

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.11.006

· 基础研究 ·

miR-133a-5p对胃贲门腺癌细胞增殖、黏附和M1型巨噬细胞极化的影响

杜海侠¹, 李帅², 黄国胜¹, 杨金华¹, 赵冬峰³ (1. 南阳医学高等专科学校第一附属医院 普胸外二科, 河南 南阳 473000; 2. 河南省肿瘤医院 消化内科, 河南 郑州 450003; 3. 郑州人民医院 胸外科, 河南 郑州 450012)

[摘要] **目的:** 探究 miR-133a-5p 调控血清外泌体源性纤连蛋白 1 (fibronectin1, FN1) 的表达对胃贲门腺癌 (gastric cardia adenocarcinoma, GCA) 细胞增殖、黏附和 M1 型巨噬细胞极化的影响。**方法:** 借助 GEO 数据库分析 GCA 组织中的差异表达基因, 进行功能富集分析。采用 qPCR 检测 FN1 在 GCA 组织、血清、血清外泌体和细胞中的表达。向 GCA 患者血清外泌体中转染 FN1 的过表达载体及其对照质粒, 向 HGC-27 细胞中转染 miR-133a-5p 模拟物及其对照, 将转染后的 HGC-27 细胞和外泌体共培养, 再将此细胞与 THP-1 细胞共培养。采用 CCK-8 和细胞黏附实验分别检测各组 HGC-27 细胞的增殖和黏附情况, WB 法、ELISA 分别检测细胞中 CD86、iNOS 的水平以及对巨噬细胞分泌 IL-6、IL-1 β 的影响。采用双荧光素酶报告基因实验验证 FN1 mRNA 和 miR-133a-5p 之间的相互作用关系。**结果:** 与健康人对照组相比, GCA 组织、血清、血清外泌体和细胞中的 FN1 表达水平显著上调 (均 $P < 0.05$), FN1 高表达的血清外泌体与 GCA 患者的 TNM 分期 ($P = 0.032\ 9$) 和淋巴结转移有关联 ($P = 0.012\ 7$)。富含 FN1 的血清外泌体能够被 GCA 细胞内化, 与过表达 FN1 的外泌体共培养能够提高 HGC-27 细胞的增殖和黏附能力, 抑制 THP-1 细胞中 IL-6、IL-1 β 、CD86 和 iNOS 的表达, 抑制 M1 型巨噬细胞极化 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。miR-133a-5p 在 GCA 组织和细胞中较对照组显著降低, 可负调控 FN1 的表达, 过表达 miR-133a-5p 能够通过降低 GCA 细胞增殖和黏附能力, 促进 IL-6、IL-1 β 、CD86 和 iNOS 的表达, 部分逆转 FN1 对 GCA 细胞恶性行为的促进作用 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论:** miR-133a-5p 可通过抑制血清外泌体分泌 FN1 对 GCA 细胞的恶性行为起抑制作用, 对 M1 型巨噬细胞极化起促进作用。

[关键词] miR-133a-5p; 纤连蛋白 1; 血清外泌体; 胃贲门腺癌

[中图分类号] R735.2; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2021)11-1087-11

Effects of miR-133a-5p on the proliferation and adhesion of gastric cardia adenocarcinoma cells and the polarization of M1 macrophages

DU Haixia¹, LI Shuai², HUANG Guosheng¹, YANG Jinhua¹, ZHAO Dongfeng³ (1. Second Department of General Thoracic Surgery, the First Affiliated Hospital of Nanyang Medical College, Nanyang 473000, Henan, China; 2. Department of Gastroenterology, Henan Cancer Hospital, Zhengzhou 450003, Henan, China; 3. Department of Thoracic Surgery, Zhengzhou People's Hospital, Zhengzhou 450012, Henan, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of miR-133a-5p regulating serum exosomes derived fibronectin1 (FN1) on the proliferation, adhesion, and M1 macrophage polarization of gastric cardia adenocarcinoma (GCA) cells. **Methods:** The differentially expressed genes in GCA were predicted using the GEO database, and their functional enrichment analysis was performed. qPCR was used to detect the expression of FN1 in GCA tissue, serum and serum-derived exosomes of GCA patients, and GCA cells. The FN1 overexpression vector and its control plasmid were respectively transfected into the serum-derived exosomes of GCA patients. The miR-133a-5p mimics and its control mimics were transfected into HGC-27 cells. The transfected HGC-27 cells were co-cultured with transfected exosomes, and then the cells were co-cultured with THP-1 cells. CCK-8 and cell adhesion experiments were used to detect the proliferation and adhesion of HGC-27 cells in each group. WB method and ELISA were used to detect the levels of CD86 and iNOS in cells and the effects of transfection on the secretion of IL-6 and IL-1 β from macrophages. Dual-luciferase reporter experiment was adopted to verify the interaction between FN1 mRNA and miR-133a-5p. **Results:** Compared with healthy controls, the expression levels of FN1 in GCA tissues, serum and serum-derived exosomes from GCA patients, and GCA cells were significantly up-regulated (all $P < 0.05$). High expression of FN1 in serum exosomes was associated with the TNM stage ($P = 0.032\ 9$) and lymph node metastasis ($P = 0.012\ 7$) in GCA patients. FN1-riched exosomes could be internalized by GCA cells, and co-culture with FN1-riched exosomes could improve the proliferation and adhesion ability of GCA cells and inhibit the polarization of M1-type macrophages by blocking the expression of IL-6, IL-1 β , CD86, and iNOS ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). miR-133a-5p was lowly expressed in GCA tissues and cells and could negatively regulate the expression of FN1. Overexpression of miR-133a-5p could promote

[作者简介] 杜海侠 (1984—), 男, 硕士生, 主治医师, 主要从事胸外科肿瘤相关的基础与临床研究, E-mail: haiding0446683@163.com

[通信作者] 杜海侠 (DU Haixia, corresponding author), E-mail: haiding0446683@163.com

the expression of IL-6, IL-1 β , CD86, and iNOS in M1 macrophages by reducing the proliferation and adhesion of GCA cells, and partially reversing the promotion effect of FN1 on the malignant behaviors of GCA cells ($P<0.05$ or $P<0.01$). **Conclusion:** miR-133a-5p inhibits the proliferation and adhesion of GCA cells *via* suppressing the secretion of FN1 by serum exosomes and promotes the polarization of M1 macrophages.

[Key words] miR-133a-5p; fibronectin1 (FN1); serum exosomes; gastric cardia adenocarcinoma (GCA)

[Chin J Cancer Biother, 2021, 28(11): 1087-1097. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.11.006]

胃贲门腺癌(gastric cardia adenocarcinoma, GCA)作为一种常见的消化系统肿瘤,其病死率和发病率均在各种恶性肿瘤中位居前列^[1]。GCA的诊断水平不断提高,但其发生发展的确切分子机制尚不清楚^[2]。进一步探索GCA中新的分子生物标志物对于提高GCA的诊断、治疗和预后十分必要。外泌体(exosome)是小的脂质双层膜囊泡,包含许多活性分子,如蛋白质、mRNA和miRNA等,外泌体的独特性质使其成为肿瘤诊断和预后的新标志物^[3-5]。肿瘤患者血清中的外泌体浓度、形态和大小有所改变,可作为有效生物标志物应用于胃肠道肿瘤的诊断、治疗和预后^[6-7]。从肿瘤患者的体液中很容易分离出外泌体,且与传统的肿瘤生物标志物相比,外泌体内容物具有更高的稳定性和肿瘤特异性,采样更为方便^[8-9]。据报道^[10],纤连蛋白1(fibronectin 1, FN1)在胃癌中高表达,能够促进胃癌细胞增殖、侵袭和迁移,而外泌体FN1在GCA中的作用尚少有研究。本课题组利用miRWalk、TargetScan和miRactDB在线预测网站进行分析,结果均显示FN1和miR-133a-5p具有相互作用位点,而miR-133a-5p先前被报道^[11]对于GCA细胞的增殖、侵袭、迁移和EMT具有抑制作用。因此推测, FN1可能与miR-133a-5p共同参与GCA进展。本研究旨在探讨miR-133a-5p是否通过抑制血清外泌体分泌的FN1调控GCA细胞的生物学行为。

1 材料与方法

1.1 细胞系、主要试剂与仪器

人急性单核白血细胞THP-1、人胃癌细胞HGC-27、AGS、NCI-N87和人胃黏膜上皮细胞GES-1均购自中国科学院上海细胞库。胎牛血清(FBS)和LipofectamineTM3000试剂盒(L3000015)购自美国Thermo Fisher公司, RIPA裂解液(R0020)和双荧光素酶报告基因检测试剂盒(D0010)购自北京索莱宝科技有限公司, BCA蛋白浓度测定试剂盒(AR0197)购自武汉博士德生物工程有限公司, 抗CD63单抗(ab134045)、抗CD81单抗(ab109201)、抗iNOS单抗(ab178945)、抗CD86单抗(ab239075)、抗GAPDH单抗(ab8245)和山羊抗小鼠IgG H&L(ab6789)均购自美国Abcam公司, CCK-8试剂盒(C0037)购自上海碧云天生物技术有限公司, ELISA试剂盒购自上海极威生物科技有限公司, FN1过表达载体(pcDNA3.1-FN1)及其阴性对照

(pcDNA3.1-NC)和miR-133a-5p模拟物(miR-133a-5p mimic)及其阴性对照(miR-NC)由汉恒生物设计并合成, 外泌体转染试剂(EXFT10A-1)购自上海研卉生物科技有限公司, exoEasy Maxi试剂盒购自北京布拉德科技发展有限公司, 外泌体红色荧光标记染料(PKH26)购自上海宇玫博生物科技有限公司, Hoechst 33342荧光染料(KFS260)购自上海百奥莱博科技有限公司, RNasy Mini试剂盒(74104)、miScript逆转录试剂盒(218161)和miScript SYBR-Green PCR试剂盒(218073)均购自杭州沃森生物技术有限公司, miR-133a-5p和FN1的引物序列由上海艾博思生物科技有限公司设计并合成。双荧光素酶报告分析系统(E1910)购自美国Promega公司, 颗粒分析跟踪仪(NanoSight NS300)购自英国马尔文帕纳科公司, 透射电镜(transmission electron microscope, TEM)购自德国徕卡公司。

1.2 临床资料

将2014年6月至2015年6月期间于本院就诊的43例GCA患者及对应的43例健康志愿者纳入本研究。纳入标准如下:(1)患者年龄为 ≥ 18 岁或 ≤ 80 岁;(2)经病理证实为GCA的患者,并根据2016年颁布的第8版胃癌TNM分期系统将患者分为I-IV期;(3)无其他并发恶性肿瘤。排除标准如下:(1)患者年龄 < 18 岁或 > 80 岁;(2)GCA复发者;(3)有手术或放化疗治疗史。另选取43例健康志愿者作为对照。取患者GCA组织($n=43$)和癌旁组织($n=43$)(距离肿瘤边缘5 cm),并采集GCA患者和健康志愿者外周血样,收集血清,保存在 -80°C 备用。所有参与者在样本采集前均签署知情同意书。研究方案获本院伦理委员会的审查和批准。

1.3 血清外泌体的分离和鉴定

使用exoEasy Maxi试剂盒从血清样本中分离外泌体,按说明书操作。在室温下孵育5 min后用1%醋酸铀染色1 min, PBS清洗网格,室温下干燥,在TEM下观察外泌体形态。

用纳米颗粒跟踪分析(nanosight tracking analysis, NTA)技术测定外泌体的大小和浓度。简言之,将外泌体与1 ml PBS混合均匀,然后将稀释后的外泌体注入颗粒分析跟踪仪(NanoSight NS300)中,并根据布朗运动和扩散系数自动跟踪粒径。测量条件设置为25帧/s,测量时间为60 s。

1.4 细胞培养

THP-1 细胞、HGC-27 细胞、AGS 细胞、NCI-N87 细胞和 GES-1 细胞均用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基置于 37 °C、5% CO₂ 的湿化空气中培养。用含 20 ng/ml IFN-γ 和 1 mg/ml LPS 的新鲜培养基培养 THP-1 细胞 6 h, 使其分化为 M1 表型巨噬细胞^[12]。为分析 GCA 患者血清外泌体对巨噬细胞 M1 极化可能的影响, 将与 GCA 血清外泌体共孵育后的 GCA 细胞再与巨噬细胞共培养, WB 和 ELISA 检测巨噬细胞 M1 极化标志分子 CD86、iNOS、IL-6 和 IL-1β 的水平。

1.5 外泌体和细胞的转染与分组

从公司获取合成并纯化后的 FN1 过表达载体 (pcDNA3.1-FN1) 及其阴性对照 (pcDNA3.1-NC) 和 miR-133a-5p 模拟物 (miR-133a-5p mimic) 及其阴性对照 (miR-NC)。按照制造商的说明, 分别用外泌体转染试剂和 Lipofectamine™3000 对外泌体和 HGC-27 细胞进行转染。

根据干预条件不同, 将 HGC-27 细胞分为如下几组: Normal-exo 组 (与健康志愿者血清外泌体共孵育)、GCA-exo 组 (与 GCA 患者血清外泌体共孵育)、pcDNA3.1-FN1-exo 组 (与 FN1 过表达处理的 GCA 患者血清外泌体共孵育)、pcDNA3.1-NC-exo 组 (与转染阴性对照 pcDNA3.1-NC 的 GCA 患者血清外泌体共孵育)、miR-133a-5p mimic 组 (转染 miR-133a-5p mimic)、miR-NC 组 (转染 miR-133a-5p mimic 的阴性对照)、pcDNA3.1-FN1-exo+miR-133a-5p mimic 组 (FN1 过表达的 GCA 患者血清外泌体+miR-133a-5p 过表达的 HGC-27 细胞共孵育) 和 pcDNA3.1-FN1-exo+miR-NC 组 (FN1 过表达的 GCA 患者血清外泌体+转染 miR-NC 的 HGC-27 细胞共孵育)。

1.6 荧光标记法观察外泌体的内化

用 PKH26 红色荧光标记的外泌体与 HGC-27 细胞在 24 孔板中放置 48 h。用 Hoechst 33342 对细胞核进行染色。在倒置荧光显微镜下观察外泌体的转移情况。

1.7 CCK-8 实验检测细胞增殖

采用 CCK-8 细胞计数试剂盒测定细胞增殖情况。将 3×10³ 个细胞接种于 96 孔板中。在细胞贴壁后的 24、48 和 72 h 时将 20 μl CCK-8 溶液加入培养孔中, 继续培养 2 h 后用酶标仪检测 490 nm 波长处每孔的光密度 (D) 值, 以 D 值代表细胞增殖水平。

1.8 细胞黏附实验

将转染成功的 HGC-27 细胞 (4×10⁴ 个细胞) 接种于用基质凝胶包被的 24 孔板中, 将培养板置于 37 °C、5%CO₂ 的条件下培养, 接种 30、60 和 90 min 后去除含有非黏附细胞的培养液, 用 PBS 洗涤两次以去除潜在的松散附着细胞, 加入新的培养基, 然后用

上述 CCK-8 法对贴壁细胞进行分析。

1.9 ELISA 法检测细胞分泌 IL-1β 和 IL-6 的水平

将 ELISA 试剂盒平衡至室温, 稀释标准溶液, 建立 6 个浓度梯度。在 96 孔板各孔加入不同浓度的标准品 (50 μl), 分别设置空白孔和样品孔。在样品孔中加入培养上清液的稀释液 40 μl, 然后加入 10 μl 生物素标记的 IL-6 和 IL-1β, 封板, 37 °C 孵育 30 min。除封板膜, 弃去液体, 洗涤并干燥, 放置 30 s 后弃去, 重复 5 次。样品孔分别加入酶标试剂 50 μl, 37 °C 孵育 30 min 后洗涤, 加入显色剂 A 和 B 各 50 μl, 混匀后避光显色 15 min, 反应终止后检测 450 nm 处的 D 值。

1.10 qPCR 检测 GCA 组织和细胞中 miR-133a-5p 和 FN-1 mRNA 的表达水平

用 RNasy Mini 试剂盒分离纯化 GCA 组织和细胞中的总 RNA。用 miScript 逆转录试剂盒将 RNA 逆转录成 cDNA, 再用 miScript SYBR-Green PCR 试剂盒对 cDNA 进行 qPCR 扩增。以 GAPDH 作为 FN1 的内参, U6 作为 miR-133a-5p 的内参, 采用 2^{-ΔΔCt} 法计算目的基因的相对表达水平。引物序列见表 1。

表 1 引物序列
Tab.1 Primer sequences

Target	Sequence
miR-133a-5p	F:5'-ACACTCCAGCTGGGAGCTGGT-3' R:5'-CTCAACTGGTGTCTGGAGTGG-3'
FN1	F:5'-TCTACAGTGCACGTGTCTCCAG-3' R:5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'
GAPDH	F:5'-ACCACAGTC CATGCCATCAC-3' R:5'-TCCACCACCT GTT GCTGTA-3'
U6	F:5'-GCUUCGGCAGCACAUAUACUAAA-3' R:3'-CGCUUCACGAAUUUGCGUGUCAU-3'

1.11 双荧光素酶报告基因实验验证 FN1 和 miR-133a-5p 的靶向关系

根据双荧光素酶报告基因检测试剂盒使用说明书, 对 miR-133a-5p 和 FN1 是否存在靶向调控关系进行验证。将含有原始 miR-133a-5p 结合位点的 FN1 3'-UTR 的野生型序列片段和突变型序列片段克隆到 pmirGLO 报告质粒中, 分别命名为 WT-FN1 和 MUT-FN1。用 Lipofectamine™3000 将 WT-FN1 或 MUT-FN1 与 miR-133a-5p 模拟物或 miR-NC 共转染 HGC-27 细胞。转染 48 h 后裂解细胞, 离心、收集上清液。使用双荧光素酶报告基因检测系统 (Promega) 检测荧光素酶活性。每个细胞样品中加入 100 μl 萤火虫荧光素酶工作液检测萤火虫荧光素酶, 加入 100 μl 海肾荧光素酶工作液检测海肾荧光素酶, 以萤火虫荧光素酶与海肾荧光素酶的比值作为

相对荧光素酶活性。

1.12 WB法检测胃贲门腺癌组织和细胞中相关蛋白表达水平

用含有蛋白酶抑制剂的RIPA裂解液裂解外泌体、组织标本和细胞。采用BCA蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度。用10%的SDS-PAGE分离蛋白,随后经电泳转移到PVDF膜上,在5%的脱脂奶粉中封闭,然后与一抗[抗CD63单抗(1:1 000)、抗CD81单抗(1:1 000)、抗iNOS单抗(1:1 000)、抗CD86单抗(1:1 000)和抗GAPDH单抗(1:1 000)]在4℃下孵育过夜,洗涤后在室温下加入山羊抗兔IgG(1:2 000)孵育2 h,以GAPDH(1:500)为内参,使用ECL发光试剂盒检测目标蛋白表达。

1.13 生物信息学工具预测GCA中可能存在的互作用调控网络

从NCBI数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)获取GEO芯片表达数据,选择GSE29272芯片数据分析GCA中的差异表达基因,该芯片中包含62例GCA和61例对照正常组织。筛选条件为 $\text{adj.}P\text{-Value}<0.05$ 和 $|\text{LogFoldChange}|>1$ 。通过DAVID网站(<http://david.ncifcrf.gov>)对目标基因进行功能富集分析。利用miRactDB(<http://mirdb.org>)、miRWalk(<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de>)和TargetScan(http://targetscan.org/vert_72/)网站工具获取目标基因的靶miRNA。利用STRING(<http://string-db.org>)网站预测基因间的紧密连接。利用TIMER(<http://cistrome.shinyapps.io/timer/>)数据库预测基因在肿瘤组织中与免疫细胞的关联性。

1.14 统计学处理

采用SPSS 23.0软件进行统计分析。符合正态分布的计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。绘制Kaplan-Meier生存曲线分析FN1的表达水平与GCA患者生存率的关系,采用卡方检验分析FN1的表达水平与临床病理参数的相关性,MannWhitney U检验分析GCA患者和健康志愿者血清外泌体FN1水平的差异;两组间的比较采用 t 检验,多组间的比较采用单因素方差分析法(ANOVA),方差分析后进行Tukey事后检验。以 $P<0.05$ 或 $P<0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 生物信息学工具预测GCA相关的分子机制

分析GSE29272芯片数据中的差异表达基因,结果(图1A)显示,在GCA中有159个上调基因和138个下调基因。借助DAVID在线分析软件对GCA中上调的基因进行KEGG通路富集分析,GO分析结果(图1B)显示,有59个基因显著富集在外泌体的生物

学过程(extracellular exosome; Fold enrichment=2.43632499257919; FDR=9.5225268279234 $\times 10^{-10}$)。从GO分析结果中选择另外2个感兴趣的生物学过程,即细胞黏附(cell adhesion; Fold enrichment=5.22626828509181; FDR=4.64615056682142 $\times 10^{-7}$)和细胞增殖正调控(positive regulation of cell proliferation; Fold enrichment=3.50983780168329; FDR=0.00922062706929841),与富集在外泌体生物学过程中的基因取交集(图1C),交集基因为FN1和COL18A1。在DisGeNET获取GCA(adenocarcinoma; CUI: C1333762)的前10个疾病风险基因,通过STRING预测FN1和COL18A1与GCA疾病风险基因间的紧密连接,结果(图1D)显示, FN1较COL18A1与更多的GCA风险基因具有互作用关系。此外,在TIMER数据库发现, FN1在胃癌组织中与巨噬细胞的免疫浸润具有较强的关联性(partial.cor=0.487; $P=1.82\times 10^{-23}$)(图1E)。推测FN1可能参与调控GCA细胞的免疫调节。

在miRWalk、TargetScan和miRactDB得到FN1的靶miRNA并取交集(图1F),交集miRNA有hsa-miR-543、hsa-miR-618、hsa-miR-643、hsa-miR-3615、hsa-miR-573、hsa-miR-1323、hsa-miR-133b和hsa-miR-133a-5p。根据已有的研究结果,选择将miR-133a-5p纳入本研究(图1G)。

2.2 GCA患者血清中外泌体的特征

从GCA患者和健康志愿者的血清中分离出外泌体,TEM下观察结果(图2A)显示,外泌体呈球形或椭圆形囊泡;NTA技术检测结果(图2B)表明,GCA患者和健康志愿者血清外泌体的大小无明显差异,直径50~100 nm;WB法检测结果显示,所有血清中分离的外泌体特异性标志蛋白CD63和CD81的表达均呈阳性,且在GCA患者组中水平更高(均 $P<0.01$,图2C、D),且GCA患者血清中外泌体的浓度高于健康志愿者(均 $P<0.01$,图2E)。

2.3 外泌体FN1在GCA中表达升高,与GCA的预后不良有关

qPCR检测结果显示,GCA-exo组FN1的表达水平显著高于Normal-exo组($P<0.01$,图3A);与邻近正常组织和GSE-1细胞相比, FN1在GCA组织和细胞中高表达(均 $P<0.01$,图3B、C),且在HGC-27细胞中表达水平最高,因此选取此细胞进行后续实验。

根据FN1在GCA患者血清外泌体中表达量的中位数(1.5163)将43例GCA患者分为FN1高表达组($n=21$)和FN1低表达组($n=22$),分析血清外泌体FN1表达水平与临床病理参数的相关性,结果(表2)显示,血清外泌体FN1的表达水平与TNM分期

($P=0.0329$) 和淋巴结转移有关联($P=0.0127$), 而与其他临床病理参数无关联(均 $P>0.05$)。Kaplan-Meier

生存曲线分析显示, 外泌体 FN1 水平较高的患者预后较差($P=0.0403$, 图 3D)。

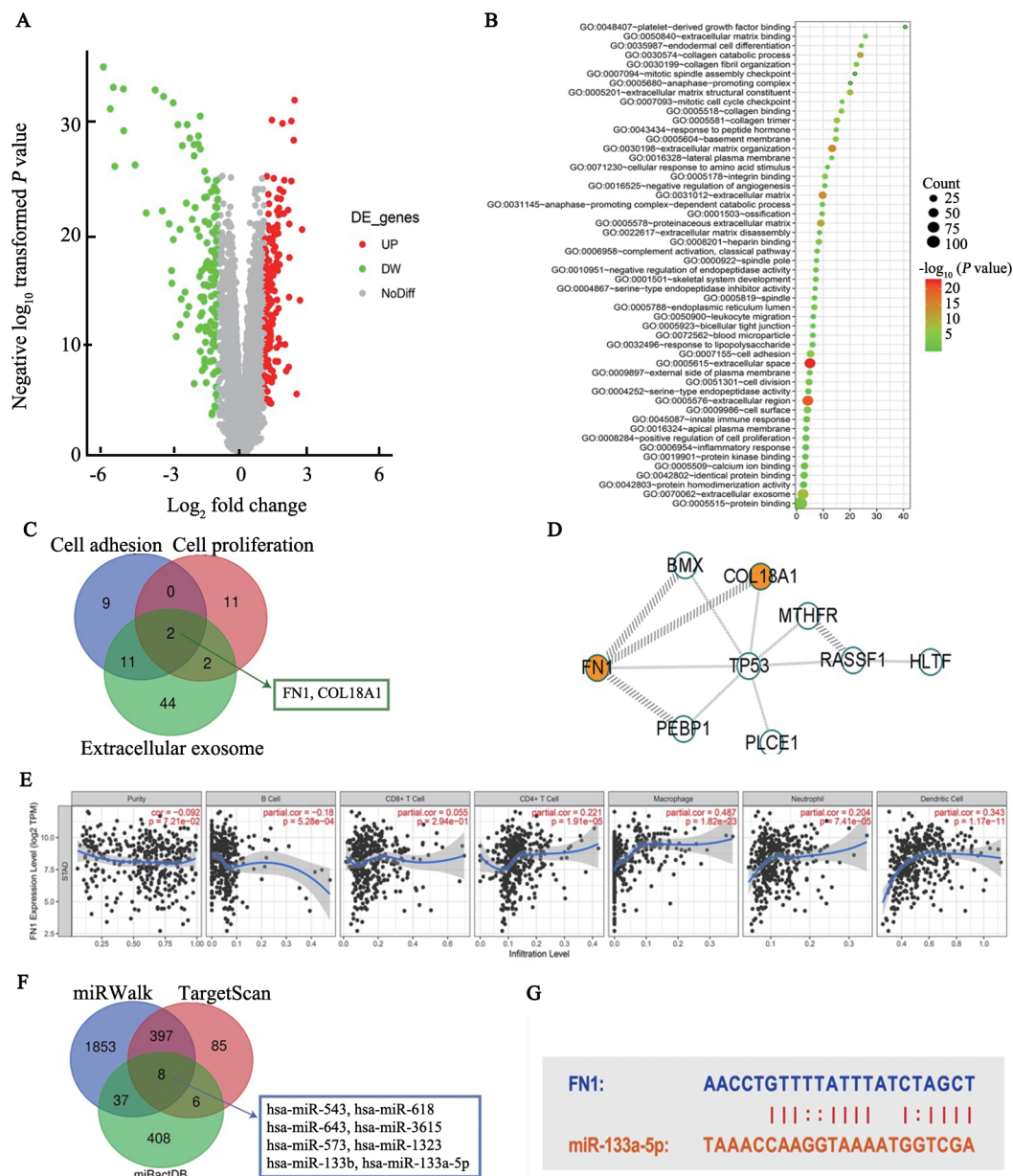


图 1 生物信息学工具预测 GCA 中可能的分子机制

图 1 Bioinformatics tools were used to predict possible molecular mechanisms in GCA

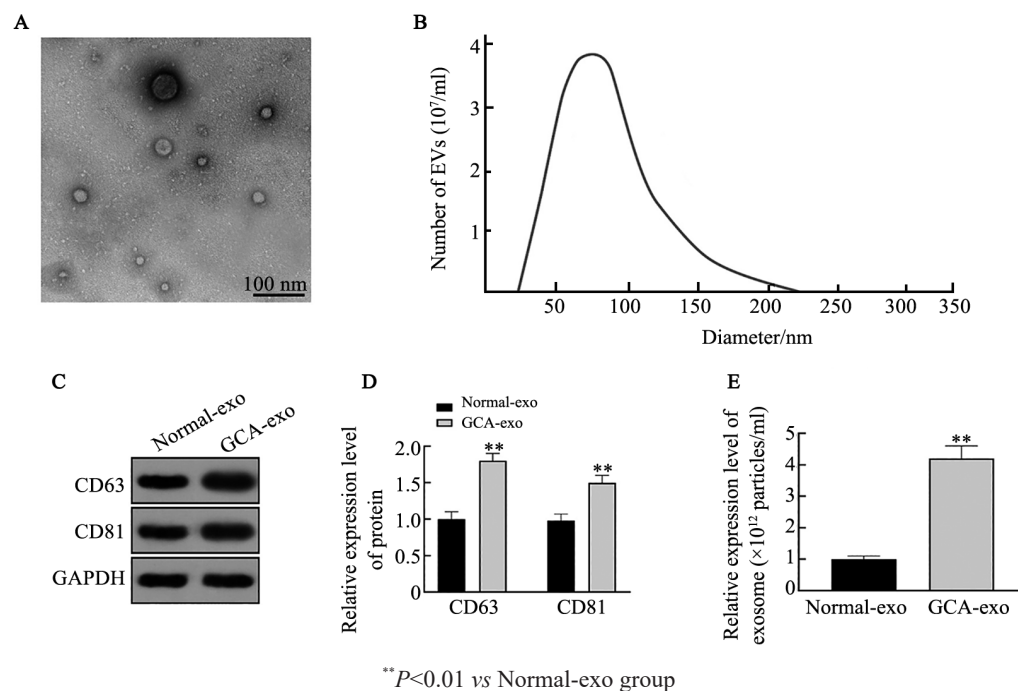
2.4 GCA 患者血清外泌体能够促进 GCA 细胞增殖、黏附并抑制巨噬细胞 M1 极化

为研究 GCA 血清外泌体在 GCA 进展中的作用, 将 HGC-27 细胞与血清外泌体共孵育 48 h, 观察其生物学行为变化。与 Normal-exo 组细胞相比, GCA-exo 组 HGC-27 细胞表现出更高的增殖和黏附能力(均 $P<0.05$, 图 4A、B)。分泌 IL-6 和 IL-1 β 是 M1 巨噬细

胞的标志, ELISA 检测结果(图 4C)显示, THP-1 细胞经 IFN- γ 和 LPS 诱导培养后, 分泌至培养上清液中的 IL-6 和 IL-1 β 水平显著升高(均 $P<0.05$), 证明 M1 型巨噬细胞诱导成功, 而上述 M1 型巨噬细胞与 GCA-exo 组 HGC-27 细胞共培养后, 相比与 Normal-exo 组细胞共培养, 上清液中 IL-6 和 IL-1 β 的水平显著降低(均 $P<0.05$, 图 4D)。qPCR 检测结

果(图4E)显示,与GCA-exo组HGC-27细胞共培养的巨噬细胞中CD68和iNOS的mRNA水平较Normal-exo组显著降低(均 $P<0.01$)。WB检测结果(图4F、G)显示,与GCA-exo组HGC-27细胞共培养

的巨噬细胞中CD86和iNOS的蛋白表达较Normal-exo组显著降低(均 $P<0.01$)。这表示GCA血清外泌体对M1型巨噬细胞极化发挥抑制作用。



A: Exosomes observed under TEM; B: NTA technology was used to analyze the size and concentration of exosomes; C, D: WB method was used to detect the levels of CD63 and CD81 in exosomes; E: The concentration of exosomes in the serum of GCA patients and healthy volunteers

图2 GCA患者血清中外泌体的特征

Fig.2 Characteristics of exosomes in serum of patients with GCA

表2 GCA患者FN1的表达与临床病理特征的相关性

Tab.2 Correlation between FN1 expression and clinicopathological features in patients with GCA

Clinicopathological feature		N	FN1 Expression		P
			Low (n=22)	High (n=21)	
Age/a	<50	15	7	8	0.7546
	≥50	28	15	13	
Gender	Male	26	14	12	0.7597
	Female	17	8	9	
TNM stage	I - II	23	16	7	0.0148
	III-IV	20	6	14	
Histological grade	Well	25	15	10	0.2231
	Poor	18	7	11	
Lymph node metastasis	Negative	27	10	17	0.0268
	Positive	16	12	4	

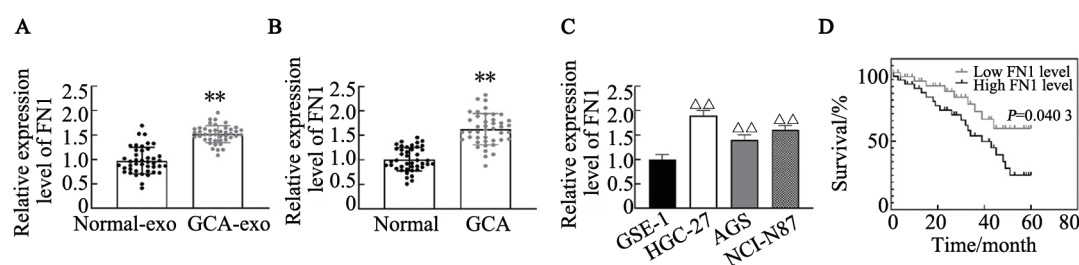
2.5 血清外泌体FN1能够促进GCA细胞增殖、黏附,抑制巨噬细胞M1极化

qPCR检测结果(图5A)显示,与pcDNA3.1-NC组相比,pcDNA3.1-FN1组外泌体中FN1表达水平升高($P<0.01$)。对外泌体进行荧光标记并与HGC-27细胞孵育,48 h后观察到带有红色荧光标记的外泌体聚集在细胞核周围的胞质中,表明HGC-27细胞可以有效地摄

取外泌体(图5B)。将pcDNA3.1-FN1(NC)处理后的血清外泌体与GCA细胞共孵育进行功能性实验以评估富含FN1的血清外泌体对GCA细胞的可能的调节作用。细胞增殖和黏附实验的检测结果显示,与pcDNA3.1-FN1-exo组HGC-27细胞增殖和黏附能力较pcDNA3.1-NC-exo组明显提高(均 $P<0.05$)。此外,与pcDNA3.1-FN1-exo处理的HGC-27细胞共培养的巨噬

细胞培养上清液中 IL-6 和 IL-1 β 的表达显著低于 pcDNA3.1-NC-exo 组 (均 $P < 0.05$, 图 5E), CD86 和 iNOS

的 mRNA 及蛋白表达水平也均有不同程度的下降 (均 $P < 0.01$, 图 5F、G、H)。

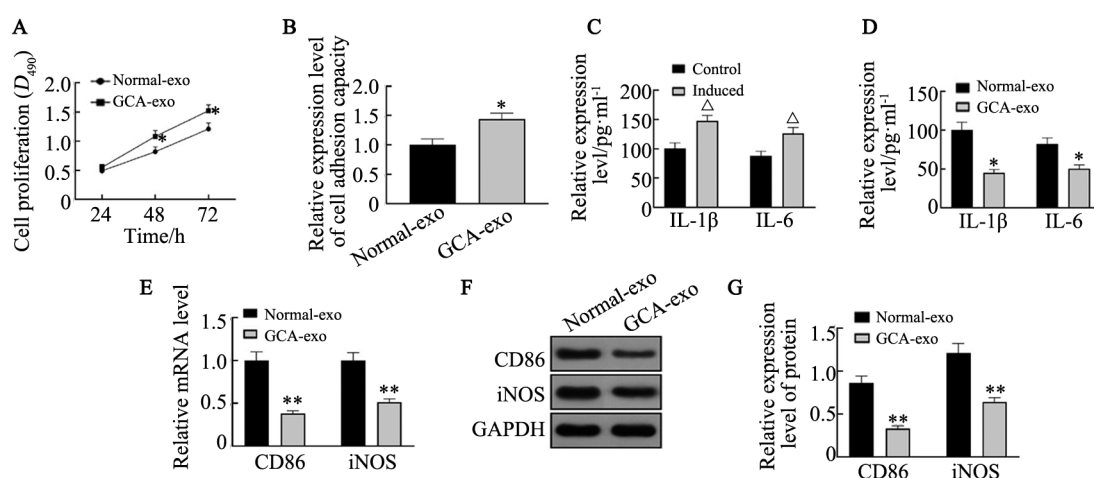


** $P < 0.05$ vs Normal-exo or Normal group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs GSE-1 group

A: The expression of FN1 in serum exosomes of GCA patients and healthy volunteers detected by qPCR; B: Expression of FN1 in GCA tissues and adjacent tissues; C: Expression of FN1 in GCA cell lines and GSE-1 cells; D: Kaplan-Meier survival curve of GBM patients with high and low expression of FN1

图3 外泌体 FN1 表达升高与 GCA 的预后不良有关

Fig.3 The increased expression of exosomal FN1 was related with the poor prognosis of GCA



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Normal-exo group; $\Delta P < 0.05$ vs Control group

A: GCA-exo promoted the proliferation of HGC-27 cells (detected by CCK-8 method); B: GCA-exo promoted the adhesion of HGC-27 cells; C, D: Successfully induced M1 type macrophages and high levels of IL-1 β and IL-6 secretion (detected by ELISA); E: The mRNA levels of CD86 and iNOS in HGC-27 cells incubated with GCA-exo were significantly reduced (detected by qPCR); F, G: The protein expression levels of CD86 and iNOS in HGC-27 cells incubated with GCA-exo were significantly reduced (detected by WB method)

图4 GCA 血清外泌体促进 HGC-27 细胞恶性生物学行为

Fig.4 GCA serum exosomes promoted malignant biological behaviors of HGC-27 cells

2.6 FN1 是 miR-133a-5p 的靶基因

双荧光素酶报告实验验证 FN1 和 miR-133a-5p 的靶向结合关系, 结果 (图 6A) 显示, miR-133a-5p 模拟物显著降低 WT-FN1 的荧光活性 ($P < 0.05$), 而对 MUT-FN1 几乎没有影响。接下来在 HGC-27 细胞中过表达 miR-133a-5p, 观察 FN1 的表达变化, 结果 (图 6B) 显示, 与 miR-NC 组相比, miR-133a-5p mimic 组的 FN1 表达水平显著降低 ($P < 0.05$)。

2.7 miR-133a-5p 在 GCA 组织和细胞中呈低表达且影响 HGC-27 细胞增殖、黏附和巨噬细胞 M1 极化

qPCR 检测结果 (图 7A、B) 显示, miR-133a-5p 在 GCA 组织和细胞中的表达较癌旁组织和 GSE-1 细

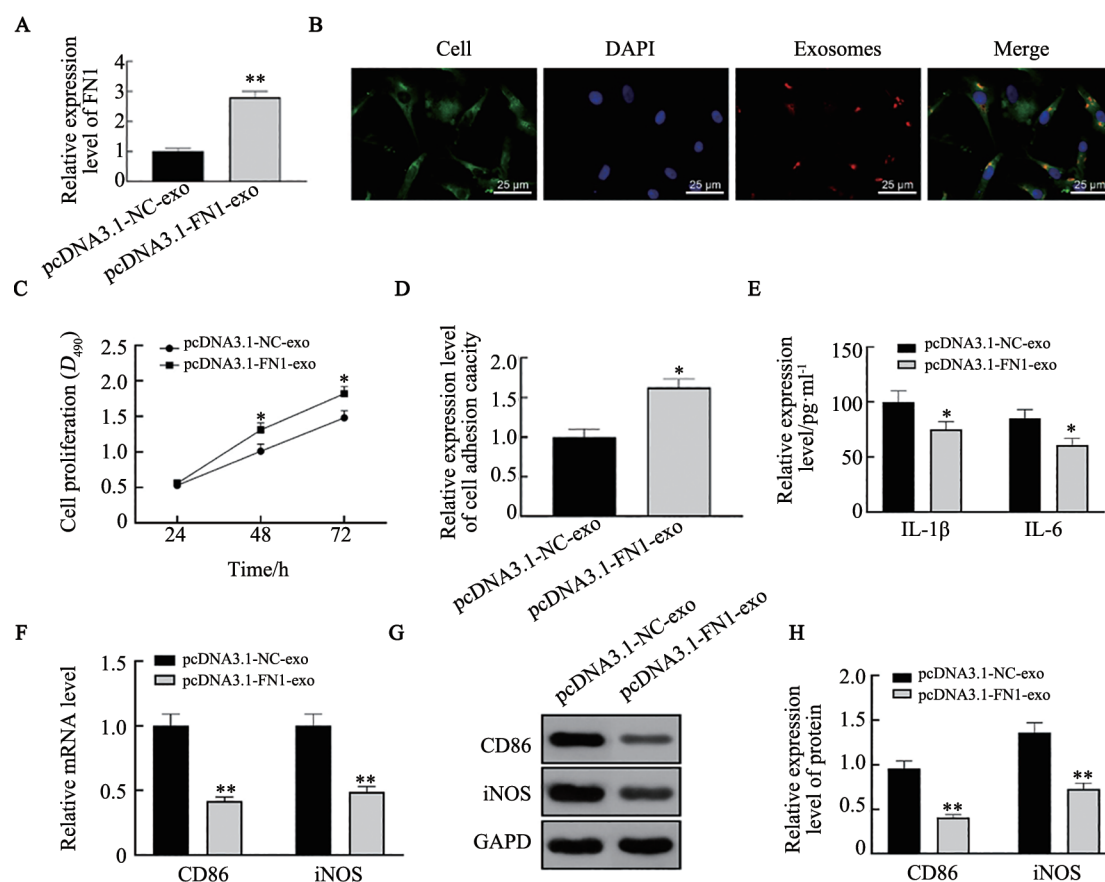
胞显著降低 (均 $P < 0.01$)。miR-133a-5p mimic 组 HGC-27 细胞的增殖和黏附能力较 miR-NC 组显著降低, 且与之共培养的巨噬细胞培养上清液中 IL-6 和 IL-1 β 的表达均显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$, 图 7C、D、E), 细胞中 CD86 和 iNOS 的 mRNA 及蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.05$, 图 7F、G、H)。

2.8 过表达 miR-133a-5p 能够部分逆转过表达 FN1 对 HGC-27 细胞的影响

将 miR-133a-5p 过表达处理的 GCA 细胞与 FN1 过表达处理的 GCA 血清外泌体共孵育, 观察 miR-133a-5p 和 FN1 在 GCA 中分子机制, 图 8A 显示了各组细胞中 FN1 的表达水平, 与 pcDNA3.1-FN1-exo+

miR-NC 组相比, pcDNA3.1-FN1-exo+miR-133a-5p mimic 组 HGC-27 细胞的增殖和黏附能力均显著降低,而与之共培养的巨噬细胞分泌 IL-6 和 IL-1 β 的能

力显著增强 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$, 图 8B-D)。此外,上调 miR-133a-5p 能够部分逆转 FN1 对 CD86 和 iNOS 的 mRNA 及蛋白表达的抑制(图 8E-G, 均 $P<0.01$)。

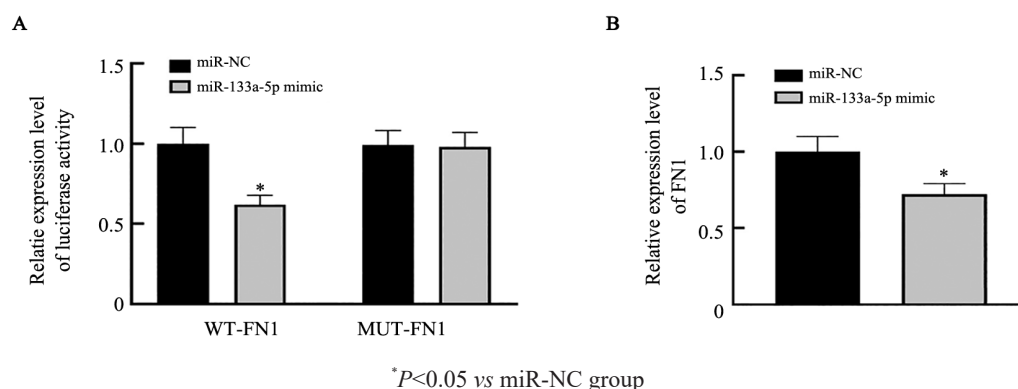


* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs pcDNA3.1-NC-exo group

A: The expression of FN1 in the exosomes transfected with pcDNA3.1-FN1 was significantly increased; B: The internalization of exosomes in HGC-27 cells was detected by fluorescent labeling method ($\times 400$); C: Co-incubation with pcDNA3.1-FN1-exo promoted the proliferation of HGC-27 cells (detected by the CCK-8 method); D: Co-incubation with pcDNA3.1-FN1-exo promoted the adhesion of HGC-27 cells; E: The concentration of IL-1 β and IL-6 in the culture supernatant of macrophages detected by ELISA; F: The mRNA levels of CD86 and iNOS in HGC-27 cells detected by qPCR; G, H: The levels of CD86 and iNOS protein expression in HGC-27 cells detected by WB

图5 血清外泌体 FN1 对 HGC-27 细胞的影响

Fig.5 Effects of serum exosomal FN1 on HGC-27 cells

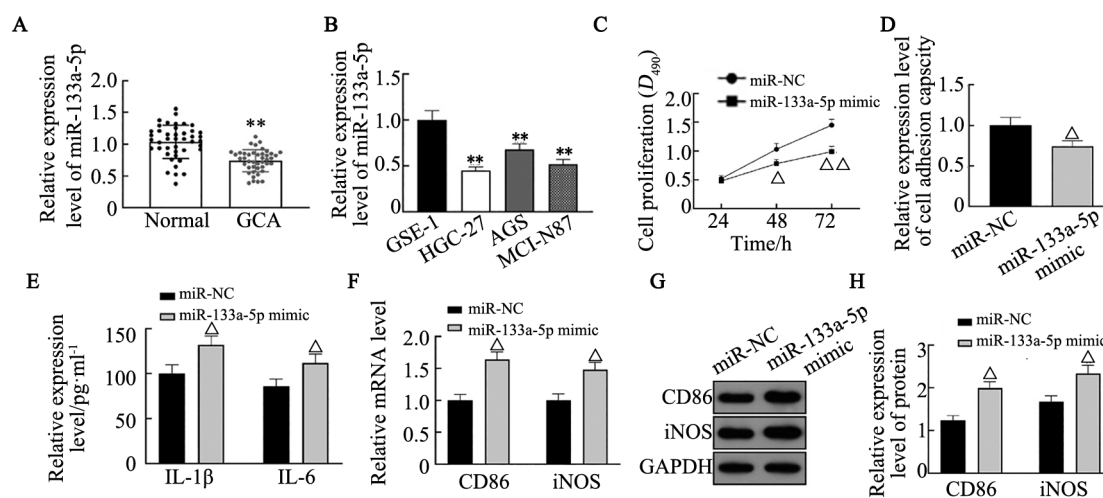


* $P<0.05$ vs miR-NC group

A: Dual luciferase report experiment verified the targeting relationship between FN1 mRNA and miR-133a-5p; B: The effect of miR-133a-5p overexpression on the expression level of FN1 in HGC-27 cells detected by qPCR

图6 FN1 是 miR-133a-5p 的靶基因

Fig.6 FN1 was predicted to be a target gene of miR-133a-5p



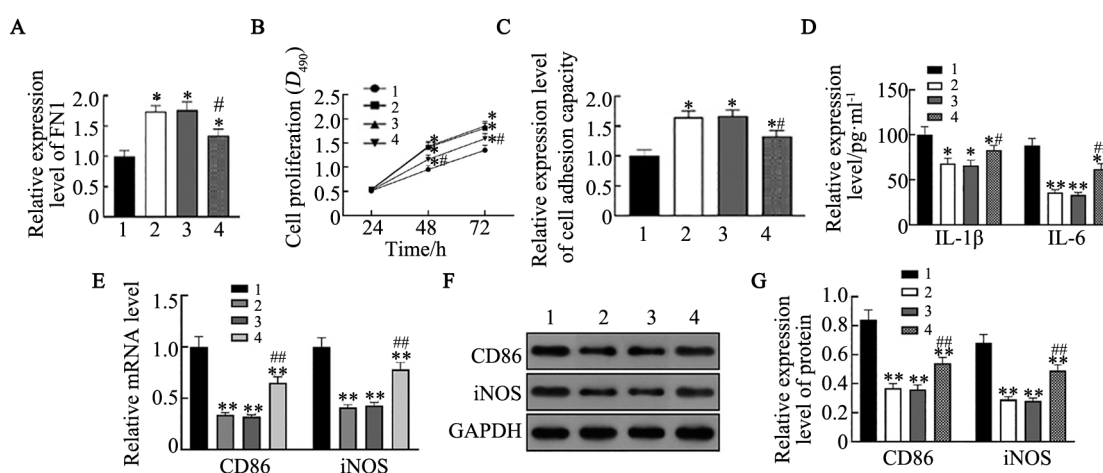
** $P < 0.01$ vs Normal or GSE-1 cells; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs miR-NC group

A: The expression of miR-133a-5p in GCA tissues and adjacent tissues detected by qPCR;

B: The expression of miR-133a-5p in GCA cells and GSE-1 cells; C: The effect of miR-133a-5p overexpression on the proliferation of HGC-27 cells (detected by CCK-8 method); D: The effect of miR-133a-5p overexpression on the adhesion ability of HGC-27 cells; E: Co-culture with HGC-27 cells overexpressing miR-133a-5p promoted the secretion of IL-1 β and IL-6 by macrophages (detected by ELISA); F: The effect of miR-133a-5p overexpression on the mRNA levels of CD86 and iNOS in HGC-27 cells (detected by qPCR); G, H: The effect of miR-133a-5p overexpression on the expression of CD86 and iNOS protein in HGC-27 cells (detected by WB method)

图7 miR-133a-5p 在 GCA 组织和细胞中的表达水平及对 HGC-27 细胞的影响

Fig.7 Expression level of miR-133a-5p in GCA tissues and cells and its effect on HGC-27 cells



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ pcDNA3.1-NC-exo group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs pcDNA3.1-FN1-exo+miR-NC group

1: pcDNA3.1-NC-exo; 2: pcDNA3.1-FN1-exo; 3: pcDNA3.1-FN1-exo+miR-NC; 4: pcDNA3.1-FN1-exo+miR-133a-5p mimic

A: FN1 expression level in each group of cells; B: Cell proliferation detected by CCK-8; C: Cell adhesion test results; D: The levels of IL-1 β and IL-6 secreted by macrophages detected by ELISA; E: The mRNA level of CD86 and iNOS in HGC-27 cells detected by qPCR; F, G: The protein expression of CD86 and iNOS in HGC-27 cells detected by WB

图8 过表达 miR-133a-5p 能够部分逆转过表达 FN1 对 HGC-27 细胞的影响

Fig.8 Overexpression of miR-133a-5p could partially reverse the effect of FN1 overexpression on HGC-27 cells

3 讨论

本研究发现, FN1 在 GCA 患者血清外泌体中表达显著升高, 并与 GCA 预后不良有关联, 富含 FN1 的 GCA 血清外泌体能够促进 GCA 细胞增殖和黏附, 抑制 M1 型巨噬细胞极化, 而 miR-133a-5p 在 GCA 中的

表达显著降低, 过表达 miR-133a-5p 能够部分逆转 FN1 表达升高对 GCA 细胞的影响。先前的报道^[13]指出, FN1 在包括 GCA 在内的多种胃肿瘤组织中的表达均较健康对照组均有提升。本研究借助 GEO 数据库分析发现, FN1 在 GCA 组织中的表达异常上调, 并与细胞增殖、黏附和分泌的生物过程有关, 且

在胃肿瘤中 FN1 水平与巨噬细胞存在较高关联性, 提示 FN1 可能以外泌体形式参与调控 GCA 细胞的增殖、黏附和免疫调节过程。实验结果显示, GCA 患者血清中较健康志愿者存在更多外泌体。外泌体可以将生物活性分子传递给靶细胞, 从而影响其功能和表型^[14]。如结肠癌细胞分泌的外泌体富含 Δ Np73, 与含有外泌体的 Δ Np73 孵育后, 靶细胞的增殖能力显著提高^[15]。本研究发现 GCA 血清外泌体能够被 GCA 细胞有效摄取, 并显著促进 GCA 细胞增殖和黏附。据报道^[16], M1 巨噬细胞是可以产生促炎细胞因子的巨噬细胞, 具有吞噬大量病原体的能力。M1 巨噬细胞的特征在于分泌细胞因子如 IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6 的能力增强, 在表型上表达高水平的 CD80 和 CD86 等共刺激分子, 并诱导 NOS2 或 iNOS 产生 NO^[17-18]。本研究分析表明, 与 GCA 患者血清中分离出的外泌体共培养后的 GCA 细胞显著抑制巨噬细胞分泌 IL-1 β 和 IL-6, 巨噬细胞中 iNOS 和 CD86 的 mRNA 及蛋白表达水平也有不同程度的下降。FN1 能够以外泌体形式参与调控肿瘤进展^[19-20]。qPCR 检测发现, FN1 在 GCA 血清外泌体中表达显著升高, 与 GCA 患者的生存率低, 预后不良有关。功能性实验结果显示 FN1 过表达显著提高了 GCA 细胞增殖和黏附能力, 与 FN1 过表达处理的血清外泌体共孵育的 GCA 细胞抑制巨噬细胞分泌 IL-1 β 和 IL-6 的能力。这些结果证实, 血清外泌体分泌的 FN1 参与调控 GCA 细胞行为, 能够促进 GCA 细胞增殖和黏附, 抑制 M1 型巨噬细胞极化, 血清外泌体 FN1 可能成为治疗 GCA 的有效分子靶点。

miR-133a-5p 在多种肿瘤进展中均发挥抑癌作用, 其在 GCA 组织和细胞中的表达显著下调, 可负调控 FN1 的表达、有效抑制 GCA 细胞的恶性进展^[9, 21-22]。本研究中功能性实验分析显示, 上调 miR-133a-5p 可抑制 GCA 细胞增殖和黏附, 促进 M1 型巨噬细胞极化。将 miR-133a-5p 过表达处理的 GCA 细胞与 FN1 过表达处理的血清外泌体共孵育, FN1 显著促进的 GCA 细胞增殖和黏附均被上调的 miR-133a-5p 部分抑制, 巨噬细胞培养上清液中 IL-1 β 和 IL-6 的浓度、iNOS 和 CD86 的 mRNA 及蛋白表达水平均随 miR-133a-5p 水平上调而提高。以上实验结果表明, GCA 血清外泌体分泌的 FN1 对 GCA 恶性行为的促进作用可通过上调 miR-133a-5p 来抑制。

本研究证实了血清外泌体 FN1 对 GCA 细胞增殖和黏附发挥促进作用, 对 M1 型巨噬细胞极化起抑制作用。但本实验缺乏相关体内实验的探讨, 后续将开展相关研究以进一步证实血清外泌体 FN1 在 GCA 进展中的作用。

[参 考 文 献]

- [1] LI H S, LIU X, ZHANG M Y, et al. Clinicopathologic characteristics, survival, and treatments for gastric adenocarcinoma: a population-based study[J]. *Curr Oncol*, 2020, 27(6): 527-536. DOI:10.3747/co.27.6337.
- [2] ZHU X, PIGAZZI A, ZELL J, et al. Changing disparity of gastric cancer incidence by histological types in US race-specific populations[J/OL]. *Cancer Control*, 2020, 27(1): 107327482097715 [2021-05-11]. <https://doi.org/10.1177/1073274820977152>. DOI: 10.1177/1073274820977152.
- [3] YUAN X, QIAN N, LING S, et al. Breast cancer exosomes contribute to pre-metastatic niche formation and promote bone metastasis of tumor cells[J]. *Theranostics*, 2021, 11(3): 1429-1445. DOI:10.7150/thno.45351.
- [4] 陈良远, 杨阳, 黄春莉, 等. 肺腺癌细胞源性外泌体活化的人 THP-1 巨噬细胞促进肺癌细胞的侵袭[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2019, 35(11): 967-972. DOI: 10.13423/j.cnki.cjmi.008884.
- [5] ZHA Y, LI Y, LIN T, et al. Progenitor cell-derived exosomes endowed with VEGF plasmids enhance osteogenic induction and vascular remodeling in large segmental bone defects[J]. *Theranostics*, 2021, 11(1): 397-409. DOI:10.7150/thno.50741.
- [6] ZLOTOGORSKI-HURVITZ A, DAYAN D, CHAUSHU G, et al. Morphological and molecular features of oral fluid-derived exosomes: oral cancer patients versus healthy individuals[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2016, 142(1): 101-110. DOI: 10.1007/s00432-015-2005-3.
- [7] RAHBARI M, RAHBARI N, REISSFELDER C, et al. Exosomes: novel implications in diagnosis and treatment of gastrointestinal cancer[J]. *Langenbecks Arch Surg*, 2016, 401(8): 1097-1110. DOI: 10.1007/s00423-016-1468-2.
- [8] GAN D X, WANG Y B, HE M Y, et al. Lung cancer cells-controlled Dkk-1 production in brain metastatic cascade drive microglia to acquire a pro-tumorigenic phenotype[J/OL]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 591405 [2021-05-11]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33384994>. DOI:10.3389/fcell.2020.591405.
- [9] 杨朝纲, 窦荣章, 王舒艺, 等. 肿瘤细胞来源的外泌体微小 RNAs 介导肿瘤免疫抑制的研究进展[J]. *中华普通外科杂志*, 2021, 36(1): 75-77. DOI:10.3760/cma.j.cn113855-20200527-00426.
- [10] WU C, ZENG M H, LIAO G, et al. Neuropilin-1 interacts with fibronectin-1 to promote epithelial-mesenchymal transition progress in gastric cancer[J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13: 10677-10687. DOI:10.2147/ott.s275327.
- [11] GUO Y, SUN P, GUO W, et al. Long non-coding RNA LINC01503 promotes gastric cardia adenocarcinoma progression via miR-133a-5p/VIM axis and EMT process[J]. *Dig Dis Sci*, 2021, 66(10): 3391-3403. DOI:10.1007/s10620-020-06690-9.
- [12] CHANPUT W, MES J J, SAVELKOUL H F, et al. Characterization of polarized THP-1 macrophages and polarizing ability of LPS and food compounds[J]. *Food Funct*, 2013, 4(2): 266-276. DOI:10.1039/c2fo30156c.
- [13] GUO L, SONG C, WANG P, et al. A systems biology approach to detect key pathways and interaction networks in gastric cancer on the basis of microarray analysis[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(5): 7139-7145. DOI:10.3892/mmr.2015.4242.

- [14] JAFARI A, BABAJANI A, ABDOLLAHPUR-ALITAPPEH M, et al. Exosomes and cancer: from molecular mechanisms to clinical applications[J/OL]. *Med Oncol*, 2021, 38(4): 45 [2021-05-11]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33743101/>. DOI:10.1007/s12032-021-01491-0.
- [15] SOLDEVILLA B, RODRÍGUEZ M, SAN MILLÁN C, et al. Tumor-derived exosomes are enriched in ΔNp73, which promotes oncogenic potential in acceptor cells and correlates with patient survival[J]. *Hum Mol Genet*, 2014, 23(2): 467-478. DOI:10.1093/hmg/ddt437.
- [16] XIE C, GUO Y, LOU S. LncRNA ANCR promotes invasion and migration of gastric cancer by regulating FoxO1 expression to inhibit macrophage M1 polarization[J]. *Dig Dis Sci*, 2020, 65(10): 2863-2872. DOI:10.1007/s10620-019-06019-1.
- [17] 赵蓓, 殷亦男, 王程燕, 等. 牡荆素调控 M1/M2 型巨噬细胞极化抗肺腺癌转移的作用研究[J]. *中国免疫学杂志*, 2020, 36(20): 30-35. DOI:10.3969/j.issn.1000-484X.2020.20.006
- [18] LIU Z B, ZENG H R, XU K Q, et al. AFM-IR probing the influence of polarization on the expression of proteins within single macrophages[J]. *J Mater Chem B*, 2021, 9(12): 2909-2917. DOI:10.1039/d0tb02584d.
- [19] LI X L, CHEN R J, KEMPER S, et al. Structural and functional characterization of fibronectin in extracellular vesicles from hepatocytes[J/OL]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 640667 [2021-05-11]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33816490/>. DOI:10.3389/fcell.2021.640667.
- [20] KERSY O, LOEWENSTEIN S, LUBEZKY N, et al. Omental tissue-mediated tumorigenesis of gastric cancer peritoneal metastases[J/OL]. *Front Oncol*, 2019, 9: 1267 [2021-05-11]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31803630/>. DOI:10.3389/fonc.2019.01267.
- [21] YIN L, CHEN J, MA C, et al. Hsa_circ_0046263 functions as a ceRNA to promote nasopharyngeal carcinoma progression by upregulating IGFBP3[J/OL]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(7): 562 [2021-05-11]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32703944/>. DOI:10.1038/s41419-020-02785-3.
- [22] WANG T, WANG X, DU Q, et al. The circRNA circP4HB promotes NSCLC aggressiveness and metastasis by sponging miR-133a-5p [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 513(4): 904-911. DOI:10.1016/j.bbrc.2019.04.108.

[收稿日期] 2021-06-27

[修回日期] 2021-10-28

[本文编辑] 黄静怡