

· 肿瘤专题研究 ·

## 胶质瘤干细胞来源的外泌体促进胶质瘤恶性进展

高健成, 陆晨飞, 张梓枫, 张军霞, 尤永平\*

南京医科大学第一附属医院神经外科, 江苏 南京 210029

**[摘要]** 目的: 探讨胶质瘤干细胞(glioblastoma stem cell, GSC)来源的外泌体(extracellular vesicle, EV)对胶质瘤细胞的增殖、侵袭和替莫唑胺(temozolomide, TMZ)耐药能力的体内外影响。方法: 选用原代GSC, 通过分化实验获得相对应的分化肿瘤细胞(differentiated glioma cell, DGC)。通过超速离心法分别获得GSC和DGC细胞培养基上清液中的EV。利用CCK8和克隆形成实验、transwell侵袭实验检测GSC来源的EV对胶质瘤U87细胞增殖、TMZ耐药和侵袭能力的影响。小鼠颅内原位成瘤实验分析GSC来源的EV对U87细胞体内增殖、TMZ耐药的影响。结果: 通过对原代GSC进行分化, 获得了与之相对应的DGC, 并且成功获得GSC和DGC来源EV。与DGC来源的EV相比, GSC来源的EV可显著增强U87细胞增殖、侵袭和替莫唑胺耐药能力。体内实验进一步证实, GSC来源的EV能显著促进肿瘤体内生长, 明显降低小鼠存活期。结论: GSC来源的EV增强胶质瘤细胞的增殖、侵袭和替莫唑胺耐药能力。

**[关键词]** 胶质瘤; 肿瘤干细胞; 肿瘤微环境; 替莫唑胺耐药**[中图分类号]** R739.41**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2022)12-1658-06**doi:** 10.7655/NYDXBNS20221203

## Glioblastoma stem cell-derived exosomes promote glioma malignant progression

GAO Jiancheng, LU Chenfei, ZHANG Zifeng, ZHANG Junxia, YOU Yongping\*

Department of Neurosurgery, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effects of extracellular vesicles (EVs) from glioblastoma stem cells (GSC) on the proliferation, invasion and temozolomide (TMZ) - resistance of glioblastoma (GBM) *in vitro* and *in vivo*. **Methods:** The GSCs were derived from the primary GBM patient and the matched differentiated glioma cells (DGCs) were obtained through differentiation experiments. The EVs in culture medium of GSC and DGC were obtained by ultracentrifugation, respectively. Cell Counting Kit 8 (CCK8) assay, colony formation assay and transwell invasion assay were used to detect the effects of GSC-derived EVs on the proliferation, invasion and TMZ-resistance of U87 glioma cells. Intracranial xenografts murine experiment was used to validate the effects of GSC-derived EVs on the *in vivo* proliferation, invasion and TMZ-resistance of U87 cells. **Results:** GSC and the matched DGC were obtained through tumor dissociation and differentiation experiments, respectively. GSC and DGC derived EVs were obtained by ultracentrifugation methods. GSC-derived EVs significantly enhanced U87 cell proliferation, invasion and TMZ-resistance, compared to DGC-derived EVs. Consistently, *in vivo* experiments validated that GSC-derived EVs promoted tumor growth and reduced the survival time of mice. **Conclusion:** GSC-derived EVs enhance the proliferation, invasion and TMZ-resistance of glioma cells.

**[Key words]** glioma; cancer stem cells; tumor microenvironment; TMZ resistance

[J Nanjing Med Univ, 2022, 42(12): 1658-1663]

胶质母细胞瘤(glioblastoma, GBM)是最常见的原发性颅内恶性肿瘤,存在异质性强、放化疗耐药和

极易复发等特点,严重影响了患者的生存质量<sup>[1-2]</sup>。胶质瘤干细胞(glioblastoma stem cell, GSC)是具有无限增殖和自我更新能力的肿瘤细胞亚群,参与了胶质瘤恶性进展的众多过程,包括放疗抗性、化疗耐药性、血管生成、侵袭和复发等<sup>[3-4]</sup>。外泌体(extra-

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81974389)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: YYPL9@njmu.edu.cn

cellular vesicle, EV)是细胞在生理、病理条件下释放到胞外的一种双层膜囊泡,能与相应靶细胞受体结合或转移外泌体内含物进而发挥生物学功能<sup>[5]</sup>。研究表明,肿瘤细胞分泌的EV能通过不同机制影响肿瘤的侵袭、转移、血管生成等<sup>[6]</sup>。为此,本研究拟采用体外、体内实验,探讨GSC来源的EV对胶质瘤细胞增殖、侵袭和替莫唑胺(temozolomide, TMZ)耐药能力的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

人胶质母细胞瘤细胞U87购买自美国模式培养物集存库(ATCC)。人胶质母细胞瘤干细胞来自南京医科大学汪秀星实验室。

B27、表皮生长因子、成纤维细胞生长因子、神经基础培养液(赛默飞世尔科技公司,美国);胎牛血清(Hyclone公司,美国);人SOX2抗体、人Olig2抗体、人c-MYC抗体、人CD9抗体、人TSG101抗体(CST公司,美国);人GAPDH抗体(上海碧云天生物公司);羊抗兔、鼠IgG-HRP二抗(合肥Biosharp公司)。人Ki-67、人Cleavedcaspase3抗体(武汉Proteintech公司)。Exosupur™外泌体分离纯化试剂盒(武汉ABclonal公司)。蛋白酶抑制剂、蛋白裂解缓冲液RIPA(上海碧云天生物公司)。TRIZOL试剂、PrimeScript RT试剂盒(北京宝日生物公司)。CCK8(南京诺唯赞生物公司)。姬姆萨染液、荧光素钾盐(上海翌圣公司)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养

原代GSC培养于添加了B27、表皮生长因子和成纤维细胞生长因子的神经基础培养液中。为了获得分化肿瘤细胞(differentiated glioma cell, DGC),将GSC培养于含10%胎牛血清的DMEM培养基中进行分化,置于37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养,每隔1d换液,分化7d。胶质瘤U87细胞培养于添加了10%胎牛血清的DMEM培养基中,置于37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养。

#### 1.2.2 外泌体分离与实验分组

DGC和GSC培养48h,收集培养基上清,在4℃条件下,3000g离心10min。1mL上清加250μL外泌体分离试剂,混匀,4℃静置2h。混匀液在4℃条件下,12000g离心20min。将EV颗粒悬浮于PBS中进一步实验或在-80℃下保存。不同来源的EV分别加入细胞培养基(30μg/mL),刺激U87细胞,观

察U87细胞增殖、侵袭和TMZ耐药能力的差异。

#### 1.2.3 RNA提取及qRT-PCR

采用TRIZOL试剂从细胞中提取总RNA。用PrimeScript RT试剂盒合成cDNA。用SYBR Green PreMix Ex Taq进行实时定量PCR(qRT-PCR)分析。总RNA水平用18s归一化。各基因的相对定量取值为2<sup>-ΔΔCT</sup>。

#### 1.2.4 蛋白质提取及Western blot分析

细胞在添加蛋白酶抑制剂的裂解缓冲液中裂解30min。裂解产物4℃下14000g离心15min,收集上清液,用BCA法测定蛋白质浓度。每个槽口取20μg蛋白上样,10%SDS-PAGE凝胶电泳分离蛋白,湿转到PVDF膜上,5%脱脂奶粉封闭2h,4℃一抗孵育过夜,常温二抗孵育2h,曝光显影。

#### 1.2.5 CCK8检测

各处理组的U87细胞消化后重悬于培养液中,每孔1×10<sup>4</sup>个细胞接种于96孔培养板中,37℃、5%CO<sub>2</sub>继续培养。分别于处理后24、48、72h检测。检测前4h每孔加入5μL CCK8溶液,用酶标仪测定各孔的吸光度值,波长为450nm,取平均值。

#### 1.2.6 克隆形成实验

取对数生长期细胞,以500个/孔密度接种到6孔板中。24h后待细胞贴壁后换液,并分别给以GSC EV和DGC EV处理,静置生长10d后终止培养。用PBS缓慢清洗2遍后加甲醇置-20℃冰箱固定6min,加0.1%结晶紫染色30min,吸去染色液,PBS漂洗2次,风干拍照。

#### 1.2.7 Transwell侵袭实验

将不同处理后的U87细胞,消化后用培养基吹打成为细胞悬液,将小室放入24孔板,取200μL(3×10<sup>4</sup>个/mL)细胞悬液置于上室,下室为500μL的新生牛血清,24h后取出培养板,弃培养基,PBS洗3次,甲醇固定15min,PBS洗3次,姬姆萨染色45min,显微镜拍照统计。

#### 1.2.8 动物研究

雄性裸鼠(nu/nu)购自北京Vital River Animal Center,饲养在无特殊病原体(SPF)条件下。为了评估化疗耐药性,原位成瘤1周后,小鼠每天腹腔注射20mg/kg浓度的TMZ。所有动物操作均按照南京医科大学伦理指导原则进行。

#### 1.2.9 颅内原位成瘤和活体成像

根据文献报道,构建小鼠原位成瘤模型<sup>[7]</sup>。为监测活体动物的肿瘤生长,使用带萤火虫荧光素酶的慢病毒感染U87细胞(MOI=0.8)。通过生物发光

成像技术监测植入GSC的小鼠脑内的生长情况。动物腹腔注射荧光素钾盐 120 mg/kg, 异氟醚麻醉后进行图像分析。使用 ANIVIS 成像系统捕获肿瘤荧光素酶图像。

### 1.2.10 免疫组化染色

对于免疫组织化学研究, 将切片分别与 Ki-67 和 cleaved caspase3 的一抗(1:100 稀释)于 4 °C 下孵育过夜, 然后与生物素化的二抗(1:200 稀释)于室温下孵育 1 h, 然后用 ABC-过氧化物酶试剂孵育 1 h, 用 PBS 洗涤, 用 3, 3'-二氨基联苯胺(30 mg 溶于 100 mL 含 0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的 Tris 缓冲液中)染色 5 min, 用水冲洗并用苏木精复染。每个切片随机选择的 10 个视野, 光学显微镜评估 Ki-67 和 cleaved caspase3 表达。

### 1.3 统计学方法

所有数据均用 GraphPad Prism 8 软件进行分析, 采用双尾 Student-*t* 检验评估差异的显著性。生存分析采用 Kaplan-Meier 法。P < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 配对 GSC 和 DGC 的获取与验证

通过含有 10% FBS 的 DMEM 培养基对原代 GSC 进行分化, 成功获得了 1 对相匹配的 GSC 和 DGC(图 1A)。Western blot 和 qRT-PCR 分析检测胶质瘤干细胞特异标志物的表达。相较于 DGC, GSC 的干细胞特异标志 SOX2、Olig2 和 c-Myc 的表达升高, 而分

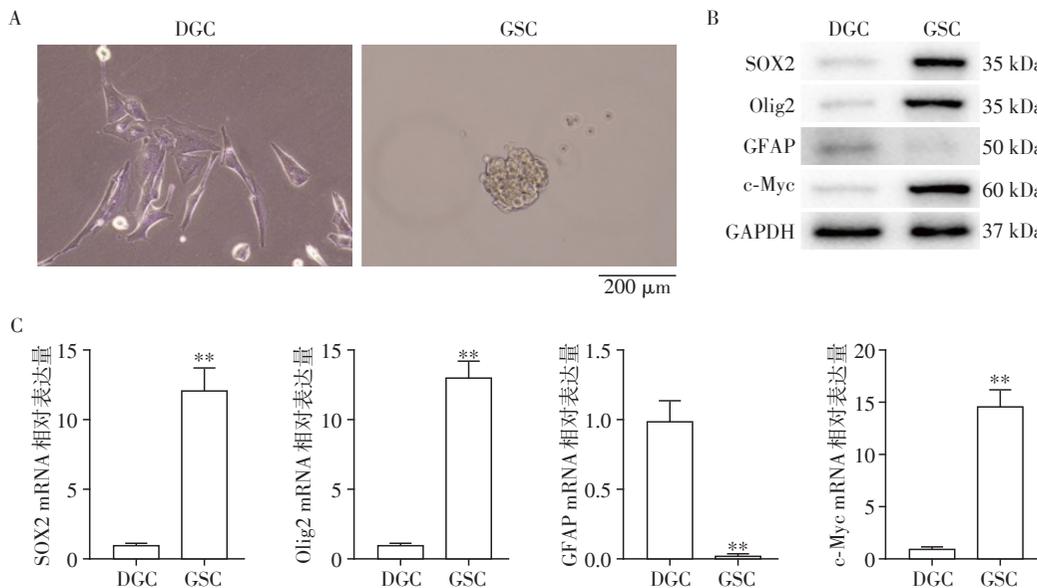
化标志物 GFAP 表达降低(图 1B、C)。通过以上实验获得并验证了配对的 DGC 和 GDC。

### 2.2 外泌体的提取与鉴定

按图示流程收集细胞上清中 EV(图 2A)。透射电镜观察显示, GSC EV 和 DGC EV 呈圆形或椭圆形囊泡结构, 直径约 100 nm, 双层膜包被(图 2B)。Western blot 实验结果表明, GSC EV 和 DGC EV 总蛋白表达外泌体特异标志蛋白 CD9、TSG101(图 2C)。纳米颗粒跟踪分析发现 GSC EV 和 DGC EV 的粒径和数量没有显著差异(图 2D)。以上实验表明获得了分别来源于 DGC 和 GDC 培养基上清液中的 EV。

### 2.3 GSC EV 对 U87 细胞增殖、侵袭和 TMZ 耐药能力的影响

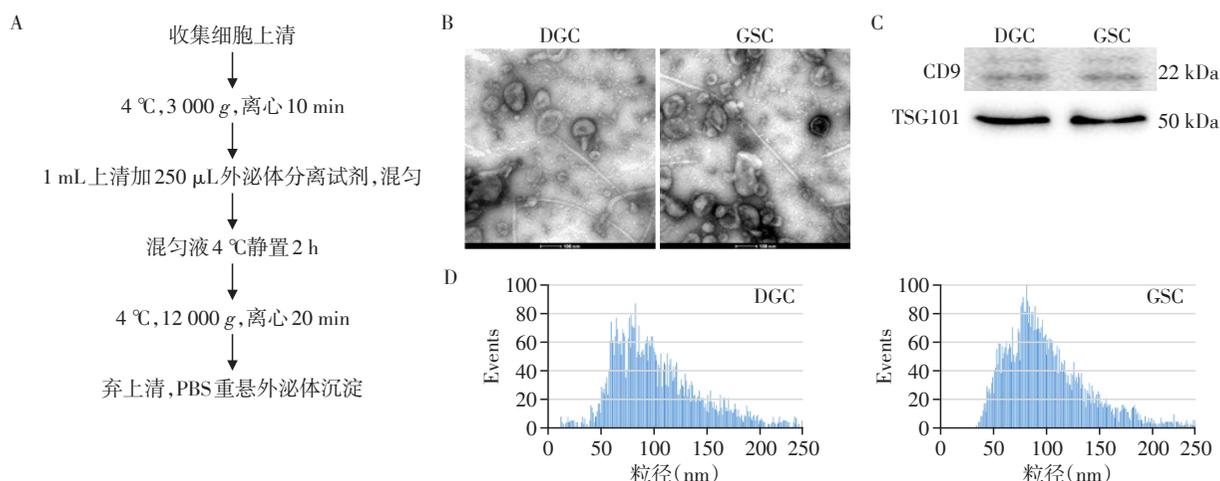
为研究 EV 对胶质瘤细胞恶性生物学行为的调控作用, 使用不同来源外泌体处理 U87 胶质瘤细胞。通过 CCK8 实验检测发现, 相比 DGC 来源的 EV, GSC 来源的 EV 可显著增加 U87 细胞增殖能力(图 3A)。克隆形成实验结果也提示, GSC EV 能使 U87 细胞克隆形成显著增多(图 3B)。Transwell 侵袭实验表明, 经过 GSC EV 刺激后的 U87 细胞具有更强的侵袭能力, 差异有统计学意义(图 3C)。另外 GSC EV 刺激后的 U87 细胞, 在 TMZ 处理的情况下, 其细胞活力相比 DSC EV 刺激后的 U87 细胞更强, 说明 GSC EV 刺激后的 U87 细胞获得了更高的 TMZ 耐药能力(图 3D)。以上实验说明, GSC 来源的 EV 可显著提高胶质瘤细胞增殖、侵袭和 TMZ 耐药能力。



A: 细胞成球实验检测胶质瘤干细胞成球能力; B: 免疫印迹实验检测胶质瘤干细胞的干性标志物和分化肿瘤细胞的分化标志物; C: qRT-PCR 实验检测胶质瘤干细胞的干性标志物和分化肿瘤细胞的分化标志物。与 DGC 比较, \*\*P < 0.01。

图1 人脑胶质瘤干细胞的分化与鉴定

Figure 1 Differentiation and identification of human glioblastoma stem cells



A: 胶质瘤干细胞和分化肿瘤细胞培养上清外泌体的提取流程; B: 透射电镜观察细胞上清外泌体形态学特征; C: 免疫印迹法检测 CD9、TSG101 蛋白表达; D: 纳米颗粒跟踪分析, 检测外泌体粒径和数量。

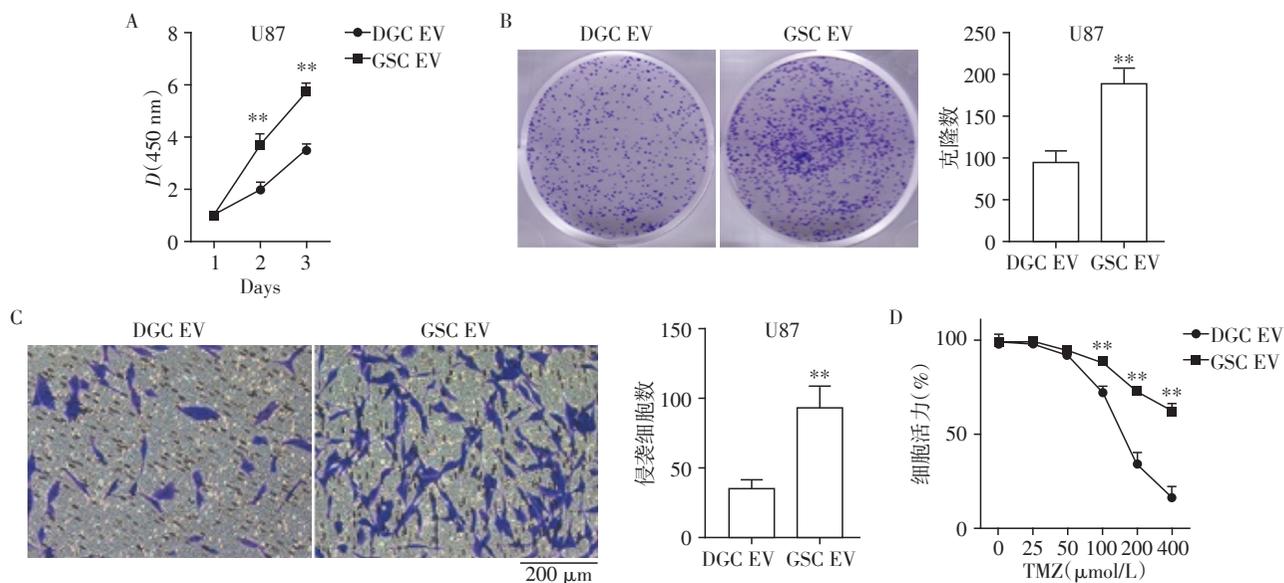
图2 胶质瘤干细胞和分化肿瘤细胞上清外泌体的提取和鉴定

Figure 2 Extraction and identification of exosomes from the supernatant of glioblastoma stem cells and differentiated tumor cells

#### 2.4 GSC EV 促进胶质瘤体内生长

为进一步探究 GSC EV 对胶质瘤细胞恶性表型的体内调控作用, 使用外泌体连续处理 U87 细胞 7 d 后, 原位种植于小鼠大脑。与 DGC EV 处理过的 U87 细胞相比, 小鼠活体成像显示 GSC EV 处理过的 U87 细胞体内肿瘤体积明显增大。荷瘤小鼠生存曲线表明, GSC EV 处理过的 U87 细胞原位成瘤的小鼠生存时间明显缩短(图 4A~C)。另外在 TMZ 治疗处

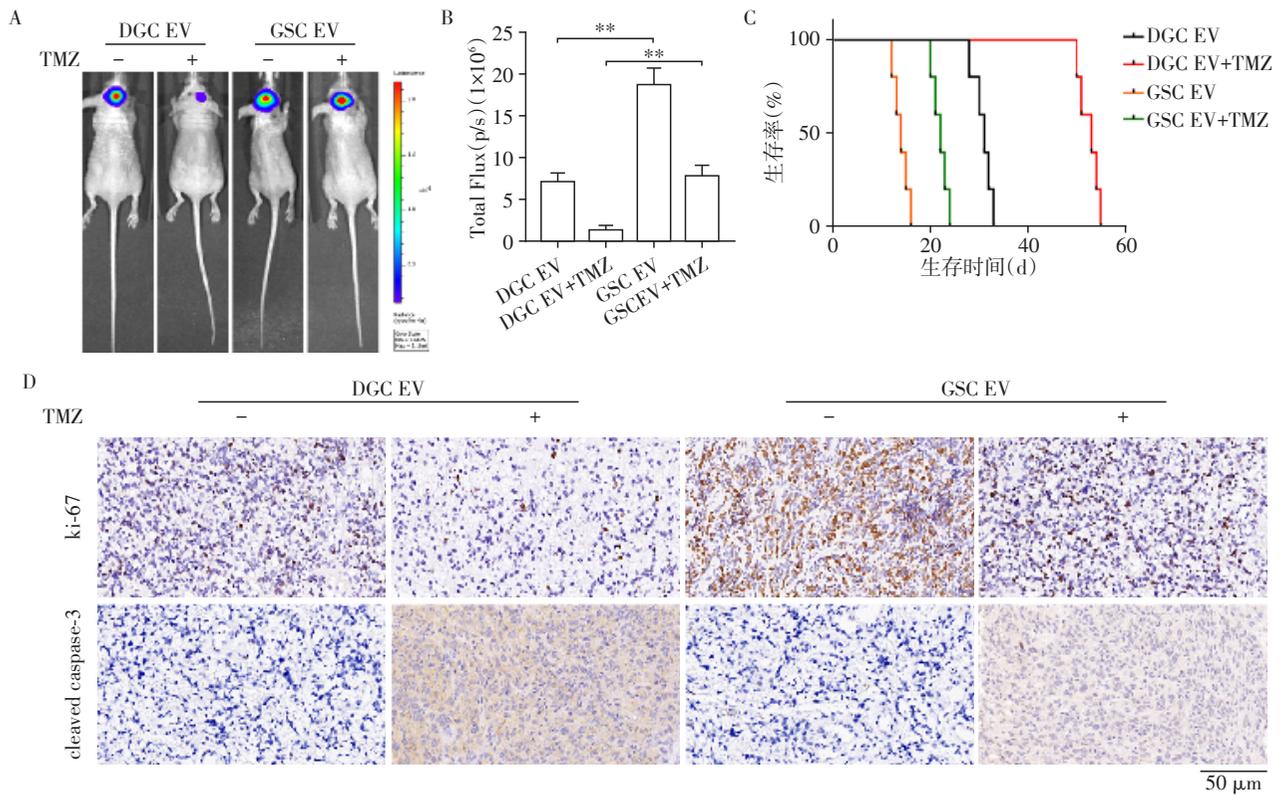
理下, 与 DGC EV 处理过的 U87 细胞相比, GSC EV 处理过的 U87 细胞体内生长能力也相应增强, 及其荷瘤鼠生存时间相应减少(图 4A~C)。免疫组织化学染色结果显示, GSC EV 促进 U87 细胞增殖指标 Ki-67 表达上升, 凋亡指标 cleaved caspase-3 表达减弱(图 4D)。以上实验结果提示, GSC 来源的 EV 可显著提高 U87 细胞体内生长和 TMZ 耐药能力, 降低小鼠存活时间和 TMZ 治疗效果。



A: CCK8 法检测 DGC EV 和 GSC EV 刺激后 U87 增殖能力; B: 克隆形成实验检测 DGC EV 和 GSC EV 刺激后 U87 增殖能力; C: Transwell 实验检测 DGC EV 和 GSC EV 刺激后 U87 侵袭能力; D: CCK8 法检测 DGC EV 和 GSC EV 刺激后 U87 的 TMZ 耐药能力。与 DGCEV 比较,  $^{**}P < 0.001$ 。

图3 DGC EVs 和 GSC EVs 对 U87 增殖和侵袭能力的影响

Figure 3 Effects of DGC EVs and GSC EVs on U87 proliferation and invasion ability



A、B:活体成像检测DGC EV和GSC EV处理后U87细胞的TMZ耐药能力;C:小鼠生存曲线分析DGC EV和GSC EV处理后荷瘤鼠的生存时间;D:免疫组化检测增殖指标Ki-67和凋亡指标cleaved caspase-3。两组比较,\*\**P*<0.01。

图4 GSC EV增强U87细胞体内恶性表型

Figure 4 GSC EV enhance the malignant phenotype of U87 cells *in vivo*

### 3 讨论

肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)是由肿瘤细胞、常驻和招募的细胞(与癌症相关的基质细胞和免疫细胞)、以及相应细胞的分泌产物(如细胞因子、趋化因子)和细胞外基质中的非细胞成分等组成<sup>[8]</sup>。胶质瘤微环境中细胞成分主要由GSC、DGC、胶质细胞、神经元、内皮细胞、巨噬细胞、树突状细胞等组成。DGC通常被认为是GSC来源的终末分化状态,相比在GBM组织中含量更多的DGC,含量更低的GSC被认为在胶质瘤的异质性、血管生成、化疗和放疗抵抗以及复发中发挥到更为重要的作用<sup>[9]</sup>。因此,胶质瘤干细胞既是现存治疗困难的主要驱动因素,也是我们未来寻求更有效治疗方案的潜在靶点。本研究选用GBM患者来源的原代GSC,通过细胞分化实验获得对应的GSC和DGC,以探寻GSC和DGC在体内外作用的差异。

EV是一种细胞外囊泡,大小通常在20~100 nm,在体内可由多种细胞分泌,如T细胞、神经细胞和肿瘤细胞等<sup>[10]</sup>。越来越多的研究发现,EV参与肿瘤细

胞和其周围环境的相互调节,促进肿瘤细胞的生长、侵袭和转移,在肿瘤的发生和进展中发挥了重要作用<sup>[11-12]</sup>。如EV通过传递非编码RNA(miR-21)来诱导肿瘤细胞的免疫逃逸,从而促肝癌进展<sup>[13]</sup>。乳腺癌相关巨噬细胞通过EV的内含物长链非编码RNA H1SLA,来增强乳腺癌细胞的有氧糖酵解和细胞抗凋亡能力<sup>[14]</sup>。另外,EV与胰腺癌的发生发展密切相关,是胰腺癌潜在的生物标志物、治疗靶点和治疗药物的载体<sup>[15]</sup>。本研究发现,比DGC来源的EV,GSC来源的EV可显著地增加胶质瘤细胞的增殖、侵袭和TMZ的耐药能力,提示GSC分泌的外泌体具有更强的生物学效应。国内学者也发现,在缺氧条件下,GBM分泌的外泌体可以通过改变周围内皮细胞的表型来诱导血管生成,进而促进GBM进展<sup>[16]</sup>。

EV的体积很小并且不稳定,因而如何高效分离和提取细胞上清外泌体也是亟需解决的问题。目前分离和提取EV的方法主要有超速离心法、免疫磁珠法、PEG沉淀法、试剂盒法<sup>[17-18]</sup>。超速离心法是EV提取最常用的方法,方法简便,获得EV量多,但

纯度稍低。免疫磁珠法,可保证外泌体形态的完整,特异性高,但易影响外泌体生物活性。本研究通过超速离心法来提取EV,分别获得GSC和DGC来源的EV,在鉴定外泌体标志物的基础上采用纳米颗粒跟踪分析发现两者的粒径和数量没有显著差异。

综上所述,相较于DGC来源的EV,GSC来源的EV能显著增加胶质瘤细胞的体内外增殖、侵袭和TMZ耐药的能力,表明GSC在胶质瘤恶性进展中发挥了极为重要的作用。本研究为解释胶质瘤患者的不良预后和对TMZ的耐药反应提供了一个新的视角。当然本研究也存在不足,如缺乏GSC来源的EV的具体调控机制,需要临床数据的支持验证等。

#### [参考文献]

[1] JIANG T, NAM D H, RAM Z, et al. Clinical practice guidelines for the management of adult diffuse gliomas [J]. *Cancer Lett*, 2021, 499: 60-72

[2] PLATTEN M, BUNSE L, WICK A, et al. A vaccine targeting mutant IDH1 in newly diagnosed glioma [J]. *Nature*, 2021, 592(7854): 463-468

[3] SUVÀ M L, TIROSH I. The glioma stem cell model in the era of single-cell genomics [J]. *Cancer Cell*, 2020, 37(5): 630-636

[4] ZHOU W, CHEN C, SHI Y, et al. Targeting glioma stem cell-derived pericytes disrupts the blood-tumor barrier and improves chemotherapeutic efficacy [J]. *Cell Stem Cell*, 2017, 21(5): 591-603.e4

[5] RAPOSO G, STAHL P D. Extracellular vesicles: a new communication paradigm? [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20(9): 509-510

[6] VINIK Y, ORTEGA F G, MILLS G B, et al. Proteomic analysis of circulating extracellular vesicles identifies potential markers of breast cancer progression, recurrence, and response [J]. *Sci Adv*, 2020, 6(40): eaba5714

[7] ZHAO S P, WANG F, YANG M, et al. CBX3 promotes glioma U87 cell proliferation and predicts an unfavorable

prognosis [J]. *J Neurooncol*, 2019, 145(1): 35-48

[8] 赵薇,季国忠. 微环境中肿瘤细胞与免疫细胞之间的代谢对话及对免疫治疗的影响 [J]. *南京医科大学学报*, 2020, 40(6): 779-782

[9] WANG X, PRAGER B C, WU Q, et al. Reciprocal signaling between glioblastoma stem cells and differentiated tumor cells promotes malignant progression [J]. *Cell Stem Cell*, 2018, 22(4): 514-528. e5

[10] WIKLANDER O P B, BRENNAN M Á, LÖTVALL J, et al. Advances in therapeutic applications of extracellular vesicles [J]. *Science Translational Medicine*, 2019, 11(492): eaav8521

[11] 陈群,吴颺,时国东,等. 肿瘤来源的外泌体在肿瘤进展中的作用及其诊疗意义 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2019, 39(2): 300-305

[12] 任真,吕金辉,张丽波,等. 肿瘤来源外泌体调控癌细胞转移机制的研究进展 [J]. *同济大学学报(医学版)*, 2021, 42(5): 705-710

[13] 冯思嘉,殷莲华. 外泌体在肝癌中作用的研究进展 [J]. *复旦学报(医学版)*, 2018, 45(2): 262-265

[14] CHEN F, CHEN J, YANG L, et al. Extracellular vesicle-packaged HIF-1 $\alpha$ -stabilizing lncRNA from tumour-associated macrophages regulates aerobic glycolysis of breast cancer cells [J]. *Nat Cell Biol*, 2019, 21(4): 498-510

[15] 唐普贤,修典荣. 外泌体在胰腺癌肿瘤微环境中的作用及机制 [J]. *中华实验外科杂志*, 2020, 37(4): 787-790

[16] JIANG J, LU J, WANG X, et al. Glioma stem cell-derived exosomal miR-944 reduces glioma growth and angiogenesis by inhibiting AKT/ERK signaling [J]. *Aging (Albany NY)*, 2021, 13(15): 19243-19259

[17] 罗靖莹,贺宏丽,郭等. 差速离心、密度梯度离心、超滤离心技术在骨髓间充质干细胞外泌体提取中的应用对比观察 [J]. *山东医药*, 2019, 59(12): 48-52

[18] 叶宁珍,赵绍杰,王高莹,等. 外泌体 miRNA 在妇产科疾病中的研究进展 [J]. *南京医科大学学报*, 2021, 41(6): 932-936

[收稿日期] 2022-04-13  
(本文编辑:唐震)