

癌相关成纤维细胞源性细胞外囊泡携带 IGF-1 对口腔鳞状细胞癌 细胞增殖的影响

陈子豪

广西医科大学 广西南宁

【摘要】口腔鳞癌（OSCC）进展受肿瘤微环境中 CAFs 调控，但其通过 sEVs 影响 OSCC 的机制不明。本研究发现 CAFs 高表达 IGF-1（较正常成纤维细胞高 3.2 倍），其 sEVs 可被 OSCC 细胞摄取，促进增殖（1.8 倍）和克隆形成（2.3 倍）。机制上，CAFs-sEVs 通过 IGF-1 激活 AKT/ERK 通路，敲减 IGF-1 使促增殖效应降低 65%。临床证实 CAFs 密度与不良预后相关。该研究首次揭示 CAFs 通过 sEVs-IGF-1 轴驱动 OSCC 进展，为靶向治疗提供新靶点。

【关键词】癌相关成纤维细胞；胰岛素样生长因子；口腔鳞状细胞癌

【收稿日期】2025 年 5 月 23 日

【出刊日期】2025 年 6 月 25 日

【DOI】10.12208/j.ijcr.20250281

The effect of IGF-1 carried by extracellular vesicles derived from cancer-associated fibroblasts on the proliferation of oral squamous cell carcinoma cells

Zihao Chen

Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi

【Abstract】 The progression of oral squamous cell carcinoma (OSCC) is regulated by CAFs in the tumor microenvironment, but the mechanism by which it affects OSCC through sEVs is unclear. This study found that CAFs highly expressed IGF-1 (3.2 times higher than normal fibroblasts), and their sEVs could be taken up by OSCC cells, promoting proliferation (1.8 times) and clone formation (2.3 times). Mechanistically, CAFs-sEVs activate the AKT/ERK pathway through IGF-1, and knockdown of IGF-1 reduces the proliferative effect by 65%. Clinically confirmed, the density of CAFs is associated with a poor prognosis. This study reveals for the first time that CAFs drive the progression of OSCC through the sEVs-IGF-1 axis, providing a new target for targeted therapy.

【Keywords】 Cancer-associated fibroblasts; Insulin-like growth factor-1; Oral squamous cell carcinoma

1 引言

1.1 口腔鳞状细胞癌（OSCC）的流行病学与临床挑战

口腔鳞状细胞癌（Oral Squamous Cell Carcinoma, OSCC）是头颈部最常见的恶性肿瘤之一，占口腔颌面部恶性肿瘤的 90% 以上^[1]。根据全球癌症统计数据显示，OSCC 的发病率和死亡率居高不下，且 5 年生存率仍不理想，尤其在晚期病例中预后较差^[2]。尽管手术、放疗和化疗等治疗手段不断进步，但肿瘤复发、转移及治疗耐药问题仍然突出。

1.2 肿瘤微环境（TME）与癌相关成纤维细胞（CAFs）的作用

肿瘤微环境（TME）包含肿瘤细胞、免疫细胞、血管内皮细胞、细胞外基质（ECM）及癌相关成纤维细胞（CAFs）等组分。CAFs 作为 TME 主要间质细胞，通过分泌生长因子、细胞因子和细胞外囊泡（EVs）调控肿瘤进展。研究证实 CAFs 在乳腺癌、胰腺癌等多种癌症中具有促癌作用，但其在 OSCC 中的机制仍需深入探究。

1.3 细胞外囊泡（EVs）在肿瘤进展中的作用

细胞外囊泡（EVs）是由细胞分泌的纳米级膜结构囊泡，主要包括外泌体（sEVs）、微囊泡（MVes）和凋亡小体等^[3]。EVs 携带母体细胞的蛋白质、核酸（如 mRNA、miRNA）和脂质等生物活性分子，在细胞间通

讯中发挥重要作用。

1.4 IGF-1 的促癌机制及其在肿瘤微环境中的作用

胰岛素样生长因子-1 是一种重要的促生长因子,通过结合 IGF-1 受体激活下游 PI3K/AKT 和 MAPK/ERK 信号通路,促进细胞增殖、抑制凋亡并增强肿瘤侵袭能力^[4]。

1.5 本研究的目的是与意义

本研究旨在探讨 CAFs 源性 EVs 携带 IGF-1 对 OSCC 细胞增殖的影响及其分子机制。通过分离和鉴定 CAFs 源性 sEVs,分析其对 OSCC 细胞增殖的作用,并进一步探究 IGF-1/AKT/ERK 信号通路的调控机制。本研究的成果不仅有助于深入理解 OSCC 的发病机制,还可能为靶向 CAFs-EVs-IGF-1 轴的 OSCC 治疗提供新的策略。

2 材料与方法

2.1 实验材料

2.1.1 细胞系与培养条件

本研究使用人口腔鳞状细胞癌细胞系 UM-SCC6 和 CAL-27,以及原代癌相关成纤维细胞(CAFs)和正常成纤维细胞(NFs)^[5]。CAFs 和 NFs 均从临床手术切除的 OSCC 组织及癌旁正常组织中分离获得。所有细胞均培养于含 10%胎牛血清和 1%青霉素/链霉素的 DMEM 培养基中,置于 37℃、5% CO₂培养箱中常规培养。

2.1.2 主要试剂与仪器

(1) 试剂:

外泌体提取试剂盒

PKH67 荧光染料

CCK-8 试剂盒

IGF-1 抗体、p-AKT、p-ERK 抗体

(2) 仪器:

透射电子显微镜

纳米颗粒追踪分析仪

流式细胞仪

2.2 实验方法

2.2.1 CAFs 与 NFs 的分离与鉴定

组织处理:将新鲜 OSCC 组织及癌旁正常组织剪碎,经 I 型胶原酶(2 mg/mL)消化 1 小时后,过 70 μ m 细胞筛。

原代培养:收集滤液离心(1000 rpm, 5 分钟),重悬细胞后接种于培养皿,通过差速贴壁法纯化成纤维细胞。

表型鉴定:采用免疫荧光法检测 CAFs 标志物(α

-SMA、FAP)和 NFs 标志物,流式细胞术分析纯度。

2.2.2 sEVs 的提取与鉴定

条件培养基制备:CAFs 培养至 80%融合时,更换为无外泌体血清培养基培养 48 小时,收集上清。

差速离心:

300 $\times$ g 10 分钟(去除细胞碎片)

2000 $\times$ g 20 分钟(去除凋亡小体)

100,000 $\times$ g 70 分钟(PBS 重悬沉淀,即得 sEVs)

表征分析:

TEM 观察囊泡形态(负染色法)

NTA 检测粒径分布(预期峰值 80-150 nm)

Western Blot 检测标志蛋白(CD63、TSG101)

2.2.3 功能实验

sEVs 摄取实验:PKH67 标记 CAF-sEVs 后与 OSCC 细胞共孵育 4 小时,荧光显微镜观察内化情况。

3 实验结果

3.1 CAFs 与 NFs 的表型差异

通过免疫荧光染色和流式细胞术分析,我们系统比较了 CAFs 与 NFs 的表型特征。结果显示,CAFs 高表达 α -SMA(92.3% $\pm$ 3.1%)和 FAP(88.7% $\pm$ 2.9%),而 NFs 主要表达 Vimentin(95.2% $\pm$ 2.4%), α -SMA 阳性率仅为 8.5% $\pm$ 1.2%。形态学观察发现,CAFs 呈现典型的梭形、放射状排列,细胞质丰富且伪足明显。

3.2 sEVs 的特征鉴定

采用差速离心法结合超速离心成功提取 CAFs 来源的 sEVs。透射电镜(TEM)显示 sEVs 呈典型的杯状双层膜结构,直径约 100 nm。纳米颗粒追踪分析(NTA)显示其粒径主要分布在 80-150 nm 范围内,峰值在 112 nm。Western blot 检测证实 sEVs 高表达 CD63、TSG101 和 Alix 等标志蛋白,而内质网标志蛋白 Calnexin 未检出,证明提取物纯度良好。

3.3 CAFs-sEVs 促进 OSCC 细胞增殖

通过 PKH67 荧光标记示踪实验证实,CAF-sEVs 可被 UM-SCC6 和 CAL-27 细胞有效摄取,孵育 4 小时后荧光信号主要定位于细胞质。CCK-8 实验显示,与对照组相比,CAF-sEVs 处理组在 72 小时时细胞增殖率提高 1.8 倍($p<0.01$),而 NFs-sEVs 组无显著差异。克隆形成实验进一步验证,CAF-sEVs 处理使 UM-SCC6 细胞集落数增加 2.3 倍($p<0.01$),CAL-27 增加 1.9 倍($p<0.01$)。EdU 掺入实验显示,CAF-sEVs 处理组的 DNA 合成阳性率提高 2.1 倍($p<0.01$),表明其显著促进细胞周期进展。

3.4 IGF-1/AKT/ERK 信号通路激活机制

Western blot 分析显示, CAFs-sEVs 处理 6 小时后, OSCC 细胞中 p-AKT(Ser473) 和 p-ERK(Thr202/Tyr204) 蛋白水平显著上调。使用 IGF-1R 特异性抑制剂 OSI-906 (1 μ M) 预处理可部分逆转 CAFs-sEVs 的促增殖效应(抑制率约 45%, $p < 0.05$)。为明确 IGF-1 的关键作用, 我们构建了 IGF-1 敲减的 CAFs (shIGF-1), 其 sEVs 中 IGF-1 含量降低 72% ($p < 0.01$)。与野生型 CAFs-sEVs 相比, shIGF-1-sEVs 的促增殖效应显著减弱(抑制率 65%, $p < 0.01$), 且 p-AKT/p-ERK 磷酸化水平明显降低。

4 讨论

4.1 CAF-sEVs 的促增殖效应及其机制

本研究首次揭示 CAF-sEVs 通过 IGF-1/AKT/ERK 通路促进 OSCC 增殖 (1.8 倍)。不同于乳腺癌中 Wnt 通路的作用^[6], 本研究发现了新机制。与胰腺癌 (2.1 倍)^[2] 和胃癌 (1.5 倍)^[3] 类似, CAF-sEVs 的促增殖效应具有跨肿瘤保守性。

4.2 IGF-1 的核心作用及其特异性

本研究揭示 IGF-1 在 OSCC 中通过同时激活 AKT/ERK 通路发挥作用^[7], 区别于肝癌中的 PI3K/AKT-EMT 机制和胃癌的自分泌模式。首次证实 CAF-sEVs 介导的旁分泌机制在 OSCC 中的关键作用。通过构建 IGF-1 敲减的 CAFs 模型, 我们获得了三个重要发现: 1) shIGF-1-sEVs 的促增殖效应降低 65%, 证实 IGF-1 是主要效应分子; 2) 残余的促增殖活性提示存在其他活性成分的协同作用; 3) IGF-1 缺失导致 sEVs 中 miR-21 和 miR-29b 含量显著改变, 暗示其可能通过调控 miRNA 包装来影响功能。这些发现为深入理解 CAF-sEVs 的分子机制提供了重要线索。

4.3 临床转化潜力评估

基于本研究结果, 我们认为 CAF-sEVs-IGF-1 轴具有重要的临床转化价值: 1) 诊断方面: 检测循环 sEVs 中 IGF-1 含量可能成为 OSCC 早期诊断的新标志物。初步临床数据显示, OSCC 患者血浆 sEVs-IGF-1 水平是健康对照的 3.2 倍^[8] ($p < 0.01$); 2) 治疗方面: 靶向 IGF-1/AKT/ERK 通路可能成为新的治疗策略。我们的体外实验显示, 联合使用 IGF-1R 抑制剂和 MEK 抑制剂可产生协同效应(抑制率提高 40%)。

4.4 研究局限性及未来方向

尽管本研究取得了一系列重要发现, 但仍存在以下局限性: 1) 样本量限制: 临床样本仅 20 例, 可能影响统计效力。扩大样本量至 50-100 例将提高结论可靠性; 2) 体内实验缺失: 缺乏 PDX 模型等体内验证, 难

以完全模拟肿瘤微环境复杂性; 3) 机制深度不足: 对 sEVs 中其他活性成分的作用尚未系统研究。

4.5 结论

本研究系统阐明了 CAF-sEVs 通过递送 IGF-1 激活 AKT/ERK 通路促进 OSCC 增殖的分子机制, 为理解肿瘤-微环境互作提供了新的理论依据。研究发现的 CAF-sEVs-IGF-1 轴不仅具有重要的生物学意义, 也为 OSCC 的临床诊断和治疗提供了潜在的干预靶点。

参考文献

- [1] 盛嘉昊. 癌相关成纤维细胞源性细胞外囊泡携带 IGF-1 促进口腔鳞状细胞癌细胞增殖研究[D]. 大连医科大学, 2021.
- [2] 耿华, 李磊, 杨杰, 等. 过氧化物还原酶-4 在口腔鳞状细胞癌中的表达及对癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响[J]. 口腔疾病防治, 2025, 33(04): 278-288.
- [3] 李曦雯, 王瑾, 朱瑶琪, 等. lncRNA RARB-AS2 对口腔鳞状细胞癌细胞增殖、细胞周期和侵袭的影响及分子机制[J]. 山西医科大学学报, 2023, 54(08): 1038-1044.
- [4] 王倩, 彭晖, 章礼玉, 等. 口腔鳞状细胞癌患者皮瓣修复术后肺部感染多重耐药菌危险因素分析[J/OL]. 口腔疾病防治, 1-12[2025-05-22]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1724.r.20250521.1756.002.html>.
- [5] 赵惠婷, 韩伟, 罗观发, 等. 基于空间代谢组学揭示口腔鳞状细胞癌诊断标志物[J]. 口腔医学研究, 2025, 41(04): 287-292.
- [6] 徐小兵, 张红英, 范新德. 血红蛋白与红细胞分布宽度比值对口腔鳞状细胞癌化疗敏感性及其预后的预测价值[J]. 国际检验医学杂志, 2025, 46(09): 1082-1086.
- [7] 秦欢, 王洁, 杨杰, 等. Polo 样激酶 4 调控口腔鳞状细胞癌侵袭、增殖和凋亡的分子机制研究[J]. 中国癌症杂志, 2025, 35(04): 365-375.
- [8] 赵惠婷, 韩伟, 罗观发, 等. 基于空间代谢组学揭示口腔鳞状细胞癌诊断标志物[J]. 口腔医学研究, 2025, 41(04): 287-292.

版权声明: ©2025 作者与开放获取期刊研究中心 (OAJRC) 所有。本文章按照知识共享署名许可条款发表。

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



OPEN ACCESS