarian granulosa cell proliferation and apoptosis in polycystic ovary syndrome by targeting YY1[J]. *Med Mol Morphol*, 2021, 10, 1007/s00795-021-00307-4.
- [13] KURISAKI K, KURISAKI A, VALCOURT U, *et al.* Nuclear factor YY1 inhibits transforming growth factor beta- and bone morphogenetic protein-induced cell differentiation[J]. *Mol Cell Biol*, 2003, 23(13):4494-4510.
- [14] TAN C Y, WONG J X, CHAN P S, *et al.* Yin Yang 1 suppresses dilated cardiomyopathy and cardiac fibrosis through regulation of Bmp7 and Ctgf[J]. *Circ Res*, 2019, 125(9):834-846.
- [15] YU M, LIU J. MicroRNA-30d-5p promotes ovarian granulosa cell apoptosis by targeting Smad2[J]. *Exp Ther Med*, 2020, 19(1):53-60.
- [16] MACHACKOVA T, VYCHYTILOVA-FALTEJSKOVA P, SOUCKOVA K, *et al.* MiR-215-5p reduces liver metastasis in an experimental model of colorectal cancer through regulation of ECM-receptor interactions and focal adhesion[J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12(12):3518-3538.
- [17] XIONG X, HE Q, LIU J, *et al.* MicroRNA miR-215-5p regulates doxorubicin-induced cardiomyocyte injury by targeting ZEB2[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2021, 78(4):622-629.
- [18] ZHU X, SUN J. CircHIPK3 regulates melanoma cell behaviors by binding with miR-215-5p to upregulate YY1[J]. *Mol Cell Probes*, 2020, 53(1):101644-101656.
- [19] ZHEN J, LI J, LI X, *et al.* Downregulating lncRNA NEAT1 induces proliferation and represses apoptosis of ovarian granulosa cells in polycystic ovary syndrome via microRNA-381/IGF1 axis[J]. *J Biomed Sci*, 2021, 28(1):53-66.
- [20] XU Y, PAN CS, LI Q, *et al.* The ameliorating effects of bushen huatan granules and kunling wan on polycystic ovary syndrome induced by dehydroepiandrosterone in rats [J]. *Front Physiol*, 2021, 12(1):525145-525162.
- [21] GAO P, LI L, YANG L, *et al.* Yin Yang 1 protein ameliorates diabetic nephropathy pathology through transcriptional repression of TGF β 1[J]. *Sci Transl Med*, 2019, 11(510):2050-2065.
- [22] YAN X, PAN J, XIONG W, *et al.* Yin Yang 1 (YY1) synergizes with Smad7 to inhibit TGF- β signaling in the nucleus[J]. *Sci China Life Sci*, 2014, 57(1):128-136.

(收稿日期: 2022-03-15; 修回日期: 2022-12-09; 编辑: 张翰林)

(上接第 661 页)

- [13] COLVIN E K. Tumor-associated macrophages contribute to tumor progression in ovarian cancer[J]. *Front Oncol*, 2014, 4:137.
- [14] CHEN Y, SONG Y, DU W, *et al.* Tumor-associated macrophages: an accomplice in solid tumor progression[J]. *J Biomed Sci*, 2019, 26(1):78.
- [15] ZHENG P, LUO Q, WANG W, *et al.* Tumor-associated macrophages-derived exosomes promote the migration of gastric cancer cells by transfer of functional Apolipoprotein E[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(4):434.
- [16] YANG Y, GUO Z, CHEN W, *et al.* M2 macrophage-derived exosomes promote angiogenesis and growth of pancreatic ductal adenocarcinoma by targeting E2F2[J]. *Mol Ther*, 2021, 29(3):1226-1238.
- [17] LAN J, SUN L, XU F, *et al.* M2 macrophage-derived exosomes promote cell migration and invasion in colon cancer[J]. *Cancer Res*, 2019, 79(1):146-158.
- [18] CRISTOFANON S, FULDA S. ABT-737 promotes tBid mitochondrial accumulation to enhance TRAIL-induced apoptosis in glioblastoma cells[J]. *Cell Death Dis*, 2012, 3(11):e432.
- [19] SHEN H P, WU W J, KO J L, *et al.* Effects of ABT-737 combined with irradiation treatment on uterine cervical cancer cells [J]. *Oncol Lett*, 2019, 18(4):4328-4336.
- [20] ZHANG C, WANG M, SHI C, *et al.* Long non-coding RNA Linc00312 modulates the sensitivity of ovarian cancer to cisplatin via the Bcl-2/Caspase-3 signaling pathway[J]. *Biosci Trends*, 2018, 12(3):309-316.
- [21] FERRARESI A, GIRONE C, ESPOSITO A, *et al.* How autophagy shapes the tumor microenvironment in ovarian cancer[J]. *Front Oncol*, 2020, 10:599915.
- [22] CHEN X, LAN H, HE D, *et al.* Analysis of autophagy-related signatures identified two distinct subtypes for evaluating the tumor immune microenvironment and predicting prognosis in ovarian cancer[J]. *Front Oncol*, 2021, 11:616133.
- [23] YIN M, LI X, TAN S, *et al.* Tumor-associated macrophages drive spheroid formation during early transcoelomic metastasis of ovarian cancer[J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(11):4157-4173.

(收稿日期: 2022-07-07; 修回日期: 2022-12-09; 编辑: 张翰林)