

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.19.008

CAFs 外泌体通过上调 ABCB5 诱导乳腺癌细胞化疗耐药 *

胡晓鹏¹ 张 哲² 晏昱婧¹ 罗智勇¹ 吴亚群^{1Δ}

(1 华中科技大学同济医学院附属同济医院 湖北 武汉 430030; 2 郑州大学附属第一医院 河南 郑州 450052)

摘要 目的:探讨肿瘤相关成纤维细胞(CAFs)诱导乳腺癌细胞耐药及其作用机制。**方法:**从临床样本中分离培养 CAFs,获取条件培养基,并纯化外泌体。使用 CAFs 条件培养基或 CAFs 外泌体与 CD44⁺的乳腺癌干细胞(CSCs)和 CD44⁻的非干细胞亚群共培养,并用 5 氟尿嘧啶(5-FU)处理共培养的细胞,通过成球实验和 CCK8 实验检测细胞的自我更新能力和存活能力。抑制细胞中 ABCB5 的表达,检测 5-FU 对细胞存活能力的影响。**结果:**CAFs 条件培养或外泌体处理的 CSCs 自我更新能力和对 5-FU 的耐药能力更强,成球能力和对 5-FU 耐药性上升约 1.5-2 倍。CAFs 外泌体可提高 CSCs 中 ABCB5 的表达水平约 4-5 倍,抑制 ABCB5 可降低 CSCs 的耐药性至原来的约 60-80%。**结论:**CAFs 通过旁分泌外泌体增强 CSCs 的自我更新能力并通过上调 CSCs 中 ABCB5 的表达水平促进其对化疗药物的抵抗。

关键词:乳腺癌;肿瘤相关成纤维细胞;外泌体;耐药

中图分类号:R-33;R737.9;Q291 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)19-3637-05

CAFs-exosomes Induce Chemoresistance of Breast Cancer Cells via Upregulating ABCB5*

HU Xiao-peng¹, ZHANG Zhe², YAN Yu-jing¹, LUO Zhi-yong¹, WU Ya-qun^{1Δ}

(1 Tongji Hospital affiliated to Tongji Medical college, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei, 430030, China;

2 The first Hospital affiliated to Zheng Zhou University, Zhengzhou, Henan, 450052, China)

ABSTRACT Objective: To explore drug resistance and its underlying mechanisms of breast cancer cells induced by carcinoma-associated fibroblasts (CAFs). **Methods:** CAFs were isolated from clinical samples and cultured to produce conditioned medium (CM) followed by purification of exosomes. Sphere-formation assay and CCK8 assay were performed to detect the capacity of self-renewing and survival of CD44⁺ breast cancer stem cells (CSCs) and CD44⁻ non-CSCs cocultured with CAFs-CM or exosomes and treated with 5-FU. The survival ability of CSCs was detected after knocking down of ABCB5. **Results:** Treatment with CAFs-CM or exosomes enhanced the capacity of self-renewing and resistance to 5-FU of CSCs, sphere formation ability and chemoresistance to 5-FU increased about 1.5 to 2 folds. CAFs-exosomes increased the expression of ABCB5 of CSCs to about 4 to 5 folds and knockdown of ABCB5 decreased its drug resistance to 60-80% of that of normal ABCB5 expression groups. **Conclusion:** CAFs-exosomes enhanced the capacity of self-renewing of CSCs and upregulated the expression of ABCB5 thus contributing to its resistance to chemotherapy.

Key words: Breast cancer; Carcinoma-associated fibroblasts; Exosomes; Drug resistance

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R737.9; Q291 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)19-3637-05

前言

乳腺癌是女性常见的恶性肿瘤之一^[1]。尽管在过去数十年中,乳腺癌的诊断和治疗有了显著的提高,极大的延长了患者的生存时间,但其仍是世界范围内肿瘤患者死亡的主要原因之一^[1-4]。手术术后序贯化疗药物治疗是乳腺癌最常用的综合治疗方法,但肿瘤细胞的耐药性可导致化疗失败。乳腺癌化疗后的复发和转移是导致患者死亡的主要原因,因此明确肿瘤化疗抵抗的机制对于提高患者总生存率十分重要,近年来肿瘤间质与肿瘤实质细胞相互作用的肿瘤微环境对化疗耐药的影响成为新

的研究增长点^[5,6]。

肿瘤实质中存在一群具有强大的自我更新能力和分化潜能的细胞亚群,被称为肿瘤干细胞(cancer stem cells, CSCs)^[7,8]。CSCs 不仅参与肿瘤的发生发展,而且与化疗耐药及化疗后肿瘤复发密切相关^[8,9]。在乳腺癌细胞中,CD44 是 CSCs 重要的表面标志,CD44⁺的细胞亚群富集 CSCs,CD44⁻的细胞亚群则为非肿瘤干细胞(non-CSCs)^[10-12]。另一方面,肿瘤相关成纤维细胞(carcinoma-associated fibroblasts, CAFs)是肿瘤间质中主要的细胞成分,在肿瘤化疗耐药和复发中发挥重要作用^[13,14],而间质细胞分泌的外泌体是介导肿瘤间质细胞和实质细胞相互作用

* 基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(81502373)

作者简介:胡晓鹏(1982-),博士,主治医师,主要研究方向:普通外科临床及肿瘤基础研究, E-mail: xiaopeng_hu@hust.edu.cn

Δ 通讯作者:吴亚群, E-mail: wyqmd@126.com

(收稿日期:2018-05-28 接受日期:2018-06-23)

的重要载体^[15]。为进一步研究 CAFs 与乳腺癌 CSCs 耐药的相关性,本研究通过体外成球实验和细胞活性检测证实了 CAFs 通过旁分泌外泌体增强 CSCs 的自我更新能力,并初步阐明其通过外泌体介导上调 ABCB5 (ATP-binding cassette sub-family B member 5)促进乳腺癌 CSCs 对化疗药物的抵抗。

1 材料与方法

1.1 材料

本实验所用人乳腺癌细胞系 MCF7 和 MDA-MB-231 细胞由华中科技大学同济医学院附属同济医院实验室常规保存。DMEM 培养基,胎牛血清购自美国 Gibco 公司。IV 型胶原酶购自美国 Invitrogen 公司。5-氟尿嘧啶(5-FU)购自美国 Sigma 公司。Rabbit-anti-CD81、Rabbit-anti-ABCB5 购自美国 Abcam 公司。PE 标记的 CD44 抗体购自美国 CST 公司。

1.2 CAFs 分离与培养

将人乳腺癌标本用无菌眼科剪将标本剪碎至 1 mm³ 大小的小块,置于无血清 DMEM 培养基(含 37.5 mg/mL 的 IV 型胶原酶)离心管中,37℃ 温箱摇床孵育 2 h。4℃、2000 rpm 离心 10 min,弃上清。PBS 重悬细胞沉淀,400 目无菌滤网过滤,4℃、2000 rpm 离心 10 min,弃上清。将细胞直接接种至培养皿中,加入 DMEM 高糖培养基(含 10% FBS),置于 37℃、5% CO₂ 培养箱内。3 h 后,弃培养基,PBS 洗去未贴壁的细胞,继续放入 37℃、5% CO₂ 培养箱内,每日观察细胞状态适时更换新鲜培养基。待细胞融合度达 80~90%,镜下细胞形态为长梭形时使用 0.25%胰酶消化传代,扩增细胞,继续培养。

1.3 外泌体分离纯化与鉴定

六孔板每孔培养 CAFs,融合度达 80~90%时弃培养基,无菌 PBS 洗 2 次,加入 2 mL 无血清 DMEM 培养基,继续培养 2 h 后收集上清,即为 CAFs 条件培养基(conditioned medium, CM)。将 CAFs-CM 于 4℃、300×g 离心 10 min,去除细胞沉淀,上清转至新离心管;4℃、2000×g 离心 1 h,除去残存细胞,上清转移至新离心管;4℃、10000×g 离心 40 min 去除亚细胞成分,将上清转移超速离心管;4℃、150000 g 超速离心 2 h,此时沉淀即为外泌体(CAFs-exo)。NP-40 裂解液提取外泌体蛋白,western blot 检测 CD81 的表达情况,确定外泌体分离成功^[16]。外泌体沉淀重悬于 2 mL 无血清 DMEM 培养基备用,使用时条件培养基和外泌体的量为 24 孔板每孔加入 100 μL-CAF-CM 或 CAFs-exo。

1.4 成球实验

采用流式分选术分选出 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞中的 CD44⁺ 的肿瘤干细胞(CSCs)亚群和 CD44⁺ 的非肿瘤干细胞(non-CSCs)亚群。用干细胞培养基重悬分选的细胞并计数,将各组细胞接种至低吸附的 24 孔板内,每孔 500 个细胞(每个实验组设置 3 个复孔),添加培养基至 1 mL,观察细胞生长和球体形成情况。细胞球体直径生长至 ≥ 50 μm 时计数、拍照并进行统计学分析。

1.5 CCK8 实验和凋亡检测

将分选后的细胞计数,分别接种至 96 孔板内,每孔 3000 个细胞,补齐培养基至 100 μL。置于 37℃、5% CO₂ 的培养箱中过夜,待细胞贴壁后加入 5-FU(终浓度为 1 μM),对照组中

仅加入等体积的 PBS(每组设置 3 个复孔)。72 h 后,每孔加入 10 μL CCK-8 试剂,37℃ 孵育 1 小时,酶标仪 450 nm 波长下检测细胞活性,记录吸光度值。平行培养的未处理组设为对照组,按照 [(对照组 OD-实验组 OD)/对照组 OD]×100% 计算生长抑制率,并进行统计学分析。将分选后的细胞接种至 6 孔板,贴壁后加入 5-FU(终浓度为 10 μM)± CAFs-exo 400 μL,共培养 24 h 后制备单细胞悬液,以 Annexin V-FITC 和 PI 双染后(碧云天,C1062)流式细胞仪检测。

1.6 统计学分析

所有实验数据采用 SPSS 13.0 统计软件分析,两组均数比较采用 t 检验,检验水准 α=0.05。

2 结果

2.1 CSCs 具有较强的成球能力,与非 CSCs 对比对 5-FU 具有天然耐药性

用流式分选术将 MCF-7 和 MDA-MB-231 分选为 CD44⁺ 和 CD44⁻ 的亚群并接种至低吸附的 24 孔板中,观察细胞的成球能力。MCF-7 CD44⁺ 亚群和 CD44⁻ 亚群细胞的成球率分别为 46.18% 和 4.42%(P<0.01),MDA-MB-231 CD44⁺ 亚群和 CD44⁻ 亚群细胞的成球率分别为 65.71% 和 9.49%(P<0.01)(Fig. 1a)。结果显示在乳腺癌细胞系中,CD44⁺ 细胞亚群的成球能力较 CD44⁻ 亚群更强,说明 CD44⁺ 的细胞亚群具有更强的自我更新能力。

使用 5-FU 处理 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞 72h 后进行流式检测发现,CD44⁺ 比例显著升高(分别从约 5.2% 和 78.3% 升高至约 10.0% 和 85.3%,P<0.05)(Fig. 1b)。随后将分选的 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞分别接种至 96 孔板,加入 5-FU 处理 72 小时后,CCK8 检测细胞活性。结果显示:MCF-7 CD44⁺ 亚群细胞抑制率(36.59%)显著低于 CD44⁻ 亚群(81.22%,P<0.01),MDA-MB-231 CD44⁺ 亚群细胞抑制率(29.31%)也显著低于 CD44⁻ 亚群(73.29%,P<0.01)(Fig. 1c)。该结果提示周期特异性化疗药 5-FU 可富集 CSCs,且 CSCs 对 5-FU 明显耐药。

2.2 CAFs 通过旁分泌途径促进 CSCs 耐药

培养 CAFs 并获得条件培养基(CAFs-CM)。流式分选 MCF-7、MDA-MB-231 中的 CD44⁺ 的 CSCs,加入 CAFs 条件培养基(或对照培养基)和 5-FU 处理 CSCs,检测细胞的成球能力和细胞活性。研究显示:CAF-CM 处理的 CSCs 成球能力较对照组增强(MCF-7 CAFs-CM 处理组为 43.62%,对照组为 22.78%,P<0.01;MDA-MB-231 CAFs-CM 处理组为 67.33%,对照组为 35.51%,P<0.01)(Fig. 2a);CAF-CM 处理组细胞抑制率较对照组低(MCF-7 CAFs-CM 处理组为 26.32%,对照组为 35.78%,P<0.01;MDA-MB-231 CAFs-CM 处理组为 19.83%,对照组为 30.11%,P<0.01)(Fig. 2b)。该结果提示 CAFs 通过旁分泌途径增强 CSCs 的自我更新能力并促进 CSCs 对化疗药物的抵抗。

2.3 CAFs 通过外泌体促进 CSCs 耐药

从 CAFs-CM 中分离纯化外泌体,通过 western blot 检测外泌体的生物标记 CD81 的表达鉴定外泌体分离成功(Fig. 3a)。

分选 MCF-7、MDA-MB-231 中的 CD44⁺ 亚群,CAF 外泌体或对照培养基和 5-FU 处理 CSCs,检测细胞的成球能力和细

胞活性。研究显示: CAFs 外泌体处理的 CSCs 成球能力较对照组增强(MCF-7 CAFs-exo 处理组为 47.25%, 对照组为 23.64%, $P < 0.01$; MDA-MB-231 CAFs-exo 处理组为 70.63%, 对照组为 33.95%, $P < 0.01$); 平行培养的空白对照和 CAFs-exo 阳性对照则成球率明显高于化疗组 (Fig. 3b); CAFs 外泌体处理组细胞抑制率较低 (MCF-7 CAFs-exo 处理组为 23.18%, 对照组为 37.28%, $P < 0.01$; MDA-MB-231 CAFs-exo 处理组为 21.25%,

对照组为 32.14%, $P < 0.01$) (Fig. 3c)。提示 CAFs 通过外泌体增强 CSCs 的自我更新能力并促进 CSCs 对化疗药物的抵抗。 CAFs 外泌体处理的 CSCs 由 5-FU 诱导的早期凋亡率明显降低 (MCF-7 CAFs-exo 处理组为 65.56%, 对照组为 44.08%, $P < 0.001$; MDA-MB-231 CAFs-exo 处理组为 57.47%, 对照组为 31.72%, $P < 0.001$) (Fig. 3d)。

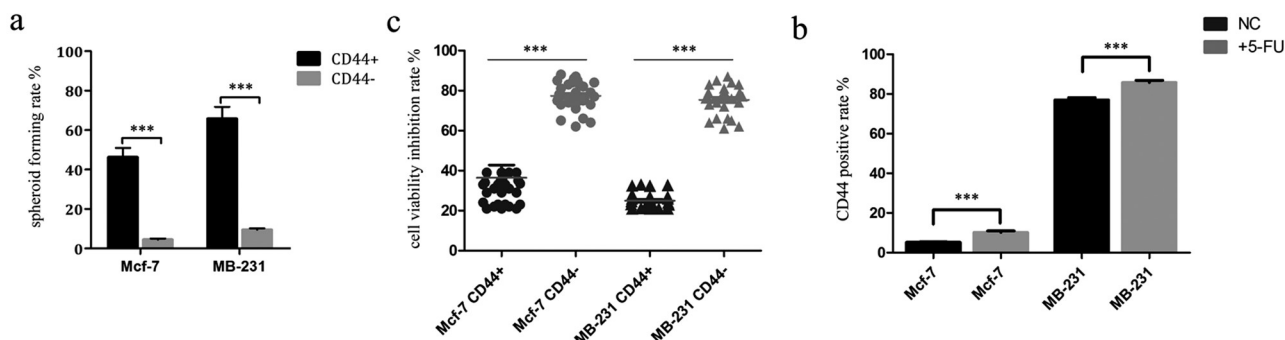


图 1 (a) MCF-7 和 MDA-MB-231 中 CD44⁺ 亚群与 CD44⁻ 亚群细胞的成球能力; (b) 5-FU 处理 MCF-7 和 MDA-MB-231 后 CD44⁺ 细胞的比例; (c) MCF-7 和 MDA-MB-231 中 CD44⁺ 亚群与 CD44⁻ 亚群细胞经 5-FU 处理后的细胞存活能力抑制率。误差条代表均值 $\pm$ 标准差; t 检验, ***, $P < 0.001$ 。

Fig.1 (a) The different spheroid forming ability of CD44⁺ or CD44⁻ subpopulations of MCF-7 and MDA-MB-231 cells; (b) The CD44⁺ subpopulation percentage of 5-FU treated MCF-7 and MDA-MB-231 cells; (c) The cell viability inhibition rate of CD44⁺ or CD44⁻ subpopulations of 5-FU treated MCF-7 and MDA-MB-231 cells respectively. Error bar is mean $\pm$ SD; Student t-test, ***, $P < 0.001$.

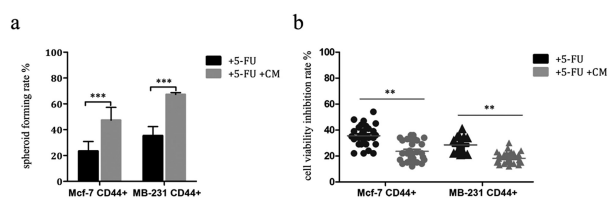


图 2 (a) CAFs-CM 或对照培养基和 5-FU 处理后 MCF-7 和 MDA-MB-231 中 CSCs 的成球能力; (b) CAFs-CM 或对照培养基和 5-FU 处理后 MCF-7 和 MDA-MB-231 中 CD44⁺ 的细胞存活能力抑制率。

Fig.2 (a) The spheroid forming ability of CD44⁺ subpopulation of MCF-7 and MDA-MB-231 cells after treated by 5-FU plus CAFs-conditioned medium or control medium; (b) The cell viability inhibition rate of CD44⁺ subpopulation of MCF-7 and MDA-MB-231 cells after treated by 5-FU plus CAFs-conditioned medium or control medium. Error bar is mean $\pm$ SD; Student t-test, ***, $P < 0.001$, **, $P < 0.01$.

2.4 CAFs 外泌体通过诱导 ABCB5 的表达促进 CSCs 耐药

分选 MCF-7、MDA-MB-231 中的 CD44⁺ 的 CSCs, CAFs 外泌体或对照培养基处理 CSCs, western blot 检测细胞中 ABCB5 的表达水平。结果显示: CAFs 外泌体处理的 CSCs 中 ABCB5 的表达水平较对照组升高 (Fig. 4a)。进一步通过 RNAi 抑制 CSCs 中 ABCB5 的表达后, 加入 5-FU 处理, CCK8 检测细胞活性。结果显示: ABCB5 经 siRNA 下调组细胞抑制率高于对照组 (MCF-7 细胞 ABCB5 下调组为 63.05%, 对照组为 40.22%, $P < 0.01$; MDA-MB-231 细胞 ABCB5 下调组为 47.75%, 对照组为 35.44%, $P < 0.01$) (Fig. 4b)。提示 CAFs 通过外泌体诱导 CSCs 中 ABCB5 的表达上调从而促进 CSCs 耐药。

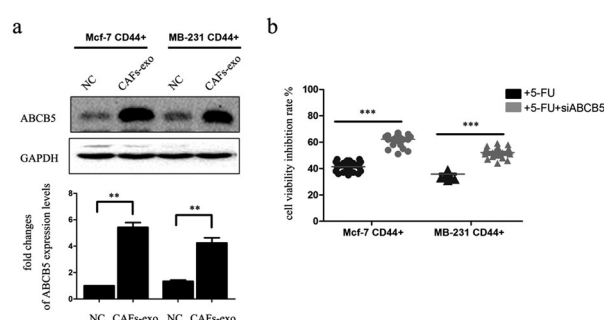


图 3 (a) CAFs 外泌体的鉴定; (b) CAFs 外泌体或对照和 5-FU 处理后 MCF-7 和 MDA-MB-231 中 CD44⁺ 细胞的成球能力, 右侧为空白对照和阳性对照组; (c) CAFs 外泌体或对照和 5-FU 处理后 MCF-7 和 MDA-MB-231 中 CSCs 的细胞存活能力抑制率; (d) 流式检测早期凋亡率及其对应的统计学结果。

Fig. 3 (a) Western blotting show identification of the exosome marker CD81 in the CAFs exosomes without the endoplasmic reticulum marker Calnexin; (b) The spheroid forming ability of CD44⁺ subpopulation of MCF-7 and MDA-MB-231 cells after treated by 5-FU plus CAFs exosomes or control, the right panel represents control ('non 5-FU, non Exo') and positive control ('non 5-FU, + Exo') groups; (c) The cell viability inhibition rate of CD44⁺ subpopulation of MCF-7 and MDA-MB-231 cells after treated by 5-FU plus CAFs exosomes or control. (d) The representative early apoptosis rate and the corresponding statistical results are shown. Error bar is mean $\pm$ SD; Student t-test, **, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$.

3 讨论

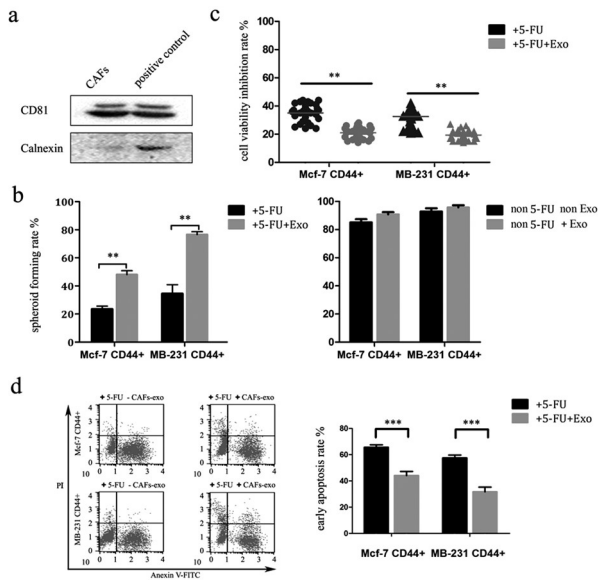


图4 (a) CAFs 外泌体或对照处理后 CSCs 中 ABCB5 的表达水平,误差条为均值 $\pm$ 标准差;(b) 抑制 ABCB5 表达后 CSCs 在 5-FU 中的存活能力抑制率。

Fig. 4 (a) The expression level of ABCB5 in CSCs of MCF-7 and MDA-MB-231 cells treated by CAFs-exosomes or negative control (NC), the error bar represents mean $\pm$ SD; (b) The cell viability inhibition rate of CSCs of MCF-7 and MDA-MB-231 cells treated by 5-FU with or without ABCB5 depletion. Student t-test, **, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$.

CSCs 在肿瘤的发生、发展和肿瘤耐药、复发中发挥重要作用^[17-19]。在乳腺癌细胞中,CD44⁺ 是 CSCs 的标志^[20-22]。我们通过对两种不同的乳腺癌细胞系 MCF-7 和 MDA-MB-231 的研究发现,经 5-FU 处理后,MCF-7 和 MDA-MB-231 中 CD44⁺ 的细胞亚群比例显著升高,且 CD44⁺ 的细胞亚群成球能力和对化疗药物 5-FU 的耐受性显著高于 CD44⁻ 的细胞亚群,提示化疗可富集 CSCs,且 CSCs 对 5-FU 天然耐药。

作为用于长期口服维持化疗的药物 5-FU 前体卡培他滨(Capecitabine),在体内经一系列酶作用变为 5-FU 进而在肿瘤细胞内发挥抗肿瘤作用^[23]。在乳腺癌治疗中,主要用于既往用过蒽环类和紫杉类的复发转移病人长期治疗^[24]。维持治疗的晚期病人无论复发或转移均已失去根治手术机会,体内存在不同数量的肿瘤负荷,其残留的肿瘤组织中富集有乳腺癌 CSCs^[25],而 CSCs 对化疗药 5-FU 的耐药是维持治疗失败的直接原因。

造成 CSCs 耐药的原因是多因素共同作用的,与肿瘤组织的微环境改变密切相关。肿瘤微环境包括基质细胞、免疫细胞及多种细胞因子等组分,不仅对肿瘤起支持作用,且与肿瘤耐药与复发密切相关^[26,27]。肿瘤基质是肿瘤微环境的重要组成部分,CAFs 是肿瘤基质细胞中最主要的细胞,可通过直接接触或旁分泌途径促进肿瘤的发生和发展^[28]。我们使用 CAFs 条件培养基上清处理 CSCs 后发现,CSCs 的成球能力和对 5-FU 的抵抗能力显著升高,提示 CAFs 对 CSCs 的调节作用可通过旁分泌途径实现。

旁分泌作用可经由外泌体介导而实现,外泌体(exosomes)是一种直径 30~100 nm 双层脂质膜包裹的小体,可来源于包括 CAFs 在内的多种肿瘤组织细胞并可将供体细胞中的核酸和蛋白质等成分传输到受体细胞,在细胞与细胞之间的通讯中发挥

重要作用^[29],肿瘤基质细胞分泌的外泌体可介导肿瘤细胞的化疗耐药^[30]。为此我们进一步从乳腺 CAFs 条件培养基上清中分离纯化了 CAFs 源性外泌体并与乳腺癌 CSCs 共培养,结果发现 CAFs 外泌体处理的 CSCs 成球能力和对化疗药物的耐药能力明显高于对照组,提示 CAFs 通过外泌体增强 CSCs 的自我更新能力并促进 CSCs 对化疗药物的抵抗。

我们之前的研究中发现外源性的 ABC 转运蛋白(ATP-binding cassette transporter,ABC transporter)来源的蛋白多肽片段与肿瘤增殖有相关性,其作为整体蛋白促进肿瘤生长而作为短的多肽片段则抑制肿瘤生长^[31,32],这提示某些 ABC 转运蛋白的异常表达可促进肿瘤细胞增殖。ABC 转运蛋白是一类大型跨膜蛋白,可通过 ATP 依赖的途径促进蛋白、脂类、药物和离子等物质的跨膜转运^[33-35]。因为 ABC 转运蛋白可以促进药物小分子向胞外排放,所以我们假设 CAFs 外泌体通过增强胞内药物的外排促进 CSCs 对 5-FU 的耐药。为了验证这一假设,我们选择 ABC 转运蛋白之一的 ABCB5 作为切入点。

ABCB5 是 ABC 转运蛋白家族中的成员之一。研究显示,ABCB5 在多种恶性肿瘤组织中高表达,且与多种肿瘤包括乳腺癌的化疗耐药相关^[36,37]。我们的研究结果显示:CAFs 外泌体可上调 CSCs 中 ABCB5 的表达水平,而抑制 CSCs 中 ABCB5 的表达可导致 5-FU 处理后 CSCs 的细胞增殖抑制率升高,提示 CAFs 通过外泌体诱导 CSCs 中 ABCB5 的表达从而促进 CSCs 耐药。

综上所述,本研究阐明了 CAFs 外泌体对乳腺癌肿瘤干细胞化疗耐药的促进作用;揭示了 CAFs 外泌体通过上调肿瘤细胞的 ABCB5 表达水平促进乳腺癌肿瘤干细胞对 5-FU 的化疗耐药性,以期外泌体介导的乳腺癌耐药的相关研究提供新的发现。

在本研究之外又引出一个关键问题,CAFs 源性外泌体促进 CSCs 中 ABCB5 的表达水平上调通过何种途径实现尚不明确。由 CAFs 外泌体成分通过何种物质介导接受细胞中 ABCB5 的表达水平变化尚不得而知。从外泌体的成分入手归为核酸、蛋白质和脂质三大类生物大分子。从对接受细胞的生理功能调控来看,相对于整个细胞而言,由少量的外源物质诱导接受细胞蛋白表达水平的明显变化,这一过程中显然存在放大效应。就目前已知的调控过程而言,外泌体外源性核酸是最主要的具放大效应的驱动因素^[38,39],而其中又依据片段长度可归为小 RNA(miRNA)和长非编码 RNA(lncRNA)两类。外泌体的内容物繁多且复杂,根据 ExoCarta 数据(<http://www.exocarta.org>),已经确定有 3873 种 miRNA 存在于不同组织和细胞来源的外泌体中^[40];而对于 lncRNA 而言,外泌体 lncRNA 目前主要的报道是作为肿瘤生物标记物的描述性研究,而对其功能和机制的研究尚在起步阶段^[41]。由以上分析可见,CAFs 外泌体促进接受细胞 ABCB5 表达上调可能的途径是通过 miRNA 或 lncRNA 介导,如需在此环节中阐明机制,需首先确定关键的 miRNA 或 lncRNA 分子。如同在海量的数据中找出有效的信息一样,分析外泌体中何种 RNA 分子促进 ABCB5 的表达必须用到高通量的分析手段诸如 RNA 芯片的 RNA 测序等。分析能够促进和不能够促进乳腺癌 CSCs 中 ABCB5 表达的外泌体 RNA 的成分差异,结合生物信息学分析,逐步缩小范围,再

通过实验来验证,最终鉴别出起关键作用的 RNA 分子,这正是我们下一步研究的计划之一。

参 考 文 献(References)

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(1): 7-30
- [2] Jung KW, Won YJ, Kong HJ, et al. Cancer Statistics in Korea: Incidence, Mortality, Survival, and Prevalence in 2015 [J]. *Cancer Res Treat*, 2018, 50(2): 303-316
- [3] Cebi A, Akgun E, Ozturk T, et al. Cancer Statistics in Giresun Province, Turkey: A 12-Years Retrospective Review [J]. *Gulf J Oncolog*, 2018, 1(26): 43-48
- [4] DeSantis CE, Ma J, Goding Sauer A, et al. Breast cancer statistics, 2017, racial disparity in mortality by state[J]. *CA Cancer J Clin*, 2017, 67(6): 439-448
- [5] Majidinia M, Yousefi B. Breast tumor stroma: A driving force in the development of resistance to therapies[J]. *Chem Biol Drug Des*, 2017, 89(3): 309-318
- [6] Santos JC, Ribeiro ML, Sarian LO, et al. Exosomes-mediate microRNAs transfer in breast cancer chemoresistance regulation [J]. *Am J Cancer Res*, 2016, 6(10): 2129-2139
- [7] Alferez DG, Simoes BM, Howell SJ, et al. The Role of Steroid Hormones in Breast and Effects on Cancer Stem Cells[J]. *Curr Stem Cell Rep*, 2018, 4(1): 81-94
- [8] Ramdass B, Duggal R, Minev B, et al. Functional role of solid tumor stem cells in disease etiology and susceptibility to therapeutic interventions[J]. *J Stem Cells*, 2013, 8(3-4): 189-231
- [9] Phi LTH, Sari IN, Yang YG, et al. Cancer Stem Cells (CSCs) in Drug Resistance and their Therapeutic Implications in Cancer Treatment[J]. *Stem Cells Int*, 2018, 2018: 5416923
- [10] Azzam DJ, Zhao D, Sun J, et al. Triple negative breast cancer initiating cell subsets differ in functional and molecular characteristics and in gamma-secretase inhibitor drug responses [J]. *EMBO Mol Med*, 2013, 5(10): 1502-1522
- [11] Horimoto Y, Arakawa A, Sasahara N, et al. Combination of Cancer Stem Cell Markers CD44 and CD24 Is Superior to ALDH1 as a Prognostic Indicator in Breast Cancer Patients with Distant Metastases[J]. *PLoS One*, 2016, 11(10): e0165253
- [12] Xu H, Tian Y, Yuan X, et al. Enrichment of CD44 in basal-type breast cancer correlates with EMT, cancer stem cell gene profile, and prognosis[J]. *Onco Targets Ther*, 2016, 9: 431-444
- [13] McCuaig R, Wu F, Dunn J, et al. The biological and clinical significance of stromal-epithelial interactions in breast cancer[J]. *Pathology*, 2017, 49(2): 133-140
- [14] Bussard KM, Mutkus L, Stumpf K, et al. Tumor-associated stromal cells as key contributors to the tumor microenvironment [J]. *Breast Cancer Res*, 2016, 18(1): 84
- [15] Maia J, Caja S, Strano Moraes MC, et al. Exosome-Based Cell-Cell Communication in the Tumor Microenvironment [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2018, 6: 18
- [16] Hu Y, Yan C, Mu L, et al. Fibroblast-Derived Exosomes Contribute to Chemoresistance through Priming Cancer Stem Cells in Colorectal Cancer[J]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0125625
- [17] Hainaut P, Plymoth A. Targeting the hallmarks of cancer: towards a rational approach to next-generation cancer therapy[J]. *Curr Opin Oncol*, 2013, 25(1): 50-51
- [18] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation [J]. *Cell*, 2011, 144(5): 646-674
- [19] Sin WC, Lim CL. Breast cancer stem cells-from origins to targeted therapy[J]. *Stem Cell Investig*, 2017, 4: 96
- [20] Colacino JA, Azizi E, Brooks MD, et al. Heterogeneity of Human Breast Stem and Progenitor Cells as Revealed by Transcriptional Profiling[J]. *Stem Cell Reports*, 2018, 10(5): 1596-1609
- [21] Li W, Ma H, Zhang J, et al. Unraveling the roles of CD44/CD24 and ALDH1 as cancer stem cell markers in tumorigenesis and metastasis [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 13856
- [22] Senbanjo LT, Chellaiah MA. CD44: A Multifunctional Cell Surface Adhesion Receptor Is a Regulator of Progression and Metastasis of Cancer Cells[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2017, 5: 18
- [23] Furukawa T, Tabata S, Yamamoto M, et al. Thymidine phosphorylase in cancer aggressiveness and chemoresistance [J]. *Pharmacol Res*, 2018, 132: 15-20
- [24] Takano T, Tsurutani J, Takahashi M, et al. A randomized phase II trial of trastuzumab plus capecitabine versus lapatinib plus capecitabine in patients with HER2-positive metastatic breast cancer previously treated with trastuzumab and taxanes: WJOG6110B/ELTOP[J]. *Breast*, 2018, 40: 67-75
- [25] Lee JS, Kim WG. Cutaneous metastases of breast cancer during adjuvant chemotherapy correlates with increasing CD44(+)/CD24(-) and ALDH-1 expression: a case report and literature review[J]. *Stem Cell Investig*, 2018, 5: 7
- [26] Tao L, Huang G, Wang R, et al. Cancer-associated fibroblasts treated with cisplatin facilitates chemoresistance of lung adenocarcinoma through IL-11/IL-11R/STAT3 signaling pathway[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 38408
- [27] Tsai MJ, Chang WA, Huang MS, et al. Tumor microenvironment: a new treatment target for cancer [J]. *ISRN Biochem*, 2014, 2014: 351959
- [28] Luo H, Tu G, Liu Z, et al. Cancer-associated fibroblasts: a multifaceted driver of breast cancer progression[J]. *Cancer Lett*, 2015, 361(2): 155-163
- [29] Boelens MC, Wu TJ, Nabat BY, et al. Exosome transfer from stromal to breast cancer cells regulates therapy resistance pathways [J]. *Cell*, 2014, 159(3): 499-513
- [30] Sharma A. Chemoresistance in cancer cells: exosomes as potential regulators of therapeutic tumor heterogeneity [J]. *Nanomedicine (Lond)*, 2017, 12(17): 2137-2148
- [31] Zhang Z, Luo Z, Min W, et al. An anti-cancer WxxxE-containing azurin polypeptide inhibits Rac1-dependent STAT3 and ERK/GSK-3beta signaling in breast cancer cells[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(26): 43091-43103
- [32] Hu X, Yu J, Zhou X, et al. A small GTPase-like protein fragment of Mycoplasma promotes tumor cell migration and proliferation in vitro via interaction with Rac1 and Stat3 [J]. *Mol Med Rep*, 2014, 9(1): 173-179

148-156

- [10] Marynissen T, Flore V, Heidbuchel H, et al. Heart rate turbulence predicts icd-resistant mortality in ischaemic heart disease [J]. *Europace*, 2014, 16: 1069-1077
- [11] Spinarova L, Spinar J, Vitovec J, et al. Gender differences in total cholesterol levels in patients with acute heart failure and its importance for short and long time prognosis[J]. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 2012, 156: 21-28
- [12] Danilowicz-Szymanowicz L, Suchecka J, Niemirycz-Makurat A, et al. Autonomic predictors of hospitalization due to heart failure decompensation in patients with left ventricular systolic dysfunction[J]. *PLoS One*, 2016, 11: e0152372
- [13] Adabag S, Patton KK, Buxton AE, et al. Association of Implantable Cardioverter Defibrillators With Survival in Patients With and Without Improved Ejection Fraction: Secondary Analysis of the Sudden Cardiac Death in Heart Failure Trial [J]. *JAMA Cardiol*, 2017, 2(7): 767-774
- [14] Liu X, Yu H, Pei J, et al. Clinical characteristics and long-term prognosis in patients with chronic heart failure and reduced ejection fraction in China[J]. *Heart Lung Circ*, 2014, 23(9): 818-826
- [15] Hamm W, Stülpnagel L, Vdovin N, et al. Risk prediction in post-infarction patients with moderately reduced left ventricular ejection fraction by combined assessment of the sympathetic and vagal cardiac autonomic nervous system[J]. *Int J Cardiol*, 2017, 249: 1-5
- [16] Fauchier L, Babuty D, Cosnay P, et al. Prognostic value of heart rate variability for sudden death and major arrhythmic events in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy [J]. *J Am Coll Cardiol*, 1999, 33: 1203-1207
- [17] Zipse MM, Tzou WS. Sudden cardiac death in nonischemic cardiomyopathy: Refining risk assessment[J]. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 2017, 28(11): 1361-1366
- [18] Lатарo RM, Silva LEV, Silva CAA, et al. Baroreflex control of renal sympathetic nerve activity in early heart failure assessed by the sequence method[J]. *J Physiol*, 2017, 595: 3319-3330
- [19] Eckberg DL, Drabinsky M, Braunwald E. Defective cardiac parasympathetic control in patients with heart disease[J]. *N Engl J Med*, 1971, 285: 877-883
- [20] Triposkiadis F, Karayannis G, Giamouzis G, et al. The sympathetic nervous system in heart failure physiology, pathophysiology, and clinical implications[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2009, 54: 1747-1762
- [21] Piacentino V 3rd, Weber CR, Chen X, et al. Cellular basis of abnormal calcium transients of failing human ventricular myocytes[J]. *Circ Res*, 2003, 92: 651-658
- [22] Olivetti G, Abbi R, Quaini F, et al. Apoptosis in the failing human heart[J]. *N Engl J Med*, 1997, 336: 1131-1141
- [23] Xia P, Liu Y, Cheng Z. Signaling pathways in cardiac myocyte apoptosis[J]. *Biomed Res Int*, 2016, 2016: 9583268
- [24] Shinohara K, Kishi T, Hirooka Y, et al. Circulating angiotensin ii deteriorates left ventricular function with sympathoexcitation via brain angiotensin ii receptor[J]. *Physiol Rep*, 2015, 3(8): e12514
- [25] Leenen FH. Brain mechanisms contributing to sympathetic hyperactivity and heart failure[J]. *Circ Res*, 2007, 101: 221-223
- [26] Karayannis G, Kitsios G, Kotidis H, et al. Left atrial remodelling contributes to the progression of asymptomatic left ventricular systolic dysfunction to chronic symptomatic heart failure [J]. *Heart Fail Rev*, 2008, 13: 91-98
- [27] Bronzwaer AGT, Bogert LWJ, Westerhof BE, et al. Abnormal haemodynamic postural response in patients with chronic heart failure [J]. *ESC Heart Fail*, 2017, 4: 146-153
- [28] Larsen HE, Lefkimmatis K, Paterson DJ. Sympathetic neurons are a powerful driver of myocyte function in cardiovascular disease [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 38898
- [29] Grassi G, Esler M. How to assess sympathetic activity in humans[J]. *J Hypertens*, 1999, 17: 719-734
- [30] Arsenos P, Manis G, Gatzoulis KA, et al. Deceleration Capacity of Heart Rate Predicts Arrhythmic and Total Mortality in Heart Failure Patients[J]. *Ann Noninvasive Electrophysiol*, 2016, 21(5): 508-518
- [31] Trankle C, Canada JM, Buckley L, et al. Impaired myocardial relaxation with exercise determines peak aerobic exercise capacity in heart failure with preserved ejection fraction [J]. *ESC Heart Fail*, 2017, 4(3): 351-355

(上接第 3641 页)

- [33] Kiss K, Kucsma N, Brozik A, et al. Role of the N-terminal transmembrane domain in the endo-lysosomal targeting and function of the human ABCB6 protein[J]. *Biochem J*, 2015, 467(1): 127-139
- [34] Kawanobe T, Kogure S, Nakamura S, et al. Expression of human ABCB5 confers resistance to taxanes and anthracyclines[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 418(4): 736-741
- [35] Huang Y, Anderle P, Bussey KJ, et al. Membrane transporters and channels: role of the transportome in cancer chemosensitivity and chemoresistance[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(12): 4294-4301
- [36] Frank NY, Margaryan A, Huang Y, et al. ABCB5-mediated doxorubicin transport and chemoresistance in human malignant melanoma [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(10): 4320-4333
- [37] Lal S, Mahajan A, Chen WN, et al. Pharmacogenetics of target genes across doxorubicin disposition pathway: a review [J]. *Curr Drug Metab*, 2010, 11(1): 115-128
- [38] Meldolesi J. Exosomes and Ectosomes in Intercellular Communication[J]. *Curr Biol*, 2018, 28(8): R435-R444
- [39] Bortoluzzi S, Lovisa F, Gaffo E, et al. Small RNAs in Circulating Exosomes of Cancer Patients: A Minireview[J]. *High Throughput*, 2017, 6(4)
- [40] Sinha A, Yadav AK, Chakraborty S, et al. Exosome-enclosed microRNAs in exhaled breath hold potential for biomarker discovery in patients with pulmonary diseases [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2013, 132(1): 219-222
- [41] Sun Z, Yang S, Zhou Q, et al. Emerging role of exosome-derived long non-coding RNAs in tumor microenvironment [J]. *Mol Cancer*, 2018, 17(1): 82