

微囊泡对人卵巢癌细胞耐药性传递作用的初步研究

谷芳,王淑珍*

基金项目:北京市医管局“扬帆”计划重点项目(项目编号:ZYLX201713)

作者单位:100020 北京,首都医科大学附属北京朝阳医院妇产科

作者简介:谷芳,毕业于解放军医学院,博士,医师,主要研究方向为妇科肿瘤

* 通信作者,E-mail:darrywang2003@163.com

【摘要】目的 探讨微囊泡(microvesicles, MV)在人卵巢癌细胞间耐药性的传递作用。**方法** 以人卵巢癌耐顺铂细胞 SKOV3/DDP 和敏感细胞 SKOV3 为模型,用超高速离心法从细胞上清液中提取分离得到 SKOV3/DDP 的 MV;使用基于 Megamix Beads 的高灵敏度流式细胞仪检测 MV,计算 MV 的提纯率;采用 MTT 法检测 SKOV3/DDP、SKOV3 细胞的耐药情况,计算耐药指数;运用流式细胞仪观察 SKOV3/DDP、SKOV3/DDP 分离的 MV 分别与 SKOV3 在微孔滤膜的 transwell 小室共孵育后对罗丹明 123(R123)的外排功能。**结果** 通过超高速离心和高灵敏度流式细胞仪检测到 SKOV3/DDP 产生的 MV 提纯率为 75.82%;在顺铂的作用下,SKOV3/DDP 的细胞活力明显高于 SKOV3,SKOV3/DDP 在 24 h、48 h 的耐药指数分别为 4.21、4.59。SKOV3/DDP 与 SKOV3 共同孵育后,SKOV3 内蓄积的 R123 的荧光峰向左偏移,蓄积的 R123 减少,对 R123 的外排能力增加,耐药性增加;SKOV3/DDP 分离的 MV 与 SKOV3 共同孵育后,SKOV3 内蓄积的 R123 减少,对 R123 的外排能力增加,耐药性增加。**结论** 耐药细胞产生的 MV 可以使敏感细胞获得一定的耐药性,人卵巢癌细胞可能通过一种“非遗传”的方式——MV 的介导传递耐药性。

【关键词】 微囊泡;人卵巢癌细胞;耐药

【中图分类号】R 737.31

【文献标志码】A

【文章编号】1674-4020(2021)06-066-04

doi:10.3969/j.issn.1674-4020.2021.06.15

The role of microvesicles in drug resistance transmission of human ovarian cancer cells

GU Fang, WANG Shuzhen*

Department of Gynecology and Obstetrics, Beijing Chaoyang Hospital, Capital Medical University, Beijing 100020, P. R. China

* Corresponding author, E-mail: darrywang2003@163.com

【Abstract】Objective To explore the role of microvesicles (MV) in the transmission of drug resistance among human ovarian cancer cells. **Methods** Human ovarian cancer cisplatin-resistant cells lines SKOV3/DDP and sensitive cells SKOV3 were selected as experimental models. MV was extracted from SKOV3/DDP supernatants by ultracentrifugation. MV was detected and the purification rate of MV was calculated by high sensitivity flow cytometry based on Megamix Beads. MTT examination was used to assess the drug resistance and to calculate the resistance index. Cell efflux of R123 was observed by flow cytometry after the incubation of SKOV3/DDP and SKOV3 and the incubation of MV and SKOV3 cells in transwell chambers. **Results** The MV purity rate of SKOV3/DDP was 75.82% by ultracentrifugation and high sensitivity flow cytometry. Under the action of cisplatin, the cell viability of SKOV3/DDP was significantly higher than that of SKOV3 cells. The resistance index of SKOV3/DDP at 24 h and 48 h was 4.21 and 4.59, respectively. After the incubation of SKOV3/DDP and SKOV3, the fluorescence peak of the accumulated R123 in the SKOV3 shifted to the left. The decrease of the accumulated R123 meant that the efflux of R123 increased and the drug resistance increased. After the incubation of MV

and SKOV3, the accumulation of the R123 in the SKOV3 was decreased, and that meant the efflux ability of the R123 increased and the drug resistance increased. **Conclusion** Sensitive cells can acquire drug resistance from the MV of drug-resistant cells. Human ovarian cancer cells may transmit drug resistance through a “non-heritage” mode——mediation of MV.

【Key words】microvesicles; human ovarian cancer cells; drug resistance

卵巢癌是妇科常见的恶性肿瘤之一,其病死率居妇科恶性肿瘤的首位^[1]。卵巢癌化疗过程中产生的耐药是卵巢癌复发和治疗失败的最主要原因之一,卵巢癌细胞易对化疗药物如顺铂、紫杉醇等产生耐药性,从而导致治疗失败^[2]。肿瘤化疗产生耐药的过程可能是多因素联合完成的,包括细胞环境中药物的解毒作用增加、化疗药物在细胞内积聚减少、排出增加、对 DNA 损伤耐受或修复增加和对促凋亡信号的抵抗^[3]。

1967 年 Wolf 第一次提出微囊泡 (microvesicles, MV) 的释放和它的生理功能^[4]。MV 是细胞以出芽方式产生的直径 0.1 ~ 1 μm 的具有双层膜结构的微囊泡^[5],以膜表面显著暴露磷脂酰丝氨酸 (phosphatidylserine, PS) 为特征^[6-7]。

本研究通过人卵巢癌耐顺铂细胞 SKOV3/DDP 和敏感细胞 SKOV3,通过超高速离心、流式细胞仪分离检测耐药细胞 SKOV3/DDP 释放的 MV,进一步证实人卵巢癌细胞的耐药性可以通过一种“非遗传”的方式——MV 的介导,以期为临床逆转卵巢癌耐药提供一种新的治疗靶点。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

人卵巢癌 SKOV3、SKOV3/DDP 细胞购自中国医学科学院肿瘤医院研究所,采用 10% 胎牛血清、2 mmol/L 谷氨酰胺、100 U/mL 青霉素、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素的 RPMI1640 培养液,培养于 37℃、饱和湿度、5% CO_2 (V/V)、21% O_2 (V/V) 条件下。顺铂购自美国 Sigma 公司,用 DMSO 溶液溶解成 10 mmol/L 的储存液,避光保存于 4℃。Megamix Beads 购自法国 Biocytex 公司。Rhodamine123 购自美国 Sigma 公司。流式细胞仪 Gallios 购自美国 Beckman Coulter 公司。

1.2 方法

1.2.1 微囊泡的提取分离 SKOV3/DDP 生长长期细胞无血清状态下培养 12 h,收集上清液 3 000 rpm、15 min 离心去除细胞碎片,将上清液无菌状态下 27 300 rpm、1 h、4℃ 超高速分离得到 SKOV3/DDP 的 MV,用 PBS 或超高速分离后的 medium 将 MV 沉淀重悬,可 -80℃ 分装冻存。

1.2.2 微囊泡的流式检测 使用流式细胞仪的定标及校正,使用 Megamix Beads (含 0.5 μm 、0.9 μm 、3 μm 预混微球)进行定标,调整 PMT 使三群微球同时出现在同一 FS-SS 窗内,调整电压,使 0.5 μm 与 0.9 μm 微球比值介于 2:1 ~ 1:1 之间。我们首先通过 FL1 通道,区

分 0.5 μm 和 0.9 μm 微球,分别标记为 a 门和 b 门,外切 0.9 μm 微球群作为 MV gate。将分装的 MV 于 37℃ 迅速溶解,使用荧光 AnnexinV 标记,与 MV 孵育半小时,在 Beckman Coulter Gallios 上进行 MV 检测,调整各荧光通道之间补偿值,避免相互干扰,利用 Gallios 随机自带软件获取原始数据。

1.2.3 MTT 实验分析细胞活力 取对数生长期的人卵巢癌 SKOV3/DDP、SKOV3 细胞,调整密度为 1×10^4 /孔接种于 96 孔培养板,每孔 100 μL ,每组分别设 5 个复孔,培养过夜后,实验组加入终浓度分别为 0.25、1、4、16、64、128 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的顺铂,对照组加入等量的 RPMI1640 培养液,置于 37℃、5% CO_2 孵育箱内分别培养 24 h、48 h 后,每孔加入 5 mg/mL MTT 20 μL ,继续培养 4 h 后,每孔再加 DMSO 150 μL ,充分震荡 10 min,酶联免疫检测仪 570 nm 处测量吸光度 (A) 值。计算各组细胞活力 (cell viability% of control),绘制生长曲线,并计算 50% 抑制浓度 (IC_{50}) 及耐药指数。细胞活力 = $(1 - \text{实验组 A 值} / \text{对照组 A 值}) \times 100\%$ 。耐药指数 = IC_{50} (耐药细胞株) / IC_{50} (亲本细胞株)。

1.2.4 SKOV3/DDP 与 SKOV3 共同孵育,检测 SKOV3 耐药性的改变 鉴于细胞直径 8 ~ 12 μm ,MV 直径 0.1 ~ 1 μm ,我们应用微孔滤膜 2 μm 的 12-well transwell 小室模型,上室培养耐药细胞 SKOV3/DDP,下室培养敏感细胞 SKOV3,将 SKOV3/DDP 与 SKOV3 共同孵育 24 h,如图 1。

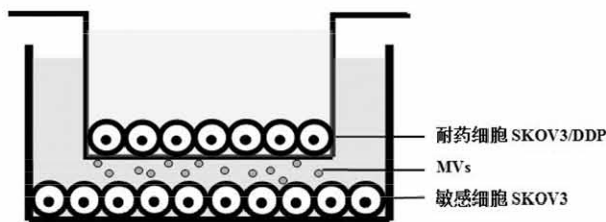


图 1 SKOV3/DDP 与 SKOV3 共同孵育

对于耐药功能的检测可以通过流式细胞仪检测 SKOV3/DDP、孵育后 SKOV3 (Co-incubatin SKOV3)、SKOV3 细胞对罗丹明 123 (R123) 的外排功能 (蓄积能力),实现对耐药功能的检测。用 0.25% 的胰酶消化,1 000 rpm 离心 5 min;用 PBS 洗涤细胞两次,2 000 rpm 离心 5 min,去除未结合的 MV,PBS 混匀,收集细胞并调整细胞浓度至 $1 \times 10^6/\text{mL}$;加入荧光染料 R123 0.5 μM ,混匀,4℃ 避光 30 min;在 Beckman Coulter Gallios 流式细胞机上进行检测,记录激发波长 488 nm 处红色荧光。

1.2.5 分离 SKOV3/DDP 的 MV,检测 SKOV3 与 MV 共同孵育后耐药性的改变 收集 SKOV3/DDP 的上清,按照 1.2.1 的方法超高速分离法得到 MV,将 MV 与敏感细胞 SKOV3 共同孵育 24 h,如图 2。

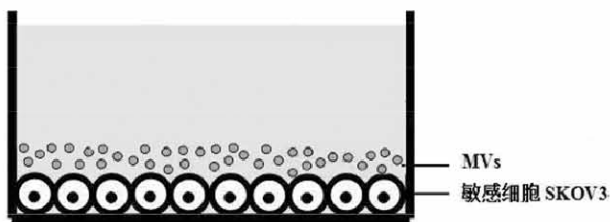


图2 MV 与 SKOV3 共同孵育

通过流式细胞仪检测 SKOV3/DDP 与 MV 孵育后的 SKOV3 (MV Co-incubation SKOV3)、SKOV3 细胞对罗丹明 123 (R123) 的外排功能 (蓄积能力)。方法同上。

1.3 统计学分析

所有数据采用 GraphPad Prism 软件进行处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,所有实验重复 3 次,MTT 分析设置 5 个复孔,敏感细胞与耐药细胞耐药性比较采用 *t* 检验;流式细胞仪检测平均荧光强度的半定量分析采用方差分析法 (ANOVA)。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 微囊泡的提取分离与流式检测

在 FL1 通道,区分 $0.5 \mu\text{m}$ 和 $0.9 \mu\text{m}$ 微球,分别标记为 a 门和 b 门 (图 3A)。然后在 FSC 和 SSC 通道上,外切 b 门,确立 MV gate (图 3B)。图 3C 为用该方法检测卵巢癌 SKOV3/DDP 细胞产生的 MV。图 3D 表示用该方法检测 MV 的提纯率为 75.82%。图 3 见彩插 2。

2.2 卵巢癌 SKOV3、SKOV3/DDP 细胞的细胞活力及耐药指数

在 0.25 、 1 、 4 、 16 、 64 、 $128 \mu\text{mol/L}$ 浓度的顺铂作用 24 h、48 h 后,SKOV3/DDP 的细胞活力明显高于 SKOV3 细胞,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。SKOV3 细胞培养 24 h、48 h 的 IC_{50} 分别是 $8.06 \mu\text{mol/L}$ 、 $2.7 \mu\text{mol/L}$,SKOV3/DDP 细胞培养 24 h、48 h 的 IC_{50} 分别是 $34 \mu\text{mol/L}$ 、 $12.4 \mu\text{mol/L}$,SKOV3/DDP 在 24 h、48 h 的耐药指数为 4.21、4.59。人卵巢癌 SKOV3 和耐药细胞 SKOV3/DDP 在不同浓度顺铂作用下的细胞活力,见图 4。

2.3 SKOV3/DDP 与 SKOV3 共同孵育后,流式细胞仪检测 SKOV3 的耐药性增加

流式细胞仪检测结果发现,SKOV3/DDP 与 SKOV3 共同孵育后,SKOV3 内蓄积的 R123 的荧光峰向左偏移 ($P < 0.001$),见图 5 (彩插 2),表明敏感细胞与耐药细胞共同孵育后,敏感细胞内蓄积的 R123 减少,对 R123 的外排能力增加,耐药性增加。

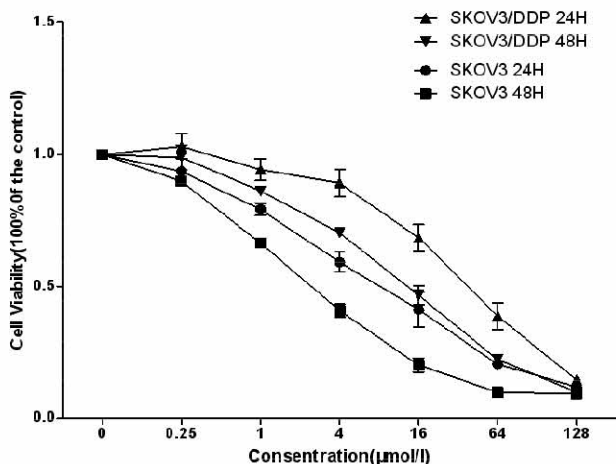


图4 MTT 法检测 SKOV3/DDP、SKOV3 在顺铂作用下的细胞活力

2.4 微囊泡与 SKOV3 共同孵育后,流式细胞仪检测 SKOV3 的耐药性增加

流式细胞仪检测结果发现,SKOV3/DDP 分离的 MV 与 SKOV3 共同孵育后,SKOV3 内蓄积的 R123 的荧光峰同样向左偏移 ($P < 0.001$),见图 6 (彩插 2),表明敏感细胞内蓄积的 R123 减少,对 R123 的外排能力增加,SKOV3 的耐药性增加。

3 讨论

卵巢癌耐药极大影响了卵巢癌的预后,因此研究卵巢癌耐药的发生和发展机制,寻求逆转卵巢癌耐药发生的治疗方案成为卵巢癌研究中有待解决的重要课题。近年来,外泌体 (exosomes, Exo) 在肿瘤中的作用已经得到了很多关注,但是体积较大的 MV 的功能仍不甚清楚。这似乎令人惊讶,因为与 Exo 相比,MV 在患者血液中更易于获取,且通过常规方法即可检测鉴定,理论上更适合成为“体液检查”的理想选择^[8]。很多研究发现,肿瘤细胞同样可以释放大量的内含蛋白酶、各种信号分子、mRNA 和 microRNA 的 MV,通过 MV 的传递,这些来自肿瘤细胞的蛋白、脂质和核苷酸等作用于靶细胞,从而影响肿瘤自身的生长、侵袭、转移、血管化、导致肿瘤细胞耐药^[9-11]。

最常用的 MV 定量检测方法是使用流式细胞仪^[12-13],传统流式细胞仪的检测灵敏度较低,尤其是直径 $0.5 \mu\text{m}$ 以下的颗粒,而新一代的高灵敏度流式细胞仪在这方面具有明显的优势。本实验采用 Beckman Coulter Gallios 高灵敏度流式细胞仪作为主要仪器,建立了基于 Megamix Beads 的 MV 定量方法。Megamix Beads 是一种商品化的荧光微球,含有 $0.5 \mu\text{m}$ (a)、 $0.9 \mu\text{m}$ (b)、 $3 \mu\text{m}$ (c) 3 种尺寸。在本实验中,我们使用该方法确立了 MV gate,成功检测到卵巢癌细胞产生的 MV。

MV 在肿瘤细胞耐药形成机制中所起的作用很值得一提,研究发现肿瘤细胞通过释放 MV 的方式募集、排出抗肿瘤药物,从而使肿瘤细胞产生抵抗作用^[14-15]。在

本研究中,为了探究 MV 在人卵巢癌细胞之间耐药性的传递作用,我们用 R123 实验模拟肿瘤药物的输出,发现人卵巢癌耐药细胞 SKOV3/DDP 与敏感细胞 SKOV3 共同孵育后,敏感细胞耐药性增加,同时,人卵巢癌耐药细胞 SKOV3/DDP 释放到肿瘤微环境中 MV 单独与敏感细胞 SKOV3 共同孵育后,敏感细胞耐药性同样增加,这说明 MV 作为一种“非遗传”的介导工具,在耐药细胞和敏感细胞之间传递了耐药性。关于 MV 与卵巢癌耐药性产生和传递过程中的具体信号通路和机制,我们还在进一步研究中。

综上,本研究通过高灵敏度流式细胞仪成功检测到人卵巢癌细胞产生的 MV,通过流式细胞仪检测 R123 的外排实验,表明人卵巢癌细胞可以通过 MV 向敏感细胞传递耐药性,但其具体机制尚需要进一步的研究。在卵巢癌耐药方面,我们可以进一步研究抑制 MV 释放及靶细胞摄取的方法,或许可为逆转卵巢癌耐药提供新思路,成为化疗耐药新的治疗靶点。

【参考文献】

- [1] Chan J K, Cheung M K, Husain A, et al. Patterns and progress in ovarian cancer over 14 years [J]. *Obstet Gynecol*, 2006, 108 (3 Pt 1): 521-528.
- [2] Agarwal R, Kaye S B. Ovarian cancer: strategies for overcoming resistance to chemotherapy [J]. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3 (7): 502-516.
- [3] Fodale V, Pierobon M, Liotta L, et al. Mechanism of cell adaptation: when and how do cancer cells develop chemoresistance? [J]. *Cancer J*, 2011, 17 (2): 89-95.
- [4] Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma [J]. *Br J Haematol*, 1967, 13 (3): 269-288.
- [5] Minciacchi V R, Freeman M R, Di Vizio D. Extracellular vesicles in cancer: exosomes, microvesicles and the emerging role of large oncosomes [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2015, 40: 41-51.
- [6] Taylor J, Bebawy M. Proteins regulating microvesicle biogenesis and

- multidrug resistance in cancer [J]. *Proteomics*, 2019, 19 (1-2): e1800165.
- [7] Piccin A, Murphy W G, Smith O P. Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications [J]. *Blood Rev*, 2007, 21 (3): 157-171.
- [8] Mezouar S, Mege D, Darbousset R, et al. Involvement of platelet-derived microparticles in tumor progression and thrombosis [J]. *Semin Oncol*, 2014, 41 (3): 346-358.
- [9] Arendt B K, Walters D K, Wu X, et al. Multiple myeloma derived microvesicles are enriched in CD147 expression and enhance tumor cell proliferation [J]. *Oncotarget*, 2014, 5 (14): 5686-5699.
- [10] Menck K, Sivaloganathan S, Bleckmann A, et al. Microvesicles in cancer: Small size, large potential [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21 (15): 5373.
- [11] Menck K, Scharf C, Bleckmann A, et al. Tumor-derived microvesicles mediate human breast cancer invasion through differentially glycosylated EMMPRIN [J]. *J Mol Cell Biol*, 2015, 7 (2): 143-153.
- [12] Thery C, Witwer K W, Aikawa E, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines [J]. *J Extracell Vesicles*, 2018, 7 (1): 1535750.
- [13] Mateescu B, Kowal E J, Van Balkom B W, et al. Obstacles and opportunities in the functional analysis of extracellular vesicle RNA-an ISEV position paper [J]. *J Extracell Vesicles*, 2017, 6 (1): 1286095.
- [14] Jorfi S, Ansa-Addo E A, Kholia S, et al. Inhibition of microvesiculation sensitizes prostate cancer cells to chemotherapy and reduces docetaxel dose required to limit tumor growth in vivo [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 13006.
- [15] Muralidharan-Chari V, Kohan H G, Asimakopoulos A G, et al. Microvesicle removal of anticancer drugs contributes to drug resistance in human pancreatic cancer cells [J]. *Oncotarget*, 2016, 7 (31): 50365-50379.

(收稿日期: 2021-03-11 编辑: 杨叶)

欢迎投稿 欢迎订阅

《中国计划生育和妇产科》是由中华人民共和国国家卫生健康委员会主管,中国医师协会、四川省卫生健康政策和医学情报研究所主办的国内外公开发行的国家级医学刊物,中国科技核心期刊(中国科技论文统计源期刊)。刊号:ISSN 1674-4020, CN 51-1708/R, 全国公开发行,邮发代号:62-10。主要报道国内外计划生育和妇产科以及相关学科的最新研究动态和进展,反映临床、教学和科学研究成果。读者对象为本学科及相关学科的医务工作者和研究人员。主要栏目有述评、专家笔谈、综述、论著与临床研究、多学科团队讨论、技术交流、短篇报道与个案、新药介绍、讲座、基层经验交流等,欢迎全国各地广大作者在在线投稿系统 <http://zgjhshyhfckzz.paperonice.com> 注册并投稿。