

DOI: 10.12037/YXQY.2024.02-08

经血间充质干细胞外泌体对人卵巢癌细胞A2780生物学行为的影响

陆茜林¹, 丁娜¹, 贺红林¹, 袁怡君¹, 贺天文¹, 冯露¹, 田超², 刘康³, 李均¹ (1. 川北医学院第二临床医学院(南充市中心医院)妇科, 四川 南充 637000; 2. 川北医学院第二临床医学院(南充市中心医院)烧伤整形美容外科, 四川 南充 637000; 3. 川北医学院第二临床医学院(南充市中心医院)组织工程与干细胞研究所, 四川 南充 637000)

【摘要】 目的 探讨经血源性间充质干细胞(menstrual blood-derived mesenchymal stem cells, MenSCs)来源的外泌体(MenSCs-derived exosomes, MenSCs-Exos)对人卵巢癌细胞A2780增殖、迁移、侵袭能力和细胞周期分布的影响和机制。**方法** 分离纯化MenSCs, 流式细胞术鉴定其细胞表型, 油红O染色观察其成脂分化能力; 超速离心法分离MenSCs-Exos, 电子显微镜观察外泌体形态, 纳米颗粒追踪分析其大小及分布, 蛋白免疫印迹法检测外泌体标志性蛋白分子CD9、TSG101、calnexin的表达。采用CCK-8实验、划痕实验、Transwell细胞体外侵袭实验、流式细胞仪检测MenSCs-Exos对A2780细胞增殖、迁移、侵袭能力和细胞周期分布的影响; 蛋白免疫印迹法检测Wnt/ β -catenin信号通路相关蛋白和迁移相关蛋白的表达。**结果** 成功分离具有干细胞表型和成脂分化潜能的MenSCs, 同时检测发现MenSCs-Exos为边缘清晰、大小分布均匀的膜性囊泡, 粒径为30~150 nm, 平均为72.89 nm, 膜表面标志性蛋白CD9、TSG101表达呈阳性, calnexin表达呈阴性。与对照组相比, MenSCs-Exos能增强A2780细胞增殖、迁移和侵袭能力, 影响其细胞周期分布, 并且可上调 β -catenin、c-Myc、TCF4、CyclinD1、Vimentin、N-cadherin的表达, 下调E-cadherin的表达。**结论** MenSCs-Exos可能是通过激活Wnt/ β -catenin信号通路促进A2780细胞增殖, 并通过下调E-cadherin的表达促进A2780细胞的迁移和侵袭。

【关键词】 外泌体; 经血源间充质干细胞; 卵巢癌; Wnt/ β -catenin信号通路

Effects of exosomes derived from menstrual blood-derived mesenchymal stem cells on biological behavior of human ovarian cancer cell line A2780

Lu Xilin¹, Ding Na¹, He Honglin¹, Yuan Yijun¹, He Tianwen¹, Feng Lu¹, Tian Chao², Liu Kang³, Li Jun¹ (1. Department of Obstetrics and Gynecology, Nanchong Central Hospital, the Second Clinical Medical College, North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, Sichuan, China; 2. Department of Burn and Plastic Surgery, Nanchong Central Hospital, the Second Clinical Medical College, North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, Sichuan, China; 3. Institute of Tissue Engineering and Stem Cell Research, Nanchong Central Hospital, The Second Clinical Medical College of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, Sichuan, China)

Corresponding author: Li Jun, E-mail: lijun@nsmc.edu.cn

【Abstract】 Objective To investigate the effect and mechanism of menstrual blood-derived mesenchymal stem cells (MenSCs) derived exosomes (MenSCs-Exos) on proliferation, migration, invasion and cell cycle distribution of human ovarian cancer cell line A2780. **Methods** MenSCs were isolated and purified, cell phenotype was identified by flow cytometry, adipogenic differentiation ability was observed by red oil O staining, MenSCs-Exos were isolated by ultracentrifugation, the morphology of exosomes were observed by electron microscope, the size and distribution were analyzed by NTA, and the expression of CD9, calnexin and TSG101 were detected by Western blot. The effects of MenSCs-Exos on the proliferation, migration, invasion and cell cycle distribution of A2780 cells were detected by CCK-8 assay, wound healing assay, Transwell migration and invasion assay and flow cytometry. The expression of Wnt/ β -catenin signaling pathway related proteins and migration related proteins were detected by Western blot. **Results** MenSCs with stem cell phenotype, osteogenic and adipogenic differentiation potential were successfully isolated. At the same time, MenSCs-Exos was found a membranous vesicle with clear edge and uniform size distribution, the diameter of which was about 30-150 nm, with an average of 72.89 nm. The expression of CD9 and TSG101 on the membrane surface was positive, while the expression of calnexin was

基金项目: 南充市校科技战略合作项目(22SXQT0134)

通信作者: 李均 E-mail: lijun@nsmc.edu.cn

negative. Compared with the control group, MenSCs-Exos treatment group could enhance the ability of proliferation, migration and invasion of A2780 cells, affect the distribution of cell cycle and up-regulate the expression of β -catenin, c-Myc, TCF4, CyclinD1, Vimentin and N-cadherin, and down-regulate the expression of E-cadherin. **Conclusion** MenSCs-Exos may promote the proliferation of ovarian cancer cells by activating Wnt/ β -catenin signal pathway and promote the migration and invasion of A2780 cells by up-regulating the expression of E-cadherin.

【Keywords】 Exosomes; Menstrual blood-derived mesenchymal stem cells; Ovarian cancer; Wnt/ β -catenin signal pathway

Fund Program: Nanchong Municipal School of Science and Technology Strategic Cooperation Special Project (22SXQT0134)

据全球癌症 2020 年统计报告 (GLOBOCAN 2020)^[1]显示, 卵巢癌在 2020 年全球 185 个国家/地区新发癌症的女性病例中占比 3.4%, 在新发癌症女性死亡病例中占比高达 4.7%, 发病率和死亡率仅次于宫颈癌, 给全球女性健康带来极大威胁。大多数卵巢癌患者在肿瘤扩散到腹腔腔和上腹部器官后才得到诊断, 导致卵巢癌的死亡率居高不下^[2]。目前手术、以铂类药物为基础的联合化疗及靶向治疗在卵巢癌的治疗中取得了阶段成果, 但卵巢癌的转移、侵袭机制尚未明确, 探究其转移、侵袭机制并研制新的治疗方式对卵巢癌的治疗至关重要。经血间充质干细胞 (menstrual blood-derived mesenchymal stem cells, MenSCs) 是来源于中胚层的多能干细胞, 隶属于间充质干细胞家族, 具有强大的增殖和自我更新能力, 可分泌多种胞外囊泡参与机体生物过程^[3]。已有研究证实 MenSCs 来源的外泌体 (MenSCs-derived exosomes, MenSCs-Exos) 可通过多种作用机制促进受损卵巢组织再生^[4]。但目前 MenSCs-Exos 在卵巢癌发生发展中的作用机制仍不明确。

本研究以 MenSCs-Exos 和人卵巢癌细胞株 A2780 为研究对象, 观察 MenSCs-Exos 共培养对人卵巢癌细胞株 A2780 生物学行为的影响, 为后续深入研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

实验用经血由年龄 25~35 岁的健康成年女性捐赠。本研究通过南充市中心医院医学伦理委员会批准 (伦理号: 2022-045)。人卵巢癌细胞株 A2780 购自上海轩祎生物科技有限公司。

1.2 主要仪器和试剂

DMEM/F12 培养基、RPMI-1640 培养基、青-链霉素 (penicillin and streptomycin, PS)、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、0.25% 胰蛋白酶 (含 EDTA) 购自以色列 Biological Industries;

磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered solution, PBS) 购自美国 Hyclone; 油红 O 染料购自美国 Cyagen; 成脂诱导分化培养基试剂盒购自美国 Cyagen; Matrigel 基质胶购自美国 Corning; BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; CCK-8 试剂盒、周期试剂盒购自江苏凯基生物技术有限公司; 碘化丙啶购自北京索莱宝生物科技有限公司; 结晶紫购自中国白鲨; 发光试剂盒购自美国 Millipore; 磷酸酶抑制剂混合液购自上海雅酶生物医药科技有限公司。一抗 CD9 (ab92726)、TSG101 (ab125011)、Calnexin (ab22595) 购自英国 Abcam; c-Myc (HA721182)、cyclin D1 (ET1601-31)、TCF4 (ET1610-73)、 β -catenin (ET1601-5)、GAPDH (ET1601-4)、 β -actin (M1210-2)、Vimentin (ET1610-39)、N-cadherin (ET1607-37)、E-cadherin (ET1607-75)、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗 (HA1001)、辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗 (HA1006) 购自杭州华安生物技术有限公司。

1.3 MenSCs 的分离培养及鉴定

取适量健康月经血加入等体积 PBS (含 2% PS) 中, 混合均匀后轻柔加入淋巴细胞分离液中, 2 000 r/min 离心 10 min, 取白膜层, 800 r/min 离心 5 min, 弃上清, 含 10% FBS 的 DMEM/F12 培养基洗涤两次, 然后将其悬浮在含有 10% FBS、1% PS 的 DMEM/F12 培养基中, 在 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。细胞培养基每 2 天更换一次, 当细胞达到 90% 融合时, 用含 EDTA 的 0.25% 胰蛋白酶消化, 并以 1:3 的比例传代。取第 3 代细胞于倒置相差显微镜下观察细胞形态。流式细胞术鉴定细胞表面标志性抗原 CD73、CD90、CD105、CD34 和 HLA-DR, 成脂诱导分化培养基试剂盒说明书方法进行成脂诱导, 22 d 后行油红 O 染色, 在倒置显微镜下观察脂滴形成情况。

1.4 MenSCs-Exos 的分离培养及鉴定

取第 3~5 代生长良好 MenSCs, 待细胞融合率

达80%时,更换为不含血清的DMEM/F12培养基培养,48 h后收集MenSCs上清培养液,4℃条件下2 000 g离心30 min,取上清10 000 g离心30 min,再取上清100 000 g离心70 min。PBS重悬收集沉淀后100 000 g离心70 min。PBS重悬收集沉淀,置于-80℃保存备用。透射电镜观察MenSCs-Exos形态;蛋白免疫印迹法检测MenSCs-Exos膜表面标志性蛋白CD9、TSG101、Calnexin;纳米颗粒跟踪分析仪检测MenSCs-Exos粒径分布。

1.5 MenSCs-Exos对卵巢癌细胞株A2780增殖、迁移的影响

1.5.1 CCK-8法检测MenSCs-Exos对A2780细胞增殖的影响 A2780细胞以含10%FBS的RPMI-1640培养基培养,培养条件为37℃、5%CO₂,待生长状态良好的A2780细胞长至70%融合度时,采用含EDTA的0.25%胰蛋白酶消化,以10 000个/孔接种于96孔板,每孔加入RPMI-160培养基100 μl,待细胞贴壁后,将细胞分成共培养组和对照组,吸净原培养基,共培养组分别添加含MenSCs-Exos颗粒浓度为 1×10^6 particle/ml、 5×10^6 particle/ml、 1×10^7 particle/ml、 5×10^7 particle/ml的RPMI-1640培养基,对照组加入不含MenSCs-Exos的RPMI-1640培养基;在培养第1、2、3天,每孔加入10 μl CCK-8溶液,继续孵育1 h后,采用多功能酶标仪检测450 nm波长下吸光值(OD₄₅₀),绘制细胞生长曲线。实验独立重复3次。

1.5.2 划痕实验检测MenSCs-Exos对A2780细胞迁移的影响 在6孔板底部均匀划宽约0.5 mm标记线,取上述A2780细胞以 1×10^6 个/孔接种于6孔板中,每孔加入等量含10%FBS的RPMI-1640培养基,待细胞密度达70%时,取无菌的200 μl移液枪枪头垂直在6孔板内部划线,保持每条划痕宽度均匀一致且与标记线垂直,弃去原培养基,无菌PBS洗涤两次,在倒置显微镜下观察并拍照,将细胞分为共培养组和对照组,共培养组加入含MenSCs-Exos颗粒浓度为 1×10^7 particle/ml的10%FBS RPMI-1640培养基,对照组加入不含MenSCs-Exos的10%FBS RPMI-1640培养基,留置培养箱常规培养,在划痕后36 h、72 h时用显微镜拍照记录。采用Image J软件测定划痕迁移率。迁移率(%) = 迁移距离/划痕距离 ×

100%。实验独立重复3次。

1.5.3 Transwell实验检测MenSCs-Exos对A2780细胞迁移、侵袭的影响 Transwell小室置于24孔板内,取生长密度为70%的A2780细胞,用含EDTA的0.25%胰蛋白酶消化,无血清RPMI-1640培养基洗涤两遍后重悬,上室中加入10 000个A2780细胞(200 μl),共培养组下室中加入600 μl含MenSCs-Exos颗粒浓度为 1×10^7 particle/ml的20%FBS RPMI-1640培养基,对照组加入不含MenSCs-Exos的20%FBS RPMI-1640培养基600 μl,培养36 h后取出小室,棉签擦拭上室细胞,10%甲醇固定30 min,0.5%结晶紫染色10 min,显微镜下随机取3个视野计数迁移细胞数目并取平均值。侵袭实验:4℃冰箱过夜融化Matrigel基质胶,将基质胶与无血清RPMI-1640培养基按1:4稀释后,均匀铺在Transwell小室底部膜的上室面(45 μl),37℃干燥后待用。上室加入上述A2780细胞10 000个(155 μl),将细胞分为共培养组和对照组,共培养组下室中加入600 μl含MenSCs-Exos颗粒浓度为 1×10^7 particle/ml的20%FBS RPMI-1640培养基,对照组加入不含MenSCs-Exos的20%FBS RPMI-1640培养基600 μl,培养36 h后取出小室,后续操作同迁移试验,所有实验重复3次。

1.6 MenSCsExos对卵巢癌细胞株A2780周期的影响

常规消化收集对数生长期的A2780细胞,接种于6孔板中,待生长融合至50%~60%,将细胞分为共培养组和对照组,共培养组加入2 ml含MenSCs-Exos颗粒浓度为 1×10^7 particle/ml的10%FBS RPMI-1640培养基,对照组加入不含MenSCs-Exos的10%FBS RPMI-1640培养基2 ml,置于37℃、5%CO₂孵育箱中培养24 h后取出培养板,常规消化后4℃1 000 r离心5 min,重复两次,弃上层液体,加入1 ml预冷的75%乙醇溶液重悬,4℃过夜。取出细胞,4℃2 000 r离心5 min去除乙醇,PBS洗涤1遍,加入提前配制好的500 μl碘化丙啶/RNase A染色工作液,室温避光30~60 min后采用流式细胞仪检测细胞周期,记录激发波长488 nm处红色荧光。

1.7 蛋白免疫印迹法检测Wnt/β-catenin信号通路相关蛋白的表达

常规消化收集对数生长期的A2780细胞,接种于

6孔板中,待生长融合至50%~60%,将细胞分为共培养组和对照组,共培养组加入2 ml含MenSCs-Exos颗粒浓度为 1×10^7 particle/ml的10%FBS RPMI-1640培养基,对照组加入不含MenSCs-Exos的10%FBS RPMI-1640培养基2 ml,置于37℃,5%CO₂孵育箱中培养24 h后取出培养板,分别提取两组细胞总蛋白,BCA蛋白浓度测试盒测定并将样品调定至统一浓度,混合蛋白上样缓冲液后金属浴37℃煮5 min使蛋白变性,分装-80℃保存。配制10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶行蛋白质电泳,干转法将凝胶中的蛋白质转移至PVDF膜,5%脱脂奶粉封闭,用抗 β -catenin、TCF-4、c-Myc、cyclin D1、GAPDH、 β -actin、Vimentin、N-cadherin的一抗4℃孵育过夜,PBST清洗3次,添加与一抗种属对应的二抗,室温孵育1 h,PBST清洗3次,1:1加入发光液,显影,定影,以目的条带和GAPDH、 β -actin条带的灰度值比值作为蛋白表达水平。

1.8 统计学方法

采用SPSS26.0软件和Graphpad Prism9.0软件对实验结果进行统计学分析和作图,计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 MenSCs的分离、培养和鉴定

倒置相差显微镜下可见第三代MenSCs状态良好,呈均一长梭形,细胞生长密集后呈成纤维细胞样梭形(图1A),油红O染色可见红色脂滴形成(图1B),流式细胞仪检测证实,源于中胚层的细胞表型标志物CD105、CD73、CD90在MenSCs中明显高表达,其阳性率分别为99.24%、99.93%与97.96%;造血细胞表型标志物CD34和HLA-DR,在MenSCs中低表达,其阳性率分别是1.43%和0.56%(图1C)。

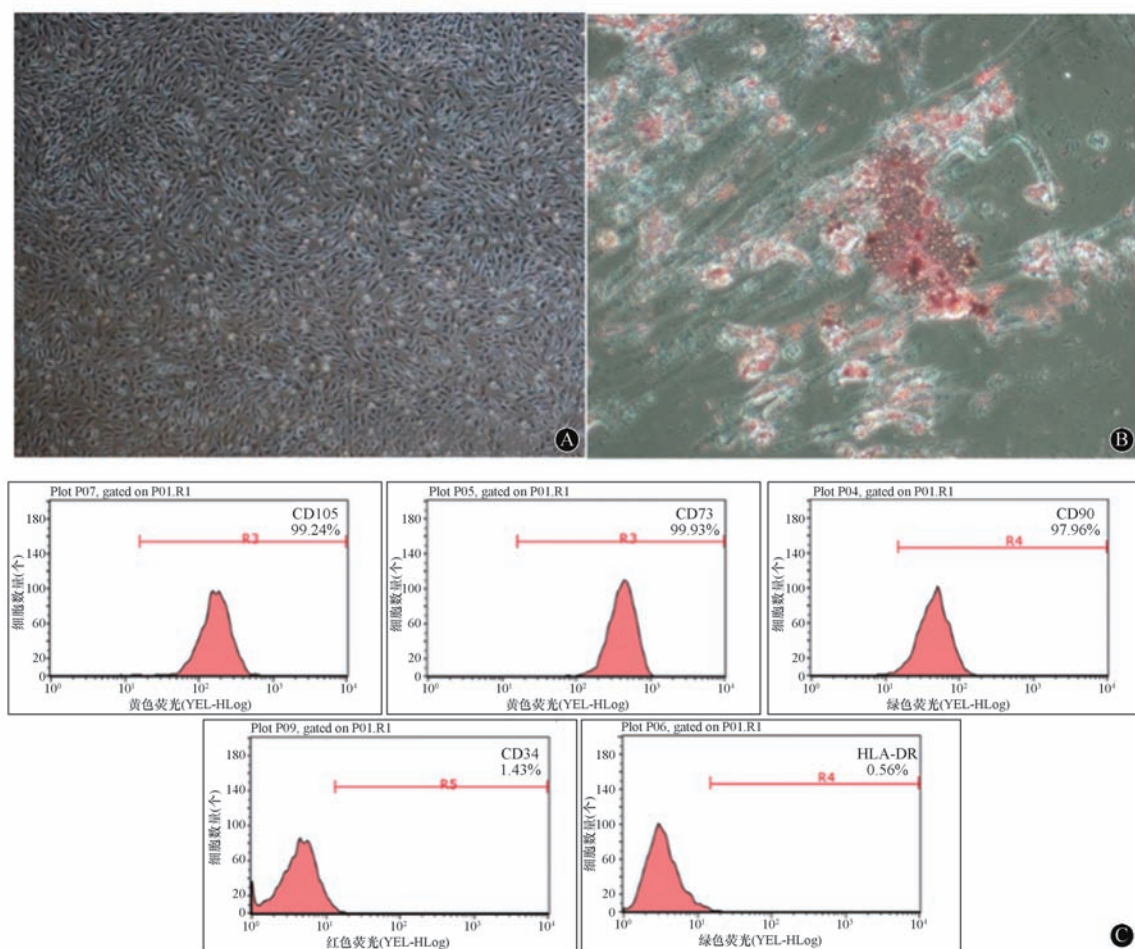


图1 MenSCs的鉴定

注:A,倒置相差显微镜下观察MenSCs的形态,放大倍数100×;B,油红O染色鉴定MenSCs的成脂分化能力,放大倍数200×;C,流式细胞术检测MenSCs的免疫表型。MenSCs,经血间充质干细胞。

2.2 MenSCs-Exos 的提取及鉴定

透射电镜下可见 MenSCs-Exos 为大小分布均匀的茶杯状膜性囊泡(图 2A), 纳米颗粒跟踪分析仪检测粒径为 30~150 nm, 平均为 72.89 nm (图 2B)。蛋白免疫印迹法检测膜表面标志性蛋白 CD9、TSG101 表达呈阳性、calnexin 表达呈阴性(图 2C)。

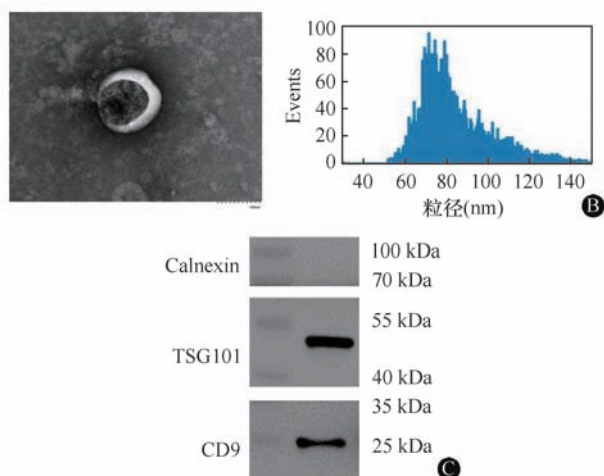


图 2 MenSCs-Exos 鉴定

注: A, 透射电镜观察 MenSCs-Exos (放大倍数 50×); B, MenSCs-Exos 的粒径分析; C, 蛋白免疫印迹法检测 MenSCs-Exos 膜表面标志性蛋白。MenSCs-Exos, 经血间充质干细胞来源的外泌体。

2.3 MenSCs-Exos 对 A2780 细胞增殖能力的影响

通过 CCK-8 实验可知, 当 MenSCs-Exos 颗粒浓度为 1×10^7 particle/ml 时, A2780 细胞生长速率增快 (24 h, $P < 0.05$; 48 h, $P < 0.01$; 72 h, $P < 0.01$)。当 MenSCs-Exos 颗粒浓度为 1×10^6 particle/ml、 5×10^6 particle/ml、 5×10^7 particle/ml 时, A2780 细胞生长速率较对照组无明显变化, 表明当 MenSCs-Exos 颗粒浓度为 1×10^7 particle/ml 时能够促进 A2780 细胞增殖, 差异有统计学意义(图 3)。因此, 选择 MenSCs-Exos 颗粒浓度为 1×10^7 particle/ml 参与后续实验。

2.4 MenSCs-Exos 对 A2780 细胞迁移和侵袭能力的影响

通过划痕实验检测细胞迁移能力变化, 结果显示, 与 MenSCs-Exos 共培养的 A2780 细胞划痕愈合百分比更高, 差异有统计学意义 (36 h, $P < 0.01$; 72 h, $P < 0.01$), 通过 Transwell 迁移和侵袭实验检测 MenSCs-Exos 对 A2780 细胞迁移和侵

袭的作用, 结果显示, 与 MenSCs-Exos 共培养的 A2780 细胞迁移、侵袭能力增强, 差异有统计学意义 (迁移实验, $P < 0.01$; 侵袭实验, $P < 0.01$) (图 4、表 1), 表明 MenSCs-Exos 能促进卵巢癌 A2780 细胞的迁移和侵袭。

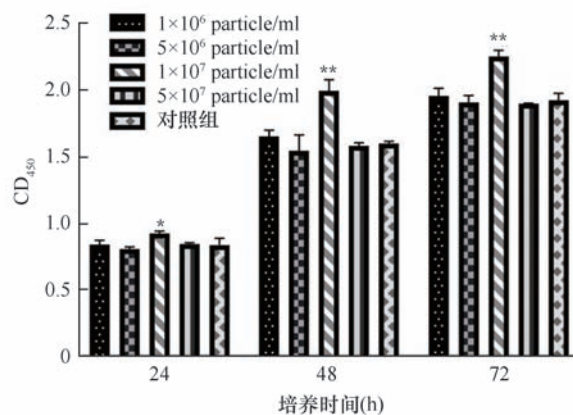


图 3 不同颗粒浓度的 MenSCs-Exos 对 A2780 细胞增殖能力的影响

注: MenSCs-Exos, 经血间充质干细胞来源的外泌体。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

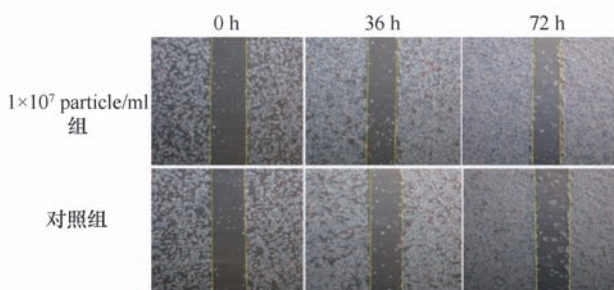


图 4 MenSCs-Exos 对 A2780 细胞迁移和侵袭能力的影响

注: MenSCs-Exos, 经血间充质干细胞来源的外泌体。

2.5 MenSCs-Exos 对 A2780 细胞周期分布的影响

采用流式细胞术检测细胞周期变化, 结果显示, 与 MenSCs-Exos 共培养的 A2780 细胞 G1 期细胞比例较对照组明显减少, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 5), 提示 MenSCs-Exos 促进细胞增殖可能与调节细胞周期有关。

2.6 MenSCs-Exos 对 β -catenin、TCF-4、c-Myc、cyclin D1 蛋白表达的影响

与 MenSCs-Exos 共培养的 A2780 细胞 Wnt/ β -catenin 相关蛋白 β -catenin、TCF-4、c-Myc、cyclin D1 的蛋白表达水平升高, 差异有统计学意义 (β -catenin、TCF-4、cyclin D1, $P < 0.01$; c-Myc, $P < 0.05$) (图 6A、B、D)。

表 1 MenSCs-Exos 对 A2780 细胞迁移和侵袭能力的影响 ($\bar{x} \pm s$)

分组	36 h 划痕迁移率 (%)	72 h 划痕迁移率 (%)	迁移细胞数目 (个)	侵袭细胞数目 (个)
1×10^7 particle/ml	$22.08 \pm 0.52^{**}$	$47.04 \pm 0.75^{**}$	$867.67 \pm 49.43^{**}$	$553.67 \pm 33.07^{**}$
对照组 (0 particle/ml)	13.22 ± 0.68	24.94 ± 0.34	507.00 ± 24.26	250.67 ± 19.67

注：MenSCs-Exos，经血源性间充质干细胞来源的外泌体。* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。

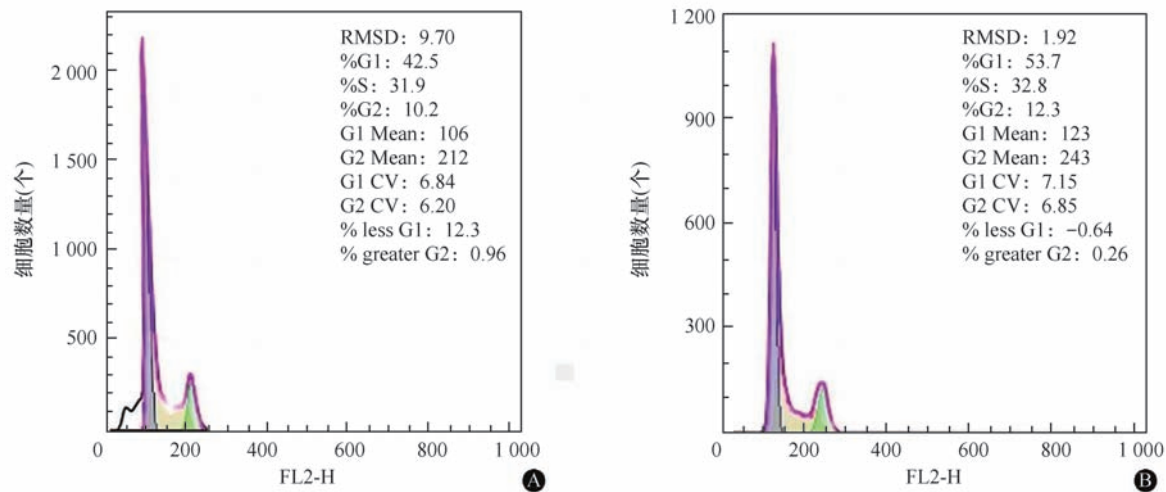


图 5 MenSCs-Exos 对 A2780 细胞周期分布的影响

注：A，MenSCs-Exos 共培养组；B，对照组。MenSCs-Exos，经血源性间充质干细胞来源的外泌体。

2.7 MenSCs-Exos 对 E-cadherin、N-cadherin、Vimentin 蛋白表达的影响

与 MenSCs-Exos 共培养的 A2780 细胞 N-cadherin、Vimentin 蛋白表达水平升高，而 E-cadherin 蛋白表达水平降低，差异有统计学意义（E-cadherin， $P < 0.01$ ；N-cadherin、Vimentin， $P < 0.05$ ）（图 6C、E）。

3 讨论

肿瘤的生长和转移速率是决定患者预后的先决条件，其内包含多种机制，包括血管再生、肿瘤微环境、上皮间质转化（epithelial-mesenchymal transition，EMT）等，卵巢癌由于其早期症状隐匿，且具有独特的腹腔转移模式，患者预后较差，患者在发现时往往诊断为晚期。据国家癌症中心统计，我国 2016 年新增癌症病例 406.4 万例，其中 15~44 岁女性中新发卵巢癌 10 220 例，较前几年发病率呈逐年上升趋势^[5]，现有的治疗方法虽然在延缓患者复发上取得了一定成效，但卵巢癌患者的 5 年生存率仍然较低。因此仍有必要探索卵巢癌转移和侵袭的机制，以期对卵巢癌的治疗提供新的靶点，改善目前卵巢癌高复发的治疗困境。

间充质干细胞起源于中胚层，存在于脂肪、

骨髓、脐血、胎盘等组织中^[6]，具有自我复制能力和多向分化潜能。多项研究证明间充质干细胞在肿瘤的生长和转移中起重要作用，其可分泌一类双层脂质分子囊泡，内含有多种 RNA 包括 mRNA、微小 RNA、环状 RNA、小干扰 RNA 和多种蛋白质，被称为间充质干细胞来源的外泌体（exosome derived from mesenchymal stem cells，MSCs-Exos）^[7]，因 MSCs-Exos 具有低免疫原性、强增殖能力和可作为载体等优点而被应用于各种良恶性疾病中，包括创面愈合^[8]、急慢性肾损伤^[9]等。然而，MSCs-Exos 在肿瘤的治疗中是一把双刃剑，既可表现为肿瘤抑制，也可表现为肿瘤促进。Qi 等^[10]研究证实骨髓间充质干细胞来源的外泌体可促进骨肉瘤细胞的生长，脐带间充质干细胞来源的外泌体可增强胃癌细胞的迁移和侵袭能力^[11]。相反，在 Yao 等^[12]的研究中，骨髓间充质干细胞来源的外泌体可抑制胰腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭。这些研究表明 MSCs-Exos 在肿瘤的发生发展中扮演何种角色尚不明确，可能与 MSCs 的培养条件、外泌体作用的细胞类型等因素有关。MenSCs 作为间充质干细胞家族的成员之一，首次发现于 2007 年，Meng 等^[13]在女性月经血中分离

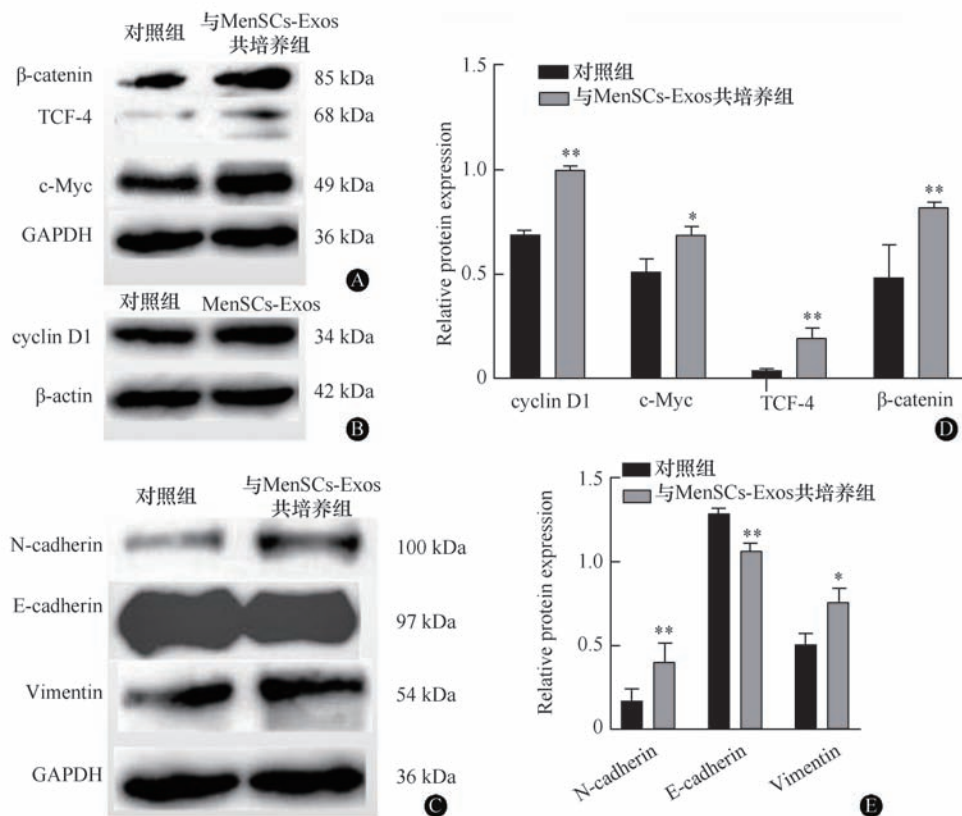


图6 MenSCs-Exos对A2780细胞β-catenin、TCF-4、c-Myc、cyclin D1、E-cadherin、N-cadherin、Vimentin蛋白表达水平的影响

注：A、B，MenSCs-Exos处理对A2780细胞内β-catenin、TCF-4、c-Myc、cyclin D1蛋白表达的影响；C，MenSCs-Exos处理对A2780细胞内对E-cadherin、N-cadherin、Vimentin蛋白表达的影响；D，β-catenin、TCF-4、c-Myc、cyclin D1的相对表达量；E，E-cadherin、N-cadherin、Vimentin的相对表达量。MenSCs-Exos，经血源性间充质干细胞来源的外泌体。

提取出一种贴壁生长且表达间充质干细胞表面标志物CD9、CD73、CD105的细胞，在相应诱导条件下可分化为脂肪细胞和成骨细胞。近年来MenSCs常应用于基础和临床研究，成为再生医学的研究热点。目前，多项研究证实MenSCs与卵巢组织之间存在复杂的相互作用关系，但MenSCs-Exos与卵巢组织特别是卵巢癌细胞之间的研究较少。本研究将MenSCs-Exos与卵巢癌细胞A2780共培养，通过CCK-8实验、划痕实验、Transwell细胞体外侵袭实验、周期检测等方法证实MenSCs-Exos可促进卵巢癌细胞的增殖及侵袭能力，并且与MenSCs-Exos共培养后其G1期细胞比例明显减少。由于不同种类的MSC-Exos对于肿瘤的作用尚存在争议，不同组织来源或不同组织环境下的间充质干细胞分泌的外泌体作用也不尽相同，故MenSCs-Exos的不同成分和功能特点的具体分

析仍然需要深入研究。

Wnt信号通路的异常调节普遍存在于肿瘤的发生发展中，Wnt/β-catenin通路是其中的经典信号通路^[14]，其激活方式为Wnt配体与相应细胞表面受体结合，从而解离细胞质中的β-catenin使其进入细胞核，从而启动靶基因转录。经证实，抑制Wnt/β-catenin信号通路的激活可抑制非小细胞肺癌的增殖和侵袭^[15]，在卵巢癌中，抑制卵巢癌细胞OVCAR-4中的Wnt/β-catenin信号通路，可抑制卵巢癌的增殖、迁移和侵袭^[16]。本研究结果显示，与MenSCs-Exos共培养的A2780细胞β-catenin、TCF-4、c-Myc、cyclin-D1表达水平显著升高，这表明MenSCs-Exos可能是通过激活Wnt/β-catenin通路来促进A2780细胞增殖和侵袭。

EMT是指在特定条件下上皮来源的细胞向间质细胞发生转化的现象，该机制在肿瘤的转移和

侵袭中发挥重要作用, EMT 的发生通常表现为上皮标志物 E-cadherin 的表达降低和间质标志物 Vimentin 的表达增加, 在卵巢癌中, 众多调控因素如微小 RNA、环状 RNA、小干扰 RNA 等均可通过调节该机制从而影响卵巢癌的发生发展^[17]。有研究证明经骨髓源性间充质干细胞来源的外泌体处理后的前列腺癌细胞 E-cadherin 表达水平显著降低, 同时, N-cadherin 和 Vimentin 表达水平显著升高, 这表明骨髓源性间充质干细胞来源的外泌体通过 EMT 促进前列腺癌细胞的迁移和侵袭^[18]。在本实验中, 与 MenSCs-Exos 共培养的 A2780 细胞 E-cadherin 表达量降低, 而 N-cadherin 和 Vimentin 表达量升高, 这表明 MenSCs-Exos 可能是通过促进 A2780 细胞的 EMT 过程从而提高其转移和侵袭能力。

综上所述, 本研究将 MenSCs-Exos 与卵巢癌细胞 A2780 共培养, 表明了 MenSCs-Exos 可能是通过激活 Wnt/ β -catenin 通路和调节 EMT 通路相关信号蛋白, 从而提高 A2780 细胞的增殖、迁移和侵袭能力, 并影响其细胞周期分布。MenSCs-Exos 作为一种复杂的生物活性物质, 具有广阔的临床应用前景。

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] KUROKI L, GUNTUPALLI S R. Treatment of epithelial ovarian cancer [J]. *BMJ*, 2020, 371: m3773.
- [3] CHEN L, QU J, CHENG T, et al. Menstrual blood-derived stem cells: toward therapeutic mechanisms, novel strategies, and future perspectives in the treatment of diseases [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10 (1): 406.
- [4] WANG Z, WANG Y, YANG T, et al. Study of the reparative effects of menstrual-derived stem cells on premature ovarian failure in mice [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2017, 8 (1): 11.
- [5] ZHENG RS, ZHANG SW, ZENG HM, et al. Cancer incidence and mortality in China, 2016 [J]. *J Natl Cancer Center*, 2022, 2 (1): 1-9.
- [6] LV F, TUAN RS, CHEUNG KMC, et al. Concise Review: The Surface Markers and Identity of Human Mesenchymal Stem Cells [J]. *Stem cells*, 2014, 32 (6): 1408-1419.
- [7] YU B, ZHANG X, LI X. Exosomes Derived from Mesenchymal Stem Cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15 (3): 4142-4157.
- [8] BIAN D, WU Y, SONG G, et al. The application of mesenchymal stromal cells (MSCs) and their derivative exosome in skin wound healing: a comprehensive review [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2022, 13 (1): 24.
- [9] GATTI S, BRUNO S, DEREGIBUS MC, et al. Microvesicles derived from human adult mesenchymal stem cells protect against ischaemia-reperfusion-induced acute and chronic kidney injury [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2011, 26 (5): 1474-1483.
- [10] QI J, ZHOU Y, JIAO Z, et al. Exosomes Derived from Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Promote Tumor Growth Through Hedgehog Signaling Pathway [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 42 (6): 2242-2254.
- [11] GU H, JI R, ZHANG X, et al. Exosomes derived from human mesenchymal stem cells promote gastric cancer cell growth and migration via the activation of the Akt pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14 (4): 3452-3458.
- [12] YAO X, MAO Y, WU D, et al. Exosomal circ_0030167 derived from BM-MSCs inhibits the invasion, migration, proliferation and stemness of pancreatic cancer cells by sponging miR-338-5p and targeting the Wif1/Wnt8/ β -catenin axis [J]. *Cancer Lett*, 2021, 512: 38-50.
- [13] MENG XL, ICHIM TE, ZHONG J, et al. Endometrial regenerative cells: a novel stem cell population [J]. *J Transl Med*, 2007, 5: 57.
- [14] POLAKIS P. Wnt Signaling in Cancer [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2012, 4 (5): a8052.
- [15] XIE M, CAI L, LI J, et al. FAM110B Inhibits Non-Small Cell Lung Cancer Cell Proliferation and Invasion Through Inactivating Wnt/ β -Catenin Signaling [J]. *Oncotargets Ther*, 2020, 13: 4373-4384.
- [16] ZHANG H, SUN D, QIU J, et al. SFRP1 inhibited the epithelial ovarian cancer through inhibiting Wnt/ β -catenin signaling [J]. *Acta Biochim Pol*, 2019, 66 (4): 393-400.
- [17] PASTUSHENKO I, BLANPAIN C. EMT Transition States during Tumor Progression and Metastasis [J]. *Trends Cell Biol*, 2019, 29 (3): 212-226.
- [18] 柯井卫, 沈宏春, 刘星, 等. 骨髓间充质干细胞源外泌体 miR-21-5p 通过下调 PHLPP2 促进前列腺癌 PC-3 细胞的增殖、迁移和侵袭 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2020, 27 (5): 534-540.

收稿日期: 2023-05-23

修回日期: 2023-06-13

本文编辑: 潘麒羽 周子一