



· 论 著 ·

# 外泌体中ISG15在卵巢癌铂类药物耐药中的作用及初步机制探讨

田亚楠, 郑 慧, 严天晴, 张 玢, 卢仁泉, 郭 林

复旦大学附属肿瘤医院检验科, 复旦大学上海医学院肿瘤学系, 上海 200032

**[摘要]** 背景与目的: 上皮性卵巢癌 (epithelial ovarian cancer, EOC) 患者预后较差, 易对铂类药物产生耐受; 目前认为外泌体可能参与卵巢癌铂类药物耐药, 本研究主要探讨外泌体对卵巢癌铂类药物耐药的作用及机制。方法: 通过超速离心提取外泌体, 采用电镜、粒径分析和蛋白质印迹法 (Western blot) 对外泌体表征、外泌体蛋白及相关信号转导通路的表达水平进行检测。通过蛋白质组学对外泌体蛋白表达谱进行分析; 通过与已有耐药数据集筛选关键差异蛋白。收集2023年8月—2024年8月在复旦大学附属肿瘤医院经病理学检查诊断为EOC并接受手术治疗符合入组标准的患者, 以分析患者血清外泌体中干扰素刺激基因15 (interferon-stimulated gene 15, ISG15) 表达水平与铂类药物耐药的关系。通过酶联免疫吸附法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 检测血清外泌体中相关蛋白的表达水平, 采用受试者工作特征曲线 (receiver operating characteristic, ROC) 探究血清外泌体蛋白对卵巢癌耐药的预测价值。结果: 本研究成功提取源自卵巢癌铂类药物敏感及耐药细胞的外泌体并进行蛋白组学分析, 鉴定出9个与铂类药物耐药相关的差异蛋白, 筛选出ISG15。与敏感细胞相比, 卵巢癌耐药细胞外泌体中ISG15表达水平显著上调; 外泌体示踪实验表明, 外泌体能够被卵巢癌受体细胞摄取。在与耐药细胞外泌体共培养后, 卵巢癌受体细胞ISG15表达水平升高。敲低细胞ISG15, 外泌体中ISG15的表达下降; 加入下调ISG15的外泌体后, 卵巢癌细胞对铂类药物的耐受降低。且ISG15可通过磷脂酰肌醇3-激酶 (phosphoinositide 3-kinase, PI3K) /蛋白激酶B (protein kinase B, AKT) /核因子激活的B细胞的 $\kappa$ -轻链增强复合物 (nuclear factor-kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NF- $\kappa$ B) 信号转导通路调控多耐药蛋白1 (multidrug resistance protein 1, MDR1) 的表达促进卵巢癌细胞对铂类药物耐药。对87例患者血清标本检测结果发现, 与卵巢癌敏感患者相比, 耐药卵巢癌患者血清外泌体中ISG15表达升高; 将血清外泌体ISG15作为区别敏感和耐药的指标绘制ROC的曲线下面积为0.779 ( $P < 0.05$ ), Cutoff值为27.35 ng/mL, 灵敏度为70.2%, 特异度为76.4%。结论: 外泌体中的ISG15可以通过PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B信号转导通路调节卵巢癌细胞中MDR1的表达, 促进卵巢癌细胞对铂类药物耐药。

**[关键词]** 卵巢癌; 外泌体; ISG15; 铂类药物耐药

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2025.04.002

**基金项目:** 国家自然科学基金 (82373383)。

**利益冲突:** 作者声明无利益冲突。

**伦理批件:** 050432-4-2307E。

**知情同意:** 已披露。

**引用本文:** 田亚楠, 郑 慧, 严天晴, 等. 外泌体中ISG15在卵巢癌铂类药物耐药中的作用及初步机制探讨 [J]. 中国癌症杂志, 2025, 35(4): 346-354.

**Funding:** National Natural Science Foundation of China (82373383).

**Conflicts of interest:** authors declare no conflicts of interest.

**Ethical approval:** 050432-4-2307E.

**Informed consent:** available.

**Cite this article:** TIAN Y N, ZHENG H, YAN T Q, et al. Preliminary study on the role and mechanism of ISG15 in exosomes in platinum resistance in ovarian cancer [J]. Chin Oncol, 2025, 35(4): 346-354.

**Preliminary study on the role and mechanism of ISG15 in exosomes in platinum resistance in ovarian cancer** TIAN Yanan, ZHENG Hui, YAN Tianqing, ZHANG Heng, LU Renquan, GUO Lin (Department of Clinical Laboratory, Fudan University Shanghai Cancer Center; Department of Oncology, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Correspondence to: GUO Lin E-mail: guolin500@hotmail.com

**[Abstract]** **Background and purpose:** Epithelial ovarian cancer (EOC) has a poor prognosis and is prone to developing resistance to platinum-based chemotherapy. Exosomes are currently believed to be involved in platinum resistance in ovarian cancer. This study

explored the role and mechanism of exosomes on platinum resistance of ovarian cancer. **Methods:** Through ultracentrifugation, exosomes were isolated and analyzed using electron microscopy, particle size studies, and Western blot for detailed exosome analysis. We detected the expression levels of exosomal proteins and related signaling pathways. Exosomal protein expression profile was analyzed by proteomics. Key differential proteins were screened by intersecting with existing drug resistance datasets. Furthermore, patients diagnosed with EOC via pathological analysis at the Fudan University Shanghai Cancer Center from August 2023 to August 2024, who underwent surgery and fulfilled the eligibility requirements, were gathered to examine the link between the expression of interferon-stimulated gene 15 (ISG15) in serum exosomes and resistance to platinum medication. The expression levels of related proteins in serum exosomes were quantitatively detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Receiver operating characteristic (ROC) curve was plotted to explore the predictive value of serum exosomal protein in ovarian cancer resistance. **Results:** Exosomes derived from platinum-sensitive and drug-resistant ovarian cancer cells were extracted and proteomic analysis was further performed. We identified 9 differential proteins associated with platinum-resistance and found the key molecule interferon-stimulated gene 15 (ISG15). Compared with sensitive cells, the expression of ISG15 in exosomes of drug-resistant ovarian cancer cells was significantly upregulated. Exosome tracer tests showed that exosomes were successfully taken up by ovarian cancer receptor cells. After coculture with drug-resistant exosomes, the expression level of ISG15 in ovarian cancer receptor cells was increased. Knockdown ISG15 in EOC cells decreased the expression of ISG15 in exosomes, and incubation of ISG15-knockdown exosomes decreased the cell viability on the condition of platinum drugs, indicating that ISG15 in exosomes regulated platinum resistance of ovarian cancer cells. Moreover, ISG15 could regulate the expression of multidrug resistance protein 1 (MDR1) through phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (AKT)/nuclear factor-kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- $\kappa$ B) signaling pathway. This study included a total of 87 patients. Clinical serum samples also showed that the expression of ISG15 in exosomes was higher in platinum-resistant ovarian cancer patients than in sensitive ovarian cancer patients. Using serum exosomal ISG15 as an indicator to distinguish between sensitivity and resistance, the area under ROC curve was 0.779 ( $P < 0.05$ ), cutoff value was 27.35ng/mL, sensitivity was 70.2%, and specificity was 76.4%. **Conclusion:** ISG15 in exosomes can regulate the expression of MDR1 in ovarian cancer cells through PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B signaling pathway, and promote platinum resistance in ovarian cancer cells.

[ **Key words** ] Ovarian cancer; Exosome; ISG15; Platinum resistance

卵巢癌是女性生殖系统常见的恶性肿瘤，其中上皮性卵巢癌（epithelial ovarian cancer, EOC）占卵巢癌的绝大多数，致死率远高于宫颈癌和子宫内膜癌，是女性妇科肿瘤患者死亡的重要原因<sup>[1]</sup>。虽然在早期使用铂类药物治疗卵巢癌对大多数患者而言效果较好，但治疗后发生耐药的比例仍高达30%<sup>[2]</sup>。卵巢癌患者耐药是临床和研究人员面临的重要挑战。

外泌体作为细胞信息传递的重要媒介，可参与肿瘤进展，并改变肿瘤对化疗药物的敏感性<sup>[3]</sup>。外泌体是一种由细胞分泌的直径在30~100纳米的囊泡，可存在于血液、尿液和腹水中<sup>[4]</sup>。外泌体携带多种生物分子，包括蛋白质、核酸、脂质和代谢物。外泌体的特殊脂质双层结构可保护其内容物不受损伤，使内容物具有稳定的生物活性<sup>[5]</sup>。外泌体蛋白的变化与许多肿瘤的病理生理过程有关。目前关于卵巢癌外泌体的蛋白质组学研究较少，特别是在卵巢癌耐药中，外泌体蛋白的具体作用机制仍不明确。因此，我们基于蛋白质组学等技术，鉴定出卵巢癌外泌体中的关键蛋白分子，明确其在卵巢癌细胞耐药性中的作用，为预测卵巢癌耐药提供新的思路。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要材料

#### 1.1.1 细胞株

人卵巢癌细胞系A2780和SKOV3购自美国典型培养物保藏中心（American Type Culture Collection, ATCC），顺铂耐药细胞系SKOV3DDP由本实验室自建<sup>[6]</sup>。

#### 1.1.2 临床资料

收集2023年8月—2024年8月在复旦大学附属肿瘤医院初次就诊并接受治疗的卵巢癌患者的相关性临床资料。患者纳入的标准：①接受肿瘤细胞减灭术，且术后接受铂类药物联合紫杉醇的化疗并达到临床缓解；②术后病理学检查确诊为上皮性卵巢癌；③完成最后一次含铂类药物的化疗后，随访时间大于6个月；④患者一般资料完整，且初始治疗前有完善的肿瘤标志物、血常规等相关检查结果。排除标准：①非卵巢上皮性原发性或合并其他原发性或继发性肿瘤；②术前合并感染或其他严重肝、肾疾病；③全程化疗以非铂类药物为主或联合抗血管生成药物的患者；④最后一次化疗结束后随访期间服用靶向治疗药物维持治疗的患者；⑤临床或随访资料不完整及未能返院复诊的患者。

本研究经复旦大学附属肿瘤医院临床试验伦理委员会审核批准(伦理编号: 050432-4-2307E), 所有患者均已签署书面知情同意书。

### 1.1.3 主要试剂

10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)和1%青霉素-链霉素和改良鹰酮基本培养基(Dulbecco's modified Eagle medium, DMEM)购自美国Gibco公司, 总外泌体分离试剂(从细胞培养基)、总外泌体分离试剂(从血清)和siRNA转染试剂均购自美国ThermoFisher公司, CD63、TSG101、MDR1和GAPDH抗体均购自武汉三鹰生物技术有限公司, 蛋白激酶B(protein kinase, AKT)、磷酸化的AKT(p-AKT)、核因子激活的B细胞的 $\kappa$ -轻链增强复合物(nuclear factor-kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NF- $\kappa$ B)、磷酸化的NF- $\kappa$ B(p-NF- $\kappa$ B)、磷脂酰肌醇3-激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)和磷酸化的PI3K(p-PI3K)抗体均购自美国Cell Signaling Technology公司, 干扰素刺激基因15(interferon stimulated gene 15, ISG15)抗体购自武汉爱博泰克生物科技有限公司, 细胞计数试剂盒(cell counting kit-8, CCK-8)试剂盒购自翌圣生物科技(上海)股份有限公司, LY294002、MK2206和BAY 11-7082均购自美国MedChemexpress公司, 酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司, 1,1'-二十八烷基-3,3',3'-四甲基吲哚菁高氯酸盐(1,1'-dioctadecyl-3,3',3'-tetramethylindodicarbocyanineperchlorate, DiI)购自上海碧云天生物技术股份有限公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 细胞培养

A2780和SKOV3细胞培养在含10%的FBS和1%青霉素-链霉素的DMEM培养基中, 在37℃、CO<sub>2</sub>体积分数为5%的条件下进行培养。

### 1.2.2 细胞转染

采用0.25%胰蛋白酶消化细胞, 取对数生长期的SKOV3DDP细胞, 消化后接种于6孔板过夜, 待细胞融合度为60%时分别加入ISG15 siRNA质粒和对照质粒, 室温静置20 min后进行转染。37℃、CO<sub>2</sub>体积分数为5%的条件下用不含血清的DMEM培养液培养4~6 h后, 换成完全培养基, 继续培养。

### 1.2.3 外泌体的提取和鉴定

收集细胞培养上清液, 100 000×g超速离心

2 h, 收集包含外泌体的沉淀。使用磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)对沉淀进行多次洗涤, 将洗涤后的含外泌体悬浮液再次进行超速离心(条件同前), 得到外泌体沉淀, 重悬后进行后续分析。

透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)用于观察外泌体的形态。将铜网格放在纯化的外泌体液滴上, 采用滤纸侧吸法去除多余液体, 滴加2%醋酸双氧铀染色液15  $\mu$ L, 双联滤纸吸干法去除残留染液, 将铜网置于超净工作台, 干燥3~5 min后使用TEM观察外泌体的形态。使用激光纳米粒度分析系统(Nanolink s900)分析外泌体的粒度分布。将纯化的样品加入仪器, 分析外泌体的直径。

### 1.2.4 蛋白质印迹法(Western blot)检测

细胞培养后弃去培养液, 用0.25%胰蛋白酶消化细胞。用放射免疫沉淀法缓冲液(radio-immunoprecipitation assay, RIPA)裂解细胞获得总蛋白, 去除不溶性物质, 用二辛可宁酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白定量试剂盒测定总蛋白浓度。将蛋白裂解上清液离心后(14 000×g, 15 min)与5×上样缓冲液混匀, 100℃煮沸5 min, 使蛋白质变性。收集蛋白质经十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)后, 转移至聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上。用5%脱脂牛奶在室温下封闭1 h, 加入一抗4℃温育过夜, TBST清洗后加入二抗摇床温育1 h, TBST清洗后加入电化学发光液(electrochemiluminescence, ECL), 凝胶成像仪进行曝光显影。

### 1.2.5 外泌体示踪实验

纯化的外泌体用DiI染色, 并在37℃下温育20 min。SKOV3和A2780细胞与DiI标记的外泌体温育24 h后, 用4%的多聚甲醛固定细胞10 min, 并用DAPI染色5 min, 对细胞核进行标记。用荧光显微镜(日本Olympus公司)对细胞进行成像观察。

### 1.2.6 质谱分析

从SKOV3细胞和SKOV3DDP细胞的上清液中获取外泌体, 使用BCA蛋白检测试剂盒测定外泌体的蛋白质浓度。通过捕集离子淌度(trapped ion mobility spectrometry, TIMS)与同步累积连续碎裂(parallel accumulation-serial fragmentation, PASEF)扫描模式进行差异定量蛋白质组学, 基于离子淌度平台的数据非依

赖型采集 (data independent acquisition, DIA) 技术, 通过数据非依赖采集-同步累积连续碎裂 (data-independent acquisition-synchronous parallel accumulation serial fragmentation, diaPASEF) 扫描模式进行差异定量蛋白质组学分析。所有数据均在Xcalibur软件 (第3版) 中获取。

### 1.2.7 克隆形成实验

将SKOV3细胞和A2780细胞以 $5 \times 10^2$ 个细胞/孔的密度分别接种到6孔板中。待细胞贴壁后, 加入相同浓度的外泌体, 将细胞培养基更换为不含外泌体的新鲜培养基并继续培养10~14 d, 出现可见的克隆后加入适当浓度的顺铂。用0.5%的结晶紫对细胞集落进行染色, 计数细胞集落。

### 1.2.8 CCK-8细胞毒性测定

将细胞接种到96孔板中, 并用不同剂量的顺铂处理24 h。向每个孔中加入10 mL CCK-8溶液, 37 °C温育1~4 h。于450 nm处测量吸光度 ( $D$ ) 值, 并根据 $D$ 值计算药物的半数最大抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration,  $IC_{50}$ )。进行3次独立实验。根据以下公式计算细胞毒性: 抑制率 (%) =  $(D_{\text{药物}} - D_{\text{空白}}) / (D_{\text{药物对照}} - D_{\text{空白}}) \times 100\%$ 。

### 1.2.9 酶联免疫吸附试验

设置标准品孔和样本孔, 分别加入50  $\mu$ L不同浓度的标准品和待测样本。室温温育60 min后, 洗涤5次, 吸水纸上拍干, 随后每孔加入辣根过氧化物酶标记的检测抗体100  $\mu$ L, 用封板膜封住反应孔, 37 °C温育60 min, 弃去液体, 吸水纸上拍干, 洗涤5次, 每孔加入底物A、B各50  $\mu$ L, 37 °C避光温育15 min。加入中止液终止反应, 在450 nm波长处读取 $D$ 值。

### 1.2.10 统计学处理

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 服从正态分布的计量资料的两组比较采用 $t$ 检验, 多组间比较采用单因素方差分析。所有细胞实验均采用3次重复。采用受试者工作特征曲线 (receiver operating characteristic, ROC) 评价外泌体ISG15对卵巢癌耐药的预测效能。使用GraphPad Prism 9.0软件进行统计分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 铂类药物耐药SKOV3细胞外泌体中ISG15的表达升高

提取亲本SKOV3和顺铂耐药SKOV3DDP细胞的外泌体, 分别标记为SKOV3-Exo和SKOV3

DDP-Exo。Western blot检测外泌体标志性蛋白CD63和TSG101在SKOV3-Exo和SKOV3 DDP-Exo中表达 (图1A)。通过动态光散射分析外泌体的颗粒直径, 发现SKOV3-Exo和SKOV3DDP-Exo在形状和大小上差异无统计学意义 (图1B); 透射电子显微镜观察SKOV3-Exo和SKOV3DDP-Exo外泌体的形状类似于标准的碟形囊泡, 形态相似 (图1C)。这些结果表明卵巢癌耐药细胞可以分泌外泌体, 并可能影响其耐药。

对亲本SKOV3和顺铂耐药SKOV3DDP细胞提取的外泌体进行蛋白组学检测。蛋白组分析共鉴定出2 825个蛋白质, 其中有694个差异蛋白 (differential expressed protein, DEP) 及63个SKOV3DDP-Exo特异表达蛋白 ( $|\text{fold change}| > 2$ 且 $P < 0.05$ )。本研究对DEP进行热图分析 (图1D)。DEP中包括396个上调蛋白和298个下调蛋白; 对差异表达蛋白进行GO富集通路分析 (图1E), 发现跨膜转运、细胞增殖及能量代谢有关蛋白在卵巢癌耐药细胞外泌体中富集。为进一步探究外泌体蛋白质与卵巢癌耐药有关的具体分子, 我们将来自HGSOC-Platinum (<https://ngdc.cnbc.ac.cn/databasecommons/>) 网站中的937个铂类药物耐药相关基因作为铂类药物耐药蛋白基因集 (PRR-genes), 同时将课题组之前研究中报道的临床卵巢癌化疗耐药和敏感患者组织的249个差异表达蛋白作为DEP-1集合<sup>[7]</sup>, 与上述外泌体中757个差异表达蛋白 (DEP-2) 进行交集, 韦恩图显示9种在3个集合中共表达蛋白 (图1F)。采用STRING (<https://string-db.org>) 数据库进行PPI (protein-protein interaction) 网络分析, 并使用Cytoscape软件 (3.9.0) 对PPI网络进行可视化, 通过使用插件cytoHubba中的最大团中心算法 (maximal clique centrality, MCC) 进行互作打分 (图1G), 筛选出得分最高的枢纽蛋白, 即ISG15, 提示其在卵巢癌耐药中可能发挥重要作用。

### 2.2 ISG15通过外泌体进入卵巢癌细胞

Western blot检测结果发现, SKOV3DDP-Exo中的ISG15蛋白表达水平明显高于SKOV3-Exo。卵巢癌细胞摄取外泌体研究结果显示, 培养24 h后, 标记有红色荧光的外泌体可以进入SKOV3和A2780细胞 (图2B), 提示外泌体可以进入卵巢癌细胞 (图2C)。加入SKOV3DDP-Exo后, 卵巢癌细胞中ISG15蛋白表达水平明显提高 (图2D), 表明ISG15可以通过外泌体传递到卵巢癌细胞中进一步发挥作用。

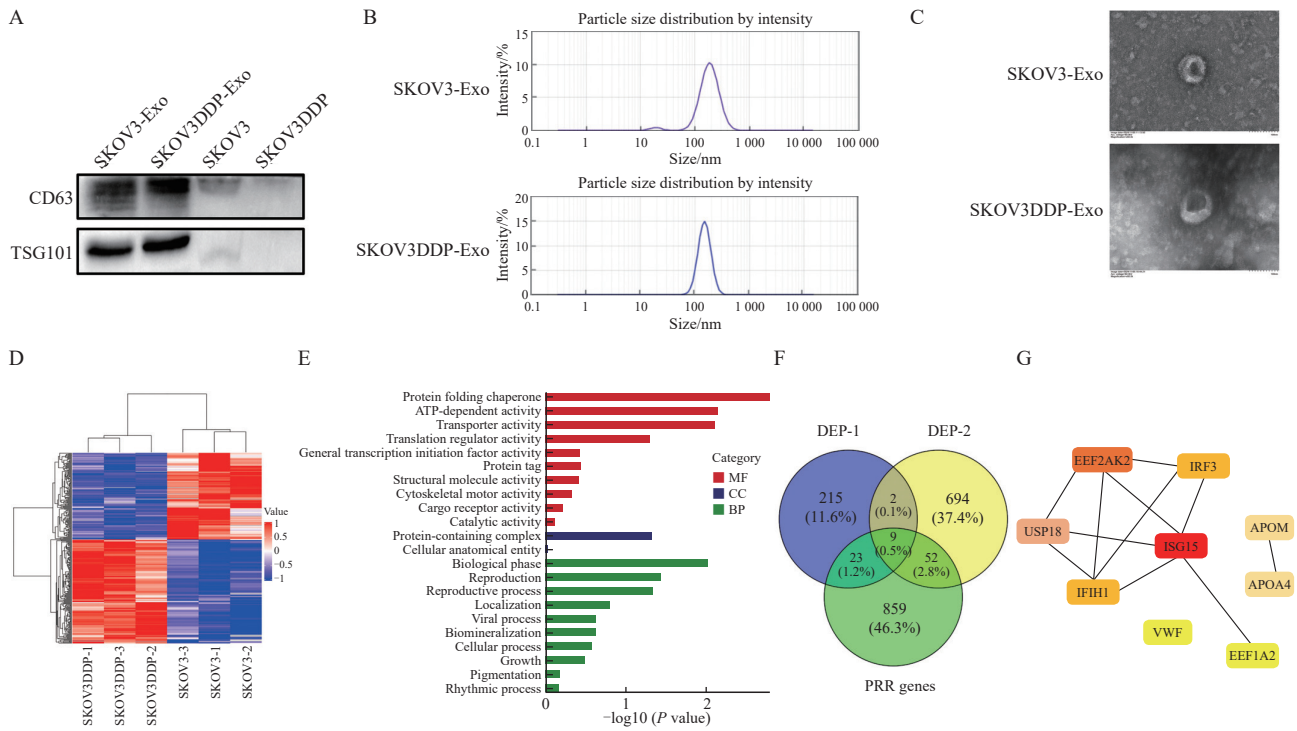


图1 外泌体表征的鉴定及蛋白质组学分析

Fig. 1 Characterization of exosomes and bioinformatics analysis of exosomal proteome

A: Western blot analysis of exosomal markers CD63 and TSG101. B: DLS analysis of exosomes. C: TEM analysis of exosomes. D: Heatmap of DEPs. E: GO analysis of DEPs. F: Venn diagram of PRR-genes, DEP-1 and DEP-2. G: Nine key proteins in the PPI network constructed by the STRING. DEP: Differentially expressed protein; PPI: Protein-protein interaction.

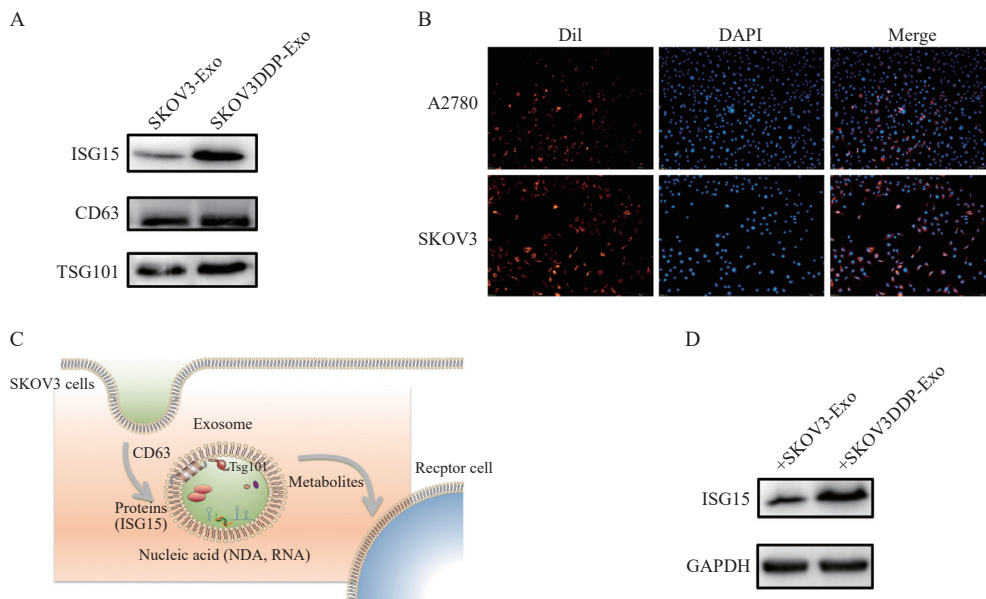


图2 ISG15通过外泌体进入卵巢癌细胞

Fig. 2 ISG15 was delivered to ovarian cancer cells through exosomes

A: ISG15 expression level in SKOV3-Exo and SKOV3DDP-Exo by Western blot. B: Representative fluorescent photos of ovarian cancer cells (SKOV3 and A2780) incubated with Dil-labeled exosomes (Dil in red and DAPI in blue). C: Schematic diagram of exosome entry into recipient cells. D: The SKOV3 cells were cocultured with SKOV3-Exo and SKOV2DDP-Exo, and the ISG15 expression level was detected by Western blot.

2.3 外泌体中ISG15可增强卵巢癌铂类药物耐药性

为了研究外泌体ISG15在卵巢癌铂类药物耐药中的生物学作用, 本研究敲低SKOV3DDP细胞中ISG15, 发现外泌体中的ISG15也相应下调(图

3A)。

在卵巢癌亲本细胞中分别加入PBS、SKOV3-Exo、SKOV3DDP-Exo和si-ISG15-Exo共培养, 使用CCK-8法测定A2780细胞和SKOV3细胞的IC<sub>50</sub>。培养48 h后, 与SKOV3-Exo组相比,

加入SKOV3DDP-Exo后卵巢癌细胞对顺铂的耐药性增强；而与SKOV3DDP-Exo组相比，加入si-ISG15-Exo后卵巢癌细胞对顺铂耐受性降低（图3B）。同样，将A2780或SKOV3细胞与PBS、SKOV3-Exo、SKOV3DDP-Exo和si-ISG15-Exo共培养后，通过集落形成实验分析细胞的增殖和耐药性（图3C）。结果显示，加入顺铂后，SKOV3DDP-Exo组的增殖能力相对于SKOV3-Exo组增强，提示卵巢癌耐药细胞产生的外泌体能够诱导细胞对顺铂的耐药性。而si-ISG15-Exo组比SKOV3DDP-Exo组对顺铂的耐药性明显降低，提示ISG15可通过外泌体增强卵巢癌细胞对铂类药物的耐药性。

#### 2.4 外泌体中ISG15通过调节多耐药蛋白1 (multidrug resistance protein 1, MDR1) 的表达影响卵巢癌铂类药物耐药

本研究进一步探讨外泌体ISG15对卵巢癌细胞铂类药物耐药性产生的机制。此前已有文献报道PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B信号转导通路是细胞内重要

的信号转导途径，在细胞耐药过程中发挥关键作用，而p-NF- $\kappa$ B的激活可以增强多种靶蛋白的表达量，其中就包括MDR1<sup>[8]</sup>。本研究发现，与耐药细胞的外泌体相比，在耐药细胞中敲低ISG15表达，其产生的外泌体进入受体细胞后，细胞中MDR1、p-PI3K、p-AKT、p-NF- $\kappa$ B的表达水平均下降（图4A）。进一步通过PI3K磷酸化抑制剂LY294002、AKT磷酸化抑制剂MK2206和NF- $\kappa$ B磷酸化抑制剂BAY 11-7082抑制PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B信号转导通路作用后，本研究发现，MDR1的表达下调（图4B）。因此，本研究认为，外泌体ISG15可能是通过PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B信号转导通路来调控MDR1的表达，进而影响EOC细胞对铂类药物的耐药性。

#### 2.5 EOC患者血清外泌体中ISG15表达水平与铂类药物耐药有关

本研究共纳入87例于2023年8月—2024年8月在复旦大学附属肿瘤医院确诊并进行治疗的EOC患者（图5）。

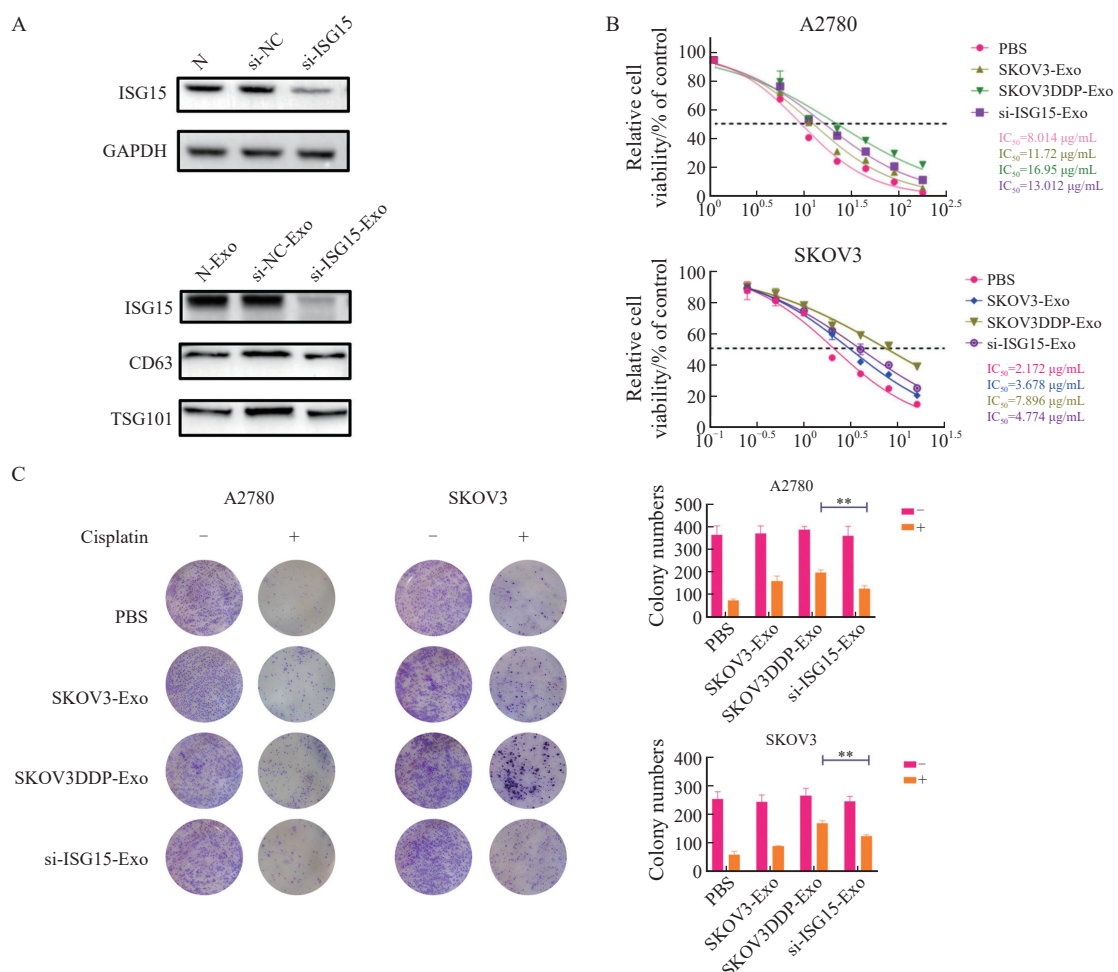


图3 外泌体中ISG15可增强卵巢癌细胞对铂类药物的耐药性

Fig. 3 Exosomal ISG15 improve platinum resistance in ovarian cancer cells

A: Knockdown of ISG15 in SKOV3DDP cell. B: The IC<sub>50</sub> assay of A2780 nad SKOV3. Cells were incubated with PBS, SKOV3-Exo, SKOV3DDP-Exo and si-ISG15-Exo for 48 hours and analysis the cell viability by CCK-8 assays. C: Colony-formation assay shows the number of formed clones. Data were expressed as the  $\bar{x} \pm s$ ;  $n=3$ , \*:  $P<0.05$ , \*\*:  $P<0.01$ . NC: Negative control; N: Blank control.

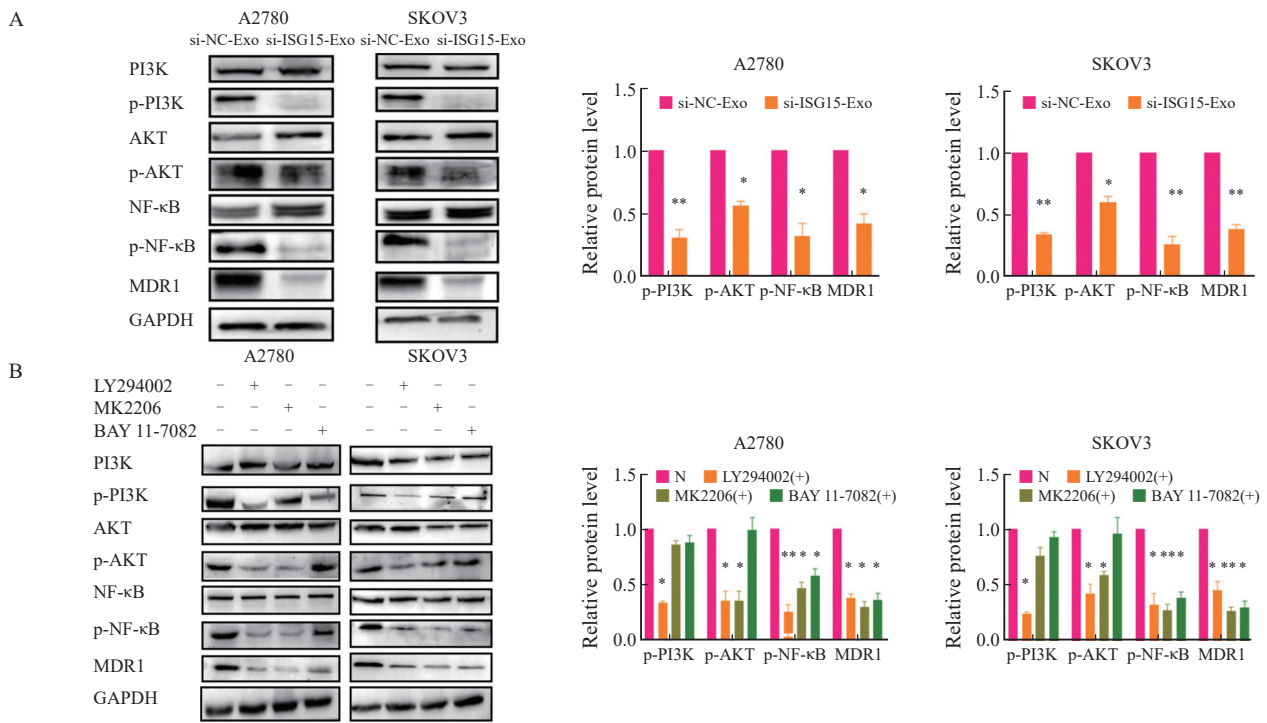


图4 外泌体ISG15通过调节MDR1的表达影响EOC细胞的铂类药物耐药性

Fig. 4 Exosomal ISG15 affects the platinum resistance of EOC cells by regulating the expression of MDR1

A: Western blot showed the protein levels of PI3K, p-PI3K, AKT, p-AKT, NF-κB, p-NF-κB, MDR1 and GAPDH in EOC cells incubated with exosomes (SI-NC-Exos, SI-ISG15-Exos). B: The protein levels of proteins with inhibitors in EOC cells. Data were expressed as the  $\bar{x} \pm s$ ;  $n=3$ , \*:  $P<0.05$ ; \*\*:  $P<0.01$ .

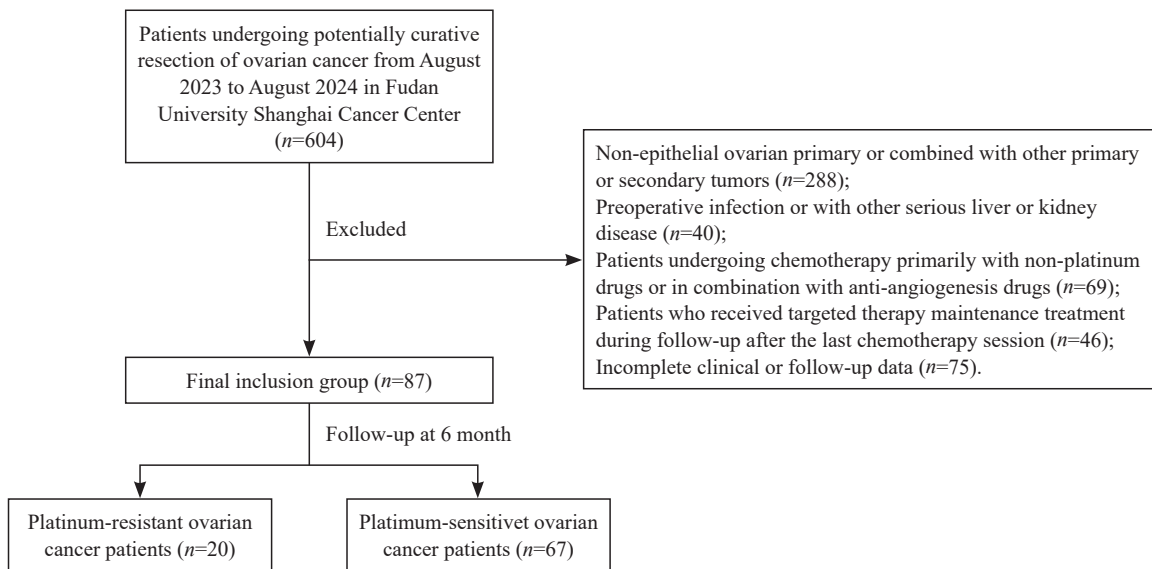


图5 卵巢癌患者入组及随访流程图

Fig. 5 Flowchart of EOC patients' enrollment and follow-up

根据实体肿瘤的反应评价标准 (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors, RECIST) 达到完全缓解的EOC患者87例, 随访至2025年1月, 以复发为观察结局和终点, 共计复发20例, 未复发67例。统计患者信息, 包括姓名、确诊年龄、血清采集时间、手术日期、手术后化疗方案/用药方案、淋巴结转移情况等。收集血清, 通过病历系统及电话随访追踪患者后续耐药

情况等, 从最后一次铂类药物治疗检测到复发或转移的时间小于6个月被认为是铂类药物耐药。我们将20例复发患者记为卵巢癌铂类药物耐药患者; 未复发患者记为卵巢癌铂类药物敏感患者, 从中随机取20例样本用于后续研究。Western blot结果显示, 卵巢癌患者血清外泌体中ISG15的表达, 发现与敏感患者相比, EOC耐药患者血清中ISG15水平升高 (图6A)。使用ELISA对40例卵

巢癌患者血清（耐药组， $n=20$ ；敏感组， $n=20$ ）进行分析，发现敏感组和耐药组的血清中ISG15水平差异无统计学意义；但耐药患者血清外泌体中ISG15水平与敏感患者相比显著升高（图6B）。绘制ROC显示外泌体ISG15的ROC曲线下

面积（area under curve, AUC）为0.779，其临界值（cutoff值）为27.35 ng/mL，灵敏度为70.2%，特异度为76.4%。结果表明，血清外泌体中ISG15对于卵巢癌铂类药物耐药有一定的提示作用（图6C）。

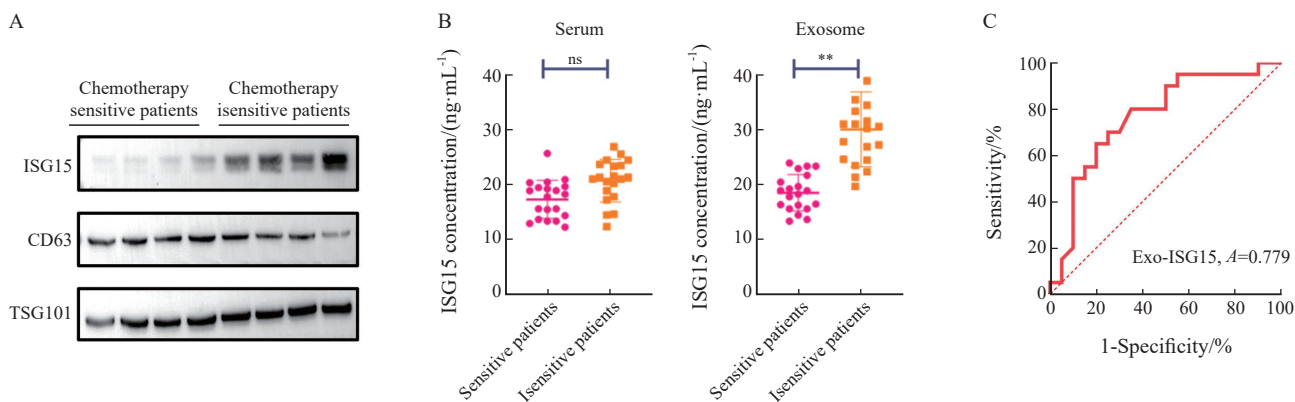


图6 EOC耐药患者血清外泌体中ISG15水平显著升高

Fig. 6 ISG15 levels significantly elevated in serum exosomes of platinum-resistant EOC patients

A: Protein levels of ISG15, CD63 and TSG101 in serum exosome of insensitive patients and sensitive patients. B: ELISA revealed ISG15 concentration in serum and serum exosomes from sensitive patients and insensitive patients (sensitive:  $n=20$ , insensitive:  $n=20$ ). C: Receiver operating characteristic curves of Exo-ISG15. Data were expressed as the  $\bar{x} \pm s$ ; ns: No significance. \*\*:  $P < 0.01$ .

### 3 讨 论

目前，手术治疗和铂类药物化疗仍然是卵巢癌治疗的主要手段<sup>[9]</sup>。但卵巢癌患者易耐药复发，复发后治疗的复杂性增加，这都是导致其高死亡率的重要原因。癌细胞产生的外泌体是肿瘤微环境形成的重要因素，可促进肿瘤细胞增殖、转移、耐药和肿瘤血管生成<sup>[10]</sup>。检测卵巢癌患者血清外泌体的蛋白质谱可能为卵巢癌的诊断和治疗提供新的视角。

本研究对卵巢癌外泌体蛋白进行了蛋白质组学检测，将差异蛋白与已有耐药基因集取交集得到了9个差异蛋白，大部分与免疫反应密切相关。有研究显示，参与先天性免疫的蛋白分子与肿瘤耐药存在相关性<sup>[11]</sup>，如EIF2AK2、ISG15、USP18等，进一步通过生物信息学分析鉴定蛋白互作程度，筛选出关键分子ISG15。ISG15为干扰素相关的DNA损伤抵抗基因，是干扰素刺激基因的一个亚群，在许多癌症类型中被发现上调，促进对DNA的损伤和化疗、放疗的抵抗<sup>[12]</sup>。ISG15可能是外泌体中关键的促耐药蛋白。ISG15是泛素样蛋白超家族成员<sup>[13]</sup>，它以ISGylation类似泛素的修饰的形式在多种细胞通路中发挥作用<sup>[14]</sup>。ISG15作为一个重要的原癌蛋白，是一个潜在的预后生物标志物和癌症的治疗靶点<sup>[15]</sup>。

ISG15在一些肿瘤中高表达并发挥促肿瘤发

生作用，如在鼻咽癌中，ISG15上调促进肿瘤干细胞克隆和成球能力并增加肿瘤细胞对顺铂治疗的耐药性<sup>[16]</sup>。在卵巢癌中，ISG15可以促进外泌体的分泌增加，并与囊泡致癌蛋白的释放共同影响卵巢癌的转移<sup>[17]</sup>。本研究也证实卵巢癌耐药细胞产生的外泌体中高表达ISG15，并且ISG15可进入受体细胞发挥提高其耐药性。本研究发现，ISG15表达水平升高，可通过调控MDR1的表达水平来调节细胞耐药性。MDR1编码的P-糖蛋白是ABC蛋白家族的成员，主要参与多种细胞内外复合物的转运，调节细胞内物质的分布等，MDR1基因的过度表达可能导致肿瘤细胞对多种药物产生耐受<sup>[18]</sup>。

目前，对于卵巢癌耐药的预测尚缺乏有效的生物标志物。本研究发现，血清外泌体ISG15对卵巢癌耐药有一定的提示作用。卵巢癌化疗敏感患者和化疗耐药患者血清中ISG15的表达水平差异无统计学意义，但血清外泌体ISG15存在显著差异，可能是由于以下几个原因：①不同细胞来源的外泌体在蛋白质分泌上存在显著差异，这是由于细胞类型的异质性导致的。血清中不仅含有肿瘤细胞分泌的外泌体，也含有如白细胞、巨噬细胞、间充质干细胞等细胞分泌的外泌体，其来源复杂，外泌体将部分蛋白进行富集，相比血清可以得到更好的可视化。②血清中的蛋白质种类繁多，其中高丰度蛋白（如白蛋白、免疫球蛋白等）占据了总蛋白量的绝大部分。这些高丰度蛋

白在检测过程中会占据主导地位, 其信号强度可能掩盖低丰度蛋白的信号, 使得低丰度蛋白难以被有效地检测和定量<sup>[19]</sup>。而我们经过检测, 血清样本中ISG15含量极低, 由于高丰度蛋白的掩盖效应, 可能会导致其检测变得困难。

综上所述, 血清外泌体ISG15可能对卵巢癌患者的早期铂类药物耐药有一定的预测作用。外泌体作为生物标志物具有来源易得、检测便利、伤害较小等优点, 可以极大地提高诊断效率。当然, 本研究还有一定的局限性, 纳入分析的卵巢癌铂类药物耐药患者例数相对较少, 后续还有待扩大样本量进一步研究。此外, 外泌体ISG15输送到受体细胞的具体机制仍不清楚。综上, 本研究证实, 外周血中的外泌体ISG15可能作为卵巢癌铂类药物耐药的潜在标志物, 为提高卵巢癌的治疗效果提供新的思路。

#### 第一作者:

田亚楠 (ORCID: 0009-0007-1417-6129), 硕士研究生在读。

#### 通信作者:

郭林 (ORCID: 0000-0002-8419-3350), 主任医师, 硕士研究生导师, E-mail: guolin500@hotmail.com。

#### 作者贡献声明:

田亚楠: 实验操作, 数据分析, 文章撰写; 郑慧: 实验设计和监督, 指导文章修改; 严天晴: 实验设计和实验方法指导; 张珩: 指导文章修改; 卢仁泉: 设计研究思路及方案, 审核文章; 郭林: 实验设计, 文章审核定稿。

#### [参 考 文 献]

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, WAGLE N S, et al. Cancer statistics, 2023 [J]. *CA A Cancer J Clinicians*, 2023, 73(1): 17-48.
- [2] STEWART C, RALYEA C, LOCKWOOD S. Ovarian cancer: an integrated review [J]. *Semin Oncol Nurs*, 2019, 35(2): 151-156.
- [3] LI B L, LU W, QU J J, et al. Loss of exosomal miR-148b from cancer-associated fibroblasts promotes endometrial cancer cell invasion and cancer metastasis [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(3): 2943-2953.
- [4] DOYLE L M, WANG M Z. Overview of extracellular vesicles, their origin, composition, purpose, and methods for exosome isolation and analysis [J]. *Cells*, 2019, 8(7): 727.
- [5] ZHANG Y, BI J Y, HUANG J Y, et al. Exosome: a review of its classification, isolation techniques, storage, diagnostic and targeted therapy applications [J]. *Int J Nanomedicine*, 2020, 15: 6917-6934.
- [6] LIU Y X, ZHU K Y, GUAN X L, et al. TTK is a potential therapeutic target for cisplatin-resistant ovarian cancer [J]. *J Ovarian Res*, 2021, 14(1): 128.
- [7] ZHENG H, ZHANG M Q, MA S, et al. Identification of the key genes associated with chemotherapy sensitivity in ovarian cancer patients [J]. *Cancer Med*, 2020, 9(14): 5200-5209.
- [8] LIU J, ZHU M Y, FENG Y, et al. The multidrug resistance can be reversed for the decrease of P-gp and LRP by inhibiting PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B signal pathway in nasopharynx carcinoma [J]. *Biosci Rep*, 2020, 40(5): BSR20190239.
- [9] SANDERCOCK J, PARMAR M B, TORRI V, et al. First-line treatment for advanced ovarian cancer: paclitaxel, platinum and the evidence [J]. *Br J Cancer*, 2002, 87(8): 815-824.
- [10] ROMA-RODRIGUES C, FERNANDES A R, BAPTISTA P V. Exosome in tumour microenvironment: overview of the crosstalk between normal and cancer cells [J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014: 179486.
- [11] MAIORINO L, DABLER-PLENKER J, SUN L J, et al. Innate immunity and cancer pathophysiology [J]. *Annu Rev Pathol*, 2022, 17: 425-457.
- [12] PADARIYA M, SZNARKOWSKA A, KOTE S, et al. Functional interfaces, biological pathways, and regulations of interferon-related DNA damage resistance signature (IRDS) genes [J]. *Biomolecules*, 2021, 11(5): 622.
- [13] NGUYEN H M, GAIKWAD S, OLADEJO M, et al. Interferon stimulated gene 15 (ISG15) in cancer: an update [J]. *Cancer Lett*, 2023, 556: 216080.
- [14] PERNG Y C, LENSCHOW D J. ISG15 in antiviral immunity and beyond [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2018, 16(7): 423-439.
- [15] DESAI S D, WOOD L M, TSAI Y C, et al. ISG15 as a novel tumor biomarker for drug sensitivity [J]. *Mol Cancer Ther*, 2008, 7(6): 1430-1439.
- [16] CHEN R H, DU Y, HAN P, et al. ISG15 predicts poor prognosis and promotes cancer stem cell phenotype in nasopharyngeal carcinoma [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(13): 16910-16922.
- [17] DORAYAPPAN K D P, WAGNER V, PARK D, et al. ISG15 mediates the function of extracellular vesicles in promoting ovarian cancer progression and metastasis [J]. *J Extracell Biol*, 2024, 3(2): e92.
- [18] OYAMA Y, SHIGETA S, TOKUNAGA H, et al. CHD4 regulates platinum sensitivity through MDR1 expression in ovarian cancer: a potential role of CHD4 inhibition as a combination therapy with platinum agents [J]. *PLoS One*, 2021, 16(6): e0251079.
- [19] QIU F H, HOU T Y, HUANG D H, et al. Evaluation of two high-abundance protein depletion kits and optimization of downstream isoelectric focusing [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(5): 7749-7755.

(收稿日期: 2025-01-22 修回日期: 2025-04-01)

(责任编辑: 王琳辉)