DOI:10.16016/j.2097-0927.202311002

成骨细胞外泌体对前列腺癌细胞生物学特性的影响及潜在机制研究

李京羿,陈家久,李耀明,王洛夫 400042 重庆,陆军特色医学中心泌尿外科

[摘要] **目的** 研究成骨细胞外泌体对前列腺癌细胞生物学特性的影响和潜在的机制。**方法** 将人骨髓间充质干细胞诱导分化为成骨细胞,超速离心提取细胞培养基上清中的外泌体并鉴定。克隆形成试验分析成骨细胞外泌体对前列腺癌细胞增殖的影响。PCR 芯片分析外泌体处理后前列腺癌细胞中表达变化的 miRNA。通过荧光标记实验证明成骨细胞和肿瘤细胞中存在 miRNA 传递。在细胞和动物水平研究关键 miRNA 对前列腺癌细胞生物学特性的影响。生信分析并实验验证关键 miRNA 的靶基因。**结果** 成功提取并鉴定了成骨细胞外泌体。相比于对照组,加入成骨细胞外泌体的前列腺癌细胞克隆形成能力明显增强($P<0.05$)。PCR 芯片筛选发现 miR-223 可能是其中的关键分子。膜交换实验显示成骨细胞与前列腺癌细胞存在膜交换,FAM 标记 miRNA 显示 miR-223 能够在细胞间传递。功能实验表明,过表达 miR-223 能够增强前列腺癌细胞的增殖、抗凋亡和迁移侵袭能力($P<0.05$)。生信分析提示 WNT 通路抑制蛋白 APC 可能是 miR-223 的靶基因,实验证实过表达 miR-223 能够降低前列腺癌细胞中 APC 的表达($P<0.05$)。Rescue 实验显示过表达 APC 能够逆转 miR-223 对前列腺癌细胞增殖、迁移、侵袭的促进作用。**结论** 成骨细胞外泌体是前列腺癌的促癌因子。外泌体中 miR-223 可能是其中的关键作用分子,其通过影响细胞中 APC 的表达发挥促癌作用。

[关键词] 成骨细胞,外泌体,miR-223,APC,前列腺癌

[中图法分类号] R322.71;R363.21;R737.25 [文献标志码] A

Impact and underlying mechanisms of osteoblast-derived exosomes on biological characteristics of prostate cancer cells

LI Jingyi, CHEN Jiajiu, LI Yaoming, WANG Luofu Department of Urology, Army Medical Center of PLA, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400042, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effects and potential mechanisms of osteoblast-derived exosomes on the biological properties of prostate cancer (PC) cells. **Methods** Human bone marrow mesenchymal stem cells was induced to differentiate into osteoblasts, and then the exosomes were extracted from the supernatant of cell culture medium by ultracentrifugation and identified. Clone formation assay was employed to determine the effect of derived exosomes on the proliferation of PC cells, and PCR microarray was used to analyze miRNA changes after exosome treatment. Fluorescence labeling was applied to validate the transfer of miRNA between osteoblasts and tumor cells. The impact of key miRNA on the biological characteristics of PC cells was studied at the cellular and animal levels. Bioinformatics analysis was conducted to explore the target genes of key miRNA and then further validated. **Results** Osteoblast-derived exosomes were successfully extracted and then identified. These exosomes significantly promoted the clonogenic ability of PC cells when compared with the cells without treatment ($P<0.05$). PCR microarray showed that miR-223 might be a key molecule in this process. Membrane exchange experiments demonstrated the presence of

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金项目(81902600)

[通信作者] 李耀明,E-mail:finleylym@126.com

王洛夫,E-mail:wangluofu@aliyun.com

2097-0927/Copyright © 2024, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

membrane exchange between osteoblasts and PC cells, and miRNA FAM labeling displayed that miR-223 was transferred within above cells. Functional experiments indicated that overexpression of miR-223 enhanced the proliferation, anti-apoptosis, and migration/invasion ability of PC cells ($P<0.05$). Bioinformatics analysis indicated that APC, an inhibitor of WNT signaling pathway, may be a target gene of miR-223, which was further confirmed that overexpressing miR-223 down-regulated APC expression. Rescue experiment showed that overexpression of APC reversed the promoting effect of miR-223 on the proliferation, migration and invasion of PC cells. **Conclusion** Osteoblast-derived exosomes are pro-carcinogenic factors in PC, and miR-223 may be a key molecule in exosomes, which plays a oncogenic role by regulating APC in PC cells.

[**Key words**] Osteoblast, exosome, miR-223, APC, Prostate cancer

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81902600). Corresponding authors: LIYaoming, E-mail: finleylym@126.com; WANG Luofu, E-mail: wangluofu@aliyun.com

前列腺癌骨转移是临床面临的挑战,尽管过去几十年中针对转移性前列腺癌的系统治疗取得了诸多进展,患者的生存期不断延长,但病情进展仍然不可避免[1]。“种子和土壤”学说是前列腺癌特异性嗜骨转移的公认机制。在形成骨转移灶的过程中,前列腺癌细胞与骨微环境中细胞的交互对话起着核心作用[2]。

外泌体是新近发现的细胞间通讯载体。这是一类直径为40~160 nm,具有双层脂质结构的细胞外囊泡。其包含有细胞的许多成分,包括DNA、RNA、脂质、代谢物以及胞质和细胞表面蛋白等[3]。外泌体参与了多种生理与病理过程。在癌症研究中,外泌体不仅可以作为标记物,也能够影响肿瘤形成、生长、转移以及治疗抵抗。在肿瘤转移过程中,外泌体被认为介导了“种子和土壤”的相互作用[4]。

前列腺癌作为主动因素分泌外泌体,构建适宜肿瘤细胞生长的转移前生态已有研究证实[4]。前列腺癌骨转移的转移前生态中,一个重要的特征是存在过度活跃的成骨细胞。癌细胞通过外泌体传递miR-1275[5]、miR-940[6]、miR-375[7]等作用分子至骨微环境,通过相应靶基因促进间充质干细胞成骨分化或者直接激活成骨细胞。但是,外泌体作为一种双向传递介质,成骨细胞激活后其分泌的外泌体对前列腺癌细胞的反馈作用却鲜有研究。本项目探索了在前列腺癌中成骨细胞过度活跃的背景下,成骨细胞外泌体对前列腺癌细胞生物学特性的影响及内在机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 人骨髓间充质干细胞购自浙江美森细胞科技有限公司,人前列腺癌细胞系C4-2B和LNCaP为大坪医院泌尿外科实验室自存细胞。

1.1.2 实验动物 BALB/c雄性裸鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司[批件号:SYXK(京)2022-0052],8周龄,体质量为21~23 g,饲养在大坪医院动物实验中心标准SPF级动物房。

1.1.3 主要试剂 间充质干细胞成骨诱导分化试剂(货号BI 05-440-1)购自上海逍鹏生物科技有限公司。miRNA提取试剂盒(货号RC201)购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司。miRNA定量检测试剂盒(货号C10211)购自广州锐博生物技术有限公司。总RNA提取试剂盒(货号Z3100)、RNA反转录试剂盒(货号A2801)及定量检测试剂盒(货号A6001)购自普洛麦格(北京)生物技术有限公司。PKH67染色试剂盒(货号D0031)、EdU试剂盒(货号CA1170)购自北京索莱宝科技有限公司。细胞计数试剂盒(货号C0037)、凋亡检测试剂盒(货号C1062L)、APC过表达质粒购自上海碧云天生物技术有限公司。APC(兔抗,ab40778)、CD9(兔抗,ab236630)、TSG101(兔抗,ab125011)、β-actin(兔抗,ab8227)、β-tubulin(兔抗,ab179513)、山羊抗兔二抗抗体(ab205718)购自美国Abcam公司。miRNA-223过表达及对照慢病毒购自和元生物技术(上海)股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 成骨细胞诱导培养和鉴定 人骨髓间充质干细胞培养于含10%胎牛血清的DMEM培养基中,在37 ℃,5% CO_2 的恒温培养箱培养,当细胞90%融合后更换为商品化成骨诱导培养基,2周后茜素红染色鉴定。

1.2.2 成骨细胞外泌体提取和鉴定 将诱导的成骨细胞用PBS清洗后,加入无外泌体培养基中培养,36 h后收集上清。参照超速离心流程获得外泌体[8]。简要离心流程为:4 ℃下离心;300×g,10 min,去除细胞;2 000×g,10 min去除死细胞;10 000×g,30 min去除细胞碎片;100 000×g,120 min获得外泌体,120 min清洗外泌体颗粒(Hitachi CP100MX)。获得的外泌体通过透射电镜(Hitachi HT-7700,100 kV)观察外泌体形态

及大小,粒径分析仪(NanoFCM N30E)分析外泌体的粒径分布。

1.2.3 Western blot 检测 使用含蛋白酶和磷酸酶抑制剂 cocktail 的蛋白裂解液(RIPA)提取蛋白,细胞和外泌体悬液直接裂解提取,组织样本经电动匀浆机研磨离心(15 000 r/min,4 ℃,20 min)后取蛋白上清液。BCA 法测定浓度后于 4%~20% FuturePAGE 预制胶中 150 V 恒压电泳分离蛋白,随后湿转法 250 mA 恒流将蛋白转至 PVDF 膜,10%脱脂奶粉封闭 2 h,4 ℃摇床孵育一抗过夜(APC 1∶5 000、CD9 1∶1 000、TSG101 1∶2 000、β-actin 1∶5 000、β-tubulin 1∶1 000),室温孵育二抗 2 h(1∶3 000),ECL 化学发光显影,使用 Bio-Rad 显色仪显色成像。

1.2.4 肿瘤细胞培养和转染 人前列腺癌细胞系 C4-2B 和 LNCaP 培养于含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中,培养条件为 37 ℃恒温培养箱,5% CO_2。miRNA mimics 及 inhibitors 的转染试剂为 ribo*FECT*™ CP(广州锐博生物技术有限公司),质粒转染采用 Lipofectamine 2000(美国 Thermo Fisher Scientific 公司),均按照说明书操作。转染 48 h 后收集细胞用于后续实验。

1.2.5 克隆形成实验 将经预处理后的前列腺癌细胞接种至 6 孔板中,每孔细胞计数 300 个,细胞培养在含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中,3 天换液一次。培养 14 天后去除培养基,PBS 漂洗后 4%多聚甲醛固定,0.1%结晶紫溶液染色,使用 Image J 统计直径超过 3 mm 的群落。克隆形成率≥3 mm 的群落数/接种细胞数。

1.2.6 RT-qPCR 检测、miRNA 拷贝数计算 miRNA 提取使用 MiPure Cell/Tissue miRNA Kit(南京诺唯赞生物科技股份有限公司),定量分析采用 Bulge-Loop miRNA qRT-PCR Starter Kit(广州锐博生物技术有限公司),参考说明书进行操作。总 RNA 提取、逆转录、定量分析,分别采用北京普洛麦格试剂盒产品 SV Total RNA Isolation System, GoScript™ Reverse Transcription System 和 GoTaq® qPCR Master Mix。qPCR 数据分析使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法,GAPDH/U6 作为内参。使用标准品 miRNA 制备标准曲线,根据 miR-223 qPCR 的 CT 值估算 miR-223 拷贝数。qPCR 引物序列如表 1。

1.2.7 膜交换及 miRNA 示踪实验 膜交换实验时将 6 孔板中的成骨细胞,0.25%胰酶消化液(含 EDTA)消化后,250×*g* 离心 3 min,收集细胞。加入 PKH67 工作液,37 ℃孵育 5 min,4 ℃孵育 15 min。离心去除工作液,PBS 清洗 3 次。将细胞接种在 0.4 μm 的 Transwell 小室(美国 Corning 公司,货号 3412)上室。在下层预铺前列腺癌细胞,共培养 24 小时后,荧光显微镜观察下层细胞中的膜染色情况。miRNA 示踪实验方法同上,上层细胞为转染有 FAM 标记的 miR-223(miR-223-FAM)24h 后的成骨细胞。

1.2.8 CCK-8 实验 96 孔板中每孔接种 5 000 个转染 miR-223 mimics(miR-223 组)、APC 过表达质粒(过表达 APC 组)、miR-223 mimics+ APC 过表达质粒(miR-223+过表达 APC 组)及对应阴性对照(NC 组)的细胞。设置 3 复孔,分别在接种后 0、24、48、72、96、120 h 时加入 10 μL CCK-8 溶液,孵育 2 h 后使用酶标仪在 450 nm 处测定 OD 值。细胞活力计算公式为:细胞活力(%)= $OD_{450\ nm(时间点)}/OD_{450\ nm(初始时间点)}$。

1.2.9 EdU 实验 96 孔板中每孔接种 5 000 个转染 miR-223 mimics(miR-223 组)和阴性对照(NC 组)的 C4-2B 细胞,72 h 后,每孔加入 100 μL 50 μmol/L EdU 培养基孵育 2 h,PBS 冲洗后 4%多聚甲醛固定,再用 2 mg/mL 甘氨酸溶液孵育 5 min,0.5% TritonX-100 渗透 10 min,1×Apollo 反应液避光染色,0.5% TritonX-100 再次渗透,甲醇清洗,DAPI 染色,PBS 清洗后使用荧光显微镜观察并拍照。

1.2.10 流式凋亡检测 将转染 miR-223 mimics(miR-223 组)和阴性对照(NC 组)48 h 后的 LNCaP 和 C4-2B 细胞用 25 nmol/L 多西他赛诱导凋亡 24 h,胰酶消化后 PBS 清洗 3 次,1 000 r/min 离心 5 min 后弃上

表 1 miR-223 qPCR 引物序列

基因	正向引物(5′-3′)	反向引物(5′-3′)
c-MYC	GCCAGAGGAGGAACGAG	GCTTGGACGGACAGGAT
*CCND*1	AGAGGCGGAGGAGAACA	GAGAGGAAGCGTGTGAGG
*HOXB*9	ATTTGCGAAGGAAGCGAGGA	CTACGGTCCCTGGTGAGGTA
*FOSL*1	GCCTGTGCTTGAACCTGA	TGCTGCTACTCTTGCGATG
*WISP*1	CAGCACACGCTCCTATCA	CAAGCCCATCAGGACACT
GAPDH	CAGGAGGCATTGCTGATGAT	GAAGGCTGGGGCTCATT
Pre-miR-223	CCACGCTCCGTGTATTTGAC	CCGCACTTGGGGTATTTGAC

清,将细胞悬浮在结合缓冲液中,加入 5 μL Annexin V-FITC 和 10 μL PI 避光孵育 20 min,流式细胞仪检测分析细胞凋亡。

1.2.11　迁移和侵袭实验　　迁移实验时在 Transwell 下室加入 500 μL 完全培养基,小室内种入转染 miR-223 mimics(miR-223 组)、APC 过表达质粒(过表达 APC 组)、miR-223 mimics+ APC 过表达质粒(miR-223 +过表达 APC 组)及对应阴性对照(NC 组)48 h 后的细胞 5×10^4 个及 200 μL 无血清培养基。细胞培养箱孵育 48 h,取出小室,结晶紫染色计数穿透小室膜的下层细胞。侵袭实验时用基质胶稀释液(基质胶:培养基=1:8)预处理 Transwell 小室,其余步骤同迁移实验。

1.2.12　miRNA 靶基因预测　　miR-233 的潜在靶基因来自 starbase2.0 数据库(https://starbase.sysu.edu.cn/)[9],其中 miRNA-Target 模块中包含了多个工具(Target-Scan6.2、miRWalk、miRanda、miRmap、PITA、miRdb 和 microT)的预测结果。在 mirTarPathway 模块中对靶基因进行 KEGG 通路分析。靶基因 GO 分析采用在线分析工具 sangerbox3.0(http://www.sangerbox.com/)的 GO 分析模块进行[10]。

1.2.13　慢病毒感染和动物实验　　使用 miR-223 过表达慢病毒及其对照病毒感染 C4-2B 细胞,杀稻瘟菌素 S 筛选稳转株细胞用于动物实验。稳定转染 miR-223 过表达慢病毒(Lv-miR-223 组)及其对照慢病毒(Lv-NC 组)的 C4-2B 细胞约 1×10^7 个分别悬浮在 200 μL 混合液中(PBS:水凝胶=1:1)并注射到裸鼠左侧腹股沟皮下。对照组和实验组各 5 只,每周测量 2 次肿瘤大小,用修正椭圆公式(体积=长×宽^2/2)计算肿瘤体积。当肿瘤长径达到 15 mm 时处死小鼠,解剖肿瘤并测定最终体积。动物研究项目得到陆军军医大学实验动物福利伦理审查委员会批准。

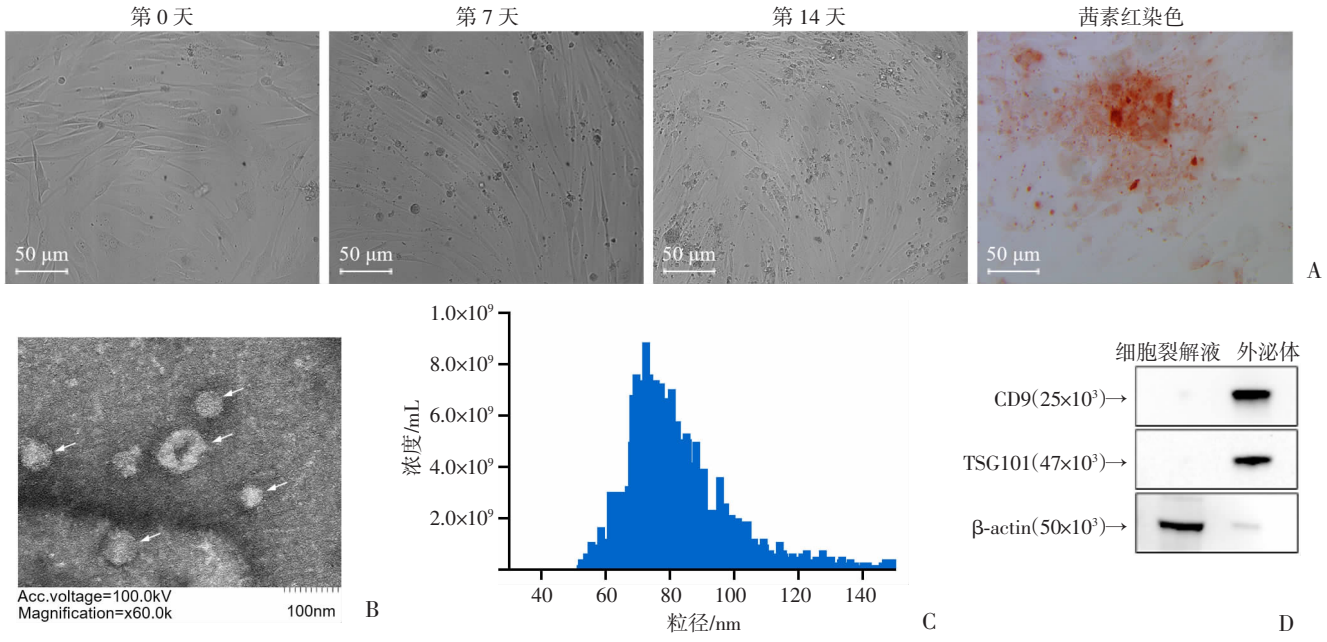
1.3　统计学分析

采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计学分析,两组间比较采用独立样本 t 检验,多组间比较采用方差分析,多组两两比较采用 Bonferroni 法。重复测量的时间序列数据使用 SPSS26.0 软件采用广义估算方程进行分析。$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2　结果

2.1　人骨髓间充质干细胞成骨诱导分化及外泌体提取和鉴定

人骨髓间充质干细胞经成骨诱导完全培养基培养 14 天后,使用茜素红染色法鉴定成骨细胞(图 1A);可见细胞中大量钙与茜素红复合物,提示成骨诱导成功。成骨细胞外泌体在透射电子显微镜下呈现出一致的圆形或者椭圆形膜囊泡形态(图 1B),粒径分布在 50~150 nm 之间(图 1C)。在细胞裂解液和外泌体中检测蛋白标记物,结果显示,外泌体中标记物 CD9 和 TSG101 高表达,而细胞骨架蛋白 β-tubulin 低表达(图 1D)。以上实验证实从成骨细胞中成功提取到外泌体。



A:人骨髓间充质干细胞成骨诱导分化;B:透射电子显微镜下观察到的外泌体(白色箭头所示);C:提取的成骨细胞外泌体粒径分布;D:Western blot 检测外泌体及细胞裂解液蛋白标记

图 1　成骨细胞诱导及其外泌体提取和鉴定

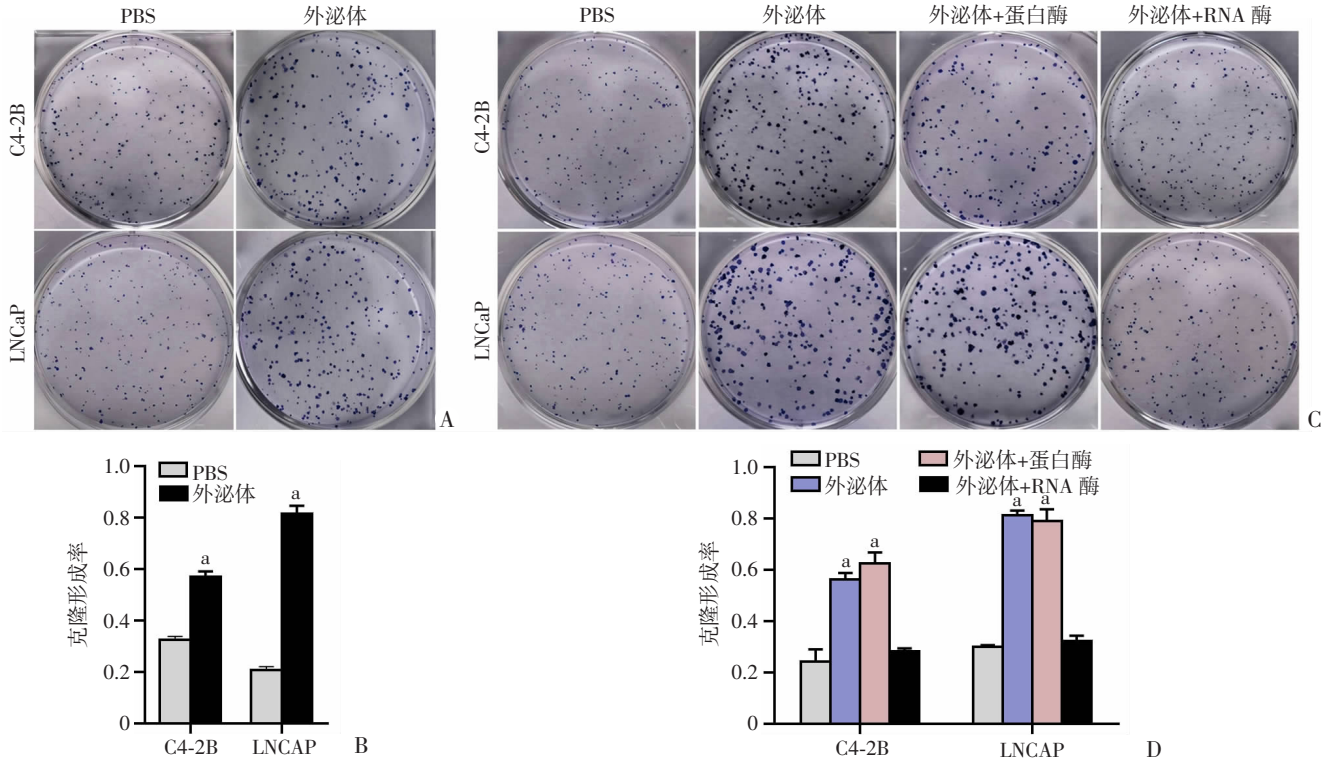
2.2 成骨细胞外泌体促进前列腺癌细胞克隆形成

为研究成骨细胞外泌体能否促进前列腺癌细胞增殖成瘤,我们进行了克隆形成实验。结果表明,将成骨细胞外泌体加入前列腺癌细胞 C4-2B 和 LNCaP 中,癌细胞的克隆形成能力显著增强(图 2A、B)。为了明确外泌体中发挥主要作用的分子类型,我们用 TritonX-100 破膜外泌体后再分别加入蛋白酶和 RNA 酶,将处理过的外泌体加入前列腺癌细胞中。结果显示降解 RNA 后,外泌体对癌细胞克隆形成的促进作用显著降低,而降解蛋白后的变化不显著(图 2C、D)。这提示成骨细胞外泌体中对前列腺癌克隆形成起主要促进作用的成分可能是 RNA。

2.3 成骨细胞外泌体传递功能分子 miR-223 至前列腺癌细胞

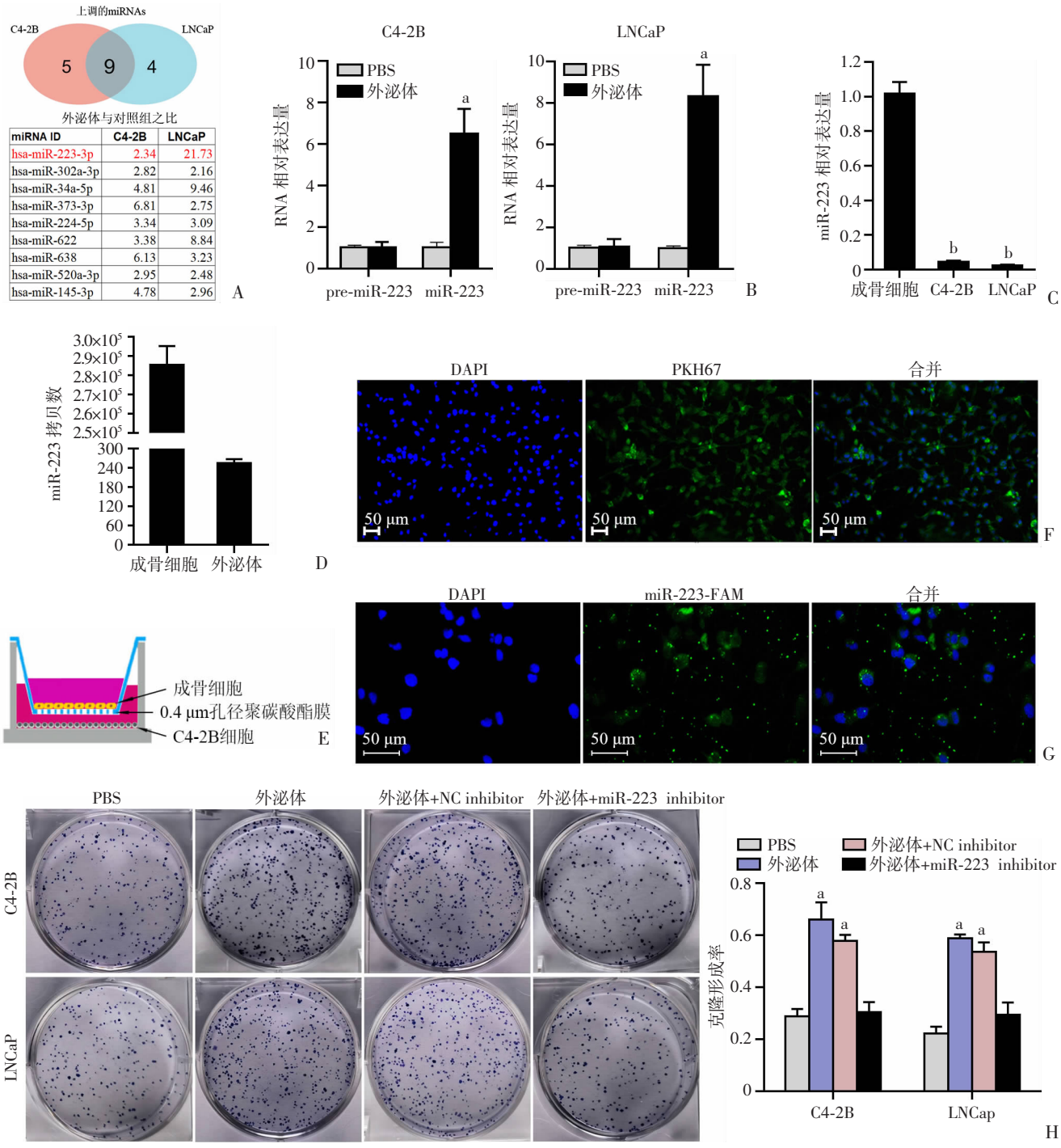
miRNA 是外泌体 RNA 的主要组分,在外泌体传递的 RNA 分子中,对 miRNA 的研究最为成熟。为研究成骨细胞外泌体中的关键 miRNA,我们用 miRNA PCR 芯片(miRACLE On-Call-Screen human cancer miRNA qPCR panel, 120001A1S, Genetimes)检测了外泌体处理前后前列腺癌细胞 C4-2B 和 LNCaP 中的 miRNA 表达。在芯片检测的 420 个肿瘤相关 miRNAs 中,9 个 miRNAs 在两种前列腺癌细胞中表达上调(图 3A),其中我们关注到在骨髓中出现,与免疫反应、细胞炎症和恶性肿瘤转移密切相关的 miR-223,并对其进行后续研究。qPCR 检测外泌体处理后的 C4-2B 和 LNCaP 中 miR-223 成熟体及其前体表达发现,miR-223 成熟体含量增加但前体变化不明显(图 3B),这提示外泌体传递的可能是 miR-223 的成熟体。qPCR 对比成骨细胞和 C4-2B、LNCaP 中 miR-223 表达发现,miR-223 在成骨细胞中的表达显著高于前列腺癌细胞(图 3C)。拷贝数结果表明 miR-223 在成骨细胞外泌体中富集(图 3D)。

为证实成骨细胞与前列腺癌细胞之间存在外泌体一类膜结构物质的交换以及 miR-223 在其中的传递,我们进行了膜交换实验和 miRNA 示踪。采用 0.4 μm Transwell 小室,共培养模式图如图 3E 所示。在上层加入 PKH67 标记的成骨细胞后,荧光显微镜观察到 PKH67 绿色荧光标记的细胞膜性结构与下层 C4-2B 细胞融合,膜融合后的细胞局部或整体可见荧光(图 3F)。在上层加入预先转染 FAM 标记 miR-223(miR-223-FAM)的成骨细胞后,下层 C4-2B 细胞中可以观察到细小、散在的荧光颗粒(图 3G)。以上实验表明,成骨细胞能够将膜结构物质及 miR-223 传递至前列腺癌细胞。



A、B: 加入成骨细胞外泌体后前列腺癌细胞系 C4-2B 和 LNCaP 的克隆形成;C、D: 蛋白酶、RNA 酶降解外泌体中蛋白或 RNA 成分后对前列腺癌细胞克隆形成的影响 a: $P<0.05$,与 PBS 组比较

图 2 成骨细胞外泌体促进前列腺癌细胞克隆形成



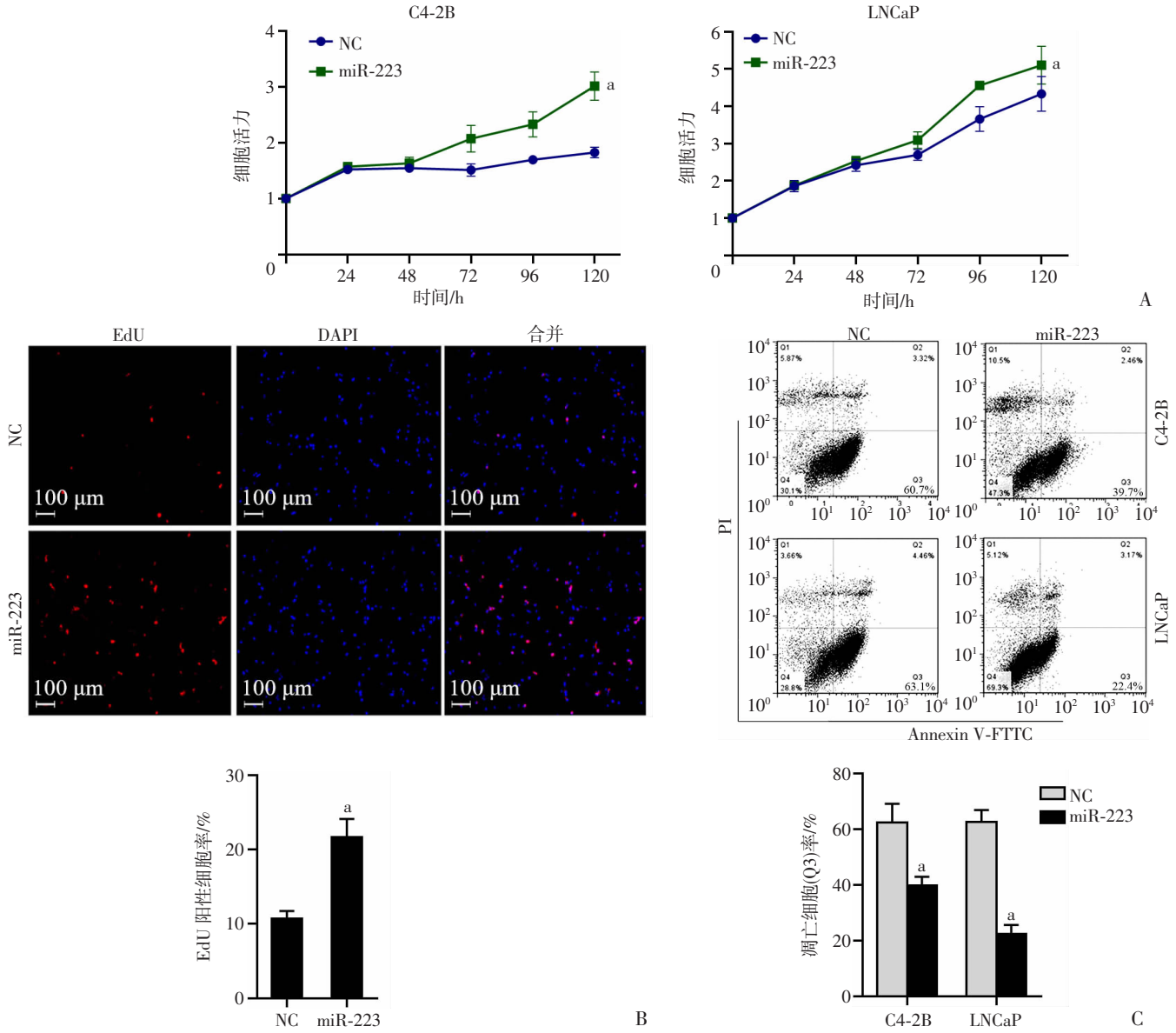
A:加入成骨细胞外泌体后前列腺癌细胞中表达增高的 miRNAs;B: 前列腺癌细胞加入外泌体后 miR-223 前体和成熟体的变化 a: $P<0.05$,与 PBS 组比较;C: 成骨细胞与前列腺癌细胞中 miR-223 的相对表达水平 b: $P<0.05$,与成骨细胞比较;D:成骨细胞及其外泌体中 miR-223 拷贝数水平;E: 细胞共培养设计示意图;F: 膜交换实验观察下层 C4-2B 膜融合后的 PKH67 荧光;G: miR-223 FAM 标记示踪在下层 C4-2B 细胞可见颗粒状 FAM 荧光;H: miR-223 inhibitors 可逆转成骨细胞外泌体对前列腺癌细胞克隆形成的促进作用 a: $P<0.05$,与 PBS 组比较

图 3 成骨细胞运载功能分子 miR-223 至前列腺癌细胞

为验证 miR-223 是外泌体中的关键分子,我们在用成骨细胞外泌体处理前列腺癌细胞时同时转染 miR-223 的抑制剂(inhibitors)。如图 3H 所示,成骨细胞外泌体能够促进 C4-2B 和 LNCaP 的克隆形成,但这种促进作用在转染 miR-223 inhibitors 后能够逆转。

2.4 miR-223 促进前列腺癌恶性表型

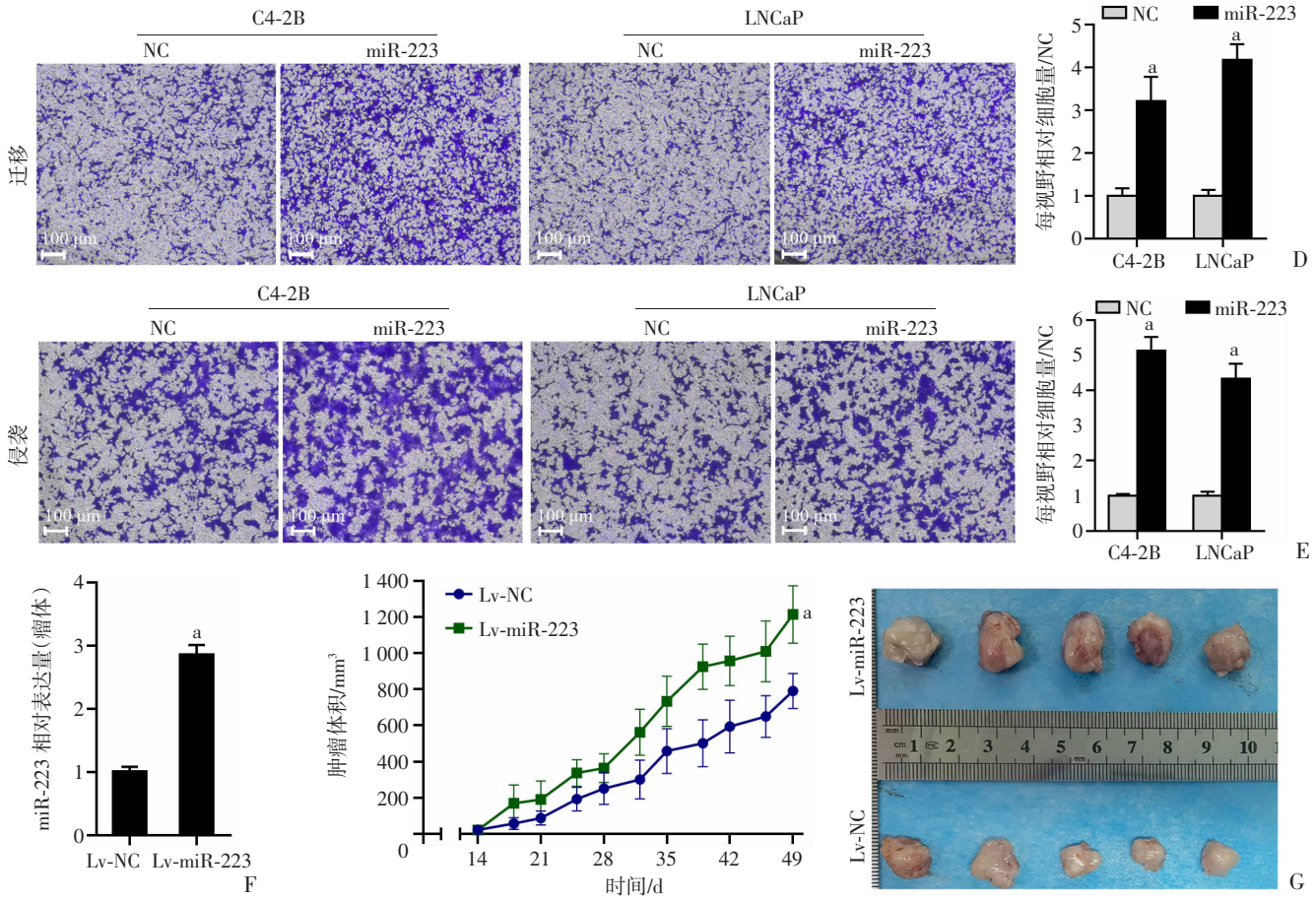
为研究 miR-223 在前列腺癌细胞中的功能作用,我们向前列腺癌细胞 C4-2B 和 LNCaP 转染 miR-223 mimics 模拟 miR-223 过表达。CCK-8 实验表明过表达 miR-223 后 C4-2B 细胞和 LNCaP 细胞增殖能力显著增强(图 4A);EdU 实验发现过表达 miR-223 后 DNA 合成活跃的细胞显著增加(图 4B);使用多西他赛作为凋亡诱导剂,流式 Annexin V/PI 凋亡检测显示过表达 miR-223 组凋亡更少(图 4C);Transwell 实验表明过表达 miR-223 后癌细胞迁移(图 4D)和侵袭(图 4E)能力显著增强。使用慢病毒构建稳定过表达 miR-223 的 C4-2B 细胞(图 4F),裸鼠皮下移植瘤模型生长曲线显示 miR-223 过表达组的瘤体生长速度显著高于对照组(图 4G)。



a:$P<0.05$,与 NC 组比较,A:CCK-8 检测 miR-223 对前列腺癌细胞增殖的影响;B:EdU 实验检测 miR-223 对细胞 DNA 合成的影响;C:流式 Annexin V/PI 检测 miR-223 对多西他赛处理后的前列腺癌细胞凋亡的影响

图 4 miR-223 促进前列腺癌细胞恶性表型

(图 4D~G 续下页)



a:$P<0.05$,与 NC 组比较; D、E: Transwell 实验检测 miR-223 对前列腺癌细胞迁移和侵袭能力的影响;F:C4-2B 慢病毒稳转株 miR-223 过表达效率;G:裸鼠皮下成瘤模型瘤体生长曲线(左)及肿瘤大体观(右)

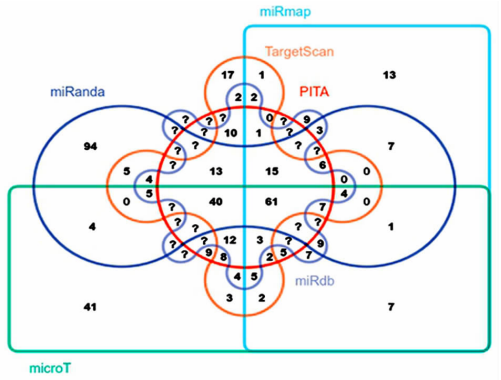
续图 4 miR-223 促进前列腺癌细胞恶性表型

2.5 miR-223 通过靶向 APC 提高 WNT 通路的活性

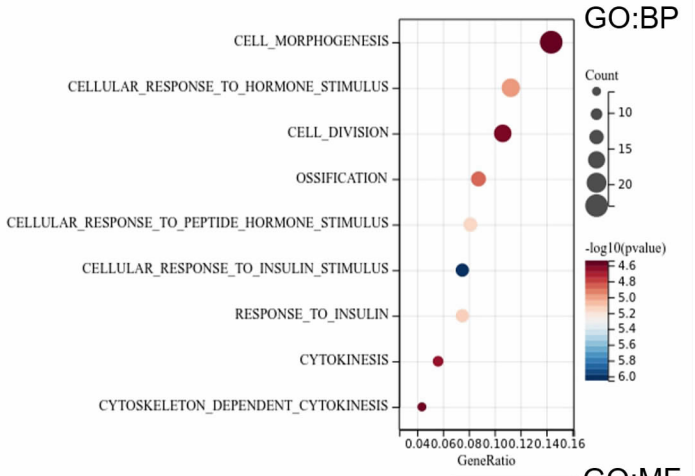
使用 Starbase2.0 数据库获取 miR-223 在多个预测工具中的靶基因(图 5A),对至少在 4 个分析工具中出现的 96 个交集靶基因进行后续 GO 通路分析。GO 生物学过程(Gene Ontology: Biological Process, GO: BP)分析表明,这些靶基因主要参与了细胞形态发生、细胞对激素刺激的反应和骨化等过程。GO 分子功能(Molecular Function, MF)分析目标基因主要参与酶结合、转录因子结合、染色质结合等分子功能(图 5B)。Starbase2.0 数据库中对 miR-223 靶基因的 KEGG Pathway 分析结果显示,靶基因在 WNT 通路中富集明显(图 5C)。同时,在 4 个靶基因预测工具中均提示 WNT 通路抑制分子 APC 可能是 miR-223 的靶点。图 5D 上显示了 Targetscan6.2 预测的 miR-223 种子区与 APC 3′-UTR 预测结合位点。过表达 miR-223 后,前列腺癌细胞和移植瘤中 APC 的表达降低(图 5D 下)。图 5E 显示 qPCR 检测多个 WNT 通路下游基因 WISP1、CCND1、HOXB9、FOSL1 和 c-MYC 表达增高。

2.6 miR-223 通过 APC 增强前列腺癌细胞恶性表型

为验证 miR-223 通过其靶基因 APC 发挥功能作用,我们进行了 Rescue 实验。CCK-8 实验显示,过表达 miR-223 对前列腺癌细胞增殖的促进作用能够被过表达 APC 所逆转(图 6A)。类似的趋势也表现在 Transwell 迁移和侵袭实验中,过表达 APC 减弱了过表达 miR-223 对前列腺癌细胞迁移(图 6B)和侵袭(图 6C)的促进作用。以上实验表明,miR-223 对前列腺癌恶性行为的影响可能是通过抑制 APC 来实现的。



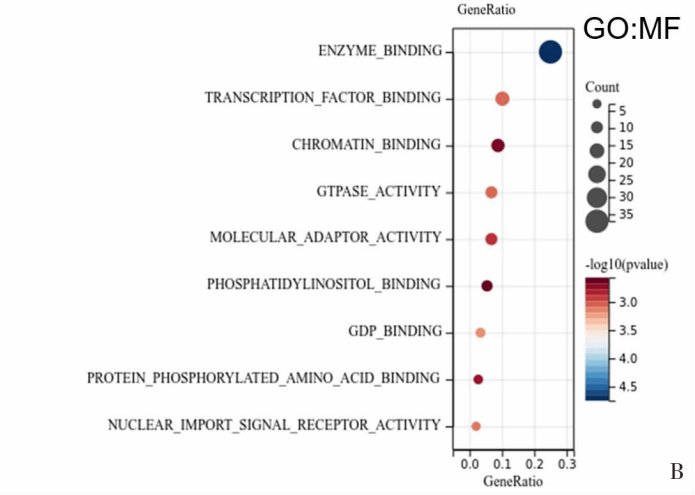
A



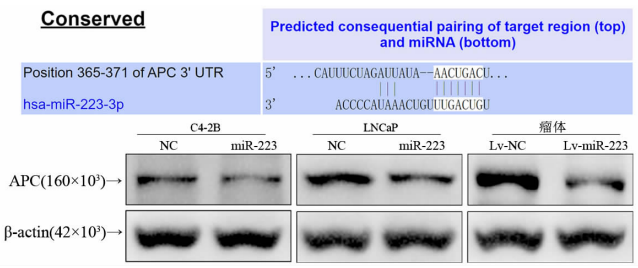
The Enrichment Analysis of hsa-miR-223-3p Targets in KEGG Pathways

pathwayName	log10(pval)	log10(FDR)
KEGG_Prostate_Cancer	-4.50427	-2.55245
KEGG_Phosphatidylinositol_Signaling_System	-4.63709	-2.38424
KEGG_Wnt_Signaling_Pathway	-4.11371	-2.33798
KEGG_Pathways_In_Cancer	-3.79653	-2.24265
KEGG_Fc_Gamma_R_Mediated_Phagocytosis	-3.88006	-2.22926
KEGG_Inositol_Phosphate_Metabolism	-3.50924	-2.10148
KEGG_Glioma	-3.55377	-2.07907
KEGG_Colorectal_Cancer	-3.30815	-1.95838
KEGG_Ubiquitin_Mediated_Proteolysis	-3.00036	-1.74751
KEGG_Regulation_Of_Actin_Cytoskeleton	-3.02078	-1.72217

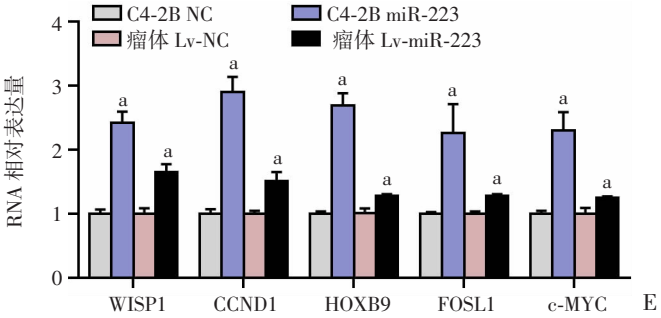
C



B



D



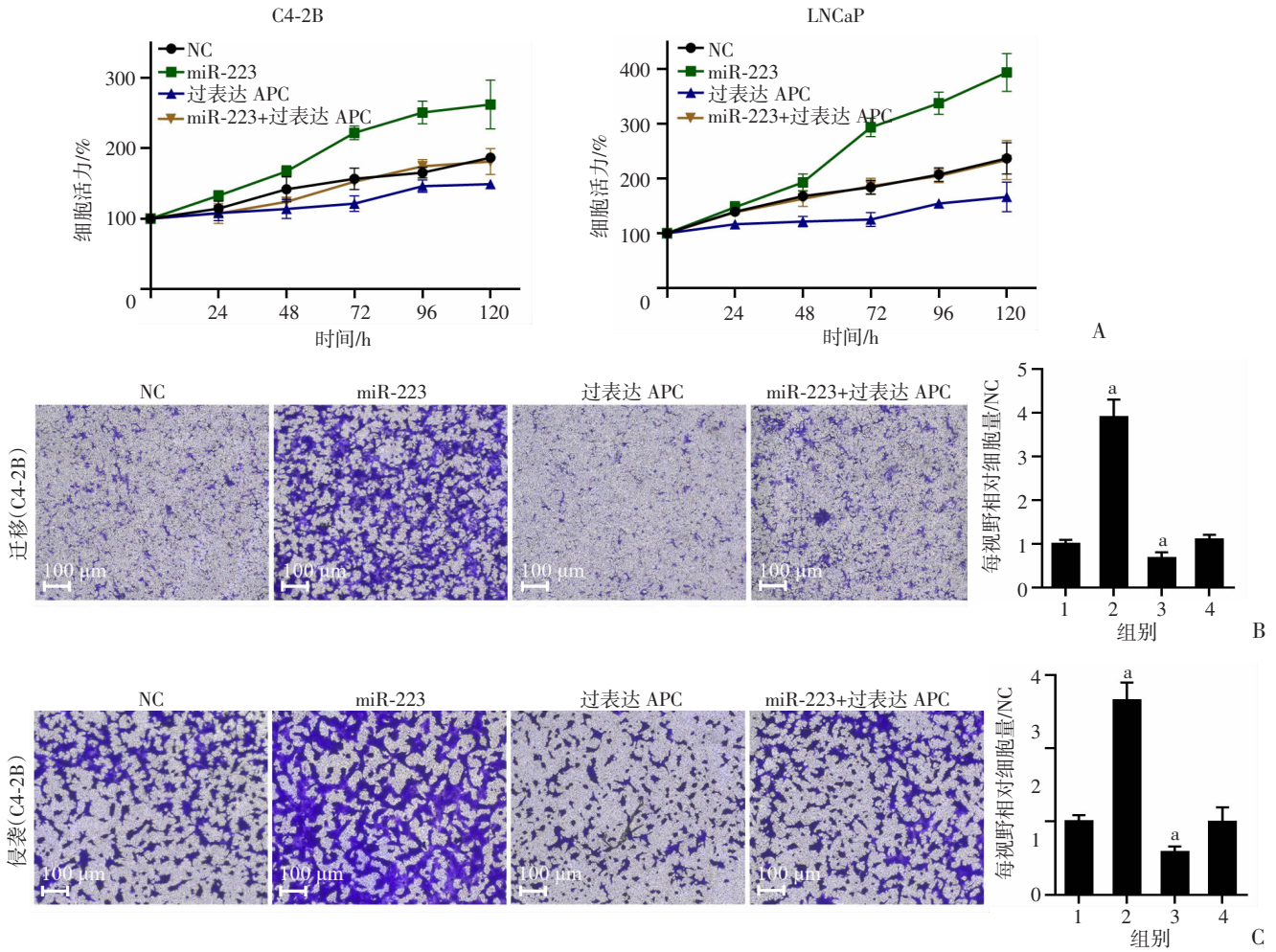
E

A: miR-223 在 6 个预测工具中的靶基因 Venn 图;B: miR-223 靶基因 GO 分析;C: miR-223 预测靶基因 KEGG Pathway 分析;D: Targetscan6.2 预测 miR-223 与 APC 结合位点(上)、Western Blot 检测细胞和移植瘤中 miR-223 对 APC 表达水平的影响(下);E: RT-qPCR 检测细胞和移植瘤中 miR-223 对 WNT 通路下游基因表达水平的影响 a: $P<0.05$,与 NC 组比较

图 5 miR-223 抑制 APC 表达增强 WNT 通路活性

3 讨论

在全球,转移性前列腺癌每年导致约 40 万患者死亡,且这一数字正在逐年上升[11]。特异性嗜骨转移和成骨转移是前列腺癌骨转移的显著特征。对前列腺癌骨转移的机制研究认为,癌细胞与骨微环境的相互作用是其发生的主要原因。在本研究中,我们发现成骨细胞外泌体是前列腺癌的促癌因子,外泌体中的 miR-223 可能是关键的功能分子。研究证实了成骨细胞与前列腺癌细胞的体外交互作用,包括细胞之间膜的交换和 miR-223 的传递。同时在细胞中研究了 miR-223 的功能作用和靶向分子。



A:过表达 APC 可以逆转 miR-223 对前列腺癌细胞增殖的促进作用;B、C:过表达 APC 可以抑制 miR-223 对肿瘤细胞迁移(B)和侵袭(C)的促进作用 a:$P<0.05$,与 NC 组比较,1:NC,2:miR-223;2:过表达 APC;4:miR-233+过表达 APC

图 6 miR-223 通过抑制 APC 促进前列腺癌恶性表型

骨微环境的稳态由成骨细胞和破骨细胞这两类主要的细胞维持[12]。破骨细胞由骨髓造血干细胞来源的单核/巨噬前体细胞融合分化而来,具有溶解、吸收骨组织的能力。而间充质干细胞来源的成骨细胞则通过分泌细胞外基质并使其矿化成新骨来完成骨的重建。成骨细胞与破骨细胞本身依靠核因子 κB 受体活化因子(receptor activator of nuclear factor-κB, RANK)和核因子 κB 受体活化因子配体(receptor activator of nuclear factor -κB ligand, RANKL)信号通路互相牵制。破骨细胞介导的骨吸收为癌细胞归巢并形成转移前生态提供了先决条件[13]。同时,破骨细胞分泌的多种促癌因子也能够增强肿瘤细胞的恶性表型[14]。因此破骨细胞被认为是前列腺癌骨转移的潜在治疗靶点。但目前针对破骨细胞的药物如双膦酸盐和地诺单抗等没有显著的延长患者的生存期[15]。

前列腺癌细胞能够通过多种机制使骨微环境中成骨细胞过度激活[16]。但成骨细胞激活后对前列腺癌细胞的反馈影响却鲜有研究。一些基于分泌因子的研究显示,成骨细胞能够协助前列腺癌细胞在骨部位的休眠[17]。但癌细胞从播散至骨到形成转移灶,需要经过一个复杂的过程,这个过程包括定植、休眠、重新激活、重建,其中的具体机制有待深入探究。我们的研究初步证实了来自成骨细胞的外泌体对前列腺癌的增殖具有促进作用。

外泌体的出现,极大地丰富了人们对细胞通讯的理解。现在外泌体被认为是肿瘤细胞与转移灶微环境之间的关键信使。在转移前小室的形成和肿瘤发展过程中,外泌体在血管渗漏、嗜器官部位的基质细胞生长以及骨髓衍生细胞培养和募集中发挥着不同的作用[18]。例如,前列腺癌细胞分泌的外泌体可能在骨转

移微环境中诱导成骨细胞和破骨细胞之间的失衡,导致骨转移发生及进展[19]。当下靶向外泌体的治疗有着一定的应用前景:磺胺异恶唑(Sulfisoxazole)是一种抗生素,可显著抑制癌症细胞中外泌体的生成,并对癌症生长和骨转移表现出抑制作用[20]。本研究发现成骨细胞外泌体的促癌作用,有望成为前列腺癌转移治疗的靶点。

外泌体作为信使,能够传递多种信息物质。这些信息物质中 miRNA 的研究最为成熟[21],经外泌体的传递被认为是 miRNA 能在循环中稳定存在的重要机制[22]。miRNA 是小内源性非编码 RNA,通过与下游靶基因的 3′-UTR 中的特定序列结合,发挥转录后调控作用,导致 mRNA 降解或抑制 mRNA 翻译,进而影响细胞的各项生理过程;其经外泌体传递引起的异常表达与肿瘤的生长、转移、耐药等密切相关[23]。通过高通量筛选,我们发现 miR-223 可能是成骨细胞中的关键功能分子,通过靶向 APC 发挥功能作用。miR-223 作为一种在脊椎动物中高度保守表达的 microRNA,在其他恶性肿瘤中已被证实可通过调控 WNT 通路影响肿瘤的进展和转移[24]。本研究的结果证实了经成骨细胞外泌体传递的 miR-223 可以通过抑制 APC 蛋白增强前列腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力,并抑制癌细胞凋亡。这些结果可能有助于开发新的应对转移性前列腺癌的治疗方案。

综上所述,本研究通过一系列实验证明了成骨细胞外泌体对前列腺癌生长的促进作用,其中 miR-223 是关键的功能分子,它通过抑制 APC 表达,影响 WNT 通路活性,进而促进前列腺癌细胞恶性表型,从另一个角度揭示了前列腺癌骨转移灶进展的机制。

参考文献:

[1] ACHARD V, PUTORAP M, OMLIN A, *et al*. Metastatic prostate cancer: treatment options[J]. Oncology, 2022, 100(1): 48-59. DOI: 10.1159/000519861.

[2] GANGULY SS, LI X H, MIRANTI C K. The host microenvironment influences prostate cancer invasion, systemic spread, bone colonization, and osteoblastic metastasis[J]. Front Oncol, 2014, 4: 364. DOI: 10.3389/fonc.2014.00364.

[3] KALLURI R, LEBLEU V S. The biology, function, and biomedical applications of exosomes[J]. Science, 2020, 367(6478): eaau6977. DOI: 10.1126/science.aau6977.

[4] SABER S H, ALI H E A, GABALLA R,*et al*. Exosomes are the driving force in preparing the soil for the metastatic seeds: lessons from the prostate cancer[J]. Cells, 2020, 9(3): 564. DOI: 10.3390/cells9030564.

[5] ZOU Z H, DAI RR, DENG N, *et al*. Exosomal miR-1275 secreted by prostate cancer cells modulates osteoblast proliferation and activity by targeting the SIRT2/RUNX2 cascade[J]. Cell Transplant, 2021, 30: 9636897211052977. DOI: 10.1177/09636897211052977.

[6] HASHIMOTO K, OCHI H, SUNAMURA S,*et al*. Cancer-secreted hsa-miR-940 induces an osteoblastic phenotype in the bone metastatic microenvironment via targeting ARHGAP1 and FAM134A[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018, 115(9): 2204-2209. DOI: 10.1073/pnas.1717363115.

[7] LIU Y, YANG C M, CHEN SS, *et al*. Cancer-derived exosomal miR-375 targets DIP2C and promotes osteoblastic metastasis and prostate cancer progression by regulating the Wnt signaling pathway[J]. Cancer Gene Ther, 2023, 30(3): 437-449. DOI: 10.1038/s41417-022-00563-1.

[8] COUGHLAN C, BRUCE K D, BURGY O,*et al*. Exosome isolation by ultracentrifugation and precipitation and techniques for downstream analyses[J]. Curr Protoc Cell Biol, 2020, 88(1): e110. DOI: 10.1002/cpcb.110.

[9] LI J H, LIU S, ZHOU H,*et al*. starBase v2.0: decoding miRNA-ceRNA, miRNA-ncRNA and protein-RNA interaction networks from large-scale CLIP-Seq data[J]. Nucleic Acids Res, 2014, 42(Database issue): D92-D97. DOI: 10.1093/nar/gkt1248.

[10] SHEN W T, SONG Z G, ZHONG X,*et al*. Sangerbox: a comprehensive, interaction-friendly clinical bioinformatics analysis platform[J]. iMeta, 2022, 1(3): e36. DOI: 10.1002/imt2.36.

[11] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L,*et al*. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249. DOI: 10.3322/caac.21660.

[12] FORNETTI J, WELM A L, STEWART S A. Understanding the bone in cancer metastasis[J]. J Bone& Mineral Res, 2018, 33(12): 2099-2113. DOI: 10.1002/jbmr.3618.

[13] HOSHINO A, COSTA-SILVA B, SHEN T L, *et al*. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis[J]. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. Nature. 2015, 527(7578): 329-335. DOI: 10.1038/nature15756.

[14] POLAVARAM N S, DUTTA S, ISLAM R,*et al*. Tumor- and osteoclast-derived NRP2 in prostate cancer bone metastases[J]. Bone Res, 2021, 9(1): 24. DOI: 10.1038/s41413-021-00136-2.

[15] KONG D P, YE C, ZHANG C X, *et al*. Procoxacin bidirectionally inhibits osteoblastic and osteoclastic activity in bone and suppresses bone metastasis of prostate cancer [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2023, 42(1): 45. DOI: 10.1186/s13046-023-02610-7.

[16] ZHANG X Y. Interactions between cancer cells and bone microenvironment promote bone metastasis in prostate cancer [J]. Cancer Commun (Lond), 2019, 39(1): 76. DOI: 10.1186/s40880-019-0425-1.

[17] YU-LEE L Y, YU G Y, LEE Y C, *et al*. Osteoblast-secreted factors mediate dormancy of metastatic prostate cancer in the bone via activation of the TGFβRIII-p38MAPK-pS249/T252RB pathway [J]. Cancer Res, 2018, 78(11): 2911-2924. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-17-1051.

[18] VALADI H, EKSTRÖM K, BOSSIOS A, *et al*. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells[J]. Nat Cell Biol, 2007, 9(6): 654-659. DOI: 10.1038/ncb1596.

[19] PONZETTI M, RUCCI N. Switchinghomes: how cancer moves to bone[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(11): 4124. DOI: 10.3390/ijms21114124.

[20] IM E J, LEE C H, MOON P G,*et al*. Sulfisoxazole inhibits the secretion of small extracellular vesicles by targeting the endothelin receptor A[J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 1387. DOI: 10.1038/s41467-019-09387-4.

[21] MELO S A, SUGIMOTO H, O'CONNELL J T, *et al*. Cancer exosomes perform cell-independent microRNA biogenesis and promote tumorigenesis[J]. Cancer Cell, 2014, 26(5): 707-721. DOI: 10.1016/j.ccell.2014.09.005.

[22] CHENG L, SHARPLES R A, SCICLUNA B J, *et al*. Exosomes provide a protective and enriched source of miRNA for biomarker profiling compared to intracellular and cell-free blood[J]. J Extracell Vesicles, 2014, 3: (1): 23743. DOI: 10.3402/jev.v3.23743.

[23] LI B W, CAO Y, SUN M J, *et al*. Expression, regulation, and function of exosome-derived miRNAs in cancer progression and therapy[J]. FASEB J, 2021, 35(10): e21916. DOI: 10.1096/fj.202100294RR.

[24] HAN L Z, LI Z G, JIANG Y Q,*et al*. SNHG29 regulates miR-223-3p/CTNND1 axis to promote glioblastoma progression via Wnt/β-catenin signaling pathway [J]. Cancer Cell Int, 2019, 19: 345. DOI: 10.1186/s12935-019-1057-x.

(收稿:2023-11-01;修回:2023-11-22)

(编辑 刘秋池)