

miR-761通过调控肿瘤相关巨噬细胞极化对骨肉瘤MG63细胞 上皮-间质转化的影响

高世磊, 王家强, 姚伟涛, 田志超, 李超, 梁潇潇, 王鑫
(郑州大学附属肿瘤医院 河南省肿瘤医院骨与软组织科, 河南 郑州 450008)

[摘要] **目的:** 分析外泌体(Exo)微小RNA-761(miR-761)通过调控肿瘤相关巨噬细胞(TAM)极化对骨肉瘤(OS)细胞上皮-间质转化(EMT)进程的影响, 阐明其相关的作用机制。**方法:** miR-761质粒和阴性对照(miR-NC)质粒分别转染至HEK239细胞中, 同时设不转染的细胞为对照组, 实时荧光定量PCR(RT-qPCR)法检测转染效果。分离含miR-761的Exo, 采用透射电镜观察Exo形态, 采用纳米颗粒分析仪检测Exo样品浓度和粒径分布, Western blotting法检测Exo表面标志蛋白表达情况。采用佛波酯(PMA)刺激人单核细胞白血病THP-1细胞成为M0巨噬细胞, 采用含miR-761的Exo处理M0巨噬细胞并与OS MG63细胞建立共培养体系, 实验分组为M0组、TAM组、miR-761 NC组和miR-761 Exo组, 收集各组M0巨噬细胞, 流式细胞术检测各组细胞中M1巨噬细胞标志物CD86和M2巨噬细胞标志物CD206阳性率, Western blotting法检测各组细胞中M1巨噬细胞分泌因子白细胞介素 1β (IL- 1β)及肿瘤坏死因子 α (TNF- α)和M2巨噬细胞分泌因子白细胞介素10(IL-10)及转化生长因子 β 1(TGF- β 1)蛋白表达水平; 采用含miR-761的Exo处理M0巨噬细胞并与MG63细胞建立共培养体系, 实验分为对照组、TAM组、miR-NC Exo+TAM组和miR-761 Exo+TAM组, 收集各组MG63细胞, 免疫荧光染色法观察各组MG63细胞中E-钙黏附蛋白(E-cadherin)和波形蛋白(Vimentin)荧光强度, Western blotting法检测各组细胞中E-cadherin、Vimentin及EMT调控相关转录因子Twist1、Snail和Slug蛋白表达水平, Transwell小室实验检测各组MG63细胞中侵袭和迁移细胞数。**结果:** 通过转染实验成功获得含miR-761的HEK239细胞, 并分离得到Exo。与M0组比较, TAM组巨噬细胞中CD86阳性率降低($P<0.05$), CD206阳性率升高($P<0.05$), IL- 1β 和TNF- α 蛋白表达水平降低($P<0.05$), IL-10和TGF- β 1蛋白表达水平升高($P<0.05$); 与TAM组比较, miR-761 Exo组巨噬细胞中CD86阳性率升高($P<0.05$), CD206阳性率降低($P<0.05$), IL- 1β 和TNF- α 蛋白表达水平升高($P<0.05$), IL-10和TGF- β 1蛋白表达水平降低($P<0.05$)。与对照组比较, TAM组MG63细胞中E-cadherin荧光表达强度减弱而Vimentin荧光表达强度增强, E-cadherin蛋白表达水平降低($P<0.05$), Vimentin、Twist1、Snail和Slug蛋白表达水平升高($P<0.05$), 迁移细胞数和侵袭细胞数增加($P<0.05$); 与TAM组比较, miR-761 Exo+TAM组MG63细胞中E-cadherin荧光表达强度增强而Vimentin荧光表达强度减弱, E-cadherin蛋白表达水平升高($P<0.05$), Vimentin、Twist1、Snail和Slug蛋白表达水平降低($P<0.05$), 迁移细胞数和侵袭细胞数减少($P<0.05$)。**结论:** Exo传递miR-761能够抑制OS细胞EMT进程, 进而抑制细胞的迁移和侵袭, 其作用机制可能与调控TAM极化作用有关。

[关键词] 骨肉瘤; 微小RNA-761; 外泌体; 上皮-间质转化; 肿瘤相关巨噬细胞极化

[中图分类号] R738.1 **[文献标志码]** A

[收稿日期] 2023-09-18

[基金项目] 河南省科技厅科技发展计划项目(222102310131)

[作者简介] 高世磊(1988—), 男, 河南省郑州市人, 主治医师, 医学硕士, 主要从事骨肿瘤、软组织肿瘤和骨转移癌诊断及治疗方面的研究。

[通信作者] 王鑫, 副主任医师(E-mail: superwx1984@163.com)

Effect of miR-761 on epithelial-mesenchymal transition in osteosarcoma MG63 cells by regulating tumor-associated macrophage polarization

GAO Shilei, WANG Jiaqiang, YAO Weitao, TIAN Zhichao, LI Chao, LIANG Xiaoxiao, WANG Xin
(Department of Bone and Soft Tissue, Affiliated Tumor Hospital, Zhengzhou University, Henan Cancer Hospital, Zhengzhou 450008, China)

ABSTRACT Objective: To discuss the effect of exosome (Exo) microRNA-761 (miR-761) on the epithelial-mesenchymal transition (EMT) process of the osteosarcoma (OS) cells by regulating tumor-associated macrophage (TAM) polarization, and to clarify its related mechanism. **Methods:** The miR-761 plasmid and negative control (miR-NC) plasmid were transfected into the HEK293 cells, and the non-transfected cells were regarded as control group. The transfection efficiency was detected using real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) method. The Exo containing miR-761 was isolated, and the morphology of Exo was observed by transmission electron microscope. The concentration and size distribution of Exo samples were detected by nanoparticle analyzer, and the expression of Exo surface marker protein was detected by Western blotting method. The human monocyte leukemia THP-1 cells were stimulated with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) to become the M0 macrophages, which were then treated with Exo containing miR-761 and co-cultured with the OS MG63 cells to establish the co-culture system. The experiment was divided into M0 group, TAM group, miR-761 NC group, and miR-761 Exo group. The M0 macrophages were collected from various groups, and the positive rates of M1 macrophage marker CD86 and M2 macrophage marker CD206 in various groups were detected by flow cytometry; the protein expression levels of M1 macrophage secreted factors interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) and M2 macrophage secreted factors interleukin-10 (IL-10) and transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) in various groups were detected by Western blotting method. The M0 macrophages were treated with Exo containing miR-761 and co-cultured with MG63 cells to establish the co-culture system. The experiment was divided into control group, TAM group, miR-NC Exo+TAM group, and miR-761 Exo+TAM group. The MG63 cells in various groups were collected, and the fluorescence intensities of E-cadherin and Vimentin in the MG63 cells in various groups were observed by immunofluorescence staining; the expression levels of E-cadherin, Vimentin, and EMT regulation-related transcription factors Twist1, Snail, and Slug proteins in the cells in various groups were detected by Western blotting method; the numbers of invasion and migration cells in various groups were detected by Transwell chamber assay. **Results:** The HEK293 cells containing miR-761 were successfully obtained by transfection experiments, and the Exo was isolated. Compared with M0 group, the positive rate of CD86 of the macrophages in TAM group was decreased ($P < 0.05$), while the positive rate of CD206 was increased ($P < 0.05$), the expression levels of IL-1 β and TNF- α proteins were decreased ($P < 0.05$), while the expression levels of IL-10 and TGF- β 1 proteins were increased ($P < 0.05$). Compared with TAM group, the positive rate of CD86 of the macrophages in miR-761 Exo group was increased ($P < 0.05$), while the positive rate of CD206 was decreased ($P < 0.05$), the expression levels of IL-1 β and TNF- α proteins were increased ($P < 0.05$), while the expression levels of IL-10 and TGF- β 1 proteins were decreased ($P < 0.05$). Compared with control group, the fluorescence intensity of E-cadherin in the MG63 cells in TAM group was decreased, while the fluorescence intensity of Vimentin was increased, the expression level of E-cadherin protein was decreased ($P < 0.05$), while the expression levels of Vimentin, Twist1, Snail,

and Slug proteins were increased ($P < 0.05$), and the numbers of invasion and migration cells were increased ($P < 0.05$). Compared with TAM group, the fluorescence intensity of E-cadherin in the MG63 cells in miR-761 Exo+TAM group was increased, while the fluorescence intensity of Vimentin was decreased, the expression level of E-cadherin protein was increased ($P < 0.05$), while the expression levels of Vimentin, Twist1, Snail, and Slug proteins were decreased ($P < 0.05$), and the numbers of invasion and migration cells were decreased ($P < 0.05$). **Conclusion:** The exo-delivered miR-761 can inhibit the EMT process of the OS cells, thereby inhibiting the cell migration and cell invasion; its mechanism may be related to regulating TAM polarization.

KEYWORDS Osteosarcoma; MicroRNA-761; Exosome; Epithelial-mesenchymal transition; Tumor-associated macrophage polarization

骨肉瘤 (osteosarcoma, OS) 是常见的原发性骨恶性肿瘤, 主要累及长骨的干骺端^[1]。据统计, 全球 OS 的新发病例约为每年每百万人中 1~3 例^[2]。虽然 OS 患者通常可以采用手术和辅助化疗进行治疗, 但由于 OS 具有高度异质性, 治疗后易出现复发或转移, 且该部分 OS 患者的 5 年生存率低于 20%^[3-4]。OS 的肿瘤微环境是一个复杂且高度动态的环境, 由骨细胞、间充质基质细胞、血管细胞、巨噬细胞和细胞外基质等多种成分组成, OS 微环境的免疫细胞主要是肿瘤相关巨噬细胞 (tumor associated macrophage, TAM), TAM 通过多种途径促进 OS 的发生和进展, 并具有保护肿瘤干细胞样表型和促进血管生成的作用^[5]。上皮-间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 是肿瘤发生和转移的初始阶段, 在肿瘤转移期间, TAM 通过上调基质金属蛋白酶水平来降解细胞外基质, 并通过激活多种信号转导途径来刺激 EMT^[6]。

微小 RNA (microRNA, miRNA) 是一组短的单链非编码 RNA, 通过与 mRNA 的 3' 非翻译区 (3' untranslated region, 3' UTR) 结合来调节基因表达^[7]。研究^[8-9]显示: miRNA 表达变化与 OS 细胞的增殖、迁移、侵袭和凋亡等行为有密切关联。miR-761 位于 1p2 号染色体, 通过调节肿瘤相关基因表达参与肿瘤进展, 有研究^[10]表明: miR-761 通过靶向人 CXC 趋化因子受体 1 (C-X-C chemokine receptor 1, CXCR1) 抑制 OS 细胞增殖和侵袭, 提示 miR-761 在 OS 中发挥肿瘤抑制因子的作用。外泌体 (exosome, Exo) 是直径为 40~100 nm 的囊泡, 其产生、组成、运输和递送的机制已被广泛研究, 并可作为内源性信息载体^[11]。本研究通过构建 Exo 传递 miR-761 体系, 探讨其对 OS 细胞中 TAM 极化的影响, 并利用细胞共培养

模型来验证 Exo 传递 miR-761 调控 TAM 极化进而介导 EMT 的机制, 以期研究以 Exo 为载体递送 miRNA 靶向调节 OS 细胞的生长和迁移进而减缓 OS 进展提供一种新途径。

1 材料与方法

1.1 细胞和主要试剂 人源胚胎肾 HEK239 细胞、人单核细胞白血病 THP-1 细胞和人 OS MG63 细胞购自美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Collection, ATCC)。DMEM 培养基、RPMI-1640 培养基、青-链霉素溶液和消化用胰酶 (美国 Gibco 公司), 胎牛血清 (美国 Sigma 公司), Lipofectamine™ 2000 Reagent 试剂盒 (美国 Thermo 公司), TRIzol 试剂盒 (日本 TaKaRa 公司), miRNA 逆转录试剂盒和 miRcute 增强型 miRNA 荧光定量检测试剂盒 [北京天根生化科技 (北京) 有限公司], Exo 提取试剂盒 (北京百奥博莱科技有限公司), RIPA 裂解液、增强型 ECL 试剂液、DAPI 染料和结晶紫染料 (上海碧云天生物技术有限公司), BCA 蛋白定量试剂盒 (北京凯诗源生物科技有限公司), 0.4 μm Transwell 小室和 12.0 μm Transwell 小室 (美国 iCell 公司), Triton X-100 (瑞士 Roche 公司), Matrigel 胶 (美国 Corning 公司), 流式抗体 FITC-CD206 和 PE-CD86 (美国 BD 公司), 兔抗人 E-钙黏蛋白 (E-cadherin) 单克隆抗体、兔抗人波形蛋白 (Vimentin) 单克隆抗体、兔抗人 Snail 多克隆抗体、兔抗 Slug 多克隆抗体、兔抗人 GAPDH 多克隆抗体和 Alexa Fluor 标记的山羊抗兔 IgG 抗体 (英国 Abcam 公司), 兔抗人 Twist1 单克隆抗体 (美国 Proteintech 公司)。miR-761 质粒和阴性对照 (miR-NC) 质粒由生物工程 (上海) 股份有限公司设计构建。

1.2 细胞培养和转染 HEK239 细胞和 MG63 细

胞分别接种于DMEM培养基中, THP-1细胞接种于RPMI-1640培养基中, 各培养基均含有10%胎牛血清和1%青-链霉素溶液, 置于37℃、5%CO₂培养箱中孵育, 0.25%胰酶消化, 常规传代培养。取对数生长期HEK239细胞, PBS缓冲液洗涤, 调整密度后按照每孔1×10⁵个细胞的密度接种于6孔细胞培养板过夜培养, 将miR-761质粒和miR-NC质粒分别转染至HEK239细胞中, 为miR-761组和miR-NC组, 同时设未转染的HEK239细胞为对照组, 按照Lipofectamine™2000 Reagent试剂盒说明书步骤操作, 采用实时荧光定量PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR) 法检测转染后细胞中miR-761表达水平, 以确定转染是否成功。

1.3 含miR-761的Exo提取和鉴定 将转染后的HEK239细胞收集于无菌离心管中, 4℃、4 500 r·min⁻¹离心15 min, 获取上清, 移至新离心管, 4℃、12 000 r·min⁻¹离心20 min, 获取上清, 移至另一新离心管。在上清中加入等体积提取液A, 涡旋混匀, 4℃静置过夜。次日, 4℃、12 000 r·min⁻¹离心60 min, 弃上清, 保留沉淀物, 吸取适量保存液B重悬沉淀物, 即获得Exo悬液, -20℃保存备用。取适量Exo, 滴入载样铜网, 2%醋酸双氧乙铀溶液染色, 双蒸水清洗后晾干, 透射电镜观察Exo形态表现。将Exo悬液缓慢注入纳米颗粒分析仪中, 根据纳米微粒的布朗运动成像测定样品浓度和粒径分布。

1.4 RT-qPCR法检测HEK239细胞中和Exo中miR-761表达水平 收集转染后的HEK239细胞, TRIzol法提取各组细胞或Exo样本总RNA, 核酸微量测定仪检测总RNA的浓度和纯度。取A(260)/A(280)值范围为1.8~2.0的RNA, 设计特异性反转录引物, 进行逆转录以合成cDNA。以U6为内参, 定量检测各样本中miR-761表达水平, 严格按照miRcute增强型miRNA荧光定量试剂盒操作, 将配制好的反应体系转移至Bio-Rad CFX96系统内, 反应程序: 95℃起始模板变性15 min; 94℃变性20 s、60℃退火延伸34 s, 循环45次。扩增结束后, 分析溶解曲线, 采用2^{-ΔΔCt}法计算细胞或Exo中miR-761表达水平。引物序列: miR-761, 上游引物5'-ACAGCAGGCACAGAC-3', 下游引物5'-GAGCAGGCTGGAGAA-3'; U6, 上游引物5'-TCCGATCGTGAAGCGTTC-3', 下游

引物5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'。

1.5 Western blotting法检测Exo标志蛋白和MG63细胞中相关目的蛋白表达水平 采用RIPA蛋白裂解液提取Exo或不同分组处理THP-1细胞和MG63细胞的总蛋白, BCA法对蛋白定量。蛋白通过沸水浴变性, 制备10%SDS-PAGE凝胶, 每孔上样等量40 μg蛋白进行垂直电泳, 结束后将分离的蛋白转移至硝酸纤维素膜, 恒流转膜2 h。用5%脱脂奶粉室温封闭2 h, 以免抗CD9、CD63、CD81、肿瘤易感基因101 (tumor susceptibility gene 101, TSG101)、白细胞介素1β (interleukin-1β, IL-1β)、肿瘤坏死因子α (tumor necrosis factor-α, TNF-α)、白细胞介素10 (interleukin-10, IL-10)、转化生长因子β1 (transforming growth factor-β1, TGF-β1)、E-cadherin、Vimentin、Twist1、Snail和Slug多克隆抗体(1:1 000)作为一抗加至膜上, 4℃过夜。次日取膜复温, TBST洗膜, 加入对应二抗(1:5 000), 常温孵育2 h, TBST洗膜, 增强型ECL液显影, 紫外凝胶仪上进行图像扫描, 观察各蛋白条带。以GAPDH作为内参, 采用Image J软件分析各蛋白条带灰度值, 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。

1.6 含miR-761的Exo处理THP-1细胞及与MG63细胞共培养体系的制备 采用THP-1细胞模拟巨噬细胞形成, 将细胞按照每孔5×10⁵个的密度接种于6孔细胞培养板, 加入终浓度150 μg·L⁻¹ PMA刺激THP-1细胞, 24 h后得到未活化的M0巨噬细胞。以M0巨噬细胞为研究对象, 将OS MG63细胞按照每孔5×10⁵个细胞的密度接种于孔径为0.4 μm的Transwell小室上层, 将不同处理的M0巨噬细胞按照每孔5×10⁵个细胞的密度分别接种于细胞培养板中; 二者均置于37℃、5%CO₂培养箱中, 分开培养至细胞贴壁后, 将贴有MG63细胞的上室移至含M0巨噬细胞的细胞培养板中, 建立上下双层细胞共培养体系^[12]。实验分为对照组、TAM组、miR-NC Exo组和miR-761 Exo组。M0组: 上室仅有培养基无MG63细胞, 下层为M0巨噬细胞; TAM组: 上室为MG63细胞, 下层为M0巨噬细胞; miR-NC Exo组: 上室为MG63细胞, 下层为含终浓度20 mg·L⁻¹ miR-NC Exo的M0巨噬细胞; miR-761 Exo组: 上室为MG63细胞, 下层为含终浓度20 mg·L⁻¹ miR-761 Exo的M0巨噬细胞。

继续培养48 h, 收集各组下室细胞检测其极化状态。

1.7 流式细胞术检测各组M0巨噬细胞中CD86和CD206阳性率 收集“1.6”中获得的各组下室细胞, 0.25%胰酶消化, PBS缓冲液洗涤, 4℃、4 000 r·min⁻¹离心10 min后, 4%多聚甲醛固定; PBS缓冲液洗涤, 4℃、4 000 r·min⁻¹离心10 min, 采用0.1% Triton X-100通透处理5 min; PBS缓冲液洗涤, 再次离心后, 添加100 μL PBS缓冲液重悬沉淀, 加入FITC-CD206抗体和PE-CD86抗体, 常温避光孵育60 min, PBS缓冲液洗涤, 添加流式缓冲液重悬细胞, 采用流式细胞术检测各组M0巨噬细胞中CD86和CD206阳性率, 可反映巨噬细胞极化状态。

1.8 MG63细胞分组和处理方法 MG63细胞分为对照组、TAM组、miR-NC Exo+TAM组和miR-761 Exo+TAM组。按照“1.6”中方法建立双层细胞共培养体系: 对照组, 在孔径为0.4 μm的Transwell上室接种MG63细胞, 下室仅有培养基; TAM组, 上室接种MG63细胞, 下层细胞培养板接种M0巨噬细胞; miR-NC Exo+TAM组, 上室接种MG63细胞, 下层细胞培养板接种含终浓度20 mg·L⁻¹ miR-NC Exo处理的M0巨噬细胞; miR-761 Exo+TAM组, 上室接种MG63细胞, 下层细胞培养板接种含终浓度20 mg·L⁻¹ miR-761 Exo处理的M0巨噬细胞。处理结束后, 收集各组MG63细胞进行后续实验。

1.9 免疫荧光染色法检测各组MG63细胞中E-cadherin和Vimentin荧光强度 将处理后的各组MG63细胞接种至防脱载玻片上, 37℃、5%CO₂条件下培养12 h。PBS缓冲液洗涤, 4%多聚甲醛固定, 0.1% Triton X-100通透处理10 min, 采用10%山羊血清常温孵育2 h, 加入稀释的兔抗人E-cadherin单克隆抗体(1:200)和兔抗人Vimentin单克隆抗体(1:200), 4℃过夜。次日, PBS缓冲液洗涤, 加入稀释的Alexa Fluor标记的山羊抗兔IgG抗体(1:500), 常温孵育1 h。PBS缓冲液洗涤, DAPI避光染核, 清洗多余染料后, 防淬灭封片剂封固, 自然晾干, 采用荧光显微镜观察各组细胞中蛋白表达荧光强度。

1.10 Transwell小室实验检测各组MG63细胞中侵袭和迁移细胞数 细胞分组同上。在孔径为12.0 μm的Transwell小室上层加入适量Matrigel胶, 置于37℃恒温箱内待胶凝固。0.25%胰酶消

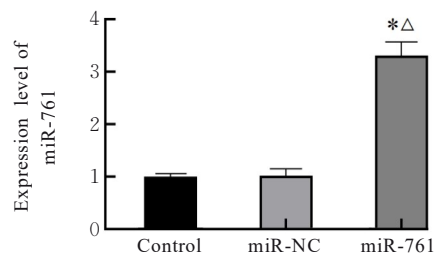
化处理后的MG63细胞, 按照每孔2×10⁵个细胞的密度接种于含24孔细胞培养板的Transwell小室上层, 下层加入500 μL含10%胎牛血清的DMEM培养液。将Transwell小室体系置于37℃、5%CO₂培养箱中培养48 h后取出, 弃培养液, 棉签擦去上室未穿孔细胞, PBS缓冲液洗涤, 4%多聚甲醛固定, 0.1%结晶紫染色10 min, PBS缓冲液洗涤, 中性树胶封固, 自然晾干, 采用光学显微镜观察细胞穿过小室情况, 随机选择6个视野统计侵袭细胞数, 结果取平均数。检测迁移细胞数时除不在上层铺Matrigel胶外, 其余操作均与上述方法一致。

1.11 统计学分析 采用GraphPad Prism 8.30统计软件进行统计学分析。各组HEK239细胞中miR-761表达水平, 各组巨噬细胞中CD86和CD206阳性表达率及IL-1β、TNF-α、IL-10和TGF-β1蛋白表达水平, 各组MG63细胞中E-cadherin、Vimentin、Twist1、Snail和Slug蛋白表达水平, 各组MG63细胞中侵袭和迁移细胞数均符合正态分布, 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 转染后HEK239细胞中miR-761表达水平

与对照组和miR-NC组比较, miR-761组HEK239细胞中miR-761表达水平均升高($P < 0.05$)。见图1。



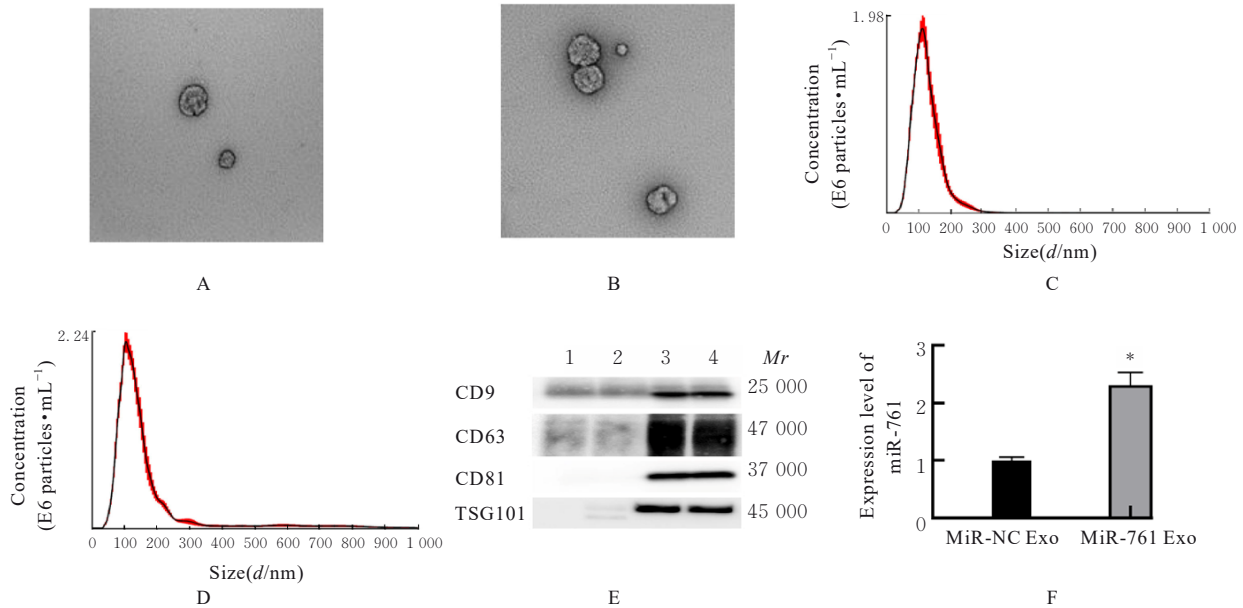
* $P < 0.05$ compared with control group; $\Delta P < 0.05$ compared with miR-NC group.

图1 转染后各组HEK239细胞中miR-761表达水平
Fig. 1 Expression levels of miR-761 in HEK239 cells in various groups after transfection

2.2 含miR-761的Exo提取和鉴定结果 透射电镜下观察: 提取的颗粒物呈圆形或椭圆形囊泡结构, 大多径粒分布在100 nm左右(图2A~2D)。Exo标志蛋白检测结果显示: 转染miR-NC和

miR-761的HEK239细胞中CD9、CD63、CD81和TSG101蛋白表达水平均明显低于转染miR-NC和miR-761的HEK239细胞来源Exo(图2E)。转染

miR-761细胞来源的Exo中miR-761表达水平高于转染miR-NC细胞来源的Exo($P<0.05$)(图2F)。以上结果表明:成功分离到含miR-761的Exo。



A: Morphology of miR-NC Exo observed by transmission electron microscope ($\times 10,000$); B: Morphology of miR-761 Exo observed by transmission electron microscope ($\times 10,000$); C: MiR-NC Exo concentration and particle size detected by nanoparticle analysis technology; D: MiR-761 Exo concentration and particle size detected by nanoparticle analysis technology; E: Expression of Exo marker protein detected by Western blotting method (Lane 1, 2: HEK239 cell; Lane 3, 4: Exo; Lane 1, 3: MiR-NC; Lane 2, 4: MiR-761); F: Expression level of miR-761 in Exo (* $P<0.05$ compared with miR-NC Exo).

图2 含miR-761的Exo鉴定

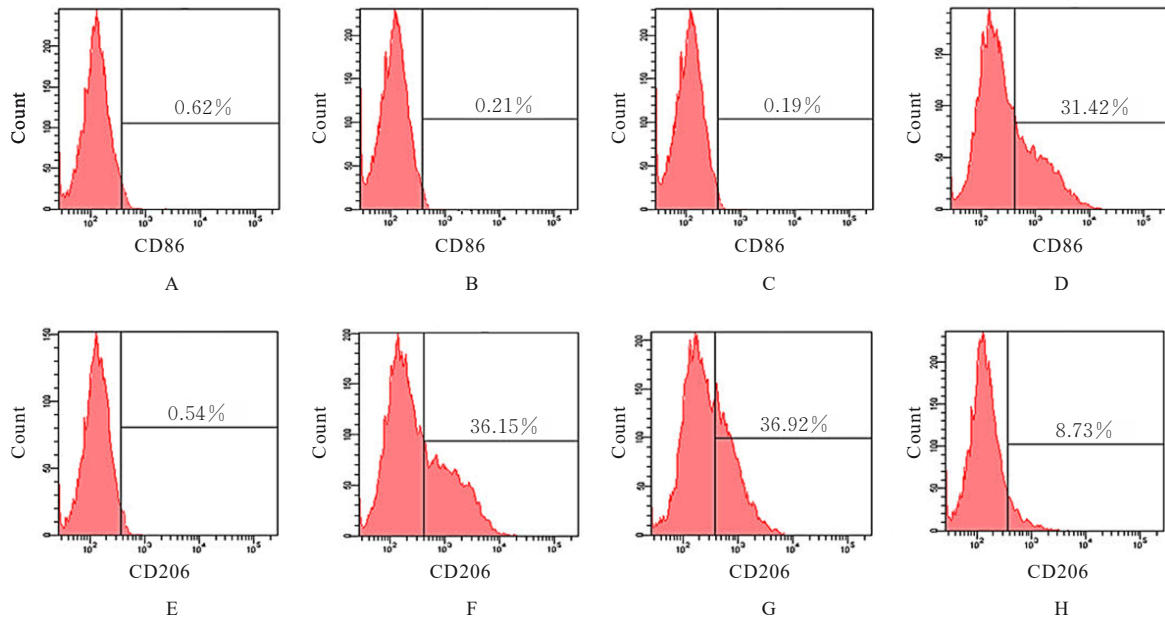
Fig. 2 Identification of Exo containing miR-761

2.3 各组巨噬细胞中极化相关蛋白阳性率和极化相关细胞因子蛋白表达水平 与M0组比较, TAM组巨噬细胞中M1巨噬细胞标志物CD86阳性率降低($P<0.05$), M2巨噬细胞标志物CD206阳性率升高($P<0.05$); 与TAM组比较, miR-761 Exo组细胞中CD86阳性率升高($P<0.05$), CD206阳性率降低($P<0.05$), miR-NC Exo组细胞中CD86和CD206阳性率差异无统计学意义($P>0.05$)。见图3和表1。

与M0组比较, TAM组巨噬细胞中IL-1 β 和TNF- α 蛋白表达水平降低($P<0.05$), IL-10和TGF- β 1蛋白表达水平升高($P<0.05$); 与TAM组比较, miR-761 Exo组细胞中IL-1 β 和TNF- α 蛋白表达水平升高($P<0.05$), IL-10和TGF- β 1蛋白表达水平降低($P<0.05$), miR-NC Exo组上述各蛋白表达水平差异无统计学意义($P>0.05$)。见图4。

2.4 各组MG63细胞中E-cadherin和Vimentin荧光强度 与对照组比较, TAM组MG63细胞中E-cadherin荧光强度减弱, Vimentin荧光强度增强; 与TAM组比较, miR-761 Exo+TAM组MG63细胞中E-cadherin荧光强度增强, Vimentin荧光强度减弱, miR-NC Exo+TAM组MG63细胞中E-cadherin和Vimentin荧光强度无明显变化。见图5。

2.5 各组MG63细胞中E-cadherin、Vimentin、Twist1、Snail和Slug蛋白表达水平 与对照组比较, TAM组MG63细胞中E-cadherin蛋白表达水平降低($P<0.05$), Vimentin、Twist1、Snail和Slug蛋白表达水平升高($P<0.05$); 与TAM组比较, miR-761 Exo+TAM组MG63细胞中E-cadherin蛋白表达水平升高($P<0.05$), Vimentin、Twist1、Snail和Slug蛋白表达水平降低($P<0.05$), miR-NC Exo+TAM组MG63细胞中上述各蛋白表达水平差异无统计学意义($P>0.05$)。见图6。



A—D: CD86; E—H: CD206; A,E: M0 group; B,F: TAM group; C,G: MiR-NC Exo group; D,H: MiR-761 Exo group.

图3 流式细胞术检测各组细胞中CD86和CD206阳性率

Fig. 3 Positive rates of CD86 and CD206 in cells in various groups detected by flow cytometry

表1 各组巨噬细胞中CD86和CD206阳性率

Tab. 1 Positive rates of CD86 and CD206 in macrophages in various groups ($n=6, \bar{x} \pm s, \eta/\%$)

Group	CD86	CD206
M0	0.62±0.07	0.54±0.05
TAM	0.21±0.01*	36.15±3.82*
MiR-NC Exo	0.19±0.01	36.92±3.71
MiR-761 Exo	31.42±3.28 [△]	8.73±0.89 [△]

* $P<0.05$ compared with M0 group; [△] $P<0.05$ compared with TAM group.

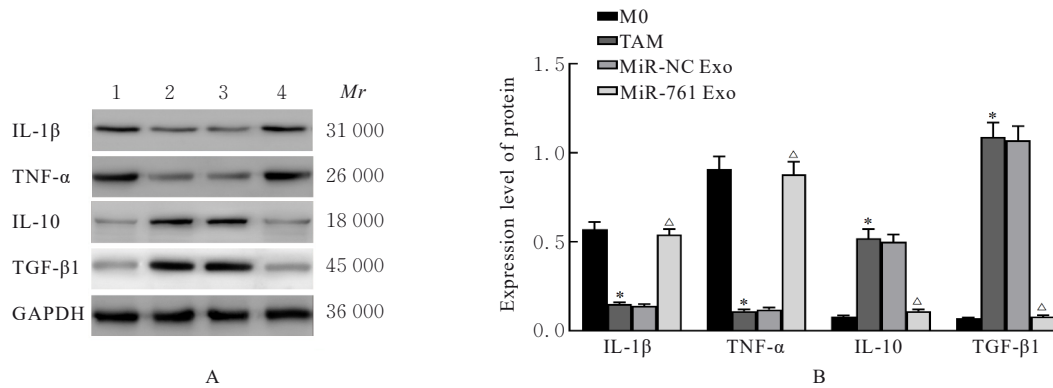
2.6 各组MG63细胞中侵袭和迁移细胞数 与对照组比较, TAM组MG63细胞中侵袭和迁移细胞数增加 ($P<0.05$); 与TAM组比较, miR-761 Exo+TAM组MG63细胞中侵袭和迁移细胞数减少 ($P<0.05$), miR-NC Exo+TAM组MG63细胞中侵袭和迁移细胞数差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见图7和8。

3 讨论

TAM通过特异性分化可以进化成2种不同的极化状态: 经典活化的M1型和替代活化的M2型。在肿瘤微环境中, M1型TAM可由干扰素 γ (interferon- γ , IFN- γ)、脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 和TNF- α 等细胞因子诱导产生, M1型TAM表现出较强的抗原呈递能力, 具有促进辅助

性T细胞 (T helper cell, Th1) 免疫反应、吞噬细菌及病毒和杀死肿瘤细胞的作用, 并分泌白细胞介素6 (interleukin-6, IL-6)、白细胞介素23 (interleukin-23, IL-23)、活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 及其他参与炎症反应并发挥抗肿瘤免疫作用的炎症介质, 进而抑制肿瘤的发生和发展^[13]。在白细胞介素4 (interleukin-4, IL-4)、IL-10、白细胞介素13 (interleukin-13, IL-13) 和糖皮质激素诱导下可以促进TAM向M2型极化, M2型TAM分泌IL-10和TGF- β 1等抗炎细胞因子, 促进血管生成、组织重塑、组织损伤修复和肿瘤生长^[14]。在肿瘤微环境中, TAM主要具有M2样巨噬细胞的表型, 通过促进肿瘤血管生成或间接诱导肿瘤微环境中免疫细胞之间的相互作用来促进肿瘤免疫抑制。已有研究^[15]表明: M1型TAM抑制OS转移, 而M2型TAM通过分泌相关细胞因子促进OS转移。TAM极化是一种高度可塑性的生理过程, 因此使用药物或天然免疫制剂通过改变其表型甚至抑制TAM向M2型极化, 有望成为OS新的治疗方式。

作为一种通用调节因子, miRNA在功能上参与多种关键的细胞过程, 包括TAM极化。miR-195-5p通过抑制结肠癌细胞中GATA结合蛋白3 (GATA binding protein 3, GATA3) 介导的IL-4分泌途径来抑制TAM向M2型极化, 并有



Lane 1: M0 group; Lane 2: TAM group; Lane 3: MiR-NC Exo group; Lane 4: MiR-761 Exo group. * $P < 0.05$ compared with M0 group; $^{\Delta}P < 0.05$ compared with TAM group.

图4 Western blotting法检测各组巨噬细胞中极化相关细胞因子蛋白表达电泳图(A)和直条图(B)

Fig. 4 Electrophoregram (A) and histogram (B) of expressions of polarization-related cytokine proteins in macrophages in various groups detected by Western blotting method

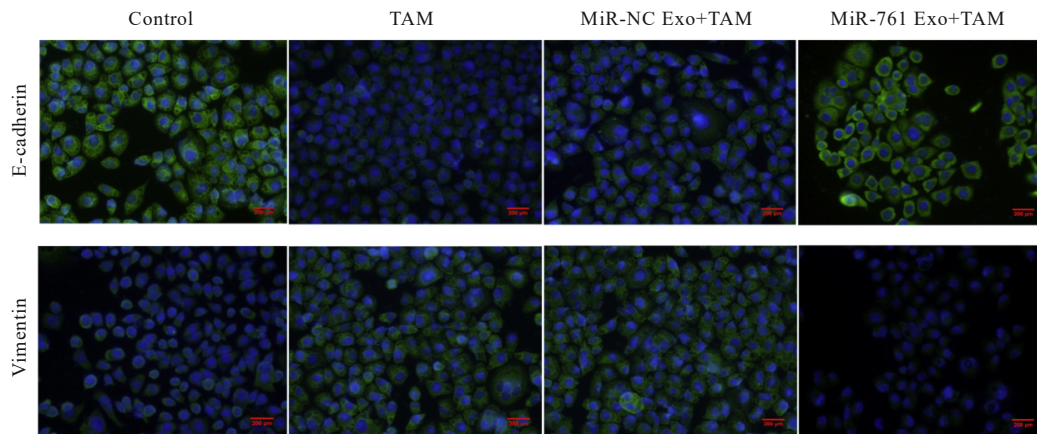
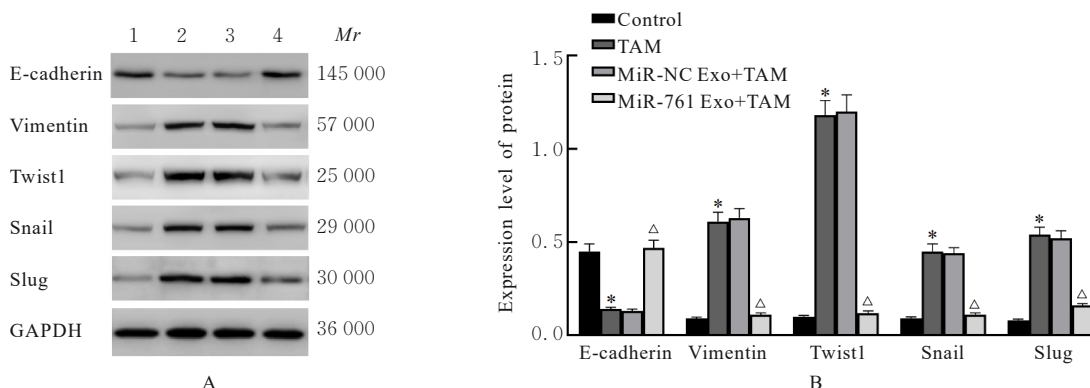


图5 免疫荧光染色法检测各组 MG63 细胞中 E-cadherin 和 Vimentin 荧光强度($\times 100$)

Fig. 5 Fluorescence intensities of E-cadherin and Vimentin in MG63 cells in various groups detected by immunofluorescence staining assay($\times 100$)



Lane 1: Control group; Lane 2: TAM group; Lane 3: MiR-NC Exo+TAM group; Lane 4: MiR-761 Exo+TAM group. * $P < 0.05$ compared with control group; $^{\Delta}P < 0.05$ compared with TAM group.

图6 Western blotting法检测各组 MG63 细胞中 E-cadherin、Vimentin、Twist1、Snail 和 Slug 蛋白表达电泳图(A)和直条图(B)

Fig. 6 Electrophoregram (A) and histogram (B) of expressions of E-cadherin, Vimentin, Twist1, Snail, and Slug proteins in MG63 cells in various groups detected by Western blotting method

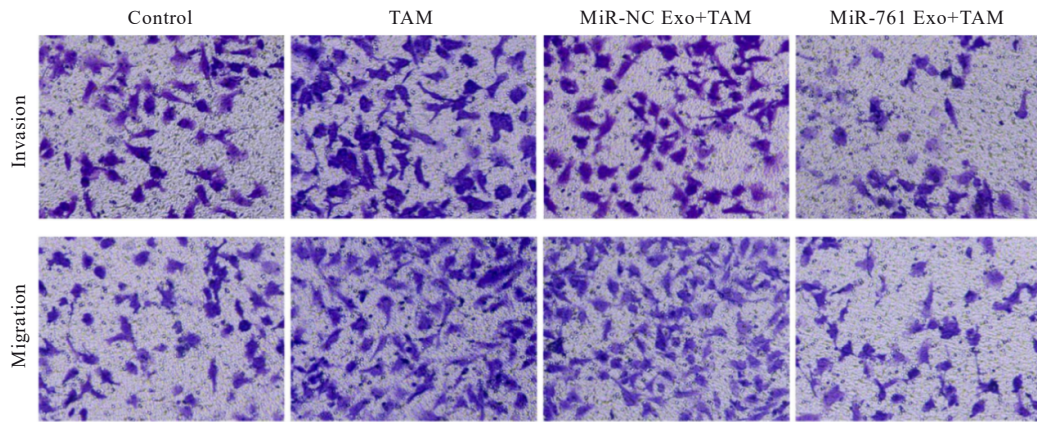
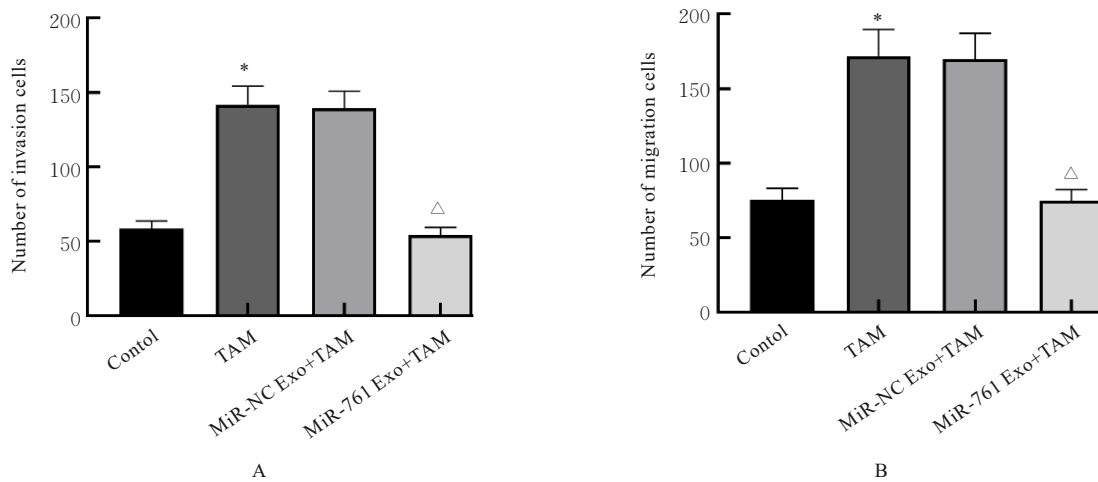


图7 Transwell小室实验检测各组MG63细胞侵袭和迁移情况(结晶紫, $\times 100$)

Fig. 7 Invasion and migration of MG63 cells in various groups detected by Transwell chamber assay (Crystal violet, $\times 100$)



* $P < 0.05$ compared with control group; $\Delta P < 0.05$ compared with TAM group.

图8 各组MG63细胞中侵袭细胞数(A)和迁移细胞数(B)

Fig. 8 Numbers of invasion cells (A) and migration cells (B) in MG63 cells in various groups

助于TAM向M1型极化,起到了抑制结直肠癌体内外生长的作用^[16]; miR-498可抑制鼠双微体2 (murine double minute 2, MDM2) 介导的转录激活因子3 (activating transcription factor 3, ATF3) 降解,进而抑制食管癌中TAM自噬和向M2表型极化,对食管癌进展起到抑制作用^[17]; 巨噬细胞中的miR-182诱导其向M2型极化,在乳腺癌小鼠模型和巨噬细胞中敲除miR-182会抑制TAM向M2型极化,从而抑制M2型TAM发挥的促肿瘤作用^[18]。由于Exo体积小、稳定性强、免疫原性低和生物相容性高等特点,已被作为纳米级载体在研究中广泛使用^[19-20]。将调控TAM极化的miRNA通过Exo递送至肿瘤微环境中,可影响肿瘤的生长和转移。本研究中,采用PMA刺激THP-1细胞产生

M0型巨噬细胞,并与OS MG63细胞建立共培养体系,结果显示:巨噬细胞中M1巨噬细胞标志物CD86阳性率降低,M2巨噬细胞标志物CD206阳性率升高,M1巨噬细胞分泌因子IL-1 β 和TNF- α 蛋白表达下调,M2巨噬细胞分泌因子IL-10和TGF- β 1蛋白表达上调,表明OS MG63细胞可诱导TAM向M2型极化;含miR-761 Exo的M0型巨噬细胞与OS MG63细胞建立共培养体系培养后,巨噬细胞中M1巨噬细胞标志物CD86阳性率升高,M2巨噬细胞标志物CD206阳性率降低,M1巨噬细胞分泌因子IL-1 β 和TNF- α 蛋白表达上调而M2巨噬细胞分泌因子IL-10和TGF- β 1蛋白表达下调,表明Exo传递的miR-761可能抑制TAM向M2型极化并促进TAM向M1型极化。

EMT 是细胞失去上皮特征并获得间充质特性的过程, 可触发癌细胞与原发部位的解离, 使癌细胞侵入邻近组织并随后扩散至远处器官, 有助于肿瘤恶性生物学特性, 包括细胞侵袭和转移。研究^[21]表明: TAM 极化参与不同类型癌症的 EMT 进程调节。在三阴性乳腺癌中不仅检测到 M2 型 TAM 高度浸润, 且与患者的不良预后有关; 与 M2 型 TAM 共培养的三阴性乳腺癌 BT549 和 HCC1937 细胞中间充质标志物 N-钙黏蛋白 (N-cadherin)、Vimentin 和转录因子 Snail 表达明显增加, 而上皮标志物 E-cadherin 表达受到抑制^[22]; M2 型 TAM 与肝内胆管癌细胞共培养后可促进肝内胆管癌细胞的 EMT, 增强细胞侵袭和转移能力; 此外, M2 型 TAM 通过调节细胞因子如细胞间黏附分子 1 (intercellular cell adhesion molecule-1、ICAM-1)、IL-6、CC 趋化因子配体 1 (C-C chemokine ligand 1, CCL1) 和 CC 趋化因子配体 3 (C-C chemokine ligand 3, CCL3) 等分泌来调节肝内胆管癌微环境^[23]。推测打破 TAM 和 EMT 之间的信号通路或串扰循环能够对抗肿瘤转移。本研究结果显示: 与 M0 巨噬细胞共培养的 OS MG63 细胞中 E-cadherin 荧光强度减弱、Vimentin 荧光强度增强, E-cadherin 蛋白表达水平下调, Vimentin、Twist1、Snail 和 Slug 蛋白表达水平上调, 侵袭和迁移细胞数均增加, 表明 MG63 细胞诱导 TAM 向 M2 型极化后促进了 EMT, 同时提高了细胞迁移和侵袭能力; 而与含 miR-761 Exo 的 M0 型巨噬细胞共培养的 OS MG63 细胞中 E-cadherin 荧光强度增强、Vimentin 荧光强度减弱, E-cadherin 蛋白表达水平上调而 Vimentin、Twist1、Snail 和 Slug 蛋白表达水平下调, 侵袭和迁移细胞数均减少, 表明 Exo 传递的 miR-761 抑制 TAM 向 M2 型极化及其介导的 EMT, 进而抑制肿瘤转移。

综上所述, Exo 传递的 miR-761 能够调节 OS 微环境下 TAM 极化, 通过抑制 TAM 向 M2 型极化进而抑制 EMT 进程可抑制肿瘤转移, 本研究结果为 OS 的临床治疗提供了新思路。但本研究只在体外进行了初步研究, 关于 miR-761 作用的具体机制及在体内是否发挥同样作用尚有待进一步探讨。

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:

高世磊参与实验设计和论文撰写, 王家强、田志超、

李超和梁潇潇参与数据收集、数据整理和统计学分析, 姚伟涛和王鑫参与实验设计指导和论文审阅。

[参考文献]

- [1] BELAYNEH R, FOURMAN M S, BHOGAL S, et al. Update on osteosarcoma [J]. *Curr Oncol Rep*, 2021, 23(6): 71.
- [2] COLE S, GIANFERANTE D M, ZHU B, et al. Osteosarcoma: a Surveillance, Epidemiology, and End Results program-based analysis from 1975 to 2017 [J]. *Cancer*, 2022, 128(11): 2107-2118.
- [3] SUN C N, LI S L. PTHR1 in osteosarcoma: specific molecular mechanisms and comprehensive functional perspective [J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(7): 3175-3181.
- [4] SHOAIB Z, FAN T M, IRUDAYARAJ J M K. Osteosarcoma mechanobiology and therapeutic targets [J]. *Br J Pharmacol*, 2022, 179(2): 201-217.
- [5] ANAND N, PEH K H, KOLESAR J M. Macrophage repolarization as a therapeutic strategy for osteosarcoma [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(3): 2858.
- [6] GAZZILLO A, POLIDORO M A, SOLDANI C, et al. Relationship between epithelial-to-mesenchymal transition and tumor-associated macrophages in colorectal liver metastases [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(24): 16197.
- [7] DIENER C, KELLER A, MEESE E. Emerging concepts of miRNA therapeutics: from cells to clinic [J]. *Trends Genet*, 2022, 38(6): 613-626.
- [8] CHEN D F, ZHANG B W, CAO J J, et al. Preparation of polycation with hydroxyls for enhanced delivery of miRNA in osteosarcoma therapy [J]. *Biomater Sci*, 2022, 10(11): 2844-2856.
- [9] HAN G, GUO Q Y, LIN, et al. Screening and analysis of biomarkers in the miRNA-mRNA regulatory network of osteosarcoma [J]. *J Healthc Eng*, 2022, 2022: 8055052.
- [10] WANG S Y, ZHANG J Y, CHEN G P, et al. MiR-761 inhibits human osteosarcoma progression by targeting CXCR1 [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2018, 11(11): 5327-5334.
- [11] LAI J J, CHAU Z L, CHEN S Y, et al. Exosome processing and characterization approaches for research and technology development [J]. *Adv Sci*, 2022, 9(15): e2103222.
- [12] 靳鑫, 倪田根, 王宁, 等. PGC-1 α 通过线粒体介导巨噬细胞极化状态的机制研究 [J]. *第三军医大学学报*, 2019, 41(1): 56-62.

- [13] GAO J, LIANG Y Z, WANG L. Shaping polarization of tumor-associated macrophages in cancer immunotherapy[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 888713.
- [14] LI C X, XU X F, WEI S H, et al. Tumor-associated macrophages: potential therapeutic strategies and future prospects in cancer[J]. *J Immunother Cancer*, 2021, 9(1): e001341.
- [15] DUMARS C, NGYUEN J M, GAULTIER A, et al. Dysregulation of macrophage polarization is associated with the metastatic process in osteosarcoma [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(48): 78343-78354.
- [16] LIN X B, WANG S Y, SUN M, et al. MiR-195-5p/NOTCH2-mediated EMT modulates IL-4 secretion in colorectal cancer to affect M2-like TAM polarization[J]. *J Hematol Oncol*, 2019, 12(1): 20.
- [17] LI D Z, YAN M, SUN F F, et al. MiR-498 inhibits autophagy and M2-like polarization of tumor-associated macrophages in esophageal cancer via MDM2/ATF3[J]. *Epigenomics*, 2021, 13(13): 1013-1030.
- [18] MA C X, HE D S, TIAN P, et al. MiR-182 targeting reprograms tumor-associated macrophages and limits breast cancer progression[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2022, 119(6): e2114006119.
- [19] SHAO J T, ZARO J, SHEN Y X. Advances in exosome-based drug delivery and tumor targeting: from tissue distribution to intracellular fate [J]. *Int J Nanomedicine*, 2020, 15: 9355-9371.
- [20] 陈瑞婧, 冯韬锦, 程实, 等. 3D培养人脐带间充质干细胞来源的外泌体对成骨细胞分化的作用[J]. *解放军医学杂志*, 2023, 48(4): 411-419.
- [21] LIN Y X, XU J X, LAN H Y. Tumor-associated macrophages in tumor metastasis: biological roles and clinical therapeutic applications [J]. *J Hematol Oncol*, 2019, 12(1): 76.
- [22] CHEN X Z, YANG M Q, YIN J, et al. Tumor-associated macrophages promote epithelial-mesenchymal transition and the cancer stem cell properties in triple-negative breast cancer through CCL2/AKT/ β -catenin signaling[J]. *Cell Commun Signal*, 2022, 20(1): 92.
- [23] SUN D L, LUO T C, DONG P P, et al. M2-polarized tumor-associated macrophages promote epithelial-mesenchymal transition via activation of the AKT3/PRAS40 signaling pathway in intrahepatic cholangiocarcinoma[J]. *J Cell Biochem*, 2020, 121(4): 2828-2838.