

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2023.01.004

❖ 基础研究 ❖

细胞外泌体蛋白 AGR2 表达差异与上皮性卵巢癌 获得性耐药关系及机制研究

曹阳¹, 谢鑫², 李明珠¹

(1. 中国医科大学肿瘤医院·辽宁省肿瘤医院; 2. 辽宁中医药大学, 辽宁 沈阳 110042)

【摘要】目的: 探讨细胞外泌体蛋白 AGR2 表达差异与上皮性卵巢癌获得性耐药的关系。**方法:** 用不同浓度顺铂(6、12、18、24 $\mu\text{g}/\text{mL}$)处理细胞,筛选出大鼠卵巢癌耐药细胞株,MTT 法检测细胞存活率。用超速差速离心法获得外泌体蛋白,纳米流式检测外泌体蛋白的粒径大小及颗粒浓度。通过 qRT-PCR 技术比较两组细胞系 AGR2 相关 mRNA 的转录情况,并通过 Western blot 实验对外泌体中 AGR2 蛋白表达水平进行比较,分析细胞外泌体中蛋白 AGR2 表达差异与上皮性卵巢癌获得性耐药的关系。**结果:** NUTU-19 肿瘤细胞生存率与化疗药浓度呈负相关;药物浓度的升高与耐药细胞株(NUTU-19R)死亡率相关性不明显。NUTU-19R 细胞株 AGR2 相关 mRNA 表达水平高于 NUTU-19 细胞株,差异有统计学意义($P < 0.05$);NUTU-19R 细胞株 AGR2 蛋白表达高于 NUTU-19 细胞株,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论:** 细胞外泌体蛋白 AGR2 高表达促进了上皮性卵巢癌获得性耐药的形成。

【关键词】 卵巢癌;外泌体;外泌体蛋白 AGR2;获得性耐药

【中图分类号】 R737.31 **【文献标志码】** A

Relationship between expression difference of cellular exosome protein AGR2 and acquired drug resistance in epithelial ovarian cancer and its mechanism

CAO Yang¹, XIE Xin², LI Ming-zhu¹

(1. Cancer Hospital of China Medical University · Liaoning Cancer Hospital; 2. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110042, Liaoning, China)

【Abstract】Objective: To explore the relationship between expression difference of cellular exosome protein AGR2 and acquired drug resistance in epithelial ovarian cancer. **Methods:** The cells culture in culture medium was conducted with cisplatin (6, 12, 18, 24 $\mu\text{g}/\text{mL}$) to screen out drug-resistant cell lines in rat with ovarian cancer. The survival rate of cells was detected by MTT assay. The exosome protein was obtained by ultrafast differential centrifugation method. The particle size and concentration of exosome protein were detected by nanometer flow cytometry. The transcription of AGR2-related mRNA in the two groups was compared by RT-PCR. The expression of AGR2 protein in exosome was compared by Western Blot to find out the relationship between expression difference of cellular exosome protein AGR2 and acquired drug resistance in epithelial ovarian cancer. **Results:** MTT assay showed that there was negative correlation between survival rate of tumor cells and the concentration of chemotherapy drugs in NUTU-19 cells. In contrast, the increase of drugs concentration was not proportional to cells death in drug-resistant cell line (NUTU-19R). AGR2-related mRNA in NUTU-19R cell line was higher than that in NUTU-19 cell line ($P < 0.05$), and the expression of AGR2 protein was higher than that in NUTU-19 cell line ($P < 0.05$). **Conclusion:** The high expression of cellular exosome protein AGR2 promotes the formation of acquired drug resistance in epithelial ovarian cancer.

【Key words】 Ovarian cancer; Exosome; Exocrine protein AGR2; Acquired drug resistance

卵巢癌是世界上第七大常见癌症,也是继乳腺癌和宫颈癌之后女性第三大常见癌症^[1-2]。虽然部分国家卵巢癌的死亡率呈下降趋势,但是近 20 年全球总体 5 年生存率无明显变化^[3-4],我国卵巢癌患

者 5 年生存率约为 30%^[1-2]。经过专业对症治疗,70% 的一线治疗达到完全缓解的卵巢癌患者 3 年内仍会复发,且随着治疗次数的增多,多药耐药等副作用也随之出现,导致患者缓解期或稳定期越来越短,

最终导致死亡^[5]。治疗中出现的获得性耐药与遗传突变、细胞凋亡切断、肿瘤增强修复和免疫系统抑制密切相关^[6]。目前,细胞减灭术结合化疗已成为卵巢癌标准治疗方法,最初一线药物化疗的有效率高达 65 ~ 80%,但约 50% 的患者最终产生耐药^[7]。目前,铂耐药是主要的卵巢癌治疗障碍。

外泌体为一类直径 30 ~ 150 nm 的脂质双层小膜泡,人体内几乎所有细胞都能产生外泌体,包括肿瘤细胞。分泌细胞将外泌体分泌到内环境中被受体细胞接受,从而影响受体细胞的生物学行为。前梯度蛋白 2 (recombinant anterior gradient protein 2, AGR2) 是一种细胞外泌性蛋白^[8-9],在多种癌症中呈高表达,可能与增强癌细胞的适应性有关^[10]。既往研究已验证了 AGR2 在癌症环境中的存在,但有关外泌体中的 AGR2 报道较少。本研究拟探讨 AGR2 表达水平对上皮性卵巢癌获得性耐药性的诊断价值。

1 材料与方法

1.1 实验材料

Dulbecco 改良鹰培养基 (Dulbecco's modified eagle medium, DMEM)、胎牛血清 (Hyclone);其他细胞培养所需基本试剂 (北京索莱宝科技有限公司)、PCR 试剂盒与 Western blot 试剂盒 (大连宝生物工程有限公司)。大鼠卵巢癌细胞 NUTU-19 购自上海沪峥。

1.2 实验仪器

紫外分光光度计 (T6 新世纪)、恒温干燥干箱、Real-time PCR 仪 (Bio-Rad)、光学显微镜 (奥林帕斯)、细胞培养箱 (Thermo)、高速冷冻离心机 (长沙湘仪,型号 TGL-20M)、制冰机 (日本三洋,型号 SIM-F140)、转膜仪 (Bio-Rad) 等。

1.3 卵巢癌细胞的培养

NUTU-19 细胞维持培养基为含 10% 胎牛血清的洛斯基·帕克纪念研究所 (Roswell Park Memorial Institute, RPMI) 1640 培养基环境,待细胞密度为 80% ~ 90%,去除原有培养基,无菌磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffered saline, PBS) 洗涤 3 ~ 5 次,并加入胰酶消化,使细胞呈单细胞悬液,再加入 10% 胎牛血清 + 90% 含 1.5 g/L NaHCO₃ 的 DMEM 培养基,移至细胞培养箱 (气相:95% 空气,5% CO₂, 37 °C) 中培养。细胞贴壁生长,上皮细胞样 (鼠卵巢癌细胞),1:3 传代,2 ~ 3 d 换培养液 1 次 (半量换液)。

1.4 耐药细胞株筛选与鉴定

耐药细胞株的造模过程:通过 6、12、18、24 μg/mL 递进式顺铂药物浓度加入到细胞培养基中,每次更高梯次浓度给药均要求于上一梯次药物浓度环境下细胞增殖平稳后再进行,顺铂浓度到达 24 μg/mL

就不再变化,持续同一浓度给药,培养细胞的耐药性。将筛选出的耐药细胞株 (NUTU-19R) 停止加入顺铂两个细胞培养周期 (约 1 周) 再进行后续试验,规避化疗药物干扰相关实验结果。MTT 法检测细胞的生存率:NUTU-19 细胞和耐药细胞株 (NUTU-19R) 以 5×10^3 个细胞/孔加样于 96 孔培养板内,培养基 100 μL 含有梯度浓度顺铂,培养 60 h,酶联免疫仪检测 490 nm 波长处吸光度值 (OD 值),勾画生存率曲线并分析。

1.5 外泌体提取和鉴定

细胞继续培养 72 h 获得上清液,采取差速离心法获得外泌体,300 r/min、4 °C 离心 10 min,获得上清液;2 000 r/min、4 °C 离心 10 min,取上清继续 10 000 r/min、4 °C 离心 30 min,获得上清液,滤掉细胞碎片和大体积囊泡;100 000 r/min 离心 30 min,获沉淀物,无菌 PBS 液冲洗,再次 100 000 r/min、4 °C 离心 90 min,获沉淀以 50 μL 无菌 PBS 重悬。纳米流式法检测外泌体的粒径大小及颗粒浓度。

1.6 实验指标

1.6.1 反转录-聚合酶链式反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 法检测细胞 AGR2 相关 mRNA 转录情况 细胞经处理后,清除培养基,把细胞放在冰面上,预冷消毒后的 PBS 液清洗 3 遍。经总 RNA 提取、变性、复性、延伸、电泳、拍照等步骤完成 PCR 实验。AGR2 引物序列:F5'-GTCAGCATTCTTGCTCCTTGT-3'; R5'-GGGTCGAGA GTCCTTTGTGTC-3'。

1.6.2 Western blot 法检测细胞外泌体 AGR2 蛋白表达情况 收集的外泌体经预冷消毒后的 PBS 处理后,经裂解、电泳、转膜、一抗孵育、二抗孵育、蛋白检测等步骤完成 Western blot 实验。

1.7 统计学分析

采用 SPSS17.0 软件进行统计分析。计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用独立样本 *t* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 耐药细胞株的筛选和鉴定

随着给药浓度的增加,细胞的密度逐渐降低,当药物浓度达到 24 μg/mL 并稳定一段时间,细胞密度也趋于稳定,此时得到 NUTU-19R。NUTU-19 细胞经过化疗药浓度的提高,其生存率降低,趋势清晰可见,即肿瘤细胞生存率与化疗药浓度之间关系呈负相关;但 NUTU-19R 在化疗药物浓度上升中生存率曲线没有较大的波动,即药物浓度的升高与细胞死亡率无相关性,表明细胞对药物敏感性较差,对化

疗药可能存在耐药性。NUTU-19R 的 OD 值为 (0.52 ± 0.15) , 高于 NUTU-19 的 OD 值为 (0.38 ± 0.05) ($t = 3.936, P < 0.05$)。见图 1 及表 1。



图 1 不同顺铂给药浓度镜下细胞密度

A. 6 $\mu\text{g/mL}$; B. 12 $\mu\text{g/mL}$; C. 18 $\mu\text{g/mL}$; D. 24 $\mu\text{g/mL}$ 。

表 1 NUTU-19 与 NUTU-19R 细胞株 OD 值 ($\bar{x} \pm s$)

DDP($\mu\text{g/mL}$)	0	10	20	40	60	100
NUTU-19	0.62 ± 0.05	0.45 ± 0.02	0.38 ± 0.02	0.32 ± 0.06	0.30 ± 0.01	0.19 ± 0.05
NUTU-19R	0.53 ± 0.04	0.53 ± 0.07	0.51 ± 0.06	0.56 ± 0.01	0.54 ± 0.02	0.41 ± 0.06

2.2 NUTU-19R 细胞株和 NUTU-19 细胞株细胞 AGR2 相关 mRNA 转录情况对比

NUTU-19R 细胞株细胞 AGR2 的 mRNA 为 (0.76 ± 0.09) , 高于 NUTU-19 细胞株细胞 AGR2 的 mRNA 为 (0.52 ± 0.08) , 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 2 及表 2。

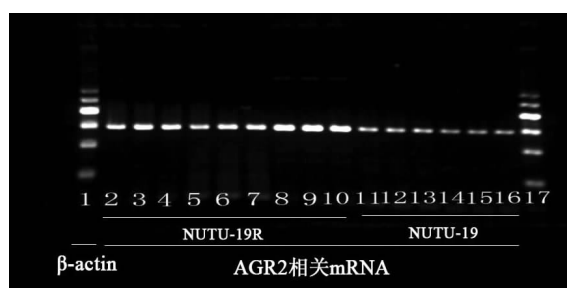


图 2 NUTU-19 与 NUTU-19R 细胞株 AGR2 RT-PCR 结果

2-10 条带为 NUTU-19R 细胞株; 11-16 条带为 NUTU-19 细胞株

2.3 NUTU-19R 细胞株和 NUTU-19 细胞株细胞 AGR2 蛋白表达水平对比

NUTU-19R 细胞株细胞 AGR2 蛋白表达相对水平为 (0.63 ± 0.06) , 高于 NUTU-19 细胞株细胞 AGR2 蛋白表达水平为 (0.51 ± 0.09) , 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2 及图 3。

表 2 NUTU-19 与 NUTU-19R 细胞株 AGR2 相关 mRNA 转录和蛋白表达情况对比 ($\bar{x} \pm s$)

细胞株 ($n = 10$)	RT-PCR	Western blot
NUTU-19	0.52 ± 0.08	0.51 ± 0.09
NUTU-19R	0.76 ± 0.09	0.63 ± 0.06
t 值	6.303	3.508
P 值	< 0.001	0.003

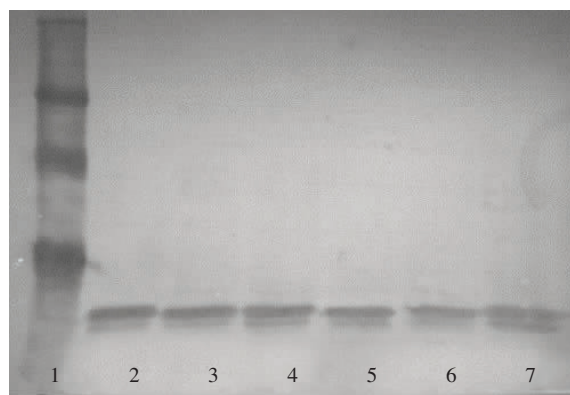


图 3 NUTU-19 与 NUTU-19R 细胞株 AGR2 蛋白 Western blot 结果

2-4 条带为 NUTU-19R 细胞株; 5-7 条带为 NUTU-19 细胞株。

3 讨论

卵巢癌是女性最致命的癌症之一, 化疗仍是常见的有效治疗方法, 但部分卵巢癌细胞对化疗药物产生耐药性, 导致临床常规药物失效。外泌体参与的细胞间信息传递有三种形式: 一种为外泌体膜蛋白能够和受体细胞膜结合并介导受体细胞信号通路; 第二种为细胞外环境中蛋白酶将外泌体膜蛋白剪切, 蛋白短链以配体形式和细胞膜受体结合并介导信号通路; 第三种外泌体膜能够和受体细胞膜类似于细胞内吞形式结合, 无差别吞入内容物^[11]。外泌体发挥的作用决定于其释放物种类, AGR2 最初在乳腺癌细胞中被发现^[12]。AGR2 定位于不同的细胞室, 如细胞质, 浆膜和细胞外环境^[8]。近年来, 越来越多的研究证实了 AGR2 存在于细胞外环境中, 特别是在癌症内环境中^[13]。

AGR2 可在多种实体肿瘤中表达, 如 AGR2 可促进膀胱癌的发生、发展, 检测膀胱癌组织 AGR2 表达有助于判断膀胱癌患者病情及评估预后^[14]; AGR2 通过上调 CCAAT 增强子结合蛋白 β 和转录因子缺氧诱导因子 2 α 亚基的表达, 从而影响细胞信号传导和代谢, 在肾透明细胞癌进展中发挥重要作用^[15]。本研究发现耐药细胞株细胞对药物不敏感, 更易对药物产生耐受性, 卵巢癌细胞在出现铂类耐药后, AGR2 相关 mRNA 转录增多, 蛋白表达上调。综上, AGR2 的表达与上皮性卵巢癌获得性耐药性密切相关, 细胞外泌体蛋白 AGR2 高表达促进了上皮性卵巢癌获得性耐药的形。

参考文献

- [1] Christie EL, Bowtell DDL. Acquired chemotherapy resistance in ovarian cancer[J]. *Annals of Oncology*, 2017, 28(8): 13-15.
- [2] Castellarin M, Milne K, Zeng T. Clonal evolution of high-grade se-

- rous ovarian carcinoma from primary to recurrent disease[J]. Journal of Pathology, 2013, 229(4):515-524.
- [3] Ricciardelli C, Lokman NA, Pyragius CE. Keratin 5 overexpression is associated with serous ovarian cancer recurrence and chemotherapy resistance[J]. Oncotarget, 2017, 8(11):17819-17832.
- [4] Pavla B, Samuel RM, Matthew JC. TP53 oncomorphic mutations predict resistance to platinum and taxane based standard chemotherapy in patients diagnosed with advanced serous ovarian carcinoma[J]. International Journal of Oncology, 2015, 46(2):607-618.
- [5] 何玲玲, 孙亮亮, 俞晓云, 等. 外泌体与卵巢癌耐药及治疗的关系研究进展[J]. 河北医药, 2021, 43(13):2045-2049.
- [6] Alison EF, Jessica AB, Elizabeth LC. Mechanisms of drug resistance in high-grade serous ovarian cancer[J]. Hematology-Oncology Clinics North America, 2018, 32(6):983-996.
- [7] Sandra Muñoz-Galván, Amancio C. Targeting cancer stem cells to overcome therapy resistance in ovarian cancer[J]. Cells, 2020, 9(6):1402-1403.
- [8] Nurshahirah AM, Nisa SAR. Secretion of pro-oncogenic AGR2 protein in cancer[J]. Heliyon, 2020, 6(9):e05000.
- [9] Katrin T, Carolina G, Sang BL. Loss of ER retention motif of AGR2 can impact mTORC signaling and promote cancer metastasis[J]. Oncogene, 2019, 38(16):3003-3018.
- [10] Frederic D, Amal N, Delphine F. The role of protein disulphide isomerase AGR2 in the tumour niche[J]. Biol Cell, 2018, 110(12):271-282.
- [11] 郭梦玲, 李燕伶, 王巧丽, 等. 外泌体源性 lnc RNA 与肿瘤的研究进展[J]. 国际遗传学杂志, 2021, 44(1):32-39.
- [12] Kyoungsook P, Yong JC, HyeKyung S. AGR2, a mucinous ovarian cancer marker, promotes cell proliferation and migration[J]. Experimental and Molecular Medicine, 2011, 43(2):91-100.
- [13] Delphine F, Jacques R, Cecile H. The Anterior Gradient (AGR) family proteins in epithelial ovarian cancer[J]. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 2021, 40(1):271.
- [14] 李峰, 冯宇鹏, 连学雄, 等. 膀胱癌组织前梯度蛋白 2 表达变化及其临床意义[J]. 山东医药, 2018, 58(20):60-62.
- [15] Pajdzik K, Wilamowski M, Żurawek D, et al. Anterior gradient 2 promotes tumorigenesis through upregulation of CCAAT-enhancer binding protein beta and hypoxia-inducible factor-2 α and subsequent secretion of interleukin-6, interleukin-8, and vascular endothelial growth factor in the Caki-1 clear cell renal cell carcinoma cell line[J]. IUBMB Life, 2020, 72(8):1807-1818.
- (收稿日期:2022-10-09 修回日期:2022-11-11)

(上接第 14 页)

- [3] Plebani M, Basso D, Navaglia F, et al. Is CA242 really a new tumour marker for pancreatic adenocarcinoma[J]. Oncology, 1995, 52:19-23.
- [4] Dou H, Sun G, Zhang L. CA242 as a biomarker for pancreatic cancer and other diseases[J]. Progress in Molecular Biol and Translational Science, 2019, 162:229-239.
- [5] Dong D, Li J, Lufang Z, et al. Periostin and CA242 as potential diagnostic serum biomarkers complementing CA19.9 in detecting pancreatic cancer[J]. Cancer Science, 2018, 109:2841-2851.
- [6] Burz C, Aziz BY, Bcescu L, et al. Tumor markers used in monitoring the tumor recurrence in patients with colorectal cancer[J]. Clujul Medical, 2016, 89(3):378-383.
- [7] Lei F, Jia SZ, Ye J, et al. Application values of detection of serum CA199, CA242 and CA50 in the diagnosis of pancreatic cancer[J]. Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents, 2017, 31(2):383-388.
- [8] 贺琰雯, 邹雅如, 鲁琼, 等. 环境温度对 Luminex 流式荧光免疫分析法测定糖类抗原 242 结果的影响[J]. 第二军医大学学报, 2019, 40(7):759-762.
- [9] 沈惠, 张能华, 邱丽娜, 等. 基于蛋白芯片技术联合检测血清肿瘤标志物在肺癌诊断中的应用研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2019, 29(12):1424-1426, 1430.
- [10] 满霞, 郑进. 国产全自动化学发光测定仪检测糖类抗原 242 和糖类抗原 50 的分析性能验证[J]. 标记免疫分析与临床, 2019, 26(7):1214-1218.
- [11] 邵仟仟, 林国乐. 2017. V1 版《NCCN 结直肠癌诊治指南》更新解读(纳入标准)[J]. 中国全科医学, 2017, 20(6):635-638.
- [12] National Committee for Clinical Laboratory Standards. Evaluation of precision performance of quantitative measurement methods; approved guideline second edition: EP-5A2[M]. Wayne, PA, USA: NCCLS, 2005.
- [13] 毕波, 吕元. 定量检测方法学性能验证的系统设计[J]. 中华检验医学杂志, 2007, 30(2):143-145.
- [14] 向张强, 杨茜, 倪来超, 等. 18F-脱氧葡萄糖 PET/CT 联合胰腺肿瘤标志物在诊断早期可切除胰腺癌术后复发转移中的应用价值[J]. 重庆医科大学学报, 2019, 44(11):1469-1473.
- [15] Zhang Y, Yang J, Li H, et al. Tumor markers CA19-9, CA242 and CEA in the diagnosis of pancreatic cancer: a meta-analysis[J]. International Journal of Clinical and Experimental Medicine, 2015, 8(7):11683-11691.
- [16] Nilsson O, Johansson C, Glimelius B, et al. Sensitivity and specificity of CA242 in gastro-intestinal cancer, A comparison with CEA, CA50 and CA 19-9[J]. Cancer, 1992, 65:215-221.
- [17] Fan B, Xiong B. Investigation of serum tumor markers in the diagnosis of gastric cancer[J]. Hepato-gastroenterology, 2016, 58(105):239-243.
- [18] 汤方俊, 孙波, 陈明, 等. 肿瘤标志物联合检测对 156 例肺癌诊断价值分析[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2019, 26(17):1284-1287.
- [19] 朱耀毅. 2019 年中国体外诊断行业报告[R]. 北京: 全国卫生产业企业管理协会医学检验产业分会, 2020.
- (收稿日期:2022-04-02 修回日期:2022-05-06)