

DOI: 10.16305/j.1007-1334.2026.z20250606001

食道通结方对食管癌来源外泌体 LncRNA ZFAS1 诱导人血管内皮细胞血管生成的影响

蔡霄月¹, 王 慧², 周亚宁¹, 郭毅峻¹, 张洲姬¹, 张 铭¹

1. 上海交通大学医学院附属胸科医院中西医结合科(上海 200030); 2. 上海交通大学医学院研究生院(上海 200025)

【摘要】 目的 探讨食道通结方对人食管癌 Eca-109 细胞来源外泌体诱导人脐静脉内皮细胞(HUVECs)血管生成的影响。**方法** 20 只雄性 SD 大鼠, 随机分为食道通结方含药血清组和空白鼠血清组, 每组 10 只, 分别以 51.3 g/kg 食道通结方及等体积 0.9% 氯化钠溶液灌胃, 制备含药血清。分别以 20% 无外泌体空白血清、20% 食道通结方含药血清(体积分数)处理 Eca-109 细胞; 以超速离心法分别提取 Eca-109 细胞来源外泌体(Eca-109 外泌体), 以及经食道通结方含药血清处理的 Eca-109 细胞来源外泌体(食道通结方外泌体); 采用电镜、纳米颗粒跟踪分析(NTA)法、Western blot 法鉴定外泌体, 实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应(RT-qPCR)检测外泌体长链非编码 RNA 锌指结构反义转录本 1(LncRNA ZFAS1)的表达。将外泌体与 HUVECs 共培养, 免疫荧光染色法观察外泌体被 HUVECs 摄取的情况。5-乙炔基-2'-脱氧尿苷(EdU)细胞增殖、血管形成实验观察外泌体对 HUVECs 血管生成的影响, RT-qPCR 检测 HUVECs 中 LncRNA ZFAS1、血管内皮生长因子 A(VEGFA)mRNA 的表达, Western blot 法检测 HUVECs 中 VEGFA 蛋白的表达。**结果** 电镜、NTA 及 Western blot 法检测分化簇 63(CD63)、肿瘤易感基因 101 蛋白(TSG101)、钙联蛋白(Calnexin)的结果表明, 两组提取物均鉴定为外泌体。荧光显微镜下观察到两组外泌体均被 HUVECs 摄取。食道通结方可降低 Eca-109 细胞来源外泌体 LncRNA ZFAS1 的表达($P<0.01$)。与空白对照组比较, Eca-109 细胞外泌体能诱导 HUVECs 的增殖、显著增加成管($P<0.05$, $P<0.01$), LncRNA ZFAS1、VEGFA mRNA 及 VEGFA 蛋白的表达显著上调($P<0.05$); 而食道通结方能显著降低 Eca-109 细胞外泌体诱导 HUVECs 增殖、成管的能力($P<0.05$, $P<0.01$), 使 HUVECs 中 LncRNA ZFAS1、VEGFA mRNA 及 VEGFA 蛋白的表达显著下调($P<0.05$)。**结论** Eca-109 细胞来源外泌体 LncRNA ZFAS1 可诱导 HUVECs 血管形成, 食道通结方可能通过降低 Eca-109 细胞来源外泌体 LncRNA ZFAS1 的表达, 下调 HUVECs 中 LncRNA ZFAS1、VEGFA 的表达, 抑制 HUVECs 增殖、成管的能力, 从而起到拮抗食管癌肿瘤血管新生的作用。**【关键词】** 食管癌; 食道通结方; 外泌体; 血管内皮生长因子; 肿瘤血管生成; 中药研究

Effect of Shidao Tongjie Formula on esophageal cancer cell-derived exosomal LncRNA ZFAS1 induced angiogenesis in human vascular endothelial cells

CAI Xiaoyue¹, WANG Hui², ZHOU Yaning¹, GUO Yijun¹, ZHANG Zhouji¹, ZHANG Ming¹

1. Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Shanghai Chest Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, 200030, China; 2. Graduate School, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, 200025, China

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82104953); 国家中医药管理局重大疑难疾病中西医临床协作项目(ZDYN-2024-A-147)
[作者简介] 蔡霄月, 女, 博士, 主要从事中西医结合诊治胸部恶性肿瘤的临床及实验研究工作
[通信作者] 张铭, 主任医师, 博士研究生导师;
E-mail: gason2000@126.com

Abstract: Objective To explore the effect of Shidao Tongjie Formula on angiogenesis of HUVECs induced by exosomes derived from Eca-109 esophageal cancer cells. **Methods** Twenty male SD rats were randomly divided into the Shidao Tongjie Formula drug serum group and the blank serum group, with 10 rats in each group. Two groups of rats

were respectively administered 51.3 g/kg of the Shidao Tongjie Formula and the same volume of 0.9% sodium chloride solution by gavage to prepare the drug serum. Eca-109 cells were treated with 20% exosome-free blank serum or 20% Shidao Tongjie Formula drug serum (volume fraction). The exosomes derived from Eca-109 cells (Eca-109 exosomes) as well as the exosomes derived from Eca-109 cells that had been treated with the Shidao Tongjie Formula drug serum (Shidao Tongjie Formula exosomes) were isolated by ultracentrifugation method. The exosomes were identified by electron microscopy, nanoparticle tracking analysis (NTA) and Western blot. Real-time fluorescence quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR) was used to detect the expression of long non-coding RNA zinc finger structure antisense transcript 1 (LncRNA ZFAS1) in exosomes. Exosomes were co-cultured with HUVECs, and the uptake of exosomes by HUVECs was observed using immunofluorescence staining. The effect on the angiogenesis of HUVECs was evaluated by 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) and tube formation assays. LncRNA ZFAS1 and Vascular endothelial growth factor A (VEGFA) mRNA in HUVECs were measured by RT-qPCR, and VEGFA protein in HUVECs was determined by Western blot. **Results** The results of electron microscopy, NTA and Western blot for the marker proteins of differentiation cluster 63 (CD63), tumor susceptibility gene 101 (TSG101), and calnexin indicated that both groups of extracts were identified as exosomes. It was observed that both groups of exosomes were taken up by HUVECs under fluorescence microscope. The expression of LncRNA ZFAS1 in Eca-109 cell derived exosomes was significantly decreased by Shidao Tongjie Formula ($P<0.01$). Compared with the control group, the proliferation and tube formation of HUVECs induced by Eca-109 cells derived exosomes were significantly promoted ($P<0.05$, $P<0.01$), and the expressions of LncRNA ZFAS1, VEGFA mRNA and VEGFA protein in HUVECs cells were significantly upregulated ($P<0.05$). While Shidao Tongjie Formula could significantly reduce the ability of Eca-109 cells derived exosomes to induce the proliferation and tube formation of HUVECs ($P<0.05$, $P<0.01$), and significantly downregulate the expressions of LncRNA ZFAS1, VEGFA mRNA and VEGFA protein in HUVECs cells ($P<0.05$). **Conclusions** Eca-109 cells derived exosomal LncRNA ZFAS1 can promote angiogenesis in HUVECs. Shidao Tongjie Formula may inhibit esophageal cancer angiogenesis by reducing Eca-109 cells derived exosomal LncRNA ZFAS1 expression, downregulating LncRNA ZFAS1 and VEGFA expression in HUVECs, and suppressing HUVECs proliferation and tube formation.

Keywords: esophageal cancer; Shidao Tongjie Formula; exosome; vascular endothelial growth factor; tumor angiogenesis; Chinese materia medica research

我国是食管癌发病大国,90%以上病例的病理类型为鳞癌。2022年相关监测数据显示,我国食管癌新发22.40万例,病死18.75万例,表明我国食管癌的疾病负担仍较重^[1-2]。外泌体是细胞分泌的膜性囊泡,作为细胞间信息传递交流的载体,携带蛋白质、脂质、核酸等活性物质,在肿瘤生长、侵袭转移及血管新生等病理过程中发挥重要作用。锌指结构反义转录本1(ZFAS1)是一种长链非编码RNA(LncRNA),在结直肠癌、胃癌、非小细胞肺癌、食管癌等多种恶性肿瘤组织中高表达,与不良预后密切相关^[3]。研究^[4]发现,食管鳞癌(ESCC)细胞(供体细胞)通过外泌体将ZFAS1传递到周围癌细胞(受体细胞),外泌体携带ZFAS1可促进ESCC细胞增殖、迁移和侵袭,但目前有关外泌体ZFAS1参与食管癌肿瘤血管新生的机制研究较少。

食道通结方是上海交通大学医学院附属胸科医院中西医结合科基于长期临床实践,以“健脾化痰”法为中医治则制定的治疗食管癌的协定方。前期临床研究^[5-7]表明食道通结方联合化学疗法(简称“化疗”)能延长中晚期ESCC术后患者的无病生存期,提高中晚期食管癌化疗的近期疗效,改善患者

的生活质量,延长生存时间。实验研究^[8]表明,食道通结方协同顺铂具有抑制人食管癌裸鼠皮下移植瘤微血管生成的作用。本研究拟从肿瘤来源外泌体角度,观察食管癌来源外泌体对人血管内皮细胞成管的影响及食道通结方的干预作用,以期对食道通结方拮抗食管癌肿瘤血管新生的作用机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞与动物 人食管癌上皮细胞Het-1A,食管癌细胞EC9706、Eca-109、TE-1,人脐静脉内皮细胞(HUVECs),均购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。

SPF级雄性SD大鼠20只,体质量180~220 g,购自上海斯莱克实验动物有限公司。动物生产许可证号:SCXK(沪)2022-0004;动物使用许可证号:SYXK(沪)2020-0009。实验动物饲养于上海交通大学医学院附属胸科医院SPF级动物实验室,温度24~26℃,湿度45%~65%,昼夜12 h/12 h明暗交替,自由饮水和摄食。本研究涉及动物的实验方案均经上海交通大学医学院附属胸科医院实验动物伦

理委员会批准[伦理审批号:KS(Y)21025]。

1.1.2 药物与试剂 食道通结方由党参 15 g、急性子 15 g、壁虎 9 g、石见穿 30 g、制天南星 15 g、诃子 15 g、枸橘 15 g(批号分别为 20231224-1、20231007-1、20231230-1、20231211-1、20231223-1、20231209-1、20230806-1)组成,均购于上海交通大学医学院附属胸科医院中药房。上述饮片加入 10 倍量水,浸泡 30 min,煎煮 1 h;滤渣后再加入 8 倍量水,煎煮 40 min;将 2 次药液混匀,浓缩至生药 2.6 g/mL,4 ℃ 保存备用。

胎牛血清、RPMI 1640 培养基、DMEM 培养基(批号分别为 10099141、8121680、11320033),美国 Gibco 公司;无外泌体血清(批号:EXO-FBS-50A-1),美国 System Biosciences 公司;细胞膜染色试剂盒(PKH26)(批号:410E513876),美国 Sigma 公司;细胞活力检测试剂盒(CCK-8)、5-乙炔基-2'-脱氧尿苷(EdU)细胞增殖检测试剂盒(批号分别为 C0037、C0071S),上海碧云天生物技术有限公司;分化簇 63(CD63)、肿瘤易感基因 101 蛋白(TSG101)、钙联蛋白(Calnexin)、血管内皮生长因子 A(VEGFA)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体及辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔二抗(批号分别为 ab134045、ab125011、ab265603、ab51745、ab128915、ab205718),英国 Abcam 公司;二辛可酸(BCA)蛋白浓度检测试剂盒、聚偏二氟乙烯(PVDF)膜、TRIzol 总 RNA 提取试剂盒(批号分别为 A55860、88518、15596018),美国 Thermo Fisher Scientific 公司;逆转录试剂盒、TB Green 实时荧光定量 PCR 试剂盒(批号分别为 AJ60795A、RR4208),日本 Takara 公司。

1.1.3 主要仪器 细胞培养箱(型号:3141),美国 Thermo Fisher Scientific 公司;超速离心机(型号:Optima XPN-100 型),美国 Beckman Coulter 公司;纳米颗粒跟踪分析仪(型号:ZetaView 型),德国 Particle Metrix 公司;透射电镜(型号:HT7800 型),日本 Hitachi 公司;激光共聚焦显微镜(型号:LEXT OLS5100 型),日本 Olympus 公司;倒置相差荧光显微镜(型号:CKX53 型),日本 Olympus 公司;化学发光成像系统(型号:Chemi DocMP 型),美国 Bio-Rad 公司;电泳仪(型号:PowerPac Universal 型),美国 Bio-Rad 公司;转膜仪(型号:Mini Trans-Blot 型),美国 Bio-Rad 公司;实时荧光定量 PCR 仪(型号:7500 Fast 型),美国 Applied Biosystems 公司。

1.2 细胞培养 人食管上皮细胞 Het-1A 及食管癌

细胞 EC9706、Eca-109、TE-1 采用含体积分数 10% 胎牛血清、1% 青-链霉素的 RPMI 1640 培养基, HUVECs 采用含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,以上细胞均置于 37 ℃、体积分数 5%CO₂ 培养箱培养。

1.3 HUVECs 分组与干预 HUVECs 分为 4 组,分别进行相应干预:空白对照组,将体积分数 20% 无外泌体血清加入 HUVECs 中进行细胞培养;Eca-109 外泌体组,将体积分数 20% 无外泌体血清处理 Eca-109 细胞后,提取获得的外泌体加入 HUVECs 中进行外泌体-HUVECs 共培养;空白鼠血清外泌体组,将 20% 无外泌体空白鼠血清处理 Eca-109 细胞后提取获得的外泌体加入 HUVECs 中进行外泌体-HUVECs 共培养;食道通结方外泌体组,将 20% 无外泌体食道通结方含药血清处理 Eca-109 细胞后,提取获得的外泌体加入 HUVECs 中进行外泌体-HUVECs 共培养。

1.4 无外泌体含药血清制备 20 只雄性 SD 大鼠,体质量约 200 g,随机分为空白鼠血清组和食道通结方含药血清组,每组 10 只。食道通结方含药血清组以 51.3 g/kg(参考临床成人用量换算成大鼠用量的 5 倍剂量)灌胃,空白鼠血清组给予等体积 0.9% 氯化钠溶液,灌胃给药体积 10 mL/kg,每日 2 次,连续 3 d。于末次给药 1 h 后,以戊巴比妥钠麻醉大鼠,腹主动脉取血,血液样本室温静置 4 h 后,离心取血清,4 ℃、300 r/min 离心 10 min,取上清;4 ℃、2 000 r/min 离心 20 min,取上清;4 ℃、12 000 r/min 离心 30 min,取上清;4 ℃、100 000 r/min 离心 360 min,收集上清,即为去除外泌体的含药血清,56 ℃ 灭活 30 min,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过除菌后,分别获得空白血清和含药血清,-20 ℃ 保存备用。

1.5 Eca-109 细胞来源外泌体的提取与鉴定

1.5.1 细胞上清外泌体的提取 Eca-109 细胞分别经 20% 无外泌体血清或 20% 无外泌体食道通结方含药血清处理 48 h 后,收集 Eca-109 细胞上清,参照相关文献^[9-10],采用超速离心法提取外泌体。4 ℃ 环境下,300 r/min 离心 10 min,取上清;以 2 000 r/min 离心 20 min,取上清;再以超速离心机以 10 000 r/min 离心 30 min,取上清;然后以 10 000 r/min 离心 90 min,弃上清,留取沉淀,以无菌磷酸盐缓冲液(PBS)重悬,混匀后再以 10 000 r/min 离心 90 min,弃上清,最后予无菌 PBS 溶液 500 μL 重悬沉淀,即获得外泌体混悬液,以 BCA 法定量,-80 ℃ 保存。

1.5.2 外泌体电镜鉴定 用 200 μL 含 2% 多聚甲醛溶液重悬外泌体,抽取 20 μL 滴于载样铜网上,加入 2% 戊二醛溶液固定后,于铜网上加入 3% 磷钨酸溶液 10 μL ,室温下染色 5 min,滤纸吸去多余染液,用蒸馏水清洗铜网 4 次,室温下干燥后,采用透射电镜观察外泌体形态。

1.5.3 NTA 分析外泌体粒径及分布 以 1 mL PBS 重悬外泌体,通过粒径分析仪实时对悬浮液中直径 50~1 000 nm 的外泌体及囊泡进行逐一观察成像,通过软件分析外泌体的粒径和分布情况。

1.5.4 Western blot 法检测外泌体表面标记蛋白 采用放射性免疫沉淀分析缓冲液(RIPA)提取外泌体的总蛋白,BCA 法定量后调整蛋白浓度,采用 12% 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离,每孔加入外泌体 5 μg ,电转移至 PVDF 膜,分别加入稀释后的 CD63、TSG101、Calnexin 单克隆抗体(稀释比例均为 1:1 000),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗(稀释比例均为 1:10 000),洗脱后底物化学发光(ECL)显影,采用化学发光成像仪拍照,使用 ImageJ 软件分析各条带灰度值。

1.5.5 免疫荧光法检测 HUVECs 摄取外泌体的情况 以 PKH26 染料标记外泌体。1 mL 外泌体悬液(2×10^6 mol/L)加入 1 mL PKH26 染料孵育 3 min,加入等体积血清孵育 1 min 终止反应,用 PBS 漂洗 3 次。将上述 PKH26 标记的外泌体重悬于培养基,加入培养 HUVECs 的 24 孔板中共孵育 24 h 后,PBS 漂洗 5 min $\times$ 3 次,4% 多聚甲醛溶液固定 1~5 min,10% 4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)染核 10 min,PBS 漂洗 5 min $\times$ 3 次。封片,共聚焦荧光显微镜观察 HUVECs 对外泌体的摄取情况,采集图像进行分析。

1.6 HUVECs 的增殖、成管情况

1.6.1 EdU 细胞增殖实验 收集 HUVECs,调整细胞浓度,以 2×10^4 个/孔接种于 96 孔板培养,按实验分组处理 HUVECs,每组 6 个复孔,作用 24 h 后,加入 50 $\mu\text{mol/L}$ EdU 的 DMEM 培养基孵育 2 h。根据试剂盒进行细胞固定,DNA 染色,显微镜下观察,每孔随机选择 3 个视野,采集图像,计算染色细胞核占相应总细胞的百分比。

1.6.2 血管形成实验 将 Matrigel 胶按 50 μL /孔加入预冷的 24 孔板中,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 45 min。按实验分组处理 HUVECs 24 h 后,分别将各组 HUVECs 以 5×10^4 个/孔加入 24 孔板,每组设 3 个复孔,培养 8 h

后,显微镜下观察,采集分析图像。

1.7 实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应(RT-qPCR)法检测相关基因的表达 采用 RT-qPCR 检测 Eca-109 细胞来源外泌体 LncRNA ZFAS1 的表达及 HUVECs 中 LncRNA ZFAS1、VEGFA mRNA 的表达。取按“1.3”分组,不同 Eca-109 细胞来源外泌体及与其共培养 48 h 的 HUVECs,用 TRIzol 试剂提取 Eca-109 细胞来源外泌体及 HUVECs 内总 RNA,按逆转录试剂盒说明书逆转录成 cDNA,引物由生工生物工程(上海)有限公司合成,引物序列见表 1。反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,40 个循环。实验重复 3 次。以 GAPDH 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算目的基因相对表达量。

表 1 引物序列表

基因	引物序列	产物长度/ bp
LncRNA ZFAS1	上游:5'-CGGGCCTGGACAACACTACTA-3'	123
	下游:5'-AAGATGGCTTTTCGCACCT-3'	
VEGFA	上游:5'-AGGGCAGAATCATCACGAAGT-3'	118
	下游:5'-AGGGTCTCGATTGGATGGCA-3'	
GAPDH	上游:5'-GCTGAGAACGGGAAGCTTGT-3'	195
	下游:5'-GCCAGGGTGCTAAGCAAGT-3'	

注:LncRNA ZFAS1 为长链非编码 RNA 锌指结构反义转录本 1, VEGFA 为血管内皮生长因子 A 基因,GAPDH 为甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因。

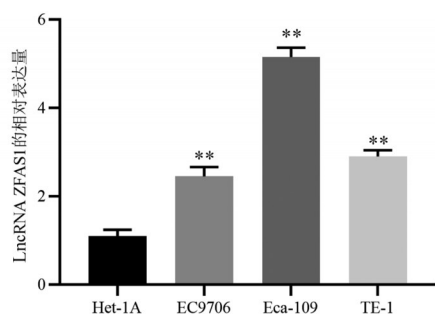
1.8 Western blot 法检测 HUVECs 的 VEGFA 蛋白表达 裂解法提取总蛋白,BCA 法测定蛋白含量,调节浓度。10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白,使用半干法转膜,分别以兔抗人 VEGFA 和 GAPDH 单克隆抗体为一抗(1:1 000 稀释),HRP 标记的山羊抗兔 IgG 为二抗(1:1 000 稀释),室温摇床孵育 1 h,含吐温-20 的 Tris-HCl 溶液(TBST)洗涤 10 min $\times$ 3 次,ECL 发光显影,采用化学发光成像仪拍照。使用 ImageJ 软件分析各条带灰度值。

1.9 统计学方法 使用 SPSS 21.0 软件进行数据分析,计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间均数比较采用 t 检验或 ANOVA 方差分析。以 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 不同细胞株中 LncRNA ZFAS1 的表达 食管癌细胞株 EC9706、Eca-109、TE-1 的 LncRNA ZFAS1 的表达水平显著高于正常人食管上皮细胞 Het-1A ($P<0.01$),且 Eca-109 细胞 LncRNA ZFAS1 的表达水

平最高(图1),故选用Eca-109细胞为食管癌细胞来源外泌体的提取对象。



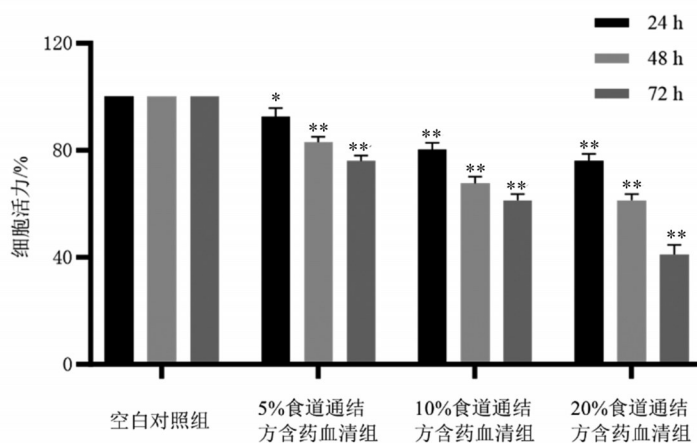
注:与Het-1A细胞比较,** $P<0.01$; $n=3, \bar{x} \pm s$ 。

图1 lncRNA ZFAS1在不同食管癌细胞中的表达比较

2.2 含药血清浓度筛选 与空白对照组比较,各浓

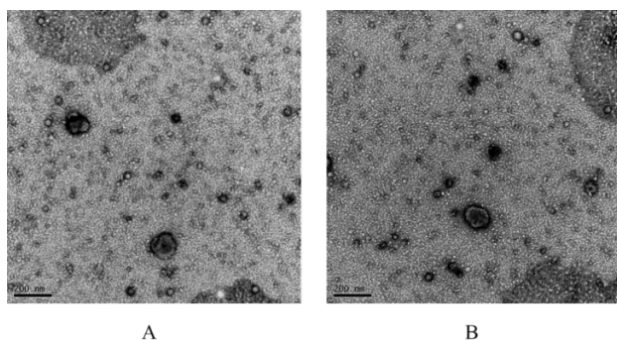
度食道通结方含药血清组Eca-109细胞存活率明显下降($P<0.05, P<0.01$)。干预48 h后,20%食道通结方含药血清组Eca-109细胞存活率接近50%,故将20%食道通结方含药血清浓度作为最佳浓度进行后续实验。见图2。

2.3 外泌体鉴定 电镜下观察无外泌体血清干预后的Eca-109细胞来源外泌体(Eca-109外泌体)及食道通结方含药血清干预后Eca-109细胞上清提取的外泌体(食道通结方外泌体),两者形态均呈茶托样特征(图3),粒径分布在50~200 nm之间(图4),平均粒径分别为13 nm及145.3 nm。Western blot法结果显示,两组的外泌体标记蛋白CD63、TSG101均呈阳性表达,Calnexin呈阴性表达(图5)。以上结果表明,两组细胞上清提取分离所得均为外泌体。



注:与空白对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$; $n=3, \bar{x} \pm s$ 。

图2 不同浓度食道通结方含药血清在不同时点对Eca-109细胞活力的影响



注:A为Eca-109细胞来源外泌体组,B为食道通结方外泌体组。

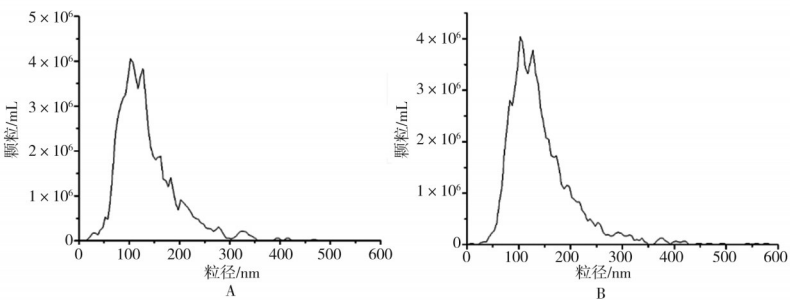
图3 Eca-109细胞上清来源外泌体的形态($\times 1000$)

2.4 HUVECs对外泌体的摄取情况 PKH26标记的两组外泌体分别与HUVECs共培养48 h后,荧光显微镜下观察到HUVECs的细胞质中出现红色荧光标记的外泌体,表明HUVECs可以摄取Eca-109外泌体及食道通结方外泌体。见图6。

采用RT-qPCR法检测各组外泌体中lncRNA ZFAS1的表达水平。与Eca-109外泌体组和空白鼠血清外泌体组比较,食道通结方外泌体组外泌体中lncRNA ZFAS1的表达水平明显降低($P<0.01$)。见图7。

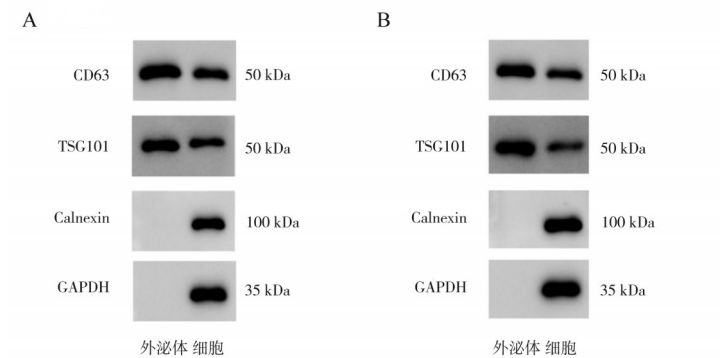
2.5 外泌体对HUVECs增殖、成管的影响 结果表明,与空白对照组比较,Eca-109外泌体能显著促进HUVECs增殖、成管的表型($P<0.05, P<0.01$),而食道通结方外泌体能使HUVECs增殖、成管的能力明显受抑制($P<0.05, P<0.01$)。见图8。

2.6 外泌体对HUVECs中lncRNA ZFAS1、VEGFA mRNA表达的影响 与空白对照组比较,Eca-109外泌体组HUVECs中lncRNA ZFAS1、VEGFA mRNA的表达水平均显著升高($P<0.05$);与Eca-109外泌体组比较,食道通结方外泌体组HUVECs中lncRNA



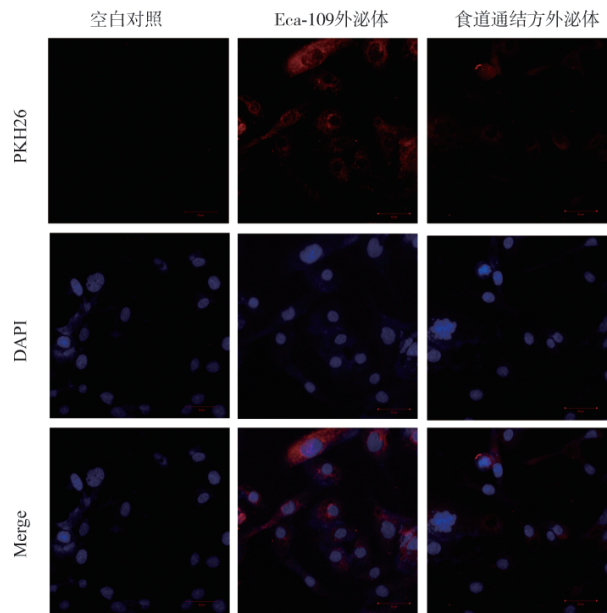
注:A为Eca-109外泌体,B为食道通结方外泌体。

图4 Eca-109细胞上清来源外泌体的粒径分布



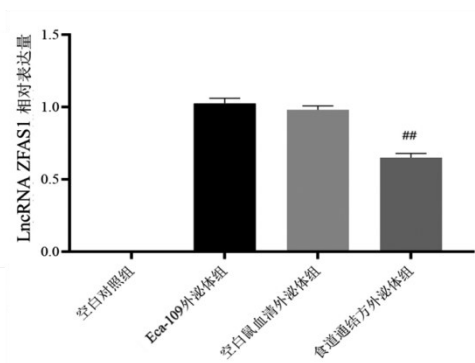
注:A为Eca-109外泌体的鉴定,B为食道通结方含药血清干预后外泌体的鉴定。CD63为分化簇63,TSG101为肿瘤易感基因101蛋白,Calnexin为钙联蛋白,GAPDH为甘油醛-3-磷酸脱氢酶

图5 Eca-109细胞上清来源外泌体标志蛋白的表达(Western blot法)



注:PKH26表示荧光标记的外泌体,4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)表示荧光标记的细胞核,Merge为融合成像。

图6 各组人脐静脉内皮细胞(HUVECs)对外泌体的摄取情况(PKH26染色,×200)

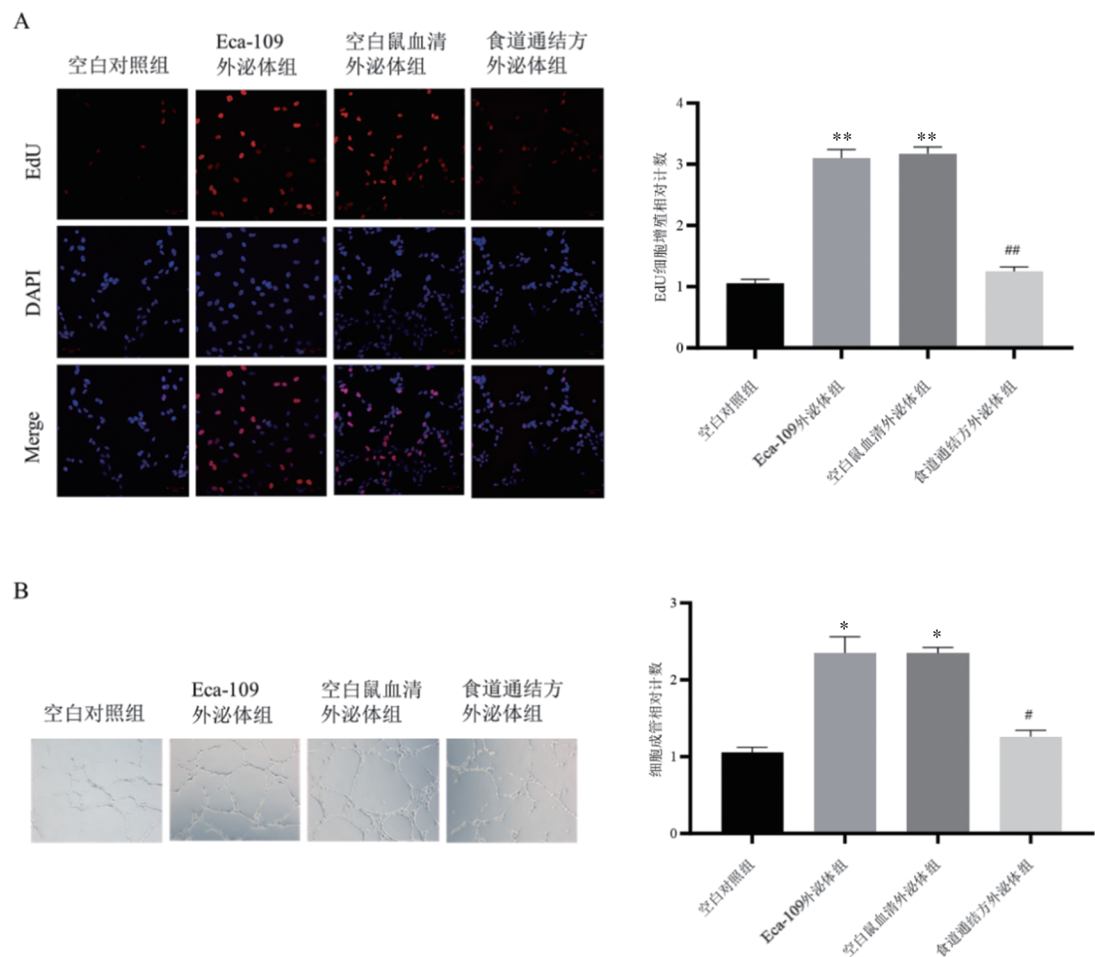


注:与Eca-109外泌体组比较,## $P<0.01$; $n=3, \bar{x} \pm s$ 。

图7 各组外泌体中LncRNA ZFAS1的表达

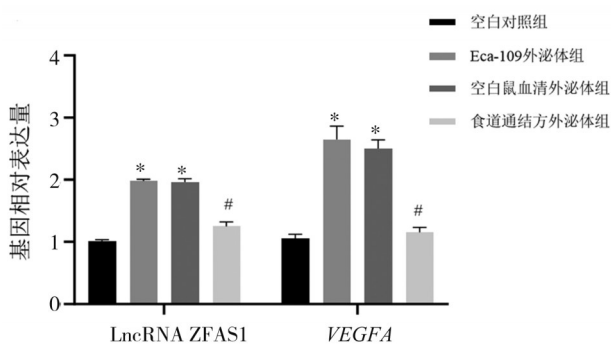
ZFAS1、VEGFA mRNA 的表达水平均显著降低($P<0.05$)。见图9。

2.7 外泌体对HUVECs的VEGFA蛋白表达的影响 与空白对照组比较,Eca-109外泌体组HUVECs中VEGFA蛋白的表达水平均显著上调($P<0.01$);与Eca-109外泌体组比较,食道通结方外泌体组HUVECs中VEGFA蛋白的表达水平均显著下调($P<0.05$)。见图10。



注:A为EdU细胞增殖实验检测人脐静脉内皮细胞(HUVECs)增殖情况($\times 200$)及其统计图,B为血管形成实验检测 HUVECs 成管情况($\times 200$)及其统计图。EdU 为 5-乙炔基-2'-脱氧尿苷,DAPI 为 4',6-二脒基-2-苯基吡啶,Merge 为融合成像。与空白对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与 Eca-109 外泌体组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$; $n=3, \bar{x} \pm s$ 。

图 8 各组 HUVECs 增殖、成管情况



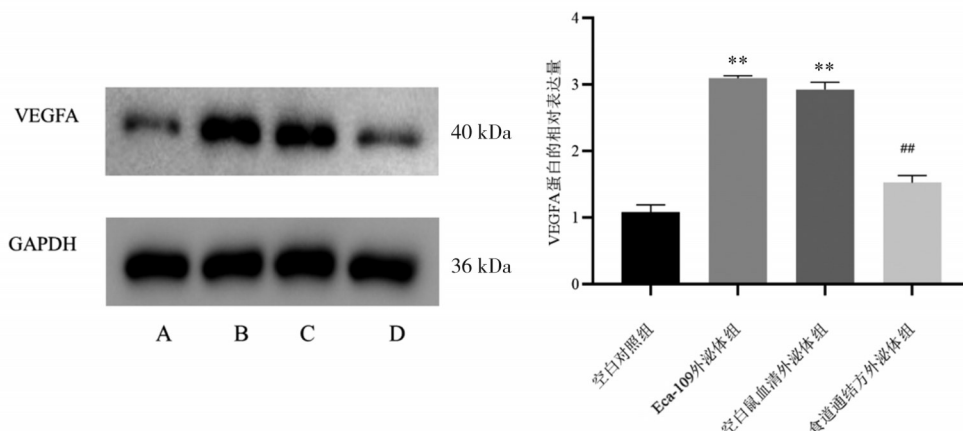
注:LncRNA ZFAS1 为长链非编码 RNA 锌指结构反义转录本 1, VEGFA 为血管内皮生长因子 A 基因。与空白对照组比较,* $P<0.05$;与 Eca-109 外泌体组比较,# $P<0.05$; $n=3, \bar{x} \pm s$ 。

图 9 各组 HUVECs 中 LncRNA ZFAS1、VEGFA mRNA 表达比较

3 讨论

肿瘤细胞来源外泌体通过介导细胞间的通信,在肿瘤微环境中扮演多重关键角色。外泌体中所包含的 LncRNAs 被证实参与肿瘤形成发展的多个环节,包括肿瘤侵袭转移、免疫逃逸、耐药及肿瘤血管新生等^[11]。

LncRNA ZFAS1 在食管癌组织中高表达,与不良预后有关^[4,12]。张考等^[13]研究表明,局晚期食管鳞癌患者血清外泌体 ZFAS1 的表达水平明显高于健康人群,且血清外泌体 ZFAS1 升高与肿瘤大小、T 分期等临床病理特征及放化疗敏感性密切相关。Li 等^[4]研究发现食管癌细胞来源外泌体 ZFAS1 可通过吸附 miR-124 促进下游靶基因 STAT3 的表达,通过调控关键转录因子 STAT3 在肿瘤微环境中发挥促



注:A为空白对照组,B为Eca-109外泌体组,C为空白鼠血清外泌体组,D为食道通结方外泌体组。VEGFA为血管内皮因子A,GAPDH为甘油醛-3-磷酸脱氢酶。与空白对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与Eca-109外泌体组比较,## $P<0.05$,### $P<0.01$; $n=3, \bar{x} \pm s$ 。

图10 各组外泌体对HUVECs中VEGFA蛋白表达的影响

瘤作用。综上,提示血清外泌体ZFAS1可作为潜在的诊断和监测食管癌治疗反应的生物标志物;ZFAS1以外泌体为载体参与食管癌的发生进展过程。

VEGFA是促血管生成的关键调节因子。张晶等^[14]临床报道,食管鳞癌组织中VEGFA mRNA及蛋白表达水平均显著高于癌旁正常组织,其表达与肿瘤组织的分化程度、TNM分期密切相关;且食管癌组织VEGFA高表达患者术后5年的复发转移率明显高于低表达患者,提示VEGFA高表达是影响食管鳞癌患者复发转移的独立危险因素。

在基础研究领域,多项肿瘤细胞来源外泌体LncRNA介导肿瘤血管新生的相关机制研究表明,外泌体LncRNA可被HUVECs内化,LncRNA作为VEGFA的上游调控因子,可活化VEGFA介导的信号通路,促进肿瘤血管的生成。Lang等^[15]观察发现神经胶质瘤细胞U87-MG来源外泌体lin-CCAT2与HUVECs共培养,能被后者所摄取,通过活化HUVECs中VEGFA、转化生长因子- β (TGF- β)等介导的信号通路,参与对肿瘤血管新生的调控。Qiu等^[16]研究发现卵巢癌细胞通过外泌体传递的方式将LncRNA MALAT1移至HUVECs,外泌体MALAT1的内化能诱导HUVECs中VEGFA、VEGFD等血管生成相关基因的表达增加,从而促进肿瘤血管新生。

本研究选取LncRNA ZFAS1相对高表达的食管癌Eca-109细胞株,采用超速离心法提取Eca-109细胞来源外泌体,将外泌体与HUVECs共培养,荧光显微镜下观察到外泌体被HUVECs所摄取;且食管癌

细胞(供体细胞)来源外泌体可通过上调HUVECs(受体细胞)ZFAS1及血管形成相关VEGFA mRNA及蛋白的表达,促进HUVECs的增殖及血管的形成,提示食管癌细胞-人血管内皮细胞间通过外泌体传递LncRNA ZFAS1,继而激活HUVECs中VEGFA蛋白促血管生成的功能是肿瘤血管新生微环境的调控机制之一;而食道通结方可通过调控此途径抑制食管癌血管新生。那么,食管癌来源外泌体调控HUVECs成管后是否进一步影响肿瘤微环境内T细胞、巨噬细胞等免疫细胞的功能,是否可能是免疫逃逸的机制之一;外泌体转运LncRNA ZFAS1进入HUVECs后,通过什么方式调控VEGFA的表达;食道通结方能否通过外泌体调控HUVECs血管生成相关的VEGFA/血管内皮因子受体2(VEGFR2)信号通路,这些问题均有待进一步研究,本课题组将从以上角度继续深入探讨食管癌血管新生相关的分子病理机制以及食道通结方的抗肿瘤药理作用。

参考文献:

- [1] 国家卫生健康委员会. 食管癌筛查与早诊早治方案(2024年版)[J]. 消化肿瘤杂志(电子版), 2024, 16(4): 412-413.
- [2] CHEN R, ZHENG R S, ZHANG S W, et al. Patterns and trends in esophageal cancer incidence and mortality in China: An analysis based on cancer registry data[J]. J Natl Cancer Cent, 2023, 3(1): 21-27.
- [3] GHAFOURI-FARD S, KAMALI M J, ABAK A, et al. LncRNA ZFAS1: Role in tumorigenesis and other diseases[J]. Biomed Pharmacother, 2021, 10(142): 111999.
- [4] LI Z R, QIN X B, BIAN W, et al. Exosomal lncRNA ZFAS1 regulates esophageal squamous cell carcinoma cell proliferation, invasion, migration and apoptosis via microRNA-124/STAT3 axis

- [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2019, 38(1): 477-489.
- [5] 蔡霄月, 张铭, 金长娟, 等. 食道通结颗粒联合化疗对 II b-III c 期食管鳞癌根治术后患者无病生存期的影响[J]. 上海中医药杂志, 2019, 53(6): 54-57.
- [6] 蔡霄月, 杨茜文, 卢文峰, 等. 食道通结颗粒联合化疗治疗中晚期食管癌的近期疗效观察[J]. 上海中医药杂志, 2017, 51(7): 44-47.
- [7] 杨茜雯, 张铭, 金长娟, 等. 食道通结方辅助化疗对中晚期食管癌鳞癌患者生存期及免疫功能的影响[J]. 中医杂志, 2017, 58(21): 1838-1841.
- [8] 蔡霄月, 张铭, 周亚宁, 等. 食道通结方对人食管癌裸鼠移植瘤微血管生成的影响[J]. 上海中医药杂志, 2021, 55(1): 83-87.
- [9] THERY C, AMIGORENA S, RAPOSO G, et al. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids[J]. Curr Protoc Cell Biol, 2006, 3(3): 22.
- [10] 刘佳琴, 罗吉, 李勇敏, 等. 健脾消癌方对结肠癌外泌体诱导 HFL1 活化成 CAFs 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(22): 40-46.
- [11] DAI J, SU Y Z, ZHONG S Y, et al. Exosomes: key players in cancer and potential therapeutic strategy [J]. Signal Transduct Target Ther, 2020, 5(1): 145.
- [12] SHI H T, LIU Z H, PEI D, et al. Development and validation of nomogram based on lncRNA ZFAS1 for predicting survival in lymph node-negative esophageal squamous cell carcinoma patients [J]. Oncotarget, 2017, 8(35): 59048-59057.
- [13] 张考, 黄啸, 熊思. 血清外泌体 lncRNA ZFAS1 与老年局部中晚期不可切除食管癌患者病理特征及同步放化疗敏感性的关系研究[J]. 现代医学, 2022, 50(8): 987-994.
- [14] 张晶, 安秀英, 胡锋超. 微小核糖核酸-200b-3p、血管内皮生长因子 A 在食管鳞状细胞癌组织中的表达及其与复发转移相关性[J]. 安徽医药, 2022, 26(10): 1954-1959, 2122.
- [15] LANG H L, HU G W, ZHANG B, et al. Glioma cells enhance angiogenesis and inhibit endothelial cell apoptosis through the release of exosomes that contain long non-coding RNA CCAT2[J]. Oncol Rep, 2017, 38(2): 785-798.
- [16] QIU J J, LIN X J, TANG X Y, et al. Exosomal Metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1 promotes angiogenesis and predicts poor prognosis in epithelial ovarian cancer [J]. Int J Biol Sci, 2018, 14(14): 1960-1973.

编辑:杨轶舜

收稿日期:2025-06-06

(上接第 52 页)

患者药后诸症减轻,门诊继续治疗,随证加减,随访至今,情况稳定。

按 本案患者历经手术、放疗、内分泌治疗后,气血脏腑亏损。初次时病机特点以少阳气郁,枢机不利,热扰心神为主,治疗遵循“木郁达之,火郁发之”,和解少阳,调畅气机,同时益气健脾,解郁安神。柴胡、郁金疏肝理气;黄芩、黄连清热泻火,厚朴、姜半夏、瓜蒌皮化痰;党参、炒白术、茯苓、薏苡仁、大枣益气健脾;煅龙骨、煅牡蛎平肝潜阳,与茯神一同安神助眠。临床诊治过程中陈教授强调应法随症变、随症治之,因此本案以疏肝解郁贯穿始终,并根据临床表现不同,辨证有所不同。

参考文献:

- [1] 欧阳飞, 石磊. 1990—2021 年中国及全球女性乳腺癌疾病负担分析和未来趋势预测[J]. 中国循证医学杂志, 2025, 25(5): 497-503.
- [2] 王宗玉, 何晞辰, 陈一贞, 等. 乳腺癌术后内分泌治疗后类更年期综合征中医证型列线图预测模型的建立和评估[J]. 上海中医药杂志, 2023, 57(4): 29-35.

- [3] 王猛. 基于数据挖掘分析中医治疗乳腺增生症的用药规律及网络药理学研究[D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2024.
- [4] 孙文杰, 余薇薇, 杨艳环, 等. 基于聚类与因子分析探讨女性乳腺良性结节中医证候规律[J]. 中国中医药信息杂志, 2023, 30(4): 129-134.
- [5] 曹雪, 张卫华, 郭新荣, 等. 国医大师郭诚杰从肝论治乳腺病学术思想探析[J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(10): 5906-5909.
- [6] 张东佳, 彭云霞, 魏莉霞, 等. 《中国药典》2015 版含柴胡成方制剂分析[J]. 中国中医药科技, 2020, 27(2): 325-329.
- [7] 任典群, 刘杰. 柴胡类方加减治疗乳腺癌探讨[J]. 浙江中医杂志, 2023, 58(4): 298.
- [8] 乔世杰, 付超, 蔡姿尧, 等. “中医状态”纵向视域下方证相应理论内涵新释[J]. 北京中医药大学学报, 2024, 47(6): 760-764.
- [9] 黄煌. 经方方证的四大特征[J]. 南京中医药大学学报, 2022, 38(8): 651-654.
- [10] 邵家东, 胡鸿毅, 孙羿帆, 等. 从《伤寒论》方证相应角度谈柴胡类方的临床应用[J]. 环球中医药, 2021, 14(6): 1087-1090.
- [11] 鲁颖晔. 从“舌边白涎”浅论柴胡证[J]. 浙江中医杂志, 2023, 58(4): 269-270.
- [12] 黄煌. 经方的魅力——黄煌谈中医[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 103.

编辑:马丽亚

收稿日期:2024-12-26