

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.14.014

细胞外囊泡装载多柔比星对人膀胱癌 BIU - 87 细胞增殖及凋亡的影响*

马燕凌, 晏菲, 魏武杰, 邓洁, 李黎, 刘莉, 孙建海[△]

(江汉大学附属湖北省第三人民医院肿瘤科, 湖北 武汉 430000)

摘要:目的 探讨细胞外囊泡(EVs)装载多柔比星对人膀胱癌 BIU - 87 细胞增殖及凋亡的影响。方法 体外培养 BIU - 87 细胞并进行 EVs 提取, 制备装载多柔比星的载药囊泡。实验分为空白对照组(不进行处理)、EVs 组(EVs 混悬液, 100 个/细胞)、多柔比星组(0.3 μ g 多柔比星)、载药囊泡组(载药囊泡混悬液, 100 个/细胞)。采用 MTT 法和流式细胞法分别检测细胞增殖率和凋亡率, 实时荧光聚合酶链式反应(RT-PCR)法和 Western blot 法分别检测细胞中糖原合成酶激酶-3 β (GSK-3 β)、 β -连环蛋白(β -catenin)、Notch1 的 mRNA 及蛋白表达水平。结果 EVs 组和载药囊泡组细胞内 PKH67 标记的团块状绿色荧光均匀; 与空白对照组比较, EVs 组上述指标均无显著差异($P > 0.05$); 与空白对照组及 EVs 组比较, 多柔比星组和载药囊泡组细胞增殖率、 β -catenin 和 Notch1 mRNA 及蛋白表达水平均显著降低, 细胞凋亡率、GSK-3 β mRNA 及蛋白表达水平均显著升高, 且载药囊泡组更优($P < 0.05$)。结论 EVs 装载多柔比星抑制 BIU - 87 细胞增殖和促进其凋亡的作用较单用多柔比星强, 机制可能与抑制 β -catenin / Notch1 信号通路有关。

关键词: 细胞外囊泡; 多柔比星; 膀胱癌; 细胞增殖; 细胞凋亡; β -catenin / Notch1 通路

中图分类号: R979.1⁺4; R96

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2022)14-0060-05

Effect of Extracellular Vesicles Loaded with Doxorubicin on the Proliferation and Apoptosis of Human Bladder Cancer BIU - 87 Cells

MA Yanling, YAN Fei, WEI Wujie, DENG Jie, LI Li, LIU Li, SUN Jianhai

(Department of Oncology, Hubei No. 3 People's Hospital of Jianghan University, Wuhan, Hubei, China 430000)

Abstract: Objective To investigate the effect of extracellular vesicles (EVs) loaded with doxorubicin on the proliferation and apoptosis of human bladder cancer BIU - 87 cells. **Methods** BIU - 87 cells were cultured *in vitro* and EVs were extracted to prepare drug-loaded vesicles loaded with doxorubicin. The blank control group (without treatment), EVs group (EVs suspension, 100 EVs / cell), doxorubicin group (0.3 μ g of doxorubicin) and drug-loaded vesicle group (drug-loaded vesicle suspension, 100 EVs / cells) were set up in this experiment. MTT assay and flow cytometry were used to detect the proliferation rate and apoptosis rate of cells, and real-time fluorescence polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot were used to detect the expression levels of glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β), β -catenin and Notch1 mRNA and protein in cells. **Results** In the EVs group and drug-loaded vesicle group, the PKH67 labeled green fluorescence in BIU - 87 cells was uniform. Compared with those in the blank control group, there was no significant difference in the above indexes in the EVs group ($P > 0.05$). Compared with those in the blank control group and EVs group, the cell proliferation rate, the expression levels of β -catenin and Notch1 mRNA and protein were significantly lower, while the apoptosis rate and the expression levels of GSK-3 β mRNA and protein were significantly higher in the doxorubicin group and drug-loaded vesicle group, and those in the drug-loaded vesicle group were better ($P < 0.05$). **Conclusion** EVs loaded with doxorubicin has a stronger effect on inhibiting the proliferation of BIU - 87 cells and promoting the apoptosis of BIU - 87 cells than that of doxorubicin, and its mechanism may be related to the inhibition of the expression of β -catenin / Notch1 signaling pathway.

Key words: extracellular vesicles; doxorubicin; bladder cancer; cell proliferation; apoptosis; β -catenin / Notch1 pathway

膀胱癌(BC)是泌尿生殖系统常见恶性肿瘤, 超70%的膀胱癌为非肌层浸润性膀胱癌(NMIBC)^[1]。临床治疗 NMIBC 常先行经尿道膀胱肿瘤切除术, 然后以多柔比星行膀胱内化学药物治疗(简称化疗)。然而, 随着 NMIBC 分期和分级的增长, 复发率超过50%^[2]。膀胱内化疗与静脉内输注化疗药物一样, 不能完全消除癌细

胞, 同时, 由于其靶向性差、副作用多等缺点, 限制了多柔比星的疗效^[3]。近年来, 细胞外囊泡(EVs)在肿瘤进展和治疗中的作用引起了广泛关注^[4]。细胞能释放不同大小的微囊泡, 在受到刺激后, 细胞改变其骨架, 导致胞质内容物被包裹在细胞膜中, 形成囊泡, 随后被释放到细胞外空间, 通过在细胞间转移生物活性和功能活

*基金项目: 湖北省卫生健康委科研立项项目[WJ2019F184]。

第一作者: 马燕凌, 女, 硕士, 教授, 研究方向为恶性肿瘤的综合治疗, (电子信箱)zhongshan_doctor@163.com。

[△]通信作者: 孙建海, 男, 硕士, 教授, 研究方向为恶性肿瘤的综合治疗, (电子信箱)sunjian.hai@163.com。

性蛋白及RNA来介导细胞间通信^[5]。载药囊泡是肿瘤细胞来源的EVs经过特殊处理,与常规化疗药物有机结合,形成以囊泡为载体的载药微颗粒,具有靶向性和特异性高及副作用小等特点^[6]。同时, β -连环蛋白(β -catenin)/Notch1通路与膀胱癌、前列腺癌和乳腺癌的转移相关,对细胞的分化、增殖和凋亡有显著影响^[7]。因此,本研究中探讨了EVs装载多柔比星对人膀胱癌BIU-87细胞增殖和凋亡的影响,及 β -catenin/Notch1通路在其中的作用,为膀胱癌的临床治疗提供新的理论依据。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与细胞

仪器:240i型CO₂培养箱(美国Thermo Revco公司);Z36HK型高速冷冻离心机(德国Hermle公司);TE2000-U+DXM1200型倒置显微镜(日本Nikon公司);BS-1096B型酶标仪(南京德铁实验设备有限公司);Real-time PCR扩增仪(美国ABI公司);BD FACS-Canto型流式细胞仪和BD垂直电泳仪(美国BD公司);Tanon 1600型凝胶成像系统(上海天能科技有限公司)。

试剂:多柔比星(齐鲁制药有限公司,批号为2020064);RPMI-1640培养基、胎牛血清(FBS,浙江天杭生物科技有限公司);PKH67试剂盒(美国Sigma公司);四甲基偶氮唑盐(MTT,美国Amresco公司);膜联蛋白(Annexin)V/碘化丙啶(PI)细胞凋亡检测试剂盒(美国BD公司);Trizol(美国Invitrogen公司);cDNA反转录试剂盒和实时荧光聚合酶链式反应(RT-PCR)试剂盒(瑞士Roche公司);RIPA裂解液和Western blot相关试剂(北京索莱宝生物技术公司);糖原合成酶激酶-3 β (GSK-3 β)、 β -catenin、Notch1、 β -actin抗体和HRP标记山羊抗鼠IgG二抗(上海碧云天生物技术有限公司)。

细胞:人膀胱癌BIU-87细胞(中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和EVs提取

在37℃、5% CO₂条件下用含10% FBS的RPMI-1640培养基培养BIU-87细胞,隔天换液,当细胞处于对数生长期时进行后续试验。将60 mL含2% FBS的培养基离心(30 900 r/min)过夜,去除血清中的EVs,用此培养基培养BIU-87细胞(约 5×10^7 个),48 h内收集上清,1 200 r/min离心10 min,经0.45 μ m过滤器过滤;4 000 r/min离心30 min,经0.22 μ m过滤器过滤;30 900 r/min离心70 min,将沉淀溶于磷酸盐缓冲液(PBS),即得EVs混悬液。

1.2.2 载药囊泡制备

取多柔比星30 μ g,溶于1 mL EVs混悬液中,在

37℃恒温培养箱中孵育1 h,9 168 r/min离心10 min,经0.22 μ m过滤器过滤;30 900 r/min离心70 min,将沉淀溶于PBS,即得载药囊泡混悬液。

1.2.3 观察指标与检测

细胞摄取EVs情况:向EVs混悬液和载药囊泡混悬液中分别加入4 μ L PKH67稀释液,混匀,静置3 min,用PBS终止染色,经0.22 μ m过滤器过滤;30 900 r/min离心70 min,将沉淀溶于PBS,即得PKH67标记的EVs和PKH67标记的载药囊泡。取对数生长期BIU-87细胞,以 5×10^3 个/孔接种于96孔板中(每孔200 μ L),待细胞融合后分别加入PKH67标记的EVs和PKH67标记的载药囊泡,静置24 h,显微镜下观察细胞摄取情况。

细胞增殖率:采用MTT法。实验分为空白对照组(不进行处理)、EVs组(EVs混悬液,100个/细胞)、多柔比星组(0.3 μ g多柔比星)、载药囊泡组(载药囊泡混悬液,100个/细胞),以相应方法处理细胞,44 h后加入MTT(每孔50 μ L),继续培养4 h,加入二甲基亚砷(每孔200 μ L),缓慢振荡10 min,用酶标仪在490 nm波长处检测各孔吸光度(OD)值,计算细胞增殖率。细胞增殖率 = $OD_{\text{实验组}} / OD_{\text{空白对照组}}$ 。

细胞凋亡率:采用流式细胞法。按“细胞增殖率”项下分组及处理细胞,48 h后收获细胞,用预冷PBS洗涤,1 000 r/min离心10 min,弃上清,分别加入5 μ L Annexin V-FITC与PI,充分混匀后室温避光孵育20 min,以流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

细胞中GSK-3 β 、 β -catenin和Notch1 mRNA表达:采用RT-PCR法。按“细胞增殖率”项下分组及处理细胞,48 h后收获细胞,加入Trizol提取总RNA,反转录制备cDNA。反应条件为,95℃预变性4 min,94℃变性30 s,58℃退火30 s,72℃延伸1 min,40个循环;72℃延伸7 min。读取循环阈值(C_t值),以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示GSK-3 β 、 β -catenin和Notch1 mRNA的表达量(以 β -actin为内参)。

细胞中GSK-3 β 、 β -catenin和Notch1蛋白表达:采用Western blot法。按“细胞增殖率”项下分组及处理细胞,48 h后收获细胞,各组分别加入100 μ L RIPA裂解液,进行电泳(每孔20 μ g),转膜,加入GSK-3 β (1:200)、 β -catenin(1:400)和Notch1(1:400)抗体孵育(4℃过夜);用HRP标记山羊抗鼠IgG二抗(1:5 000)在室温下孵育30 min,显色、采集图像并分析(以 β -actin为内参)。

1.3 统计学处理

采用SPSS 23.0统计学软件分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,行单因素方差分析,多重比较采用SNK-q检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

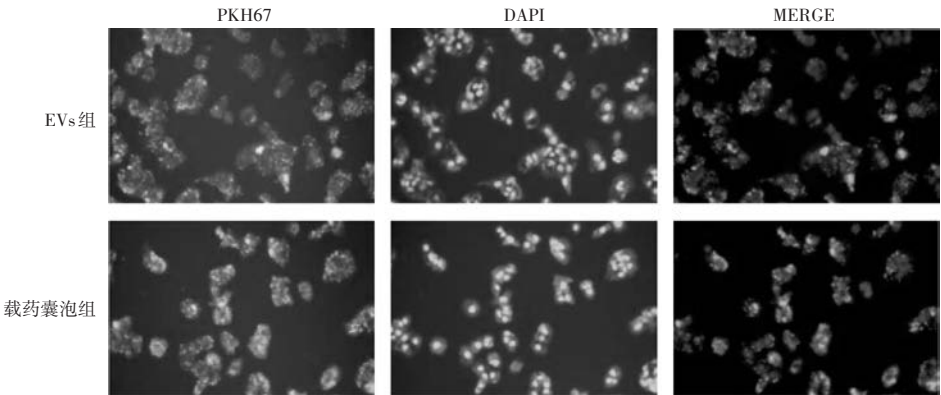
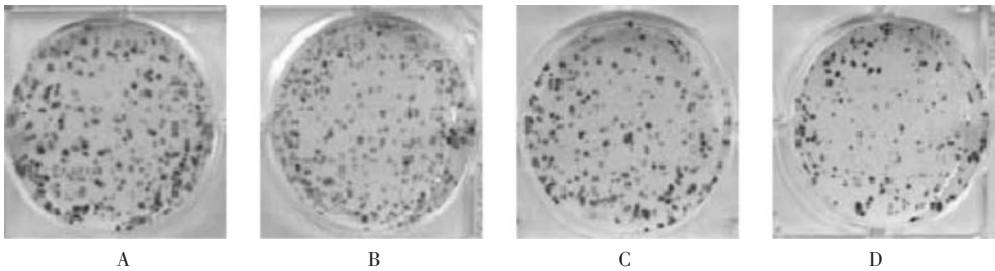


图 1 BIU - 87 细胞摄取 EVs 和载药囊泡情况

Fig. 1 The uptake of EVs and drug - loaded vesicles by BIU - 87 cells



A. 空白对照组 B. EVs 组 C. 多柔比星组 D. 载药囊泡组

图 2 载药囊泡对 BIU - 87 细胞增殖的影响

A. Blank control group B. EVs group C. Doxorubicin group D. Drug - loaded vesicle group

Fig. 2 Effect of drug - loaded vesicles on the proliferation of BIU - 87 cells

2 结果

2.1 BIU - 87 细胞摄取 EVs 情况

EVs 组和载药囊泡组 BIU - 87 细胞内 PKH67 标记的团块状绿色荧光均匀,提示 BIU - 87 细胞可摄取 EVs 和载药囊泡。详见图 1。

2.2 细胞增殖率及凋亡率

与空白对照组比较, EVs 组细胞增殖率及细胞凋亡率无显著差异 ($P > 0.05$); 与空白对照组及 EVs 组比较, 多柔比星组和载药囊泡组细胞增殖率显著降低、细胞凋亡率显著升高, 且载药囊泡组更优 ($P < 0.05$)。详见图 2 和表 1。

表 1 各组细胞增殖率和凋亡率比较 ($\bar{X} \pm s, \%, n = 3$)

Tab. 1 Comparison of proliferation rate and apoptosis rate of BIU - 87 cells in each group ($\bar{X} \pm s, \%, n = 3$)

组别	细胞增殖率	细胞凋亡率
空白对照组	100.00 $\pm$ 9.42	1.84 $\pm$ 0.27
EVs 组	97.58 $\pm$ 14.36	2.29 $\pm$ 0.49
多柔比星组	76.10 $\pm$ 6.82 ^{ab}	5.78 $\pm$ 0.82 ^{ab}
载药囊泡组	57.42 $\pm$ 7.69 ^{abc}	9.30 $\pm$ 0.75 ^{abc}

注: 与空白对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与 EVs 组比较, ^b $P < 0.05$; 与多柔比星组比较, ^c $P < 0.05$ 。表 2 及表 3 同。

Note: Compared with those in the blank control group, ^a $P < 0.05$; Compared with those in the EVs group, ^b $P < 0.05$; Compared with those in the doxorubicin group, ^c $P < 0.05$ (for Tab. 1 - 3).

2.3 GSK - 3 β , β - catenin 和 Notch1 mRNA 表达水平

与空白对照组比较, EVs 组细胞中 GSK - 3 β 、 β - catenin 和 Notch1 mRNA 表达水平无显著差异 ($P > 0.05$); 与空白对照组及 EVs 组比较, 多柔比星组和载药囊泡组细胞中 GSK - 3 β mRNA 表达水平显著升高、 β - catenin 和 Notch1 mRNA 表达水平显著降低, 且载药囊泡组更优 ($P < 0.05$)。详见表 2。

表 2 各组细胞中 GSK - 3 β 、 β - catenin 和 Notch1 mRNA 表达水平比较 ($\bar{X} \pm s, n = 3$)

Tab. 2 Comparison of GSK - 3 β , β - catenin and Notch1 mRNA expression levels in cells in each group ($\bar{X} \pm s, n = 3$)

组别	GSK - 3 β	β - catenin	Notch1
空白对照组	1.00 $\pm$ 0.15	1.00 $\pm$ 0.07	1.00 $\pm$ 0.14
EVs 组	0.96 $\pm$ 0.11	1.04 $\pm$ 0.13	0.98 $\pm$ 0.07
多柔比星组	1.32 $\pm$ 0.08 ^{ab}	0.87 $\pm$ 0.09 ^{ab}	0.85 $\pm$ 0.11 ^{ab}
载药囊泡组	1.56 $\pm$ 0.13 ^{abc}	0.72 $\pm$ 0.10 ^{abc}	0.70 $\pm$ 0.10 ^{abc}

2.4 GSK - 3 β , β - catenin 和 Notch1 蛋白表达水平

与空白对照组比较, EVs 组细胞中 GSK - 3 β 、 β - catenin 和 Notch1 蛋白表达水平无显著差异 ($P > 0.05$); 与空白对照组及 EVs 组比较, 多柔比星组和载药囊泡组细胞中 GSK - 3 β 蛋白表达水平显著升高、 β - catenin 和 Notch1 蛋白表达水平显著降低, 且载药囊泡组更优 ($P < 0.05$)。详见表 3。

表3 各组细胞中GSK-3 β 、 β -catenin和Notch1蛋白表达水平比较($\bar{X} \pm s, n=3$)

Tab.3 Comparison of GSK-3 β , β -catenin and Notch1 protein expression levels in cells in each group ($\bar{X} \pm s, n=3$)

组别	GSK-3 β	β -catenin	Notch1
空白对照组	0.42 $\pm$ 0.09	0.38 $\pm$ 0.05	0.49 $\pm$ 0.06
EVs组	0.45 $\pm$ 0.13	0.38 $\pm$ 0.06	0.46 $\pm$ 0.07
多柔比星组	0.73 $\pm$ 0.06 ^{ab}	0.25 $\pm$ 0.04 ^{ab}	0.30 $\pm$ 0.05 ^{ab}
载药囊泡组	0.89 $\pm$ 0.10 ^{abc}	0.13 $\pm$ 0.03 ^{abc}	0.08 $\pm$ 0.03 ^{abc}

3 讨论

NMIBC具有易侵犯、易转移、易耐药和复发率高等特点,故急需新疗法来增强NMIBC对膀胱内化疗的敏感性。EVs是细胞释放的囊泡状结构,可被癌细胞有效吸收,使EVs装载化疗药物作用于癌细胞成为可能^[8]。研究表明,载药囊泡是以癌细胞来源的EVs作为化疗药物载体,携带化疗药物,可将药物输入癌细胞内,具有极强的癌细胞亲和力及较好的靶向性^[9]。多柔比星是NMIBC术后膀胱内化疗的首选药物,通过抑制DNA拓扑异构酶II活性,诱导癌细胞凋亡,但其在体内缺乏特异性且清除过快,降低了化疗有效性^[10]。本研究中通过EVs装载多柔比星给药,升高了BIU-87细胞凋亡率,降低了其增殖率,提示载药囊泡可作为理想的敏化剂,增强化疗药物对膀胱癌细胞的杀伤力。同时,膀胱上皮属移行上皮,其结构中有一层圆顶状细胞的浅层,这一结构细胞排列在管腔表面,作为管腔和血流间不可穿透的屏障,可抑制载药囊泡进入更深的细胞层。然而,这种物理屏障可能由于其不规则的组织结构而在膀胱癌组织中被破坏,使载药囊泡进入膀胱癌细胞^[11]。本研究中主要关注了载药囊泡对BIU-87细胞的作用,其对正常膀胱细胞的作用将在后续的研究中完善。

β -catenin/Notch1通路参与哺乳动物胚胎发育、器官发生、细胞凋亡及各种癌细胞迁移的调节^[12]。与 β -catenin/Notch1通路中的正向调节因子 β -catenin不同,GSK-3 β 属负调控因子,GSK-3 β 磷酸化 β -catenin的氨基端丝氨酸/苏氨酸,从而下调 β -catenin在细胞质中的表达,阻断 β -catenin/Notch1通路的激活,减弱 β -catenin/Notch1通路对凋亡的抑制,促进细胞凋亡^[13]。作为 β -catenin/Notch1通路的下游信号因子,Notch1已被证明是BC的肿瘤促进因子,Notch1过表达促进了上皮间质转化的进程^[14]。在鼻咽癌中,抑制Notch-1可增加Kruppel样因子4(KLF4)的表达,从而减少鼻咽癌细胞增殖和抑制肿瘤形成^[15]。同时,转染Notch1 siRNA的细胞增殖率明显低于转染Notch1的细胞^[16]。由于增殖与化疗抗性有关,开发针对抗增殖的调节剂,可获得新的化疗增敏剂^[17-18]。本研究结果显示,载药囊泡抑制 β -catenin/Notch1通路的作用明显强于

单用多柔比星。因此, β -catenin/Notch1通路下调可能为抑制BC细胞增殖提供了一个靶点,具有潜在的临床意义。

综上所述,EVs装载多柔比星抑制BIU-87细胞增殖和促进其凋亡的作用较单用多柔比星强,其机制可能与抑制 β -catenin/Notch1信号通路有关。

参考文献

- [1] TRAN L, XIAO JF, AGARWAL N, et al. Advances in bladder cancer biology and therapy[J]. Nat Rev Cancer, 2021, 21(2): 104-121.
- [2] LI S, ZHAO K, JIN Y, et al. Relapse and Prognosis of Non-Muscle Invasive Bladder Cancer After Combined HOLRBT with Sunitinib and TGC Perfusion Chemotherapy[J]. Cancer Biother Radiopharm, 2020, 35(8): 563-569.
- [3] HAMMER L, LAUFER M, DOTAN Z, et al. Accelerated Hypofractionated Radiation Therapy for Elderly Frail Bladder Cancer Patients Unfit for Surgery or Chemotherapy[J]. Am J Clin Oncol, 2019, 42(2): 179-183.
- [4] 王成,汪俊军. 细胞外囊泡miRNA作为肿瘤新型液体活检分子指标的价值[J]. 中华检验医学杂志, 2021, 44(3): 250-254.
- [5] 王璘,陈建英. EVs研究新进展[J]. 中国组织工程研究, 2017, 21(4): 135-140.
- [6] ZHANG Y, LI C, QIN Y, et al. Small extracellular vesicles ameliorate peripheral neuropathy and enhance chemotherapy of oxaliplatin on ovarian cancer[J]. J Extracell Vesicles, 2021, 10(5): 12073-12085.
- [7] LU N, PIAO MH, FENG CS, et al. Isoflurane promotes epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis of bladder cancer cells through HIF-1 α - β -catenin/Notch1 pathways[J]. Life Sci, 2020, 258: 118154-118181.
- [8] 刁艳君,范维肖,郝晓柯. 细胞外囊泡在肿瘤诊断中的应用[J]. 中华检验医学杂志, 2021, 44(3): 255-259.
- [9] 骆昱煜,岳文君,骆莹,等. 细胞外囊泡装载阿霉素对人肝癌细胞PLC/PRF/5增殖及凋亡的影响[J]. 中华肝胆外科杂志, 2020, 26(4): 247-252.
- [10] 黄文杰,袁朝勇,刘蕾. 多柔比星辅助治疗对浅表性膀胱癌患者TURBT术后血清炎症因子及肿瘤标志物的影响[J]. 现代预防医学, 2019, 46(4): 747-751.
- [11] MÖLLER A, LOBB RJ. The evolving translational potential of small extracellular vesicles in cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2020, 20(12): 697-709.
- [12] SAHA SK, YIN YF, CHAE HS, et al. Opposing Regulation of Cancer Properties via KRT19-Mediated Differential Modulation of Wnt/ β -Catenin/Notch Signaling in Breast and Colon Cancers[J]. Cancers, 2019, 11(1): 99.
- [13] WEI RJ, ZHANG CH, YANG WZ. MiR-155 affects renal carcinoma cell proliferation, invasion and apoptosis through regulating GSK-3 β / β -catenin signaling pathway[J]. Eur