

• 论 著 • DOI:10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2023. 20. 002

巨噬细胞来源的外泌体对弥漫大 B 细胞淋巴瘤增殖、迁移、侵袭和凋亡的影响^{*}

韩 笑,王雪莲[△]

复旦大学附属中山医院青浦分院血液科,上海 201700

摘 要:目的 探讨巨噬细胞来源的外泌体对弥漫大 B 细胞淋巴瘤(DLBCL)增殖、迁移、侵袭和凋亡的影响。**方法** 构建体外巨噬细胞极化模型;提取外泌体,以加外泌体的 DLBCL 细胞作为外泌体组,以未加外泌体的 DLBCL 细胞作为对照组;采用透射电镜检测外泌体形态;采用纳米颗粒跟踪分析技术检测外泌体粒径与水平;采用免疫荧光法检测外泌体传递;采用 CCK-8 法检测人 DLBCL 细胞系 U2932 细胞增殖;采用细胞划痕试验检测 U2932 细胞迁移;采用 Transwell 法检测 U2932 细胞侵袭;采用流式细胞术检测 U2932 细胞凋亡。**结果** 外泌体水平为 $(5.27 \pm 0.36) \times 10^{10}$ particles/mL,平均粒径为 121.69 nm,单峰,呈正态分布,直径 50~150 nm,其密度约为 (1.15 ± 0.03) g/mL。与对照组比较,外泌体组在人 DLBCL 细胞和巨噬细胞株 RAW264.7 细胞中的传递均明显增多,差异均有统计学意义($P < 0.05$);外泌体组人 DLBCL 细胞系 U2932 细胞增殖、迁移和侵袭能力均明显高于对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$);外泌体组人 DLBCL 细胞系 U2932 细胞凋亡能力明显低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 巨噬细胞来源的外泌体可以促进人 DLBCL 细胞系 U2932 细胞的增殖、迁移和侵袭,并抑制其凋亡,为进一步研究巨噬细胞来源外泌体在人 DLBCL 发生和发展中的相关机制提供了一定的理论基础。

关键词:巨噬细胞; 外泌体; 弥漫大 B 细胞淋巴瘤; 增殖; 迁移; 侵袭; 凋亡
中图法分类号:R733.4;R730.3 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2023)20-2950-05

Effect of macrophage-derived exosomes on proliferation, migration, invasion, and apoptosis of diffuse large B-cell lymphoma^{*}

HAN Xiao, WANG Xuelian[△]

Department of Hematology, Department of Hematology, Qingpu Branch of Zhongshan Hospital Affiliated to Fudan University, Shanghai, 201700, China

Abstract: **Objective** To investigate the effects of macrophage-derived exosomes on proliferation, migration, invasion and apoptosis of diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). **Methods** An in vitro macrophage polarization model was established. Exosomes were extracted, and DLBCL cells with exosomes were selected as exosome group, LBCL cells without exosomes were selected as control group. Transmission electron microscopy was used to detect the morphology of exosomes. Nanoparticle tracking analysis was used to detect the particle size and levels of exosomes. The proliferation of human DLBCL cell line U2932 was detected by CCK-8 method. DLBCL cells with exosomes were used as exosome group, and DLBCL cells without exosomes were used as control group. The migration of U2932 cells was detected by cell scratch test. Transwell assay was used to detect the invasion of U2932 cells. The apoptosis of U2932 cells was detected by flow cytometry. **Results** The levels of exosomes was $(5.27 \pm 0.36) \times 10^{10}$ particles/mL, the average size was 121.69 nm, the diameter was 50—150 nm, and the density was (1.15 ± 0.03) g/mL. Compared with control group, the transmission of exosomes in human DLBCL cells and macrophage cell line RAW264.7 cells was significantly increased, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). The proliferation, migration and invasion abilities of human DLBCL cell line U2932 cells in exosome group were significantly higher than those in control group ($P < 0.05$). The apoptosis ability of human DLBCL cell line U2932 in exosome group was significantly lower than that in control group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Macrophage-derived exosomes can promote the proliferation, migration and invasion of human DLBCL cell line U2932, and inhibit its apoptosis, which provides a theoretical basis for further study on the mechanism of macrophage-de-

^{*} 基金项目:上海市青浦区科技发展基金项目(QKY:2020-21)。
作者简介:韩笑,女,医师,主要从事淋巴瘤、白血病的临床与基础研究。 [△] 通信作者,E-mail:455940152@qq.com。
网络首发 <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1167.R.20230911.1121.002.html>(2023-09-12)

rived exosomes in the occurrence and development of human DLBCL.

Key words: macrophage; exosome; diffuse large B-cell lymphoma; proliferation; migration; invasion; apoptosis

弥漫大 B 细胞淋巴瘤(DLBCL)是非霍奇金淋巴瘤中最为常见的一种类型,每年约有 15 万例新发病例,约占所有非霍奇金淋巴瘤的 30%,DLBCL 具有高度侵袭性,发病后可累及全身多个脏器。目前,利妥昔单抗、环磷酰胺、多柔比星、长春新碱、泼尼松方案已经成为治疗 DLBCL 的标准一线化疗方案,大大提高了患者的生存率,由于该病异质性大,仍有近 1/3 的患者容易复发或者产生耐药性。在过去的几十年里,基于临床病理学特征的预后因子,包括 AnnArbor 分期、国际预后指数 (IPI) 等被广泛应用于评价 DLBCL 患者的预后,然而, IPI 和治疗方案一致的患者却有着不同的预后^[1]。外泌体是由多种细胞分泌的小细胞外囊泡,在人体体液中广泛分布,不同组织来源的外泌体携带的核酸、蛋白质和脂质也不完全相同。目前,关于外泌体的研究主要集中在肿瘤血管生成、免疫、肿瘤微环境等方面,与肿瘤的发生、发展、侵袭和转移有一定相关性^[2]。肿瘤细胞来源的外泌体具有调控巨噬细胞的功能,反之,巨噬细胞来源的外泌体亦具有调控肿瘤细胞生物学行为的作用;肿瘤细胞与肿瘤相关巨噬细胞(TAM)可以通过与外泌体互相作用,在肿瘤的增殖、侵袭、转移等方面发挥重要作用。目前有研究主要集中在肝癌、肺癌、前列腺癌和卵巢癌等^[3],而巨噬细胞来源的外泌体对 DLBCL 的影响及机制尚不清楚,探寻新的 DLBCL 疾病预后标志物及机制可为深入研究 DLBCL 的发病机制及防治提供新思路。本研究主要探讨巨噬细胞来源的外泌体对人 DLBCL 细胞系 U2932 细胞生物学行为的影响,为进一步研究 DLBCL 的发病机制提供新的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料 巨噬细胞株(RAW264.7 细胞)、人 DLBCL 细胞系 U2932 细胞均购自中国科学院上海细胞库。

1.2 主要试剂 RPMI1640 购自美国 Corning 公司;青/链霉素购自美国 Gibco 公司;Dil 染料购自北京索莱宝科技公司;CCK-8 试剂盒、结晶紫染液均购自上海碧云天生物科技有限公司;外泌体染色滤柱购自上海碧云天生物科技有限公司;人源重组巨噬细胞集落刺激因子购自美国 ThermoFisher 公司;胎牛血清购自天根生化科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 体外巨噬细胞极化模型构建 将 RAW264.7 细胞株用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基,置于 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱内培养,当 RAW264.7 细胞株达到 2×10^6 /mL 时,将细胞悬液放入离心管中离心处理,当细胞状态良好且悬浮细胞总量达 10^7 个时,接

种于 12 孔板中,用白细胞介素(IL)-4 和 IL-13 慢病毒表达载体感染细胞,12 h 后去上清液,更换培养基,72 h 后在培养液中加入嘌呤霉素($1 \mu\text{g/mL}$)继续培养 7 d,在药物筛选下最后存活的细胞为稳定株,即为 M2 型巨噬细胞,然后收集用于后续试验。

1.3.2 外泌体提取 取标本 15 mL 放入离心管中,加入磷酸盐缓冲液(PBS),配平后以 $300 \times g$ 、4℃ 离心 10 min,取上清液转移到新的 15 mL 离心管中,配平后以 $2\,000 \times g$ 、4℃ 离心 10 min,转移至超速离心机配套的离心管中,配平所收集的超速离心机配套离心管中的上清液后以 $10\,000 \times g$ 、4℃ 离心 30 min,取上清液转移至超速离心机配套的离心管中;配平所收集的超速离心机配套离心管中的上清液后以 $100\,000 \times g$ 、4℃ 离心 70 min,取透明沉淀,并用 250、150 μL 的 PBS 重悬,所得即为外泌体溶液,按检测要求分装后于 -80℃ 冰箱保存待检。

1.3.3 透射电镜检测外泌体形态 将 50 μL 外泌体标本滴在 200 目的铜网上,室温下孵育 5 min,然后用滤纸吸去铜网边缘多余的液体,接着用 1% 磷钨酸负染色 1 min,用蒸馏水冲洗铜网 1~2 次,再用滤纸吸去多余的液体,干燥后,用 TEM-1400plus 透射电镜在 80 kV 下观察铜网。

1.3.4 纳米颗粒跟踪分析技术(NTA)检测外泌体水平和粒径 将外泌体标本的水平用 PBS 稀释,采用 ZetaViewPMX110 仪器进行检测,并用 ZetaView 8.04.02 软件进行数据分析。

1.3.5 免疫荧光法检测外泌体传递 将适量 Dil 染料加入外泌体中,避光染色 20 min,经外泌体染色滤柱去除多余的染料。以加外泌体的人 DLBCL 细胞作为外泌体组,以未加外泌体的人 DLBCL 细胞作为对照组,处理后的外泌体加入 DLBCL 细胞中培养,在 37℃ 培养箱中培养 24 h 后,用 4% 甲醛固定并采用荧光显微镜观察两组人 DLBCL 细胞和 RAW264.7 细胞中的荧光强度。

1.3.6 CCK-8 法检测 U2932 细胞增殖 取人 DLBCL 细胞与 M2 型巨噬细胞来源的外泌体共孵育 24 h 后取计数板,进行细胞计数,将 1.5×10^4 个/孔接种于 96 孔板中,以加外泌体的人 DLBCL 细胞作为外泌体组,以未加外泌体的人 DLBCL 细胞作为对照组,每组设置为 5 个复孔,将细胞放入培养箱中培养,分别在每孔 0、24、48、72 h 加入 10 μL CCK 溶液,孵育 2 h,采用酶标仪于 450 nm 处测定吸光度(A)值。

1.3.7 细胞划痕试验检测 U2932 细胞迁移 取人 DLBCL 细胞与 M2 型巨噬细胞来源的外泌体共孵育 24 h 后计数,接种于 6 孔板中,在直尺辅助下,采用枪头划直线, PBS 清洗,培养 48 h。以加外泌体的人

DLBCL 细胞作为外泌体组,以未加外泌体的 DLBCL 细胞作为对照组,显微镜下观察 6 孔板中 U2932 细胞划痕,分别在 0、48 h 的时间点内随机选择 3 个视野拍照,计算迁移率。

1.3.8 Transwell 法检测 U2932 细胞侵袭 取人 DLBCL 细胞与 M2 型巨噬细胞来源的外泌体共孵育 24 h 后计数,取 2×10^5 个 DLBCL 细胞均匀平铺到 8 μm PET 小室中,并加入 200 μL 不含胎牛血清(FBS)的培养基,将小室放置于 24 孔板中,下室加入 600 μL 含 FBS 的培养基,然后置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 18 h,随后将小室取出并用 PBS 清洗,用棉签小心将小室内的细胞擦掉,PBS 洗 3 次,接着将小室浸没于 4%甲醛中固定 20 min,固定后室温晾干并放于结晶紫染液中 10 min,PBS 冲洗 3 次后使用显微镜观察并计数,以加外泌体的人 DLBCL 细胞作为外泌体组,以未加外泌体的 DLBCL 细胞作为对照。

1.3.9 流式细胞术检测 U2932 细胞凋亡 取人 DLBCL 细胞与 M2 型巨噬细胞来源的外泌体共孵育接种于培养皿中。以加外泌体的人 DLBCL 细胞作为外泌体组,以未加外泌体的 DLBCL 细胞作为对照组。采用离子水将 $10 \times \text{BindingBuffer}$ 稀释成 $1 \times \text{BindingBuffer}$ 后,将各组以 1 200 r/min 离心 5 min,PBS 重

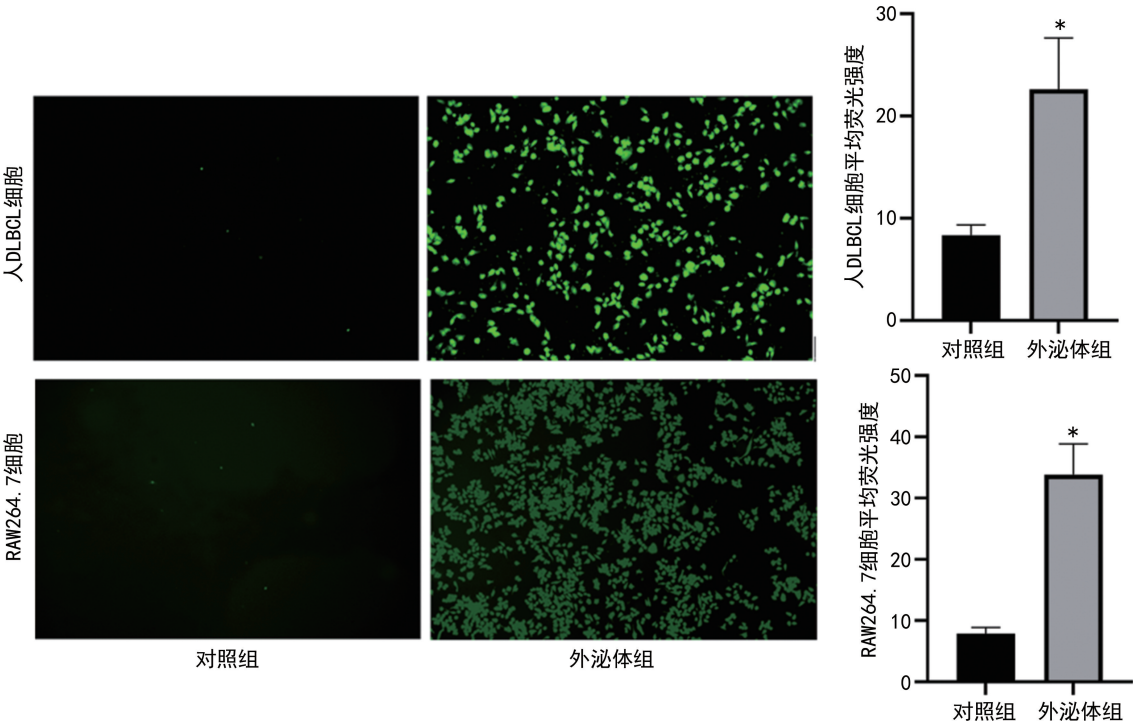
悬,1 200 r/min 离心 5 min,重悬细胞,离心后加入 BindingBuffer 和 AnnexinV-FITC 混匀,孵育 15 min,采用流式细胞仪检测。

1.4 统计学处理 采用 GraphPadPrism9 进行数据分析处理。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两样本均数比较采用 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 外泌体浓度和粒径 通过透射电镜检测发现,所得的外泌体呈圆形,具有比较明显的膜结构。NTA 检测结果显示,外泌体水平为 $(5.27 \pm 0.36) \times 10^{10}$ particles/mL,平均粒径为 121.69 nm,单峰,呈正态分布,直径 50~150 nm,其密度约为 $(1.15 \pm 0.03)\text{g/mL}$ 。

2.2 外泌体传递 免疫荧光法检测结果显示,外泌体组在人 DLBCL 细胞和 RAW264.7 细胞中的荧光强度分别为 22.78 ± 5.42 和 32.96 ± 4.93 ,对照组人 DLBCL 细胞和 RAW264.7 细胞中的荧光强度分别为 9.03 ± 1.46 和 8.97 ± 1.35 ,与对照组比较,外泌体组在人 DLBCL 细胞和巨噬细胞株 RAW264.7 细胞中的传递均明显增多,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见图 1。



注:与对照组比较,* $P < 0.05$ 。

图 1 两组人 DLBCL 细胞和 RAW264.7 细胞外泌体传递情况

2.3 人 DLBCL 细胞系 U2932 细胞增殖能力 CCK-8 法检测结果显示,外泌体组在 0、24、48、72 h 的 A 值分别为 0.44 ± 0.07 、 0.63 ± 0.13 、 0.87 ± 0.21 、 0.96 ± 0.19 ,对照组分别为 0.42 ± 0.05 、 0.49 ± 0.08 、 0.53 ± 0.11 、 0.61 ± 0.15 ,外泌体组人 DLBCL 细胞系 U2932 细胞增殖能力均明显高于对照组,差异

均有统计学意义($P < 0.05$)。见图 2。

2.4 人 DLBCL 细胞系 U2932 细胞迁移和侵袭能力 细胞划痕试验和 Transwell 法检测结果显示,外泌体组人 DLBCL 细胞系 U2932 细胞迁移率为 $(78.92 \pm 11.45)\%$,细胞侵袭个数为 (218.54 ± 30.57) 个;对照组人 DLBCL 细胞系 U2932 细胞迁移率为 $(47.32 \pm 8.19)\%$,

细胞侵袭个数为 (89.21 ± 13.84) 个。外泌体组细胞迁移率和细胞侵袭个数均明显高于对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见图 3。

2.5 人 DLBCL 细胞系 U2932 细胞凋亡能力 流式细胞术检测结果显示,外泌体组凋亡率为 $(4.87 \pm 1.07)\%$,对照组为 $(13.16 \pm 4.63)\%$,外泌体组凋亡率明显低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 4。

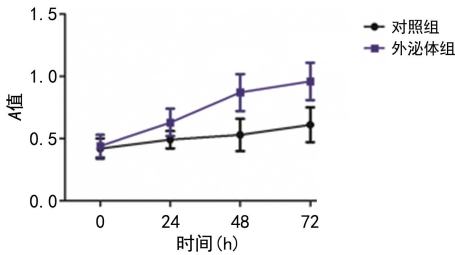
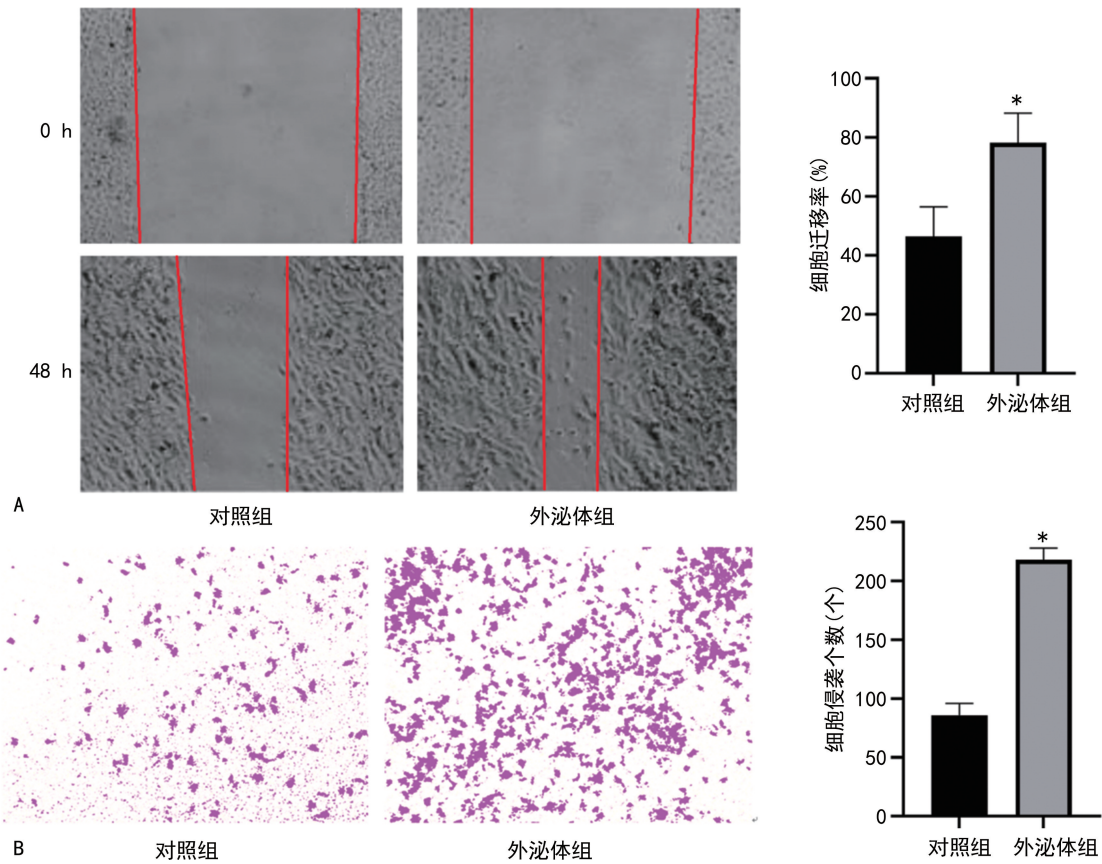
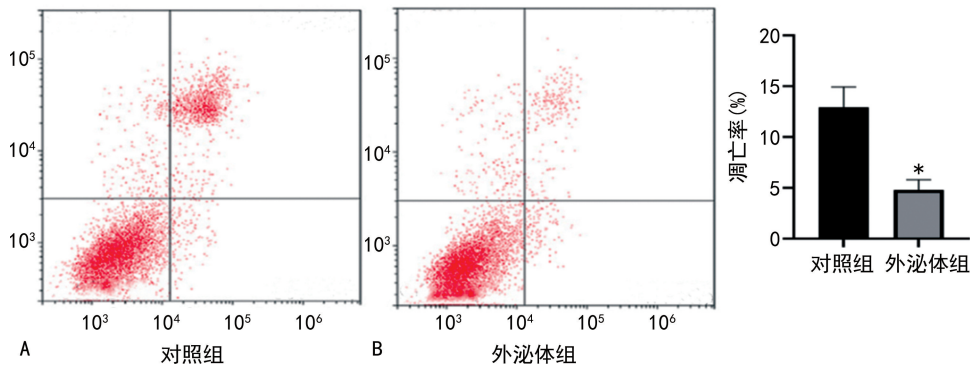


图 2 两组人 DLBCL 细胞系 U2932 细胞增殖能力比较



注:A 为细胞迁移;B 为细胞侵袭;与对照组比较,* $P < 0.05$ 。

图 3 两组人 DLBCL 细胞系 U2932 细胞迁移和侵袭能力



注:A 为对照组细胞凋亡;B 为外泌体组细胞凋亡。与对照组比较,* $P < 0.05$ 。

图 4 两组人 DLBCL 细胞系 U2932 细胞凋亡能力

3 讨 论

DLBCL 是淋巴瘤中侵袭性较强的一类,无论是在生物学特征还是在临床上均具有很大的异质性^[4]。尽管以抗 CD20 的 Rituximab 为代表的治疗使 DL-

BCL 患者的生存得到明显改善,但是仍有部分患者完全缓解后容易在疾病早期复发或者出现耐药,对患者预后的预测仍然困难^[5]。外泌体属于细胞外囊泡,起源于细胞内的多泡内体,通过内向出芽作用,并包裹

特异分选的核酸、蛋白、脂质等生物大分子产生多个管腔囊泡,外泌体随体液流动到达靶细胞,发挥其相应的生物学作用。巨噬细胞是一群具有高度可塑性的细胞,是固有免疫系统的重要组成部分,根据环境的变化,巨噬细胞可以快速作出反映,表现出不同的表型和功能,在肿瘤的发生和发展中发挥重要作用。M1 型巨噬细胞一般被认为具有抗肿瘤作用,而 M2 型巨噬细胞通常被认为是肿瘤相关巨噬细胞,可以通过血管生成和淋巴管生成调节、免疫抑制、缺氧诱导等促进肿瘤发生、增殖、转移^[6]。巨噬细胞来源的外泌体参与很多重要的病理、生理过程。XU 等^[7]通过研究发现,肿瘤相关巨噬细胞来源的外泌体通过将 lncMMPA 转移至肿瘤细胞并激活糖酵解途径促进肝细胞癌的恶性发展;WEI 等^[8]研究发现,M2 型巨噬细胞来源的外泌体通过传递 miR-942 促进肺腺癌进展。人们也越来越关注肿瘤或巨噬细胞来源的外泌体的基本特征及其之间的相互作用关系,这些外泌体会导致治疗期间的癌症进展和耐药性,及其潜在的临床应用前景。目前,关于巨噬细胞来源的外泌体在 DLBCL 中的作用和机制尚不明确,因此,揭示巨噬细胞来源的外泌体与 DLBCL 发病之间的关系,探讨巨噬细胞来源的外泌体对 DLBCL 细胞生物学行为的影响及相关发病机制就显得非常重要。

本研究采用超速离心法提取外泌体,得到 50~150 nm 大小的囊泡,分离囊泡的纯度较好。同时采用免疫荧光法检测外泌体的传递情况,结果显示,外泌体组在人 DLBCL 细胞和巨噬细胞株 RAW264.7 细胞中的传递均明显增多。为了验证 M2 型巨噬细胞来源的外泌体在人 DLBCL 细胞中增殖、侵袭、迁移和凋亡的作用,本研究让人 DLBCL 细胞与 M2 型巨噬细胞来源的外泌体共孵育 24 h,以未加外泌体的人 DLBCL 细胞作为对照,通过各项试验研究结果表明,加入外泌体的人 DLBCL 细胞系 U2932 细胞增殖、迁移、侵袭能力均明显高于对照组,而凋亡能力明显低于对照组。上述结果表明,M2 型巨噬细胞来源的外泌体具有调控人 DLBCL 细胞系 U2932 细胞的生物学功能,能够促进人 DLBCL 细胞系 U2932 细胞的增殖、迁移和侵袭,抑制其凋亡。癌症的进展与免疫细胞活性的失调密切相关,肿瘤相关外泌体被认为是癌症和免疫细胞之间交换物质的媒介,M2 型肿瘤相关巨噬细胞具有促进肿瘤进展的功能。LING 等^[9]研究发现,DLBCL 分泌的外泌体可以诱导巨噬细胞转化为肿瘤 M2 样表型,并且阻断药物诱导的 DLBCL 细胞凋亡,不同 DLBCL 衍生的外泌体可以通过 STAT3 信号改变巨噬细胞的表型,STAT3 信号上调致癌基因和 M2 样表型巨噬细胞经典标志物的表达,DLBCL 衍生的外泌体可以促使巨噬细胞极化为促生长的 M2 样表型的表达。此外,LIU 等^[10]研究发现,从 DLBCL 释放的细胞外囊泡增强了巨噬细胞的 M2 极化效应,

DLBCL 衍生的细胞外囊泡通过增加 PGC-1 β 蛋白的表达来调节巨噬细胞的代谢,重编程促进肿瘤进展的巨噬细胞表型,从而促进肿瘤进展。LIU 等^[10]研究表明,DLBCL 释放的外泌体促进巨噬细胞极化成 M2 型,M2 型巨噬细胞释放的外泌体又进一步促进 DLBCL 进展,也进一步印证了本研究的结论,即 M2 型巨噬细胞来源的外泌体能够促进人 DLBCL 细胞系 U2932 细胞的增殖、迁移和侵袭,抑制其凋亡。

综上所述,巨噬细胞来源的外泌体能够促进人 DLBCL 细胞系 U2932 细胞的增殖、迁移和侵袭,抑制其凋亡。本研究未进行巨噬细胞来源的外泌体对人 DLBCL 细胞系 U2932 细胞促进作用的具体机制研究,但通过对 DLBCL 生物学行为的观察,为进一步研究巨噬细胞来源的外泌体在 DLBCL 发生和发展中的相关机制提供了一定的理论基础。

参考文献

- [1] SEHN L H, SALLES G. Diffuse large B-cell Lymphoma [J]. N Engl J Med, 2021, 384(9): 842-858.
- [2] ZHOU Y, ZHANG Y, GONG H, et al. The role of exosomes and their applications in cancer [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(22): 12204.
- [3] BAIG M S, ROY A, RAJPOOT S, et al. Tumor-derived exosomes in the regulation of macrophage polarization [J]. Inflamm Res, 2020, 69(5): 435-451.
- [4] HU J, XU J, YU M, et al. An integrated prognosis model of pharmacogenomic gene signature and clinical information for diffuse large B-cell lymphoma patients following CHOP-like chemotherapy [J]. J Transl Med, 2020, 18(1): 144-148.
- [5] WANG L, LI L R. R-CHOP resistance in diffuse large B-cell lymphoma: biological and molecular mechanisms [J]. Chin Med J (Engl), 2020, 134(3): 253-260.
- [6] BOUTILIER A J, ELSAWA S F. Macrophage polarization states in the tumor microenvironment [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(13): 6995.
- [7] XU M, ZHOU C, WENG J, et al. Tumor associated macrophages-derived exosomes facilitate hepatocellular carcinoma malignance by transferring lncMMPA to tumor cells and activating glycolysis pathway [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2022, 41(1): 253.
- [8] WEI K, MA Z, YANG F, et al. M2 macrophage-derived exosomes promote lung adenocarcinoma progression by delivering miR-942 [J]. Cancer Lett, 2022, 526: 205-216.
- [9] LING H Y, YANG Z, WANG P J, et al. Diffuse large B-cell lymphoma-derived exosomes push macrophage polarization toward M2 phenotype via GP130/STAT3 signaling pathway [J]. Chem Biol Interact, 2022, 352: 109779.
- [10] LIU W, ZHU M, WANG H, et al. Diffuse large B cell lymphoma-derived extracellular vesicles educate macrophages to promote tumours progression by increasing PGC-1 β [J]. Scand J Immunol, 2020, 91(2): e12841.