论著

文章编号:1000-5404(2012)02-0168-04

HepaCAM 蛋白通过 exosomes 途径分泌到细胞外并抑制肿瘤细胞增殖

刘安全[1],吴小候[1],罗春丽[2] (400016 重庆,重庆医科大学:附属第一医院泌尿外科[1],检验医学院[2])

[摘要] **目的** 探讨肝细胞黏附分子(hepatocyte cell adhesion molecule, hepaCAM)在肾癌786-0细胞中通过exosomes途径分泌到细胞外及是否可以抑制肿瘤细胞增殖。**方法** 将携带hepaCAM基因的重组腺病毒质粒瞬时转染786-0细胞,Western blot鉴定hepaCAM基因在786-0中的表达;莫能星(monensin)和二甲基阿米洛利(DMA)处理转染后肿瘤细胞,检测肿瘤细胞上清液及exosomes中hepaCAM蛋白的量的变化。MTT法检测hepaCAM蛋白是否可以抑制肿瘤细胞增殖。**结果** 成功构建并转染hepaCAM重组腺病毒质粒,在肿瘤细胞上清液中检测到hepaCAM蛋白的分泌,经药物处理后,莫能星明显增加了转染后肿瘤细胞的hepaCAM蛋白的分泌量,而二甲基阿米洛利处理转染后肿瘤细胞,能显著抑制细胞上清液中hepaCAM的分泌量。Western blot进一步证明hepaCAM蛋白存在于exosomes上。成功转染hepaCAM基因的肾癌细胞分泌的exosomes明显抑制了肿瘤细胞增殖。**结论** hepaCAM蛋白可能通过exosomes途径分泌到肿瘤细胞外并抑制肿瘤细胞增殖。

[关键词] 肝细胞粘附分子;exosomes;分泌;增殖
[中图法分类号] R73-36;R737.11;R394.2 [文献标志码] A

HepaCAM secreted by renal cell carcinoma 786-0 cells through exosomes pathway inhibits cell proliferation

Liu Anquan[1], Wu Xiaohou[1], Luo Chunli[2] ([1]Department of Urology, First Affiliated Hospital, [2]Faculty of Clinical Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate that whether hepatocyte cell adhesion molecule (hepaCAM) is actively secreted from renal cell carcinoma 786-0 cells by a pathway involving exosomes and whether hepaCAM could inhibit proliferation in 786-0 cells. **Methods** A recombinant adenovirus vector plasmid containing hepaCAM was transfected into 786-0 cells. The expression of hepaCAM was detected by Western blotting. The transfected cells were treated with monensin and 5-(N-N-Dimetyl)-amiloride hydrochloride (DMA), and then extracellular culture medium and exosomes were used to investigate the content of hepaCAM by Bradford protein assay. MTT assay was used to detect the cell viability after treatment of exosomes cotaining hepaCAM. **Results** HepaCAM adenovirus vector plasmid was successfully constructed and stably transfected into 786-0 cells. Monensin enhanced the release of hepaCAM while DMA inhibited the process in the transfected 786-0 cells. Exosomes puritYed from the supernatant of transfected 786-0 cells inhibited the proliferation of 786-0 cells obvously. **Conclusion** HepaCAM is secreted from renal cell carcinoma cells by a pathway involving exosomes, and inhibits cell proliferation at the same time.

[**Key words**] hepatocyte cell adhesion molecule; exosomes; secretion; proliferation

Corresponding author: Wu Xiaohou, E-mail:wuxiaohou80@hotmail.com

肾癌在成人恶性肿瘤中所占比例高达3%[1],一般达到中晚期才被发现,一旦发生转移,平均生存时间仅为1~2年[2],因此研究肾癌发病的分子机制,并找到有效的治疗途径,已成为目前的研究热点。一般认为恶性转化的肿瘤细胞是过度增殖、凋亡受到抑制的结果,包括原癌基因的激活和抑癌基因受到抑制。HepaCAM(hepatocyte cell adhesion molecule)是由新加坡沈莎莉教授于2004年发现的一种是新基因,它编码的是一个免疫球蛋白样跨膜糖蛋白,是黏附分子中免疫球蛋白超家族,该基因在肿瘤细胞内低表达[3],过表达后可明显抑制肿瘤细胞增殖[4]。肿瘤细胞内存在大量肿瘤相关蛋白,对肿瘤细胞的发生发展起着重要的作用,同时肿瘤细胞可以通过多种方式将多种活性因子及蛋白分泌到细胞外并发挥一定的作用,如

[通信作者] 吴小候,E-mail:wuxiaohou80@hotmail.com

HSP60[5-6]、HSP70[7-8]等,HSP60、HSP70 可诱导免疫反应,促进肿瘤细胞浸润等,这些分泌通路主要包括:经典的内质网高尔基体通路,细胞膜蛋白质细胞外部分的裂解等。最近发现了一种新的蛋白质分泌通路即 exosomes 分泌途径。研究表明,exosomes 是由细胞膜内陷形成多胞体后再与细胞膜融合后外排而产生,可作为肿瘤细胞亚型间蛋白质转移的中介,对肿瘤细胞的生长造成了明显的影响[9]。胰腺癌细胞来源的 exosomes 可诱导胰腺癌细胞的凋亡并抑制其增殖[10]。本研究将外源性 hepaCAM 基因导入肾癌细胞,上调 hepaCAM 在肾癌细胞株 786-0 中的表达,进一步探讨细胞外 hepaCAM 蛋白质的存在与否,是否通过 exosomes 途径分泌及是否可以抑制肿瘤细胞增殖。

1 材料与方法

1.1 质粒、细胞系和主要试剂

hepaCAM 腺病毒质粒由重庆医科大学附属第一医院感染科贾蓓副教授构建并馈赠,经测序证实序列完全正确;786-0 细胞株由重庆医科大学检验医学院提供;莫能星(monensin)和二甲基阿米洛利(DMA)购于 Santa Cruz 公司,anti-HepaCAM 抗体购于武汉三鹰公司,anti-β-tubulin 抗体购于 Santa Cruz 公司,抗辣根过氧化物酶标记的兔 IgG 购自 Santa Cruz 公司,RPMI1640 和小牛血清购自 Gibco 公司。

1.2 细胞培养与质粒转染

人肾细胞癌 786-0 细胞用含 10% 新生小牛血清的 RPMI1640 培养液,置于 37 ℃、含 CO_2 体积分数为 5% 的培养箱中培养,常规换液传代。腺病毒转染:取处于生长良好的长满 70% ~80% 的 786-0 细胞,去培养基,加入一定量无血清培养液,加入适量腺病毒质粒,于 37 ℃培养 1.5 h 加入等量含 10% 新生小牛血清的 RPMI1640 培养液,12 h 后更换为含 10% 新生小牛血清的 RPMI1640 培养液。经 MTT 法检测,转染 hepaCAM 腺病毒后未引起明显的细胞死亡。转染 48 h 后提取细胞蛋白,Western blot 鉴定 hepaCAM 蛋白的表达。将细胞分为 3 组:实验组(转染 hepaCAM 腺病毒转染组)、对照组(空载腺病毒转转组)、空白组(未转染组)。

1.3 细胞上清液的提取

取生长良好的对数期 786-0 细胞,等量的细胞传于等体积 3 个培养瓶中,hepaCAM 腺病毒及空载腺病毒常规转染成48 h,用等量无血清培养液替换 3 组细胞完全培养液,按要求加入或不加药物后 7 h 或 24 h 后收集的 786-0 无血清培养上清液,1 000 × g、4 ℃低温离心 1 h 去除细胞碎片,冷冻干燥法浓缩上清液。以等量细胞的培养上清液为上样量,Western blot 检测细胞培养上清液中蛋白量的变化。

1.4 莫能星和二甲基阿米洛利处理

常规转染 hepaCAM 腺病毒质粒 48 h 后,用等量无血清培养液替换完全培养液,并分别加入 7 μmol/L 的莫能星或15 nmol/L 的二甲基阿米洛利及少量 PBS,7 h 后搜集细胞培养上清液。常规离心及浓缩上清液。Western blot 检测细胞培养上清液中 hepaCAM 蛋白量的变化。莫能星是 H^+/Na^+ 和 Na^+/Ca^{2+} 交换激动剂,能促进 exosomes 分泌,而 MDA 是 H^+/Na^+ 和 Na^+/Ca^{2+} 交换抑制剂,抑制 exosomes 分泌。经 MTT 法检测,所加药物浓度及时间并未引起细胞明显死亡。

1.5 Exosomes 提取及鉴定

收集足量 3 组细胞培养上清液,常规离心去细胞碎片。再以 100 000 × g、4 ℃低温离心 1 h,用 PBS 收集离心管底部沉淀,0.22 μm 除菌滤膜除菌后 -80 ℃低温保存。Bradford 法测定蛋白含量。exosomes 电镜观察:将 20 μl exosomes 悬液滴于直径为 2 mm 的铜网上,室温静置 1 min,用滤纸从侧面吸干液体,滴加 20 ml/L 磷钨酸溶液(pH 6.8),负染 0.5 ~ 1 min,滤纸从侧面吸干负染液体,室温干燥约 20 min,透视电镜下观察、照相。

1.6 Western blot 法检测

细胞用预冷的 PBS 洗 3 次,细胞刮收集细胞于离心管中,500 r/min 离心 5 min,转移到 EP 管,4 800 r/min 离心 5 min,加入 RIPA 裂解液,冰上放 30 min,15 000 r/min 离心 30 min 收集上清,Bradford 法测定蛋白浓度。加入蛋白上样缓冲液 100 ℃变性 5 min,每个上样孔上相 同量的蛋白,每孔约 50 g,SDS-PAGE 电泳,转膜转于 PVDF 膜上,5% 脱脂奶 粉封闭 1.5 h,一抗 4 ℃过夜,TBST 洗膜,3 次/10 min,二抗 37 ℃孵 1 h,TBST 洗膜,3 次/10 min,ECL 显色。

1.7 MTT 法检测细胞增殖

取对数期生长的肾癌 786-0 细胞,常规胰酶消化制成单细胞悬液,接种于 96 孔板中,每孔 5 000 个细胞,培养 12 h 后分别加入终浓度为 0、1、5、10、20 μg 实验组 786-0 细胞 exosomes,对照组 786-0 细胞提取的 exosomes 和未转染组 786-0 细胞来源的 exosomes 做空白对照组。每组设 3 个复孔, 每孔终体积为 200 μl。分别培养 24 h 后,每孔加入 MTT 溶液(5 mg/ml) 20 μl,继续孵育 4 h 后吸弃上清 , 每孔加入 150 μl DMSO,振荡摇匀。用酶标仪于 490 nm 波长条件下测定吸光度值[D(490)]。重复试验 3 次。计算细胞生长抑制率。

细胞生长抑制率 = [1 - 实验组 D(490)/对照组 D(490)] × 100%

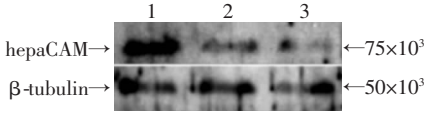
1.8 统计学分析

使用 MTT 法检测细胞增殖情况,应用 SAS 9.13 软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析以及 SNK 方法进行两两比较。

2 结果

2.1 腺病毒质粒的鉴定及 hepaCAM 蛋白表达的鉴定

提取 hepaCAM 腺病毒转染后 786-0 细胞蛋白,Western blot 鉴定 hepaCAM 蛋白的表达。实验组 hepaCAM 蛋白表达量明显高于对照组和空白组,说明 hepaCAM 转染成功(图 1)。



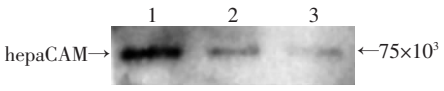
1:实验组;2:对照组;3:空白组

图 1 Western blot 检测 hepaCAM 在肾癌细胞中的表达

2.2 肿瘤细胞 hepaCAM 蛋白的分泌

常规转染 hepaCAM 腺病毒质粒,收集 786-0 无血清培养上

清液。Western blot 检测浓缩上清液中是否存在 hepaCAM 蛋白。实验组可分泌大量 hepaCAM 蛋白到细胞外，而对照组和空白组则少量分泌 hepaCAM 蛋白(图2)。

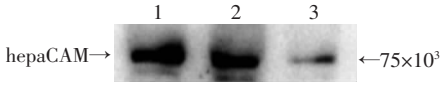


1：实验组；2：对照组；3：空白组

图2 Western blot 检测 786-0 无血清培养上清液中 HepaCAM 蛋白分泌量

2.3 hepaCAM 蛋白分泌到细胞外的机制

莫能星、PBS 及二甲基阿米洛利分别处理 hepaCAM 腺病毒转染组细胞。与 PBS 组相比，莫能星组中上清液中 hepaCAM 蛋白的量增加而二甲基阿米洛利组中 hepaCAM 蛋白的分泌明量明显减少(图3)。即促进或抑制 exosomes 的分泌后，hepaCAM 蛋白的分泌量也同时增加或减少。说明 exosomes 分泌途径参与了 hepaCAM 蛋白的分泌。

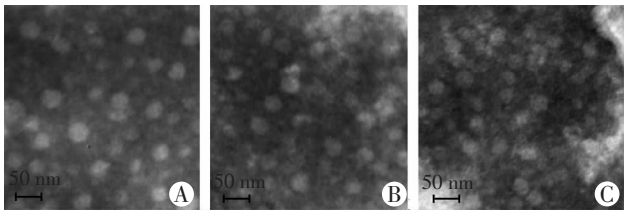


1：莫能星组；2：PBS 组；3：二甲基阿米洛利组

图3 Western blot 检测药物处理后 hepaCAM 蛋白分泌量

2.4 exosomes 电镜观察和蛋白检测

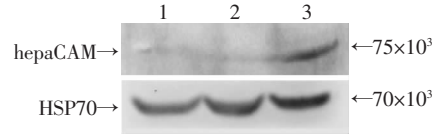
透射电镜观察示 exosomes 为类圆碟形小囊泡，大小均匀，直径为 30～100 nm，3 组 exosomes 无明显区别(图4)。提示转染 hepaCAM 后，细胞分泌的 exosomes 未改变其形态。



1：实验组；2：对照组；3：空白组

图4 透射电镜观察各组 exosomes 的形态

取转染后 786-0 细胞分泌的 exosomes，Western blot 检测 hepaCAM 及 HSP70。实验组 exosomes 中有大量 hepaCAM 蛋白表达，实验组、对照组及空白组 exosomes 均有 HSP70 蛋白表达(图5)。进一步证明提取物为 exosmes，exosomess 上有 hepaCAM 表达。



1：空白组；2：对照组；3：实验组

图5 Western blot 鉴定 exosmes 上 hepaCAM 及 HSP70 存在

超高速离心实验组细胞培养上清液，鉴定 hepaCAM 蛋白是存在于 exosomes 上还是去 exosomes 上清液中。超高速离心前细胞培养上清液中存在大量 hepaCAM 蛋白，离心后上清液 hepaCAM 蛋白量明显降低。进一步提示 hepaCAM 主要存在于 exosomes 上。

2.5 携带 hepaCAM 的肾癌来源 exosomes 抑制肾癌细胞增殖

MTT 检测示实验组与空白组、对照组比较，除 0 μg 无统计学意义外($P=0.1427$)，1～20 μg 均有统计学意义($P<0.05$)，而空白组与对照组差异无统计学意义(图6)。提示携带 hepaCAM 的 exosomes 以剂量依赖性的方式抑制肿瘤增殖。以空载组 exosomes 为对照，实验组 exosomes 在第 1、5、10、20 μg 其抑制率分别为 10%、19.9%、29.9%、30.9%。

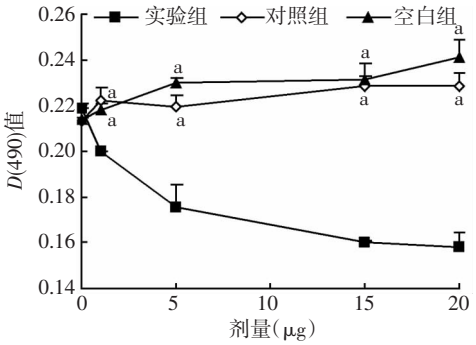


图6 MTT 法检测携带 hepaCAM 的 786-0 细胞来源的 exosomes 对 786-0 细胞增殖抑制作用

3 讨论

本课题组前期研究发现 hepaCAM 基因在肾癌组织中低表达[11]。成功转染 hepaCAM 基因后，hepaCAM 蛋白主要分布在细胞膜上[12]。hepaCAM 可通过 cmyc 通路抑制肿瘤细胞增殖[13]。exosomes 是多种活细胞细胞膜内陷形成多泡体(MVBs)，多泡体再与细胞膜融合以胞吐的方式向细胞外分泌释放的小囊泡，直径为 30～100 nm[14]。研究发现肿瘤细胞可以通过 exosomes 通路分泌到细胞外，是细胞内蛋白质分泌的方式之一。上述研究提示跨膜蛋白 hepaCAM 与由细胞膜内陷后外排而产生 exosomes 有着密切的关系。

国内外对 hepaCAM 的前期研究工作主要集中在细胞内，但是 hepaCAM 蛋白是否可以分泌到细胞外及细胞外作用研究甚少。是否可以通过 exosomes 途径分泌及 HepaCAM 蛋白在细胞外是否对肿瘤细胞本身发生作用尚不清楚。本研究通过外源性 hepaCAM 基因导入 786-0，探讨 hepaCAM 的分泌机制及细胞外活性。实验表明肾癌 786-0 细胞可以分泌 hepaCAM 蛋白到细胞外，exosomes 分泌激动剂莫能星能促进 hepaCAM 分泌，而 exosomes 抑制剂能显著抑制 hepaCAM 分泌。提取 exosomes，透射电镜和 Western blot 证明提取物为 exosomes，并进一步鉴定实验组 exosomes 上有大量 hepaCAM 表达，证明 hepaCAM 可以通过 exosomes 途径分泌。将 hepaCAM 腺病毒质粒转染的肾癌 786-0 细胞所分泌的 exosomes 与肾癌 786-0 细胞共培养，能显著抑制肾癌 786-0 细胞增殖，表明细胞外的 hepaCAM

具有一定的抗肿瘤增殖活性。有趣的是,除 exosomes 所表达的 hepaCAM 外,细胞培养液中仍有部分游离 hepaCAM 蛋白,这些游离的 hepaCAM 蛋白是否通过其他方式分泌尚需进一步探讨。hepaCAM 蛋白在其他肿瘤和非肿瘤中是否可以通过 exosomes 途径分泌、是否可以通过其他方式分泌到细胞外及 hepaCAM 蛋白的其他细胞外作用均需进一步探讨。本研究表明 hepaCAM蛋白通过 exosomes 分泌到肿瘤细胞外并抑制了肿瘤细胞增殖可能是研究肿瘤发生发展的重要过程之一,为研究肿瘤提供了一定的理论基础,并为进一步探索治疗肿瘤提供了新的可能靶点。

参考文献:

[1] Jemal A, Siegel R, Ward E, *et al*. Cancer statistics, 2008[J]. CA Cancer J Clin, 2008, 58(2): 71-96.

[2] Flanigan R C, Mickisch G, Sylvester R, *et al*. Cytoreductive nephrectomy in patients with metastatic renal cancer: a combined analysis[J]. J Urol, 2004,171(3): 1071-1076.

[3] Chung-Moh M, Hoon-lee L, Shen S. Cloning and characterization of hepaCAM, a novel Ig-like cell adhesion molecule suppressed in human hepatocellular carcinoma[J]. J Hepatol, 2005, 42(6): 833-841.

[4] Moh M C, Zhang C, Shen S, *et al*. Structural and functional analyses of a novel Ig-like cell adhesion molecule, hepaCAM, in the human breast carcinoma MCF7 cells[J]. J Biol Chem, 2005, 280(29): 27366-27374.

[5] Gupta S, Knowlton A A. HSP60 trafficking in adult cardiac myocytes: role of the exosomal pathway[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007, 292(6): H3052-H3056.

[6] Merendino A M, Bucchieri F, Campanella C, *et al*. Hsp60 is actively secreted by human tumor cells[J]. PLoS One, 2010, 5(2): e9247.

[7] Lancaster G I, Febbraio M A. Exosome-dependent trafficking of HSP70: a novel secretory pathway for cellular stress proteins[J]. J Biol Chem, 2005, 280(24): 23349-23355.

[8] Zhan R, Leng X, Liu X,*et al*. Heat shock protein 70 is secreted from endothelial cells by a non-classical pathway involving exosomes[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 387(2): 229-233.

[9] Al-Nedawi K, Meehan B, Micallef J, *et al*. Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells[J]. Nat Cell Biol, 2008,10(5): 619-624.

[10] Ristorcelli E, Beraud E, Verrando P, *et al*. Human tumor nanoparticles induce apoptosis of pancreatic cancer cells[J]. FASEB J,2008, 22(9): 3358-3369.

[11] 苟春华, 罗春丽, 吴小候, 等. hepaCAM 基因转染对肾癌 786-0 细胞增殖和侵袭活性的影响[J]. 重庆医科大学学报, 2009, 34(7): 841-844.

[12] He Y, Wu X, Luo C, *et al*. Functional significance of the hepaCAM gene in bladder cancer[J]. BMC cancer, 2010, 10: 83.

[13] Moh M C, Zhang T, Lee L H, *et al*. Expression of hepaCAM is downregulated in cancers and induces senescence-like growth arrest *via* a p53/p21-dependent pathway in human breast cancer cells[J]. Carcinogenesis,2008, 29(12): 2298-2305.

[14] Zhang Y, Luo C L, He B C, *et al*. Exosomes derived from IL-12-anchored renal cancer cells increase induction of specific antitumor response *in vitro*: a novel vaccine renal cell carcinoma[J]. Int J Oncol, 2010, 36(1): 133-140.

(**收稿**:2011-08-08;**修回**:2011-09-24)

(编辑 龙 亮)

关于计量单位的使用

在医学领域中几乎时时处处都离不开计量单位。国务院于1984-02-27公布了《关于在我国统一实行法定计量单位的命令》和《中华人民共和国法定计量单位》。1993-12-27国家技术监督局发布了《量和单位》国家强制标准,全国必须统一采用计量单位。

我国的法定计量单位包括:①国际单位制的基本单位,如长度(m)、质量(kg)、时间(s)等;②国际单位制的辅助单位;③国际单位制中具有专门名称的导出单位,如频率(Hz)、压力(Pa)、能量(J);④国家选定的非国际单位制单位,如时间(min、h、d)、转速(r/min);⑤由以上单位构成的组合形式单位,如速度(m/s)、浓度(mol/L);⑥由词头和以上单位所构成的倍数和分数单位,如μm、kPa、ml等。在医学写作时必须严格执行国务院的命令和有关的国家标准。

各种单位除在无数值的叙述性文字中和科普读物中可使用中文名称或中文符号外,均应使用符号。单位符号都是正体拉丁和希腊字母,无复数形式,符号后不附加圆点(正常语法名字尾标点符号除外)。来源于人名的单位,例如:Pa、Gy、W等和10^6以上的词头,例如:M、G、T等的首字母大写以外均为小写,容积"升"的符号可用大写(L)也可用小写(l),一般在单独使用不加词头时用大写。数值与单位符号之间、单位符号与相邻的其他符号(例如:化学元素符号)之间应留半个阿伯数字空隙,词头与其所组合的单位符号之间不需空隙。词头不能单独使用,也不能重叠使用(例如:"mμm"应为"nm")。

本刊编辑部