

· 肿瘤学研究 ·

前列腺癌细胞外泌体抑制成骨细胞分化

田笑,金玉翠,马长艳*

南京医科大学发育遗传学系,江苏 南京 211166

[摘要] 目的:探讨前列腺癌细胞外泌体对成骨细胞分化的影响。方法:采用ExoQuick-TC试剂盒与超滤法结合分离纯化前列腺癌细胞系PC3的外泌体,通过电镜、外泌体蛋白标志物CD63进行鉴定。用纯化的前列腺癌细胞外泌体处理前成骨细胞,提取总RNA,采用荧光实时定量PCR检测早期成骨分化标志物Runx2、Osx和中期成骨分化标志物Alp的表达情况。此外利用碱性磷酸酶(alkaline phosphatase,ALP)染色、茜素红染色方法检测成骨分化情况。结果:前列腺癌细胞外泌体可以进入到前成骨细胞中,并且外泌体处理前成骨细胞后,与对照组相比,Alp、Runx2与Osx的表达量显著降低($P < 0.05$),染色结果显示成骨分化受抑制。结论:在前列腺癌中,前列腺癌细胞会分泌出外泌体作用于前成骨细胞,并抑制成骨细胞的分化。

[关键词] 外泌体;前列腺癌;骨转移

[中图分类号] R737.25

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2019)08-1167-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20190813

Prostate cancer exosomes inhibit osteoblast differentiation

Tian Xiao, Jin Yucui, Ma Changyan*

Department of Developmental Genetics, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China

[Abstract] **Objective:** This study aims to explore the effect of exosome of prostate cancer cells on the osteoblast differentiation. **Methods:** The ExoQuick-TC kit and ultrafiltration are adopted to isolate and purify exosomes from prostate cancer cell lines. The exosomes will be characterized by marker CD63, and observed through electron microscopy. Extract total RNA from pre-osteoblasts treated by exosomes of prostate cancer cells; then expressions of Osx, Runx2 and Alp were detected by real-time PCR. Osx and Runx2 are the biomarker of early osteogenic differentiation and Alp is the biomarker of metaphase osteogenic differentiation. Furthermore, osteogenic differentiation were observed by using ALP and ARS staining. **Results:** Prostate cancer cell exosomes can enter pre-osteoblasts. Compared to control cells, the expression of Osx, Runx2 and Alp are decreased in pre-osteoblasts cells treated with prostate cancer cell exosomes ($P < 0.05$). The staining results showed that osteogenic differentiation was inhibited. **Conclusion:** Prostate cancer cells secrete exosomes that can act on pro-osteoblasts and inhibit osteoblast differentiation.

[Key words] exosome; prostate cancer; bone metastasis

[J Nanjing Med Univ, 2019, 39(08):1167-1171]

前列腺癌不仅是男性泌尿外科最常见的恶性肿瘤,也是引起男性肿瘤相关性死亡的第二大原因^[1]。在美国,前列腺癌的发病率已经逐渐超过肺癌,成为发病率最高的恶性肿瘤^[2]。随着我国国民的生活饮食习惯等逐渐西化,特别是经济发达地区前列腺

癌患者日趋增多,前列腺癌有可能成为我国男性发病率最高的恶性肿瘤,严重威胁我国男性的健康。由于前列腺癌在早期缺乏明显的临床症状,容易被忽视而错过最佳治疗机会。而晚期患者大部分已经出现转移,骨是最常见的前列腺癌转移靶器官。因此针对前列腺癌转移的分子机制研究,寻找新的治疗靶点具有十分重要的临床意义。

细胞外泌体是不同细胞之间通讯的一种新方式^[3-5],是目前微环境中的研究热点。它是双层脂质

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81570804, 81872389)

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

构成的囊泡,直径30~150 nm,内含蛋白、脂质和核酸等活性物质。研究表明,细胞外泌体不仅参与正常的生理调节活动,而且参与多种病理生理过程,包括肿瘤、炎症性疾病、自身免疫和神经退行性病变等^[6]。

本研究将纯化的前列腺癌细胞外泌体处理前成骨细胞,检测成骨细胞的成熟与分化,确定前列腺癌细胞外泌体在前列腺癌骨转移中的作用,进而为前列腺癌骨转移的早期诊断与治疗提供新靶点。

1 材料和方法

1.1 材料

人前列腺癌细胞系PC3(American Type Culture Collection,美国),小鼠前成骨细胞MC3T3-E1(中科院上海细胞所)。RPMI1640、 α -MEM培养基(Invitrogen公司,美国);超滤管(AmiconUltra-15, Millipore公司,美国),ExoQuick-TC(SBI公司,美国);碱性磷酸(ALP)酶检测试剂盒(南京建成),PKH67(Sigma公司,德国);地塞米松、抗坏血酸、茜素红和 β -甘油磷酸钠(Sigma公司,美国);二甲基亚砷(DMSO)、多聚甲醛、PBS(Gibco公司,美国);兔抗CD63、calnexin多克隆抗体(Abcam公司,美国),相应二抗(Sigma公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

人前列腺癌细胞PC3培养于含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素和100 μ g/mL链霉素的RPMI1640培养基中。小鼠前成骨细胞MC3T3-E1用含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素和100 μ g/mL链霉素的 α -MEM培养基培养。所有细胞置于37 $^{\circ}$ C 5% CO₂的培养箱中培养。

1.2.2 外泌体的提取

采用ExoQuick-TC试剂盒与超滤法结合的方法提取PC3分泌的外泌体。将PC3用无血清培养基培养48 h后收集培养液,以4 000 r/min离心20 min,去除细胞碎片。吸取上清液于50 mL超滤管中,以4 000 r/min离心30 min,得到的上清按照1:4的比例加入提取试剂,4 $^{\circ}$ C过夜后12 000 r/min离心20 min,沉淀即为外泌体(PC3-exo)。加入适量PBS重悬后,储存于-80 $^{\circ}$ C备用。

1.2.3 电镜鉴定外泌体结构

将50 μ L外泌体悬液滴加在载样铜网上,室温条件静置1 min后将铜网上多余液体用滤纸从侧面吸干,在铜网上滴加pH值为6.8的磷钨酸溶液(3%)30 μ L,1 min后将磷钨酸用滤纸吸干,室温静

置10 min后在透射电镜下观察外泌体并拍照。

1.2.4 蛋白质免疫印迹(Western blot)

将变性后的蛋白样品按照30 μ g/孔,加入预先配制好的变性聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)的加样孔中;电泳使蛋白分离。根据不同蛋白分子量的大小选择合适的转膜时间,80 V恒压转膜。转膜后用TBST缓冲液配制的5%脱脂奶粉溶液封闭2 h;根据目的蛋白的分子量大小,将特定位置的膜切至合适大小,2% BSA稀释一抗,加入一抗4 $^{\circ}$ C孵育过夜;TBST缓冲液洗膜,8 min \times 3次;分别加入TBST缓冲液配制的3%脱脂奶粉溶液稀释的辣根过氧化物酶标记的抗兔或小鼠IgG,室温孵育2 h;TBST缓冲液洗膜,8 min \times 3次;洗膜结束后,用发光液进行曝光拍片。预染的蛋白Marker作为分子量标准。

1.2.5 PKH67染色

将PC3-exo与PKH67避光孵育,4 min后加入染色终止液。再用试剂盒提取染色后的PC3-exo,用0.22 μ m滤器过滤,加入提前铺板的MC3T3-E1细胞中。培养4 h后,根据蓝光激发绿光原理进行荧光拍照。

1.2.6 成骨诱导分化

MC3T3-E1细胞向成骨细胞分化的诱导条件为:细胞培养至80%~90%融合度时在其培养基中加入100 mmol/L β -磷酸甘油钠、50 mg/L抗坏血酸和10 nmol/L地塞米松,每隔2~3 d进行细胞换液。

1.2.7 实时荧光定量PCR(real-time PCR)

TRIzol法提取细胞总RNA,采用随机引物将1 μ g RNA反转为cDNA。采用FastStart DNAMaster SYBRGreen I试剂盒进行real-time PCR。PCR条件为:95 $^{\circ}$ C 10 min;95 $^{\circ}$ C 10 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,共40个循环。通过比较Ct值法(2^{- $\Delta\Delta$ Ct})进行相关定量分析。ALP上游引物5'-TGACCTTCTCTCCTCCA-TCC-3',ALP下游引物5'-CTTCCTGGGAGTCTCA-TCC-3';Runx2上游引物5'-ATGATGACACTGC-CAGGTCTGAC-3',Runx2下游引物5'-AACTGCCT-GGGGTCTGAAAAGG-3';Osterix上游引物5'-AGCGACCACTTGAGCAAACAT-3',Osterix下游引物5'-GCGGCTGATTGGCTTCTTCT-3';内参 β -actin上游引物5'-AGATGTGGATCAGCAAGCAG-3',下游引物5'-GCGCAAGTTAGGTTTTGTCA-3'。

1.2.8 ALP染色

细胞经成骨诱导4 d后,吸弃上清,用PBS漂洗细胞2~3次,用95%乙醇固定2 min,晾干。按照试剂盒说明书配制ALP染色液,加入适量ALP染色工

作液,确保充分覆盖样品。室温避光孵育直至出现颜色变化。吸弃BCIP/NBT染色液,用ddH₂O洗涤1~2次终止显色反应。晾干镜下观察,扫描拍照。

1.2.9 茜素红染色

细胞经成骨诱导7 d后,吸弃上清,用PBS漂洗细胞2~3次,用95%乙醇固定2 min,晾干。配制2%的茜素红染液,室温染色。用ddH₂O洗涤3次终止染色反应。晾干镜下观察,扫描拍照。

1.3 统计学方法

所有实验重复3次,实验结果用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,运用SPSS17.0统计软件分析。多组间的两两比较采用LSD-*t*法, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 前列腺癌细胞PC3-exo的鉴定

从人前列腺癌细胞系PC3中分离出外泌体,透射电子显微镜结果显示,前列腺癌细胞PC3-exo形状规则,边缘清晰,具有特征性的杯状结构(图1A)。蛋白印迹法结果表明,CD63作为外泌体表面的标志性分子可以在PC3-exo中检测到,而骨钙联素只可在PC3细胞中检测到,而PC3-exo中检测不到(图1B)。

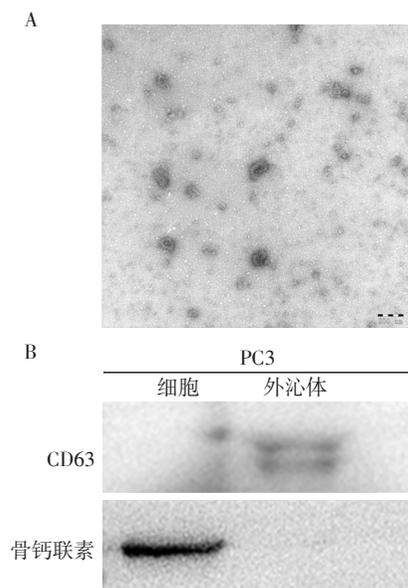
2.2 前成骨细胞吸收PC3-exo

为进一步研究PC3-exo对前成骨细胞的影响,采用荧光显微镜观察前成骨细胞摄取PC3-exo的情况。如图2所示,PC3-exo被PKH67荧光染料标记为绿色,MC3T3-E1细胞的细胞核被DAPI标记为蓝色。PC3-exo加入MC3T3-E1细胞培养液培养4 h后,用荧光显微镜进行拍照,结果显示与明场细胞位置相比,绿色标记的PC3-exo能够被MC3T3-E1细胞摄取,且主要集中在细胞核周边,这说明PC3-exo可以被前成骨细胞高效吸收。

2.3 前列腺癌细胞PC3-exo抑制成骨分化

将PC3-exo加入到MC3T3-E1细胞中,培养4 d后提取细胞的总RNA,使用real-time PCR进行检测。结果显示,当使用成骨分化诱导液诱导之后,ALP、Runx2和O_{sx}这3个成骨细胞分化标志物的mRNA水平都明显升高,但加入PC3-exo后,ALP、O_{sx}、Runx2的表达水平下调,差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$,图3A)。

为了进一步验证上面的实验结果,在诱导液诱导MC3T3-E1细胞5~7 d后,通过ALP染色检测细胞ALP活性。18~21 d后,通过茜素红染色检测细胞矿



A:电镜拍摄外泌体形态($\times 50$);B:Western blot检测CD63蛋白表达量。

图1 前列腺癌细胞PC3外泌体的鉴定

Figure 1 Characterization of prostate cancer cell PC3-derived exosomes

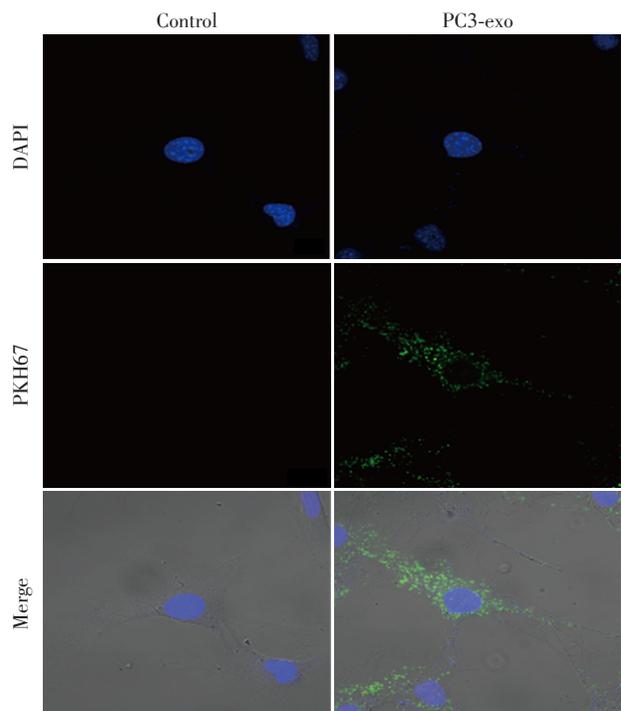


图2 荧光显微镜下观察MC3T3-E1对PC3-exo的摄取($\times 40$)

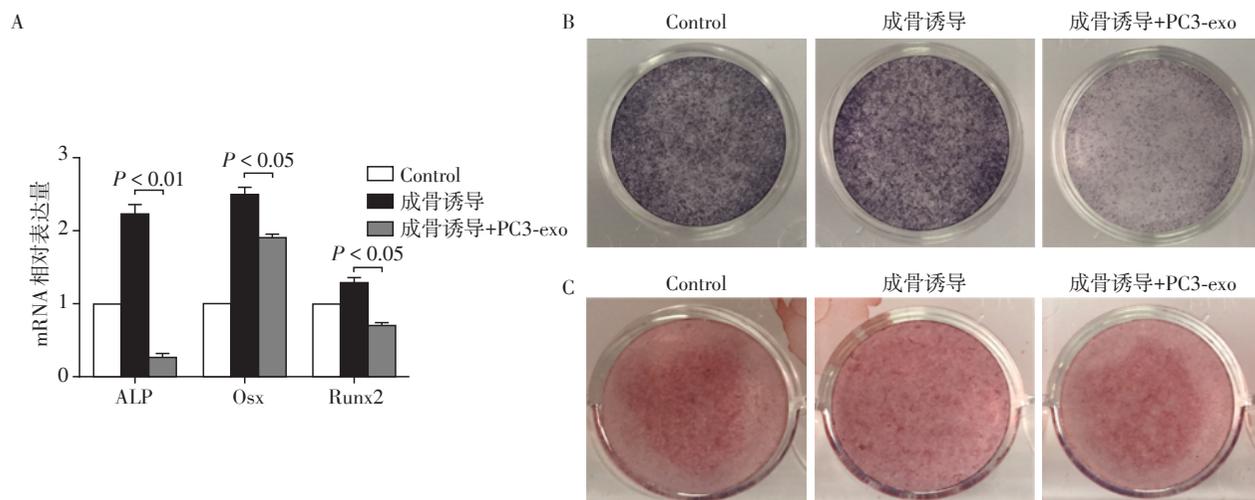
Figure 2 Representative confocal images of MC3T3-E1 cells uptake of exosomes from PC3 cells($\times 40$)

化结节的形成。结果表明,成骨细胞诱导液处理MC3T3-E1细胞后,细胞的ALP活性显著增强,并且形成的矿化结节明显增多(图3B、C)。但加入PC3-exo处理MC3T3-1细胞后,较诱导液组比较ALP活

性都显著减弱,并且形成的矿化结节也都明显减少(图3B、C)。以上结果表明PC3-exo能明显抑制MC3T3-E1细胞向成骨细胞分化。

3 讨论

肿瘤的转移是导致肿瘤相关性死亡的主要原因



A: ALP、Osx、Runx2 mRNA 相对表达量; B: ALP 染色观察成骨分化; C: 茜素红染色观察成骨分化。

图3 PC3-exo抑制成骨细胞的成熟与分化

Figure 3 Osteogenic differentiation of MC3T3-E1 cells inhibited by PC3 exosomes

因^[7]。据报道,80%~90%的晚期前列腺癌患者均有不同程度的骨转移^[8-9]。患者一旦发生骨转移,不仅预后极差,而且严重影响患者的生活质量。Hervonea等^[10]在进行人群大样本研究中发现,未发生骨转移的早期前列腺癌患者1年及5年生存率分别为87%和56%,而对于已有骨转移灶存在的患者其相应的生存率仅为47%和3%。

前列腺癌骨转移中约95%表现为成骨型骨转移,产生大量骨小梁^[11],破骨型骨转移十分少见。虽然没有研究表明破骨细胞数量增加,但从组织学水平检查常发现前列腺癌骨转移合并有溶骨型改变以及从分子水平检测与骨吸收相关的基因,发现其表达量有所增加^[12]。有报道称,骨转移发生之初有溶骨过程。从细胞水平来看,转移的前列腺癌细胞可能首先发生溶骨,抑制成骨形成,为以后成骨提供形成空间、营养物质及钙离子。此外,在动物模型中也发现溶骨现象先于成骨活动发生,而且在成骨过程中发挥重要作用^[13]。临床研究发现,前列腺癌骨转移患者抑制溶骨活动后相应成骨活动也得到了抑制^[14]。

目前,前列腺癌骨转移的发生机制仍不十分清楚,但有文献报道肿瘤细胞与骨功能细胞之间的相互作用会参与调控肿瘤骨转移的发生,并且文献报道前列腺癌细胞可以产生多种因子,这些细胞因子

可以刺激骨母细胞的分化^[15-16]。

外泌体作为一种由细胞分泌,脂质双分子层包裹的,包含mRNA、miRNA和蛋白质等多种小分子的囊泡,几乎可由所有种类的细胞产生,如免疫细胞、上皮细胞、干细胞、肿瘤细胞等^[17-19]。其中肿瘤细胞来源的细胞外泌体与肿瘤的恶变进程关系密切,参与调节肿瘤细胞生长、侵袭、转移和血管形成等^[20]。并且由于外泌体在胞质内合成且富含活性蛋白、脂质和核酸而发挥主要作用。已有研究证实,外泌体与前列腺癌的进展密切相关,包括化疗耐药、免疫抑制、增殖、凋亡和血管生成等^[21]。

为进一步探讨前列腺癌细胞外泌体对骨转移的影响,本研究首先提取了前列腺癌细胞的外泌体并使用电镜与Western blot进行鉴定,然后采用了PKH67染色的方法证明了前列腺癌细胞的外泌体可以被前成骨细胞吸收。分别采用了real-time PCR、ALP染色与茜素红染色的方法鉴定了在前列腺癌细胞外泌体处理后的成骨分化情况。结果表明,在使用前列腺癌细胞外泌体处理成骨细胞前体细胞后,成骨细胞的成熟与分化会受到抑制。

综上所述,随着对前列腺癌细胞外泌体功能研究的不断深入,其在肿瘤中的作用将会逐渐清晰,有望成为一个新的肿瘤治疗靶点。本研究在细胞水平考察了前列腺癌细胞外泌体对成骨分化的影

响,为前列腺癌细胞外泌体作为前列腺癌转移治疗的新靶点提供了理论和实验依据。

[参考文献]

- [1] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2013, 63(1): 11-30
- [2] Cooperberg MR, Konety BR. Management of localized prostate cancer in men over 65 years [J]. *Curr Opin Urol*, 2009, 19(3): 309-314
- [3] Kalluri R. The biology and function of exosomes in cancer [J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(4): 1208-1215
- [4] Graner MW, Cumming RI, Bigner DD. The heat shock response and chaperones/heat shock proteins in brain tumors: surface expression, release, and possible immune consequences [J]. *J Neurosci*, 2007, 27(42): 11214-11227
- [5] Vanni I, Alama A, Grossi F, et al. Exosomes: a new horizon in lung cancer [J]. *Drug Discov Today*, 2017, 22(6): 927-936
- [6] 陈群,吴颺,时国东,等.肿瘤来源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
- [7] Costa R, Carneiro BA, Wainwright DA, et al. Developmental therapeutics for patients with breast cancer and central nervous system metastasis: current landscape and future perspectives [J]. *Ann Oncol*, 2016, 28(1): 44-56
- [8] Carter HB, Albertsen PC, Barry MJ et al. Early detection of prostate cancer: AUA guideline [J]. *J Urol*, 2013, 190(2): 419-426
- [9] Li J, Djenaba JA, Soman A, Rim SH, Master VA. Recent trends in prostate cancer incidence by age, cancer stage, and grade, the United States, 2001-2007 [J]. *Prostate Cancer*, 2012; 2012: 691380
- [10] Hervonen P, Joensuu H, Joensuu T, et al. Biweekly docetaxel is better tolerated than conventional three-weekly dosing for advanced hormone-refractory prostate cancer [J]. *Anticancer Res*, 2012, 32(3): 953-956
- [11] Roudier MP, Vesselle H, True LD, et al. Bone histology at autopsy and matched bone scintigraphy finding in patients with hormone re-refractory prostate cancer: The effect of bisphosphonate therapy on bone scintigraphy results [J]. *Clin Exp Metastasis*, 2003, 20(2): 171-180
- [12] 汤昊. 前列腺癌骨转移研究进展 [J]. *中华男科学杂志*, 2010, 16(4): 364-367
- [13] Yi B, Williams PJ, Niewolna M, et al. Tumor-derived platelet-derived growth factor-BB plays a critical role in osteosclerotic bone metastasis in an animal model of human breast cancer [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(3): 917-923
- [14] Drake MT, Clarke BL, Kholsa S. Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice [J]. *Mayo Clin Proc*, 2008, 83(9): 1032-1045
- [15] Devita VT, Rosenberg SA, Hellman S. *Cancer: Principles and practice of oncology* [M]. Lippincott, Williams and Wilkins, 2005: 353
- [16] Overall CM, Lopez-Otin C. Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era [J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(9): 657-672
- [17] Vlassov AV, Magdaleno S, Setterquist R, et al. Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1820(7): 940-948
- [18] Fang JH, Zhang ZJ, Shang LR, et al. Hepatoma cell secreted exosomal microRNA-103 increases vascular permeability and promotes metastasis by targeting junction proteins [J]. *Hepatology*, 2018, 68(4): 1459-1475
- [19] Cai Q, Zhu A, Gong L. Exosomes of glioma cells deliver miR-148a to promote proliferation and metastasis of glioblastoma via targeting CADM1 [J]. *Bull Cancer*, 2018, 105(7-8): 643-651
- [20] Keller S, Sanderson MP, Stoeck A, et al. Exosomes: from biogenesis and secretion to biological function [J]. *Immunol Lett*, 2006, 107(2): 102-108
- [21] Lässer C, Eldh M, Lötvall J. Isolation and characterization of RNA-containing exosomes [J]. *J Vis Exp*, 2012, 59: e3037

[收稿日期] 2019-03-13