

## M2巨噬细胞来源的外泌体转运miR-1260b促进胶质母细胞瘤迁移的机制研究

张衡<sup>1</sup>, 陈倩倩<sup>1</sup>, 桂艳萍<sup>1</sup>, 黄敏<sup>1</sup>, 郭雅冰<sup>2</sup>, 赵丽<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>中国药科大学基础医学与临床药学院,南京 211198; <sup>2</sup>中国药科大学药学动物实验中心,南京 211198)

**摘要** 肿瘤相关巨噬细胞浸润肿瘤组织并促进胶质母细胞瘤进展,但作用机制还有待进一步研究。本文以探究M2巨噬细胞通过分泌外泌体影响胶质母细胞瘤迁移能力的机制为目的。采用超高速离心法提取外泌体;采用RNA测序筛选差异表达的miRNA;采用数据库靶点预测miRNA可能的靶蛋白;采用双萤光素酶报告基因实验验证miRNA与靶基因的相互作用;采用裸鼠皮下移植瘤模型检测肿瘤细胞增殖能力。实验结果表明,肿瘤相关巨噬细胞主要是M2巨噬细胞,M2巨噬细胞分泌的外泌体能够促进脑胶质瘤细胞的迁移,其机制与转运miR-1260b且靶向调控AJAP1影响脑胶质瘤细胞的迁移有关,提示巨噬细胞分泌的外泌体通过转运miR-1260b,从而影响胶质母细胞瘤的迁移能力。

**关键词** 胶质母细胞瘤; M2巨噬细胞; 外泌体; miR-1260b; AJAP1

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2023)01-0095-12

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.2023020901

引用本文 张衡, 陈倩倩, 桂艳萍, 等. M2巨噬细胞来源的外泌体转运miR-1260b促进胶质母细胞瘤迁移的机制研究[J]. 中国药科大学学报, 2023, 54(1): 95–106.

Cite this article as: ZHANG Heng, CHEN Qianqian, GUI Yanping, et al. Mechanism of M2 macrophage-derived exosomes in promoting the migration of glioblastoma via transferring miR-1260b[J]. J China Pharm Univ, 2023, 54(1): 95–106.

## Mechanism of M2 macrophage-derived exosomes in promoting the migration of glioblastoma via transferring miR-1260b

ZHANG Heng<sup>1</sup>, CHEN Qianqian<sup>1</sup>, GUI Yanping<sup>1</sup>, HUANG Min<sup>1</sup>, GUO Yabing<sup>2</sup>, ZHAO Li<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>School of Basic Medicine and Clinical Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198;

<sup>2</sup>Center of Pharmaceutical Animal Experiments, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China

**Abstract** Tumor-associated macrophage promotes the progression of glioblastoma (GBM) by infiltrating into tumor tissue, yet its mechanism has not been fully elucidated. This paper aimed to investigate the mechanism of M2 macrophages in affecting the migratory capacity of GBM via secreting exosomes. Ultracentrifugation was used to extract exosomes; RNA sequencing was carried out to screen differentially expressed miRNAs; target prediction database was used to predict the possible target proteins of miRNA; Dual-luciferase reporter assay was performed to verify the interaction between miRNA and target genes; and the proliferation ability of tumor cells was detected by subcutaneous xenograft model in nude mice. Results showed that tumor-related macrophages were mainly M2 macrophages, and that exosomes secreted by M2 macrophages could promote the migration of glioma cells. Meanwhile, exosomes secreted by M2 macrophages transported miR-1260b and affected the migration of glioma cells through directly targeted AJAP1, suggesting that exosomes secreted by macrophages could affect the migration ability of GBM through transporting miR-1260b.

**Key words** glioblastoma; M2 macrophage; exosomes; miR-1260b; AJAP1

胶质母细胞瘤(glioblastoma, GBM)是最常见的恶性肿瘤之一,其恶性程度高,进展迅速。患者

的中位生存期仅有15个月,5年生存率低于6%<sup>[1]</sup>。目前GBM的治疗以手术治疗为主,辅以放疗和替

莫唑胺化疗<sup>[2]</sup>。尽管这些治疗方法可以在一定程度上缓解患者的疼痛,但GBM依然存在预后不良、中位生存期短等问题。因此在分子水平研究GBM的进展机制,对提供新的治疗方法具有重要意义。

肿瘤微环境是包括多种细胞、生物化学分子和细胞外基质(extra-cellular matrix, ECM)的特殊环境。GBM和其他恶性实体肿瘤一样,被多种免疫细胞浸润,如肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophage, TAM)、单核细胞、肥大细胞等。据报道,TAM是肿瘤微环境中促进肿瘤进展的主要参与者<sup>[3]</sup>。此外,TAM被认为更类似于M2型巨噬细胞<sup>[4]</sup>。

外泌体是大小40~120 nm的脂质双分子层囊泡,内含蛋白质、DNA和miRNA等各种生物活性分子,在细胞通讯中发挥作用<sup>[5]</sup>。MiRNA是长度在18~22个核苷酸的非编码RNA分子,可以通过与靶mRNA的3'-非翻译区(3'-untranslated regions, 3'UTR)结合并抑制目标基因的表达。目前,越来越多的miRNA证实与肿瘤的发生发展有关<sup>[6-7]</sup>。现阶段,有200多种miRNA相关药物处于临床研究的不同阶段<sup>[8]</sup>。

本研究观察到巨噬细胞浸润胶质母细胞瘤组织,运用体外细胞划痕实验发现M2巨噬细胞对胶质母细胞瘤的促迁移作用,而分离M2型巨噬细胞分泌的外泌体(M2 macrophage-derived exosomes, M2 exos)同样促进GBM细胞的迁移,采用RNA测序筛选发现miR-1260b在M2 exos处理的U251细胞中表达显著升高。GBM中miR-1260b的过表达可以抑制AJAP1的表达,进而促进GBM细胞的迁移。因此,本研究的研究结果为GBM的治疗提供了新的潜在思路。

## 1 材料

### 1.1 试剂

DMEM高糖培养基,RPMI-1640培养基,胎牛血清(美国Gibco公司);青霉素-链霉素双抗,鬼比环肽(江苏碧云天生物科技有限公司);佛波酯(PMA)、IL-4、IL-13(美国Sigma公司);DAB(北京中杉金桥生物技术有限公司);N-钙黏蛋白(N-cadherin)、E-钙黏蛋白(E-cadherin)、波形蛋白(vimentin)抗体(美国Santa Cruz公司);AJAP1抗体(武汉爱博泰克生物科技有限公司);CD68、CD206、F4/80

(美国Cell Signaling Technology公司);β-Actin、GAPDH抗体(武汉三鹰生物技术有限公司);Alexa Fluor®488偶联二抗(英国Abcam公司);DAPI(江苏凯基生物技术股份有限公司);RIPA裂解液、硝甲基纤维素膜(美国ThermoFisher公司);脱脂牛奶(美国Bio-Rad公司);化学发光液(上海天能生命科学有限公司);Trizol RNA提取试剂、Lipofectamine 2000(美国Invitrogen公司);miRNA加尾法逆转录试剂盒、高效cDNA一链合成试剂盒、高特异性染料法定量PCR检测试剂盒、miRNA染料法定量专用预混液(南京诺维赞生物科技有限公司);pUC57 plasmid DNA pGL3 promoter vector(金斯瑞生物科技股份有限公司);双萤光素酶报告基因试剂盒(美国Promega公司);miR-1260b模拟物(miR-1260b mimics)、模拟物阴性对照(mimics negative control, miR-NC)(上海吉玛基因有限公司);miR-1260b过表达病毒(miR-1260b overexpressing lentiviral particles, LV-miR-1260b)、阴性对照病毒(negative control lentiviral particles, LV-miR-NC)(广州复能基因有限公司);聚凝胺(美国Millipore公司);miR-1260b特异性逆转录引物、U6、AJAP1和GAPDH的扩增前引物及后引物(北京擎科生物公司);红色荧光蛋白基因的慢病毒(RFP-Lentivirus, 上海钰博生物科技有限公司);其他试剂均为市售分析纯。

### 1.2 仪器

NanoDrop™ One/OneC微量UV-Vis分光光度计、PCR扩增仪(美国Thermo公司);实时荧光定量PCR系统(Life Technologies公司);DM2500正置荧光显微镜、DMi8倒置荧光显微镜(德国Leica公司);LSM800型激光共聚焦显微镜(德国Zeiss公司);电泳仪、全湿转膜槽(美国Bio-Rad公司);全自动化学发光成像仪(上海天能科技有限公司);超滤管(美国Beckman公司);FEI Tecnai 12透射电子显微镜(荷兰Philips公司);NanoSight LM20纳米颗粒分析仪(英国Amesbury公司)。

### 1.3 动物

清洁级雌性BALB/c裸小鼠,6~8周龄,购自常州卡文思实验动物有限公司,合格证号:SCXK(苏)2016-0010;雌性C57BL/6小鼠,6~8周龄,购自中国科学院上海实验动物中心,合格证号:SCXK(沪)2018-0004。动物研究根据美国国立卫

生研究院的实验动物护理和使用指南(NIH 出版物第 86-23 号, 1985 年修订)进行。该方案获得中国药科大学动物实验伦理委员会批准。

#### 1.4 细胞株

GBM 细胞系 A172 和 U251、THP-1 单核细胞、GL261 和 293T 细胞株购自中国科学院细胞库。

## 2 方法

### 2.1 细胞培养及转染

用含有 10% 胎牛血清和 1% 青霉素和链霉素的 DMEM 高糖培养基培养 A172、U251 和 293T 细胞, 并置于 5% CO<sub>2</sub>, 37 °C 恒温的孵箱中。用含有 10% 胎牛血清和 1% 青霉素和链霉素的 RPMI 1640 培养基培养 THP-1 细胞, 选择生长对数期细胞进行转染, 按照 Lipofectmine 2000 转染试剂的说明, 将 miR-1260b 模拟物阴性对照、miR-1260b 模拟物分别转染 A172、U251 及巨噬细胞, 得到相应瞬时转染细胞, 以不同的转入物质分组、命名。U251 细胞分别稳定感染 LV-miR-NC、LV-miR-1260b 慢病毒颗粒, 构建稳定转染的细胞株。GL261 细胞稳定感染红色荧光蛋白基因的慢病毒颗粒, 构建稳定转染的细胞株。

### 2.2 动物原位移植瘤模型及皮下异种移植瘤模型的建立

将 C57BL/6 小鼠置于恒温和湿度适宜的条件下, 自由饮食, 光/暗循环 12 h/12 h。用氯胺酮(100 mg/kg)麻醉小鼠, 用生理盐水 5 μL 重悬的  $1 \times 10^6$  个红色荧光蛋白标记的 GL261 细胞注射到小鼠脑右额叶中建立颅内原位移植瘤模型。2 周后, 处死小鼠并取出其大脑, 用 4% 多聚甲醛固定、30% 蔗糖溶液脱水, 冰冻切片、染色固定, 进行 HE 染色和免疫组化(immunohistochemistry, IHC)检测。

将 U251-LV-miR-NC 或 U251-LV-miR-1260b 细胞皮下注射到 BALB/c 裸鼠的腋下( $5 \times 10^6$  个细胞, 100 μL, n = 4)建立皮下异种移植瘤模型。每 3 天检测一次肿瘤体积,  $V = (b^2 \times l)/2$ , b 和 l 分别为肿瘤的宽和长。实验结束处死小鼠, 取出皮下异种移植肿瘤, 拍照, 固定, 并切片进行 IHC 检测。

### 2.3 免疫组化

石蜡包埋切片 60 °C 下加热 30 min 进行脱蜡, 进行水合, 抗原修复; PBST 缓冲液清洗 3 次, 每次 1 min; 使用封闭液封闭 15 min, 阻断非特异性结合

位点; PBS 缓冲液清洗 3 次, 每次 1 min, 分别加入 N-钙黏蛋白(1:500)、E-钙黏蛋白(1:500)、波形蛋白(1:500)和 AJAP1(1:2 000)一抗 4 °C 孵育过夜; 使用 PBS 清洗 3 次, 每次 1 min, 生物素标记的山羊抗小鼠/兔 IgG, 37 °C 孵育 20 min; PBS 缓冲液清洗 3 次, 每次 1 min, DAB(1:20)显色, 镜下控制; 水洗终止显色; 苏木精淡染细胞核 2 min, 水洗, 蓝化, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶固封。

### 2.4 免疫荧光染色和 F-actin 染色

将 THP-1 细胞接种于 6 孔板的盖玻片上, 分为空白对照组和聚凝胺、IL-4、IL-13 处理组, 分别用 4% 组织细胞固定液固定 15 min, 之后用免疫染色通透液通透 15 min, PBS 清洗 3 次, 每次 5 min; 3% 牛血清白蛋白常温封闭 1 h; 一抗 CD68(1:400), CD206(1:500), F4/80(1:400) 在 4 °C 孵育过夜。次日, PBS 清洗 3 次, 每次 5 min, 加入 Alexa Fluor 偶联二抗, 常温孵育 1 h, 清洗后加入 DAPI 染色 20 min, 使用激光共聚焦显微镜观察捕捉图像。

将 A172 和 U251 细胞接种于 6 孔板的盖玻片上, 并用含或不含 M2 巨噬细胞上清液的培养基孵育 24 h, 用 4% 组织细胞固定液固定 15 min, 之后用免疫染色通透液通透 15 min, PBS 清洗 3 次, 每次 5 min; 用 F-actin 染色 20 min, DAPI 染色 15 min, 使用激光共聚焦显微镜观察捕捉图像。

### 2.5 RNA 分离提取和 RT-qPCR

根据使用说明书使用 Trizol 试剂提取总 RNA。使用 NanoDrop™ One/OneC 微量 UV-Vis 分光光度计测定 RNA 浓度。根据操作说明, 使用高效 cDNA 一链合成试剂盒或 miRNA 加尾法逆转录试剂盒合成 cDNA。使用高特异性染料法定量 PCR 检测试剂盒或 miRNA 染料法定量专用预混液进行实时荧光定量 PCR 检测。

### 2.6 细胞划痕实验

GBM 细胞接种于 6 孔板, 使用 200 μL 移液器枪头划痕, PBS 轻轻洗涤细胞, 随机选择 3 个区域显微镜捕捉记录; 给予相应的处理, 培养板放入孵箱, 孵育 24 h, 随机选择 3 个区域并通过显微镜分析不同组细胞的迁移距离。

### 2.7 蛋白质免疫印迹

蛋白质免疫印迹用于 N-钙黏蛋白、E-钙黏蛋白、波形蛋白和 AJAP1 等蛋白的检测, 使用 GAPDH 或 β-actin 作为内参。将 A172 和 U251 细胞接

种于6孔板内,培养过夜,并在第2天进行相应的处理。继续孵育24 h后,使用胰酶消化收集细胞,1 000 r/min离心5 min,预冷PBS清洗,1 000 r/min,离心5 min,加入含蛋白酶抑制剂的RIPA裂解液在4 °C裂解30 min,裂解后12 000 r/min,4 °C离心20 min。蛋白质浓度通过BCA定量试剂盒检测。然后进行SDS-PAGE电泳,上样后80 V恒压电泳30 min,之后转120 V恒压电泳1.5 h,湿转恒流转膜,5%脱脂奶粉封闭2 h,PBST洗膜3次,每次10 min,4 °C孵育一抗过夜;PBST洗膜3次,每次10 min,室温孵育二抗2 h后,PBST洗膜3次,每次10 min。采用Tanon 5200图像系统采集发光图像。

## 2.8 外泌体的分离与纯化

收集M2巨噬细胞条件培养基,500 r/min离心10 min,沉淀剩余的细胞;7 000 r/min离心10 min去除培养基中的大囊泡和碎片;取上清液使用0.22 μm过滤,将滤液转移到超高速离心管中,使用超高速离心机100 000 r/min离心70 min,弃上清液,沉淀用PBS洗涤1次,100 000 r/min离心70 min。将收集的外泌体进行如下实验:(1)用RIPA缓冲液重悬以用于蛋白质印迹分析;(2)预冷外泌体重悬缓冲液重悬以用于免疫荧光检测;(3)2%戊二醛的0.1 mol/L磷酸盐缓冲液中用于透射电子显微镜观测。

## 2.9 透射电子显微镜观测

4%多聚甲醛混合固定后,外泌体滴到甲复碳包被的电子显微镜网格上。将铜网格在室温下干燥10 min。样品用2%乙酸铀酰染色并干燥10 min。然后在80 kV下观察样品。通过透射电子显微镜观察外泌体的形态。通过使用配备快速视频捕获和粒子跟踪软件的NanoSight LM20纳米颗粒分析仪系统测量布朗运动速率来分析外泌体的大小分布。

## 2.10 DiO标记的外泌体转移测定

用培养基1 mL重悬U251-RFP细胞并在37 °C下与DiO-外泌体孵育30 min。用冷PBS洗涤细胞3次,并通过共聚焦显微镜对活细胞进行荧光测量。

## 2.11 使用 Illumina HiSeq 2500 进行 RNA 测序

M2 exos 处理和未处理的 U251 细胞分别用 Trizol 混合并快速置于液氮中,杭州联川生物公司对总 RNA 中 miRNA 的数量和类别进行了检测以及 miRNA 文库构建和测序。然后在 Illumina Hiseq 2500 上对 cDNA 文库进行测序。使用相关的 Illumina 分析软件收集原始读数。

## 2.12 双萤光素酶报告基因实验

将miR-1260b模拟物阴性对照、miR-1260b模拟物分别和AJAP1-Wt荧光质粒、AJAP1-Mut荧光质粒共转染到U251细胞中,共转染48 h后,按照双萤光素酶报告基因试剂盒的说明书测定荧光强度。

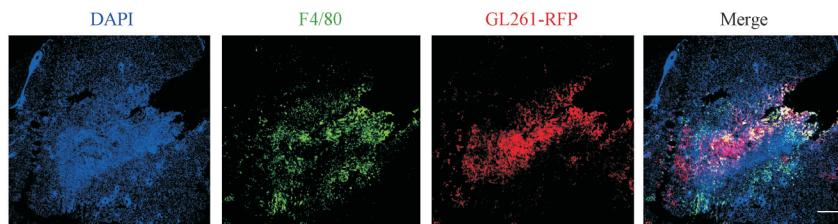
## 2.13 数据统计与分析

使用GraphPad Prism 8.0统计分析各项实验数据和作图,每组数据以均值±标准误差表示,两组独立样本之间采用t检验,多组样本间采用单因素方差分析,以P<0.05认为有统计学意义。每个实验至少重复3次。

## 3 结果

### 3.1 小鼠原位胶质母细胞瘤移植瘤模型中巨噬细胞浸润

红色荧光蛋白标记的GL261细胞原位异种移植瘤模型小鼠脑组织进行免疫荧光染色,结果显示小鼠巨噬细胞的表面标志物F4/80在GBM细胞周围表达明显(图1),表明大量巨噬细胞浸润GBM组织。



**Figure 1** Tumor-associated macrophages (TAMs) infiltrate into glioblastoma (GBM)

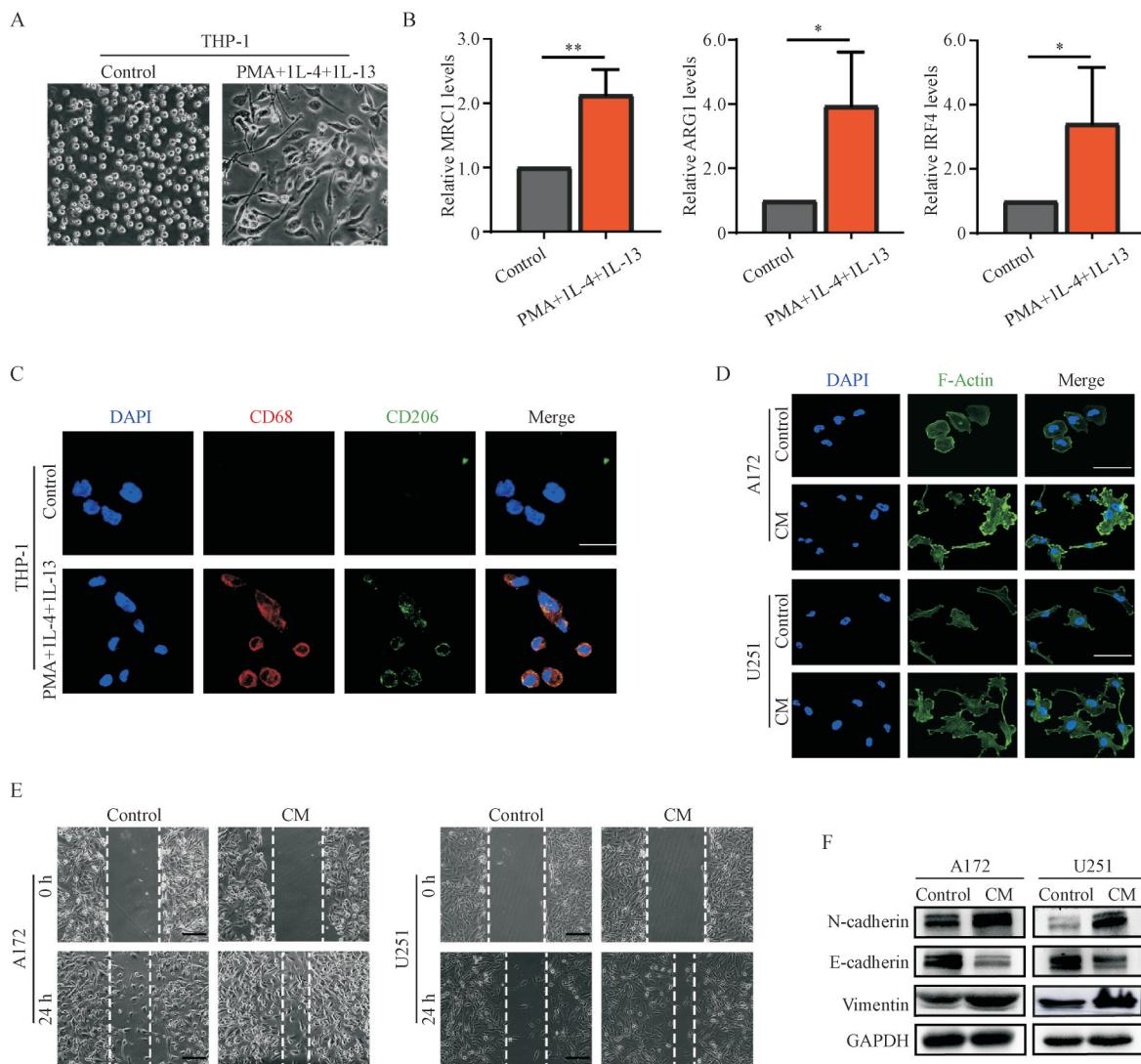
Tissue slice immunofluorescence assays for macrophages enrichment in GL261-RFP intracranial transplantation mouse model (Scale bar = 400 μm)  
RFP: Red fluorescent protein

### 3.2 M2 巨噬细胞上清液对 GBM 细胞迁移能力的影响

基于上述研究结果,建立体外巨噬细胞模型。参照参考文献<sup>[10]</sup>,使用 PMA、IL-4 和 IL-13 处理 THP-1 细胞 24 h,观察到 THP-1 细胞停止增殖并且从悬浮状态变成贴壁状态(图 2-A),检测表明 M2 巨噬细胞特异性基因 MRC1、ARG1 和 IRF4 的表达上调(图 2-B),细胞免疫荧光检测巨噬细胞标志物 CD68 和 CD206 表达增多(图 2-C),提示 PMA、IL-4 和 IL-13 有效诱导 THP-1 细胞分化为 M2 巨噬细

胞,更换正常培养基进行培养。

收集 M2 巨噬细胞上清液(conditioned medium, CM),处理 A172 和 U251 细胞,并观察主要细胞骨架蛋白 F-actin 的变化。如图 2-D 所示,与空白对照组相比,M2 巨噬细胞 CM 可以促进 A172 和 U251 细胞伪足的形成,进而促进细胞迁移。细胞划痕结果显示 M2 巨噬细胞 CM 处理后显著增强 A172 和 U251 细胞迁移能力(图 2-E)。蛋白免疫印迹结果显示,M2 巨噬细胞 CM 处理的组别中 A172 和 U251 细胞 N-钙黏蛋白和波形蛋白表达上调,而 E-钙黏



**Figure 2** M2 macrophage conditioned medium (CM) enhanced GBM cells migration

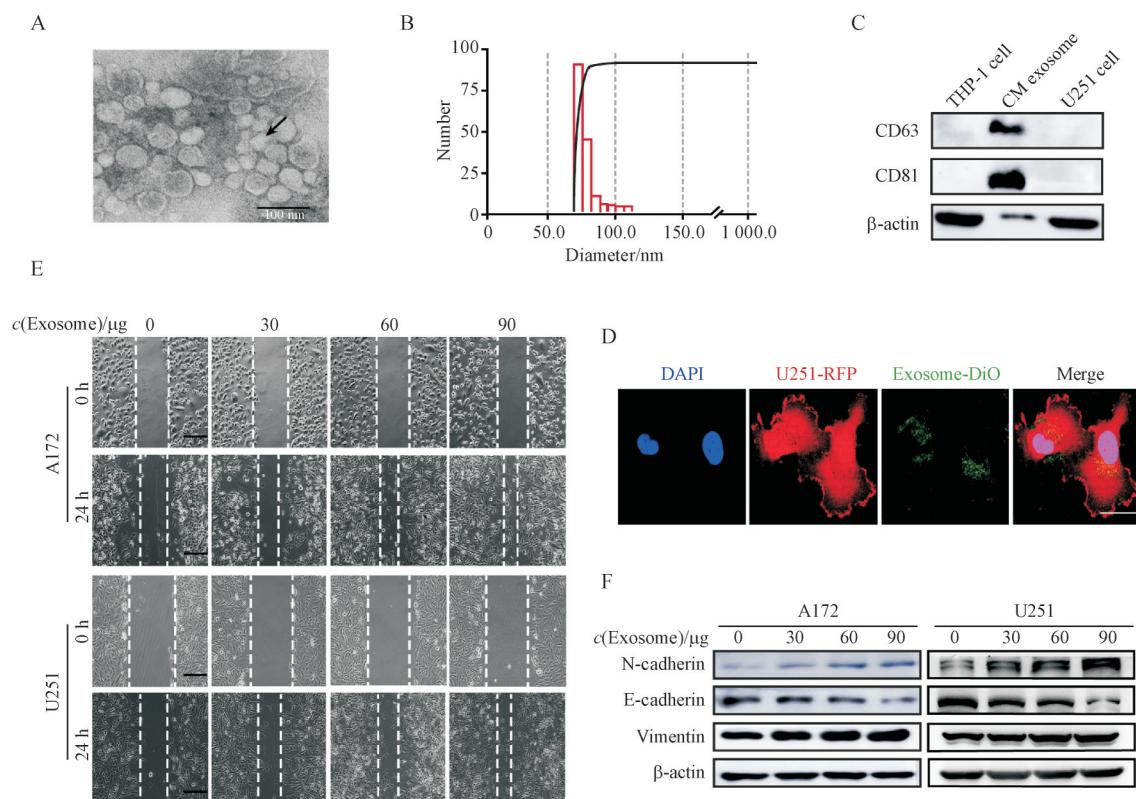
A: Morphological changes of THP-1 cells after treatment with phorbol ester (PMA), IL-4, and IL-13 ( $\times 200$ ); B: mRNA levels of MRC1, ARG1, and IRF4 in THP-1 cells after treatment with PMA, IL-4, and IL-13 by Real-time PCR assays ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ , \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ); C: Immunofluorescence assays were conducted to confirm the differentiated macrophages from THP-1 cells(Scale bar = 40  $\mu\text{m}$ ); D: F-actin was stained with phalloidin to observe mobility and morphology changes in GBM cells (Scale bar = 50  $\mu\text{m}$ ); E: Wound healing assays was used to detect the effect of M2 macrophage CM on migration (Scale bar = 1 000  $\mu\text{m}$ ); F: Western blot assays was conducted to analyze the expression of epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) markers N-cadherin, E-cadherin and vimentin in GBM cells after treatment with M2 macrophage CM

蛋白表达下调(图2-F),说明M2巨噬细胞CM可以促进GBM细胞的迁移。

### 3.3 M2巨噬细胞来源的外泌体对GBM细胞的迁移能力的影响

外泌体作为细胞间通讯的介质之一,在肿瘤细胞转移过程中起一定作用<sup>[11]</sup>。因此,从M2巨噬细胞的CM中分离外泌体,透射电镜观察到其形态为双层膜的圆形颗粒,平均粒径为75.8 nm,且蛋白质免疫印迹显示外泌体标志物CD63和CD81表达增加(图3-A~图3-C),提示成功分离M2巨噬细

胞CM中M2 exos。使用亲脂性膜染料DiO作为荧光探针标记外泌体,再用该外泌体处理U251细胞,观察到DiO标记的外泌体可以被U251细胞摄取(图3-D)。随后,细胞划痕实验结果显示,与空白对照组相比,M2 exos处理组的GBM细胞迁移能力呈现剂量依赖性的增强(图3-E),同时蛋白质免疫印迹结果显示N-钙黏蛋白和波形蛋白表达上调,而E-钙黏蛋白表达下调(图3-F)。以上结果提示M2 exos增强GBM细胞的迁移能力。



**Figure 3** M2 exos enhanced GBM cells migration

A: Transmission electron microscopy was used to identify the morphology of M2 exos (Black arrow head points at exosomes, Scale bar = 100 nm); B: Laser particle size analyzer for detecting exosome particle size; C: Exosomes markers CD63 and CD81 proteins were detected by Western blot assays in M2 exos; D: Fluorescence imaging was conducted to detect the internalization of exosomes by U251-RFP cells (Scale bar = 20 μm); E: Effects of M2 exos with different concentrations on migration of GBM cells by wound healing assays (Scale bar = 1 000 μm); F: Effects of M2 exos with different concentrations on expression of EMT markers N-cadherin, E-cadherin, and vimentin in GBM cells by Western blot assays

### 3.4 M2 exos中的miR-1260b对GBM细胞迁移能力的影响

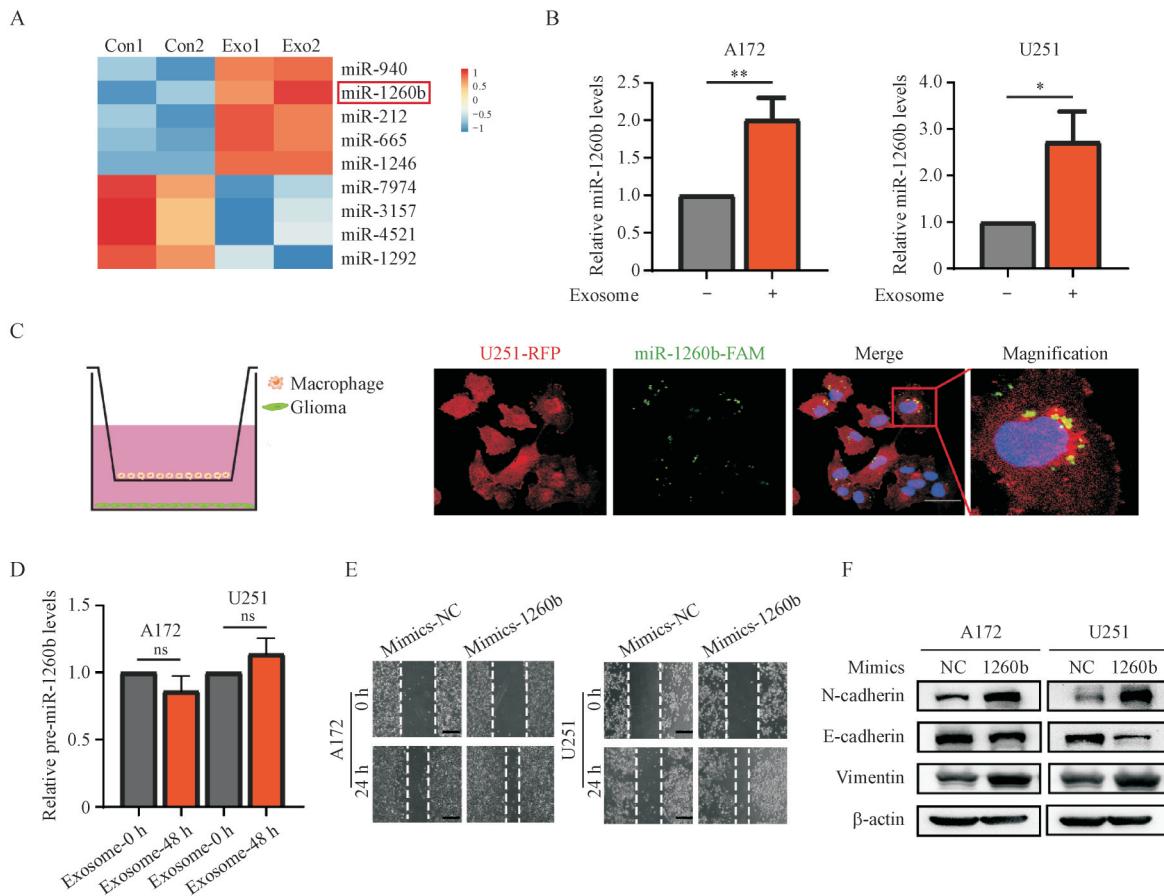
大量研究显示,外泌体中携带的miRNAs在肿瘤的侵袭转移过程中发挥重要作用<sup>[12]</sup>。RNA测序筛选检测在U251细胞和M2 exos处理的U251细胞中差异表达的miRNA(图4-A),其中miR-1260b表达显著增加。图4-B中,RT-qPCR证实M2 exos处

理的A172和U251细胞中miR-1260b表达显著增加。为了证实细胞中miR-1260b的表达增加是由于M2巨噬细胞的转运,本研究应用细胞共培养模型,如图4-C所示,使用带有FAM标签的miR-1260b转染的巨噬细胞与U251-RFP细胞共培养48 h后,免疫荧光实验观察到miR-1260b被U251细胞摄取。同时,RT-qPCR检测miR-1260b前体

(pre-miR-1260b) 的表达, 发现在 A172 和 U251 细胞中, pre-miR-1260b 的表达均无显著增加(图 4-D)。这表明 miR-1260b 在 GBM 细胞中的表达增加是外泌体直接转运的结果, 而不是由 GBM 细胞自身产生。

分别使用 miR-1260b 模拟物阴性对照和 miR-1260b 模拟物转染 GBM 细胞, 细胞划痕实验显示

miR-1260 模拟物可促进 A172 和 U251 细胞的迁移(图 4-E)。同时, 蛋白质免疫印迹结果显示 miR-1260b 模拟物处理的脑胶质细胞中 N-钙黏蛋白和波形蛋白表达上调, 而 E-钙黏蛋白表达下调(图 4-F)。综上可知, M2 exos 转运的 miR-1260b 有助于 GBM 细胞的迁移。



**Figure 4** MiR-1260b in M2 exosomes contributed to GBM cell migration

A: Hierarchical clustering analysis of differentially expressing miRNAs in U251 cells (Con1 and Con2) and M2 exosomes treated U251 cells (Exo1 and Exo2) by microRNA microarray; B: Relative expression of miR-1260b in A172 and U251 cells by Real-time PCR assays ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ , U6 was used as internal control); C: Transwell co-culture of M2 Macrophage /miR-1260b-FAM cells(Laser scanning confocal microscope was used to harvest U251-RFP cells and observe images, Scale bar = 20  $\mu\text{m}$ ); D: Relative expression of pre-miR-1260b in A172 and U251 treated with M2 exosomes by Real-time PCR assays ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ ); E: Effect of miR-1260b mimics on the migration of GBM cells by wound healing assays (Scale bar = 500  $\mu\text{m}$ ); F: Effects of miR-1260b mimics on expression of EMT markers N-cadherin, E-cadherin, and vimentin in GBM cells by Western blot assays

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , ns: not significant

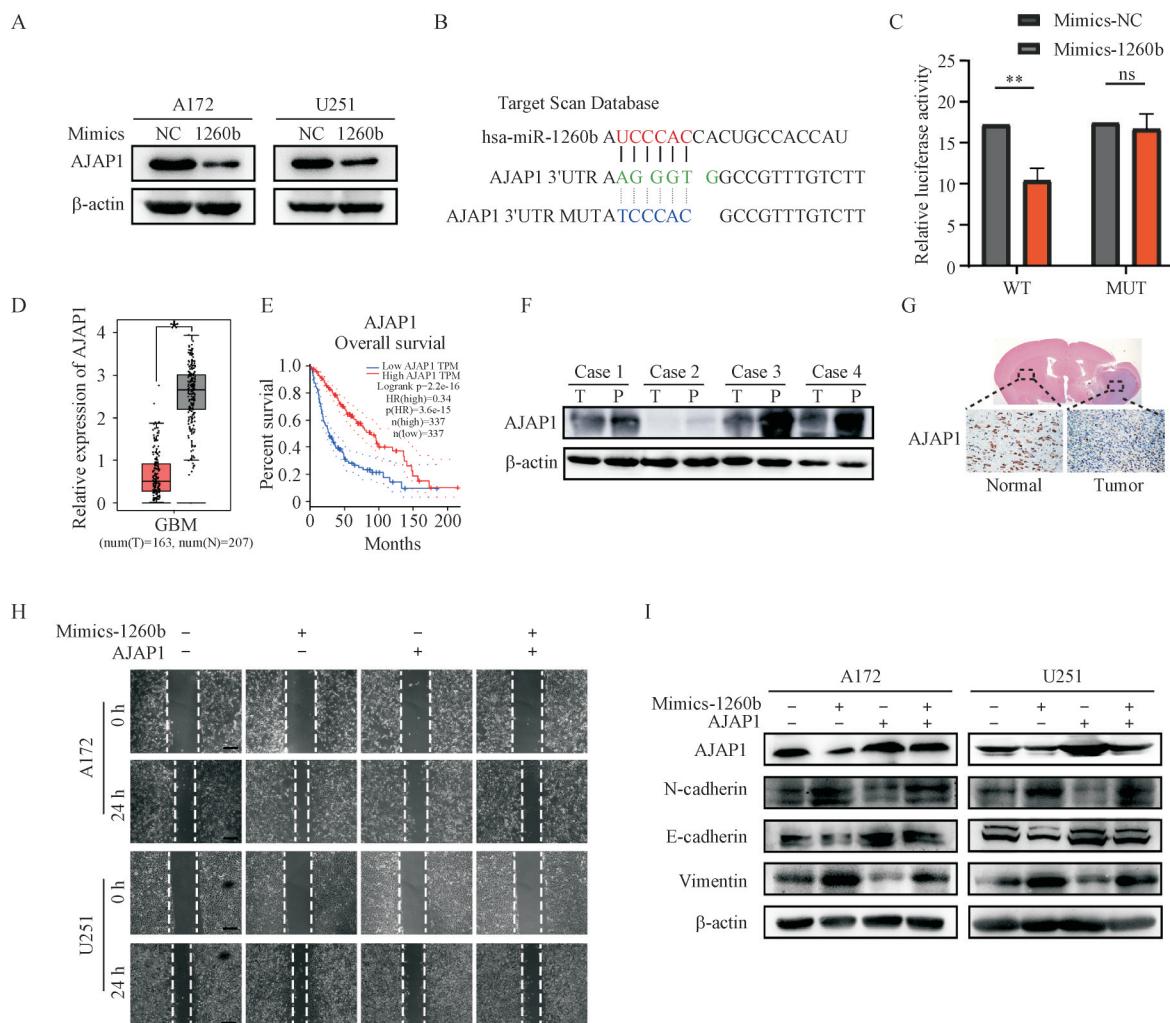
### 3.5 miR-1260b 通过调控靶基因 AJAP1 的表达影响 GBM 细胞的迁移能力

在 GBM 中, AJAP1 是一种肿瘤抑制基因<sup>[13-14]</sup>, 并且可能是 miR-1260b 下游的靶基因之一。本实验中, 使用 miR-1260b 模拟物处理 A172 和 U251 细胞后, 可以观察到 AJAP1 的表达显著降低(图 5-

A)。为了验证 miR-1260b 与 AJAP1 的靶向结合关系, 使用数据库 TargetScan 预测 miR-1260b 与 AJAP1 的 3'UTR 的结合位点(图 5-B)。根据结合位点序列, 设计并扩增相应的野生型(wild type, WT) 和突变型(mutant type, MUT) 序列, 克隆到 PGL3 萍光素酶报告载体中, 进行双萤光素酶报告基因实

验,结果如图5-C所示,WT组的相对萤光素酶活性在与miR-1260b模拟物共转染时显著降低,而MUT组不受miR-1260b模拟物的影响,说明miR-1260b与AJAP1在其3'UTR的486~493位置结合。此外,生物信息学分析表明,AJAP1在GBM组织中的表达比正常脑组织低(图5-D),且AJAP1高表达的患者比低表达患者生存期更长(图5-E)。本研究应用临床脑胶质瘤手术样本进行检测如图5-F所示,在肿瘤组织中AJAP1表达低于癌旁组织。同

样,在小鼠脑组织切片中,与正常组织相比,AJAP1在肿瘤组织中的表达也明显降低(图5-G)。将miR-1260b与AJAP1共同转染到A127和U251细胞后进行细胞划痕实验,结果表明AJAP1的过表达部分逆转了由miR-1260b引起的GBM细胞迁移(图5-H)。此外,图5-I表明,miR-1260b过表达的A172和U251细胞中,AJAP1和E-钙黏蛋白的表达降低,N-钙黏蛋白和波形蛋白的表达增高。然而,过表达AJAP1后,明显逆转了这种趋势。以上数



**Figure 5** miR-1260b directly targets AJAP1 mRNA in 3'UTR

A: Expression of AJAP1 in A172 and U251 cells transfected with mimics-NC and mimics-1260b by Western blot assays; B: Sequences of miR-1260b and the potential miR-1260b-binding sites at the 3'UTR of AJAP1. Also shown are nucleotides mutated in AJAP1-3'UTR mutant. Seed sequences are marked; C: Dual-Luciferase reporter assays were used to assess GBM cells transfected with luciferase vectors carrying WT or MUT 3'-UTR of AJAP1 in 293T cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ ); D, E: Expression of AJAP1 and overall survival of GBM in GEPIA (Gene Expression Profiling Interactive Analysis) database; F: Expression of AJAP1 in tumor site (T) and para-tumor site (P) of patient samples; G: IHC detection of AJAP1 expression in mouse situ vaccination model (Scale bar = 500  $\mu$ m); H: Effect of mimics-1260b and AJAP1 on migration of A172 and U251 cells by wound healing assays (Scale bar = 1000  $\mu$ m); I: Expression of AJAP1 and EMT markers N-cadherin, E-cadherin and vimentin in A172 and U251 cells transfected with mimics-NC/AJAP1-NC, mimics-1260b/AJAP1-NC, mimics-NC/AJAP1 and mimics-1260b/AJAP1 by Western blot assays

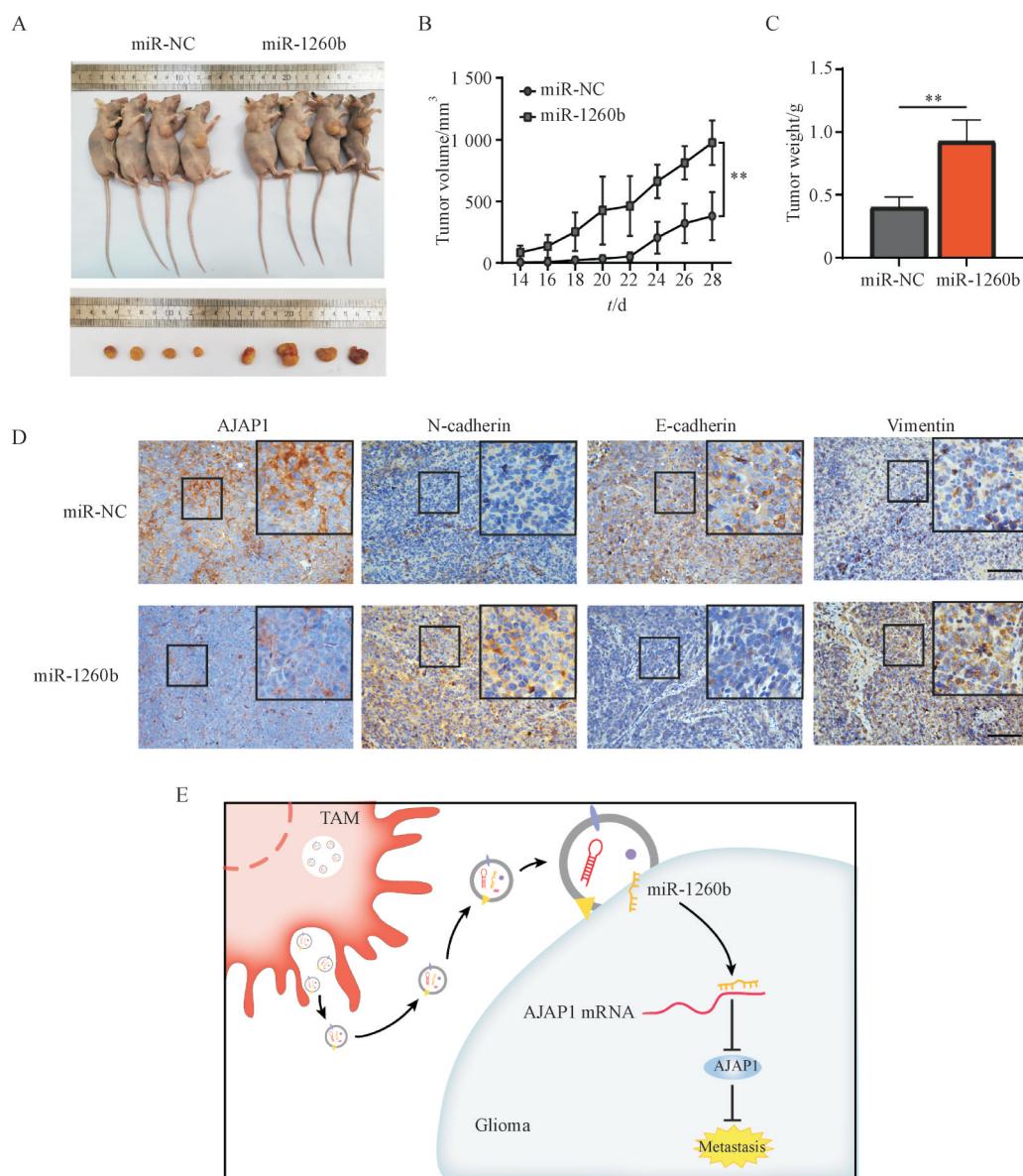
\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , ns: not significant

据表明, miR-1260b 促进脑胶质瘤细胞的迁移能力部分是通过抑制 AJAP1 来实现的。

### 3.6 体内异种移植肿瘤模型中 miR-1260b 对 GBM 的影响

为了研究 miR-1260b 在体内的作用, 本研究通过慢病毒转染构建稳定过表达 miR-1260b 的 U251 细胞株, 然后将 U251-miR-NC/miR-1260b 细胞皮下注射接种到裸鼠的腋下, 建立皮下异种移植瘤模型, 接种两周后开始测量裸鼠肿瘤体积变化, 如图

6-A 和图 6-B 所示, 与 U251-miR-NC 组相比, U251-miR-1260b 组的肿瘤增长速度明显增快。图 6-C 中 U251-miR-1260b 组的肿瘤重量明显高于 U251-miR-NC 组。取肿瘤组织做 IHC, 结果证明, 与 miR-260b-NC 组相比, miR-1260b 过表达组的 AJAP1、E-钙黏蛋白表达量较低, 而 N-钙黏蛋白和波形蛋白表达量较高(图 6-D), 这与体外实验结果一致。这些结果表明, miR-1260b 在体内促进了 GBM 的增殖和迁移。



**Figure 6** miR-1260b regulated GBM tumorigenic and migration process *in vivo*

A: Xenograft tumor model were established in BALB/c nude mice after injection with U251 LV-miR-NC/miR-1260b ( $n = 4$ ); B, C: Growth curves of xenograft tumors volume and tumor weights (\*\* $P < 0.01$ ); D: Expression of AJAP1 and EMT markers N-cadherin, E-cadherin, and vimentin in xenograft tumor tissues detected by IHC (Scale bar = 100 μm); E: GBM cells uptake M2 exosomes, leading to an increase of miR-1260b, showing increased migration of GBM cells. Mechanically, miR-1260b suppressing AJAP1 expression by directly binding to its 3'UTR

## 4 讨 论

肿瘤微环境在肿瘤发展中起着重要作用。肿瘤细胞和细胞外基质,如巨噬细胞和免疫细胞等相互沟通,影响肿瘤的进展和迁移<sup>[15]</sup>,然而,肿瘤转移的机制仍有待探索。越来越多的证据表明,巨噬细胞通过在肿瘤微环境中产生大量的炎症介质进而促进恶性肿瘤的发生和发展<sup>[16]</sup>。已知巨噬细胞可以极化为M1或M2巨噬细胞,PMA、IL-4和IL-13是使巨噬细胞M2极化的刺激因子,且TAMs被认为更接近于M2极化状态的巨噬细胞<sup>[17]</sup>。基于此,本研究诱导THP-1细胞极化为M2巨噬细胞,且发现M2巨噬细胞的CM可以增强GBM细胞的迁移能力。

外泌体是一类细胞外囊泡,是肿瘤微环境的关键组成部分<sup>[18]</sup>。研究表明,外泌体可以介导肿瘤细胞和基质细胞之间的交流<sup>[19]</sup>。然而,来自M2巨噬细胞的外泌体在GBM中的功能还没有被阐明。在本研究中,本研究用超高速离心法从M2巨噬细胞CM中分离出外泌体,并证明了来自M2巨噬细胞的外泌体可以促进GBM细胞的迁移。随后,在GBM细胞中探究来自M2巨噬细胞的外泌体的作用。

miRNAs是一类18~22个核苷酸的非编码RNA分子。许多研究表明,miRNAs可以作为GBM诊断的生物标志物<sup>[20-21]</sup>。MiR-144通过抑制CAV2和FGF7,增强GBM细胞对替莫唑胺的敏感性<sup>[22]</sup>。来自血清外泌体的miR-210的表达水平可作为GBM的诊断、预后和缺氧生物标志物<sup>[23]</sup>。此外,miR-29a<sup>[24]</sup>、miR-193a-3p<sup>[25]</sup>和miR-720<sup>[26]</sup>在GBM中具有促进肿瘤进展的作用。越来越多的证据表明,miR-1260b作为一种致癌基因发挥作用<sup>[27]</sup>。在肺癌中,miR-1260b与SOCS6的3'UTR直接结合,促进肺癌细胞增殖,抑制肺癌细胞的凋亡<sup>[28]</sup>。在缺氧条件下,miR-1260b通过靶向GDF11促进血管平滑肌细胞的异常增殖<sup>[29]</sup>。除此之外,miR-1260b在肺腺癌<sup>[30]</sup>、肾癌<sup>[31]</sup>和肝细胞癌<sup>[32]</sup>中起到促进肿瘤发展的作用。然而,miR-1260b在GBM中的功能仍是未知的。本研究发现M2 exos能够转运miR-1260b并促进GBM细胞的EMT过程。本研究通过RNA测序筛选,以检测U251细胞和经M2 exos处理的U251细胞中差异表达的miRNAs。在

U251细胞被M2 exos处理后,miR-940、miR-1260b、miR-212、miR-665和miR-1246表达增加。其中,miR-1260b的增加最为显著,且与临床预后有关。同时,通过多种功能实验,发现在GBM中,无论体内还是体外miR-1260b均呈进肿瘤进展,这表明miR-1260b可能是GBM的一个候选治疗目标。

AJAP1是许多癌症的肿瘤抑制因子<sup>[33]</sup>。越来越多的证据表明AJAP1可以介导细胞黏附和细胞连接<sup>[34]</sup>。AJAP1可以通过重组F-actin来改变细胞骨架,防止丝状体向前延伸<sup>[35]</sup>。研究表明,EGFR通过EZH2依赖的PI3K/AKT途径下调AJAP1,而AJAP1的缺失促进GBM细胞的侵袭<sup>[14]</sup>。有趣的是,人们越来越关注miRNAs转录后调节AJAP1的表达,包括miR-196a和miR-552<sup>[36-37]</sup>。在本研究中,发现miR-1260b可以通过与AJAP1的3'UTR结合来下调其表达,表明,miR-1260b/AJAP1轴可能是GBM分子发病机制的一个关键调节机制。

综上所述,本研究通过小鼠原位移植瘤模型发现巨噬细胞浸润GBM组织,进行体外实验证明肿瘤相关巨噬细胞能够增强GBM细胞的迁移能力,其机制是M2巨噬细胞分泌的外泌体转运miR-1260b进而下调AJAP1的表达来实现促进GBM细胞的迁移。本研究首次揭示了肿瘤微环境中肿瘤相关巨噬细胞分泌外泌体转运miR-1260b影响GBM的迁移,但巨噬细胞分泌的外泌体所转运的其他生物分子是否有协同作用仍需进一步验证。

## Reference

- [1] Shergalis A, Bankhead A 3rd, Luesakul U, et al. Current challenges and opportunities in treating glioblastoma [J]. *Pharmacol Rev*, 2018, **70**(3):412-445.
- [2] Horibe S, Tanahashi T, Kawauchi S, et al. Mechanism of recipient cell-dependent differences in exosome uptake [J]. *BMC Cancer*, 2018, **18**(1):47.
- [3] Xiong Y, Chen L, Yan CC, et al. M2 Macrophagy-derived exosomal miRNA-5106 induces bone mesenchymal stem cells towards osteoblastic fate by targeting salt-inducible kinase 2 and 3[J]. *J Nanobiotechnology*, 2020, **18**(1):66.
- [4] Chanmee T, Ontong P, Konno K, et al. Tumor-associated macrophages as major players in the tumor microenvironment [J]. *Cancers*, 2014, **6**(3):1670-1690.
- [5] Ghaemmaghami AB, Mahjoubin-Tehran M, Movahedpour A, et al. Role of exosomes in malignant glioma: microRNAs and

- proteins in pathogenesis and diagnosis [J]. *Cell Commun Signal*, 2020, **18**(1):120.
- [6] Chen X, Yang F, Zhang TZ, et al. MiR-9 promotes tumorigenesis and angiogenesis and is activated by MYC and OCT4 in human glioma[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, **38**(1):99.
- [7] Wang J, Shu HZ, Guo SG. MiR-646 suppresses proliferation and metastasis of non-small cell lung cancer by repressing FGF<sub>2</sub> and CCND2[J]. *Cancer Med*, 2020, **9**(12):4360-4370.
- [8] Rupaimoole R, Slack FJ. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2017, **16**(3):203-222.
- [9] Yang Y, Nagai S, Kang SW, et al. Tolerogenic properties of CD206<sup>+</sup> macrophages appeared in the sublingual mucosa after repeated antigen-painting [J]. *Int Immunol*, 2020, **32**(8):509-518.
- [10] Lv J, Chen FK, Liu C, et al. Zoledronic acid inhibits thyroid cancer stemness and metastasis by repressing M2-like tumor-associated macrophages induced Wnt/β-catenin pathway [J]. *Life Sci*, 2020, **256**:117925.
- [11] Cai J, Gong LQ, Li GD, et al. Exosomes in ovarian cancer ascites promote epithelial-mesenchymal transition of ovarian cancer cells by delivery of miR-6780b-5p[J]. *Cell Death Dis*, 2021, **12**(2):210.
- [12] Shen SJ, Song Y, Zhao B, et al. Cancer-derived exosomal miR-7641 promotes breast cancer progression and metastasis [J]. *Cell Commun Signal*, 2021, **19**(1):20.
- [13] Di CH, MLadkova N, Lin J, et al. AJAP1 expression modulates glioma cell motility and correlates with tumor growth and survival[J]. *Int J Oncol*, 2018, **52**(1):47-54.
- [14] Yang C, Li YS, Wang QX, et al. EGFR/EGFRvIII remodels the cytoskeleton via epigenetic silencing of AJAP1 in glioma cells [J]. *Cancer Lett*, 2017, **403**:119-127.
- [15] Cheng HS, Lee JXT, Wahli W, et al. Exploiting vulnerabilities of cancer by targeting nuclear receptors of stromal cells in tumor microenvironment[J]. *Mol Cancer*, 2019, **18**(1):51.
- [16] Farajzadeh Valilou S, Keshavarz-Fathi M, Silvestris N, et al. The role of inflammatory cytokines and tumor associated macrophages (TAMs) in microenvironment of pancreatic cancer [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2018, **39**:46-61.
- [17] Genin M, Clement F, Fattaccioli A, et al. M1 and M2 macrophages derived from THP-1 cells differentially modulate the response of cancer cells to etoposide [J]. *BMC Cancer*, 2015, **15**:577.
- [18] He CS, Li L, Wang LL, et al. Exosome-mediated cellular cross-talk within the tumor microenvironment upon irradiation [J]. *Cancer Biol Med*, 2021, **18**(1):21-33.
- [19] Naseri Z, Oskuee RK, Jaafari MR, et al. Exosome-mediated delivery of functionally active miRNA-142-3p inhibitor reduces tumorigenicity of breast cancer *in vitro* and *in vivo* [J]. *Int J Nanomedicine*, 2018, **13**:7727-7747.
- [20] Wu JH, Zhou ZC. MicroRNA-432 acts as a prognostic biomarker and an inhibitor of cell proliferation, migration, and invasion in breast cancer[J]. *Clin Breast Cancer*, 2021, **21**(4):e462-e470.
- [21] Huang JH, Liu HZ, Zhao Y, et al. MicroRNAs expression patterns predict tumor mutational burden in colorectal cancer[J]. *Front Oncol*, 2021, **10**:550986.
- [22] Liu ZQ, Ren JJ, Zhao JL, et al. MicroRNA-144 represses gliomas progression and elevates susceptibility to Temozolomide by targeting CAV2 and FGF<sub>7</sub>[J]. *Sci Rep*, 2020, **10**(1):4155.
- [23] Lan FM, Yue X, Xia TY. Exosomal microRNA-210 is a potentially non-invasive biomarker for the diagnosis and prognosis of glioma[J]. *Oncol Lett*, 2020, **19**(3):1967-1974.
- [24] Chen QD, Wang WF, Chen SY, et al. MiR-29a sensitizes the response of glioma cells to temozolomide by modulating the P53/MDM2 feedback loop[J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2021, **26**(1):21.
- [25] Zhou DD, Li HL, Liu W, et al. MiR-193a-3p promotes the invasion, migration, and mesenchymal transition in glioma through regulating BTRE[J]. *Biomed Res Int*, 2021, **2021**:8928509.
- [26] Liu YL, Jiang K, Zhi TL, et al. MiR-720 is a key regulator of glioma migration and invasion by controlling TARSL2 expression [J]. *Hum Cell*, 2021, **34**(5):1504-1516.
- [27] Xu L, Xu X, Huang H, et al. MiR-1260b promotes the migration and invasion in non-small cell lung cancer via targeting PTPRK [J]. *Pathol Res Pract*, 2018, **214**(5):776-783.
- [28] Xia Y, Wei K, Yang FM, et al. MiR-1260b, mediated by YY1, activates KIT signaling by targeting SOCS<sub>6</sub> to regulate cell proliferation and apoptosis in NSCLC[J]. *Cell Death Dis*, 2019, **10**(2):112.
- [29] Seong M, Kang H. Hypoxia-induced miR-1260b regulates vascular smooth muscle cell proliferation by targeting GDF<sub>11</sub>[J]. *BMB Rep*, 2020, **53**(4):206-211.
- [30] Xia Y, Wei K, Hu LQ, et al. Exosome-mediated transfer of miR-1260b promotes cell invasion through Wnt/β-catenin signaling pathway in lung adenocarcinoma[J]. *J Cell Physiol*, 2020, **235**(10):6843-6853.
- [31] Hirata H, Hinoda Y, Shahryari V, et al. Genistein downregulates onco-miR-1260b and upregulates sFRP1 and Smad4 via demethylation and histone modification in prostate cancer cells [J]. *Br J Cancer*, 2014, **110**(6):1645-1654.
- [32] Li XY, Song HX, Liu ZR, et al. MiR-1260b promotes cell migration and invasion of hepatocellular carcinoma by targeting the regulator of G-protein signaling 22[J]. *Biotechnol Lett*, 2018, **40**(1):57-62.
- [33] Han L, Zhang KL, Zhang JX, et al. AJAP1 is dysregulated at an early stage of gliomagenesis and suppresses invasion through cytoskeleton reorganization [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2014, **20**(5):429-437.
- [34] Yan YL, Huang ZN, Zhu Z, et al. Downregulation of TET1 promotes bladder cancer cell proliferation and invasion by reducing DNA hydroxymethylation of AJAP1[J]. *Front Oncol*, 2020,

- 10:667.
- [35] Hötte K, Smyrek I, Starzinski-Powitz A, et al. Endogenous AJ-AP1 associates with the cytoskeleton and attenuates angiogenesis in endothelial cells[J]. *Biol Open*, 2017, **6**(6):723-731.
- [36] Takkar S, Sharma V, Ghosh S, et al. Hypoxia-inducible miR-196a modulates glioblastoma cell proliferation and migration through complex regulation of NRAS[J]. *Cell Oncol*, 2021, **44**(2):433-451.
- [37] Qu WQ, Wen XY, Su KL, et al. MiR-552 promotes the proliferation, migration and EMT of hepatocellular carcinoma cells by inhibiting AJAP1 expression[J]. *J Cell Mol Med*, 2019, **23**(2):1541-1552.

## ·本刊讯·

### 《中国药科大学学报》首届青年编委会招募

为进一步推进《中国药科大学学报》高质量发展、提升期刊影响力、构建良好的学术氛围,经研究决定,拟面向国内外公开招募《中国药科大学学报》青年编委,旨在适应《中国药科大学学报》发展新需求,发挥药学青年科技工作者的学术力量,促进青年科技工作者交流与互动,并为本刊编委会储备后备力量。相关药学领域的专家学者可以本人自荐或单位推荐方式申请。

#### 青年编委招募条件

1. 年龄原则上不超过45周岁;
2. 获得博士学位并具有副高以上职称;
3. 从事医药研发青年学者;
4. 以第一负责人承担过省级以上科研项目;
5. 在国内外同行评议期刊发表论文10篇以上;
6. 具有同行评议经验,具有为国际医药期刊审稿的经历。
7. 以第一负责人主持过国家级科研项目、取得重大研究成果等的青年学者优先考虑。

#### 青年编委职责

包含但不限于:

1. 推荐和组稿约稿所研究药学领域的高质量稿件,为期刊发展和推广献计献策;
2. 每两年至少投稿一篇以第一作者或通信作者著作的论文;
3. 积极推荐选题,承担期刊专栏/专辑/专刊的组稿工作;
4. 根据青年编委的研究领域,积极承担论文同行评议工作;
5. 参加国内外学术会议或其他学术活动时积极宣传和推介本刊;
6. 积极参加本刊青年编委会会议,或与本刊共同主办或协办相关学术会议。

#### 青年编委任期和评估

1. 任期:每期任期2年。每年根据年度任务完成情况进行考核。
2. 评估:每期任期初制定工作计划,每年需参与以上工作的至少3项任务,并于每期任期结束前提交所负责工作的业绩材料,组织专家进行评估,优异者继续连任。

#### 青年编委权利

1. 获得《中国药科大学学报》编辑部颁发的青年编委聘书;
2. 青年编委本人或推荐的论文绿色通道审稿,通过审稿后可优先发表;
3. 受邀参加本刊主办或承办的编委会和各类学术活动;
4. 青年编委的学术成果、个人业绩、团队介绍、人才招募等可在本刊官网或微信公众号进行发布宣传;
5. 对杂志有突出贡献的青年编委,由编辑部向编委会提出申请,经主编审批,推荐担任编委。

#### 青年编委报名方式

1. 点击下载“《中国药科大学学报》青年编委申请表”,填写完成后发送至xuebao@cpu.edu.cn,邮件主题为“《中国药科大学学报》青年编委申请+姓名”;
2. 报名截止时间:2023年4月30日;
3. 青年编委的入选流程:申请表审查→《中国药科大学学报》编委会遴选→主编办公会讨论→公示→确认聘请。

(本刊编辑部)