

miR-487a通过靶向调控TIA1对胃癌肿瘤相关巨噬细胞M2型极化的抑制作用

曲 颜¹, 戴 霖¹, 王 彪¹, 阮笃激¹, 钟裕昌¹, 杨雪峰^{1,2}

(1. 遵义医科大学第二附属医院胃肠外科, 贵州 遵义 563006; 2. 遵义医科大学附属医院胃肠外科, 贵州 遵义 563000)

[摘要] **目的:** 探讨微小RNA (miR) -487a对胃癌肿瘤相关巨噬细胞 (TAMs) M2型极化的抑制作用, 并阐明其对胃癌 AGS 细胞增殖、侵袭和迁移的影响。**方法:** 分离和培养原发性胃癌患者胃癌组织 TAMs 及癌旁组织来源的正常巨噬细胞 (NTMs), 体外诱导人单核细胞 THP-1 分化为 TAMs, 将分化得到的 M0、M1 和 M2 型巨噬细胞经条件培养基 (CM) 刺激培养 24 h, 分别获取 TAMs、M1-TAMs 和 M2-TAMs。转染 TAMs, 分为空白组、inhibitor-NC 组、miR-487a inhibitor 组、miR-487a inhibitor+si-NC 组和 miR-487a inhibitor+si-TIA1 组, 采用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 法和 Western blotting 法验证转染效率。将 M2-TAMs 与 AGS 细胞共培养, 分为 AGS 组、AGS+inhibitor-NC 组、AGS+miR-487a inhibitor 组、AGS+miR-487a inhibitor+si-NC 组和 AGS+miR-487a inhibitor+si-TIA1 组, RT-qPCR 法检测胃癌组织 TAMs 和癌旁组织 NTMs 及各组 TAMs 中 miR-487a 和 T 淋巴细胞胞浆内抗原-1 (TIA1) mRNA 表达水平, Western blotting 法检测胃癌组织 TAMs 和癌旁组织 NTMs 及各组 TAMs 中 TIA1 蛋白表达水平, 流式细胞术检测各组 TAMs 中 CD206 和 CD163 水平, 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 法检测各组 TAMs 培养上清中白细胞介素 10 (IL-10)、转化生长因子 β (TGF- β)、血管内皮生长因子 A (VEGF-A) 和精氨酸酶 1 (Arg-1) 水平, CCK-8 法检测各组 AGS 细胞增殖活性, 细胞划痕实验检测各组 AGS 细胞迁移率, Transwell 实验检测各组 AGS 细胞侵袭细胞数。**结果:** RT-qPCR 法, 与癌旁组织 NTMs 比较, 胃癌组织 TAMs 中 miR-487a 表达水平明显升高 ($P < 0.01$), TIA1 mRNA 表达水平明显降低 ($P < 0.01$); 与 TAMs 比较, M1-TAMs 中 miR-487a 表达水平明显降低 ($P < 0.01$), TIA1 mRNA 表达水平明显升高 ($P < 0.01$); M2-TAMs 中 miR-487a 表达水平明显升高 ($P < 0.01$), TIA1 mRNA 表达水平明显降低 ($P < 0.01$); 转染后, 与空白组和 inhibitor-NC 组比较, miR-487a inhibitor 组细胞中 miR-487a 表达水平明显降低 ($P < 0.01$), 提示细胞转染成功。Western blotting 法, 与癌旁组织 NTMs 比较, 胃癌组织 TAMs 中 TIA1 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.01$); 与 TAMs 比较, M1-TAMs 中 TIA1 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.01$), M2-TAMs 中 TIA1 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.01$); 共转染后, 与 inhibitor-NC 组比较, miR-487a inhibitor 组细胞中 TIA1 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.01$); 与 miR-487a inhibitor+si-NC 组比较, miR-487a inhibitor+si-TIA1 组细胞中 TIA1 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.01$)。流式细胞术, 与空白组和 inhibitor-NC 组比较, miR-487a inhibitor 组细胞中 CD206 和 CD163 水平明显降低 ($P < 0.01$); 共转染后, 与 inhibitor-NC 组比较, miR-487a inhibitor 组细胞中 CD206 和 CD163 水平均明显降低 ($P < 0.01$); 与 miR-487a inhibitor+si-NC 组比较, miR-487a inhibitor+si-TIA1 组细胞中 CD206 和 CD163 水平均明显升高 ($P < 0.01$)。ELISA 法, 与空白组和 inhibitor-NC 组比较, miR-487a inhibitor 组 TAMs 细胞培养上清中 IL-10、TGF- β 、VEGF-A 和 Arg-1 水平均明显降低 ($P < 0.01$); 共转染后, 与 inhibitor-NC 组比较, miR-487a inhibitor 组 TAMs 细胞培养上清中 IL-10、TGF- β 、VEGF-A 和 Arg-1 水平均明显降低 ($P < 0.01$); 与 miR-487a inhibitor+si-NC 组比较, miR-487a inhibitor+si-TIA1 组 TAMs 细胞培养上清中 IL-10、TGF- β 、VEGF-A 和 Arg-1

[收稿日期] 2023-07-11

[基金项目] 贵州省科技厅科技计划项目 (黔科合基础 [2020] 1Y335)

[作者简介] 曲 颜 (1984-), 男, 山东省临沂市人, 主治医师, 医学硕士, 主要从事消化道肿瘤发病机制方面的研究。

[通信作者] 杨雪峰, 主任医师, 副教授, 硕士研究生导师 (E-mail: yangxuefeng1978@126.com)

水平均明显升高 ($P<0.01$)。CCK-8法, 与 AGS 组比较, AGS+inhibitor-NC 组细胞增殖活性明显升高 ($P<0.01$); 与 AGS+inhibitor-NC 组比较, AGS+miR-487a inhibitor 组细胞增殖活性明显降低 ($P<0.01$); 与 AGS+miR-487a inhibitor+si-NC 组比较, AGS+miR-487a inhibitor+si-TIA1 组细胞增殖活性明显升高 ($P<0.01$)。细胞划痕实验, 与 AGS 组比较, AGS+inhibitor-NC 组 AGS 细胞迁移率明显升高 ($P<0.05$); 与 AGS+inhibitor-NC 组比较, AGS+miR-487a inhibitor 组 AGS 细胞迁移率明显降低 ($P<0.01$); 与 AGS+miR-487a inhibitor+si-NC 组比较, AGS+miR-487a inhibitor+si-TIA1 组 AGS 细胞迁移率明显升高 ($P<0.05$)。Transwell 实验, 与 AGS 组比较, AGS+inhibitor-NC 组 AGS 细胞侵袭细胞数明显升高 ($P<0.01$); 与 AGS+inhibitor-NC 组比较, AGS+miR-487a inhibitor 组 AGS 细胞侵袭细胞数明显降低 ($P<0.01$); 与 AGS+miR-487a inhibitor+si-NC 组比较, AGS+miR-487a inhibitor+si-TIA1 组 AGS 细胞侵袭细胞数明显升高 ($P<0.01$)。**结论:** 沉默 miR-487a 表达可通过靶向上调 TIA1 抑制胃癌肿瘤相关巨噬细胞 M2 型极化, 并抑制胃癌细胞增殖、迁移和侵袭。

[关键词] 胃肿瘤; 微小 RNA-487a; T 淋巴细胞内抗原 1; 肿瘤相关巨噬细胞; M2 型极化

[中图分类号] R735.2 [文献标志码] A

Inhibitory effect of miR-487a on M2-type polarization of gastric cancer tumor-associated macrophages by targeting TIA1

QU Yan¹, DAI Lin¹, WANG Biao¹, RUAN Duji¹, ZHONG Yuchang¹, YANG Xuefeng^{1,2}

(1. Department of Gastrointestinal Surgery, Second Affiliated Hospital, Zunyi Medical University, Zunyi 563006, China; 2. Department of Gastrointestinal Surgery, Affiliated Hospital, Zunyi Medical University, Zunyi 563000, China)

ABSTRACT Objective: To discuss the inhibitory effect of microRNA-487a (miR-487a) on the M2 polarization of tumor-associated macrophages (TAMs) in gastric cancer, and to clarify its effect on the proliferation, invasion, and migration of the gastric cancer AGS cells. **Methods:** The TAMs from gastric cancer tissue and adjacent normal tissue macrophages (NTMs) from adjacent tissue of the primary gastric cancer patients were isolated and cultured. The human monocyte THP-1 cells were induced *in vitro* to differentiate into TAMs, and the differentiated M0, M1, and M2 macrophages were cultured for 24 h by conditioned medium (CM) to obtain the TAMs, M1-TAMs, and M2-TAMs respectively. The TAMs were transfected and then divided into blank group, inhibitor-NC group, miR-487a inhibitor group, miR-487a inhibitor+si-NC group, and miR-487a inhibitor+si-TIA1 group. The transfection efficiencies of the cells in various groups were detected by real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) and Western blotting methods. The M2-TAMs were co-cultured with the AGS cells, and divided into AGS group, AGS+inhibitor-NC group, AGS+miR-487a inhibitor group, AGS+miR-487a inhibitor+si-NC group, and AGS+miR-487a inhibitor+si-TIA1 group. RT-qPCR method was used to detect the expression levels of miR-487a and lymphocyte intracytoplasmic antigen-1 (TIA1) mRNA in TAMs from gastric cancer tissue and NTMs from adjacent normal tissue in various groups; Western blotting method was used to detect the expression level of TIA1 protein in TAMs from gastric cancer tissue and NTMs from adjacent normal tissue and TAMs in various groups; flow cytometry was used to detect the levels of CD206 and CD163 in TAMs in various groups; enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the levels of interleukin-10 (IL-10), transforming growth factor-beta (TGF- β), vascular endothelial growth factor A (VEGF-A), and arginase-1 (Arg-1) in culture supernatant of the TAMs cells; CCK-8 assay was used to detect the proliferative activity of the AGS cells in various groups; wound healing assay was used

to detect the migration rates of the AGS cells in various groups; Transwell assay was used to detect the number of invasion AGS cells in various groups. **Results:** The RT-qPCR results showed that compared with NTMs from adjacent tissue, the expression level of miR-487a in the TAMs from gastric cancer tissue was significantly increased ($P<0.01$) and the expression level of TIA1 mRNA was significantly decreased ($P<0.01$). Compared with TAMs, the expression level of miR-487a in M1-TAMs was significantly decreased ($P<0.01$), and the expression level of TIA1 mRNA was increased ($P<0.01$); the expression level of miR-487a in M2-TAMs was significantly increased ($P<0.01$), and the expression level of TIA1 mRNA was decreased ($P<0.01$). After transfection, compared with blank group and inhibitor-NC group, the expression level of miR-487a in the cells in miR-487a inhibitor group was significantly decreased ($P<0.01$), indicating successful transfection. The Western blotting results showed that compared with NTMs from adjacent normal tissue, the expression level of TIA1 protein in TAMs from gastric cancer tissue was decreased ($P<0.01$); compared with TAMs, the expression level of TIA1 protein in M1-TAMs was significantly increased ($P<0.01$), and the expression of TIA1 protein in M2-TAMs was significantly decreased ($P<0.01$); after co-transfection, compared with inhibitor-NC group, the expression level of TIA1 protein in the cells in miR-487a inhibitor group was significantly increased ($P<0.01$); compared with miR-487a inhibitor+si-NC group, the expression level of TIA1 protein in the cells in miR-487a inhibitor+si-TIA1 group was significantly decreased ($P<0.01$). The flow cytometry results showed that compared with blank group and inhibitor-NC group, the levels of CD206 and CD163 in the cells in miR-487a inhibitor group were significantly decreased ($P<0.01$); after co-transfection, compared with inhibitor-NC group, the levels of CD206 and CD163 in the cells in miR-487a inhibitor group were significantly decreased ($P<0.01$); compared with miR-487a inhibitor+si-NC group, the levels of CD206 and CD163 in the cells in miR-487a inhibitor+si-TIA1 group were significantly increased ($P<0.01$). The ELISA results showed that compared with blank group and inhibitor-NC group, the levels of IL-10, TGF- β , VEGF-A, and Arg-1 in culture supernatant of the TAMs in miR-487a inhibitor group were significantly decreased ($P<0.01$); after co-transfection, compared with inhibitor-NC group, the levels of IL-10, TGF- β , VEGF-A, and Arg-1 in culture supernatant of the TAMs in miR-487a inhibitor group were significantly decreased ($P<0.01$); compared with miR-487a inhibitor+si-NC group, the levels of IL-10, TGF- β , VEGF-A, and Arg-1 in culture supernatant of the TAMs in miR-487a inhibitor+si-TIA1 group were significantly increased ($P<0.01$). The CCK-8 assay results showed that compared with AGS group, the proliferation activity of the cells in AGS+inhibitor-NC group was significantly increased ($P<0.01$); compared with AGS+inhibitor-NC group, the proliferation activity of the cells in AGS+miR-487a inhibitor group was significantly decreased ($P<0.01$); compared with AGS+miR-487a inhibitor+si-NC group, the proliferation activity of the cells in AGS+miR-487a inhibitor+si-TIA1 group was significantly increased ($P<0.01$). The wound healing assay results showed that compared with AGS group, the migration rate of the cells in AGS+inhibitor-NC group was significantly ($P<0.05$); compared with AGS+inhibitor-NC group, the migration rate of the cells in AGS+miR-487a inhibitor group was significantly decreased ($P<0.01$); compared with AGS+miR-487a inhibitor+si-NC group, the migration rate of the cells in AGS+miR-487a inhibitor+si-TIA1 group was significantly increased ($P<0.05$). The Transwell assay results showed that compared with AGS group, the number of invasion AGS cells in AGS + inhibitor-NC group was significantly increased ($P<0.01$); compared with AGS + inhibitor-NC group, the number of invasion AGS cells in AGS+miR-487a inhibitor group was significantly decreased ($P<0.01$); compared with AGS+miR-487a inhibitor+si-NC group, the number of invasion AGS cells in AGS+miR-487a inhibitor+si-TIA1 group was significantly increased ($P<0.01$). **Conclusion:** Silencing the miR-487a expression can inhibit the M2 polarization of the gastric cancer-associated macrophages by targeted upregulation of TIA1, and suppress

the proliferation, migration, and invasion of the gastric cancer cells.

KEYWORDS Gastric neoplasm; MicroRNA-487a; T-lymphocyte-restricted intracellular antigen-1; Tumor-associated macrophage; M2 polarization

胃癌是最为常见的恶性肿瘤之一, 尽管胃癌的诊断方法和治疗手段有较大进步, 但胃癌患者的预后仍然较差, 5年生存率不足30%^[1-3]。肿瘤相关巨噬细胞 (tumor-associated macrophages, TAMs) 是一种肿瘤浸润免疫细胞类型, 通常分为 M1 和 M2 型 2 种功能不同的巨噬细胞亚型, 前者通常具有抗肿瘤功能, 后者可促进肿瘤生长、侵袭、转移和耐药^[4-6]。M1 和 M2 巨噬细胞均具有高度的可塑性, 在肿瘤微环境改变或治疗干预下可以相互转化^[7]。随着 TAMs 与恶性肿瘤之间的关系逐渐明确, TAMs 已成为癌症治疗的新的靶点^[8]。微小 RNA (microRNA, miRNA) 是一类小的非编码 RNA, 具有调节基因表达的作用, 在细胞增殖、分化、代谢和凋亡等多种生物过程中发挥重要作用^[9]。研究^[9-13]显示: miRNA 在多种疾病和癌症的进展过程中异常表达。本课题组前期研究^[12-13]结果显示: miR-487a 可以靶向 T 淋巴细胞胞浆内抗原 1 (T-lymphocyte intracyto plasmic antigen-1, TIA1) 促进胃癌细胞的生长, 并且 M2 巨噬细胞通过外泌体将 miR-487a 转移至胃癌细胞中进而促进胃癌的进展。但 miR-487a 是否在胃癌 TAMs 极化中发挥作用及 TIA1 是否参与调控 M2 型极化, 还有待于进一步研究。本研究探讨 miR-487a 对胃癌 TAMs M2 型极化的影响, 为胃癌治疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 组织样本来源 收集 2020 年 9 月—2021 年 9 月于遵义医科大学附属医院就诊的 14 例原发性胃癌患者胃癌组织 (病理特征一致) 和配对癌旁正常胃组织 (距癌组织边缘 > 5 cm)。所有患者样本使用方案均经遵义医科大学医学伦理委员会批准, 伦理审批号: 遵医伦审 [2019] 1-020 号。

1.2 细胞、主要试剂和仪器 人胃癌系 AGS 细胞和巨噬细胞系 THP-1 细胞购于中国科学院上海细胞生物研究所。RPMI 1640 培养基和胎牛血清购自美国 Invitrogen 公司, 反转录试剂盒购自日本 TaKaRa 公司, Taqman PCR 试剂盒和实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR) 试剂盒均购自美国 Applied Biosystems

公司, TIA1 和 GAPDH 抗体购自美国 Abcam 公司, 标记辣根过氧化物酶二抗购自北京中杉金桥公司, miR-487a inhibitor、inhibitor-NC、si-NC 和 si-TIA1 质粒购自南京 Synthgene 公司, Lipofectamine 2000 购自美国 ThermoFisher 公司, CCK-8 试剂购自上海碧云天生物技术有限公司, CD206 和 CD163 抗体购自美国 BD Biosciences 公司, 白细胞介素 (interleukin, IL) -10、转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)、血管内皮生长因子 A (vascular endothelial growth factor-A, VEGF-A) 和精氨酸酶 1 (arginase-1, Arg-1) 酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒购自美国 eBioscience 公司。超净工作台 (型号: Hfsafe-1500) 购自苏州净化设备有限公司, 倒置显微镜 (型号: BM2100) 购自南京江南永新光学有限公司, 暗盒 (型号: II 型-X 射线) 购自浙江蔚蓝医疗器械有限公司, PCR 扩增仪 (型号: 5331) 购自德国艾本德公司, 酶标仪 (型号: SYNERGY) 购自美国 BioTek 公司。

1.3 胃癌 TAMs 分离 将胃癌组织和癌旁组织分别剪成体积约为 2 mm³ 的碎块, 37 °C 下胶原酶消化 30 min。使用 70 μ m 不锈钢丝网过滤悬液, 得到细胞悬液用磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 洗涤 2 次, 2 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, PBS 缓冲液重悬细胞, 采用密度梯度离心法分离巨噬细胞, 分别获取胃癌组织来源的 TAMs 和癌旁组织来源的正常巨噬细胞 (normal tissue macrophages, NTMs), 保存细胞用于后续实验。

1.4 细胞培养和分化 AGS 细胞和 THP-1 细胞均用含 10% 灭活胎牛血清的 RPMI 1640 培养基培养, 置于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养。将胃癌 AGS 细胞置于无血清 RPMI 1640 培养基中培养 24 h, 收集上清, 经过 0.45 μ m 滤膜过滤获取条件培养基 (conditioned medium, CM)。体外培养人单核 THP-1 细胞, 加入 10 μ g·L⁻¹ 佛波酯 (phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA), 诱导 24 h 分化为未分化的 M0 型巨噬细胞; M0 型巨噬细胞中加入 20 μ g·L⁻¹ γ 干扰素 (interferon- γ , IFN- γ) 和 10 μ g·L⁻¹ 脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS), 诱导 24 h 分化成 M1 型

巨噬细胞; 或加入 $20 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ IL-4 和 $20 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ IL-13 孵育培养 24 h, 分化成 M2 型巨噬细胞。将分化得到的 M0、M1 和 M2 型巨噬细胞经过 CM 刺激培养 24 h, 分别获取 TAMs、M1-TAMs 和 M2-TAMs。

1.5 细胞转染及分组 选取分化得到的胃癌组织 TAMs 细胞, 依照 Lipofectamine 2000 说明书操作, 将 inhibitor-NC 和 miR-487a inhibitor 分别转染至 TAMs 中, 再分别将 si-NC 和 si-TIA1 质粒分别共转染至已转染 miR-487a inhibitor 的 TAMs 及 NTMs 中, 分为 inhibitor-NC 组、miR-487a inhibitor 组、miR-487a inhibitor+si-NC 组和 miR-487a inhibitor+si-TIA1 组, 另设置空白组, 采用 RT-qPCR 和 Western blotting 法验证转染效率。采用 $20 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ IL-4 和 $20 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ IL-13 孵育 24 h, 诱导各组细胞向 M2 型巨噬细胞分化。将诱导分化的各组 TAMs 细胞通过 Transwell 共培养体系与 AGS 细胞共孵育 24 h, 分为 AGS 组、AGS+inhibitor-NC 组、AGS+miR-487a inhibitor 组、AGS+miR-487a inhibitor+si-NC 组和 AGS+miR-487a inhibitor+si-TIA1 组。

1.6 RT-qPCR 法检测胃癌组织 TAMs 和癌旁组织 NTMs 及各组 TAMs 中 miR-487a 和 TIA1 mRNA 表达水平 采用 TRIzol 试剂提取各组细胞总 RNA, 将其逆转录为 cDNA。采用 Taqman PCR 试剂盒, 进行 RT-qPCR 反应。miR-487a 引物序列: miR-487a 上游引物, $5'$ -TTCGCACTGGATACGACA-ACTGG- $3'$, 下游引物, $5'$ -CGCTGGCAATCAT-ACAGGGACATGTGCAGGGTCCGAGGT- $3'$; U6 上游引物, $5'$ -CTCGCTTCGGCAGCACA- $3'$, 下游引物, $5'$ -AACGCTTCACGAATTTGCGT- $3'$ 。反应条件: 95°C 、10 min, 95°C 、10 s, 60°C 、1 min, 共 40 个循环。TIA1 引物序列: TIA1 上游引物, $5'$ -TCCCCTCCAAAGAGTACATATGAG- $3'$, 下游引物, $5'$ -AAACAATTGCATGTGCTGCAC-TTTC- $3'$; GAPDH 上游引物, $5'$ -GATATTGT-TGACATCAATGAC- $3'$, 下游引物, $5'$ -TTGAT-TTTGGAGGGATCTCG- $3'$ 。反应条件: 95°C 预变性 5 min, 95°C 、30 s, 60°C 、30 s, 72°C 、30 s, 共 40 个循环。分别以 U6 和 GAPDH 为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算各组细胞中 miR-487a 和 TIA1 mRNA 表达水平。

1.7 Western blotting 法检测胃癌组织 TAMs 和癌旁组织 NTMs 及各组 TAMs 中 TIA1 蛋白表达水平 收集各组细胞, 采用 RIPA 裂解液裂解细胞, 提取总蛋白, 采用 BCA 法进行蛋白定量。各组取 $20 \mu\text{g}$ 蛋白进行电泳分离, 并将蛋白转至 PVDF 膜。采用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 加一抗 TIA1 (1:1 000) 和 GAPDH (1:1 000), 4°C 孵育轻摇过夜。加入二抗室温孵育 1 h, 化学发光法检测蛋白条带, 采用 Image J 软件分析蛋白条带灰度值, 以 GAPDH 为内参, 计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平=目的蛋白条带灰度值/内参蛋白条带灰度值。

1.8 流式细胞术检测各组 TAMs 中 CD206 和 CD163 水平 收集各组细胞, 采用 4% 多聚甲醛固定 10 min, PBS 缓冲液洗涤 2 次, 加入 0.1% Triton 处理 5 min, 分别加入 PE 标记的抗 CD206 和 FITC 标记的抗 CD163 单抗处理细胞, 于 4°C 避光孵育 30 min, 流式细胞仪检测各组细胞表面 CD206 和 CD163 水平。

1.9 ELISA 法检测各组 TAMs 培养上清中 IL-10、TGF- β 、VEGF-A 和 Arg-1 水平 收集各组细胞培养基, $1\ 000\ \text{g}$ 、 4°C 离心 10 min, 取离心上清。按照 ELISA 试剂盒说明书操作, 检测各组 TAMs 培养上清中 IL-10、TGF- β 、VEGF-A 和 Arg-1 水平。

1.10 CCK-8 法检测各组 AGS 细胞增殖活性 按“1.5”中分组, 转染后的 M2-TAMs 与 AGS 细胞共孵育 24 h, 提前 4 h 向每孔中加入 $20 \mu\text{L}$ CCK-8 溶液, 4 h 后弃去培养液, 每孔加入 $150 \mu\text{L}$ 二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO), 震荡混匀, 采用酶标仪检测 490 nm 波长处的吸光度 (A) 值, 以 A 值代表各组细胞增殖活性。

1.11 细胞划痕实验检测各组 AGS 细胞迁移率

选取与 M2-TAMs 共培养 24 h 后的 AGS 细胞, 以每孔 2.5×10^5 个细胞的密度接种至 6 孔细胞培养板中, 待细胞融合度达到 90% 时, 弃去培养基, 加入不含血清的培养基, 继续培养 24 h, 待细胞融合度达到 100%, 使用移液枪枪头对细胞进行划痕操作, 光学显微镜观察细胞划痕并拍照。采用 Image J 软件计算 0 和 24 h 时的划痕面积, 计算各组细胞迁移率。细胞迁移率=(0 h 划痕面积-24 h 划痕面积)/24 h 划痕面积 $\times 100\%$ 。

1.12 细胞侵袭试验检测 AGS 细胞侵袭细胞数 于含有 Matrigel 基质涂层的 Transwell 板上室中

加入 200 μL AGS 细胞悬液, 含有 2×10^4 个 AGS 细胞, 下室分别加入含 10% FBS 的 500 μL 诱导分化后的 M2-TAMs 细胞悬液, 细胞密度为 $4 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 。培养箱共孵育 24 h 后, 甲醇固定细胞, 以 0.4% 结晶紫染色。于光学显微镜下随机选择 5 个区域进行计数, 计算各组 AGS 细胞侵袭细胞数。

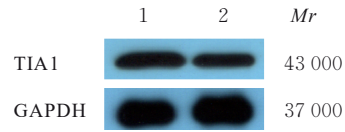
1.13 统计学分析 采用 SPSS 22.0 统计软件进行统计学分析。胃癌组织 TAMs 和癌旁组织 NTMs 中 miR-487a 及 TIA1 mRNA 表达水平, 不同极化类型 TAMs 中 miR-487a 及 TIA1 mRNA 表达水平, 转染后各组 TAMs 中 CD206 和 CD163 水平, 各组 TAMs 培养上清中 IL-10、TGF- β 、VEGF-A 和 Arg-1 水平, 各组 AGS 细胞增殖活性、细胞迁移率和细胞侵袭数均符合正态分布且方差齐, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间样本均数比较采用单因素方差分析, 组间样本均数两两比较采用 LSD-*t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胃癌组织 TAMs 和癌旁组织 NTMs 及各组 TAMs 中 miR-487a 和 TIA1 mRNA 表达水平 与癌旁组织 NTMs (0.99 ± 0.04 和 0.98 ± 0.04) 比较, 胃癌组织 TAMs 中 miR-487a 表达水平 (7.65 ± 2.45) 明显升高 ($P < 0.01$), TIA1 mRNA 表达水平 (0.17 ± 0.09) 明显降低 ($P < 0.01$)。与 TAMs (1.01 ± 0.09 和 1.02 ± 0.09) 比较, M1-TAMs 中 miR-487a 表达水平 (0.28 ± 0.04) 明显降低 ($P < 0.01$), TIA1 mRNA 表达水平 (7.75 ± 2.10) 明显升高 ($P < 0.01$); M2-TAMs 中 miR-487a 表达水平 (5.11 ± 0.69) 明显升高 ($P < 0.01$), TIA1 mRNA 表达水平 (0.19 ± 0.07) 明显降低 ($P < 0.01$)。转染后, 与空白组 (1.01 ± 0.07) 和 inhibitor-NC 组 (0.98 ± 0.02) 比较, miR-487a inhibitor 组细胞中 miR-487a 表达水平 (0.20 ± 0.03) 明显降低 ($P < 0.01$)。提示 miR-487a inhibitor 转染成功。

2.2 胃癌组织 TAMs 和癌旁组织 NTMs 及各组 TAMs 中 TIA1 蛋白表达水平 与癌旁组织 NTMs (1.05 ± 0.08) 比较, 胃癌组织 TAMs 中 TIA1 蛋白表达水平 (0.58 ± 0.08) 明显降低 ($P < 0.01$)。与 TAMs (0.42 ± 0.05) 比较, M1-TAMs 中 TIA1 蛋白表达水平 (0.99 ± 0.07) 明显升高 ($P < 0.01$), M2-TAMs 中 TIA1 蛋白表达水平 (0.07 ± 0.05) 明显降低 ($P < 0.01$)。共转染后, 与 inhibitor-NC 组

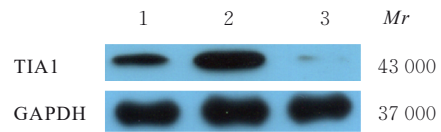
(0.48 ± 0.03) 比较, miR-487a inhibitor 组细胞中 TIA1 蛋白表达水平 (0.86 ± 0.04) 明显升高 ($P < 0.01$); 与 miR-487a inhibitor+si-NC 组 (0.85 ± 0.05) 比较, miR-487a inhibitor+si-TIA1 组细胞中 TIA1 表达水平 (0.62 ± 0.04) 明显降低 ($P < 0.01$)。见图 1~3。



Lane 1: NTMs; Lane 2: TAMs.

图 1 癌旁组织 NTMs 和胃癌组织 TAMs 中 TIA1 蛋白表达电泳图

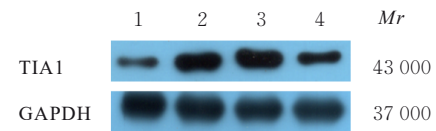
Fig. 1 Electrophoregram of expressions of TIA1 protein in NTMs from adjacent tissue and TAMs from gastric cancer tissue



Lane 1: TAMs; Lane 2: M1-TAMs; Lane 3: M2-TAMs.

图 2 不同极化类型 TAMs 中 TIA1 蛋白表达电泳图

Fig. 2 Electrophoregram of expression of TIA1 protein in TAMs with different types of polarization



Lane 1: Inhibitor-NC group; Lane 2: MiR-487a inhibitor group; Lane 3: MiR-487a inhibitor+si-NC group; Lane 4: MiR-487a inhibitor+si-TIA1 group.

图 3 共转染后各组 TAMs 中 TIA1 蛋白表达电泳图

Fig. 3 Electrophoregram of expressions of TIA1 protein in TAMs in various groups after co-transfection

2.3 各组 TAMs 中 CD206 和 CD163 水平 与空白组 ($76.60\% \pm 0.96\%$ 和 $81.38\% \pm 1.40\%$) 和 inhibitor-NC 组 ($76.24\% \pm 1.08\%$ 和 $81.13\% \pm 1.88\%$) 比较, miR-487a inhibitor 组细胞中 M2 巨噬细胞表面标志物 CD206 和 CD163 水平 ($56.72\% \pm 1.20\%$ 和 $61.83\% \pm 1.52\%$) 明显降低 ($P < 0.01$)。共转染后, 与 inhibitor-NC 组 ($77.86\% \pm 1.25\%$ 和 $81.76\% \pm 1.15\%$) 比较, miR-487a inhibitor 组细胞中 CD206 和 CD163 水平 ($58.13\% \pm 1.34\%$ 和

62.43%±1.19%) 均明显降低 ($P<0.01$); 与 miR-487a inhibitor+si-NC 组 (58.43%±1.49% 和 62.53%±1.42%) 比较, miR-487a inhibitor+si-

TIA1 组细胞中 CD206 和 CD163 水平 (73.40%±1.49% 和 77.96%±2.22%) 均明显升高 ($P<0.01$)。见图 4 和 5。

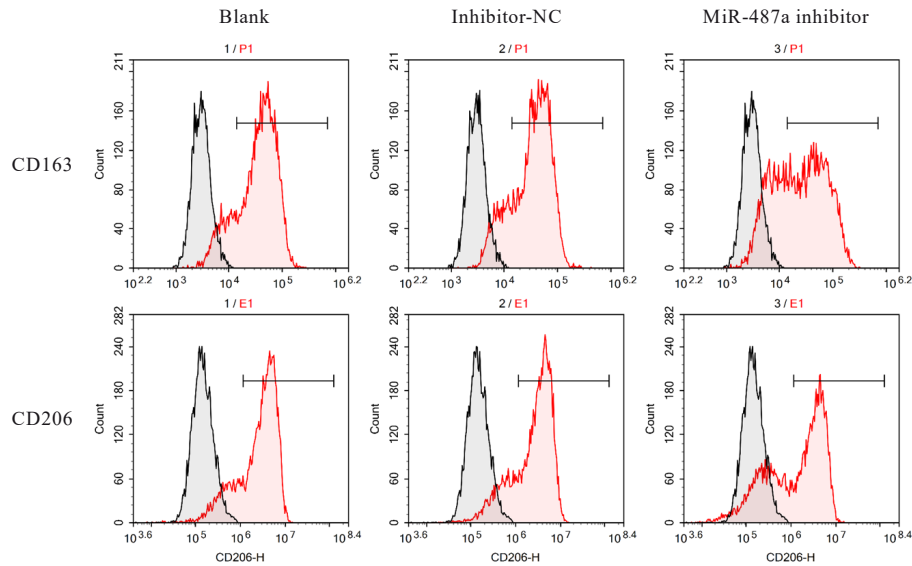


图4 流式细胞术检测各组 TAMs 中 CD206 和 CD163 水平

Fig. 4 Levels of CD206 and CD163 in TAMs in various groups detected by flow cytometry

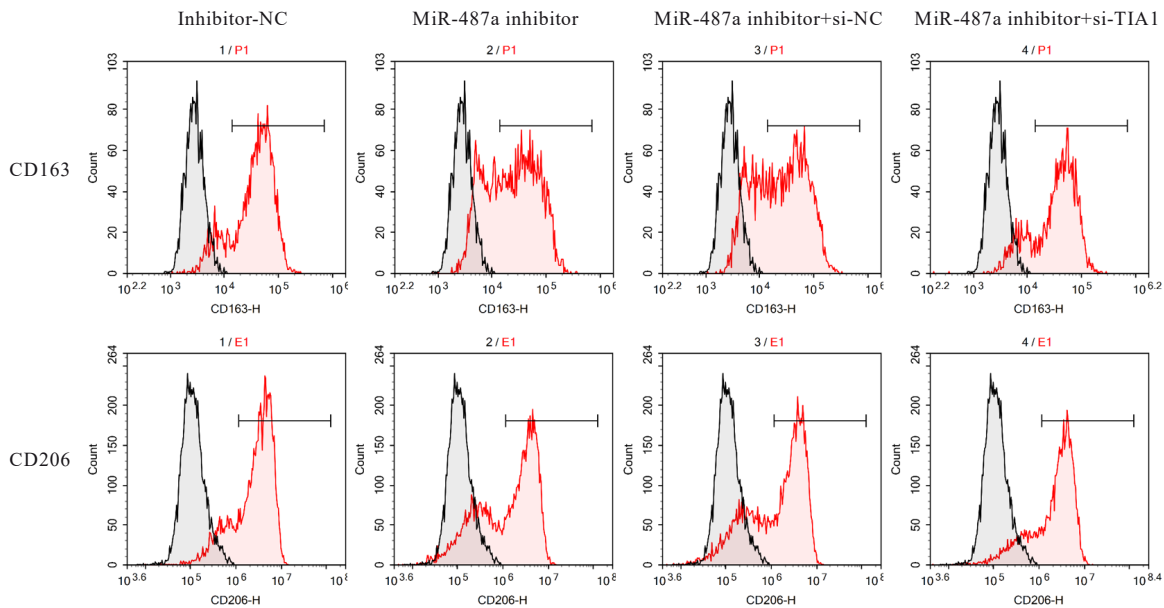
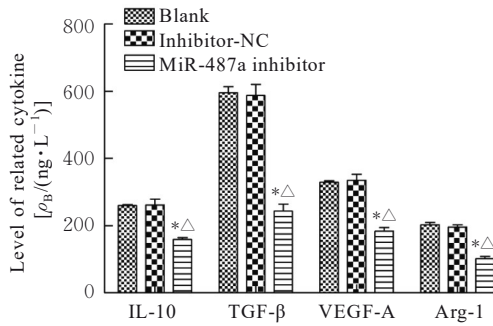


图5 流式细胞术检测共转染后各组 TAMs 中 CD206 和 CD163 水平

Fig. 5 Levels of CD206 and CD163 in TAMs in various groups detected by flow cytometry after co-transfection

2.4 各组 TAMs 培养上清中 IL-10、TGF- β 、VEGF-A 和 Arg-1 水平 与空白组和 inhibitor-NC 组比较, miR-487a inhibitor 组 TAMs 培养上清中 M2 巨噬细胞相关细胞因子 IL-10、TGF- β 、VEGF-A 和 Arg-1 水平均明显降低 ($P<0.01$)。共转染后, 与 inhibitor-NC 组比较, miR-487a inhibitor 组 TAMs

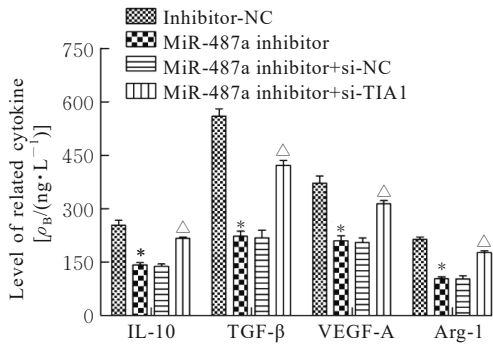
细胞培养上清中 IL-10、TGF- β 、VEGF-A 和 Arg-1 水平均明显降低 ($P<0.01$); 与 miR-487a inhibitor+si-NC 组比较, miR-487a inhibitor+si-TIA1 组 TAMs 细胞培养上清中 IL-10、TGF- β 、VEGF-A 和 Arg-1 水平均明显升高 ($P<0.01$)。见图 6 和 7。



* $P < 0.01$ compared with blank group; $\Delta P < 0.01$ compared with inhibitor-NC group.

图 6 各组 TAMs 培养上清中 IL-10、TGF-β、VEGF-A 和 Arg-1 水平

Fig. 6 Levels of IL-10, TGF-β, VEGF-A, and Arg-1 in culture supernatant of TAMs in various groups



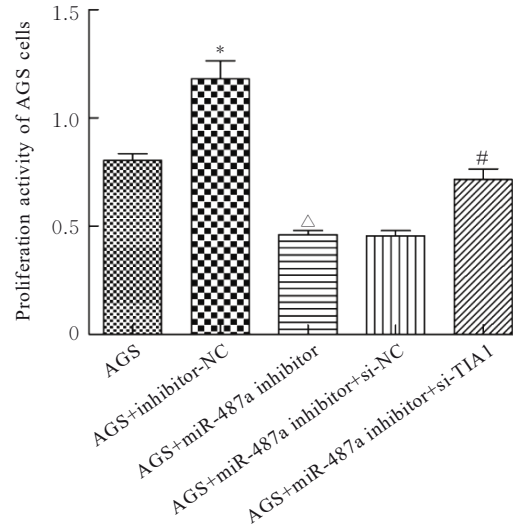
* $P < 0.01$ compared with inhibitor-NC group; $\Delta P < 0.01$ compared with miR-487a inhibitor+si-NC group.

图 7 共转染后各组 TAMs 培养上清中 IL-10、TGF-β、VEGF-A 和 Arg-1 水平

Fig. 7 Levels of IL-10, TGF-β, VEGF-A, and Arg-1 in culture supernatant of TAMs in various groups after co-transfection

2.5 各组 AGS 细胞增殖活性 与 AGS 组比较, AGS+inhibitor-NC 组细胞增殖活性明显升高 ($P < 0.01$)。与 AGS+inhibitor-NC 组比较, AGS+miR-487a inhibitor 组细胞增殖活性明显降低 ($P < 0.01$)。与 AGS+miR-487a inhibitor+si-NC 组比较, AGS+miR-487a inhibitor+si-TIA1 组细胞增殖活性明显升高 ($P < 0.01$)。见图 8。

2.6 各组 AGS 细胞迁移率 与 AGS 组比较, AGS+inhibitor-NC 组 AGS 细胞迁移率明显升高 ($P < 0.05$)。与 AGS+inhibitor-NC 组比较, AGS+miR-487a inhibitor 组 AGS 细胞迁移率明显降低 ($P < 0.01$)。与 AGS+miR-487a inhibitor+si-NC 组比较, AGS+miR-487a inhibitor+si-TIA1 组 AGS 细胞迁移率明显升高 ($P < 0.05$)。见图 9 和 10。



* $P < 0.01$ compared with AGS group; $\Delta P < 0.01$ compared with AGS+inhibitor-NC group; # $P < 0.05$ compared with AGS+miR-487a inhibitor+si-NC group.

图 8 各组 AGS 细胞增殖活性

Fig. 8 Proliferation activities of AGS cells in various groups

2.7 各组 AGS 细胞侵袭细胞数 与 AGS 组比较, AGS+inhibitor-NC 组 AGS 细胞侵袭细胞数明显升高 ($P < 0.01$)；与 AGS+inhibitor-NC 组比较, AGS+miR-487a inhibitor 组 AGS 细胞侵袭细胞数明显降低 ($P < 0.01$)；与 AGS+miR-487a inhibitor+si-NC 组比较, AGS+miR-487a inhibitor+si-TIA1 组 AGS 细胞侵袭细胞数明显升高 ($P < 0.01$)。见图 11 和 12。

3 讨论

TAMs 是参与肿瘤微环境形成的巨噬细胞, 通常分为 M1 和 M2 型 2 种巨噬细胞, 其中 M1 巨噬细胞是抗肿瘤细胞, M2 巨噬细胞可发挥促癌作用 [14-15]。研究 [8, 16] 显示: M2 极化巨噬细胞对胃癌患者预后具有负向作用, 且胃癌细胞与 TAMs 之间存在正反馈回路促进肿瘤进展。巨噬细胞极化是指巨噬细胞在单一时间点的激活状态, 由于巨噬细胞的可塑性, 其极化状态在肿瘤微环境改变或治疗干预下可以相互转化 [7]。因此, 靶向 TAMs 可作为一种新的癌症治疗策略, 包括限制单核细胞募集、靶向激活 TAMs、将 TAMs 重新编程为抗肿瘤活性及靶向 TAMs 特异性标记物 [7]。研究 [17] 显示: 硫酸葡聚糖通过干扰 M2 型巨噬细胞极化抑制胃癌血管生成和侵袭。胃癌中过量的痤疮丙酸杆菌通过 Toll 样受体 4 (Toll-like receptors, TLR4) /

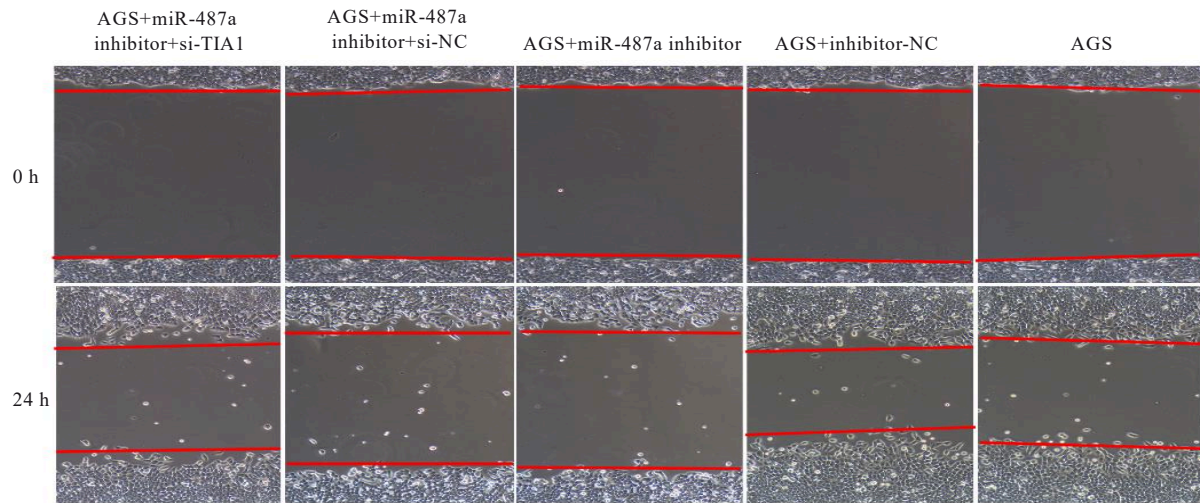
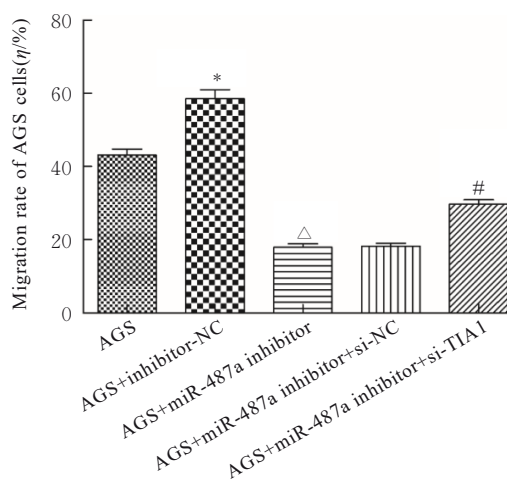


图9 细胞划痕实验检测各组AGS细胞迁移情况($\times 200$)

Fig. 9 Migration of AGS cells in various groups detected by cell scratch assay($\times 200$)



* $P < 0.05$ compared with AGS group; $^{\Delta}P < 0.01$ compared with AGS+inhibitor-NC group; $^{\#}P < 0.05$ compared with AGS+miR-487a inhibitor+si-NC group.

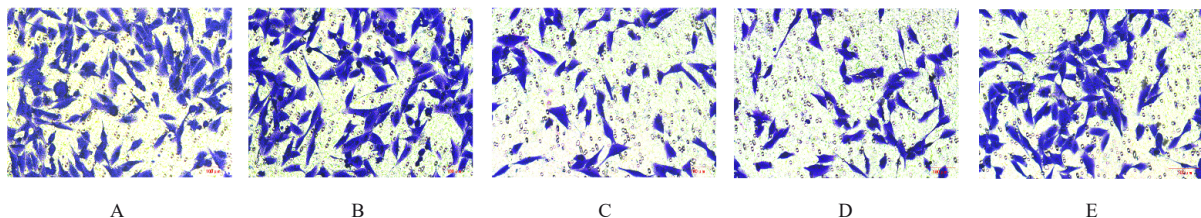
图10 各组AGS细胞迁移率

Fig. 10 Migration rates of AGS cells in various groups

磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) /蛋白激酶 B (protein kinase B, AKT) 信

号促进巨噬细胞 M2 极化, 促进肿瘤进展^[18]。TAMs 现已成为胃癌治疗新的靶点。

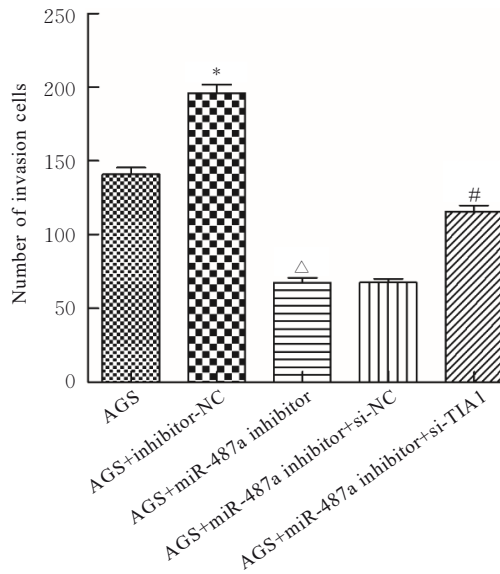
miRNAs 在细胞增殖、分化和凋亡等多种过程中发挥重要作用, 并且在许多疾病和癌症的进展过程中异常表达^[9]。研究^[19]显示: 胃癌外泌体衍生的 miR-151-3p 可诱导 M2 巨噬细胞极化, 促进胃癌的生长。胃癌源性外泌体 miR-519a-3p 通过诱导肝内 M2 型巨噬细胞介导的血管生成促进肝转移^[20]。提示 miRNAs 可在巨噬细胞 M2 极化过程中发挥重要作用。TIA1 是一种 RNA 结合蛋白, 可以调节 RNA 代谢, 在人体生理和病理过程中发挥重要作用^[11, 21]。研究^[12]显示: TIA1 在胃癌细胞中表达下调, 是胃癌中的肿瘤抑制基因。miR-487a 可以靶向 TIA1, 在体内和体外促进胃癌细胞的生长。M2 巨噬细胞外泌体可将 miR-487a 转移到胃癌细胞中, 促进胃癌的进展^[13]。但 miR-487a 对胃癌 TAMs M2 型极化的影响尚未完全阐明。本研究结果显示: 胃癌组织分离培养得到的 TAMs 中 miR-



A: AGS group; B: AGS+inhibitor-NC group; C: AGS+miR-487a inhibitor group; D: AGS+miR-487a inhibitor+si-NC group; E: AGS+miR-487a inhibitor+si-TIA1 group.

图11 Transwell实验检测各组AGS细胞侵袭情况(结晶紫, $\times 200$)

Fig. 11 Invasion of AGS cells in various groups detected by Transwell assay(Crystal violet, $\times 200$)



* $P < 0.01$ compared with AGS group; ^Δ $P < 0.01$ compared with AGS+inhibitor-NC group; [#] $P < 0.01$ compared with AGS+miR-487a inhibitor+si-NC group.

图 12 各组 AGS 细胞侵袭细胞数

Fig. 12 Numbers of invasion AGS cells in various groups

487a 高表达, 而 TIA1 mRNA 和蛋白低表达。分化后的巨噬细胞经 CM 刺激培养后, M1-TAMs 中 miR-487a 低表达, TIA1 mRNA 和蛋白高表达, 而在 M2-TAMs 中则相反。通过下调 miR-487a, 细胞中 M2 巨噬细胞表面标志物 CD206 和 CD163 水平降低, 细胞培养上清中 M2 巨噬细胞相关细胞因子 IL-10、TGF- β 、VEGF-A 和 Arg-1 水平降低, M2 型极化被抑制。提示下调 miR-487a 表达可以抑制胃癌 TAMs 的 M2 型极化表型。本研究结果显示: 沉默 TIA1 基因可逆转下调 miR-487a 对胃癌 TAMs M2 型极化表型的抑制作用。提示下调 miR-487a 可以通过靶向上调 TIA1 表达抑制胃癌 TAMs M2 型极化。通过 M2 型巨噬细胞与胃癌 AGS 细胞共孵育, 进一步研究下调 miR-487a 抑制胃癌 TAMs M2 型极化对胃癌 AGS 细胞的影响, 结果显示: 下调 miR-487a 抑制胃癌 TAMs M2 型极化可以抑制胃癌 AGS 细胞增殖活性、细胞迁移和侵袭能力, 沉默 TIA1 基因可逆转 miR-487a 下调对胃癌 AGS 细胞增殖活性、迁移和侵袭能力的抑制作用。

综上所述, 沉默 miR-487a 表达可通过靶向上调 TIA1 表达抑制胃癌肿瘤相关巨噬细胞 M2 型极化, 并抑制胃癌细胞增殖、迁移和侵袭。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

曲颜参与实验实施和论文撰写, 戴霖、王彪和阮笃激参与实验实施、实验数据分析及整理, 钟裕昌参与文献检索和论文修改, 杨雪峰参与文章实验设计、论文修改和审校。

[参考文献]

- [1] SMYTH E C, NILSSON M, GRABSCH H I, et al. Gastric cancer[J]. *Lancet*, 2020, 396(10251): 635-648.
- [2] SALVATORI S, MARAFINI I, LAUDISI F, et al. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: pathogenetic mechanisms[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(3): 2895.
- [3] GUAN W L, HE Y, XU R H. Gastric cancer treatment: recent progress and future perspectives[J]. *J Hematol Oncol*, 2023, 16(1): 57.
- [4] PAN Y Y, YU Y D, WANG X J, et al. Tumor-associated macrophages in tumor immunity [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 583084.
- [5] MUNIR M T, KAY M K, KANG M H, et al. Tumor-associated macrophages as multifaceted regulators of breast tumor growth[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(12): 6526.
- [6] RIHAWI K, RICCI A D, RIZZO A, et al. Tumor-associated macrophages and inflammatory microenvironment in gastric cancer: novel translational implications[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(8): 3805.
- [7] BOUTILIER A J, ELSAWA S F. Macrophage polarization states in the tumor microenvironment[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(13): 6995.
- [8] GAMBARDELLA V, CASTILLO J, TARAZONA N, et al. The role of tumor-associated macrophages in gastric cancer development and their potential as a therapeutic target [J]. *Cancer Treat Rev*, 2020, 86: 102015.
- [9] HO P T B, CLARK I M, LEL T T. MicroRNA-based diagnosis and therapy[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(13): 7167.
- [10] LIU S Z, ZHAO Y L, ZHAO Y B, et al. The prognostic value of miR-487a in clear cell renal cell carcinoma and its influence on cell biological behavior[J]. *Arch Esp Urol*, 2022, 75(4): 346-353.
- [11] LIU Y Q, LIU R, YANG F, et al. MiR-19a promotes colorectal cancer proliferation and migration by targeting TIA1[J]. *Mol Cancer*, 2017, 16(1): 53.
- [12] YANG X F, WANG M D, LIN B H, et al. MiR-487a promotes progression of gastric cancer by targeting

- TIA1[J]. *Biochimie*, 2018, 154: 119-126.
- [13] YANG X F, CAI S, SHU Y, et al. Exosomal miR-487a derived from m2 macrophage promotes the progression of gastric cancer[J]. *Cell Cycle*, 2021, 20(4): 434-444.
- [14] XIANG X N, WANG J G, LU D, et al. Targeting tumor-associated macrophages to synergize tumor immunotherapy [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1): 75.
- [15] ZHENG P M, CHEN L, YUAN X L, et al. Exosomal transfer of tumor-associated macrophage-derived miR-21 confers cisplatin resistance in gastric cancer cells[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2017, 36(1): 53.
- [16] PIAO H Y, FU L F, WANG Y X, et al. A positive feedback loop between gastric cancer cells and tumor-associated macrophage induces malignancy progression[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2022, 41(1): 174.
- [17] GUO J X, LI Z J, MA Q, et al. Dextran sulfate inhibits angiogenesis and invasion of gastric cancer by interfering with M2-type macrophages polarization[J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2022, 22(11): 904-918.
- [18] LI Q, WU W, GONG D X, et al. *Propionibacterium acnes* overabundance in gastric cancer promote M2 polarization of macrophages via a TLR4/PI3K/Akt signaling[J]. *Gastric Cancer*, 2021, 24(6): 1242-1253.
- [19] XIE S L, ZHU Y K, WANG S, et al. MiR-151-3p derived from gastric cancer exosomes induces M2-phenotype polarization of macrophages and promotes tumor growth[J]. *Chin J Cell Mol Immunol*, 2022, 38(7): 584-589.
- [20] QIU S K, XIE L, LU C, et al. Gastric cancer-derived exosomal miR-519a-3p promotes liver metastasis by inducing intrahepatic M2-like macrophage-mediated angiogenesis[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2022, 41(1): 296.
- [21] GOURDOMICHALI O, ZONKE K, KATTAN F G, et al. *In situ* peroxidase labeling followed by mass-spectrometry reveals TIA1 interactome [J]. *Biology*, 2022, 11(2): 287.