



读书报告

张文雅

2016-10-29



Breast Cancer Res Treat (2015) 150:685–695

DOI 10.1007/s10549-015-3326-2

BRIEF REPORT

Targeting exosomes from preadipocytes inhibits preadipocyte to cancer stem cell signaling in early-stage breast cancer

**Ramkishore Gernapudi · Yuan Yao · Yongshu Zhang ·
Benjamin Wolfson · Sanchita Roy · Nadire Duru ·
Gabriel Eades · Peixin Yang · Qun Zhou**

Received: 7 January 2015 / Accepted: 26 February 2015 / Published online: 18 March 2015

© Springer Science+Business Media New York 2015



目录

CONTENTS

01

文章背景

02

材料方法

03

试验结果

04

分析讨论



一、文章背景



文章摘要



背景介绍

(一) 摘要

- 共培养试验：3T3L1细胞+SK+外泌体+DCIS细胞
 - 在肿瘤微环境中，miR-140/SOX2/SOX9 调节细胞分化，多能行和细胞转移。
 - SK可以抑制前脂肪细胞信号转导从而抑制临近的DCIS细胞。
 - SK处理的前脂肪细胞分泌的外泌体有高含量的miR-140，它能够通过靶向SOX9信号转导影响附近的DCIS细胞。
 - 前脂肪细胞分泌的外泌体能够促进体内的肿瘤形成。
 - 靶向肿瘤微环境有助于阻止肿瘤发展。



(二) 背景介绍



外泌体 (exosomes)

外泌体是由细胞胞吞形成的囊泡，大小约30~100nm，也可以通过各种类型的细胞分泌形成，包括癌细胞。外泌体含有mRNA，miRNA，蛋白质和脂类。外泌体参与细胞间和细胞内的通讯，并且可以作为药物的载体。



紫草素(shikonin)

紫草素（SK）是紫草的主要生理活性成分，是一种可以治疗多种癌症的化学预防剂，包括乳腺癌。



在这项研究中，使用早期乳腺癌细胞作为代表细胞，我们研究了脂肪细胞分泌的外泌体在调节癌细胞的行为和肿瘤形成的作用。我们发现miR-140 / Sox9通路是前脂肪细胞外泌体信号转导的一个关键组成部分。此外，我们表明，前脂肪细胞分泌的外泌体提高体内肿瘤发生。我们发现的天然化合物SK显著的改变前脂肪细胞的信号转导，这可能会影响附近的癌细胞。前脂肪细胞来源的外泌体具有致瘤性并且发现SK能靶向肿瘤微环境的信号转导，为一个新的SK抗肿瘤作用机制提供了一个分子基础。

二、材料方法



1. 细胞培养 (Cell culture)

- MCF10DCIS cells
- DMEM/F12培养液 + 5% 热灭活的马血清
- 4 $\mu\text{g/ml}$ 胰岛素
- 100 ng/ml 霍乱毒素
- 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 氢化可的松
- 20 ng/ml EGF
- 小鼠前脂肪细胞 (3T3L1, MBA-1) 用含5% FBS和1% L -谷氨酰胺的DMEM培养液培养
- MBA-1 细胞
- 在前脂肪细胞介质中生长的人乳腺癌细胞
- 5 % CO_2 , 37 $^\circ\text{C}$ 孵育



2. 细胞迁移和共培养试验 (Transwell migration and co-culture assays)

细胞迁移实验:

- MCF10DCIS cells(0.5×10^5 cells/ml)接种于上室(1.5ml)。
- 下室中有1.5 ml 含10%胎牛血清的DMEM培养液。
- 在光学显微镜下用含1%结晶紫的甲醇/ PBS计数。

共培养试验:

- MCF10DCIS cells(0.5×10^5 cells/ml)
- 100 μ g 来自 3T3L1 细胞的外泌体
- 上室有0.4 μ m 的气孔和下室含有10%PBS的DMEM培养基。



3. 微球体实验 (mammosphere assays)

用40 μm 细胞过滤器得到MCF10DCIS single cells并进行计数。

微球体形成：

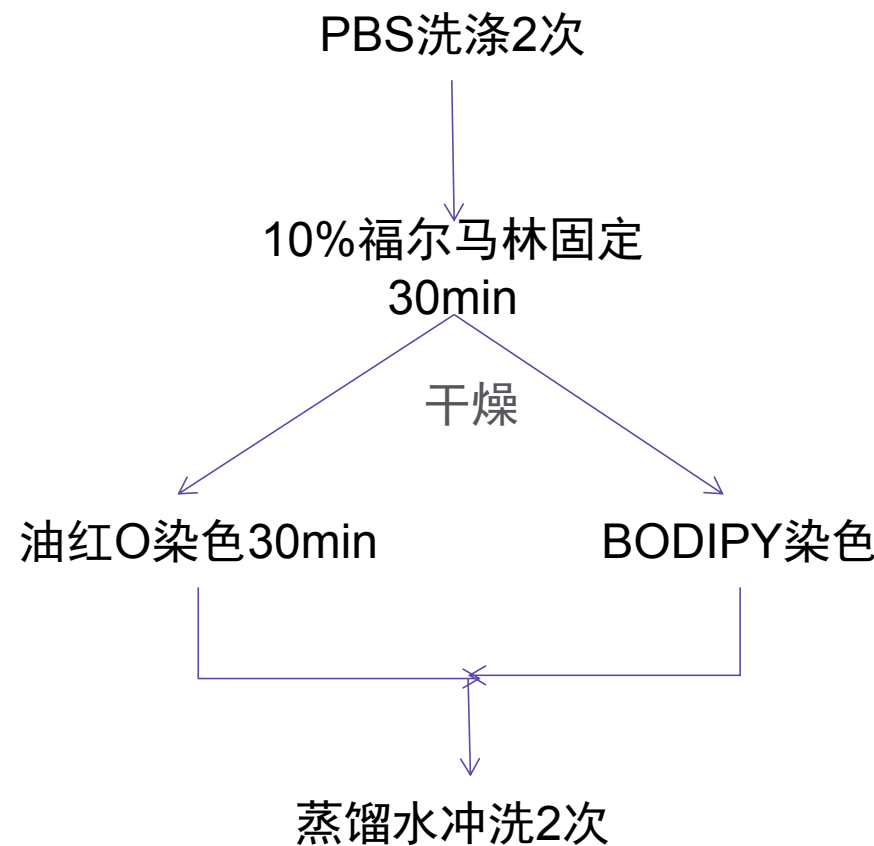
10000cells/ml接种于2%聚HEMA涂层的六孔板,在含2% B27, 20 ng/ml EGF, 4 $\mu\text{g/ml}$ 胰岛素, 和0.4%牛血清白蛋白的DMEM/F12培养液中培养7天, 光镜观察体积大于100 μM 。



4.qRT-PCR

qRT-PCR分析mRNA和miRNA的表达。mRNA的内参是GAPDH或者 β -actin，miRNA的内参是U6 snRNA。

5. 油红染色和BODIPY染色 (Oil-Red-O and BODIPY staining)





6. Western印迹法和免疫荧光染色 (Western blotting and immunofluorescent stainin)

所有的细胞裂解液经SDS-PAGE分离，转移到PVDF膜。该膜与特定的初级抗体在4℃进行孵育，然后与山葵过氧化物酶（HRP）标记的二次抗体孵育，通过ECL免疫印迹法检测系统可视化。β-Actin按1:5000稀释。Sox9, Sox2, 和DLK1分别按1:500, 1:250, 1:100进行稀释。



7. 外泌体纯化、标记、抗体实验 (Exosome purification, labeling, and antibody arrays)

外泌体纯化：超速离心法。

外泌体标记：用PKH-26对外泌体进行荧光标记

抗体实验：EXO检查抗体芯片是用已知的外泌体抗体来检测外泌体纯度。用人膜抗体阵列对外泌体的生长因子和细胞因子进行筛选。

8. 异种移植的研究 (Xenograft studies)

五到六周龄免疫缺陷nu/nu雌性小鼠每组五只随机分成两组。细胞重悬在基质胶/介质悬浮液(1:1)并注射到第五乳腺乳头，DCIS细胞注射前脂肪细胞分泌的外泌体，另一组不注射。每周使用数显卡尺监测肿瘤的生长。用来评估肿瘤的大小的公式‘ $(\text{长} \times \text{宽}^2) / 2$ ’。注射六周后处死小鼠，取肿瘤，并用甲醛固定。



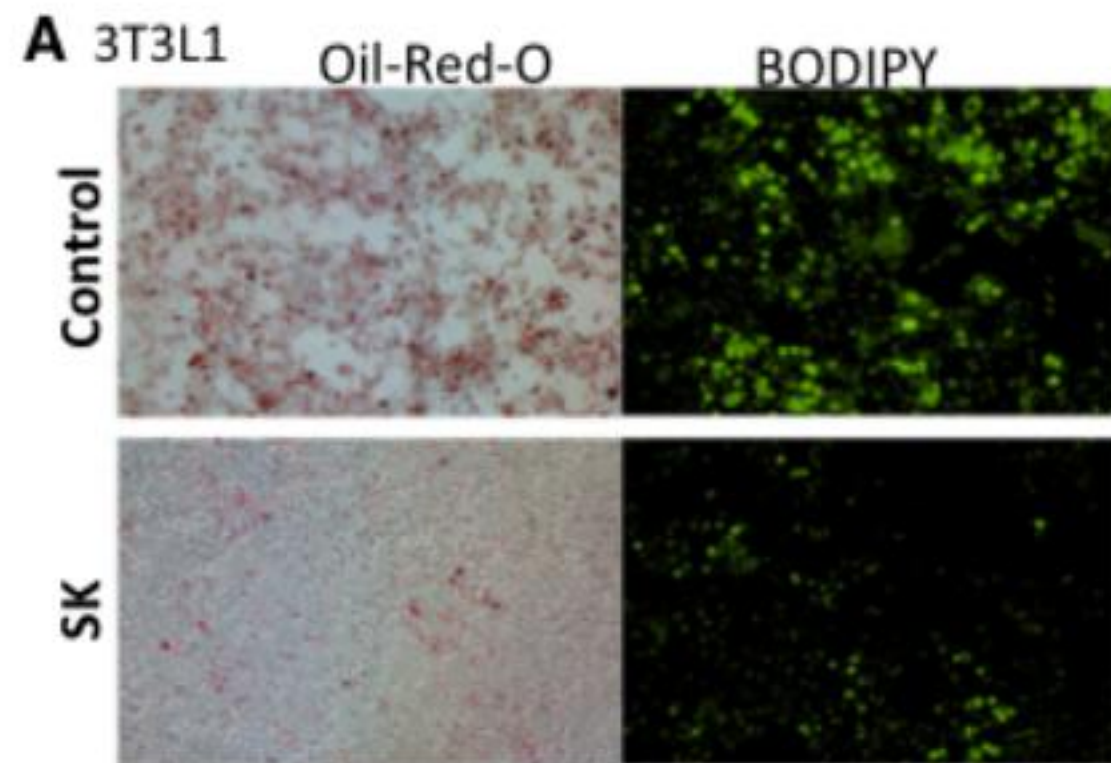
9. 统计分析 (Statistical analysis)

采用Graph Pad Prism软件对数据进行的双尾t检验评估。
当 $P < 0.05$ (*) 并且数据为平均 \pm SEM时, 结果被认为是显著的。

三、试验结果

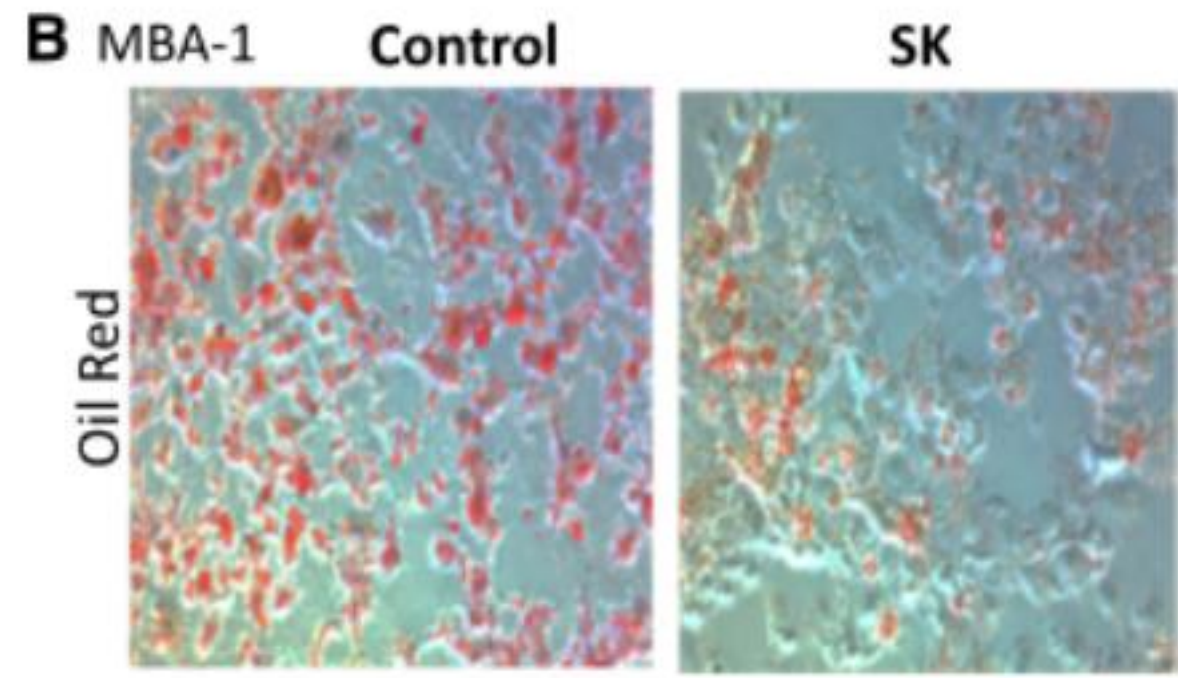
(一) SK通过靶向SOX9/miR-140 信号通路抑制前脂肪细胞分化

SK可以减少前脂肪细胞分化。

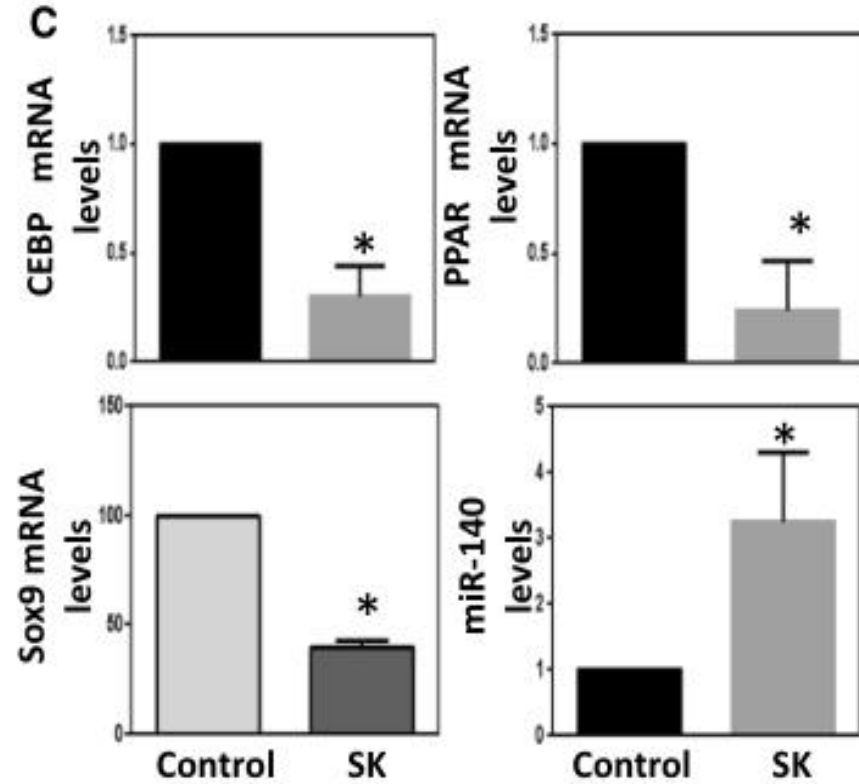




SK可以减少MBA-1
细胞前脂肪细胞的分化。



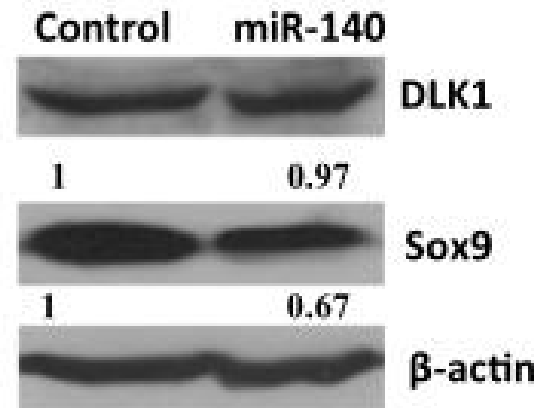
使用qRT-PCR检测
C/EBP α 、PPAR γ 、
SOX9、miR-140的表达。

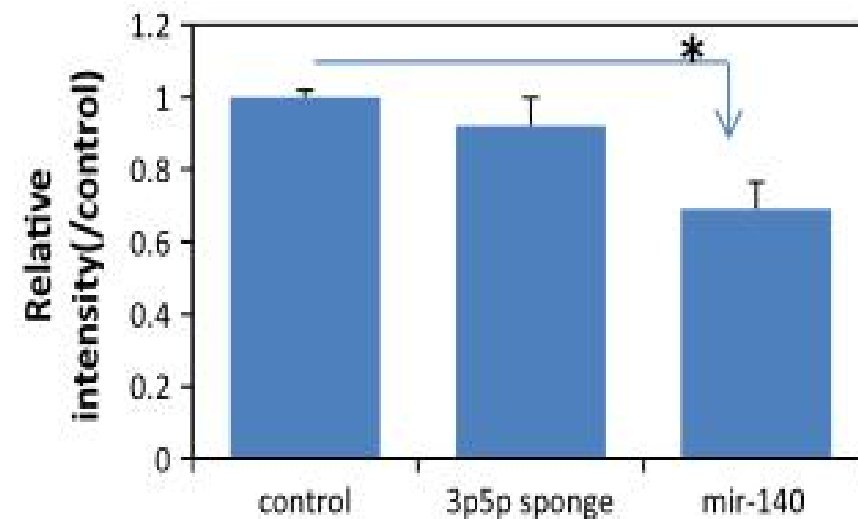
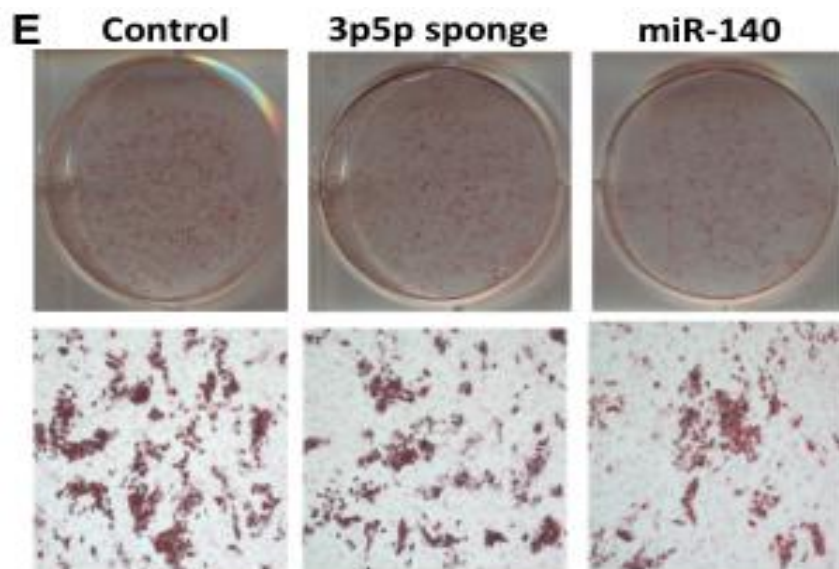




D

miR-140过表达导致
SOX9蛋白水平升高而
DLK1无影响。

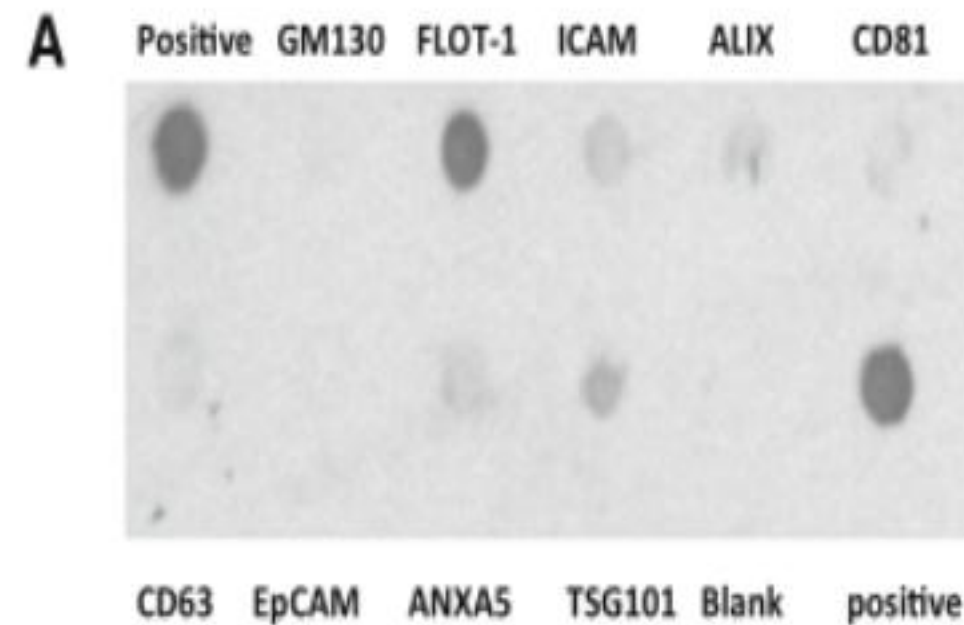




人乳腺前脂肪细胞加入mir-140抑制剂不影响细胞分化，而转载了miR-140的人乳腺前脂肪细胞显著抑制细胞分化。

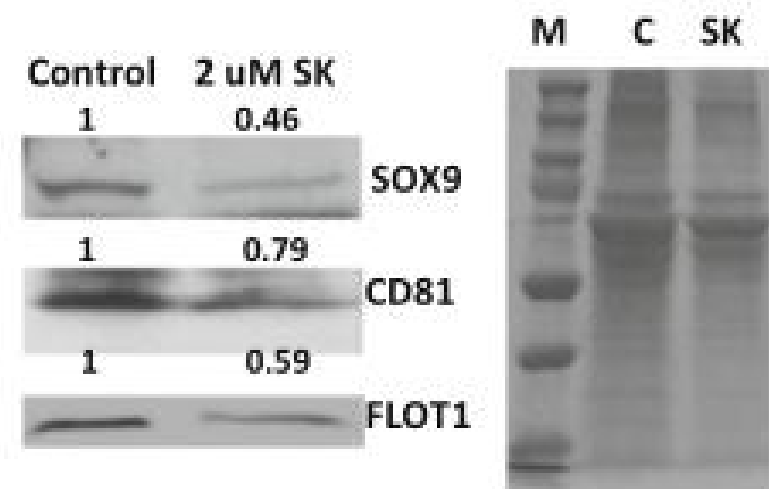
(二) SK抑制外泌体分泌的细胞因子和生长因子

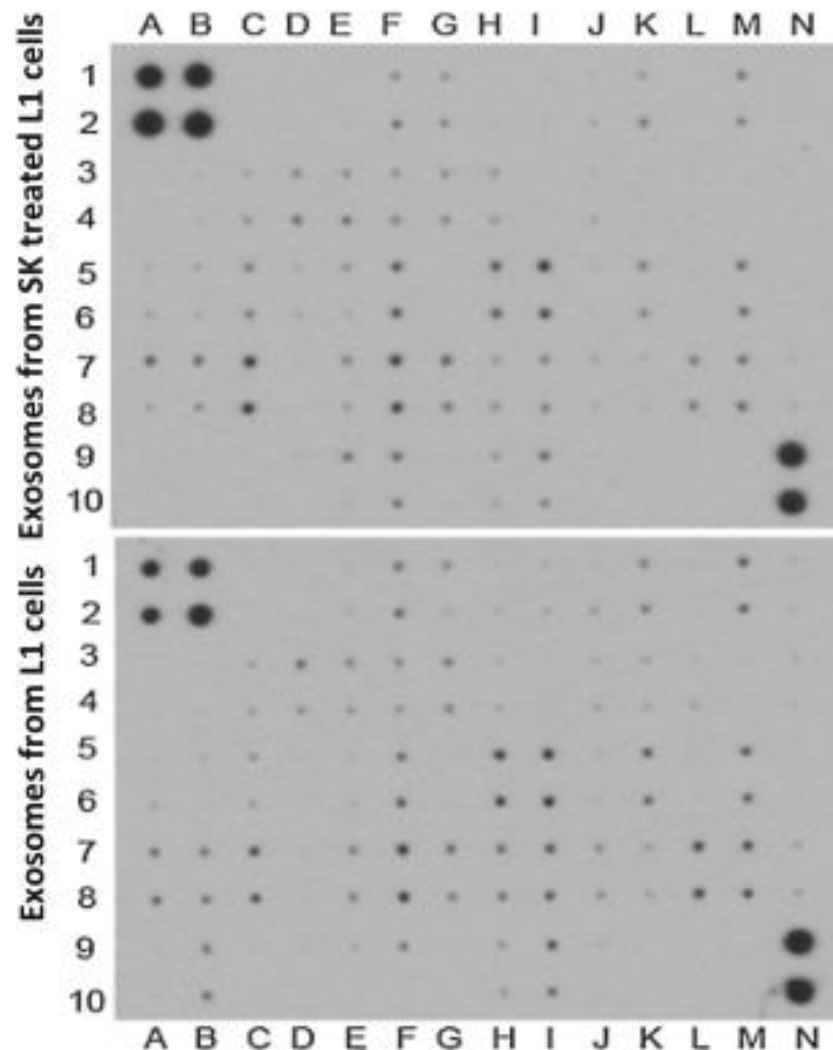
在FLOT-1特异抗体
中外泌体纯度最高。



加入SK后，SOX9蛋白显著减少。

B





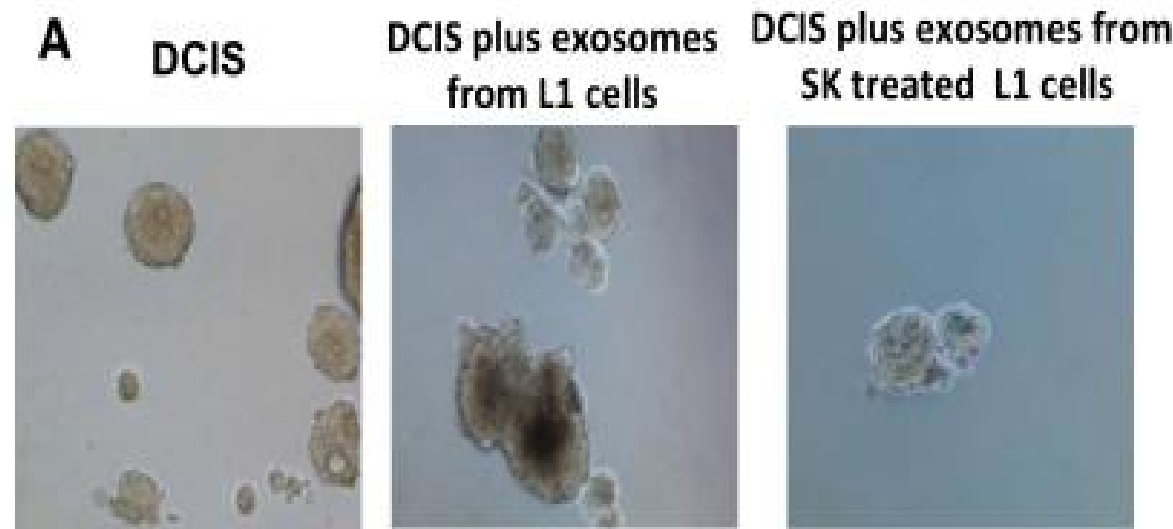
D Alterations of protein levels in exosomes in response to SK treatment

Proteins	Expression levels Relative to control L1 cells	Positions on the antibody arrays
IGFBP-2	0.49	G3, G4
Resistin	0.48	M7, M8
AgRP	0.44	I1, I2
LIF	0.44	K5, K6
PDGF-AA	0.36	I7, I8
RANTES	0.35	L7, L8
PARC	0.34	H7, H8
ENA-78	0.24	N1, N2
Serum Amyloid A	0.23	N7, N8
PDGF-AB	0.17	J7, J8
PDGF-BB	0.14	K7, K8
sTNF-RII	0.05	B9, B10

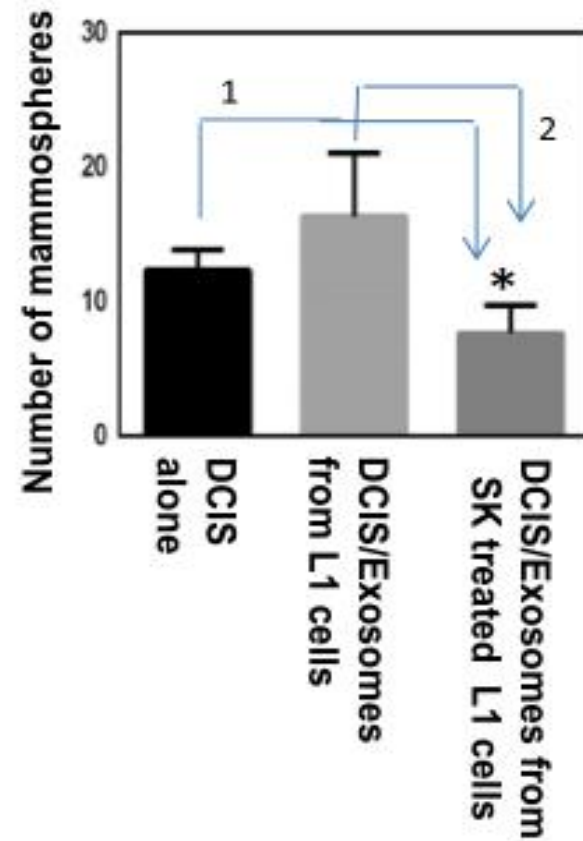
蛋白点样显示外泌体分泌的与肿瘤的生长、侵袭和血管生成直接相关的细胞因子和生长因子显著降低。

(三) 前脂肪细胞来源的外泌体可以改变原位癌干细胞的更新，紫草素可以改变外泌体的信号转导抑制原位癌干细胞。

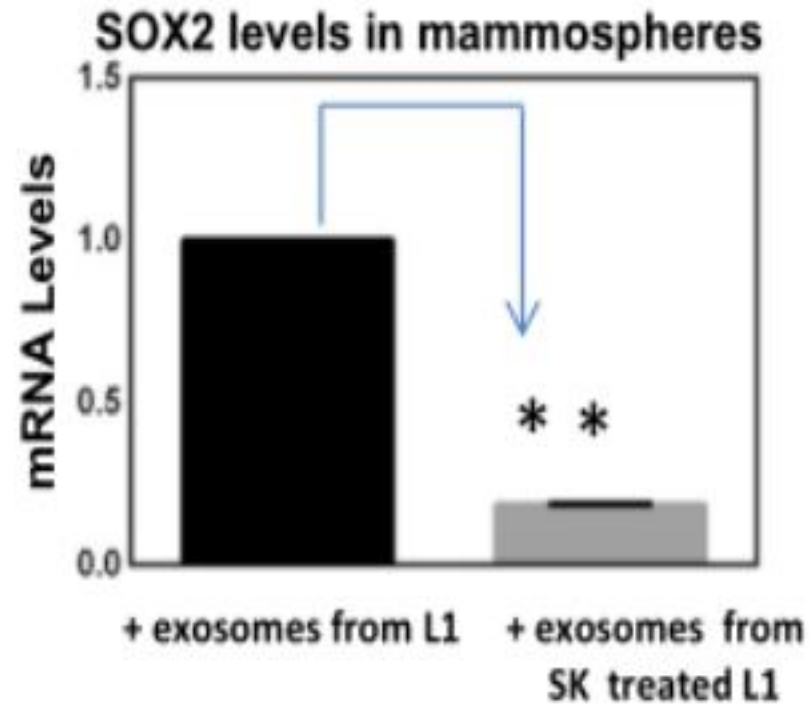
外泌体促进癌症干细胞更新，SK处理的3T3L1细胞分泌的外泌体不能促进癌症干细胞的更新。



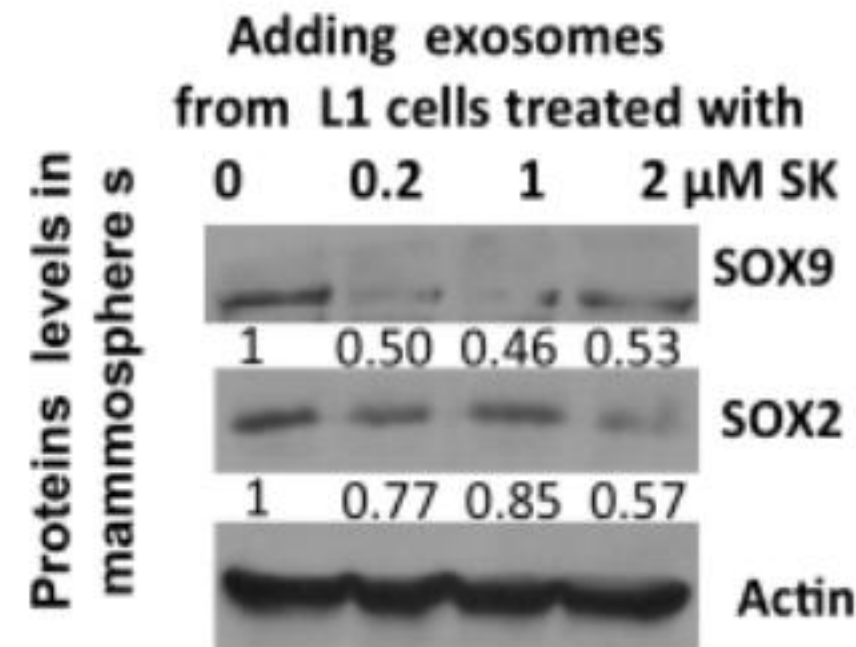
DCIS细胞加3T3L1细胞分泌的外泌体形成的微球体数量明显多于DCIS细胞加经SK处理的3T3L1细胞分泌的外泌体形成的微球体数量



经SK处理的L1细胞分泌的外泌体的原位癌细胞微球体中SOX2的mRNA水平显著减少。

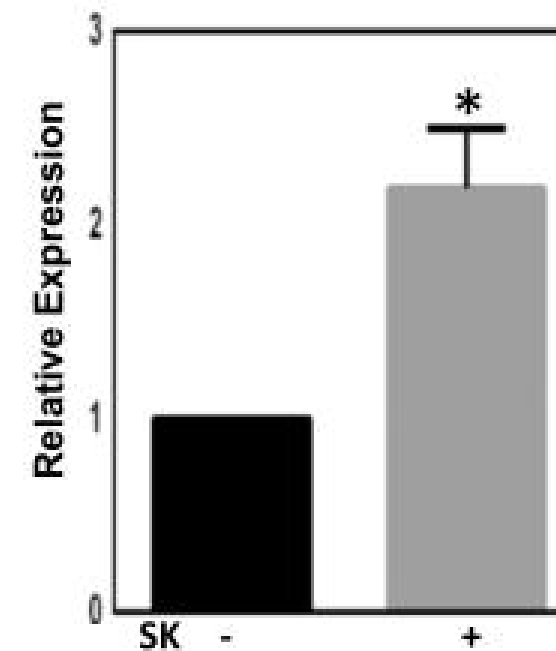


SK量越大，SOX9和SOX2的蛋白水平在原位癌微球体中逐渐降低。

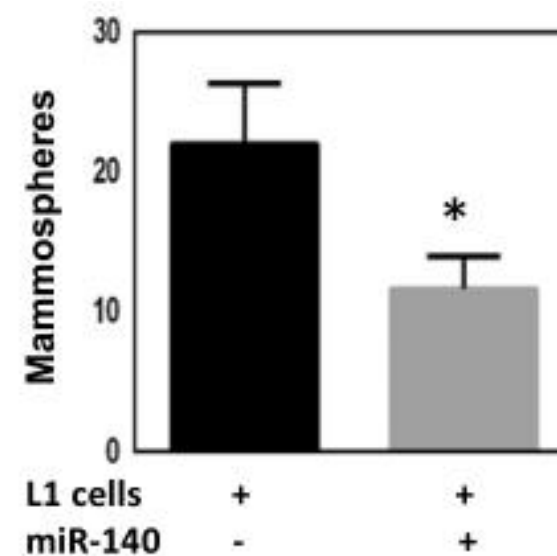
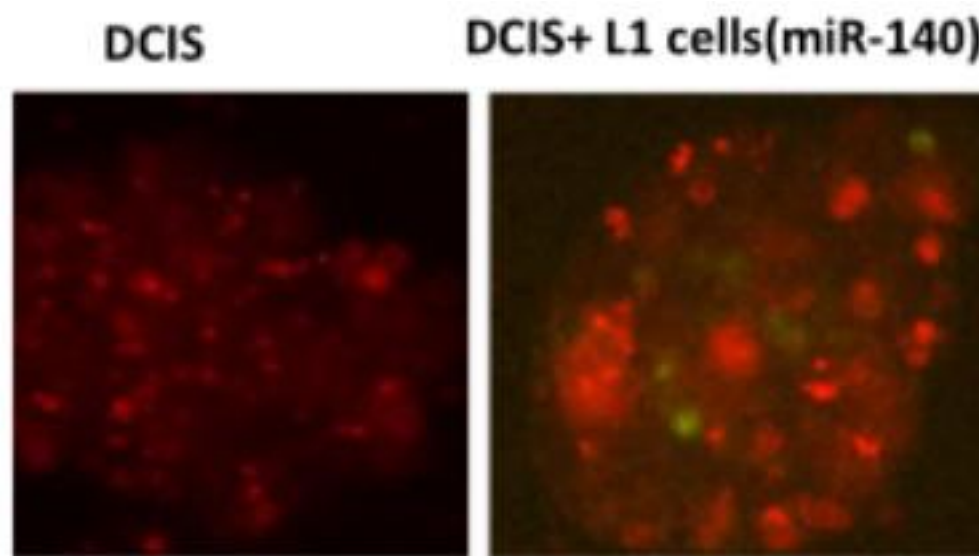


SK处理的L1细胞分泌的外泌体具有高含量miR-140。

miR-140 levels in exosomes from L1 cells



(四) 前脂肪细胞分泌的外泌体miR-140可以靶向DCIS干 细胞从而抑制Sox9基因表达

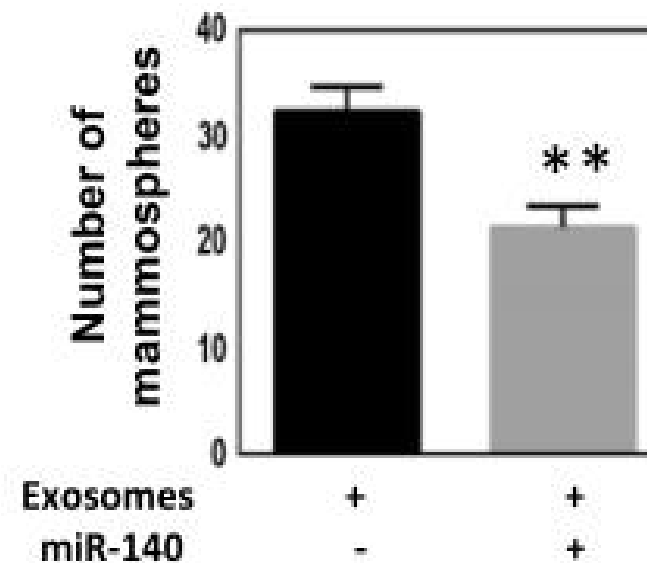


DCIS细胞+L1细胞微球体的量显著高于DCIS细胞+L1细胞+miRNA微球体的量。

DCIS+ exosomes from L1

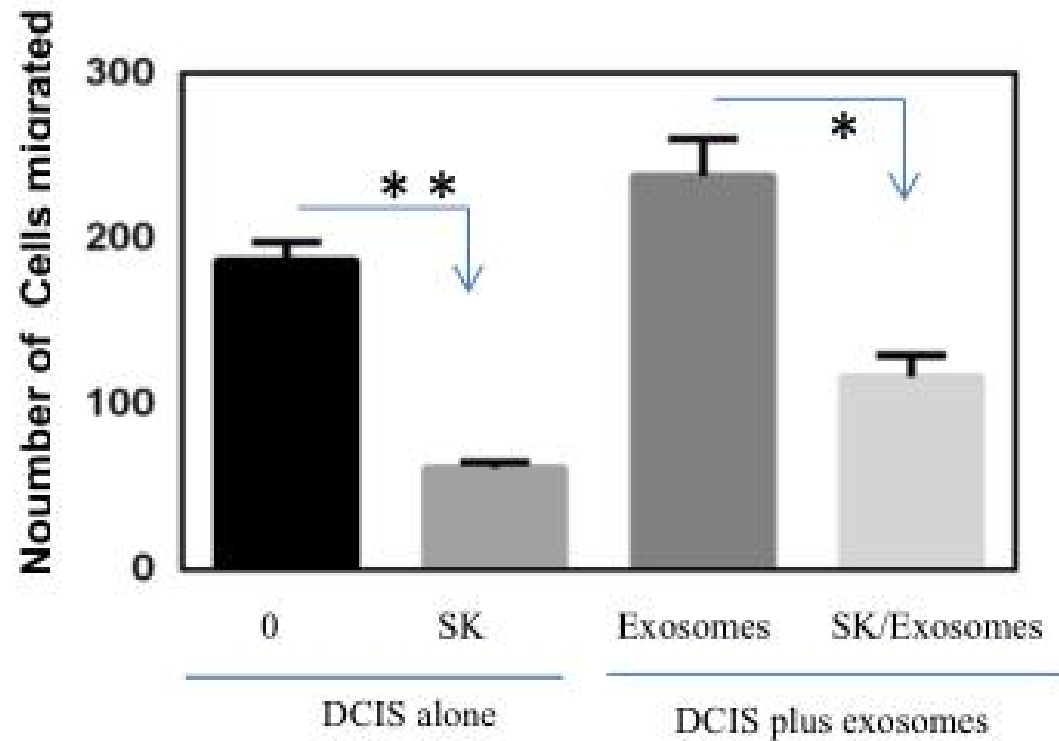


DCIS+ exosomes from
miR-140 overexpressed L1

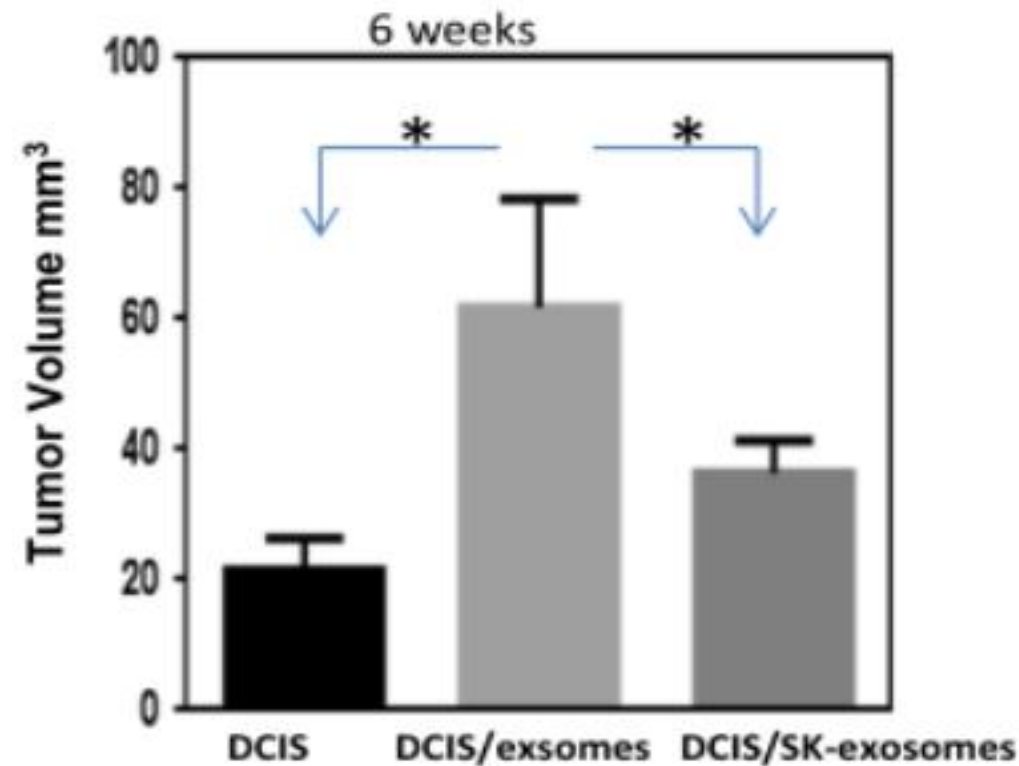


DCIS细胞+外泌体微球体的量显著高于DCIS细胞+miRNA过表达的外泌体微球体的量。

SK处理的DCIS细胞的转移量明显减少。外泌体显著增强DCIS细胞的侵袭能力。



注射DCIS细胞+外泌体的
肿瘤体积显著高于注射
DCIS细胞+SK-外泌体的肿
瘤体积。





结论

- 1.紫草素治疗通过靶向SOX9/miR-140信号转导通路来抑制前脂肪细胞分化。
- 2.紫草素抑制前脂肪细胞分泌的外泌体的信号转导通路。
- 3.紫草素抑制原位癌干细胞的形成通过抑制前脂肪细胞分泌的外泌体的信号转导。
- 4.紫草素通过介导外泌体来抑制细胞转移。
- 5.外泌体促进体内肿瘤形成。

四、分析讨论

- 1. SK可能是一种通过靶向肿瘤细胞和作用于的肿瘤微环境的有效的预防性化合物。
- 2. 脂肪细胞分泌的外泌体通过与肿瘤干细胞的信号传导影响乳腺癌的发生。
- 3. 脂肪细胞分泌的外泌体miR-140可以通过靶向靶细胞中 Sox9 基因转录影响原位癌干细胞。
- 4. 外泌体介导细胞间信号转导在调节乳腺肿瘤发生中起着重要的作用。
- 5. 通过靶向肿瘤微环境中的前脂肪细胞信号通路来抑制乳腺癌是一个新的可研究的方法。



THANK YOU!

请各位老师和同学批评指正。